

HS-SPME-GC-MS 联用分析四妙丸挥发性成分

夏 婷^{1,2,3}, 张艳华⁴, 陈飞龙^{1,2,3}, 谭晓梅^{1,2,3*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 2. 广东省中药制剂重点实验室, 广东 广州 510515; 3. 广东省中药制剂技术工程实验室, 广东 广州 510515; 4. 广西壮族自治区花红药业集团股份有限公司, 广西 柳州 545199)

摘要: **目的** 采用顶空固相微萃取法 (HS-SPME) 与气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 法分析四妙丸中的挥发性成分。**方法** 单因素考察并确定四妙丸最佳萃取条件。萃取物分析采用 HP-5MS 弹性石英毛细管柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 载气氦气; 进样口温度 250 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 分流比 10:1; 程序升温。**结果** 最佳条件为取样量 1.5 g, 萃取温度 100 ℃, 萃取时间 30 min, 解析时间 5 min。从四妙丸、黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁中分别鉴定得到挥发性成分 23、28、24、18、24 种, 其峰面积分别占总挥发性成分峰面积的 93.3%、61.3%、87.2%、81.4%、70.6%。四妙丸的挥发性成分中, 15 种在黄柏中检出, 9 种在苍术中检出, 6 种在牛膝中检出, 12 种在薏苡仁中检出。**结论** 该方法简便可靠, 可为四妙丸全面质量评价提供参考。

关键词: 四妙丸; 固相微萃取; 气相-质谱联用; 挥发性成分

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)06-2045-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.051

四妙丸由黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁组成, 收录于 2020 年版《中国药典》, 具有清热利湿功效, 用于治疗湿热下注所致的痹病, 症见足膝红肿、筋骨疼痛等^[1]。挥发性成分在四妙丸中含量较高, 具有芳香燥湿、健脾之功效^[2-4], 是四妙丸发挥药理作用的主要有效成分。然而, 目前四妙丸相关质量研究主要为非挥发性成分^[5-6], 对复方中挥发性成分的研究较少, 现行质量标准未对四妙丸的挥发性成分进行相关规定。固相微萃取 (solid-phase microextraction, SPME) 技术是一种集成分萃取、富集、解吸、进样于一体的新型样品前处理方法, 与传统处理方式相比, 具有简便, 快速, 萃取完全等优点^[7]。本实验采用顶空固相微萃取 (HS-SPME) 与气质联用 (GC-MS) 的方法, 对四妙丸及其单味药黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁的挥发性成分进行分析, 以期对四妙丸的全面质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 6890-5973 气质联用仪 (美国 Agilent 公司); CP324S 型电子微量天平 (广州市计量检测技术研究院); HH-S6 型数显恒温水浴锅 (江苏金怡仪器科技有限公司); Fiber-SPME 型纤维头式固相微萃取装置 (美国 Sigma 公司)。

1.2 药物 苍术 (批号 181005, 亳州市沪谯药业有限公司); 酒炙川牛膝 (批号 171102, 康美药业股份有限公

司); 黄柏 (批号 HX18B01, 广东和翔制药有限公司); 薏苡仁 [批号 170701, 太安堂 (亳州) 中药饮片有限公司], 药材经南方医科大学中医药学院鉴定教研室刘传明教授鉴定为正品。

2 方法

2.1 分析条件

2.1.1 色谱 HP-5MS 弹性石英毛细管气相色谱柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 载气氦气; 体积流量 1.0 mL/min; 分流比 10:1; 进样口温度 250 ℃; 程序升温, 升温程序为初始温度 80 ℃, 保持 5 min, 以 10 ℃/min 的速率升温至 105 ℃, 保持 2 min, 再以 3 ℃/min 的速率升温至 150 ℃, 保持 15 min, 最后以 8 ℃/min 的速率升温至 250 ℃。

2.1.2 质谱 EI 离子源 70 eV; 离子源温度 230 ℃; 检测器温度 250 ℃; 四级杆温度 150 ℃; 电子倍增幅度 1988 eV。

2.2 四妙丸样品制备 将苍术、牛膝、炒黄柏和薏苡仁分别粉碎, 过 5 号筛得细粉, 取苍术 10 g、牛膝 10 g、炒黄柏 20 g、薏苡仁 20 g, 混匀, 用水泛丸, 60 ℃干燥, 即得四妙丸。

将四妙丸研成粉末, 取粉末 1.5 g 置于 10 mL 顶空瓶中, 插入装有 65 μm PDMS/DVB 萃取纤维头的手动进样器, 于 100 ℃水浴萃取 30 min, 取出, 即得四妙丸供试样品。

2.3 单味药供试样品制备 按 2020 年版《中国药典》中

收稿日期: 2021-12-12

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1704500, 2018YFC1704503)

作者简介: 夏 婷 (1996—), 女, 博士生, 从事中药制剂物质基础研究。Tel: (020) 61648265, E-mail: xiating0226@163.com

* 通信作者: 谭晓梅 (1962—), 女, 研究员, 博士, 从事中药新制剂及中药复方配伍规律研究。Tel: (020) 61648265, E-mail: txm@smu.edu.cn

四妙丸比例分别取黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁粉末 0.50、0.25、0.25、0.50 g，按“2.2”项下方法制备，即得。

3 结果

3.1 色谱条件及供试品处理方法的确定

3.1.1 SPME 固相萃取头的筛选 将装有 30 μm DVB/CAR/PDMS、65 μm PDMS/DVB、75 μm CAR/PDMS 纤维萃取头分别进行萃取，在“2.1”项条件下进样测定，其中 65 μm PDMS/DVB 纤维头萃取峰个数最多，故选用 65 μm PDMS/DVB 的纤维头进行实验。

3.1.2 四妙丸不同取样量考察 称取四妙丸粉末 1.0、1.5、2.0 g，精密称定，在“2.1”项条件下进样测定，各取样量色谱图的总峰面积如表 1 所示。由此可知，取样量为 1.5 g 时，吸附的挥发性成分达到相对饱和，因此选择 1.5 g 为最佳取样量。

表 1 不同考察因素的峰面积结果

考察因素	考察水平	峰面积(×10 ⁶)
取样量	1.0 g	3.52
	1.5 g	5.77
	2.0 g	5.81
萃取温度	75 ℃	2.18
	85 ℃	3.66
	100 ℃	5.69
萃取时间	15 min	3.46
	30 min	6.02
	45 min	6.07
解析时间	2 min	3.61
	5 min	5.84
	8 min	5.89
分流比	100 : 1	0.07
	50 : 1	1.41
	10 : 1	5.65

3.1.3 四妙丸不同萃取温度考察 在 75、85、100 ℃ 下进行萃取，由表 1 可知，当萃取温度为 100 ℃ 时，四妙丸粉末被充分萃取，故选择 100 ℃ 为最佳萃取温度。

3.1.4 四妙丸不同解析时间考察 解析时间的长短取决于分析物的性质，当进样口温度为 250 ℃ 时，分别解析 2、5、8 min，由表 1 可知，解析时间为 5 min 时，解析程度达到相对吸附平衡，因此选择 5 min 为最佳解析时间。

3.1.5 四妙丸不同分流比考察 实际的样品分析量取决于分流比的大小，分别设置分流比为 100 : 1、50 : 1、10 : 1，由表 1 可知，分流比为 10 : 1 时，色谱图总峰面积最大，成分吸附较完全，故选择 10 : 1 作为最佳分流比。

3.2 GC-MS 分析结果 在“2.1”项条件下对各供试样品进行分析，样品 TIC 色谱图见图 1~5。通过峰面积归一化法计算四妙丸及单味药黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁中各成分的相对峰面积，经过 NIST 和 WILLY 谱库检索鉴定各化合物结构与名称，化学成分鉴定结果见表 2。结果表明，从四妙丸、黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁中分别鉴定出挥发性成分 23、28、24、18、24 种，分别占总挥发性成分的 93.3%、61.3%、87.2%、81.4%、70.6%。四妙丸的挥发性成分中，15 种在黄柏中检出，9 种在苍术中检出，6 种在牛膝中检出，12 种在薏苡仁中检出。其中，主要包括倍半萜类和三萜类化合物。倍半萜类化合物包括柠檬烯（占 0.42%）、β-榄香烯（占 5.81%）、γ-榄香烯（占 1.42%）、石竹烯（占 0.70%）、α-葑草烯（占 0.48%）、α-姜黄烯（占 0.40%）、β-姜黄烯（占 0.54%）、β-芹子烯（占 34.49%）等；三萜类化合物主要包括棕榈酸乙酯（占 1.35%）。

4 讨论

四妙丸不良反应小，疗效好，在临床上应用广泛。现

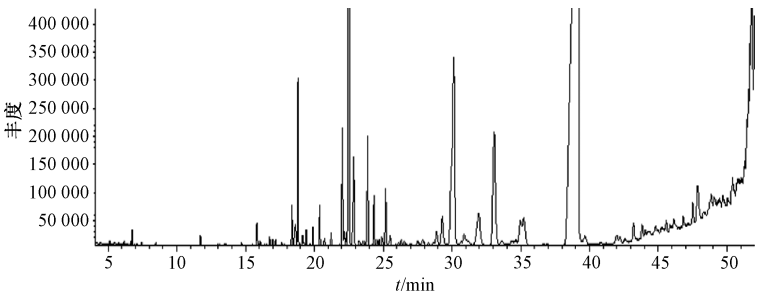


图 1 四妙丸总 TIC 图

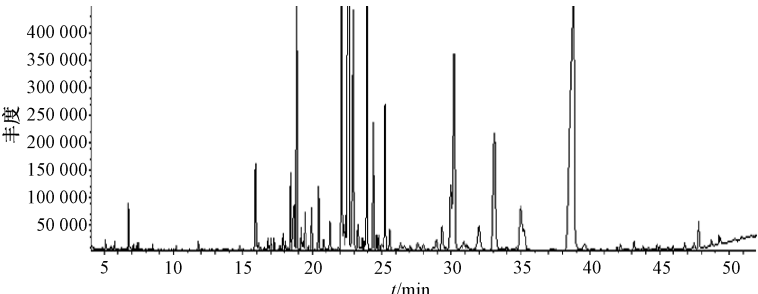


图 2 黄柏总 TIC 图

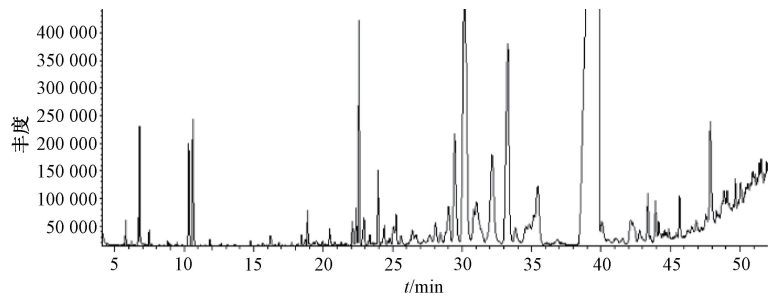


图 3 苍术总 TIC 图

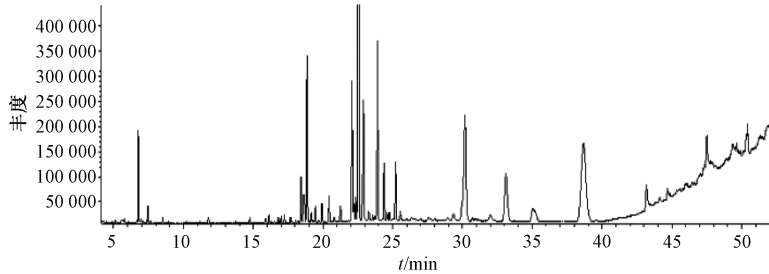


图 4 薏苡仁总 TIC 图

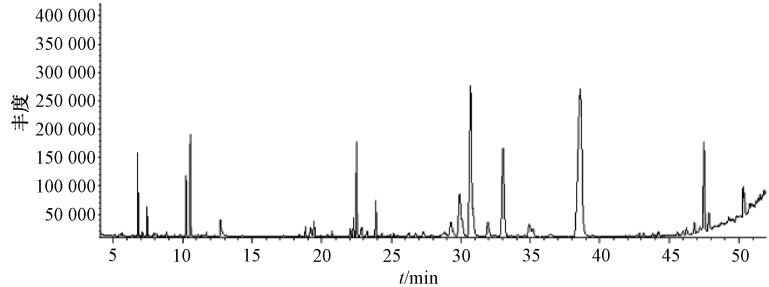


图 5 牛膝总 TIC 图

表 2 四妙丸、黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁挥发性成分分析结果

序号	t_R/min	化合物	分子式	置信度	分子量	峰面积百分比/%				
						四妙丸	炒黄柏	苍术	牛膝	薏苡仁
1	6.76	柠檬烯	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	93	136	0.42	0.47	2.40	2.05	1.51
2	15.82	4-乙烯基-2-甲氧基	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$	93	150	0.93	1.60	—	—	—
3	18.58	(<i>Z</i>)-4-decen-1-ol, methyl ether	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}$	95	170	0.76	—	—	—	1.31
4	18.81	β -榄香烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	87	204	5.81	4.86	—	0.41	4.15
5	19.14	香附子	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	99	204	0.47	0.32	—	—	—
6	19.89	石竹烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	97	204	0.70	0.64	—	—	0.51
7	20.40	(-)- γ -榄香烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	95	204	1.42	0.80	—	—	0.69
8	21.22	α -蒎草烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	94	204	0.48	0.51	—	—	—
9	22.04	naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethylidene)-, (4 <i>aR-trans</i>)	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	89	204	4.72	4.61	0.90	—	—
10	22.18	β -姜黄烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	90	204	0.54	0.48	—	—	—
11	22.30	α -姜黄烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}$	99	202	0.40	0.45	1.06	0.79	0.56
12	22.53	β -芹子烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	93	204	34.5	27.62	6.66	—	28.61
13	22.87	巴伦西亚橘烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	91	204	4.79	1.85	0.85	—	1.56
14	23.87	β -倍半水芹烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	89	204	4.14	4.46	2.12	1.44	4.84
15	25.18	甘香烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	88	204	2.37	2.43	—	—	—
16	29.30	β -愈创木烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	90	204	2.67	0.73	—	—	—
17	31.96	α -红没药醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	95	222	5.22	—	11.31	—	—
18	33.08	对苯基苯甲醛	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}$	93	182	13.83	—	—	—	13.10
19	35.00	2-羟基茚	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}$	91	182	3.10	—	—	—	12.01
20	43.20	9,10-脱氢异长叶烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}$	88	202	1.55	—	2.05	—	—
21	45.59	1-甲氧基-2-(1-甲基-2-亚甲基环戊基)苯	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}$	89	202	0.67	—	1.09	—	—
22	47.51	棕榈酸乙酯	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	94	284	1.35	—	—	6.33	0.98
23	50.04	estra-1,3,5(10)-trien-17. β .-ol	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}$	88	256	0.51	—	—	1.17	—

代药理学研究表明,四妙丸具有抗炎^[8]、增强免疫功能^[9]、抗氧化^[10]的药理作用。但 2020 年版《中国药典》对四妙丸的质量规定仅为炒黄柏中盐酸小檗碱的含量,缺乏复方挥发性成分的质量控制。故本实验拟通过 HS-SPME-GC-MS 法建立一种高效、操作简便、稳定性好的四妙丸挥发性成分分析方法。

课题组前期采用水蒸气蒸馏法和溶剂超声萃取法得到的样品挥发性成分数量较少,使用 HS-SPME 萃取得到的样品挥发性成分较多,可见采用 HS-SPME-GC-MS 联用技术对药物挥发性成分的提取有大幅度的提高^[11]。同时,固相微萃取法还具有使用样品量少,萃取效率高,萃取简便,稳定性良好等优点^[12]。以峰面积百分比为考察指标,通过考察萃取头类型、样品取样量、萃取温度、萃取时间、解析时间、进样口温度、程序升温条件、分流比等条件,确定最佳萃取和分析条件。

由 GC-MS 分析结果可知,四妙丸中挥发性成分主要包括倍半萜类和三萜类化合物。研究表明,倍半萜类和三萜类化合物大都具有较好的生物活性和药理作用^[13-14]。柠檬烯为黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁的共有成分,是四妙丸的主要挥发性成分之一,现代药理学研究表明,柠檬烯具有增加胃肠动力,促进胃肠消化的功能,且药理作用与其含量呈正相关^[15],推测柠檬烯可增强四妙丸健脾、除湿之功效。榄香烯在四妙丸挥发性成分中峰面积占比大,占总峰面积的 7.05%,包括 β-榄香烯和少量 γ-榄香烯,研究表明,榄香烯可增加自噬细胞的自噬,降低肿瘤细胞 Akt、mTOR 蛋白表达,提高机体免疫功能^[16-17],抑制 JAK2 与 STAT1 磷酸化^[18],提高机体免疫调节功能。α-萹草烯有抗炎和清热解毒的作用^[19]。石竹烯能抑制 LTB4、PGE₂、NO、iNOS 等炎症介质的产生^[20]。α-红没药醇占四妙丸挥发性成分总峰面积的 5.22%,可通过抑制分泌炎症因子 TNF-α、IL-6 水平,减轻炎症反应。以上研究提示,四妙丸治疗类风湿性关节炎可能与 α-萹草烯、石竹烯、α-红没药醇有关。

综上所述,四妙丸的挥发性成分是其有效成分,建议在质量标准中增加柠檬烯、β-榄香烯、α-红没药醇等含量较高且具有药理活性成分的含量测定。本实验采用 HS-SPME-GC-MS 联用技术测定四妙丸的挥发性成分,对部分成分进行了定性研究。该方法简便,提取效率高,稳定性良好,可为四妙丸的全面质量控制研究提供参考。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 823-824.

[2] 徐小颖, 张北雪, 逢 健, 等. 白术和 4 种不同来源的苍术对脾气虚大鼠的药效学比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 39-45.

[3] 邓 聪, 尹海波, 王 娜, 等. 辽宁产苍术属植物挥发性成分含量比较[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(5): 156-159.

[4] 潘红英, 时 乐, 徐 立, 等. 加味四妙丸有效部位群抗高尿酸血症作用及其机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(3): 380-385.

[5] 白忠旭, 刘玉强, 才 谦, 等. 四妙丸用生苍术与用麸炒苍术的药效学比较研究[J]. 中草药, 2013, 44(18): 2577-2580.

[6] 夏 婷, 陈飞龙, 崔媛媛, 等. 四妙丸 HPLC 指纹图谱建立[J]. 中成药, 2020, 42(5): 1380-1384.

[7] 叶 欣, 卢金清, 曹 利, 等. 牛蒡子炒制前后挥发性成分的比较[J]. 中药材, 2017, 40(7): 1586-1589.

[8] Lin X, Shao T, Huang L, *et al.* Simiao Decoction alleviates gouty arthritis by modulating proinflammatory cytokines and the gut ecosystem[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 955.

[9] 张秀丽, 雷 昌, 孟 盼, 等. 四妙丸超微制剂与传统制剂对佐剂性关节炎的改善作用及免疫调节比较研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(15): 15-18.

[10] Shang S W, Yang J L, Huang F, *et al.* Modified Si-Miao-San ameliorates pancreatic B cell dysfunction by inhibition of reactive oxygen species-associated inflammation through AMP-kinase activation[J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(5): 351-360.

[11] 黄雪莹, 王圣鑫, 余爱明, 等. HS-SPME-GC-MS 联用分析羌活、防风药对配伍前后挥发性组分变化规律[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 707-714.

[12] 叶 欣, 卢金清, 曹 利. 顶空-固相微萃取技术在中药领域的运用[J]. 中国药房, 2017, 28(6): 861-864.

[13] 孙 金, 翁丽丽, 肖春萍. 药用植物苍术挥发油合成及积累影响因素的研究进展[J]. 中药材, 2021, 44(5): 1259-1265.

[14] 邓爱平, 李 颖, 吴志涛, 等. 苍术化学成分和药理的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3904-3913.

[15] 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.

[16] 赵 茗, 周 庄, 齐典文, 等. β-榄香烯诱导人骨肉瘤 143B 细胞增殖、凋亡及自噬的实验研究[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2021, 13(3): 267-271.

[17] 王乔宇, 赵志刚. 榄香烯抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 药学进展, 2020, 44(7): 546-551.

[18] 王峥嵘, 郭 洁, 范焕芳, 等. β-榄香烯增强紫杉醇对卵巢癌 OVCAR3 细胞凋亡的促进作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(18): 2861-2864; 2868.

[19] 陈 贵, 夏稷子, 张 华, 等. GC 法同时测定艾纳香油中 3 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(8): 1739-1741.

[20] 蔡亚玲, 廖加美, 彭俊超, 等. 艾纳香油中抗炎成分的筛选及其对炎症因子的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(3): 402-409.