

· 顶空固相微萃取法研究专题 ·

[编者按] 湖北省药用植物校企共建研发中心分为资料室、提取制备研究室、活性物质研究室、分析室及会议室。研发中心是以促进企业成为技术创新主体、提升企业自主创新能力、提高企业核心竞争力为目标,开展天然植物基础研究和应用基础研究工作的重点实验室。药用植物资源开发与应用研究团队负责人卢金清,二级教授,现任湖北省药用植物校企共建研发中心主任,享受国务院特殊津贴专家,获湖北省“五一”劳动奖章,长期从事中药化学和天然药物化学的教学和科研工作,主持、参与国家和省部级科研课题 20 余项,取得科研成果 10 余项,申请发明专利 10 余项,发表学术论文百余篇。

团队现有成员 20 余人,其中教授 5 人,副教授 9 人,博士 5 人,在读研究生 20 余人。本科研团队以湖北省药用植物研发中心、湖北省药用植物校企共建研究中心等为依托开展研究工作,建有药用植物品质资源研究、药用植物活性研究、药用植物提取制备技术研究、药用植物数据库研究、药用植物中试及生产技术研究等平台。仪器设备总值约 500 余万元。

HS-SPME-GC-MS 联用分析炒制前后莱菔子中挥发性成分变化

夏青松¹, 卢金清^{2*}, 黎强²

(1. 湖北省直属机关医院, 武汉 430071; 2. 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:分析莱菔子生品及炒制品中挥发性成分的化学成分及相对含量的变化。方法:采用顶空固相微萃取法(HS-SPME)结合气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对莱菔子的生品及炒制品挥发性成分进行分析;以峰面积归一化法计算各组分的质量分数。结果:从莱菔子生品和炒制品中分别分离鉴定出 26 种和 27 种化合物,共有成分 11 种,分别占挥发性成分总量 80.3% 和 54.90%,其中生品质量分数较高的成分有二甲基二硫醚(23.26%),二甲基三硫醚(13.74%),芥酸(3.45%),油酸(2.98%)等,炒制品中质量分数较高的成分有亚麻酸(9.43%),油酸(8.80%),棕榈酸(5.64%),二甲基二硫醚(5.21%),二甲基三硫醚(4.18%)等。结论:采用 HS-SPME-GC-MS 联用技术分析莱菔子生品及炒制品中挥发性成分及质量分数变化,可以从挥发性成分的变化方面为莱菔子生品及炒制品功效差异奠定一定的物质理论基础,为其进一步研究和综合利用提供科学依据。

[关键词] 莱菔子; 生品及炒制品; 顶空-固相微萃取; 气相色谱-质谱联用; 挥发性成分

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)02-0057-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020057

HS-SPME-GC-MS Analysis on Changes in Volatile Components in Raphani Semen Before and After Stir-frying

XIA Qing-song¹, LU Jin-qing^{2*}, LI Qiang²

(1. *Affiliated Institution Hospital of Hubei Province, Wuhan 430071, China;*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes in chemical compositions of volatile components and their relative contents in Raphani Semen crude and stir-fried products. **Method:** Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis technique was used to analyze the volatile components in Raphani Semen crude and stir-fried products; peak area

[收稿日期] 20160518(009)

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2004AB242)

[第一作者] 夏青松,从事药剂学研究,Tel:027-68890101,E-mail:qqss8655@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,E-mail:ljq59169@sohu.com

normalization method was used to calculate the relative contents of each components. **Result:** The 26 and 27 compounds were separated and identified from Raphani Semen crude and stir-fried products respectively, involving a total of 11 common components, respectively accounting for 80.3% and 54.90% of total volatile components. The components with higher contents in crude Raphani Semen included dimethyl disulfide (23.26%), dimethyl trisulfide (13.74%), erucic acid (3.45%), and oleic acid (2.98%). The components with higher contents of stir-fried products included linolenic acid (9.43%), oleic acid (8.80%), palmitic acid (5.64%), dimethyl disulfide (5.21%), and dimethyl trisulfide (4.18%), etc. **Conclusion:** HS-SPME-GC-MS technology could be used to analyze the changes in chemical compositions of volatile components and their relative contents in Raphani Semen crude and stir-fried products, lay certain theoretical foundation for explaining the material basis of efficacy differences between Raphani Semen crude and stir-fried products, and provide scientific basis for further research and comprehensive utilization.

[**Key words**] Raphani Semen; crude and stir-fried products; headspace solid-phase microextraction; gas chromatography-mass spectrometry; volatile components

莱菔子,别名萝卜子,主产于我国的河北、河南、浙江、湖北、四川等地。莱菔子性平,味辛、甘,归肺、脾、胃经,长于降气化痰、消食除胀,用于治疗饮食积滞、脘腹胀痛、大便秘结,积滞泻痢,痰壅喘咳等疾病^[1]。清代《本草求真》中总结为“生用研汁,能吐风痰,炒熟则下气定喘,消食宽胀。一生一熟,性气悬殊”^[2]。莱菔子中主要含有脂肪酸及少量挥发油、硫苷等。为了探究莱菔子“生升熟降”具体的物质基础,近年来研究较多的是其脂肪酸的组成及其抗癌机制,而关于其挥发性成分研究的较少,张欣等^[3]利用 GC-MS 分析了挥发油部位生品检出了特有的异硫氰酸酯类成分,共有成分在生、炒品中的含量有明显差别,得出了生、炒莱菔子挥发性成分有显著区别这一结论。孙忠迪等^[4]利用 GC-MS 法分析了莱菔子生品及炒制品中脂肪油含量及成分,发现莱菔子生炒品脂肪油含量相近,水煎液中炒品含量高于生品。生、炒品脂肪油中均检出了芥酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和 11-二十碳烯酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山萘酸。为了进一步探究炮制前后莱菔子中挥发性成分变化及其“生升熟降”物质基础,本实验采用 HS-SPME-GC-MS 分析莱菔子生品及炒制品中挥发性成分的化学组成及含量,分析炒制前后莱菔子挥发性成分及含量的变化,以期充分利用莱菔子这一中药资源提供可靠的依据。

1 材料

手动固相微萃取装置(德国 IKA 公司), PDMS/DVB 萃取纤维头(65 μm , 美国 Supelco 公司),顶空瓶(德国 IKA 公司,15 mL),6890/5973 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Hewlett-Packard 公司)。

生莱菔子采摘于湖北省罗田县三里畈镇,炒制

莱菔子药材购于湖北中联大药房,以上药材均经湖北中医药大学药教研室张秀桥教授鉴定为十字花科植物莱菔 *Raphanus sativus* 的干燥成熟种子及其炒制品。

2 方法与结果

2.1 固相微萃取条件 经过对样品取样量、萃取头种类、平衡温度及时间、萃取温度及时间、解吸附时间等进行了详尽的考察,得出了最佳的固相微萃取条件为,分别称取生莱菔子及炒制莱菔子粗粉 1.0 g,分别置于 15 mL 固相微萃取仪专用顶空瓶中,将带有 65 μm PDMS/DVB 萃取纤维头的手动进样器插入瓶内,于 120 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 30 min,探出萃取头萃取 20 min,取出,立即插入气相色谱仪进样口(温度为 230 $^{\circ}\text{C}$),解吸附 5 min。

2.2 气相色谱-质谱条件

2.2.1 色谱条件 前期经过对石英毛细管柱中内涂层种类、程序升温等条件进行了调试,得出了最佳的色谱条件,即 HP-5MS 石英毛细管柱(0.25 mm \times 30 m,0.25 μm);程序升温为初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$,以 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 120 $^{\circ}\text{C}$,再以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 180 $^{\circ}\text{C}$;进样口温度 230 $^{\circ}\text{C}$,载气为高纯氦气(99.999%),载气流速 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,进样模式为不分流进样。

2.2.2 质谱条件 离子源为 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。

2.3 结果 采用 GC-MS 计算机联用仪分析莱菔子生品及炒制品挥发性化学成分,经化学工作站数据处理系统及面积归一化法从其总离子流图(图 1,2)

中计算各组分的质分数,按各峰的质谱图经计算机质谱数据库检索,从莱菔子生品和炒制品中分别分离鉴定出 26 种和 27 种化合物,共有成分 11 种,分别占挥发性成分总量的 80.3% 和 54.90%,其中生品质分数较高的成分有二甲基二硫醚

(23.26%), 二甲基三硫醚(13.74%), 芥酸(3.45%), 油酸(2.98%) 等,炒制品中成分质分数较高的成分有亚麻酸(9.43%), 油酸(8.80%), 棕榈酸(5.64%), 二甲基二硫醚(5.21%), 二甲基三硫醚(4.18%) 等,结果见表 1。

表 1 莱菔子生品及炒制品挥发性成分及质分数

Table 1 Semen Raphani volatile crude and processed product composition and relative content

| No. | 化合物 | 化学式 | 质分数/% | |
|-----|---|---|-------|------|
| | | | 生品 | 炒制品 |
| 1 | 二甲基二硫醚 disulfide dimethyl | C ₂ H ₆ S ₂ | 23.26 | 5.21 |
| 2 | 正己醛 hexanal | C ₆ H ₁₂ O | 0.60 | 1.18 |
| 3 | 正己醇 1-hexanol | C ₆ H ₁₄ O | 1.28 | - |
| 4 | (1R)-(+) - α 蒎烯 1R-(+) . <i>alpha.</i> -pinene | C ₁₀ H ₁₆ | 3.91 | - |
| 5 | 二甲基三硫醚 dimethyl trisulfide | C ₂ H ₆ S ₃ | 13.74 | 4.18 |
| 6 | 3,5,5-三甲基-1-己烯 1-hexene, 3,3,5-trimethyl- | C ₉ H ₁₈ | 1.27 | 0.24 |
| 7 | 庚腈 heptanonitrile | C ₇ H ₁₃ N | 2.19 | - |
| 8 | 2-正戊基呋喃 furan, 2-pentyl- | C ₉ H ₁₄ O | 3.38 | - |
| 9 | 11-二十碳烯酸 11tr-eicosenoic acid | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | 0.16 | 3.78 |
| 10 | 花生酸 arachidic acid | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | - | 1.19 |
| 11 | 正辛醛 octanal | C ₈ H ₁₆ O | 3.27 | - |
| 12 | 3-蒎烯 3-carene | C ₁₀ H ₁₆ | 1.80 | - |
| 13 | 右旋柠檬烯 <i>d</i> -limonene | C ₁₀ H ₁₆ | 3.40 | 0.24 |
| 14 | 3,5-辛二烯-2-酮 3,5-octadien-2-one | C ₈ H ₁₂ O | - | 0.09 |
| 15 | 3,5-辛二烯-2-酮 3,5-octadien-2-one, (<i>E,E</i>) | C ₈ H ₁₂ O | 1.68 | - |
| 16 | 壬醛 nonanal | C ₉ H ₁₈ O | 0.13 | 0.56 |
| 17 | 棕榈酸 hexadecanoic acid | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 1.10 | 5.64 |
| 18 | 1,2-二甲氧基丙烷 1,2-dimethoxypropane | C ₅ H ₁₂ O ₂ | 0.11 | - |
| 19 | 油酸 oleic acid | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | 2.98 | 8.8 |
| 20 | 二甲醇缩甲硫基乙醛 1,1-dimethoxy-2-(methylthio) ethane | C ₅ H ₁₂ O ₂ S | 0.34 | 0.11 |
| 21 | 十一烷 undecane | C ₁₁ H ₂₄ | - | 1.95 |
| 22 | 十五烷 pentadecane | C ₁₅ H ₃₂ | - | 0.65 |
| 23 | 二苯甲酮 benzophenone | C ₁₃ H ₁₀ O | - | 5.00 |
| 24 | 十七烷 heptadecane | C ₁₇ H ₃₆ | 0.48 | - |
| 25 | 十八烷 octadecane | C ₁₈ H ₃₈ | - | 0.73 |
| 26 | 芳樟醇 linalool | C ₁₀ H ₁₈ O | 2.81 | - |
| 27 | 十一醛 undecylic aldehyde | C ₁₁ H ₂₂ O | - | 1.52 |
| 28 | 橙花叔醇 nerolidol | C ₁₅ H ₂₆ O | 2.61 | - |
| 29 | 1,1-二甲基胍 1,1-dimethylhydne | C ₂ H ₈ N ₂ | - | 0.56 |
| 30 | 硬脂酸 stearic acid | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 0.11 | 0.53 |
| 31 | 邻苯二甲酸二乙酯 diethyl phthalate | C ₁₂ H ₁₄ O ₄ | - | 0.14 |
| 32 | 二甲基四硫醚 tetrasulfide, dimethyl | C ₂ H ₆ S ₄ | 1.52 | - |
| 33 | 硫氰酸乙酯 thiocyanic acid, ethyl ester | C ₃ H ₅ NS | 3.61 | - |

续表 1

| No. | 化合物 | 化学式 | 质量分数/% | |
|-----|---|-------------------|--------|------|
| | | | 生品 | 炒制品 |
| 34 | 亚麻酸 linoleic acid | $C_{18}H_{32}O_2$ | 1.11 | 9.43 |
| 35 | 芥酸 erucic acid | $C_{22}H_{42}O_2$ | 3.45 | 1.19 |
| 36 | 4-甲基-1-(1-甲基乙基)二环[3.1.0]己-2-烯 4-methyl-1-(1-methylethyl)-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene | $C_{10}H_{16}$ | - | 1.06 |
| 37 | 1,9-壬二醇 1,9-nonanediol | $C_9H_{20}O_2$ | - | 0.28 |
| 38 | 反式-2,4-庚二烯醛 <i>trans,trans</i> -2,4-heptadienal | $C_7H_{10}O$ | - | 0.35 |
| 39 | 2,4-二甲基癸烷 2,4-dimethyl-decane | $C_{12}H_{26}$ | - | 0.14 |
| 40 | 1,2,3,4-四氢-1,1,6-三甲基萘 1,1,6-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene | $C_{13}H_{18}$ | - | 0.15 |

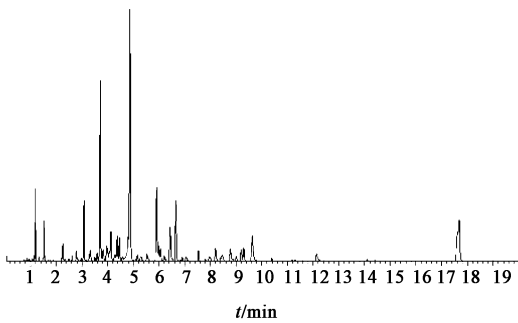


图 1 莱菔子生品挥发性成分的总离子流

Fig. 1 Total ion crude Semen Raphani volatile component flow graph

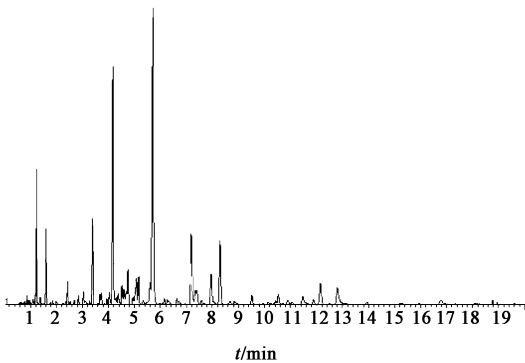


图 2 莱菔子炒制品挥发性成分的总离子流

Fig. 2 Semen Raphani total ion products of volatile components of flow chart

3 讨论

研究结果显示,莱菔子中的挥发性成分主要为烯类,酯类,硫类,酮类,醛类等。从莱菔子生品和炒制品中分别分离鉴定出 26 种和 27 种化合物,共有成分 11 种,共有成分中有二甲基二硫醚(生品 23.26%,炒制品 5.21%),二甲基三硫醚(生品 3.74%,炒制品 4.18%),油酸(生品 2.98%,炒制品 8.80%)等,烯类成分有右旋萜柠檬烯,其多年来常在食用香料、天然洗涤剂、驱虫剂中使用,还可以作为溶剂在油漆中使用。此外,也作为原料在制备基

础化学中间体物质中使用。另外右旋柠檬烯还具有镇静中枢神经^[5]、溶解胆结石、缓解心绞痛^[6]、抗菌^[7]、抗癌^[8]等作用。二甲基二硫醚是溶剂和农药中间体,也是甲基磺酰氯及甲基磺酸产品的主要原料,具有一定的胃毒性,二甲基三硫醚常用于香料香精行业,此外,还有抗菌作用^[9]。其他成分如 2-正戊基呋喃、正辛醛、壬醛可用于香料香精行业,正辛醛具有抗菌作用^[10]。芳樟醇具有镇静作用^[11],还具有一定程度的镇痛作用和中枢抑制作用^[12],芳樟醇对香味成分也起着主要的作用^[13]。油酸具有抗氧化^[14]、降低胆固醇的作用^[15]。

从实验数据可以看出,生品挥发性成分中的具有胃毒性的二甲基二硫醚的含量较炒制品高,而具有润肠作用油酸的含量较低,根据这也就很好的从挥发性成分及含量变化方面解释了莱菔子“生用研汁,能吐风痰,炒熟则下气定喘,消食宽胀。一生一熟,性气悬殊”^[2]的原因。

顶空固相微萃取法(HS-SPME)萃取速度快、操作简便、富集效率高,特别适合于低含量挥发性成分的测定。HS-SPME 的萃取过程是一个非常复杂的传质过程,萃取结果受到多种因素的影响,比如萃取纤维上的涂层种类及厚度、萃取时间、萃取温度、解吸时间等。在固相微萃取的条件考察中,样品取样量过小,如 0.1 g,会出现峰面积过小,分析出来的成分数目少等情况,取样量过大,如取 2 g,又会出现峰面积过大,峰容易叠加在一起,不容易分开,而考察到取样量为 1 g 的时候,无论是峰数目还是峰形均达到最佳,故采用 1 g 的取样量。萃取纤维头对总峰面积的影响较大,65 μm PDMS/DVB 萃取出的挥发性成分为 100 μm PDMS 萃取的 3 倍。在萃取温度的考察中,温度的上升会导致总峰面积的增加,但是随着温度的上升最高峰的含量也出现了较大变化。萃取时间上,时间过小,峰数目少,时间过长,峰

形变差。故得出了最佳的固相微萃取条件,即为分别称取生莱菔子及炒制莱菔子粗粉 1.0 g,分别置于 15 mL 固相微萃取仪专用顶空瓶中,将带有 65 μm PDMS/DVB 萃取纤维头的手动进样器插入瓶内,于 120 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 30 min,探出萃取头萃取 20 min,取出,立即插入气相色谱仪进样口(温度为 230 $^{\circ}\text{C}$),解吸附 5 min。

采用 HS-SPME-GC-MS 联用技术分析莱菔子生品及炒制品中挥发性成分及含量变化,生品挥发性成分中的具有毒性的二甲基二硫醚的含量较炒制品要高,这可以为莱菔子生品及炒制品的功效差异的物质基础提供一定的解释,为其进一步研究和综合利用提供科学依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:272.
[2] 黄宫秀·清. 本草求真[M]. 北京:中国中医药出版社,1997:105.
[3] 张欣,王爱武,宿廷敏,等. 莱菔子生制品挥发性成分 GC-MS 分析[J]. 中成药,2008,30(1):96-98.
[4] 孙忠迪,王群,李书云,等. 炮制对莱菔子中脂肪油的含量影响及 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,18(1):67-69.

[5] 尹显洪,杨仕平,杨满芽. 柠檬烯选择性环氧化的研究进展[J]. 化学试剂,1998,20(5):267-269.
[6] SUN J. *D*-Limonene:safety and clinical applications[J]. *Altern Med Rev*,2007,12(3):259-264.
[7] 王雪梅,谌徽,李雪皎,等. 天然活性单帖-柠檬烯的抑菌性能研究[J]. 吉林农业大学学报,2010,32(1):24-28.
[8] 杨真. 右旋柠檬烯诱导人白血病细胞凋亡作用机制的初步研究[D]. 大连:大连医科大学,2008.
[9] 王方艳,王秋霞,颜冬冬,等. 二甲基二硫熏蒸对保护地连作土壤微生物群落的影响[J]. 中国生态农业学报,2011,19(4):890-896.
[10] 周海恩. 三种挥发性芳香物质对柑橘采后酸腐病菌作用初探[D]. 长沙:湘潭大学,2013.
[11] 林翔云. 天然芳樟醇与合成芳樟醇[J]. 化学工程与装备,2008(7):21-26.
[12] 廖凤霞,辛龙涛,陈华,等. 中药枳实与枳壳挥发油成分对比分析[J]. 重庆大学学报:自然科学版,2004,27(5):38-40.
[13] 赵艳. 橙汁主要芳香物质及其在加工贮藏过程中的变化研究[D]. 重庆:西南大学,2010.
[14] 唐传核,徐建祥,彭志英. 脂肪酸营养与功能的最新研究[J]. 中国油脂,2000,25(6):20-23.
[15] 张峰,杨勇,赵国华,阚健全. 青稞 β -葡聚糖研究进展[J]. 粮食与油脂,2003(12):3-5.

[责任编辑 顾雪竹]