

孙海楠, 吕运舟, 汪有良. 基于不同提取方法的月季香气成分比较分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(5): 1342-1344.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.05.034

基于不同提取方法的月季香气成分比较分析

孙海楠, 吕运舟, 汪有良
(江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153)

关键词: 月季; 香气; 蒸馏法; 溶剂法; 固相微萃取法

中图分类号: S685.12 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2020)05-1342-03

Comparison of *Rosa hybrida* petals volatiles based on different extraction methods

SUN Hai-nan, LYU Yun-zhou, WANG You-liang
(Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China)

Key words: *Rosa hybrida*; petals volatiles; steam distillation; solvent extraction; solid-phase microextraction (SPME)

现代月季(*Rosa hybrida*)是传统月季与蔷薇属其他植物通过人工杂交所获得的复杂类群,广泛应用于园林绿化和家庭园艺中^[1]。藤本月季的抗逆性强,且生长旺盛,是公园、庭院垂直绿化的优选植物^[2]。花卉的香气不仅可以使人心旷神怡,其中一些成分还对人体健康具有积极作用^[3],培育出花朵具有芳香气味的品种是观赏植物重要的育种目标^[4-6]。花朵的香气成分非常复杂,且多为相对分子质量较小的易挥发物质,因此在对花朵香气成分进行研究时,香气组分的收集和提取方法尤为重要,不同的提取方法对最终检测结果有很大影响^[4]。目前,实验室提取植物挥发物的传统方法主要为蒸馏法和溶剂法^[7]。固相微萃取(SPME)法是一种新型的挥发物收集方法,属于高分子材料吸附法^[8]。

大花藤本月季香粉蝶的开花量大,并且香气浓郁,具备良好的应用前景,不仅可以直接用于园林造景中,还可以作为后续培育芳香型月季品种的育种材料^[9-10]。本研究拟通过比较蒸馏法、溶剂法、SPME法对香粉蝶花朵香气组分的提取效果,并对提取的香气组分进行气质联用(GC-MS)分析,确定芳香气味的主要成分及其相对含量,筛选适合月季

香气组分研究的样品前处理方法,以期为芳香型品种的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料大花藤本月季香粉蝶取自江苏省林业科学研究院月季种质资源圃内,选取处于盛花期的新鲜花瓣,用去离子水将花瓣洗净后再用吸水纸吸去表面水分,自然阴干备用。

1.2 蒸馏法

准确称取 50 g 香粉蝶花瓣,加入 100 μ l 正十二烷,置于 2 000 ml 烧瓶中蒸馏提取 3 h,随后将馏出物用 10 ml 乙醚萃取 1 h,静置分液后加入无水硫酸钠充分涡旋干燥,过滤获得纯净的乙醚萃取液。重复上述操作 4 次,并将获得的萃取液混合,于 36.5 $^{\circ}$ C 下旋转蒸发,得到挥发油。

因为获得的挥发油为高浓度易挥发混合物,GC-MS 仪器为高灵敏度检测仪器,所以检测时需要进行稀释。本试验将挥发油用正己烷分别稀释至 5 000 倍、10 000 倍、20 000 倍、50 000 倍、100 000 倍,然后取 2 ml 加入离心管中,分别取 1 μ l 进样,分流比为 1:40,进样后设置 5 min 的溶剂延迟。

1.3 溶剂法

称取 100 g 香粉蝶花瓣,剪碎至 0.5~1.0 cm 小片,并加入 200 μ l 正十二烷,在 200 ml 的非极性溶剂正己烷和极性溶剂甲醇中分别提取 24 h,随后过滤以去除残渣得到浸提液。提取过程中每 3 h 进行一次振荡混匀,全程在避光条件下进行,温度为室温,检测时分别取 1 μ l 进样,分流比为

收稿日期:2020-04-13

基金项目:江苏省林业科学研究院青年科技基金项目(JAF-2016-05)

作者简介:孙海楠(1989-),男,江苏如皋人,博士,助理研究员,主要从事景观树种和木本花卉遗传育种研究。(E-mail) sunhainan1989@hotmail.com

通讯作者:汪有良,(E-mail) 761132247@qq.com

1:40,进样后设置5 min的溶剂延迟。

1.4 SPME 法

取2 g香粉蝶完整花瓣,置于40 ml棕色螺口顶空瓶中,并加入4 μ l正十二烷,棕色螺口顶空瓶盖内含聚四氟乙烯垫片。萃取头选用100 μ m聚二甲基硅氧烷(PDMS)涂层,在60 $^{\circ}$ C水浴条件下萃取15 min后立即进样解析,解析时间为3 min,进样后不设置溶剂延迟。

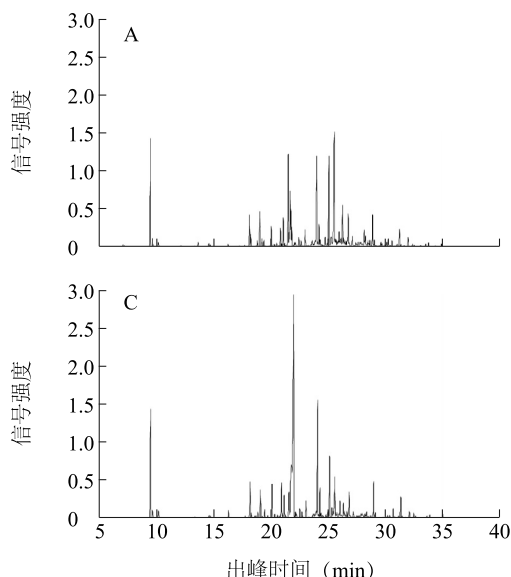
1.5 质谱条件与气相色谱升温程序

选用450-GC/320-MS气质联用仪(布鲁克公司产品),色谱柱为HP-5毛细管柱,载气为氮气(纯度99.999%),流速设置为1 ml/min,进样口温度设置为250 $^{\circ}$ C。

色谱柱升温程序:50 $^{\circ}$ C保持3 min,随后以5 $^{\circ}$ C/min的速度升至180 $^{\circ}$ C,再以10 $^{\circ}$ C/min的速度升至270 $^{\circ}$ C,保持6 min。离子源为电子电离(EI),温度设定为230 $^{\circ}$ C,轰击电压70 eV,扫描范围40~500 amu。

1.6 数据处理与分析

由布鲁克公司色谱工作站完成总离子流图峰面积的计算,使用SPSS软件进行数据分析。



2 结果与分析

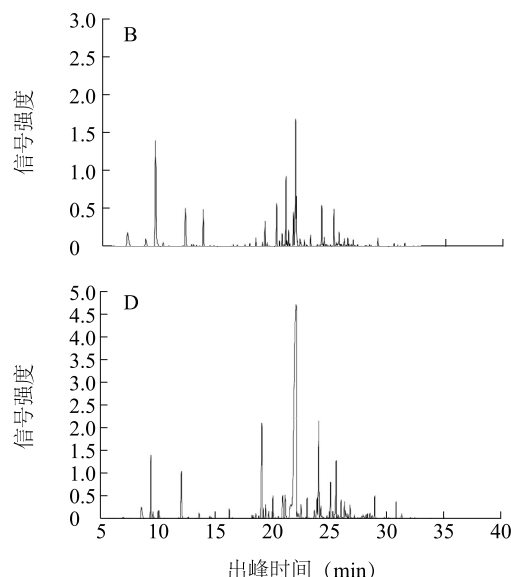
2.1 蒸馏法产物获得与稀释倍数确定

采用蒸馏法提取香粉蝶花瓣的香气组分,本试验共消耗新鲜香粉蝶花瓣200 g,获得香粉蝶花瓣挥发油1.8 g,出油率为0.9%,挥发油芳香气浓郁,嗅觉感官佳。

将挥发油按照不同稀释倍数进行稀释,进样后的结果表明,当样品稀释5 000倍和10 000倍时,离子流的信号超出质谱检测器的检测限度,当稀释20 000倍时,可在仪器检测限范围内获得最大的信号强度。

2.2 香粉蝶花瓣香气成分收集效果的比对

本试验采用正十二烷作为不同提取方法比对的内标物。在不同提取方法中,花瓣的使用量与添加内标物量的比值恒定,即每1 g花瓣对应2 μ l的正十二烷。对香气组分进行GC-MS检测,并对总离子流图进行修正,使得内标物对应的峰面积一致,并将总离子流图进行堆叠,堆叠结果(图1)显示,4份样品中内标物的出峰时间一致,峰形为对称峰,内标物峰面积与总峰面积的比值在合理范围内。



A:溶剂法(正己烷);B:溶剂法(甲醇);C:固相微萃取法;D:蒸馏法。

图1 香粉蝶花瓣香气组分总离子流堆叠图

Fig.1 Total ion flow chromatogram of petals volatiles from *Rosa hybrida* Xiangfendie

在内标物信号强度一致的情况下,蒸馏法检测的信号强度最高,SPME法次之,溶剂法较差。信号密度方面,蒸馏法和SPME法均有较高的信号密度,溶剂法的信号密度较低,并且用甲醇作为溶剂获得的信号密度明显低于用正己烷作为溶剂获得的信号密度。

蒸馏法处理下样品的出峰时间集中在8~13 min、18~32 min,该方法所获得的花瓣香气成分最多,高达43种,其中鉴定出的成分有32种。SPME法处理下样品的出峰时间集中在18~35 min,该方法共获得40种成分,其中鉴定出31种,与蒸馏法的提取效果接近。甲醇作为溶剂的溶剂法处理的

样品出峰时间集中在6~14 min、18~30 min,正己烷作为溶剂的溶剂法处理的样品出峰时间集中在18~35 min。基于甲醇作为溶剂的溶剂法和正己烷作为溶剂的溶剂法分别获得了35种和29种成分,分别鉴定出22种和21种。

在正己烷和甲醇的浸提液中共检测到24种相同的成分,其中可以鉴定出的成分有17种,另外7种成分虽然未能成功鉴定,但在质谱仪中的离子碎片信号特征一致,可视为同一种成分。综合2种溶剂的提取结果,溶剂法共获得40种成分,其中鉴定出26种。溶剂法处理下获得的香气成分数量与SPME法相同,但鉴定出的成分数量低于蒸馏法和SPME法。

基于 SPME 法鉴定出成分的相对含量为 98.19%, 在 3 种提取方法中最高, 其次为以甲醇作为溶剂的溶剂法 (97.24%), 蒸馏法和以正己烷作为溶剂的溶剂法鉴定出成分的相对含量较低, 分别为 96.04%、96.00%。基于蒸馏法和 SPME 法获得的可鉴定含量小于 1.00% 的成分数量分别为 11 个和 12 个, 远高于溶剂法[以甲醇作为溶剂的溶剂法 5 个, 以正己烷作为溶剂的溶剂法 4 个]。

2.3 香粉蝶花瓣香气主要成分的鉴定

将含量高于 5.00% 的成分视为香粉蝶花瓣香气的主要成分, 分别为香叶醇、1,3,5-三甲氧基苯、大根香叶烯-D、丁香酚、别香橙烯、苯乙醇、3,5-二甲氧基苯。其中, 3,5-二甲氧基苯和苯乙醇的含量明显高于其他成分。基于蒸馏法和 SPME 法提取的 3,5-二甲氧基苯分别占总组分的 56.47%、31.03%, 基于溶剂法提取的 3,5-二甲氧基苯在总组分中的占比高于 20.00%。基于 SPME 法和溶剂法提取的苯乙醇在总组分中的占比高于 10.00%, 基于蒸馏法提取的苯乙醇占总组分的 6.75%。

3 讨论

在 3 种提取方法中, 溶剂法处理的样品在检测过程中获得的信号强度较弱, 并且鉴定出的香气成分数量最少; 蒸馏法处理下样品所获得的检测信号强度最强, 且鉴定出的香气成分最多; SPME 法处理的样品虽然在检测信号强度方面介于蒸馏法与溶剂法之间, 但鉴定出的香气成分种类与蒸馏法接近, 且鉴定出的香气成分的相对含量最高。

除了本研究提到的方法外, 挥发物的收集方法还有超临界萃取法、吸附-热脱附法等, 但所需设备的体积较大, 且价格较为昂贵, 不适合在一般实验室中进行花朵香气分析试验^[11-12]。SPME 法作为一种新型的挥发物收集方法, 具有设备小巧、操作简便、重复性高等特点^[13-15]。本试验中, SPME 法对样品的需求量最小, 操作简便, 且具有较高的检测效率。

香粉蝶花瓣的香气成分中, 最主要的 2 种成分是 3,5-二甲氧基苯和苯乙醇。蒸馏法提取的苯乙醇在总组分中的占比低于 SPME 法和溶剂法, 可能是因为苯乙醇的相对分子质量较小, 沸点较低, 在蒸馏的高温环境下流失严重^[12], 也可能是因为蒸馏法处理下 3,5-二甲氧基苯的提取效率较高, 该成分在总组分中占比过高, 导致其他成分的相对含量较低^[16]。

3,5-二甲氧基苯和 1,3,5-三甲氧基苯是众多香水月季花朵香气中共有的成分, 也是香水月季清新香气的主要成分, 香粉蝶花朵的气味与传统香水月季类似^[17-18]。香粉蝶花朵香气的主要成分中有香叶醇, 而香叶醇多为原产于欧洲的蔷薇属花朵香气中的主要成分, 说明在香粉蝶的育种过程中可能有欧洲蔷薇属植物的基因掺入^[17,19]。

本研究综合比较了 3 种提取方法处理下香粉蝶花朵香气成分的收集效果, 并确定了大花藤本月季香粉蝶花朵香气的主要成分, 可以为今后月季芳香型品种的选育以及香气合

成机制的研究提供理论指导。

参考文献:

- [1] 张佐双, 朱秀珍. 中国月季 [M]. 1 版. 北京: 中国林业出版社, 2006: 66-67.
- [2] 高鹏华, 于文剑, 赵 芮, 等. 38 个藤本月季品种 ITS 序列分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(4): 1338-1342.
- [3] 刘陈玮, 陈素梅, 郑 丽. 园艺作物挥发物合成及其生物学功能研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1506-1512.
- [4] 孙海楠. 菊花及近缘种属植物挥发性次生代谢物的鉴定及合成机制初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [5] 赵印泉, 潘会堂, 张启翔, 等. 梅花花朵香气成分时空动态变化的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(4): 201-206.
- [6] DUDAREVA N, KLEMPHEN A, MUHLEMANN J K, et al. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds [J]. New Phytologist, 2013, 198(1): 16-32.
- [7] KNUDSEN J T, TOLLSTEN L, BERGSTRÖM L G. Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques [J]. Phytochemistry, 1993, 33(2): 253-280.
- [8] GORECIK T, YU X, PAWLISZYN J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres [J]. Analyst, 1999, 124(5): 643-649.
- [9] 汪有良, 胡道达. 藤本月季“香粉蝶”种苗扦插试验 [J]. 江苏林业科技, 2018, 45(3): 28-29, 57.
- [10] 金 菁. 蔷薇属植物远缘杂交的幼胚拯救研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [11] 李亚峰, 修 毅, 杨元直, 等. 超临界 CO₂ 萃取红松松针留醇的动力学和热力学 [J]. 林业科学, 2018, 54(4): 128-133.
- [12] 王 辉, 姚 雷. 直接热脱附法和气相色谱法对玫瑰花检出成分的对比如分析 [J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2013, 31(1): 46-51.
- [13] 孙海红, 钱叶苗, 宋相丽, 等. 固相萃取技术的应用与研究新进展 [J]. 现代化工, 2011, 31(S2): 21-24, 26.
- [14] 李俊星, 钟玉娟, 罗剑宁, 等. 基于顶空固相萃取结合气相色谱-质谱技术分析香芋南瓜叶片的香气物质成分及特征 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2019, 45(2): 175-180.
- [15] 冯永刚. SPME-GC-MS 法测定龙胆草中 15 种有机磷农药残留 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(22): 215-218.
- [16] 容 蓉, 邱丽丽, 张玉朋, 等. 水蒸气蒸馏提取与顶空进样气质联用分析仙茅挥发性成分 [J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(4): 366-367.
- [17] 李晋华, 晏慧君, 杨锦红, 等. 香水月季复合群 (*Rosa odorata* Complex) 花香成分分析 [J]. 西南农业学报, 2018, 31(3): 587-591.
- [18] 于 超. 四倍体月季遗传连锁图谱的构建及部分观赏性状的 QTLs 分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
- [19] 李淑颖. 华东地区油用与非油用蔷薇属资源的应用拓展研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2013.

(责任编辑: 王 妮)