



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104101677 B

(45) 授权公告日 2016.06.15

(21) 申请号 201410383802.5

(22) 申请日 2014.08.07

(73) 专利权人 福建中烟工业有限责任公司  
地址 361012 福建省厦门市思明区莲岳路  
118号中烟工业大厦

(72) 发明人 邓其馨 黄朝章 张建平 苏明亮  
刘江生 谢卫

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038  
代理人 苏红梅

(51) Int. Cl.  
G01N 30/88(2006.01)

(56) 对比文件  
US 2005/0064076 A1, 2005.03.24,  
JP 特开 2006-90886 A, 2006.04.06,  
孙汉董等. 香叶油的化学成分.《云南植物研  
究》.1985, 第7卷(第2期), 第233~237页.  
席海为等. 高效液相色谱法对化妆品中17种  
致敏原的同时测定.《分析测试学报》.2010, 第  
29卷(第1期),  
姚卫蓉等. 玫瑰花中键合态和游离态组分的

分析.《食品科学》.2007, 第28卷(第11期),  
第487~492页.

王颖等. 香料前体香叶醇-β-D-葡萄糖苷的  
合成、纯化与表征.《食品与机械》.2006, 第22卷  
(第3期), 第47~50页.

E.Schievano等. Identification of wine  
aroma precursors in Moscato Giallo grape  
juice:A nuclear magnetic resonance and  
liquid chromatography-mass spectrometry  
tandem study.《Talanta》.2013, 第116卷第  
841~851页.

审查员 王方

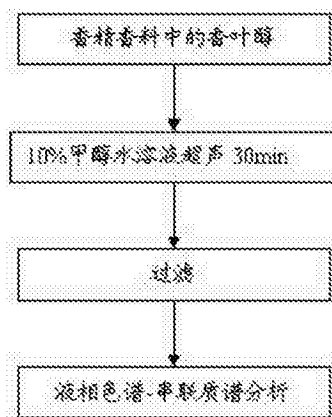
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

液相色谱串联质谱法测定香精香料中香叶醇  
的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种香精香料中香叶醇的检测方  
法,该方法采用液相色谱串联质谱法测定,采用  
外标法定量。该检测方法具有检测时间短、操作  
简便、灵敏度高、回收率高及重复性好等优点,该  
方法色谱条件使得香叶醇的色谱峰与杂质色谱  
峰分离较好,并且具有较好的线性范围,检测限为  
0.001 μg/mL,回收率在90.8%~98.3%之间,相  
对标准偏差RSD<5%(n=6)。



1. 一种香精香料中香叶醇的检测方法,该方法采用液相色谱串联质谱法测定,采用外标法定量,包括以下步骤:

(1)标准溶液的配制:称取香叶醇标准品,用甲醇配制成具有浓度梯度的香叶醇标准工作溶液;

(2)样品溶液的制备:使用甲醇萃取香精香料样品中的香叶醇,过滤后得到样品溶液,萃取用的甲醇为浓度为8~12v/v%甲醇水溶液;

(3)液相色谱-串联质谱分析:利用液相色谱-串联质谱仪分别对标准溶液和样品溶液进行检测分析;

(4)绘制标准曲线,计算烟用香精香料中香叶醇的含量,

其中液相色谱的分析条件为:采用C18色谱柱,流动相:A为乙腈,B为5mmol/L乙酸铵溶液,该乙酸铵溶液中含有0.1v/v%乙酸,采用等度洗脱程序,体积比50:50,流速为0.1~0.3ml/min;

质谱的分析条件为:用电喷雾离子阱串联质谱测定香叶醇,离子源:电喷雾电离源(ESI);以选择离子对定性,离子对为:定性离子对 $m/z$  155.3>73.1,155.3>127.1,定量离子对 $m/z$  155.3>73.1。

2. 权利要求1的检测方法,其中所述的香精香料为烟用香精香料。

3. 权利要求1的检测方法,其中,萃取用的甲醇为浓度为10v/v%甲醇水溶液。

4. 权利要求1的检测方法,其中萃取的方式为超声萃取。

5. 权利要求1的检测方法,其中所述的香精香料样品的制备过程如下:称取适量待测香精香料样品,加入适量甲醇水溶液,室温下超声萃取,过滤后,得到样品溶液。

6. 权利要求1的检测方法,其中液相色谱的分析条件为以下(i)至(v)中的一项或多项:

(i)所述的色谱柱的规格为50mm×2.1mm i.d.,2.6μm粒径,

(ii)色谱柱温度为30℃,

(iii)进样量为8~12μL,

(iv)流速为0.2ml/min,

(v)洗脱时间10min。

7. 权利要求6的检测方法,其中进样量为10μL。

8. 权利要求1的检测方法,其中质谱的分析条件为:扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM);电喷雾电压:5500V;离子源温度:700℃;辅助气Gas1压力:60psi;辅助气Gas2压力:50psi;去簇电压(DP):40V;碰撞能(CE):20V。

9. 权利要求1的检测方法,其中色谱柱采用菲罗门C18液相色谱柱,色谱柱温度为30℃,进样量为10μL,流速为0.2ml/min;洗脱时间总共10min。

10. 权利要求2的检测方法,其中外标法所用的标准溶液的配制步骤如下:称取0.1g香叶醇,精确至0.0001g,用甲醇溶解后转移至1000mL容量瓶中并定容,定为标准储备液;分别移取0.01mL,0.05mL,0.1mL,0.5mL,1.0mL的标准储备液到100mL容量瓶中,用浓度为10v/v%甲醇水溶液定容,则香叶醇的浓度分别为0.01μg/mL、0.05μg/mL、0.1μg/mL、0.5μg/mL、1.0μg/mL,得到香叶醇的系列标准溶液。

## 液相色谱串联质谱法测定香精香料中香叶醇的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学检测技术领域,涉及香叶醇的测定方法,具体地说是一种通过液相色谱-串联质谱法快速测定香精香料中香叶醇的方法。

### 背景技术

[0002] 香叶醇(Geraniol,反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)别名牻牛儿醇、香天竺葵醇,是一种单萜烯醇,天然存在于玫瑰草油(含量80%左右)、香叶油、茉莉油等250多种植物中,具有类似玫瑰花香,是香料的常用主香剂,广泛应用于药物、烟草、食品配料等领域。在卷烟香味中起到重要的作用,是最为常见的烟用香料,可以增加卷烟的玫瑰香气、甜香,过多则会产生皂香和花香。

[0003] 目前,对香叶醇的检测方法主要是气质联用法(GC-MS)。但香精香料样品成分复杂,用气质联用法(GC-MS)将目标物和干扰物基线分离需要较长的分析时间,且前处理步骤繁琐。

[0004] 近年来,随着液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)技术的发展,LC-MS/MS技术在化合物分析中得到广泛的应用。液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)分析技术无论在灵敏度上还是选择性上都具有明显的优势,且分析时间较短。检测香精香料中香叶醇的LC-MS/MS方法未见报导。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种准确检测香精香料中香叶醇含量的方法。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 一种香精香料中香叶醇的检测方法,该方法采用液相色谱串联质谱法测定,采用外标法定量。

[0008] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法包括以下步骤:

[0009] (1)标准溶液的配制:称取香叶醇标准品,用甲醇配制成具有浓度梯度的香叶醇标准工作溶液;

[0010] (2)样品溶液的制备:使用甲醇萃取香精香料样品中的香叶醇,过滤后得到样品溶液;

[0011] (3)液相色谱-串联质谱分析:利用液相色谱-串联质谱仪分别对标准溶液和样品溶液进行检测分析;

[0012] (4)绘制标准曲线,计算烟用香精香料中香叶醇的含量。

[0013] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中所述的香精香料为烟用香精香料,优选地,所述的香精香料样品使用甲醇萃取样品中的香叶醇;优选地,萃取用的甲醇为浓度为8~12%(v/v)甲醇水溶液,更优选地,萃取用的甲醇为浓度为10%(v/v)甲醇水溶液。

[0014] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中萃取的方式为超声萃取。

[0015] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中步骤(2)所述的样品溶液的制备过程如下:称取适量待测香精香料样品,加入适量甲醇水溶液,室温下超声萃取,过滤后,得到样品溶液。优选的过滤方式采用微孔滤膜过滤,例如0.22 $\mu$ m有机滤膜或0.45 $\mu$ m有机滤膜。

[0016] 在一个具体的实施方案中,所述香精香料样品的制备方法具体为:称取0.1g左右试样,置于25mL锥形瓶中;加入10%(v/v)甲醇水溶液10mL,室温下超声30min,用0.22 $\mu$ m有机滤膜过滤后直接进样。

[0017] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中液相色谱的分析条件为以下(i)至(vi)中的一项或多项:

[0018] (i)采用C18色谱柱,

[0019] 优选地,所述的色谱柱的规格为50mm $\times$ 2.1mm i.d.,2.6 $\mu$ m粒径,

[0020] (ii)色谱柱温度为28~32 $^{\circ}$ C,优选为30 $^{\circ}$ C,

[0021] (iii)进样量为8~12 $\mu$ L,优选为10 $\mu$ L,

[0022] (iv)流动相:乙腈-乙酸铵-乙酸-水溶液,

[0023] 优选的流动相:A为乙腈,B为5mmol/L乙酸铵溶液(其中含有0.1%(v/v)乙酸),采用等度洗脱程序,体积比50:50,

[0024] (v)流速为0.1~0.3ml/min,优选为0.2ml/min,

[0025] (vi)洗脱时间约10min。

[0026] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中质谱的分析条件为以下(i)至(iii)中的一项或多项:

[0027] (i)用电喷雾离子阱串联质谱测定香叶醇;

[0028] (ii)离子源:电喷雾电离源(ESI);

[0029] (iii)以选择离子对定性,优选的离子对为:子离子73.1(m/z),母离子155.3(m/z)。

[0030] 在一个具体的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中液相色谱的分析条件为:色谱柱采用菲罗门C18液相色谱柱,色谱柱的规格为50mm $\times$ 2.1mm i.d.,2.6 $\mu$ m粒径,色谱柱温度为30 $^{\circ}$ C,进样量为10 $\mu$ L,流速为0.2ml/min;流动相:A为乙腈,B为5mmol/L乙酸铵溶液(其中还含有0.1%(v/v)乙酸),采用等度洗脱程序,体积比50:50,洗脱时间总共约10min。

[0031] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中质谱的分析条件为:扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM);电喷雾电压:5500V;离子源温度:700 $^{\circ}$ C;辅助气Gas1压力:60psi;辅助气Gas2压力:50psi;去簇电压(DP):40V;碰撞能(CE):20V。

[0032] 在一个具体的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中所述的质谱的分析条件为离子源:电喷雾电离源(ESI);扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM);电喷雾电压:5500V;离子源温度:700 $^{\circ}$ C;辅助气Gas1压力:60psi;辅助气Gas2压力:50psi;去簇电压(DP):40V;碰撞能(CE):20V;离子对选择为:定性离子对m/z 155.3>

73.1, 155.3 > 127.1, 定量离子对  $m/z$  155.3 > 73.1。

[0033] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中外标法所用的标准溶液的配制步骤如下:称取0.1g香叶醇,精确至0.0001g,用甲醇溶解后转移至1000mL容量瓶中并定容,定为标准储备液;分别移取0.01mL,0.05mL,0.1mL,0.5mL,1.0mL的标准储备液到100mL容量瓶中,用浓度为10%(v/v)的甲醇水溶液定容,则香叶醇的浓度为0.01 $\mu$ g/mL、0.05 $\mu$ g/mL、0.1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、1.0 $\mu$ g/mL,得到香叶醇的系列标准溶液。

[0034] 在一个优选的实施方案中,发明所述的香精香料中香叶醇的检测方法,其中香叶醇含量的计算方法为:首先以标准溶液所检测出的目标物的色谱峰面积对其相应浓度进行回归分析,得到标准曲线;然后将样品溶液检出的目标物的色谱峰面积,代入标准曲线,即得到样品中的香叶醇浓度,由此即可计算出烟用香精香料中香叶醇的含量。

[0035] 本发明的检测方法对样品的处理方法和色谱条件进行了优化,达到了以下效果:

[0036] (1)检测时间短:采用本发明的检测方法测定烟用香精香料中香叶醇的含量,检测周期仅需要10分钟左右。

[0037] (2)本发明的检测方法具有操作简便、灵敏度高、回收率高及重复性好的优点,本发明的检测方法的色谱条件能够使香叶醇的色谱峰与杂质色谱峰分离较好,并且具有较好的线性相关性,检测限为0.001 $\mu$ g/mL,平均回收率为90.8%~98.3%,平均相对标准偏差RSD<5%(n=6)。

## 附图说明

[0038] 图1为本发明的检测方法的流程图;

[0039] 图2为实施例1中浓度为1 $\mu$ g/mL的标准溶液中香叶醇的色谱图;

[0040] 图3为实施例1中样品溶液的色谱图;

[0041] 图4为香叶醇的质谱图;

[0042] 图5为实施例1获得的标准曲线。

## 具体实施方式

[0043] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0044] 实施例1

[0045] 本实施例对烟用香精香料中香叶醇含量进行检测,检测方法如下所述,所述检测方法的流程图如图1所示。

[0046] (1)称取0.1g香叶醇(分析纯),精确至0.0001g,用甲醇溶解后转移至1000mL容量瓶中并定容,定为标准储备液;分别移取0.01mL,0.05mL,0.1mL,0.5mL,1.0mL的标准储备液到100mL容量瓶中,用10%(v/v)甲醇水溶液定容,则香叶醇的浓度为0.01 $\mu$ g/mL、0.05 $\mu$ g/mL、0.1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、1.0 $\mu$ g/mL,得到香叶醇的系列标准溶液。标准溶液避光4 $^{\circ}$ C保存,取用时放置于常温下,达到常温后方可使用。每周做一次标线;

[0047] (2)样品溶液的制备:称取0.1g左右的待测烟用香精香料样品,置于25mL锥形瓶

中;准确加入10%(v/v)甲醇水溶液10mL,室温下超声30min,用0.22 $\mu$ m有机滤膜过滤后,得到样品溶液,于4 $^{\circ}$ C保存待分析;

[0048] (3)色谱分析条件为采用菲罗门C<sub>18</sub>液相色谱柱,色谱柱的规格为50mm $\times$ 2.1mm i.d.,2.6 $\mu$ m粒径。色谱柱温度为30 $^{\circ}$ C,进样量为10 $\mu$ L,流速为0.2ml/min;流动相:A为乙腈,B为5mmol/L乙酸铵溶液(该乙酸铵溶液中还含有0.1%(v/v)的乙酸),采用等度洗脱程序,体积比50:50。洗脱时间总共10min。浓度为1 $\mu$ g/mL的标准溶液的色谱分析结果见图2;样品溶液的色谱分析结果见图3;

[0049] (4)质谱分析条件为离子源:电喷雾电离源(ESI);扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM);电喷雾电压:5500V;离子源温度:700 $^{\circ}$ C;辅助气Gas1压力:60psi;辅助气Gas2压力:50psi;去簇电压(DP):40V;碰撞能(CE):20V。香叶醇的质谱图见图4。依据碎片丰度高、选择性高的原则顺序,确定离子对选择为:定性离子对m/z 155.3>73.1,155.3>127.1,定量离子对m/z 155.3>73.1。

[0050] (4)烟用香精香料中香叶醇含量的计算:首先以标准溶液所检测出的目标物的色谱峰面积对其相应浓度进行回归分析,得到标准曲线(见图5);与标准曲线相对应的回归方程、相关系数等数据如表1所示。

[0051] 表1香叶醇的标准曲线和检测限

[0052]

化合物	保留时间 (min)	回归方程	线性范围 ( $\mu$ g/mL)	相关系数 (R <sup>2</sup> )	LOD/( $\mu$ g/mL)
香叶醇	4.13	Y=88432X+16282	0.01 ~ 1.0	0.9994	0.001

[0053] 然后将样品测得的检出目标物的色谱峰面积,代入标准曲线,即得到样品中的香叶醇浓度,由此计算烟用香精香料中香叶醇的含量,计算公式如下:

$$[0054] \quad m = (A \times S) / n$$

[0055] 式中:

[0056] m—每克烟用香精香料中香叶醇的含量,单位为微克每克( $\mu$ g/g);

[0057] A—样品中香叶醇的浓度( $\mu$ g/mL);

[0058] S—溶液体积(mL);

[0059] n—称取样品的质量(g)。

[0060] 由表1和图3可知,所采用的色谱条件使香叶醇的色谱峰与杂质色谱峰分离较好,并且具有较好的相关性,检测限在0.001 $\mu$ g/mL。本实施例样品的香叶醇的含量为22.3 $\mu$ g/g。

[0061] 实施例2

[0062] 本实施例对本发明方法的重复性和加标回收率进行检测,检测方法如下所述。

[0063] 采用标准加入法测定本发明的方法的回收率。称取待测烟用香精香料样品(该样品与实施例1步骤(2)中所用的香精香料样品相同)0.1g,各三份,向其中分别加入0.01mL、0.02mL、0.05mL实施例1步骤(1)中配制的香叶醇标准储备液,然后按照实施例1步骤(2)“样品溶液的制备”中的配制方法制备加标样品溶液,每个样品分别测定6次,色谱和质谱分析的条件同实施例1,根据分析结果计算本方法烟用香精香料中香叶醇的加标回收率,结果如表2所示;

[0064] 表2烟用香精香料中香叶醇的回收率和重复性(n=6)

本底值 ( $\mu\text{g/g}$ )	加标量 ( $\mu\text{g/g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
22.3	10	92.6	94.3	2.1
		97.8		
		94.3		
		95.4		
		91.8		
		93.7		
22.3	20	91.2	94.9	2.7
		98.3		
		97.4		
		93.6		
		95.4		
		93.3		
22.3	50	97.2	93.6	2.4
		92.6		
		90.8		
		91.6		
		95.5		
		93.9		

[0066] 由表2可以看出,在3个加标水平上,利用此方法检测烟用香精香料中香叶醇的回收率在90.8%~98.3%之间,样品测试结果的相对标准偏差小于5%,说明本法的回收率较高,重复性较好。

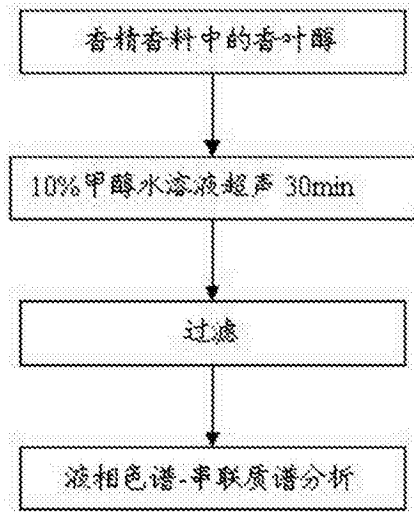


图1

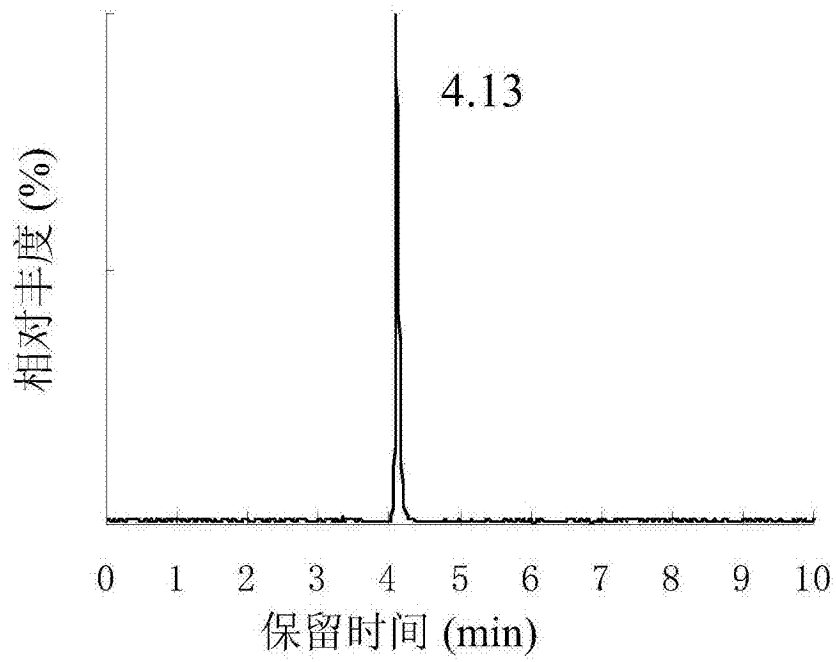


图2



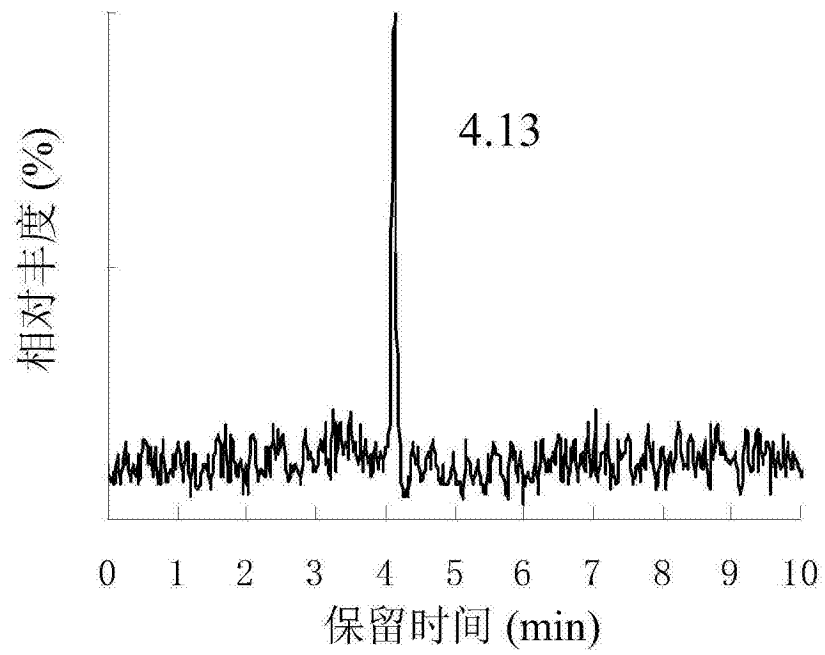


图3

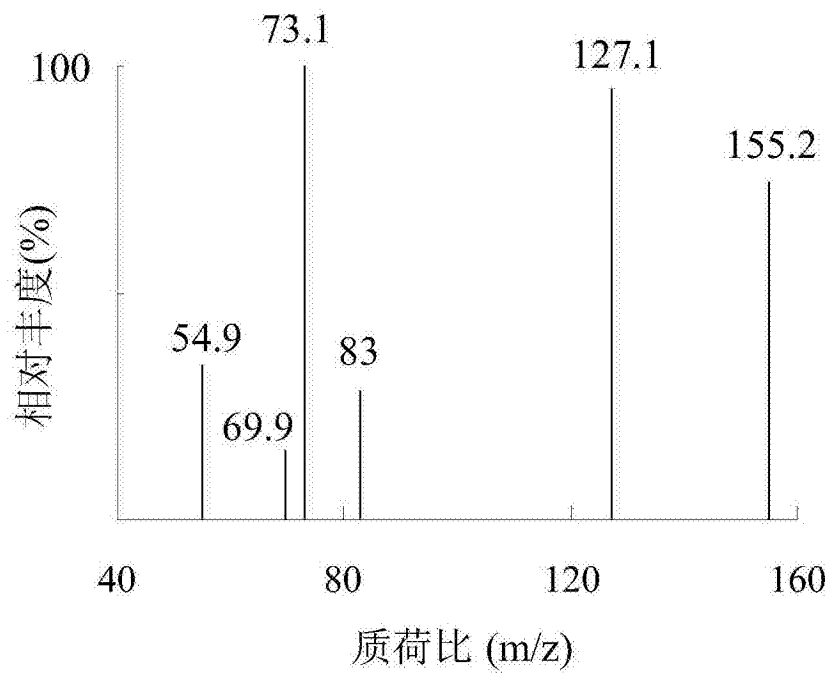


图4

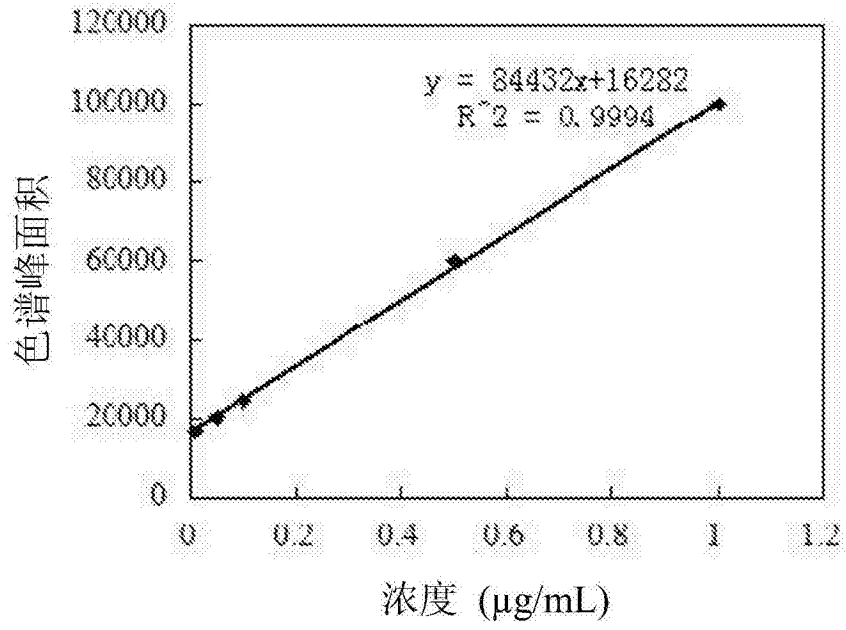


图5