

维药新塔花中挥发性成分提取方法的优化

许云章¹, 孟庆艳^{2*}, 刘文杰², 刘圆^{1*}, 卢亚玲², 晋玉霞²

(1. 西南民族大学民族医药研究院, 成都 610041;

2. 塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室, 新疆阿拉尔 843300)

[摘要] **目的:**比较水蒸气蒸馏法(WSD)和顶空固相微萃取法(HS-SPME)对提取芳香新塔花中挥发性成分的影响。**方法:**采用水蒸气蒸馏法和固相微萃取法提取芳香新塔花药材中挥发性成分,用气相色谱-质谱法测定。**结果:**水蒸气蒸馏法处理的芳香新塔花样品获得20种化合物,总含量为89.18%,主要成分为胡薄荷酮(36.27%)、3-甲基-6-(1-甲基亚乙基)-2-环己烯-1-酮(28.12%)、百里酚(5.55%);顶空固相微萃取法获得23种化合物,总含量为92.99%,主要成分为胡薄荷酮(28.38%)、3-甲基-6-(1-甲基亚乙基)-2-环己烯-1-酮(26.31%)、百里酚(9.38%)、(4aS-cis)-2,4a,5,6,7,8,9,9a-八氢-3,5,5-三甲基-9-亚甲基-1H-苯并环庚烯(5.07%)。**结论:**顶空固相微萃取法用样品量少,提取率高,是提取维药新塔花挥发性成分的理想方法。

[关键词] 芳香新塔花;水蒸气蒸馏法;顶空固相微萃取;挥发性成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0108-05

Optimization of the Extraction Method of the Volatile Components from *Ziziphora clinopodioides*

XU Yun-zhang¹, MENG Qing-yan^{2*}, LIU Wen-jie², LIU Yuan^{1*}, LU Ya-ling², JIN Yu-xia²

(1. Ethnic Medicine Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

2. Biological Resource Protection and Utilization Keystone Lab of Tarim Basin, Alaer 843300, China)

[Abstract] **Objective:** To compare WSD and HS-SPME influence on volatile components of *Ziziphora clinopodioides*. **Method:** Volatile components of *Z. clinopodioides* were extracted by methods of WSD and HS-SPME and then analyzed by GC-MS. **Result:** The results showed that 20 chemical compounds were identified by WSD, and its total content was 89.18%. The main components were pulegone (36.27%), 3-methyl-6-(1-methylethylidene-2-cyclohexen-1-one (28.12%), thymol (5.55%); and 23 chemical compounds were identified by HS-SPME, and its total content was 92.99%. The main components are pulegone (28.38%), 3-methyl-6-(1-methylethylidene-2-cyclohexen-1-one (26.31%), thymol (9.38%), 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 9, 9a-octahydro-3, 5, 5-trimethyl-9-1H-benzocycloheptene (5.07%). **Conclusion:** The HS-SPME method is the best with less sample usage and higher extraction rate for extracting volatile composition from *Z. clinopodioides*.

[Key words] *Ziziphora clinopodioides*; WSD; HS-SPME; volatile components

维药新塔花为唇形科新塔花属植物芳香新塔花
Ziziphora clinopodioides Lam. 的干燥地上部分,别名

小叶薄荷,维药名“续择”,为维吾尔族民间常用药
材。全株地上部分均可入药,具有强心利湿、理气化痰

[收稿日期] 20120916(001)

[基金项目] 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2013SZ18);新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题(BRYB1005);兵团青年科技创新资金专项(2012CB028)

[第一作者] 许云章,硕士研究生,从事民族药物研究,Tel: 18781914804, E-mail: 834179835@qq.com

[通讯作者] *孟庆艳,助理研究员,从事天然产物活性成分快速筛选研究,Tel: 13657570952, E-mail: hongyan_meng@sina.com;

*刘圆,教授,从事民族药物学研究,Tel:028-85522322, E-mail:yuanliu163@yahoo.com.cn

痰、消炎散结之功效,临床上用于失眠、心慌、软骨病、高血压、冠心病等疾病的治疗。新塔花属植物主要分布于地中海至亚洲中部及阿富汗地区,我国分布4种即新塔花 *Z. bungeana* Juz. 南疆新塔花 *Z. pamiroalaica* Juz. ex Nevski、天山新塔花 *Z. tomentosa* Juz. 和小新塔花 *Z. tenuior* Linn., 均产于新疆^[1-3]。新塔花为芳香植物,具有薄荷香味,提炼芳香油的特色维药资源,具有广阔的应用前景。本品收载于《新疆维吾尔自治区药品标准》(1987年版),仅开发有医院制剂,药典尚未收载该药材。

挥发油提取以《中国药典》记载的水蒸气蒸馏法最为普遍,具有设备简单、操作安全、不污染环境、成本低、避免了提取过程中有机溶剂残留对油质造成影响等优点。但由于该方法存在原材料易受热焦化或使成分发生变化,所得挥发油的芳香气味也可能变味等局限性,一定程度降低其使用价值^[4]。顶空固相微萃取技术(solid phase micro extraction, SPME)是20世纪90年代初提出并发展起来的用于吸附并浓缩待测物中目标物质的样品制备方法^[5-7],具有无需有机溶剂、简单方便、测试快、费用低,集采样、萃取、浓缩、进样于一体等优点^[8],近几年来顶空固相微萃取联用气相色谱质谱技术也已被众多学者所采用,用于挥发性成分的测定,取得了较好的结果^[9-12]。

本文拟采用水蒸气蒸馏和顶空固相微萃取2种方法对维药新塔花的样品进行处理,GC-MS测定挥发性成分,比较两种提取方法对新塔花挥发性成分测定的影响。

1 材料

RACE-DSQ气相色谱-质谱联用仪(美国热电公司);挥发油提取装置:电热套(河北省黄骅市新兴电器厂)、圆底烧瓶、挥发油提取器、冷凝管;BPZ11D型分析天平(中国轻工业机械总公司常熟衡器工业公司);SPME专用顶空瓶(30 mL)、顶空固相萃取手动进样手柄、DF-II集热式磁力加热器及30 μm PDMS,65 μm CW/DVB,75 μm CAR/PDMS,100 μm PDMS 4种萃取头均产于美国Supelco公司。水为2次重蒸水,其他均为国产分析纯。

维药新塔花于2010年7月采自于新疆伊犁州巩留野核桃沟,经新疆塔里木大学助理研究员孟庆艳鉴定为唇形科新塔花属植物 *Z. clinopodioides* Lam. 的干燥全草。

2 方法

2.1 色谱-质谱条件 色谱条件:TR-1MS毛细管色

谱柱(0.25 mm × 30 m),进样口温度220 °C,柱温采用程序升温,初温40 °C,保持1 min后以8 °C · min⁻¹速度升至77 °C,保持5 min,然后以1 °C · min⁻¹速度升至82 °C,保持10 min,再以1 °C · min⁻¹速度升至90 °C,保持3 min,最后以4 °C · min⁻¹的速度升至250 °C,保持2 min。载气为高纯氦气(99.999%),恒流模式,流速1.0 mL · min⁻¹。

质谱条件:EI源;电离电压70 eV,离子源温度220 °C,扫描范围 *m/z* 10 ~ 100,进样量1 μL,不分流。

2.2 水蒸汽蒸馏法提取新塔花中的挥发性成分 称取新塔花药材200 g,于3 000 mL圆底烧瓶中,按料液比1:10加入蒸馏水,加热至沸腾,控制冷凝液的下滴速率为2滴/s,回流提取4 h,收集挥发性成分,加入少量无水硫酸钠,4 °C干燥过夜,按照1:100溶于乙醚中,待测。

2.3 HS-SPME-GC-MS法测定维药新塔花中挥发性成分

2.3.1 萃取头的老化 在进样口温度为220 °C的条件下,将萃取头插入进样口进行老化2 h,至无干扰峰出现。

2.3.2 HS-SPME条件优化

2.3.2.1 萃取头对萃取新塔花药材中挥发性成分的影响 称取芳香新塔花药材粉末0.10 g,分别使用30 μm PDMS,65 μm CW/DVB,75 μm CAR/PDMS,100 μm PDMS 4种萃取头,在60 °C下,萃取30 min,测定。结果表明,使用100 μm PDMS萃取头吸附样品获得有效物质数最多且出峰总面积最大,故选择100 μm PDMS萃取头。

2.3.2.2 样品预热时间对萃取新塔花药材中挥发性成分的影响 称取芳香新塔花药材粉末0.10 g,分别预热5,10,15,20,25 min后,在60 °C下,使用100 μm PDMS萃取头萃取30 min,测定。结果表明,预热15 min出现物质数总面积最大,故选15 min。预热样品,萃取瓶浸入水面深度以完全浸没样品为宜,萃取涂层勿深入水浴中,以免影响吸附。

2.3.2.3 萃取温度对萃取新塔花药材中挥发性成分的影响 称取芳香新塔花药材粉末0.10 g,预热15 min,使用100 μm PDMS萃取头分别在40,50,60,70,80 °C下,萃取30 min,测定。结果出峰个数均为30,出现的有效物质个数为50 °C > 80 °C > 60 °C = 70 °C > 40 °C,总峰面积60 °C > 40 °C > 80 °C > 50 °C > 70 °C,在出峰数及物质个数相差不大的情况下,60 °C时峰面积最大,故选择60 °C。

2.3.2.4 萃取时间对萃取新塔花药材中挥发性成分的影响 称取芳香新塔花药材粉末 0.10 g, 预热 15 min 后, 在 60 °C 下, 使用 100 μm PDMS 萃取头分别萃取 10, 20, 30, 40, 50 min 后, 测定。结果表明, 在出现物质数相当的情况下, 萃取 40 min 所得物质数总峰面积最大, 故选择 40 min 为最佳萃取时间。

2.3.2.5 样品量对萃取新塔花药材中挥发性成分的影响 分别称取芳香新塔花药材粉末 0.04, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20 g, 分别预热 15 min 后, 在 60 °C 下, 使用 100 μm PDMS 萃取头萃取 40 min, 测定。结果表明, 在结合出现物质数和总面积之和两个指标的情况下, 取 0.15 g 样品即可。

表 1 不同萃取头对萃取物质的影响

不同萃取头	出峰数 /个	出现物质数 /个	总峰面积 /μA·s
30 μm PDMS	24	7	2.89 × 10 ⁶
65 μm CW/DVB	30	22	9.80 × 10 ⁷
75 μm CAR/PDMS	30	7	2.38 × 10 ⁶
100 μm PDMS	30	23	3.92 × 10 ⁸

表 2 样品预热时间对萃取物质的影响

预热时间 /min	出峰数 /个	出现物质数 /个	总峰面积 /μA·s
5	30	23	3.87 × 10 ⁸
10	30	23	2.81 × 10 ⁸
15	30	26	8.73 × 10 ⁸
20	30	3.92 × 10 ⁸	
25	30	28	6.79 × 10 ⁸

综合以上, 最佳条件为样品量 0.15 g, 用 100 μm PDMS 萃取头, 预热 15 min, 在 60 °C 下, 萃取 40 min。在此条件下, 按照 1.2.1 色谱-质谱条件进行测定, 确认各组峰。

表 6 两种处理方法联用 GC-MS 分析新塔花挥发性成分及相对含量

No.	t /min	化合物	分子式	相对分子质量	两种方法相对含量/%	
					水蒸气蒸馏法	固相微萃取法
1	5.33	<i>o</i> -二甲苯 <i>o</i> -xylene	C ₈ H ₁₀	106	4.35	-
2	5.77	<i>p</i> -二甲苯 <i>p</i> -xylene	C ₈ H ₁₀	106	1.19	-
3	17.33	5-甲基-2-(1-甲基乙基)-环己酮 cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.7	-
4	17.91	顺-5-甲基-2-(1-甲基乙基)-环己酮 cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, cis-	C ₁₀ H ₁₈ O	154	3.3	-
5	18.54	[1 <i>R</i> -(1 <i>Δ</i> , 2 <i>Δ</i> , 5 <i>Δ</i>)]-5-甲基-2-(1-甲基乙基)-环己醇 cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, [1 <i>R</i> -(1 <i>Δ</i> , 2 <i>Δ</i> , 5 <i>Δ</i>)]-	C ₁₀ H ₂₀ O	156	1.57	1.71
6	19.88	薄荷醇 menthol	C ₁₀ H ₂₀ O	156	-	1.19

表 3 不同萃取温度对萃取物质的影响

萃取温度 / °C	出峰数 /个	出现物质数 /个	总峰面积 /μA·s
40	30	22	2.03 × 10 ⁸
50	30	25	1.13 × 10 ⁸
60	30	23	3.87 × 10 ⁸
70	30	23	6.18 × 10 ⁷
80	30	24	1.17 × 10 ⁸

表 4 不同萃取时间对萃取物质的影响

萃取时间 /min	出峰数 /个	出现物质数 /个	总峰面积 /μA·s
10	30	25	5.37 × 10 ⁸
20	30	25	6.11 × 10 ⁸
30	30	24	3.87 × 10 ⁸
40	30	24	7.21 × 10 ⁸
50	30	23	5.13 × 10 ⁸

表 5 不同样品量对萃取物质的影响

样品质量 /g	出峰数 /个	出现物质数 /个	总峰面积 /μA·s
0.04	30	24	4.39 × 10 ⁸
0.08	30	23	1.15 × 10 ⁹
0.1	30	21	3.87 × 10 ⁸
0.15	30	27	1.29 × 10 ⁹
0.20	30	24	8.10 × 10 ⁸

3 结果与分析

经水蒸气蒸馏法处理的新塔花样品通过 GC-MS 法分离并鉴定了 20 个组分, 经固相微萃取法处理的新塔花样品鉴定了 23 个组分, 用面积归一化法计算出各组分的相对百分含量, 结果见表 6。

表 6 两种处理方法联用 GC-MS 分析新塔花挥发性成分及相对含量

No.	<i>t</i> /min	化合物	分子式	相对分 子质量	两种方法相对含量/%		
					水蒸气蒸馏法	固相微萃取法	
7	20.81	(S)- α , α ,4-三甲基-3-环己烯-1-甲醇 3-cyclohexene-1-methanol, α , α , 4-trimethyl-, (S)-	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.68	-	
8	25.81	胡薄荷酮 pulegone	C ₁₀ H ₁₆ O	152	36.27	28.38	
9	27.76	2-异丙基-5-甲基-3-环己烯-1-酮 3-cyclohexen-1-one, 2-isopropyl-5-methyl-	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.85	0.8	
10	34.08	百里酚 thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	5.55	9.38	
11	38.88	3-甲基-6-(1-甲基亚乙基)-2-环己烯-1-酮 2-cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethylidene)-	C ₁₀ H ₁₄ O	150	28.12	26.31	
12	39.27	薄荷呋喃酮 mint furanone	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	0.8	1.07	
13	40.59	丁香酚 eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	0.65	—	
14	44.89	石竹烯 caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.25	1.16	
15	46.23	6,10-二甲基-5,9-十一碳二烯-2-酮 5,9-undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	C ₁₃ H ₂₂ O	194	-	0.38	
16	46.36	5-甲基-2-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-酮 2-cyclohexen-1-one, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.41	2.02	
17	47.36	(+)-epi-二环倍半水芹烯 (+)-epi-bicyclosesquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄	204	-	2.2	
18	47.46	4-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-3-丁烯-2-酮 3-buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-	C ₁₃ H ₂₀ O	192	-	0.42	
19	47.71	4-(1,1-二甲基乙基)-2-甲基-苯酚 2-methyl-phenol, 4-(1,1-dimethylethyl)-	C ₁₁ H ₁₆ O	164	—	0.49	
20	47.91	3,7-二甲基-6-辛烯酸 6-octenoic acid, 3,7-dimethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	0.83	2.2	
21	48.8	2-羟基-3,5,6-三甲基-2,5-环己二烯-1,4-二酮 2,5-cyclohexadiene-1,4-dione, 2-hydroxy-3,5,6-trimethyl-	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	0.35	2.02	
22	49.6	(4 <i>aS</i> - <i>cis</i>)-2,4 <i>a</i> ,5,6,7,8,9,9 <i>a</i> -八氢-3,5,5-三甲基-9-亚甲基- 1 <i>H</i> -苯并环庚烯 1 <i>H</i> -benzocycloheptene, 2,4 <i>a</i> ,5,6,7,8,9,9 <i>a</i> - octahydro-3,5,5-trimethyl-9-methylene-, (4 <i>aS</i> - <i>cis</i>)- (1 <i>ù</i> ,4 <i>aù</i> ,8 <i>aù</i>)-1,2,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -六氢-4,7-三甲基-1-(<i>-</i> 甲基乙 基)-萘 naphthalene, 1,2,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -hexahydro-4,7-dimethyl-1- (1-methylethyl)-, (1 <i>ù</i> ,4 <i>aù</i> ,8 <i>aù</i>)-	C ₁₅ H ₂₄	204	0.57	5.07	
23	50.02	(-)-斯巴醇 (-)-spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.34	1.86	
24	52.04	氧化石竹烯 caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.3	1.54	
25	52.46	十六烷 hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226	-	0.78	
26	53.65	茉莉酮酸甲酯 methyl jasmonate	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224	-	0.72	
27	54.83	环氧化异香树烯 isoaromadendrene epoxide	C ₁₅ H ₂₄ O	220	-	0.91	
28	60.6	4-十八烷基-吗啉 morpholine, 4-octadecyl-	C ₂₂ H ₄₅ NO	339	-	0.31	
29	60.7	丁基 2-戊基酯-酞酸 phthalic acid, butyl 2-pentyl ester-	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	292	1.1	-	
					总计	89.18	92.99

注:表中“-”表示不含该化合物。

由表 6 可知,用水蒸气蒸馏法处理过的新塔花样品经 GC-MS 检测,共测定出 20 种化合物,占总含

量的 89.18%;用顶空固相微萃取法获得了 23 种化合物,占总量的 92.99%。2 种方法测定结果都表

明,新塔花样品中挥发性成分主要为胡薄荷酮、百里酚和 3-甲基-6-(1-甲基亚乙基)-2-环己烯-1-酮。

3 讨论

从两种样品处理方法的 GC-MS 测定结果看,虽然两种方法测得的主要成分种类是相同的,但顶空固相微萃取法较水蒸气蒸馏法出现有效物质的数量多。另外,水蒸气蒸馏法在加热过程中对热不稳定的挥发性成分在提取的过程中可能发生分解或者与其他成分发生化学反应,致使错误的将最后检测的物质认为是原药材中所含物质,而导致实验结果的误差。顶空固相微萃取法则是在相对低温的情况下对挥发性成分进行的吸附,从而避免的上述缺点,综合考虑,顶空固相微萃取法优于水蒸气蒸馏法。

[参考文献]

- [1] 中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 下册[M]. 北京:人民卫生出版社,1978:842.
- [2] 刘勇民. 维吾尔药志. 上册[M]. 修订版. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:446.
- [3] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志. 第4卷[M]. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社,2004:326.
- [4] 刘继鑫,王克霞,李朝品. 水蒸气蒸馏法提取中药挥发油存在的问题及解决方法[J]. 时珍国医国药,

2008,19(1):97.

- [5] Pawliszyn J. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds[J]. J Anal Chem, 1995, 14(3):113.
- [6] Andreas, Stephan. Novel analytical tools for food flavours[J]. Food Res Inter. 2000, 33:199.
- [7] 蒋生祥,冯娟娟. 固相微萃取研究进展[J]. 色谱, 2012,30(3):219.
- [8] 王锡昌,陈俊卿. 固相微萃取及其应用[J]. 上海水产大学学报,2004,13(4):348.
- [9] 邢煜君,常星,张倩,等. 固相微萃取气相色谱质谱联用分析贵州产杏叶茵芹挥发性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):93.
- [10] 陈青,张前军,朱少晖,等. SPME-GC-MS 分析鱼眼草花茎叶挥发油成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(8):92.
- [11] 孙慧玲,王俊霞,顾雪竹,等. 山胡椒叶及果实挥发性成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(7):94.
- [12] 李伟,陆占国,封丹,等. 顶空固相微萃取——气质分析白芷香气成分研究[J]. 中国调味品,2012, 37(5):109.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2013 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,320 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。