

GC-MS 分析甜菊叶的挥发性成分

詹家芬^{1,2}, 陆舍铭^{1*}, 向能军¹, 倪朝敏¹,
孟昭宇¹, 曹秋娥², 缪明明¹

(1. 红塔烟草集团有限责任公司技术中心, 云南 玉溪 653100; 2. 云南大学化学科学与工程学院, 昆明 650091)

摘要: 甜菊(*Stevia rebaudianum* Bertohi)叶经固相微萃取(SPME)和同时蒸馏萃取(SDE),用气相色谱/质谱法(GC-MS)检测其挥发性成分。从甜菊叶中共检出 101 种化学物质,其中从 SPME 萃取物中检出 67 种,SDE 萃取物中检出 80 种,二者共有组分 46 种。主要成分为反式- α -香柠檬烯、 β -蒎烯、石竹烯氧化物、匙叶桉油烯醇、橙花叔醇等,其主要成分与菊科(Compositae)其他植物的明显不同。

关键词: 固相微萃取; 同时蒸馏萃取; 气相色谱/质谱法; 甜菊; 叶; 挥发性成分

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)04-0377-05

GC-MS Analysis of Volatile Components in Leaves of *Stevia rebaudianum*

ZHAN Jia-fen^{1,2}, LU She-ming^{1*}, XIANG Neng-jun¹,
NI Chao-min¹, MENG Zhao-yu¹, CAO Qiu-e², MIAO Ming-ming¹

(1. Research and Development Center of Hongta Tobacco Group Co., Ltd., Yuxi 653100, China;

2. College of Chemistry Science and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The volatile components extracted from leaves of *Stevia rebaudianum* Bertohi were studied using Solid phase micro-extraction (SPME) and Simultaneous distillation extraction (SDE), and chemical constituents were analyzed by gas chromatograph/mass spectrometer (GC-MS). One hundred and one compounds were identified, in which there were sixty-seven compounds from SPME, eighty from SDE, among them forty-six from both SDE and SPME. The main compositions were *trans*- β -farnesene, β -pinene, caryophyllene oxide, spathulenol, nerolidol, which were much different from other Compositae plant.

Key words: SPME; SDE; GC-MS; *Stevia rebaudianum* Bertohi; Leaf; Volatile components

甜菊 (*Stevia rebaudianum* Bertohi) 是菊科 (Compositae) 斯台比亚属 (*Stevia*) 的多年生草本植物。甜菊原产地在南美巴拉圭东北部与巴西相接的阿曼拜山脉中, 后来被引入中国。近年来, 它在中国的产量和质量都有一定的提高。甜菊叶口感清新、回味绵长, 且高甜度、低热量, 是糖尿病、肥胖症、高血压、胃酸过多和长期饮酒者的首选饮品。甜菊还具有帮助消化、促进胰腺和脾胃等功能, 以

及滋肝养神、减肥养颜等保健功效^[1]。随着科学研究的深入和生产的发展, 甜菊已引起世界各国的重视。各种关于甜菊的应用和功效的报道不断出现, 但其挥发性成分的报道在国内还未见到^[2-4]。因此, 本实验采用固相微萃取和同时蒸馏萃取法提取甜菊叶的挥发性成分, 利用气相色谱-质谱联用仪进行定性, 峰面积归一化和内标法进行定量分析, 为甜菊资源的合理开发和利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

美国 PE 公司的 GC-MS (Clarus 500 气相色谱仪, Clarus 500 四极杆质谱仪); 美国 Supelco 公司的手动 SPME 装置, 配有 100 μm /PDMS 纤维萃取头; 同时蒸馏萃取装置 (自制); 旋转蒸发器 (瑞士 BUCHI 公司); 电子天平 (METTLER PG503-S)。

二氯甲烷 (分析纯, 由天津试剂三厂提供); 乙酸苯乙酯 (ABCRC GmbH & Co. KG); 95% 乙醇 (分析纯, 汕头市达豪区精细化学品有限公司); 二次蒸馏水; 甜菊 (*Stevia rebaudianum* Bertoni) 叶 (产地: 广西)。

1.2 材料处理

固相微萃取 将 10 g 甜菊叶放入 100 ml 平底小烧瓶中, 用封口膜密封瓶口, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下将 PDMS 纤维萃取头插入小烧瓶中顶空萃取 20 min, 拔出萃取头, 立即插入进样口, 脱附 2 min, 进行 GC-MS 分析。

同时蒸馏萃取 称取 20 g 甜菊叶于 1 000 ml 烧瓶中, 加入 300 ml 二次蒸馏水和少许沸石, 将该烧瓶接在 SDE 装置的一端, 用可控温电热套加热。SDE 装置的另一端为盛有 20 ml 二氯甲烷的 50 ml 圆底烧瓶, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热。同时蒸馏萃取 2 h 后, 取出萃取液, 加入适量无水硫酸钠, 静置于冰箱中干燥过夜, 再将萃取液用旋转蒸发器减压浓缩至 1 ml, 加入 100 μl 内标溶液, 进行 GC-MS 分析。

内标溶液的配制 用移液枪抽取 100 μl 乙酸苯乙酯, 注入 100 ml 容量瓶中, 加入 95% 乙醇溶液稀释至刻度线, 摇匀, 置于冰箱中待用。

1.3 色谱质谱条件

色谱柱: PE-5MS 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 进样口温度: 280 $^{\circ}\text{C}$; 程序升温: 50 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) — 5 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) — 300 $^{\circ}\text{C}$ (10 min); 载气: He; 流速: 1.3 ml min^{-1} ; 进样量: 1 μl (SDE); 分流比: 30:1。

离子源: EI; 电离能量: 70 eV; 离子源温度: 190 $^{\circ}\text{C}$; 传输线温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 溶剂延迟时间: 2 min; 扫描范围: 35 ~ 350 amu; 谱图检索: WILEY 谱库和 NIST 谱库。

2 结果

表 1 显示用两种萃取方法从甜菊叶中分离和鉴定出的 101 种化学成分, 包含醇类 21 个, 酚类 1 个, 醛酮类 13 个, 酸类 2 个, 酯类 7 个, 烯及萜类 39 个, 烃类 5 个, 含氮氧化物 13 个。可见, 甜菊叶的挥发性成分主要含有萜类、醇类、醛酮类和氮氧化物。其中, SPME 检测出 67 个组分, 占其总出峰面积的 88.5920%; SDE 检测出 80 个组分, 二者共同检出 46 个组分, 主要是 1-辛烯、己醛、 α -侧柏烯、 α -蒎烯、桉烯、DL-柠檬烯、反式芳樟醇氧化物、芳樟醇等物质。

表 1 甜菊叶挥发性成分的 GC-MS 分析

Table 1 Volatile components from leaves of *Stevia rebaudianum* by GC-MS

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	匹配度 Similarity	含量 Content	
				SPME (%)	SDE (mg g^{-1})
1	3.02	1-辛烯 1-Octene	974	0.7460	0.0005
2	3.20	己醛 Hexanal	918	0.0760	0.0009
3	3.79	右旋去甲基伪麻黄碱 D-Norpseudoephedrine	908	0.1010	/
4	3.87	5,5-二甲基-2-乙基-1,3-环戊二烯 5,5-Dimethyl-2-ethyl-1,3-cyclopentadiene	929	/	0.0001
5	4.11	2-己烯醛 2-Hexenal	962	/	0.0013
6	4.74	1-壬烯 1-Nonene	942	0.3520	0.0002
7	5.54	α -侧柏烯 α -Thujene	947	0.0990	0.0001
8	5.71	α -蒎烯 α -Pinene	990	2.0010	0.0009
9	6.11	桉烯 Camphene	980	0.3710	/
10	6.39	2-庚烯醛 2-Heptenal	962	/	0.0002
11	6.69	桉烯 Sabinene	981	0.6440	0.0005
12	6.81	β -蒎烯 β -Pinene	984	16.4170	0.0067

续表(Continued)

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	匹配度 Similarity	含量 Content	
				SPME (%)	SDE (mg g ⁻¹)
13	6.88	1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	952	0.8810	0.0015
14	7.15	2-戊基呋喃 2-Amylfuran	876	/	0.0005
15	7.33	3-辛醇 3-Octanol	969	0.2470	0.0001
16	7.40	2-(2-戊烯基)呋喃 2-(2-Pentenyl)furan	818	/	0.0002
17	7.82	α -松油烯 α -Terpinene	982	0.0450	/
18	7.86	2,4-庚二烯醛 2,4-Heptadienal	897	/	0.0003
19	8.05	对伞花烃 P-Cymene	947	0.0960	0.0002
20	8.16	DL-柠檬烯 DL-Limonene	985	0.6130	0.0004
21	8.26	桉油精 Eucalyptol	967	0.3790	0.0003
22	8.38	2,2,6-三甲基环己酮 2,2,6-Trimethylcyclohexanone	950	0.0760	0.0001
23	8.69	苯乙醛 Phenylacetaldehyde	985	/	0.0010
24	8.97	γ -松油烯 γ -Terpinene	979	0.1210	/
25	9.35	反式芳樟醇氧化物 <i>trans</i> -Linalool oxide	998	0.2610	0.0006
26	9.62	1-壬烯-3-醇 1-Nonen-3-ol	948	/	0.0001
27	9.63	奥沙那胺 Oxanamide	945	0.0250	/
28	9.83	顺式芳樟醇氧化物 <i>cis</i> -Linalool oxide	942	0.1800	0.0006
29	10.15	芳樟醇 Linalool	978	1.4930	0.0027
30	10.23	2-甲基丁酸-2-甲基丁酯 2-methylbutyl 2-methylbutanoate	979	2.0990	0.0005
31	10.52	1,1-二甲基-2-乙烯基-3-亚甲基环己烷 1,1-Dimethyl-2-vinyl-3-methylidenecyclohexane	885	0.3800	0.0013
32	11.33	反式松香芹醇 <i>trans</i> -Pinocarveol	969	0.1100	0.0005
33	11.51	2-甲酸基咪唑 2-Formylimidazole	861	/	0.0001
34	11.54	樟脑 Camphor	970	0.1080	/
35	11.98	松香芹酮 Pinocarvone	945	0.2350	0.0002
36	12.28	环氧芳樟醇 Epoxy linalol	922	/	0.0001
37	12.34	薄荷醇 Menthol	874	0.0400	/
38	12.83	α -松油醇 α -Terpineol	977	0.1870	0.0010
39	12.91	桃金娘烯醛 Myrtenal	937	0.2250	0.0005
40	13.16	葵醛 Decanal	876	0.0840	/
41	13.57	β -环柠檬醛 β -Cyclocitral	942	/	0.0002
42	13.78	冰片烯 Bornylene	885	/	0.0002
43	13.81	2-甲基丁酸-3-己烯酯 3-Hexenyl-2-methylbutyrate	979	0.4070	/
44	13.95	2-甲基丁酸己酯 2-Hexyl-2-methylbutyrate	988	3.8970	0.0010
45	14.42	2,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇 2,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol	910	/	0.0001
46	15.63	吲哚 Indole	953	0.0490	0.0007
47	16.23	1-戊酰基咪唑 1-Valerylimidazole	880	0.1220	/
48	16.56	双环榄香烯 Bicycloelemene	890	/	0.0001
49	16.59	2,2-二甲基丙酸庚酯 2,2-Dimethylpropanoic acid, heptyl ester	939	1.4300	0.0003
50	16.93	α -蒾澄茄油烯 α -Cubebene	959	0.1480	/
51	16.99	三醋酸甘油酯 Triacetin	983	4.3650	/
52	17.17	丁香香酚 Eugenol	938	/	0.0005
53	17.67	α -胡椒烯 α -Copaene	986	0.9260	0.0001
54	17.89	β -波旁老鹳草烯 β -Bourbonene	988	2.6180	0.0006
55	18.05	β -榄香烯 β -Elemene	995	3.5260	0.0010
56	18.26	十四烷 Tetradecane	979	0.0950	/
57	18.37	姜烯 Zingiberene	960	0.0880	/
58	18.49	α -古芸烯 α -Gurjuene	959	0.5080	0.0003

续表(Continued)

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	匹配度 Similarity	含量 Content	
				SPME (%)	SDE (mg g ⁻¹)
59	18.65	α -香柠檬烯 α -Bergamotene	983	0.1320	/
60	18.80	反式石竹烯 <i>trans</i> -Caryophyllene	978	1.4190	0.0010
61	19.15	反式- α -香柠檬烯 <i>trans</i> - α -Bergamotene	986	19.5930	0.0029
62	19.65	反式- β -法尼烯 <i>trans</i> - β -Farnesene	987	1.8870	0.0041
63	19.70	α -葎草烯 α -Humulene	993	0.3620	0.0019
64	19.83	别香橙烯 Alloaromadendrene	981	1.2340	0.0004
65	20.17	α -桉叶烯 α -Selinene	940	0.1830	/
66	20.20	γ -杜松烯 γ -Cadinene	943	0.3060	/
67	20.37	α -姜黄烯 α -Curcumene	980	1.9660	/
68	20.42	β -法尼烯 β -Farnesene	964	1.3140	/
69	20.54	β -桉叶烯 β -Selinene	973	2.3920	0.0009
70	20.71	(-)- α -桉叶烯 (-)- α -Selinene	965	0.5740	/
71	20.72	双环大香叶烯 Bicyclogermacrene	979	/	0.0030
72	20.79	α -伊兰烯 α -Muurolene	947	0.3470	0.0001
73	21.00	β -没药烯 β -Bisabolene	963	1.7360	0.0008
74	21.15	γ -衣兰油烯 γ -Muurolene	916	1.2120	0.0006
75	21.29	δ -杜松烯 δ -Cadinene	949	0.3510	0.0005
76	21.38	β -倍半水芹烯 β -Sesquiphellandrene	881	0.1620	/
77	21.63	二氢猕猴桃内酯 Dihydroactinidiolide	963	0.1290	0.0039
78	22.09	(-)-石竹烯氧化物 (-)-Caryophyllene oxide	959	/	0.0004
79	22.29	橙花叔醇 Nerolidol	995	0.5150	0.0077
80	22.69	匙叶桉油烯醇 Spathulenol	965	0.6560	0.0163
81	22.83	石竹烯氧化物 Caryophyllene oxide	992	4.4500	0.0224
82	23.08	表蓝桉醇 Epiglobulol	975	/	0.0015
83	23.33	蓝桉醇 Globulol	977	/	0.0013
84	23.46	环氧葎草烯 Humulene oxide	891	0.5020	0.0062
85	24.00	(+)-匙叶桉油烯醇 (+)-Spathulenol	901	/	0.0013
86	24.18	杜松醇 Cadinol	951	0.0970	0.0021
87	24.49	α -杜松醇 α -Cadinol	921	/	0.0046
88	26.01	β -木香醇 β -Costol	886	/	0.0031
89	28.43	6,10,14-三甲基-2-十五酮 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone	969	/	0.0011
90	28.54	硬脂醛 Stearaldehyde	914	/	0.0001
91	28.88	邻苯二甲酸二-2-甲基丙酯 2-Methylpropyl phthalate	931	/	0.0004
92	29.86	法尼基丙酮 Farnesyl acetone	984	/	0.0002
93	30.89	棕榈酸 Palmitinic acid	974	/	0.0066
94	31.22	油酸 Oleic acid	977	/	0.0001
95	31.46	泪杉醚 Manoyl oxide	900	0.2020	0.0071
96	32.40	贝壳杉烯 Kaurene	925	/	0.0007
97	33.13	硬脂醇 Stearol	986	/	0.0073
98	33.59	植醇 Phytol	990	/	0.0070
99	40.12	十六烷 Hexadecane	964	/	0.0003
100	43.14	十八烷 Octadecane	975	/	0.0019
101	45.98	二十五烷 Pentacosane	975	/	0.0006

SPME 是采用峰面积归一化法进行定量分析, 而 SDE 则是加入乙酸苯乙酯为内标溶液, 利用内标法进行定量分析, 计算出每个组分在 1 g 甜菊叶

中的含量。如表 1 所示, SPME 检测到的甜菊叶主要成分是: 反式- α -香柠檬烯(19.5930%)、 β -蒎烯(16.4170%)、石竹烯氧化物(4.4500%)、三醋酸甘油

酯(4.3650%)、2-甲基丁酸己酯(3.8970%)、 β -榄香烯(3.5260%)等;SDE检测到的甜菊叶主要成分是:石竹烯氧化物(0.0224 mg)、匙叶桉油烯醇(0.0163 mg)、橙花叔醇(0.0077 mg)、硬脂醇(0.0073 mg)、泪杉醚(0.0071 mg)、植醇(0.0070 mg)等。

3 讨论

从我们的实验结果来看,用SPME鉴定到的21种物质,如右旋去甲基伪麻黄碱、茨烯、 α -松油烯、薄荷醇等,用SDE法没有检出,而用SDE检测到的2-戊基呋喃、环氧芳樟醇、 β -环柠檬醛、丁子香酚等34种成分,用SPME法也没有检出。这55种成分大多是致香或者潜香物质,如 α -松油烯具有柑橘香味,可以用于制造精油和香料;带有薄荷香气的薄荷醇是一种重要香料,多用在香烟、化妆品、牙膏、口香糖、药物涂擦剂等行业中; β -环柠檬醛带有柠檬香气,能用于制造柑橘香味食品香料;具有浓郁石竹麝香气味的丁子香酚,是一种重要的调味剂。此外,从表1还可看到,SPME萃取到的成分大多是低沸点组分,出现在保留时间为23 min之前,而用SDE法在保留时间为23~46 min之间还检测到了硬脂醛、棕榈酸、植醇等较高沸点物质。引起这些差别的原因可以从两种萃取方法的作用机理得到合理的解释:SPME是在一定的温度下,样品达到动态平衡后,萃取头的固定相对样品蒸汽进行顶空吸附、采样。这个过程不需要溶剂,因此只受到温度和固定相的影响。在本实验中,萃取温度为60℃,所以获得的物质大多是低沸点成分;而SDE是利用样品在水相和有机相之间的溶解度差异,不断地回流,最终把挥发性成分富集在有机相里。因此,一些在水相里溶解度较小、沸点较高的组分容易溶解在有机相中,转移到二氯甲烷里。两种方法各具特点,SPME不需溶剂、操作简单、快速有效,非常适合应用于味道浓重的样品定性分析,但存在定量不方便的缺点;SDE将样品的蒸馏和萃取两个步骤合二为一,具有富集净化的优点,是天然产物较为广泛应用的一种处理方法,但提取时间较长,容易导致组分发生变化,影响样品真实面貌的反映。二者各具优势,同时应用,可以得到更多、更准确的信息。

有关菊科其他植物挥发性成分的报道已有不少,但与本研究结果有着显著的区别。周海梅等^[5]用

SPME提取贡黄菊(*Chrysanthemum morifolium* ‘Gonghuangju’)和贡白菊(*C. morifolium* ‘gongbaiju’),获得的都是萜类和醇类化合物,主要成分是氧化红没药醇、樟脑、桉油精、 β -法尼烯等;姜宁华等^[6]用乙醇提取水蒸汽蒸馏乙醚萃取的方法提取杭白菊(‘Hangbaiju’),主要成分是萜烯茄油烯、N,N-双-2,6-二甲基-6-亚硝基、1,1-二环戊基、4-乙基-2-甲基吡咯等;邵华等^[7]采用水蒸汽蒸馏、乙醚萃取微甘菊(*Mikannia micrantha*),几乎都是萜类和醛酮类化合物,主要成分是 β -萜烯茄油烯、别香树烯、倍半萜、5-(1,1-二甲基)-2,3-萘酮等。而我们用SPME和SDE提取甜菊叶,以萜类、醇类和氮氧化物为主,主要成分是反式- α -香柠檬烯、 β -蒎烯、石竹烯氧化物、匙叶桉油烯醇、橙花叔醇等。这一方面可能是处理方法不同造成的,贡黄菊和贡白菊用SPME,杭白菊用乙醇提取-水蒸汽蒸馏-乙醚萃取,微甘菊采用水蒸汽蒸馏、乙醚萃取,而甜菊叶同时使用SPME和SDE;另一方面是植物种不同,不同属的植物含有的成分及含量也不相同,因而形成了自己独特的风味、风格和功效。

参考文献

- [1] 胡献丽,董文宾,郑丹,等.甜菊及甜菊糖研究进展[J].食品研究与开发,2005,26(1):36-38.
- [2] Li Y F(李永芳), Xu D Y(许德义). Effects of isosteviol against myocardium injury induced by ischemia-reperfusion in anesthetized rats [J]. Chin J Pharm Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2005, 19(5): 343-346.(in Chinese)
- [3] Xia J M(夏敬民), Xu D Y(许德义), Li F(李芳), et al. Effect of stevioside on hemodynamics in anesthetized rats [J]. Herald Med(医药导报), 2000, 19(2): 103-105.(in Chinese)
- [4] Shen M S, Jiang X Z, Xu J S, et al. Biological effects of *Stevia rebaudianum* induced by carbon ion implantation [J]. Acta Bot Sin, 2000, 42(9): 892-897.
- [5] Zhou H M(周海梅), Xie P S(谢培山), Wang W H(王万慧), et al. Analysis of volatile components from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* by GC-MS with solid-phase microextraction [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(13): 986-989.(in Chinese)
- [6] 姜宁华,朱山寅,吴素香.杭白菊挥发油成分分析[J].浙江中医学院学报,2003,27(5):83-84.
- [7] Shao H(邵华), Nan P(南蓬), Peng S L(彭少麟), et al. Study of chemical constituents of essential oil from flowers of *Mikannia micrantha* H. B. K. [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2001, 24(5): 341-342.(in Chinese)