第 23 卷 第 4 期 分析测试学报 Vol. 23 No. 4
2004 年 7 月 FENXI CESHI XUEBAO(Journal of Instrumental Analysis) 54～57

微柱高效液相色谱法分离八角茴香挥发油成分

王晓春[1,2], 马继平[2,3], 陈令新[2], 谭 峰[2], 关亚风[2]

(1. 东北大学 化学系, 辽宁 沈阳 110004; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116012;
3. 辽宁石油化工大学 应用化学系, 辽宁 抚顺 113001)

摘 要: 利用微柱高效液相色谱法(μ- HPLC)对八角茴香果实挥发油成分进行了分离, 对固定相类型、流动相组成及流速等条件进行了优化。结果表明, 选用氰基分析柱(250 mm×0.32 mm i.d., 5 μm), 正己烷-乙腈-二氯甲烷(80∶8∶12, 体积比)为流动相, 流速为 2 μL·min^{-1}, 八角茴香果实挥发油成分在微柱液相色谱上分离效果最好。在优化的实验条件下, 对实际样品中反式-茴香醚、茴香醛等成分进行了定量。本实验为以后的μ- HPLC 与毛细管气相色谱联用分析植物挥发油奠定了基础。

关键词: 微柱高效液相色谱法; 八角茴香果实; 挥发油

中图分类号: O657.72; Q946.91 **文献标识码**: A **文章编号**: 1004-4957(2004)04-0054-04

Separation of Volatile Constituents in Illicillm Verum Fruit by Micro-column Liquid Chromatography

WANG Xiao-chun[1,2], MA Ji-ping[2,3], CHEN Ling-xin[2], TAN Feng[2], GUAN Ya-feng[2]

(1. Department of Chemistry, Northeastern University, Shenyang 110004, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116012, China; 3. Department of Applied Chemistry, Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology, Fushun 113001, China)

Abstract: Constituents in the essential oil of illicillm verum fruit were separated by HPLC with a packed capillary column. Factors affecting the separation performance, such as the composition and flow rate of the mobile phase, as well as the stationary phase, were investigated. The results showed that good separation can be achieved by using a capillary column packed with 5 μm cyano-bonded silica and a mobile phase consisting of *n*-hexane, acetonitrile and dichloromethane in a volume ratio of 80∶8∶12 at a flow rate of 2 μL·min^{-1}. Quantitation of main components, i.e., *trans*-anethole and anisoldehyde, was performed by the "external standard" method.

Key words: Micro-column liquid chromatography; Illicillm verum fruit; Essential oil

八角茴香(Illicillm verum hook, f)是传统的食物调料, 又可作药物, 具有温阳散寒、理气止痛的功效, 用于治疗寒疝腹痛、肾虚腰痛、胃寒呕吐、脘腹冷痛。八角茴香易与外形相似但有毒性的莽草和多蕊红茴香混淆, 曾报道有人因误食莽草而中毒的事件, 因此对八角茴香的鉴别具有实际的意义。八角茴香油的主要成分为茴香醚(anethole), 含量在 80%～90%。此外, 尚含有茴香醛(anisaldehyde)、甲基胡椒酚(methylchavicol)、茴香酸(anisic acid)、茴香酮(anisylacetone)、蒎烯(pinene)、水芹烯(phellandrene)、柠檬烯(limonene)、1,8-桉叶素(cineole)、黄樟醚(safrole)、3,3-二甲基烯丙基-对丙烯基苯醚(3,3-dimethylallyl *p*-propenyl phenyl ether)等成分[1]。对其挥发油成分的研究, 通常采用气相色谱和质谱(GC-MS)联用的方法。兰州大学陈耀祖教授曾利用闪蒸-毛细管气相色谱-质谱法分析八角茴香的挥发性成分[2]。

填充毛细管液相色谱(μ- HPLC)由于具有分离效率高、惰性好、样品和流动相消耗低、污染小、易于与其它检测方法在线联用等优点, 在研究及应用领域有广阔的前景[3]。我们实验室在μ- HPLC 柱的制作、μ- HPLC 与气相色谱的联用方面作了一系列工作[4～6], 并准备在植物挥发油分离分析方面得到进一步应用。

本文利用微柱高效液相色谱对八角茴香的挥发油成分进行了分离, 目前在国内尚无报道。本实验优化得到的分析条件为将来进一步利用微柱液相色谱-质谱和微柱液相色谱-气相色谱联用进行

收稿日期: 2003-06-23; **修回日期**: 2004-05-23

作者简介: 王晓春(1974-), 男, 吉林通化人, 硕士研究生; 关亚风, 联系人.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

八角茴香挥发油的分析奠定基础。

1　实验部分

1.1　仪器与试剂

惠普 1100 系列高压梯度双元泵(美国); 自制分流进样系统: 六通阀和微三通(VALCO 公司); 自制微填充柱(250 mm ×0.32 mm i.d., 5 μm); CE-1575 紫外 - 可见光检测器(JASCO 公司); 旋转蒸发仪(巩义市英峪予华仪器厂); 水蒸气蒸馏器(自制)。正己烷、乙腈(色谱纯, TEDIA 公司); 二氯甲烷、无水硫酸钠、石油醚(30～60 ℃)(分析纯, 沈阳联邦试剂厂); 标准品: 反式茴香醚、茴香醛购于北京百灵威公司; 填料(北京金欧亚科技发展公司): 二醇基硅胶键合固定相, 氰基硅胶键合固定相, 粒度均为 5 μm; 药材: 八角茴香购于大连美罗大药房, 产地: 广西。

1.2　微液相色谱柱内填料的填充

微液相色谱柱的填柱方法有湿法、电动填充法和干法。湿法在填装过程中担体破碎率为 0.5%～2%, 后两者几乎为零[3]。文献[7]报道用干法可以填装粒度 d_p = 5 μm 的微填充柱, 且具有优越的柱性能。与湿法相比, 干法填装压力低, 对填料的破坏性小, 填充装置简单, 操作方便, 且在制柱过程中不使用毒性有机溶剂, 对环境无污染。本实验中我们采用干法装柱(见图 1), 过程如下: 对固定相作除静电处理, 即用乙醇将固定相处理至流沙状, 把处理好的填料装入储料罐中, 确认体系无漏后, 打开气瓶开始装柱, 柱管装满后, 进一步调高压力, 同时超声振动填充床层, 当填充床层高度保持不变后, 关闭超声振动和减压阀, 使其自然降压, 压力降为零后, 取下柱管备用, 柱管使用前, 用流动相冲洗 2 h 左右进行平衡。

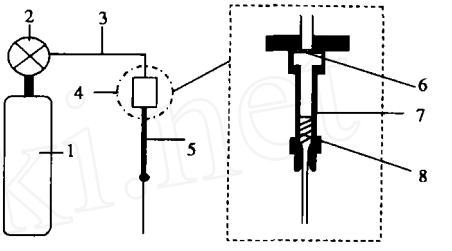

图 1　干法制柱装置

Fig. 1　Installation for dry packing of micro-columns

1. 气体钢瓶(gas cylinder); 2. 减压阀(high-pressure regulator); 3. 铜管(copper tubing); 4. 储料槽(reservoir); 5. 色谱柱(column); 6. 不锈钢筛网(stainless steel frit); 7. 储料槽体(reservoir body); 8. 填料(packing material)

1.3　挥发油的提取

取八角茴香果实 50 g 粉碎后, 水蒸气蒸馏, 收集得到蒸馏液 500 mL, 用石油醚(30～60 ℃)进行萃取, 经无水硫酸钠干燥脱水后, 通过旋转蒸发仪蒸发溶剂, 得到无色透明的挥发油, 得率为 4.7%。在水蒸气蒸馏过程中注意控制蒸馏瓶温度, 过低造成液面超过规定值, 过高则低沸点的有机酸同时蒸出。

1.4　标准溶液和样品溶液的配制

精确吸取反式茴香醚和茴香醛标准品各 2 μL 于 25 mL 容量瓶中, 加入正己烷稀释至刻度。取上述溶液, 用正己烷稀释, 配制成不同浓度标准溶液。取八角茴香挥发油 2、16 μL 于 25 mL 容量瓶中, 用正己烷定容, 超声振荡, 作为样品溶液。

2　结果与讨论

2.1　二醇基硅胶键合微液相色谱柱流动相和流速的选择

以二醇基硅胶键合固定相为填料的二醇基柱为分析柱, 检测波长选定为 254 nm, 流速为 5 μL·min^{-1}, 分别选取不同的流动相种类并逐步改变其配比, 观察流动相的改变对分离的影响。分别选取 3 个体系进行实验: A. 正己烷; B. 正己烷 - 无水乙醚; C. 正己烷 - 乙腈 - 二氯甲烷。发现体系 A 的分离效果最差, 体系 B 较好, 而体系 C 的分离最好, 同时当流动相中正己烷 - 乙腈 - 二氯甲烷的体积比为 80 ∶8 ∶12 时, 八角茴香挥发油的分离效果最好, 结果见图 2。所以在二醇基柱上选取正己烷 - 乙腈 - 二氯甲烷(80 ∶8 ∶12)作为流动相。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

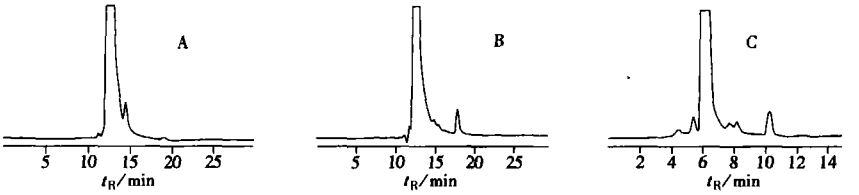

图 2 八角茴香挥发油在二醇基柱上不同流动相的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of essential oil in illicillm verum fruit by using a diol-bonded packed column with various mobile phases

Conditions: flow rate: 5 μL·min^{-1}; detection wavelength: 254 nm; column: microcolumn(250 mm×0.32 mm i.d., 5 μm); packing material: diol-bonded silica; A. *n*-hexane; B. *n*-hexane - anhydrous diethyl ether(1∶2 by volume); C. *n*-hexane - acetonitrile - dichloromethane(80∶8∶12 by volume)

选择流速分别为 5、3.5、2 μL·min^{-1}。发现改变流速对八角茴香挥发油在二醇基柱上的分离影响不大，只是使总体分离时间发生改变，使用大流速可以显著的降低分离时间。图 3 为在流速为3.5、2 μL·min^{-1}时的分离谱图。

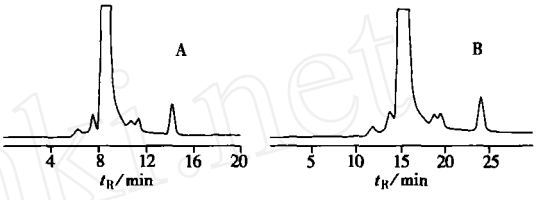

图 3 八角茴香挥发油在二醇基柱上不同流速时的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of essential oil in illicillm verum fruit by using a diol-bonded packed column under different flow rates

Mobile phase: *n*-hexane - acetonitrile - dichloromethane(80∶8∶12 by volume); Flow rate: A. 3.5 μL/min; B. 2 μL/min

2.2 氰基硅胶键合微液相色谱柱流动相及流速的选择

以氰基硅胶为固定相，正己烷 - 乙腈 - 二氯甲烷为流动相。考察了不同体积比的正己烷 - 乙腈 - 二氯甲烷对分离的影响，结果如图 4。结果表明，正己烷 - 乙腈 - 二氯甲烷的体积比为 89∶4.5∶6.5 和 80∶8∶12 时都能获得比较好的分离效果，虽然前者能够获得更好的分离度，但很明显分析时间延长，最后一个峰在接近 50 min 时才出来。所以选取流动相中正己烷 - 乙腈 - 二氯甲烷的配比为 80∶8∶12。另外，通过比较图 4 A 和图 3 B，可以清楚地看出，氰基键合固定相比二醇基硅胶键合固定相对八角茴香挥发油的分离效果要好。

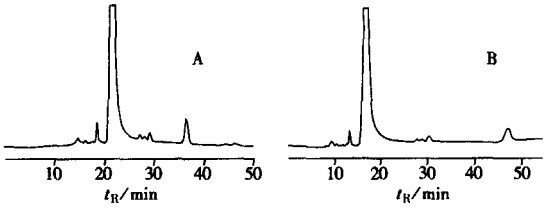

图 4 八角茴香挥发油在氰基柱上不同流动相色谱图

Fig. 4 Chromatograms of essential oil in illicillm verum fruit by using a cyano-bonded packed microcolumn with various mobile phases

Conditions: microcolumn(250 mm×0.32 mm i.d., 5 μm); packing material: 5 μm cyano-bonded silica; flow rate: 2 μL·min^{-1}; mobile phases: A. *n*-hexane - acetonitrile - dichloromethane(80∶8∶12 by volume); B. *n*-hexane - acetonitrile - dichloromethane(89∶4.5∶6.5 by volume); detection wavelength: 254 nm

以氰基柱为分析柱，体积比为 80∶8∶12 的正己烷 - 乙腈 - 二氯甲烷为流动相，在 2～6 μL·min^{-1}范围内改变流动相流速，考察分离效果。发现流速在 2～4 μL·min^{-1}内对实际样品的分离度影响不大，而对分析时间却有很大影响。但是在流速大于 5 μL·min^{-1}后，主峰与在其之后流出的相邻峰之间的重叠现象严重，使其分离度严重下降。所以流动相的流速应控制在 2 μL·min^{-1}。

2.3 反式茴香醚和茴香醛的定量分析

取各浓度的标准溶液进微柱高效液相色谱进行分析，以峰面积对质量浓度做回归计算，得到反式茴香醚和茴香醛的线性回归方程，结果见表 1。再将实际样品溶液进微柱高效液相色谱，以峰面积代入回归方程，经计算得到反式茴香醚和茴香醛的含量，结果见表 2。定量结果表明，八角茴香果实的挥发油中的主要成分为反式茴香醚，其含量为 90.79%，与文献[2]中报道结论一致，而茴香醛的含量则比文献[2]要高出许多，达到 7.83%，与文献[8]的报道相符合。其原因可能是产地的不同而导致含量的差别。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　样品线性关系(n = 5)

Table 1　The results of linear correlation(n = 5)

Component	Linear equation *	Correlation coefficient r	Linearity range ρ/ (mg ·L^{-1})
trans - Anethole	y = 7.531 4 ×10^{-8} x - 0.020 13	0.999 7	4.0～0.1
Anisoldehyde	y = 1.382 9 ×10^{-8} x - 0.052 02	0.999 9	3.2～0.1

* x is area, μV ·s; y is content, mg ·L^{-1}

表 2　样品测定结果(n = 5)

Table 2　Analytical results of samples(n = 5)

Component	Content w/ %						RSD s_r/ %	Recovery R/ %
	1	2	3	4	5	Average		
trans - Anethole	90.44	92.2	90.29	90.45	90.57	90.79	0.79	98
Anisoldehyde	7.86	7.83	7.89	7.76	7.83	7.83	0.04	102

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典: 上册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1975. 26 - 27.

[2] 陈耀祖, 李兆琳, 薛敦渊. 闪蒸 - 毛细管气相色谱 - 质谱法分析八角茴香的挥发性成分[J]. 分析化学, 1986, 14(11): 853 - 856.

[3] 陈令新, 关亚风, 马继平. 微柱液相色谱的研究进展[J]. 化学进展, 2003, 15(2): 107 - 116.

[4] JIANG T, GUAN Y F. Analysis of PAH derivatives by on - line coupled packed capillary HPLC/ high temperature GC[J]. J Chromatogr Sci, 1999, 37(7): 255 - 265.

[5] 朱翠茹, 关亚风, 王涵文. 台锥形柱尾的填充毛细管液相色谱柱[J]. 分析化学, 2000, 28: 1204 - 1208.

[6] 唐意红, 朱道乾, 关亚风. 不锈钢宽口径填充毛细管液相色谱柱的制备及评价[J]. 分析化学, 2001, 29(10): 1228 - 1232.

[7] GUAN Y F, ZHOU L M, SHANG Z H. Dry-packed capillary columns for micro - HPLC[J]. J HRC, 1992, 15: 434 - 436.

[8] 刘成梅, 游　海. 天然产物有效成分的分离与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 515 - 516.

关于举办第二届全国分析测试界人士联谊会的通知

为加强分析测试界企业家、专家(管理、技术)及业内有关人士之间的直接交流和沟通, 促进产、学、研、用的结合, 推动我国分析测试事业的发展, 中国分析测试协会定于 2004 年 11 月在湖北省武汉市举办第二届全国分析测试界人士联谊会。现将有关事项通知如下:

一、联谊会采取有分有合、自由结合等灵活多样的形式开展交流和洽谈。会议将邀请有关企业家、专家学者, 就相关的热点问题作重点发言和讨论。二、联谊会不作任何结论性意见, 完全是自由讨论。如会议取得一些共识, 会后, 中国分析测试协会将集中专题, 组织深入研究, 并负责向有关主管部门反映。中国分析测试协会的指定网站 —— 仪器信息网也将同步重点介绍联谊会情况, 为与会者提供发布和宣传的良机。三、本次联谊会的主要议题有: 响应国家"科技兴贸"战略和科技型企业"走出去"战略, 如何打造我国分析仪器出口"航母", 创造分析仪器厂商和产品的国际知名品牌, 争取获得更大的分析仪器国际市场份额等。四、会议时间: 2004 年 11 月 14～15 日。报到时间: 11 月 13 日。五、会议地点: 武汉市洪山区鲁磨路 388 号中国地质大学。六、会议交通及食宿费自理。会务费与会代表每人 500 元。七、为便于会务安排, 务请填好回执, 并于 10 月 10 日前通过传真/ 电话/ 邮寄/ 电子邮件等方式通知会务组。八、会议不安排接站和接机, 请各与会代表自行前往会议报到地点。九、联系方式: 会务组: 中国地质大学(武汉) 机电学院, 地址: 武汉市洪山区鲁磨路 388 号, 邮编: 430074, 联系人: 王　伟, 电话/ 传真: 027 - 67883273(办); 027 - 62017576　E - mail: jdb @cug. edu. cn

中国分析测试协会: 联系人: 高　颖, 电话: 010 - 62327607, 传真: 010 - 68537684, E - mail: ygao @caia. org. cn。

中国分析测试协会

二〇〇四年六月一日

第二届全国分析测试界人士联谊会

回　执

2004 年　　月　　日

单　位							
地　址						邮　编	
姓　名		性　别		职　务		电　话	
姓　名		性　别		职　务		电　话	
如要大会发言, 发言题目							

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net