

GC-MS 法分析畲药十二时辰花中挥发油成分

沈廷明¹, 黄春情¹, 吴军军¹, 杨成梓², 陈珏³, 刘知远⁴

1. 福建中医药大学附属宁德市中医院, 福建 宁德 352100

2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

3. 福建省漳州片仔癀药业股份有限公司, 福建 漳州 363000

4. 宁德市食品药品检验检测中心, 福建 宁德 352100

摘要: 目的 对畲药十二时辰花 *Clematis florida* var. *plena* 挥发油的主要化学成分进行分析研究, 为十二时辰规模化合理栽培及质量标准的制定提供参考。方法 采用水蒸气蒸馏法提取十二时辰花中的挥发油, 采用 GC-MS 进行分析鉴定, 并采用面积归一化法测定各成分的百分比含量。结果 从十二时辰花挥发油中检出 32 种成分, 鉴定出 20 种挥发油化学成分, 其中含量高于 1% 的成分有 13 个, 占比最多的 5 种成分分别为棕榈酸 (26.94%)、叶绿醇 (10.58%)、亚油酸 (6.13%)、十五烷 (4.54%) 和正二十三烷 (3.84%), 以棕榈酸含量最高。结论 采用 GC-MS 联用技术分析十二时辰花挥发油活性成分的主要化学组成, 为推广十二时辰的种植、生产及进一步开发利用提供了科学依据。

关键词: 畲药; 十二时辰花; 挥发油; 棕榈酸; 气相色谱-质谱

中图分类号: R282.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)24-6362-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.027

GC-MS analysis of volatile oil from traditional She medicine *Clematis Florida* var. *plena* flower

SHEN Ting-ming¹, HUANG Chun-qing¹, WU Jun-jun¹, YANG Cheng-zi², CHEN Jue³, LIU Zhi-yuan⁴

1. Ningde Hospital of Traditional Chinese Medicine of Fujian Province, Ningde 352100, China

2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

3. Fujian Province Zhangzhou Pientzhuang Pharmaceutical Limited by Share Ltd., Zhangzhou 363000, China

4. Ningde Food and Drug Inspection and Testing Center, Ningde 352100, China

Abstract: Objective *Clematis florida* var. *plena* is a traditional She medicine. In this paper, we aim to study the main chemical components of essential oil of *C. florida* var. *plena* flower. The study will provide reference for large-scale reasonable cultivation and quality standard establishment of *C. florida* var. *plena*. **Methods** *C. florida* var. *plena* flower's essential oil was extracted with steam distillation and it was identified by GC-MS. Area normalization method was used to measure the percentage of each components. **Results** In the experiment, 32 element were detected in essential oil of *C. florida* var. *plena* flower, among which 20 chemical components were identified. There are 13 chemical components over 1%, and the top five compounds are palmitic acid (26.94%), phytol (10.58%), linoleic acid (6.13%), pentadecane (4.54%) and n-tricosane (3.84%). **Conclusion** GC-MS was first used to analyze the main chemical components of *C. florida* var. *plena*'s flower essential oil. The study provides scientific basis for cultivation, production, development, utilization of *C. florida* var. *plena*.

Key words: Traditional She medicine; *Clematis florida* Thunb. var. *plena* D. Don; volatile oil; palmitic acid; GC-MS

十二时辰为闽东地区民间畲族群众常用药, 其来源为毛茛科植物重瓣铁线莲 *Clematis florida* Thunb. var. *plena* D. Don 的全株或根^[1]。《中华本草》^[2]记载其“味苦、微辛; 性温, 有小毒。归肝、脾、肾经, 可通利二便、理气通络、解毒止痛”, 主治风湿性关节炎、小便不利、闭经、痛

经、便秘腹胀、牙龈肿痛、翳障、虫蛇咬伤、黄疸等。十二时辰在宁德市畲族地区被广泛用于风湿骨痛、骨折瘀肿及跌打损伤等病^[3], 十二时辰花还能用于治疗反胃呕吐、饮食胸膈饱胀、胃口疼痛、吞酸吐痰等症^[4], 且效果显著, 极具民族及地方特色。近年来, 随着十二时辰的广泛应用, 需求

收稿日期: 2020-03-09

基金项目: 宁德市卫生健康委员会 2020 年医技提升科研项目 (2020008)

作者简介: 沈廷明 (1975—), 男, 副主任中药师, 主要从事畲族医药研究, Tel: (0593)2315799 E-mail: yjk2827300@163.com

量不断增加,甚至逐渐销往福建周边省市地区,常常供不应求,价格不断上涨。目前福安、霞浦及浙江景宁等地十二时辰种植已经初具规模。但国内外对十二时辰的研究尚处于初步阶段,十二时辰仅作为地方特色草药使用,尚未被《福建省中药材标准》、《福建省中药饮片炮制规范》等标准收录,面临产业化难的困境。

本实验通过对十二时辰花挥发油的 GC-MS 分析,明确其主要的挥发油成分,在此基础上,对不同地区十二时辰花进行挥发油含量分析,为其进一步研究及相关产品的开发利用和质量评价提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

7890B GC/5977A MSD 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司)。HWS-12 型电热恒温水浴锅(上海恒一科学仪器有限公司);XP205 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多);挥发油测定器及配套冷凝管、圆底烧瓶(天津津波玻璃仪器厂)。

1.2 试药

十二时辰花供试样品由福安市赛岐镇高水笕畲族村等基地提供,具体信息见表 1,并经宁德市食品药品检验检测中心刘知远主任中药师鉴定为毛茛科植物重瓣铁线莲 *Clematis florida* Thunb. var. *plena* D. Don 的花。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取

按照《中国药典》2015 年版四部通则 2204 挥

发油测定法,甲法^[5]提取挥发油。精密称取十二时辰花 100 g,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 500 mL 水和 2 粒沸石,使水全部浸没药材,浸渍 1 h,振摇混匀,连接挥发油测定器与回流球形冷凝管。自冷凝管上端加水使其充满挥发油测定器的刻度部分,并溢流入烧瓶时为止。置电热套中缓慢加热至沸,并保持微沸约 2 h,至测定器中油量不再增加,停止加热,放置片刻,开启测定器下端的活塞,将水缓慢放出,至油层上端到达刻度 0 线上面 5 mm 处为止。放置 1 h 后再开启活塞使油层上端恰与刻度 0 线平齐。

2.2 十二时辰花挥发油分析的 GC-MS 条件与结果

2.2.1 气相色谱条件 安捷伦气相色谱柱为 HP-5 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气为氮气;体积流量 1.2 mL/min;进样口温度 260 ℃,接口温度 230 ℃;分流比 20 ∶ 1;进样量 1.0 μL,升温程序及柱温如下:60 ℃(45 ℃/min)→150 ℃(20 ℃/min)→170 ℃(4 ℃/min)→260 ℃(1.5 ℃/min)→280 ℃,保持 20 min。

2.2.2 质谱条件 电子轰击源 EI;离子源温度为 230 ℃;四级杆温度为 150 ℃;扫描质量范围 *m/z* 40~400,扫描间歇 1.1 s,溶剂延迟为 3 min。

2.2.3 挥发油组成分析 按照上述 GC-MS 条件,对十二时辰花挥发油成分进行分离鉴定,其总离子流图见图 1。通过 NIST11 谱图库进行检索匹配,以及查阅相关文献资料,对色谱峰进行鉴定;并采用面积归一化法测得挥发油各组分的相对百分含量,共检出 32 个化合物,其中总相似度 80%以上的化合物有 30 个,已鉴定出脂肪酸、烷烃、酚、醇、酮、酯类等 20 种化合物,占挥发油总含量的 78.06%。占比最多的 5 种成分分别为棕榈酸(26.94%)、叶绿醇(10.58%)、亚油酸(6.13%)、十五烷(4.54%)和正二十三烷(3.84%),以棕榈酸占比最高。结果见表 2。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

样品产地	采收日期
福安赛岐	2018-05-10
霞浦盐田	2018-05-22
福安穆云	2018-05-07
福安溪尾	2018-06-10
寿宁竹管垅	2018-06-22
蕉城赤溪	2018-06-08

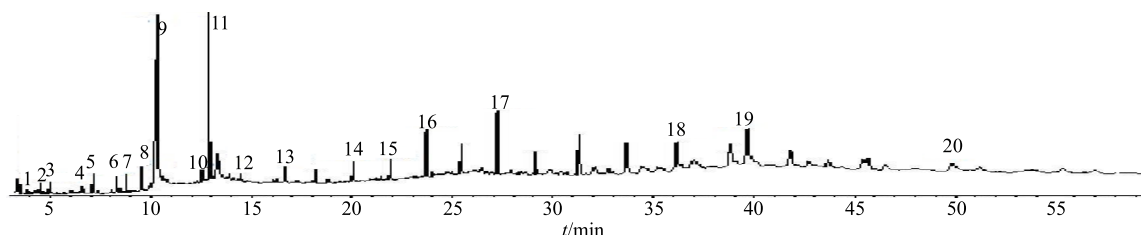


图 1 十二时辰花挥发油 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram of *Clematis florida* var. *plena* flower volatile oil

表 2 十二时辰花挥发油化学成分及占比

Table 2 Chemical components and its relative content of *C. florida* var. *plena* flower volatile oil

峰号	保留时间/min	化合物名称	化学式	占比/%	文献
1	3.50	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.11	6
2	4.89	二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	0.23	7
3	5.00	月桂酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.50	8
4	6.73	3,7,11-三甲基-2,6,10-十二烷三烯-1-醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.20	8
5	7.13	肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.97	9
6	8.34	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	C ₁₈ H ₃₆ O	1.08	9
7	8.53	正十五酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.30	10
8	9.56	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1.21	11
9	10.34	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	26.94	11
10	12.62	9,12,15-十八烷三烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	1.11	8
11	12.86	叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	10.58	12
12	13.30	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	6.13	12
13	16.71	对甲氧基肉桂酸辛酯	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	0.90	13
14	20.08	二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	1.55	14
15	23.68	2-甲基二十八烷	C ₂₉ H ₆₀	3.76	15
16	25.41	二十八烷	C ₂₈ H ₅₈	3.68	15
17	29.15	正二十三烷	C ₂₃ H ₄₈	3.84	16
18	36.93	二十一烷	C ₂₁ H ₄₄	1.82	17
19	38.81	十五烷	C ₁₅ H ₃₂	4.54	18
20	49.90	二十烷	C ₂₀ H ₄₂	2.90	19

2.2.4 样品测定 取采集的十二时辰花,按照“2.1”项方法制备的十二时辰花挥发油供试品,在“2.2”项气相色谱条件及质谱条件下测定,测定其挥发油各组分的百分含量。结果见表 3。

3 讨论

本实验从十二时辰花挥发油中共检出 32 个化合物,鉴定出脂肪酸、烷烃、酚、醇、酮、酯类等 20 种化合物,其中占比最多的 5 种成分分别为以

表 3 十二时辰花共有峰的相对含量

Table 3 Relative percentage of *C. florida* var. *plena* flower common peak

产地	相对含量/%									
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10
福安赛岐	0.11	0.23	0.50	0.20	0.97	1.08	0.30	1.21	26.94	1.11
霞浦盐田	0.08	0.21	0.42	0.12	0.42	0.67	0.20	1.01	11.48	0.92
福安穆云	0.06	0.14	0.36	0.09	0.39	0.53	0.11	1.10	16.91	0.61
福安溪尾	0.03	0.16	0.35	0.11	0.51	0.71	0.09	0.83	17.82	0.73
寿宁竹管垅	0.50	0.13	0.37	0.13	0.46	0.47	0.07	0.96	12.39	0.58
蕉城赤溪	0.06	0.12	0.31	0.10	0.35	0.46	0.06	0.74	13.46	0.57

产地	相对含量/%									
	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	峰 18	峰 19	峰 20
福安赛岐	10.58	6.13	0.90	1.55	3.76	3.68	3.84	1.82	4.54	2.90
霞浦盐田	8.93	5.19	0.76	1.25	2.98	3.29	2.65	1.57	4.24	2.47
福安穆云	9.43	4.47	0.45	1.17	3.21	3.41	2.56	1.47	4.33	2.65
福安溪尾	7.59	5.09	0.52	0.95	3.08	3.15	3.04	1.63	4.10	2.88
寿宁竹管垅	8.13	5.41	0.48	0.86	3.00	3.27	3.64	0.96	3.97	2.27
蕉城赤溪	7.76	3.98	0.32	1.08	2.87	3.11	2.14	1.36	3.04	1.29

棕榈酸含量最高。其中棕榈酸, 又称十六烷酸、软脂酸, 是广泛存在于自然界各种植物油中的一种饱和脂肪酸。单用棕榈酸或亚油酸能抑制肝星状细胞(HSC)的增殖^[20], 而 HSC 是肝纤维化发生发展的关键细胞, 棕榈酸能抑制 HSC 的增殖, 逆转肝纤维化过程, 这提示应用棕榈酸治疗肝纤维化的可能性。有研究表明, 棕榈酸占母乳中总脂肪酸的 17%~25%^[21], 而其中约 70%~75% 为 β -棕榈酸, β -棕榈酸能减少粪便中脂肪酸钙皂含量, 有利于婴幼儿肠道对脂肪酸、钙等成分的吸收, 从而改善婴儿反流、消化不良和便秘等消化问题, β -棕榈酸同时还能促进婴幼儿骨骼的发育生长^[22]。同时, 棕榈酸还是良好的靶向药物载体, 薄膜分散法制备 pH 敏感性载紫杉醇-cRGD-羧甲基壳聚糖-软脂酸胶束具有良好的肿瘤靶向性, 是一种具有良好开发潜力的新型药物载体^[23]。叶绿醇可以通过上调肝脏中脂酸酸氧化的基因表达水平, 从而减少肝脏中的脂肪累积^[24]。亚油酸是一种人体必需脂肪酸, 具有降低血脂、软化血管、降低血压、促进微循环的药理作用, 可以防止血清胆固醇在血管壁的沉积, 有效预防心血管疾病的发生并减少其发病率^[25]。同时亚油酸还具有清除自由基、延缓衰老、预防损伤等重要的生理活性^[26]。十五烷和正二十三烷属烷烃类挥发油成分, 其中十五烷的长链脂肪酸十五烷酸能通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)途径促进人体骨骼肌细胞和脂肪细胞对葡萄糖的摄取。2 型糖尿病小鼠空腹血糖水平并未被影响, 但十五烷酸能改善高胰岛素血症, 保护胰岛细胞, 同时降低糖尿病小鼠血清胆固醇, 减少脂肪的积累, 降低糖尿病小鼠的炎症水平^[27]。而目前尚无正二十三烷的生物活性相关研究资料。

根据十二时辰花的挥发油组分来看, 主含棕榈酸、叶绿醇、亚油酸等成分, 有文献报道, 棕榈酸及棕榈酸甲酯有治疗胃肠功能失调的作用^[28], 这可能是十二时辰花治疗反胃呕吐、饮食胸膈饱胀等作用的有关成分。兽医认为十二时辰“味辛, 性温”, 而现代中药药理研究认为有“通经活络、祛风除湿、活血止痛”功效的“辛味药”多含挥发油或其他脂溶性成分, 其中挥发性成分是药效作用的关键成分^[29]。根据现有研究报道, 十二时辰花的药理作用和具体机制尚不明确, 还有待进一步探讨。

本实验采用水蒸气蒸馏法提取十二时辰花挥发油成分, 按照《中国药典》2015 年版四部通则 2204 挥发油测定法甲法测定挥发油含量, 对提取时间 1、2、3、4 h 的挥发油含量进行比较, 发现提取时间 2 h 较提取 1 h 所得的十二时辰花挥发油含量高, 随着提取时间增加, 提取的挥发油含量并未有所增加。本实验同时参考指纹图谱相似度评价的方法, 以提取 2 h 的挥发油气相色谱-质谱图为参比, 利用简便易行的 Excel 2010 软件进行样品气相色谱-质谱图峰的相似度计算, 结果发现挥发油提取时间不宜超过 2 h。当提取时间超过 2 h, 对一些色谱峰峰面积造成影响, 其与提取时间 2 h 的图谱相比相似度下降。原因可能一些中药含对热不稳定的挥发性成分, 其随着提取时间的延长而损失, 导致含量下降有关^[30]。所以, 从节约实验时间, 减少不必要的误差和损失, 本实验挥发油提取时间应以 2 h 为宜。

在色谱柱的选择上, 本实验选用 3 种不同极性的毛细管柱进行比较分析, 分别是 HP-5 (非极性柱)、HP-50+ (中等极性柱) 和 HP-FFAP (极性柱)。结果发现以 HP-5 色谱柱得到的色谱峰个数较多, 峰形较好, 因此选用 HP-5 作为十二时辰花挥发油检测的色谱柱。在升温方式选择上, 发现程序升温方式得到的色谱峰分离度优于单一速率升温方式, 且保留时间适中, 因此, 采取程序升温方式。本实验采用的程序升温随着柱温的上升, 升温速率逐步减小, 最后维持 280 °C, 保持 20 min。这种程序升温方式是目前挥发油分析最常用的升温方式, 有利于挥发油成分的良好分离^[31]。

本实验对十二时辰花挥发油的质谱分析方法属实时直接分析法, 是指应用水蒸气蒸馏法提取的挥发油未经前处理的情况下进行快速定性鉴别^[32]。实验所得的十二时辰花挥发油 GC-MS 总离子流图具有明显的指纹特征, 在今后成分分析和质量控制领域有较好的应用前景。

鉴于本次十二时辰花挥发油气相色谱-质谱联用分析结果, 明确了十二时辰花挥发油的主要化学成分, 为十二时辰的质量控制提供了研究基础, 有利于十二时辰中药制剂的开发和应用, 从而丰富畲族医药的内涵。

通过分析根据地域对样品的挥发油含量进行比较研究, 发现福安赛岐高水菴畲族村所产的十二时辰花样品挥发油含量较高, 与霞浦盐田等其

它 5 个地区比较, 有显著差异, 其他地区无显著差异; 因此福安赛岐高水菟畲族村所产十二时辰花质量较好, 高水菟村大规模栽培种植有 40 多年历史, 笔者认为, 挥发油含量较高可能与规范化种植和地理环境有关, 提示规范化栽培种植和地理环境对十二时辰的质量有较大影响, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 黄泽豪, 张月玲, 沈贤娟. 畲药十二时辰的生药鉴定 [J]. 亚热带植物科学, 2013, 42(2): 104-108.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 钟隐芳. 福安畲医畲药 [M]. 福州: 海风出版社, 2010.
- [4] 章楚纓. 闽东畲族本草 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2000.
- [5] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [6] 徐玉雪, 李 婷, 李利君, 等. SDE-GC-MS 结合 GC-O 分析速溶滇红茶的挥发性风味物质 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(11): 277-284, 276.
- [7] 赵鹏宇, 朴 燕, 张昌浩, 等. 长白瑞香挥发性成分的 GC-MS 分析 [J]. 延边大学医学学报, 2019, 42(1): 16-19.
- [8] 苑 函, 马 越, 李双石. 可可脂与代可可脂的 GC-MS 鉴别分析及应用 [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 178-181.
- [9] 戴 鑫. 基于气相色谱-质谱的黄酒香气分析和酒龄、产地鉴别 [D]. 上海: 上海应用技术学院, 2014.
- [10] 李贵军, 汪 帆. 臭菜挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国调味品, 2014, 39(6): 118-120.
- [11] 尹庚明, 马晓鸥, 康思琦. GC-MS 联用鉴别植物油中的特征脂肪酸 [J]. 五邑大学学报: 自然科学版, 2003, 17(3): 29-32.
- [12] 肖艳华, 龚 琳, 潘兹娇, 等. 青钱柳石油醚提取物的 GC-MS 分析 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(24): 152-155.
- [13] 刘丽琴, 黄博能, 张建扬. 气相色谱-质谱法快速测定儿童纺织品中 11 种 CHCCs 物质 [J]. 中国纤检, 2017(10): 97-101.
- [14] 袁明焱, 刘守金, 杨 柳, 等. 辣木叶挥发性成分的 GC-MS 研究 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(8): 174-176.
- [15] 黄春燕, 梁 洁, 麦嘉妮, 等. 龙眼叶的化学成分研究 [J]. 中药材, 2017, 40(10): 2344-2346.
- [16] 马金爽, 汤锡丽, 尹 星, 等. 诺丽叶挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2017, 30(3): 311-316.
- [17] 张娟娟, 尹震花, 陈 林, 等. 桃花脂溶性成分分析 [J]. 河南大学学报: 医学版, 2019, 38(3): 158-160.
- [18] 宋金峰, 王海英, 马铭君. 桑叶正丁醇提取物的气相色谱-质谱分析 [J]. 广东化工, 2019, 46(12): 13-14.
- [19] 王胜碧, 赵荣飞, 程劲松, 等. 白车轴草不同花期挥发性成分研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 126-130.
- [20] 朱迎春, 潘晓辉, 俞 力, 等. 软脂酸和亚油酸对肝星状细胞增殖的影响 [J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(2): 152-154.
- [21] Breckenridge W C, Marai L, Kuksis A. Triglyceride structure of human milk fat [J]. *Can J Biochem*, 1969, 47(8): 761-769.
- [22] 张雅莉, 蔡美琴. β -棕榈酸(OPO 结构脂肪)对婴幼儿肠道健康的促进作用 [J]. 临床儿科杂志, 2015, 33(10): 918-920.
- [23] 李继昭, 袁志强, 闫 萌, 等. cRGD 介导的 pH 敏感性紫杉醇羧甲基壳聚糖-软脂酸胶束 [J]. 药学报, 2016, 51(4): 642-649.
- [24] 林厦菁, 朱晓彤, 江青艳, 等. 叶绿醇对脂肪细胞分化及糖脂代谢的调节作用 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(10): 1866-1870.
- [25] 李 珍, 杨得坡. 共轭亚油酸构效关系及其分子药理研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2007, 34(1): 26-30.
- [26] 李 珍, 杨得坡. 共轭亚油酸的皮肤分子药理及在皮肤科学的应用 [J]. 中国美容医学, 2006, 15(6): 745-747.
- [27] 付文诚. 十五烷酸对糖代谢的调控及机理研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2017.
- [28] 陈银基, 鞠兴荣, 周光宏. 饱和脂肪酸分类与生理功能 [J]. 中国油脂, 2008, 33(3): 35-39.
- [29] 黄泽豪, 郭家欣, 沈贤娟. 畲药十二时辰挥发油的 GC-MS 分析 [J]. 福建中医药, 2014, 45(1): 52-53.
- [30] 张小飞, 万 娜, 王学成, 等. 丁香挥发油理化性质、提取工艺参数与其芳香水稳定性的相关性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 3975-3981.
- [31] 李秋怡, 宋 恬, 干国平, 等. 川芎油的气相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 206-208.
- [32] 孙 磊, 胡晓茹, 金红宇, 等. 实时直接分析-串联质谱法快速分析乳香中多种乳香酸 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1320-1323.