

雪松不同部位中莽草酸的含量分析[△]

雷艳萍^{1,2*}, 石晓峰^{1#}, 白朝辉², 刘东彦¹, 李 师²(1.甘肃省医学科学研究院药物研究所, 兰州 730050; 2.甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室/甘肃中医学院, 兰州 730030)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0803-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.28

摘要 目的:测定雪松不同部位的莽草酸含量,为进一步开发利用雪松提供参考。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈,流动相为0.1%磷酸水溶液-甲醇(95:5, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为217 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:莽草酸的质量浓度在1~50 μg/ml范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$);精密度的RSD<2%,重复性、稳定性试验的RSD<3%;平均加样回收率为99.2%,RSD=2.08%($n=9$)。雪松不同部位中莽草酸的含量依次为松针>嫩枝>花序>老枝>老枝的树皮>老枝的木质部,其中以雪松松针最高,达3.22%。结论:雪松的松针和嫩枝所含的莽草酸较高,具有较高的开发价值。

关键词 雪松;不同部位;莽草酸;含量分析;高效液相色谱法

Analysis on the Content of Shikimic Acid in Different Parts of *Cedrus deodara*

LEI Yan-ping^{1,2}, SHI Xiao-feng¹, BAI Zhao-hui², LIU Dong-yan¹, LI Shi²(1.Institute of Pharmaceutical Research, Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China; 2.Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional (Tibet) Chinese Medicines of the College in Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the content of shikimic acid in different parts of *Cedrus deodara* and provide reference for its further development and application. METHODS: HPLC was conducted with Diamonsil C₁₈ column, 0.1% Phosphoric acid-methanol solution (95:5, V/V) mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 217 nm, column temperature was 30 ℃ and injection volume was 20 μl. RESULTS: The concentration of shikimic acid had good linear relationship with its peak area values in the range of 1-50 μg/ml($r=0.999\ 8$). The RSD of precision test was less than 2% and the RSDs of repeatability and stability test were less than 3%; the average sample recovery were 99.2%, the RSD were 2.08%($n=9$). The content of shikimic acid from different part of *C. deodara* was as follows: the pine needles>tender branches>inflorescence>old branches>tree bark of old branches>xylem of old branches, in which the *C. deodara* pine needles stand top, accounting for 3.22%. The content of shikimic acid in tree bark from old branches of *C. deodara* is 1.67%, which is more than that of wood. CONCLUSIONS: The content of shikimic acid in the pine needles and tender branches of *C. deodara* stand the highest with high development value.

KEY WORDS *Cedrus deodara*; Different parts; Shikimic acid; Content analysis; HPLC

莽草酸又称毒八角酸,化学名为3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-羧酸,分子式为C₇H₁₀O₅,相对分子质量为174.15。其具有抗病毒、抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗血栓形成和抗脑缺血等多种药理活性^[1],是合成抗禽流感病毒和甲型H1N1流感病毒药物磷酸奥司他韦的重要原料^[2],广泛存在于木兰科八角茴香、松柏科等高等植物和微生物中^[3]。笔者曾对7种松柏科植物的枝、叶和不同采集期雪松松针中莽草酸的含量进行测定,结果发现雪松松针可作为莽草酸的优质生产原料,其莽草酸的含量高达3.93%,且4~6月时的含量最高,为最佳采集期^[4];同时研究了利用该原料4步即可分离到纯度95%以上的莽草酸的最佳提取工艺和生产工艺^[5-6]。为了有效开发利用雪松,本研究采

用高效液相色谱(HPLC)法测定雪松不同部位(松针、花序、嫩枝、老枝及老枝的树皮、木质部)中莽草酸的含量,旨在为莽草酸的原料选择和雪松的开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪(美国安捷伦公司);AE260型万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);CP225D型十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司);B3200S-T型超声波清洗仪[必能信超声(上海)有限公司];手提式高速中药粉碎机(广州市一搏机电设备有限公司)。

1.2 试剂

莽草酸对照品(昆明科翔生物科技有限公司,纯度>98%);甲醇为色谱纯(西陇化工股份有限公司);水为自制重蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

雪松松针、花序、嫩枝、老枝及老枝的树皮、木质部于2011年6月采自甘肃省兰州市市区,经甘肃省医学科学研究院何福江研究员鉴定为雪松*Cedrus deodara*。

[△]基金项目:甘肃省科技支撑计划项目(No.1204FKCA152);甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(No.zzy-2011-05)

* 硕士。研究方向:中药有效成分与质量标准。E-mail:495306892@qq.com

通信作者:主任药师,教授,硕士生导师。研究方向:天然药物化学。电话:0931-2302644。E-mail:shixiaofeng2005@sina.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 磷酸水溶液-甲醇(95:5, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 217 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取莽草酸对照品 5 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 用流动相溶解并定容, 配制成质量浓度为 0.5 mg/ml 的对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液 0.5 ml, 置于 5 ml 量瓶中, 用流动相定容, 即得质量浓度为 50 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 分别精密称取雪松松针、嫩枝、花序、老枝及老枝的树皮、木质部的干燥粉末(过 20~40 目筛)各 1.0 g, 加水 80 ml, 浸泡 12 h, 在 60 °C 条件下超声(消耗功率: 160 W, 加热功率: 260 W, 频率: 59 kHz)提取 45 min, 放置至室温, 滤过, 滤液移至 100 ml 量瓶中, 用纯化水定容。精密吸取上述溶液 1 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 用流动相定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 系统适用性试验

精密吸取“2.2”项下对照品溶液(质量浓度为 15 μg/ml)和松针供试品溶液各 20 μl, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。结果, 莽草酸色谱峰的保留时间均为 2.7 min, 该峰与其相邻色谱峰的分离度 > 1.5; 理论板数以莽草酸峰计不小于 4 000; 最低检测限为 0.1 μg/ml。

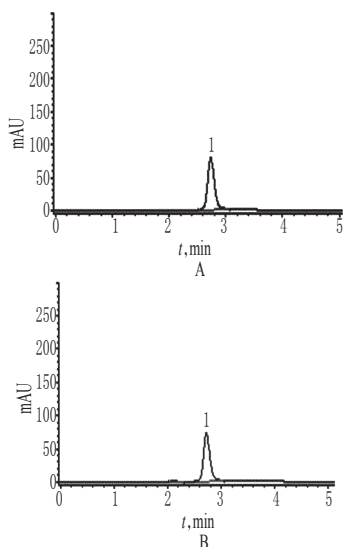


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 莽草酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. shikimic acid reference; B. sample; 1. shikimic acid

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.5”项下质量浓度为 50 μg/ml 的对照品溶液 20、100、300、500、700、1 000 μl, 分别加流动相定容至 1 ml 量瓶中, 摇匀, 得到质量浓度为 1、5、15、25、35、50 μg/ml 的系列对照品溶液。分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以莽草酸的质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $y = 47.133\ 54x - 9.457\ 00$ ($r = 0.999\ 8$)。结果表明, 莽草酸的质量浓度在 1~50 μg/ml 范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.4”项下莽草酸对照品溶液(质量浓度为 5 μg/ml)适量, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积。结果, $RSD = 1.47\%$ ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密称取雪松松针的干燥粉末(过 20~40 目筛)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于放置 0、1、2、4、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, $RSD = 2.11\%$ ($n = 7$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批雪松松针粉末(过 20~40 目筛)适量, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 莽草酸的质量分数分别为 3.14%、3.17%、3.08%、3.17%、3.28%、3.22%, 平均质量分数为 3.30%, $RSD = 2.19\%$ ($n = 6$), 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知质量分数为 3.30% 的雪松松针粉末(过 20~40 目筛)约 0.1 g, 共 9 份, 每 3 份分别精密加入高、中、低质量的莽草酸对照品适量, 置于 10 ml 量瓶中, 加水 8 ml, 于 60 °C 超声(消耗功率: 160 W, 加热功率: 260 W, 频率: 59 kHz)处理 45 min, 放置至室温, 加水定容。精密吸取上清液 1.0 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 用流动相定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率, 结果详见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n = 9$)

Tab 1 Results of sample recovery test($n = 9$)

称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.100 3	3.31	2.64	6.00	101.9		
0.100 5	3.32	2.64	5.88	97.0		
0.100 8	3.33	2.64	5.90	97.3		
0.099 5	3.28	3.30	6.61	100.9		
0.099 9	3.30	3.30	6.66	101.8	99.2	2.08
0.100 9	3.33	3.30	6.55	97.6		
0.100 9	3.33	3.96	7.21	98.0		
0.100 6	3.32	3.96	7.19	97.7		
0.098 3	3.24	3.96	7.23	100.8		

2.9 样品含量测定

取同一批雪松的松针、嫩枝、花序、老枝及老枝的树皮、木质部粉末各 3 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果, 松针、嫩枝、花序、老枝及老枝的树皮、木质部中莽草酸的质量分数依次为 3.22%、1.66%、1.04%、0.73%、1.67%、0.68%。其中, 以雪松松针质量分数最高(达 3.22%), 其次为嫩枝。

3 讨论

目前, 有关植物中莽草酸的提取多采用超声法^[7]、微波法、回流法和水浸法^[1]。本研究比对了超声法与回流法, 结过发现回流提取的杂质较多, 故选择超声提取; 笔者又考察了超声提取的时间、温度、次数对提取效率的影响, 最终确定供试品的提取条件为 60 °C 下超声提取 45 min。

莽草酸为有机弱酸, 可发生电离, 在 $pH < 2.67$ 时基本上以分子形式存在; $pH > 4.43$ 时基本上以离子形式存在^[8]。文献多采用含量为 1%~2% 的磷酸调节 pH, 但酸性过大对色谱柱有一定损害^[9-11]。笔者在确保目标峰峰形良好、测量准确的前提下降

UV法测定贵州产香薷和野草香药材中总黄酮的含量[△]

高 健*,王 静,陈 青*(贵州大学化学与化工学院化学系,贵阳 550025)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0805-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.29

摘 要 目的:建立测定贵州产香薷和野草香药材中总黄酮的含量测定方法。方法:采用紫外-可见分光光度法,以芦丁为对照品,在482 nm波长处对两种香薷属植物中的总黄酮进行含量测定。结果:芦丁的质量浓度在0.02~0.1 mg/ml范围内与吸光度值呈良好的线性关系;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为97.55%,RSD为0.66%(n=6)。香薷和野草香的花、茎叶及根中总黄酮的含量分别为0.704、0.438、0.247 mg/g和0.901、0.476、0.352 mg/g。结论:该方法操作简便、准确,重复性和稳定性良好,适用于香薷属植物总黄酮的含量测定。

关键词 香薷;野草香;总黄酮;提取;紫外-可见分光光度法;含量测定

Determination of Total Flavonoids Contents in *Elsholtzia ciliata* and *cypriani* Produced in Guizhou by UV

GAO Jian, WANG Jing, CHEN Qing (Dept. of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of total flavonoids content in *Elsholtzia ciliata* and *Elsholtzia cypriani* produced in Guizhou. METHODS: The total flavonoids contents in two *Elsholtzia* plants were determined by UV at 482 nm with the reference of rutinum. RESULTS: The concentration of rutinum had a good linear relationship with absorbance in the range of 0.02-0.1 mg/ml. The RSDs of precision, stability and repeatability test were less than 2%; the average sample recovery were 97.55%, RSD were 0.66% (n=6). The contents of total flavonoids in the flowers, stem leaf and root of *E. ciliata* and *E. cypriani* were 0.704, 0.438, 0.247 mg/g and 0.901, 0.476, 0.352 mg/g. CONCLUSIONS: This method is simple and accurate and has good repeatability and stability. It is applicable for the determination of total flavonoids contents in *Elsholtzia* plants.

KEYWORDS *Elsholtzia ciliata*; *Elsholtzia cypriani*; Total flavonoids; Extract; UV; Content determination

低了磷酸用量,分别考察了甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液等流动相体系,经过优化对比后采用0.1%磷酸水溶液-甲醇作为流动相获得了良好的分离效果,峰纯度经液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检验为单一峰^[12]。

目前,莽草酸主要是从中药八角茴香中提取,其莽草酸含量最高达9.88%~10.91%^[13],但八角茴香价格十分昂贵。而雪松的松针和嫩枝易得,再生速度快,且可持续利用。由本研究结果可知,雪松的松针和嫩枝所含的莽草酸较高,具有较高的开发价值。

参考文献

- [1] 张军民,石晓峰.天然产物莽草酸的研究进展[J].中国中医药信息杂志,2011,18(2):109.
- [2] 仇国苏.莽草酸与禽流感治疗药:达菲[J].化学教育,2006,27(2):1.
- [3] 边清泉,汪红,罗英,等.HPLC测定不同植物中莽草酸的含量[J].中国中药杂志,2007,14(32):1485.
- [4] 王东东,石晓峰,李冲,等.7种松柏科植物中莽草酸的含量测定[J].中国药房,2011,22(7):616.

- [5] 刘东彦,石晓峰,李冲,等.雪松松针中莽草酸的分离及其纯度检查[J].中国现代应用药学杂志,2011,28(7):637.
- [6] 石晓峰,刘东彦,沈薇,等.从雪松松针中提取、分离、纯化莽草酸的生产工艺:中国,201010174776.7[P].2010.
- [7] 刘新,马廉举,林於,等.正交试验优选侧柏叶中莽草酸提取工艺[J].中国药房,2010,21(43):4076.
- [8] 何冀川,李松,罗英.紫外分光光度法测定莽草酸的解离常数[J].绵阳师范学院学报,2006,25(5):40.
- [9] 张志琴,刘光明,杨永寿,等.云南松松针中莽草酸的含量测定[J].云南民族大学学报:自然科学版,2012,21(1):10.
- [10] 吴俊珠,周浓,周梅,等.RP-HPLC测定松龄血脉康胶囊中莽草酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):113.
- [11] 谢济运,陈小鹏,粟本超,等.高效液相色谱法测定松针中莽草酸的含量[J].化学研究与应用,2010,22(7):943.
- [12] 沈薇,石晓峰,王东东,等.正交试验优选雪松松针中莽草酸的提取工艺[J].中国现代应用药学杂志,2011,28(10):831.
- [13] 黄雪梅,覃小玲,蒋伟哲.八角茴香中莽草酸的含量测定[J].中国医院药学杂志,2008,28(2):130.

△基金项目:贵州省科技计划课题(No.黔科合SY字[2011]3086)
* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学。E-mail: 527795639@qq.com
通信作者:教授,博士。研究方向:天然药物化学。E-mail: cchen_qing@sina.com

(收稿日期:2014-06-10 修回日期:2014-09-13)

(编辑:孙冰)