

GC-MS 分析不同产地香荚兰商品荚乙醇提取物化学成分差异及其香草醛的测定

孙 皓^{1,3}, 刘 薇², 曾建国^{1,2,3*}, 彭 旋³, 刘军鸽², 杜方麓^{1,3}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410007

2. 湖南农业大学 国家中药材生产(湖南)技术中心, 湖南 长沙 410128

3. 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南 长沙 410331

摘 要: 目的 分析中国海南与巴布亚新几内亚所产香荚兰商品荚乙醇提取物中化学成分的差异并测定香草醛的量。方法 对不同样品处理方法进行比较, 采用 GC-MS 分析法, 利用 Agilent DB-5MS 弹性石英毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm), 在初始温度为 60 ℃, 保持 1 min, 以 10 ℃/min 升至 260 ℃, 保持 6 min, 再以 6 ℃/min 升至 290 ℃, 保持 8 min; 载气为氦气的条件下, 对比两产地乙醇提取物的差异。结果 两产地所产香荚兰商品荚乙醇提取物中分别鉴定出 34 和 32 种化合物, 其中共有化合物 18 种。香草醛在香荚兰商品荚中的相对质量分数较高, 定量测定结果表明, 在质量浓度 0.04~1.10 mg/mL 内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$, $n=5$); 回收率为 100.05%, RSD 为 1.88%。结论 本方法能快速、简便、高效地检测出香荚兰商品荚乙醇提取物的化学成分, 并且在香草醛的定量测定中具有稳定、可重复的特点。

关键词: GC-MS; 香荚兰商品荚; 乙醇提取物; 香草醛; 定量测定

中图分类号: R284.1; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-0955-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.007

Analysis on chemical constituents in ethanol extract from vanilla pod in various habitats and quantitative determination of vanillin by GC-MS

SUN Hao^{1,3}, LIU Wei², ZENG Jian-guo^{1,2,3}, PENG Xuan³, LIU Jun-ge², DU Fang-lu^{1,3}

1. Pharmacy College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. National Herbal Medicine Production Technology Center (Hunan), Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

3. Hunan Engineering Research Center of Botanical Extract, Changsha 410331, China

Abstract: Objective To analyze the chemical constituents in ethanol extracts from vanilla pod in Hainan (China) and Papua-New Guinea and to assay the content of vanillin. **Methods** Comparing various pretreatment methods, GC-MS analysis method was selected and the column was packed with Agilent DB-5MS capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm); column temperature: the column initial temperature was 60 ℃, kept for 1 min, rose to 260 ℃ at the rate of 10 ℃/min, kept for 6 min, rose to 290 ℃ at the rate of 6 ℃/min, kept for 8 min; carrier gas: helium for comparing the difference of the constituents from the above two habitats. **Results** Because of the different habitats, 34 and 32 compounds were respectively identified from vanilla pod and 18 compounds were common components. Vanillin had a high content in vanilla pod and presented a good linearity with the peak area at the concentration of 0.04—1.10 mg/mL ($r = 0.999\ 8$, $n = 5$). The average recovery was 100.05% with the RSD of 1.88%. **Conclusion** GC-MS is quick, simple, convenient, and effective to analyze the constituents in the ethanol extracts from vanilla pod, and it is also reliable and reproducible to determine the content of vanillin.

Key words: GC-MS; vanilla pod; ethanol extract; vanillin; quantitative determination

香荚兰 *Vanilla planifolia* Andrews 为兰科 香果兰、扁叶香草兰, 是热带雨林下的攀缘植物。
(Orchidaceae) 香子兰属植物, 又名香子兰、香草兰、 目前, 香荚兰产地主要集中在巴布亚新几内亚、马

收稿日期: 2012-06-06

基金项目: 科技部国际合作——对发展中国家科技援助项目

作者简介: 孙 皓(1983—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药化学及质量研究。E-mail: snowolf318@163.com

*通信作者 曾建国(1965—), 男, 教授, 博导。Tel: (0731)84635293 E-mail: ginkgo@world-way.net

达加斯加、印度尼西亚、科摩罗、留旺尼、乌干达、塞舌尔、墨西哥和塔希提等岛屿国或地区,我国于1960年从印度尼西亚引种,并由福建省亚热带植物研究所在室内试种获得成功。由于香荚兰商品荚中含有200多种芳香成分及17种氨基酸,具有独特的香气^[1],用于治疗抑郁、癔病、胃病、阳痿、虚热、风湿病等病症^[2]。在香荚兰中以香草醛质量分数较高,通常作为质量控制的指标成分。目前,香草醛较普遍的检测方法是电化学法^[3]、高效液相色谱法^[4-5]、紫外分光光度法^[6]、气相色谱法^[7]。本实验采用气-质联用的方法,对香荚兰商品荚中挥发性成分进行质谱定性的同时,建立香草醛的定量测定方法,旨在为我国香荚兰的进一步研究与开发提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

GC-MS—QP2010 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司),AOC—20S 自动进样器(日本岛津公司),DB—5MS 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm)(美国安捷伦公司),AB135—S 分析天平(梅特勒-托利多),KQ—250B 超声仪(昆明市超声仪器有限公司)。香草醛(阿拉丁试剂有限公司,质量分数99%,批号43885);乙醇等试剂均为分析纯,实验用水为重蒸水。

不同产地香荚兰商品荚分别购自巴布亚-新几内亚及中国海南香圣天然食品有限公司,经湖南中医药大学大学生药学教研室杨广民教授鉴定为香荚兰 *Vanilla planifolia* Andrews 的豆荚。

2 实验方法与结果

2.1 实验条件

气相色谱条件:色谱柱为 Agilent DB—5MS 弹性石英毛细管柱(30 m×0.32 mm,0.25 μm);柱温为初始温度60℃,保持1 min,以10℃/min升至260℃,保持6 min,再以6℃/min升至290℃,保持8 min;载气为He(质量分数>99.999%);体积流量为1.0 mL/min;进样量为1.0 μL;不分流进样。

质谱条件:在相同色谱条件下,电离方式:EI,离子源温度200℃,接口温度220℃,电子轰击电压:70 eV;检测器电压:1.0 kV;质核比扫描范围:40~500 amu;自动调谐;溶剂延迟3.00 min^[8]。

2.2 供试品溶液的制备

将香荚兰商品荚剪成0.5~1 cm的小段,取药材约1 g,精密称定,分别精密加入75%乙醇20、15、15 mL于锥形瓶中,在40℃、40 kHz条件下超声

提取,每次提取20 min。提取液分别滤过,残渣用75%乙醇洗涤,合并滤液,冷却至室温。以75%乙醇定容至50 mL,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 对照品溶液的制备

取干燥至恒定质量的香草醛对照品适量,精密称定,置50 mL量瓶中,加75%乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,得浓度为10 mg/mL香草醛对照溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 样品处理方法考察 取同一批次样品(BS8112-6)分别用甲醇、95%乙醇、75%乙醇经回流、超声、索氏处理制备供试品溶液,进样,测定其中香草醛的质量分数。综合考虑提取时间、效率等结果,确定适当的前处理方法为:取切碎的香荚兰药材约1.0 g,精密称定,分别精密加入75%乙醇20、15、15 mL于锥形瓶中,在40℃、40 kHz条件下超声提取,每次提取20 min。提取液滤过,残渣用75%乙醇洗涤,合并滤液,冷却至室温。以75%乙醇定容至50 mL,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.4.2 系统适应性试验 精密吸取空白溶剂乙醇、供试品溶液及对照品溶液各1.0 μL,按“2.1”项色谱条件,注入气-质联用仪,记录43 min内的色谱峰,并进行基线补偿。结果见图1。

由图1可知,香荚兰商品荚乙醇提取物中的主要物质峰得到较好分离,且香草醛的分离度良好,方法真实可行。此外,通过总离子流色谱图对比,样品和对照品中香草醛均在12.6 min左右出峰,溶

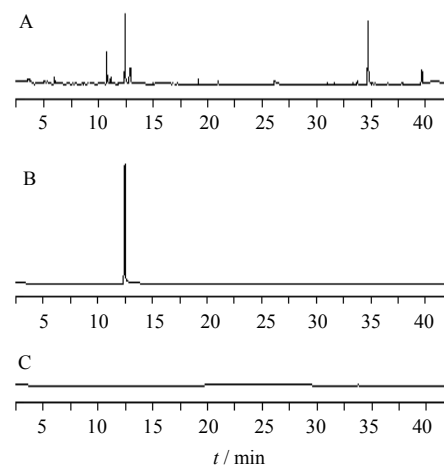


图1 样品(A)、香草醛对照品(B)和空白(C)的总离子流图
Fig. 1 TIC chromatogram of samples (A), vanillin reference substance (B), and blank (C) solution

剂在此时间点无干扰。

2.4.3 方法检出限确定 取香草醛标准对照溶液,以信噪比3为基准,在“2.1”项色谱条件下进样,测其峰面积,计算该方法的最低检出质量浓度为0.025 mg/mL。

2.4.4 线性范围考察 取香草醛对照溶液 0.04、0.05、0.10、0.60、1.10 mL,分别置10.0 mL量瓶中,加入75%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得香草醛质量浓度分别为0.04、0.05、0.10、0.60、1.10 mg/mL的对照溶液。取以上对照溶液在“2.1”项色谱条件下各进样1.0 μL,以香草醛进样量(X)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归分析,得回归方程 $Y=1.01 \times 10^5 X-2.00 \times 10^6$, $r=0.999\ 8$, $n=5$ 。表明香草醛在进样量为0.04~1.10 mg/mL与峰面积呈良好线性关系。

2.4.5 精密度试验 精密称取样品(产地中国海南,批号BS9102-1),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,然后依“2.1”项色谱条件吸取供试溶液重复进样6次,记录峰面积,计算其RSD值为1.86% ($n=6$),表明精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 精密称取样品(产地中国海南,批号BS9102-1),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,然后依“2.1”项色谱条件分别在0、2、4、6、8、10、12 h测定香草醛质量分数,其质量分数的RSD为1.10% ($n=7$),表明供试品溶液中香草醛在12 h内稳定性良好。

2.4.7 重复性试验 精密称取同一批样品6份(产地中国海南,批号BS9102-1),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件,每份进样3次,记录香草醛峰面积,测得其中香草醛的量为13.160 3 mg/g, RSD值为2.62% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 称取已测定香草醛的药材9份(产地中国海南,批号BS9102-1),每份1 g,精密称定,均分为3组,每组分别精密加入一定量的香草醛对照品(各约10.5、13.1、15.6 mg),按“2.2”项方法制备,按“2.1”项色谱条件进样1.0 μL,测得香草醛的平均回收率为100.05%,RSD为1.46% ($n=9$),表明测定方法准确可靠,可用于香草醛的定量测定。

2.5 香草醛定量测定

取中国海南及巴布亚新几内亚产香荚兰商品荚样品各3批,按照“2.2”项下方法制备供试液,按

“2.1”项下色谱条件进样,测定香草醛峰面积并计算其质量分数,结果见表1。

表1 样品中香草醛的测定结果
Table 1 Determination of vanillin contents

编号	产地	批号	质量分数 / %
1	中国海南	BS9101-1	1.350
2	中国海南	BS9101-2	1.370
3	中国海南	BS9102-5	1.361
4	巴布亚新几内亚	BX100923	0.930
5	巴布亚新几内亚	BX101027	0.920
6	巴布亚新几内亚	BX110815	0.970

2.6 GC-MS 分析结果

经GC-MS联用仪分析,所得质谱图经计算机数据处理和标准质谱图库NIST08、NIST08S检索鉴定,从中国海南和巴布亚新几内亚产香荚兰商品荚的乙醇提取物中分别鉴定出34和32种化合物,并测定所鉴定的各种化学成分及其峰面积百分含量,结果见表2。

由表2可知,香荚兰商品荚乙醇提取物的主要成分为3-甲氧基苯甲醇、2,3,3-三甲基辛烷、香草醛、4-甲氧基苯甲酸、正-十六酸甲酯、正-十六酸、7-十六烯酸甲酯、(Z,Z)-9,12-十八二烯酸、(Z)-9-十八酮烯、环十二烷乙酮、正十七烷、5-十四烷基-2(3H)-二氢呋喃、丁基磷酸-4-甲氧苄基壬酯、1,4-二甲基-2-十八烷基环己烷、(E,E)-2,13-十八二烯醇、鸦胆丁等,其中以香草醛的量相对最高,故以此为指标对其进行定量比较。

3 讨论

由于产地土壤、气候等因素的差异,两产地香荚兰商品荚乙醇提取物中的成分具有较大差异。其中,中国海南产香荚兰商品荚乙醇提取物中共鉴定出34个化合物;而巴布亚新几内亚产香荚兰商品荚乙醇提取物中则鉴定出32个化合物。在海南产香荚兰提取物中,未检测到十三酸乙酯、(9E)-9-二十六烯、十七烷、二十九烷、2,4-十九二酮、二氯乙酸十七烷酯、1,2-苯二甲酸-(2-乙基)-己酯等14化合物;而在巴布亚新几内亚产香荚兰提取物中,未检测到1-十九烯、二十八烷、2-甲基-8-丙基十二烷、二十碳酸、2,2'-二[6-(1,1-二甲基)-乙基-4-甲基苯酚基]-甲烷、三氟甲酸十七烷酯、1,2-苯甲酸二异辛酯、溴甲酸十九酯等16个化合物。通过相关文献查阅,该两产地香荚兰均为引种品种,若对不同产地香荚兰内在差异及因引种而引起的变异进行分析对

表2 不同产地香荚兰商品荚乙醇提取物化学成分

Table 2 Chemical constituents in ethanol extract from vanilla pod in various habitats

序号	<i>t</i> / min	化合物	分子式	相对分子质量	质量分数 / %	
					中国海南	巴布亚新几内亚
1	11.075	3-甲氧基苯甲醇	C ₈ H ₁₀ O ₂	138	1.81	0.87
2	11.958	2, 3, 3-三甲基辛烷	C ₁₁ H ₂₄	156	0.13	0.14
3	12.550	香草醛	C ₈ H ₈ O ₃	152	8.88	5.57
4	12.983	4-甲氧基苯甲酸	C ₈ H ₈ O ₃	152	2.78	1.10
5	16.283	2-甲基-8-丙基十二烷	C ₁₆ H ₃₄	226	0.06	—
6	18.825	正十六酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	0.12	0.13
7	19.208	正十六酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	1.15	0.85
8	19.525	十三酸乙酯	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	—	0.09
9	20.640	7-十六烯酸甲酯	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268	0.20	0.14
10	21.025	(<i>Z</i> , <i>Z</i>)-9, 12-十八二烯酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	1.14	0.97
11	21.242	二十碳酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	310	0.44	—
12	21.625	正二十一烷	C ₂₁ H ₄₄	296	0.10	—
13	22.433	(<i>9E</i>)-9-二十六烯	C ₂₆ H ₅₂	364	—	0.15
14	22.450	1-十九烯	C ₁₉ H ₃₈	266	0.10	—
15	22.725	正十七烷	C ₁₇ H ₃₆	240	—	0.19
16	22.733	正二十八烷	C ₂₈ H ₅₈	394	0.25	—
17	24.008	正二十九烷	C ₂₉ H ₆₀	408	—	0.14
18	24.017	2-甲基二十烷	C ₂₁ H ₄₄	296	0.10	—
19	24.183	2, 4-十九二酮	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	—	0.15
20	24.292	2, 2'-二-[6-(1, 1-二甲基)-乙基-4-甲基苯酚基]-甲烷	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	340	0.20	—
21	25.158	二氯乙酸十七烷酯	C ₁₉ H ₃₆ Cl ₂ O ₂	366	—	0.11
22	25.167	三氟甲酸十七烷酯	C ₁₈ H ₃₃ F ₃ O ₂	338	0.14	—
23	25.542	正二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	338	0.21	—
24	25.550	正二十八烷	C ₂₈ H ₅₈	394	—	0.21
25	26.150	1, 2-苯二甲酸二异辛酯	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	5.61	—
26	26.158	1, 2-苯二甲酸-1-(2-乙基)-己酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	—	0.75
27	27.417	2-溴十四烷	C ₁₄ H ₂₉ Br	276	—	0.08
28	27.686	(<i>Z</i>)-9-十八烯酮	C ₁₈ H ₃₄ O	266	0.23	0.25
29	29.183	环十二烷乙酮	C ₁₄ H ₂₆ O	210	0.34	0.23
30	29.340	正十七烷	C ₁₇ H ₃₆	240	0.15	0.10
31	30.592	3-甲基-2-(1-甲基乙基) 环己醇	C ₁₀ H ₂₀ O	156	—	0.27
32	30.608	溴甲酸十九酯	C ₂₀ H ₃₉ BrO ₂	390	0.17	—
33	31.020	5-十四烷基-2(3 <i>H</i>)-二氢呋喃	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	0.68	0.85
34	31.600	丁基磷酸-4-甲氧苄基壬酯	C ₂₁ H ₃₇ O ₄ P	384	0.65	0.59
35	32.400	三氟甲酸十六烷酯	C ₁₇ H ₃₁ F ₃ O ₂	324	0.17	—
36	32.525	1-二十八烷醇	C ₂₈ H ₅₈ O	410	—	0.61
37	32.525	(<i>9E</i>)-9-二十六烯	C ₂₆ H ₅₂	364	0.67	—
38	33.367	1, 4-二甲基-2-十八烷基环己烷	C ₂₆ H ₅₂	364	0.48	0.46
39	33.730	(<i>E</i> , <i>E</i>)-2, 13-十八二烯醇	C ₁₈ H ₃₄ O	266	1.67	1.44
40	34.983	反-8-乙基-二环-[4.3.0]-3-壬烯	C ₁₁ H ₁₈	150	0.05	—
41	35.150	2, 4-二十三二酮	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	352	0.17	0.21
42	36.320	(<i>17E</i>)-17-三十五烯	C ₃₅ H ₇₀	490	0.30	0.69
43	36.508	1-二十七烷醇	C ₂₇ H ₅₆ O	396	—	0.98
44	36.517	正三十烷醇	C ₃₀ H ₆₂ O	438	0.70	—
45	36.808	正二十九烷	C ₂₉ H ₆₀	408	—	0.62
46	36.825	正四十四烷	C ₄₄ H ₉₀	618	0.39	—
47	37.850	鸦胆丁	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₁	548	1.16	1.04
48	38.042	十四烷基环辛烷	C ₂₂ H ₄₄	308	—	0.29

比, 还需扩大香荚兰的产地来源并采用更多样的分析方法对其展开进一步研究。

此外, 两产地已鉴定的成分中, 各化合物的量也存在较大差异。在中国海南产香荚兰提取物中, 已鉴定的化合物占总挥发物的 31.30%; 而巴布亚新几内亚产香荚兰提取物中, 已鉴定化合物则占总挥发物的 20.27%。其中, 以香草醛为例, 在中国海南产香荚兰中的相对质量分数达 8%以上, 而巴布亚新几内亚产香荚兰则在 6%以下; 其绝对定量中, 香草醛在海南产香荚兰中 1.3%左右, 而巴布亚新几内亚产香荚兰中 0.9%左右。据文献报道, 香草醛具有抗癫痫作用, 特别适用于小发作, 也可用于治疗多动症及眩晕等精神方面的疾患^[2]; 其提取物也可开发为食品调味剂及保健品, 因而其中的挥发性成分差异将影响其品质。因此, 对其中活性成分差异的研究还需进一步深入。

在对不同提取溶剂、提取方式、提取次数的对比实验中发现, 以 75%乙醇为溶媒分 3 次超声提取可将香荚兰商品荚中的香草醛较好地提取出来。又因香草醛的易挥发性, 在超声提取时可不断加入冰块, 从而可有效避免香草醛的损失。

由于香荚兰提取物中成分较复杂, 采用程序升温的方法, 可使香草醛与其他物质峰实现有效分离, 各色谱峰对称性良好, 空白样品也无干扰, 香草醛保留

时间适当, 整个过程在 50 min 内便可完成。本方法利用质谱进行定量分析, 为香荚兰中香草醛的测定提供了有效方法, 为产品质量控制提供了有效参考。

参考文献

- [1] 陈德新. 香荚兰—世界食品香料皇后 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2009.
- [2] Delfinadearaujo.tom.Vanilla Mill [EB/OL]. <http://www.delfinadearaujo.com/generos/vanilla/vaniaen.htm>, 2004-12-05.
- [3] 邱萍, 倪永年. 微分脉冲溶出伏安法测定食品中的香兰素 [J]. 南昌大学学报: 理科版, 2002, 26(2): 124-127.
- [4] 周庆礼, 黄艳凤, 韩英素, 等. 高效液相色谱法测定发酵液中的香兰素 [J]. 色谱, 2004, 22(3): 295.
- [5] 顾蕴华, 卢忠魁, 黄越. 高效液相色谱法测定饼干中的香兰素 [J]. 中国饮食卫生与健康, 2004(2): 63-64.
- [6] Li R, Jiang Z T, Mao L Y, *et al.* Absorbed resin phase spectrophotometric determination of vanillin or/and its derivatives [J]. *Talanta*, 1998, 47: 1121-1127.
- [7] 李济东, 陈尚文. 气相色谱法测定香荚豆中的香兰素 [J]. 色谱, 1990, 8(2): 127-128.
- [8] Kumar K K, Kumar A A A, Ahmad R, *et al.* Effect of gamma-radiation on major aroma compounds and vanillin glucoside of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*) [J]. *Food Chem*, 2010, 122: 841-845.