

“武当松针茶”中莽草酸含量测定及提取工艺优选

朱雪松¹,李鹏¹,叶芳健²,郑芳¹,李聪¹,柯昌虎¹,冯协和¹,田先地¹

(1. 湖北医药学院附属东风医院药学部、武当特色中药研究所湖北省重点实验室,湖北 十堰 442000;

2. 湖北武当生物医药科技有限公司,湖北 十堰 442000)

摘要:目的 优选“武当松针茶”中莽草酸的提取工艺,并建立其含量测定方法。方法 采用反相高效液相色谱法-二极管阵列检测器测定“武当松针茶”中莽草酸的含量。通过正交设计试验,分别以水和不同浓度的甲醇为提取溶剂考察料液比、超声功率和超声时间对莽草酸含量的影响。结果 莽草酸在 $10.02 \sim 100.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9995$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系;平均加样回收率为 99.5%, $\text{RSD}=1.93\%$ ($n=6$)。以水为提取溶剂,正交试验提取条件为料液比 1:50,超声功率 200 W,提取 45 min;以甲醇为提取溶剂,正交试验结果为料液比 1:50,甲醇浓度 40%,超声功率 500 W,超声时间 45 min 为最佳。此条件下测得莽草酸的含量分别为 $36.38, 38.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论 最佳提取工艺为 40% 甲醇为提取溶剂,料液比 1:50,超声功率 500 W,超声时间 45 min,所建立的含量测定方法稳定可靠,可用于提取和测定“武当松针茶”中莽草酸的含量。

关键词: 武当松针茶;莽草酸;提取工艺;含量测定;高效液相色谱法

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.01.013

Extraction technology optimization and content determination of shikimic acid in wudang pineneedle tea

ZHU Xuesong¹, LI Peng, YE Fangjian², ZHENG Fang¹, LI Cong¹, KE Changhu¹, FENG Xiehe¹, TIAN Xiandi¹

(1. Department of Pharmacy, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Shiyan, Hubei 442000, China;

2. Hubei Wudang Biopharmaceutical Science and Technology Company Limited, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of shikimic acid in Wudang pineneedle tea and to establish the assay method. **Methods** The content of shikimic acid in Wudang pineneedle tea was determined by RP-HPLC-DAD. Orthogonal design was adopted to investigate the influence on solid/liquid ratio, ultrasound power, ultrasound time by using water and different concentration methanol as extraction solvent respectively. **Results** A good linearity relationship between the concentration of shikimic acid and peak area showed within the range of $10.02 \sim 100.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9995$), and the average recovery was 99.5% ($\text{RSD}=1.93\%$, $n=6$). With water as extraction solvent, the better extraction conditions by orthogonal experiment were ratio of solid to liquid 1:50, ultrasonic power 200 W, extraction of 45 min. With methanol as extraction solvent, the better extraction conditions by orthogonal experiment were ratio of solid to liquid 1:50, 40% methanol concentration, ultrasonic power 500 W, ultrasonic time of 45 min. The average contents of shikimic acid were $36.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and $38.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively. **Conclusions** The optimal technology was as follows: adding 50 times of 40% methanol, ultrasonic extracting for 45 min under ultrasound power 500 W. The assay method is stable and reliable, which can be used in the extraction and determination of shikimic acid in Wudang pineneedle tea.

Key words: Wudang pineneedle tea; Shikimic acid; Extraction technology; Assay; HPLC

“武当松针茶”是以武当山区天然优质的松科植物马尾松 *Pinus massoniana* 的松针为主要原料,结合现代先进生产技术精制而成。该产品由湖北武当生物医药科技有限公司生产,于 2011 年 9 月上市(湖北省技术监督局批准生产,批准文号

QS420314020079)。

马尾松药用的代表部位是松针,其药用成分高于马尾松的其他部位,含有大量黄酮类、莽草酸、木质素、多种维生素等,研究表明松针提取物具有抗氧化、抗突变、降血糖、降血脂等多种功能^[1-3]。其中莽草酸是各种芳香族化合物的来源,其通过影响花生四烯酸的代谢,可作为抗癌和抗病毒药物的中间体,不仅能抑制动脉血栓、脑血栓的形成,还能抑制血小板聚集,具有抗炎、镇痛和抗人类免疫缺

基金项目:湖北省十堰市科技局项目(14k73);湖北省 2011 协同创新中心基金(2011JH-2014CXTT15)

通信作者:郑芳,女,教授,主任药师,研究方向:药物分析, E-mail: 1154756319@qq.com

陷病毒(HIV)等作用^[4-5]。笔者查阅国内外相关文献[6-8],分别以甲醇和水为提取溶剂,通过正交试验确定其优化提取条件,并采用反相高效液相色谱法对“武当松针茶”中莽草酸进行含量测定,以期完善其质量标准提供技术依据。

1 材料

1.1 仪器 UltiMate 3000 高效液相色谱仪(DI-ONEX);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(功率200~500 W,频率40 kHz,昆山市超声仪器有限公司);FW100 型高速万能粉碎机[额定频率(50±1) Hz,天津市泰斯特仪器有限公司];METTLER TOLEDO 十万分之一电子分析天平;GZX-DH-40X 4.5 型电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 试剂 “武当松针茶”(湖北武当生物医药科技有限公司生产,批号20150921、2015112、20160118;莽草酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号100081-200907);乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)均购自天津市科密欧化学试剂有限公司;磷酸(分析纯)、甲醇(分析纯)均购自武汉市中天化工有限责任公司。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法学研究

2.1.1 溶液的制备 (1)对照品溶液:精密称取莽草酸对照品50.10 mg,置50 mL棕色瓶中,加40%甲醇溶液制成浓度为1.002 g·L⁻¹对照品储备液,用封口膜封上,置4℃冰箱中备用;精密吸取上述储备液1.0 mL,置50 mL量瓶中,用40%甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,得浓度为20.04 mg·L⁻¹莽草酸对照品溶液。

(2)供试品溶液:供试样品的处理方法即提取工艺,均为后述正交试验结果所确定:取松针茶于40℃鼓风干燥12 h,粉碎,过60目筛,精密称取上述松针茶粉末1 g,置具塞锥形瓶中,精密移取40%甲醇40 mL加入,称量,超声处理[功率500 W,频率40 kHz,超声温度(40±1)℃]45 min,放冷,再称量。用40%甲醇补足减少的重量,摇匀。用0.22 μm的过滤头过滤,弃去初滤液,取续滤液,即得。

2.1.2 色谱条件与方法学考察 (1)色谱条件:色谱柱:Fortis Xi C₈(250 mm×4.60 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸水溶液(9:91,V/V);流速:0.8 mL·min⁻¹;检测波长:213 nm;柱温:30℃;进样量:20 μL。

(2)系统适应性试验:在前述色谱条件下,分别进样前述对照品溶液和稀释了50倍的供试品溶

液,色谱图见图1。结果:莽草酸的保留时间约为4.4 min;莽草酸色谱峰的理论塔板数均不低于6 000,各色谱图中莽草酸峰的DAD匹配值均不低于999.95,莽草酸与相邻色谱峰的分度均大于2.5,说明样品中的莽草酸均与相邻的杂质色谱峰达到了基线分离。

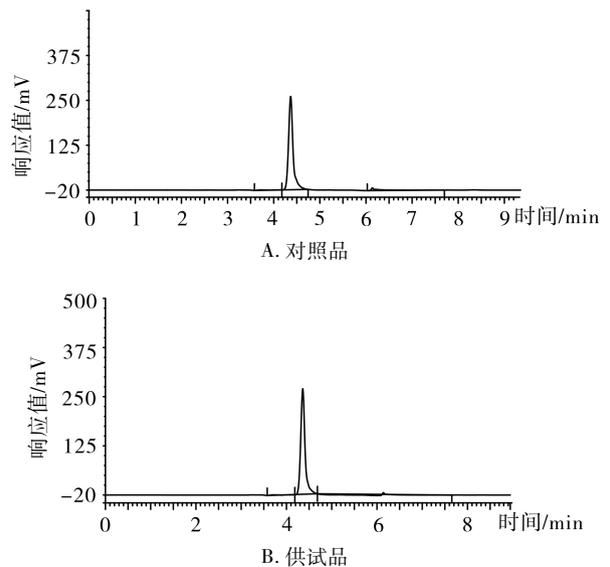


图1 莽草酸高效液相色谱图

(3)线性关系考察:精密吸取前述莽草酸对照品储备液(1.002 g·L⁻¹)各0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分置50 mL容量瓶中,制成浓度分别为10.02、20.04、40.08、60.12、80.16、100.2 mg·L⁻¹的莽草酸对照品溶液,按前述色谱条件依次进样,记录各自峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),进样浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 1.3934X + 1.7315$ ($r = 0.9995$),结果表明莽草酸在10.02~100.2 mg·L⁻¹范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

(4)精密度试验:精密吸取前述莽草酸对照品溶液(20.04 mg·L⁻¹)20 μL注入液相色谱仪,重复进样6次,记录每次峰面积,结果莽草酸峰面积的RSD为0.87% ($n = 6$),表明所用高液相色谱仪的精密度良好。

(5)稳定性试验:精密称取同一批号(20151122)的“武当松针茶”干燥粉末(过60目筛),按前述方法制备的供试品,分别每隔4 h进样1次,共进样7次,记录峰面积,结果莽草酸峰面积的RSD为1.22% ($n = 7$),表明在24 h内供试品溶液稳定。

(6)重复性试验:精密称取同一批号

表1 回收率试验结果($n=6$)

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.102 2	3.951	4.008	7.870	97.8	9.5	1.9
0.102 4	3.958	4.008	7.871	97.6		
0.103 8	4.012	4.008	8.125	102.6		
0.101 5	3.924	4.008	7.899	99.2		
0.102 5	3.962	4.008	8.007	100.9		
0.103 9	4.017	4.008	7.981	98.9		

(20151122)的“武当松针茶”干燥粉末(过60目筛)6份,分别按前述方法平行操作,制备成供试品溶液,按前述色谱条件分别进样,记录峰面积,结果莽草酸峰面积的RSD值为1.85%($n=6$),表明用上述方法测定莽草酸含量时,重复性较好。

(7)回收率试验:精密称取批号为20151122的“武当松针茶”干燥粉末(莽草酸含量 $38.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)6份,每份约0.1 g,精密称定,分别精密加入前述莽草酸对照品储备液($1.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)各4.0 mL,加40%甲醇各4.0 mL,按前述方法制备供试品溶液并测定,结果见表1。

2.2 提取工艺优选 本试验采用超声法分别以甲醇和水为提取溶剂,提取“武当松针茶”中莽草酸,在固定超声频率为40 kHz,超声温度为 $(40 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下进行单因素试验,初步考察料液比、超声时间、超声功率对其提取的影响^[9-11]。

2.2.1 以水为提取溶剂提取工艺筛选 (1)单因素试验。①料液比对提取的影响:固定超声功率500 W,超声30 min,改变水的用量(20、30、40、50、60倍),考察对莽草酸提取效果的影响。结果料液比1:50莽草酸含量最高。②超声时间对提取的影响:固定超声功率500 W,料液比1:50,改变超声时间(15、30、45、60、75、90 min),考察对莽草酸提取效果的影响。结果表明,超声45 min莽草酸含量最高。③超声功率对提取的影响:固定超声时间45 min,料液比1:50,改变超声功率(200、300、400、500 W)对莽草酸提取的影响,结果表明超声功率为300和400 W时,莽草酸含量最高。

(2)正交试验。①正交试验参数:取“武当松针茶”样品(批号20151122)0.5 g,采用正交试验 $L_9(3^4)$ 中的各因素、水平进行莽草酸的超声水提取工艺研究,以莽草酸的含量为评价指标,其中, K_1 、 K_2 、 K_3 分别表示列上水平号为1、2、3时所对应的试验结果之和, R 表示极差。正交试验设计表见表2。②正交试验结果:试验结果见表3。根据极差 R 值直接分析:“武当松针茶”中莽草酸以水为提取溶剂的最佳工艺组合为 $A_2 B_2 C_1$,极差 R 大小为 $B > A >$

C ,说明超声时间对松针茶中莽草酸提取影响最大,其次为水的用量和超声功率。经方差分析表明 A 、 B 、 C 三因素影响均不明显($P > 0.05$)。最终确定的最佳提取工艺为:加50倍量的水,超声(功率200 W)提取45 min[超声频率为40 kHz,超声温度为 $(40 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$]。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平	因素		
	A(料液比)	B(超声时间/min)	C(超声功率/W)
1	1:40	30	200
2	1:50	45	350
3	1:60	60	500

表3 正交试验结果($n=3$)

试验号	因素				莽草酸含量 /mg · g ⁻¹
	A	B	C	D(误差)	
1	1	1	1	1	31.49
2	1	2	2	2	32.06
3	1	3	3	3	30.34
4	2	1	2	3	34.33
5	2	2	3	1	33.01
6	2	3	1	2	30.39
7	3	1	3	2	31.00
8	3	2	1	3	35.60
9	3	3	2	1	30.57
K_1	31.297	32.273	32.493	31.690	
K_2	32.577	33.557	32.320	31.150	
K_3	32.390	30.433	31.450	33.423	
极差 R	1.280	3.124	1.043	2.273	

2.2.2 以甲醇为提取溶剂提取工艺筛选 (1)单因素试验。①甲醇浓度对提取的影响:固定料液比(1:40)、超声功率(500 W)、超声时间(30 min),分别采用不同浓度的甲醇(30%、40%、50%、70%、80%)考察对松针茶中莽草酸的提取效果,结果当采用40%甲醇提取时,莽草酸含量最高。②料液比对提取的影响:固定超声功率(500 W)、超声时间(30 min),采用40%甲醇为提取溶剂,考察不同的

料液比(1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70)对松针茶中莽草酸提取效果,结果当料液比为1:50时,莽草酸含量最高。③超声功率对提取的影响:采用40%甲醇为提取溶剂,固定超声时间(30 min)、料液比(1:50),改变超声功率(200、300、400、500 W)对松针茶中莽草酸提取的影响,结果当超声功率为300、400 W时,莽草酸含量最高。④超声时间对提取的影响:采用40%甲醇为提取溶剂,固定超声功率(3 500 W)、料液比(1:50),改变超声时间(15、30、45、60、75 min)对松针茶中莽草酸提取的影响,结果表明,超声45 min莽草酸含量最高。

(2)正交试验。①正交试验参数:取武当松针茶样品(批号20151122)0.5 g,以莽草酸的含量为评价指标,采用正交试验 $L_9(3^4)$ 中的各因素、水平进行莽草酸的超声水提取工艺研究。正交试验设计见表4。②正交试验结果:试验结果见表5。根据极差 R 值可以看出,各因素影响大小的排序为 $A > D > C > B$,综合各因素的 K 值和直观比较,得出:松针茶中莽草酸以甲醇为提取溶剂时,最佳工艺组合为 $A_2B_2C_3D_2$;经方差分析表明 A 、 B 、 C 、 D 四因素影响均不明显($P > 0.05$)。最终确定的最佳提取工艺为:加50倍量的40%甲醇,超声(功率为500 W)提取45 min[超声频率为40 kHz,超声温度为 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$]。

表4 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A (料液比)	B (甲醇浓度/%)	C (超声功率/W)	D (超声时间/min)
1	1:40	30	200	30
2	1:50	40	350	45
3	1:60	50	500	60

表5 正交试验结果($n=3$)

试验号	因素				莽草酸含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
	A	B	C	D(误差)	
1	1	1	1	1	31.31
2	1	2	2	2	32.18
3	1	3	3	3	29.25
4	2	1	2	3	33.30
5	2	2	3	1	38.61
6	2	3	1	2	37.77
7	3	1	3	2	34.79
8	3	2	1	3	32.55
9	3	3	2	1	31.15
K_1	30.913	33.133	33.877	33.690	
K_2	36.560	34.447	32.210	34.913	
K_3	32.830	32.723	34.217	31.700	
极差 R	5.647	1.724	2.007	3.213	

2.2.3 验证试验 为进一步考察上述最佳提取工艺的稳定性,选用上述优化提取条件,精密称取松针茶粉末约1 g共6份,3份各加50 mL水,超声(功率200 W)提取45 min;另3份各加40%甲醇50 mL,超声(功率500 W)提取45 min。上述超声频率均为40 kHz,超声温度均为 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。结果,分别以水和甲醇为提取溶剂时HPLC测得莽草酸的平均含量分别为36.38、38.66 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($n=3$),均处于各自正交试验的较高水平,说明上述正交试验所选择的工艺条件是适宜的。由于以甲醇为提取溶剂时的验证结果高于以水为提取溶剂的验证结果,故本试验样品制备采用:加50倍量的40%甲醇,超声(功率为500 W)提取45 min[超声频率为40 kHz,超声温度为 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$]。

2.2.4 样品含量测定 分别取批号为20150921、20151122、20160118的“武当松针茶”干燥粉末(过60目筛)各3份,按上述验证的适宜条件:料液比1:50(40%甲醇溶液),超声(功率为500 W)提取45 min[超声频率为40 kHz,超声温度为 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$]。并分别按“2.2.1”项下色谱条件测定莽草酸的峰面积,并按标准曲线法计算莽草酸的含量。结果为 $(38.57 \pm 0.09) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

在选择提取溶剂时,由于莽草酸极性较大,选取水和不同浓度的甲醇分别通过正交优化提取条件,虽然以水为溶剂时,莽草酸含量最高达36.38 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,只稍低于以甲醇为提取溶剂时(莽草酸最高含量:38.66 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),但水提液杂质较多,不利于后期样品的色谱分离,最终选择40%甲醇为提取溶剂。

本试验过程中比较了Fortis Xi C_8 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)柱和Phenomenex Luna C_{18} (250 mm \times 4.60 mm, 5 μm)柱,前者的分离效果高于后者,可能是由于 C_8 柱的极性高于 C_{18} 柱,对于分离莽草酸这样极性较大的物质, C_8 柱保留能力比 C_{18} 柱的强,故本试验优选前者作为检测色谱柱。由Ultimate3000二极管阵列检测器对莽草酸色谱峰的紫外扫描图谱得知:莽草酸的最大吸收波长约为: $(213 \pm 0.2) \text{nm}$,故该试验将莽草酸的检测波长定为213 nm。选择流动相时,比较了甲醇-0.05%、0.1%、0.2%、0.4%磷酸溶液系统和乙腈-0.05%、0.1%、0.2%、0.4%磷酸溶液系统,最终选择乙腈-0.4%磷酸溶液作为本试验的流动相系统,因此系统的稳定性、色谱峰的分离效果、峰形及柱效均较高。