

川楝子中香草酸含量测定研究

杜怡昊¹, 刘建华², 李计龙³, 安立群³, 杨迺嘉^{2*}

¹四川农业大学生命科学与理学院, 雅安 625014; ²贵州省生物技术研究开发基地, 贵阳 550002; ³贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025

摘要: 本实验采用薄层色谱法对川楝子中香草酸、异香草酸进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法对川楝子中香草酸进行含量测定。色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ (250 mm × 4.60 mm 5 μm) 柱温: 30 °C, 流动相: 甲醇: 水: 冰乙酸 = 25: 75: 0.5, 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长: 260 nm。最终, 定性鉴别斑点清晰。结果表明香草酸含量在 1.022 ~ 16.352 μg 范围内, 进样量与峰面积呈良好线性关系, 相关系数 $r = 0.9998$; 香草酸的平均回收率为 102.45%, $RSD = 1.22\%$ ($n = 6$)。

关键词: 川楝子; 香草酸; 异香草酸; 薄层色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

Content Determination of Vanillic Acid in *Melia toosendan* Sieb.

DU Yi-hao¹, LIU Jian-hua², LI Ji-long³, AN Li-qun³, YANG Nai-jia^{2*}

¹Sichuan Agriculture University, College of Life Science, Ya'an 625014, China; ²Guizhou Institute of Biotechnology Research and Development, Guiyang 550002, China; ³Guizhou University, College of Life Science, Guiyang 550025, China

Abstract: In this research, vanillic acid and iso-vanillic acid in *Melia toosendan* Sieb. were identified by TLC. The content of vanillic acid was determined by HPLC. The HPLC system consisted of BDS-C₁₈, methanol-water-acetic acid (25: 75: 0.5) as mobile phase, flow rate of 1.0 mL/min and column temperature of 30 °C. The eluate was detected at 260 nm. The TLC spots developed were fairly clear. The control content of vanillic acid was within the range of 1.022 ~ 16.352 μg and there was fine linearship between the sample input and the peak area. The average recovery was 102.45%, $r = 0.9998$ ($n = 6$), $RSD = 1.22\%$.

Key words: *Melia toosendan* Sieb.; vanillic acid; iso-vanillic acid; TLC; HPLC

川楝子(toosendan fruit)为楝科植物川楝(*Melia toosendan* Sied.)的成熟果实^[1],具有舒肝驱虫、行气止痛的作用,其主治热厥心痛、胁痛、疝痛、虫积腹痛^[2]。其中川楝素为其驱除蛔虫的有效成分,另外,其他文献资料表明^[3,4]:川楝子对胃病、皮肤病及前列腺炎等也有很好疗效。香草酸(vanillic acid)有抗菌和抗真菌作用,体外显示还具抗炎活性^[5],但川楝子中香草酸的定性和定量方面研究还未见报道。本文采用薄层色谱法和高效液相色谱法对川楝子中的香草酸进行定性鉴别和定量分析,为进一步研究川楝子提供依据。

1 仪器与药材

高效液相色谱仪:岛津 LC-10A 液相色谱仪,

SPD-10A 紫外检测器,南宁威玛龙色谱工作站。色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (250 mm × 4.60 mm, 5 μm); 香草酸对照品(0823-9802)购自中国药品生物制品检定所,异香草酸对照品(14210)购自上海晶纯试剂有限公司(纯度 97%);摇摆式高速中药粉碎机(浙江温岭市大德中药机械有限公司);SYFM-8II 型超微粉碎机(济南松岳机器有限责任公司);紫外可见分光光度计: TU-1800SPC;薄层用硅胶 G 板(青岛海洋化工厂分厂)。供试的三组药材来自不同批次川楝子,采自四川,由贵阳中医学院张荣川教授鉴定为楝科植物川楝的成熟果实;甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 薄层色谱鉴别

取川楝子药材粉碎成细粉,称取 2.5 g,置锥形瓶中,加入 0.1N HCl 1 mL,乙酸乙酯 20 mL,超声 10

收稿日期: 2010-06-11 接受日期: 2010-10-12

* 通讯作者 Tel: 86-851-5713626; E-mail: khyangbiyu@163.com

min 过滤, 置水浴挥干, 残渣加无水乙醇 1 mL 溶解作为供试品溶液, 另取香草酸、异香草酸对照品配制成 1 mg/mL 的对照品溶液。按照《中国药典》2010 版一部附录 VIB 中薄层色谱法试验方法, 将香草酸、异香草酸对照品溶液与供试品溶液点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 正己烷-氯仿-冰乙酸(10:5:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干。

2.2 含量测定

2.2.1 检测波长的选择

经对香草酸对照品溶液进行紫外扫描, 发现在 260 nm 处有最大吸收峰。因此选择 260 nm 作为检测波长。

2.2.2 对照品溶液的制备

精密称取香草酸对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 16.3 μg 的溶液 1; 将对照品配制成香草酸(每 1 mL 约含 15 μg) 和异香草酸(每 1 mL 约含 10 μg) 的混合溶液 2。

2.2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末 2.5 g, 精密称定, 置具塞磨口锥形瓶中, 加入 0.1 N HCl 1 mL, 乙酸乙酯 20 mL, 超声 50 min, 过滤, 置水浴挥干溶剂, 残渣加 5 mL 甲醇使溶解, 滤过, 取滤液过 0.45 μm 的微孔滤膜, 所得滤液作为供试品溶液 1; 称取样品 2.5 g, 用 20 mL 甲醇超声 30 min, 滤过, 取滤液过 0.45 μm 的微孔滤膜, 所得滤液作为供试品溶液 2。

2.2.4 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C₁₈(250 mm × 4.60 mm, 5 μm) 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇-水-冰乙酸 = 25:75:0.5 流速: 1.0 mL · min⁻¹ 检测波长: 260 nm。

测定法: 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 进行含量测定。

2.2.5 线性关系考察

精密吸取香草酸对照品溶液适量, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇至刻度, 使对照品浓度分别达到 1.022、2.044、4.088、8.176、16.352 μg/mL, 再精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 依法测定, 以峰面积为纵坐标, 香草酸浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

2.2.6 精密度考察

取同一对照品, 分别重复进样 5 次, 测定香草酸的含量。

2.2.7 重复性试验

取本品 6 份, 精密称定样品, 按[样品含量测定]项下的方法操作, 制成供试品溶液, 测定香草酸

的含量。

2.2.8 稳定性试验

将配置好的供试品溶液在室温下放置, 分别于 0、2、4、8、12 h 测定香草酸的含量。

2.2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品共 6 份, 分别加入等量香草酸对照品, 照供试品方法制备, 测定香草酸的含量。

2.2.10 川楝子中香草酸的含量测定

按 2.2.3 项下方法, 将三批不同批次川楝子药材制备供试品溶液, 并测定其香草酸的含量。

3 实验结果

3.1 薄层色谱鉴别结果

(UF254 + UF360 下观察) 在与对照品色谱相应的位置显相同斑点。见图 1。(香草酸 R_f 值 0.62, 异香草酸 R_f 值 0.5)



图 1 川楝子的 TLC

Fig. 1 Thin layer chromatography of toosendan fruit

1. 香草酸对照品 2. 供试品 3. 异香草酸对照品

1. the standard of vanillic acid 2. sample 3. the standard of iso-vanillic acid

3.2 高效液相色谱测定结果

本实验对提取溶剂进行了考察, 比较了甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯、酸性乙酸乙酯、冰乙酸-水的提取效果, 用酸性乙酸乙酯作为提取溶剂时, 杂质少, 峰面积较大, 香草酸提取量也较完全, 同时塔板数与分离度也处于较高水平, 因此本实验采用酸性乙酸乙酯进行提取。

本实验还对超声提取时间进行了考察, 比较了 10、20、30、40、50 min 与 60 min 的超声提取效果, 发现前 50 分钟内, 香草酸含量随超声时间延长而增长, 且在 50 min 时, 香草酸的含量达到顶点, 若超声 60 min, 香草酸含量反而降低。因此本实验的样品超声提取时间采用 50 min。

3.2.1 对照品溶液的 HPLC 图谱分别见图 2 和图 3

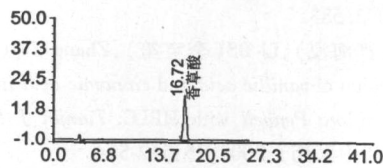


图2 香草酸对照品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of standard vanillic acid

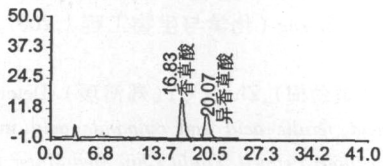


图3 香草酸和异香草酸对照品 HPLC

Fig. 3 HPLC of standard vanillic acid and iso-vanillic acid

3.2.2 供试品溶液的 HPLC 图谱分别见图4 和图5

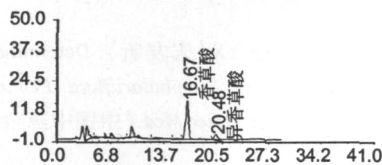


图4 川楝子样品1的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of toosendan fruit (NO. 1)

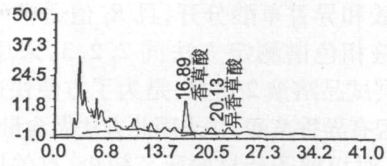


图4 川楝子样品2的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of toosendan fruit (NO. 2)

3.2.3 线性关系考察

线性回归方程: $A = 51035C + 19875$, $r = 0.9998$ 。结果表明: 香草酸在 $1.022 \sim 16.352 \mu\text{g}$ 范围内具有良好的线性关系。

3.2.4 精密度考察

对照品溶液中香草酸 $RSD = 0.80\%$ ($n = 5$)。

3.2.5 重复性试验

平均含量为 28.14 mg/g , RSD 为 1.30% 。

3.2.6 稳定性试验

结果样品溶液在 12 h 内基本稳定, RSD 为 1.15% 。

3.2.7 加样回收率试验

香草酸平均回收率为 102.45% , $RSD = 1.22\%$ ($n = 6$) 结果见表1。

表1 香草酸回收率实验结果

Table 1 The result of the experiment about recovery

取样量 Sample weight (g)	样品中香草酸的量 Quantity of vanillic acid in sample (μg)	加入香草酸对照品量 Quantity of vanillic acid added (μg)	实测值 Measured value (μg)	回收率 Recovery (%)
1.2524	35.2476	15	50.6302	102.55
1.2582	35.4109	15	50.8422	102.88
1.2537	35.2842	15	50.5719	101.92
1.2557	35.3405	15	50.7912	103.00
1.2547	35.3124	15	50.3579	100.35
1.2594	35.4446	15	51.0474	102.55

$X = 102.45\%$ $RSD = 1.22\%$

3.2.8 川楝子中香草酸的含量测定测定结果见表2。

表2 川楝子中香草酸的含量测定结果

Table 2 The result of content determination of vanillic acid in *Melia toosendan* Sieb.

批次 No.	川楝子中香草酸含量 Contents of vanillic acid ($\mu\text{g/g}$)	平均百分含量 Average content (%)
1	35.171	0.0034
2	33.184	
3	33.840	

4 讨论

4.1 实验中采用香草酸对照品溶液进行紫外扫描,发现 260 nm 有最大的吸收峰,故采用 260 nm 作为本实验的检测波长。

4.2 对异香草酸进行了薄层色谱和高效液相色谱定性鉴别。

薄层色谱鉴别,用不同的展开剂进行摸索后确定展开剂为: 正己烷-氯仿-冰乙酸 ($10:5:1$),能较好

的将香草酸和异香草酸分开,且 R_f 值适中。

高效液相色谱测定方法同 2.2.3,采用对照品溶液 2 和供试品溶液 2 进样,是为了方便快速的鉴别样品中是否有异香草酸,并未用此方法做含量测定。

目前,对川楝子药材的研究较少,有关川楝子中香草酸定量方面的研究还未见报道,本试验建立了川楝子药材中的香草酸的薄层鉴别及含量测定方法,且方法简单可行,重复性好,结果准确可靠,为进一步开发利用川楝子药材提供参考。

参考文献

- National Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中国药典), Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010. Vol. I: 39-40.
- Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Dictionary of Chinese Materia Medica(中药大辞典). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1975. 232-234.
- Shi YL(施玉梁), Wang WP(王文萍). Biological effects of *Toosendanin*, an active ingredient of herbal vermifuge in Chinese traditional medicine. *Acta Phys Sin*(生理学报) 2006, 58: 397-406.
- Sun J(孙建), Zhou HL(周洪雷). Clinical application of *Toosendanin*. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*(辽宁中医药大学学报) 2008, 1(10): 27-28.
- Sun WJ(孙文基), Sheng JF(绳金房). The handbook of the active components in Natural Medicine(天然活性成分简明手册). Beijing: Chinese Medicine Technical Publishing House 2002. 583.
- Yan HH(严海泓), Li BS(李宝笙), Zhang YQ(张雅茜). Determination of *vanillic acid* and *cinnamic acid* in *Picrorhiza Scrophulariiflora* Pennell with HPLC. *Tianjin J Tradit Chin Med*(天津中医药) 2008, 25: 512-514.
- Yin DZ(尹德忠), Zhao HX(赵红侠), Liu JX(刘建勋). Simultaneous determination of *vanillic acid*, *ferulic acid* and *cinnamic acid* in *Picrorhiza Scrophulariiflora* Pennell by HPLC. *Chem Bioeng*(化学与生物工程) 2007, 24(10): 75-76.
- Huang JM(黄劲梅), Zheng QY(郑清媛). Determination of *vanillic acid*, *ferulic acid* and *cinnamic acid* in *Picrorhiza Scrophulariiflora* Pennell. *Tradit Chin Med Mater*(中药材), 2002, 25: 881-882.
- Wang YQ(王玉秀), Wang YB(王玉璧). Determination of *vanillic acid* and *cinnamic acid* in *Picrorhiza Scrophulariiflora* Pennell by TLC scanning. *China New Med*(中国新医药), 2004, 3: 114-115.
- Yu JB(虞金宝), Song YX(宋友昕). Determination of *vanillic acid* in *Picrorhiza Scrophulariiflora* Pennell by TLC scanning. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 1999, 24: 102-103.
- Cao YH(曹玉华), Wang Y(汪云). The determination of *vanillic acid* and *ferulic acid* in rhizoma *Picrorhiza* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Instr Anal*(分析测试学报) 2003, 22(6): 95-97.
- Xie F(谢帆), Zhang M(张勉), Zhang CF(张朝凤) et al. Studies on chemical constituents in fruit of *Melia toosendan*. *Chin Pharm J*(中国药学杂志) 2008, 43: 1060-1069.
- Zhang T(张婷), Liang YZ(梁逸曾), Zhao CX(赵晨曦) et al. Prediction of temperature-programmed retention indices from molecule structures. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2006, 34: 1607-1610.
- Guan YY(官艳丽), Dawa ZM(达娃卓玛), Gesang SL(格桑索朗) et al. Study on essential oil from flowers of *Mecynopsis integrifolia*. *Chin Pharm J*(中国中药杂志) 2007, 42: 539-540.
- Hall LH, Kier LB. Electrotopological state index for atom types: a novel combination of electronic, topological, and valence state information. *J Chem Inf Comput Sci*, 1995, 35: 1039-1045.
- Liu SS, Yin CS, Cai SX et al. Molecular structural vector description and retention index of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Intell* 2002, 61: 3-15.
- Sun LL, Zhou Y, Li GR et al. Molecular electronegativity-distance vector (MEDV-4): a two-dimensional QSAR method for the estimation and prediction of biological activities of estradiol derivatives. *J Mol St-Th* 2004, 679: 107-113.
- Zhou Y, Sun LL, Mei H et al. Estimation and prediction of relative retention indices of polychlorinated naphthalenes in GC with molecular electronegativity distance vector. *Chromatographia* 2006, 64: 565-570.
- Liao LM, Mei H, Li JF et al. Estimation and prediction on retention times of components from essential oil of *Paulownia tomentosa* flowers by molecular electronegativity-distance vector (MEDV). *J Mol St-Th* 2008, 850: 1-8.
- Sutter JM, Peterson TA, Juts PC. Prediction of gas chromatographic retention indices of alkylbenzenes. *Anal Chim Acta*, 1997, 342: 113-122.
- Liao LM(廖立敏), Mei H(梅虎), Li JF(李建凤) et al. Prediction on retention times of components from essential oil of *Tilia mongolica* leaves by H-MEDV. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2008, 20: 47-51.

(上接第 1094 页)