

正交试验优选雪松松针中莽草酸的提取工艺

沈薇¹, 石晓峰^{1*}, 王东东², 滕有斌¹, 刘东彦² (1. 甘肃省医学科学研究院, 兰州 730050; 2. 兰州大学药学院, 兰州 730000)

摘要: 目的 优选雪松松针中莽草酸的最佳提取工艺。方法 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 以莽草酸的含量为指标, 以液料比、浸泡时间、提取时间为因素, 优化雪松松针中莽草酸的提取工艺。结果 最佳提取工艺为加 20 倍量的水, 浸泡 0.5 h, 加热回流 2 h。在最佳工艺条件下, 提取的莽草酸含量为 3.58%。结论 优选得到的提取工艺简单、稳定、可行。

关键词: 雪松松针; 正交试验设计; 提取工艺; 莽草酸

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)09-0831-04

Optimization of the Extracting Process of Shikimic Acid from Pine Needles of *Cedrus Deodara* (Roxb.) G. Don by Orthogonal Experiment

SHEN Wei¹, SHI Xiaofeng^{1*}, WANG Dongdong², TENG Youbin¹, LIU Dongyan² (1. Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China; 2. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction technology and condition of shikimic acid from pine needles of *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don. **METHODS** The extraction technology of shikimic acid was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal experiment with the contents of shikimic acid as index, and with the ratio of raw material to liquid, soaking time and extraction time as factors. **RESULTS** The optimal extracting process was adding 20 times of water, soaking 0.5 h, reflux 2 h. Under the conditions, the content of shikimic acid was 3.58%. **CONCLUSION** The optimal extracting process is simple, stable and practical.

KEY WORDS: pine needles of *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don; orthogonal experiment; extracting process; shikimic acid

雪松具有解痉、镇痛、抗炎、抗癌、抗菌、抗病毒等多种药理活性, 主要含萜类、木脂素类、黄酮类、脂肪酸等化学成分^[1]。另有文献报道雪松松针是针叶胶的很好的提取原料^[2-3], 对其进行综合开发利用, 可变废为宝, 有很大的开发价值。

莽草酸(shikimic acid)是抗禽流感药物磷酸奥司米韦(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^[4], 从其成熟果实中提取分离莽草酸的收率虽然较高, 但无法满足合成达菲的可能用量; 化学合成莽草酸, 由于工艺条件苛刻、成本高也无法满足市场需求。以雪松松针为原料, 从中分离得到莽草酸^[5], 但成本较高。为开发利用雪松松针、提高莽草酸的产率、降低成本, 笔者通过正交试验对雪松松针的水提工艺进行优选, 以期对莽草酸的大生产提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), B3200S-T 超声波清洗仪(必能信超声上海有限公司), HANNA pH211 台式酸度计(厦门欣锐仪器仪表有限公司), AE260 分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), 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 药材

雪松松针于 2008 年 6 月采自兰州市市区, 经甘肃省医学科学研究院何福江研究员鉴定为雪松属植物雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don 的针叶。

1.3 试剂

莽草酸对照品(由云南昆明科翔生物科技有限公司提供, 批号: 0435-200907, 经 HPLC 测定其纯度>98%); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其它试

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: 沈薇, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: 13893423827 E-mail: shenwei_0124@sina.com
教授, 硕士 Tel: (0931)2614521-603 E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

*通信作者: 石晓峰, 男, 主任药师,

剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸水溶液(pH 为 2)-甲醇(90:10); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 波长: 217 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.1.2 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, 加流动相使溶解, 并定容, 配制成浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 雪松松针粉碎过筛(40 目), 取约 1.0 g, 精密称定, 按试验设计进行加热回流提取, 收集提取液, 定容于 100 mL 量瓶中, 吸取 1 mL 置 25 mL 量瓶, 用流动相定容, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 结果标准品和样品中莽草酸色谱峰的保留时间均为 2.3 min, 理论板数以莽草酸计≥4 000。峰的纯

度经 LC-MS/MS 检验为单一峰。色谱图见图 1 和图 2。

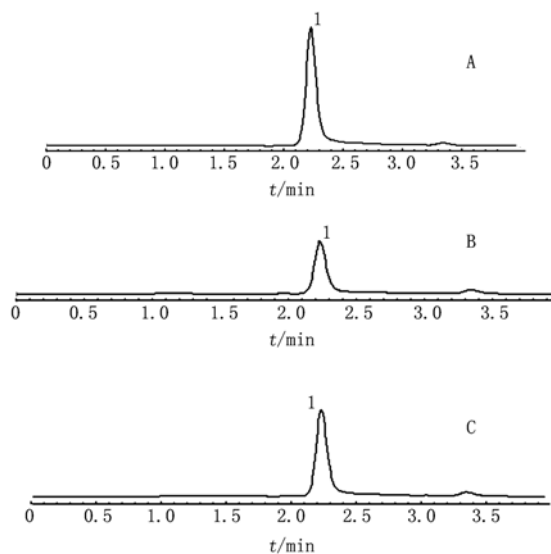


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-雪松松针样品; C-样品+对照品; 1-莽草酸

Fig 1 HPLC chromatogram

A-reference; B-sample of pine needle of *Cedrus deodara*; C-spiked sample; 1-shikimic acid

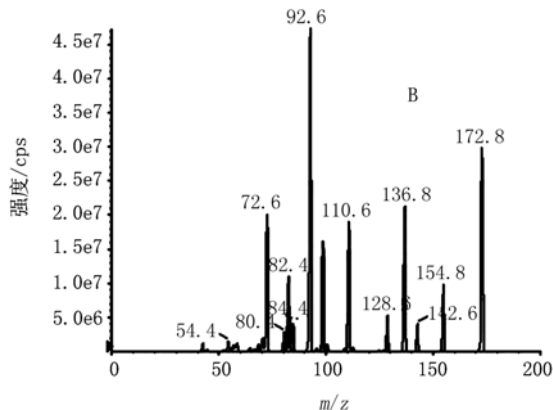
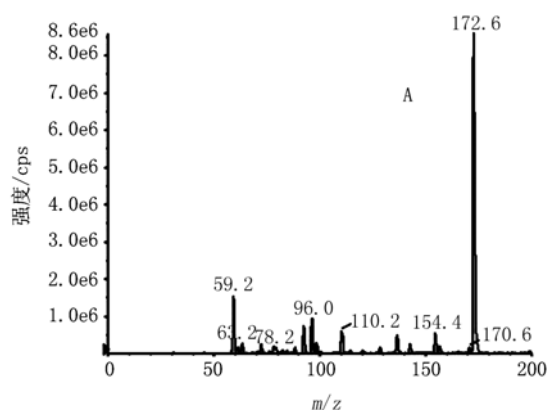


图 2 质谱图

A-莽草酸全离子扫描质谱图; B-莽草酸二级质谱碎裂图

Fig 2 MS/MS spectra showing

A-MS/MS spectra of shikimic acid showing prominent precursor to production transitions; B-production mass spectra of deprotonated ions obtained from shikimic acid

2.1.5 线性关系考察 精密量取浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液 5 mL, 用流动相定容至 50 mL, 依次精密量取 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 用流动相定容、摇匀, 得到浓度 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。按“2.1.1”色谱条件, 分别进样 20 μL 测定, 以峰面积(Y)为纵坐标, 浓度(X)为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=35.725X+34.034$,

$r=0.9998$; 结果莽草酸在 1~25 μg·mL⁻¹ 内与其峰面积呈良好线性关系。

2.1.6 仪器适应性试验 取莽草酸对照品溶液(10 μg·mL⁻¹), 按“2.1.1”项下色谱条件, 重复进样 6 次, 分别测定, 求得其峰面积的 RSD 为 0.18%($n=6$), 显示仪器精密度良好。

2.1.7 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“2.1.3”项下方法制得

供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件，于 0.5，1，2，4，8，12，24 h 分别进样 20 μ L，测定峰面积，结果莽草酸峰面积的 RSD 为 0.83%，表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 精密度试验 精密称取同一批雪松松针的干燥粉末(过 40 目筛)6 份，按“2.1.3”项下方法制得供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件，进样 20 μ L，测得莽草酸含量的 RSD 为 0.386%($n=6$)，表明该方法重复性较好。

2.1.9 回收率试验 精密称取已知莽草酸含量的雪松松针干燥粉末(过 40 目筛)9 份，按样品含量的 80%，100%，120% 分别加入莽草酸对照品适量，按“2.1.3”项下方法制备并测定，莽草酸的平均回收率为 97.9%，RSD 为 1.43%。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery tests

供试品 含量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/%	平均 回收率/%	RSD/%
3.69	2.92	6.53	97.3	97.9	1.43
3.65	2.92	6.54	99.1		
3.63	2.92	6.43	96.0		
3.64	3.65	7.27	99.6		
3.68	3.65	7.27	98.2		
3.66	3.65	7.20	97.1		
3.62	4.38	8.01	100.2		
3.67	4.38	7.91	96.8		
3.58	4.38	7.84	97.3		

2.2 提取溶剂的选择

根据莽草酸极性较强的化学性质，依次选取 95%，85%，75%，65%，55% 乙醇和水进行回流提取，分别测定莽草酸的含量，结果乙醇浓度从 95% 逐级降至 65%，莽草酸的含量变化不大，均在 3.4% 左右；乙醇浓度减低至 55%，莽草酸的含量提高至 3.54%；以水为溶剂时，莽草酸含量最高，达 3.63%，故将提取溶剂确定为水。

2.3 提取次数的选择

精密称取样品 1 g，浸泡 0.5 h，按回流提取提取 3 次(依次为 2, 2 和 1 h)，分别收集滤液，按“2.1”项下方法测定，计算每次提取的莽草酸的提取率，结果第 1 次提取的提取率即可达到 96.4%，故将提取次数确定为 1 次。

2.4 正交试验

参照文献[6]，并根据预试验结果，以莽草酸含量为考察指标，对影响提取工艺的主要因素固液比(A)、浸泡时间(B)、提取时间(C)进行考察，

每个因素选择 3 个水平，按正交试验设计表进行 $L_9(3^4)$ 优化试验。因素水平见表 2，正交试验和方差分析结果见表 3 和表 4。

表 2 因素水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A(固液比)	B(浸泡时间/h)	C(提取时间/h)
1	1 : 12	0.5	1.0
2	1 : 16	1.0	1.5
3	1 : 20	1.5	2.0

表 3 正交试验结果($n=3$)

Tab 3 Results of orthogonal test ($n=3$)

试验号	因素				莽草酸 含量/%
	A	B	C	D(误差)	
1	1	1	1	1	2.61
2	1	2	2	2	2.82
3	1	3	3	3	2.97
4	2	1	2	3	2.82
5	2	2	3	1	3.37
6	2	3	1	2	2.83
7	3	1	3	2	3.63
8	3	2	1	3	3.46
9	3	3	2	1	3.52
K_1	2.800	3.020	2.967	3.167	
K_2	3.007	3.217	3.053	3.093	
K_3	3.537	3.107	3.323	3.083	
R	0.737	0.197	0.356	0.084	

表 4 方差分析表

Tab 4 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F	P
A	0.850	2	94.444	<0.05
B	0.045	2	5.000	
C	0.199	2	22.111	<0.05
误差	0.009	2		

注: $F_{0.05(2,2)}=19.000$

Note: $F_{0.05(2,2)}=19.000$

根据极差 R 值可以看出，影响因素的排序为 $A>C>B$ ，综合各因素的 K 值和直观比较，得出理论最佳工艺条件为 $A_3C_3B_1$ ；方差分析表明因素 A、因素 C 影响显著($P<0.05$)。故最终确定的最佳提取工艺为：加 20 倍量的水，浸泡 0.5 h，加热回流提取 2 h。

2.5 验证试验

精密称取雪松松针粉末(过 40 目筛)1.0 g，按上述最佳提取条件处理样品，平行制备 3 份，测定莽草酸含量，经计算其平均含量为 3.58%，RSD 为 1.13%，处于较高水平，方法重复性好，说明该提取工艺稳定、可行。结果见表 5。

表 5 验证试验结果($n=3$)

Tab 5 Results of confirmatory test($n=3$)

样品编号	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	3.60		
2	3.52	3.58	1.13
3	3.57		

3 讨论

在提取溶剂选择时, 由于莽草酸极性较大, 选取不同浓度的乙醇和水在相同条件下进行提取, 虽然以水为溶剂时, 莽草酸含量最高达 3.63%, 但水提液杂质较多, 会对后期分离纯化造成一定困难, 考虑到大批量生产节约成本和安全生产, 最终还是选取水作为提取溶剂。

本试验研究所得的最佳工艺经验证简单可行, 其水提液经萃取、柱层析、重结晶等步骤可得到纯度达 98%以上的莽草酸^[7], 收率达 0.72%(按投料量计)。

REFERENCES

- [1] ZHANG J M, SHI X F, FAN B. Progress of researches on chemical constituents and pharmacological actions of *Cedrus deodara* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2009, 31(6): 928-933.
- [2] 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.
- [3] 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
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] XU X H, YANG Y, ZHANG H J, et al. Objective to optimize the water-extraction of polysaccharide from *Herba Ecliptae* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(4): 319-322.
- [7] SHI X F, LIU D Y. The production process of extraction, separation and purification from pine needles of *Cedrus deodara*: China, 201010174776.7[P]. 2010-09-01.

收稿日期: 2010-11-22