

湖南怀化产山苍子挥发油的 GC-MS 分析

刘政^{1,2}, 刘秀斌¹, 郑亚杰¹, 曾庆海³, 唐其^{1*}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128; 2. 河北定州中学, 河北定州 073000; 3. 辰溪天绿生态农业农民专业合作社, 湖南怀化 419500)

摘要 [目的]通过对山苍子挥发油和商品油的气相色谱-质谱(GC-MS)测定,对湖南省怀化地区产山苍子挥发油进行品质评价。[方法]建立了山苍子挥发油的GC-MS分析检测方法,通过NIST标准谱库检索进行定性分析。[结果]从山苍子挥发油中共检出29种挥发性成分,按峰面积归一化法对占总峰面积90%的挥发性成分进行定性分析,结合文献发现山苍子挥发油中的主要成分为 α -柠檬醛、 β -柠檬醛和D-柠檬烯,3种成分所占比例达65.95%,其次为 β -月桂烯、芳樟醇、石竹烯、 α -蒎烯和香茅醛等。商品油与挥发油的化学组成基本一致,差异主要在低含量和低沸点组分,提示不同生产工艺会对产品组成产生影响。[结论]该研究为湖南怀化产山苍子的资源状况评估以及山苍子油的质量评价提供依据。

关键词 山苍子;挥发油;GC-MS;怀化

中图分类号 S573+.8;R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)01-0130-03

Analysis of the Essential Oil in *Listea cubeba* from Huaihua District of Hunan Province by GC-MS

LIU Zheng^{1,2}, LIU Xiu-bin¹, ZHENG Ya-jie¹, TANG Qi^{1*} et al (1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128; 2. Dingzhou High School, Dingzhou, Hebei 073000)

Abstract [Objective] To evaluate quality of essential oil in *Listea cubeba* from Huaihua District of Hunan Province by GC-MS. [Method] GC-MS method for evaluating quality of essential oil in *Listea cubeba* was established, qualitative analysis was conducted by NIST standard library searching. [Result] There were 29 volatile components in *Listea cubeba* essential oil, and by means of the area normalization, the components accounting for 90% of the sum of the total peak areas were assigned to the probable compound in the NTST library and the literature. The main volatile substances were α -citral, β -citral and D-limonene, which were the 65.95% of the sum peak areas, followed by β -myrcene, linalool, caryophyllene, α -pinene, citronellal and so on. The practical volatile oil had the similar chromatogram to that of the oil from laboratory, and the difference between them was in low content and low boiling point components, indicating the quality of oil was affected by the production process. [Conclusion] The results can provide basis for evaluating *Listea cubeba* resource and quality of its essential oil in Huaihua District of Hunan Province.

Key words *Listea cubeba*; Essential oil; GC-MS; Huaihua

山苍子(*Listea cubeba*)又名山鸡椒、木姜子、山胡椒,是樟科木姜子属的多年生灌木或小乔木,主要分布在我国南方地区和东南亚,属于我国特有的香料植物资源之一^[1]。山苍子挥发油具有广泛的应用价值,可用作食用香料添加剂和合成甲基紫罗兰酮香料的原料^[2-3];具有抗心律失常、抗过敏、平喘等功效,还可以作为合成维生素K、E和A的原料,在医药方面具有较好的应用^[4]。

山苍子油出口是我国山苍子的主要利用途径,每年平均出口量约占国际市场的70%^[2,5]。湖南省是我国山苍子的中心产区,全省除洞庭湖区外的山区、丘陵均有分布,目前仍以野生资源为主要来源,湖南山苍子油的收购量居全国首位^[6]。但受地理环境、基因遗传变异、气候条件和采收加工等因素的影响,不同分布区域内的山苍子油中成分及含量存在一定的差异^[7-9]。怀化地区是湖南省山苍子的主要产区之一,张立等^[6]对湖南省怀化市山苍子野生资源进行了调查,发现该地区的野生山苍子资源蕴含量丰富,但存在资源分布不够集中、野生资源保护力度不够等局限性。迄今有关怀化地区山苍子挥发油的品质研究鲜见报道。笔者利用气相色谱-质谱(GC-MS)技术对怀化地区产山苍子的挥发油中化学组成进行了系统的定性分析,旨在为客观地评估该地区产山苍子挥发油的品质和合理开发利用该地区的山苍子

野生植物资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 新鲜山苍子果实采摘自湖南省怀化市辰溪县。山苍子商品油是由辰溪县天绿生态农业农民专业合作社提供,该挥发油是采用水蒸气蒸馏工艺制备而得。正己烷为色谱纯,购自上海安谱实验科技股份有限公司。氦气为高纯度气体。电热套购自天津泰斯特仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 挥发油提取。取适量新鲜山苍子果实进行粉碎后过筛,备用。从中称取约150 g置圆底烧瓶中,加入6倍量水浸泡3 h,然后用电热套加热回流提取,参照《中华人民共和国药典》(2015版四部)“挥发油测定法”中的方法制备挥发油,提取完成后充分放置待油水充分分离后,读取挥发油提取器的刻度值并转移挥发油至具塞玻璃瓶中,置冰箱中低温密闭保存。

1.2.2 供试品溶液制备。分别吸取“1.2.1”中挥发油和山苍子商品油各20 μ L,加正己烷稀释至1 mL,摇匀,备用。

1.2.3 GC-MS分析条件。气相色谱-三重四级杆质谱联用仪配有Agilent 7890B气相色谱仪、7000C质谱检测器、Agilent 7693自动进样系统;毛细管色谱柱采用HP-5 MS 5% phenyl methyl silox(30 m $\times$ 250 μ m $\times$ 0.25 μ m);氦气作为载气,载气流量为1 mL/min;不分流进样口,隔垫吹扫流量为3 mL/min;程序升温方式,初始温度为50 $^{\circ}$ C,以3 $^{\circ}$ C/min速率升温至150 $^{\circ}$ C,再以5 $^{\circ}$ C/min速率升温至220 $^{\circ}$ C,220 $^{\circ}$ C保持3 min;进样体积为1 μ L。电离源为电子轰击离子源(EI);

基金项目 湖南省科技计划项目(2014SK2005)。

作者简介 刘政(1999—),男,河北定州人,高中生。*通讯作者,助理研究员,博士,从事药用植物分子生物学研究。

收稿日期 2016-10-26

电子能量为 70 eV;离子源温度为 230 ℃;质量范围为 50 ~ 600 Da;溶剂延迟为 3 min;采用全扫描模式进行数据采集;氮气为碰撞气。

1.2.4 样品测定。供试品溶液经 GC-MS 进样系统吸取 1 μ L 注入气相色谱-三重四级杆质谱联用仪,经 HP-5 MS 毛细管色谱柱分离后进入质谱系统进行分析测定,数据由 MassHunter 软件完成采集。样品检测过程中随行溶剂空白。

1.3 数据分析 采用色谱数据处理系统中自动解卷积发现化合物功能,查找色谱图中存在的可能化合物,通过对化合物的质谱图进行 NIST 14 标准谱库检索,结合人工手动图

谱解析及文献资料对可能化合物进行定性分析,推测化合物的可能结构。采用峰面积归一化法计算各成分相对含量。

2 结果与分析

2.1 气相色谱分离条件优化 为了更有效地获取山苍子挥发油和商品油中化合物的相关信息,便于对它们的品质进行比较评价,该研究首先对气相色谱分离的程序升温条件进行了系统地优化(图 1),通过对升温速率进行优化确定了色谱分离条件,该程序升温条件使样品中大多数化合物的色谱峰实现了有效的分离,且在分析时间内色谱峰分布均匀,色谱峰峰形良好。

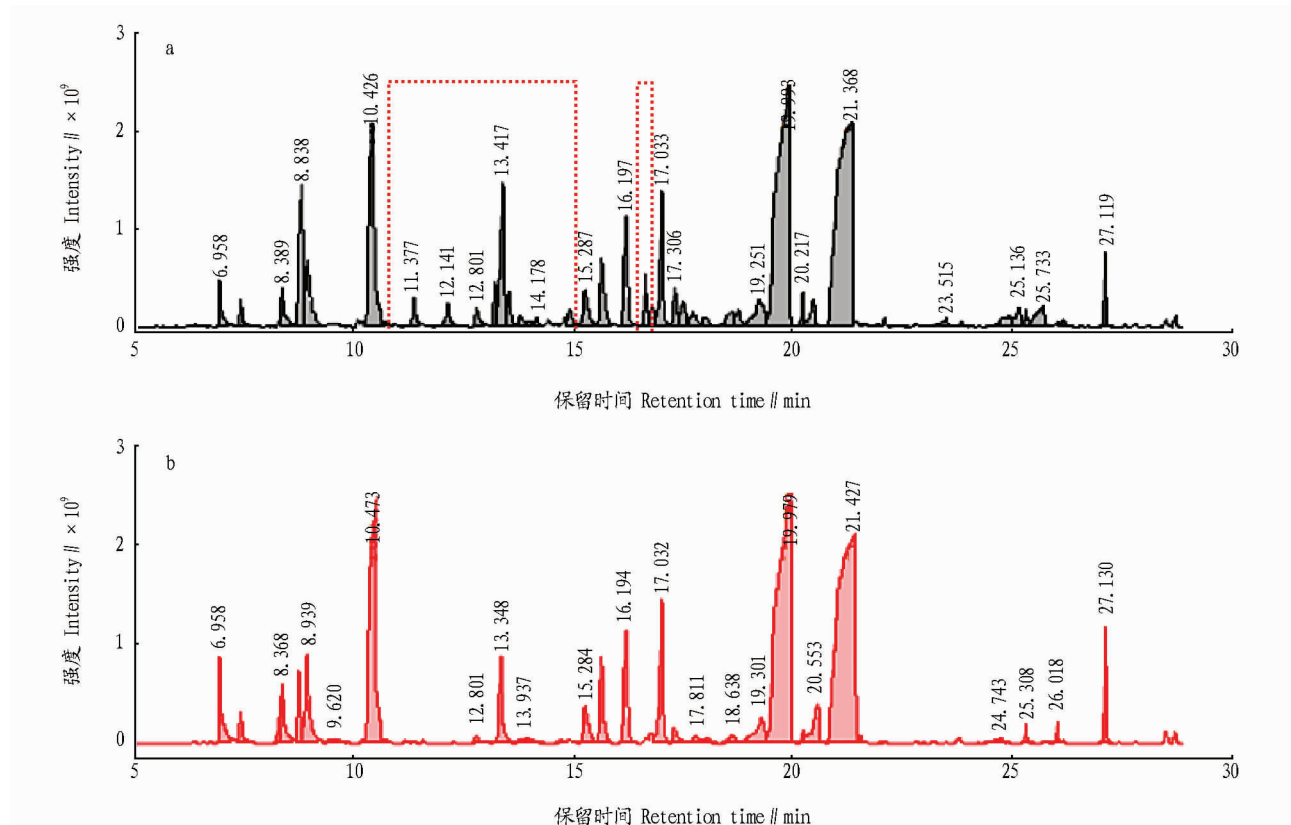


图 1 山苍子挥发油(a)和山苍子商品油(b)总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of *Listea cubeba* essential oil(a)and commercial oil(b)

2.2 不同来源样品中挥发油的差异 由图 1 可知,从整体上看试验自制的山苍子油和山苍子商品油在色谱峰的分布上差异并不大,两者之间的差别主要表现在峰的数量和峰的强度上,如挥发油在 11.3 ~ 15.3 和 16.2 ~ 17.0 min 的色谱峰的数量更多,但峰强度相比主要色谱峰均偏低。分析导致 2 种样本产生差异的主要原因是它们获取方式的不同,相比商品油在生产中采用的水蒸气蒸馏法,实验室挥发油提取装置的油水分离会更加完全,低含量、低沸点的挥发性成分更容易被获取。

2.3 山苍子挥发油的成分分析 利用“1.3”方法,从商品油样品的 GC-MS 数据中共发现 29 个挥发性成分。利用峰面积归一化法对色谱峰进行归一化处理,选取占总峰面积 90% 的目标色谱峰,通过 NIST 标准谱库检索对目标化合物的可能结构进行定性分析,结合文献进一步确认。从表 1 和图 1 可知,山苍子挥发油中的主要成分为 α -柠檬醛、 β -柠檬醛

和 D-柠檬烯,3 种成分所占比例达 65.95%,其次为 β -月桂烯(2.91%)、芳樟醇(2.56%)、石竹烯(2.40%)、 α -蒎烯(2.20%)和香茅醛(2.18%)等,未知化合物 14(16.195 min, 3.14%)和未知化合物 15(17.032 min, 4.66%)的结构推测有待进一步研究。

3 讨论

该研究所用样品来自实验室自制和合作社提供的商品油,两者在分析谱图上基本一致,主要成分类别没有明显区别。差异主要体现在低沸点和低含量的组分,表明不同生产工艺存在组分差异,因此在实际生产中应尽量控制挥发油提取的工艺参数,保证挥发油产品的批次稳定、品质均一。

研究发现怀化地区产山苍子挥发油中主要含有 α -柠檬醛和 β -柠檬醛,与文献报道的长江以南地区山苍子挥发油的组成研究结果具有一致性^[9]。由于山苍子果实挥发油

表1 山苍子挥发油中挥发性成分

Table 1 Volatile components in *Listea cubeba* essential oil

编号 No.	保留时间 Retention time min	峰面积百分比 Peak area percentage// %	分子质量 Molecular mass	化合物 Compound
1	6.957	2.20	136.1	α-蒎烯
2	7.428	0.69	136.1	桉烯
3	8.283	0.42	136.1	β-蒎烯
4	8.387	1.59	136.1	6-甲基-5-庚烯-2-酮
5	8.770	1.60	126.1	β-月桂烯
6	8.940	2.91	136.1	
7	9.619	0.37		
8	10.473	11.63	136.1	D-柠檬烯
9	12.801	0.29	136.1	萜品油烯
10	13.350	2.56	154.1	芳樟醇
11	13.983	0.54		
12	15.286	1.35		
13	15.663	2.18	154.1	香茅醛
14	16.195	3.14		
15	17.032	4.66		
16	17.295	0.63		
17	17.794	0.39		
18	18.073	0.31		
19	18.638	0.47		
20	19.301	1.83		
21	19.978	26.22	138.1	β-柠檬醛
22	20.235	0.32		
23	20.554	1.78	154.1	香叶醇
24	21.415	28.10	178.1	α-柠檬醛
25	24.740	0.32		
26	25.308	0.36		
27	26.018	0.42		
28	27.131	2.40	136.1	石竹烯
29	33.568	0.31	152.1	石竹烯氧化物

(上接第129页)

目前关于铁皮石斛的组培快繁技术方面的研究十分成熟,已建立了较为完整的铁皮石斛组培快繁体系,该试验在借鉴前人研究成果的基础上,不断探索更好的生根培养基配方,使铁皮石斛组培苗生根率达到了较高水平,然而生根率和移栽成活率并不对等,该研究筛选出的8株内生真菌对铁皮石斛组培苗生根有一定的正向作用,同时解决了组培苗移栽成活率低的问题,在铁皮石斛工厂化育苗中有良好的应用前景。

对该研究中筛选出的最优促铁皮石斛根系生长及组培苗移栽成活率的一株内生真菌F₁₄,未进行种属地位的鉴定。下一步应通过菌落形态及显微结构观察,并结合ITS序列PCR扩增技术,确定促生作用最显著的菌株F₁₄的种属地位。

参考文献

[1] 朱艳,秦民坚.铁皮石斛茎段诱导丛生芽的研究[J].中国野生植物资源,2003,22(2):56-57.
[2] 李满飞,徐国钧,徐璐珊,等.商品石斛的调查及鉴定(Ⅱ)[J].中草药,1991,22(4):173-176,180.
[3] 丁鸽,丁小余,沈洁,等.铁皮石斛野生居群遗传多样性的RAPD分析与鉴定[J].药学报,2005,40(11):1028-1032.
[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:化学工业出版社,2010:265-266.
[5] 吴昊妹,徐建华,陈立钻,等.铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究[J].中国中药杂志,2004,29(2):160-163.
[6] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第19卷[M].北京:

的化学组成及其含量随采收期、产地和气候等不同而产生差异^[10],因此在山苍子资源利用上应充分了解当地植物资源,并结合挥发油中组成成分的具体情况进行药用和香料配方等用途的安排。

参考文献

[1] 彭宏.特种经济植物栽培技术[M].北京:化学工业出版社,2010:182-185.
[2] CAJA M M,PRESTON C,KEMPF M,et al. Flavor authentication studies of α-lonone,β-lonone,and α-lonol from various sources[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2007,55(16):6700-6704.
[3] 孙青,舒学军,陈茹冰,等.香料紫罗兰酮的合成研究[J].浙江大学学报(理学版),2012,39(1):56-59.
[4] JIANG Z L,AKHTAR Y,BRADBURY R,et al. Comparative toxicity of essential oils of *Listea pungens* and *Listea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2009,57(11):4833-4837.
[5] 王旭,杨关锋.我国山苍子开发利用中存在的问题研究与发展对策[C]//第二届中国林业学术大会:S9 木本粮油产业化论文集.南宁:[出版者不详],2009.
[6] 张立,李涛,王立新,等.湖南省怀化市山苍子野生资源调查[J].北京农业,2015(11):29.
[7] SI L L,CHEN Y C, HAN X J,et al. Chemical composition of essential oils of *Listea cubeba* harvested from its distribution areas in China[J]. Molecules,2012,17(6):7057-7066.
[8] 田胜平,汪阳东,陈益存,等.不同居群山苍子果实精油和柠檬醛含量及其与地理-气候因子的相关性[J].植物资源与环境学报,2012,21(3):57-62.
[9] 张艳,胡金波,李金凤,等.山苍子油GC-MS指纹图谱研究[J].中成药,2013,35(11):2452-2456.
[10] 赵欧,班大明.贵州不同地区山苍子果实挥发油化学成分的差异[J].贵州农业科学,2015,43(1):126-128,131.

科学出版社,1999.
[7] 柳连芳.铁皮石斛的最新研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(11):6426-6428.
[8] 黄勇.铁皮石斛组织培养技术研究进展[J].文山学院学报,2013,26(6):14-19.
[9] 金辉,亢志华,陈晖,等.菌根真菌对铁皮石斛生长和矿质元素的影响[J].福建林学院学报,2007,27(1):80-83.
[10] 赵昕梅,远凌威,张苏锋,等.铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其促宿主生长作用[J].河南农业科学,2012,41(6):101-105.
[11] 金辉,许忠祥,陈金花,等.铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养过程中的相互作用[J].植物生态学报,2009,33(3):433-441.
[12] 陈晓梅,郭顺星,孟志霞.真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响[J].中草药,2008,39(3):423-426.
[13] 何劲,雷帮星,宋贞富,等.石斛内生细菌DEB-2对5种辣椒病原真菌的抑制作用[J].植物保护学报,2014,41(2):157-162.
[14] 杨绍周,吴毅歆,邵德林,等.鼓槌石斛内生细菌分离、鉴定及功能分析[J].中国农学通报,2014,30(25):171-176.
[15] 徐文婷,张雅琼,董文汉,等.石斛内生真菌固体菌剂对铁皮石斛组培苗促生作用研究[J].西南农业学报,2014,27(1):317-324.
[16] 陈泽斌,李冰,王定康,等.铁皮石斛叶片内生真菌多样性的研究[J].福建农业学报,2015,30(10):978-983.
[17] 徐文婷,张雅琼,董文汉,等.石斛内生真菌固体菌剂对铁皮石斛组培苗促生作用研究[J].西南农业学报,2014,27(1):317-324.
[18] 毛益婷,代晓宇,马荣.不同生境下野生铁皮石斛内生真菌多样性的初步研究[J].新疆农业大学学报,2011,34(3):234-238.
[19] 陈玉栋,李文锦,雷玲,等.铁皮石斛内生真菌的分离与鉴定[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2009,22(2):236-238.
[20] 侯晓强,郭顺星.铁皮石斛促生长内生真菌的筛选与鉴定[J].中国中药杂志,2014,39(17):3232-3237.
[21] 郭顺星,曹文琴,高微微.铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定[J].中国中药杂志,2000,25(6):338-341.