

文章编号 1006-8147(2021)06-0642-04

论著

整体柱固相萃取结合 GC-MS 鉴定中药苍术水煎液化学成分

张帆,程佳喆,焦盼,唐铖

(天津医科大学药学院天然药物学系,天津 300070)

摘要 目的:制备并采用整体柱固相萃取柱鉴定苍术水煎液中的化学成分。方法:以甲基丙烯酸缩水甘油酯为单体,甲基丙烯酸乙二醇酯为交联剂,环己醇和十二醇为致孔剂,偶氮二异丁腈为氧化还原引发剂,制备整体柱。采用所制备整体柱对苍术水煎液进行固相萃取,结合 GC-MS 分析确定苍术水煎液的化学成分。结果:所建立的方法精密度 1.08%,回收率为 93.23%~104.52%,相对标准偏差为 2.91%($n=6$),结合 GC-MS 从苍术水煎液鉴定确定茅术醇、 β -桉叶醇、苍术酮、红没药醇等化学成分。结论:采用所制备的整体柱固相萃取结合 GC-MS 分析可快速鉴定苍术中的化学成分。

关键词 苍术水煎液;固相萃取;挥发油;气相色谱-质谱联用

中图分类号 R917

文献标志码 A

Identification on the components of *Atractylodes lancea* by using Monolith Column Solid Phase Extraction combined with GC-MS analysis

ZHANG Fan, CHENG Jia-zhe, JIAO Pan, TANG Cheng

(Department of Natural Medicines, Pharmacy School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: Monolith column solid phase extraction column was prepared and used to identify the chemical components of *Atractylodes lancea* decoction. **Methods:** Using glycidyl methacrylate as monomer; ethylene dimethacrylate as a crosslinker; cyclohexanol and dodecanol as co-porogens; azobisisobutyronitrile as the redox initiation system, the monolithic column was synthesized. The prepared monolithic column was used for solid phase extraction of *Atractylodes lancea* decoction, and the chemical components analysis of *Atractylodes lancea* decoction combined with GC-MS analysis. **Results:** The precision of the assay was 1.08%. The average recovery of the assay was between 93.23% and 104.52%, with relative standard deviations of 2.91% ($n=6$). And the components of *Atractylodes lancea* decoction such as hinesol, β -eudesmol, atractylone, bisabolol, were identified by using monolith column solid phase extraction followed by GC-MS analysis. **Conclusion:** Monolith column solid phase extraction combined with GC-MS analysis can rapidly identify the components in *Atractylodes lancea* decoction.

Key words *Atractylodes lancea* decoction; solid phase extraction; volatile oil; GC-MS

苍术为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* 或北苍术 *Atractylodes chinensis* 的干燥根茎^[1],具有燥湿健胃、祛风湿、明目、抗炎等功效,能治湿困脾胃、倦怠嗜卧、食欲不振、肢节酸痛、夜盲等症^[2-4]。该药是医家最常用的中药之一。苍术发挥治疗疾病的作用与其所含的化学成分有关。故确定中药苍术所含化学成分组成对于该药作用机制的阐明以及临床应用都是有益的。传统的中药苍术化学成分研究多是采用 GC-MS 测定苍术醇提液的化学成分的方式进行^[5-10]。然而,中药苍术多是以水煎剂的形式给药的。在多种中药复方中如黄柏苍术汤、麻黄苍术汤、秦艽苍术汤等几种中药复方中都含有该药^[11-14]。国家

药监局进一步提出了标准煎剂的概念,并制定了标准煎剂的质量评价标准。水煎剂与醇提液的化学成分组成有较大的差异。水煎剂中还含有多糖等大量水溶性杂质。这些杂质不仅干扰药效物质的测定,而且还会降低分析方法的灵敏度。故寻找一种适用于中药苍术水煎液中化学成分鉴定的方法就显得较为重要了。

整体柱是一种由有机或无机聚合方法在空柱中进行原位聚合的连续棒状整体材料^[15]。与常规的填充型萃取柱相比,整体柱制备简单,可避免繁琐复杂的填充色谱柱过程;整体柱含有特殊的孔结构,渗透性良好,传质阻力小,可提高萃取效率^[16];还可通过选择性吸附、选择性洗脱的方式对样品进行富集、分离、净化^[17]。故本文探索将整体柱技术应用于中药苍术化学成分分析鉴定研究,结合 GC-MS 对中药苍术的化学成分进行鉴定。

基金项目 天津市自然科学基金(18JCYBJC95100);天津医科大学大学生创新创业资助计划(TMUUROP2021-46)

作者简介 张帆(1995-),女,硕士在读,研究方向:中药药效物质研究;通信作者:唐铖, E-mail: tangcheng@tmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 7890A-7975C GC-MS 联用仪(美国);BSA124S 型十万分之一电子天平(赛多利斯股份公司);循环水式真空泵(上海翔雅仪器设备有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KX-1740QT 型超声波清洗器(深圳市科玺化工有限公司);TGL-16M 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 材料 甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、甲基丙烯酸乙二醇酯(EDMA)、偶氮二异丁腈(AIBN)、环己醇和十二醇购自阿拉丁生化技术公司。正己烷、甲醇(色谱纯,山东博城化学有限公司);水为超纯水,其他试剂均为国产分析纯。苍术(河北安国药材市场)经天津医科大学药学院唐铎副教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* 的干燥根茎。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制 精密称取 β -桉叶醇标准品适量,用正己烷溶解,定容至 5 mL,摇匀,即得 50 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液。

1.3.2 供试品溶液的配制 称取适量苍术药材,粉碎,精密称取 5 g 粉末加入水 50 mL,煎煮 1.5 h,冷却至室温后补足失重,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.3 整体柱的制备与表征 采用热引发聚合的方法在注射器中制备整体柱,聚合过程如下:将单体 GMA、交联剂 EDMA、致孔剂环己醇和十二醇、引发剂 AIBN 按照配比制成预聚溶液,加入离心管中超声混匀,然后通氮气 10 min,将拔掉针头的注射器经脱气后抽取预聚溶液,封口后超声混匀 10 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴聚合 12 h,即得聚合物整体柱。反应结束后甲醇和水冲洗整体柱,除去未反应的单体和致孔剂。然后注入正丁胺,封闭整体柱两端,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 12 h。修饰完成后,分别用甲醇和水冲洗整体柱。在 4 000~400 cm^{-1} 范围内获得 FT-IR 光谱,以观察疏水整体柱的官能团。

1.3.4 整体柱固相萃取分析苍术化学成分 将水

煎液加入所制备整体柱,然后依次采用水、80%甲醇溶液作为洗脱液,收集的 80%甲醇溶液洗脱部分,浓缩至干,正己烷重溶后进样分析。

1.3.5 传统方法分析苍术化学成分 采用正己烷萃取苍术水煎液化学成分,萃取液经微孔滤膜过滤后进样分析。

1.3.6 GC-MS 分析条件 色谱条件:HP-5MS(30 mm \times 0.25 mm,0.25 μm)毛细管柱,程序升温:柱初始温度为 70 $^{\circ}\text{C}$,以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 255 $^{\circ}\text{C}$,保留 10 min,再以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 270 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量 1 μL ,维持 10 min;溶剂延迟 3 min;分流比为 50:1;气化室温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;载气为高纯度 He(99.999%)。质谱条件:EI 离子源;离子源温度为 230 $^{\circ}\text{C}$;电离能量为 70 eV;四极杆温度为 150 $^{\circ}\text{C}$;EM 电压 2 165 V;接口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$;扫描质量范围 m/z 100~650。

1.3.7 定性和定量 应用 NIST 8.0 谱库检索,并逐个解析各色谱峰相应的质谱图,对基峰、质荷比以及相对丰度等与标准图谱比较、鉴定。定量用峰面积归一化法计算各化学成分在挥发油中的相对百分含量。

2 结果

2.1 疏水整体柱制备及表征 为了获得具有良好渗透性和机械稳定性的整体柱,对不同聚合物整体柱进行柱背压试验,考察单体/致孔剂比例及致孔剂比例两个参数的影响。

2.1.1 十二醇含量 随着十二醇的增加,柱体内大孔的比例增加,导致柱压逐渐下降,渗透性和机械稳定性增加(表 1)。此外,当十二醇的用量达到 7%时,整体柱渗透性较差。当十二醇含量为 10%时,整体柱柱背压低、渗透性和机械稳定性良好。

2.1.2 致孔剂配比 如表 1 所示,随着致孔剂总用量比的增加,整体柱材料孔隙率增多,结构疏松,使得整体柱的柱压下降,渗透性增加。综合考虑机械稳定性和渗透性等参数,选择 9:1(环己醇:十二醇)和 1:3(v/v)的单体与致孔剂的混合比例作为合适的配比。

表 1 疏水整体柱的聚合参数

Tab 1 Synthesis parameters on the hydrophobic monolithic column

柱 ¹	单体/致孔剂	GMA(%)	EDMA(%)	环己醇(%)	十二醇(%)	柱背压 ² (MPa)	渗透率 ³ ($\times 10^{-15}$ m^2)
1	1:4	75	25	93	7	2.7	20.52
2	1:3	75	25	90	10	1.9	29.17
3	1:2	75	25	87	13	1.6	34.64
4	2:3	75	25	84	16	1.2	46.19
5	1:1	75	25	67	33	1.0	55.42

注:1.加入 1%(w/v)AIBN 制备整体柱;2.用甲醇冲洗,流速 1 mL/min;3.渗透率按达西定律计算($B_0=f\eta L/\Delta P\pi R^2$),25 $^{\circ}\text{C}$ 时甲醇黏度为 0.58×10^{-3} (Pa \cdot s);GMA:甲基丙烯酸缩水甘油酯;EDMA:甲基丙烯酸乙二醇酯

2.1.3 疏水整体柱的表征 通过 FT-IR 表征得到的整体柱如图 1 所示。1 612 cm^{-1} 处易识别的峰较弱,对应于甲基丙烯酸缩水甘油酯和乙二醇二甲基丙烯酸酯的双键聚合。在 1 730 cm^{-1} 处的峰值是制备的整体柱中乙二醇-二甲基丙烯酸酯杂化物 C=O 键的特征吸收。3 422 cm^{-1} 处的 N-H 峰表明正丁胺成功修饰聚 GMA-EDMA(甲基丙烯酸缩水甘油酯-甲基丙烯酸乙二醇酯)整体柱。

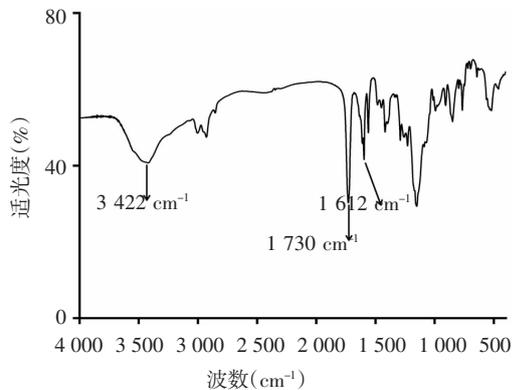


图 1 疏水整体柱的红外光谱

Fig 1 Infrared spectrum of hydrophobic monolithic column

2.2 整体柱固相萃取结合 GC-MS 分析方法学考察

2.2.1 精密度试验 取 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 β -桉叶醇标准品溶液,按“1.3.5”GC-MS 条件进行分析,连续进样 6 次,结果显示, β -桉叶醇的相对标准偏差(RSD)为 1.08%。

2.2.2 重复性试验 取同一批整体柱,按“1.3.4”项下方法平行萃取制备 5 份供试品溶液,按“1.3.5”项下 GC-MS 条件进样测定,记录峰面积,计算得到样品中 β -桉叶醇的平均含量为 35.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$,RSD 为 1.66%,表明该方法重现性良好。

2.2.3 加标回收率试验 对经过预处理样品中的 β -桉叶醇进行加标回收率测定,按照相当于供试品中成分含量的 80%、100%、120% 比例加入 β -桉叶醇对照品,按“1.3.4”项下方法制备供试品溶液,按“1.3.5”项下 GC-MS 条件进样测定,记录峰面积,计算平均加样回收率,结果见表 2。 β -桉叶醇加样回收率在 93.23%~104.52%,RSD 为 2.91%($n=9$),表明该方法准确性良好。

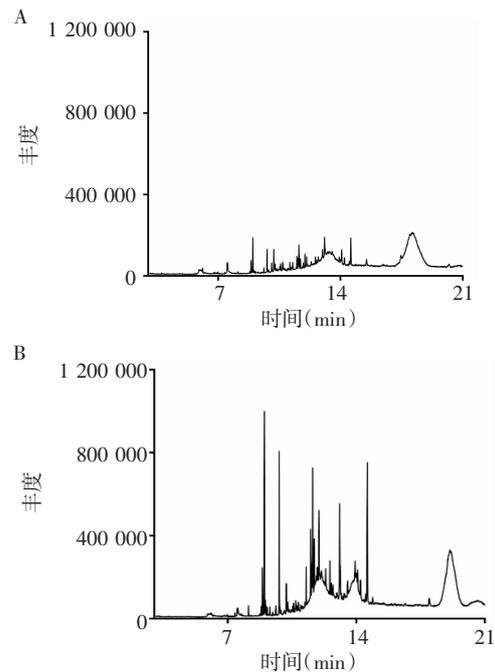
2.3 苍术化学成分分析 应用 GC-MS 对整体柱固相萃取后的苍术水煎液样品进行分析,以面积归一化法计算各组分的相对百分含量,结合质谱计算机软件、NIST 8.0 质谱库和文献资料共同分析,鉴定结果见表 2。

表 2 苍术的化学成分

Tab 2 The components of *Atractylodes lancea*

序号	相对分子质量	化合物名称	分子式	固相萃取相对百分含量(%)
1	204	瓦伦烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	2.551
2	222	茅苍术醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	2.456
3	222	β -桉叶醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	7.630
4	216	苍术酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$	1.524
5	222	α -甜没药萜醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	1.370
6	206	2,4-二(1,1-二甲基乙基)苯酚	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$	3.441
7	192	β -紫罗蓝酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$	5.164
8	182	1,1'-二苯基-4-甲醛	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}$	7.913
9	280	(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	2.214
10	260	2-(3,7-二甲基-八,辛-2,6-二烯基)-4-对甲氧基-苯酚	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2$	8.498
11	472	2,3-二氢基-4-(戊氧基)苯基-4-(4-环己基)-苯甲酸酯	$\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3$	38.532

2.4 与传统分析方法对比 应用 GC-MS 分别对传统的正己烷萃取法及整体柱固相萃取后的苍术水煎液样品进行分析,得到总离子流图,见图 2。从图中可以看出,传统方法水煎液所得到的色谱响应值(图 2A)低于固相萃取法(图 2B)。



注:A.正己烷萃取法;B.整体柱固相萃取法

图 2 苍术水煎液总离子流图

Fig 2 Total ion current chromatogram of *Atractylodes lancea* decoction

3 讨论

中药水煎剂是传统中医临床用药的主流,水煎煮也更接近服用药物的真实情况。在临床治疗过程

中,苍术常被制成黄柏苍术汤、麻黄苍术汤、秦艽苍术汤等经典名方,且这些经典方剂大多以水煎剂的形式应用于临床^[11-14]。研究苍术水煎液中的主要化学成分对于该类方剂的研究也是较为重要的。然而水煎剂中水溶性杂质较多,不仅影响对化学成分鉴定的准确性,还影响色谱的分离度。故本文以 GMA 为单体,EDMA 为交联剂,环己醇和十二醇为致孔剂,AIBN 为氧化还原引发体系,通过正丁胺修饰成功制备了渗透性良好的聚(GMA-EDMA-正丁胺)疏水整体柱。据报道苍术主要的有效成分是由倍半萜类和聚乙烯烯类等化学成分组成^[6],该类化学成分具有降血糖、抗凋亡、抗氧化、抗肿瘤、抗炎等活性。而苍术传统水煎液中不仅包含此类化学成分,还包含多糖等水溶性的化学成分。这些杂质不仅干扰药效物质的测定,而且还会降低分析方法的灵敏度。故在本研究中建立并采用整体柱固相萃取苍术水煎液中化学成分。采用整体柱固相萃取可避免苍术水煎液中水溶性杂质对分析的干扰,结合 GC-MS 联用技术可对苍术水煎液的化学成分进行鉴定。 β -桉叶醇等半萜类化学成分常被用于苍术的质量控制研究^[18-19]。故本文也采用该化学成分进行方法学考察。结果表明该方法具有较好的精密度和准确度。

在洗脱溶剂的选择方面,在研究中比较了10%、50%、80%的甲醇。通过 GC-MS 的分析表明80%的甲醇可较完全的将苍术中的化学成分洗脱下来。故在后续研究中,采用该比例的甲醇进行洗脱;在 GC-MS 分析条件方面,本文考察了不同的分流比。随着分流比增大,GC-MS 图谱的检出成分减少,分流比越小 GC-MS 检出成分越多,但定性分析发现,分流比较小时苍术 GC-MS 图谱中有少量柱流失物色谱峰。因此,综合色谱峰检出情况,实验选择分流比 50:1。

总之,本文制备并应用整体柱结合 GC-MS 分析对苍术水煎液中化学成分进行了鉴定。该方法操作简单、稳定性高、重复性好,回收率高,可为中药苍术水煎剂的整体质量评价与控制提供新思路。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2020 版(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 168
- [2] KOONRUNGSESOMBOON N, NA -BANGCHAG K, KARBWANG J. Therapeutic potential and pharmacological activities of *Atractylodes lancea*(Thunb) DC[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(6):421
- [3] 李英姬, 朴惠善. 关苍术的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(1): 12
- [4] 赵千里, 王美娟, 赵敏. 关苍术的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3797
- [5] 高岩, 王知斌, 杨春娟, 等. GC-MS 联用法分析不同产地茅苍术挥发油成分[J]. 中医药学报, 2017, 45(3): 35
- [6] 李万娟, 郭艳玲, 商春丽, 等. 北苍术化学成分的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 66
- [7] 吉力, 敖平, 潘炯光, 等. 苍术挥发油的气相色谱-质谱联用分析[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 182
- [8] 计禹, 王悦, 朴锦. GC-MS 分析关苍术挥发性成分[J]. 延边大学农学学报, 2018, 40(3): 52
- [9] 刘晓冬, 阎雪, 卫永, 等. 苍术挥发油成分的分析[J]. 分析测试学报, 1998, 17(3): 58
- [10] 姚发业, 刘文英, 邱琴, 等. 北苍术挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2001, 24(9): 643
- [11] 李薇薇, 刘磊, 刘先洋, 等. 张国海运用麻黄苍术汤“肝脾同调”治疗寒湿型咳嗽经验[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(12): 2224
- [12] 李璐璐, 胡馨, 尚菊菊, 等. 苍术麻黄汤及其组成成分在血脂异常治疗中的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2020, 19(5): 524
- [13] 杨虹, 罗干, 熊梓汀, 等. 黄柏苍术汤对急性痛风性关节炎鼠模型抗炎作用的研究[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(1): 104
- [14] 李铁, 吕恩基. 秦艽苍术汤加减保留灌肠治疗大肠湿热型溃疡性结肠炎的临床观察[J]. 黑龙江医药, 2018, 31(6): 1262
- [15] 邱姗姗, 何梓桑, 钟东玲, 等. 整体固相萃取材料的制备及应用研究[J]. 质量与安全检验检测, 2020, 30(6): 96
- [16] 杨嘉慧, 陈飞龙, 侯军沛, 等. 固相萃取-高效液相色谱-双检测器法测定垃圾渗滤液中的多环芳烃[J]. 山东化工, 2020, 49(21): 86
- [17] 陈玲, 李明, 韩亚星, 等. 聚(甲基丙烯酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯)整体柱合成及微萃取应用[J]. 湖北大学学报, 2018, 40(4): 357
- [18] 孙金, 翁丽丽, 肖春萍, 等. HPLC—测多评法结合色差原理分析不同生长年限北苍术药材的质量[J]. 中国药房, 2020, 31(11): 1314
- [19] 朱利霞, 黄青, 王茹静, 等. 苍术药材的质量标准研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 3046

(2021-03-31 收稿)