

文章编号 1000-5269(2013)04-0050-04

# 高效液相色谱法测定马尾松松针中莽草酸的含量

程兰香<sup>1,2</sup>, 周文美<sup>1,2,\*</sup>, 赵辰路<sup>1,2</sup>, 张建敏<sup>1,2</sup>

(1. 贵州大学 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 化学与化工学院, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 采用高效液相色谱法对马尾松松针中的莽草酸进行含量测定。马尾松松针原料以蒸馏水为提取溶剂加热回流进行提取得样品供试液。色谱条件为: Shodex Asahipak NH<sub>2</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱; 乙腈-2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (80:20); 流速 0.8 mL/min; 测定波长 213 nm, 柱温 40 °C。结果表明, 线性范围为 4.08-24.48 μg/mL ( $r^2=0.9997$ ), 平均回收率为 97.92%, RSD 为 1.230% (n=9)。莽草酸的保留时间约为 5.85 min, 含量为 3.20%。此方法准确、简便, 适用于马尾松松针中莽草酸的定量分析。

**关键词:** 马尾松松针; 莽草酸; 高效液相色谱; 含量

中图分类号: TS202.1 文献标识码: A

马尾松属松科植物, 是我国特产的乡土树种, 松针是松属植物的代表性药用部位, 是一种再生速度快、可一年四季采收、可持续利用的天然再生资源。松针中含有丰富的黄酮、木脂素、莽草酸等活性物质及丰富的 Ca、P、Mn 等矿物质<sup>[1]</sup>。

莽草酸分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, 是一种白色精细粉末, 易溶于水, 气味辛酸。莽草酸有着非常重要的药理作用, 它能抗炎、镇痛、是抗病毒和抗癌药物中间体, 是可有效对付致命 H5N1 型禽流感病毒的药物“达菲”的重要成分。获得莽草酸的途径主要有两种: 微生物发酵和从天然植物中提取, 也可用化学方法合成<sup>[2]</sup>。目前莽草酸主要从野生八角茴香中提取得到<sup>[3]</sup>, 但是八角茴香资源有限, 需要寻求新的资源来满足市场。马尾松松针中含有莽草酸, 陈晓熠等<sup>[4]</sup>人采用高效液相色谱法分析马尾松松针中莽草酸的含量为 5.71%。为了充分利用其资源, 本实验采用 HPLC 法测定马尾松松针中莽草酸的含量, 为有针对性的开发利用我国各地丰富的马尾松资源中的莽草酸提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪: 日本岛津公司; RE-52 旋转型蒸发仪: 上海亚荣生化仪器厂; 电子天平 FA2004N: 上海菁海仪器有限公司;

SHZ-III 循环水式真空泵: 上海亚荣生化仪器厂; 电动离心机: 常州澳华仪器有限公司。

### 1.2 试剂与原料

莽草酸对照品(贵州迪大生物有限公司 纯度 ≥ 98%); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为国产分析纯。马尾松松针样品, 采集于贵州省贵阳市花溪区。

### 1.3 对照品储备液的制备

精密称取干燥至恒重的莽草酸对照品 5.1 mg, 置于 50 mL 容量瓶中用超纯水溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 0.102 mg/mL 的对照品储备液。

### 1.4 样品供试液的制备

通过单因素试验, 可以得出最佳的提取工艺条件: 马尾松松针粉碎过 40 目筛(0.42 mm), 料液比 1:25, 85 °C 下回流提取 2 h。

精密称取已干燥粉碎(过 40 目筛)的马尾松松针样品 2.0000 g 于圆底烧瓶中, 加入 50 mL 蒸馏水 85 °C 下回流提取 2 h。提取液过滤, 离心, 在减压水浴装置下浓缩, 将浓缩液倒入 100 mL 容量瓶中用超纯水定容至刻度。从容量瓶中移取 1 mL 提取液于 25 mL 容量瓶中用超纯水定容至刻度, 临用前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

莽草酸含量(%) = 提取液中莽草酸的质量 / 松针的质量 × 100%。

\* 收稿日期: 2013-06-12

基金项目: 贵州省科技厅重大专项(黔科合重大专项字[2012]601-5号)

作者简介: 程兰香(1985-), 女, 山东菏泽人, 在读硕士研究生, 研究方向为: 食品资源利用, Email: chenglx325@163.com.

\* 通讯作者: 周文美, Email: zwm45@126.com.

### 1.5 色谱条件

岛津 LC-10Avp 型高效液相色谱仪, SPD-10Avp 检测器。色谱柱: Shodex Asahipak NH<sub>2</sub> (5 μm 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 乙腈 - 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (80: 20); 流速: 0.8 mL/min; 测定波长 213 nm 柱温 40 °C; 对照品溶液和供试品溶液分别进样 20 μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的制作

精密量取莽草酸对照品储备液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 mL 分别置 10 mL 容量瓶中, 加入超纯水稀释至刻度, 摇匀, 得系列质量浓度的对照品溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤待用。分别精密吸取莽草酸对照品溶液 20 μL 注入色谱仪, 测得峰面积。以对照品峰面积 (y) 对浓度 (x, μg/mL) 进行线性回归分析。求出回归方程:  $y = 63316x + 20511$ ,  $r^2 = 0.9997$ , 在 4.08 ~ 24.48 μg/mL 的范围内, 莽草酸浓度 x 对峰面积 y 有良好的线性关系。

### 2.2 精密度试验

精密吸取莽草酸对照品溶液 (4.08 μg/mL) 20 μL, 重复进样 5 次, 测定色谱峰峰面积并从回归方程中换算出莽草酸含量 (%), 其 RSD 为 1.016%, 符合分析要求。结果见表 1。

表 1 精密度试验结果

试验号	保留时间/s	峰面积	莽草酸含量/%	平均值/%	RSD/%
1	5.870	268834	0.490		
2	5.858	267580	0.488		
3	5.854	270014	0.493	0.487	1.016
4	5.858	264937	0.483		
5	5.853	263969	0.481		

### 2.3 重复性试验

同取马尾松松针粉末 (过 40 目) 2.0 g, 按样品测定法重复测定 5 次, 测得莽草酸含量平均值为 3.180%, RSD 为 1.546%, 符合要求。结果见表 2。

表 2 重复性试验结果

试验号	保留时间/s	峰面积	莽草酸含量/%	平均值/%	RSD/%
1	5.855	1605264	3.129		
2	5.858	1654504	3.226		
3	5.872	1623195	3.164	3.180	1.546
4	5.869	1659949	3.237		
5	5.869	1611828	3.142		

### 2.4 稳定性试验

取松针供试液, 在“1.5”项色谱条件下, 于 0, 4, 8, 12 h 分别测定莽草酸峰面积, 计算峰面积的 RSD 为 1.122%, 表明样品供试液在 12 h 内稳定性良好。

### 2.5 加样回收试验

精密称取已知含量的马尾松松针粉末约 2.0 g, 共 9 份, 分别精密加入一定量的莽草酸对照品, 按样品供试液制备及测定法操作, 分别进行色谱分析, 其平均回收率为 97.92%, RSD 为 1.230%, 符合分析要求。结果见表 3。

表 3 加样回收率试验结果

试验号	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	64.032	1.35	65.359	98.30		
2	64.038	1.35	65.354	97.48		
3	64.029	1.35	65.332	96.52		
4	64.042	1.65	65.673	98.85		
5	64.048	1.65	65.664	97.94	97.92	1.230
6	64.022	1.65	65.650	98.67		
7	64.058	1.95	65.988	98.97		
8	64.035	1.95	65.898	95.54		
9	64.032	1.95	65.962	98.97		

### 2.6 样品测定

按照“1.4”项方法制备样品试液, 连续平行测定三次, 精密吸取样品供试液 20 μL, 莽草酸对照品 20 μL, 分别进入高效液相色谱仪, 测定。结果马尾松松针中莽草酸含量为 3.20%。见图 1(A、B)。

## 3 讨论

### 3.1 样品供试液制备方法的选择

试验中分别对比了超声提取、加热回流、索氏提取等方法的提取效果, 其中索氏提取效率最高, 但是装配比较麻烦, 也最为费时。超声波提取效果微优于热回流提取, 但它们之间的差别不是很大。超声波提取的提取成本比较高不便于推广, 也不便于大规模的运行。所以在实际生产操作中我们采用加热回流提取效果较好, 而且操作简单, 成本较低。

### 3.2 样品中莽草酸提取工艺的优化

以蒸馏水为提取溶剂, 通过单因素实验对时间 (15、30、60、90、120、150 min), 提取温度 (45、55、65、75、85、95 °C)、料液比 (1:10、1:15、1:20、1:25、1:35) 和原料粒度 (20、40、60、80、100、120 目) 四个

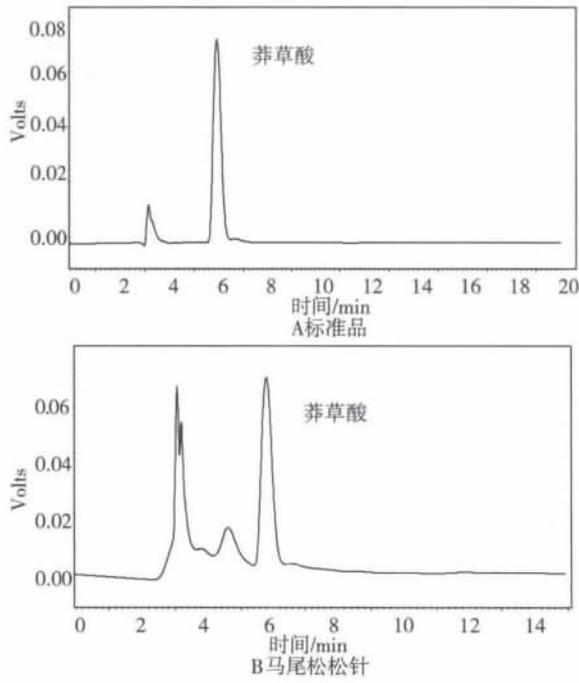


图 1 标准品与样品 HPLC 色谱图

因素对莽草酸得率的影响进行研究,得出最佳提取条件为:马尾松松针粉碎过 40 目筛(0.42 mm),料液比 1:25,85 ℃ 下回流提取 2 h.

### 3.3 流动相比比例的选择

用乙腈-2%  $H_3PO_4$  多种比例进行试验,结果以流动相乙腈-2%  $H_3PO_4$  = 80:20(V/V)的比例,各组分离为最好,保留时间短。如果乙腈的比例过大,主峰与杂质峰分离不理想,并且出峰时间过长,如果磷酸比例过大,流动相酸性过强会影响液相色谱仪寿命。

### 3.4 流动相流速与柱温的选择

本试验结合莽草酸色谱峰的保留时间、与杂峰的分离度和柱压等因素,选用 0.8 mL/min 的流速。该试验在柱温为 15-50 ℃ 范围内对莽草酸进行检测,通过观察保留时间的再现性以及查阅相关资料,在柱温为 40 ℃ 时,主峰与杂质峰分离最好,故选择柱温为 40 ℃。

## 4 结论

采用蒸馏水作为提取溶剂,提取效果好,无有机溶剂残留,安全、环保、成本低。采用 HPLC 法测定马尾松松针中莽草酸的含量,该方法准确性、精密度和重复性良好,为测定松针及其他天然植物中莽草酸的含量提供参考。目前莽草酸主要来源于八角属植物八角茴香的果实中,但是资源有限,而且受季节性限制,成本较高,无法满足市场需求。马尾松松针资源丰富,且一年四季都可采集,经测定马尾松松针中的莽草酸含量为 3.20%,可以作为提取莽草酸的新原料。

### 参考文献:

- [1] 陈英,刘成国,赵毓芝,等. 松针功能性成分及应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(10): 5994-5996.
- [2] Hiroki Ohiraa<sup>a</sup>, Naota Torii<sup>a</sup>, Taku M. Aida<sup>a</sup>, et al. Rapid separation of shikimic acid from Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) with hot water extraction [J]. Separation and Purification Technology, 2009, (69): 102-108.
- [3] 张中朋. 八角茴香、莽草酸生产市场概况[J]. 中国现代中药, 2006, 8(4): 41-42.
- [4] 陈晓熠,袁利,王敏,等. 马尾松、侧柏和八角茴香中的莽草酸含量分析[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(5): 1238-1240.
- [5] 粟本超. 广西柳州产马尾松松针中莽草酸含量测定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(21): 12933-12935.
- [6] 刘永友,廖晓峰,于荣. 八角茴香中莽草酸的提取工艺研究[J]. 食品工艺, 2008, 29(5): 88-93.
- [7] 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): 943-947.
- [8] ZELAYA I, JENNIFERA H A, MICHEALD K O, et al. Evaluation of Spectrophotometric and HPLC Methods for Shikimic Acid Determination in Plants: Models in Glyphosate-Resistant and -Susceptible Crops [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, (59): 2202-2212.

(责任编辑:王先桃)

## Determination of Shikimic Acid in Leaves of *Pinus massoniana* by High Performance Liquid Chromatography

CHENG Lan-xiang<sup>1,2</sup> ZHOU Wen-mei<sup>1,2,\*</sup> ZHAO Chen-lu<sup>1,2</sup> ZHANG Jian-min<sup>1,2</sup>

(1. Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** The quantitative determination of shikimic acid in leaves of *pinus massoniana* was studied by high performance liquid chromatography. Sample solution of *pinus massoniana* materials was extracted by heating reflux with distilled water. The chromatographic conditions: the separation column, Shodex Asahipak NH2(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  250 mm); mobile phase, acetonitrile - 2% H3P04(80:20); the flowing velocity 0.8 mL/min; the testing wavelength, 213 nm; and the temperature of column 40°C. The results show that, the linear range of the shikimic acid was in 4.08 ~ 24.48  $\mu\text{g/mL}$ ( $R^2 = 0.9997$ ), the average collection was 97.92%, RSD was 1.230% ( $n = 9$ ). The retention time of Shikimic acid was 5.85 min; the average content of shikimic acid in leaf of pine needle was 3.20%. This method is accurate, simple and suitable for quantitative analysis of shikimic acid in leaves of *pinus massoniana*.

**Key words:** leaves of *pinus massoniana*; shikimic acid; high performance liquid chromatography; content

(上接第39页)

## REE Geochemical Characteristics in Dingtai Ni-Mo Deposit in Zunyi, and Their Geological Significance

ZHANG Mei-jiang<sup>1\*</sup>, LI Ming-qin<sup>2</sup>, DENG Xu-sheng<sup>2</sup>, ZHANG Shuang-ju<sup>3</sup>, TAN Yue<sup>1</sup>

(1. Guizhou Academy of Geology Survey, Guiyang 550005, China;

2. College of Resources and Environmental Engineering, Guizhou University, Guiyang 550003, China;

3. College of Resources and Environmental Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China)

**Abstract:** Samples were systematically collected and REE contents of ore and rock in ore roof and foot-wall were analyzed in Dingtai Ni-Mo deposit in Zunyi. REE geochemical characteristics were distinguished, i.e.,  $\Sigma\text{REE}$  contents are large change,  $\Sigma\text{LREE}$  and  $\Sigma\text{HREE}$  are abundant, fractionation degree are not obvious,  $\delta\text{Ce} = 0.54 \sim 0.79$  (0.68 on average),  $\delta\text{Eu} = 1.02 \sim 2.61$  (1.45 on average);  $\text{La/Ce} = 0.60 \sim 0.93$ . REE geochemical characteristics suggest that Dingtai Ni-Mo deposit were deposited in hot seawater sediments under reduction environment with dry climate. The graph of  $\Sigma\text{REE-La/Yb}$  suggests that mineralizing material have many origins.

**Key words:** Ni-Mo deposit; REE geochemistry; Dingtai area in Zunyi; Guizhou

论文降重，论文修改，论文代写加微信:18086619247或QQ:516639237

论文免费查重，论文格式一键规范，参考文献规范扫二维码：



相关推荐：

[高效液相色谱法测定啉啉磺草胺的含量](#)

[高效液相色谱法测定杀虫磺含量](#)

[高效液相色谱法测定松针软膏中的 \$\beta\$ -胡萝卜素含量](#)

[高效液相色谱法测定松针中莽草酸的含量](#)

[高效液相色谱法测定纽甜的含量](#)

[高效液相色谱法测定大黄酸的含量](#)

[高效液相色谱法测定马尾松松针中莽草酸的含量](#)

[高效液相色谱法测定华山松中莽草酸的含量](#)

[高效液相色谱法测定阿司匹林含量](#)

[高效液相色谱法测定1,2-丙二胺含量](#)