气相色谱-一测多评法同时测定佛手挥发油中6种成分的含量Δ

罗忻昳*，李　培，何　兵，张　春，张　丹，田　吉#（西南医科大学药学院，四川 泸州　646000）

中图分类号　R284.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2021）16-1995-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2021.16.13

摘　要　目的：建立同时测定佛手挥发油中α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇等6种成分含量的方法。方法：采用气相色谱-一测多评法。色谱柱为Agilent DB-17毛细管柱，检测器为火焰离子化检测器，载气为氮气（纯度99.999%），载气流速为0.5 mL/min，氮气（尾吹）流速为25 mL/min，氢气流速为30 mL/min，空气流速为400 mL/min，进样口温度为250 ℃，检测器温度为280 ℃，程序升温，进样量为0.5 μL，分流比为35∶1。以柠檬烯为内参物，计算α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、γ-松油烯等4种成分的相对校正因子，再根据相对校正因子计算佛手挥发油中4种成分的含量，并与内标法（以十二烷为内标物，测定6种成分）进行比较。结果：α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇检测质量浓度的线性范围分别为0.030 5～0.213 8、0.066 6～0.466 0、0.021 8～0.152 3、0.765 2～5.356 4、0.387 3～2.710 8、0.034 2～0.239 6 mg/mL（r均大于0.999）；检测限分别为4.82、7.89、4.01、4.54、5.53、2.47 μg/mL，定量限分别为15.34、25.91、13.69、15.70、18.68、8.36 μg/mL；精密度、重复性、稳定性（24 h）试验的RSD均小于2%；平均加样回收率分别为96.08%、97.48%、100.90%、101.22%、100.54%、95.84%（RSD均小于3%，n=6）。α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、γ-松油烯的平均相对校正因子分别为0.997 8、1.530 7、0.952 4、1.025 5（RSD均小于1%）。内标法测得α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇的含量分别为3.296 9～20.994 1、11.300 6～39.440 9、3.684 2～11.291 4、174.857 8～511.611 8、0～285.127 3、0～48.858 6 mg/g；一测多评法测α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、γ-松油烯的含量分别为3.296 8～20.994 0、11.300 3～39.439 7、3.684 1～11.291 1、0～285.126 6 mg/g；两种方法测得α-蒎烯等4种成分含量的相对误差均小于1%。结论：所建气相色谱-一测多评法简便、快捷，准确度高，重复性好，可用于佛手挥发油成分的定量分析及质量控制。

关键词　佛手挥发油；气相色谱法；一测多评法；含量测定

Simultaneous Determination of 6 Components in Volatile Oil from *Citrus medica* by GC-QAMS

LUO Xinyi, LI Pei, HE Bing, ZHANG Chun, ZHANG Dan, TIAN Ji (School of Pharmacy, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of α-pinene, β-pinene, myrcene, limonene, γ-terpinene and α-terpineol in volatile oil from *Citrus medica*. METHODS: GC-QAMS method was adopted. The determination was performed on Agilent DB-17 capillary column. Flame ionization detector was adopted with nitrogen as carrier gas (purity 99.999%) at the flow rate of 0.5 mL/min. The flow rate of nitrogen (make-up gas) was 25 mL/min, the flow rate of hydrogen was 30 mL/min, and the flow rate of air was 400 mL/min. The inlet temperature was 250 ℃, and the detector temperature was 280 ℃ (programmed temperature), and injection volume was 0.5 μL with split ratio of 35∶1. Using limonene as internal reference, relative correction factors of α-pinene, β-pinene, myrcene and γ-terpinene were calculated. The contents of 4 components in the samples were calculated according to the relative correction factors. The results were compared between QAMS and internal standard method (ISM, using dodecane as internal substance, 6 components to be determined). RESULTS: The linear range of α-pinene, β-pinene, myrcene, limonene, γ-terpinene and α-terpineol were 0.030 5-0.213 8, 0.066 6-0.466 0, 0.021 8-0.152 3, 0.765 2-5.356 4, 0.387 3-2.710 8, 0.034 2-0.239 6 mg/mL (all r>0.999). The limits of detection were 4.82, 7.89, 4.01, 4.54, 5.53, 2.47 μg/mL, and the limits of quantification were 15.34, 25.91, 13.69, 15.70, 18.68, 8.36 μg/mL, respectively. RSDs of precision, repeatability and stability tests (24 h) were all less than 2%. The average recovery rates were 96.08%, 97.48%, 100.90%, 101.22%, 100.54%, 95.84% (all RSD<3%, n=6). The average relative correction factors of α-pinene, β-pinene, myrcene and γ-terpinene were 0.997 8, 1.530 7, 0.952 4 and 1.025 5 (all RSD<1%). The contents of α-pinene, β-pinene, myrcene, limonene, γ-terpinene and α-terpineol by ISM were 3.296 9-20.994 1, 11.300 6-39.440 9, 3.684 2-11.291 4, 174.857 8-511.611 8, 0-285.127 3, 0-48.858 6 mg/g, respectively. The contents of α-pinene, β-pinene, myrcene and γ-terpinene determined by QAMS were 3.296 8-20.994 0, 11.300 3-39.439 7, 3.684 1-11.291 1, 0-285.126 6 mg/g, respectively. Relative content errors of 4 components as α-pinene determined by 2 methods were all less than 1%. CONCLUSIONS: The established GC-QAMS method is simple, rapid, accurate and repeatable, and can be used for quantitative analysis and quality control of volatile oil from *C. medica*.

KEYWORDS　Volatile oil from *Citrus medica*; GC; QAMS; Content determination

Δ 基金项目：四川省科技厅应用基础研究项目（No.2021YJ0114）；泸州市重点科技项目[No.2011-S-31（3/3）]；合江县人民政府—西南医科大学战略合作项目（No.2018-HJXNYD-2）

* 硕士研究生。研究方向：中药制备工艺及质量评价。电话：0830-3162291。E-mail：493359958@qq.com

通信作者：研究员，硕士生导师，硕士。研究方向：中药制备工艺及质量评价。电话：0830-3162291。E-mail：759211049@qq.com

佛手为芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实，收载于2020年版《中国药典》（一部），具有疏肝理气、和胃止痛、燥湿化痰之功[1]。佛手主产于我国广东、四川、浙江等地，根据产地不同被称为广佛手、川佛手和浙佛手等[2]，主要含挥发油、黄酮、香豆素和多糖等成分[3]。佛手外皮为黄绿色或橙黄色，有皱纹和油点，气香，是挥发油的主要来源[1]。近年来，关于佛手挥发油药理作用的报道逐渐增多，且研究显示其具有抑菌[4]、止咳平喘祛痰[5]、抗抑郁[6]、抗肿瘤[7-9]等作用，现已被广泛用于香水、化妆品、医药、食品等行业。此外，佛手挥发油还可用于芳香疗法，用于调节患者情绪和改善轻微的应激障碍症状，如焦虑、抑郁、痴呆症的行为障碍和慢性疼痛等[10]。目前关于佛手挥发油的研究主要集中在成分分析方面，有学者采用气质联用技术（GC-MS）分析了不同产地佛手挥发油的成分，结果表明，佛手挥发油中含有萜烯类及其含氧衍生物，其中柠檬烯、α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、γ-松油烯、α-松油醇等6种成分在佛手挥发油中的含量较高[11-16]；有研究指出，柠檬烯是佛手挥发油的主要成分，具有抗炎、抗焦虑、抑制细胞增殖、抗肿瘤等作用[17]。此外，α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、γ-松油烯、α-松油醇等也具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化以及抗哮喘等多种药理作用[18-20]。

2020年版《中国药典》（一部）中佛手“含量测定”项仅规定以高效液相色谱法测定橙皮苷的含量[1]。本课题组前期虽然采用气相色谱法（GC）测定了佛手挥发油中主成分柠檬烯的含量[21]，但考虑到挥发油是由多种萜类成分组成的有效部位，故单一成分的含量测定不能完全反映挥发油的整体质量。现代中药质量评价提倡采用多指标质量控制模式，对对照品的种类和数量需求均较大[22]，而一测多评法（QAMS）可通过单一对照品而实现对多个成分的同步检测，检测成本大大降低[22]，但文献报道的QAMS相关研究以液相色谱法居多[23-24]。基于此，本研究采用气相色谱-一测多评法（GC-QAMS）测定佛手挥发油中α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇等成分的含量，旨在为佛手药材及其挥发油的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Agilent 7890A型GC仪、Agilent 8890型GC仪（美国Agilent公司），岛津GC-2030型GC仪（日本shimadzu公司），XR 205SM-DR型十万分之一电子天平（瑞士Precisa公司）。

1.2 主要药品与试剂

α-蒎烯对照品（批号00016834-424，纯度98.9%）、α-松油醇对照品（批号00020105-FMC，纯度98.0%）均购自美国ChromaDex公司；β-蒎烯对照品（批号131559，纯度99.5%）购自德国Dr. Ehrenstorfer GmbH公司；月桂烯对照品（批号BCBW0611，纯度93.0%）、γ-松油烯对照品（批号STBH9503，纯度98.8%）均购自西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；柠檬烯对照品（批号100470-201503，纯度96.0%）购自中国食品药品检定研究院；十二烷对照品（内标，批号K1920078，纯度99.7%）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；乙酸乙酯为分析纯，水为超纯水。

23批佛手药材（编号S1～23）均购自原产地，经西南医科大学药学院张春教授鉴定为佛手芸香科植物佛手 *C. medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实。采用水蒸气蒸馏提取法制备佛手挥发油（共23批，以无水硫酸钠去除挥发油中的残余水分，得率为0.2%～1.0%）。佛手药材信息来源见表1。

表1 佛手药材信息来源

Tab 1 Source information of *Citrus medica*

编号	药材	产地	挥发油批号
S1	广佛手1	广东省肇庆市德庆县	20171218
S2	广佛手2	广东省肇庆市德庆县	20171221
S3	广佛手3	广东省肇庆市德庆县	20191031
S4	广佛手4	广西壮族自治区桂林市永福县	20191111
S5	川佛手1	四川省绵阳市安州区	20191028
S6	川佛手2	四川省甘孜州九龙县	20191102
S7	川佛手3	四川省泸州市合江县	20151218
S8	川佛手4	四川省泸州市合江县	20151202
S9	川佛手5	四川省泸州市合江县	20161128
S10	川佛手6	四川省泸州市合江县	20170601
S11	川佛手7	四川省泸州市合江县	20170914
S12	川佛手8	四川省泸州市合江县	20190823
S13	川佛手9	四川省绵阳市安州区	20191103
S14	川佛手10	四川省乐山市沐川县	20180715
S15	川佛手11	四川省乐山市沐川县	20180720
S16	川佛手12	四川省雅安市石棉县	20171205
S17	川佛手13	四川省雅安市石棉县	20171207
S18	川佛手14	四川省宜宾市	20191112
S19	川佛手15	重庆市石柱县	20200724
S20	浙佛手1	浙江省金华市金东区	20161200
S21	浙佛手2	浙江省金华市金东区	20180103
S22	浙佛手3	浙江省金华市金东区	20191101
S23	云南佛手	云南省昆明市晋宁区	20191113

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 单一对照品贮备液 精密称取α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇对照品76.34、83.22、90.68、191.30、203.82、90.06 mg，分别置于10 mL量瓶中，加入乙酸乙酯溶解，制成上述6种成分质量浓度分别为7.634、8.322、9.068、19.130、20.382、9.006 mg/mL的单一对照品贮备液。

2.1.2　内标溶液　精密称取十二烷对照品适量，加入乙酸乙酯溶解，混匀，制成质量浓度为7.327 mg/mL的内标溶液。

2.1.3　混合对照品溶液　分别精密量取“2.1.1”项下6种单一对照品贮备液400、800、240、4 000、1 900、380 μL，置于10 mL量瓶中，加入乙酸乙酯定容，混匀，得各成分质量浓度分别为0.305 4、0.665 8、0.217 6、7.652 0、3.872 6、0.342 2 mg/mL的混合对照品贮备液。精密量取上述贮备液5 mL及“2.1.2”项下内标溶液1 mL，加入乙酸乙酯定容至10 mL，混匀，即得α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇、十二烷质量浓度分别为0.152 7、0.332 9、0.108 8、3.826 0、1.936 3、0.171 1、0.732 7 mg/mL的混合对照品溶液。

2.1.4　供试品溶液　精密称取佛手挥发油0.1 mL，置于10 mL量瓶中，精密加入“2.1.2”项下内标溶液1 mL，加入乙酸乙酯定容，混匀，即得供试品溶液。

2.2　色谱条件

色谱柱为Agilent DB-17毛细管柱（30 m×0.32 mm，0.25 μm）；检测器为火焰离子化检测器；载气为氮气（纯度99.999%），载气流速为0.5 mL/min；氮气（尾吹）流速为25 mL/min，氢气流速为30 mL/min，空气流速为400 mL/min；进样口温度为250 ℃，检测器温度为280 ℃，程序升温（起始温度50 ℃，以5 ℃/min升温至60 ℃，再以2 ℃/min升温至100 ℃，然后以20 ℃/min升温至250 ℃，保留5 min）；进样量为0.5 μL，分流比为35∶1。

2.3　系统适用性试验

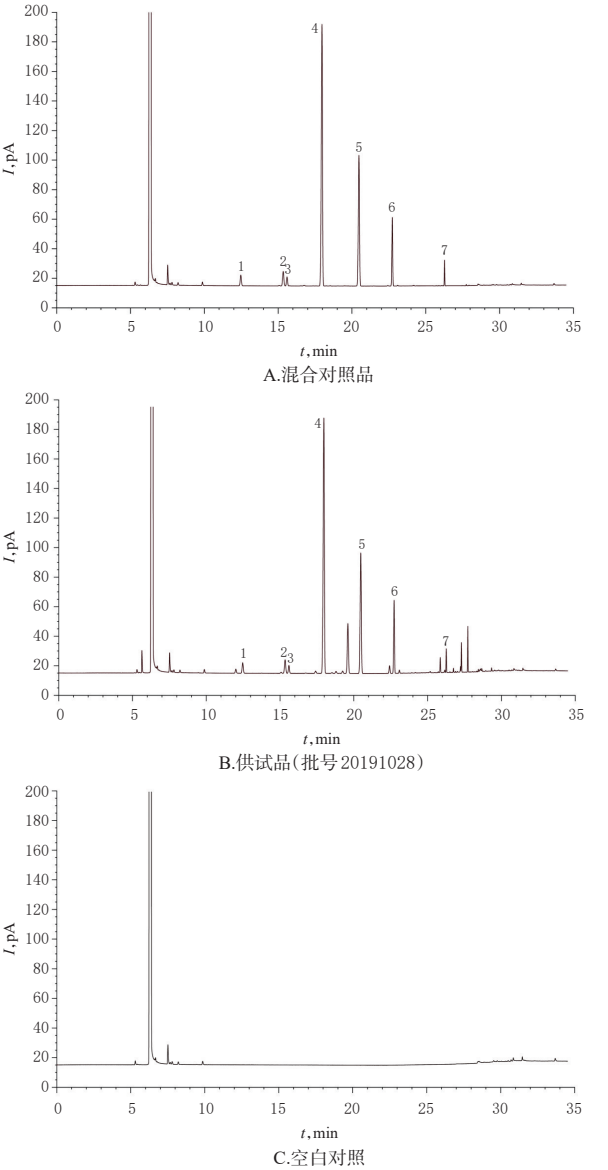
分别取“2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液以及空白对照溶液（乙酸乙酯），按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，详见图1。由图1可知，各待测成分色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于1.5，理论板数按柠檬烯峰计均不低于100 000，空白对照对测定无干扰。

2.4　线性关系考察

分别精密量取“2.1.3”项下混合对照品贮备液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL，置于2 mL量瓶中，精密加入“2.1.2”项下内标溶液0.2 mL，加入乙酸乙酯定容，混匀，得不同质量浓度的系列线性溶液（表2），按“2.2”项下色谱条件进样，记录峰面积。以各待测成分质量浓度（x，mg/mL）为横坐标、各成分与内标的峰面积比值（y）为纵坐标进行线性回归，结果见表3。

2.5　检测限与定量限考察

取“2.1.3”项下混合对照品溶液，用乙酸乙酯逐级稀释，按“2.2”项下色谱条件进样测定，分别以信噪比3∶1、10∶1计算α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇等6种成分的检测限与定量限。结果，上述6种成分的检测限分别为4.82、7.89、4.01、4.54、5.53、2.47 μg/mL，定量限分别为15.34、25.91、13.69、15.70、18.68、8.36 μg/mL。



注：1. α-蒎烯；2. β-蒎烯；3.月桂烯；4.柠檬烯；5. γ-松油烯；6.内标；7. α-松油醇

Note：1. α-pinene；2. β-pinene；3. myrcene；4. limonene；5. γ-terpinene；6. internal standard；7. α-terpineol

图1　佛手挥发油混合对照品、供试品以及空白对照溶液的气相色谱图

Fig 1　GC chromatograms of mixed control，test sample and blank control of volatile oil from *C. medica*

2.6　精密度试验

精密量取“2.1.3”项下混合对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次，记录α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇等6种成分与内标的峰面积比值。结果，上述6种成分与内标峰面积比值的

RSD分别为0.37%、0.55%、1.09%、0.13%、0.07%、0.11%（n=6），表明仪器精密度较好。

表2 α-蒎烯等6种成分系列线性溶液的质量浓度（mg/mL）

Tab 2 Concentration of series linear solutions of 6 components as α-pinene（mg/mL）

浓度梯度	α-蒎烯	β-蒎烯	月桂烯	柠檬烯	γ-松油烯	α-松油醇
1	0.030 5	0.066 6	0.021 8	0.765 2	0.387 3	0.034 2
2	0.061 1	0.133 2	0.043 5	1.530 4	0.774 5	0.068 4
3	0.091 6	0.199 7	0.065 3	2.295 6	1.161 8	0.102 7
4	0.122 1	0.266 3	0.087 0	3.060 8	1.549 0	0.136 9
5	0.152 7	0.332 9	0.108 8	3.826 0	1.936 3	0.171 1
6	0.183 2	0.399 5	0.130 6	4.591 2	2.323 5	0.205 3
7	0.213 8	0.466 0	0.152 3	5.356 4	2.710 8	0.239 6

表3 佛手挥发油中α-蒎烯等6种成分的回归方程与线性范围

Tab 3 Regression equations and linear ranges of 6 components as α-pinene in volatile oil from *C. medica*

待测成分	回归方程	r	线性范围，mg/mL
α-蒎烯	y=1.454 3x−0.003 9	0.999 6	0.030 5～0.213 8
β-蒎烯	y=0.939 4x−0.001 9	0.999 8	0.066 6～0.466 0
月桂烯	y=1.507 6x−0.000 9	0.999 9	0.021 8～0.152 3
柠檬烯	y=1.424 1x−0.003 0	0.999 8	0.765 2～5.356 4
γ-松油烯	y=1.386 9x+0.001 7	0.999 8	0.387 3～2.710 8
α-松油醇	y=1.201 6x+0.000 2	0.999 8	0.034 2～0.239 6

2.7 重复性试验

取佛手挥发油样品（批号20191028），按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，共6份，再按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇等6种成分与内标的峰面积比值，并按内标法计算样品中上述6种成分的含量。结果，上述6种成分含量的RSD分别为0.71%、1.07%、1.51%、0.72%、0.66%、0.82%（n=6），表明方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取“2.1.4”项下供试品溶液（批号20191028），分别于室温下0、2、4、8、16、24 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇等6种成分与内标的峰面积比值。结果，上述6种成分与内标峰面积比值的RSD分别为0.74%、0.58%、1.02%、0.41%、0.56%、0.23%（n=6），表明佛手挥发油供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验

分别精密称取已知含量的佛手挥发油（批号20191028）50 μL（约0.043 g），共6份，置于10 mL量瓶中，分别精密加入“2.1.1”项下α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、柠檬烯、γ-松油烯、α-松油醇等6种单一对照品贮备液100、190、54、1 040、480、90 μL，精密加入“2.1.2”项下内标溶液1 mL，加入乙酸乙酯定容，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录各待测成分与内标的峰面积比值并计算加样回收率，结果见表4。

表4 佛手挥发油中α-蒎烯等6种成分的加样回收率试验结果（n=6）

Tab 4 Results of recovery tests of 6 components as α-pinene in volatile oil from *C. medica*（n=6）

待测成分	已知量，mg	加入量，mg	测得量，mg	加样回收率，%	平均加样回收率，%	RSD，%
α-蒎烯	0.722 4	0.763 4	1.466 7	97.49	96.08	1.27
	0.736 6	0.763 4	1.471 0	96.20		
	0.736 9	0.763 4	1.479 7	97.30		
	0.739 0	0.763 4	1.467 5	95.43		
	0.716 4	0.763 4	1.448 0	95.84		
	0.678 0	0.763 4	1.397 3	94.23		
β-蒎烯	1.502 4	1.581 2	3.075 1	99.46	97.48	2.74
	1.531 9	1.581 2	3.094 5	98.83		
	1.532 6	1.581 2	3.106 9	99.57		
	1.502 4	1.581 2	3.062 7	98.68		
	1.502 4	1.581 2	2.974 8	93.12		
	1.410 0	1.581 2	2.915 5	95.21		
月桂烯	0.463 9	0.489 6	0.954 7	100.24	100.90	1.37
	0.472 9	0.489 6	0.960 7	99.61		
	0.473 2	0.489 6	0.962 4	99.92		
	0.463 9	0.489 6	0.956 9	100.69		
	0.463 9	0.489 6	0.969 9	103.35		
	0.435 3	0.489 6	0.932 8	101.60		
柠檬烯	18.022 5	19.895 1	37.909 7	99.96	101.22	2.56
	18.375 4	19.895 1	37.967 8	98.48		
	18.383 8	19.895 1	38.193 3	99.57		
	18.022 5	19.895 1	38.007 8	100.45		
	18.022 5	19.895 1	38.898 3	104.93		
	16.913 4	19.895 1	37.593 6	103.95		
γ-松油烯	8.724 6	9.783 4	18.654 8	101.50	100.54	1.16
	8.895 4	9.783 4	18.681 7	100.03		
	8.899 5	9.783 4	18.783 4	101.03		
	8.724 6	9.783 4	18.704 2	102.01		
	8.724 6	9.783 4	18.481 3	99.73		
	8.187 7	9.783 4	17.866 2	98.93		
α-松油醇	0.765 9	0.810 5	1.554 3	97.27	95.84	1.50
	0.780 9	0.810 5	1.560 2	96.15		
	0.781 3	0.810 5	1.562 6	96.40		
	0.765 9	0.810 5	1.552 5	97.05		
	0.765 9	0.810 5	1.530 8	94.37		
	0.718 8	0.810 5	1.479 0	93.79		

2.10 QAMS法的建立

2.10.1 相对校正因子的计算 取“2.4”项下系列线性溶液（质量浓度与表2中各浓度梯度对应），按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以柠檬烯为内参物（因柠檬烯为佛手挥发油的主要成分，具有多种药理活性，含量较高且对照品价格便宜，故选择柠檬烯为内参物），计算其余4种成分的相对校正因子（$f_{k/s}$）：$f_{k/s}=(C_s\times A_k)/(C_k\times A_s)$。式中，$C_s$为内参物质量浓度，$A_s$为内参物色谱峰峰面积，$C_k$为其余成分质量浓度，$A_k$为对照成分色谱峰峰面积。具体结果见表5（因采用内标法和QAMS法时α-松油醇的结果差异较大，RSD>3%，不适用于

QAMS法测定，故未纳入）。

表5　α-蒎烯等4种成分的相对校正因子

Tab 5　Relative correction factors of 4 components as α-pinene

浓度梯度	α-蒎烯	β-蒎烯	月桂烯	γ-松油烯
2	1.008 1	1.544 5	0.966 2	1.024 9
3	0.997 0	1.544 3	0.955 4	1.025 3
4	0.997 8	1.529 1	0.951 1	1.026 7
5	0.994 2	1.526 4	0.945 5	1.025 5
6	0.998 1	1.519 6	0.947 8	1.024 7
7	0.991 6	1.520 5	0.948 5	1.026 0
平均值	0.997 8	1.530 7	0.952 4	1.025 5
RSD，%	0.56	0.73	0.79	0.07

2.10.2　相对校正因子的耐用性考察　取“2.4”项下系列线性溶液，按“2.2”项下色谱条件分别以不同色谱仪（Agilent 7890A型、Agilent 8890型、岛津GC-2030型GC仪）、不同品牌色谱柱（Agilent DB-17、岛津InertCap 17、岛津WondaCap 17，规格均为30 m×0.32 mm，0.25 μm，下同）进样。结果，以Agilent 7890A型、Agilent 8890型GC仪以及不同品牌色谱柱得到的相对校正因子变化均较小，可共用；虽然以岛津GC-2030型GC仪在不同品牌色谱柱上的相对校正因子变化也较小，但与上述两种GC仪比较，所得相对校正因子差异较大，提示同一厂家仪器的相对校正因子耐用性较好；同一色谱仪在不同品牌色谱柱上所得的相对校正因子差异较小，耐用性好，详见表6。此外，由于3种不同品牌色谱柱以Agilent DB-17的分离度、峰形更好，基线更平稳，故选择Agilent DB-17色谱柱进行后续考察。

2.10.3　不同仪器对含量的影响　取佛手挥发油（批号20191028），按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2”项下色谱条件进样测定，按各自的相对校正因子计算α-蒎烯等4种成分的含量，每样品平行测定3次。结果，内标法和QAMS法以不同仪器所得含量测定结果基本一致，RSD＜2%，详见表7。

2.10.4　待测成分色谱峰定位　以柠檬烯峰的保留时间为参照，计算α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯及γ-松油烯峰的相对保留时间，考察不同色谱仪（Agilent 7890A型、Agilent 8890型、岛津GC-2030型GC仪）、色谱柱（Agilent DB-17、岛津WondaCap 17、岛津InertCap 17）对相对保留时间的影响。结果，不同型号仪器、不同色谱柱对4种成分相对保留时间的影响均不明显，RSD为0.20%～1.41%，提示可以通过相对保留时间来定位待测成分的色谱峰，详见表8。

2.11　含量测定

分别精密称取23批佛手挥发油各100 μL，按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，分别以内标法和QAMS法计算含量，每样品平行测定3次，取平均值，结果见表9。

表6　3种不同型号色谱仪和不同色谱柱的相对校正因子

Tab 6　Relative correction factors of three different types of chromatographs and different chromatographic columns

色谱仪型号	色谱柱	相对校正因子			
		α-蒎烯	β-蒎烯	月桂烯	γ-松油烯
Agilent 7890A型	Agilent DB-17	0.997 8	1.530 7	0.952 4	1.025 5
	InertCap 17	1.004 5	1.529 7	0.939 8	1.023 9
	WondaCap 17	1.002 4	1.515 2	0.931 3	1.026 0
平均值		1.001 6	1.525 2	0.941 2	1.025 2
RSD，%		0.34	0.57	1.13	0.11
Agilent 8890型	Agilent DB-17	0.992 1	1.506 1	0.930 4	1.019 0
	InertCap 17	0.994 7	1.512 4	0.914 9	1.018 4
	WondaCap 17	0.993 2	1.507 2	0.913 2	1.017 8
平均值		0.993 3	1.5086	0.919 5	1.018 4
RSD，%		0.13	0.22	1.03	0.06
岛津GC-2030型	Agilent DB-17	1.236 0	1.861 4	1.139 8	1.093 5
	InertCap 17	1.226 5	1.847 2	1.110 1	1.063 9
	WondaCap 17	1.219 0	1.825 4	1.115 3	1.053 3
平均值		1.227 2	1.8447	1.121 7	1.070 2
RSD，%		0.70	0.98	1.41	1.95
Agilent 7890A型	Agilent DB-17	0.997 8	1.530 7	0.952 4	1.025 5
Agilent 8890型		0.992 1	1.506 1	0.930 4	1.019 0
岛津GC-2030型		1.236 0	1.861 4	1.139 8	1.093 5
Agilent仪器厂家的平均值		0.995 0	1.518 4	0.941 4	1.022 3
RSD，%		0.41	1.15	1.65	0.45
3个厂家仪器的平均值		1.075 3	1.632 8	1.007 5	1.046 0
RSD，%		12.95	12.15	11.42	3.94

表7　不同色谱仪测定佛手挥发油中α-蒎烯等6种成分的含量结果（n=3，mg/g）

Tab 7　Content determination of 6 components as α-pinene in volatile oil from *C. medica* by different chromatographs（n=3，mg/g）

待测成分	Agilent 7890A型GC仪+Agilent DB-17色谱柱		岛津GC-2030型GC仪+Agilent DB-17色谱柱		平均值	RSD，%
	内标法	QAMS法	内标法	QAMS法		
α-蒎烯	17.016 9	17.036 5	16.846 8	16.846 9	16.936 8	0.61
β-蒎烯	36.090 9	36.126 6	35.181 1	35.182 2	35.645 2	1.50
月桂烯	11.002 6	11.011 4	10.757 5	10.757 8	10.882 4	1.32
柠檬烯	415.785 6		420.402 9		418.094 3	0.78
γ-松油烯	201.228 4	201.234 9	202.773 3	202.773 8	202.002 6	0.44
α-松油醇	17.912 6		17.922 6		17.917 6	0.04

由表9可知，各批次佛手挥发油中，两种方法所得α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、γ-松油烯等4种成分含量的相对误差（RE）均小于1%（以每批样品计），表明所得结果无明显差异。

3　讨论

本课题组前期对Agilent DB-5、Agilent DB-17两种

表8　不同色谱仪、色谱柱测定α-蒎烯等4种成分的相对保留时间

Tab 8　Relative retention time of 4 components as α-pinene by different chromatographs and chromatographic columns

色谱仪型号	色谱柱	相对保留时间			
		α-蒎烯	β-蒎烯	月桂烯	γ-松油烯
Agilent 7890A型	Agilent DB-17	0.694 1	0.854 0	0.868 5	1.139 5
	InertCap 17	0.697 3	0.850 4	0.871 3	1.118 7
	WondaCap 17	0.695 3	0.846 9	0.870 8	1.107 8
Agilent 8890型	Agilent DB-17	0.698 0	0.856 5	0.870 3	1.136 9
	InertCap 17	0.701 3	0.852 9	0.873 2	1.108 9
	WondaCap 17	0.699 3	0.852 6	0.872 7	1.096 2
岛津GC-2030型	Agilent DB-17	0.692 6	0.853 4	0.868 0	1.140 7
	InertCap 17	0.697 0	0.850 6	0.871 4	1.118 3
	WondaCap 17	0.692 4	0.848 6	0.869 9	1.112 6
平均值		0.696 4	0.851 8	0.870 7	1.120 0
RSD,%		0.44	0.34	0.20	1.41

不同极性的色谱柱进行了考察，结果发现，当以Agilent DB-5为色谱柱时，佛手挥发油中多数成分的分离效果较好，但柠檬烯峰后面有个小峰（基本包进了柠檬烯峰中），经反复调整色谱条件也不能将之与柠檬烯基线分离。采用Agilent DB-17色谱柱后，柠檬烯与后面的小峰达到基线分离，色谱图中的大部分峰的分离效果较好，但β-蒎烯峰与月桂烯峰保留时间相近，易重合，未达到基线分离，经反复试验，最终通过降低初始温度实现基线分离，得到各成分分离均较好的色谱图，故最终选择Agilent DB-17为色谱柱。载气流速通常选用1 mL/min，但因十二烷峰旁边有小色谱峰，二者未能分开；当将载气流速调为0.5 mL/min后，十二烷峰峰形较好，且与相邻色谱峰基线分离。

外标法简便但要求进样量十分准确，要严格控制在与标准物相同的色谱条件下进行，否则易造成分析误差；内标法测定结果准确，由于内标物与待测成分峰面积的比值不受进样量波动的影响，因而在一定程度上消除了操作条件等变化所引起的误差[25－26]，但内标物的选择很重要。本课题组前期在参考文献[27]的基础上，分别选择萘、正十一烷、十二烷为内标物，结果发现，十二烷在GC图谱中的出峰时间与前后相邻峰相差较大，分离度好，且十二烷的保留时间在6种待测成分之间，故选择十二烷为内标物。

由于α-松油醇的相对保留时间在不同色谱柱中相差较大，无法准确定位，且采用QAMS法与内标法计算所得的含量相差亦较大，故未采用QAMS法检测α-松油醇的含量，最终采用QAMS法测定其他4种成分的含量。本研究结果显示，QAMS法和内标法所得α-蒎烯、β-蒎烯、月桂烯、γ-松油烯等4种成分含量的RE均小于1%，两种方法比较无明显差异。

综上所述，所建GC-QAMS法简便、快捷，准确度

表9　佛手挥发油中α-蒎烯等6种成分的含量测定结果（n=3，mg/g）

Tab 9　Content determination of 6 components as α-pinene in volatile oil from *C. medica* (n=3, mg/g)

批号	柠檬烯	α-蒎烯		β-蒎烯		月桂烯		γ-松油烯		α-松油醇
	内标法	内标法	QAMS法	内标法	QAMS法	内标法	QAMS法	内标法	QAMS法	内标法
20171218	397.820 8	15.303 0	15.303 0	27.744 4	27.743 6	9.174 6	9.174 3	122.012 1	122.011 7	16.041 8
20171221	286.593 0	8.323 4	8.323 4	18.479 5	18.478 9	4.431 5	4.431 4	0	0	10.313 1
20191031	413.453 1	13.727 8	13.727 7	29.974 2	29.973 3	10.932 8	10.932 5	212.069 5	212.069 0	18.569 6
20191111	457.126 5	8.518 5	8.518 5	18.810 1	18.809 5	9.075 5	9.075 3	100.772 5	100.772 2	22.899 3
20191028	420.104 2	16.840 4	16.840 3	35.022 9	35.021 9	10.812 9	10.812 6	203.370 7	203.370 2	17.853 6
20191102	379.468 9	5.240 7	5.240 7	21.849 6	21.848 9	8.189 2	8.189 0	127.532 8	127.532 4	19.789 8
20151218	375.897 9	20.994 1	20.994 0	33.556 9	33.555 9	8.990 3	8.990 0	24.743 7	24.743 6	0
20151202	434.273 5	14.301 4	14.301 4	26.070 1	26.069 3	11.291 4	11.291 1	285.127 3	285.126 6	11.616 2
20161128	366.955 5	13.788 6	13.788 5	25.280 1	25.279 3	9.710 5	9.710 2	207.691 4	207.690 8	18.139 5
20170601	222.314 6	6.122 5	6.122 4	12.455 1	12.454 7	3.684 2	3.684 1	35.521 0	35.520 9	48.858 6
20170914	371.166 0	8.940 2	8.940 1	17.980 4	17.979 8	9.105 1	9.104 9	174.054 5	174.054 0	35.952 1
20190823	174.857 8	3.296 9	3.296 8	11.300 6	11.300 3	3.982 8	3.982 7	57.444 5	57.444 4	35.906 6
20191103	259.617 7	10.911 3	10.911 3	31.568 2	31.567 3	7.682 5	7.682 3	140.286 7	140.286 3	30.295 6
20180715	464.716 8	16.416 5	16.416 4	29.799 1	29.798 1	8.778 3	8.778 1	18.904 3	18.904 2	5.043 5
20180720	469.555 5	17.281 6	17.281 6	31.868 6	31.867 6	10.683 6	10.683 3	218.017 7	218.017 2	14.011 3
20171205	465.784 2	16.103 6	16.103 6	30.450 9	30.450 0	9.082 9	9.082 6	28.765 0	28.765 0	4.849 0
20171207	439.599 6	11.439 5	11.439 5	24.289 0	24.288 2	8.070 7	8.070 4	54.100 5	54.100 4	8.696 6
20191112	378.262 4	18.157 9	18.157 8	39.440 9	39.439 7	10.477 9	10.477 6	246.723 3	246.722 6	20.155 2
20200724	205.219 5	15.913 1	15.913 0	29.371 6	29.370 7	5.250 1	5.249 9	136.105 8	136.105 4	33.347 9
20161200	402.615 0	10.521 2	10.521 2	21.637 9	21.637 2	7.499 0	7.498 8	32.487 6	32.487 5	16.339 1
20180103	445.110 6	15.395 0	15.394 9	26.314 2	26.313 4	7.285 9	7.285 7	0	0	3.507 6
20191101	498.839 0	11.145 8	11.145 7	26.823 7	26.822 9	10.678 3	10.678 0	129.416 2	129.415 9	24.067 6
20191113	511.611 8	9.605 0	9.604 9	17.955 9	17.955 3	7.377 1	7.376 9	2.892 7	2.892 7	5.613 6

高，重复性好，可用于佛手挥发油成分的定量分析及质量控制。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[S]. 2020年版.北京：中国医药科技出版社，2020：185-186.

[2] 张桂芳，徐鸿华.佛手种质资源研究概况[J].广州中医药大学学报，2007，24(1)：69-72.

[3] 赵永艳，胡瀚文，彭腾，等.佛手的化学成分药理作用及开发应用研究进展[J].时珍国医国药，2018，29(11)：2734-2736.

[4] 郭卫东，郑建树，邓刚，等.佛手挥发油抑菌活性的研究[J].中国粮油学报，2009，24(8)：103-107.

[5] 施长春，王建英，朱婉萍，等.佛手挥发油对哮喘的治疗作用[J].实用儿科临床杂志，2012，25(4)：287-288.

[6] 高洪元，田青.佛手挥发油的抗抑郁作用机制探讨[J].中国实验方剂学杂志，2012，18(7)：231-234.

[7] 吕学维，邵邻相，张均平，等.佛手挥发油对B16黑色素瘤细胞体外增殖的抑制作用[J].中国粮油学报，2011，26(8)：50-54.

[8] 邵邻相，高海涛，成文召，等.佛手挥发油对小鼠体内B16黑色素瘤生长的影响[J].浙江师范大学学报(自然科学版)，2012，35(2)：184-188.

[9] 麻艳芳，邵邻相，张均平，等.佛手挥发油对MDA-MB435人乳腺癌细胞体外增殖的影响[J].中国药学杂志，2010，45(22)：1737-1741.

[10] BAGETTA G，MORRONE L A，ROMBOLA L. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot[J]. Fitoterapia，2010，81(6)：453-461.

[11] 赵永艳，张军银，彭腾，等.不同产地佛手的挥发油成分比较分析[J].中国药房，2020，31(4)：423-428.

[12] 马越，王利明，王晓杰，等.超临界CO_2萃取佛手挥发油的工艺研究及GC-MS分析[J].食品科学，2009，30(2)：221-223.

[13] 王建英，施长春，朱婉萍.金佛手挥发油化学成分的GC-MS研究[J].中国现代应用药学，2006，4(1)：32-34.

[14] 金晓玲，徐丽珊，施潇，等.4种佛手挥发油化学成分的研究[J].中国药学杂志，2002，37(10)：19-21.

[15] 王俊华，符红.广佛手挥发油化学成分的GC-MS分析[J].中药材，1999，22(10)：516-517.

[16] 胡明，权美平.佛手挥发油的化学成分分析研究进展[J].粮食与油脂，2019，32(1)：7-9.

[17] 李思思，王涛，董志红，等.右旋柠檬烯的研究进展及其新型专利技术[J].河南医学研究，2013，22(4)：636-638.

[18] SALEHI B，UPADHYAY S，ORHAN I E，et al. Therapeutic potential of α- and β-pinene：a miracle gift of nature[J]. Biomolecules，2019，9(11)：738.

[19] DU Y，LUAN J，JIANG R P，et al. Myrcene exerts anti-asthmatic activity in neonatal rats via modulating the matrix remodeling[J]. Int J Immunopathol Pharmacol，2020，34(48)：1-10.

[20] 章斌，侯小桢，秦轶，等.柠檬果皮精油主要组分抑菌及抗氧化活性研究[J].食品与机械，2017，33(12)：138-142.

[21] 田吉，刘艳，雷素娟.气相色谱法测定佛手挥发油中柠檬烯含量[C]//2014年中国药学大会暨第十四届中国药师周论文集.石家庄：中国药学会，2014：1-6.

[22] 王智民，钱忠直，张启伟，等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志，2011，36(6)：657-658.

[23] 李倩，刘伟，罗祖良，等.一测多评法测定丹参中丹参酮ⅡA、隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、二氢丹参酮Ⅰ的含量[J].中国中药杂志，2012，37(6)：824-828.

[24] 王钰莹，冯伟红，杨菲，等."一测多评"法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分[J].中国中药杂志，2012，37(2)：212-217.

[25] 刘楚楚，王超，王录.内标法和外标法测定浓香型白酒中甲醇含量的比较分析[J].酿酒，2017，44(4)：65-67.

[26] 薛敏.手动进样条件下内标法测酒中有机物指标的优势[J].大众标准化，2016，4(10)：67-68.

[27] 付滢舟，冯有龙，曹玲，等.一测多评法测定速效救心丸中冰片的含量[J].药物分析杂志，2012，32(5)：775-778，796.

（收稿日期：2021-04-20　修回日期：2021-07-16）

（编辑：陈　宏）

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊，欢迎投稿、订阅