

HS-SPME-GC-MS 法分析海南产黄皮不同部位的挥发性成分

何小稳^{1,2}, 马寅正², 陈锦萍², 刁新鹏¹, 梁彩娟¹, 张兰桐^{1*}

1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017

2. 海南医学院, 海南 海口 571199

摘要: **目的** 采用顶空固相微萃取(HS-SPME)结合气相色谱质谱法(GC-MS)分析检测海南产黄皮不同部位的挥发油成分。**方法** 在对5种不同性质的萃取头考察优化后,选用L₁₆(4⁵)正交表进行正交试验优化其他5个影响HS-SPME萃取的因素(水的体积、萃取温度、平衡时间、萃取时间、NaCl添加量),最终采用GC-MS相似度检索结合保留指数对黄皮叶、果皮和种子中的挥发性成分进行分析与鉴定。**结果** 最终确定的萃取条件为采用50/30 μm DVB/CAR/PDMS萃取头,取样品粉末10.0 mg于20 mL顶空瓶中,加水2.0 mL和NaCl 0.2 g,萃取温度80 ℃,平衡时间30 min,萃取时间60 min。在此条件下从海南产黄皮叶、果皮和种子中分别鉴定出83、96和106种挥发性成分,分别占挥发油总量的95.24%、92.15%和95.92%,含量较高的均为倍半萜类成分,其成分和含量在不同部位中差异较大。**结论** HS-SPME-GC-MS法灵敏度高,样品用量少,操作简便,无需有机溶剂,谱库相似度检索结合保留指数提高了分析鉴定的准确性,为海南产黄皮的进一步研究提供了科学依据。该方法能对中药中高沸点及微量成分进行富集分析,更全面、科学地对中药的质量进行表征及评估。

关键词: HS-SPME-GC-MS; 挥发性成分; 黄皮; 正交试验; 保留指数

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)18-4241-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.007

Analysis and identification of volatile components of different parts of *Clausena lansium* in Hainan by HS-SPME-GC-MS

HE Xiao-wen^{1,2}, MA Yin-zheng², CHEN Jin-ping², DIAO Xin-peng¹, LIANG Cai-juan¹, ZHANG Lan-tong¹

1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Hainan Medical University, Haikou 571199, China

Abstract: **Objective** A headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method (HS-SPME-GC-MS) was adopted for analyzing the volatile components of different parts of *Clausena lansium* in Hainan Province. **Methods** Five different fibers were investigated and optimized. Other five experimental parameters such as volume of water, extraction temperature, equilibrium time, extraction time, and salt concentration had been evaluated and optimized by means of the orthogonal design with L₁₆(4⁵) table. Finally, the volatile components of *C. lansium* leaves, pericarps, and seeds in Hainan were analyzed and identified by GC-MS combined with retention index (RI). **Results** The optimum extraction conditions were as follows: a 50/30 μm DVB/CAR/PDMS fiber, 10 mg sample powders, 2.0 mL water, 0.2 g NaCl, extraction temperature 80 ℃, equilibrium time 30 min, extraction time 60 min. A total of 83 chemical components were identified from leaves, 96 from pericarps, and 106 from seeds, representing the relative contents of 95.24%, 92.15%, and 95.92% of the total composition. The highest contents were sesquiterpenes in all of the parts, but there were obviously different both in components and contents. **Conclusion** The HS-SPME-GC-MS method is rapid and sensitive, with a small sample size, without any organic solvents. GC-MS combined with RI has improved the accuracy of analysis and identification. The results may provide experimental basis for further exploitation of *C. lansium* in Hainan. This method can be used to perform enrichment analysis of the components with high-boiling point and micro-components, which can comprehensively and scientifically characterize and evaluate the quality of Chinese materia medica.

Key words: HS-SPME-GC-MS; volatile components; *Clausena lansium* (Lour.) Skeels; orthogonal design; retention index

收稿日期: 2018-01-28

基金项目: 海南省自然科学基金项目(20163076); 海南医学院科研培育基金项目(HY2015-15); 海南医学院大学生创新训练计划项目(HYCX2018046)

作者简介: 何小稳(1985—),女,河北滦县人,博士研究生,助理研究员,主要从事中药新技术与质量控制研究。

Tel: (0898)66892235 E-mail: xiaowen_he@126.com

*通信作者 张兰桐,男,教授,博士生导师,研究方向为中药质量控制与药动学研究。Tel: (0311)86266419 E-mail: zhanglantong@263.net

黄皮 *Clausena lansium* (Lour.) Skeels 是芸香科 (Rutaceae) 黄皮属 *Clausena* Burm. f. 植物, 广泛分布于东半球热带、亚热带地区, 在我国集中于海南、广西、广东、云南、台湾等省, 其药理活性广泛, 具有行气、消滞、解表、散热、止痛、化痰等功效, 近年来国内外十分重视^[1]。黄皮中主要含有挥发油类、生物碱类、香豆素类和黄酮类等成分, 具有保肝、促智、抗氧化、抗细胞凋亡、降血糖、调血脂、抗肿瘤和抑菌等生物活性^[2-3]。黄皮的各个部位均可入药, 但功效不同, 这与其不同部位化学成分不同具有直接的关系, 其中挥发性成分也具有明显的差异^[4-6]。

已有文献报道了黄皮中挥发性成分的含量测定, 一般采用传统的水蒸气蒸馏法^[4]或同时蒸馏萃取法^[5], 但这些方法样品用量大, 提取时间长, 操作步骤繁杂, 而且整个过程在开放体系中完成, 易造成挥发性成分的丢失, 不能准确、快速、全面的分析鉴定黄皮中的挥发性成分。顶空固相微萃取技术 (HS-SPME)^[7]是一种集萃取、浓缩、解吸、进样于一体的样品前处理技术, 是以涂渍在石英玻璃纤维上的固定相作为吸附介质对待测分析物进行萃取和浓缩, 并在气相色谱仪或气相色谱质谱联用仪 (GC-MS) 的进样口进行解吸分析的技术。HS-SPME 具有操作简单、无需有机溶剂、样品用量少、灵敏度高、可与分析仪器联用实现在线自动化操作等优点, 其比直接顶空的方法^[6]灵敏度更高, 能同时富集高沸点微量的成分, 适合于环境、食品、药品及生物样品等多个领域的样品前处理, 近年来在中药挥发性成分的研究及中药质量控制等方面也得到了广泛应用^[8]。

在影响 HS-SPME 萃取的诸多因素中萃取头的性质起决定作用, 因此本研究考察不同性质的萃取头的萃取效率后, 再采用正交试验考察优化其他影响因素对萃取的影响, 以减少工作量, 更合理、科学地确立最佳的萃取条件, 并首次建立 HS-SPME-GC-MS 法结合保留指数 (RI) 分析鉴定海南产黄皮叶、果皮和种子中的多种挥发性成分。该法对黄皮中的高沸点及微量组分都能进行更好地富集, 从而更加快速、全面、准确地对黄皮药材的质量进行评价。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

GC/MS-QP2010 Plus 气相色谱-质谱联用仪 (日本岛津公司), 配有 Gerstel MPS2 多功能自动进样器, 电子轰击离子源 (EI), 四级杆质量分析器,

GC/MS-Solution 数据处理系统; FW-80 高速万能粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司); AL104 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 固相微萃取头 (100 μm PDMS、65 μm PDMS/DVB、85 μm CAR/PDMS、50/30 μm DVB/CAR/PDMS、85 μm Polyacrylate, 美国 Supelco 公司); 20 mL 顶空瓶, 配备有 PTFE/硅橡胶隔垫和磁性瓶盖 (美国安捷伦公司)。

1.2 试剂

黄皮叶和果实干于 2017 年 6 月采自海南省海口市龙桥, 经海南医学院生药学田建平副教授鉴定为芸香科黄皮属植物黄皮 *Clausena lansium* (Lour.) Skeels, 标本 (CL01-03) 存放于海南医学院科学实验中心。正构烷烃混标 C8~C40 (美国 o2si, 编号 CDGG-115320-05-1, 500 mg/L 于正己烷)。

2 方法

2.1 HS-SPME 条件

将采集的黄皮叶阴干, 黄皮果去除果肉, 果皮和种子分开洗涤, 置于烘箱 40~50 $^{\circ}\text{C}$ 干燥, 将干燥后的黄皮叶、果皮和种子用高速万能粉碎机粉碎, 过 50 目筛, 精密称取粉末 10.0 mg 于 20 mL 顶空瓶中, 加水 2.0 mL 和 NaCl 0.2 g, 混匀, 萃取温度 80 $^{\circ}\text{C}$, 平衡时间 30 min, 萃取时间 60 min, 然后在进样口 250 $^{\circ}\text{C}$ 解析 5 min, 采集 GC-MS 图谱。

2.2 GC-MS 条件

GC 条件: ZB-5MS 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm), 柱温采用升温程序: 初始柱温 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 120 $^{\circ}\text{C}$, 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 170 $^{\circ}\text{C}$, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 210 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min; 载气为氦气, 柱体积流量 1.0 mL/min; 吹扫体积流量 3.0 mL/min; 进样温度 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

MS 条件: EI 源, 离子源温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$; 溶剂延迟时间 2.0 min; 检测器电压 0.86 kV; 质量扫描时间: 3.00~50.00 min, 扫描范围 m/z 50~500; 质谱谱库: NIST08 和 NIST08s。

海南产黄皮叶、果皮和种子 GC-MS 总离子流色谱图见图 1。

2.3 RI 值测定

取正构烷烃混标按“2.2”项下条件进样分析, 记录各正构烷烃保留时间, 采用线性升温公式计算各组分的 RI 值: $RI = 100n + 100(t_x - t_n)/(t_{n+1} - t_n)$, 其中 t_x 、 t_n 和 t_{n+1} 分别为被分析组分和碳原子数处于 n 和 $n+1$ 之间的正烷烃 ($t_n < t_x < t_{n+1}$) 的流出峰的保留时间。

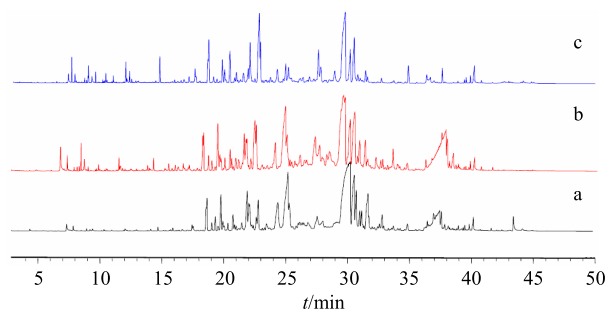


图1 海南产黄皮叶 (a)、果皮 (b) 和种子 (c) 的 GC-MS 总离子流色谱图

Fig. 1 GC-MS chromatograms of *C. lansium* leaves (a), pericarps (b), and seeds (c) in Hainan

2.4 数据分析

通过 GC-MS 工作站数据处理系统的 NIST 谱库的相似度检索, 选取匹配度高的前 10 个可能物质, 并与计算的各成分的 RI 值比较, 以质谱相似度和 RI 值接近度最高的化学结构为最佳鉴定结果, 并通过峰面积归一化法定量分析其相对含量。采用 SPSS 17.0 软件进行正交试验设计和方差分析。

由分析结果 (表 1) 可知, 黄皮叶、果皮和种子中分别检测出 113、123 和 126 个色谱峰, 鉴定了 83、96 和 106 种成分, 占总量的 95.24%、92.15% 和 95.92%。黄皮叶、果皮和种子中的成分由倍半萜、单萜、酯、酸等组成, 其中倍半萜含量最高, 3 者

表1 海南产黄皮不同部位的挥发性成分及相对含量

Table 1 Volatile components of different parts of *C. lansium* in Hainan

峰号	化合物名称	相对百分含量/%			分子式	RI
		叶	果皮	种子		
1	正己醛	—	—	0.02	C ₆ H ₁₂ O	
2	2-己烯醛	0.07	—	0.02	C ₆ H ₁₀ O	
3	反-2-己烯醇	—	—	0.01	C ₆ H ₁₂ O	
4	己醇	—	—	0.05	C ₆ H ₁₄ O	
5	对二甲苯	—	0.06	0.02	C ₈ H ₁₀	
6	α-侧柏烯	—	—	0.05	C ₁₀ H ₁₆	
7	蒎烯	—	0.01	0.01	C ₁₀ H ₁₆	
8	反-2-庚烯醛	—	—	0.03	C ₇ H ₁₂ O	
9	苯甲醛	0.42	0.85	0.55	C ₇ H ₆ O	
10	香桉烯	0.03	0.03	0.94	C ₁₀ H ₁₆	
11	β-蒎烯	—	—	0.01	C ₁₀ H ₁₆	
12	甲基庚烯酮	0.15	0.28	0.36	C ₈ H ₁₄ O	
13	月桂烯	—	0.02	0.07	C ₁₀ H ₁₆	
14	1-ethylcyclohexene	0.02	0.01	0.05	C ₈ H ₁₄	
15	β-水芹烯	—	0.06	0.04	C ₁₀ H ₁₆	
16	反,反-2,4-庚二烯醛	0.02	—	0.02	C ₇ H ₁₀ O	
17	α-萜品醇	—	0.06	0.16	C ₁₀ H ₁₆	
18	对伞花烃	—	0.07	0.09	C ₁₀ H ₁₄	
19	柠檬烯	0.02	0.09	0.24	C ₁₀ H ₁₆	
20	α-水芹烯	0.06	0.43	0.58	C ₁₀ H ₁₆	
21	苯乙醛	0.07	0.27	0.42	C ₈ H ₈ O	
22	甜瓜醛	0.12	0.03	0.06	C ₉ H ₁₆ O	806
23	γ-松油烯	0.02	0.07	0.38	C ₁₀ H ₁₆	808
24	3,5-辛二烯-2-酮	0.01	—	0.02	C ₈ H ₁₂ O	831
25	顺-4-侧柏醇	—	—	0.03	C ₁₀ H ₁₈ O	836
26	异松油烯	—	0.02	0.10	C ₁₀ H ₁₆	869

续表 1

峰号	化合物名称	相对百分含量/%			分子式	RI
		叶	果皮	种子		
27	2-壬酮	0.01	0.04	0.05	C ₉ H ₁₈ O	877
28	芳樟醇	0.04	0.10	0.35	C ₁₀ H ₁₈ O	897
29	正壬醛	0.02	0.02	0.12	C ₉ H ₁₈ O	904
30	左旋樟脑	—	—	0.01	C ₁₀ H ₁₆ O	948
31	(Z)-2-壬烯醛	—	0.01	0.03	C ₉ H ₁₆ O	957
32	冰片	—	0.02	0.06	C ₁₀ H ₁₆ O	973
33	4-萜烯醇	0.02	0.24	0.86	C ₁₀ H ₁₈ O	981
34	melilotal	0.12	0.09	0.31	C ₉ H ₁₀ O	985
35	隐酮	—	0.11	—	C ₉ H ₁₄ O	988
36	水杨酸甲酯	0.01	—	—	C ₈ H ₈ O ₃	993
37	α -松油烯	—	0.03	0.50	C ₁₀ H ₁₈ O	996
38	(-)-反式-松香芹醇	0.01	0.04	0.17	C ₁₀ H ₁₆ O	1 004
39	顺-辣薄荷醇	—	0.01	0.04	C ₁₀ H ₁₈ O	1 009
40	β -环柠檬醛	0.01	0.02	0.10	C ₁₀ H ₁₆ O	1 017
41	(+)-香芹酮	0.01	0.04	0.02	C ₁₀ H ₁₄ O	1 041
42	橙花醇	—	—	0.07	C ₁₀ H ₁₈ O	1 046
43	(E)-柠檬醛	0.02	0.03	0.03	C ₁₀ H ₁₆ O	1 065
44	1-norbornane methanol acetate	0.08	0.04	0.07	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	1 073
45	水芹醛	—	0.12	0.03	C ₁₀ H ₁₆ O	1 078
46	乙酸冰片酯	—	0.04	0.08	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1 083
47	2-carene-10-al	—	0.03	—	C ₁₀ H ₁₄ O	1 088
48	甲酸香叶酯	—	0.02	0.03	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	1 117
49	乙酸桃金娘烯酯	—	0.06	0.10	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	1 126
50	(Z)-乙酸香芹酯	—	0.02	—	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	1 128
51	α -檀香烯	0.05	0.01	0.05	C ₁₅ H ₂₄	1 131
52	δ -榄香烯	0.13	0.20	0.17	C ₁₅ H ₂₄	1 136
53	α -萜澄茄油烯	0.03	0.08	0.15	C ₁₅ H ₂₄	1 145
54	橙花乙酸酯	0.03	0.13	0.15	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1 153
55	异硫氰酸苄酯	0.11	0.16	0.34	C ₈ H ₇ NS	1 160
56	乙酸香叶酯	0.04	0.23	0.43	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1 173
57	可巴烯	—	0.07	—	C ₁₅ H ₂₄	1 177
58	佛手柑油烯	0.29	0.07	—	C ₁₅ H ₂₄	1 186
59	β -榄香烯	0.20	0.14	0.88	C ₁₅ H ₂₄	1 189
60	顺式-茉莉酮	0.04	—	0.41	C ₁₁ H ₁₆ O	1 191
61	姜烯	0.03	0.03	0.08	C ₁₅ H ₂₄	1 201
62	α -雪松烯	0.03	0.05	—	C ₁₅ H ₂₄	1 207
63	(-)-反- α -香柠檬烯	0.02	0.04	—	C ₁₅ H ₂₄	1 212
64	荳蔻烯	1.13	1.28	1.62	C ₁₅ H ₂₄	1 218
65	石竹烯	1.82	1.17	3.47	C ₁₅ H ₂₄	1 220
66	β -柏木烯	0.02	—	—	C ₁₅ H ₂₄	1 225

续表 1

峰号	化合物名称	相对百分含量/%			分子式	RI
		叶	果皮	种子		
67	(+)- α -柏木萜烯	0.45	0.43	0.32	C ₁₅ H ₂₄	1 230
68	香树烯	0.76	0.33	0.29	C ₁₅ H ₂₄	1 237
69	橙化基丙酮	0.35	—	0.18	C ₁₃ H ₂₂ O	1 243
70	(+)- <i>epi</i> - β -檀香烯	—	0.17	—	C ₁₅ H ₂₄	1 244
71	(<i>E</i>)- β -金合欢烯	2.44	2.34	1.96	C ₁₅ H ₂₄	1 249
72	葎草烯	0.61	0.68	1.10	C ₁₅ H ₂₄	1 253
73	α -雪松烯	0.29	0.41	0.21	C ₁₅ H ₂₄	1 256
74	(-)- β -杜松烯	0.03	—	—	C ₁₅ H ₂₄	1 270
75	γ -依兰油烯	1.01	0.74	0.36	C ₁₅ H ₂₄	1 275
76	β -雪松烯	0.37	0.41	0.91	C ₁₅ H ₂₄	1 278
77	(<i>Z</i>)- β -金合欢烯	—	0.11	0.17	C ₁₅ H ₂₄	1 281
78	β -瑟林烯	0.30	—	0.10	C ₁₅ H ₂₄	1 287
79	γ -杜松烯	—	0.65	0.96	C ₁₅ H ₂₄	1 293
80	γ -榄香烯	0.72	—	—	C ₁₅ H ₂₄	1 294
81	α -法尼烯	3.83	1.92	0.97	C ₁₅ H ₂₄	1 303
82	β -红没药烯	3.57	1.56	4.11	C ₁₅ H ₂₄	1 306
83	(+)- α -长叶蕈烯	—	1.27	—	C ₁₅ H ₂₄	1 309
84	δ -杜松烯	0.39	0.57	0.30	C ₁₅ H ₂₄	1 315
85	β -倍半水芹烯	1.02	3.62	11.64	C ₁₅ H ₂₄	1 324
86	α -香柠檬烯	2.15	2.22	3.04	C ₁₅ H ₂₄	1 326
87	cubinene	0.01	0.11	0.15	C ₁₅ H ₂₄	1 330
88	大根香叶烯 D	0.08	—	0.23	C ₁₅ H ₂₄	1 335
89	α -红没药醇	0.22	0.41	0.18	C ₁₅ H ₂₄	1 336
90	acoradien	0.87	0.16	0.15	C ₁₅ H ₂₄	1 340
91	榄香醇	—	—	0.51	C ₁₅ H ₂₆ O	1 344
92	反式橙花叔醇	5.40	2.06	1.71	C ₁₅ H ₂₆ O	1 357
93	黑蚁素	—	0.35	0.26	C ₁₅ H ₂₂ O	1 366
94	桉油烯醇	12.76	8.34	1.69	C ₁₅ H ₂₄ O	1 372
95	氧化石竹烯	0.23	2.63	1.10	C ₁₅ H ₂₄ O	1 377
96	环氧化蛇麻烯 II	0.14	1.53	0.57	C ₁₅ H ₂₄ O	1 405
97	反式- <i>Z</i> - α -环氧红没药烯	0.28	0.79	0.53	C ₁₅ H ₂₄ O	1 416
98	α -桉叶醇	—	—	0.25	C ₁₅ H ₂₆ O	1 422
99	cubenol	—	4.76	0.27	C ₁₅ H ₂₂ O	1 428
100	(<i>E</i>)-香榧醇	—	2.34	2.13	C ₁₅ H ₂₀	1 435
101	(+)- γ -古芸烯	1.01	1.74	0.25	C ₁₅ H ₂₄	1 442
102	aromadendrene oxide-(2)	—	3.39	1.56	C ₁₅ H ₂₄ O	1 459
103	顺- α -檀香醇	29.08	18.21	23.58	C ₁₅ H ₂₄ O	1 477
104	α -红没药醇	6.62	5.12	4.61	C ₁₅ H ₂₆ O	1 486
105	α -檀香醇	2.88	6.58	7.33	C ₁₅ H ₂₄ O	1 493
106	(-)-isoaromadendrene-(V)	0.88	0.28	0.55	C ₁₅ H ₂₄	1 505

续表 1

峰号	化合物名称	相对百分含量/%			分子式	RI
		叶	果皮	种子		
107	反- Z - α -香柠檬烯	—	1.37	—	C ₁₅ H ₂₄ O	1 507
108	顺- α -檀香醇	5.80	1.97	1.15	C ₁₅ H ₂₄ O	1 519
109	E - α -檀香醇	—	1.02	0.16	C ₁₅ H ₂₄ O	1 531
110	(Z,E)- α -金合欢烯	0.91	—	—	C ₁₅ H ₂₂ O	1 541
111	ledol	0.29	0.92	—	C ₁₅ H ₂₆ O	1 561
112	檀香醇	0.11	—	—	C ₁₅ H ₂₄ O	1 569
113	α -甜橙醛	—	—	0.09	C ₁₅ H ₂₄ O	1 573
114	檀香醇	0.36	0.46	0.92	C ₁₅ H ₂₄ O	1 623
115	顺- α -红没药醇	—	—	1.29	C ₁₅ H ₂₄	1 641
116	反- Z - α -红没药烯环氧化物	0.81	0.17	0.40	C ₁₅ H ₂₄ O	1 644
117	澳白檀醇	—	1.35	—	C ₁₅ H ₂₄ O	1 676
118	亚麻醇	0.07	0.81	—	C ₁₈ H ₃₂ O	1 690
119	反式- β -檀香醇	0.26	—	—	C ₁₅ H ₂₄ O	1 701
120	法尼基丙酮	0.17	—	—	C ₁₈ H ₃₀ O	1 706
121	棕榈酸甲酯	0.09	0.06	0.18	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1 725
122	异植物醇	0.03	0.05	—	C ₂₀ H ₄₀ O	1 745
123	棕榈酸	0.90	0.46	1.85	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1 763
124	棕榈酸乙酯	0.05	0.08	0.14	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1 791
125	亚油酸甲酯	—	—	0.09	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	1 838
126	植醇	1.16	—	—	C ₂₀ H ₄₀ O	1 847
127	亚油酸	—	—	0.09	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	1 857
128	十八烷酸	0.16	—	—	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	1 862
129	亚油酸乙酯	—	—	0.11	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	1 873
130	亚麻酸乙酯	—	—	0.08	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	1 876

—未检测出或者痕量

—No detected or trace

中含量较高的大多为共有成分,有顺- α -檀香醇(29.08%、18.21%、23.58%)(括号中分别表示该成分在黄皮叶、果皮和种子的含量,下同)、桉油烯醇(12.76%、8.34%、1.71%)、 β -倍半水芹烯(1.02%、3.62%、11.64%)、 α -檀香醇(2.88%、6.58%、7.33%)、 α -红没药醇(6.62%、5.12%、4.61%)等,虽然成分一样,但有的含量差异很大。有些含量较高成分仅存在于叶中,如植物醇(1.16%),仅存在于果皮中的有澳白檀醇(1.35%),仅存在于种子中的有顺- α -红没药醇(1.29%)等,也有存在于2个部位的共有成分。总之,黄皮叶、果皮和种子中的挥发性成分种类和含量均有差异,可直接导致不同部位功效和药理作用的不同。

3 讨论

3.1 HS-SPME 萃取条件的优化

3.1.1 萃取头纤维(Fiber)的优化 HS-SPME 的

萃取遵循“相似相溶”的原理,Fiber的性质是影响待测组分的萃取效率的决定因素。基于Fiber在SPME的重要性,本研究先考察了5种不同性质的Fiber的萃取效果。首先按表2将5种Fiber置于仪器上老化,在预实验的基础上,称取黄皮叶10.0 mg于20 mL顶空瓶中,加水4.0 mL,萃取温度70℃,平衡时间30 min,萃取60 min,解析5 min,在该条件下采用5种不同性质的Fiber,主要比较不同Fiber萃取得到的峰数(化合物个数)、总峰面积,并将峰面积分为3个时间段(3.00~15.00 min、15.01~35.00 min和35.01~50.00 min)进行比较,这3段时间的化合物大体可以代表低、中、高沸点的化合物,具体见图2。

由图2可以看出,不同Fiber提取得到的峰数相差不大,总峰面积、3.00~15.00 min峰面积、

表 2 5 种 Fiber 老化温度及时间

Table 2 Aging temperatures and times of five kinds of Fibers

SPME Fiber 种类	老化温度/℃	时间/min
65 μm PDMS/DVB	250	30
85 μm Polyacrylate	280	30
85 μm CAR/PDMS	300	30
100 μm PDMS	250	30
50/30 μm DVB/CAR/PDMS	270	30

PDMS-聚二甲基硅氧烷 DVB-二乙烯基苯 Polyacrylate-聚丙烯酸酯 CAR-专利碳吸附剂

PDMS-polydimethylsiloxane DVB-divinylbenzene Polyacrylate-polyacrylate CAR-carbon adsorbent

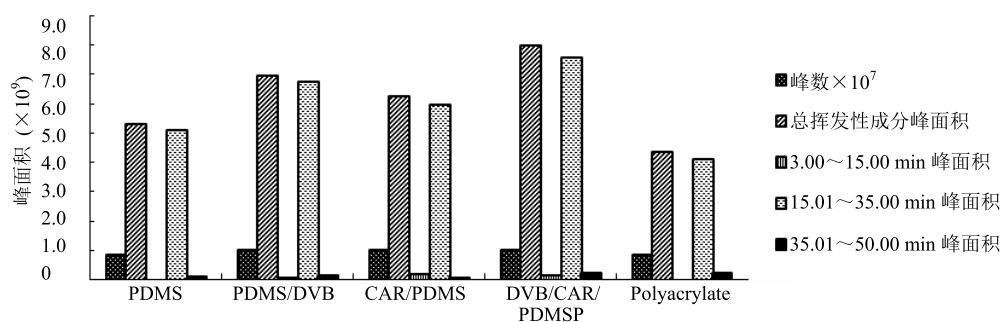


图 2 不同 Fiber 萃取结果的比较

Fig. 2 Extraction efficiency of five different Fibers

得到的峰数、总峰面积、3.00~15.00 min 峰面积、15.01~35.00 min 峰面积、35.01~50.00 min 峰面积这 5 个指标，最终选择的 Fiber 为 50/30 μm DVB/CAR/PDMS。

3.1.2 水的体积、萃取温度、平衡时间、萃取时间和 NaCl 添加量的条件优化 在确立了最佳萃取效率的萃取头后，因影响 HS-SPME 萃取的其他因素及水平多，如采用全面试验，试验次数多、难以达到，而正交实验设计是一种合理安排、科学分析各实验因素的有效数理统计方法^[9-10]，可用不太多的实验次数，找出实验因素的最佳水平组合，避免浪费，减少盲目性。因此本研究采用 5 因素 4 水平的正交试验设计对 HS-SPME 的 5 个影响因素：水的体积 (A)、萃取温度 (B)、平衡时间 (C)、萃取时间 (D)、NaCl 添加量 (E) 进行优化，以总峰面积为实验指标进行统计分析，正交因素水平见表 3，正交试验分析结果见表 4，5 因素在 4 个不同水平的总峰面积的变化情况见图 3。

由表 4 的结果可见，因素 B 对萃取影响最显著，各因素对萃取影响的顺序为 B>D>A>E>C。

15.01~35.00 min 峰面积的大小均为 50/30 μm DVB/CAR/PDMS>65 μm PDMS/DVB>85 μm CAR/PDMS>100 μm PDMS>85 μm Polyacrylate，而 35.01~50.00 min 的峰面积 DVB/CAR/PDMS>Polyacrylate>PDMS/DVB>PDMS>CAR/PDMS。Polyacrylate 属于极性涂层，具有吸附强极性半挥发性物质的特点；PDMS 属于非极性涂层，易吸附低沸点低极性挥发性物质；DVB 属于极性涂层，易吸附极性半挥发性物质；CAR 比表面积大易于吸附低沸点小分子化合物，而 PDMS/DVB、CAR/PDMS 和 DVB/CAR/PDMS 分别具备 2 种或 3 种 Fiber 的特点，因此吸附的总挥发性化合物会更高，综合考虑提取

表 3 正交因素水平

Table 3 Factors and levels of orthogonal design

水平	试验因素				
	A/mL	B/℃	C/min	D/min	E/g
1	2	50	20	30	0
2	6	60	30	40	0.1
3	10	70	40	50	0.2
4	14	80	50	60	0.4

(1) 水的体积：在 20 mL 顶空瓶中，随着顶空溶剂水的体积增大，顶空空间的比例缩小，挥发性成分的含量应该增加，但因水中的样品总量 (10.0 mg) 相同，样品在水中的质量浓度随着水体积的增大反而降低，总的萃取效率也有所降低，所以最终确定水的体积为 2.0 mL。

(2) 萃取温度：萃取温度对萃取效率的影响最大，当温度为 50~80 $^{\circ}\text{C}$ 时，随着萃取温度的升高，萃取效率也相应升高，因此最终选择的萃取温度为 80 $^{\circ}\text{C}$ 。

(3) 平衡时间：由图 3 可知，该研究中平衡时间从 20~50 min 对萃取效率的影响较小，为了提高萃取

表 4 正交试验分析结果

Table 4 ANOVA results for experimental response in $L_{16}(4^5)$ matrix

变异来源	SS	df	MS	F	P
A	7.718×10^{18}	3	2.573×10^{18}	11.993	0.035
B	1.451×10^{18}	3	4.836×10^{18}	22.546	0.015
C	—	—	—	—	—
D	9.468×10^{18}	3	3.156×10^{18}	14.712	0.027
E	2.564×10^{18}	3	8.545×10^{18}	3.984	0.143
误差	6.435×10^{18}	3	2.145×10^{18}		
总计	3.490×10^{18}	15			

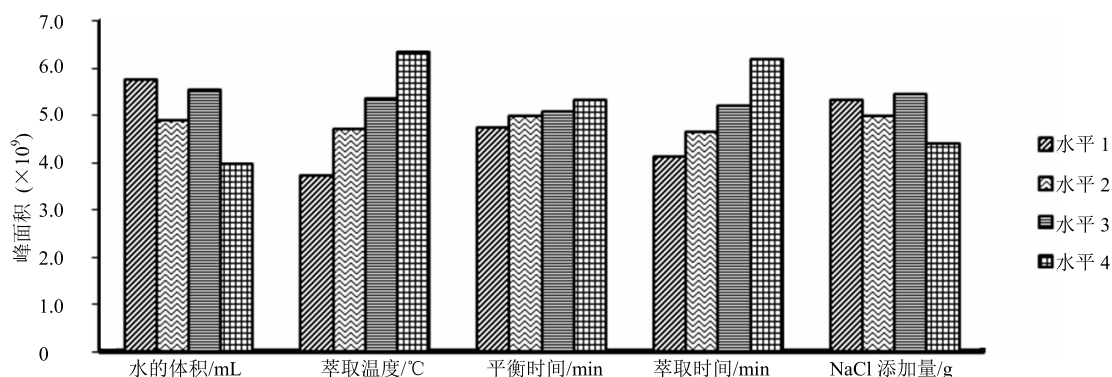
 $P < 0.05$ 具有显著性影响 $P < 0.05$ with significant effects

图 3 5 因素在 4 个不同水平的总峰面积的变化情况

Fig. 3 Effect of total peak area of five factors at four different levels

效率且缩短萃取时间, 最终选择平衡时间为 30 min。

(4) 萃取时间: 在萃取时间为 30~60 min 时, 随着萃取时间的延长, 萃取效率显著升高, 因此最终选择萃取时间为 60 min。

(5) NaCl 添加量: 增加水中的离子浓度可以使待测组分在水中的溶解度降低, 提高顶空空间待测组分的浓度, 进而提高萃取效率。本研究 NaCl 的添加量为 0.2 g 时萃取效率最高, 因此最终选择 2.0 mL 水中加入 NaCl 0.2 g 作为顶空溶剂。

3.2 黄皮不同部位挥发性成分的研究

Zhao 等^[4]采用水蒸气蒸馏法提取海南昌江产的黄皮叶、花、果肉和种子中的挥发油, 并结合 GC-MS 分析检测, 叶中主要成分有 β -檀香醇 (35.2%)、红没药醇 (13.7%); 花中主要成分有 β -檀香醇 (50.6%), 9-octadecenamide (17.2%); 果肉中主要成分有 β -檀香醇 (52%), α -檀香醇 (15.5%); 种子中主要成分有水芹烯 (54.8%)、柠檬烯 (23.6%), 其中种子的挥发性成分与其他部位差异最大。唐冰

等^[11]同样采用水蒸气蒸馏法提取广西产的黄皮叶的挥发油, 其含量最高的为 2,6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-二环 [3.1.1] 庚-2-烯 (22.25%) 即 α -香柠檬烯, 其次为石竹烯 (14.29%)、(S)-1-甲基-4-(5-甲基-1-亚甲基-4-己烯基)-环己烯即红没药烯 (12.35%) 等。廖华卫等^[12]也采用水蒸气蒸馏法提取广东产的黄皮果皮的挥发油, 其中含量最高的为 β -水芹烯 (35.59%), 其次为 α -蒎烯 (9.01%)。研究发现, 黄皮同一部位采用同一提取方法挥发性成分的组成及含量仍存在差异, 这可能跟黄皮的产地、生长条件等因素有关, 而黄皮不同部位挥发性成分的差异更大。

据文献报道, 采用不同提取方法分析测得的黄皮挥发性成分差异更大。殷艳华等^[5]采用同时蒸馏萃取法提取从市场上购买的黄皮种子、枝叶和果皮的挥发油, 并结合 GC-MS 分析检测, 其中种子中主要成分为月桂烯 (12.74%)、4,4-二甲基-6-亚甲基-2-环己烯-1-酮 (11.6%)、2,7-二甲基-3-辛烯-5-炔

(10.62%)、 β -蒎烯(10.44%);枝叶主要成分为 β -匙叶桉油烯醇(11.81%)、 γ -衣兰油烯(10.89%)、 α -酮醇(10.23%);果皮主要成分为反式异柠檬烯(37.03%)、 γ -蒎品烯(10.74%)。Chokeprasert 等^[6]采用 HS-GC-MS 分析产自泰国的黄皮叶、果肉、果皮、种子的挥发性成分,其主成分香桉烯在叶中含量为 14.9%,果肉中 50.6%,果皮中 69.1%、种子中为 83.6%。黄皮叶其他主要成分为 β -没药烯(9.9%)、 β -石竹烯(7.7%);果肉体中为 3-cyclohexen-1-ol(15%)、环己烯(6.5%);果皮中为 α -水芹烯(10.6%)和 α -蒎烯(9.4%);种子中为 α -蒎烯(4.3%)、 α -水芹烯(3%)。同为顶空技术,该报道中采用直接 HS-GC-MS 测得黄皮叶、果皮、种子的挥发性成分分别为 39、30 和 25 种,且分析得到的成分沸点均较低,而高沸点成分及微量成分很少检测到。本实验采用的 HS-SPME-GC-MS 的灵敏度更高,微量成分及高沸点成分如棕榈酸、植物醇等均能被富集并检测,因此鉴定的成分更多,分别为 83、96 和 106 种成分,该方法更全面、科学地对黄皮的质量进行了表征和评估。

另外,GC-MS 分析鉴定结果的准确性也是造成挥发性成分存在差异的原因之一,因此本实验采用 GC-MS 的 NIST 谱库相似度检索结合 RI 的方法^[13],大大提高了分析结果的准确性。例如第 51 个成分,相似度检索结果显示 α -檀香烯和 β -香烯的相似度均为 93,但 α -檀香烯的 RI 为 1 211, β -香烯则为 1 431,因 α -檀香烯更接近计算所得的 RI 值 1 131 而确定该成分为 α -檀香烯。采用 RI 值作为辅助手段,对检索结果进行进一步验证,可以使结果更加准确可信。

3.3 小结

本研究首次采用 HS-SPME-GC-MS 法分析鉴定海南产黄皮叶、果皮和种子中的多种挥发性成分,仅使用 10 mg 样品就能对黄皮中的高沸点、微量组分进行富集、分析,共鉴定出百余种化合物,而传统方法需蒸馏数小时,操作繁琐、样品用量大,一般从几十克到上百克,或需用有机溶剂,污染环境。HS-SPME-GC-MS 法操作简单、灵敏度高、无需有机溶剂,是一种快速、全面、准确的中药挥发性成

分的分析鉴定方法,也为海南产黄皮的进一步研究与开发提供了依据。

参考文献

- [1] 彭文文,宋卫武,刘欣媛,等.黄皮属植物中呋唑生物碱的研究进展[J].中草药,2017,48(13):2761-2770.
- [2] Shen D Y, Chao C H, Chan H H, et al. Bioactive constituents of *Clausena lansium* and a method for discrimination of aldose enantiomers[J]. *Phytochemistry*, 2012, 82(1): 110-117.
- [3] Adebajo A C, Iwalewa E O, Obuotor E M, et al. Pharmacological properties of the extract and some isolated compounds of *Clausena lansium* stem bark: Anti-trichomonal, antidiabetic, anti-inflammatory, hepatoprotective and antioxidant effects[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122(1): 10-19.
- [4] Zhao J Y, Nan P, Zhong Y. Chemical composition of the essential oils of *Clausena lansium* from Hainan island, China[J]. *Z Naturforsch C*, 2004, 59(4): 153-156.
- [5] 殷艳华,万树青.黄皮不同部位挥发油化学成分分析[J].广东农业科学,2012,39(5):99-102.
- [6] Chokeprasert P, Charles A L, Sue K H. Volatile components of the leaves, fruits and seeds of wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels][J]. *J Food Compos Anal*, 2007, 20(1): 52-56.
- [7] 傅若农.固相微萃取(SPME)近几年的发展[J].分析试验室,2015,34(5):602-620.
- [8] 叶欣,卢金清,曹利.顶空-固相微萃取技术在中药领域的运用[J].中国药房,2017,28(6):861-864.
- [9] 李志西,杜双奎.试验优化设计与统计分析[M].北京:科学出版社,2010.
- [10] Anbia M, Khataei N K. Ordered nanoporous carbon as an effective adsorbent in solid-phase microextraction of toluene and chlorinated toluenes in water samples[J]. *J Saudi Chem Soc*, 2016, 20(Suppl 1): S38-S45.
- [11] 唐冰,王成芳,费超,等.GC-MS 法分析黄皮叶挥发油的化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):94-97.
- [12] 廖华卫,邓金梅,黄敏仪.黄皮果皮挥发油成分研究[J].广东药学院学报,2006,22(2):139-141.
- [13] 梁晟,李雅文,赵晨曦,等.GC-MS 结合保留指数对中药挥发油的定性[J].分析测试学报,2008,27(1):84-87.