

复方加味温胆汤挥发性成分分析

肖宇硕, 卢金清*, 黄立, 蔡佩

(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:**研究复方加味温胆汤中的挥发性成分,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对煎煮前后复方挥发性成分进行对比分析。**结果:**共鉴定复方挥发性成分187种,含量最高的为 α -细辛醚,*D*-柠檬烯次之。采用SD-GC-MS检测出74种,鉴定出66种,占挥发性成分总量99.89%;采用HS-SPME-GC-MS从煎煮前复方中检测出挥发性成分104种,鉴定出85种,占总挥发性成分的99.79%,从煎煮后复方中检测出挥发性成分77种,鉴定出65种,占总挥发性成分95.45%。**结论:**复方中 α -细辛醚、*D*-柠檬烯和右旋龙脑等5种挥发性成分具有调节中枢神经系统、改善大脑功能、抗惊厥和安定等作用,能够改善自闭症的症状。本研究为复方加味温胆汤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] 加味温胆汤; 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(2014)19-0082-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190082

Analysis of Volatile Components of Compound Jiawei Wendan Decoction

XIAO Yu-shuo, LU Jin-qing*, HUANG Li, CAI Pei

(Hubei University of Chinese Medicine Research and Development Center of
Medicinal Plant in Hubei Province, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** This article was aiming to study the volatile components of the compound Jiawei Wendan decoction and to explore its pharmacodynamic material basis of the treatment on autism and related symptoms. **Method:** The study used HS-SPME, steam distillation (SD) methods combined with GC-MS technique to analyze the volatile components of the compound Jiaweiwendan decoction; the study used HS-SPME-GC-MS to compare the volatile components before and after the decoction. **Result:** A total of 187 peaks were identified; the highest content was α -asarone, with *D*-limonene followed. Seventy-four volatile components were detected by SD-GC-MS, among which 66 were identified, accounting for 99.89% of the total volatile components. One hundred and four volatile components were detected before the decoction by HS-SPME-GC-MS, with 85 identified, accounting for 99.79% of the total volatile components. Seventy-seven volatile components were detected after the decoction by HS-SPME-GC-MS, with 65 identified, accounting for 95.45% of the total volatile components. **Conclusion:** Five volatile components such as α -asarone, *D*-limonene, *L*-borneol etc. Paly a role in regulating the central nervous system, improving cerebral function, being anticonvulsant, improving stability and so on, thus can improve the symptoms of autism. The study provided not only a methodological basis for the volatile components Jiawei Wendan decoction, but also a reference to the phamacodynamic material basis of the decoction on the therapy of autism.

[Key words] Jiawei Wendan decoction; volatile components; autism; HS-SPME; steam distillation

[收稿日期] 20140414(007)

[第一作者] 肖宇硕, Tel: 15271912017, E-mail: xys1120@163.com

[通讯作者] * 卢金清, 教授, 从事中药及其天然药物活性成分研究, Tel: 027-68890101, E-mail: ljqs9169@sohu.com

加味温胆汤由《三因极——病证方论》中温胆汤^[1]衍化而来。本方由制半夏、竹茹、石菖蒲、枳实、橘红、益智仁、生姜等 10 味中药组成,具有燥湿化痰、理气宁神、健脾开窍的功效,现代临床研究表明加味温胆汤对自闭症及相关症状具有较好的疗效。余定辉^[2]、严愉芬^[3]等使用加味温胆汤对自闭症患儿进行治疗,发现服药后患儿言语发育障碍、社会交往困难、兴趣范围狭窄和重复刻板动作等症状均得到显著改善,有效率达 84%。复方加味温胆汤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^[4],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 和 SD-GC-MS 分析方法,研究复方加味温胆汤中挥发性成分及复方煎煮前后的挥发性成分的变化,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 Agilent6890/5973 型气相-质谱-计算机联用仪(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)RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试药 加味温胆汤原药材均来源于武汉强康药业有限公司,经湖北中医药大学药教研室陈科力教授鉴定,茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poriacocos* (Schw.) Wolf. 的干燥菌核、甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、制半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternatata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎炮制品、党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根、石菖蒲为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott. 的干燥根茎、枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果、橘红为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco. 的干燥外层果皮、益智仁为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实、竹茹为禾本科植物青秆竹 *Bambusa tuldoidea* Munrod. 的茎秆的干燥中间层、生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎;蒸馏水、乙醚均为分析纯。

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量药材,粉碎过 40 目筛,加入 10 倍量水,浸泡 3 h 后,

照《中国药典》2010 年版附录 XD 挥发油测定法提取,收集挥发油,取 0.5 mL 置 10 mL 量瓶中用乙醚稀释定容至刻度,用于 GC-MS 分析。

2.1.2 顶空固相微萃取法 复方煎煮前:按照复方比例称取处方量药材,经粉碎后混合均匀,过 40 目筛。取 1 g 置于 15 mL 顶空瓶中,插入装有 65 μm PDMS/DVB 纤维头的手动进样器,70 $^{\circ}\text{C}$ 下预平衡 10 min,萃取 15 min,取出立即插入气相色谱仪进样口中,解析 3 min,进行 GC-MS 分析。

复方煎煮后:按照复方比例称取处方量药材,模拟临床煎药过程,煎液即为加味温胆汤复方汤剂。将汤剂减压浓缩至膏状,取 0.5 g 按复方煎煮前 HS-SPME 条件同法进行萃取,随后进行 GC-MS 分析。

2.2 GC-MS 条件 GC 条件:HP-5MS 色谱柱(0.25 mm \times 30 m,0.25 μm),进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,载气为高纯氦气(99.999%),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹。程序升温:初始温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C} \cdot$ min⁻¹升温至 85 $^{\circ}\text{C}$,再以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot$ min⁻¹升温至 134 $^{\circ}\text{C}$,保留 10 min,最后以 15 $^{\circ}\text{C} \cdot$ min⁻¹升温至 200 $^{\circ}\text{C}$ 。

MS 条件:离子源 EI 源,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。

3 结果

经 GC-MS 计算机联用仪联合化学工作站数据处理系统及用峰面积归一化法,从其总离子流图中计算各成分的相对百分含量,按各峰的质谱图经 NIST05 谱库检索,共鉴定出挥发性成分 187 种,含量最高的为 α -细辛醚,*D*-柠檬烯次之。采用 SD-GC-MS 检测出 74 种,鉴定出 66 种,占总挥发性成分 99.89%;采用 HS-SPME-GC-MS 从煎煮前复方中检测出挥发性成分 104 种,鉴定出 85 种,占总挥发性成分的 99.79%,从煎煮后复方中检测出挥发性成分 77 种,鉴定出 65 种,占总挥发性成分 95.45%。具体结果见图 1~3 及表 1。

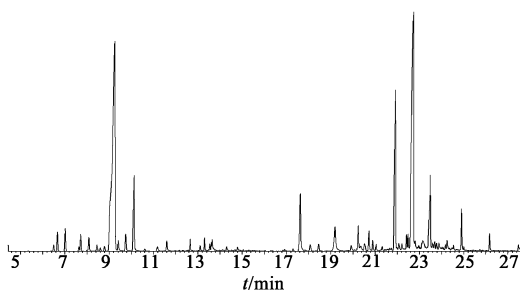


图 1 SD-GC-MS 分析复方挥发性成分 TIC

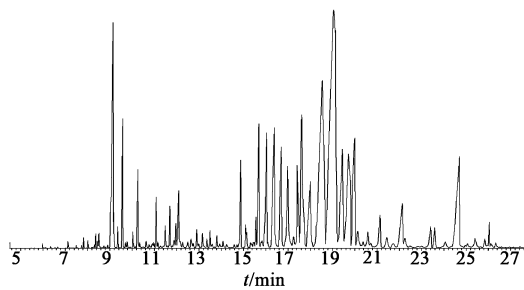


图2 HS-SPME-GC-MS分析复方煎煮前挥发性成分TIC

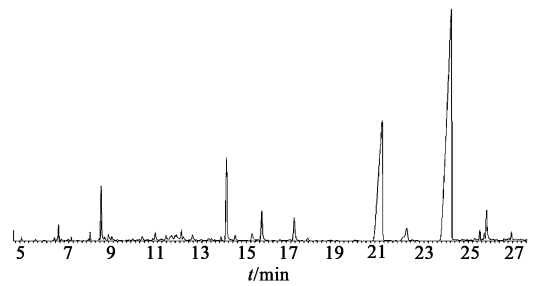


图3 HS-SPME-GC-MS分析复方煎煮后挥发性成分TIC

表1 不同方法检测结果中共有挥发性成分

t_R /min	化学成分	分子式	质量分数/%		
			水蒸气蒸馏	煎煮前 HS-SPME	煎煮后 HS-SPME
3.84	甲氧基苯基肟 (oxime-, methoxy-phenyl)	$C_8H_9NO_2$	-	0.03	0.73
4.04	蒎烯 (pinene)	$C_{10}H_{16}$	1.81	2.20	-
4.26	菝烯 (camphene)	$C_{10}H_{16}$	0.93	0.07	-
4.85	月桂烯 (myrcene)	$C_{10}H_{16}$	0.69	0.23	-
4.95	α -水芹烯 (α -phellandrene)	$C_{10}H_{16}$	0.59	0.05	-
5.33	萜品油烯 (terpinolene)	$C_{10}H_{16}$	0.66	0.04	-
5.60	<i>D</i> -柠檬烯 (<i>D</i> -limonene)	$C_{10}H_{16}$	25.56	5.46	-
5.86	β -顺-罗勒烯 (β -cis-ocimene)	$C_{10}H_{16}$	0.87	0.20	-
6.11	γ -萜品烯 (γ -terpinene)	$C_{10}H_{16}$	3.96	1.38	-
6.36	芳樟醇氧化物 (linaloloxide)	$C_{10}H_{18}O_2$	0.16	0.15	0.31
6.93	芳樟醇 (linalool)	$C_{10}H_{18}O$	0.57	1.08	-
8.40	右旋龙脑 (<i>L</i> -borneol)	$C_{10}H_{18}O$	0.29	0.35	-
8.65	(-)-4-萜品醇 (1-4-terpineol)	$C_{10}H_{18}O$	0.47	0.55	-
10.63	柠檬醛 (geranial)	$C_{10}H_{16}O$	0.28	0.36	-
11.69	香芹酚 (carvacrol)	$C_{10}H_{14}O$	0.13	0.11	-
12.43	4-甲基-4-乙烯基-1-(丙烷-2-基)-3-(2-丙烯基)环己烯 (4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene)	$C_{15}H_{24}$	0.03	1.30	-
14.11	丁香酚 (eugenol)	$C_{10}H_{12}O_2$	3.25	3.68	4.46
14.50	1-石竹烯 (1-caryophyllene)	$C_{15}H_{24}$	-	2.42	0.50
14.95	塞舌尔烯 (seychellene)	$C_{15}H_{24}$	0.09	2.18	-
15.56	1,1,7-三甲基-4-亚甲基十二氢-1H-环丙[e]萹 (1,1,7-trimethyl-4-methylenedecahydro-1H-cyclopropa[e]azulene)	$C_{15}H_{24}$	0.28	5.61	-
16.98	α -柏木烯 (α -cedrene)	$C_{15}H_{24}$	-	21.37	0.26
19.07	α -白菖考烯 (α -calacorene)	$C_{15}H_{22}$	-	0.46	0.09
19.13	氧化石竹烯 (caryophyllene oxide)	$C_{15}H_{24}O$	0.65	0.31	-
21.09	α -细辛醚 (α -asarone)	$C_{12}H_{16}O_3$	32.05	6.05	49.67
21.37	努特卡酮 (nootkanone)	$C_{15}H_{22}O$	2.12	0.03	-

4 讨论

4.1 复方挥发性成分分析 复方中共鉴定出187种挥发性成分,主要为烯类、醛酮类、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 -细辛醚能够阻断中枢多巴胺受体、 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^[5-8]; *D*-柠檬烯具有镇静中枢神经、促进消化液分泌和祛痰的作用^[9-10]; 芳樟醇具有抗惊厥, 镇静催眠的作用^[11-12]; 右旋龙脑能调节中枢神经组织中单胺类神经递质达到稳态平衡, 具有改善血脑屏障通透性, 醒脑开窍, 提高认知能力的作用^[13-14]; 丁香酚具有抗惊厥、改善记忆、促进消化功能等作用, 在神经障碍、癫痫等与自闭症症状相似病症中应用广泛^[15]。综上所述, 本研究结果中 α -细辛醚、丁香酚、芳樟醇、右旋龙脑和 *D*-柠檬烯具有改善自闭症症状的功效, 为深入探讨复方加味温胆汤治疗自闭症的药效物质基础提供了参考依据。

4.2 不同分析方法对复方挥发性成分的分析比较

SD-GC-MS 和 HS-SPME-GC-MS 两种方法检测结果中有共有挥发性成分 21 种, 主要为 α -细辛醚、*D*-柠檬烯、芳樟醇、右旋龙脑、丁香酚等物质, 且含量最高的成分均为 α -细辛醚。SD 法为常用的提取挥发性成分的方法, 但其所需样品量大、溶剂损耗大、成分易于破坏, 不适用于化学性质不稳定组分的提取; 而 HS-SPME 技术无需溶剂和复杂装置, 步骤简单, 操作时间短, 样品量小, 重复性好, 集萃取、富集、进样于一体, 能减少操作误差, 降低操作费用。在本研究中 HS-SPME-GC-MS 比 SD-GC-MS 检测物质更多, 反映的信息更全面, 且 HS-SPME-GC-MS 应用于中药复方药物能够快速检测出复方中主要挥发性成分^[16]。

4.3 复方煎煮前后挥发性成分的分析比较 采用 HS-SPME-GC-MS 对复方加味温胆汤煎煮前后的挥发性成分进行检测分析, 分别鉴定出 85 和 65 种化合物, 占各自总挥发性成分的 99.79% 和 95.45%。其中 1-石竹烯、芳樟醇氧化物等 7 个物质为复方煎煮前后检测到的共有成分。复方中能够改善自闭症症状的几种挥发性成分, 仅 α -细辛醚存在于煎煮后的复方汤剂中, 且含量极少, 而 *D*-柠檬烯、芳樟醇、右旋龙脑和丁香酚均未检测到。采用煎煮法导致复方加味温胆汤中常见芳香类药物的挥发性成分大量丢失, 故煎煮过程中应遵从芳香类药物后下的原则, 这样能够有效地利用复方加味温胆汤中的挥发性成分, 对临床运用具有实践指导意义。

[致谢] 湖北中医药大学湖北省药用植物研发中心李肖爽、蔡君龙、梁欢、戴艺对本研究工作的指导和帮助。

[参考文献]

[1] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 404.
[2] 余定辉. 从痰论治小儿精神心理性疾病体会[J]. 中

医杂志, 2003, 44(4): 258.

- [3] 严愉芬, 雷法清. 加味温胆汤配合教学训练矫治孤独症儿童异常行为 25 例[J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 244.
[4] 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.
[5] 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.
[6] Shin J W, Cheong Y J, Koo Y M, et al. α -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.
[7] Han, Han T, Peng W, et al. Antidepressant-like effects of essential oil and asarone, a major essential oil component from the rhizome of acorus tatarinowii-[J]. Pharm Biol, 2013, 51(5): 589.
[8] Kumar, Kim B W, Song S Y, et al. Cognitive enhancing effects of alpha asar-one in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(8): 1518.
[9] 王伟江. 天然活性单萜柠檬烯的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005, 12(1): 33.
[10] 李思思, 王涛, 董志红, 等. 右旋柠檬烯的研究进展及其新型专利技术[J]. 河南医学研究, 2013, 22(4): 636.
[11] 陈尚研, 赵玲华, 徐小军. 天然芳樟醇资源及其开发利用[J]. 林业科技开发, 2013, 27(2): 13.
[12] Quintans-Júnior L J, Barreto R S, Menezes P P, et al. β -Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces antinociceptive effects superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2013, 113(3): 167.
[13] 施文甫, 罗安明, 郑曙光. 冰片在脑部疾病中的应用[J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(1): 59.
[14] 吕旭潇, 孙明江, 孙凤志. 冰片促进药物透过血脑屏障的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 878.
[15] 陶莉, 望运玲, 武双婵, 等. 丁香酚对大鼠局灶性脑缺血/再灌注神经保护作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1146.
[16] 孙文, 巢志茂, 王淳, 等. HS-SPME-GC-MS 技术对栝楼雌、雄花挥发性成分的差异研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1570.

[责任编辑 顾雪竹]