

顶空固相微萃取-气质联用技术分析川芎酒炙前后的挥发性成分

曹利*,卢金清#,叶欣,王樊(湖北中医药大学药学院/湖北省药用植物研发中心,武汉 430065)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3945-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.16

摘要 目的:比较川芎生品和酒炙品挥发性成分的差异,为川芎的药理活性研究及临床应用提供参考。方法:采用顶空固相微萃取-气质联用技术分析川芎酒炙前后的挥发性成分,并运用面积归一化法计算各成分的相对百分含量。结果:从川芎生品中分离出28个成分,鉴定出24个成分,占总挥发性成分的99.70%,含量较高的分别为2-甲基-2,3-二氢-1H-茚-2-醇(20.06%)、 α -芹子烯(17.97%)及4-乙基-壬烯-5-炔(9.24%)。从川芎酒炙品中分离出21个成分,鉴定出18个成分,占总挥发性成分的89.74%,含量最高的为4-乙基-壬烯-5-炔(12.97%),其次为4-蒈烯(11.74%)和 α -芹子烯(10.79%);与生品相比,有效镇痛成分 α -蒎烯、 β -榄香烯含量有所增加。结论:川芎酒炙前后挥发性成分及相对百分含量存在一定差异,酒炙后挥发性成分相对减少,但有镇痛作用的成分含量增加,镇痛效果优于生品。

关键词 川芎;生品;酒炙品;挥发性成分;顶空固相微萃取;气质联用

Analysis of Volatile Ingredients of *Ligusticum chuanxiong* before and after Processed with Wine by Head-space Solid Phase Microextraction-GC/MS

CAO Li, LU Jinqing, YE Xin, WANG Fan (School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine/Research and Development Center of Medicinal Plant in Hubei Province, Wuhan 430065, China)

蛋白表达增加,表明PG破坏了A375细胞中的线粒体膜电位,使线粒体膜通透性增加,细胞色素C进入细胞基质,加剧了细胞凋亡。

综上所述,PG能抑制A375细胞活性、促进细胞凋亡,其是通过破坏线粒体膜电位、促进细胞色素C外流来发挥促凋亡作用的。

参考文献

- [1] 张国强,张朝利,丁政云,等.恶性黑色素瘤治疗的新进展[J].中国老年学杂志,2015,11(35):6281-6284.
- [2] Hübner J, Waldmann A, Geller AC, et al. Interval cancers after skin cancer screening: incidence, tumour characteristics and risk factors for cutaneous melanoma[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(2):253-259.
- [3] Green B, Elhamshary A, Gomez R, et al. An update on the current management of head and neck mucosal melanoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2017, 46(7):475-479.
- [4] 何盛江,聂阳,陈刚,等. HPLC法同时测定不同产地羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J].中国药房,2016,27(33):4719-4721.
- [5] 邓立华,刘丹,雷韵涛,等.羊蹄根有效部位的初步分离[J].吉林医药学院学报,2009,30(4):197-199.
- [6] 尚小雅,刘威,赵聪伟,等.羊蹄甲属植物化学成分和药理活性的研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(6):709-
- 717.
- [7] 吴琪,黄璐,茹梦,等.羊蹄化字成分及其抗肿瘤活性研究[J].药学与临床研究,2013,21(3):227-229.
- [8] Li YP, Takamiyagi A, Ramzi ST, et al. Inhibitory effect of *Rumex japonicus* houtt on the porphyrin photooxidative reaction[J]. *J Dermatol*, 2000, 27(12):761-768.
- [9] Alzoreky N, Nakahara K. Antioxidant activity of some edible yemeni plants evaluated by ferrylmyoglobin/abts⁺ assay[J]. *Food Sci Technol Res*, 2001, 7(2):141-144.
- [10] Xie QC, Yang YP. Anti-proliferative of physcion 8-O- β -glucopyranoside isolated from *Rumex japonicus* Houtt. on A549 cell lines via inducing apoptosis and cell cycle arrest [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14(1):1-10.
- [11] Ding Z, Xu F, Tang J, et al. Physcion 8-O- β -glucopyranoside prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer HCT116 cells by modulating EMMPRIN[J]. *Neoplasma*, 2016, 63(3):351-361.
- [12] Liu M, Xiong S, Tan F, et al. Physcion 8-O- β -glucopyranoside induces mitochondria-dependent apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cells via suppressing survivin expression[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(5):687-697.
- [13] Chen X, Guo H, Li F, et al. Physcion 8-O- β -glucopyranoside suppresses the metastasis of breast cancer in vitro and in vivo by modulating DNMT1[J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 69(1):36-44.

(收稿日期:2017-04-17 修回日期:2017-08-16)

(编辑:邹丽娟)

* 硕士研究生。研究方向:中药及其天然产物活性成分。电话:027-68890101。E-mail:15377575302@163.com

通信作者:教授。研究方向:中药及其天然产物活性成分。电话:027-68890101。E-mail:ljq59168@163.com

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the differences in the volatile ingredients of raw products and wine processed products of *Ligusticum chuanxiong*, and provide reference for its pharmacological activity research and clinical application. METHODS: Headspace solid phase microextraction-GC/MS was used to analyze the volatile components of *L. chuanxiong* before and after processed with wine. And area normalization method was adopted to calculate the relative percentage content of each component. RESULTS: 28 components were isolated from the raw products and 24 components were identified, accounting for 99.70% of total volatile components. 2-methyl-2,3-dihydro-1H-inden-2-ol (20.06%), α -selinene (17.97%) and 4-ethyl-3-nonen-5-yne (9.24%) were higher in contents. 21 components were isolated from the wine processed products and 18 components were identified, accounting for 89.74% of total volatile components. 4-ethyl-nonen-5-yne (12.97%) was the highest in content, followed by 4-carene (11.74%) and α -selinene (10.79%). Compared with raw products, the contents of active components α -pinene and β -elemene were increased. CONCLUSIONS: The volatile components and their relative contents of *L. chuanxiong* before and after processed with wine show certain differences, and volatile components after wine processed are relatively reduced. However, contents of the components with analgesic effect are increased, and its analgesic effect is superior to raw products.

KEYWORDS *Ligusticum chuanxiong*; Raw products; Wine processed products; Volatile components; Headspace solid phase microextraction; GC-MS

川芎为伞形科植物川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的干燥根茎^[1], 始载于《神农本草经》^[2], 属栽培植物, 主产于四川灌县, 在云南、贵州、广西等地均有栽培, 生长于温和气候环境。川芎性辛、温, 归肝、胆、心包经, 具有活血行气、祛风止痛之功效, 主要用于治疗胸痹心痛、胸胁刺痛、跌扑肿痛、闭经痛经、头痛、风湿痹痛、癥瘕腹痛^[1]。

川芎生品中含有挥发油、生物碱、有机酸、多糖等化学成分。挥发性成分是挥发油的主要组成部分, 而挥发油是川芎中重要的活性物质。现代药理研究表明, 川芎挥发油不仅可解痉, 而且对缺血性脑血管疾病疗效显著; 除此之外, 其还具有抗凝血、解热镇痛等作用^[3]。中医认为, 酒炙能改变药性、引药上行, 或能增强活血通络作用, 或能矫臭去腥。与川芎生品相比, 川芎酒炙品颜色较深, 气味较淡, 且镇痛、活血、调经的作用更优^[4], 临幊上多用于治疗疼痛病症^[5]。目前, 川芎化学成分研究主要集中于挥发油、生物碱、有机酸、多糖等, 挥发性成分的分析及鉴定涉及较少, 且尚未见川芎生品和酒炙品挥发性成分的比较研究。因此, 笔者在本研究中采用顶空固相微萃取-气质联用技术(GC-MS)分析川芎酒炙前后挥发性成分的变化, 为后续药理活性研究奠定基础。同时, 考察酒炙对川芎中挥发性成分的组成和相对百分含量的影响, 为川芎的临床应用提供科学依据, 为其进一步研究及综合开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent6890/MS5973 型 GC-MS 仪(美国 Agilent 公司); 65 μm 聚二甲基硅氧烷(PDMS)-二乙烯基苯(DVB)萃取头、100 μm PDMS 萃取头(美国 Supelco 公司); ALC-210.2 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 药材与试剂

川芎生品购于湖北聚瑞中药饮片有限公司, 经湖北中医药大学生药教研室张秀桥教授鉴定为伞形科植物

川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的干燥根茎; 黄酒(浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 川芎酒炙品的制备

参照2015年版《中国药典》(四部)0213炮制通则中的炮制方法。取100 g川芎生品, 加10 g黄酒拌匀、闷透, 置炒制容器内, 用文火炒至表面微黄时取出, 放凉, 备用。

2.2 GC-MS色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱: HP-5MS 石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm); 程序升温: 初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 70 $^{\circ}\text{C}$, 保留 1 min, 以 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 110 $^{\circ}\text{C}$, 以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 160 $^{\circ}\text{C}$, 以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 190 $^{\circ}\text{C}$, 保留 2 min; 进样口温度: 230 $^{\circ}\text{C}$; 载气: 高纯氦气(纯度: 99.999%); 载气流速: 0.8 mL/min。

2.2.2 质谱条件 离子源: 电子轰击(EI)源; 离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$; 四级杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 接口温度: 280 $^{\circ}\text{C}$; 电子能量: 70 eV; 倍增管电压: 1.2 kV; 质荷比(m/z)范围: 35~550。

2.3 GC条件的优化

2.3.1 萃取纤维头的选择 取川芎生品粗粉 1.5 g, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 20 min 后, 再压缩手柄伸出萃取头萃取 10 min, 分别考察 65 μm PDMS-DVB 和 100 μm PDMS 两种萃取头对川芎生品挥发性成分的萃取能力。按“2.2”项下条件进样测定, 以样品中主要挥发性成分 2-甲基-2,3-二氢-1H-茚-2-醇、 α -芹子烯和 4-乙基-壬烯-5-炔的峰面积来评价这 2 种萃取头效果。结果, 65 μm PDMS-DVB 萃取头对这 3 种化合物的响应均优于 100 μm PDMS 萃取头, 故选用 65 μm PDMS-DVB 萃取头。2 种萃取头对川芎生品中 3 种主要成分峰面积的响应结果详见图 1。

2.3.2 取样量的优化 分别精密称取川芎生品粗粉 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 20 min 后, 再压缩手柄伸出 65 μm PDMS-DVB 萃取头萃取 10 min, 按

“2.2”项下条件进样测定。结果,当取样量 ≥ 2.0 g时,萃取吸附量达到饱和,故2.0 g为最佳取样量。取样量-总峰面积关系图见图2A。

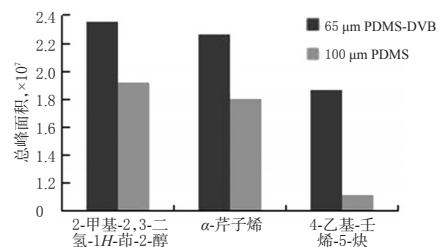


图1 2种萃取头对川芎生品中3种主要成分峰面积的响应结果

Fig 1 Response results of 2 extraction heads on peak areas of 3 main components in the raw products of *L. chuanxiong*

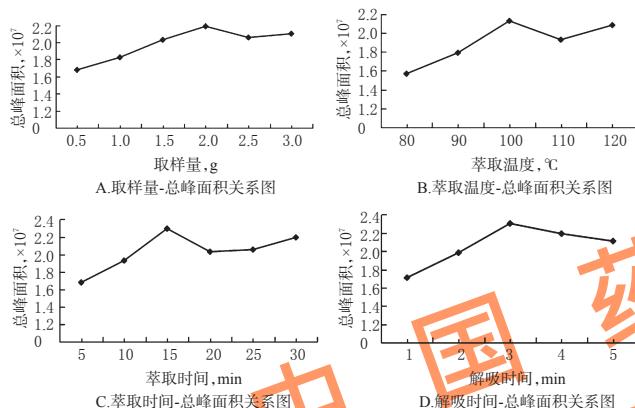


图2 顶空固相微萃取条件优化的单因素考察结果

Fig 2 Investigation results of single factor optimized by headspace solid phase microextraction conditions

2.3.3 萃取温度的优化 精密称取川芎生品粗粉2.0 g,在其他条件不变的情况下,分别在80、90、100、110、120 ℃条件下对川芎生品粗粉进行萃取,按“2.2”项下条件进样测定。结果,温度为100 ℃时,能达到最佳萃取效果。萃取温度-总峰面积关系图见图2B。

2.3.4 萃取时间的优化 精密称取川芎生品粗粉2.0 g,100 ℃下加热平衡20 min,缓缓伸出65 μm PDMS-DVB萃取头,分别萃取5、10、15、20、25、30 min,按“2.2”项下条件进样测定。结果,当萃取时间为15 min时,吸附量趋于平衡,故确定15 min为最佳萃取时间。萃取时间-总峰面积关系图见图2C。

2.3.5 解吸时间的优化 精密称取川芎生品粗粉2.0 g,100 ℃下加热平衡20 min,伸出萃取头萃取15 min,取出,立即插入色谱仪进样口,分别解吸1、2、3、4、5 min,按“2.2”项下条件进样测定。结果,当解吸时间为3 min时,总峰面积趋于最大,故确定3 min为最佳解吸时间。解吸时间-总峰面积关系图见图2D。

2.3.6 GC条件的确定 综合“2.3.1”~“2.3.5”项下考察

结果,确定GC的最佳条件为:取川芎生品粗粉2.0 g,置于15 mL顶空瓶中,插入装有65 μm PDMS-DVB萃取纤维头的手动进样器,在100 ℃下平衡20 min后,再压缩手柄伸出萃取头萃取15 min,取出,立即插入气相色谱仪进样口(温度230 ℃)解吸3 min,不分流进样。川芎酒炙品萃取条件同上。

2.3.7 重复性试验 分别取川芎生品、川芎酒炙品各6份,按“2.3.6”项下条件萃取,按“2.2”项下条件进样测定。结果,生品和酒炙品中各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别小于2.85%、3.05%($n=6$),表明该方法重复性较好,适合川芎生品和酒炙品挥发性成分的分析鉴定。

2.4 川芎酒炙前后挥发性成分的考察

按照“2.3.6”项下条件,采用GC-MS法对川芎酒炙前后的挥发性成分进行检测分析,得到各自挥发性成分的总离子流图。各峰的质谱图经化学工作站数据处理,用面积归一化法从各总离子流图中计算各组分的相对百分含量,按各峰的质谱图经美国国家标准与技术研究院(NIST)质谱数据库(2005年版)检索,并结合相对保留时间,对检测出的成分进行鉴定,结果见图3、表1。

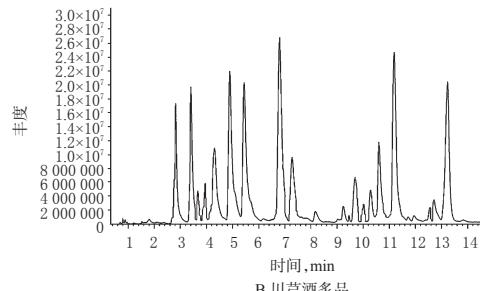
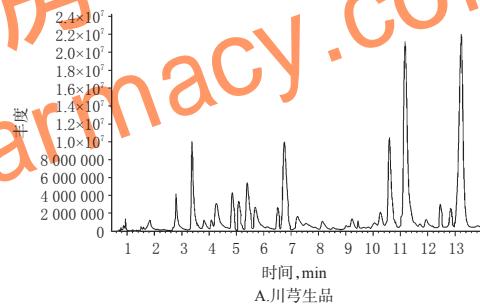


图3 川芎生品与酒炙品挥发性成分的总离子流图

Fig 3 Total ion flow of volatile components in raw products and wine processed products of *L. chuanxiong*

3 讨论

本研究采用GC-MS技术,共鉴定出川芎生品及酒炙品中30个成分。其中,从川芎生品中共分离得到了28个峰,鉴定出24个成分,占总挥发性成分的99.70%;其主要成分有烯类、醇类、酯类及烷烃类,含量最高的为2-甲基-2,3-二氢-1H-茚-2-醇(20.06%),其次是 α -芹子烯(17.97%)及4-乙基-壬烯-5-炔(9.24%)。从川芎酒炙品

表1 川芎酒炙前后总挥发性成分测定结果

Tab 1 Determination results of total volatile components in *L. chuanxiong* before and after processed with wine

峰号	保留时间, min	化学成分	分子式	m/z	相对百分含量, %	
					川芎生品	川芎酒炙品
1	1.84	丁酸	C ₄ H ₈ O ₂	88	1.07	0.37
2	2.71	4-甲基-1-(1-甲基乙基)-3-环己烯-1-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.78	1.46
3	2.80	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.96	4.23
4	3.38	桧烯	C ₁₀ H ₁₆	136	5.01	1.38
5	3.41	伪柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	136	—	5.76
6	3.64	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.71	—
7	3.82	2-辛醇	C ₈ H ₁₈ O	126	0.80	—
8	3.89	α-水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	136	—	0.85
9	4.27	邻异丙基甲苯	C ₁₀ H ₁₄	134	3.23	—
10	4.31	间异丙基甲苯	C ₁₀ H ₁₄	134	—	5.79
11	4.85	γ-松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136	2.79	10.07
12	5.40	4-蒈烯	C ₁₀ H ₁₆	136	4.75	11.74
13	5.69	环己醇	C ₆ H ₁₂ O	154	5.30	—
14	6.75	4-乙基-壬烯-5-炔	C ₁₁ H ₁₈	150	9.24	12.97
15	7.24	4-蒈品醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.56	6.00
16	7.55	对甲基苯异丙醇	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.98	—
17	8.55	3-蒈烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.15	—
18	9.01	乙酸龙脑酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	0.22	—
19	9.03	醋酸	C ₂ H ₄ O ₂	196	—	0.16
20	9.23	十三烷	C ₁₃ H ₂₈	184	0.82	0.79
21	9.70	对乙烯基愈疮木酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	150	—	3.44
22	9.82	α-荜澄茄油萜	C ₁₅ H ₂₄	204	0.15	—
23	10.27	β-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.48	1.77
24	10.82	7,11-二甲基-3-亚甲基-1,6,10-十二碳三烯	C ₁₉ H ₂₄	204	1.16	—
25	11.18	α-芹子烯	C ₁₅ H ₂₄	204	17.97	10.79
26	11.71	甘香烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.36	—
27	11.94	桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₂ O	220	1.02	0.50
28	12.56	2-氨基苯并咪唑	C ₇ H ₈ N ₃	133	—	0.67
29	13.23	2-甲基-2,3-二氢-1H-茚-2-醇	C ₉ H ₁₂ O	148	20.06	—
30	13.81	5,7,8-三甲基-2-氢香豆素	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	188	0.34	—

注:“—”表示未检测出

Note: “—” indicated it was not detected

中共分离得到了23个峰, 鉴定出18个成分, 占总挥发性成分的89.74%; 其主要成分为烯类和醇类, 其次还有酸类及酚类等, 含量从高到低依次为4-乙基-壬烯-5-炔(12.97%)、4-蒈烯(11.74%)和α-芹子烯(10.79%)。两者共有的挥发性成分有12种, 其中含量最高的是α-芹子烯(生品: 17.97%、酒炙品: 10.79%), 其次是4-乙基-壬烯-5-炔(生品: 9.24%、酒炙品: 12.97%)、4-蒈烯(生品: 4.75%、酒炙品: 11.74%)。川芎酒炙前后挥发性成分及其相对百分含量存在一定差异, 且川芎酒炙后挥发性成分明显减少。

川芎酒炙前后的相同成分中, γ-松油烯具有较强的抑制肝癌细胞增殖的作用, 且抑制作用呈现明显的量效关系^[6]; β-榄香烯可以作为广谱抗肿瘤新药^[7]; α-芹子烯具有较强的抗炎、抗菌作用^[8]; 4-蒈品醇可以减轻炎症反应对机体的损伤, 还可有效减轻组胺引起的水肿反应^[9]; 丁酸对于防治肠道疾病的益生菌具有较大的研究价值^[10]; 以上成分可能是川芎抗炎、抗癌、抗肿瘤作用的活性成

分。此外, 川芎生品中的镇痛成分乙酸龙脑酯^[11]和β-蒎烯^[12]的相对百分含量分别为0.22%、0.71%, 二者相对百分含量低且酒炙后消失; 而川芎酒炙品中产生的新镇痛成分α-蒎烯的相对百分含量为4.23%, 远大于川芎生品中乙酸龙脑酯和β-蒎烯二者相对百分含量之和, 且相同的镇痛成分β-榄香烯^[13]在酒炙后相对百分含量增加了0.29%。这为川芎酒炙后镇痛作用增强提供了依据。

综上所述, 川芎酒炙前后其挥发性成分的组成和含量变化较大, 酒炙后川芎治疗疼痛的效果更好。本研究对比分析了川芎酒炙前后挥发性成分的差异, 为后期川芎进一步的开发研究提供了物质基础, 并为川芎在临床上的合理应用提供了参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:73.
- [2] 张晓琳, 徐金娣, 朱玲英, 等. 中药川芎研究新进展[J]. 中药材, 2012, 35(10):1706-1711.
- [3] 谢秀琼, 詹珂, 尹蓉莉, 等. 川芎挥发油的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6):1508-1510.
- [4] 黄勤挽, 黄媛莉, 韩丽, 等. 川芎配方颗粒的药理等效性实验[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(2):154-157.
- [5] 李滨萍, 冯倩茹, 区炳雄, 等. 正交试验法优选酒制川芎的微波炮制工艺[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 347-349.
- [6] 叶奎川, 殷中琼, 魏琴, 等. 油樟叶挥发油及其主要成分的体外抗肝癌活性[J]. 解剖学报, 2012, 43(3):381-386.
- [7] 花文峰, 蔡绍晖. β-榄香烯抗肿瘤作用的基础与临床研究[J]. 中药材, 2006, 29(1):93-97.
- [8] 余红, 张小平, 邓明强, 等. 多花黄精挥发油GC-MS分析及其生物活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5):4-6.
- [9] Hart P, Brand C, Carson CF, et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (teatreeoil), suppresses sinflamatory mediator production by activated human monocytes[J]. *Inflamm Res*, 2000, 49(11):619-626.
- [10] Brand C, Ferrante A, Prager RH, et al. The water-soluble component soft the essential oil (teatreeoil) suppresses the production of superoxide by humanmonocytes, but not neutrophils activated invitro[J]. *Inflamm Res*, 2001, 50 (4): 213-219.
- [11] 张明发, 沈雅琴. 砂仁临床药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2013, 10(1):8-13.
- [12] 衣晓明, 宋述芹, 谷茂. 白兰花挥发性物质GC/MS分析[J]. 深圳职业技术学院学报, 2016, 15(1):50-53.
- [13] 许俊杰, 龚敏操, 陈眉. 郁金提取物对福尔马林致痛小鼠行为学及大脑皮层NF-κB蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(12):2707-2709, 2842-2843.

(收稿日期:2016-10-07 修回日期:2017-06-11)

(编辑:刘明伟)