

芳香类中药复方挥发油提取工艺优化及其成分组成、抗氧化活性研究

张双双, 华丽萍, 陈俊洩, 丁美红, 石森林*
(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 优化芳香类中药复方(苍术、藿香、豆蔻、砂仁)挥发油提取工艺,并考察其成分组成、抗氧化活性。方法 在单因素试验基础上,以粉碎粒度、提取时间、浸泡时间为影响因素,挥发油转移率为评价指标,正交试验优化提取工艺。采用GC-MS法分析挥发油成分组成,测定挥发油对DPPH自由基、ABTS自由基的清除率。结果 最佳条件为粉碎粒度粒径2~4 mm,提取时间6 h,浸泡时间2 h,挥发油转移率为76.2%。共鉴定出22种成分,其中主要化合物左旋-β-蒎烯、桉油精、左旋乙酸冰片酯、百秋李醇相对含量分别为5.24%、41.73%、15.90%、12.31%。挥发油质量浓度为50 μg/mL时,对DPPH自由基的清除率为94.17%;为100 μg/mL时,对ABTS自由基的清除率为56.51%。结论 该方法稳定可行,灵敏稳定,可用于提取抗氧化活性较强的芳香类中药复方挥发油。

关键词: 芳香类中药复方;挥发油;提取工艺;成分组成;抗氧化活性;正交试验;GC-MS

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)04-1261-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.037

芳香类中药防治疾病的主要机制是抗菌、杀菌、抗病毒、促进人体新陈代谢、提高机体免疫力^[1-3]。挥发油作为该类中药的特色成分,具有较强的功效,如解表、化湿、行气、开窍等,可作用于局部或全身以防治疾病^[4-5]。

氧化应激是机体或细胞内氧化/抗氧化平衡失调的病理状态,在多种疾病发生发展中起着重要作用^[6],目前关于中药挥发油的抗氧化活性已有大量文献报道^[7-9],但鲜有涉及中药复方总挥发油。前期报道,藿香、苍术等芳香类中药具有芳香化湿的作用^[10],挥发油为其主要物质基础,在抗炎、抗氧化、抗病毒等方面具有较好的药理活性^[11-12];白豆蔻挥发油在低剂量下效果与抗坏血酸(VC)、二丁基羟基甲苯(BHT)相当,而剂量升高时更优^[13];砂仁主要成分左旋乙酸冰片酯具有广谱抑菌、抗氧化等活性^[14-15],故本实验优化上述4种芳香类中药复方挥发油提取工艺,并考察其成分组成、抗氧化活性,以期为今后相关开发提供参考。

1 材料

Agilent 7890-5977A型气相色谱-单四级杆质谱联用仪(美国Agilent公司)。1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)、2,2'-联苯-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐(ABTS)(上海源叶生物科技有限公司);抗坏血酸(VC,上海展云化工有限公司)。生苍术、广藿香、豆蔻、砂仁均购自浙江中医药大学饮片有限公司,经浙江中医药大学石森林教授鉴定为正品。水为纯水。

2 方法与结果

2.1 提取工艺优化

2.1.1 单因素试验 称取处方量药材饮片,以挥发油转移率为指标,依次对粉碎粒度(未粉碎、只粉碎果皮、粒径2~4 mm、粒径1~2 mm,其中粒径2~4 mm是药材过5目筛而不过10目筛,粒径1~2 mm是药材过10目筛而不过18目筛)、提取时间(3、4、5、6 h)、料液比(1:6、1:8、1:10、1:12)、浸泡时间(0、1、2、3 h)进行考察,平行3次,计算平均值,结果见图1。由此可知,粉碎粒度为2~4 mm,提取时间为6 h,料液比为1:8,浸泡时间为1 h时挥发油转移率最高。

2.1.2 正交试验 在单因素试验基础上,选择粉碎粒度(A)、提取时间(B)、浸泡时间(C)作为影响因素,每个因素取3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表,因素水平见表1,结果见表2,方差分析见表3。由此可知,各因素影响程度依次为 $A>B>C$,最优工艺为 $A_2B_3C_3$,即粉碎粒度粒径2~4 mm,提取时间6 h,浸泡时间2 h。

表1 因素水平

水平	A 粉碎粒度	B 提取时间/h	C 浸泡时间/h
1	只粉碎果皮	4	0
2	粒径2~4 mm	5	1
3	粒径1~2 mm	6	2

平行称取3份粒径2~4 mm的药材,每份50 g,加入8倍量纯水浸泡2 h,在恒温电热套上加热提取6 h,采用移液器将挥发油与水分离,称定质量,计算转移率,结果见表4,可知该工艺稳定可行。

2.2 成分组成研究 采用GC-MS法。

2.2.1 分析条件 DB-5弹性石英毛细管柱(50 m×

收稿日期: 2022-09-25

作者简介: 张双双(1996—),女,硕士,研究方向为药剂学。E-mail: 837665679@qq.com

*通信作者: 石森林(1970—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为药物新剂型及制剂新技术。Tel: (0571) 86658051, E-mail: pjstone@163.com

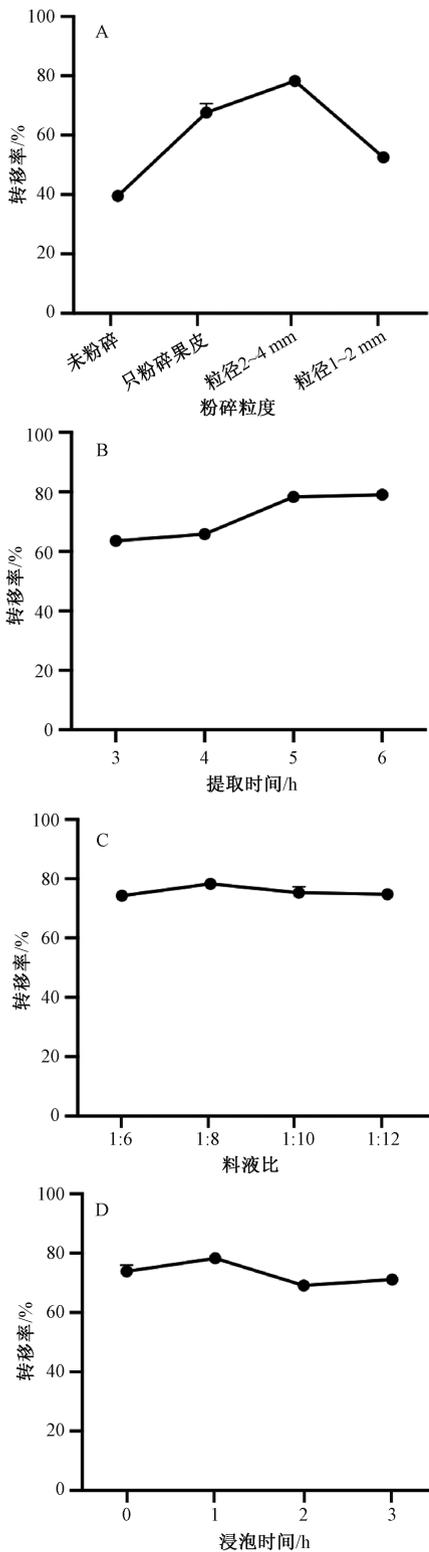


图1 粉碎粒度 (A)、提取时间 (B)、料液比 (C)、浸泡时间 (D) 对挥发油转移率的影响

0.25 mm×0.25 μm, 初始温度 50 ℃, 停留 2 min, 程序升温 (4 ℃/min 升至 130 ℃, 保持 1 min, 8 ℃/min 升至 280 ℃, 保持 1 min); 气化室温度 280 ℃; 进样量 1 μL; 分流比 30 : 1; 进样口温度 280 ℃; 电离离子源 (EI) 检测; 离子源电压 70 eV, 电子倍增器电压 1.553 kV; 离子源

表2 试验设计与结果

试验号	A	B	C	D(空白)	挥发油转移率/%
1	1	1	1	1	52.6
2	1	2	2	2	59.4
3	1	3	3	3	65.0
4	2	1	2	3	62.4
5	2	2	3	1	66.5
6	2	3	1	2	74.2
7	3	1	3	2	41.3
8	3	2	1	3	48.7
9	3	3	2	1	46.7
K_1	59.000	52.100	58.500	55.267	—
K_2	67.700	58.200	56.167	58.300	—
K_3	45.567	61.967	57.600	58.700	—
R	22.133	9.867	2.333	3.433	—

表3 方差分析

来源	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	746.029	2	3.229	3.110	<0.05
B	148.749	2	0.644	3.110	>0.05
C	8.309	2	0.036	3.110	>0.05
误差	924.24	8	—	—	—

表4 验证试验结果 (n=3)

试验号	挥发油转移率/%	平均值/%	RSD/%
1	74.7	76.2	1.86
2	77.5		
3	76.4		

温度 280 ℃; 接口温度 280 ℃; 四级杆温度 150 ℃; 扫描范围 m/z 40~500; 扫描速度 3 125 u/s, 总离子流图见图 2。

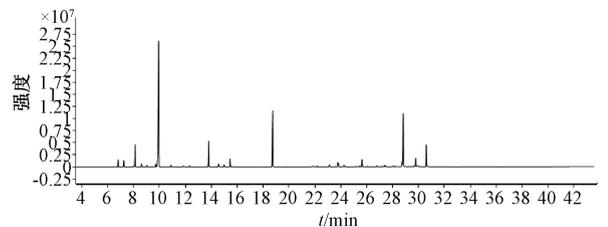


图2 挥发油 GC-MS 总离子流图

2.2.2 结果分析 表5显示, 共鉴定出22种成分, 以左旋-β-蒎烯、桉油精、樟脑、左旋乙酸冰片酯、百秋李醇等为主, 其中左旋-β-蒎烯为苍术主要成分, 桉油精为豆蔻主要成分, 左旋乙酸冰片酯为砂仁主要成分, 百秋李醇为藿香主要成分。

2.3 抗氧化活性研究

2.3.1 DPPH 自由基清除率 称取 DPPH 固体粉末约 10 mg, 乙醇溶解后定容至 250 mL 棕色量瓶中, 避光保存。吸取 3.125、6.25、12.5、25、50 μg/mL 挥发油各 2 mL, 加入 2 mL DPPH 溶液, 摇匀, 在 37 ℃ 下避光反应 30 min, 在 517 nm 波长处检测吸光度, 以抗坏血酸为阳性对照, 平行 3 次, 计算清除率, 公式为清除率 = $[(1-A_1-A_2)/A_3] \times 100\%$, 其中 A_1 为样品吸光度, A_2 为背景吸光度 (乙醇代

表5 挥发油成分及其相对含量

峰号	名称	t_R /min	相对含量/%
1	3,6,6-三甲基-双环(3.1.1)庚-2-烯	6.80	1.76
2	蒎烯	7.23	1.53
3	左旋-β-蒎烯	8.10	5.24
4	月桂烯	8.61	0.75
5	对薄荷-1,3,8-三烯	9.70	0.83
6	桉油精	9.94	41.73
7	γ-松油烯	10.86	0.44
8	茴香酮	11.84	0.45
9	樟脑	13.80	6.83
10	左旋龙脑	14.56	1.03
11	(-)-4-萜品醇	14.97	0.53
12	α-松油醇	15.45	2.15
13	左旋乙酸冰片酯	18.73	15.90
14	[1R-(1R*,4Z,9S*)]-4,11,11-三甲基-8-亚甲基-二环	23.11	0.63
15	[1S-(1α,4α,7α)]-1,2,3,4,5,6,7,8-八氢化-1,4-二甲基-7-(1-甲基乙烯基)奥	23.76	1.37
16	塞舌尔烯	23.81	0.97
17	α-广藿香烯	24.24	0.72
18	A-布黎烯	25.64	1.78
19	1,4-二甲基-7-丙-1-烯-2-基-1,2,3,3a,4,5,6,7-八氢天青	28.72	0.96
20	百秋李醇	28.82	12.31
21	广藿香酮	29.78	2.11
22	4-联苯甲醛	30.59	4.22

替 DPPH 溶液), A_3 为空白吸光度 (乙醇代替样品), 结果见图 3。由此可知, 挥发油质量浓度小于 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 DPPH 清除能力弱于抗坏血酸, 而大于 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时强于后者, 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时清除率最高, 为 94.17%。

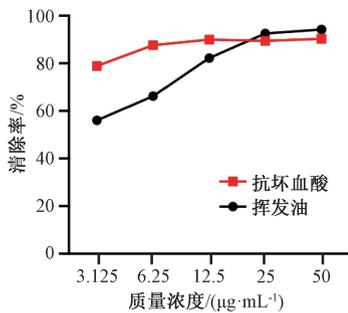


图3 挥发油对 DPPH 自由基的清除率

2.3.2 ABTS 清除率 称取 ABTS、过硫酸钾适量, 分别用蒸馏水定容至 10 mL, 将两者按 1:1 比例混合, 避光贮存 12 h 后制得贮备液, 使用时用 PBS 缓冲液稀释至 734 nm 波长处的吸光度为 0.7 ± 0.02 。吸取 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 挥发油各约 0.2 mL 至试管中, 加入 3.8 mL 贮备液, 混合均匀后静置 6 min, 以蒸馏水为空白, 抗坏血酸为阳性对照测定吸光度, 平行 3 次, 计算清除率, 公式为清除率 = $[(1-A_1-A_2)/A_3] \times 100\%$, 其中 A_1 为样品吸光度, A_2 为背景吸光度 (蒸馏水代替贮备液), A_3 为空白吸光度 (蒸馏水代替样品), 结果见图 4。由此可知, 挥发油

质量浓度小于 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 ABTS 自由基清除能力强于抗坏血酸, 而大于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时弱于后者; 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时清除率最高, 为 56.51%。

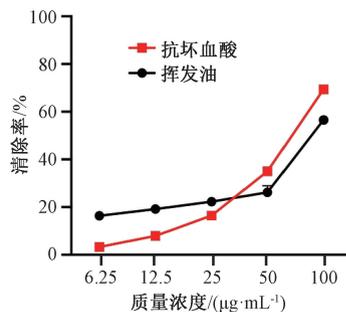


图4 挥发油对 ABTS 自由基的清除率

3 讨论与结论

本实验采用单因素试验结合正交实验, 确定芳香类中药复方挥发油最优提取工艺为粉碎粒度粒径 2~4 mm, 提取时间 6 h, 浸泡时间 2 h, 挥发油转移率为 76.2%, 并且该方法稳定可行。然后, 采用 GC-MS 法鉴定出 22 个化合物, 其中桉油精相对含量为 41.73%, 具有良好的抑菌、抗炎、抗病毒活性, 在治疗呼吸系统疾病方面具有良好疗效^[16]; 百秋李醇相对含量为 12.31%, 具有抗多种流感病毒的作用^[17], 但总挥发油中化学成分数量明显低于各中药单独提取挥发油中, 可能是因为采用归一化法时主要成分含量较高, 而其他成分含量较低, 无法完全分析鉴别。最后, 考察挥发油抗氧化活性, 发现该类成分在高质量浓度下对 DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除率较高。

综上所述, 本实验优化芳香类中药复方挥发油提取工艺, 并考察其成分组成、抗氧化活性, 可为该类成分抗病毒活性研究提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 王梁凤, 李慧婷, 陈青垚, 等. 中药挥发油抗菌作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1026-1033.
- [2] 汪 激. 芳香性中药的功效及药理特点浅识[J]. 浙江中医学院学报, 2002, 26(2): 69.
- [3] 宋文娟, 顾 伟. 芳香中药的药理学研究概况与展望[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2609-2611.
- [4] 王雅琪, 杨园珍, 伍振峰, 等. 中药挥发油传统功效与现代研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(2): 455-461.
- [5] 张 翼, 张 硕, 谭永红, 等. 4 种不同方法提取苍术挥发油的比较研究[J]. 西南国防医药, 2018, 28(3): 201-204.
- [6] 郭向辉, 郑 慧, 吴 巍. 白头翁皂苷 B4 对慢性肾功能衰竭大鼠肾组织的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(1): 90-95; 210.
- [7] 王 萍, 汪镇朝, 刘英孟, 等. 丁香挥发油的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(3): 871-878.
- [8] 马 可, 南星梅, 苏姗姗, 等. 肉豆蔻挥发油对低氧诱导肺动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用及其抗氧化活性[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(7): 535-542.

- [9] 陈如一, 史悦悦, 张晓熙, 等. 艾柱挥发油和燃烧产物成分 GC-MS 分析及抗氧化活性比较[J]. 中成药, 2021, 43(12): 3507-3512.
- [10] 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: 46.
- [11] 于艳, 贾天柱, 魏新智, 等. 麸炒前后茅苍术挥发油对缺氧/复氧损伤心肌细胞的抗氧化与抗凋亡作用[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(1): 124-130.
- [12] 于艳, 贾天柱, 吴振起, 等. 麸炒茅苍术挥发油抗 LPS 诱导 HCoEpiC 炎症损伤的作用[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5): 1134-1139.
- [13] 李伟, 陈林林, 王振兴, 等. 白豆蔻精油的化学组成及清除亚硝酸钠能力[J]. 中国调味品, 2018, 43(7): 12-14.
- [14] 李晓花, 金玲钰, 岳建军, 等. 砂仁活性成分乙酸龙脑酯药理活性研究进展[J]. 中医药导报, 2021, 27(5): 131-134.
- [15] 李丽丽, 田文仓, 刘茵, 等. 砂仁中化学成分及其药理作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(22): 4390-4396.
- [16] 侯明楮, 常聪, 陈林霖, 等. 桉油精的药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(16): 2023-2032.
- [17] 畅立圣, 陈红宇, 张莹瑄, 等. 中药活性成分百秋李醇在疾病防治中的实验研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2022, 36(S1): 272-276.

HPLC 法测定健肝灵胶囊中 6 种成分及五味子投料情况分析

邓映明¹, 宋增炫¹, 陈思婷², 陈媛¹

(1. 梅州市食品药品监督管理局, 广东 梅州 514000; 2. 嘉应学院医学院, 广东 梅州 514000)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定健肝灵胶囊中丹参素、丹酚酸 B、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素的含量, 并探讨五味子投料情况。方法 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Symmetry[®] C₁₈ 色谱柱 (4.6×150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 °C; 检测波长 220 nm。结果 6 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r>0.9997$), 平均加样回收率 95.4%~105.9%, RSD 0.53%~1.95%。3 个厂家 4 批样品投料为五味子, 1 个厂家 3 批样品投料为南五味子。结论 该方法简便准确, 可用于健肝灵胶囊质量控制和五味子投料鉴别。

关键词: 健肝灵胶囊; 化学成分; 五味子; 南五味子; 投料; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)04-1264-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.038

健肝灵胶囊由五味子种子浸出物、灵芝浸膏、丹参浸膏组成, 具有益气健脾、活血化瘀、降低谷丙转氨酶的功效, 临床上用于保肝、治疗慢性肝炎等^[1-3], 方中丹参所含丹参素、丹酚酸 B 是重要活性成分, 具有抑制血栓形成、抗炎、慢性酒精性肝病保护作用^[4-5], 并且五味子为规定投料。自 2000 年版《中国药典》开始, 对五味子、南五味子分别收载, 两者在形态、产地、成分有所差异, 功能主治各有侧重^[6-7], 而 2015 年版《中国药典》以五味子醇甲、五味子酯甲含量为指标对两者进行表征。但健肝灵胶囊现行质量标准只有五味子甲素的 TLC 鉴别, 无其他成分含量测定方法, 难以反映投料情况^[8]。

研究表明, 五味子、南五味子中木脂素成分五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素存在明显差异^[9-10], 考察其含量差异成为鉴定两者的重要手段^[11-13]。因此, 本实验建立 HPLC 法同时测定健肝灵胶囊中丹参素、丹酚酸 B, 五味子所含五味子醇甲、五味子酯

甲、五味子甲素、五味子乙素的含量, 并通过计算五味子酯甲、五味子醇甲峰面积比值 (R_1) 及五味子甲素、五味子乙素峰面积比值 (R_2) 来判断五味子投料情况^[14], 以期更好地控制该制剂质量。

1 材料

1.1 仪器 Nexera X2 色谱仪 (日本岛津公司); PM4-1300TD 型超声波清洗器 [360 W、40 kHz, 普律玛仪器 (上海) 有限公司]; XS205Du 电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); ACY-2001-U 超纯水机 (美国艾科浦国际有限公司)。

1.2 试剂与药物 丹参素钠 (批号 110855-201915, 纯度 97.8%)、丹酚酸 B (批号 111562-201917, 纯度 96.6%)、五味子醇甲 (批号 110857-201815, 纯度 99.7%)、五味子酯甲 (批号 111529-201706, 纯度 95.2%)、五味子甲素 (批号 110764-201915, 纯度 99.5%)、五味子乙素 (批号 110765-201813, 纯度 99.1%) 对照品均购于中国食品药品

收稿日期: 2021-09-27

作者简介: 邓映明 (1987—), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品、化妆品检验技术。E-mail: dengym13@163.com