

基于GC-MS和GC-O联用法分析佛手精油 关键香气成分

杨 君¹, 郇海燕², 储国海¹, 李泽桦³, 牛云蔚⁴, 蔡 铭³, 胡安福¹, 蒋 健^{1,*}

(1.浙江中烟工业有限责任公司, 浙江 杭州 310009; 2.浙江省农业科学院食品科学研究所, 浙江 杭州 310021;
3.浙江工业大学海洋学院, 浙江 杭州 310014; 4.上海应用技术学院香料香精技术与工程学院, 上海 201418)

摘 要: 研究佛手精油的挥发性物质和关键香气成分。佛手经水蒸气蒸馏法提取精油, 利用气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 结合气相色谱-嗅闻 (gas chromatography-olfactometry, GC-O) 技术对挥发性物质和香气成分进行分析。GC-MS-O检测出36种挥发性物质, 主要成分为D-柠檬烯 (34.69%)、 γ -松油烯 (20.42%)、 β -甜没药烯 (4.59%)。采用稀释法和强度法分析发现D- α -蒎烯、D-柠檬烯、 β -芳樟醇、别罗勒烯、4-松油醇、 α -佛手柑烯具有较大的香气强度; D- α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -罗勒烯、橙花乙酸酯、 α -佛手柑烯具有较大风味稀释因子。综合分析认为D- α -蒎烯和 α -佛手柑烯是佛手精油的关键特征香味成分。

关键词: 佛手精油; 香气成分; 气相色谱-质谱联用仪; 气相色谱-嗅闻技术

Characterization of Volatile Constituents and Odorous Compounds in Essential Oil of Finger Citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle) by GC-MS and GC-O

YANG Jun¹, GAO Haiyan², CHU Guohai¹, LI Zehua³, NIU Yunwei⁴, CAI Ming³, HU Anfu¹, JIANG Jian^{1,*}

(1. China Tobacco Zhejiang Industrial Co. Ltd., Hangzhou 310009, China;

2. Institute of Food Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;

3. College of Ocean, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

4. Shanghai Institute of Technology, School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract: The volatile constituents and odorous compounds in essential oil of finger citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle) were evaluated. The oil was extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O). A total of 36 compounds in the oil were identified, among which, D-limonene (34.69%), γ -terpinene (20.42%), and β -bisabolene (4.59%) were the main compounds. D- α -pinene, D-limonene, β -linalool, allo-ocimene, terpin-4-ol and α -bergamotene displayed strong aromatic intensity, while D- α -pinene, β -pinene, β -ocimene, neryl acetate and α -bergamotene showed relatively higher flavor dilution (FD) factor. The results demonstrated that D- α -pinene and α -bergamotene were the key contributors to the characteristic aroma of finger citron oil.

Key words: finger citron essential oil; odorous compounds; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); gas chromatography-olfactometry (GC-O)

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 20-0194-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201520037

佛手 (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle) 是芸香科柑橘属植物香橼的变种, 为常绿小乔木, 由于果实顶部张开呈指状, 因此得名^[1]。佛手精油含量较高, 主要存在于佛手果实的外果皮、中果皮中, 色泽透明或淡黄色, 具有清新怡人的特征香味, 常作为高档香料而广泛应用于食品、化妆品领域^[2]。佛手精油具有较多生理

活性功能, 如治疗胃痛、胁胀、呕吐、痰饮咳嗽、解酒等^[3]。佛手精油主要物质是柠檬烯, 此外还含有一定量 γ -松油烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯等物质^[4-5]。研究^[6-8]表明, 柠檬烯对大肠杆菌O157:H7和肠炎沙门氏菌具有很强抑制作用, γ -松油烯对沙门氏菌具有较好抑菌活性。Peng等^[4]发现佛手精油能促进胰岛素分泌, 可用于治疗II型糖尿

收稿日期: 2015-02-15

作者简介: 杨君 (1972—), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为天然植物提取、感官组学。E-mail: yangjun@zjtobacco.com

*通信作者: 蒋健 (1978—), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为香精香料化学分析。E-mail: jiangj@zjtobacco.com

病。Somrudee等^[9]报道佛手精油具有抗焦虑效果。实验证明,佛手挥发油对支气管哮喘动物具有止咳、平喘、祛痰等治疗作用^[10]。此外,佛手精油还可改善情绪、应激障碍等轻度症状^[11]。目前,对佛手精油挥发性成分的研究已取得了众多进展,但对其关键香气成分的研究还尚属空白。

气相色谱-嗅闻(gas chromatography-olfactometry, GC-O)法是目前香气成分分析的重要手段之一。GC-O是一种直观的感官检测方法,即通过人的鼻子直接嗅闻复杂的混合气味从而筛选出具有气味的化合物,并对气味特征进行评价。GC-O可以发现食品中大量挥发性成分中真正具有气味活性的成分和各气味成分在不同浓度条件下对整体气味的贡献,在鉴别特征香味化合物、香味活性化合物等方面具有明显的优势,广泛应用于食品、环境监测等领域^[12-16]。常用的GC-O检测方法有稀释法、强度法、检测频率法等^[17]。稀释法是将被分析物稀释一定倍数,嗅辨师鉴定在哪个稀释度条件下仍然能闻到,并描述该气味。风味稀释因子(flavor dilution factor, FD)是气味化合物能被感知的最大稀释度,FD值高的物质即被认为是重要的致香物质。强度法是根据实际嗅闻到的气味强度评价各化合物对整体香气贡献程度,化合物气味强度越大,其对香气整体贡献就越大。

本实验采用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)技术鉴定佛手精油中挥发性物质,利用GC-O稀释法和强度法评价各香气成分对整体香味的贡献,对佛手精油在食品药品、香精香料领域中的应用具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金华佛手柑(2014年) 浙江金手宝生物科技有限公司;无水乙醇为色谱纯,乙醚、无水硫酸钠均为分析纯。

1.2 仪器与设备

TRACE1300GC仪配有ISQ LT MS仪 美国Thermo Fisher Scientific公司;Sniffer 9000嗅味检测仪 瑞士Brechtbühler公司。

1.3 方法

1.3.1 佛手精油的分离提取

取金华佛手柑果实切成1 cm×1 cm×1 mm片状。按料液比1:10(g/mL)加入蒸馏水,加热至微沸,自沸腾起计时保持3 h,收集精油,加入一定量的Na₂SO₄至精油中,静置过夜,过滤,用乙醚洗涤Na₂SO₄,并将洗涤液与滤液合并,用0.45 μm有机膜过滤精油,挥发除尽乙醚,得佛手脱水精油。

1.3.2 GC-MS分析条件

GC条件:DB-5 MS色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);分流比10:1;进样量1.0 μL;进样温度250 ℃;载气为高纯氮气,纯度大于99.999%;流量1.0 mL/min;程序升温:50 ℃保持1 min,5 ℃/min升到130 ℃,保持0.5 min,15 ℃/min升到250 ℃,保持10 min。

MS条件:电子电离源;电子能量70 eV;离子源温度280 ℃;质量扫描范围50~500 u;用Mainlab谱库检索加以确认。各物质相对含量采用峰面积归一化法确定。

1.3.3 GC-O分析条件

GC-O系统由GC(配氢火焰离子检测器(flame ionization detector, FID)) and Sniffer嗅辨仪组成。

GC条件:DB-5 MS色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);分流比10:1;进样量1.0 μL;进样温度250 ℃;FID检测器温度为280 ℃;载气为高纯氮气,纯度大于99.999%,流量1.0 mL/min。程序升温条件同GC-MS。气相毛细管柱末端以分流比为1:1分别连接FID检测器和Sniffer嗅辨仪。GC柱箱与嗅辨仪传输线温度220 ℃,在嗅觉端口处对气体进行加湿,防止因气体干燥引起嗅辨师不适。

嗅辨师经专业培训,熟悉各种香味并掌握一定量术语描述香味与香气特征。为避免嗅觉疲劳,每次嗅闻时间不超过40 min,且2次嗅闻之间至少间隔30 min。实验采用稀释法和强度法,即嗅辨师在实验过程中需描述闻到的气味和强度。样品逐级稀释(分别稀释50、100、200、400倍等),直到嗅辨师闻不到气味为止。每种香味化合物最高稀释倍数即为FD值,气味强度级别表示见表1。

表1 5级气味强度表示法^[18]
Table 1 Descriptions of odor intensities^[18]

强度级别	嗅觉感觉
0	无任何气味
1	稍微感觉到极弱的气味
2	能感觉和分辨出何种气味
3	能明显感觉到气味
4	能感觉到强烈的气味

2 结果与分析

样品经GC-MS分析,结果如表2所示,总离子流图如图1所示。共发现33种物质,其中烯烃类物质16种,相对峰面积占83.53%;醇类物质6种,相对峰面积占7.40%;酸类物质3种,相对峰面积占7.48%;酯类物质3种,相对峰面积占0.85%;酚类物质2种,相对峰面积占0.23%;醛类物质2种,相对峰面积占0.18%和烷烃物质1种,相对峰面积占0.31%。相对含量超过1%的

物质有D-柠檬烯（34.69%）、 γ -松油烯（20.42%）、 β -甜没药烯（4.59%）、月桂酸（2.98%）、 α -松油醇（2.63%）、石竹烯（2.53%）、肉豆蔻酸（1.98%）、4-萜品醇（1.91%）、2-萆烯（1.73%）、棕榈酸（1.53%）、 β -蒎烯（1.48%）、 β -罗勒烯（1.26%）、大牻牛儿烯（1.23%）、D- α -蒎烯（1.20%）。结果与其他学者研究基本相符。陈丽君等^[19]从橙油中检测到35种挥发性物质，其中相对含量较高的化合物为柠檬烯（80.79%）、芳樟醇（3.85%）、癸醛（2.90%）、 β -月桂烯（1.94%）、 β -蒎烯（0.82%）等。金宏等^[20]报道佛手挥发油中95%以上物质是柠檬烯、1-甲基-（1-甲基）-苯、 β -蒎烯和 α -蒎烯。赵磊等^[21]定性定量分析了12种金华佛手的挥发油，鉴定出27种化学成分，主要成分均是柠檬烯和 γ -松油烯。柠檬烯通常是柑橘类精油中含量最高的物质，相对含量可达60%~90%，相对含量与种植环境、成熟程度有关^[22-25]。柠檬烯可作为用于掩盖某些生物碱苦味的风味改良剂或作为合成香芹酮的前体物质。通过GC-O分析，共发现26种物质，其中有3种风味物质（保留时间在3.35、3.90、27.70 min）并未在MS分析中检测出，可能是相对含量低于MS的检测限而没有被检测到。

表2 佛手精油GC-MS和GC-O分析结果

Table 2 Analytical results of finger citron essential oil by GC-MS-O						
编号	保留时间/min	相对含量/%	FD值	强度值	化合物	描述
1	3.35		50	1		果香，木质感
2	3.90		50	2		清甜香
3*	7.17	1.20	400	4	D- α -蒎烯	清甜果香，有焦味，清甜味，刺感
4	8.29	1.48	400	2	β -蒎烯	清香，果甜，松针味
5	8.61	0.96	0	0	β -月桂烯	
6	9.36	0.59	100	2	α -松油烯	柑橘香
7	9.90	34.69	100	3	D-柠檬烯	花香，凉味感，柠檬特征香
8	10.21	1.26	400	1	β -罗勒烯	壤香，果甜，清香
9	10.70	20.42	200	2	γ -松油烯	柑橘香，清甜
10	11.36	1.73	200	2	2-萆烯	柠檬清甜，松针
11	11.71	0.42	100	3	β -芳樟醇	酱香，清甜
12	12.41	0.41	200	3	别罗勒烯	花甜香，果香，霉味
13	13.19	0.27	200	1	1-(1,4dimethyl-3-cyclohexen-1-yl)-ethane	清甜味
14	14.00	1.91	200	3	4-萜品醇	清甜香/柠檬香，果肉感
15	14.42	2.63	200	2	α -松油醇	焦甜香，松针感
16	15.26	0.33	50	2	香叶醇	果香
17	15.68	0.09	100	2	β -柠檬醛	果甜，果肉感
18	16.47	0.07	0	0	α -柠檬醛	
19	17.20	0.12	200	1	百里香酚	清甜花香，柑橘甜味
20	17.32	0.08	0	0	香芹酚	
21	18.74	0.22	400	2	橙花乙酸酯	果甜
22	19.11	0.29	100	2	乙酸牻牛儿酯	果甜，清甜
23*	19.68	0.16	400	3	α -佛手柑烯	清甜，柑橘
24	19.84	2.53	0	0	石竹烯	
25	20.35	0.49	0	0	蛇麻烯	
26	20.64	0.28	0	0	衣兰油烯	
27	20.73	1.23	200	1	大牻牛儿烯	果甜，果肉感

续表2

编号	保留时间/min	相对含量/%	FD值	强度值	化合物	描述
28	21.04	4.59	200	2	β -甜没药烯	果甜，焦甜，清香
29	21.24	0.42	0	0	萆烯基烯	
30	21.98	2.98	200	1	月桂酸	清甜
31	22.78	0.23	50	2	β -甜没药醇	柠檬感
32	22.93	0.90	0	0	α -甜没药醇	
33	23.59	1.98	0	0	肉豆蔻酸	
34	24.98	1.53	0	0	棕榈酸	
35	25.78	0.23	100	1	亚油酸甲酯	清甜
36	27.70		200	1		松针

注：*：特征香味。

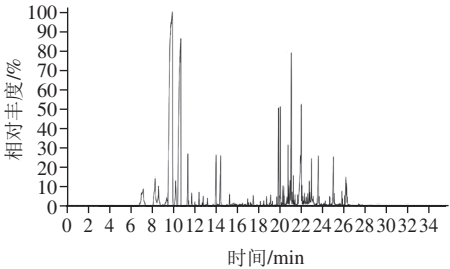
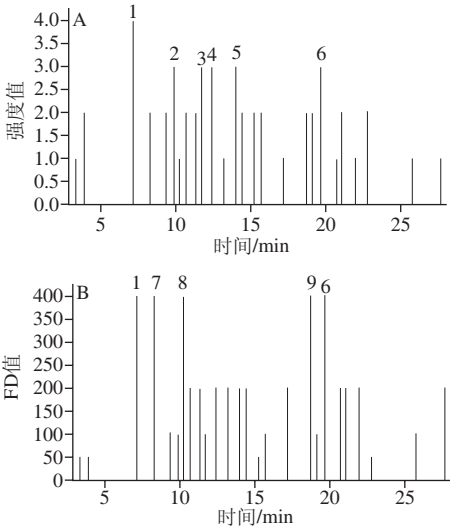


图1 佛手精油GC-MS总离子流图

Fig.1 GC-MS TIC chromatogram for finger citron essential oil



1. D- α -蒎烯；2. D-柠檬烯；3. β -芳樟醇；4.别罗勒烯；5. 4-萜品醇；6. α -佛手柑烯；7. β -蒎烯；8. β -罗勒烯；9. 橙花乙酸酯。

图2 佛手精油的强度法(A)和稀释法(B)图谱

Fig.2 GC-MS-O analysis of finger citron essential oil

由图2A可知，香气强度值最大的物质为D- α -蒎烯（强度值为4），其他较大的物质有D-柠檬烯（强度值为3）、 β -芳樟醇（强度值为3）、别罗勒烯（强度值为3）、4-萜品醇（强度值为3）、 α -佛手柑烯（强度值为3），说明它们是佛手精油香味的重要成分。由图2B可知，在稀释法中，D- α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -罗勒烯、橙花乙酸酯、 α -佛手柑烯FD值都达到400，说明它们在浓度极低的情况下仍可提供强烈的香气，被认为对佛手精油香

味的影响非常大。物质气味强度和浓度之间存在一定关系, Kamadia等^[26]采用稀释法证实了物质气味强度和浓度之间满足Steven's Law定律。因此, 稀释法可以弥补强度法的缺陷, 二者优势互补, 更有利于把握佛手精油中的关键致香物质。佛手精油整体嗅香主要表现为清香、甜香、果香为主体的香韵, 经过嗅辩师反复闻香鉴定, 强度和稀释度均为最大的 D - α -蒎烯表现出强烈的清甜果香, 与精油的头香果香味很相似, 确定为佛手精油的主体香韵, α -佛手柑烯表现为清甜香、柑橘香, 也与佛手的香韵非常相似。而其他物质的香气强度或浓度未达到主体香的要求, 故确定 D - α -蒎烯和 α -佛手柑烯是佛手精油的特征香味, 即佛手精油的关键致香物质。以上分析也说明, 各化合物是否是关键致香物质, 不能仅靠单一的方法来进行判断, 稀释法和强度法结合可以更有效的鉴别精油的关键致香物质。

对比GC-MS和GC-O分析, D -柠檬烯和 γ -松油烯相对含量虽然较高, 但FD值较小, 说明其对佛手精油的整体香气影响较小, 从结果可以看出, 对佛手精油香味贡献大的物质相对含量并不一定大, 仅从相对含量来比较不同成分对香味的贡献是不准确的, 需要结合阈值才能得出更真实的结果。

3 结 论

利用GC-MS和GC-O鉴定出佛手精油中挥发性成分和香气物质36种。佛手精油主要成分是 D -柠檬烯(34.69%)、 γ -松油烯(20.42%)、 β -甜没药烯(4.59%)等。佛手精油中烯烃相对含量占到大部分, 达83.53%, 酸类、醇类、酯类、酚类、醛类和烷烃分别占到总相对含量的7.48%、7.40%、0.85%、0.23%、0.18%和0.31%。嗅闻实验中采用强度法和稀释法结合的方法, 发现 D - α -蒎烯、 D -柠檬烯、 β -芳樟醇、4-松油醇、 α -佛手柑烯具有较大的强度, D - α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -罗勒烯、橙花乙酸酯、 α -佛手柑烯具有较大FD值。综合分析后确定 D - α -蒎烯和 α -佛手柑烯是佛手精油的特征香味。

近年来, 食品风味方面的研究越来越受到人们的重视, GC-O作为分析风味物质的有力工具, 应用越来越多, 尤其是食品和饮料领域。本实验利用GC-MS-O联用方法, 快速准确地筛选出香气中关键致香物质, 为佛手精油在食品药品、添香领域的应用提供理论参考, 并为香精香料进一步研究开发提供新的思路。

参考文献:

[1] 张兴旺. 佛手的用途和栽培管理[J]. 中国南方果树, 2003, 32(2): 7-8.
[2] 何云芳, 金晓玲. 佛手的研究现状及发展前景[J]. 经济林研究, 2001, 19(4): 41-43.
[3] 王建英, 施长春, 朱婉萍. 金佛手挥发油化学成分的GC-MS研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(1): 32-34.

[4] PENG C H, KER Y B, WENG C F, et al. Insulin secretagogue bioactivity of finger citron fruit (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Hort, Rutaceae)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(19): 8812-8819.
[5] FARHAT A, FABIANO A. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: kinetic data, extract's global yield and mechanism[J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 255-261.
[6] ESPINA L, SOMOLINOS M, LORAN S, et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes[J]. Food Control, 2011, 22(6): 896-902.
[7] 张萍, 王平, 石超峰, 等. 油樟油主成分对几种常见病原菌的抑菌活性研究[J]. 四川农业大学学报, 2013, 31(4): 393-397.
[8] 郭卫东, 郑建树, 邓刚, 等. 佛手挥发油抑菌活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(8): 103-107.
[9] SOMRUDEE S, CHARLES A M. Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behaviour and corticosterone level in rats[J]. Phytother Research, 2011, 25(6): 858-862.
[10] 杨慧, 周爱梅, 林敏浩, 等. 佛手挥发油提取及其药理研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(5): 1347-1352.
[11] BAGETTA G, MORRONE L A, ROMBOLA L, et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot[J]. Fitoterapia, 2010, 81(6): 453-461.
[12] BUENO M, RESCONI V C, CAMPO M, et al. Gas chromatographic-olfactometric characterisation of headspace and mouthspace key aroma compounds in fresh and frozen lamb meat[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1909-1918.
[13] ZHANG S, CAI L, KOZIEL J A, et al. Field air sampling and simultaneous chemical and sensory analysis of livestock odorants with sorbent tubes and GC-MS/olfactometry[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010, 146(2): 427-432.
[14] 张玉玉, 孙宝国, 祝钧. 牛至精油挥发性成分的GC-MS与GC-O分析[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 275-277.
[15] 乔宇, 范刚, 程薇, 等. 固相微萃取结合GC-O分析两种葡萄柚汁香气成分[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 194-198.
[16] 杨峥, 公敬欣, 张玲, 等. 汉源红花椒和金阳青花椒香气活性成分研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(5): 226-230.
[17] RUTH S M V. Methods for gas chromatography-olfactometry: a review[J]. Biomolecular Engineering, 2001, 17(4): 121-128.
[18] 陈丽君. 采用GC-MS/O分析精油和烟草中致香物质[D]. 上海: 复旦大学, 2011.
[19] 陈丽君, 高建宏, 王申, 等. 气相色谱-质谱与嗅觉测量法联用分析橙油中致香物质[J]. 精细化工, 2012, 29(2): 142-208.
[20] 金宏, 公衍玲, 赵文英. 佛手挥发油GC-MS指纹图谱研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(4): 76-78.
[21] 赵磊, 籍保平, 周峰, 等. 十二种金华佛手挥发油成分的比较研究[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 179-184.
[22] KIM K N, KO Y J, YANG H M, et al. Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF-kappaB signaling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 57: 126-131.
[23] 牛丽影, 郁萌, 刘夫国, 等. 香橼精油的组成及香气活性成分的GC-MS-O分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(4): 186-191.
[24] GONZALEZ-MOLINA E, DOMINGUEZ-PERLES R, MORENO D A, et al. Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 51(2): 327-345.
[25] MICHEL T, COKOJA M, SIEBER V, et al. Selective epoxidation of (+)-limonene employing methyltrioxorhenium as catalyst[J]. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2012, 358: 159-165.
[26] KAMADIA V V, YOON Y, SCHILLING M W, et al. Relationships between odorant concentration and aroma intensity[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3): 193-197.