

高效液相色谱-串联质谱法测定厚朴中的厚朴酚与和 异构厚朴酚

吕思雨, 陈驰, 闫徐, 王唯秀, 何星瑶, 焦禄, 王志兵

(长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林长春 130012)

摘要: 建立一种微波辅助离子液体均相液液微萃取高效液相色谱-串联质谱法, 测定了中药材厚朴中的厚朴酚与和厚朴酚。本研究以离子液体为萃取溶剂, 样品经微波提取后, 向所获得的样品提取液中加入离子对试剂六氟磷酸铵 (NH_4PF_6), 采用均相液液微萃取法分离富集目标分析物, 并通过高效液相色谱-串联质谱进行定性定量检测。本研究对影响萃取效率的各个条件进行单因素和响应面优化。实验结果表明, 目标分析物在检测浓度范围内具有较好的线性关系 ($R>0.9999$), 检出限和定量限分别为 17.2~3.9 ng/g 和 57.4~79.6 ng/g, 样品加标回收率在 89.25%~95.00%之间。与传统超声提取法和回流提取法相比, 本法在溶剂用量、萃取时间上具有一定的优势, 可用于中草药及相关医药产品中厚朴酚与和厚朴酚的提取分析。

关键词: 亲水性离子液体; 均相液液微萃取; 微波辅助提取; 厚朴酚与和异构厚朴酚; 高效液相色谱-质谱法; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2020)07-321-330

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1285

Determination of Magnolol and Honokiol from *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils by HPLC-MS

LYU Si-yu, CHEN Chi, YAN Xu, WANG Wei-xiu, HE Xing-yao, JIAO Lu, WANG Zhi-bing

(College of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

Abstract: Microwave-assisted ionic liquid homogeneous liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was established to extract magnolol and honokiol from *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. In this study, ionic liquid was used as the extraction solvent. After microwave-assisted extraction, the ion-pairing reagent, ammonium hexafluorophosphate (NH_4PF_6), was added to the obtained sample extract, and the target analytes were separated and enriched by homogeneous liquid-liquid microextraction, and analyzed qualitatively and quantitatively by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In this study, the conditions affecting the extraction efficiency were optimized by single factor and response surface experiments. The experimental results showed a good linear relationship ($R>0.9999$) for the target analytes within the detection concentration range, with the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) being 17.2~23.9 ng/mL and 57.4~79.6 ng/mL, respectively, and the spiked recovery between 89.25% and 95.00%. Compared with the traditional ultrasonic extraction and reflux extraction methods, the present method has advantages in the amount of solvent used and extraction time, and can be used for the extraction of magnolol and honokiol in Chinese herbal medicine and related pharmaceutical products.

Key words: hydrophilic ionic liquid; homogeneous liquid-liquid microextraction; microwave-assisted extraction; magnolol and honokiol; high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS); response surface analysis

引文格式:

吕思雨,陈驰,闫徐,等.高效液相色谱-串联质谱法测定厚朴中的厚朴酚与和异构厚朴酚[J].现代食品科技,2020,36(7):321-330

LYU Si-yu, CHEN Chi, YAN Xu, et al. Determination of magnolol and honokiol from *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils by HPLC-MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 321-330

收稿日期: 2019-12-23

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(21401011); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20181014K)

作者简介: 吕思雨(1994-), 女, 硕士, 研究方向: 食品分析

通讯作者: 王志兵(1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品分析

厚朴是一种著名的中草药, 收录于《中国药典》(2015 版)^[1]中。据报道, 它可用于治疗神经焦虑、伤寒和肌肉坏死等^[2-4]多种疾病。其中, 厚朴酚与和厚朴酚作为主要活性成分, 具有多种治疗作用和药理活性, 如抗炎、抗菌、抗焦虑、抗抑郁、抗氧化、抗心律失常、抗肿瘤和抗癌等^[3,5-8]。

自 1930 年日本学者杉井善雄于厚朴树皮中分离得到了厚朴酚后^[9], 国内外学者随即展开了大量研究。目前, 厚朴酚与和厚朴酚常用的分析检测方法主要有: 高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、荧光分光光度法、毛细管电泳法和紫外分光光度法等^[10]。由于高效液相色谱法样品用量少, 灵敏度高, 稳定性好, 操作简单快速而成为应用最广泛的分析方法。周高^[3]等采用高效液相色谱分析检测了 19 批不同产地厚朴药材中的厚朴酚与和厚朴酚。朱俊平^[11]等建立了一种基于高效液相色谱双波长指纹图谱快速测定藿香正气制剂中和厚朴酚含量的方法, 用于藿香正气制剂的质量控制。顾宁宁^[12]等采用超高效液相色谱-质谱联用对厚朴不同部位的成分含量进行分析比较, 为厚朴的质量标准的制定提供参考。鉴于高效液相色谱在中药分析检测中的优势, 本研究采用高效液相色谱-串联质谱法测定厚朴中的厚朴酚与和厚朴酚。

目前, 厚朴酚常用的提取方法主要有热回流提取法、碱提酸沉法、超临界提取法、超声提取法、索式提取法和快速溶剂萃取法等^[13,14]。夏丽珍^[15]等将 5 mL 藿香正气水加 2 滴盐酸后, 用三氯甲烷振摇提取 3 次 (每次 10 mL), 成功萃取得到了厚朴酚与和厚朴酚。李卫民^[16]等通过超声强化超临界萃取方式, 以 200 mL 乙醇为萃取剂, 将 100.02 g 厚朴粉末在超声条件下超临界提取 1.5 h 用于萃取厚朴酚与和厚朴酚, 通过与超临界提取与超声提取比较后, 证实两者之间存在协同作用。刘晓鹏等^[17]以 60% 乙醇为萃取剂, 采用快速溶剂萃取结合高效液相色谱法, 测定了保济丸中厚朴酚与和厚朴酚的含量。张碧瑶^[18]等用碱性乙醇超声提取法对厚朴中厚朴酚与和厚朴酚进行提取, 得到以乙醇体积分数为 65%, pH 值为 8, 提取次数为 2 次, 每次提取时间为 0.5 h, 液料比为 5:1 时为最佳萃取条件。上述方法均使用不同浓度的醇溶液作为萃取溶剂, 可获得较满意的萃取效果, 但同时具有萃取时间长、操作复杂、有机溶剂用量大等缺点。

近年来, 离子液体作为一种新型绿色溶剂而备受关注^[19,20], 它具有不挥发、不可燃、室温下黏度大、性质稳定、可循环利用的特点, 且对许多无机盐和有机物有良好的溶解度。目前, 离子液体已被成功应用于中药中黄酮类、蒽醌类、皂苷类、生物碱类和木脂素

类等活性成分的提取^[21], 尤其是离子液体对酚类化合物显示出较好的萃取性能。Zhang^[22]等在超声辅助下将疏水性离子液体与超临界萃取相结合, 成功萃取了厚朴中的厚朴酚和和厚朴酚。于秀培^[23]等建立了基于疏水性离子液体的分散液微萃取结合高效液相色谱法测定藿香正气口服液中厚朴酚与和厚朴酚含量的方法。然而, 上述萃取方法中所使用的疏水性离子液体水溶性较差, 为了提高萃取效率, 常使用有机溶剂作为分散剂, 或辅以超声、涡旋等分散手段以增大离子液体萃取溶剂与目标分析物之间的接触面积, 从而使实验操作变得复杂、繁冗。此外, 由于离子液体黏度较大, 当其作为溶剂用于萃取药材中的活性成分时, 离子液体不易与药材残渣分离, 从而在固液分离过程中造成目标物的损失。

因此, 本研究以黏度较小的亲水性离子液体水溶液为萃取溶剂, 在微波辐射作用下提取目标分析物进入离子液体水溶液中, 随后, 通过离子液体与 NH_4PF_6 之间的原位反应, 使亲水性离子液体转变为疏水性离子液体, 从而使结合有目标物的离子液体与水相分离 (见图 1)。最后, 采用高效液相色谱-串联质谱对离子液体提取液进行定性定量分析和方法学考察, 并与超声提取法、热回流法提取法和乙醇提取法进行比较。

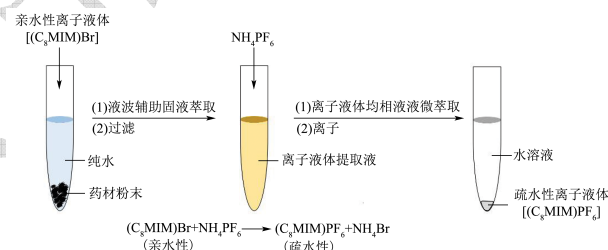


图 1 离子液体均相液微萃取原理图

Fig.1 Schematic diagram of ionic liquid homogeneous liquid-liquid microextraction

本研究的主要优势在于: (1)以亲水性离子液体代替传统有机溶剂作为萃取剂, 避免了有机溶剂的使用, 同时使溶剂用量大大减少; (2)本方法将固液萃取与液液萃取相结合, 通过离子液体与 NH_4PF_6 之间的原位反应, 实现目标物的萃取、分离和富集, 简化了实验操作步骤; (3)通过微波辅助萃取, 使离子液体均一的分散于样品水溶液中, 有效地提高了离子液体与目标分析物的传质效率, 缩短了萃取时间。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

厚朴酚与和厚朴酚标准品购于 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司 (Augsburg, Germany), 以甲醇为溶剂配

制成 500 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液,并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下保存,备用。离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ($[\text{C}_4\text{MIM}]\text{BF}_4$)、1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ($[\text{C}_6\text{MIM}]\text{BF}_4$)、1-丁基-3-甲基咪唑溴化盐 ($[\text{C}_4\text{MIM}]\text{Br}$)、1-己基-3-甲基咪唑溴化盐 ($[\text{C}_6\text{MIM}]\text{Br}$) 和 1-辛基-3-甲基咪唑溴化盐 ($[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Br}$) 购于上海成捷化工有限公司(上海,中国)。其他试剂均为分析纯。

厚朴药材购于当地药房(中国长春),产地为四川,经粉碎后过 80 目筛,并于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥至恒重,备用。

1.2 仪器与设备

LC-1260 高效液相色谱-G6420A 三重四级杆质谱联用仪,同时配备 DAD 检测器,美国安捷伦公司; ETHOS UP 微波消解仪,意大利 MILESTONE 公司; S28L 超声波清洗机,东莞市墨洁超声波设备有限公司; TGL-16 台式高速离心机,常州凯航干燥设备有限公司; Milli-Q 超纯水装置,美国 Millipore 公司。

1.3 微波辅助离子液体均相液液微萃取

准确称取 0.01 g 样品粉末、0.28 g $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Br}$ 和 10 mL 超纯水于微波消解罐中,混合均匀后置于微波消解仪中进行微波提取,于 6 min 升温至 150 $^{\circ}\text{C}$,保持 3 min 后冷却 10 min,将所得混合物在 14000 r/min, 15 min 条件下离心,弃去药品残渣,上层清液转移至离心管中,随后加入 0.33 g NH_4PF_6 ,振摇 1 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴环境下静置 18 min 后再次离心(14000 r/min, 15 min),弃去上层清液,加甲醇定容至 2 mL,过 0.22 μm 滤膜后,进行色谱质谱分析。

1.4 色谱与质谱条件

色谱条件: TC-C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm),进样量 20 μL ,流速 0.5 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 294 nm,流动相甲醇和水(78:22, v/v)等度洗脱 20 min。

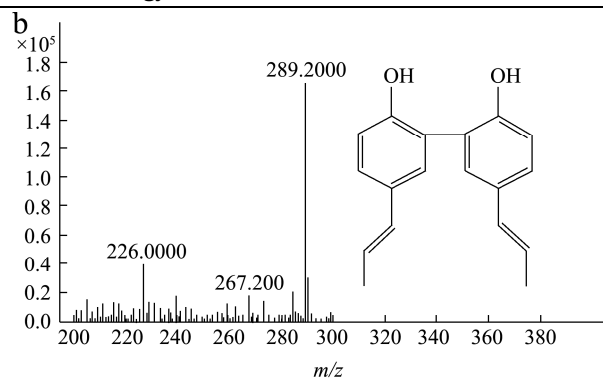
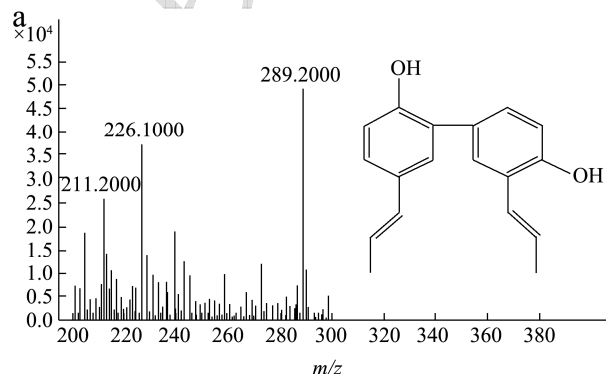


图2 和厚朴酚(a)与厚朴酚(b)的ESI-MS图和结构式

Fig.2 ESI-MS spectra and structure of Honokiol (a) and Magnolol (b)

质谱条件: 离子源为电喷雾离子源(ESI),正离子扫描方式,毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$,离子源喷雾压力 4000 V,质量扫描范围 m/z 200~300。

2 结果与分析

2.1 质谱分析

厚朴酚与和厚朴酚为同分异构体,分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_2$,相对分子质量为 266.32。由于两种目标分析物均为酚类化合物,故选择正离子扫描模式。图2为厚朴酚与和厚朴酚的结构及质谱图。从图2a可以看出,和厚朴酚主要形成准分子离子峰 m/z 289.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,同时出现 m/z 226.1 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_5+\text{H}]^+$ 和 m/z 211.2 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_5-\text{OH}+2\text{H}]^+$ 的碎片离子峰。对于厚朴酚来说,它与和厚朴酚的质谱图很相似,主要形成准分子离子峰 m/z 289.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 m/z 267.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$,同时出现 m/z 226.0 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_5+\text{H}]^+$ 的碎片离子峰,这与 Hu^[24]等的报道一致。

2.2 萃取条件的单因素优化

2.2.1 离子液体种类和用量

离子液体的结构密度、黏度等理化性质^[25,26]影响与目标物分子间存在的疏水相互作用、 π - π 堆积和氢键作用等^[27,28],进而影响离子液体的萃取效率。本研究考察了 $[\text{C}_4\text{MIM}]\text{BF}_4$ 、 $[\text{C}_6\text{MIM}]\text{BF}_4$ 、 $[\text{C}_4\text{MIM}]\text{Br}$ 、 $[\text{C}_6\text{MIM}]\text{Br}$ 和 $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Br}$ 对目标物萃取效率的影响。从图3a中可以看出,当离子液体阳离子烷基链长度相等时(4或6),其阴离子 BF_4^- 和 Br^- 对目标物的萃取率无显著差别。然而,当阴离子为 Br^- 时,随离子液体烷基链长度从 4 增加至 8,其目标分析物的萃取率稍有增加,这可能是因为烷基链越长,其与目标分析物之间的疏水相互作用和 π - π 堆积作用越强。因此,本研究选择 $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Br}$ 作为萃取溶剂。

随后,本研究又考察了离子液体 $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Br}$ 用量(0.10~0.40 g)对目标物提取率的影响。实验结果如图 3b 所示。目标化合物的提取率随 $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Br}$ 用量的增加而升高,当用量为 0.30 g 时,提取效率达到最大值且趋于稳定。因此,本研究使用 0.30 g $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Br}$ 作为萃取剂进行后续实验。

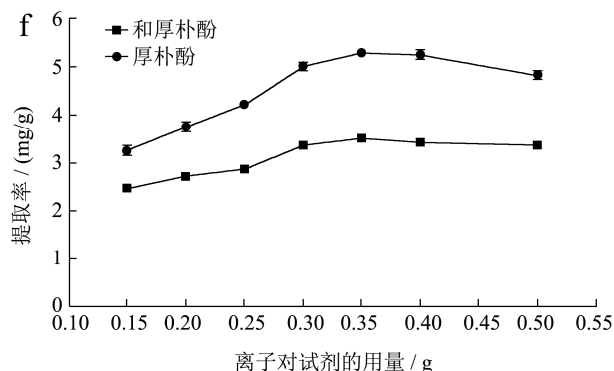
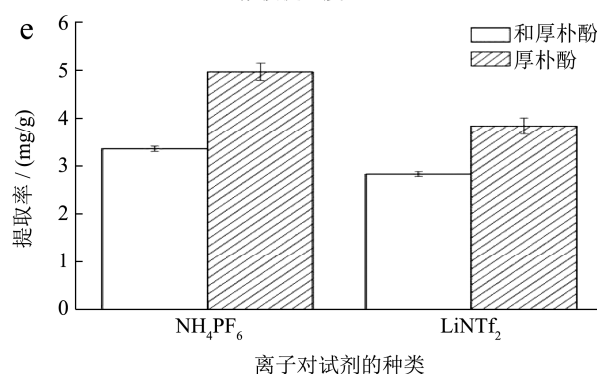
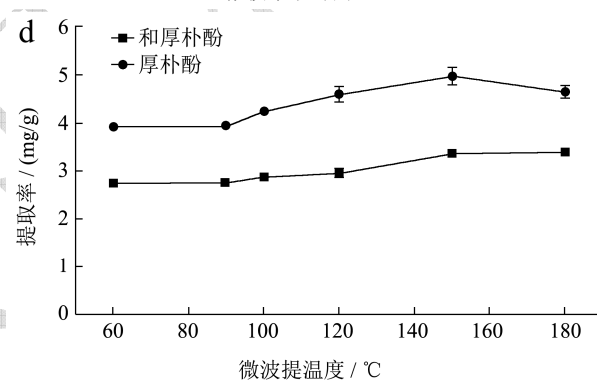
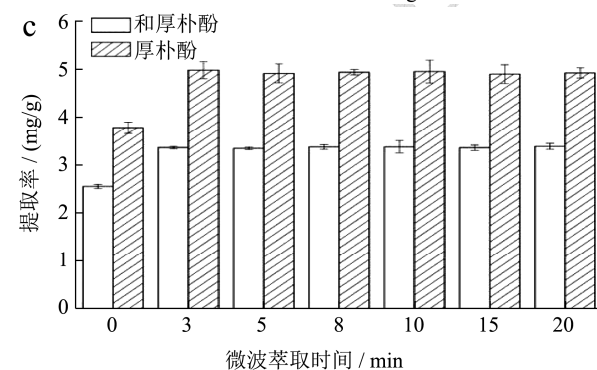
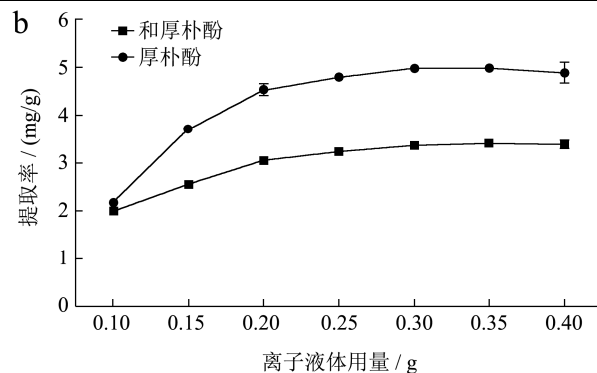
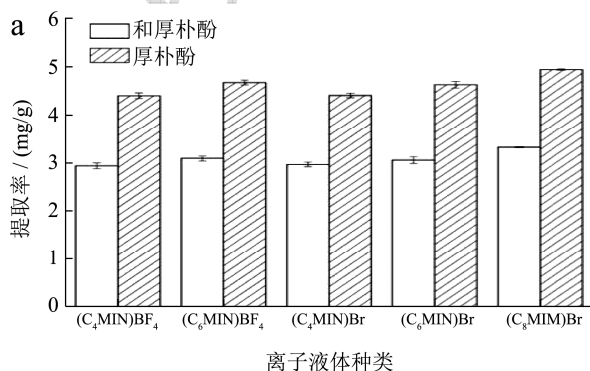
2.2.2 微波时间和微波温度

微波的热效应能够增加中药材有效成分的浸出,对溶剂的传质作用有重要的影响^[29-31]。因此,本研究考察了微波温度与时间对目标物提取率的影响。实验结果如图 3c 所示,当微波 3 min 时,厚朴酚和和厚朴酚的提取率达到最大值。当微波时间长于 3 min 时,提取率并无显著提高。微波提取温度对提取率的影响如图 3d 所示,目标分析物的萃取率随微波温度的升高(60~180 °C),呈现先增加后降低的趋势,并在 150 °C 时,提取率达到最大值。然而,由于厚朴酚的闪点为 184.5 °C,故微波温度超过 180 °C 时,其提取率略有下降。因此,本研究选择微波温度 150 °C,微波时间 3 min。

2.2.3 离子对试剂的种类和用量

本研究以亲水性离子液体为萃取剂,当加入离子对试剂后,两者发生原位置换反应,生成了新的疏水性离子液体^[31]。因此,本研究考察了 NH_4PF_6 和 LiNTf_2 分别作为离子对试剂时对目标物提取率的影响。将 NH_4PF_6 和 LiNTf_2 分别加入到含有目标分析物的离子液体萃取溶液中,通过原位分解反应生成了具有疏水性的离子液体 $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{PF}_6$ 和 $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{NTf}_2$,实验结果如图 3E 和 3F 所示, NH_4PF_6 所获得的提取率高于 LiNTf_2 ,且随着 NH_4PF_6 用量的逐渐增加,离子液体 $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{PF}_6$ 的生成量越来越大,当 NH_4PF_6 用量为 0.35 g 时,目标提取物的提取率达到峰值,随后略有下降。这可能是由于过量的 NH_4PF_6 使得溶液黏度增大阻碍了目标物进入离子液体中,最终导致了萃取率的降低。基于以上原因,采用 0.35 g NH_4PF_6 作为离子对试剂进行后续实验。

2.2.4 萃取溶液的 pH 值



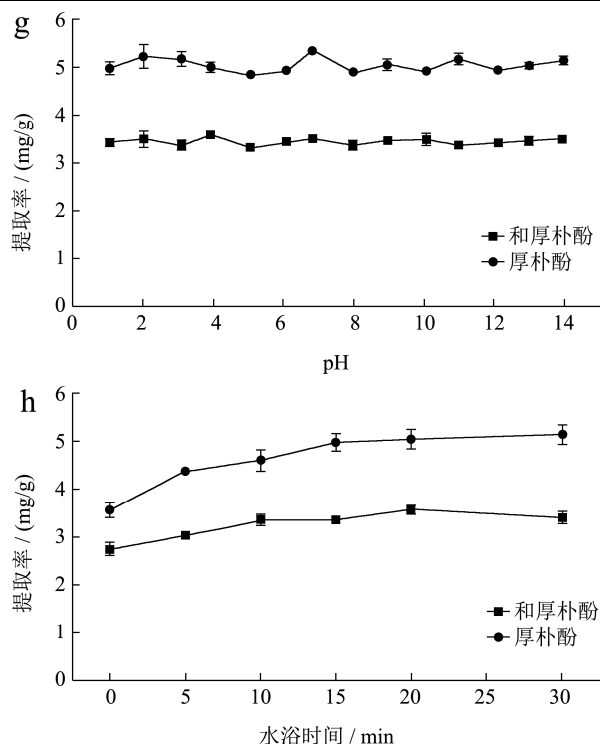


图3 离子液体种类(a)和用量(b)、微波萃取时间(c)和温度(d)、离子对试剂的种类(e)和用量(f)、pH(g)、冰浴时间(h)对提取率的影响

Fig.3 Effect of type (a) and amount (b) of ionic liquid, microwave time (c) and microwave temperature (d), type (e) and amount (f) of ion-pairing reagent, pH (g) and ice-bath time (h)

萃取溶液的 pH 值对目标分析物的解离状态可能存在影响, 从而对 $[C_8MIM]Br$ 与酚类化合物之间的相互作用产生影响。因此, 本研究考察了不同 pH 值的离子水溶液对目标物提取率的影响。从图 3g 中可以看出, pH 的变化对厚朴酚和和厚朴酚的提取效率影响不大, 这与 Zhang 等^[22]所述结果一致。因此, 在后续的研究中不调节萃取溶液的 pH 值。

2.2.5 冰浴时间

在相分离过程中, 温度对离子液体的溶解度具有至关重要的影响^[24], 从而影响离子液体的分离与富集, 进一步影响了目标物分子的萃取率。实验结果如图 3H 所示, 目标分析物的提取率随着冰浴时间增加而升高, 当冰浴时间为 20 min 时, 提取率最大, 即选

取冰浴 20 min 进行后续实验。

2.2.6 离心转速与时间

离心转速与时间能够促进水相与离子液体相快速分相。实验结果表明, 相分离在离心转速为 14000 r/min, 离心时间为 15 min 条件下即可完成。

2.3 响应面优化萃取条件

在本研究单因素试验的基础上, 选取 $[C_8MIM]Br$ 用量(X_1)、 NH_4PF_6 用量(X_2)、冰浴时间(X_3)三个因素, 以厚朴酚含量(Y_1)与和厚朴酚含量(Y_2)为响应值, 建立三因素三水平的 Box-Behnken 中心组合试验, 具体试验设计方案与结果见表 1。本研究以厚朴酚响应面优化结果为例进行分析。

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对结果数据进行二次多元回归拟合, 得到厚朴酚与和厚朴酚的二次多元回归方程: 厚朴酚为 $Y_1 = 5 + 0.6413X_1 + 0.6300X_2 + 0.4413X_3 + 0.1975X_1X_2 + 0.4250X_1X_3 + 0.3975X_2X_3 - 0.7670X_1^2 - 0.8645X_2^2 - 0.6520X_3^2$, 和厚朴酚为 $Y_2 = 3.42 + 0.441X_1 + 0.4363X_2 + 0.2975X_3 + 0.1325X_1X_2 + 0.2900X_1X_3 + 0.2750X_2X_3 - 0.5258X_1^2 - 0.5908X_2^2 - 0.4482X_3^2$ 。通过方差分析可知, 模型的 F 值和 p 值分别为 $F_{\text{厚朴酚}} = 1.57$, $p_{\text{厚朴酚}} < 0.0001$ ($F_{\text{和厚朴酚}} = 2.58$, $p_{\text{和厚朴酚}} < 0.0001$), 失拟项不显著 $p_{\text{厚朴酚}} = 0.3284 > 0.05$ ($p_{\text{和厚朴酚}} = 0.1907 > 0.05$)。这表明所建模型对目标物提取率影响极显著。此外, 回归方程相关系数分别为 $R^2_{\text{厚朴酚}} = 0.9918$ 、 $R^2_{\text{和厚朴酚}} = 0.9923$, $R^2_{\text{adj 厚朴酚}} = 0.9813$ 、 $R^2_{\text{adj 和厚朴酚}} = 0.9824$, 则表明了方程的实际拟合情况良好, 试验误差较小。根据 F 检验, 可以得出各因素对目标提取率影响效果影响程度大小为: $[C_8MIM]Br$ 用量 $> NH_4PF_6$ 用量 $>$ 冰浴时间。

以厚朴酚为例, 分析各因素之间的交互作用对目标分析物的含量影响, 响应曲面图和等高线图如图 4 所示。由 Design-Expert 8.0.6 软件对数据分析, 得到微波辅助离子液体均相液液微萃取厚朴酚与和厚朴酚的最佳提取条件是: 离子液体 $[C_8MIM]Br$ 用量为 0.28 g, 离子对试剂 NH_4PF_6 用量为 0.33 g, 冰浴时间为 18 min。在此条件下, 厚朴酚提取率为 5.19 mg/g, 和厚朴酚提取率为 3.54 mg/g。

表 1 Box-benhknen 试验设计及结果

Table 1 Box-benhknen design and results

序号	因素			和厚朴酚/(mg/g)	厚朴酚/(mg/g)
	X_1/g	X_2/g	X_3/min		
1	0.30	0.30	20	3.34	5.03
2	0.30	0.25	15	2.19	3.20

转下页

接上页

3	0.25	0.25	20	2.01	2.95
4	0.20	0.25	15	1.46	2.16
5	0.25	0.30	15	3.35	4.87
6	0.25	0.30	15	3.44	5.08
7	0.25	0.30	15	3.37	4.92
8	0.25	0.35	20	3.34	4.88
9	0.20	0.30	20	2.08	3.05
10	0.25	0.25	10	1.98	2.89
11	0.20	0.35	15	2.16	3.15
12	0.25	0.30	15	3.42	4.96
13	0.30	0.30	10	2.24	3.27
14	0.25	0.30	15	3.54	5.19
15	0.30	0.35	15	3.42	4.98
16	0.25	0.35	10	2.21	3.23
17	0.20	0.30	10	2.05	2.99

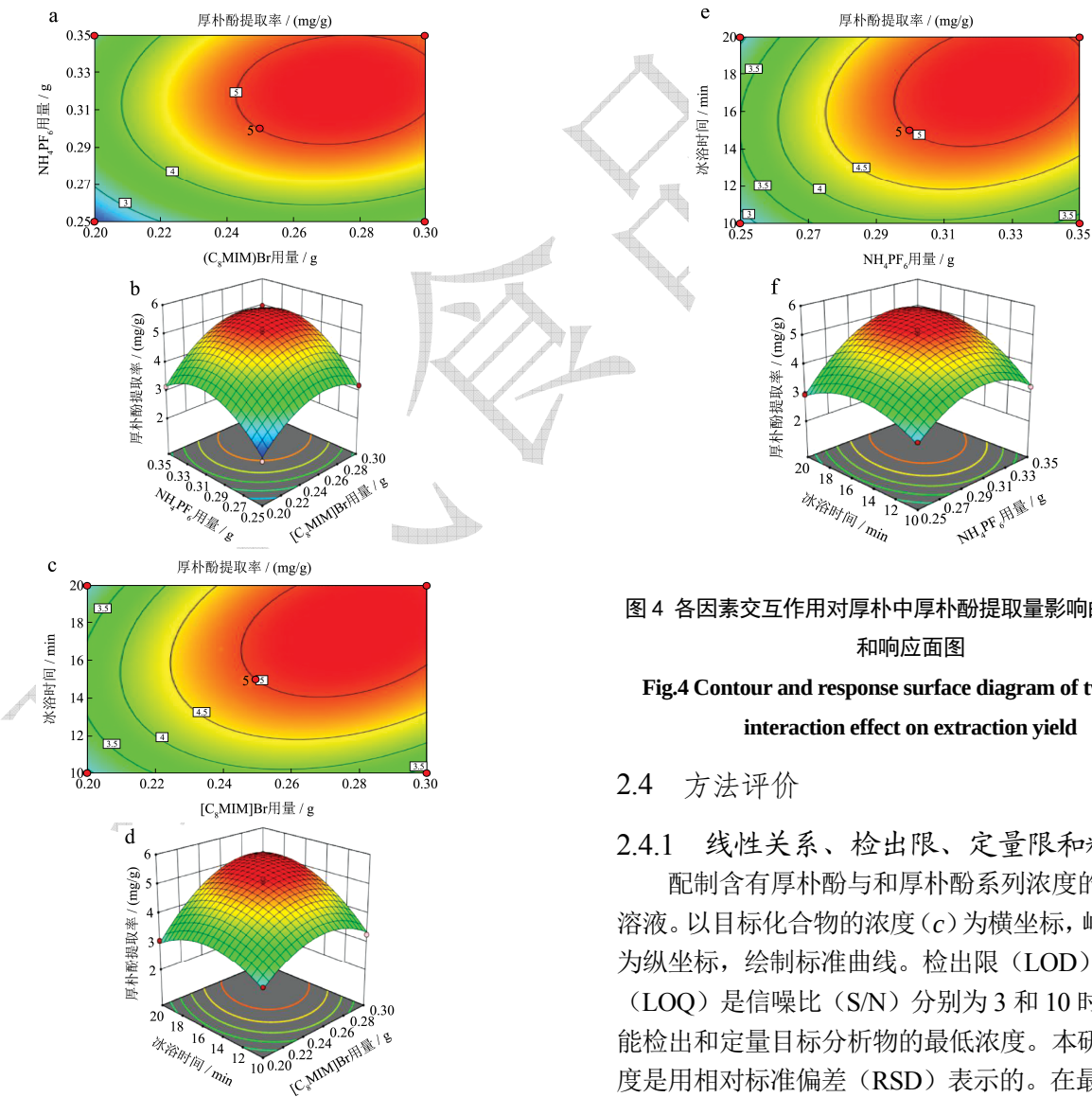


图 4 各因素交互作用对厚朴中厚朴酚提取量影响的等高线图和响应面图

Fig.4 Contour and response surface diagram of two-factor interaction effect on extraction yield

2.4 方法评价

2.4.1 线性关系、检出限、定量限和精密度

配制含有厚朴酚与和厚朴酚系列浓度的混合标准溶液。以目标化合物的浓度(*c*)为横坐标, 峰面积(*A*)为纵坐标, 绘制标准曲线。检出限(LOD)和定量限(LOQ)是信噪比(*S/N*)分别为3和10时提取方法能检出和定量目标分析物的最低浓度。本研究的精密度是用相对标准偏差(RSD)表示的。在最优提取条

件下于 1 d 内连续分析 6 次样品所得提取率的相对标准偏差为日内精密度；以最优提取条件下每天分析 2 次样品、连续 3 d 所得提取率的相对标准偏差为日间精密度。实验结果表明，目标分析物均有良好的线性关系，厚朴酚与和厚朴酚的标准曲线分别为 $A=2.95c-0.26$ 和 $A=1.08c-0.11$ ，在线性范围 0.08~80.00 $\mu\text{g/mL}$ 内各目标化合物线性关系良好（相关系数均为 $r=0.99992$ ）。检出限和定量限分别为 17.2~23.9 ng/g 和 57.4~79.6 ng/g 。厚朴酚与和厚朴酚的日内和日间精密

度分别为 1.78%~3.65% 和 2.34%~4.41%。

2.4.2 回收率

为了研究本法的准确性，对加标样品进行分析。加标样品的制备是通过向样品粉末中加入不同浓度的标准溶液所得到的。在室温下将加标样品干燥后，在最优萃取条件下制得样品提取液，再经液相色谱分析，所得结果如表 2 所示。实验结果表明，本法的回收率为 89.25%~95.00%，RSD 值小于 4.02%。

表 2 加标回收率

Table 2 Rate of recovery

目标化合物	初始量/(mg/g)	添加量/(mg/g)	发现量/(mg/g)	回收率/%	RSD/%,(n=6)
和厚朴酚	3.43	2.00	5.33	95.00	4.02
		4.00	7.00	89.25	2.96
厚朴酚	5.13	2.00	6.97	92.00	3.54
		4.00	8.76	90.75	3.93

2.4.3 实际样品分析

为评价本方法的适用性，在最优萃取条件下，对 6 种厚朴样品进行提取和分析。结果如表 3 所示，各厚朴样品中厚朴酚与和厚朴酚的含量分别为 1.59~5.13 mg/g 和 2.49~3.43 mg/g 。可以看出实际样品

中目标分析物的含量存在较大差异。这可能是由于厚朴不同生长年限、不同入药部位（干皮、枝皮和根皮）制品对两种酚类成分含量造成了影响，这与袁金凤等^[32]所报道结果一致。样品色谱图见图 5，在各目标物保留时间内未发现明显杂质干扰峰。

表 3 实际样品分析

Table 3 Analysis of real samples

目标化合物	厚朴酚		和厚朴酚	
	提取率/(mg/g)	RSD/%(n=3)	提取率/(mg/g)	RSD/%(n=3)
样品 1	5.13±0.19	1.78	3.43±0.06	3.65
样品 2	5.07±0.00	0.08	3.44±0.00	0.07
样品 3	1.59±0.03	2.07	2.49±0.00	0.12
样品 4	2.99±0.10	3.22	3.07±0.11	3.64
样品 5	4.77±0.03	0.71	3.21±0.10	3.08
样品 6	3.54±0.03	0.86	3.13±0.03	0.91

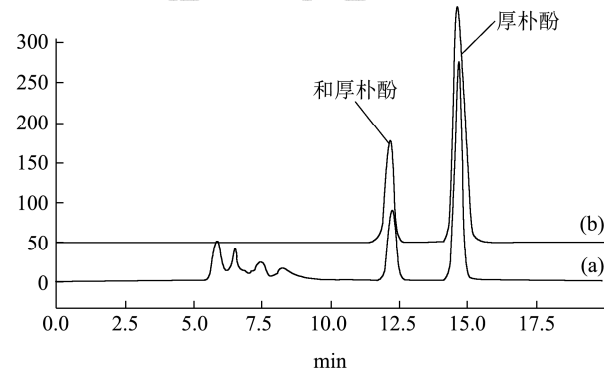


图 5 标准溶液 (a) 和样品提取液 (b) 色谱图

Fig.5 Chromatogram of the extract of sample (a) and the standard solution (b)

2.4.4 方法比较

为了进一步评价该方法的性能，将本法与文献报

道常用的酶解法、超临界流体萃取、乙醇加热回流提取法、超声提取法和微波提取法等进行了比较，结果如表 4 所示。其中，酶解法和超临界流体萃取法有机溶剂用量少，是工业化生产中典型的绿色提取方法，但其缺点是样品用量大，萃取时间长，提取时间一般需要 2~24 h。乙醇加热回流提取法作为中药有效成分的传统萃取方法，具有稳定性好、准确度高的优点，是中国药典中常用的萃取方法，但由于萃取时间长、溶剂用量大，逐渐被新型萃取技术所取代。超声辅助提取法和微波辅助提取法由于样品用量小、萃取效果好而被广泛采用，此两种方法通过机械效应、空穴效应和热效应等，能有效破坏植物细胞壁，从而获得较高提取率，从表 4 中可以看出，超声提取法对厚朴酚与和厚朴酚的提取率分别达到 10.30 mg/g 和 2.38

mg/g,但同时该法也使用了较多的有机溶剂,且需要重复提取,操作繁琐,萃取时间长至72 min。与其他方法相比,本法以离子液体代替传统有机溶剂作为萃取剂,绿色环保且用量少,在微波辅助作用下,整个萃取过程在3 min内即可完成。可以看出,本研究所

提出的微波辅助离子液体均相液液微萃取法,尽管目标物提取率略低于超声提取法,但在萃取时间、溶剂用量、样品用量等方面具有一定优势,说明本法适用于厚朴药材中厚朴酚与和厚朴酚的萃取与分离。

表4 方法比较

Table 4 Comparison between the proposed method and other methods

萃取方法	和厚朴酚 (mg/g)	厚朴酚 (mg/g)	样品 用量/g	萃取剂种类	萃取剂 用量	提取 时间	参考 文献
酶解法	2.13 (0.04)*	4.08 (0.06)	100.00 g	复合酶(30%果胶酶+70%纤维素酶)	1 g	24 h	[33]
超临界CO ₂ 流体萃取	0.99	4.37	100.00 g	二氧化碳流体	--	2 h	[34]
乙醇加热回流提取法	1.88	5.93	10.25 g	70%乙醇	100 mL	24 h	[34]
超声提取法	2.38	10.30	5.00 g	85%甲醇	170 mL	72 min	[35]
微波提取法	1.94	7.89	1.00 g	65%乙醇	40 mL	10 min	[34]
微波辅助离子液体均相液液微萃取法	3.43 (0.06)	5.13 (0.19)	0.01 g	(C ₈ MIM)Br	0.3 g	3 min	本法

注: *括号内为RSD(% , n=3)。

3 结论

本研究建立了微波辅助离子液体均相液液微萃取结合高效液相色谱-串联质谱法测定厚朴中的木脂素类化合物的新方法。本研究采用微波辅助萃取目标物,使用离子对试剂通过原位置换反应进一步对目标物进行富集。通过三因素三水平 Box-Benhnken 试验设计优化得到了最佳的萃取工艺。与其他方法相比,本法具有试剂用量少、能耗低、萃取时间短、萃取效率高特点,可用于中药材中厚朴酚与和厚朴酚的提取与分析。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015:251-252
- [2] ZHENG Yuanyuan, ZHANG Jianwu, ZHANG Rui, et al. Gold nano particles synthesized from Magnolia officinalis and anticancer activity in A549 lung cancer cells [J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019, 47: 3101-3109
- [3] 周高,张文慧,莫启贵,等.厚朴中6种苯丙素类化合物的含量及其功效[J].武汉大学学报(理学版),2019,65(4): 340-346
ZHOU Gao, ZHANG Wen-hui, MO Qi-gui, et al. Content and efficacy of six phenylpropanoids in *Magnoliae officinalis* Cortex [J]. J. Wuhan Univ (Nat. Sci. Ed.), 2019, 65(4): 340-346
- [4] LIU Yuan, WANG Dan, YANG Gongjun. Comparative pharmacokinetics and brain distribution of magnolol and honokiol after oral administration of Magnolia officinalis cortex extract and its compatibility with other herbal medicines in Zhi-Zi-Hou-Po decoction to rats [J]. Biomedical Chromatography, 2016, 30(3): 369-375
- [5] GE Lanlan, ZHANG Wenhui, ZHOU Gao, et al. Nine phenylethanoid glycosides from *Magnolia officinalis* var. biloba fruits and their protective effects against free radical-induced oxidative damage [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 45342
- [6] LEE Youngjung, LEE Yootmo, LEE Chongkil, et al. Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family [J]. Pharmacology and Therapeutics, 2011, 130(2): 157-176
- [7] WU Bo, FU Suhong, TANG Huan, et al. Design, synthesis and antibacterial evaluation of honokiol derivatives [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 28(4): 834-838
- [8] 申峰云,魏惠珍,孙勇兵.UPLC-MS/MS同时测定大承气汤大鼠血浆中9种活性成分的含量[J].中国中药杂志, 2015,39(12):2345-2350
SHEN Feng-yun, WEI Hui-zhen, SUN Yong-bing, et al. Simultaneous determination of 9 major components of dachengqitang in rat plasma by UPLC-MS/MS [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2014, 39(12): 2345-2350

- [9] 康雪峰.厚朴酚的合成研究[D].成都:西南交通大学生物化学与分子生物学,2009
KANG Xue-feng. Study on synthesis of magnolol [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University Biochemistry and Molecular Biology, 2009
- [10] 马欢欢,王晓红,程晓昆,等.厚朴酚与和厚朴酚的分析方法[J].煤炭与化工,2018,41(1):146-147
MA Huan-huan, WANG Xiao-hong, CHENG Xiao-kun, et al. Analytical methods of magnolol and honokiol [J]. Coal and Chemical Industry, 2018, 41(1): 146-147
- [11] 朱俊平,梁慧慧,文雯,等.藿香正气制剂中和厚朴酚及总多糖快速测定分析[J].中国中医药信息杂志,2019,26(5):78-82
ZHU Jun-ping, LIANG Hui-hui, WEN Wen, et al. Rapid determination and analysis of honokiol and total polysaccharide in *Huoxiang zhengqi* preparations [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2019, 26(5): 78-82
- [12] 顾宁宁,王玉龙,陈志明,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 与 HPLC 对厚朴进行成分分析及含量测定[J].现代中药研究与实践,2018,32(1):10-16
GU Ning-ning, WANG Yu-long, CHEN Zhi-ming, et al. Content Determination and Components Analysis of *Cortex Magnolia officinalis* Based on HPLC and UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2018, 32(1): 10-16
- [13] 邓义德,刘海周,曹玮娟,等.云厚朴两种提取方法的比较研究[J].云南中医学院学报,2009,32(2):32-33
DENG Yi-de, LIU Hai-zhou, CAO Wei-juan, et al. Comparative study of two extraction methods for *Magnolia rostrata* [J]. Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2009, 32(2): 32-33
- [14] 徐长超,封志平,牛梦溪,等.中药厚朴有效成分的提取分离[J].天津药学,2009,21(4):1-3
XU Chang-chao, FENG Zhi-ping, NIU Meng-xi, et al. Extraction and isolation of effective chemical constituents from *magnolia officinalis* [J]. Tianjin Pharmacy, 2009, 21(4): 1-3
- [15] 夏丽珍,张敏芳,倪璟雯.一测多评法测定藿香正气水中厚朴酚与和厚朴酚的含量[J].广西中医药大学学报,2017,20(1):49-52
XIA Li-zhen, ZHANG Min-fang, NI Jing-wen. Determination on the contents of *Magnolol* and *Honokiol* in *Huoxiang Zhengqi* Tincture by QAMS (Quality Assurance Management System) [J]. Journal of Guangxi University of Chinese Medicine, 2017, 20(1): 49-52
- [16] 李卫民,牛志强,王治平,等.超声强化超临界提取厚朴酚与和厚朴酚的工艺研究[J].中草药,2011,42(4): 680-683
LI Wei-min, NIU Zhi-qiang, WANG Zhi-ping, et al. Technology of ultrasound-enhanced supercritical extraction for magnolol and honokiol [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(4): 680-683
- [17] 刘晓鹏,姜宁.快速提取及测定保济丸中厚朴酚与和厚朴酚的研究[J].药物分析杂志,2009,3:367-369
LIU Xiao-peng, JIANG Ning. Study on extraction and determination of magnolol and honokiol in Baoji pills [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2009, 3: 367-369
- [18] 张碧瑶,刘利根,石心红.正交实验优化厚朴酚与和厚朴酚的提取工艺[J].西北药学杂志,2018,33(2):174-177
ZHANG Bi-yao, LIU Li-gen, SHI Xin-hong. Optimization of the extraction process of magnolol and honokiol by orthogonal experimental design [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2018, 33(2): 174-177
- [19] Theodoros Chatzimitakos, Charalampos Binellas, Katerina Maidatsi, et al. Magnetic ionic liquid in stirring-assisted drop-breakup microextraction: proof-of-concept extraction of phenolic endocrine disrupters and acidic pharmaceuticals [J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 9(10): 53-59
- [20] Requejop, Calvarn, Gomeze, et al. Study of the suitability of two ammonium-based ionic liquids for the extraction of benzene from its mixtures with aliphatic hydrocarbons [J]. Fluid Phase Equilibria, 2016, 42(6): 17-24
- [21] 万欢,王路华.用离子液体对中药成分进行提取、分离与分析的价值研究[J].当代医药论丛,2019,17(3):204-205
WAN Huan, WANG Lu-hua. Study on extraction, separation and analysis of Chinese medicines with ionic liquid [J]. Contemporary Medical Symposium, 2019, 17(3): 204-205
- [22] ZHANG Li-jin, WANG Xiao. Hydrophobic ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction of magnolol and honokiol from cortex *Magnoliae officinalis* [J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(13): 2035-2038
- [23] 于秀培,冯芳,滕宝祺,等.分散液液微萃取-HPLC 法测定藿香正气口服液厚朴酚与和厚朴酚含量[J].药学与临床研究,2012,20(3):264-266
YU Xiu-pei, FENG Fang, TENG Bao-qi, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction-HPLC for the determination of magnolol and honokiol in *Huoxiangzhengqi* Oral Solution [J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2012, 20(3): 264-266
- [24] HU Huiling, WANG Zhanguo, HUA Wan, et al. Effect of Chemical Profiling Change of Processed *Magnolia*

- officinalis on the Pharmacokinetic Profiling of Honokiol and Magnolol in Rats [J]. Journal of Chromatographic Science, 2016, 5: 1-12
- [25] Marsh K N, Boxall J A, Lichtenthaler R. Room temperature ionic liquids and their mixtures: a review [J]. Fluid Phase Equilibria, 2004, 219(1): 93-98
- [26] Angell C A, Ansari Y, Zhao Z. Ionic liquids: past, present and future [J]. Faraday Discussions, 2012, 154: 9-27
- [27] 金文彬,李雪楠,张依,等.离子液体在结构相似物分离的进展[J].中国科学:化学,2016,42(16):1251-1263
- JIN Wen-bin, LI Xue-nan, ZHANG Yi, et al. Separation of structurally-related compounds with ionic liquids [J]. Scientia Sinica Chimica, 2016, 42(16): 1251-1263
- [28] LOU Zaixiang, WANG Hongxin, ZHU Song, et al. Ionic liquids based simultaneous ultrasonic and microwave assisted extraction of phenolic compounds from burdock leaves [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 71(6): 28-33
- [29] 蔡延渠,朱盛山,李润萍.新型提取联用技术在中药提取中的应用进展[J].中成药,2011,33(5):863-866
- CAI Yan-qu, ZHU Sheng-shan, LI Run-ping. Application progress of new extraction combined technology in Chinese medicine extraction [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2011, 33(5): 863-866
- [30] 席彩彩,张文芳,侯明月,等.微波提取技术在中药有效成分提取中的应用[J].中国药业,2014,23(3):94-96
- XI Cai-cai, ZHANG Wen-fang, HOU Ming-yue, et al. Application of microwave extraction technology in extraction of active ingredients in traditional Chinese medicine [J]. China Pharmaceuticals, 2014, 23(3): 94-96
- [31] Nail Altunay, Ramazan Gurkan. Ion pair vortex assisted-ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for selective separation and preconcentration of 4-methylimidazole from caramel colour drinks and foodstuffs prior to its spectrophotometric determination [J]. Microchemical Journal, 2019, 147: 999-1009
- [32] 袁金凤,朱林峰,彭诗涛,等.从生长年限和入药部位探讨厚朴净制的意义[J].世界科学技术:中医药现代化中药研究,2019,21(3):559-564
- YUAN Jin-feng, ZHU Lin-feng, PENG Shi-tao, et al. Exploring the significance of *Magnolia officinalis* cleansing from growth years and medicinal parts [J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2019, 21(3): 559-564
- [33] 谭洋,满兴战,周峰,等.酶解法对凹叶厚朴中厚朴酚与和厚朴酚转移率的影响[J].广东化工,2017,44(24):13-14
- TAN Yang, MAN Xing-zhan, ZHOU Feng, et al. Study on magnolol and honokiol extraction rates from *Magnolia officinalis* Rehd. var. *biloba* Rehd. processed by enzymolysis [J]. Guangdong Chemical Industry, 2017, 44(24): 13-14
- [34] 张朝晖,王秋兰,姚茂君.厚朴枝中厚朴酚及和厚朴酚提取工艺比较[J].食品科学,2010,31(6):32-35
- ZHANG Zhao-hui, WANG Qiu-lan, YAO Mao-jun. Comparative study of different extraction techniques for extraction of magnolol and honokiol from branches of *Magnolia hypoleuca* [J]. Food Science, 2010, 31(6): 32-35
- [35] 吴巧凤,严云良,张小霞.厚朴超声提取工艺的优化[J].中成药,2018,40(5):1070-1074
- WU Qiao-feng, YAN Yun-liang, ZHANG Xiao-xia. Ultrasonic extraction optimization for *Magnoliae officinalis* cortex [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(5): 1070-1074

(上接第 149 页)

- [25] 董峰.基于果蔬包装的纳米纤维素/壳聚糖复合膜的制备、性能及应用[D].哈尔滨:东北林业大学,2015:138
- DONG Feng. Preparation, property and application of nanocellulose/chitosan composite film based on fruit and vegetable packaging [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2015: 138
- [26] 刘雪雪.黄瓜果皮褪绿进程与商品果货架品质和种子发育的关系[D].咸阳:西北农林科技大学,2018:44
- LIU Xue-xue. Study on pericarp chlorotic process and its relation to commercial fruit shelf quality and seed development in cucumber [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2018: 44