

八角茴香春果和秋果以及不同部位的莽草酸含量分析

袁经权^{1,2}, 许旭东³, 许娜³, 胡晓茹³, 王硕¹, 周小雷¹, 缪剑华^{1*}

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530023; 2. 暨南大学 中药及天然药物研究所, 广州 510632;

3. 中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 采用 HPLC 法对不同季节和不同部位的八角茴香药材主成分莽草酸的含量进行分析, 发现枝条、叶片、春果、秋果的莽草酸含量依次为 2.64%、4.94%、8.63%、12.16%; 色谱条件: Venusil HILIC(5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm) 色谱柱, 流动相: 乙腈-0.5% 三氟乙酸(95:5), 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长为 210 nm。莽草酸进样量在 0.001~6 μ g 范围内线性关系良好。莽草酸的线性回归相关系数 $r=0.9984$, 平均回收率为 98.4%, 相对标准偏差(RSD)为 1.26%。该研究为制定八角茴香药材质量检测标准提供了简便、快速、准确的方法。

关键词: 八角茴香; 春果; 秋果; 枝叶; 莽草酸; 高效液相色谱法

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)06-0850-03

Determination of shikimic acid from spring and autumn fruits as well as different parts of *Illicium verum*

YUAN Jing-Quan^{1,2}, XU Xu-Dong³, XU Na³, HU Xiao-Ru³,
WANG Shuo¹, ZHOU Xiao-Lei¹, MIAO Jian-Hua^{1*}

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: The content of shikimic acid from different seasons and parts of *Illicium verum* were analyzed by HPLC, the results showed that the content of shikimic acid in leaves, branches, autumn fruits and spring fruits of *I. verum* were 2.64%, 4.94%, 8.63%, 12.16%, successively. The chromatography conditions were as follows: Venusil HILIC column(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m) with acetonitrile-0.5% trifluoroacetic acid(95:5, volume ratio) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, and the detection wavelength was set at 210 nm. The calibration curve of shikimic acid for this method was $Y=33122X+150.17$, $r=0.9984$ in the line range of 0.001—6 μ g. The method was simple, accurate and could be used as a standard for the *I. verum* medicine material quality detected.

Key words: *Illicium verum*; spring fruits; autumn fruits; leaves and branches; shikimic acid; HPLC

八角又称八角茴香, 为木兰科八角属植物(*Illicium verum*)干燥成熟果实, 主要分布于广西、云南、广东等地。八角茴香为我国药典收载品种, 其味辛、

性温, 有温阳散寒、理气止痛功效, 用于寒疝腹痛、肾虚腰痛等症(中华人民共和国药典委员会, 2005)。八角化学成分比较丰富, 赵利琴等(2007)总结报道

收稿日期: 2009-06-03 修回日期: 2009-09-22

基金项目: 国家科技攻关计划“西部开发”重大项目(2005BA901A09)[Supported by the National Key Technologies R & D Program of China (2005BA901A09)]

作者简介: 袁经权(1967-), 男, 广西玉林市人, 博士研究生, 副研究员, 主要从事天然药物化学及新药研究, (E-mail)yjqgx@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail:mjh1962@vip.163.com)

其富含单萜、倍半萜、二萜和三萜。而含量最大并且最具八角特色成分有两种,一是反式茴香醚,八角产业提炼精油一般达 10% 左右,其中反式茴香醚为主要成分,李寿芬等(2000)报道反式茴香醚占精油比例高达 93.5%;二是莽草酸,王晓强等(2001)、黄雪梅等(2008)报道莽草酸含量占八角果实 8%~10%,为自然界中莽草酸含量较高植物。八角每年开花结果两次,第一次开花在 3~4 月,8~9 月果实成熟,果实棕红色,个大,称为“大红”,俗称“正造”,即秋果,质量好,产量高;秋果收获后当月又第二次开花,至第二年 3~4 月果实成熟,俗称“角花”,即春果,果实瘦弱、品质差,产量低。2005 年瑞士 Roche 公布其莽草酸原料来自中国八角茴香的春果,但是春果农业产量太低,难以供应全球莽草酸市场需求,尤其是区域性或全球性流感爆发时期达非的原料需要。所以亟待评价八角茴香不同季节和不同部位的莽草酸含量,满足莽草酸产业有针对性利用八角资源,但迄今未发现八角茴香各个部位以及春果和秋果的莽草酸含量分析的报道。为此我们不但尝试建立新的莽草酸含量分析方法,而且分别测定枝条、叶片、春果和秋果的莽草酸含量,基本摸清八角茴香中各部位和各季节果实的莽草酸含量,为有针对性地开发八角中的莽草酸提供了科学依据。

1 仪器与试剂

LUMTECH 二元高压液相色谱仪,四通道自外多波长检测器;化学工作站 EastChrom。H66025 型超声清洗仪(无锡市超声电子设备厂)。甲醇为色谱纯(Fisher 公司);乙腈为色谱纯(Fisher 公司);三氟乙酸为色谱纯(Fisher 公司)。对照品:莽草酸对照品(S5375)购自美国 SIGMA 公司,熔点 185 °C,纯度 99%;枝条、叶片和秋果 2006 年 10 月采集,春果 2007 年 5 月采集,产地均是广西上林县白圩镇,样品由广西药用植物研究所资源保护中心余丽莹副研究员鉴定为木兰科植物八角(*Illicium verum*)的果实和枝叶。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

莽草酸对照品真空干燥 48 h,精密称取 1.2 mg,用甲醇超声溶解,并定容于 2 mL 量瓶中,制成

0.6 mg · mL⁻¹对照品溶液。

2.2 样品供试液的制备

分别精密称取干燥的八角春果、秋果、枝条、叶片粉末(过 60 目筛)约 0.5 g,精密加入 50 mL 甲醇加热回流 2 h,过滤,滤渣再按上述方法提取 2 次,滤液定容于 200 mL 容量瓶,取 5 mL 上清液,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,滤液作为样品供试液。

2.3 液相色谱条件及系统适应性实验

色谱柱为 Agela 公司 Venusil HILIC(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.5%三氟乙酸(95:5);流速:1.0 mL · min⁻¹;测定波长为 210 nm。柱温:室温。对照品溶液和供试品溶液分别进样 10 μL,莽草酸的保留时间约为 8.3 min(图 1)。

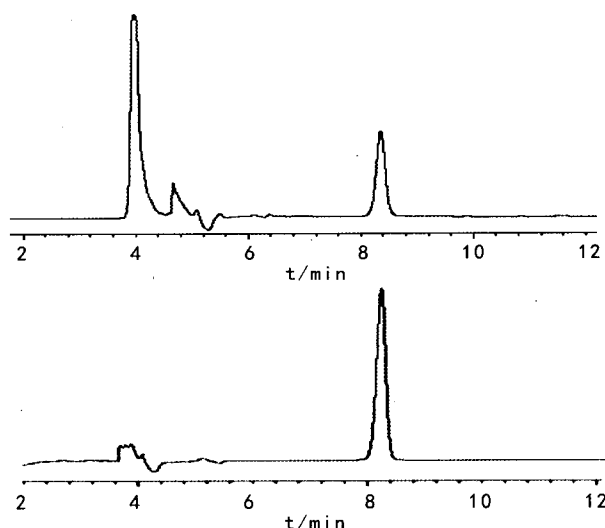


图 1 对照品(A)和广西上林县八角茴香秋果样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the reference substance(A) and the fruits of *Illicium verum* from Shanglin County, Guangxi(B)

2.4 标准曲线的制备

精密量取莽草酸标准品(0.6 mg · mL⁻¹),分别稀释为 0.4, 0.2, 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001 mg · mL⁻¹, 甲醇为空白对照,分别吸取 10 μL 进样测定。以对照品浓度为横坐标,对照品峰面积为纵坐标,结果经回归分析,莽草酸在 0.001~6 μg 内有良好的线性关系,回归方程为 $Y = 33122X + 150.17$, $r = 0.9984$ 。

2.5 精密度实验

精密吸取莽草酸对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测得色谱峰峰面积平均值为 30880, RSD 为

1.03%,符合分析要求。

2.6 回收率试验

精密称取广西上林县产八角茴香秋果粉末约 0.1 g,在其中精密加入莽草酸对照品约 5 mg,以下按样品供试液制备及样品测定,其平均回收率为 98.4%,RSD 为 1.26%,符合分析要求。

2.7 重复性试验

取同一品种样品(广西上林县产八角茴香秋果)粉末,按样品测定法重复测定 5 次,测得莽草酸含量平均值为 12.16%,RSD 为 1.32%,符合要求。

2.8 样品的测定

按上述样品液制备方法制备各样品供试液,精密吸取样品供试液 10 μ L,莽草酸对照品溶液 10 μ L,分别进入高效液相色谱仪,测定色谱峰峰面积,计算含量,结果见表 1。

表 1 八角各部位、春果和秋果的莽草酸含量
分析结果(产地:广西上林县)

Table 1 Determination result of the different parts,
spring and autumn fruits of *I. verum*

采集时间 Time (Year-Month)	2006-10		2007-05	
部位 Part	枝条	叶片	秋果	春果
含量 Content (%)	2.64	4.94	12.16	8.63

3 讨论

(1)八角茴香药材在 2005 年版中国药典中并没有莽草酸含量测定项,本文提出了以莽草酸作为有效成分定量分析八角茴香质量的方法,方法快速、简便,准确性和重复性良好,可作为有效分析方法测定八角茴香甚至其他富含莽草酸的药材质量分析。(2)开展了八角不同部位的莽草酸含量分析,从上林县的八角不同部位结果分析初步看出,八角各部位中,莽草酸含量最高的是果实,其次为叶片,枝条含量最低。可见,八角果实是最佳的莽草酸提取原料,生产企业应把八角果实作为主要的莽草酸生产原料,枝叶则可作为八角果实缺乏时的原料补充。(3)开展了八角不同季节果实的莽草酸含量分析,从上林县的八角春果和秋果的结果分析初步看出,秋果不仅是提取精油的主要原料,还是提取莽草酸的最

主要原料。(4)王晓强等(2001)采用 NH_2 键合相硅胶柱,以乙腈-2% H_3PO_4 (95:5)为流动相对八角属部分植物果实的莽草酸成分进行高效液相分析;高智席等(2005)、边青泉等(2007)、李伟等(2008)、黄雪梅等(2008)也先后对不同植物的莽草酸进行了含量分析;本研究在对八角茴香的莽草酸含量进行分析过程中,发现应用 NH_2 键合相硅胶柱分析莽草酸含量时,莽草酸保留时间较短且峰型拖尾,后用 Venusil HILIC 柱进行分析,莽草酸的峰型拖尾明显减少,此外,我们还尝试三氟乙酸在莽草酸分析上的应用,将流动相改用三氟乙酸代替磷酸后,峰型更为对称。本研究在色谱柱和流动相选用上有所不同,而且出峰时间相对比较合适。

参考文献:

- 中华人民共和国药典委员会. 2005. 中国药典(一部)[M]. 4
Bian QQ(边清泉), Wang H(汪红), Luo Y(罗英), et al. 2007. Determination of shikimic acid in different plants by HPLC (HPLC 测定不同植物中莽草酸的含量)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 32(14): 1485-1487
Gao ZX(高智席), Zhou GM(周光明), Huang C(黄成), et al. 2005. Rapid determination of rudimental shikimic acid in *Taxodium distichum* by Ion-improved Reversed-Phase HPLC (离子增强一反相高效液相色谱法快速测定落羽杉中莽草酸)[J]. *J Southwest China Normal Univ(Nat Sci)* (西南师范大学学报·自然科学版), 30(6): 1082-1085
Huang XM(黄雪梅), Qin XL(覃小玲), Jiang WZ(蒋伟哲). 2008. Determination of shikimic acid in fructus anisi stellati(八角茴香中莽草酸的含量测定)[J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 28(2): 130-132
Li SF(李寿芬), Liu SH(刘绍华). 2000. 岑溪优质八角精油的化学成分[J]. *Guihaia* (广西植物), 20(1): 69-70
Li W(李伟), Cao Y(曹庸), Wui H(魏华), et al. 2008. Reversed-Phase HPLC determination of shikimic acid in *Illicium verum* (反相高效液相法测定八角茴香果实中的莽草酸)[J]. *J Jishou Univ(Nat Sci Ed)* (吉首大学学报·自然科学版), 29(4): 104-106
Wang XQ(王晓强), Guo YJ(郭亚健), Yang CS(杨春澍). 2001. Determination of shikimic acid in fruit of Illicaceae plants by HPLC with diode-array detection(高效液相法测定八角属部分植物果实中莽草酸的含量)[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 26(7): 447-449
Zhao LQ(赵利琴), Luo YM(罗玉明). 2007. The terpenoids and their chemotaxonomic significance in *Illicium* (八角属萜类成分及其化学分类意义)[J]. *Guihaia* (广西植物), 27(2): 272-276