

食用地衣硬枝树花的香气成分分析*

作者

中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650201
..... 李志坚 张红霞 王立松 杜芝芝[#]

作者简介

李志坚(1973—),男,博士,高级工程师,主要从事科研项目管理及民族植物学研究。

[#]通讯作者:杜芝芝(1974—),女,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事药用与香料植物研究、天然香料及化妆品研发。

联系电话:0871-65223224

E-mail: duzhizhi@mail.kib.ac.cn

摘要

采用柱色谱法分离硬枝树花有机溶剂提取物,通过闻香试纸条香气评价与气相色谱-质谱/嗅觉检测器(GC-MS/O)联用技术,追踪并定位了硬枝树花提取物中的主要香气成分。利用GC-MS分析,结合正构烷烃保留指数对主要香气成分进行了鉴定,揭示了硬枝树花的特征性香气成分为2,4-二羟基-3,6-二甲基苯甲酸甲酯,该香气成分与香水行业广泛使用的被称为“橡苔”的地衣提取物中的典型香气化合物相同,为云南特色食用地衣硬枝树花的开发利用提供参考依据。

关键词

食用地衣 气相色谱-质谱/嗅觉检测器联用方法 香气成分 2,4-二羟基-3,6-二甲基苯甲酸甲酯

Analytical Study on Aroma Components in Edible Lichen *Ramalina conduplicans* Vain.*

LI Zhijian ZHANG Hongxia WANG Lisong DU Zhizhi[#]

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, Yunnan, China)

Abstract: The organic solvent extract of *Ramalina conduplicans* Vain. had been separated by column chromatography. Each fraction was evaluated by smelling strips analysis and GC-MS/Olfactometry (GC-MS/O), the main aroma components in them were traced. They were analyzed by GC-MS with Kovats index. The result showed that the most characteristic aroma component was 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid methyl ester (syn: methyl β -orcinolcarboxylate), and it presented the typical odor of the lichen extract. The same aroma component was also reported as the typical odor component in “oakmoss” lichens which were used widely in perfumery.

Key words: edible lichen GC-MS/O aroma component 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid methyl ester

地衣是共生菌(mycobiont)与共生藻(photobiont)互惠共生而形成的一类特化真菌。事实上,地衣是一个生态学的概念,每一个地衣就是一个微型生态系统^[1]。其分类系统地位属于共生群落中地衣型真菌的分类地位,目前全球已知地衣约3万种^[2],其中中国已知的约有2500种。我国民间药用及食用地衣的历史悠久,目前中国已知的食用、药用地

衣多达126种^[1]。地衣在不同国家还被广泛应用于香料和染料工业。

一些地衣种类由于具有特殊的香味而被广泛应用于香水工业中,最常用的有2种地衣的提取物,一种主要是从橡树上收集的 *Evernia prunastri* (梅衣科 Parmeliaceae),通常被称为“橡苔(oakmoss)”;另外一种被称为“雪松苔(cedarmoss)”特指主要生长在雪松上的地衣 *Pseudevernia furfuracea*。除此之外,其他种类例如树花科地衣 *Ramalina fraxinea* (L.) 有时也与 *Usnea caucasica* Vain. 掺

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(基金号:31370069)

收稿日期:2015-04-29;修回日期:2015-05-29

合在一起被用于工业提取,这 2 种地衣都主要生长在山毛榉树(*Fagus spp.*)上。有人把从除 *E. prunastri* 和 *P. furfuracea* 外的任何地衣提取得到的提取物统称为“树苔(*treemoss*)”香膏^[3]。

地衣提取物的香气通常被归于“木香(*woody*)”和“青香(*green*)”的范畴,真正的橡苔浸膏具有典型的海藻(*seaweed*)和海洋(*marine*)气息,深受调香师的喜爱。香水工业中使用橡苔提取物已经有近一个世纪的历史,针对其化学成分等方面的研究也比较深入,已报道从中发现了 170 多种化合物。而对于雪松苔的化学成分也报道了超过 90 种化合物。目前,法国每年提取大约 700 t 的橡苔^[4]。

通过对云南省民间特色食用植物的调查,发现地衣是一类非常特殊的食用植物,特别是被称为“树花”或“石花菜”的地衣在云南省内不同地区及不同民族中都有食用历史。其中主要生长于灌木枝、树干及枯枝上的树花科(*Ramalinaceae*)硬枝树花(*Ramalina conduplicans* Vain.) 不仅被广泛用作蔬菜食用,未加工的这种地衣本身也具有特殊的香气。据文献检索,发现目前还没有关于硬枝树花香气研究方面的报道,为了弄清该植物中所含的主要致香物质,本文对硬枝树花提取物的香气成分进行了研究。

1 试验部分

1.1 仪器与材料

GC-MS/O 系统包括美国 Agilent 公司的 7890A 气相色谱仪、5975 质谱仪,以及 Gerstel 公司的 Odor Detection Port (ODP2) 嗅觉检测器。

正己烷、乙酸乙酯、乙醇,分析纯,天津大茂化学试剂厂;快速柱色谱,Biotage 公司;薄层层析(TLC)用正相硅胶板 GF-254,青岛海洋化工厂;正构烷烃($C_8 \sim C_{30}$)标准溶液,1 mg/mL,美国 Sigma-Aldrich 公司。

样品采集于云南省宾川县鸡足山,由中科院昆明植物研究所王立松高级工程师鉴定为硬枝树花(*Ramalina conduplicans* Vain.),标本存放于中国科学院昆明植物研究所标本馆(KUN26144)。

1.2 条件和方法

1.2.1 样品的提取和分离

将 30 g 粉碎后的树花干样品用 500 mL 乙醇-正己烷(体积比 20:80)于索氏提取器中 85 °C 回流提取 7 h,浓缩提取液后得提取物 800 mg。

将以上提取物溶于 5 mL 10% (体积分数)的乙酸乙酯-正己烷中,可溶部分用于柱色谱分离,提取物被加到硅胶 60(SiO_2 , 粒径 40 ~ 63 μm)的快速

柱色谱(4 cm × 14 cm)上,用乙酸乙酯-正己烷进行梯度洗脱(体积分数 10%、20% 各 500 mL),之后用 200 mL 乙醇、200 mL 98% (体积分数)的甲醇水溶液进行洗脱,共收集 29 份馏分。把从柱层析接收的 29 份洗脱液分别蘸到闻香试纸条,待试纸条上的溶剂挥发后利用人体嗅觉感官对各馏分样品的气味进行评价,找到具有特征树花香气的柱层析分离馏分;同时对每一洗脱馏分都进行薄层层析(TLC)检测。根据 TLC 检测结果并结合气味评价将洗脱液合并为 11 份(Fr. A ~ Fr. K),分别用旋转蒸发仪浓缩除去有机溶剂并称重。将这 11 份样品分别溶于 2 mL 正己烷-丙酮溶液中,备用,或稀释到质量分数 10% 用于 GC 或 GC-MS/O 检测。

1.2.2 各馏分样品的 GC-MS/O 分析

将前述柱层析中合并后的馏分 Fr. A ~ Fr. J 用于 GC-MS 或 GC-MS/O 分析,寻找其中所含的主要气味化合物。

色谱柱为 HP-5 毛细管柱(50 m × 0.2 mm × 0.33 μm),载气为高纯氦气,同时使用质谱的 MS 和气相色谱的 FID 以及 ODP2 检测器。FID 检测器的温度为 300 °C,MSD 传输线的温度为 280 °C,进样器温度为 225 °C。柱温箱起始温度为 50 °C,之后以 5 °C/min 的速率升至 250 °C 并保持 10 min。数据的记录及处理通过 MSD ChemStation 软件完成。

保留指数(Kovats index, KI)的测定是将正构烷烃混合标样按前述条件进行 GC-MS 分析,记录各正构烷烃保留时间,采用线性升温公式计算各组分的 KI 值。

2 结果与讨论

在硬枝树花香气成分的研究中,利用人体嗅觉感官直接对闻香试纸条上的样品气味进行初步评价,分别对从柱层析接收的 29 份洗脱液的气味进行评价,结果见表 1。

从这 29 份洗脱液中找到具有特征树花香气的柱层析分离馏分。根据气味评价以及薄层层析分析的结果,将这些洗脱液合并为 11 份(Fr. A ~ Fr. K),各馏分合并情况等相关信息见表 2。合并后的馏分 Fr. E 具有强烈的橡苔、海藻和海洋气味,因此进一步通过 GC-MS/O 仪器分析对此部分样品进行气味活性追踪并分析其中所含的主要挥发性成分。

在气相色谱柱对样品进行分离的同时,通过嗅觉检测器嗅闻每一个被分离出来的成分,并在气相色谱图中对有香气的色谱峰进行标记,在线检测完成之后再利用质谱数据对各成分峰、特别是有标记的峰进行鉴定,从而得到被检测样品中的主要致香成分。

表 1 硬枝树花提取物柱层析馏分气味评价

洗脱液编号	气味描述
1	None(无味)
2	Weak metallic(微金属味)
3	Weak(微有味)
4	Heliotropin like(像胡椒醛味)
5	None(无味)
6	None(无味)
7	None(无味)
8	None(无味)
9	None(无味)
10	Oakmoss(橡苔味)
11	Strong oakmoss marine(浓烈的橡苔及海洋味)
12	Strong oakmoss seaweed(浓烈的橡苔及海藻味)
13	Strong oakmoss marine(浓烈的橡苔及海洋味)
14	Oakmoss woody(橡苔味和木香味)
15	Strong bitter metallic phenolic(浓烈的苦金属酚味)
16	Strong bitter metallic phenolic dried lichen smell , weak marine(浓烈的苦金属酚味、干地衣味、微有海洋味)
17	Dry , metallic (stone like) dried lichen smell(像石头金属味、地衣味)
18	Weak dry lichen smell(微有干地衣味)
19	Weak lichen , oakmoss(微有干地衣味、橡苔味)
20	Weak mossy earthy(微有青苔土味)
21	Weak mossy(微有青苔味)
22	Oakmoss earthy(橡苔土味)
23	Oakmoss earthy(橡苔土味)
24	Weak oakmoss(微橡苔味)
25	Weak oakmoss woody(微橡苔味、木香味)
26	Weak oakmoss woody(微橡苔味、木香味)
27	Weak oakmoss woody(微橡苔味、木香味)
28	Weak oakmoss woody(微橡苔味、木香味)
29	Weak oakmoss woody(微橡苔味、木香味)

表 2 硬枝树花提取物柱层析馏分合并情况

馏分代号(Fr.)	合并洗脱液编号	样品质量 /mg	溶液体积 /mL	检测样品质量分数 /%	分析方法
A	No. 1 ~ 3	106.4	2	10	GC-MS
B	No. 4	1.4	2	100	GC-MS
C	No. 5 ~ 9	4.6	2	100	GC-MS
D	No. 10	206.0	2	100	GC-MS/O
E	No. 11 ~ 13	5.5	2	100	GC-MS/O
F	No. 14	4.8	2	100	GC-MS
G	No. 15 ~ 16	80.8	2	10	GC-MS/O
H	No. 17 ~ 19	87.4	2	10	GC-MS/O
I	No. 20 ~ 23	39.0	2	100	GC-MS/O
J	No. 24 ~ 26	112.3	2	10	GC-MS
K	No. 27 ~ 29	43.2	2	100	无

通过 GC-MS/O 分析的标记在 Fr. E 中找到了主要的致香成分,各成分的鉴定是通过其质谱碎片与数据库中的质谱数据进行比较,并与文献的保留指数(KIs) 进行比对^[5]而实现的。这个被标记的香气成分的质谱图如图 1 所示,这一成分被鉴定为 2 ,

4-二羟基-3 ,6-二甲基苯甲酸甲酯(2 ,4-Dihydroxy-3 ,6-dimethylbenzoic acid methyl ester ,又名 Atraric acid、Methyl β -orcinolcarboxylate、Veramoss 等) 。从馏分 Fr. E 中鉴定出的主要挥发性成分记录于表 3。

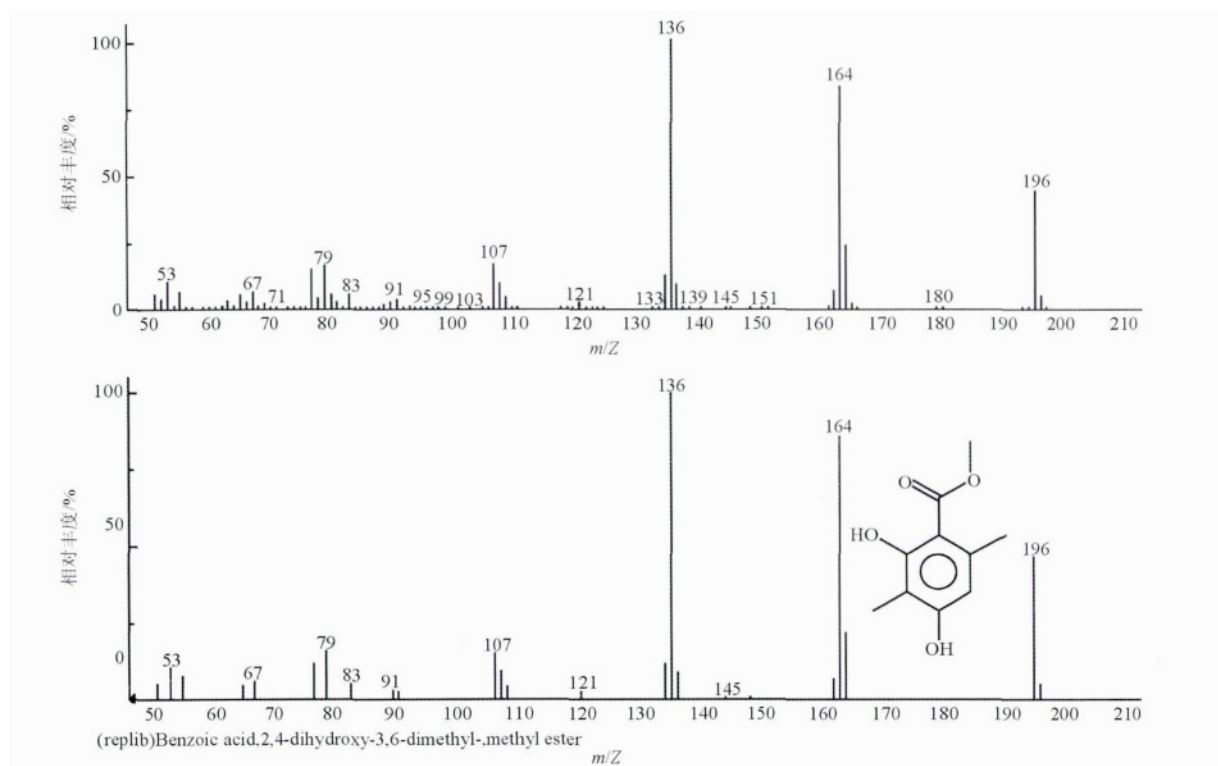


图 1 硬枝树花主要致香成分及对应的数据库中化合物质谱图

表 3 硬枝树花提取物柱层析馏分 Fr. E 中主要挥发性成分

挥发性成分	KI ^a	KI ^b	峰面积相对百分比/%
1-3-辛烯醇/Oct-1-en-3-ol	970	969	2.000
苯乙醚/Phenetole	971	969	1.840
1-8-桉树脑/1-8-Cineole	1 033	1 031	0.345
十一烷/Undecane	1 100	1 100	0.081
壬醛/Nonanal	1 104	1 100	0.163
2,6-二甲基环己-2-烯-1,4-二酮/2,6-Trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione	1 143	1 140	0.315
十二烷/Dodecane	1 200	1 200	0.417
乙酸龙脑酯/Bornyl acetate	1 293	1 288	0.001
十四烷/Tetradecane	1 400	1 400	0.652
紫罗兰醇/Ionol	1 440	1 430	0.078
2,4-二羟基-3,6-二甲基苯甲酸甲酯/Methyl 3,6-dihydroxy-2,4-dimethylbenzoate	1 732	1 728	54.881
5-庚基-1,3-苯二酚/5-Heptyl-1,3-benzenediol	1 842	1 831	4.974

^a: 计算得到的保留指数值; ^b: 文献[5-6]报道的保留指数参考值

3 结论

本研究采用柱色谱分离结合气相色谱-质谱/嗅觉检测器(GC-MS/O)联用的分析方法,追踪并定位了硬枝树花提取物中的主要致香成分。揭示了硬枝树花中主要的特征性香气成分为化合物 2,4-二羟基-3,6-二甲基苯甲酸甲酯,该香气成分与文献报道的香水行业中广泛使用的另一种被称为“橡苔”的地衣提取物的典型香气化合物相同^[4]。本研究可为云南特色食用地衣硬枝树花资源的开发利用提供依据。

参考文献

- [1] 王立松,钱子刚. 中国药用地图鉴[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2013.
- [2] NASH III T H. Lichen biology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- [3] JOULAIN D, TABACCHI R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 2: Treemoss [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2009, 24(3): 105-116.
- [4] JOULAIN D, TABACCHI R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: Oakmoss [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2009, 24(2): 49-61.
- [5] ADMAS R P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry [M]. 4th ed. Carol stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- [6] US National Institute of Standards and Technology. NIST Mass spectral library: Version 2.0 [CP]. Gaithersburg, MD: 2008.