

油樟标准提取物的指纹图谱研究

霍伟芬¹, 李海清², 银慧莲², 夏敏³

(1. 佛山市南海医药有限公司, 佛山 528200; 2. 梁介福(广东)药业有限公司, 佛山 528308;

3. 中山大学公共卫生学院, 广州 510089)

摘要 目的: 建立油樟标准提取物 GC 指纹图谱分析方法, 为其质量评价提供依据。方法: 采用气相色谱法。采用石英毛细管 HP-5 柱(30.0 m×0.32 mm×0.25 μm); 氢火焰离子化检测器; 进样口温度 195 ℃; 检测器温度 230 ℃; 程序升温: 初始温度 70 ℃, 保持 14 min, 以 1.5 ℃·min⁻¹ 的速率升温至 85 ℃, 保持 6 min。使用该方法对 35 批油樟标准提取物进行指纹图谱测定, 并以共有峰的相对峰面积值为参数, 对 35 批油樟标准提取物进行相似度评价和聚类分析。结果: 35 批油樟标准提取物的 GC 指纹图谱有 11 个共有峰, 相似度评价和聚类分析结果表明, 35 批油樟标准提取物虽来自于 6 个厂家, 提取设备和人员操作可能存在差异, 但其成分的比例和含量接近, 品质相近。结论: 该方法分析时间短, 对油樟标准提取物中各成分的分效率高, 其精密度、重复性和稳定性均符合指纹图谱研究的技术要求(RSD<3%), 可作为油樟标准提取物质量评价的参考依据。

关键词: 油樟; 樟科; 樟属植物; 油樟挥发油; 桉油精; 气相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)09-1628-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.09.22

GC fingerprint of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao standard extract

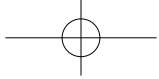
HUO Wei-fen¹, LI Hai-qing², YIN Hui-lian², XIA Min³

(1. Foshan Nanhai Medical Co., Ltd., Foshan 528200, China; 2. Leung Kai Fook (Guangdong) Medical Co., Ltd.,

Foshan 528308, China; 3. Public Health School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract Objective: To establish a GC chromatographic fingerprint analysis method for the further quality evaluation of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao standard extract. **Methods:** GC was adopted. The determination was performed on an HP-5 column (30.0 m×0.32 mm×0.25 μm). Hydrogen flame ionization detector was used with inlet temperature of 195 ℃. The temperature of the detector was 230 ℃. The controlled temperature programming was as follows: The initial temperature was 70 ℃ and maintained for 14 min, and then was raised to 85 ℃ at rate the of 1.5 ℃·min⁻¹ for 6 min. The chromatographic fingerprints of 35 batches of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao standard extract were determined. And the similarity and cluster analysis were carried out according to the relative peak area of characteristic peaks. **Results:** The GC chromatographic

第一作者 Tel: 13927210927; E-mail: 16086807@qq.com



fingerprints of 35 batches of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao standard extract showed 11 characteristic peaks, and the result of similarity evaluation and cluster analysis indicated that 35 batches of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao standard extract from 6 manufacturers might differ in extraction equipment and personnel operation, but the ratio and content of their ingredients as well as their quality were similar. **Conclusion:** The proposed method was fast and effective, whose precision, stability and reproducibility met the technical requirements of fingerprint (RSD<3%). It provided reference for quality evaluation of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao standard extract.

Keywords: *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao; lauraceae; cinnamomum; volatile oil of *Cinnamomum longepaniculatum*; eucalyptol; gas chromatography; fingerprint.

油樟 [*Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao] 为樟科 (Lauraceae) 樟属植物, 为四川特有树种^[1], 主产于四川宜宾, 在湖北、湖南、陕西、云南、江西、广西、广东等地均有分布。油樟树干、枝叶均含芳香油^[2]。油樟挥发油中主要含有单萜、倍半萜烯以及芳香族化合物^[3]。油樟挥发油具有广谱抗菌活性^[4-5], 杀虫作用^[6-7]、镇痛抗炎抗氧化作用^[8-9], 对肝癌细胞有抑制作用^[10-11]。油樟叶挥发对皮肤无刺激无光毒性, 皮肤用药安全^[12]。油樟能吸收环境中一定浓度的镉, 对城市重金属污染地区的园林绿化具有重要意义^[13]。油樟叶片含油率高, 是主要的含油部位, 所提取的挥发油中主要含有桉油精, 经精制后所得的提取物符合《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015年版中桉油的质量标准, 可作为原辅料用于驱风油、风油精等外用制剂的投料生产。

由于部分外用制剂具有芳香气味的特性, 因此对于作为原辅料投产的油樟标准提取物的气味、颜色等性状有一定的质量要求。《中国药典》2015年版中收载的桉油质量标准包括性状、鉴别、检查和含量测定项目。然而, 性状项目只有文字描述, 缺少可量化指标, 鉴别和含量测定项目指标成分单一, 若将此质量标准用于油樟标准提取物的质量控制, 不能全面反映其整体的质量情况。本研究采用气相色谱 (GC) 法, 对油樟标准提取物进行了指纹图谱分析, 为油樟标准提取物的质量评价提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

6890N 气相色谱仪, 美国 Agilent 公司, 7683B 自动进样器, 6890N 化学工作站 (版本 A.10.02), 氢火焰离子检测器 (FID)。

1.2 试剂

油樟标准提取物样品共 35 批次 (分别从 6 个香

料生产企业收集, 样品来源见表 1), 均由樟科植物油樟 (*Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao) 的新鲜茎、叶经水蒸气蒸馏法提取并精制而成。

表 1 油樟叶挥发油提取物样品来源

Tab.1 Sources of *Cinnamomum Longepaniculatum* (Gamble) N.Chao standard extract sample

厂家 (manufacturers)	样品编号 (sample number)	批次编号 (batch number)
广东 TD (Guangdong TD)	1	TD-01
	2	TD-02
	3	TD-03
	4	TD-04
	5	TD-05
	6	TD-06
	7	TD-07
	8	TD-08
	9	TD-09
	10	TD-10
	11	TD-11
	12	TD-12
	13	TD-13
	14	TD-14
	15	TD-15
昆山 JF (Kunshan JF)	16	JF-01
	17	JF-02
	18	JF-03
	19	JF-04
	20	JF-05
	21	JF-06
	22	JF-07
	23	JF-08
昆山 TY (Kunshan TY)	24	TY-01
	25	TY-02
	26	TY-03
	27	TY-04
	28	TY-05
	29	TY-06
四川 CH (Sichuan CH)	30	CH-01
	31	CH-02
	32	CH-03
江苏 DH (Jiangsu DH)	33	DH-01
	34	DH-02
四川 HR (Sichuan HR)	35	HR-01

2 方法与结果

2.1 色谱条件

石英毛细管 HP-5 柱 (30.0 m × 0.32 mm × 0.25 μm, 交联 5% 苯基甲基聚硅氧烷为固定相); 氢火焰离子化检测器; 程序升温: 初始温度 70 ℃, 保持 14 min, 以 1.5 ℃ · min⁻¹ 的速率升温至 85 ℃, 保持 6 min。进样口温度 195 ℃; 检测器温度 230 ℃。进样量 0.2 μL。

2.2 样品制备

取油樟叶挥发油提取物样品适量于样品瓶中, 直接进样。

2.3 主要成分的检识

取样品批次编号为 TD-02 的 2 号样品, 按上述分析条件进样分析, 得到 GC-MS 图谱 (中国广州分析测试中心检测报告, 报告编号 PX12001073)。见图 1。

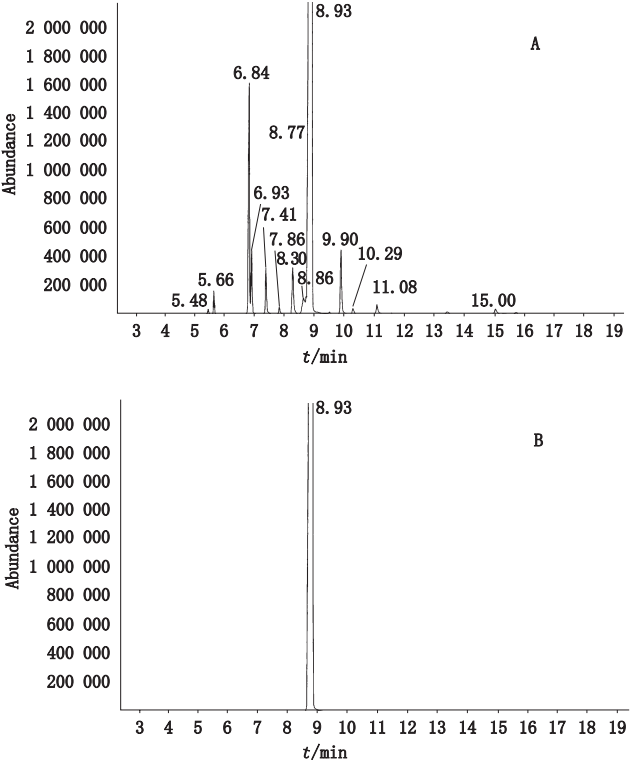


图 1 油樟标准提取物 (A) 和桉油精对照品 (B) 总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatograms of *Cinnamomum Longepaniculatum* (Gamble) N.Chao standard extract (A) and 1,8-cineole (B)

经计算机质谱检索和人工解析研究各种化学成分, 测定了油樟标准提取物含有 24 种成分, 鉴定了其中的 14 种成分, 主要为萜类化合物。通过化学工作站数据处理系统, 按峰面积归一化法计算求得 14 种主要化学成分在油樟标准提取物中的相对含量。所鉴定的油樟标准提取物中的化学成

分及所得各种化学成分的相对峰面积百分含量见表 2。

表 2 油樟标准提取物的化学成分

Tab. 2 Chemical composition of <i>Cinnamomum Longepaniculatum</i> (Gamble) N.Chao standard extract		
序号 (No.)	成分 (component)	面积归一化含量 (area normalization content) / %
1	α - 侧柏烯 (α -thujene)	0.17
2	α - 蒎烯 (α -pinene)	0.82
3	桉烯 (sabinene)	9.40
4	β - 蒎烯 (β -pinene)	2.45
5	β - 月桂烯 (β -myrcene)	2.11
6	α - 水芹烯 (α -phellandrene)	0.36
7	α - 松油烯 (α -terpinene)	2.42
8	对 - 伞花烃 (p-cymene)	1.26
9	β - 水芹烯 (β -phellandrene)	1.47
10	桉油精 (cineole)	75.19
11	γ - 松油烯 (γ -terpinene)	3.21
12	4- 侧柏醇 (thujanol-4)	0.28
13	α - 异松油烯 (α -terpinolene)	0.53
14	4- 松油醇 (terpinenol-4)	0.33

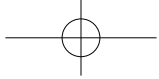
2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取样品批次编号为 TD-02 的 2 号样品, 按上述色谱条件连续直接进样 5 次, 各共有色谱峰相对保留时间 RSD 为 0.01%~0.02%, 相对峰面积 RSD 为 0.11%~0.70%, 均小于 3.0%, 符合指纹图谱制定的相关要求, 表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 分别取样品批次编号为 TD-02 的 2 号样品共 5 份, 按上述色谱条件直接进样分析, 各共有色谱峰相对保留时间 RSD 为 0.01%~0.02%, 相对峰面积 RSD 为 0.01%~2.3%, 均小于 3.0%, 符合指纹图谱制定的相关要求, 表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取样品批次编号为 TD-02 的 2 号样品, 按上述色谱条件在不同的时间点 (0、2、4、8、24 h) 分别直接进样分析, 各共有色谱峰的相对保留时间 RSD 为 0.00%~0.01%, 相对峰面积 RSD 为 0.05%~3.7%, 均小于 5.0%, 表明样品在 24 h 内稳定性较好。

2.5 油樟标准提取物指纹图谱的建立及共有峰的标定 取上述 35 个样品各 0.2 μL, 按 “2.1 项” 下色



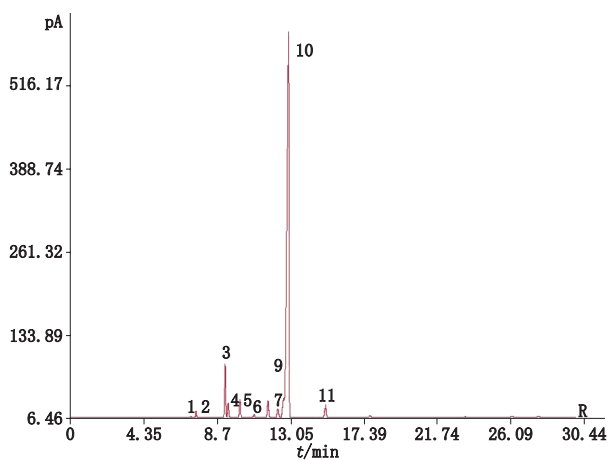
谱条件,分别注入气相色谱仪进行分析,并记录 30 min 内的色谱图。根据 35 个样品中各个成分相对保留时间的一致性,发现有 11 个峰是共有的,因此确定其为共有指纹峰。以桉油精(10 号峰)为参照

峰(S 峰),其相对保留时间和相对峰面积分别定为 1.000,确定各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积(见表 3),从而建立了油樟标准提取物的指纹图谱(见图 2)。

表 3

Tab. 3

峰号 (peak number)	成分 (component)	R _t	相对峰面积 (relative peak area) (n=35)	r	SD
1	α-侧柏烯(α-thujene)	0.555 9	0.001 4	0.005 9	0.001 0
2	α-蒎烯(α-pinene)	0.578 1	0.007 0	0.025 4	0.005 4
3	桉烯(sabinene)	0.710 9	0.073 0	0.080 5	0.017 3
4	β-蒎烯(β-pinene)	0.725 1	0.020 1	0.018 7	0.005 0
5	β-月桂烯(β-myrcene)	0.778 4	0.027 7	0.027 4	0.009 2
6	α-水芹烯(α-phellandrene)	0.843 2	0.005 1	0.025 1	0.005 6
7	α-松油烯(α-terpinene)	0.906 3	0.030 4	0.063 1	0.014 7
8	对-伞花烃(p-cymene)	0.950 7	0.017 8	0.026 4	0.008 4
9	β-水芹烯(β-phellandrene)	0.977 5	0.037 4	0.036 8	0.012 2
10	桉油精(cineole)(S)	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0
11	γ-松油烯(γ-terpinene)	1.168 1	0.022 7	0.036 0	0.011 1



1~11. 同表 3 (same as Tab. 3)

图 2 油樟标准提取物指纹图谱

Fig. 2 The common GC fingerprints of 35 batches of *Cinnamomum Longepaniculatum* (Gamble) N.Chao standard extract

2.6 指纹图谱数据分析

2.6.1 指纹图谱相似度评价 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似性评价系统 2004A 版,以 11 个共有指纹峰的相对峰面积作为参数,对 35 批次样品的气相指纹图谱进行相似度分析,结果见表 4。结果显示,35 批次样品的相似度均大于 99.0%,说明其指纹图谱相似性较高,主要峰群的特征基本一致,提示 35 批次样品虽来自于 6 个厂家,但其成分的比例和含量比较接近,品质相近。本研究建立的 GC 指纹

图谱方法,符合《中国药典》中药质量标准研究制定技术要求,所建立的色谱指纹图谱可作为油樟标准提取物质量控制的标准图谱。

表 4 35 批样品的相似度结果

Tab. 4 The similarity of 35 batches of *Cinnamomum Longepaniculatum* (Gamble) N.Chao standard extract

样品编号 (sample number)	r	样品编号 (sample number)	r
1	0.999 6	19	0.999 8
2	0.999 6	20	0.999 6
3	0.999 9	21	0.999 6
4	0.999 9	22	0.999 6
5	0.999 8	23	0.999 7
6	0.999 8	24	0.999 3
7	0.999 8	25	0.999 9
8	0.999 8	26	0.999 6
9	0.999 2	27	0.999 8
10	0.999 2	28	0.999 7
11	0.999 2	29	0.999 8
12	0.999 8	30	0.999 1
13	0.999 8	31	0.999 0
14	0.999 9	32	0.999 8
15	0.999 9	33	0.999 0
16	1.000 0	34	0.997 0
17	0.999 4	35	0.998 4
18	0.999 7		

2.6.2 系统聚类分析 将 35 批样品的 GC 指纹图谱的共有峰面积值分别组成 35×11 阶数据矩阵,运用 SPSS 19 统计分析软件对其进行系统聚类分析,采用离差平方和法(Ward's Method),以欧氏距离(Euclidean)作为样品的测度^[14]。聚类分析结果见图 3。

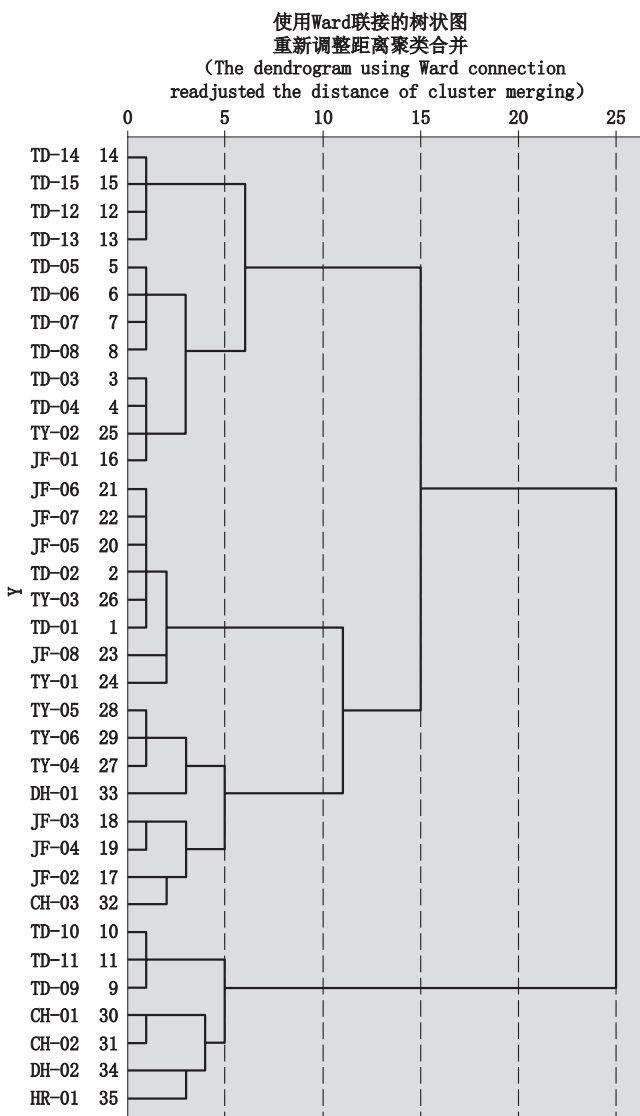


图 3 35 批样品指纹图谱系统聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis of 35 batches of *Cinnamomum Longepaniculatum* (Gamble)N.Chao standard extract

系统聚类分析结果表明,35 批样品可以聚为三类:TD-02~08、TD-12~15 厂家相同,与 TY-02、JF-01 聚为一类,说明 TD 厂家生产的油樟标准提取物质量比较稳定,且与其他厂家的产品有差异;JF-02~08、TY-01 及 TY-03~06、TD-01~02、CH-03、DH-01 聚为一类,说明大部分的厂家 JF 和厂家 TY 及

厂家 TD、厂家 CH 的部分样品质量接近;而距离较远的 TD-09~11、CH01~02、DH-02、HR-01 样品,可聚为一类,说明这几个样品的质量与前两类的质量差异较大。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本研究对比了 PEG-20M 毛细管柱和 HP-5 毛细管柱,发现在相同条件下,使用 HP-5 毛细管柱检测到的成分峰分离度较好,出峰时间比较靠前,所有成分都能在 30 min 内被检测到,故本实验选用 HP-5 毛细管柱进行分析。

3.2 程序升温

本研究曾按以下柱温进行研究:(1)初始温度 70 ℃,保持 14 min,以 $1.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 85 ℃,保持 6 min;(2)初始温度 70 ℃,保持 16 min,以 $3 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 85 ℃,保持 6 min;(3)初始温度 70 ℃,保持 14 min,以 $1.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 85 ℃,再以 $2 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 95 ℃,保持 1 min;(4)恒温 60 ℃,保持 32 min;(5)恒温 70 ℃,保持 32 min;(6)恒温 80 ℃,保持 32 min。结果方法(1)的出峰个数多,峰分离度好。

3.3 分流比

本研究分别对不分流进样和分流进样,分流比 300:1、400:1、500:1 条件下 GC 图谱进行对比,结果显示在分流比为 500:1 条件下所得图谱的出峰时间、峰分离度、峰形等均较为理想。

致谢: 向为本研究提供帮助的刘太华、何灼灼、袁小星、苏章燕、黎敏儿、梁杏云、张柯、张永表示感谢。

参考文献

- [1] 四川植物志编委会. 四川植物志. 第 1 卷[M]. 成都: 四川人民出版社, 1979: 34
Editorial Committee of Flora of Sichuan. Flora of Sichuan. Vol I [M]. Chengdu: Sichuan People's Publishing House, 1979: 34
- [2] 梁国凌. 油樟的引种栽培与育苗技术[J]. 广东园林, 2002(4): 30
LIANG GL. Cultivation and breeding technology of *Cinnamomum longepaniculatum* [J]. Guangdong Landscape Archit, 2002(4): 30
- [3] 罗中杰. 宜宾油樟的现状与未来[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2001, 24(3): 317
LUO ZJ. The status quo and future of *Cinnamomum longepaniculatum* in Yibin [J]. J Sichuan Normal Univ (Nat Sci), 2001, 24(3): 317
- [4] 陶光复. 湖北樟油化学资源[J]. 长江流域资源与环境, 2003, 12(2): 124

- TAO GF. Hubei *Cinnamomum* essential oil chemical resources [J]. Res Envir Yangtze Basin, 2003, 12 (2): 124
- [5] 程必强, 喻学俭, 丁靖垠. 中国樟属植物资源及其芳香成分 [M]. 昆明: 云南科学出版社, 1997: 23
- CHENG BQ, YU XJ, DING JK. Chinese *Cinnamomum* Plant Resources and Their Aromatic Constituents [M]. Kunming: Yunnan Science Press, 1997: 23
- [6] 姚安庆, 梁德华. 樟树和黄花蒿浸提物对菜粉蝶幼虫的生物活性 [J]. 现代农药, 2004, 3 (2): 28
- YAO AQ, LIANG DH. The biological activity of *Innamomum camphora* Sieb and *Artemisia annua* extracts against *Pieris rapre* L. [J]. Mod Agrochem, 2004, 3 (2): 28
- [7] KIM SI, ROH JY, KIM DH, *et al.* Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis* [J]. J Stored Prod Res, 2003, 39 (3): 293
- [8] SHYLAJA M, RAVINDRAN PN, BABU KN. 15 Other useful species of *Cinnamomum* [J]. Cinnamon and Cassia: the genus *Cinnamomum*, 2003: 330
- [9] 丛赢, 张琳, 祖元刚, 等. 油樟 (*Cinnamomum longepaniculatum*) 精油的抗炎及抗氧化活性初步研究 [J]. 植物研究, 2016, 36 (6): 949
- CONG Y, ZHANG L, ZU YG, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activity of *Cinnamomum longepaniculatum* essential oil [J]. Bull Bot Res, 2016, 36 (6): 949
- [10] 叶奎川. 油樟叶提取物的体外抗肝癌活性及其作用机理研究 [D]. 四川: 四川农业大学, 2012
- YE KC. Study on the Anticancer Activity and Anti-cancer Mechanism of the Extraction of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao [D]. Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2012
- [11] 杜永华, 叶奎川, 周黎军, 等. 油樟叶提取物对人肝癌 BEL-7402 细胞增殖的抑制作用 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35 (17): 80
- DU YH, YE KC, ZHOU LJ, *et al.* Effects of the extracts of *Cinnamomum longepaniculatum* leaves on the proliferation of human hepatocarcinoma cell strain BEL-7402 [J]. Food Res Dev, 2014, 35 (17): 80
- [12] 张笑乐, 向楠, 殷中琼, 等. 油樟叶挥发油对兔的急性皮肤刺激、眼睛刺激和皮肤光毒性的研究 [J]. 中国农学通报, 2011, 27 (23): 36
- ZHANG XL, XIANG N, YIN ZQ, *et al.* Research on dermal toxicity and eye toxicity of the volatile oil from the leares of *Cinnamomum longepaniculatum* [J]. Chin Agric Sci Bull, 2011, 27 (23): 36
- [13] 张楠. 锯对油樟幼苗生长及 C、N、P 积累的影响 [D]. 成都: 四川农业大学, 2013
- ZHANG N. Effect of Cd Treatment on Growth and C、N、P Accumulation of *Cinnamomum longepaniculatum* Seedling [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2013
- [14] 赵洪芝, 孟宪生, 叶挺祥, 等. 六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱和模式识别研究 [J]. 中草药, 2010, 41 (1): 48
- ZHAO HZ, MENG XS, YE TX, *et al.* HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Liuwei Dihuang pills [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2010, 41 (1): 48

(本文于 2018 年 6 月 2 日修改回)