

精油单萜化合物高效液相色谱分析方法的建立

马娜¹ 何敬愉¹ 程皓¹ 刘陈立^{1,2} 蒙海林^{1,2}

¹(广州中国科学院先进技术研究所生物工程研究中心 广州 511458)

²(中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学工程研究中心 深圳 518055)

摘要 文章建立了一种高效液相色谱方法对精油中常见的三种单萜化合物橙花醇、芳樟醇、香茅醇进行定性和定量分析,并进行了方法学验证。得到最佳色谱条件为: C18 柱(4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm),以乙腈:水=1:1(v/v)为流动相,流速为 1.0 mL/min,UV 检测波长 205 nm。同时验证了其精密度及方法的稳定性。结果表明,该方法灵敏度高,重复性好,方法学验证符合要求。进而采用此方法分析了玫瑰精油、柠檬精油、玫瑰香精、柠檬香精中三种单萜化合物的含量。

关键词 精油;橙花醇;芳樟醇;香茅醇;高效液相色谱

中图分类号 O 657.7+2 **文献标志码** A

High Performance Liquid Chromatography Method for Analysis of Monoterpenes in Essential Oils

MA Na¹ HE Jingyu¹ CHENG Hao¹ LIU Chenli^{1,2} MENG Hailin^{1,2}

¹(Bioengineering Research Center, Guangzhou Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 511458, China)

²(Center of Synthetic Biology Engineering Research, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract An analytical method based on high performance liquid chromatography was developed for analysis of nerol, linalool and citronellol, which are three main monoterpenes in essential oils. The optimized chromatographic conditions were determined as: C18 column (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm), acetonitrile/water (v/v, 1 : 1) as mobile phase, UV detector (205 nm), flow rate at 1.0 mL/min. The precision and stability of the method were also validated. This method is of high sensitivity, good reproducibility, and meets the methodological requirements. Furthermore, the methodology has been applied to detect the content of nerol, linalool and citronellol in rose oil, rose essence, lemon oil and lemon essence.

Keywords essential oil; nerol; linalool; citronellol; high performance liquid chromatography

收稿日期: 2015-08-28 修回日期: 2015-12-09

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2015A030310317); 深圳市知识创新计划基础研究项目(JCYJ20150521144321007); 广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项(201508020092)

作者简介: 马娜, 硕士, 研究方向为食品添加剂与营养控制; 何敬愉, 博士, 研究方向为天然产物化学; 程皓, 硕士, 研究方向为合成生物学; 刘陈立(通讯作者), 博士, 研究方向为合成生物学, E-mail: cl.liu@siat.ac.cn; 蒙海林(通讯作者), 博士, 研究方向为合成生物学, E-mail: hl.meng@giat.ac.cn.

1 引言

芳香精油是从植物的花、叶、茎、根或果实中, 通过蒸馏、挤压、冷浸或溶剂提取等方法提炼萃取的挥发性芳香物质, 具有美容养颜、抑菌抗菌、消除疲劳、缓解烦躁焦虑、改善内分泌失调等功效^[1], 广泛用于制造高级名贵香水、化妆品、医药和食品等领域中。精油中的芳香化合物组成复杂, 大多含有香茅醇、香叶醇、橙花醇、芳樟醇、苯乙醇、丁香酚、金合欢醇及其酯类、倍半萜及其衍生物等^[2]。其中, 挥发性单萜化合物橙花醇、芳樟醇、香茅醇在自然界中广泛存在, 是多种天然精油的成分, 亦为绝大多数香型香精的调配原料。目前, 对香料分析方法主要有: 气相色谱(Gas Chromatography, GC)或液相色谱(Liquid Chromatogram)与傅里叶变换红外光谱(FTIR)以及二维核磁共振质谱联用、色谱与同位素质谱联用等^[3]。另外, 也有报道采用高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)方法分析测定精油中的芳樟醇^[4]。本文提出了一种简便有效的、非梯度洗脱 HPLC-UV 分析方法, 分析测定玫瑰精油、柠檬精油、玫瑰香精、柠檬香精中的橙花醇、芳樟醇、香茅醇三种芳香物质的含量, 并对此方法进行了系统考察。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 系列高效液相色谱系统, Agilent ChemStation; PURELAB Classic 超纯水仪(威立雅水处理技术(上海)有限公司)。

乙腈(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)为色谱纯, 橙花醇(97%)、芳樟醇(98%)、香茅醇(95%)均来自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 玫瑰精油(9.99%)、柠檬精油来自广州栋方

日化有限公司; 玫瑰香精、柠檬香精来自澳洲昆特臣香精香料有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 对照品溶液的制备

精密量取橙花醇、芳樟醇、香茅醇标准品各 10 μL 至 1 mL 容量瓶, 加乙腈至刻度, 摇匀, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

精密量取样品 1 μL 至 10 mL 容量瓶, 加乙腈至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件

色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C18 column (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (v/v, 1 : 1); 检测波长: 205 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.4 线性关系考察

精密量取对照品储备液 0.01 mL、0.02 mL、0.04 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL 至 10 mL 容量瓶, 加乙腈至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件进样, 记录峰面积, 以质量(X)对峰面积(Y)进行线性回归, 得回归方程。

2.2.5 精密度实验

仪器精密度: 精密吸取对照品溶液 10 μL , 按上述色谱条件下, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算峰面积的相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD)值。

2.2.6 重复性考察

取样品 10 μL 至 100 mL 容量瓶, 加乙腈至刻度, 摇匀, 同上平行制备供试品溶液 5 份, 连续 3 天按上述色谱条件进样, 记录峰面积, 计算样品中三种单萜化合物峰面积的 RSD 值。

2.2.7 加标回收率考察

取同一浓度的样品溶液, 用 6 个测定结果进行评价, 取一定浓度的样品 6 份, 加入一定浓度的对照品溶液, 按照上述色谱条件进样, 记录峰

面积, 计算三种单萜化合物的含量和回收率。

2.2.8 供试样品中 3 种单萜化合物的测定

分别精密量取玫瑰精油、玫瑰香精、柠檬精油、柠檬香精 10 μL 至 100 mL 容量瓶, 加乙腈至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。采用上述液相条件对玫瑰精油、玫瑰香精、柠檬精油、柠檬香精进行测定。

3 实验结果

3.1 线性关系考察

橙花醇的标准曲线为: $Y=3.7927X-5.4902$ ($R^2=1.0000$), 芳樟醇的标准曲线为: $Y=1.29X+3.9736$ ($R^2=0.9999$), 香茅醇的标准曲线为: $Y=2.4552X-7.9788$ ($R^2=1.0000$), 具体见表 1。结果表明, 橙花醇在 8.7~174.0 ng/mL 范围内峰面积(图 1)与质量呈现良好的线性关系; 芳

樟醇在 8.9~178.0 ng/mL 范围内峰面积(图 1)与质量呈现良好的线性关系; 香茅醇在 8.6~172.0 ng/mL 范围内峰面积(图 1)与质量呈现良好的线性关系。

3.2 精密度实验

精密度实验显示, 橙花醇的峰面积的 RSD 为 0.39%, 芳樟醇的峰面积的 RSD 为 0.08%, 香茅醇的峰面积的 RSD 为 0.11%, 结果表明仪器精密度好。

3.3 重复性考察

样品中橙花醇、芳樟醇、香茅醇峰面积的 RSD 均小于 3%(表 2), 结果表明方法重复性好。

表 2 重复性测定结果 ($n=5$)

化合物	RSD (%)		
	第一天	第二天	第三天
橙花醇	0.37	0.45	0.91
芳樟醇	0.61	2.11	0.81
香茅醇	0.34	1.08	0.64

表 1 3 种单萜化合物的标准曲线及线性范围

Table 1 Standard curves and linear ranges of three monoterpenes

名称	标准曲线	R^2	线性范围 (ng/mL)	最低检测限 (ng/mL)	最低定量限 (ng/mL)
橙花醇	$Y=3.7927X-5.4902$	1.0000	8.7~174.0	2.61	8.7
芳樟醇	$Y=1.29X+3.9736$	0.9999	8.9~178.0	2.67	8.9
香茅醇	$Y=2.4552X-7.9788$	1.0000	8.6~172.0	2.58	8.6

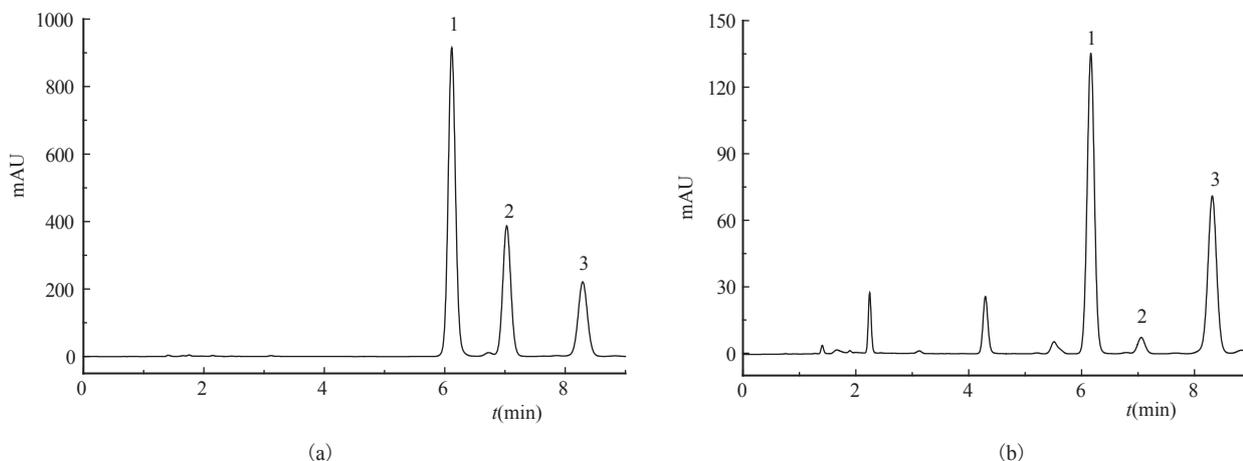


图 1 混合标准品(a)和玫瑰精油 HPLC 色谱图(b)

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standard (a) and rose oil (b)

3.4 加标回收考察

橙花醇、芳樟醇、香茅醇的加样回收率在 94%~105%、RSD 小于 5%(表 3), 结果表明方法准确。

表 3 回收率测定结果 ($n=6$)

Table 3 Results of recovery test ($n=6$)

标准品	样品含量 (ng)	加标量 (ng)	平均回 收率(%)	RSD(%)
橙花醇	418.31	445	94.67	1.37
芳樟醇	31.76	43.5	100.18	4.60
香茅醇	694.84	258	105.37	1.07

3.5 供试样品中 3 种单萜化合物的测定

玫瑰精油、玫瑰香精、柠檬精油、柠檬香精中三种单萜化合物测定结果如表 4 所示。

表 4 玫瑰精油、玫瑰香精、柠檬精油、柠檬香精中三种单萜化合物含量 ($n=6$)

Table 4 Counts of three monoterpenes in rose oil, rose essence, lemon oil and lemon essence ($n=6$)

成分	橙花醇 (mg/mL)	芳樟醇 (mg/mL)	香茅醇 (mg/mL)
玫瑰精油	28.48±0.10	2.66±0.02	52.68±0.18
玫瑰香精	1.13±0.01	1.35±0.01	13.82±0.03
柠檬精油	6.88±0.05	未检出	4.48±0.04
柠檬香精	13.82±0.03	4.82±0.01	23.23±0.07

4 讨论

本研究建立了精油中单萜化合物的 HPLC 分析方法。结果表明, 该方法简单易行, 方法学验证符合要求, 同时也证明本方法是一种准确、稳定、简便、分离效果良好的快速等度洗脱方法。传统分析精油单萜化合物普遍采用基于气相色谱的方法^[1-3]。但在前期研究中, 使用气相色谱-氢火焰检测器(GC-FID)对玫瑰精油中单萜类化合物进行分析后发现, GC-FID 分析时间较长(约 15 min), 灵敏度低(约为 8.7 $\mu\text{g/mL}$)。另外, 由于香茅醇(224 $^{\circ}\text{C}$)和橙花醇(225~226 $^{\circ}\text{C}$)的沸点接近, 导致两者不能达到有效分离, 无法对其进行准确的定性定量分析。本研究建立的 HPLC-

UV 分析方法检测限低, 灵敏度高, 分析时间短, 两者的分离度好。对于精油中橙花醇、芳樟醇、香茅醇的定性定量分析, HPLC-UV 方法较 GC-FID 具有明显的优势。此外, 根据此前已报道的 HPLC 分析方法, 芳樟醇在 60 min 左右出峰, 出峰时间较长^[4], 本文建立的 HPLC-UV 分析方法显著缩短了分析时间, 提高了效率。

本研究还进一步测定了玫瑰精油、玫瑰香精、柠檬精油、柠檬香精中的橙花醇、芳樟醇、香茅醇含量。结果表明, 玫瑰精油和玫瑰香精对比, 柠檬精油和柠檬香精对比, 其中橙花醇、芳樟醇、香茅醇含量的比例差别较大: 玫瑰精油中含有较高含量的橙花醇和香茅醇, 而玫瑰香精中的橙花醇含量较低; 柠檬精油中橙花醇和香茅醇含量较高, 未检出芳樟醇, 而柠檬香精中含有少量的芳樟醇。天然芳香精油中的化学成分复杂, 芳香成分很多, 其中橙花醇、芳樟醇、香茅醇等单萜化合物是玫瑰精油、柠檬精油等芳香精油主体香味成分^[5,6], 占有较大比例, 同时还含有其他微量香味成分; 而香精的组分相对单一, 只含有主体香味成分^[7]。

参 考 文 献

- [1] 李玉杰, 刘晓蕾, 刘霞, 等. 玫瑰精油的化学成分及其抗菌活性 [J]. 植物研究, 2009, 29(4): 488-491.
- [2] 左安连, 蔡宝国, 李琼, 等. 对中国三种玫瑰精油化学成分的研究 [C] // 第七届中国香料香精学术研讨会论文集, 2008: 16-25.
- [3] 董丽, 邢钧, 吴采樱. 香精香料的分析方法进展 [J]. 分析科学学报, 2003, 19(2): 188-192.
- [4] Porel A, Sanyal Y, Kundu A. Simultaneous HPLC determination of 22 components of essential oils; method robustness with experimental design [J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 76(1): 19-30.
- [5] Magnard JL, Rocchia A, Caissard JC, et al. Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses [J]. Science, 2015, 349(6243): 81-83.
- [6] Marmulla R, Harder J. Microbial monoterpene transformations—a review [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 346.
- [7] 杨琼伟, 张燕. 香座用玫瑰香精的调配 [C] // 2002 年中国香料香精学术研讨会论文集, 2002.