

HS-SPME-GC-MS 法检测并鉴定胡椒叶和果实中的挥发性成分[△]

张伟*,张娟娟,尹震花,张勇,康文艺*(黄河科技学院医学院,郑州 450063)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0820-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.27

摘要 目的:检测并鉴定胡椒叶和果实中挥发性成分的方法。方法:采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法(HS-SPME-GC-MS)。色谱条件:色谱柱为 HP-5 MS 石英弹性毛细管柱,载气为高纯氦气(99.999%),流速为 1.0 mL/min,进样口温度为 250 ℃,色谱柱初始温度为 50 ℃(程序升温),分流进样,分流比为 10:1。质谱条件:电离方式为电子轰击离子源,电离能量为 80 eV,离子源温度为 230 ℃,四极杆温度为 150 ℃,传输线温度为 280 ℃,电子倍增器电压为 1 588 V,质量扫描范围为 m/z 30~400。采用 RTLPEST3. L 和 NIST08. L 谱库进行谱图检索,以面积归一化法测定各挥发性成分的相对含量。结果:从胡椒叶中鉴定出 28 个挥发性成分,果实中鉴定出 15 个化合物,分别占总峰面积的 67.13%、36.85%。其中,叶中主要挥发性成分为 β -石竹烯(15.72%)、柠檬烯(9.39%)、3-萜烯(9.32%)、 β -蒎烯(6.80%)和 α -蒎品烯(4.98%)等,果实中主要挥发性成分为 1,7,7-三甲基-2-乙烯基二环[2.2.1]庚-2-烯(10.45%)、匙桉醇(8.28%)和氧化石竹烯(4.81%)等;二者有 5 个共有成分。结论:该研究基本明确了胡椒叶和果实中主要挥发性成分,并且证实了二者存在明显差异。

关键词 胡椒;挥发性成分;顶空固相微萃取;气质联用

Detection and Identification of Volatile Constituents from Leaves and Fruits of *Piper nigrum* by HS-SPME-GC-MS

ZHANG Wei, ZHANG Juanjuan, YIN Zhenhua, ZHANG Yong, KANG Wenyi (School of Medicine, Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450063, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the detection of volatile constituents from the leaves and fruits of *Piper nigrum*. METHODS: HS-SPME-GC-MS was used. The chromatographic conditions: column was HP-5 MS quartz elastic capillaries, carrier gas was high purity helium (99.999%), flow rate was 1.0 mL/min, the inlet temperature was 250 ℃, initial temperature of column was 50 ℃ (temperature programmed), split injection with split ratio of 10:1. MS conditions: ionization mode was electron impact ion source, ionization energy was 80 eV, ion source temperature was 230 ℃, quadrupole temperature was 150 ℃, transmission line temperature was 280 ℃, electron multiplier voltage was 1 588 V, mass scanning range was m/z 30-400. The spectra were retrieved using RTLPEST3. L and NIST08. L, and the relative contents of the volatile constituents were determined by area normalization method. RESULTS: There were 28 volatile constituents in the leaves and 15 in the fruits, respectively accounting for 67.13% and 36.85%. The major volatile constituents of leaves were β -caryophyllene (15.72%), limonene (9.39%), 3-carene (9.32%), β -pinene (6.80%), α -terpine (4.98%), etc., the main volatile constituents of fruits were 1,7,7-trimethyl-2-vinylbicyclo [2.2.1]hept-2-ene (10.45%), espatulenol (8.28%), caryophyllene oxide (4.81%), etc. 5 constituents were owned in both. CONCLUSIONS: The study basically clears the main volatile constituents from the leaves and fruits of *P. nigrum*, and verifies existing obvious differences.

KEYWORDS *Piper nigrum*; Volatile constituents; HS-SPME; GC-MS

- 作用[J].天然产物研究与开发,2012,24(Suppl):141-151.
- [7] 滕天立,徐世芳,陈峰阳,等.中药稀莶草的化学成分及其药理作用研究进展[J].中国现代应用药学,2015,32(2):250-260.
- [8] 张磊,李蓬秋,张学军,等.牛蒡子粉治疗糖尿病肾病的临床研究[J].四川医学,2011,32(5):656-658.
- [9] 车珂科,杨帆,邓开英.HPLC法测定养阴合剂中黄芩苷的含量[J].中国药房,2016,27(24):3410-3412.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:352-353,368.
- [11] 袁强华,宋英,朱璐璐,等.感魅合剂的质量控制[J].中国医院药学杂志,2013,33(2):111-114.
- [12] 阚红玉,宋殿荣,王跃飞,等.HPLC法同时测定黄芩中5种黄酮类成分的含量[J].中国药房,2010,21(11):1016-1019.
- [13] 祁佳,张宇锋,朱建,等.牛蒡子治疗糖尿病肾病的系统评价[J].河北医药,2016,38(1):34-38.

[△] 基金项目:河南省重点科技攻关项目(No.152102310171);郑州市科技发展计划项目(No.20150341)

* 副教授。研究方向:中药活性成分。电话:0371-69083296。E-mail: zzzwwwqq@126.com

通信作者:教授。研究方向:中药活性成分及新药开发。电话:0371-87540851。E-mail: kangweny@hotmail.com

(收稿日期:2016-08-23 修回日期:2016-09-26)

(编辑:张静)

胡椒科胡椒属藤本植物胡椒 *Piper nigrum* L., 原产东亚, 现在我国海南、福建、广西及云南等地均有栽培^[1]。其果实性热, 味辛, 有温中散寒、下气、消痰等功效, 常用于治疗胃寒呕吐、食欲不振、腹痛泄泻及癫痫痰多等症^[2]。

国内外关于胡椒的报道较多, 主要侧重于化学成分、药理作用及胡椒油的研究^[3]。目前, 已分离得到的化合物种类为生物碱、有机酸及酚类等, 具有保肝、抗焦虑、抗炎、抗癌及抗菌杀虫等药理活性^[4-5]。

胡椒经深加工开发研制的胡椒油具有抗氧化作用^[4], 是食品行业重要的香料添加剂, 现还用于理疗保健, 供熏香、按摩时使用, 市场需求量较大。本课题组采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法(HS-SPME-GC-MS)对胡椒叶和果实中挥发性成分进行分析, 并对二者成分的种类及含量进行比较, 以期探讨用胡椒叶挥发油代替胡椒果挥发油的可能性以及胡椒叶和果实的合理开发利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

GC6890/N5975 GC-MS 仪(美国 Agilent 公司); 手动 SPME 装置、100 μm 聚二甲基硅氧烷 (PDMS-DVB) 萃取纤维头(美国 Supelco 公司)。

1.2 试剂

$\text{C}_6 \sim \text{C}_{26}$ 正构烷烃(美国 Alfa Aesar 公司)。

1.3 药材

胡椒叶和果实于2013年7月采集于海南省万宁市, 经河南大学中药研究所李昌勤教授鉴定为胡椒真品, 标本存放于黄河科技学院天然药物研究所。

2 方法与结果

2.1 样品的萃取

使用前先将 SPME 的萃取纤维头在 GC 仪的进样口老化 10 min, 老化温度: 250 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速: 1.0 mL/min。取胡椒叶或果实 0.7 g, 置于 5 mL 进样瓶中, 插入 100 μm PDMS-DVB 萃取纤维头, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下顶空取样 30 min 后, 取出后立即插入色谱仪进样口(温度: 250 $^{\circ}\text{C}$) 脱附 1 min。

2.2 试验条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱: HP-5 MS 石英弹性毛细管柱 (30.0 m \times 250 μm \times 0.10 μm); 载气: 高纯氦气 (99.999%); 流速: 1.0 mL/min; 进样口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 色谱柱温度: 程序升温, 初始温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ (保持 2 min), 以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温

至 120 $^{\circ}\text{C}$ (保持 2 min), 最后以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 230 $^{\circ}\text{C}$ (保持 10 min); 分流进样, 分流比: 10:1。

2.2.2 质谱条件 电离方式: 电子轰击离子源; 电离能量: 80 eV; 离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$; 四极杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 传输线温度: 280 $^{\circ}\text{C}$; 电子倍增器电压: 1 588 V; 质量扫描范围: m/z 30~400。

2.3 定性分析

2.3.1 分析方法 通过 RTLPEST3.L、NIST08.L 谱库检索, 并结合保留指数、参考文献及相关网站 (www.vcf-online.nl) 等进行定性。按照文献^[6]选取 Kovats 保留指数 (Kovats index, KI), 公式如下:

$$KI = 100n + 100 \times \frac{t_R - t_{Rn}}{t_{Rn+1} - t_{Rn}}$$

式中: n 和 $n+1$ 分别为未知物流出前、后正构烷烃碳原子数; t_{Rn} 和 t_{Rn+1} 分别为相应正构烷烃的保留时间 (min); t_R 为未知物在气相色谱中的保留时间 (min) ($t_{Rn} < t_R < t_{Rn+1}$)。

2.3.2 分析结果 按“2.2.1”项下试验条件进样测定, 再按“2.3.1”项下方法分析, 以面积归一化法确定各成分的相对含量。根据所得的质谱信息并结合有关文献从基峰、相对丰度和 KI 等方面进行直观比较, 从而确定了其中的部分化学成分(见表1)。结果, 从胡椒叶中快速分离出 58 个挥发性成分, 鉴定出其中的 28 个挥发性成分, 占总峰面积的 67.13%; 从胡椒果实中快速分离出 37 个挥发性成分, 鉴定出其中的 15 个挥发性成分, 占总峰面积的 36.85%。胡椒叶中主要挥发性成分为 β -石竹烯 (15.72%)、柠檬烯 (9.39%)、3-萜烯 (9.32%)、 β -蒎烯 (6.80%) 和 α -蒎品烯 (4.98%) 等; 果实中主要挥发性成分为 1, 7, 7-三甲基-2-乙基二环 [2.2.1] 庚-2-烯 (10.45%)、匙桉醇 (8.28%) 和氧化石竹烯 (4.81%) 等。二者有 5 个共有成分, 即 α -萜烯油烯、 α -古芸烯、 α -愈创木烯、1, 7, 7-三甲基-2-乙基二环 [2.2.1] 庚-2-烯和十六烷, 且其在果实中含量均高于叶中。

3 讨论

本试验结果表明, 胡椒叶与果实中挥发性成分的数量和主要挥发性成分、含量有一定差异。胡椒叶成分中, β -石竹烯含量最高, 达到 15.72%。文献研究发现, 其具有镇痛^[6]、降低血脑屏障损伤^[7]、诱导癌细胞凋亡^[8]等活性。此外, 叶中柠檬烯 (9.39%) 的含量也较高, 具有抑菌防腐^[9]、抗肿瘤^[10]、祛痰平喘^[11]、镇痛和促进神经中枢维持觉醒^[12]等作用。叶与果实中均含有十六烷成分, 十六烷是植物体蜡质的主要成分之一, 对植物有保护作用, 可

以避免害虫等的破坏^[13-14]。

表1 胡椒叶和果实中挥发性成分及相对含量

Tab 1 Volatile constituents and relative contents of the leaves and fruits of *P. nigrum*

序号	保留时间, min	化合物	相对含量, %		KI值
			叶	果实	
1	6.657	1R- α -蒎烯 1R- α -Pinene	3.86	-	929
2	7.441	间异丙基甲苯 3-Isopropyltoluene	0.25	-	966
3	7.582	β -蒎烯 β -Pinene	6.80	-	973
4	8.158	α -水芹烯 α -Phellandrene	0.86	-	1001
5	8.208	3-萜烯 3-Carene	9.32	-	1003
6	8.524	4-异丙基甲苯 Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)	0.86	-	1019
7	8.624	柠檬烯 Limonene	9.39	-	1024
8	9.758	异松油烯 Terpinolene	0.18	-	1079
9	12.042	α -松油醇 α -Terpineol	0.30	-	1187
10	15.885	δ -榄香烯 δ -Elemene	-	0.73	1327
11	15.885	α -蒎品烯 α -Terpinene	4.98	-	1327
12	16.135	胡椒醛 Piperonal	0.42	-	1336
13	16.219	α -萜荜茄油烯 α -Cubebene	0.64	0.68	1339
14	17.094	胡椒烯 Copaene	-	1.95	1369
15	17.444	白菖烯 Calarene	0.80	-	1380
16	17.461	榄香烯 b-Elemene	-	0.46	1381
17	18.020	α -古芸烯 α -Gurjunene	0.13	0.69	1400
18	18.395	β -石竹烯 β -Caryophyllene	15.72	-	1413
19	19.437	α -石竹烯 α -Caryophyllene	0.90	-	1448
20	20.337	β -杜松烯 β -cadinene	0.58	-	1478
21	20.420	α -愈创木烯 α -Guaiene	0.79	2.79	1481
22	20.620	2,10,10-Trimethyltricyclo[7.1.1.0(2,7)]undec-6-en-8-one	0.74	-	1487
23	20.620	α -芹子烯 α -Selinene	-	1.25	1487
24	20.921	β -甜没药烯 β -Bisabolene	0.32	-	1498
25	21.229	D-杜松烯 D-Cadinene	3.36	-	1508
26	21.329	菖蒲烯 Calamenene	0.46	-	1511
27	22.930	匙核醇 Espatulanol	-	8.28	1566
28	23.096	氧化石竹烯 Caryophyllene oxide	-	4.81	1572
29	23.230	1,7,7-三甲基-2-乙基二环[2.2.1]庚-2-烯 1,7,7-Trimethyl-2-vinylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene	1.96	10.45	1577
30	23.446	香橙烯 Aromadendrene	-	0.54	1584
31	23.597	十六烷 Hexadecane	0.32	0.76	1589
32	25.222	β -芹子烯 β -Selinene	2.03	-	1647
33	25.222	1,4-二甲基-8-亚异丙基三环[5.3.0.0(4,10)]癸烷 1,4-Dimethyl-8-isopropylidene-tricyclo[5.3.0.0(4,10)]decane	-	1.44	1647
34	26.398	十七烷 Heptadecane	-	0.75	1689
35	26.398	10-甲基十九烷 10-Methylnonadecane	0.35	-	1689
36	30.099	植酮 Phytone	-	1.27	1827
37	36.426	二十一烷 Heneicosane	0.49	-	2085
38	37.201	亚油酸 Linoleic acid	0.32	-	2118
总计			67.13	36.85	

注：“-”为未检测到

Note:“-”means no detected

本文采用 HS-SPME-GC-MS 分析的胡椒叶和果实中挥发性成分与张水平等^[15]以 GC-MS 法分析结果有差异,后者结果显示 δ -榄香烯、3-萜烯、柠檬烯、 α -古芸烯、石竹烯和律草烯在胡椒叶和果实中含量均较高。此差异可能与药材产地、采收时间、研究方法等因素有关。胡椒资源丰富,以上挥发性成分的研究基本明确了胡椒叶和果实中主要挥发性成分,可为进一步认识胡椒叶和果实提供一定的科学依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 24-26.
- [2] 郑虎占, 董泽宏, 余靖, 等. 中药现代研究与应用: 第四卷[M]. 北京: 学苑出版社, 1988: 3243-3244.
- [3] 韦琨, 窦德强, 裴玉萍, 等. 胡椒的化学成分、药理作用及与卡瓦胡椒的对比[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 328-333.
- [4] 童汉清, 吴景雄, 李田, 等. 胡椒油的抗氧化性研究[J]. 中国调味品, 2008, 33(10): 52-55.
- [5] 李高申, 刘文, 张伟, 等. 济源地区野生品系冬凌草中挥发性成分分析[J]. 中国药房, 2016, 27(12): 1664-1667.
- [6] Paolo F, Stefania L, Agnese M, et al. In vitro and in vivo characterization of the new analgesic combination beta-caryophyllene and docosahexaenoic acid[J]. Evidence-Based Complementary Alternative Med, 2014, doi: 10.1155/2014/596312.
- [7] 李然然, 董志, 曹光秀, 等. β -石竹烯对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的保护作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(3): 204-209.
- [8] Eitan A, Rivka O, Nativ D, et al. β -Caryophyllene, a compound isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines[J]. Evidence-Based Complementary Alternative Med, 2012, doi: 10.1155/2012/872394.
- [9] 王雪梅, 谌徽, 李雪姣, 等. 天然活性单萜: 柠檬烯的抑菌性能研究[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 24-28.
- [10] Chaudhary SC, Siddiqui MS, Athar M, et al. D-limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis[J]. Human Exp Toxicol, 2012, 31(8): 1-14.
- [11] 向海洋. 强效黏液促排药: 桉柠蒎肠溶软胶囊[J]. 中南药学, 2010, 8(3): 237-239.
- [12] 王梅兰, 林建交, 陈雅容. 柠檬烯对小白鼠中枢神经系统的影响[J]. 海峡药学, 2005, 17(4): 30-32.
- [13] 康文艺, 姬志强, 王金梅, 等. 石韦叶挥发油成分 HS-SPME-GC-MS 分析[J]. 中草药, 2008, 39(7): 994-995.
- [14] 周荣汉, 段金廛. 植物化学分类学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 132-135.
- [15] 张水平, 谷风林, 吴桂苹, 等. 胡椒果与胡椒叶精油化学成分分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(2): 387-395.

(收稿日期: 2016-03-24 修回日期: 2016-10-19)

(编辑: 张静)