



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX/ISO 7358: 2021

香柠檬、柠檬、苦橙和白柠檬精油(已充分除去或部分降低 5-甲氧基补骨脂素)中 5-甲氧基补骨脂素含量的测定 高效液相色谱法

Essential oils of bergamot, lemon, bitter orange and lime, fully or partially reduced in bergapten -Determination of bergapten content by high-performance liquid chromatography (HPLC)

(ISO 7358: 2021, IDT)

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件使用翻译法等同采用国际标准ISO 7358:2021《香柠檬、柠檬、苦橙和白柠檬精油(已充分除去或部分降低5-甲氧基补骨脂素)——用高效液相色谱法测定5-甲氧基补骨脂素含量》。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国香料香精化妆品标准化技术委员会(SAC/TC 257)归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

香柠檬、柠檬、苦橙和白柠檬精油(已充分除去或部分降低 5-甲氧基补骨脂素)中 5-甲氧基补骨脂素含量的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了用高效液相色谱法(HPLC)的内标法或外标法测定已充分除去或部分降低 5-甲氧基补骨脂素的香柠檬[Citrus aurantium ssp. bergamia (Risso et Poit.) Wight et Arn. ex Engl.], 柠檬[Citrus limon (L.) Burm. f.], 苦橙(Citrus bigaradia Risso)和白柠檬[Citrus aurantiifolia (Christm.) Swingle and Citrus latifolia Tanaka]精油中 5-甲氧基补骨脂素含量的方法。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 14454.1-2008 香料 试样制备 (ISO 356: 1996, MOD)

GB/T 27579-2011 精油 高效液相色谱分析 通用法 (ISO 8432: 1987, IDT)

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

ISO和IEC维持用于标准化的术语数据库,在以下地址:

ISO: <https://www.iso.org/obp>

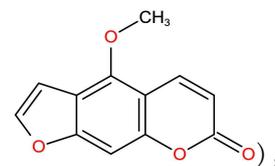
IEC: <http://www.electropedia.org/>

4 原理

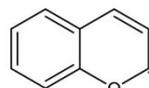
测定样品中的5-甲氧基补骨脂素的含量是样品经稀释之后,以正相或反相HPLC法梯度洗脱,使用内标物或外标物,以二极管阵列紫外光检出器进行测定。

5 试剂

仅使用分析纯试剂。



5.1 参比物质（标准物质）：5-甲氧基补骨脂素（5-甲氧基呋喃并香豆素， $C_{12}H_{8}O_4$, $MW=216.19$ g/mol, 纯度 $\geq 95\%$ 。



5.2 内标物：香豆素(1-苯并吡喃-2-酮)， $C_9H_6O_2$, 分子量 (MW) =146.14 g/mol, 纯度 $\geq 98\%$ 。

5.3 溶剂

5.3.1 正相 HPLC 用溶剂。

5.3.1.1 氯仿，分析纯，含少于 2%（体积百分）的乙醇。用于制备含 5-甲氧基补骨脂素及内标物的精油样品，也用作流动相。

5.3.1.2 正己烷，HPLC 级，用作流动相。

5.3.1.3 乙酸乙酯，HPLC 级，用作流动相。

5.3.1.4 流动相：使用与检测质量相容的溶剂（即溶剂的质量达到检测系统要求），制备足够的量，以便完成分析。举例如下：

5.3.1.5 以 80:20（体积比）比例混合正己烷（5.3.1.2）和乙酸乙酯（5.3.1.3）。

5.3.1.6 以 85:15（体积比）比例混合正己烷（5.3.1.2）和氯仿（5.3.1.1）。

5.3.2 反相 HPLC 用溶剂。用作流动相的溶剂是一个三元流动相，由三种溶剂构成，见表 1（见 8.2.2.3）。

5.3.2.1 HPLC 级蒸馏水，被用于流动相（5.3.1.4）。

5.3.2.2 HPLC 级乙腈，被用于流动相（5.3.1.4）。

5.3.2.3 HPLC 级甲醇，被用于流动相（5.3.1.4）。

5.3.2.4 稀释溶剂，甲醇（5.3.2.3）和乙腈（5.3.2.2）以 80:20（体积比）的比例混合。

6 试剂

使用可用的实验设备，特别是以下几项：

6.1 常用实验室设备

6.1.1 容量瓶：100mL，50 mL，10 mL

6.1.2 巴斯德移液管：容量移液管：1mL，5 mL，10 mL 和 20 mL；微量移液管：500 μ L，250 μ L 和 100 μ L。

6.1.3 一次性使用的注射器

6.1.4 聚四氟乙烯 (PTFE) 过滤器: 0.45 μm

6.1.5 为 HPLC 注射 (进样) 用的管形瓶

6.1.6 精密天平

6.2 HPLC 体系

6.2.1 液相色谱仪。

6.2.2 正相 HPLC 柱, 由不锈钢制造, 长度 150mm~250mm, 内径 4mm~5mm, 装有由粒状硅石 (HPLC 级质量, 颗粒大小约 5 μm) 构成的固定相。

6.2.3 反相 HPLC 柱, 由不锈钢制造, 长度 150mm (或 250mm), 内径 4.6mm, 装有 C18 型固定相, 颗粒大小约为 3.5 μm (或 5 μm), 例如 Zorbax Eclipse Plus[®] C:18:3.5 μm (4.6×150) mm agilent。

6.2.4 能从事溶剂梯度洗脱的三元泵体系。

6.2.5 溶剂脱气体系 (可选择), 例如超声波延迟线 (超声波槽) (ultrasonic tank)。

6.2.6 检测系统, 调节至波长 254nm 或 312nm, 二极管阵列紫外线光谱检出系统。

6.2.7 记录仪和积分仪 (可选择), 适用于本 HPLC。

7 样品制备

按 GB/T 14454.1 制备测试样品。经适度加热溶解任何固体沉淀。

8 程序

8.1 操作条件

调节流动相 (5.3.1.4) 的流速, 使对应于 5-甲氧基补骨脂素和香豆素 (5.2) 的色谱峰与其他能被 UV 检测器 (6.2.6) 测定的精油成分有良好的分离度, 典型的流速为 1mL/min~1.5mL/min。

按照 GB/T 27579 规定的程序执行。

8.2 测定

8.2.1 正相 HPLC 法

8.2.1.1 内标法

8.2.1.1.1 在正相色谱中优化 HPLC 条件

8.2.1.1.1.1 分离度

在所得的色谱图中,证明5-甲氧基补骨脂素与精油中的其他成分已得到良好的分离。下一步,证明内标物[香豆素(5.2)]与精油的其他成分不掩盖、不重叠。测定5-甲氧基补骨脂素和香豆素的保留时间。

8.2.1.1.1.2 内标物的量

加入样品中的香豆素(内标物)的量在这样的情况下被认为是适当的,即精油中5-甲氧基补骨脂素的峰面积与香豆素的峰面积大致相等。为决定这一数量,向HPLC中注射一个含有一定量香豆素(5.2)的氯仿(5.3.1.1)溶液(例如10mg香豆素溶于10mL氯仿的溶液)。随后注射同样体积的精油在氯仿(5.3.1.1)中的溶液。调整这两个溶液的质量浓度,以便得到大致相等的峰面积。

8.2.1.1.2 响应因子K

按照如下方法准备一校准溶液。在一个体积适当的容量瓶(6.1.1)中,称量加入约20mg的香豆素(5.2),精确至0.1mg。在同一个容量瓶中,再称量加入约10mg的5-甲氧基补骨脂素(5.1),精确至0.1mg。将这两个化合物溶于约20mL的氯仿(5.3.1.1)中。

注入适当量(见8.2.1.1)的校准溶液,以便维持在检测器灵敏度范围内。

计算色谱图的峰面积。参比物质的典型色谱图在附录A的图A.1中给出。5-甲氧基补骨脂素的吸收光谱在附录B的图B.1中给出。

用公式(1)计算响应因子K:

$$K = \frac{M_R \cdot A_{IS}}{M_{IS} \cdot A_R} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

M_R ——加入溶液中的5-甲氧基补骨脂素[参比物质(5.1)]的质量,单位为毫克(mg);

M_{IS} ——加入溶液中的香豆素[内标物(5.2)]的质量,单位为毫克(mg);

A_R ——对应于5-甲氧基补骨脂素[参比物质(5.1)]的峰面积,以积分仪单位表示;

A_{IS} ——对应于香豆素[内标物(5.2)]的峰面积,用积分仪单位表示。

注:在GB/T 27579中,这一公式等于下式:

$$K = \frac{M_R \cdot A_E}{M_E \cdot A_R}$$

式中:

M_R ——加入溶液中的5-甲氧基补骨脂素[参比物质(5.1)]的质量,单位为毫克(mg);

M_E ——加入溶液中的香豆素[内标物(5.2)]的质量,单位为毫克(mg);

A_R ——对应于5-甲氧基补骨脂素[参比物质(5.1)]的峰面积,以积分仪单位表示;

A_E ——对应于香豆素[内标物(5.2)]的峰面积,用积分仪单位表示。

8.2.1.1.3 5-甲氧基补骨脂素的测定

在一个体积适当(例如15mL)的容量瓶(6.1.1)中制备测试溶液。称量适当量的香豆素(M_{IS}) (大约10mg),精确至0.1mg(按8.2.2.1确定),称取一定量的精油(M_S),以便得到一张色谱图,使5-甲氧基补骨脂素的峰面积和香豆素的峰面积大致相等。

加入氯仿(5.3.1.1)约8mL,仔细摇匀以溶解香豆素。

为了使得到的色谱图中有大致相等的5-甲氧基补骨脂素和香豆素的峰面积,可能要对测试溶液进行几次的稀释,因为在精油中5-甲氧基补骨脂素的含量是未知的。选择容量瓶的体积、香豆素的量和氯仿的体积,以符合这一要求。

应用在8.2.1.1.1中建立的相同的HPLC操作条件,注射适量的测试溶液,以便检测维持在检测器灵敏度范围内进行。

计算色谱图的峰面积。

计算并记录色谱图中对应于5-甲氧基补骨脂素(A_X)和香豆素(A_{IS})的峰面积。

8.2.1.2 外标法

按照GB/T 27579中规定的外标法程序进行。

8.2.2 反相 HPLC

8.2.2.1 制备用于校准的参比物溶液

8.2.2.1.1 通则

对于每次校准,使用5-甲氧基补骨脂素和香豆素的储备溶液来制备标准溶液。将此标准溶液存放在4°C的阴凉地方

8.2.2.1.2 储备溶液

尽可能准确地称取50mg5-甲氧基补骨脂素于100毫升烧瓶中,用稀释溶剂稀释到刻度。使溶液均匀,将安置于超声波槽中3分钟,以得到储备溶液。这一称储备溶液含有5-甲氧基补骨脂素的浓度几乎为精确的500mg/L。尽可能准确地称取50mg香豆素于50mL容量瓶中,加洗脱溶剂至刻度。使溶液均匀,将其安置于超声波槽中3分钟,得到储备溶液。该溶液香豆素的浓度几乎是精确的1000mg/L。

8.2.2.1.3 工作溶液

应用上述储备溶液,制备5-甲氧基补骨脂素8种浓度的标准溶液:1mg/L, 2.5mg/L, 5mg/L, 10mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L及200mg/L。

——1mg/L标准溶液:向一个50mL容量瓶中由移液管加入100 μ L5-甲氧基补骨脂素储备溶液和5mL香豆素储备溶液,然后用稀释溶剂加至刻度。

——2.5mg/L标准溶液:向一个50mL容量瓶中由移液管加入250 μ L5-甲氧基补骨脂素储备溶液和5mL香豆素储备溶液,然后用稀释溶剂加至刻度。

——5mg/L标准溶液:向一个50mL容量瓶中由移液管加入500 μ L5-甲氧基补骨脂素储备溶液和5mL香豆素储备溶液,然后用稀释溶剂加至刻度。

——10mg/L标准溶液:向一个50mL容量瓶中由移液管加入1mL5-甲氧基补骨脂素储备溶液和5mL香豆素储备溶液,然后用稀释溶剂加至刻度。

——25mg/L标准溶液:向一个50mL容量瓶中由移液管加入2.5mL5-甲氧基补骨脂素储备溶液和5mL香豆素储备溶液,然后用稀释溶剂加至刻度。

——50mg/L标准溶液:向一个50mL容量瓶中由移液管加入5mL5-甲氧基补骨脂素储备溶液和5mL香豆素储备溶液,然后用稀释溶剂加至刻度。。

——100mg/L标准溶液:向一个50mL容量瓶中由移液管加入10mL5-甲氧基补骨脂素储备溶液和5mL香豆素储备溶液,然后用稀释溶剂加至刻度。

——200mg/L标准溶液：向一个50mL容量瓶中由移液管加入20mL5-甲氧基补骨脂素储备溶液和5mL香豆素储备溶液，然后用稀释溶剂加至刻度。

用搅拌法使上述制备的标准溶液均匀，注射入HPLC之前要通过0.45 μm PTFE过滤器，再装在管形瓶中。

8.2.2.2 柑桔属精油样品的制备

为了在以前创立的标准范围内（8.2.2.1.3）测定柑桔属精油中5-甲氧基补骨脂素的含量，在HPLC进样前，有必要对油样进行稀释。

在一个10mL容量瓶内精确称量加入0.3g香柠檬精油样品和1mL香豆素储备溶液（8.2.2.1.2）。用稀释溶剂（5.3.2.4）加至刻度。

对于5-甲氧基补骨脂素含量低的精油，将精油直接作为分析样品。例如，在一个10mL的容量瓶中，精确称入4g5-甲氧基补骨脂素含量已部分降低的香柠檬精油，再精确称入1mL香豆素储备溶液。用稀释溶剂（5.3.2.4）稀释到刻度。用搅拌法使每个制备样品均匀，然后通过0.45 μm PTFE过滤器过滤，进样前贮存在管形瓶里。

8.2.2.3 用 HPLC 测定和香柠檬精油中 5-甲氧基补骨脂素含量的内标化

HPLC实验条件为：

——进样体积：10μL

——炉温：25℃

——洗脱液流速：1mL/min.

——UV检测条件：二极管阵列UV检测系统，波长=312nm。

洗脱溶剂如表1所示。

表1 流动相：洗脱溶剂为三元混合物

| 时间 (min) | 水% | 甲醇% | 乙腈% |
|----------|----|-----|-----|
| 0 | 65 | 30 | 5 |
| 25 | 32 | 63 | 5 |
| 35 | 0 | 63 | 37 |
| 37 | 65 | 30 | 5 |
| 40 | 65 | 30 | 5 |

9 计算——正相或反相 HPLC

9.1 内标法

应用在8.2.1.1.2中得到的K值（响应因子），用公式（2）计算质量分数，表示为精油中5-甲氧基补骨脂素的百分含量， ω_x 。

$$\omega_x = K \left[\frac{m_{IS} \cdot A_x}{m_s \cdot A_{IS}} \right] \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

K——按公式（1）（见8.2.1.1.2）计算得到的响应因子；

- m_{IS} ——试样（见8.2.1.1.3）中作为内标加入的香豆素的质量，单位为毫克（mg）；
- m_s ——试样（见8.2.1.1.3）中精油的质量，单位为毫克（mg）；
- A_x ——试样（见8.2.1.1.3）中对应于5-甲氧基补骨脂素的峰面积，以积分仪单位表示；
- A_{IS} ——对应于香豆素（见8.2.1.1.3）的峰面积，以积分仪单位表示。

注：在GB/T 27579中，5-甲氧基补骨脂素在精油中的百分含量（ C_x ）等同于公式（2），如下：

$$C_x = K \frac{A_x \cdot m_E \cdot K}{A_E \cdot m_x} \times 100\%$$

式中：

- A_x ——试样（见8.2.1.1.3）中对应于5-甲氧基补骨脂素的峰面积，以积分仪单位表示；
- A_E ——对应于香豆素（见8.2.1.1.3）的峰面积，以积分仪单位表示；
- m_x ——试样（见8.2.1.1.3）中精油的质量，单位为毫克（mg）；
- m_E ——作为内标物而加入试样（见8.2.1.1.3）中的香豆素的质量，单位为毫克（mg）；
- K ——按公式（1）（见8.2.1.1.2）计算得到的响应因子。

9.2 外标法

按GB/T 27579计算5-甲氧基补骨脂素的含量。

10 精密度-重复性

对K值和结果（%）的表达采用对同一个样品所进行的几次测定的平均值。用来计算这一平均值的不同的值（K或%）的差异不得大于5%（±5%）。

11 试验报告

测试报告应包含以下信息：

- HPLC系统的详情；
- 参照本文件；
- 柱的特性（材料、尺寸、填料、固定相）；
- 检测器特性（可选择）和操作条件；
- 流动相特性（流速和性质）；
- 对样品的鉴别（进样量和最后的稀释度）；
- 所得的结果；
- 试验日期。

注1：Zorbar Eclipse plus是市场上可以买到的合适产品的一个例子。在本文件中给出这一信息是为了使用者的方便，不构成本文件的一部分。

附录 A

(资料性)

反相 HPLC 中参比物质 (标准物质) 典型的色谱图

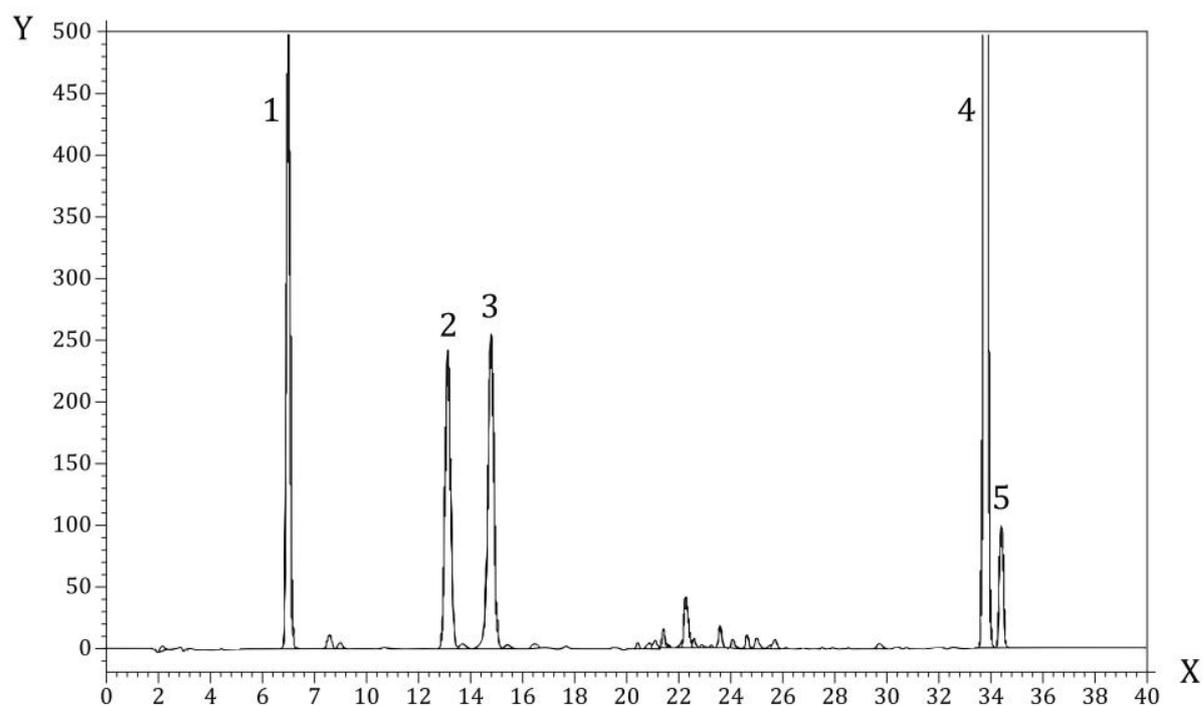
(面积归一化法)

A.1 操作条件

根据 8.2.2.3 中的 HPLC 实验条件。

A.2 反相 HPLC 中参比物质 (标准物质) 典型的色谱图

图 A.1 给出了反相 HPLC 中参比物质 (标准物质) 典型的色谱图。



说明:

- 1—— 香豆素;
- 2—— 玫瑰醚;
- 3—— 芳樟醇;
- 4—— 十七烷;
- 5—— 乙酸香叶酯。

图 A.1 反相 HPLC 中参比物质 (标准物质) 典型的色谱图

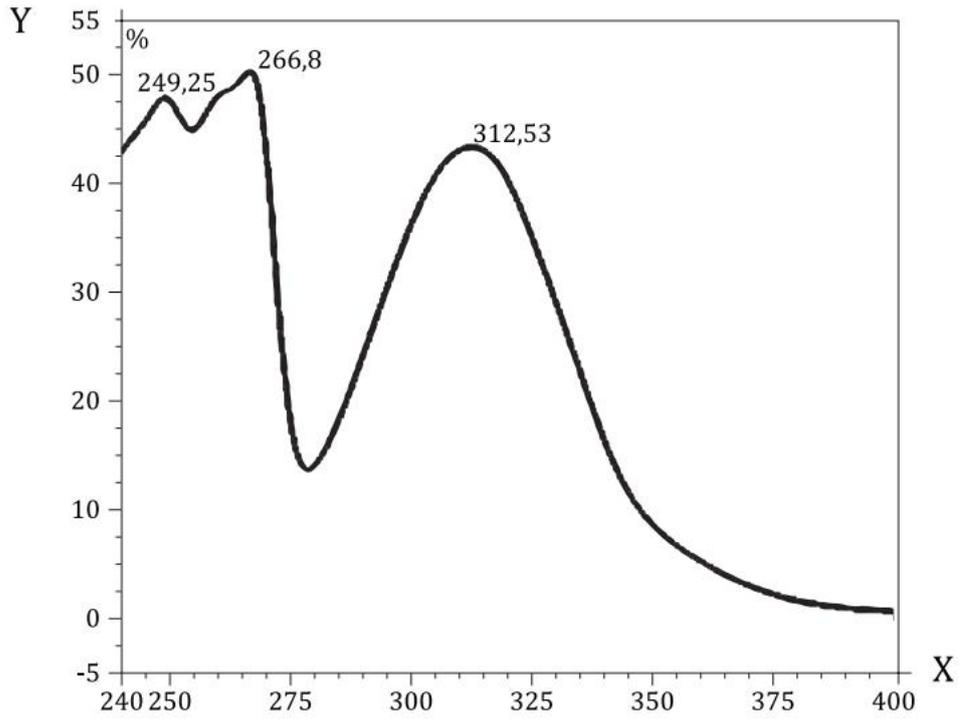
附录 B

(资料性)

5-甲氧基补骨脂素的紫外可见光谱图

B.1 5-甲氧基补骨脂素的紫外可见光谱图

图B.1 给出了5-甲氧基补骨脂素的紫外可见光谱图。



说明:

Y—— 标准化吸光度;

X—— 波长。

图 B.1 5-甲氧基补骨脂素的紫外可见光谱图

参 考 文 献

- [1] ISO 3218, *Essential oils — Principles of nomenclature*
 - [2] ISO 4720, *Essential oils — Nomenclature*
 - [3] ISO/TR 11018, *Essential oils — General guidance on the determination of flashpoint*
 - [4] ISO/TR 21092, *Essential oils — Characterization*
 - [5] MACMASTER AP, OWEN N, BREVARD H, HISERODT R, LEIJS H, BAST N, WEBER B, LOESING G, SHERLOCK A, SCHIPPA C, VEY M, FREROT E, TISSOT E, CHAINTREAU A A Quantification of selected furocoumarins by high-performance liquid chromatography and UV detection: Capabilities and limits. *Journal of chromatography*. 2012, 1257, 34 - 40
-