

GC法同时测定艾纳香油中6种成分的含量^Δ

陈宝雯^{1*}, 钱一鑫², 周黎亚³, 王 鲁^{2,3}, 康冀川^{1,2#} (1. 贵州大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学西南特色药用生物资源开发利用教育部工程研究中心, 贵阳 550025; 3. 贵阳睿腾知识产权代理有限公司, 贵阳 550007)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)22-3049-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.22.05

摘要 目的: 建立同时测定艾纳香油中 β -蒎烯、芳樟醇、*L*-樟脑、*L*-龙脑、 β -石竹烯、花椒油素含量的方法。方法: 采用气相色谱法。色谱柱为RTX-1701毛细管柱, 程序升温, 检测器为氢离子火焰检测器, 检测器温度为240℃, 进样口温度为240℃, 载气为高纯氮气, 流速为3 mL/min, 进样量为0.5 μ L, 进样分流比为50:1。结果: β -蒎烯、芳樟醇、*L*-樟脑、*L*-龙脑、 β -石竹烯、花椒油素的检测质量浓度线性范围分别为0.029 7~0.267 1 mg/mL ($r=0.999 9$)、0.024 3~0.218 9 mg/mL ($r=0.999 9$)、0.126 0~1.134 0 mg/mL ($r=0.999 9$)、0.217 2~1.954 8 mg/mL ($r=0.999 9$)、0.136 3~1.226 9 mg/mL ($r=0.999 9$)、0.044 5~0.400 3 mg/mL ($r=0.999 5$); 定量限分别为0.028 5、0.008 7、0.018 6、0.016 8、0.014 5、0.042 1 mg/mL, 检测限分别为0.009 4、0.002 9、0.006 1、0.005 5、0.004 8、0.013 9 mg/mL; 精密性、稳定性、重复性、耐用性试验的RSD均小于3%; 加样回收率分别为98.13%~101.30% (RSD=1.20%, $n=9$)、98.44%~101.81% (RSD=1.28%, $n=9$)、98.26%~101.05% (RSD=1.19%, $n=9$)、99.08%~101.58% (RSD=0.89%, $n=9$)、98.66%~101.66% (RSD=1.17%, $n=9$)、98.84%~103.60% (RSD=0.96%, $n=9$); 样品含量分别为14.552~46.766、16.951~22.096、80.597~113.115、205.224~242.537、47.761~135.697、26.493~45.771 mg/g。结论: 本方法操作简便、准确, 精密性、重复性良好, 可用于同时测定艾纳香油中6种成分的含量, 并可为艾纳香油质量的综合评价及提取工艺研究提供参考。

关键词 艾纳香油; 气相色谱法; β -蒎烯; 芳樟醇; *L*-樟脑; *L*-龙脑; β -石竹烯; 花椒油素; 含量测定

Simultaneous Determination of Contents of 6 Components in the Oil of *Blumea balsamifera* by GC

CHEN Baowen¹, QIAN Yixin², ZHOU Liya³, WANG Lu^{2,3}, KANG Jichuan^{1,2} (1. School of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Engineering Research Center of Southwest Bio-Pharmaceutical Resources, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Guizhou Rui-Teng Intellectual Property Agency Co., Ltd., Guiyang 550007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of contents of β -pinene, linalool, *L*-camphor, *L*-borneol, β -caryophyllene and xanthoxylin in the oil of *Blumea balsamifera*. METHODS: GC method was adopted. The determination was performed on RTX-1701 capillary column (programmed temperature). The FID detector was controlled at 240 °C. The inlet temperature was set at 240 °C. The carrier gas was high-purity nitrogen 3 mL/min. The the sample size was 0.5 μ L, and split ratio was 50 : 1. RESULTS: The linear range of β -pinene, linalool, *L*-camphor, *L*-borneol, β -caryophyllene and xanthoxylin were 0.029 7-0.267 1 mg/mL ($r=0.999 9$), 0.024 3-0.218 9 mg/mL ($r=0.999 9$), 0.126 0-1.134 0 mg/mL ($r=0.999 9$), 0.217 2-1.954 8 mg/mL ($r=0.999 9$), 0.136 3-1.226 9 mg/mL ($r=0.999 9$), 0.044 5-0.400 3 mg/mL ($r=0.999 5$), respectively. The limits of quantitation were 0.028 5, 0.008 7, 0.018 6, 0.016 8, 0.014 5, 0.042 1 mg/mL; the limits of detection were 0.009 4, 0.002 9, 0.006 1, 0.005 5, 0.004 8, 0.013 9 mg/mL, respectively. RSDs of precision, stability, reproducibility and durability tests were all lower than 3%. The average recoveries were 98.13%-101.30% (RSD=1.20%, $n=9$), 98.44%-101.81% (RSD=1.28%, $n=9$), 98.26%-101.05% (RSD=1.19%, $n=9$), 99.08%-101.58% (RSD=0.89%, $n=9$), 98.66%-101.66% (RSD=1.17%, $n=9$), 98.84%-103.60% (RSD=0.96%, $n=9$), respectively. The contents of 6 components in the sample were 14.552-46.766, 16.951-22.096, 80.597-113.115, 205.224-242.537, 47.761-135.697, 26.493-45.771 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: The established method is simple, accurate, precise and reproducible, which can be used for simultaneous determination of contents of 6 components in the oil of *B. balsamifera*. It can provide reference for comprehensive evaluation and extraction technology study of the oil of *B. balsamifera*.

KEYWORDS Oil of *Blumea balsamifera*; GC; β -pinene; Linalool; *L*-camphor; *L*-borneol; β -caryophyllene; Xanthoxylin; Content determination

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.31760747)

* 硕士研究生。研究方向: 药物制剂。E-mail: 2016021307@gzu.edu.cn

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 真菌学、药用生物资源。电话: 0851-88298675。E-mail: jckang@gzu.edu.cn

艾纳香 [*Blumea balsamifera* (L.) DC] 为菊科艾纳香属多年生木质草本植物, 分布于我国南部各省, 如贵州、广西、海南等^[1], 是贵州重要的民族药。该药具有祛风消肿、活血散瘀的功效, 可用于治疗跌打损伤、疮疖肿痛、

湿疹、皮炎等^[2]。艾纳香油是由艾纳香叶提炼而成的精油,具有抗炎、抗氧化和修复皮肤等药理活性^[3-5],主要含有萜品烯醇、龙脑、樟脑、芳樟脑等多种成分^[6],其中L-龙脑具有促进药物吸收的作用,L-樟脑具有神经保护作用^[7], β -石竹烯具有局部麻醉、抗炎、驱蚊虫、抗焦虑、抗抑郁等作用^[8], β -蒎烯具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗炎等作用^[9],芳樟醇具有镇痛、抗焦虑、镇静催眠等作用^[10],花椒油素具有抑制血小板凝聚和药物所致肠、子宫、膀胱等肌肉收缩等作用^[11]。《贵州省中药材、民族药材质量标准》采用气相色谱法(GC)测定艾纳香油中L-龙脑的含量,规定其含量不得低于20.0%^[6]。但由于艾纳香油成分较多,因此对单一成分的定量检测难以全面评价其质量。目前,虽然已有研究采用GC法同时测定艾纳香油中5种成分的含量,但该方法存在耗时较长的缺点^[12]。为了缩短分析时间、提高分析质量和效率,本研究在优化色谱条件的基础上,采用GC法同时测定了艾纳香油中 β -蒎烯、芳樟醇、L-樟脑、L-龙脑、 β -石竹烯、花椒油素等6种成分的含量,旨在为其质量标准的建立提供参考。

1 材料

1.1 仪器

GC-2010 Plus型GC仪,包括RTX-1701型毛细管柱、2010 Plus型氢火焰离子检测器、WBI-2010 Plus型进样口、AOC-201+S型自动进样器、Lab Solutions 5.87工作站(日本Shimadzu公司);BS1101S型万分之一电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

β -蒎烯对照品(批号:C10H116,纯度: $\geq 98\%$)、花椒油素对照品(批号:C10H1204,纯度: $\geq 98\%$)均由郑州杰克斯化工有限公司提供;L-樟脑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111749-201702,纯度:99.9%);芳樟醇对照品(批号:J28J9S66619,纯度: $\geq 98\%$)、 β -石竹烯对照品(批号:Z02A9H67113,纯度: $\geq 98\%$)均由上海源叶生物科技有限公司提供;L-龙脑对照品[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号:F1705071,纯度: $\geq 98\%$];艾纳香油(贵州A公司,批号:20170317;贵州B公司,批号:20170409;贵州C公司,批号:20170321、20180116;规格均为500 mL/瓶);水杨酸甲酯对照品[内标,阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号:J1709026,纯度: $\geq 99.5\%$];甲醇为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:RTX-1701毛细管柱(30 m \times 0.32 mm,0.25 μ m);程序升温:初始温度100 $^{\circ}$ C,以10 $^{\circ}$ C/min升温至150 $^{\circ}$ C,保持1 min,以20 $^{\circ}$ C/min升温至220 $^{\circ}$ C,保持6 min;检测器:氢火焰离子检测器;检测器温度:240 $^{\circ}$ C;进样口温度:240 $^{\circ}$ C;载气:高纯氮气(纯度:99.999%);流速:3 mL/min;进样量:0.5 μ L;进样分流比:50:1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取花椒油素、芳樟醇、 β -石竹烯、 β -蒎烯、L-龙脑和L-樟脑对照品各适量,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成 β -蒎烯、芳樟醇、L-樟脑、L-龙脑、 β -石竹烯和花椒油素质量浓度分别为0.371、0.304、1.575、2.715、1.704、0.556 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 内标溶液 精密称取水杨酸甲酯对照品适量,置于50 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成质量浓度为9.982 mg/mL的内标溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密称取艾纳香油样品40 mg,置于10 mL量瓶中,精密加入“2.2.2”项下内标溶液2 mL,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 空白对照溶液 以甲醇为空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、内标溶液、空白对照溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,各成分均能达到基线分离,分离度均大于3,保留时间均小于13 min,理论板数均大于3 000;空白对照溶液对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.4、0.8、1.0、1.8、3.6 mL,分别置于5 mL量瓶中,精密加入“2.2.2”项下内标溶液1 mL,再加甲醇定容至刻度,得系列标准工作溶液。取适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以各成分与内标的质量浓度比(x)为横坐标、各成分与内标的峰面积比(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

2.5 定量限与检测限考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,用甲醇倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果, β -蒎烯、芳樟醇、L-樟脑、L-龙脑、 β -石竹烯、花椒油素的定量限分别为0.028 5、0.008 7、0.018 6、0.016 8、0.014 5、0.042 1 mg/mL,检测限分别为0.009 4、0.002 9、0.006 1、0.005 5、0.004 8、0.013 9 mg/mL。

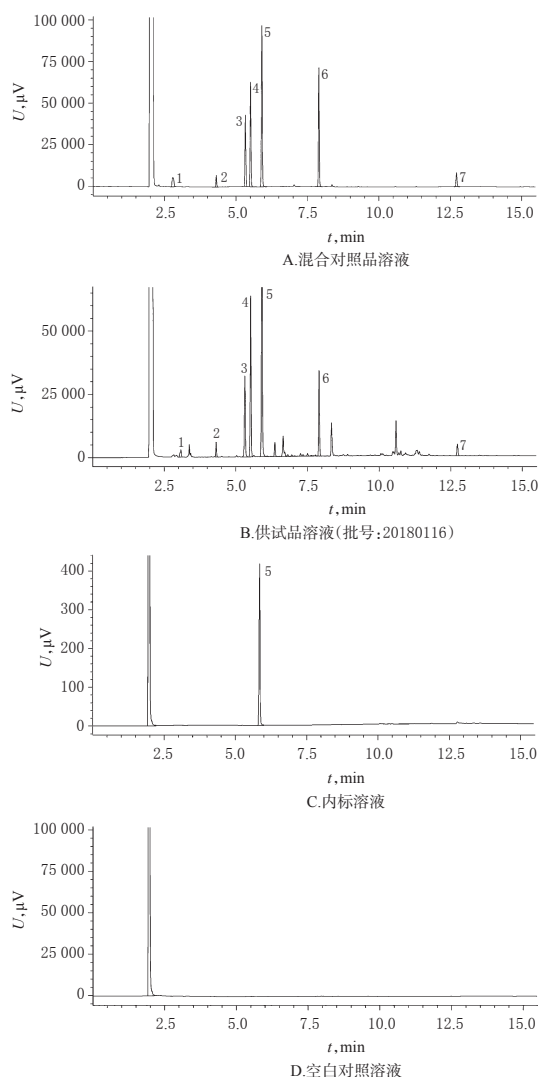
2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,用甲醇稀释后,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果, β -蒎烯、芳樟醇、L-樟脑、L-龙脑、 β -石竹烯、花椒油素峰面积的RSD分别为0.51%、0.96%、0.09%、0.12%、0.19%、0.49%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:20180116)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, β -蒎烯、芳樟醇、

L-樟脑、*L*-龙脑、 β -石竹烯、花椒油素峰面积的RSD分别为0.55%、1.91%、0.21%、0.21%、0.25%、0.46% ($n=7$)，表明供试品溶液于室温下放置12 h内稳定性良好。



注:1. β -蒎烯;2. 芳樟醇;3. *L*-樟脑;4. *L*-龙脑;5. 内标;6. β -石竹烯;7. 花椒油素

Note: 1. β -pinene; 2. linalool; 3. *L*-camphor; 4. *L*-borneol; 5. internal standard; 6. β -caryophyllene; 7. xanthoxylin

图1 气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围, mg/mL
β -蒎烯	$y=0.6356x+0.0021$	0.9999	0.0297~0.2671
芳樟醇	$y=0.6516x-0.0019$	0.9999	0.0243~0.2189
<i>L</i> -樟脑	$y=0.7812x-0.0143$	0.9999	0.1260~1.1340
<i>L</i> -龙脑	$y=0.8070x-0.0250$	0.9999	0.2172~1.9548
β -石竹烯	$y=0.8662x-0.0125$	0.9999	0.1363~1.2269
花椒油素	$y=0.3719x+0.0016$	0.9995	0.0445~0.4003

2.8 重复性试验

取样品(批号:20180116)40 mg,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按内标法计算样品中6种成分的含

量。结果, β -蒎烯、芳樟醇、*L*-樟脑、*L*-龙脑、 β -石竹烯、花椒油素的平均含量分别为16.296、20.466、114.568、209.877、117.284、35.062 mg/g, RSD分别为1.79%、0.97%、1.26%、1.04%、0.99%、1.23% ($n=6$),表明本方法重复性较好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:20180116),共9份,每份约20 mg,分别加入一定量的混合对照品溶液,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

2.10 耐用性试验

取样品(批号:20180116)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件分别以不同进样口温度(230、240、250 $^{\circ}$ C)、柱温(98、100、102 $^{\circ}$ C)、流速(2、3、4 mL/min)进样测定,记录峰面积并按内标法计算样品中6种成分的含量。结果显示,各成分含量的RSD均小于3%,提示本方法可满足试验要求,耐用性良好。

2.11 样品含量测定

取各批样品,每份40 mg,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,每批样品平行操作3次,记录峰面积并按内标法计算样品中6种成分的含量,结果见表3。

3 讨论

在样品前处理中,笔者分别考察了乙酸乙酯和甲醇为溶剂时的色谱分离情况。结果发现,以乙酸乙酯为溶剂时,色谱图中除有乙酸乙酯峰外,在3 min内还出现了杂峰,干扰了样品中其他成分的测定,这可能与乙酸乙酯具有较强吸水性,吸水后在高温下易水解有关^[13];以甲醇为溶剂时,样品在甲醇中溶解度好,且甲醇在GC分析中不易分解出杂峰,故选择将其作为溶剂。同时,笔者对程序升温进行了优化,并在10~30 $^{\circ}$ C/min范围内对升温速率进行调整。结果发现,*L*-樟脑、*L*-龙脑在温度升至150 $^{\circ}$ C左右时出峰,且保留时间相近,此时的升温速率(10~30 $^{\circ}$ C/min)无法将二者分离;在150 $^{\circ}$ C保留1 min时,*L*-樟脑和*L*-龙脑有良好的分离效果,且峰形良好;同时由于花椒油素熔点较高,在210 $^{\circ}$ C以下无法出峰,当温度升至220 $^{\circ}$ C保持4 min后才得以洗脱出现在色谱图上,继续升高温度虽然可以提高花椒油素的分析率,但是由于温度过高,使得色谱图后半段基线严重漂移,无法保证分析质量,因此将220 $^{\circ}$ C的持续时间设定为6 min,并最终确定了本研究中的升温程序。

本研究含量测定结果显示,*L*-龙脑为艾纳香油中含量最高的成分,其在4批样品中的含量相对稳定,分别为20.5%、24.3%、20.6%、20.8%,符合《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[6]中的规定(不低于20.0%),这提示虽然不同厂家的提取方法不同,但对*L*-龙脑含量的影响均

较小。不同企业样品间其余各成分的含量存在较大差异,由于本研究中的3家企业的原材料产地、样品采收季

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	已知样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
β-蒎烯	0.315	0.256	0.57	99.61	99.84	1.20			
	0.323	0.256	0.58	100.39					
	0.323	0.256	0.58	100.39					
	0.324	0.320	0.64	98.75					
	0.324	0.320	0.64	98.75					
	0.316	0.320	0.63	98.13					
	0.331	0.384	0.72	101.30					
	0.331	0.384	0.72	101.30					
	0.326	0.384	0.71	100.00					
	芳樟醇	2.212	1.728	3.97			101.74	100.58	1.28
		2.269	1.728	3.97			98.44		
		2.269	1.728	3.98			99.02		
		2.281	2.160	4.48			101.81		
		2.281	2.160	4.48			101.81		
		2.223	2.160	4.42			101.71		
2.326		2.592	4.92	100.08					
2.326		2.592	4.93	100.46					
2.292		2.592	4.89	100.23					
L-樟脑		0.394	0.382	0.78	101.05	99.87	1.19		
	0.404	0.382	0.79	101.05					
	0.406	0.382	0.79	100.52					
	0.408	0.478	0.88	98.74					
	0.408	0.478	0.89	100.84					
	0.398	0.478	0.88	100.84					
	0.416	0.574	0.98	98.26					
	0.416	0.574	0.98	98.26					
	0.410	0.574	0.98	99.30					
	L-龙脑	4.051	3.184	7.25	100.47			100.15	0.89
		4.156	3.184	7.33	99.69				
		4.156	3.184	7.33	99.69				
4.177		3.980	8.22	101.58					
4.177		3.980	8.22	101.58					
4.072		3.980	8.05	99.95					
4.261		4.776	9.03	99.85					
4.261		4.776	9.01	99.43					
β-石竹烯		4.198	4.776	8.93	99.08	100.15	1.17		
		2.264	1.736	4.01	100.58				
	2.323	1.736	4.08	101.21					
	2.323	1.736	4.06	100.06					
	2.334	2.170	4.54	101.66					
	2.334	2.170	4.54	101.66					
	2.276	2.170	4.43	99.26					
	2.381	2.604	4.95	98.66					
	2.381	2.604	4.96	99.04					
	花椒油素	2.346	2.604	4.93	99.23			100.49	0.96
		0.676	0.688	1.36	99.42				
		0.693	0.688	1.39	101.31				
0.693		0.688	1.39	101.31					
0.697		0.860	1.55	99.19					
0.697		0.860	1.56	100.35					
0.679		0.860	1.57	103.60					
0.711		1.032	1.74	99.71					
0.711		1.032	1.75	100.68					
0.700		1.032	1.72	98.84					

节均相同,只是提取工艺不同,因此提示提取方法对样品中其余成分的含量影响较大,这与严学芬等^[14]研究结果一致。

表3 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 3 Results of content determination of samples(n=3,mg/g)

批号	β-蒎烯	芳樟醇	L-樟脑	L-龙脑	β-石竹烯	花椒油素
20170317	46.766	16.951	80.597	205.224	135.697	45.771
20170409	21.269	22.096	97.637	242.537	47.761	26.493
20170321	14.552	21.018	112.811	206.343	104.726	35.323
20180116	16.572	20.763	113.115	207.834	116.541	35.643

综上所述,本方法操作简便、准确,精密度高、重复性良好,可用于同时测定艾纳香油中β-蒎烯、芳樟醇、L-樟脑、L-龙脑、β-石竹烯、花椒油素等6种成分的含量,并可作为艾纳香油质量的综合评价及提取工艺的研究提供参考。

参考文献

- [1] 官玲亮,庞玉新,王丹,等.中国民族特色药材艾纳香研究进展[J].植物遗传资源学报,2012,13(4):695-698.
- [2] 释道世,周叔迦,苏晋仁.法苑珠林校注[M].北京:中华书局,2003:728.
- [3] 李小婷.艾纳香油对晒伤小鼠皮肤氧化应激及DNA损伤的影响[J].热带农业科学,2016,36(2):59-63.
- [4] 马青松,王丹,庞玉新,等.艾纳香油对小鼠耳肿胀的抗炎效果[J].贵州农业科学,2016,44(4):100-102.
- [5] 范佐旺,王丹,庞玉新,等.艾纳香油对大鼠深二度烫伤的治疗研究[J].中医药信息,2014,31(6):93-96.
- [6] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:119.
- [7] 孙绪,付思红,熊丹丹,等.艾纳香及其提取物的GC-MS指纹图谱和相关性研究[J].中草药,2017,48(4):693-699.
- [8] 刘雨晴.左旋樟脑靶向microRNA-125a-3p对脑缺血再灌注损伤机制的研究[D].广州:广州中医药大学,2017.
- [9] 刘晓宇,陈旭冰,陈光勇.β-石竹烯及其衍生物的生物活性与合成研究进展[J].林产化学与工业,2012,32(1):104-110.
- [10] 廖圣良,商士斌,沈明贵,等.蒎烯及其衍生化合物药物活性的研究进展[J].化学试剂,2016,38(3):219-223,286.
- [11] 姜冬梅,朱源,余江南,等.芳樟醇药理作用及制剂研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(18):3530-3533.
- [12] 吴丽芬,庞玉新,杨全,等. GC法同时测定艾纳香油中5个主要成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(7):1179-1184.
- [13] 卢新生,苟如虎,刘伯渠,等.响应面法优选乙酸乙酯的水解条件研究[J].甘肃高师学报,2016,21(3):29-33.
- [14] 严学芬,刘志刚,余磊,等.艾纳香油GC指纹图谱研究[J].中药材,2018,41(6):1391-1394.

(收稿日期:2019-05-13 修回日期:2019-09-23)

(编辑:陈宏)