

静态顶空-气相色谱-质谱法测定八角挥发性成分^{*}

郭勇, 宋芸娟, 缪剑华^{**}

(广西药用植物园, 南宁 530023)

摘要 目的: 建立一种新的快速有效的测定八角挥发性成分的分析方法。方法: 采用静态顶空-气相色谱-质谱法测定八角果实和叶片中的挥发性成分, 采用面积归一法计算各组分的相对含量。结果: 分别从八角果实和叶片的顶空气体中鉴定出了 36 种和 37 种化合物, 被鉴定挥发性组分的峰面积分别占总峰面积的 97.62% 和 99.68%; 在八角果实和叶片的顶空气体中, 均以芳香族化合物的相对含量最高, 占总挥发性物质的 82.3% ~ 90.2%, 其次为萜类化合物, 占 7.3% ~ 17.3%, 非萜类脂肪族化合物的相对含量最低仅占 0.4% ~ 2.4%; 分析结果的 RSD 在 2.11% ~ 6.80% 之间。结论: 本方法具有较高的精密度, 且样品消耗量小, 无需有机溶剂提取, 整个过程高度自动化, 可快速检测与区分八角果实和叶片所得挥发油, 亦可用作八角挥发油提取原料的质量控制。

关键词: 八角; 静态顶空分析; 气相色谱-质谱分析; 挥发性成分

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0091-05

Analysis of volatile compounds from *Illicium verum* Hook f by static headspace- GC- MS^{*}

GUO Yong SONG Yun-juan, MIAO Jian-hua^{**}

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China)

Abstract Objective To establish a fast and effective new method for the analysis of the volatile compounds from *Illicium verum* Hook f. **Methods** The volatile compounds in fruit and leaf from *Illicium verum* were analyzed by static headspace- GC- MS, then separated and identified by GC- MS. Relative content of each volatile compounds was determined by area normalization. **Results** There were 36 and 37 species of volatile compounds were identified in the headspace in fruit and leaf from *Illicium verum*, 97.62% and 99.68% of the peak area were identified from the total volatile compounds peak area in the headspace of fruit and leaf. In the headspace, 82.3% - 90.2% of the peak area of volatile compounds was contributed by aromatic compounds, 7.3% - 17.3% of the peak area was contributed by terpenes, and there were only 0.4% - 2.4% of the peak area was contributed by aliphatic compounds. RSD of this method was in the range of 2.11% - 6.80%. **Conclusion** This method has many advantages in analysis of volatile compounds from *Illicium verum*, with high precision, less sample consumption, no organic solvent extraction, and highly automatic analysis process. It can be applied for fast analysis and distinguish of the volatile compounds in fruit and leaf from *Illicium verum*, as well as in controlling the quality of materials by extract star anise oil.

Key words *Illicium verum* Hook f; static headspace analysis; gas chromatography- mass spectrometry analysis; volatile compound

八角 (*Illicium verum* Hook f) 为木兰科八角属植物, 又叫八角茴香 (《本草纲目》)、大茴香、棱角 (广西壮语), 是我国南方重要的“药食同源”经济树种, 主产于广西^[1], 其果实是我国传统著名的调味

香料, 也供药用, 有祛风理气、和胃调中、温阳散寒、理气止痛等功效, 用于中寒呕逆、腹部冷痛、胃部胀闷等症^[1, 2]。近年来的研究表明, 八角还具有较好的抑菌、镇痛、杀虫活性及抗自由基氧化等作

* 国家科技攻关计划“西部开发”重大项目 (2005BA901A09)

** 通讯作者 Tel: (0771) 5601139 Fax: (0771) 5611352 E-mail: mjh1962@vip.163.com

用^[3-7]。从八角果实和叶片中提取的挥发油,不仅在香精和食品工业应用广泛,在医药上也广泛用作健胃剂,以及合成雌激素己烷雌酚的原料^[1-7]。因此,研究八角果实和叶片挥发性成分对了解八角的药用功效具有重要意义。

传统分析挥发油的方法是采用水蒸气蒸馏或有机溶剂提取再进行气相色谱分析。水蒸气蒸馏和有机溶剂提取会损失掉一些低相对分子质量的萜类和小分子量的酯类等易挥发的化合物,这些化合物往往对挥发油的气味起着重要的作用^[8]。采用顶空分析(headspace analysis)法分析挥发油,可以为气味分析提供第一手信息,在含挥发油的中草药研究及其品质控制方面具有良好的应用前景。顶空分析包括静态顶空分析(static headspace analysis)^[9]、动态顶空分析或者叫吹扫捕集(dynamic headspace analysis or purge and trap analysis)^[10]、顶空-固相微萃取(headspace solid-phase micro-extraction analysis)^[11-12]三大类,其中静态顶空分析法具有快速、自动化程度高、样品消耗量少、检测费用低等优点,并且可以最大程度地避免溶剂提取所带来的分析本底,近年来在挥发油的气味分析方面得到了快速的发展,目前尚未有应用于八角挥发性成分分析方面的报道。本试验采用静态顶空-气相色谱-质谱法测定八角挥发性成分,并对方法的可靠性进行论证。

1 仪器与材料

CP-3800型气相色谱仪(美国VARIAN公司);Saturn 2000型离子阱质谱仪(美国VARIAN公司);配Saturn GC/MS Workstation (Version 5.52)工作站;COMBI PAL自动进样器(集顶空自动加热和气体自动进样装置于一体的系统)、PAL System顶空分析自动控制系统;载气为高纯氦(纯度 $\geq 99.999\%$)。

供试材料为新鲜八角果实和叶片,采自广西壮族自治区防城港市十万林场,经广西药用植物园资源室主任余丽莹副研究员鉴定为木兰科八角属植物八角 *Illicium verum* Hook f.

2 试验方法

2.1 样品处理 将新鲜八角果实和叶片捣碎,称取2 g放入10 mL顶空瓶,于120℃加热30 min,振荡器转速为400 r·min⁻¹,取顶空气体300 μL进行气相色谱-质谱分析。

2.2 色谱条件 色谱柱:HP-5MS(交联5%苯基、95%甲基硅酮)毛细管色谱柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm),载气为高纯氦气(99.999%),流速1.0

mL·min⁻¹,进样口温度250℃,分流比为50:1,程序升温:初始温度50℃,保持3 min,以5℃·min⁻¹升温至250℃,保持5 min,总分析时间48 min。

2.3 质谱条件 采用EI电离方式,电子能量70 eV,离子阱温度230℃,质量扫描范围为40~350 amu,质谱检测时间0.5~50 min,GC-MS传输杆温度为280℃,质谱数据运用NIST Library(2002版)与Saturn标准谱库对质谱数据进行检索。

2.4 GC-MS分析 通过Saturn GC/MS Workstation (Version 5.52)工作站,运用NIST Library(2002版)与Saturn标准谱库对GC-MS分析采集得到的质谱数据进行检索,并结合参考文献^[4-8,13,14]对检出成分进行定性分析。依据总离子流色谱图中的色谱峰面积,按面积归一化法来计算各组分的相对含量。

3 结果与分析

3.1 顶空预热温度的考察 以八角鲜果为实验材料,选择八角中6种重要的呈香物质:反式茴香脑(*trans*-anethole)、顺式茴香脑(*cis*-anethole)、茴香醛(anisic aldehyde)、草蒿脑(estragole)、α-香柠檬烯(α-bergamotene)、小茴香灵(foeniculin),在加热30 min的条件下,对样品的预热温度进行考察。图1为6种化合物在不同预热温度下峰面积的变化情况,综合来看,在预热温度为120℃时,反式茴香脑、顺式茴香脑、草蒿脑、α-香柠檬烯、小茴香灵的峰面积均达到最大值,仅茴香醛的峰面积略有降低,分析灵敏度最高,为最适预热温度。预热温度低于120℃可能导致挥发性组分未能完全挥发,而预热温度过高则可能导致挥发性组分的热降解,从而降低各组分的分析灵敏度。

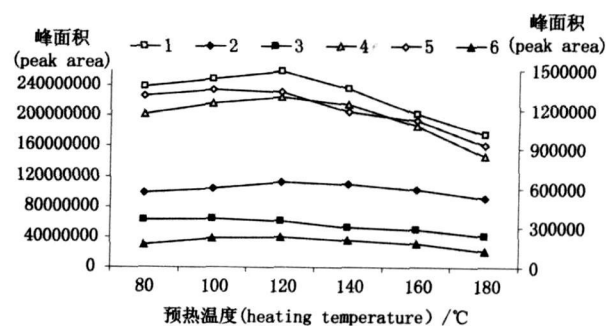


图1 预热温度对样品挥发性成分峰面积的影响

Fig 1 Influence of headspace heating temperature on peak area of volatile compounds

1. 反式茴香脑 (*trans*-anethole)
2. 顺式茴香脑 (*cis*-anethole)
3. 茴香醛 (anisic aldehyde)
4. 草蒿脑 (estragole)
5. α-香柠檬烯 (α-bergamotene)
6. 小茴香灵 (foeniculin)

3.2 顶空加热时间的考察 同样以八角鲜果为实验材料, 预热温度为 120 ℃, 选择上述 6 种化合物的峰面积对样品的加热时间进行考察。图 2 为 6 种化合物在不同加热时间下峰面积的变化情况, 综合来看, 在加热时间为 30 min 时, 上述 6 种化合物的峰面积均达到最大值, 表明在该条件下顶空瓶的蒸汽相中各化合物的分配基本达到平衡, 这 6 种挥发性成分的分析灵敏度最高。加热时间过短可能导致挥发性组分未能挥发完全, 而过长的加热时间则会导致热敏感化合物发生热分解和氧化反应, 从而降低各组分的分析灵敏度。

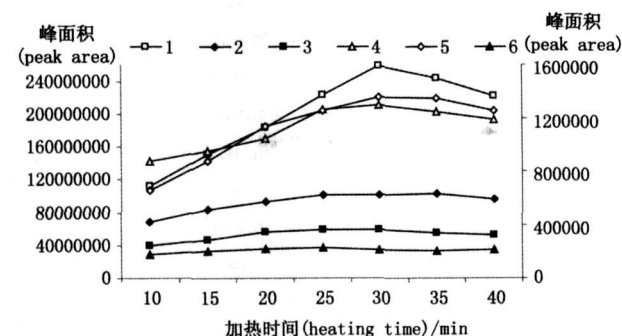


图 2 加热时间对样品挥发性成分峰面积的影响

Fig 2 Influence of headspace heating time on peak area of volatile compounds

1 反式茴香脑 (*trans*-anethole) 2 顺式茴香脑 (*cis*-anethole)
3 茴香醛 (anisaldehyde) 4 草蒿脑 (estragole) 5 α -香柠檬烯 (α -bergamotene) 6 小茴香灵 (fencholine)

3.3 顶空分析方法精密度考察 在上述选出的顶空条件下, 即加热温度为 120 ℃, 加热时间为 30 min, 通过 3 次平行测定, 八角果实和叶片中 6 种主要化合物峰面积的 RSD 见表 1, 可以看出, 在上述顶空条件下八角果实和叶片峰面积的 RSD 均较小, 实验具有较高的精密度。

表 1 顶空分析方法对分析精密度的影响 ($n = 3$)

Tab 1 Effect of static headspace analysis on analytical precision

化合物 (compounds)	RSD %	
	果实 (fruit)	叶片 (leaf)
草蒿脑 (estragole)	3.73	2.16
顺式茴香脑 (<i>cis</i> -anethole)	2.11	5.45
茴香醛 (anisaldehyde)	2.70	2.11
反式茴香脑 (<i>trans</i> -anethole)	3.06	5.18
α -香柠檬烯 (α -bergamotene)	4.58	5.70
小茴香灵 (fencholine)	6.80	4.76

3.4 八角果实和叶片的化学成分分析 图 3 为八角果实和叶片经静态顶空-气相色谱-质谱分析所得的总离子流图, 表 2 为八角果实和叶片顶空气体中挥发性成分的分析结果。通过 GC-MS 分析, 共从八角果实和叶片的顶空气体中鉴定出了 44 种化合物。其中从果实顶空气体中鉴定出了 36 种化合物, 被鉴定化合物峰面积占总峰面积的 97.62%; 从叶片顶空气体中鉴定出了 37 种化合物, 被鉴定化合物峰面积占总峰面积的 99.68%。在被鉴定的 44 种化合物中, 有 29 种化合物在果实和叶片的顶空气体中均能检测到, 有 7 种化合物仅在果实顶空气体中检测到或在叶片顶空气体中含量极微, 有 8 种化合物仅在叶片顶空气体中检测到或在果实顶空气体中含量极微, 表明果实和叶片顶空气体中的挥发性组分有较大差异, 可作为生产上快速检测与区分八角果实和叶片所得挥发油的依据。在果实顶空气体中, 芳香族化合物的相对含量最高, 占总的挥发性物质的 82.32%, 其次为萜类化合物, 占总的挥发性物质的 17.26%, 脂肪族化合物的相对含量仅占总的挥发性物质的 0.42%; 在叶片顶空气体中也是芳香族化合物的相对含量最高, 占到总的挥发性物质的 90.21%, 其次为萜类化合物占总的挥发性物质的 7.38%, 脂肪族化合物的相对含量占总的挥发性物质的 2.41%。在果实和叶片顶空气体中, 均是以芳香族化合物含量最高, 其次为萜类化合物, 非萜类脂肪族化合物含量较低, 但各类化合物的相对含量有较大差异, 在果实顶空气体中萜类挥发性物质含量明显高于叶片, 同样可作为快速检测与区分八角果实和叶片所得挥发油的依据。

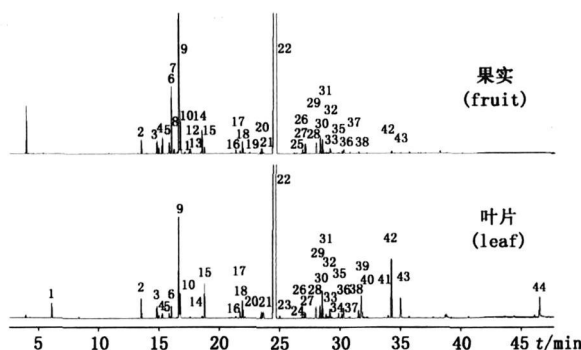


图 3 八角果实和叶片的静态顶空-气相色谱-质谱总离子流图

Fig 3 Total ion chromatograms of volatile compounds from *Illicium verum* Hook. f by static headspace-GC-MS

峰号同表 2 (peak No same as Tab 2)

表 2 八角果实和叶片顶空气体中的挥发性成分
Tab 2 Volatile compound in the headspace of *Illicium verum* Hook. f

峰号 (peak No)	t_{R}/min	化合物 (compounds)	M_{r}	分子式 (molecular formula)	相对含量% (relative content)	
					果实 (fruit)	叶片 (leaf)
1	6. 129	甲苯 (toluene)	92	C_7H_8	/	0. 0706
2	13. 536	$\text{IR}-\alpha$ - 蒎烯 ($\text{IR}-\alpha$ - pinene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 3942	0. 4636
3	14. 834	β - 水芹烯 (β - phellandrene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 3836	0. 2864
4	14. 999	β - 蒎烯 (β - pinene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 1669	0. 0789
5	15. 844	α - 水芹烯 (α - phellandrene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 3551	0. 1273
6	16. 058	Δ^3 - 蒎烯 (Δ^3 - carene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	2. 0982	0. 2850
7	16. 242	α - 萜品烯 (α - terpinene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 1405	/
8	16. 499	对伞花烯 (p - cymene)	134	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}$	0. 0784	/
9	16. 687	D - 柠檬烯 (D - limonene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	10. 0225	2. 7311
10	16. 788	桉油精 (eucalyptol)	154	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	0. 8494	0. 5650
11	17. 142	罗勒烯 (ocimene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 0502	/
12	17. 503	α - 蒎烯 (α - thujene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 0408	/
13	17. 593	γ - 萜品烯 (γ - terpinene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 1334	/
14	18. 481	异萜品烯 (terpinolene)	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0. 0419	0. 0587
15	18. 784	芳樟醇 (linalol)	154	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	0. 2021	0. 8794
16	21. 386	萜品- 4- 醇 (terpinen- 4- ol)	154	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	0. 1280	0. 0569
17	21. 750	α - 萜品醇 (α - terpinenol)	154	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	0. 0827	0. 1774
18	21. 936	草蒿脑 (estragole)	148	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	0. 4065	0. 4435
19	23. 406	3, 7- 二甲基- 2, 6- 辛二烯- 1- 醇 (3, 7- dimethyl- 2, 6- octadiene- 1- ol)	153	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}$	0. 0431	/
20	23. 525	顺式茴香脑 (cis - anethole)	148	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	0. 1928	0. 1736
21	23. 652	茴香醛 (anisic aldehyde)	136	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$	0. 1133	0. 3583
22	24. 556	反式茴香脑 ($trans$ - anethole)	148	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	81. 2806	86. 6562
23	25. 024	肉桂醇 (cinnamyl alcohol)	134	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}$	/	0. 1051
24	26. 887	对甲氧基茴香酸甲酯 (methyl p - anisate)	166	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$	/	0. 3887
25	26. 918	乙酸橙花酯 (neryl acetate)	196	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$	0. 1373	/
26	27. 048	2, 3- 二甲基茴香醛 (2, 3- dimethyl p - anisaldehyde)	164	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$	0. 2012	0. 2205
27	27. 146	烯 (copene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 3022	0. 1466
28	28. 045	反式- α - 香柠檬烯 ($trans$ - α - bergamotene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 3610	0. 2781
29	28. 392	β - 石竹烯 (β - caryophyllene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 5577	0. 3189
30	28. 568	α - 香柠檬烯 (α - bergamotene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 4250	0. 6303
31	28. 889	β - 金合欢烯 (β - farnesene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 0434	0. 1015
32	29. 044	β - 倍半萜水芹烯 (β - sesquiphellandrene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 0781	0. 0479
33	29. 187	(-)- 石竹烯 [(-)- caryophyllene]	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 1688	0. 2327
34	29. 928	甲基异丁香酚 (methylisoeugenol)	178	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$	/	0. 0822
35	30. 171	α - 金合欢烯 (α - farnesene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 0583	0. 1168
36	30. 325	β - 甜没药烯 (β - bisabolene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 1782	0. 3134
37	30. 821	β - 杜松烯 (β - cadinene)	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0. 1144	0. 0779
38	31. 552	反式橙花叔醇 ($trans$ - nerolidol)	222	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	0. 0445	0. 2111
39	31. 786	4- 异丙基环庚二烯酚酮 (β - thujaplicin)	164	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$	/	0. 7532
40	31. 859	4- 甲氧基苯- 甲基甲醇 (4- methoxyphenyl methyl carbinol)	152	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$	/	0. 1291
41	34. 002	莫勒醇 (muurolol)	222	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	/	0. 0762
42	34. 263	小茴香灵 (对丙烯基苯酚异戊烯醚) (foeniculine)	202	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}$	0. 0723	1. 5160
43	35. 727	间羟基肉桂酸甲酯 (methyl- m - hydroxycinnate)	178	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$	0. 0536	0. 0649
44	46. 544	棕榈酸 (hexadecylic acid)	256	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	/	0. 7770

注 (note): “ / ” 表示未检测到该化合物或化合物含量极微 (The sign of “ / ” indicated that the compound had not been detected or the content was extremely low)

4 讨论

采用静态顶空-气相色谱-质谱分析法是一种快速有效的分析方法,已经用于多种植物挥发性成分的分析,比如烟草、柴胡等^[13,14]。实验结果表明,在八角果实和叶片挥发性成分的分析过程中该方法具有较高的精密度,且样品消耗量仅为2g,无需有机溶剂提取,整个过程高度自动化,可作为快速检测与区分八角果实和叶片所得挥发油的依据,亦可用作八角挥发油提取原料的质量控制。

参考文献

- 1 Editorial Board of Flora of China of the Chinese Academy of Science (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China(中国植物志). Tomus 30(1) (第三十卷第一分册). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1996 228
- 2 ChP(中国药典). 2005 Vol I (一部): 4
- 3 CAO Yan-ping(曹雁平). The Flavoring Technology for Food(食品调味技术). Beijing(北京): China Light Industry Press(中国轻工业出版社), 2002 113
- 4 DeM, DeAk Sen P, et al. Antimicrobial properties of star anise(*Illicium verum* Hood. f.). *Hytother Res* 2002, 16(1): 94
- 5 Kouno Isao Yang Chun-shu Morisaki Takuya et al. Two new sesquiterpenoids from the bark of *Illicium dunnianum*. *Chem Pharm Bull* 1991 39(10): 2606
- 6 FANG Yu-zhen(方玉珍), SONG Jie-yun(宋杰云), CEN Yan-fei(岑燕飞), et al. Study on analgesic effect of aniseed acid extraction from *Illicium dunnianum* (毒八角酸的镇痛作用研究). *J Guiyang Univ Chin med* (贵阳中医学院学报), 1989 (1): 59
- 7 HUANG Jian-mei(黄建梅), YANG Chun-shu(杨春澍). Survey of chemical constituents and pharmacological activities of *Illicium* plants(八角科植物化学成分和药理研究概况). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998 33(6): 321
- 8 Chálva F, Gabri G, Liddle PAP, et al. Qualitative evaluation of aromatic herbs by direct headspace GC analysis: applications of the method and comparison with the traditional analysis of essential oils. *J High Resolut Chromatogr* 1982, 5(4): 182
- 9 Kolb B. Headspace sampling with capillary columns. *J Chromatogr A*, 1999, 842(1+2): 163
- 10 Vitenberg AG, Ioffe BV. Basic equations in continuous gas extraction and their application to headspace analysis. *J Chromatogr* 1989 471: 55
- 11 Mills GA, Walker V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J Chromatogr A*, 2000, 902(1): 267
- 12 Ulrich S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J Chromatogr A*, 2000 902(1): 167
- 13 LIAO Yuan-xi(廖远熹), WANG Hao-yang(王昊阳), GUO Yin-long(郭寅龙), et al. Analysis of volatile compounds from bupleurum by static headspace-gas chromatography-mass spectrometry (中药柴胡挥发性成分的静态顶空-气相色谱-质谱分析). *J Chin Mass Spectrom Soc* (质谱学报), 2005, 26(3): 187
- 14 WANG Hao-yang(王昊阳), GUO Yin-long(郭寅龙), ZHANG Zheng-xing(张正行), et al. The progress of headspace-gas chromatography analysis (顶空-气相色谱法进展). *Anal Test Technol Instrum* (分析测试技术与仪器), 2003 9(3): 129

(本文于2007年10月8日收到)