

# 不同方法对牛至精油化学成分定性定量分析比较研究

林国栋<sup>1,2</sup>, 李圣杰<sup>1,2</sup>, 程峰<sup>1,2</sup>, 买吾兰江·买提努尔<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院新疆理化技术研究所 干旱地区植物资源与化学重点实验室 新疆天然药用植物资源利用国家重点实验室, 乌鲁木齐 830011; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100039

**摘要:**采用气相色谱四级杆-飞行时间-质谱联用(GC-QTOF-MS)搭配三根不同极性毛细管柱分析牛至精油, 通过提供更多保留指数指认化合物, 提高定性准确度; 另外, 选择牛至精油中 8 个含量不同的化合物进行 4 种定量分析之间差异研究, 优化定量准确度。HP-5ms 柱中鉴定出 24 种化合物, HP-1 柱中鉴定出 33 种化合物, HP-INNOWax 柱中鉴定出 30 种化合物, 三种极性条件共存的化合物为 15 种, 共鉴定出 38 种化合物, 占精油总含量的 97% 以上。采用气相色谱四级杆-飞行时间-质谱联用(GC-QTOF-MS)峰面积归一化法、气相色谱-氢火焰离子化(GC-FID)峰面积归一化法、内标法、外标法测定的百里香酚的含量分别为(25.869 ± 0.263)%、(27.567 ± 0.003)%、(7.396 ± 0.068)%、(5.558 ± 0.025)%。多柱分析可以提高牛至精油成分鉴定的准确度; 不同定量方法之间各有优劣。

**关键词:**多柱定性; 归一化法; 内标法; 标准曲线法; 牛至精油

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)Suppl-0054-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.S.008

## Comparative study on qualitative and quantitative analysis of chemical components from oregano essential oil by different methods

LIN Guo-dong<sup>1,2</sup>, LI Sheng-jie<sup>1,2</sup>, CHENG Feng<sup>1,2</sup>, MAITINUER Mai-wu-lan-jiang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>The Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry of Arid Zone and State Key Laboratory Basis of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; <sup>2</sup>University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

**Abstract:** Analysis of oregano essential oil by gas chromatography quadrupole-time of flight-mass spectrometry (GC-QTOF-MS) with three capillary columns of different polarities to improve the qualitative accuracy by providing more retention indices to identify compounds. In addition, eight compounds with different contents in oregano essential oil were selected for a difference study between four quantitative analyses to optimize the quantitative accuracy. Twenty-four compounds were identified in the HP-5ms column, 33 compounds were identified in the HP-1 column, 30 compounds were identified in the HP-INNOWax column, and 15 compounds were present simultaneously in the three polar conditions, for a total of 38 compounds, accounting for more than 97% of the total essential oil content. Four methods (GC-QTOF-MS peak area normalization, GC-FID peak area normalization, internal standard method and external standard method) were used to determine the content of thymol, which were (25.869 ± 0.263)%, (27.567 ± 0.003)%, (7.396 ± 0.068)% and (5.558 ± 0.025)%, respectively.

**Key words:** multi-column qualitative analysis; normalization method; internal standard method; standard curve method; oregano essential oil

牛至是唇形科,牛至属的多年生草本植物,具有广泛的药用价值,在世界各地均有分布<sup>[1]</sup>。牛至精油是从干燥的牛至地上部分提取出来的一种淡黄色

且具有特殊气味的挥发油,具有抗氧化<sup>[2]</sup>、抗菌<sup>[3]</sup>、抗寄生虫<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>等良好的生物活性。

目前对精油等具有挥发性的复杂组分常用气相色谱进行分析。气相色谱分析方法是一种高效能、高选择性、高灵敏度、简单快速、应用广泛的分离分析方法<sup>[6]</sup>。根据色谱图中色谱峰的位置进行定性分析,通过每个色谱峰的峰高或峰面积进行定量分

收稿日期: 2022-04-29 接受日期: 2022-06-20

基金项目: 中国科学院“西部之光”创新交叉团队项目(2020-JCTD-001)

\* 通信作者 E-mail: mavlanjan@ms.xjb.ac.cn

析<sup>[7]</sup>。常用的色谱定性分析方法包括:标准品对照定性<sup>[8]</sup>、保留指数定性<sup>[9]</sup>、双柱或多柱定性<sup>[7,10]</sup>、分离单体化合物定性<sup>[10]</sup>等。对复杂样品的定性多采用联合其他技术定性,多种技术相互协作,可以保证定性结果的准确性。色谱定量分析研究的依据是样品中待测组分的量或者浓度与检测器的响应信号(峰面积或峰高)成正比。色谱定量分析常用的方法包括归一化法、外标法、内标法等<sup>[7,11]</sup>。

众所周知,精油作为天然的抗菌剂、抗氧化剂得到了广泛的研究,可以用于食品保鲜以及化妆品行业。然而,大多数精油药效物质基础研究薄弱,精油成分的含量测定方法各不相同,难以确定用于质控指标的特征性化学成分。而且,风味和香味成分的比例决定了芳香物质的嗅觉感官特性<sup>[12]</sup>。因此,明确它们的定量组成能够了解不同挥发性化合物的作用,或重新组合这类成分以模仿最初的气味或者香味。在香精香料行业中,定量分析也是必要的,以便于灵活控制复合香精或香料的添加量。如牛至作为目前研究比较普遍的植物,其精油受到人们的广泛关注,因此有必要对牛至精油的组成进行进一步的分析研究,从而比较不同定性定量的分析方法之间的区别。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

无水硫酸钠(分析纯),天津市河东区红岩试剂厂,批号:20191012;正己烷(分析纯),天津汇航化工科技有限公司,批号:20210112;正构烷烃混合对照品 C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>(色谱纯),Sigma-Aldric 公司(上海),批号:CDGG-110219-25-1ml;标准品(纯度均 99.5% 以上):百里香酚(Lot: C11405784)、香芹酚(Lot: C10097768)、1,8-桉叶素(Lot: C887406)、3-辛醇(Lot: C11090135)、3-辛酮(Lot: C10926500)、 $\alpha$ -蒎烯(Lot: C110271787)、 $\beta$ -蒎烯(Lot: C10531454)、辛酸甲酯(Lot: C11184012)等购自麦克林生化有限公司(上海),龙脑(Lot: 110881-201709)购自中国食品药品检定研究院;牛至样品(*Origanum vulgare* L.)于 2021 年 1 月从新疆维草集药材有限公司购买,样品批号为:20210125。样品于 2020 年 9 月从湖北恩施采摘收集。药材经新疆理化技术研究所陈丽博士鉴定为唇形科植物牛至 *Origanum vulgare* L. 的干燥地上部分,保存于新疆理化技术研究所标本馆(标本号:WY02683)。试验用高纯氮气、氦气、氢气(纯度 >99.99%)均由新疆康迪实业发展有限公司提供。

### 1.2 仪器与设备

台式高速离心机(德国 Eppendorf 股份公司);安捷伦 7890A-5759C 型 GC-QTOF-M 气质联用仪(美国 Agilent 公司),7890B 气相色谱仪(美国 Agilent 公司);HP-5、HP-5MS、HP-1、HP-INNOWax 毛细管柱(美国 Agilent 公司);Sartorius CPA124s 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);SK7210HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 牛至精油提取

通过团队自制的隔水蒸馏法装置提取,称取牛至药材 500 g,放入提取装置中,加入蒸馏水与药材比例为 10:1,在提取器边缘涂抹真空硅脂,保持一定的密封性。提取器上端连接 Clevenger 挥发油提取器,连通冷却循环装置,开始精油提取,全程保持微沸,提取 6 h。

$$\text{精油得率} = \frac{G_1}{G_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $G_1$  为精油的质量,  $G_2$  为药材质量,单位均为 g。

#### 1.3.2 GC-QTOF-MS 多柱定性分析

采用气相色谱四级杆-飞行时间-质谱联用(gas chromatography-quadrupole time-of-flight mass, GC-QTOF-MS)分别搭配三种不同的极性的毛细管柱,分别是非极性的 HP-5ms(30 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu$ m)、低极性的 HP-1(30 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu$ m)、强极性的 HP-INNOWax(30 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu$ m)对牛至精油进行多柱定性分析,色谱条件:60  $^{\circ}$ C 保温 3 min,4  $^{\circ}$ C/min 升温至 240  $^{\circ}$ C,保温 3 min,进样口温度为 250  $^{\circ}$ C,进样量 0.3  $\mu$ L,分流比为 20:1。以高纯氦气为载气,流速为 1 mL/min,溶剂延迟 3 min。MS 条件如下:电子能量:70 eV;离子源温度为 230  $^{\circ}$ C,四极杆温度 150  $^{\circ}$ C,质量范围为  $m/z$  50 ~ 500 amu。以正构烷烃(C<sub>7</sub> ~ C<sub>40</sub>)为参照计算保留指数,计算方法见公式 2,通过 Masshunter 工作站软件进行分析,NIST14.L 数据库进行化合物匹配。

$$RI = 100 \times Z + 100 \times \frac{T_x - T_Z}{T_{Z+1} - T_Z} \quad (2)$$

式中  $T_x$  是组分保留时间,  $Z$  是正构烷烃的碳数,  $T_Z$  是碳数为  $Z$  时正构烷烃的保留时间,  $T_{Z+1}$  是碳数为  $Z+1$  时正构烷烃的保留时间。

#### 1.3.3 不同方法定量分析

##### 1.3.3.1 GC-QTOF-MS 峰面积归一化法

色谱条件同“1.3.2”。峰面积归一化法是色谱分析中常用的一种定量分析方法。通过 Masshunter 工作站的定性分析软件,导出色谱图相关的数据,根据色谱图的响应值峰面积,计算每一个化合物的相对含量。归一化法的计算公式如下:

$$W_i = \frac{A_i}{A_1 + A_2 + \dots + A_n} \times 100\% \quad (3)$$

式中,  $w_i$  和  $A_i$  为精油组分中组分  $i$  的相对百分含量和峰面积。

### 1.3.3.2 GC-FID 峰面积归一化法

采用气相色谱-氢火焰离子化 (gas chromatography-flame ionization detector GC-FID) 峰面积归一化法对精油组分进行定量分析, GC-FID 色谱条件如下, 采用 HP-5 毛细管柱 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 升温程序: 初始温度为 60 °C, 保持 3 min, 以 4 °C/min 升温至 240 °C。载气为高纯氮气 (99.99%), 氮气流速为 1 mL/min。进样口温度: 250 °C; 进样量: 0.3 μL, 分流比: 20:1。氢火焰离子化检测器温度 250 °C, 氢气流量 30 mL/min, 空气流量 400 mL/min, 尾吹 (氮气) 流量 20 mL/min。通过 OpenLAB CDS -Agilent GC Drivers (软件版本 A.01.02.0001.02.35.0) 软件, 进行样品检测。

Agilent OpenLAB (软件版本 2.200.0.528) 数据分析软件导出色谱图相关信息, 与 GC-QTOF-MS 定性分析结果进行色谱峰比对, 确定 GC-FID 色谱图上化合物的信息, 然后进行峰面积归一化法含量计算。含量计算同公式 (3)。

### 1.3.3.3 GC-FID 内标法

内标法是向一定量的待测组分中加入精密称量的内标物质, 然后进行色谱分析测定, 色谱条件同上 GC-FID 峰面积归一化法。由于等量的不同组分在同一检测器上的响应值不同, 即相同量的不同组分可能会得到不同的峰面积。因此, 用辛酸甲酯作为内标物, 利用峰面积进行定量分析时, 需要计算每种化合物的校正因子, 对精油成分进行半定量分析。辛酸甲酯作为内标物质, 已知其质量, 在色谱图上可以得知其峰面积, 准确称量牛至精油精密加入内标物质后在容量瓶中定容, 通过气相色谱得到组分峰面积, 通过峰面积和质量的关系式计算, 含量计算公式如下:

$$m_i = \frac{m_{\text{辛}}}{A_{\text{辛}}} \times f_i \times A_i \quad (4)$$

式中, 和为精油组分中组分  $i$  的含量和峰面积,

$m_{\text{辛}}$  和  $A_{\text{辛}}$  是辛酸甲酯的质量和峰面积, 是精油中组分  $i$  的校正因子。

### 1.3.3.4 GC-FID 标准曲线法

外标标准曲线法是用待测组分的标准品在一定浓度范围内配制一组待测组分浓度 ( $c$ ) 由低到高的标准溶液, 在一定条件下测定各标准溶液中待测组分的峰面积  $A$ 。以峰面积对组分浓度进行线性回归, 并且作图, 可以得到回归方程  $A = a + bc$  ( $a$  为截距,  $b$  为斜率) 和相关系数  $R^2$ , 相关系数被用来评价线性关系的好坏。标准曲线中的浓度点的数目 ( $n$ ) 一般在 5 ~ 10。

准确称量牛至精油当中的 8 个对照品, 分别是百里香酚、香芹酚、3-辛醇、3-辛酮、1,8-桉叶素、 $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯、龙脑在 10 mL 的容量瓶中定容, 制成混合标准溶液母液。对混标母液进行梯度稀释, 制备 7 个浓度的标准溶液。通过 GC-FID 峰面积归一化法气相色谱条件, 7 个不同浓度的混合标准溶液和对应的峰面积建立线性回归方程, 通过 origin 2018 软件处理数据, 以峰面积为纵坐标  $A$ , 以标准溶液浓度为横坐标  $c$ , 得到回归方程。同时配置样品溶液, 并在相同条件下对样品溶液进行含量测定, 得到峰面积。根据式 5 计算出样品中待测组分的浓度。

$$C_i = \frac{A_i}{A_s} \times C_s \quad (5)$$

式中, 和为精油组分中组分  $i$  的浓度和峰面积, 和是标准溶液的浓度和峰面积。

## 2 结果与分析

### 2.1 精油得率

牛至含油量较低, Li 等<sup>[13-15]</sup> 通过水蒸气馏法提取了牛至精油, 提取率均在 0.15% ~ 0.3% 之间, 提取时间在 5 ~ 8 h 之间, 料液比为 10:1。本研究为了避免了药材的焦糊现象通过隔水蒸馏法对牛至地上部分提取精油, 料液比为 10:1, 为了提取完全选择时间为 6 h, 得到了具有特殊气味的淡黄色牛至精油, 500 g 牛至药材最终提取得到约 1.2 mL 牛至精油, 得到牛至精油提取率为 0.24%。用无水硫酸钠干燥后, 密封储存在棕色小瓶中, 在 4 °C 冰箱保存备用。

### 2.2 牛至精油多柱分析

对于复杂样品组分定性, 采用双柱或者多柱定性更为准确可靠。通常采用不同极性固定相的毛细管柱进行定性。本研究通过 GC-QTOF-MS 搭配三种不同极性的毛细管柱, 对牛至精油的组分进行化

学成分分析。HP-5ms 毛细管柱,涂层是(5%-苯基)-甲基聚硅氧烷,非极性;HP-1 毛细管柱,涂层是100%二甲基聚硅氧烷,低极性;HP-INNOWax 毛细管柱,涂层是聚乙二醇(PEG),强极性。三种极性毛

细管柱检测牛至精油的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)(见图1)。牛至精油三种极性毛细管柱分析结果见表1。

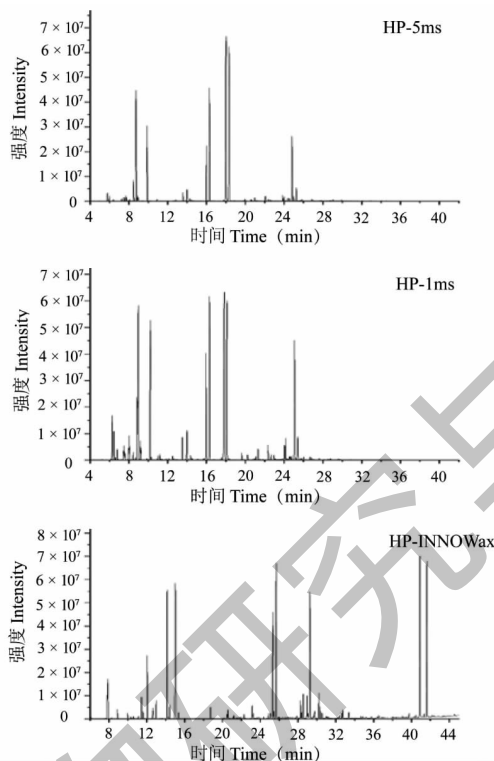


图1 牛至精油三种不同极性色谱柱总离子流图

Fig. 1 TIC of oregano essential oil by three different columns

表1 三种不同极性色谱柱分析牛至精油化学成分

Table 1 Analysis of oregano essential oil chemical composition by three different columns

序号 No.	化学组成 Chemical composition	文献保留指数 Lit. RI	实验保留指数 Exp. RI			相对含量 Relative content(%)			定方法 Identification method
			a	b	c	a	b	c	
1	$\alpha$ -侧柏烯 $\alpha$ -Thujene	924	919	915	1 015	0.63	2.10	1.00	1,2
2	$\alpha$ -蒎烯 $\alpha$ -Pinene	932	926	921	1 020	0.38	1.34	2.02	1,2,3,4
3	苴烯 Camphene	946	-	933	1 063	-	0.49	0.38	1,2
4	桉烯 Sabinene	969	-	961	1 109	-	0.31	0.22	1,2
5	$\beta$ -蒎烯 $\beta$ -Pinene	974	985	976	-	0.42	1.10	-	1,2,3
6	3-辛醇 3-Octanol	974	990	974	-	0.29	0.53	-	1,2,3
7	3-辛酮 3-Octanone	979	980	958	1 259	0.29	0.69	0.53	1,2,3
8	$\alpha$ -水芹烯 $\alpha$ -Phellandrene	1 002	-	989	1 167	-	0.37	0.29	1,2
9	(+)-4-萜烯 (+)-4-Carene	1 009	1 012	1 003	1 183	1.76	3.34	3.01	1,2
10	$\alpha$ -松油烯 $\alpha$ -Terpinene	1 014	-	1 013	1 161	-	0.84	0.86	1,2
11	<i>p</i> -伞花烃 <i>p</i> -Cymene	1 020	1 020	1 006	1 277	11.50	12.03	13.65	1,2,4
12	柠檬烯 Limonene	1 024	-	1 015	1 203	-	0.50	0.37	1,2

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	化学组成 Chemical composition	文献保留指数 Lit. RI	实验保留指数 Exp. RI			相对含量 Relative content (%)			定方法 Identification method
			a	b	c	a	b	c	
13	$\beta$ -松油烯 $\beta$ -Terpinene	1 028	1 024	-	1 214	0.43	-	0.70	1,2
14	桉叶醇 Eucalyptol	1 032	1 027	-	-	0.28	-	-	1,2,3
15	$\gamma$ -松油烯 $\gamma$ -Terpinene	1 054	1 055	1 043	1 250	6.82	8.23	8.50	1,2,4
16	异松油烯 Terpinolene	1 076	-	1 073	1 288	-	0.23	0.20	1,2
17	樟脑 Camphor	1 141	-	1 111	1 533	-	0.21	0.18	1,2
18	茨醇 Borneol	1 165	1 162	1 140	1 709	0.83	1.26	1.13	1,2,3
19	松油烯-4-醇 Terpinen-4-ol	1 174	1 074	1 153	-	1.02	1.59	-	1,2,4
20	对羟基苯甲酸-8-醇 <i>p</i> -Cymene-8-ol	1 179	-	-	1 845	-	-	0.21	1,2
21	$\alpha$ -松油醇 $\alpha$ -Terpineol	1 186	-	1 164	1 703	-	0.24	0.20	1,2
22	甲基百里香酚 Methyl thymol	1 235	1 233	1 210	1 600	5.17	6.13	6.46	1,2,4
23	甲基香芹酚 Methyl carvacrol	1 241	1 234	1 221	1 612	11.86	11.35	13.88	1,2
24	百里香酚 Thymol	1 289	1 292	1 266	2 186	26.72	19.40	17.83	1,2,3
25	香芹酚 Carvacrol	1 298	1 301	1 274	2 217	21.68	14.37	14.87	1,2,3
26	乙酸瑞香酯 Thymol acetate	1 349	-	1 320	1 860	-	0.37	0.34	1,2
27	香芹酚乙酸酯 Carvacrol acetate	1 370	-	1 338	1 883	-	0.32	0.24	1,2
28	$\beta$ -波旁烯 $\beta$ -Bourbonene	1 387	1 383	1 372	1 530	0.32	0.53	0.51	1,2
29	$\beta$ -石竹烯 $\beta$ -Caryophyllene	1 417	1 419	1 404	-	0.46	0.75	-	1,2
30	$\beta$ -胡椒烯 $\beta$ -Copaene	1 430	-	1 414	1 585	-	0.25	0.19	1,2
31	顺-罗汉柏烯 <i>cis</i> -Thujopsene	1 432	-	1 424	-	-	0.26	-	1,2
32	$\gamma$ -衣兰油烯 $\gamma$ -Muurolene	1 478	1 475	1 460	1 692	0.49	0.77	0.71	1,2
33	瓦伦亚烯 Valencene	1 480	-	1 479	-	-	0.24	-	1,2
34	大根香叶烯 D Germacrene D	1 484	1 479	1 463	1 723	0.45	1.13	0.95	1,2
35	Epicubebol	1 493	1 493	-	-	0.33	-	-	1,2
36	$\beta$ -红没药烯 $\beta$ -Bisabolene	1 505	1 506	1 494	1 734	6.15	7.07	6.63	1,2,4
37	$\gamma$ -杜松油烯 $\gamma$ -Cadinene	1 513	1 512	-	1 767	0.47	-	1.04	1,2
38	$\delta$ -杜松油烯 $\delta$ -Cadinene	1 524	1 521	1 504	1 772	1.25	1.26	0.48	1,2

注:组分按非极性柱中的洗脱顺序记录,“a”代表非极性色谱柱 HP-5ms 中数值;“b”代表低极性色谱柱 HP-1 中数值;“c”代表强极性色谱柱 HP-INNOWax 中数值;化合物确定方式:“1”指文献保留指数定性,“2”指质谱数据库比较定性,“3”指标准品定性,“4”指<sup>1</sup>H NMR 谱和<sup>13</sup>C NMR 谱定性;“-”表示未检出。

Note: Components according to the elution order of the records in non-polar column. “a” represents the values by the nonpolar column HP-5ms, “b” represents the values by the low-polarity column HP-1. “c” represents the values by strongly polar column HP-INNOWax. The determination method of compounds; “1” means identified by Lit. RI. “2” means characterized by mass spectrometry database. “3” means qualitative by standard control. “4” means identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. “-” indicated not detected.

由图 1 可以看出,不同极性的毛细管柱检测到的化合物数量差异性较大,对峰面积大于 1% 的色谱峰进行分析,发现在 HP-5ms 非极性毛细管柱上鉴定出了 24 种化合物,在 HP-1 低极性毛细管柱上鉴定了 30 个化合物,在 HP-INNOWax 强极性毛细管柱上鉴定了 33 个化合物。组分当中的主要成分的出峰时间和保留指数发生了变化,两个主要成分百里香酚和香芹酚作为极性较大的化合物在色谱柱上

出峰顺序差异较大。对于复杂组分的定性分析,多柱定性分析的结果更为可靠。同时发现确实存在部分化合物吸附在色谱柱上面,没有流出色谱柱出现在色谱图上。

由表 1 可知,三种极性条件下同时存在的化合物为 15 个,通过三种不同极性的毛细管柱共鉴定了牛至精油中 38 个化合物,占精油总体含量的 97% 以上,可以发现牛至精油的主要成分为醇酚类化合

物和萜烯类化合物。有 7 个相对含量较高的化合物,分别是百里香酚(17.83% ~ 26.72%)、香芹酚(14.87% ~ 21.68%)、百里香酚甲醚(11.35% ~ 13.88%)、对伞花烃(13.65% ~ 11.50%)、 $\gamma$ -松油烯(6.82% ~ 8.50%)、 $\beta$ -红没药烯(6.15% ~ 7.07%)、香芹酚甲醚(5.17% ~ 6.46%)。根据以上结果可以得出峰面积归一化法存在较大的偏差。

研究发现牛至精油的化学成分组成受外界影响较大,如海拔、气候、土壤等因素,以海拔影响为例,随着海拔的升高,牛至精油的含量逐渐下降,而且精油的化学成分也随着海拔的变化而变化,低海拔地区的牛至精油富含单萜和倍半萜类化合物,高海拔地区的牛至精油则含有大量的芳香和烃类的单萜化合物,只含有少量的倍半萜类化合物<sup>[16-18]</sup>。因此,本研究与文献报道<sup>[13,19-23]</sup>的有一定的区别,但是有

多个化合物如百里香酚、香芹酚、香芹酚甲醚、 $\gamma$ -松油烯、松油烯-4-醇、石竹烯等都是共有成分。

### 2.3 牛至精油成分定量分析比较

精油组常用的定量分析主要通过气相色谱-质谱联用和气相色谱-氢火焰离子化检测器来实现。前者所用的是质量型检测器,化合物质谱图中离子流量与化合物的量成正比,这是气相色谱-质谱联用的定量基础<sup>[24]</sup>。后者所用的是浓度型检测器,产生的微电流的大小与进入离子室的被测组分含量成正比,这是气相色谱-氢火焰离子化检测器的定量基础<sup>[25]</sup>。

本研究采用不同的定量分析方法,对牛至精油当中的 8 个化合物的含量进行了分析比较。结果表明,不同的定量分析方法之间差别较大(见表 2)。

表 2 不同分析方法对牛至精油成分含量测定对比

Table 2 Comparison of different analytical methods for determining the content of oregano essential oil components

化合物 Compound	峰面积归一化 Peak area normalization		内标法 Internal standard method	外标法 External standard method
	GC-QTOF-MS	GC-FID	GC-FID	GC-FID
$\alpha$ -蒎烯 $\alpha$ -Pinene	(0.350 $\pm$ 0.061)%	(0.887 $\pm$ 0.001)%	(0.011 $\pm$ 0.001)%	(0.127 $\pm$ 0.005)%
$\beta$ -蒎烯 $\beta$ -Pinene	(0.289 $\pm$ 0.035)%	(1.734 $\pm$ 0.001)%	(0.382 $\pm$ 0.004)%	(0.269 $\pm$ 0.003)%
3-辛酮 3-Octanone	(0.305 $\pm$ 0.033)%	(1.654 $\pm$ 0.001)%	(0.370 $\pm$ 0.008)%	(0.331 $\pm$ 0.003)%
3-辛醇 3-Octanol	(0.316 $\pm$ 0.009)%	(1.008 $\pm$ 0.001)%	(0.255 $\pm$ 0.032)%	(0.189 $\pm$ 0.003)%
1,8-桉叶素 1,8-Cineole	(0.320 $\pm$ 0.054)%	(0.272 $\pm$ 0.001)%	(0.011 $\pm$ 0.001)%	(0.023 $\pm$ 0.001)%
龙脑 Camphol	(0.864 $\pm$ 0.136)%	(0.842 $\pm$ 0.006)%	(0.044 $\pm$ 0.004)%	(0.190 $\pm$ 0.002)%
百里香酚 Thymol	(25.869 $\pm$ 0.263)%	(27.567 $\pm$ 0.003)%	(7.396 $\pm$ 0.068)%	(5.558 $\pm$ 0.025)%
香芹酚 Carvacrol	(21.838 $\pm$ 0.462)%	(17.154 $\pm$ 0.003)%	(4.556 $\pm$ 0.032)%	(3.481 $\pm$ 0.016)%

对牛至精油当中的含量不同的 8 个成分用四种不同的定量分析方法分析,发现结果差异较大。以主要成分百里香酚和香芹酚为例,可以看出含量测定结果具有显著性差异,GC-QTOF-MS 和 GC-FID 峰面积归一化法测得百里香酚的含量为 25.869% 和 27.567%,内标法和外标法测的结果是 7.396% 和 5.558%;香芹酚的含量测定结果 GC-QTOF-MS 和 GC-FID 峰面积归一化法分别为 21.838% 和 17.154%,内标法和外标法测的结果是 4.556% 和 3.481%。

根据不同方法的定量分析原理可知,峰面积归一化法存在较大的误差,可以说明牛至精油当中有部分组分没有流出色谱柱,无法在色谱图上找到对应的色谱峰。半定量的分析方法引入辛酸甲酯作为

内标物质,根据含量与峰面积的转换关系进行计算,并且计算了每个化合物的定量校正因子,排除了同一物质因仪器响应不同而影响实验结果的问题<sup>[12]</sup>。外标标准曲线法通过标准品建立峰面积与浓度之间线性回归模型,可以准确地测定组分中与标准品对应的化合物含量,不需要计算定量校正因子。

### 3 结论

牛至精油的化学成分具有区域差异性,与外界的客观环境密切相关,针对其中的一些同分异构体化合物,以及匹配度较低的化合物,三个不同极性色谱柱的定性分析可以有效地提高其分析结果的准确性。就精油化学成分含量的测定而言,利用标准品建立标准曲线,测得化合物的含量最为准确;其次利用结构相近的化合物作为内标物质,进行含量测定

在一定程度上也可以提高其准确性。峰面积归一化法虽然是一种常用的含量大小的判断方法,简单且方便,但是存在较大的误差。

综上所述,精油等复杂组分的定性分析可采用多柱分析提高准确度;含量测定不同方法各有优劣,可根据试验需求选择合适的定量分析方法。

#### 参考文献

- Polat R, Satil F. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir-Turkey) [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139:626-641.
- Loizzo MR, Menichini F, Conforti F, et al. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils [J]. Food Chem, 2009, 117:174-180.
- Assiri A, Elbanna K, Al-Thubiani A, et al. Cold-pressed oregano (*Origanum vulgare* L.) oil: a rich source of bioactive lipids with novel antioxidant and antimicrobial properties [J]. Eur Food Res. Technol, 2016, 242:1013-1023.
- Tao L, Liang Y, Zhou X, et al. Effects of carbon ion beam irradiation on slow-release properties and anti-coccidiosis activity of oregano essential oil microcapsules [J]. Nucl Phys Rev (原子核物理评论), 2018, 35:179-188.
- Li ZY, Song ZH. Biological activity of carvacrol and its application in livestock and poultry production [J]. Hunan Feed, 2020:36-38.
- Chen Y, Lu SM, Zhu L, et al. Analysis of volatile compositions of Hangzhou white chrysanthemum extract by GC-TOFMS [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 025:489-493.
- Qi ML. Gas Chromatography Analysis and Applications (气相色谱分析及应用) [M]. Beijing: Science Publishing House, 2012:56-65.
- Liang B, Yan SF, Chen MQ, et al. Study on the volatile components of *Acanthopanax japonica* in Gansu I. isolation and identification of essential oil components [J]. Instrum Anal, 1994, 13:7.
- Liang C, Li YW, Zhao CX, et al. Qualitative analysis of the essential oils of traditional Chinese medicines using GC-MS and retention indices [J]. Instrum Anal, 2008, 27:84-87.
- Dong GX, Bai X, Aimila A, et al. Study on Lavender essential oil chemical compositions by GC-MS and improved pGC [J]. Molecules, 2020, 25:3166.
- Chai YF, Di X. Analytical Chemistry (分析化学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016:332-336.
- Tissot E, Rochat S, Debonneville C, et al. Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors [J]. Flavour Frag J, 2012, 27:290-296.
- Li N, Wu XY, Zhao WJ, et al. Composition analysis of oregano essential oils and their antioxidant activity and antibacterial activity [J]. China Condiment (中国调味品), 2020, 45:29-33 + 54.
- Zhang XY, Xiao D, Bai BR, et al. GC-MS analysis of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Mosla chinensis* Maxim. [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 40:208-209.
- Zhang ZY, Zhao Y, Yang XB, et al. Analysis of components in fatty acid and volatile oil from *Origanum vulgare* L. by GC-MS [J]. Herald Med (医药导报), 2009, 28:549-552.
- Giuliani C, Maggi F, Papa F, et al. Congruence of phytochemical and morphological profiles along an altitudinal gradient in *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* from Venetian region (NE Italy) [J]. Chem Biodivers, 2013, 10:569-583.
- Gavalas NP, Kalburtji KL, Kokkini S, et al. Ecotypic variation in plant characteristics for *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* populations [J]. Biochem Syst Ecol, 2011, 39:562-569.
- Lombrea A, Antal D, Ardelean F, et al. A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil [J]. Int J Mol Sci Dec, 2020, 21:9653.
- Khan M, Khan S T, Khan N A, et al. The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity [J]. Arab J Chem, 2018, 11:1189-1200.
- Morshedloo M R, Mumivand H, Craker LE, et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. *gracile* at different phenological stages and plant parts [J]. J Food Process Preserv, 2018, 42:e13516.
- Dutra TV, Castro JC, Menezes JL, et al. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil against *Alicyclobacillus* spp [J]. Ind Crop Prod, 2019, 129:345-349.
- Han F, Ma GC, Yang M, et al. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano [J]. J Zhejiang Univ SCI B, 2017, 18:79-84.
- Khan M, Khan S. T, Khan M, et al. Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities [J]. AMB Express, 2019, 9:176.
- Sparkman OD, Penton ZE, Kitson FG. Gas Chromatography and Mass Spectrometry [M]. America: Academic Press, 2011:589-611.
- Wang Z, Jocelyn P JR. Chapter 3 Gas chromatography (GC): Principles and applications. In: Paré JRJ, Bélanger JMR. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry [M]. Elsevier, 1997, 18:61-91.