

薄荷素油特征图谱的研究及多组分含量测定*

陈在敏

(福建省药品检验所 福州 350001)

摘要 目的:建立薄荷素油的气相特征图谱共有模式,研究薄荷素油的化学成分。建立同时测定薄荷素油中 α -蒎烯、柠檬烯、薄荷酮、薄荷醇、胡薄荷酮、薄荷醋酸酯6种成分含量的气相色谱法。方法:采用GC-MS对薄荷素油中的共有成分进行鉴定。含量测定采用GC内标法,色谱柱:HP-5毛细管柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m),以1-辛醇为内标。结果:薄荷素油中的15种共有成分得到鉴定,建立了薄荷素油含11个主要共有峰的气相特征图谱。含量测定中6种主要成分得到良好的分离,在测定范围内的线性关系良好,平均回收率在97%以上。结论:特征图谱结合多组分的含量测定,能更好地控制薄荷素油的质量。

关键词:薄荷素油;特征图谱;气相色谱-质谱联用; α -蒎烯;柠檬烯;薄荷酮;薄荷醇;胡薄荷酮;薄荷醋酸酯;含量测定
中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2011)10-1957-04

Study on specific chromatogram and determination of chemical components in peppermint oil*

CHEN Zai-min

(Fujian Institute for Drug Control, Fuzhou 350001, China)

Abstract Objective: To set up the mutual mode of GC specific chromatograms of peppermint oil. To develop a GC method for simultaneous determination of α -pinene, limonene, menthone, menthol, pulegone, menthyl acetate in peppermint oil. **Method:** GC-MS was applied for the identification of the mutual components in peppermint oil. GC was performed on HP-5 capillary column(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m) and 1-octanol used as an internal standard. **Result:** 15 common components were identified by GC-MS in peppermint oil. The GC specific chromatogram of peppermint oil with 11 common characteristic peaks was established. Six main components were finely separated and showed good linearity in the concentration range of detection, the added sample recovery rate was above 97%. **Conclusion:** The combination of specific chromatograms and GC determination is capable of effectively controlling of the quality of peppermint oil.

Key words: peppermint oil; specific chromatogram; GC-MS; α -pinene; limonene; menthone; menthol; pulegone; menthyl acetate; assay

薄荷素油为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的新鲜茎和叶经蒸馏、冷冻、部分脱脑加工而得到的挥发油,是2010年版中国药典收载品种^[1]。由于薄荷属植物分布广、生态适应幅度大,使薄荷属植物内在形态和化学上都产生很多变异,导致提取的薄荷素油成分也有差异^[2]。为了更好控制薄荷油的质量,本文采用GC制定薄荷素油特征图谱,利用GC-MS对特征图谱中主要成分进行归属,并建立对薄荷素油中的6种成分同时进行含量测定的方

法。

1 仪器与试剂

Agilent 7890A/5975C 型气相色谱-质谱联用仪,Agilent6890N 气相色谱仪。

α -蒎烯对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:897-200001);柠檬烯(FLUKA,含量>99%),薄荷酮(Alfa Aesar,含量>97%),薄荷醇(Alfa Aesar 含量>99%),胡薄荷酮(东京化成工业株式会社),薄荷醋酸酯(SIGMA-ALDRICH,含量

* 国家科技支撑计划子课题(2009ZX09308-001-3)
作者 Tel:(0591)87627063; E-mail: yyhczm@sina.com

>97%) 薄荷素油对照提取物(中国药品生物制品检定所提供、批号: 1551 - 200101) , 1 - 辛醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司) 其他试剂均为分析纯。薄荷素油由生产厂家提供。

2 薄荷素油特征图谱

2.1 色谱条件 HP - 5 毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) , 初始温度 60 °C , 以 2 °C · min⁻¹ 升至 120 °C , 再以 20 °C · min⁻¹ 升至 220 °C , 保持 5 min。进样口温度 250 °C 检测器: FID; 温度 250 °C。载气为氮气 , 流速为 1 mL · min⁻¹。薄荷素油直接进样 0.2 μL , 分流比 100:1。

2.2 质谱条件 HP - 5MS 毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 载气为氮气 , 流量为 1 mL · min⁻¹。离子源为 EI 源 , 电子轰击能量为 70 eV , 倍增电压为 1.3 kV , 四级杆温度 150 °C , 离子源温度为 230 °C , 扫描范围 1.6 ~ 500 amu。

2.3 特征图谱的测定 按照“2.1”项下实验条件 , 将 10 批样品的气相色谱图数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)” 计算软件 , 对图谱按照保留时间进行谱峰自动匹配 , 用中位数计算得出薄荷素油的 GC 对照特征图谱。见图 1。

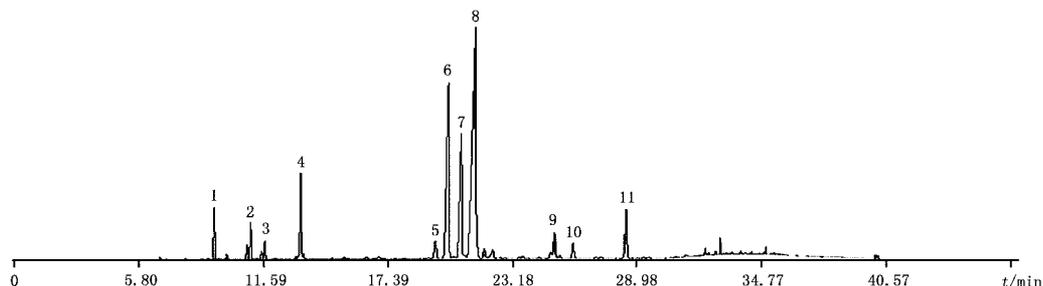


图 1 薄荷素油 GC 对照特征图谱

Fig 1 The GC reference specific chromatogram of peppermint oil

2.4 GC - MS 成分鉴定 为了确认主要共有峰的成分 , 不同批号的样品按上述实验条件进行 GC - MS 分析 , 其代表性总离子流图见图 2。由于柱子均为 HP - 5 , 及色谱条件一致(除载气外) , 总离子流图中各成分的出峰顺序与 GC 图谱中的一致 , 载气的不同 , 导致出峰时间上有所差异。通过数据库自动检索、人工解析和核对有关文献资料^[3,4] , 对共有的 15 种成分进行鉴定。并采用面积归一化法测定各成分相对百分含量 结果见表 1。

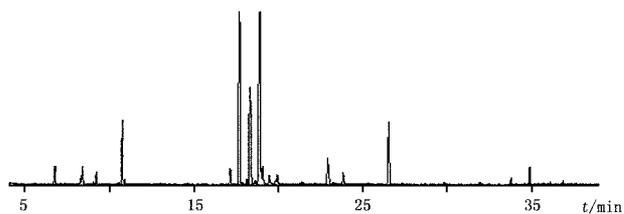


图 2 薄荷素油总离子流图

Fig 2 TIC of peppermint oil

表 1 薄荷素油中共有成分的 GC - MS 分析结果

Tab 1 The results of GC - MS analysis on common components of peppermint oil

| t _R /min | 化合物 (compound) | 分子式 (molecular formula) | 相对含量 (relative content) /% | 匹配率 (matching ratio) /% |
|---------------------|---|--|-------------------------------|----------------------------|
| 6.757 | α - 蒎烯(alpha - pinene) | C ₁₀ H ₁₆ | 1.70 | 96 |
| 8.393 | β - 蒎烯(beta - pinene) | C ₁₀ H ₁₆ | 1.38 | 94 |
| 9.212 | 3 - 辛醇(3 - octanol) | C ₈ H ₁₈ O | 1.03 | 90 |
| 10.746 | 柠檬烯(limonene) | C ₁₀ H ₁₆ | 4.88 | 94 |
| 10.875 | 桉油精(eucalyptol) | C ₁₀ H ₁₈ O | 0.33 | 97 |
| 17.142 | 异薄荷醇(cyclohexan-5-yl methyl-2-(1-methylethyl)-) | C ₁₀ H ₁₈ O | 1.41 | 99 |
| 17.690 | 薄荷酮(menthone) | C ₁₀ H ₁₈ O | 21.78 | 97 |
| 18.298 | 异薄荷酮(isomenthone) | C ₁₀ H ₁₈ O | 13.36 | 96 |
| 18.913 | 薄荷醇(menthol) | C ₁₀ H ₂₀ O | 37.70 | 98 |
| 22.909 | 薄荷酮(pulegone) | C ₁₀ H ₁₆ O | 3.15 | 95 |
| 23.220 | 香芹酮(carvone) | C ₁₀ H ₁₄ O | 0.33 | 96 |
| 23.822 | 胡椒酮[2-cyclohexen-1-one 3-methyl-6-(1-methylethyl)-] | C ₁₀ H ₁₆ O | 1.33 | 96 |
| 26.519 | 薄荷醋酸酯(menthyl acetate) | C ₁₂ H ₂₂ O ₂ | 6.03 | 91 |
| 33.774 | 石竹烯(caryophyllene) | C ₁₅ H ₂₄ | 0.52 | 99 |
| 34.869 | 邻苯二甲酸二甲酯(dimethyl phthalate) | C ₁₀ H ₁₄ O ₄ | 0.78 | 93 |

2.5 特征图谱的建立 结合 MS 给出的成分信息, 选定相对百分含量在 1% 以上的 11 个共有色谱峰作为共有特征峰, 气相特征图谱(图 1) 中的 6 号峰经确定为薄荷酮的色谱峰, 与相邻色谱峰得到良好的分离, 确定为参照峰, 计算各色谱峰与参照峰的相对保留时间比值。各特征峰的峰号(相对保留时间)如下: 1(0.46), 2(0.54), 3(0.57), 4(0.65), 5(0.97), 6(1), 7(1.03), 8(1.06), 9(1.24), 10(1.29), 11(1.41)。依次分别为 α -蒎烯、 β -蒎烯、3-辛醇、柠檬烯、异胡薄荷醇、薄荷酮、异薄荷酮、薄荷醇、胡薄荷酮、胡椒酮、薄荷醋酸酯。10 批样品中, 其 11 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.2%, 重复性良好, 具代表性。选定的 11 种共有特征峰面积所占比例在 90% 以上, 说明所选择的共有特征峰可以较为全面地反映样品中化学成分的信息。

3 内标法测定 6 种成分含量

3.1 内标溶液 取 1-辛醇适量, 精密称定, 加无水乙醇制成每 1 mL 含 40 mg 的溶液, 摇匀, 作为内标溶液。

3.2 对照品溶液 分别取对照品 α -蒎烯、柠檬烯、薄荷酮、薄荷醇、胡薄荷酮、薄荷醋酸酯适量, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 配成浓度分别为 3.783, 9.659, 49.323, 64.860, 10.995, 11.296 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液 I, 精密吸取混合对照品溶液 I 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1.0 mL, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3.3 供试品溶液 取本品约 0.2 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1.0 mL, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3.4 色谱条件及系统适用性试验 色谱条件同“2.1”项, 进样量: 1 μ L, 分流比 30:1。理论板数按薄荷酮峰计算, 应不低于 50000。在上述色谱条件下, 对照品和样品色谱图见图 3。

3.5 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 I 各 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 各精密加入内标溶液 1.0 mL, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得系列对照品溶液, 分别注入气相色谱仪, 记录色谱峰面积。分别以对照品溶液浓度 X (mg · mL⁻¹) 为横坐标, 相应对照品峰面积与内标物峰面积的比值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。各成分回归方程及线性范围见表 2。

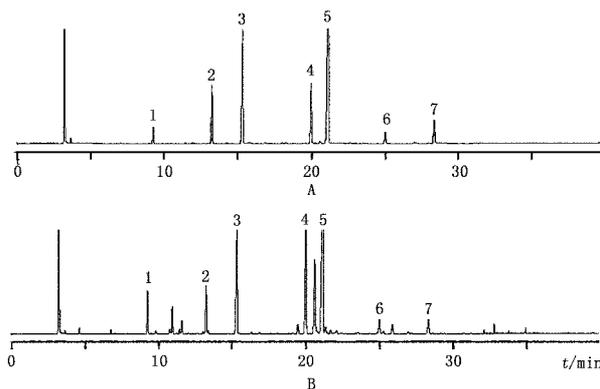


图 3 对照品(A)、样品(B)色谱图

Fig 3 Chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

1. α -蒎烯(α -pinene) 2. 柠檬烯(limonene) 3. 1-辛醇(1-octano) 4. 薄荷酮(menthone) 5. 薄荷醇(menthol) 6. 胡薄荷酮(pulegone) 7. 薄荷醋酸酯(menthyl acetate)

表 2 回归方程和线性范围
Tab 2 Regression equations and linear range

| 成分 (compound) | 线性方程 (equation of linear regression) | 相关系数 (correlation coefficient) | 线性范围 (linear range) /mg · mL ⁻¹ |
|---------------------------------|---|--------------------------------------|---|
| α -蒎烯(α -pinene) | $Y = 0.2847X - 0.0007$ | 0.9999 | 0.0757 ~ 1.892 |
| 柠檬烯(limonene) | $Y = 0.2939X - 0.002$ | 1.0000 | 0.1932 ~ 4.829 |
| 薄荷酮(menthone) | $Y = 0.2509X - 0.0107$ | 0.9999 | 0.9865 ~ 24.66 |
| 薄荷醇(menthol) | $Y = 0.269X - 0.021$ | 1.0000 | 1.297 ~ 32.43 |
| 胡薄荷酮(pulegone) | $Y = 0.2422X - 0.0015$ | 1.0000 | 0.2199 ~ 5.497 |
| 薄荷醋酸酯(menthyl acetate) | $Y = 0.2431X - 0.005$ | 0.9999 | 0.2259 ~ 5.648 |

3.6 精密度试验 取对照品溶液在上述色谱条件下连续进样 5 次, 以 α -蒎烯、柠檬烯、薄荷酮、薄荷醇、胡薄荷酮和薄荷醋酸酯与内标的峰面积比值计算各自的 RSD 分别为 1.6%, 1.3%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.4%。

3.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液在 0, 3, 6, 9, 12 h 后按上述色谱条件分别进样, 以各成分与内标峰面积的比值计算 RSD, 结果分别为 2.2%, 2.3%, 1.6%, 1.1%, 1.7%, 1.3%, 表明供试品溶液中各成分在 12 h 内稳定性良好。

3.8 回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号 100101) 5 份, 每份 0.1 g, 置 10 mL 量瓶中, 分别精密加入对照品溶液各 5 mL(含 α -蒎烯、柠檬烯、薄荷酮、薄荷醇、胡薄荷酮、薄荷醋酸酯浓度分别为 0.6558, 1.6518, 3.9904, 7.034, 0.3230, 1.2072 mg · mL⁻¹) 精密加入内标溶液 1.0 mL, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得供试溶液。在上述色

谱条件下进样,计算回收率,结果见表3。

表3 回收率试验结果

Tab 3 Recoveries of determination

| 组分 (compound) | 加入量 (add) /mg | 平均回收率 (average recovery) /% | RSD /% |
|---------------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------|
| α -蒎烯(α -pinene) | 3.279 | 97.76 | 1.3 |
| 柠檬烯(limonene) | 8.259 | 98.45 | 1.2 |
| 薄荷酮(menthone) | 19.95 | 97.92 | 1.7 |
| 薄荷醇(menthol) | 35.17 | 98.40 | 0.8 |
| 胡薄荷酮(pulegone) | 1.615 | 97.66 | 0.4 |
| 薄荷醋酸酯(menthyl acetate) | 6.036 | 104.0 | 0.6 |

表4 样品含量测定结果(%)

Tab 4 Results of determination of samples

| 生产厂家 (manufacturer) | 批号 (batch No.) | α -蒎烯 (α -pinene) | 柠檬烯 (limonene) | 薄荷酮 (menthone) | 薄荷醇 (menthol) | 胡薄荷酮 (pulegone) | 薄荷醋酸酯 (menthyl acetate) |
|--|----------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------------------|
| 黄山天目薄荷药业公司(Huangshan Tianmu Menthol Pharma. Co.) | 20100223 | 1.15 | 3.69 | 19.90 | 35.26 | 3.55 | 5.26 |
| 黄山天目薄荷药业公司(Huangshan Tianmu Menthol Pharma. Co.) | 20100428 | 1.16 | 3.71 | 19.98 | 35.43 | 3.56 | 5.28 |
| 黄山天目薄荷药业公司(Huangshan Tianmu Menthol Pharma. Co.) | 20100512 | 1.13 | 3.65 | 19.84 | 35.11 | 3.54 | 5.25 |
| 黄山天目薄荷药业公司(Huangshan Tianmu Menthol Pharma. Co.) | 091010 | 1.33 | 3.19 | 19.18 | 38.42 | 3.31 | 4.98 |
| 黄山天目薄荷药业公司(Huangshan Tianmu Menthol Pharma. Co.) | 100916 | 1.02 | 3.87 | 20.08 | 38.12 | 2.81 | 4.18 |
| 南通薄荷厂有限公司(Nantong Menthol Factory Co., Ltd) | 100101 | 2.09 | 5.28 | 18.32 | 33.71 | 1.49 | 5.62 |
| 南通薄荷厂有限公司(Nantong Menthol Factory Co., Ltd) | 100102 | 2.02 | 5.26 | 18.34 | 33.63 | 1.50 | 5.63 |
| 南通薄荷厂有限公司(Nantong Menthol Factory Co., Ltd) | 100103 | 1.93 | 5.25 | 18.53 | 33.68 | 1.51 | 5.68 |
| 安徽丰乐香料有限公司(Anhui Fengle Perfume Co., Ltd) | 100930 | 4.69 | 6.05 | 19.46 | 32.39 | 2.56 | 2.87 |
| 对照提取物(中国食品药品检定研究院 [reference extract (National Institutes for Food and Drug Control)] | 1551- 20010 | 4.66 | 5.49 | 21.12 | 30.92 | 1.91 | 2.63 |

4.2 考察了多种物质作为内标,环己酮出峰时间在 α -蒎烯之前,萘和水杨酸甲酯出峰时间紧挨在薄荷醇之后,不能与样品中其他色谱峰完全分离,而十四烷等出峰时间太迟。在实验中,考虑到内标出峰时间最佳位置就在柠檬烯与薄荷酮峰之间,从样品中组分3-辛醇的出峰时间得到提示,由于极性不同,1-辛醇出峰时间正合适,而且容易获得,与样品中的其他色谱峰均能得到很好的分离。

4.3 不同厂家的薄荷素油虽然在成分组成上基本相似,但从表4可以看出,各组分的含量还是有较大的差异。而采用国家药典会中药指纹图谱相似度评价系统2004(A版)对上述样品的特征图谱进行了相似度分析,发现各批样品间相似度均达到0.98以上,分析原因可能与薄荷醇与薄荷酮等大指纹峰影响严重,存在大峰严重掩盖小峰的缺陷,另外采用该评价系统必须与对照图谱进行比对,对色谱条件的一致性要求较高,造成在工作中存在一定的局限性。考虑到薄荷素油中的成分多为一些相对分子质量较接近、结构上也较相似的挥发性成分,在FID检测器上的响应差别较小,建议参考欧洲药典该品种项下的规定,利用归一化法对其中的主要特征峰含量进行考察。在本研究中也比较了FID检测器上归一化法得出的以上6种成分的百分含量与内标法测定

3.9 样品测定 取不同批号的样品约0.2g,精密称定,按“3.3”项下方法制备供试品溶液,在上述条件下进样分析,内标法计算各成分含量,测定结果见表4。

4 讨论

4.1 本研究还考察了HP-INNOWax柱,各组分在2种型号的柱子上出峰顺序有所差异,实验中曾尝试从起始温度70℃,升温速率5℃·min⁻¹,结果发现各组分无法完全分离。选用正文所列条件,各组分分离度良好。

数值较为接近,提示对特征图谱中的11个共有特征峰利用面积归一化法规定其相对含量范围作为薄荷素油的质量初步评判有一定意义。

4.4 中国药典收载薄荷素油含量测定项下只测定了薄荷醇的含量,本文建立了多成分含量测定方法,多指标成分的质量控制比起单一指标成分定量更为科学。

4.5 运用中药特征图谱技术和多指标成分定量相结合的质量标准控制模式,可以更全面、更科学地控制薄荷素油的质量。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I(一部):395
- 2 LIU Hong-jie(刘红杰), JIN Ruo-min(金若敏). Current advances in study of peppermint oil(薄荷油研究进展). *J Shandong Univ Tradit Chin Med*(山东中医药大学学报) 2006, 30(6):502
- 3 LI Bai-gui(李百贵), AN Qiu-rong(安秋荣), GUO Zhi-feng(郭志峰). Identification of isomer of volatile oils in peppermint leaves and its stalks by gas chromatography-mass spectrometry(用色谱-质谱方法鉴定薄荷油中的异构体). *Chin J Anal Chem*(分析化学研究简报) 2001, 29(5):530
- 4 SU Yue(苏越), WANG Cheng-zhong(王呈仲), GUO Yin-long(郭寅龙). Analysis of volatile compounds from mentha hapioealyx Briq by GC-MS based on accurate mass measurement and retention index(基于准确质量测定和保留指数的GC-MS分析薄荷挥发性成分). *Acta Chim Sin*(化学学报) 2009, 67(6):564

(本文于2011年1月23日收到)