

复方调元散挥发性成分分析

许俊洁，卢金清*，万丽娟，林杰，屠寒，黎强
(湖北中医药大学，湖北省药用植物研发中心，武汉 430065)

[摘要] 目的:研究复方调元散中的挥发性成分,探讨其治疗自闭症及相关症状的药效物质基础。方法:分别采用顶空固相微萃取法(HS-SPME)、水蒸气蒸馏法(SD)结合气质联用技术(GC-MS)对复方中挥发性成分进行分析鉴定;采用 HS-SPME-GC-MS 法对煎煮前后复方调元散挥发性成分进行对比分析。结果:SD 提取的复方挥发油中共检测出 48 种挥发性成分,鉴定出 28 种,占挥发性成分总量的 85.44%;HS-SPME 从煎煮前复方粉末中检测出挥发性成分 122 种,鉴定出 73 种,占挥发性成分总量的 75.56%,从煎煮后复方浸膏中检测出挥发性成分 50 种,鉴定出 27 种,占挥发性成分总量的 93.49%。3 次不同试验共鉴定出复方挥发性成分 97 种,含量最高的为 α -细辛脑。结论:该研究为复方调元散的挥发性成分分析提供了方法学基础,同时也为其治疗自闭症药效物质基础研究提供了参考依据。

[关键词] 调元散;挥发性成分;自闭症;顶空固相微萃取;水蒸气蒸馏法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0069-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110069

Analysis of Volatile Components of Tiaoyuan Powder XU Jun-jie, LU Jin-qing*, WAN Li-juan, LIN Jie, TU Han, LI Qiang (Hubei University of Chinese Medicine, Research and Development Center of Medicinal Plant in Hubei Province, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** Study the volatile components of Tiaoyuan powder and explore its pharmacodynamic material basis for the treatments of autism and related symptoms. **Method:** Headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) and steam distillation (SD) combined with gas chromatography and mass spectrometry technique (GC-MS) were used to analyze and identify volatile components; HS-SPME-GC-MS were used to analyze volatile components before and after decoction. **Result:** 48 volatile components were detected by SD-GC-MS, among them 28 were identified, accounting for 85.44% of the total volatile components. 122 volatile components were detected before the decoction, 73 were identified, accounting for 75.56% of the total volatile components. 50 volatile components were detected after the decoction, 27 were identified, accounting for 93.49% of the total volatile components. In three experiments a total of 97 peaks were identified; the highest content was α -asarone. **Conclusion:** This study not only provided a methodological foundation for volatile components analysis of Tiaoyuan powder, but also provided a reference on phamacodynamic material basis for improving autism.

[Key words] Tiaoyuan powder; volatile components; autism; HS-SPME; steam distillation

调元散始载于元代医家曾世荣的《活幼心书》，由山药、人参、茯苓、白术、白芍、熟地黄、当归、黄芪、川芎、甘草、石菖蒲 11 味中药组成，具有补肾健脾、调补元气、理气宁神的功效，主治小儿禀受元气不足，颅囟伺解，呆病、语迟、行迟等。现代临床研究表明调元散对自闭症及相关症状具有较好的治疗作用。曾世荣^[1]研制调元散对语迟、五软患儿进行治疗，发现服药后患儿言语发育障碍得到显著改善，肌肉逐渐富有力度，恢复正常。秦正生^[2]使用调元散对解颅患儿进行临床治疗，服药后患儿睡眠质量提高，四肢有力，与人交流顺畅，嬉戏自如，智力发育正常，临床治愈。

[收稿日期] 20140910(018)
[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2004AB242)
[第一作者] 许俊洁, 硕士, 从事中药及其天然产物活性成分研究, Tel:18986226537, E-mail: gexujunjie@163.com
[通讯作者] * 卢金清, 教授, 从事中药及其天然产物活性成分研究, Tel:027-68890101, E-mail: ljqs9169@sohu.com

调元散组方中含多味芳香类中药,富含挥发性成分,而挥发性成分多具有提神醒脑、镇静、抗惊厥等功效^[3],但目前尚无对本复方挥发性成分进行研究的报道。本试验旨在通过 HS-SPME-GC-MS、SD-GC-MS 分析方法,研究调元散中挥发性成分及复方煎煮前后挥发性成分的变化,以探讨其治疗自闭症及相关症状的药效物质基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 6890/5973 型气相-质谱-联用仪(美国 Hewlett-Packard 公司),手动顶空固相微萃取装置(德国 IKA 公司),65 μm PDMS/DVB 型萃取纤维头(美国 Supelco 公司)。

1.2 试药 山药、人参、茯苓、白术、白芍、熟地黄、当归、黄芪、川芎、甘草、石菖蒲(药材均来源于武汉强康药业有限公司)均经过湖北中医药大学生药教研室陈科力教授鉴定,符合 2010 年版《中国药典》项下标准;所用试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 样品前处理

2.1.1 水蒸气蒸馏法 按照复方比例称取处方各药共 91.5 g,加入 10 倍量水浸泡 3 h 后,照《中国药典》2010 年版附录 XD 方法提取,收集挥发油,取 0.2 mL 加乙醚稀释定容于 10 mL 量瓶中,用于 GC-MS 分析。

2.1.2 顶空固相微萃取法 按照复方比例称取处方中药,经粉碎后混合均匀,过 40 目筛。经过对取样量、萃取温度、平衡时间、萃取时间、洗脱时间等因素进行考察,得出了最佳的固相微萃取条件:取复方粉末 0.30 g 置于 5 mL 顶空瓶中,插入装有 65 μm PDMS/DVB 纤维头的手动进样器,85 $^{\circ}\text{C}$ 下预平衡 15 min,萃取 15 min,取出,立即插入气相色谱仪进样口中,解吸 5 min,进行 GC-MS 分析。

模拟临床煎药过程,制备调元散复方汤剂。将汤剂减压浓缩至膏状,取 0.30 g 按 2.1.2 项下方法进行萃取,随后进行 GC-MS 分析。

2.2 GC-MS 条件

2.2.1 SD 法 GC 条件为 HP-5MS 弹性石英毛细管柱(0.25 mm $\times$ 30 m,0.25 μm),进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,载气高纯氦气(99.999%),流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹,进样量 1 μL ,分流比 30:1。程序升温初始温度 60 $^{\circ}\text{C}$,以 15 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 130 $^{\circ}\text{C}$,再以 1 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 160 $^{\circ}\text{C}$,最后以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 180 $^{\circ}\text{C}$,溶剂延迟 3 min。MS 条件为离子源 EI,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,四级杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$,电子能量 70 eV,倍增管电压 1.2

kV,接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$,质量范围 m/z 35 ~ 550。

2.2.2 HS-SPME 法 GC 条件为 HP-5MS 弹性石英毛细管柱(0.25 mm $\times$ 30 m,0.25 μm),进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,载气高纯氦气(99.999%),流速 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹,不分流进样。程序升温初始温度 60 $^{\circ}\text{C}$,以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 80 $^{\circ}\text{C}$,再以 3 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 104 $^{\circ}\text{C}$,再以 8 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 115 $^{\circ}\text{C}$,保留 12 min,最后以 2 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 160 $^{\circ}\text{C}$ 。MS 条件同

2.2.1 项。

3 结果

采用 GC-MS 分析复方中挥发性成分,经化学工作站数据处理及面积归一化法从其总离子流图中计算各组分的相对含量,按各峰的质谱图,并结合 NIST05 谱库对化学成分进行检索鉴定。SD 法共检测出 48 种挥发性成分,其中鉴定出 28 种,占挥发性成分总量的 85.44%;HS-SPME 法共检测出挥发性成分 122 种,鉴定出 73 种,占挥发性成分总量的 75.56%,从煎煮后复方浸膏中共检测出挥发性成分 50 种,鉴定出 27 种,占挥发性成分总量的 93.49%。3 次不同试验共鉴定出复方挥发性成分 97 种,含量最高的为 α -细辛脑。见图 1~3 及表 1。

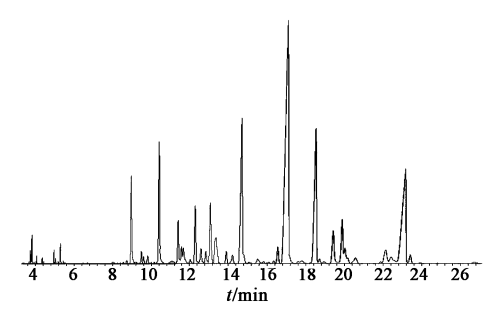


图 1 SD-GC-MS 分析复方挥发性成分 TIC
Fig. 1 Total ionic chromatogram of the volatile components in Tiaoyuan powder by SD-GC-MS

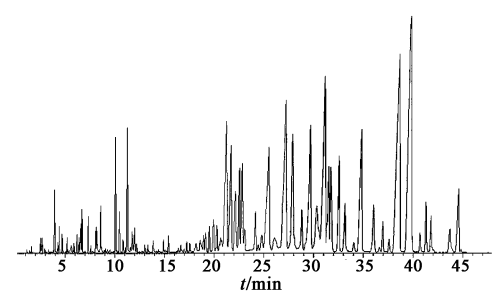


图 2 HS-SPME-GC-MS 分析复方煎煮前挥发性成分 TIC
Fig. 2 Total ionic chromatogram of the volatile components before Tiaoyuan powder decoction by HS-SPME-GC-MS

4 讨论

4.1 复方挥发性成分分析 复方中共鉴定出 97 种

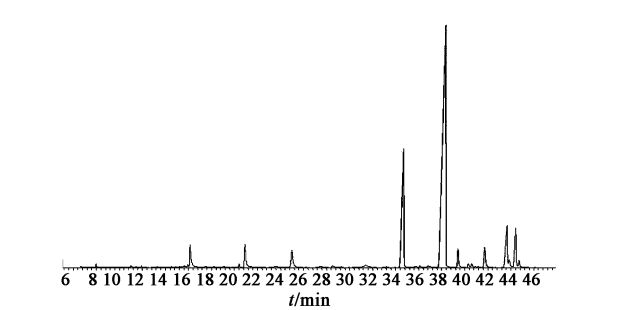


图 3 HS-SPME-GC-MS 分析复方煎煮后挥发性成分 TIC
Fig.3 Total ionic chromatogram of the volatile components after Tiaoyuan powder decoction by HS-SPME-GC-MS

挥发性成分,主要为烯类、低分子醚类、萜类等。根据分析结果并查阅相关文献资料发现,α-细辛脑能

表 1 不同方法检测结果中共有挥发性成分

Table 1 Volatile composition in the test results by three different methods

峰号	保留时间 /min	化学成分	分子式	相对质量分数/%		
				SD	煎煮前 HS-SPME	煎煮后 HS-SPME
1	3.83	反式-β-罗勒烯 (trans-β-ocimene)	C ₁₀ H ₁₆	0.62	0.29	—
2	4.08	萜品烯 (γ-terpinene)	C ₁₀ H ₁₆	0.10	0.26	—
3	4.37	萜品油烯 (terpinolene)	C ₁₀ H ₁₆	0.12	0.13	—
4	4.97	樟脑 (alcanfor)	C ₁₀ H ₁₆ O	0.28	1.05	—
5	5.19	合成右旋龙脑 [L(—)-borneol]	C ₁₀ H ₁₈ O	0.04	0.15	—
6	5.3	4-萜品醇 (4-terpineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	0.34	1.32	—
7	5.45	α-松油醇 (α-terpineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	0.10	0.26	—
8	8.74	丁香酚甲醚 (methyl eugenol)	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	3.20	0.59	2.59
9	9.48	1-石竹烯 (1-caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	1.11	2.86	—
10	9.81	异丁香酚甲醚 (methyl isoeugenol)	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	0.35	4.45	2.77
11	11.44	甘菊蓝 (azulene)	C ₁₀ H ₈	—	0.15	0.08
12	11.58	3-二甲基氨基苯甲醚 (3-dimethylaminoanisole)	C ₉ H ₁₃ NO	0.71	4.55	—
13	12.6	D-杜松烯 (D-cadinene)	C ₁₅ H ₂₄	0.83	2.39	—
14	13.07	香橙烯 (aromadendrene)	C ₁₅ H ₂₄	3.10	7.87	—
15	13.89	γ-榄香烯 (γ-elemene)	C ₁₅ H ₂₄	0.60	2.13	—
16	14.7	榄香素 (elemicin)	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	9.60	4.04	15.99
17	15.37	正十三烷 (n-tridecane)	C ₁₃ H ₂₈	—	0.19	0.03
18	16.23	对乙烯基愈疮木酚 (2-methoxy-4-vinylphenol)	C ₉ H ₁₀ O ₂	—	0.04	2.37
19	17.09	α-细辛脑 (α-asarone)	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	28.41	10.92	57.67
20	18.18	5-烯丙基愈创木酚 (5-allyl guaiacol)	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	—	0.21	0.15
21	18.52	2-(2-甲氧基苯氧基)苯酚 2-(2-methoxyphenoxy) phenol	C ₁₃ H ₁₂ O ₃	10.77	11.70	—
22	19.42	丁烯基苯酞 (butylidene phthalide)	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	2.44	0.42	0.43
23	19.89	桉利酮 (zierone)	C ₁₅ H ₂₂ O	2.99	0.83	0.11
24	23.15	2-烯丙基-4-甲基苯酚 (2-allyl-4-methylphenol)	C ₁₀ H ₁₂ O	12.76	1.72	—
25	43.67	2-丙基苯酚 (2-propylphenol)	C ₉ H ₁₂ O	—	0.61	5.15

够阻断中枢多巴胺受体和 α-肾上腺素能受体,从而发挥神经保护、中枢镇静、抗癫痫、抗惊厥、抗抑郁和安定作用^[4-5];榄香素能透过血脑屏障进入脑组织,对脑疾病具有一定的治疗作用^[6];1-石竹烯具有镇静中枢神经、保护胃黏膜、抗菌抗炎、镇咳祛痰、抗焦虑作用^[7-8];γ-榄香烯具有增强免疫力、抗氧化作用^[9];4-萜品醇具有良好的抗炎作用,能抑制自闭症患儿中单核细胞分泌超氧化物和炎症介质,减轻炎症反应对机体的损伤^[10-11];合成右旋龙脑具有保护中枢神经、促进药物透过血脑屏障,改善脑缺血,提高学习记忆能力的作用^[12-13]。研究显示自闭症与免疫功能低下、炎症、氧化应激、中枢神经功能紊乱、

肠胃炎症、持续的脑血流灌溉不足等相关。综上所述,本研究结果中 α -细辛脑、榄香素,1-石竹烯, γ -榄香烯,4-萜品醇和右旋龙脑具有改善自闭症症状的功效,为深入探讨复方调元散治疗自闭症的药效物质基础提供了参考依据。

4.2 复方煎煮前后挥发性成分的含量分析比较

复方中主要有效成分 α -细辛脑、榄香素在 3 次不同试验中均存在。 α -细辛脑和榄香素在复方粉末、挥发油和浸膏中的相对含量之和依次为 14.96%,38.01%,73.66%。1-石竹烯, γ -榄香烯,4-萜品醇,樟脑和右旋龙脑均是治疗自闭症的有效成分,其相对含量之和在复方粉末与挥发油中分别占 7.51%,2.37%,但在浸膏中未被发现。复方粉末经固相微萃取后检测到的化学成分 73 种,显著多于浸膏的 27 种,表明复方在模拟临床煎药的过程中丢掉了大量挥发性成分,故煎煮过程中应遵照芳香类药物后下的原则,充分利用复方调元散中的挥发性成分,对临床运用具有实践指导意义。通过本研究旨在以这些挥发性成分为基础,并结合调元散的其他有效成分提取出治疗自闭症的活性成分,以便制成方便携带和服用的中药新剂型。

4.3 不同分析方法对复方挥发性成分的分析

比较 SD-GC-MS 法检测出复方挥发性成分 48 种,鉴定出 28 种,占总挥发性成分的 85.44%;HS-SPME-GC-MS 法检测出煎煮前复方粉末挥发性成分 122 种,鉴定出 73 种,占总挥发性成分的 75.56%。2 种方法检测结果中共有挥发性成分有 20 种,主要为 α -细辛脑、榄香素,1-石竹烯,4-萜品醇等物质,且含量最高的成分均为 α -细辛脑。SD 法为常用的提取挥发性成分的方法,但其所需样品量大、溶剂多、提取耗时长、成分易于破坏,不适用于化学性质不稳定成分的提取;而 HS-SPME 技术无需溶剂,样品量小,重复性好,灵敏度高,操作简单,提取时间短,集萃取、富集、进样于一体,能减少操作误差,降低操作费用^[12]。在本研究中 HS-SPME 法比 SD 法检测物质更多,反映的信息更全面,具有准确快速方便的特点,更适用于中药复方挥发性成分分析。

[参考文献]

[责任编辑 顾雪竹]

[1] 张静.曾世荣主要学术思想阐释[J].中医儿科杂志,

2008,4(1):9-13.

[2] 秦正生,黄毓庆.中医儿科对治疗解颅的临床体会[J].辽宁中医杂志,1982,8(12):10.

[3] 方永奇,李翎.醒脑开窍中药治疗脑病的共性作用概况[J].广州中医药大学学报,2008,12(5):470-473.

[4] Yang L, Li S, Huang Y, et al. Effects of *Acorus gramineus* and its component, *alpha*-asarone, on apoptosis of hippocampal neurons after seizure in immature rats[J]. Neural Reg Res, 2008, 10(3):19-24.

[5] Shin J W, Cheong Y J, Koo Y M, et al. *alpha*-Asarone ameliorates memory deficit in lipopolysaccharide-treated mice via suppression of Pro-inflammatory cytokines and microglial activation[J]. Biomol Ther (Seoul), 2014, 22(1):17-26.

[6] 唐洪梅.石菖蒲治疗脑病的物质基础研究[J].时珍国医国药,2002,13(1):1-2.

[7] 陈旭冰,全诚,陈光勇. β -石竹烯的研究进展[J].山东化工,2011,40(7):34-36.

[8] 刘晓宇,陈旭冰,陈光勇. β -石竹烯及其衍生物的生物活性与合成研究进展[J].林产化学与工业,2012,32(1):104-110.

[9] 陈水根.一枝黄花挥发油在脐疗中的应用[N].中国中医药报,2014-4-9(5).

[10] Brand C, Ferrante A, Prager R H, et al. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca Alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated *in vitro* [J]. Inflamm Res, 2001, 50(4):213-219.

[11] Hart P H, Brand C, Caron C F, et al. Terpinen-4-ol, the main components of the essential oil of *Melaleuca Alternifolia* (tea tree oil) suppress inflammatory mediator production by activated human monocytes[J]. Inflamm Res, 2000, 49(11):619-626.

[12] 姚美村,邵建芳,邹佳丽,等.冰片作用特点研究综述[J].临床医药实践,2009,18(8):1977-1980.

[13] 何晓静,肇丽梅,刘玉兰,等.冰片注射液对小鼠实验性脑缺血的保护作用[J].华西药理学杂志,2005,20(4):323-325.

[14] 王英锋,刘娜,竺梅,等.顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定泽兰中的挥发性成分[J].首都师范大学学报:自然科学版,2011,32(1):38-43.