

冬青油真伪鉴别方法研究

陆燕¹, 许鹏翔², 刘秋金¹, 曹建平¹

(1. 广东石油化工学院 生物与食品工程学院, 广东 茂名 525000; 2. 厦门大学 化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 通过比较傅里叶变换红外光谱技术(FTIR)、气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)、核磁共振波谱技术(NMR)、气相色谱-燃烧-稳定同位素质谱技术(GC-C-IRMS), 建立了有效鉴别天然冬青油的方法。FTIR结果表明, 样品均含有天然冬青油的官能团; GC-MS结果表明其主要成分均为水杨酸甲酯; 而NMR定性结果显示样品均为水杨酸甲酯的C、H结构, 并利用核磁共振对样品进行了绝对定量; 碳、氢稳定同位素测定结果显示天然冬青油、冬青油的 δD 、 $\delta^{13}C$ 值偏负, 合成水杨酸甲酯、疑似合成冬青油的 δD 、 $\delta^{13}C$ 值偏正。结果表明, 稳定同位素质谱技术可以有效鉴别天然冬青油。

关键词: 天然冬青油; 水杨酸甲酯; 掺伪; 鉴别

中图分类号: O656.21

文献标识码: A

文章编号: 2095-2562(2019)06-0073-05

冬青油, 也称白珠木油, 主要成分为水杨酸甲酯, 通常采用水蒸气蒸馏法, 从冬青树的叶子中提取获得, 有冬青香味, 味甜而辣。冬青油功效较多: 可用来制作香精, 也可制作化妆品^[1]; 具有快速缓解关节疼痛、肌肉疼痛、腰痛、扭伤、拉伤等功效, 在用针灸、推拿治疗偏头痛时可作为润滑剂使用, 还可用于治疗关节炎, 用来按摩小孩腹部可治疗小儿食滞腹痛^[2-5]; 作为促透剂可有效增加亲脂性和亲水性药物的透皮吸收^[6]; 在农业上可以用来抗菌、杀虫, 可用于杀死玉米黄呆蓟马、梭毒隐翅虫等^[7, 8]; 在惠特利三色染色技术中用来代替二甲苯可以大大提高检测灵敏度^[9, 10]。

由于冬青油用途广泛, 市场的需求量不断加大, 天然冬青油的价格一直居高不下。而冬青树资源有限, 且提取效率较低, 因此, 合成冬青油(水杨酸甲酯)的工艺应运而生, 并不断改良^[11, 12]。合成的纯水杨酸甲酯也常称为“冬青油”, 但是合成品毒性较大, 且两者价格相差悬殊。随着人们对于天然冬青油和合成冬青油的认识, 对产品要求的提高, 冬青油真伪鉴别技术的建立显得尤为重要。目前这方面的研究较少, 本文利用FTIR、GC-MS、NMR和GC-C-IRMS四种技术, 寻找有效的鉴别冬青油真伪的方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

仪器: 傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 6700, 美国 Thermo Scientific 公司); 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS-QP100 plus, 日本岛津公司); 核磁共振波谱仪(AVANCE III HD400, 德国 Bruker 公司); 气相色谱-燃烧-稳定同位素质谱(SerCon20-22, 英国 SerCon 公司); 100 μ L 微量移液器(unit/703970, 德国普兰德公司)。

试剂: 氘代氯仿(Sigma Aldrich); 氯仿(色谱纯, 美国 ACS 恩科化学公司); 氘代 DMSO- d_6 (99.99%, 上海泰坦科技股份有限公司)。

1.2 FTIR 测定条件

吸取 50 μ L 冬青油样品置于硅片上, 均匀涂抹成薄薄一层, 放入光谱仪的样品架上。固定光纤探头,

收稿日期: 2019-07-01; 修回日期: 2019-07-12

基金项目: 广东省普通高校特色创新项目(650465); 广东石油化工学院自然科学研究项目(513036)

作者简介: 陆燕(1978—)女, 江苏江阴人, 博士, 副教授, 主要从事发酵技术研究。

分辨率为 4 cm^{-1} , 温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 扫描次数为 32 次, 波长范围为 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, 仪器内置背景作为对照采集光谱。

1.3 GC-MS 测定条件

色谱柱: Rtx@-Wax ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$, 美国 Restek 公司); 进样口温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; 氦气流量 1 mL/min ; 吹扫时间 0.75 min ; 进样量 $0.1\text{ }\mu\text{L}$; 手动无分流进样。

柱温升温程序: 初始柱温 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$; 保持 1 min ; 以 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 升至 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$; 以 $2.5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 升至 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$; 以 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 升至 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

EI 离子源, 能量为 70 eV ; 接口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; 离子源温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$; 溶剂延迟时间为 5 min ; 扫描方式: Scan, 质量范围 $20\sim 450\text{ amu}$; 2014NIST 谱库。

1.4 NMR 测定条件

在恒温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 采用 zg30 脉冲序列获得核磁波谱。仪器参数设置如下: 谱宽 (SWH) 400.13 Hz , 采样次数 (NS) 16 次。

(1) 定性测定: 吸取 1 mL 氘代氯仿置于 5 mm 样品管中, 吸取适量样品加入样品管, 盖上样品盖, 振荡均匀。(2) 定量测定: 吸取 1 mL DMSO- d_6 于 5 mm 样品管中, 吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 内标氯仿加入样品管, 再吸取 $12\text{ }\mu\text{L}$ 样品加入样品管, 振荡摇匀, 待测。

根据样品和内标物的比例关系算出样品的量, 被测样品绝对含量的计算公式如下:

$$m_s = (A_s/A_R) \times (m_R/M_R) \times M_s \quad (1)$$

式中: m_s 和 m_R 分别为样品和内标物的质量; A_s 和 A_R 分别为样品信号峰和内标物特征峰的面积; M_s 和 M_R 分别为样品和内标物的相对分子质量。

1.5 GC-C-IRMS 测定条件

色谱柱: Rtx@-Wax ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$, 美国 Restek 公司); 进样口温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; 氦气流量 1 mL/min ; 进样量 $0.1\text{ }\mu\text{L}$; 全自动无分流进样。

柱温升温程序: 初始柱温 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$; 保持 1 min ; 以 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 升至 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$; 以 $2.5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 升至 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$; 以 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 升至 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

EI 离子源, 加速电压为 $HT2117\text{ V}$, 扫描范围为: $2086\sim 2146\text{ V}$; 灯电流 $Emission1580\text{ }\mu\text{A}$; 阱电压 $Trap600\text{ V}$; 氧化炉温度 $860\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 FTIR 分析

图 1 为 A-天然冬青油(已知)、B-冬青油、C-合成水杨酸甲酯(已知)、D-疑似合成冬青油四个样品的红外光谱图。

谱图中包含了很多物质的结构信息, 解析图谱可知, 四个样品红外谱图的光谱形状和基本位置没有太大差异, 只在特定波数下的吸光度有些差异。将所得各样品谱图与标准谱图进行对比, 发现主要吸收峰位置很接近, 特征区的吸光度差别不大。

查阅相关资料^[13], 总结了 $-\text{CH}_3$ 、 $\text{Ar}-\text{OH}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 、 $=\text{C}-\text{H}$ 、 $\text{C}=\text{C}$ 等基团的振动吸收频率, 如表 1 所示。在 $3400\sim 3245\text{ cm}^{-1}$ 范围内, 为酚羟基的伸缩振动; 在 $3100\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 范围内, 为苯环上的 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动; 在 2830 cm^{-1} 左右, 为甲基的对称伸缩振动; 在 1725 cm^{-1} 附近, 为酯羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动; 在 $1610\sim 1370\text{ cm}^{-1}$, 为苯环上 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动; 在 $1290\sim 1270\text{ cm}^{-1}$ 和 $1250\sim 1110\text{ cm}^{-1}$, 为芳香酸酯 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的反对称和对称伸缩振动。这说明四个样品均含有天然冬青油主成分水杨酸甲酯的官能团, 无法通过官能团的区别来有效鉴别天然冬青油。

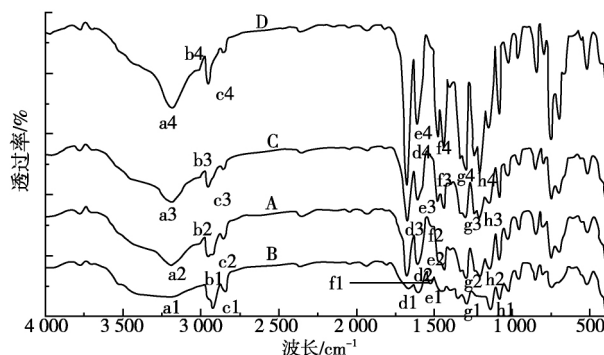


图 1 四个冬青油样品的红外光谱分析

表1 水杨酸甲酯的基团振动吸收频率

振动模式	振动频率/cm ⁻¹	备注
对称伸缩振动甲基—CH ₃	约 2830	和氧原子直接相连时,甲基的对称伸缩振动会向低频移动
伸缩振动 Ar—OH	3400~3245	单峰,峰型强且宽
伸缩振动 C=O	1725±5	与芳香环共轭的酯羰基(C=O),振动频率向低频移动
反对称和对称伸缩振动 C—O—C	1290~1270, 1250~1110	芳香酸酯的C—O—C反对称和对称伸缩振动都向高频移动
伸缩振动=C—H	3100~3000	吸收峰比较弱,峰个数、位置和强度与苯环上的取代基有关系
伸缩振动芳环 C=C	1610~1370	存在大共轭π键,振动力常数降低

2.2 GC-MS 分析

图2分别为:a-天然冬青油、b-冬青油、c-合成水杨酸甲酯、d-疑似合成冬青油的分子离子图。

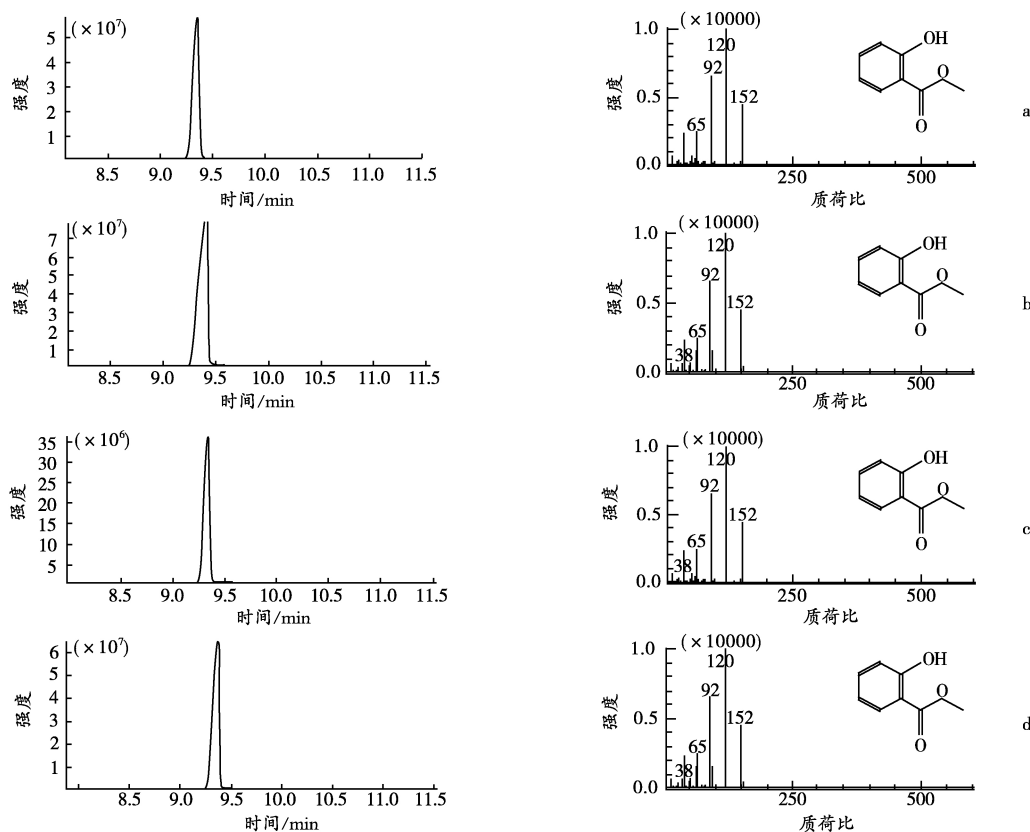


图2 四个冬青油样品的气相色谱-质谱分析

由图2的四组样品谱图可知,四个样品和标准谱图的比对结果相近,均为水杨酸甲酯,用GC-MS无法鉴别天然冬青油。

2.3 NMR 分析

1) 定性分析:对四个样品核磁定性测定,由图3天然冬青油和合成水杨酸甲酯碳谱图,与谱库水杨酸甲酯的标准核磁共振碳谱谱图比对,结果均显示冬青油主成分水杨酸甲酯的分子量为152。

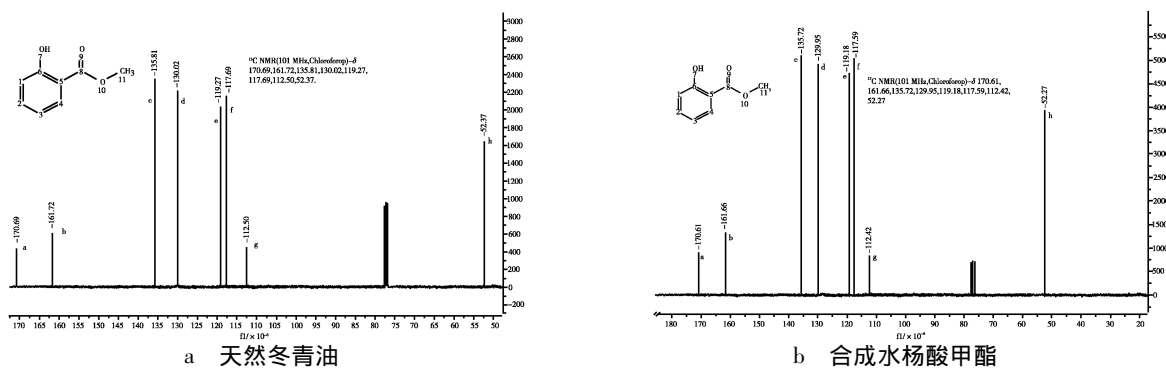


图3 天然冬青油和合成水杨酸甲酯的核磁共振碳谱分析(¹³C-NMR)

由图 4 天然冬青油和合成水杨酸甲酯氢谱图 与谱库水杨酸甲酯的标准核磁共振氢谱谱图比对 结果显示两者基本无差别。

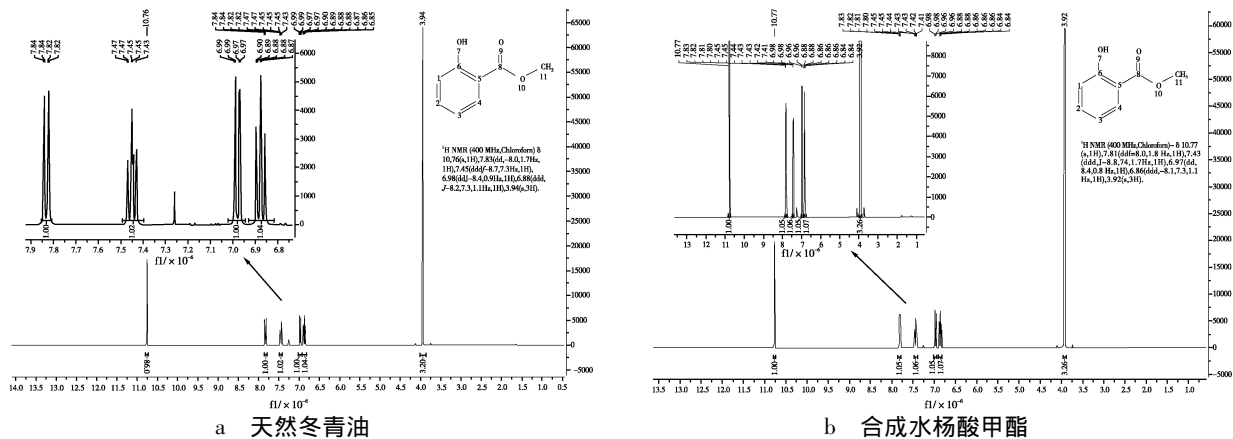


图 4 天然冬青油和合成水杨酸甲酯的核磁共振氢谱分析(¹H-NMR)

2) 定量分析: 分别对天然冬青油、冬青油、合成水杨酸甲酯、疑似合成冬青油四个样品进行了核磁定量测定。图 5 为天然冬青油的核磁共振氢谱定量分析。

由图 5 天然冬青油的定量氢谱图可知,选择内标物 CHCl₃ 的特征 a 峰;选择 b 峰作为样品定量峰,根据 a、b 峰的面积比计算样品的量。由公式(1) 分别可算出 12 μL 天然冬青油、冬青油、合成水杨酸甲酯和疑似合成冬青油的样品中水杨酸甲酯的质量分别为 0.0309 g, 0.0230 g, 0.0223 g, 0.0187 g。在相同条件下,天然冬青油的绝对含量最高,冬青油的绝对含量次之,接着是合成水杨酸甲酯,疑似合成冬青油的绝对含量最低,说明核磁共振氢谱可对冬青油样品进行定量测定,但无法有效区分天然冬青油和掺伪冬青油。

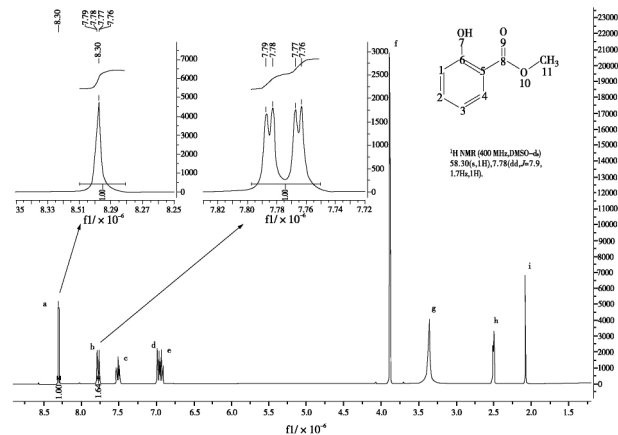


图 5 天然冬青油的核磁共振氢谱定量分析(¹H-NMR)

2.4 GC-C-IRMC 分析

以碳同位素组成为横坐标,以氢同位素组成为纵坐标,绘制碳、氢同位素组成相对比例图(见图 6)。

天然冬青油的 δD、δ¹³C 值偏负,合成水杨酸甲酯的 δD、δ¹³C 值偏正,疑似合成冬青油的 δD、δ¹³C 值相对于合成水杨酸甲酯的 δD、δ¹³C 值偏负。可能是因为疑似合成冬青油中掺入了一些天然冬青油,使数值偏负,说明疑似合成冬青油可能是掺假冬青油。A 区域为天然冬青油和冬青油的 δD、δ¹³C 范围,B 区域为合成水杨酸甲酯和疑似合成冬青油 δD、δ¹³C 值的范围。所以,当 δD、δ¹³C 测定值落在 A 区域,则说明样品为天然冬青油,当 δD、δ¹³C 测定值落在 B 区域,则说明样品为掺假冬青油,因此能区分出掺伪冬青油。

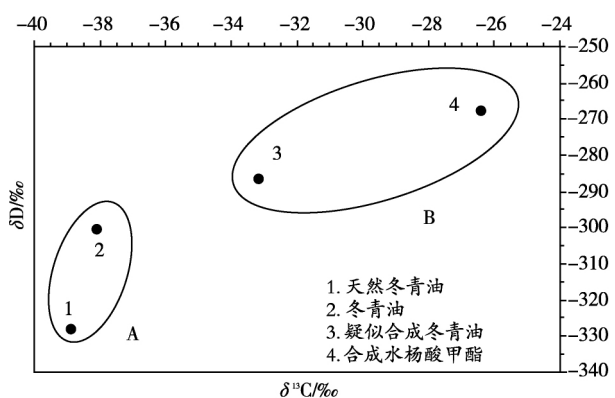


图 6 四个样品的 δD、δ¹³C 相对比例

3 结论

(1) 利用 FTIR 对冬青油样品进行鉴别,结果表明,四个样品均显示水杨酸甲酯特征吸收峰,无法有效区分天然冬青油和掺伪冬青油。(2) 利用 GC-MS 对四个样品进行鉴定,结果显示其主成分均为水杨酸甲酯,无法有效区分天然冬青油和掺伪冬青油。(3) 利用 NMR 对四个样品进行了定性和定量分析。定性结

果显示,四个样品的碳谱谱图中均含有水杨酸甲酯的8个C结构特征峰,氢谱中均含有水杨酸甲酯氢结构的特征峰,无法通过核磁共振定性分析判别掺伪冬青油;定量结果显示,天然冬青油的含量最高,合成冬青油的含量最低。因此,NMR仅可对冬青油样品进行定量测定,但无法有效鉴别天然冬青油。(4)利用GC-C-IRMS对四个样品的 δD 、 $\delta^{13}C$ 进行测定,结果发现,天然冬青油 δD 、 $\delta^{13}C$ 值偏负,合成水杨酸甲酯的 δD 、 $\delta^{13}C$ 值偏正,两者有较大差异,由此样品测定的 δD 、 $\delta^{13}C$ 值可区分出天然冬青油和掺伪冬青油。

[参考文献]

- [1] ABDULAZIZ MS A, COLLEEN F, GIDEON K. Toxicology and teratology of the active ingredients of professional therapy muscledcare products during pregnancy and lactation: a systematic review [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015 (15): 40-50.
- [2] SHUBHASHRI K, ANIL K N. Monitoring of functional blood flow on human hand due to effect of different treatments by laser biospeckle imaging [J]. Lasers in Medical Science, 2019(6): 1167-1176.
- [3] GUO Q, HUA Y, WANG H, et al. Therapeutic effect observation on combining electroacupuncture and tuina for migraine [J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2014(3): 174-179.
- [4] FAN Y, GONG L, YAN J, et al. Clinical observation on treatment of knee osteoarthritis by acupuncture and tuina therapy [J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2010(6): 390-393.
- [5] 刘丽贞, 漆丽娟. 冬青油腹部按摩治疗小儿食滞腹痛疗效观察 [J]. 护理学杂志, 2009(15): 47-48.
- [6] 高学成, 仝燕. 冬青油促进蛇床子素和桅子苷透皮吸收的研究 [J]. 中国中药杂志, 2017(7): 1338-1343.
- [7] SEENIVASAN P, MANICKKAM J, SAVARIMUTHU I. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2006(6): 39-46.
- [8] YASUSHI H, SATOSHI S, YOSHIFUMI M. House dust mites and their sensitivity to wood oils and volatiles [J]. Journal of wood science, 2008(1): 1-9.
- [9] TENGKU S A, SITI N A, FATMAH M S, et al. Molecular epidemiology of giardiasis among orang asli in Malaysia: application of the triosephosphate isomerase gene [J]. BMC Infectious Diseases, 2014(14).
- [10] SALLEH F M, ANUAR T S, YASIN A M, et al. Wintergreen oil: a novel method in Wheatley's trichrome staining technique [J]. Journal of microbiological methods, 2012(1): 174-178.
- [11] ROBERT J S. The chemistry of detergent perfumery [J]. The Journal of the American Oil Chemists' Society, 1968(6): 429-432.
- [12] 补朝阳. 水杨酸甲酯的合成新工艺 [J]. 化学研究, 2017(4): 449-452.
- [13] 翁诗甫. 傅里叶变换红外光谱仪 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

Research on Identification of Wintergreen Oil

LU Yan¹, XU Pengxiang², LIU Qiuji¹, CAO Jianping¹

(1. Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China;

2. Chemistry and Chemical Engineering Institute, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The approach to identification of wintergreen oil is established by comparing FTIR, GC-MS, NMR, and GC-C-IRMS. The results of FTIR indicate that the functional groups of wintergreen oil are found in all samples. Methyl salicylate is the principal component of the samples, which is indicated by the results of GC-MS. C and H structures of methyl salicylate are discovered by analyzing the qualitative results of NMR, and quantitative analysis by NMR is carried out. The results of C and H measurement by GC-C-IRMS show that the values of δD and $\delta^{13}C$ of natural wintergreen oil and wintergreen oil are negative, and the values of δD and $\delta^{13}C$ of synthetic methyl salicylate and suspected synthetic wintergreen oil are positive. So GC-C-IRMS can be used to effectively identify natural wintergreen oil.

Key words: natural wintergreen oil; methyl salicylate; adulteration; identification

(责任编辑:柳丰)