

硬糖类产品中桉叶素的含量测定

孔庆龙^{1,2}, 荆雯³, 杨云程⁴, 徐怡^{1,2}, 游燕^{1,2*}

(1. 云南省药物研究所, 昆明 650111; 2. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111;
3. 昆明理工大学财务处, 昆明 650500; 4. 暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要: **目的** 建立适用于硬糖类产品中桉叶素的检测方法。**方法** 采用气相色谱法测定硬糖中桉叶素的含量。采用 Agilent HP-INNOWAX 毛细管色谱柱(柱长为 30 m, 内径为 0.32 mm, 膜厚为 0.25 μm), 采用顶空进样, 进样量为 5 mL, 炉温为 85 $^{\circ}\text{C}$, 平衡时间为 30 min, 进样口温度为 150 $^{\circ}\text{C}$, 柱温为程序升温: 初始温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升温至 125 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升温至 200 $^{\circ}\text{C}$, 保留 5 min; 检测器温度为 180 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速为 1.0 mL/min。**结果** 桉叶素回归方程 $Y=8622.2X-32.028$, 相关系数 r^2 为 0.9998, 线性范围为 0.00284~0.56720 mg/mL, 加样回收率为 104.31%。**结论** 该法简便、准确、专属性强、重复性好, 经方法学验证, 本法可用于硬糖类产品中桉叶素的含量测定。

关键词: 桉叶素; 硬糖; 检测方法

Determination of the content of cineole in hard candy

KONG Qing-Long^{1,2}, JING Wen³, YANG Yun-Cheng⁴, XU Yi^{1,2}, YOU Yan^{1,2*}

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 2. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China; 3. Finance office, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 4. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of cineole in hard candy. **Methods** The content of eucalyptus in hard candy was determined by gas chromatography. Agilent HP-INNOWAX Capillary chromatographic column (30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm) was used. Headspace sample was used for injection, the amount of sample was 5 mL, the furnace temperature was 85 $^{\circ}\text{C}$, the equilibrium time was 30 min, and the inlet temperature was 150 $^{\circ}\text{C}$. The column temperature was programmed: the initial temperature was 70 $^{\circ}\text{C}$, and the temperature was increased to 125 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ for 2 min. Then the temperature was increased to 200 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ for 5 min. The detector temperature was 180 $^{\circ}\text{C}$, and the flow rate of carrier gas was 1.0 mL/min. **Results** The regression equation was $Y=8622.2X-32.028$, the correlation coefficient r^2 was 0.9998, the linear range were 0.00284–0.56720 mg/mL, and the recovery was 104.31%. **Conclusion** This method is simple, accurate, specific, and reproducible. It has been verified by methodology that this method can be used to determine the content of cineole in hard candy products.

KEY WORDS: cineole; hard candy; detection method

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1702506)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program (2017YFC1702506)

*通信作者: 游燕, 正高级工程师, 主要研究方向为药物分析和质量研究。E-mail: yy81221@ynby-yimm.com

*Corresponding author: YOU Yan, Professor, Yunnan Institute of Materia Medica, No.24, Lengshuitang, Bijie Town, Xishan District, Kunming 650111, China. E-mail: yy81221@ynby-yimm.com

0 引言

随着生活节奏加快,环境状况改变,现代人中出现咽喉问题的比例越来越大。随着人们健康意识的增强,越来越多的人选择具有清咽润喉功效的产品改善咽部不适。根据清咽润喉效果作用的发挥,硬糖(含片)形式是清咽润喉产品的最佳产品形态,硬糖在口腔含服时,功效成分可以直接作用于口腔及咽喉患处,效果明显,且含服时间长,可以较长时间地在局部发挥疗效作用。调查发现^[1-2],31%的中国消费者有食用清咽润喉糖等功能性糖果的习惯,随着主播、教师、培训师等重度用嗓人群和吸烟人群数量的增多,需要更多相应的产品缓解咽部不适。据统计^[3],2018年润喉糖市场规模为29.45亿元,且以每年10%~15%的速率增长。

1,8-桉叶素(1,8-cineole),也称桉叶素,是双环单萜化合物,分子式 $C_{10}H_{18}O$,分子量154.249。主要存在于桉树属、樟科的月桂属,以及唇形科的鼠尾草属、薰衣草属、百里香属、迷迭香属等植物体内^[4-6],是桉叶油的主要成分(占80%以上)。1,8-桉叶素具有降压、平喘、抗炎、杀虫、疏风解热、祛湿解毒、镇静及镇痛作用^[7-11],口感凉爽且气味宜人,因此广泛应用于药品、食品领域^[12-13]。桉叶素^[14-16]在清咽润喉糖方面有特殊的使用价值,其刺激性气味可增强某些呼吸道药物的药效,治疗呼吸道疾病。

我国桉叶素资源丰富,是主要的原料产地,扩大桉叶素的应用对其资源开发有良好的意义。桉叶素硬糖是以桉叶素、余甘子等为主要原料制备的一款针对咽喉问题的硬糖。桉叶素是其中的主要指标成分,但目前没有针对硬糖中其含量的检测方法,本研究参考相关检测方法^[17-21]建立硬糖中桉叶素的检测方法学,以期以桉叶素为主要功效成分的清咽润喉硬糖提供良好的质量检测标准。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桉叶素标准品(批号:110788-201707,中国食品药品检定研究院);无水乙醇(分析纯,批号:20190729,国药集团化学试剂有限公司);桉叶素硬糖阳性及阴性样品由东莞广慈生物科技有限公司提供,为中试样品。

1.2 仪器与设备

6890N型Agilent气相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);SK3200LH型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司);AG285型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);A10型Advantage纯水机(德国Milli-Q公司)。

1.3 桉叶素含量测定方法建立

1.3.1 色谱条件选择

用Agilent HP-INNOWAX毛细管色谱柱(柱长为30 m,

内径为0.32 mm,膜厚为0.25 μ m),采用顶空进样,进样量5 mL,炉温为85 $^{\circ}$ C,平衡时间为30 min,进样口温度为150 $^{\circ}$ C,柱温为程序升温:初始温度70 $^{\circ}$ C,以5 $^{\circ}$ C/min的升温速率升温至125 $^{\circ}$ C,保持2 min,再以20 $^{\circ}$ C/min的升温速率升温至200 $^{\circ}$ C,保留5 min;检测器温度为180 $^{\circ}$ C,载气流速为1.0 mL/min。

1.3.2 标准溶液的制备

精密称取桉叶素标准品70.9 mg于25 mL容量瓶中,加无水乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,得桉叶素浓度为2.836 mg/mL的对照品储备液。

精密量取1 mL储备液至10 mL容量瓶中,加超纯水稀释至刻度线,摇匀,即得对照品溶液。

1.3.3 样品的制备

取测定所需样品重量5倍以上的桉叶素硬糖样品,将样品研磨成小块,精密称取1 g转移至25 mL容量瓶中,加入2 mL无水乙醇,再加一定量的超纯水溶解,密封后超声,待桉叶素硬糖完全溶解于水,加超纯水稀释至刻度线,摇匀,即得。

阳性样品及阴性样品均按此方法制备。

1.3.4 系统适应性实验

按上述色谱条件分别进样对照品样品、阳性样品、阴性样品各5 mL。

1.3.5 线性关系考察

精密吸取对照品储备液,逐级稀释,按上述色谱条件进样,记录峰面积。

1.3.6 加样回收实验

精密称取桉叶素标准品72.6 mg至25 mL量瓶中,加无水乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,得桉叶素浓度为2.904 mg/mL的对照品储备液,备用。

精密称取同一批号阳性桉叶素硬糖样品6份,已测桉叶素含量4.16 mg/g,每份1 g,分别加入0.5 mL对照品储备液和1.5 mL无水乙醇,按样品溶液处理方法进行处理。按照含量测定方法测定,记录峰面积,并按标准曲线计算桉叶素含量。

1.3.7 重复性实验

精密称取同一批号阳性桉叶素硬糖样品6份,按样品溶液制备方法制备,按照含量测定方法测定,记录峰面积,并按标准曲线计算桉叶素含量。

1.3.8 耐用性实验

在耐用性的考察中对如下可能变动的因素做了考察:

(1)更换色谱柱:柱1:Agilent HP-INNOWAX气相柱(柱长为30 m,内径为0.32 mm,膜厚为0.25 μ m);柱2:Agilent INNOWAX气相柱(柱长为30 m,内径为0.53 mm,膜厚为1 μ m)。

(2)变化流速:分别调整载气流速为0.8 mL/min和1.2 mL/min进行实验。

2 结果与分析

2.1 系统适应性实验

依据现有文献中桉叶素含量测定的方法, 针对硬糖类产品进行相应的改进, 制定适合于桉叶素硬糖中桉叶素含量测定的方法学。由于桉叶素硬糖易溶于水, 而水溶液用气相色谱直接进样效果不佳, 故选择顶空进样方式。用 Agilent HP-INNOWAX 毛细管色谱柱(柱长为 30 m, 内径为 0.32 mm, 膜厚为 0.25 μm), 采用顶空进样, 炉温为 85 $^{\circ}\text{C}$, 平衡时间为 30 min, 进样口温度为 150 $^{\circ}\text{C}$, 柱温为程序升温: 初始温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升温至 125 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升温至 200 $^{\circ}\text{C}$, 保留 5 min; 检测器温度为 180 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速为 1.0 mL/min。在此条件下桉叶素分离良好、出峰较快、无干扰, 故将该色谱条件定为本实验的检测条件。

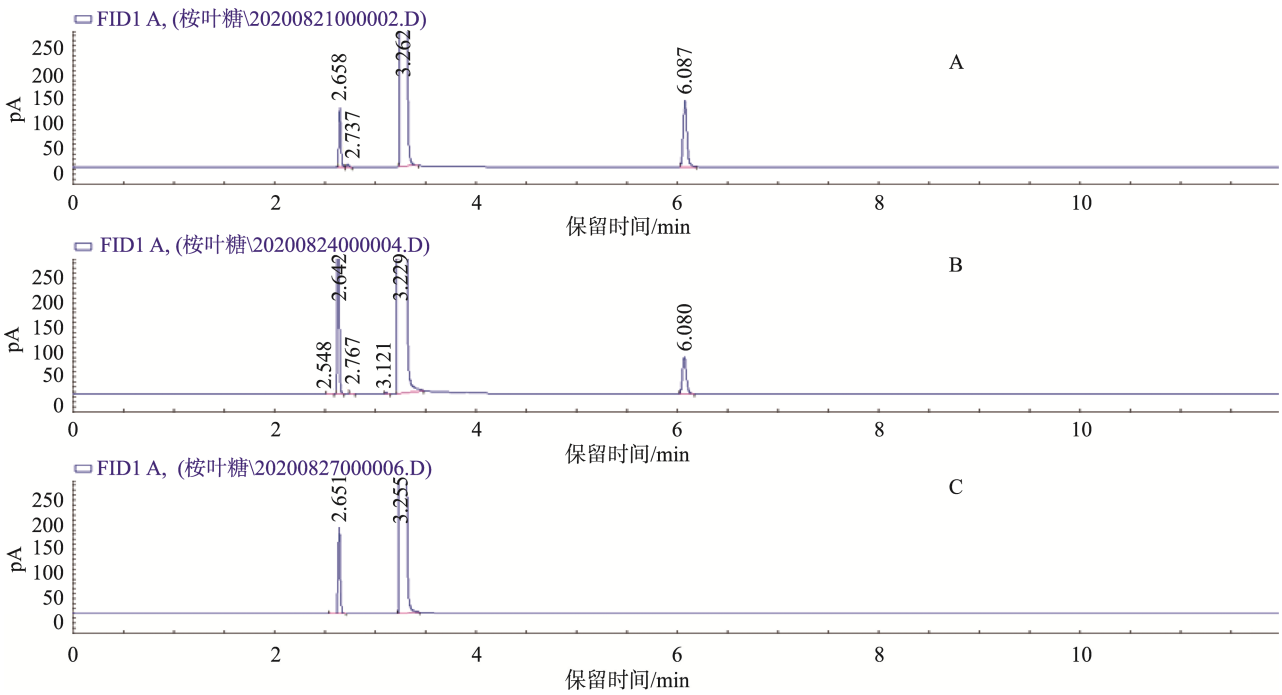
按上述色谱条件分别用顶空进样对照品、阳性样品、阴性样品各 5 mL。结果见图 1, 表 1。由图 1 及表 1 可以看出阳性样品溶液色谱中与对照品溶液色谱相应的位置上有相同的色谱峰出现, 而阴性供试品色谱位置无峰出现, 表明处方中其他成分对成品中桉叶素的含量测定无干扰。

2.2 线性关系

线性关系结果见图 2, 由图 2 可以看出在上述色谱条件下, 桉叶素在 0.00284~0.56720 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。检测方法适用于桉叶素检测。以含量(X)对峰面积(Y)进行线性回归, 得桉叶素回归方程: $Y=8622.2X-32.028$, 相关系数 $r^2=0.9998$ 。

2.3 加样回收实验

计算总回收率为 104.31%, 结果见表 2。



注: A-阳性样品, B-对照品, C-阴性样品。

图 1 系统适应性图

Fig.1 System adaptability

表 1 系统适用性
Table 1 System adaptability

样品名称	出峰物质	保留时间/min	分离度	理论塔板数	对称因子
对照品	桉叶素	6.080	40.44	120379	0.86
阴性样品	桉叶素	6.080	--	--	--
阳性样品	桉叶素	6.087	47.16	131006	0.90

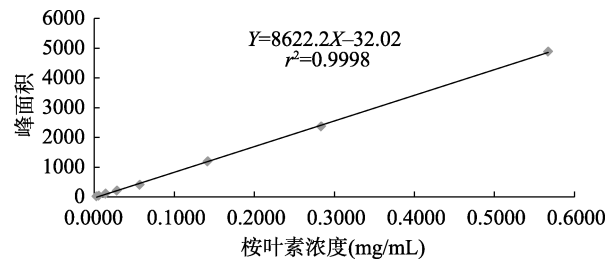


图 2 桉叶素标准曲线
Fig.2 Standard curve of cineole

表 2 加样回收率实验
Table 2 Recoveries of added samples test

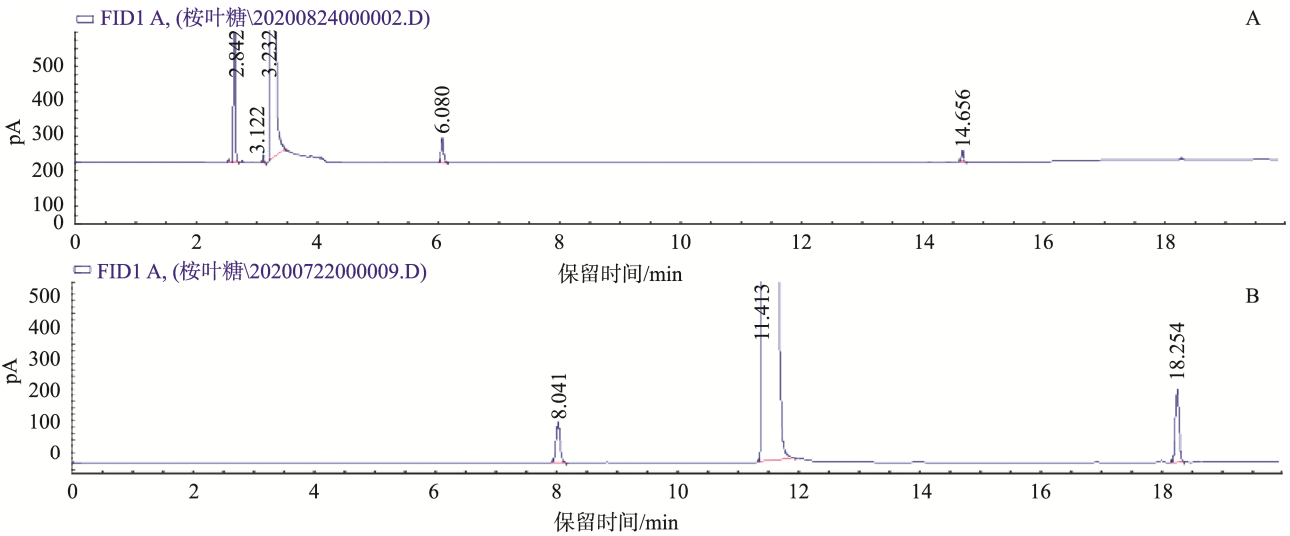
样品称样量 /g	样品含量 /mg	对照品加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%
0.9996	0.415	1.452	1.851	98.86	104.31
1.0003	0.416	1.452	1.930	104.31	
1.1566	0.481	1.452	2.043	107.59	
1.1356	0.472	1.452	2.012	106.09	
1.0263	0.426	1.452	1.901	101.57	
1.1603	0.482	1.452	2.042	107.42	

2.4 重复性实验

计算得相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)

表 4 不同色谱柱测定结果
Table 4 Results of different chromatography columns

色谱柱	目标成分	保留时间/min	分离度	理论塔板数	对称因子
柱 1	桉叶素	6.080	40.44	120379	0.86
柱 2	桉叶素	18.254	40.79	405144	0.98



注: A: 柱 1, B: 柱 2。

图 3 不同色谱柱测定结果

Fig.3 Results of different chromatography columns

小于 2%，结果表明本法具有良好的重复性，见表 3。

表 3 重复性实验结果
Table 3 Repeatability test result

序号	称样量/g	桉叶素/(mg/g)
1	0.9768	0.4231
2	1.0085	0.4262
3	0.9988	0.4129
4	0.9896	0.4114
5	1.0248	0.4089
6	0.9998	0.4102
平均含量/%	--	0.4155
RSD/%	--	1.8

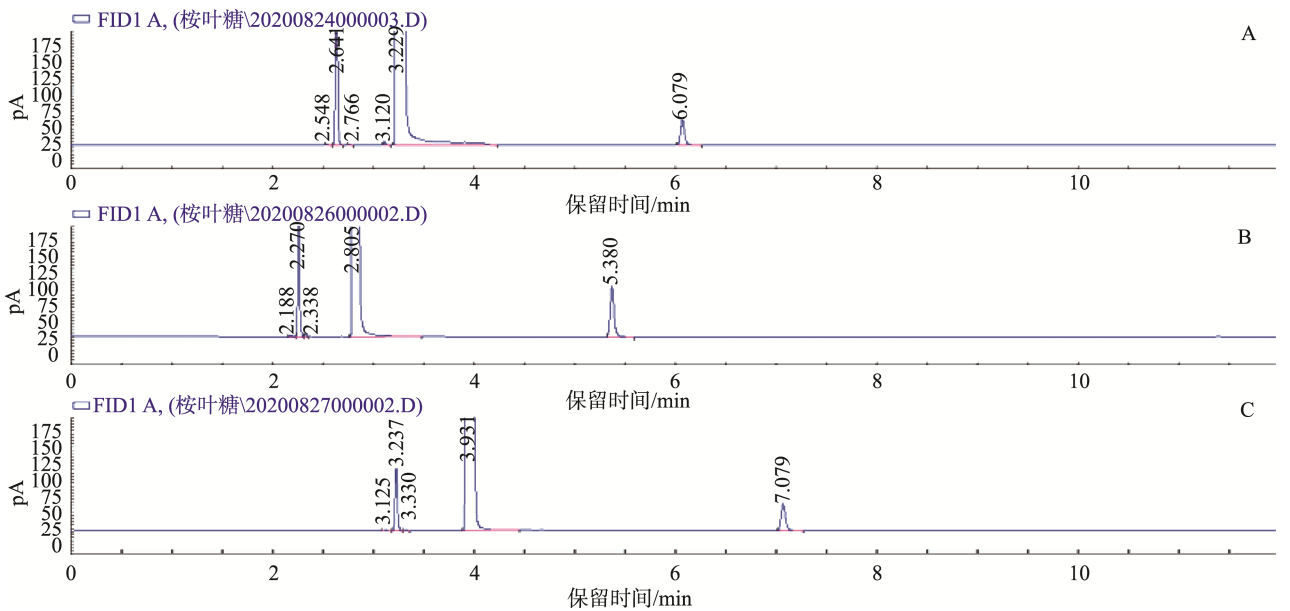
2.5 耐用性实验

取同一供试品溶液，分别使用以下气相色谱柱进行实验，发现供试品中的目标成分均能良好分离，结果见表 4、图 3。

取同一供试品溶液，分别调整载气流速为 0.8 mL/min 和 1.2 mL/min 进行实验，发现供试品中的目标成分均能良好分离，结果见表 5、图 4。

表 5 不同载气流速测定结果
Table 5 Results of different carrier gas flow rates

载气流速/(mL/min)	目标成分	保留时间/min	分离度	理论塔板数	对称因子
1.0	桉叶素	6.079	41.12	122775	0.84
0.8	桉叶素	7.079	43.86	132112	0.79
1.2	桉叶素	5.380	43.86	96138	0.84



注: 载气流速 A、B、C: 1.0、1.2、0.8 mL/min。

图 4 不同载气流速测定结果

Fig.4 Results of different carrier gas flow rates

3 结 论

随着润喉糖市场的发展, 桉叶素作为一种有良好清咽润喉作用的食物原料其在产品中的应用必将越来越多, 而桉叶素的含量是产品的关键质量指标, 但目前尚无针对硬糖类产品中桉叶素含量测定的研究报道, 无法有效地对产品质量进行控制、评价。本研究建立了硬糖类产品中桉叶素含量的检测方法, 该法简便、准确、专属性强、重复性好, 经方法学验证, 本法可用于硬糖类产品中桉叶素的含量测定, 为以桉叶素为主要功效成分的清咽润喉硬糖提供了良好的质量检测标准。

参考文献

[1] 卢羽玲, 韦倩妮, 王佳萍, 等. 清咽润喉压片糖果研究进展[J]. 轻工科技, 2020, 36(8): 6-8, 10.
LU LL, WEI QN, WANG JP, et al. Research progress of qingyan moisten throat tablet candy [J]. Sci Technol Light Ind, 2020, 36(8): 6-8, 10.
[2] 吕辰鹏, 何泉泉, 王丽斐, 等. 清咽功能保健食品的研究进展[J]. 食品工业, 2015, 36(9): 215-220.
LU CP, HE QQ, WANG LF, et al. Research progress of qingyan functional

health food [J]. Food Ind, 2015, 36(9): 215-220.
[3] 曼氏(上海)香精香料有限公司. 中国润喉糖市场报告[R]. 上海, 2019.
Man (Shanghai) Flavor and Fragrance Co., LTD. Report on Chinese Lozenges Market [R]. Shanghai, 2019
[4] VITURRO CI, MOLINA AC, HEIT CI. Volatile components of *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata* from Jujuy, Argentina [J]. J Essent Oil Res, 2003, 15(3): 206-208.
[5] TIZIANABARATTA M, DAMIENDORMAN HJ, DEANS S, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils [J]. J Essent Oil Res, 1998, 10(6): 618-627.
[6] HUSSAIN AI, ANWAR F, NIGAM PS, et al. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth [J]. LWT-Food Sci Technol, 2011, 44(4): 1199-1206.
[7] 郑晓波. 1, 8-桉叶素对 P2X₂ 受体介导神经病理痛的作用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
ZHENG XB. Study on the effect of 1, 8-eucalyptus on P2X₂ receptor-mediated neuropathic pain [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
[8] 匙占库, 文孟良, 赵江源, 等. 桉叶素生物合成研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(11): 92-102.
SHI ZK, WEN ML, ZHAO JY, et al. Advances in the biosynthesis of

- eucalyptus [J]. Chin J Bioeng, 2008, 38(11): 92–102.
- [9] 吴楠. 1, 8-桉叶素抗 IBV 作用效果及机制研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- WU N. Effect and mechanism of 1, 8-eucalyptus against IBV [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2008.
- [10] 徐年香. 桉叶素对大鼠脊髓胶状质神经元自发兴奋性传递的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- XU RX. Effects of eucalyptus on spontaneous excitatory transmission of rat spinal colloidal neurons [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012.
- [11] 白懋嘉, 刘布鸣, 柴玲, 等. 桉叶素-松油醇型复合精油对 6 种霉菌的抑制作用研究[J]. 香料香精化妆品, 2017, (5): 11–16.
- BAI MJ, LIU BM, CHAI L, *et al.* Research on the inhibitory effect of cineole and turpentine alcohol complex essential oil on 6 kinds of mold [J]. Flavour, Fragrance Cosmet, 2017, (5): 11–16.
- [12] DHAKAD AK, PANDEY VV, BEG S, *et al.* Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: A review [J]. J Sci Food Agric, 2017, 98(3): 833–848.
- [13] LAHLOU S, FIGUEIREDO AF, MAGALHES PJ, *et al.* Cardiovasculareffects of 1, 8-cineole, a terpenoid oxide present in many plantessential oils, in normotensive rats [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2002, 80(12): 1125–1131.
- [14] 李士雨, 王静康. 桉叶素应用与制备综述[J]. 精细化工, 1995, (5): 12–15.
- LI SY, WANG JK. A review of the application and preparation of eucalyptus [J]. Fine Chem Ind, 1995, (5): 12–15.
- [15] JUERGENS UR. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1, 8-cineole: Current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases [J]. Drug Res (Stuttg), 2014, 64(12): 638–646.
- [16] 孙宜田, 于娜, 康健. 桉叶素对烟熏大鼠气道炎症及细菌负荷的影响 [A]. 中华医学会、中华医学会呼吸病学分会. 中华医学会呼吸病学年会—2013 第十四次全国呼吸病学学术会议论文汇编[C]. 中华医学会、中华医学会呼吸病学分会: 中华医学会, 2013: 2.
- SUN YT, YU N, KANG J. Effects of eucalyptus on airway inflammation and bacterial load in smoked rats [A]. Chinese Medical Association, Chinese Medical Association respiratory Medicine branch. Chinese Medical Association Respiratory Epidemiology Annual Meeting—the 14th National Respiratory Epidemiology Academic Conference in 2013 [C]. Chinese Medical Association, Chinese Medical Association Respiratory Branch: Chinese Medical Association, 2013: 2.
- [17] 戚鹏飞, 丁爱华, 李志俊, 等. 气相色谱法测定野艾叶中桉叶素的含量 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2020, 37(3): 35–38.
- QI PF, DING AH, LI ZJ, *et al.* Determination of eucalyptus in Leaves of *Artemisia argyi* L. by gas chromatography [J]. J Gansu Univ Tradit Chin Med, 2020, 37(3): 35–38.
- [18] 罗成江, 周炜, 侯轩, 等. 气相色谱法测定香味剂中桉叶素肉桂醛百里香酚及香芹酚的含量[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(2): 113–115.
- LUO CJ, ZHOU W, HOU X, *et al.* Determination of eucalyptus cinnamaldehyde thymol and carvonol in fragrances by gas chromatography [J]. Chin J Vet Med, 2019, 55(2): 113–115.
- [19] 何元, 顾崇梅. 气相色谱法测定石榴健胃片中桉叶素的含量[J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35(4): 36–39.
- HE Y, GU CM. Determination of eucalyptus in Pomegranate Jianwei Tablets by gas chromatography [J]. J Gansu Univ Tradit Chin Med, 2012, 35(4): 36–39.
- [20] 丁礼琴, 金家骅. GC 测定清凉油中薄荷脑、樟脑、桉叶素和丁香酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 85–89.
- DING LQ, JIN JH. Determination of menthol, camphor, eucalyptus and eugenol in qingliang oil by GC [J]. Chin J Exp Formulol, 2014, 20(13): 85–89.
- [21] 罗秀琼, 冯华. 气相色谱法测定复方桉叶素滴丸中桉叶素的含量[J]. 中医药导报, 2009, 15(6): 87–88.
- LUO XQ, FENG H. Determination of eucalyptus in compound dropping pills by gas chromatography [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2009, 15(6): 87–88.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



孔庆龙, 硕士, 工程师, 主要研究方向为保健品、新食品开发。
E-mail: 13238660658@163.com



游 燕, 正高级工程师, 主要研究方向为药物分析和质量研究。
E-mail: yy81221@ynby-yimm.com