

顶空固相微萃取-气质联用法测定四磨汤口服液挥发性成分

罗飞亚¹，唐其^{1,2,3*}，陈淼芬⁴，程辟^{2,3}，周祎聪²，曹登天²，曾建国^{1,2,3}，杨华⁵，
郑亚杰^{2,3*}

(1. 湖南农业大学中兽药湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128; 2. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128; 3. 湖南农业大学兽用中药资源与中兽药创制国家地方联合工程研究中心, 湖南长沙 410128;
4. 湖南农业大学分析测试中心, 湖南长沙 410128; 5. 湖南汉森制药股份有限公司, 湖南益阳 413000)

摘要: 目的 采用顶空固相微萃取-气质联用 HS-SPME-GC-MS 法测定四磨汤口服液挥发性成分。方法 通过 HS-SPME-GC-MS 检测四磨汤口服液及单味药材中挥发性成分; NIST 14 谱库检索结合文献对其挥发性成分进行鉴定以及成分比较。结果 从中鉴定了 13 种挥发性成分, 它们的峰面积和占总峰面积的 91.62%。其中芳樟醇、 α -松油醇、 (Z, Z, Z) -9, 12, 15-十八碳三烯-1-醇和百里香酚等存在单味药材中, 反式芳樟醇氧化物(呋喃)、(-)香芹酮和顺式香叶醇是枳壳药材中特有的挥发性成分。结论 该方法灵敏度高, 能实现复杂中药体系的挥发性成分分析, 为完善和提升中药复方制剂质控体系提供参考。

关键词: 四磨汤口服液; 挥发油; 顶空固相微萃取-气质联用; 质量标准

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)02-0353-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.022

Determination of volatile components in Simotang Oral Solution by HS-SPME

LUO Fei-ya¹, TANG Qi^{1,2,3*}, CHEN Miao-fen⁴, CHENG Pi^{2,3}, ZHOU Yi-cong², CAO Deng-tian², ZENG Jian-guo^{1,2,3}, YANG Hua⁵, ZHENG Ya-jie^{2,3*}

(1. Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. National and Local Union Engineering Research Center for the Veterinary Herbal Medicine Resources and Initiative, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4. Center of Analytic Service, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 5. Hunan Hansen Pharmaceutical Co., Ltd, Yiyang 413000, China)

KEY WORDS: Simotang Oral Solution; volatile oil; HS-SPME; quality standard

四磨汤最早记载于《重订严氏济生方》，由木香、槟榔、枳壳、乌药 4 味药组成。挥发油是该中药制剂发挥药效作用的重要药效物质基础之一。在改善胃肠功能低下和促进胃肠动力方面发挥较好的作用^[1-4]，临幊上用于婴幼儿消化不良、老年人腹部胀气等症状^[5-7]，在术后胃肠功能的恢复方面疗效显著^[8-10]。马丽等^[11]实验室模拟四磨汤口服液

生产工艺，采用水蒸气蒸馏法获得挥发油，并对挥发油成分进行 GC-MS 检测，但模拟并不能完全真实反映该制剂在大生产中挥发性成分的实际情况。刘令安等^[12]对大量四磨汤口服液进行挥发油提取，并利用 GC-MS 对其进行分析，但是该方法样品消耗量大、耗时长。四磨汤口服液现行的质量标准并未列入挥发油的相关检测项目，尚不能对该制剂进

收稿日期: 2018-06-07

基金项目: 湖南省科技计划项目(2015SK1001, 2014SK2005); 工信部中药材扶持项目(大宗中药材枳壳跨省规范化种植及加工建设项目)

作者简介: 罗飞亚(1994—), 男, 硕士生, 研究方向为功能性植物提取物与中兽药创制。Tel: 18390924012, E-mail: soledadluo@qq.com

*通信作者: 唐其(1981—), 男, 副教授, 研究方向为中药资源与开发。Tel: (0731) 84673824, E-mail: tangqi@hunau.edu.cn
郑亚杰(1978—), 女, 高级工程师, 研究方向为中药资源与品质评价。Tel: (0731) 84673824, E-mail: zhengyj4@126.com

行全面有效的质量控制。这种情况也存在于2015版《中国药典》收录的多个中药复方制剂,如丹红化瘀口服液、柴胡口服液等^[13]。因此开展中药复方制剂中挥发成分的检测,将极大地促进中药制剂质量控制体系的全面提升。

顶空固相微萃取(HS-SPME)作为一种新兴的挥发性成分萃取和分离技术,利用膜吸附技术实现对气相中挥发性成分的直接吸附,完全不需要任何萃取溶剂,并能够最大程度地减少样品使用量,节约样品^[14-15]。该技术与GC-MS联用,能够充分利用GC-MS在挥发性成分定性分析研究中的高效、灵敏和快速结构解析的特点,同时结合NIST化合物谱库检索,实现复杂样品体系中微量挥发性成分的发现及其结构解析。目前该方法已用于川芎、迎春、石韦等植物的挥发性成分的分析检测^[16-18],但在中药复方制剂挥发性成分分析中的应用尚不多见。

本研究采用HS-SPME-GC-MS方法开展四磨汤口服液中挥发性成分的分析检测及其药味来源的溯源,以期为促进四磨汤口服液的全面质量研究和提升其质量控制水平提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 GCMS-QP2010型气相色谱-质谱联用仪、GC/MS solution色谱工作站和NIST. 14质谱数据库(日本岛津公司);固相微萃取装置、固相微萃取手动进样手柄、萃取纤维头(灰色、粉色、白色、蓝色)、顶空样品瓶(CNW)(上海安谱实验科技股份有限公司);YB-1500A型粉碎机(永康市速锋工贸有限公司);PL203电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Milli-Q Advantage A10超纯水制备系统(美国MILLPORE公司)。

1.2 药品与试剂 四磨汤口服液(批号1709219,10mL/支),木香、槟榔、乌药和枳壳药材,经湖南汉森制药股份有限公司刘爱华高级工程师鉴定为四磨汤口服液生产投料的药材饮片,均由湖南汉森制药股份有限公司提供,且经质量检验符合2015年版《中国药典》(一部)收录标准。水为实验室用Milli-Q超纯水系统自制。

2 方法

2.1 固相微萃取样品前处理 取木香、槟榔、乌药和枳壳等各单味药材饮片适量,粉碎后过30目筛,避光阴凉处密封保存。称取粉碎后的各单味药材粉末各约7mg于10mL顶空样品瓶中,均匀分

布在瓶底,然后加200μL超纯水,放入搅拌子,拧紧瓶盖,备用。

四磨汤口服液轻摇混匀,去除铝盖,吸取口服液0.2mL于顶空样品瓶中,放入搅拌子,拧紧瓶盖,备用。

2.2 萃取纤维头老化 萃取纤维头在第1次使用或间隔较长时间使用时需要进行老化。将萃取纤维头装入萃取进样手柄,然后插入气相色谱仪的气化室,设定气化室温度为240℃,推出萃取纤维头,保持30min后缩回萃取纤维头,取出萃取进样手柄。

2.3 萃取过程 将样品瓶置于带温控搅拌功能的固相微萃取装置上并进行固定,先将装有样品的顶空样品瓶在70℃预热30min,再开启磁力搅拌(400r/min),然后将萃取进样手柄插入顶空样品瓶中,推出萃取纤维头,并确保不与试样和器壁接触,使其暴露在样品上方,保持40min后缩回萃取纤维头,取出萃取手柄。

2.4 解吸附过程 将完成萃取过程的萃取进样手柄迅速插入到气相色谱仪进样口的气化室内,温度设定为240℃,推出萃取纤维头使其暴露在高温气化室内,热解析5min后缩回萃取纤维头,取出萃取手柄。

2.5 GC-MS条件 CD-WAX色谱柱(30m×0.25mm,0.25μm,上海安谱实验科技股份有限公司);进样口温度240℃;注入方式无分流;载气高纯He(含有量99.99%);载气气体体积流量0.98mL/min;程序升温条件为初始温度80℃,保持2min,以4℃/min升至100℃,保持5min,继续以3℃/min升至190℃,保持5min,再以10℃/min升至240℃,保持5min,分析检测时间共计50min。

离子源为EI源;离子源温度200℃;接口温度220℃;电离能量70eV;m/z45~500;采集时间50min。

2.6 挥发性成分定性 将GC-MS分析获得的质谱数据与计算机NIST. 14谱库进行比对分析,综合参考文献资料、四磨汤口服液和单味药材的相关信息,对挥发性物质进行定性。

3 结果与分析

3.1 萃取过程相关参数优化 为了保证更多挥发性成分被吸附,并且确保色谱分离过程中色谱峰峰形对称、分离度高,本研究对萃取纤维头种类和样品取样量进行优化。

3.1.1 萃取纤维头选择 固相微萃取纤维头的不同颜色代表了不同的吸附膜种类, 对挥发性成分的吸附能力存在较大差异。通过比较对四磨汤口服液中挥发性成分的吸附能力, 筛选出适合四磨汤口服液中挥发性成分的萃取纤维头, 见图1。高含有量成分和低含有量成分均呈现出不同的指纹特征。对

高含有量挥发性成分, 灰色>粉色≈蓝色>白色; 对低含有量挥发成分, 灰色>粉色>白色>蓝色; 对强保留的高沸点挥发性成分, 粉色>灰色>白色>蓝色。本研究选取吸附挥发性成分数量相对较多, 色谱峰强度高、峰形好且分离效果好的灰色萃取纤维头用于下一步研究。

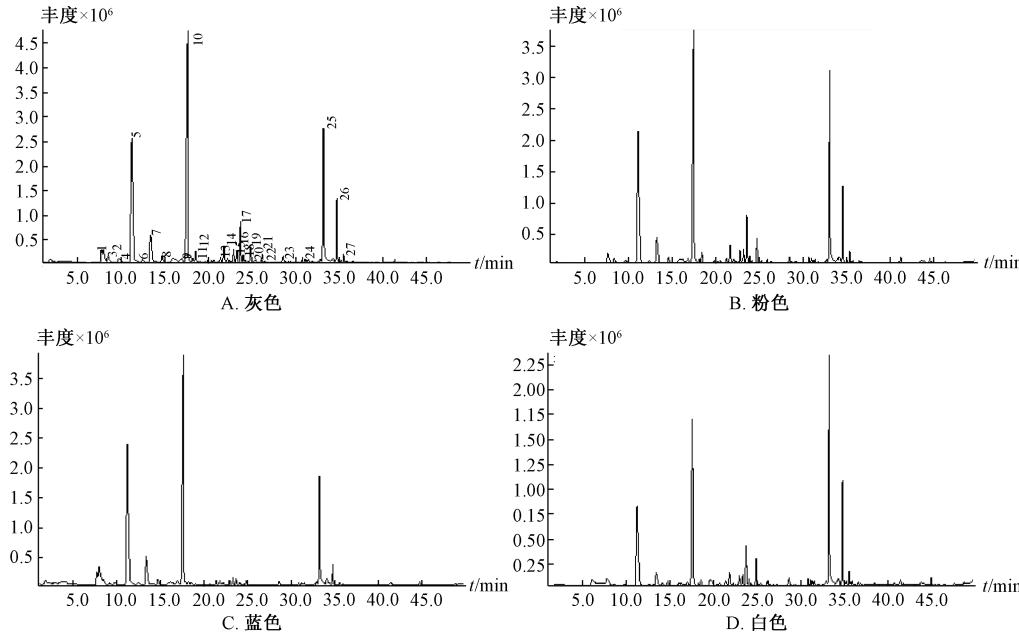


图1 不同颜色萃取纤维头吸附四磨汤口服液挥发性成分的总离子流图

Fig. 1 The total ion chromatograms of volatile components from Simotang Oral Solution by different color extraction fiber heads

3.1.2 取样量优化 按照“2.1”和“2.3”项下方法, 采用称样递减方式, 对各单味药和四磨汤口服液的取样量进行优化。以槟榔为例, 见图2, 当样品量从0.06 g降到0.007 g时, 取样量约降为原来的10%, 但其色谱峰的响应值保留了原信号强度的35%, 仍然能达到 $\times 10^6$ 。与此同时槟榔总离子流图谱中色谱峰峰形对称, 绝大多数色谱峰分离度能达到基线分离。采用相同方法, 比较了其他单味药材和四磨汤口服液不同取样量的GC-MS总离子流图中色谱峰峰形、色谱强度和色谱峰分离度, 选择它们各自的适宜取样量, 即木香、枳壳、乌药分别取7 mg, 四磨汤口服液取0.2 mL作为本研究使用量。相比于文献[12]中水蒸气蒸馏法提取挥发油进行检测, SPME仅需要微量样品就可以实现复杂样品体系中挥发性成分的分析检测。

3.2 挥发性成分解析 采用面积归一化法对各积分色谱峰占总峰面积百分比进行计算, 再将GC-MS获取的四磨汤口服液中挥发性成分的质谱数据, 通过NIST. 14谱库检索和人工仔细比对, 参考

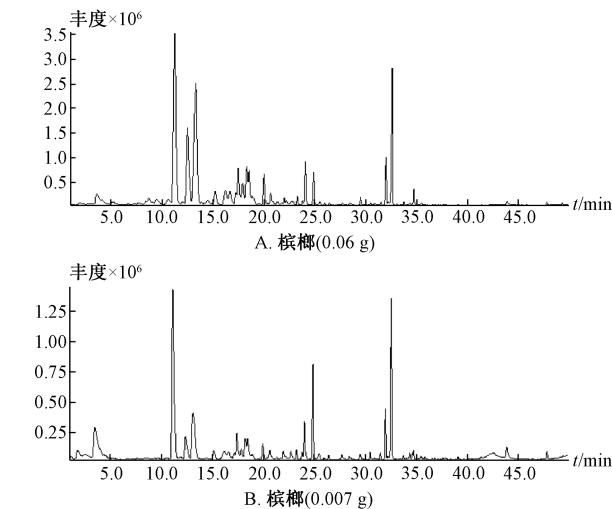


图2 不同取样量槟榔中挥发性成分总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of volatile components in Areca with different sampling amounts

文献报道的四磨汤口服液和单味药材中挥发性成分研究结果, 共鉴定了四磨汤口服液27个挥发性成

分中的13个主要挥发性成分,见表1,其峰面积总和占总峰面积的91.62%。其中占总峰面积百分比超过1%的挥发性成分包括反式芳樟醇氧化物

(呋喃)等峰面积总和占总峰面积的88.95%。作为挥发性成分的代表组分,可用于四磨汤口服液的进一步质量研究。

表1 四磨汤口服液中挥发性成分鉴定及溯源

Tab. 1 The identification and traceability of volatile components in Simotang Oral Solution

峰号	t_R /min	化合物	分子式	相对分子量	相对含有量/%	溯源比对(t_R /min)			
						木香	槟榔	枳壳	乌药
1	7.716	反式芳樟醇氧化物(呋喃)	$C_{10}H_{18}O_2$	170.25	1.05	—	—	7.724	—
2	7.939	未知	未知	未知	0.58	未知	未知	未知	未知
3	8.460	未知	未知	未知	1.01	未知	未知	未知	未知
4	9.745	未知	未知	未知	0.99	未知	未知	未知	未知
5	11.203	芳樟醇	$C_{10}H_{18}O$	154.25	25.34	11.154	11.172	11.155	11.137
6	12.468	未知	未知	未知	0.67	未知	未知	未知	未知
7	13.356	(-)-4-蒈品醇	$C_{10}H_{18}O$	154.25	4.93	—	—	13.365	13.329
8	14.675	β -松油醇	$C_{10}H_{18}O$	154.25	0.93	—	—	—	—
9	16.932	未知	未知	未知	0.46	未知	未知	未知	未知
10	17.614	α -松油醇	$C_{10}H_{18}O$	154.25	32.26	17.463	17.441	17.454	—
11	18.191	未知	未知	未知	0.39	未知	未知	未知	未知
12	18.492	(-)香芹酮	$C_{10}H_{14}O$	150.22	1.03	—	—	18.525	—
13	21.361	板香芹醇	$C_{10}H_{16}O$	152.23	0.43	—	—	21.391	—
14	21.774	顺式香叶醇	$C_{10}H_{18}O$	154.25	1.68	—	—	21.808	—
15	22.876	顺式香芹醇	$C_{10}H_{16}O$	152.23	1.12	—	—	22.894	22.898
16	23.288	未知	未知	未知	1.23	未知	未知	未知	未知
17	23.672	香叶醇	$C_{10}H_{18}O$	154.25	3.91	—	—	—	—
18	24.005	未知	未知	未知	0.57	/	/	/	/
19	24.840	(Z,Z,Z)-9,12,15-十八碳三烯-1-醇	$C_{18}H_{32}O$	264.45	2.06	25.047	24.898	—	24.912
20	25.362	未知	未知	未知	0.41	未知	未知	未知	未知
21	26.042	未知	未知	未知	0.29	未知	未知	未知	未知
22	26.416	未知	未知	未知	0.16	未知	未知	未知	未知
23	28.586	未知	未知	未知	0.68	未知	未知	未知	未知
24	30.789	未知	未知	未知	0.34	未知	未知	未知	未知
25	33.191	山梨酸	$C_6H_8O_2$	112.13	12.75	—	—	—	—
26	34.711	百里香酚	$C_{10}H_{14}O$	150.22	4.13	34.731	34.727	34.739	—
27	35.484	未知	未知	未知	0.58	未知	未知	未知	未知

注:“—”表示化合物未检测到

3.3 挥发性成分药材溯源 对四磨汤口服液生产投料的单味药材所含挥发性成分进行HS-SPME-GC-MS分析检测。同时,通过NIST.14谱库和文献对比,对单味药材的GC-MS数据进行分析鉴定并将结果与四磨汤口服液中的挥发性成分进行比较,从而对其中挥发性成分进行溯源分析,实现该中药复方中挥发性成分的来源归属。

表1可得,芳樟醇在4味药材中均含有; α -松油醇、(Z,Z,Z)-9,12,15-十八碳三烯-1-醇和百里香酚等来自其中3味药材;且芳樟醇氧化物、(-)香芹酮和顺式香叶醇3种挥发性组分仅在枳壳挥发性成分中存在。此外,槟榔和木香2味药材中均含有的香叶基丙酮在四磨汤口服液中未检测到,而在四磨汤口服液中的香叶醇和山梨酸在4味单味药材中均未发现它们对应的挥发性组分。含有

山梨酸可能是由于生产过程中添加的辅料山梨酸钾在样品萃取过程中随水蒸气蒸发到顶空样品瓶气相部分被吸附所致。

4 讨论

目前许多中药复方制剂在生产过程中保留了挥发油或芳香水,但是挥发性成分检测在质量标准中体现方式不尽相同,有的在含有量测定项下,有的在鉴别项下,有的并未进行检测。如《中国药典》中收录的小儿感冒口服液在鉴别项利用薄层色谱法对广藿香和薄荷中挥发性成分进行检测,并利用气相色谱法对广藿香中百秋李醇进行含有量测定;藿香正气口服液的挥发性成分仅在鉴别项下检测紫苏烯和紫苏醛;橘红痰咳液中水蒸气蒸馏液及薄荷脑,作为挥发性成分均未在质量标准中进行控制^[13]。现行的四磨汤口服液质量标准在含有量测

定项下对组方单味药材相关的特征指标成分(柚皮苷、辛弗林、去甲异波尔定和槟榔碱)进行测定,相比之下作为药效物质基础之一的挥发油未进行质量控制^[19-20]。因此,本研究通过对四磨汤口服液中挥发性成分进行分析,并对其药材来源进行追溯,有利于全面提升其质量标准,阐明挥发性成分来源,并为复方中药中挥发性成分检测及质量研究提供参考。

采用HS-SPME-GC-MS方法检测和鉴定四磨汤口服液中挥发性成分,经样品量考察发现该方法灵敏度高。无论固体单味药材粉末,还是液体样品,在较少的样品取样量的情况下,质谱TIC的信号响应仍能达到 $(0.9\sim1.2)\times10^7$,完全能够满足挥发性成分的定性分析检测,很大程度上简化了样品的前处理过程,能够实现复方中药制剂中挥发油的直接分析检测,极大地提高了检测效率。

为了探究研究结果与文献[11]存在差异的可能原因,与文献报道的单味药材的GC-MS检测研究结果进行比较^[21-24],结果表明本研究结果具有更好的匹配性,而存在差异的原因可能是药材批次和来源不同、实验室用药材与大生产成品用药材不一致、亦或样品前处理方法不同等。

参考文献:

- [1] 张艺,肖小东.木香的药理及制剂研究概述[J].中国药业,2003,12(4):75-76.
- [2] 郭建生,聂子文,张猛,等.乌药提取物对豚鼠离体回肠的影响[J].时珍国医国药,2012,23(1):56-58.
- [3] 郑莹,王帅,孟宪生,等.中药枳壳挥发油成分气相色谱-质谱联用分析和促进胃肠动力药效研究[J].时珍国医国药,2015,26(3):516-518.
- [4] 倪依东,王建华,王汝俊.槟榔及槟榔碱对胃肠作用的对比研究[J].中药药理与临床,2004,20(2):11-12.
- [5] 梁汝坚,梁若玲,张继平.四磨汤口服液治疗功能性消化不良45例[J].实用医学杂志,2008,24(6):1051-1052.
- [6] 张俊伟.駒马四磨汤药效学及临床试验报告[J].实用医技杂志,2003,10(1):75-76.

- [7] 王丹,曾柏荣,李为.四磨汤临床应用概况[J].医学信息(中旬刊),2010,5(2):434-436.
- [8] 周珊,周志光,钟新才.四磨汤对腹部手术后肠功能恢复的疗效观察[J].湖南中医杂志,2005,21(4):46-46.
- [9] 汪亚雄.四磨汤对腹部手术后胃肠功能恢复的影响[J].中医药导报,2009,15(7):27-28.
- [10] 熊小兰,江自卓,曹天生.四磨汤口服液对腹腔镜胆囊切除术后胃肠功能恢复的临床应用[J].现代消化及介入诊疗,2012,17(2):106-107.
- [11] 马丽,郭建生,曾贵荣.四磨汤挥发油化学成分GC/MS联用对比分析[J].中医药导报,2013,19(11):73-75.
- [12] 刘令安,杨华,谭泽云,等.一种四磨汤口服液的指纹图谱测定方法:中国,CN105301158A[P].2016-02-03.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [14] 刘俊亭.新一代萃取分离技术—固相微萃取[J].色谱,1997,15(2):118-119.
- [15] 马继平,王涵文,关亚风.固相微萃取新技术[J].色谱,2002,20(1):16-20.
- [16] Zhang C, Qi M, Shao Q, et al. Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS-SPME-GC-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 464-470.
- [17] 康文艺,王金梅,姬志强,等.迎春挥发性成分HS-SPME-GC-MS分析[J].天然产物研究与开发,2009,21(1):84-86,121.
- [18] 康文艺,姬志强,王金梅,等.石韦叶挥发油成分HS-SPME-GC-MS分析[J].中草药,2008,39(7):994-995.
- [19] 罗晖明,丁野,李文莉,等.四磨汤口服液质量标准补充研究[J].中国药事,2014,28(3):268-273.
- [20] 易跃能.基于药效物质基础的四磨汤口服液质量标准研究[D].长沙:中南大学,2011.
- [21] 杨华生,蔡光先,杨永华,等.木香挥发油GC指纹图谱的建立[J].湖南中医药大学学报,2007,27(4):18-20.
- [22] 周大鹏,王金梅,尹震花,等.HS-SPME-GC-MS分析槟榔果皮和种子的挥发性成分[J].天然产物研究与开发,2012,24(12):1782-1786.
- [23] 曹君,王少军,龚千锋,等.不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油成分的GC-MS分析[J].中草药,2005,36(2):172-177.
- [24] 杜志谦,夏华玲,江海肖,等.乌药挥发油化学成分的GC-MS分析[J].中草药,2003,34(4):308-310.