

- Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2002, 16(3): 172-175.
- [7] YE J F, DUAN H L, YANG X M, et al. Anti-thrombosis effect of paeoniflorin: Evaluated in a photochemical reaction thrombosis model *in vivo* [J]. *Planta Med*, 2001, 67(8): 766-767.
- [8] WANG D, LIU Q Y. Study on optimization of preparation of total peony glycoside [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2006, 28(9): 1380-1383.
- [9] ZHOU L. Study on extracti on separation and purification of total peony glycoside [J]. *Food Sci Technol(食品科技)*, 2008, 8(9): 152-154.
- [10] LEMMICH J. Monoterpene and coumarin glucosides of *Cnidium silaifolium* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(5): 1337-1340.
- [11] WANG Y Z, FENG W S, SHI R B, et al. Monoterpenoids constituents of *Radix Paeoniae Rubra* [J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2008, 43(9): 669-671.
- [12] HU J, ZHOU Y H. Application of macroporous resin in the purification of Chinese herbs [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2002, 24(2): 127-130.

收稿日期: 2010-09-09

雪松松针中莽草酸的分离及其纯度检查

刘东彦^{1,2}, 石晓峰^{1*}, 李冲², 王东东², 范彬¹, 沈薇¹, 马趣环¹ (1.甘肃省医学科学研究院, 兰州 730050; 2.兰州大学药学院, 兰州 730030)

摘要: 目的 从雪松松针中提取分离莽草酸并进行纯度检查。方法 采用水提、萃取、柱层析、重结晶等步骤分离纯化莽草酸,用 NMR 和理化性质鉴定其结构,再采用 TLC 和 HPLC 对其纯度进行检查。结果 分离得到的莽草酸纯度达 95% 以上,得率为 0.72%。结论 该法简便经济、合理可行,可用于雪松松针中莽草酸的提取分离。

关键词: 雪松松针; 莽草酸; 分离; 纯度检查

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)07-0637-04

Separation of Shikimic Acid from Pine Needles of *Cedrus Deodara* and Its Purity Determination

LIU Dongyan^{1,2}, SHI Xiaofeng^{1*}, LI Chong², WANG Dongdong², FAN Bin¹, SHEN Wei¹, MA Quhuan¹ (1. Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China; 2. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To separate shikimic acid from pine needles of *Cedrus deodara* and determine its purity. **METHODS** Shikimic acid was separated by process of water extraction, solvent extraction, silica gel column chromatography, recrystallizing etc. Its structure was identified on the basis of NMR analysis and chemical evidence and its purity was determined by TLC and HPLC. **RESULTS** The purity of shikimic acid was more than 95% and the total yield was 0.72%. **CONCLUSION** The method is convenient and reasonable, it can be used to separate the shikimic acid from pine needles of *Cedrus deodara*.

KEY WORDS: pine needles of *Cedrus deodara*; shikimic acid; separate; purity determination

莽草酸(shikimic acid), 化学名为 3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-羧酸, 分子式 $C_7H_{10}O_5$, 分子量 174.15, 化学结构见图 1。莽草酸是抗禽流感药物磷酸奥司米韦(oseltamivir phosphate, 商品名达菲)及抗肿瘤药物二恶霉素、乙二醛酶抑制剂等的合成原料, 其主要来源为木兰科八角属八角茴香^[1], 虽然从其成熟果实中提取分离莽草酸的收率很高, 但成本也高^[2]。雪松 *Cedrus deodara* (Roxb) G. Don 是松科 *Pianaceae* 植物雪松属 *Cedrus Trew* 树种的泛称,

资源丰富, 其针叶主要用于松叶胶的提取^[3-4]。为开发利用雪松松针, 本实验对雪松针叶中莽草酸的分离方法进行了初步探索, 以期能为莽草酸生产企业的原料选择提供参考。

1 仪器与材料

Varian INOVA-400MHz核磁共振仪(TMS内标, 美国瓦里安公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); R-200型旋转蒸发器(瑞士 BÜCHI公司); AE260型万分之一电子天平(瑞士

基金项目: 甘肃省技术与专项计划项目(0709TCYA022); 甘肃省卫生厅科研计划项目(WST07-02)

作者简介: 刘东彦, 女, 硕士生 Tel: 13919191634 E-mail: liudongy04@lzu.cn *通信作者: 石晓峰, 男, 主任药师、教授, 硕导
Tel: (0931)2615440 E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

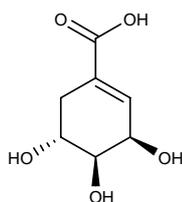


图1 莽草酸的结构

Fig 1 The structure of shikimic acid

Mettler 公司); CP225D 型十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司); FP-62 型熔点测定仪(温度未校正, 瑞士 Mettler 公司)。

莽草酸对照品(云南昆明科翔生物科技有限公司, 经 HPLC 测定其纯度>98%); 薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄、柱色谱用硅胶(100~140 目)均为青岛海洋化工厂出品; 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

雪松松针采自兰州市市区, 经甘肃省医学科学院何福江研究员鉴定为雪松属植物雪松 *Cedrus deodara* 的针叶。

2 方法与结果

2.1 莽草酸的提取分离

新鲜雪松松针置阴凉处晾干, 得到干燥的雪松松针。称取干燥雪松松针 100 g, 加 16 倍量的水煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 合并水提液, 常压浓缩至 400 mL, 依次用石油醚、乙酸乙酯萃取, 得石油醚萃取液和乙酸乙酯萃取液, 前者它用, 后者经减压浓缩得乙酸乙酯浸膏 3.15 g, 用 5 g 硅胶拌样, 装柱, 乙酸乙酯淋洗, TLC 鉴识, 合并相同流分, 减压浓缩, 析出浅红色无定形粉末, 过滤, 用乙酸乙酯-甲醇(5:1)重结晶, 得白色无定形粉末 0.7175 g, 莽草酸得率以雪松松针的重量计为 0.72%。

2.2 莽草酸的结构鉴定

白色无定形粉末(乙酸乙酯-甲醇), mp: 189~190 °C, 紫外灯($\lambda_{254\text{ nm}}$)下显淡紫色荧光, 10%浓 H₂SO₄-EtOH 显粉红色。由 NMR 和 DEPT 数据推断其分子式为 C₇H₁₀O₅, ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 2.11(1H, m, 6-H_b), 2.62(1H, m, 6-H_a), 3.66(1H, m, 5-H), 3.98(1H, m, 4-H), 4.37(1H, m, 3-H), 6.79(1H, m, 2-H); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 31.6(C-6), 67.3(C-5), 68.4(C-4), 72.7(C-3), 130.7(C-1), 138.8(C-2), 170.0(C=O)。结合文献^[5]证实该提纯后的产物即为目标产物莽草酸。

2.3 莽草酸的纯度检查

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取莽草酸对照品 5 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 配制成浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的对照品储备溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取本室分离纯化得到的 3 批莽草酸适量, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 分别配制成浓度为 11.72, 12.48, 15.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3.3 薄层色谱法 取硅胶 GF₂₅₄ 薄层板 3 块, 每块板上均点有上述对照品和供试品溶液(20, 40, 60, 80 μL), 分别用 3 种展开剂系统[系统 1: 二氯甲烷-甲醇-甲酸(10:2:0.08); 系统 2: 二氯甲烷-丙酮-甲酸(4:7:0.12); 系统 3: 石油醚-丙酮-甲酸(3:8:0.12)] 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯 254 nm 下观察, 薄层色谱相同位置均显深紫色荧光, 无杂质斑点出现, 说明样品纯度较高。薄层色谱图见图 2。

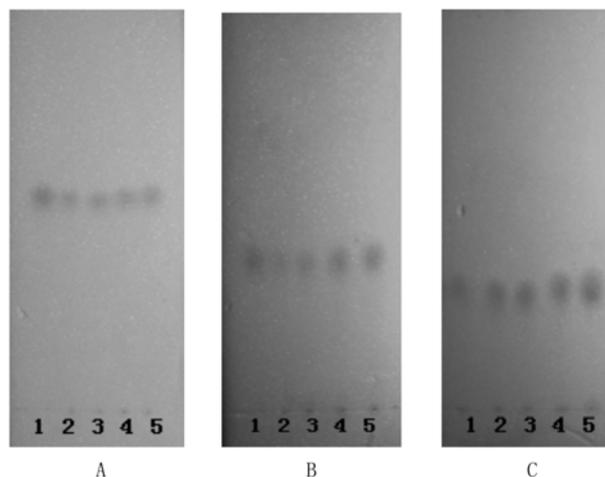


图2 莽草酸的薄层色谱图

A-薄层层析系统 1; B-薄层层析系统 2; C-薄层层析系统 3; 1-对照品; 2~5-不同体积的供试品(20, 40, 60, 80 μL)

Fig 2 TLC of shikimic acid

A-TLC of system 1; B-TLC of system 2; C-TLC of system 3; 1-reference standard; 2-5-different volume sample(20, 40, 60, 80 μL)

2.3.4 高效液相色谱法

2.3.4.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex-ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸溶液(pH 3)-甲醇(90:10); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 217 nm; 柱温: 30 °C。

2.3.4.2 系统适用性试验 分别精密吸取上述溶液各 20 μL , 注入液相色谱仪, 在上述色谱条件下测定, 结果样品中莽草酸色谱峰的保留时间均为 2.3 min, 该峰与其相邻色谱峰的分离度>1.5; 理论板数以莽草酸计 ≥ 5000 。色谱图见图 3。

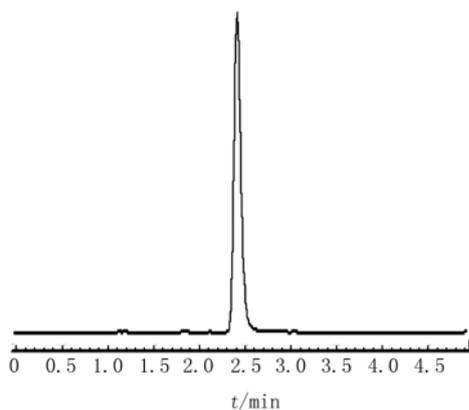


图3 莽草酸供试品的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of sample

2.3.4.3 标准曲线的绘制 分别精密吸取浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 莽草酸对照品溶液 $0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 \text{ mL}$, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相定容, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 分别进样 $20 \mu\text{L}$, 以峰面积(Y)为纵坐标, 莽草酸浓度(X)为横坐标进行线性回归, 得回归方程: $Y=35.725X+34.034$, $r=0.9999$ 。结果表明: 莽草酸在 $1\sim 25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性关系。

2.3.4.4 精密度试验 精密吸取莽草酸对照品溶液($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $20 \mu\text{L}$, 重复进样6次, 莽草酸峰面积的RSD为1.3%, 表明精密度良好。

2.3.4.5 稳定性试验 精密称取同一批雪松松针的干燥粉末(过40目筛), 按“2.3.2”项下方法处理, 于 $0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 \text{ h}$ 分别进样 $20 \mu\text{L}$, 测定峰面积。结果莽草酸峰面积的RSD为0.83%, 表明供试品在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4.6 重复性试验 精密称取同一批雪松松针的干燥粉末(过40目筛)7份, 按“2.3.2”项下方法处理, 进样测定, 测得莽草酸含量的RSD为0.386%, 表明该方法重复性较好。

2.3.4.7 加样回收率试验 精密称取已知含量为3.65%的雪松松针的干燥粉末(过40目筛)9份, 分别加入莽草酸对照品适量, 置具塞锥形瓶中, 加入 7.5 mL 水, 于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 超声处理 30 min , 放至室温, 定容至 10 mL 。精密量取上述溶液 1.0 mL , 置 25 mL 量瓶中, 流动相定容, 作为供试品溶液。依法测定, 计算, 结果莽草酸的回收率为97.9%, RSD为1.43%。见表1。

2.3.4.8 样品纯度测定 取3批莽草酸样品, 每批样品平行3份, 按“2.3.2”项下方法处理, 进样测定, 计算莽草酸纯度的标示量。结果见表2。

3 讨论

在色谱条件相同情况下, 对莽草酸检测波长

表1 回收率试验结果($n=9$)

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

称样量/g	已知量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.10100	3.69	2.92	6.53	97.3		
0.09990	3.65	2.92	6.54	99.1		
0.09939	3.63	2.92	6.43	96.0		
0.09986	3.64	3.65	7.27	99.6		
0.10190	3.68	3.65	7.27	98.2	97.9	1.43
0.10020	3.66	3.65	7.20	97.1		
0.09912	3.62	4.38	8.01	100.2		
0.10040	3.67	4.38	7.91	96.8		
0.09803	3.58	4.38	7.84	97.3		

表2 莽草酸的纯度测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of purity determination of shikimic acid ($n=3$)

批号	纯度/%
2010126	98.5
2010503	95.2
2010710	97.9

进行了选择, 分别于 $210, 214, 217, 220 \text{ nm}$ 波长处测定莽草酸, 结果在 217 nm 处峰对称性好、分离度高、灵敏度较高, 故以 217 nm 作为检测波长。

文献[6]报道雪松松针和枝条中莽草酸的含量分别为3.9%, 1.5%, 笔者也曾通过大孔吸附树脂Diaion HP-20柱和Toyopearl HW-40柱色谱从雪松松针的正丁醇萃取物分离得到莽草酸^[7]。由于雪松松针资源丰富, 适当采摘枝叶对树木的生长没有影响, 从中提取纯化莽草酸可变废为宝, 且枝叶煎煮后的残渣可直接回田作绿肥, 对环境无影响。

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10.47%^[8], 但八角茴香价格十分昂贵。雪松原料易得。本方法采取水提、溶剂萃取、硅胶柱淋洗、重结晶4步得到纯度达95%以上的莽草酸, 用于雪松松针中莽草酸的提取分离, 其生产成本十分低廉。

REFERENCES

- [1] LI W, YANG X. The progress in research on star anise (*illicium verum* Hook.F.) and its extract shikimic acid [J]. China Condiment(江苏调味副食品), 2007, 24(3): 2-4.
- [2] ZHANG Z P. The overview in manufacture market of *illicium verum* Hook.F. and shikimic acid [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2006, 8(4): 41-42.
- [3] HUANG T F, CHENG S C, ZHU D D, et al. A research on extracting the conifer leaf glue from the Cedar Conifer Leaf [J]. J Xiaogan Univ(孝感学院学报), 2005, 25(6): 16-18.
- [4] HUANG T F, HU F. Extracting conifer leaf glue from Cedar using cellulase [J]. J Xiaogan Univ(孝感学院学报), 2008,

28(6): 20-23.

- [5] NONAKA G, AGAETA M, NISHIOKA I. Tannis and related compounds. XXV. A new class of gallotannis possessing a (-)-shikimic acid core from *Castanopsis cuspidate* var. *sieboldii* Nakai.(1) [J]. Chem Pharm Bull,1985, 33(1): 96-101.
- [6] BIAN Q Q, WANG H, LUO Y, et al. Content determination of shikimic acid from different plants by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(14): 1485-1487.

- [7] ZHANG J M, SHI X F, LI C, et al. Study on the chemical constituents from pine needles of *Cedrus deodara* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2010, 33(2): 215-218.
- [8] HUANG X M, QIN X L, JIANG W Z. Determination of shikimic acid in *fructus anisi stellati* [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(2): 130-132.

收稿日期: 2010-09-29

中国药典 2010 年版毒性药材使用禁忌与毒性控制

夏东胜(国家食品药品监督管理局药品评价中心, 北京 100045)

摘要: 目的 全面了解新版药典对毒性药材使用方面的限定, 便于从标准及使用层面有效控制其毒性, 确保临床应用中的安全性。方法 对中国药典 2010 年版所载的毒性药材使用禁忌内容进行归纳与总结。结果 中国药典 2010 年版所载的毒性药材使用禁忌内容包括: 用药禁忌、特殊人群使用禁忌、病症禁忌、患者体质禁忌和饮食禁忌, 以上常见有关毒性药材的使用禁忌内容是防止其安全风险的重要环节。结论 中国药典 2010 年版对毒性药材使用禁忌的相关规定, 是从标准层面对药材毒性的有效控制, 也是保障临床安全用药的有效手段, 故在临床使用中必须严格遵守。

关键词: 中国药典 2010 年版; 毒性药材; 使用禁忌; 毒性控制

中图分类号: R285.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)07-0640-04

Using Taboo and Toxicity Control on Toxic Medical Materials in the 2010 Version of "Chinese Pharmacopoeia"

XIA Dongsheng(Center for Drug Reevaluation, State Food and Drug Administration, Beijing 100045, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To understand comprehensively the related restrictions of toxic medical materials in the new version of "Chinese Pharmacopoeia", which will facilitate to control its toxicity effectively and ensure the safety of clinical application. **METHODS** To review and summarize the contents of using taboo on toxic medical materials in the 2010 version of "Chinese Pharmacopoeia". **RESULTS** The contents of using taboo on toxic medical materials in the 2010 version of "Chinese Pharmacopoeia" include that medication using taboos, special populations using taboos, disease taboos, patients constitution taboos and dietary taboos, which are important links on preventing the security risks of toxic medical materials. **CONCLUSION** The related restrictions of toxic medical materials in the new version of "Chinese Pharmacopoeia" is a kind of effective control measures from the standard levels, and is also an effective mean ensuring the safety of clinical medication, so we should obey them strictly in clinical use.

KEY WORDS: Ch.P(2010); toxic medical materials; using taboo; toxicity control

毒性药材的使用在我国历史悠久, 古人认为“有故无殒”, 早在《淮南子》中即有“天雄, 乌喙最凶毒, 但良医以活人”的记载。在长期的医疗实践中, 历代医家通过不断探索, 逐步形成独具特色的中药毒性理论, 成为古今医家疗沉痾去痼疾的有效武器, 同时也是对药材毒性控制及安全用药的重要理论依据。由于药材的毒性除与其本身因素相关外, 还与诸如配伍、用药途径、用法用量、用药人群等使用过程中的诸多因素密切

相关, 故使用中需在确保药材质量基础上, 还需关注其使用禁忌内容并不得违背, 以达最佳效益, 防止安全性事件发生。

中国药典作为我国国家药品法典, 是药品生产和药品使用的标准和依据。本文对中国药典 2010 年版所载的毒性药材使用禁忌内容进行归纳与总结, 有利于全面了解新版药典对毒性药材使用方面的限定, 便于从标准及使用层面有效控制其毒性, 确保毒性药材临床应用中的安全性。

作者简介: 夏东胜, 女, 副主任医师 Tel: (010)68586215 E-mail: xiadongsheng@cdr.gov.cn