

迷迭香提取物检测方法研究进展



LI Da-wei

李大伟, 毕良武*, 赵振东, 李冬梅, 刘先章

(中国林业科学研究院林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室; 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室; 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 江苏 南京 210042)

摘 要: 介绍了迷迭香提取物的种类, 综述了迷迭香提取物的分析测定方法, 主要包括高效液相色谱法、胶束电动色谱法、紫外光谱分析法、红外光谱分析法、毛细管电泳法、气相色谱法、质谱法、核磁共振波谱法等, 并比较了各种方法在使用上的差别。

关键词: 迷迭香提取物; 检测; 比较

中图分类号: TQ351.0

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2011)02-0119-08

Research Progress on Analytical Examination Methods of Rosemary Extracts

LI Da-wei, BI Liang-wu, ZHAO Zhen-dong, LI Dong-mei, LIU Xian-zhang

(Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China)

Abstract: The varieties of rosemary extracts were introduced. Their analytical examination methods including micellar electrokinetic chromatography, HPLC, UV spectroscopy, infrared spectroscopy, capillary electrophoresis, gas chromatography, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, etc. were reviewed. The applicational differences of the above methods were also indicated and compared.

Key words: rosemary extract; determination; comparison

迷迭香 (*Rosmarinus officinalis* L.) 也叫油安草, 系唇形科鼠尾草属植物, 常绿小灌木, 原产欧洲、北非及地中海沿岸, 近年来在我国云南、广西、海南、湖南、四川、贵州、福建等省区均有种植^[1-3]。迷迭香是一种多用途的经济作物, 从中可提取抗氧化剂、迷迭香精油等。抗氧化剂的主要成分是具有抗氧化功能的二萜类、黄酮类、三萜类等化合物; 迷迭香精油则是一种由 30 多种挥发性成分组成的液态油状物^[4-5]。迷迭香提取物具有高效、安全等特性, 广泛应用于化妆品、香水、香皂、空气清新剂、驱虫剂、医药、各种动植物油脂、动物饲料、肉制品、海产品、面粉、调味酱、调味料、烘焙食品、油炸产品、天然色素、香精、生物农药、烟草等领域, 特别是可以治疗血液恶性肿瘤、心血管病, 抗癌、抑制艾滋病毒的感染、治疗消化不良、预防老年痴呆症、心脏病、高尿酸血症以及呼吸系统的疾病等, 为生产、生活带来了许多方便^[6-10]。迷迭香提取物中仍有不少化学成分的结构与性质存在着不确定性, 且在实际的应用过程中, 需掌握迷迭香提取物中各成分的含量, 因此, 有必要对已有的分析方法进行归纳和总结, 为建立更加科学合理的迷迭香提取物检测方法提供基础。

1 迷迭香提取物的种类

迷迭香提取物主要包括鼠尾草酚、迷迭香二醛、表迷迭香酚、表迷迭香酚甲醚、鼠尾草酸、鼠尾草酸甲酯、迷迭香酚、熊果酸、齐墩果酸等萜类物质, 芹菜素、橙皮素、高车前苷、芫花素等黄酮类物质, 香草酸、咖啡酸、迷迭香酸、阿魏酸等酚酸类物质以及含有 α -蒎烯、三环萜、对伞花烃、柠檬烯、1,8-桉叶油

收稿日期: 2010-09-26

基金项目: 引进国际先进林业科学技术项目(2011-04-01); 农业科技成果转化资金项目(2008GB24320416)

作者简介: 李大伟(1985-), 男, 山西怀仁人, 硕士生, 从事天然产物化学与利用研究; E-mail: lidawei119@126.com

* 通讯作者: 毕良武, 研究员, 博士, 从事天然产物化学与利用研究; E-mail: biliangwu@126.com。

素、龙脑、樟脑、 α -松油醇、 β -松油醇、松油烯-4-醇等成分的迷迭香精油。根据这些物质在水中的溶解性,可以将其分为两类:水溶性提取物和脂溶性提取物^[11-13]。

1.1 水溶性提取物

水溶性提取物主要包括迷迭香酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、L-抗坏血酸、橙皮苷和异橙皮苷等^[14-15],目前研究比较多的主要包括以下几种:迷迭香酸(rosmarinic acid),即(2R)-2-[[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-oxy]-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanoic acid,相对分子式为 $C_{18}H_{16}O_8$,相对分子质量为360.31,CAS号为537-15-5。咖啡酸(caffeic acid),化学名称为3-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-2-propenoic acid,分子式为 $C_9H_8O_4$,相对分子质量为180.16,CAS号为331-39-5。抗坏血酸(ascorbic acid),即(5R)-[(1S)-1,2-dihydroxy-ethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one,分子式为 $C_6H_8O_6$,相对分子质量为176.12,CAS号为50-81-7。

1.2 脂溶性提取物

脂溶性提取物包括鼠尾草酸、鼠尾草酚、齐墩果酸、熊果酸、柚皮苷、芝麻酚、迷迭香酚、迷迭香碱、异迷迭香碱、7-乙氧基迷迭香酚、7-甲氧基迷迭香酚等,目前研究比较多的主要包括以下几种^[16-17]:鼠尾草酸(carnosic acid),即(4aR-trans)-1,3,4,9,10,10a-hexahydro-5,6-dihydroxy-1,1-dimethyl-7-(1-methylethyl)-4a(2H)-phenanthrenecarboxylic acid,为二萜类化合物,分子式为 $C_{20}H_{28}O_4$,相对分子质量为332.43,CAS号为3650-09-7。鼠尾草酚(carnosol),同样是二萜类化合物,分子式为 $C_{20}H_{26}O_4$,相对分子质量为330.42,CAS号为5957-80-2。熊果酸(ursolic acid),即(1S,2R,4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-hydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-1H-picene-4a-carboxylic acid,分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$,相对分子质量为456.70,CAS号为77-52-1。齐墩果酸(oleanolic acid),是五环三萜类化合物,化学名为(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydricpicene-4a-carboxylic acid,分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$,相对分子质量为456.70,CAS号为508-02-1。熊果酸与齐墩果酸互为三萜类同分异构体,性质相似,往往同时存在,而鼠尾草酸可以转化为鼠尾草酸甲酯、鼠尾草酚,鼠尾草酚可以转化为表迷迭香酚、迷迭香酚以及7-甲氧基迷迭香酚。

2 迷迭香提取物的分析测定方法

迷迭香提取物的分析测定方法主要包括:高效液相色谱法、胶束电动色谱法、紫外光谱分析法、红外光谱分析法、毛细管电泳法(CE)、气相色谱法、质谱法、核磁共振波谱法等,而目前使用最多的分析方法则是高效液相色谱法。

2.1 高效液相色谱法

2.1.1 检测器的选择 光电二极管阵列检测器(DAD)是让所有波长的光都通过流动池,然后通过一系列分光技术,使所有波长的光在接受器上被检,以氙灯和钨灯作光源,覆盖190~800 nm的光谱区域,可以有效限制基线噪音,又可以在更高波长处提高灵敏度^[20],是一种可以同时得到时间、光强度和波长的新型的紫外检测器^[21]。如在分析迷迭香酸^[22]和鼠尾草酸的时候^[23-25],扫描后可以选择的检测波长为210、230、330 nm^[26]或285 nm^[27-28];唐丽琴等^[29]测定齐墩果酸与熊果酸的含量,所使用的检测波长220 nm;有些研究^[30-32]在同时测定鼠尾草酸、鼠尾草酚、迷迭香酚、表迷迭香酚等成分的含量时,检测波长选择230 nm;而在测定迷迭香酚、鼠尾草酚、百里酚、表迷迭香酚^[33-34]、柚皮苷、迷迭香酸、咖啡酸、鼠尾草酸的含量时^[35-37],检测的波长选择280 nm;在检测鼠尾草酚、鼠尾草酸、迷迭香酚、7-甲氧基迷迭香酚、鼠尾草酸甲酯等成分时^[38-40],检测波长选择284 nm;Ferrerres等^[41]在分析迷迭香山奈酚及3-葡萄糖苷等成分的时候,选择的检测波长为350 nm。

蒸发光散射检测器(ELSD)作为一种新型通用型检测器,可以检测没有紫外吸收或仅在紫外末端有吸收的有机成分。随着技术的不断改进和完善,蒸发光散射检测器越来越多的应用于医药、化工、食

品等领域。与其它的检测器相比,它消除了溶剂的干扰和因温度变化引起的基线漂移,特别适用于梯度洗脱。ELSD也可与MS通用色谱条件,相互补充,在物质的高灵敏度、结构分析中发挥着重要作用^[42]。如Bicchi等^[43]采用蒸发光散射检测器来检测鼠尾草酸、鼠尾草酚、迷迭香二醛、迷迭香酚、表迷迭香酚以及相对分子质量为332和346的未知成分(可能没有紫外吸收)的含量,Backleh等^[44]采用蒸发光散射检测器来对鼠尾草酸、鼠尾草酚、鼠尾草酸甲酯等成分进行定性分析。

2.1.2 分离参数的选择 色谱柱、柱温度、流速以及进样量主要影响着色谱保留时间、峰宽、峰高、分离效率以及精密度和重复性等。随着高效液相色谱的不断发展,反相色谱柱也在不断更新,在分析迷迭香提取物的时候,已有的研究主要使用的柱子包括SUNTEK C18色谱柱、Hypersil ODS C18柱、Chrochart RP-18柱、Kromasil 100-5 C18色谱柱、HP Series 1100色谱柱、Hypersil H5 ODS色谱柱、Turner C18H37色谱柱、Symmetry C18色谱柱、Kromasil C18色谱柱。填充柱的内径通常为4.6或3.9 mm,长度150、250、300 mm,填料粒度为5 μm ,通常的流速范围为0.5~1.5 mL/min,柱温度的范围是25~40 $^{\circ}\text{C}$,进样量的范围为5~25 μL ,输液泵存在单泵和双泵。

2.1.3 流动相的选择 流动相的使用,目前的研究主要体现在方法文件的更新上面,包括等度洗脱和梯度洗脱。在分析的时候,有时候需要加入酸来调节流动相的pH值,目的是为了防止流动相中的组分在检测过程中发生变化以及防止组分吸附在色谱柱上,有时还可以提高分离效率^[45]。

等度洗脱是指在一次色谱分析操作过程中,不改变流动相的组成和浓度,即以等强度流动相洗脱全部组分的方法,所采用的流动相主要包括乙腈、甲醇、乙醇、水等,加入的酸包括乙酸、磷酸等。梁振益等^[22]以乙腈和甲醇的体积比为85:15作为流动相;Erkan等^[23]在分析迷迭香精油的时候,流动相的体积比为水-甲醇-2-丙醇10:9:1;唐丽琴等^[29]选择甲醇-水94:6的体积比,且每100 mL中加入0.08 mL冰乙酸作为流动相;Erkan等^[23]在分析迷迭香抗氧化剂的时候,流动相为0.1%磷酸-乙腈40:60;Ferrerres等^[41]采用流动相为A(水-甲酸19:1):B(甲醇)65:35混合;Masuda等^[39]选择流动相采用甲醇-水-乙酸90:10:1的体积比;宋玉兰^[30]选用的流动相采用乙腈和水的体积比为60:40,并且加入0.1%的磷酸;吕岱竹等^[27]选用乙腈-水(加入少量的冰乙酸)为流动相;马淑红等^[28]以乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相;Kuzmenko等^[24]选择的流动相为乙腈和0.1%的磷酸的混合液按照体积比1:1的比例混合;Okamura等^[32]采用0.1%的磷酸水溶液和乙腈的体积比为40:60作为流动相;何默忠等^[40]选择甲醇-0.2%磷酸溶液82:18;黄纪念等^[31]以乙腈-0.1%三氟乙酸52:48的体积比作为流动相。

梯度洗脱法是指在高效液相色谱中不断改变流动相的浓度配比,从而可以使一个复杂样品中的性质差异较大的组分能按各自适宜的容量因子达到良好分离的目的。与等度洗脱法相比,梯度洗脱法具有分析周期短,分离能力高,峰型得到改善,很少拖尾,灵敏度增加的优点,但缺点是有时会引起基线漂移。在分析迷迭香提取物的时候,目前已有多种梯度洗脱的方法,因此很有必要根据已有的梯度分离条件,来寻找更加有效的分析迷迭香提取物的梯度分离方法。

目前对梯度洗脱过程的研究,集中在不断改进梯度程序,主要是洗脱的总时间、梯度洗脱过程所使用的强洗脱溶剂组分以及梯度陡度的变化方面,从而增大分离度,提高分离效果。如Pelillo等^[37]选择的流动相A为乙腈-0.5%乙酸15:85,B为纯甲醇,使流动相A的体积分数在85 min内从0增大到28%;Ibanez等^[25]在实验过程中采用1%乙酸的水溶液作为流动相A,1%乙酸的乙腈溶液作为流动相B,梯度洗脱的方法:0~5 min采用50%B;6~15 min使B的体积分数从50%线性变化到70%;16~40 min使B的体积分数从70%线性变化到100%;Tena等^[46]采用梯度洗脱的方法是纯乙腈溶液作为流动相A,10 mmol/L乙酸水溶液作为流动相B,梯度的过程为:0~8 min使A的体积分数从0增大到70%;9~14 min内,使A的体积分数从70%线性增加到100%;Aruoma等^[33]采用梯度洗脱的方法是乙腈和水(内含体积分数为0.5%的磷酸)为流动相,梯度的过程为:0~20 min内采用乙腈的体积分数从50%线性变化到85%;Wang等^[26]采用0.1%的磷酸水溶液作为流动相A,含0.1%磷酸的甲醇溶液作为流动相B,梯度的过程为:0~10 min采用B的体积分数从40%线性变化到50%;10~15 min内,

使 B 的体积分数线性变化到 60 % ,然后维持 60 % B 为 10 min ;Wada 等^[34]采用 4 % 的磷酸水溶液作为流动相 A ,流动相 B 为甲醇,梯度的过程为:0~30 min 采用 B 的体积分数为 30 % ,30~35 min 采用 B 的体积分数为 40 % ,35~40 min 采用 B 的体积分数为 10 % ;Bicchi 等^[43]在实验过程中采用梯度洗脱的方法,水-甲醇-乙酸 85:15:0.5 作为流动相 A ,甲醇-乙酸 100:0.5 作为流动相 B ,梯度的过程为:在 50 min 内,A 从体积分数为 100 % 线性变化到 0 ;Luis 等^[35]选择的流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 2.5 % 的乙酸,梯度程序为:在 10 min 内,使 A 的体积分数从 10 % 增大到 20 % ,然后在 20 min 内,A 的体积分数从 20 % 增大到 50 % ,在 5 min 内,A 的体积分数从 50 % 增大到 60 % ,再在 5 min 内,A 的体积分数从 60 % 增大到 90 % ,在 2 min 时间内,使 A 的体积分数从 90 % 增大到 100 % ,并保持 10 min ,在最后的 1 min 时间内,使 A 的体积分数降低到 10 % A ,梯度程序之后,用 10 % A 平衡系统 10 min ,然后再进行下一次进样检测;Debersac 等^[36]选用的流动相 A 为乙腈,流动相 B 为用磷酸调节 pH 值为 2.6 的水溶液,流动相 C 为甲醇,水和乙腈的混合液,体积比为 3:1:1,梯度的过程为:0~15 min 采用 0 % A - 95 % B - 5 % C ;16~25 min 采用 0 % A - 85 % B - 15 % C ;26~40 min 采用 0 % A - 70 % B - 30 % C ;41~110 min 采用 0 % A - 62 % B - 38 % C ,最后 111~120 min 采用 100 % A ;Wellwood 等^[38]采用的流动相 A 为体积比水-乙酸-乙腈 840:8.5:150,流动相 B 为甲醇,梯度程序为:在 30 min 内使 B 的体积分数从 10 % 增大到 100 % ,并保持 5 min ,然后在 4 min 内使 B 的体积分数从 100 % 降低到 10 % ,并保持 3 min ,等待下一次进样。

2.1.4 分析结果的评价参数 高效液相色谱法主要是应用于迷迭香提取物的定量(外标法)分析,测评参数包括重现性、回收率、稳定性以及精密度的相对标准误差(RSD),以此来确定分析结果的重现性、可靠性、稳定性和精密度,以及评价外标法标准曲线的线性相关度(R^2)是否在合理的区间内。根据已有的研究报道,通常认为当所测定实验结果的重现性的 RSD 小于 1 % 时^[22-25],表明重现性良好,回收率的 RSD 小于 2 % 时,较为可靠,当所测定的峰面积的 RSD 小于 3 % 时,表明稳定性良好,测定精密度的 RSD 在小于 3.5 % 时,表明精密度良好。而外标法的标准曲线的范围则是以实际要检测的迷迭香提取物的含量范围为标准,然后通过考察线性相关度等来确定标准曲线的准确性。如 Tena 等^[46]使用的外标法的线性范围是 100~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而鼠尾草酸的标准曲线的相对误差小于 0.1 % ,结果表明,实验可行,数据可靠;Wang 等^[26]采用外标法进行检测,标准曲线的线性相关度(R^2)为 0.999 95,表明该方法可以有效进行测量,其所得数据是可靠的。

2.2 其它检测方法

检测迷迭香提取物的其它方法主要包括 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、IR、MS、GC、CE 以及几种检测方法联用,不同的检测方法均具有自身的分析特点,气相色谱是利用不同物质在流动相和固定相分配系数的差别,使不同化合物从色谱柱流出的时间不同,以达到分离的目的。质谱是利用带电粒子在磁场或电场中的运动规律,按其质荷比(m/z)实现分离分析,测定离子质量及其强度分布。核磁共振的方法可以具体分析含有氢原子的有机物的结构,深入物质内部而不破坏样品,具有迅速、准确、分辨率高等优点。紫外可见分光光度法主要应用于定量分析,也可以进行纯度检验,初步推测化合物的结构,与标准物及标准图谱对照来确定物质的存在等。方法联用能够使几种仪器的优缺点互补,具有更大的分析优势。这些方法主要用于迷迭香提取物的定性定量分析。

2.2.1 定性分析 Tena 等^[46]通过使用 GC、HPLC、IR、MS、 ^1H NMR 来判断迷迭香提取物的种类。所使用的质谱条件是质谱源的温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,电离室的温度为 225 $^{\circ}\text{C}$,当锥电压为 25 V 时,失去甲基,当锥电压为 60 V 时,失去乙基,根据分子离子峰(碎片离子峰)的数据以及结合其它的相关检测数据,判断得知质荷比为 330 的是鼠尾草酚,质荷比为 346 的为鼠尾草酸甲酯。

Ninomiya 等^[47]通过 IR、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 以及质谱法共同确定迷迭香提取物的成分,将迷迭香提取物先经过硅胶柱层析,然后加入到体积分数为 85 % 的甲醇溶液中进行检测,结果确定迷迭香提取物成分包括鼠尾草酸、鼠尾草酚、7-甲氧基迷迭香酚和齐墩果酸。

Ravid 等^[48]采用填充柱制备色谱柱进行气相色谱分析,Varian 3700 玻璃柱(3 m × 4 mm),程序升温,从 80 °C(先保持 2 min)以 5 °C/min 的速度升到 200 °C,载气为氮气,流量为 30 mL/min;之后采用毛细管气相色谱分析,Supelcowax 10 熔融石英柱(30 m × 0.25 mm × 0.15 μm),程序升温与前述相同。

Leal 等^[49]采用 GC-MS 进行分析,石英毛细管柱柱子(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),电子碰撞电压 70 eV,质量范围为 40~550,载气为氦气,样本分流比为 1:30,进样温度为 240 °C,检测器的温度为 230 °C,采用程序升温,从 50 °C(保持 5 min)以 3 °C/min 的速度升到 180 °C,再以 15 °C/min 的速度升到 280 °C,280 °C 保持 20 min,进样量为 1 μL,得到的诸如保留值,分子离子峰(碎片离子峰)等数据与标准的物质质谱图进行比较,分析结果显示迷迭香提取物中含有 α-蒎烯、1,8-桉树脑、樟脑、马鞭烯醇、α-松油醇和 β-松油醇等 9 种物质。

Pintore 等^[50]对迷迭香提取物先通过反复层析后,采用 GC-MS,GC-IR 的方法进行分析检测。Hewlett-Packard Model 5890A GC-MS 的条件为石英玻璃毛细管柱(30 m × 0.53 mm × 0.2 μm)连接在离子源质谱仪上,进样品的温度为 200 °C,检测器的温度为 300 °C,HP 工作站,柱温度为从 80 °C(开始先保持 3 min)以 5 °C/min 增加到 300 °C,采用氦气作为载气,载气流量为 1 mL/min,所有的光谱均记录在傅立叶红外光谱仪上,然后采用 ¹³C NMR 对得到的光谱进行分析,¹³C NMR 的条件是采用 200 Fourier 转换色谱器,采用 50.323 MHz,再配备 10 mm 的探针,以 TMS 为内标物质,脉冲宽度(PW)为 5 μs,翻转角为 45°,累计扫描范围是 2 000~10 000 个样品,CPD 型解耦器,数字分辨率为 0.763 Hz/pt。通过以上数据所得到的结果的综合分析之后,得出迷迭香精油中存在的化合物包括 α-蒎烯、乙酸龙脑酯、1,8-桉叶素、樟脑、柠檬烯等物质。

Ravid 等^[48]采用 HRGC-MS 和手性分析相结合分析的方法。HRGC-MS 分析的条件是采用 HP-1 型柱(25 m × 0.2 mm × 0.3 mm),程序升温,从 100 °C(保持 2 min)以 6 °C/min 的速度升到 210 °C,以氦气为载气,流量为 0.5 mL/min,采用 Hewlett-Packard 5989A 型质谱仪,电子碰撞的电压为 70 eV;手性分析的条件为 Varian 3300 型手性柱(25 m × 0.25 mm × 0.3 mm),以氦气为载气,采用氢火焰离子化检测器,流速为 40 cm/s,程序升温,从 50 °C(保持 2 min)以 4 °C/min 的速度升到 200 °C。

Backleh 等^[44]采用等电聚焦吸附色谱、HPLC-DAD、HPLC-MS、HPLC-ELSD 相结合的方法分析迷迭香提取物。等电聚焦吸附色谱采用玻璃柱(130 cm × 18.5 mm × 16 μm),并且在实际分析过程中,必须使柱子非常干净,以氮气为载气,流速为 12~30 mL/min;HPLC-MS-MS 的分析参数包括,流动相 A(4 mmol/L 的甲酸),流动相 B 为乙腈,柱温为 30 °C,进样量为 5 μL,流速 0.25 mL/min。梯度程序为:10% B 保持 1 min,以 2.75%/min 的速度使 B 增大到 90%,90% B 保持 5 min;质谱条件是气化室温度为 400 °C,毛细管温度为 200 °C,离子源采用 APCI,5 μA,保护气为氮气,压力为 413.7 kPa,辅助气为氮气,压力为 34.5 kPa,质荷比的检测范围为 150~500,扫描时间为 0.5 s。

Ibanez 等^[51]使用 CE-MS、HPLC-DAD 和 HPLC-MS 相结合的方法对迷迭香提取物进行分析。CE 的高效分离与 MS 的高鉴定能力结合,成为微量样品检测的有力工具,可提供相对分子质量及结构信息,适于目标化合物分析或窄质量范围内扫描分析,同时可以提供高效率的短期迁移,大大弥补了 HPLC 的一些弱点。高压液相色谱电喷雾质谱(HPLC-ESI-MS)的分析条件是采用 C18 柱(150 mm × 4.6 mm × 3.5 μm),自动进样器,进样量为 25 μL,柱温度为 30 °C,流动相的流速为 0.6 mL/min,检测波长为 230 nm,实验过程中采用梯度洗脱的方法,50% 乙腈溶液作为流动相 A,10 mmol/L 乙酸水溶液作为流动相 B,梯度的过程为:保持 50% B 为 5 min,然后在 5 min 内使 B 线性变化到 30%,30 min 内使 B 从 30% 线性降低到 0,ESI 的参数包括毛细管电压为 4 000 V,气体温度为 335 °C,雾化器的压力为 344.8 kPa,干燥气体流速为 10.0 mL/min,CE 的条件是采用 DAD 检测器,毛细管柱有效长度(20 mm × 4.6 mm × 50 μm),所有的测量都是在 25 °C,检测分离的电压为 8~15 kV,检测波长为 230 nm,经检测分析得到的化合物包括鼠尾草酚、迷迭香酚、鼠尾草酸、鼠尾草酸甲酯。此外,Ibanez 等^[25]还进行了 GC/MS 分析,熔融石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),氦气作载气,压力为 69.0 kPa,进样量为 3 μL,进样温度为 200 °C,柱子的温度为 40 °C,程序升温,从 40 °C(保持 10 min),以 5 °C/min 的速度升

到 240 °C,再以 20 °C/min 的速度升到 280 °C,280 °C 保持 5 min;质谱的条件为电子碰撞的电压为 70 eV,质荷比的范围为 45~650。

2.2.2 定量方法 Pelillo 等^[37]采用 ¹H NMR (AC-200 200 MHz)布鲁克光谱仪、ASPECT-3000 工作站、DISR/90-NMR 分析软件进行鼠尾草酸的含量测试,记录下鼠尾草酸的核磁共振波谱并与已有的 NMR 数据进行比较;潘利明^[52]通过实验,探索了迷迭香超临界二氧化碳提取物的含量测定方法,分别采用紫外分光光度计法、薄层色谱法进行分析测定。由于紫外分光光度法是测定样品中的总成分,受其他成分的干扰较大,故测得含量较高;而薄层扫描法测定单一成分含量,故测得含量较低,并且薄层扫描法属于半定量方法,在含量测定过程中对其结果影响最大的是显色剂的使用。紫外分光光度法用于测定迷迭香中二萜酚类成分的含量,在生产实际中可以作为二萜酚类成分质量的粗控。结果显示,紫外分光光度法得到的平均回收率为 99.70%、RSD 为 1.952%,重现性好,结果准确,而薄层扫描法平均回收率为 103.11%、RSD 为 2.568%,两种方法均可以达到检测要求。

Bicchi 等^[43]采用 GC-MS 的方法来测定迷迭香提取物的含量。采用的分析条件为采用氢火焰离子化检测器,单次注射,柱子(25 m × 0.25 mm × 0.3 mm),进样温度为 230 °C,检测器的温度为 250 °C,采用程序升温,从 50 °C(保持 1 min)以 3 °C/min 的速度升到 200 °C(保持 20 min),载气为氦气,载气流速为 1.5 mL/min,Bicchi 等还采用高效液相离子束质谱(HPLC-PBI-MS)进行提取物的成分分析,所使用的液相条件与 2.1.3 节所述的单独使用 HPLC 时的相同。根据得到的含量方面的结果显示,鼠尾草酸比鼠尾草酚更容易被氧化变质,提取物中含有迷迭香二醛、鼠尾草酸、鼠尾草酚、鼠尾草酸甲酯等物质。

Kaloustian 等^[53]同样采用 GC-MS、GC-FID 来分析迷迭香精油,结果显示其中有含量很高的、可以用于心脏及呼吸催醒剂的樟脑(30%~45%)。所使用的 GC-MS 的条件为采用固体支持硅胶柱(30 m × 0.32 mm × 1 μm),程序升温的过程为从 60 °C 以 3 °C/min 的速度升到 200 °C,进样温度和检测器温度均为 250 °C,以氮气作为载气,载气的流速为 1 mL/min。而所使用的 GC-FID 的条件则是采用相同的柱子(2 m × 0.32 cm × 1 μm),氢火焰离子化检测器,进样温度和检测器的温度均为 250 °C,以氮气作为载气,流速为 8.7 mL/min,程序升温,从 50 °C(保持 4 min)以 8 °C/min 的速度升到 200 °C。

杨海麟等^[54]采用硅胶柱色谱层析法,傅立叶红外变换光谱仪及真空蒸馏分离法相结合来测定迷迭香提取物的抗氧化性能的大小。根据抗氧化值的测量结果得知,纯化后的抗氧化剂成分对动物油和植物油具有更显著的抗氧化性能。

采用紫外分光光度计法对迷迭香提取物进行定量检测时,可以根据需要选择不同的检测波长,如 Lee 等^[55]检测波长为 538 nm, Leal 等^[49]所选择的波长为 427 nm, Kahkonen 等^[56]所选择的波长为 234 nm。

除此之外,Dorman 等^[57],Escalante 等^[58]采用发射光谱仪定量比较了抗坏血酸等迷迭香提取物物质颜色方面的数据参数来比较其稳定性。

3 结语

迷迭香提取物中含有二萜类、黄酮类及三萜类化合物,可以使用的分析检测方法包括高效液相色谱法、胶束电动色谱法、紫外光谱分析法、红外光谱分析法、毛细管电泳法、气相色谱法、质谱法、核磁共振波谱法等。在实际的分析过程中,常采用质谱法、核磁共振波谱法等进行定性检测,采用高效液相色谱法进行定量检测。

高效液相色谱法适用于定量分析迷迭香提取物中多种活性成分,具有分析速度快、分析灵敏度高、分析色谱柱可反复使用、分析所需要的样品量少、容易回收等优点。当然,迷迭香提取物中还有许多不确定的化学成分需要进行进一步的定性和定量检测。通过对已有分析方法的归纳、总结与完善,很有必要建立一套更加高效、快速、精确、经济的分析检测方法,如可以对迷迭香提取物中鼠尾草酸、鼠尾草酚、迷迭香酸、熊果酸、齐墩果酸等多种化学成分进行同步检测和定量的方法,从而达到分离能力高、重现性和稳定性好、适应性强的目的,为迷迭香提取物的综合研究与深度开发提供理论依据和技术保障。

参考文献:

- [1] 许高燕,刘莹雯,银董红. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水溶性迷迭香提取物中迷迭香酸、阿魏酸和咖啡酸的含量[J]. 分析科学学报,2006,22(5):567-569.
- [2] YAAKOB B,CHE M IRWANDI J. Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refined,bleached and deodorized(RBD) palm olein during deep-fat frying[J]. Food Chemistry,2000,69:301-307.
- [3] 刘先章,赵振东,毕良武,等. 迷迭香抗氧化剂的研究进展[J]. 林产化学与工业,2004,24(增刊):132-138.
- [4] 李大伟,毕良武,赵振东. 鼠尾草酸提取和纯化方法研究进展[J]. 林产化学与工业,2010,30(5):122-126.
- [5] COLE R,毕良武,赵振东. 欧洲迷迭香的研究进展[J]. 生物质化学工程,2006,40(2):41-44.
- [6] 杨磊,肖长文,赵春建,等. pH控制匀浆法从迷迭香中提取鼠尾草酸[J]. 黑龙江大学自然科学学报,2008,25(4):514-518.
- [7] LI D W,BI L W,ZHAO Z D,et al. Study on ultrasound-assisted extraction of carnosic acid from leaves of *Rosmarinus officinalis* L [C] // International Conference on Chemical and Biological Utilization of Biomass Resources,2010.
- [8] 谢阳姣,时显芸,何志鹏. 迷迭香研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(6):2951-2952.
- [9] WEINBERG Z G,AKIRI B,POTOYEVSKI E,et al. Enhancement of polyphenol recovery from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and sage (*Salvia officinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1999,47(7):2959-2962.
- [10] 黄海英,黄绍华,沈玲霞. 天然抗氧化剂迷迭香的研究现状与展望[J]. 中国食品添加剂,2004,5:56-62.
- [11] 肖香,黄达明,王洪新,等. 迷迭香水溶性和脂溶性抗氧化剂的分离[J]. 食品研究与开发,2007,28(1):188-190.
- [12] 徐勇,姚雷,张艳玲,等. 三种迷迭香植物学性状和精油成分研究[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2006,24(5):429-434.
- [13] 毕良武,赵振东,李冬梅,等. 迷迭香抗氧化剂和精油综合提取技术研究(1)——两步提取法[J]. 林产化学与工业,2007,27(4):12-15.
- [14] 张雪,褚文静,刘伟娜. 高效液相色谱-二极管阵列检测法同时测定丹参滴注液中四种水溶性成分的含量[J]. 分析科学学报,2010,26(1):109-111.
- [15] 韩宏星,宋志宏,屠朋飞. 迷迭香水溶性成分研究[J]. 中草药,2001,32(10):877-878.
- [16] 王新玲,热娜·卡斯木,早然木·尼亚孜,等. 新疆鼠尾草花化学成分的研究[J]. 新疆医科大学学报,2003,26(6):583-585.
- [17] 陈美云. 迷迭香高效无毒抗氧化剂的开发利用[J]. 林产化工通讯,2004,38(3):28-30.
- [18] SCOTT R P W. 现代液相色谱[M]. 天津:南开大学出版社,1992:1-21.
- [19] 王俊德,商振华,郁蕴璐. 高效液相色谱法[M]. 北京:中国石化出版社,1992:1-9.
- [20] 朱彭龄,云自厚,谢光华. 现代液相色谱[M]. 兰州:兰州大学出版社,1989:62-72,85-109.
- [21] 金恒亮. 高压液相色谱法[M]. 北京:原子能出版社,1987:55-83.
- [22] 梁振益,黄光民,张德拉,等. 反相液相色谱法测定迷迭香中鼠尾草酸的含量[J]. 食品科学,2005,26(4):203-205.
- [23] ERKAN N,AYRANCI G,AYRANCI E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol[J]. Food Chemistry,2008,110:76-82.
- [24] KUZMENKO A I,MOROZOVA R P,NIKOLENKO I A,et al. Chemiluminescence determination of the *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity of roseox and carnosic acid[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology. B,1999,48:63-67.
- [25] IBANEZ E,KUBATOVA A F,SENRANS J,et al. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosmary plant[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(2):375-382.
- [26] WANG H F,PROVAN G J,HELLIWELL K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC[J]. Food Chemistry,2004,87:307-311.
- [27] 吕岱竹,王明月,袁宏球,等. 高效液相色谱法测定迷迭香超临界提取物中的鼠尾草酸和鼠尾草酚[J]. 分析测试学报,2006,25(3):109-111.
- [28] 马淑红,代常亮. RP-HPLC法测定迷迭香提取物中鼠尾草酸的含量[J]. 临床医学,2007,7(8):20-22.
- [29] 唐丽琴,刘圣,李鑫,等. 高效液相色谱法测定枇杷叶提取物中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(12):725-726.
- [30] 宋玉兰. 不同采收期迷迭香中的鼠尾草酸含量的动态研究[J]. 黑龙江科技信息,2008,43(30):148.
- [31] 黄纪念,屠鹏飞,蔡同一. 超临界CO₂流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的工艺研究[J]. 中草药,2004,35(2):150-153.
- [32] OKAMURA N,FUJIMOTO Y,KUWABARA S,et al. High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* [J]. Journal of Chromatography A,1994,679:381-386.
- [33] ARUOMA O I,SPENCER J P,ROSSI R E,et al. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs[J]. Food and Chemical Toxicology,1996,34(8):449-456.
- [34] WADA M,KIDO H,OHYAMA K,et al. Evaluation of quenching effects of non-water-soluble and water-soluble rosemary extracts against active oxygen species by chemiluminescent assay[J]. Food Chemistry,2004,87:261-267.
- [35] LUIS J C,PEREZ R M,GONZALEZ F V. UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants[J].

- Food Chemistry, 2007, 101: 1211–1215.
- [36] DEBERSAC P, VERNEVAUT M F, AMIOT M T, et al. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver[J]. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39(2): 109–117.
- [37] PELILLO M, CUVELIER M E, BIGUZZI B, et al. Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection: The case of carnosic acid[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1023: 225–229.
- [38] WELLWOOD C R L, COLE R A. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, (*Rosmarinus officinalis* L.), accessions for optimization of antioxidant yield[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(20): 6101–6107.
- [39] MASUDA T, INABA Y, MAEKAWA T, et al. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21): 5863–5869.
- [40] 何默忠, 葛秀丹, 陈正收, 等. 反相高效液相色谱法测定迷迭香中鼠尾草酚、鼠尾草酸和熊果酸含量[J]. 上海医药, 2009, 30(10): 469–470.
- [41] FERRERES F, JUAN T, ARQUILLUE P, et al. Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 77: 506–510.
- [42] 魏泱, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术[J]. 色谱, 2000, 18(5): 394–401.
- [43] BICCHI C, BINELLO A, RUBIOLO P. Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis[J]. Phytochemical Analysis, 2000, 11: 236–242.
- [44] BACKLEH M, LEUPOLD G, PARLAR H. Rapid quantitative enrichment of carnosic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(5): 1297–1301.
- [45] 卢佩章, 张玉奎, 梁鑫淼. 高效液相色谱法及其专家系统[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1992: 302–428, 636–654.
- [46] TENA M T, HIDALGO P J, UBERA J L. Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: comparison with liquid solvent sonication[J]. Analytical Chemistry, 1997, 69(3): 521–526.
- [47] NINOMIYA K, MATSUDA H, SHIMODA H, et al. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, 26(14): 1943–1946.
- [48] RAVID U, PUTIEVSKY E, KATZIN I, et al. Identification of 1R(+)-verbenone in essential oils of *Rosmarinus officinalis* L.[J]. Flavour and Fragrance Journal, 1997, 12: 109–112.
- [49] LEAL P F, BRAGA M M, SATO D N, et al. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(9): 2020–2525.
- [50] PINTORE G, USAI M, BRADESI P, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from sardinia and corsica[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2002, 17: 15–19.
- [51] IBANEZ E, CIFUENTES A, CREGO A L, et al. Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(9): 4060–4065.
- [52] 潘利明. 迷迭香超临界 CO₂ 提取物含量测定的初步研究[J]. 云南中医学院学报, 2005, 28(4): 30–32.
- [53] KALOUSTIAN J, PORTUGAL H, PAULI A M, et al. Chemical, chromatographic, and thermal analysis of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2002, 83(4): 747–756.
- [54] 杨海麟, 鲁时瑛, 杨胜利, 等. 迷迭香抗氧化剂的提取方法研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(4): 20–23.
- [55] LEE J W, PARK K S, KIM J G, et al. Combined effects of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2005, 72(1): 49–56.
- [56] KAHKONEN M P, HOPIA A I, VUORELA H J, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 3954–3962.
- [57] DORMAN H J D, PELTOKETO A, HILTUNEN R, et al. Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs[J]. Food Chemistry, 2003, 83: 255–262.
- [58] ESCALANTE A S, DJENANE D, TORRESCANO G, et al. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere[J]. Meat Science, 2001, 58: 421–429.