

HPLC 测定榆钱中水杨酸的含量

黄智鸿^{1,2}, 史宝林², 高宝嘉^{1*}

(1. 河北农业大学, 河北保定 071001; 2. 河北北方学院, 河北张家口 075000)

[摘要] 目的: 建立榆钱中水杨酸含量的测定方法。方法: 采用甲醇提取, HPLC 测定, Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.5 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.3% 磷酸溶液 (36:64), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 327 nm, 柱温 30 °C, 进样量为 20 μL。结果: 该方法样品中水杨酸与干扰物质分离良好, 水杨酸质量浓度在 8.82 ~ 282.0 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.9998$), 供试品溶液在 8 h 内稳定, 回收率为 95.23% ~ 105.3%, RSD 分别为 1.50%, 4.85%, 4.68%。结论: 该方法简便、可靠、重复性好, 可用于测定榆钱中水杨酸的含量。

[关键词] 榆钱; 水杨酸; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0112-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160112

Determination of Salicylic Acid in Fruits of Elm by HPLC

HUANG Zhi-hong^{1,2}, SHI Bao-lin², GAO Bao-jia^{1*}

(1. Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a novel method for the determination of salicylic acid in fruits of elm. **Method:** The HPLC separation was performed on an Elite Hypersil C₁₈ column (4.5 mm × 200 mm, 5 μm) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and column temperature of 30 °C. Detection was monitored at 327 nm. The mobile phase was methanol-0.3% phosphoric acid (36:64). **Result:** Salicylic acid showed good linearity from the concentration range of 8.82 to 282.0 mg·L⁻¹ ($r = 0.9998$). The sample solution is steady within 8 h. The recovery was 95.23% -105.3%, RSD was 1.50%, 4.85%, 4.68%. **Conclusion:** The method is simple, reliable and reproducible. It can be used in the determination of salicylic acid in fruits of elm.

[Key words] fruits of elm; salicylic acid; HPLC; content determination

榆钱中含有丰富的氨基酸、维生素及微量元素^[1-2], 具有通淋除湿、健脾益胃和安神等功效^[3]。植物体内的水杨酸(SA)是一种次级代谢产物, 在植物体内以游离态和结合态形式存在。作为一种内源性的信号分子^[4], SA 在水杨酸羧基转甲基酶(salicylic acid carboxyl methyltransferase, SAMT)作用下生成水杨酸甲酯。水杨酸甲酯(MeSA)在植物诱导防御过程中参与调控植物抗病基因的表达^[5-7]。而且水杨酸还有重要的生理调节作用, 如

抗病、抗低温、抗旱、诱导开花、果实成熟等^[8]。而有关榆钱中水杨酸的含量尚未见文献报道, 因此, 研究榆钱中水杨酸的含量变化, 对更深层次的了解植物受到外界胁迫时, 具有抵抗逆境的能力有重要意义。

水杨酸的含量测定方法有紫外分光光度法^[9-10]、高效液相色谱法^[11-12]、气相色谱法^[13]等, 紫外法操作简单方便, 但专属性较差, 不适用于复杂成分的测定; 气相色谱则有难挥发组分会污染柱子、高

[收稿日期] 20130816(011)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2013405094)

[第一作者] 黄智鸿, 博士, 副研究员, 从事生态学研究, Tel: 18931318517, E-mail: hbnuhz@163.com

[通讯作者] * 高宝嘉, 博士, 教授, 从事生态学研究, Tel: 13931399518, E-mail: baojiagao@163.com

浓度组分要稀释后进样等缺点。HPLC 仪器较为普及,且同时具有分离和分析功能等优点,故本实验选用 HPLC 测定榆钱中水杨酸的含量。

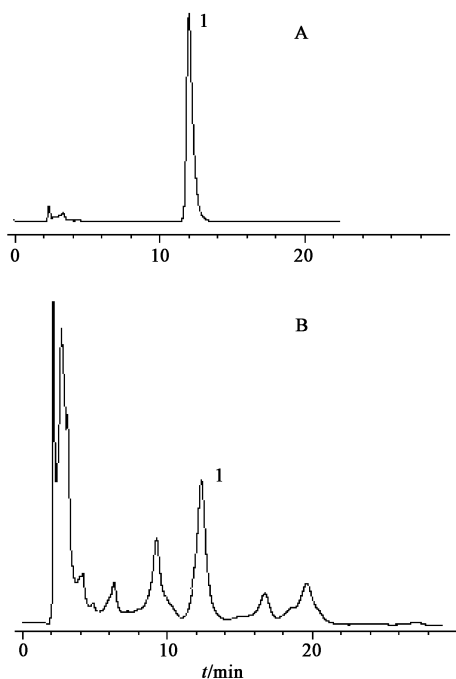
1 材料

HP1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent),KQ2200 型超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司),AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

榆钱样品采自河北北方学院南校区院内榆树,经河北北方学院中医学院赵恒成教授鉴定为榆科植物榆树 *Ulmus pumila* L. 的翅果,采样时间为 2013 年 5 月 13 日,5 月 23 日及 5 月 29 日,取样后液氮冷冻备用。水杨酸对照品(批号 100886200601, Sigma 公司),甲醇为色谱纯(Fisher,美国),娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.5 mm × 200 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.3% 磷酸溶液(36:64),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 327 nm,进样量为 20 μL,柱温 30 °C。水杨酸对照品溶液和榆钱提取物的色谱图,见图 1。样品中水杨酸色谱峰的保留时间约为 12.38 min,与相邻色谱峰能达到基线分离。



1. 水杨酸;A. 水杨酸对照品;B. 榆钱样品

图 1 榆钱样品溶液 HPLC

2.2 实验方法

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取水杨酸对照品 18.8 mg 于 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并稀释

至刻度,即得质量浓度为 1.88 g·L⁻¹ 对照品储备液,再精密量取 1.5 mL 该储备液于 10 mL 量瓶中,制成质量浓度为 0.282 g·L⁻¹ 的对照品溶液,置 4 °C 冰箱备用。

2.2.2 样品溶液的制备 取经液氮冷冻的榆钱样品 0.5 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶液 10 mL,称定质量,超声处理 50 min,取出放冷,用甲醇补足减少的质量,提取液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,续滤液作为供试品溶液。

3 结果与讨论

3.1 液相色谱条件的选择 紫外扫描发现水杨酸在 245 nm 处有最大吸收,但此时榆钱样品中其他物质干扰测定,故最终选择对水杨酸测定无干扰的 327 nm 作为测定波长。

样品溶液测定时,流动相比比例最初按文献[14]选择甲醇-0.3% 磷酸溶液体积比为(48:52),此时榆钱提取液其他成分明显干扰水杨酸测定,后采用逐渐递减甲醇比例,最后在甲醇-0.3% 磷酸溶液(36:64)时,水杨酸基本能与干扰物质分开,而且保留时间较为合适,30 min 基本洗脱完毕,故最终选择流动相比比例为甲醇-0.3% 磷酸溶液(36:64)。

3.2 样品提取溶剂的选择 准确称取榆钱样品 0.5 g,分别加入 10 mL 甲醇、乙醇和水,超声提取 40 min。提取液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分别取续滤液 20 μL 进样,计算水杨酸的含量,考察各提取溶剂对水杨酸的提取效率。每个处理进行 3 个重复,结果水杨酸质量分数分别为 0.131 8, 0.106 7, 0.073 6 mg·g⁻¹,表明用甲醇提取时,水杨酸含量最高,故选择甲醇作为提取溶剂。

3.3 样品提取时间的考察 准确称取榆钱样品 0.5 g,分别加入 10 mL 甲醇,分别超声处理 20, 30, 40, 50, 60 min。提取液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分别取续滤液 20 μL 进样,计算水杨酸的含量,考察不同提取时间对水杨酸提取率的影响。每个处理进行 3 个重复,结果水杨酸质量分数分别为 0.052 7, 0.098 3, 0.130 7, 0.141 6, 0.142 9 mg·g⁻¹,表明水杨酸提取率随着超声时间的延长而增大,但 50, 60 min 时提取率基本接近,从设备保护角度选择 50 min 作为提取时间。

3.4 线性范围、检出限和定量限 精密量取对照品溶液,加甲醇逐级等比稀释,配制系列对照溶液,按前述色谱条件,分别进样 20 μL 测定,以水杨酸峰面积(Y)对质量浓度(X)绘制标准曲线,线性回归方程为 $Y = 0.658X + 8.1948$ ($r = 0.9998$)。结果表

明,水杨酸在 8.82 ~ 282.0 mg·L⁻¹线性关系良好。

将对照品溶液,逐级稀释,进样测定,按照信噪比为 3:1和 10:1进行计算。检出限为 0.06 mg·L⁻¹,定量限为 0.235 mg·L⁻¹。

3.5 精密度和回收率试验

3.5.1 精密度试验 取 2.1.1 项下对照品溶液,连续进样 5 次,每次 20 μL,测定峰面积,考察日内精密度,峰面积 RSD 1.87%,说明仪器精密度良好。

3.5.2 稳定性试验 取供试品溶液,分别在 0,2,4,6,8 h 进样,每次 20 μL,根据水杨酸峰面积考察样品稳定性,结果 RSD 2.20%,说明样品在室温下 8 h 内稳定。

3.5.3 回收率试验 精密称取已知水杨酸含量的榆钱样品 9 份,每份约 0.5 g,分别加入一定量的水杨酸对照品,按样品溶液的制备项下,制备供试品溶液;然后测定各样品的峰面积,计算回收率。结果表明平均回收率为 98.42%,RSD 3.94%,结果见表 1,说明方法准确性良好。

表 1 水杨酸的回收率

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.228 0	0.235 0	0.451 8	95.23	96.17	1.50
0.228 2	0.235 0	0.458 1	97.83		
0.228 3	0.235 0	0.452 6	95.45		
0.228 1	0.188 0	0.413 0	98.35	98.73	4.85
0.228 1	0.188 0	0.405 1	94.15		
0.228 3	0.188 0	0.423 2	103.7		
0.228 1	0.314 0	0.558 7	105.3	100.4	4.68
0.228 2	0.314 0	0.529 5	95.96		
0.228 1	0.314 0	0.541 6	99.84		

3.6 实际样品测定 对不同时期(2013年5月13日,5月23日,5月29日)采收的榆钱用上述方法进行处理,注入高效液相色谱仪进行测定,每个样品进行 3 个平行试验,不同时期水杨酸质量分数分别为 0.142,0.139,0.176 mg·g⁻¹。

4 结论

本方法采用甲醇提取,HPLC 进行检测,回收率在 96.17% ~ 100.4%,检出限为 0.06 mg·L⁻¹,定量限为 0.235 mg·L⁻¹。方法简便、可靠、重复性好,可用于测定榆钱中水杨酸的含量。

[参考文献]

[1] 芮玉奎,郝彦珍,张福锁,等.应用 ICP-MS/ICP-AES 测定榆钱中 22 种微量元素的含量[J].光谱学与光谱分析,2007,27(10):2111.

[2] 胡雪原,闫福林,李聪辉.榆钱 6 种微量元素测定及药用价值分析[J].微量元素与健康研究,2000,17(4):54.

[3] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编[M].2 版.北京:人民卫生出版社,1975:652.

[4] Malamy J, Carr J P, Klessig D F, et al. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection [J]. Science, 1990, 250(4983):1002.

[5] De Boer J G, Dicke M. The role of methyl salicylate in prey searching behaviour of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* [J]. J Chem Ecol, 2004, 30(2):255.

[6] 刘勇,孙玉成,王国红.植物和刺吸式口器的诱导防御与反方御研究进展[J].应用昆虫学报,2011,48(4):1052.

[7] Yalpani N, Enyedi A J, León J, et al. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco[J]. Planta, 1994, 193(3):372.

[8] 孟雪娇,邸昆,丁国华.水杨酸在植物体内的生理作用研究进展[J].中国农学通报,2010,26(15):207.

[9] 郝少军.紫外-可见分光光度法测定水杨酸甲醛醇溶液的含量[J].中国医院药学杂志,1997,17(12):554.

[10] 徐风华,刘建行,陶胜源.二阶导数光谱法同时测定双组分体系中阿司匹林和水杨酸的含量[J].中国药物应用与监测,2009,6(3):141.

[11] 余小平.高效液相色谱法同时测定足光散中水杨酸、苯甲酸的含量[J].药物分析杂志,2005,25(8):955.

[12] 张卫,孙国新,徐玉新,等.植物体内水杨酸分析方法的探讨及其应用[J].生态毒理学报,2009,4(6):889.

[13] 宋圆圆,徐建峰,梁笑婷,等.利用气相色谱法同时测定番茄叶片中的信号物质水杨酸和茉莉酸[J].江西农业大学学报,2010,32(5):1056.

[14] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等.高效液相色谱法测定桃花止泻冲剂中 6-姜酚的含量[J].中南药学,2008,6(2):197.

[责任编辑 邹晓翠]