

云南松松塔药材质量标准

张志琴^{1,2}, 刘光明¹, 杨永寿¹, 肖培云^{1*}

(1. 大理学院药学院, 云南 大理 671000; 2. 楚雄医药高等专科学校, 云南 楚雄 675000)

[摘要] 目的: 建立松塔药材的质量标准。方法: 生药学研究, 浸出物测定法, 灰分测定法, 水分测定法, TLC 及 HPLC 色谱法。采用 Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 110A 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-2% 冰醋酸水溶液(90:10), 流速 0.9 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm。结果: 对 12 个不同来源的松塔药材浸出物、总灰分、酸不溶性灰分和水分进行了测定, 同时对其活性成分异海松酸进行了 TLC 鉴别和 HPLC 定量研究。通过研究, 将松塔药材质量标准定为: 水分不超过 12%, 总灰分不超过 1.3%, 浸出物不低于 3.9%。异海松醇含量不低于 0.19%。结论: 建立了松塔药材的质量控制标准。

[关键词] 松塔; 质量标准; 异海松酸; 高效液相色谱; 薄层色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0068-04

[doi] 10.11653/syfy2013130068

Research on Quality Specification of Pinecone

ZHANG Zhi-qin^{1,2}, LIU Guang-ming¹, YANG Yong-shou¹, XIAO Pei-yun^{1*}

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China;

2. Chuxiong Medical College, Chuxiong 675000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop identification and assay methods of pinecone. **Method:** Pharmacognostic studies, extract mensuration, ash determination, moisture measuring method, and the bioactive constituents were analyzed by TLC and HPLC. In the HPLC method, isopimaric acid was separated on phenomenex

[收稿日期] 20120203(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260632); 云南省教育厅科学研究基金(2012Y328)

[第一作者] 张志琴, 硕士, 讲师, 从事中药材及其制剂质量研究, Tel:18987832393, E-mail: cxyzzq@163.com

[通讯作者] * 肖培云, 硕士, 教授, 从事中药材及其制剂质量研究, Tel:15808729786, E-mail: xpy990120@126.com

性成分, 制得多糖供试品溶液。

苯酚-硫酸法为测定多糖的经典方法之一。多糖在硫酸作用下水解成单糖, 并迅速脱水生成糖醛衍生物, 与苯酚缩合成有色化合物, 然后用分光光度法测定其含量^[4-5]。显色剂中的苯酚、硫酸用量、显色时间、温度等因素均会影响测定效果, 本实验对各影响因素进行了单因素考察, 确定了最佳显色条件。

方法学考察表明, 本方法简便快捷、灵敏度高, 可作为桂枝汤水提液中总多糖含量的检测与控制方法。

[参考文献]

[1] 李沧海, 周军, 霍海如, 等. 桂枝汤及其活性成分对

EP3 受体激动剂诱导发热的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11):1056.

[2] 刘敏, 谭余庆, 黄敬耀. 桂枝汤主要成分对 PGE2 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经 cAMP-PKA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2):35.

[3] 柏冬, 范斌, 牛晓红, 等. 多波长高效液相色谱法同时测定桂枝汤中 5 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 30(1):1.

[4] 张璐, 翁立冬, 刘莉, 等. 苯酚-硫酸法测定乌梅多糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):107.

[5] 刘瑾, 史万忠, 李世芳, 等. 金力胶囊中多糖含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 16(7):34.

[责任编辑 顾雪竹]

Gemini-NX C₁₈ 110A column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol-2% acetic acid (90:10) as the mobile phase with flow rate of 0.9 mL · min⁻¹. The temperature of column was kept at 25 °C. The detection wavelength was set at 210 nm. **Result:** The content of total ash, acid-insoluble ash, and moisture of 12 samples from different origins were determined. The qualitative and quantitative analysis of isopimaric acid by TLC and HPLC were performed respectively. Quality specification of pinecone established through the experimental study: the moisture content less than 12%, total ash less than 1.3%, acid-insoluble ash less than 0.3%, extract not lower than 3.9%, isopimaric acid content not lower than 0.19%. **Conclusion:** The established method can be used for the quality specification of pinecone.

[**Key words**] pinecone; quality specification; isopimaric acid; TLC; HPLC

松塔的药史悠久,始载于《名医别录》,《纲目拾遗》、《本草求真》均有记载。松塔系松科松属植物的球果,别名松球、松实、松元,曾收载于《中国药典》1977年版一部^[1],具有祛痰、止咳、平喘之功效。目前,松塔水提物的抗肿瘤^[2-5]、抗病毒^[6-7]和抗菌^[8]等活性已经得到了国内外学者的证实。我国松科植物分布广泛,松塔资源非常丰富,而目前主要被农民当做燃料烧掉。为了更好的开发利用这一植物资源,本试验对12个不同来源云南松松塔样品药材进行了显微鉴别、水分、总灰分、酸不溶性灰分测定研究。另据文献报道,松塔中含有异海松酸等二萜类成分^[9],异海松酸为抗结核和其他3种耐药菌株的活性成分,本研究对云南松松塔中所含该活性成分采用TLC及HPLC进行了定性、定量研究,为制定松塔的质量控制标准、开发新药提供参考。

1 材料

Agilent 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),OLYMPUS BX41型生物显微镜,AL204-IC型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),SB5200DT型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),DZKW-4型电子恒温水浴锅(上海科析试验仪器厂),硅胶G预制薄层板(青岛海洋化工厂,100 mm × 200 mm,批号20110108),HPLC级甲醇(美国Fisher公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯;对照品为异海松酸(Sigma公司,批号089K1711)。松塔药材12批,经大理学院生药教研室周浓副教授鉴定为云南松 *Pinus yunnanensis* Franch 松塔。

2 方法与结果

2.1 药材性状、显微特征

2.1.1 性状 本品呈圆锥状卵形,由木质化螺旋状排列的种鳞组成,长5~11 cm,直径3.5~7 cm,熟时褐色或栗褐色,基部有果柄或残留果柄痕。种鳞背面先端宽厚隆起,为菱形有横脊的鳞盾,鳞盾肥厚

隆起,有横脊,鳞脐生于鳞盾的中央,微凹或微隆起,有短刺,熟后种鳞张开。种子卵圆形或倒卵形,长4~5 cm,连翅长1.6~2 cm。有特异的松香气,味微苦涩。

2.1.2 显微特征 本品粉末棕黄色,微有香气。具缘纹孔管胞较多,单个散在或聚集成束,直径20~25 μm。石细胞多见,黄色或棕黄色,单个散在或成群存在,类圆形或多角形,细胞壁木化增厚,直径30~150 μm,壁厚约20 μm。韧皮纤维长梭形;木纤维壁厚,木化,大多成束,直径12.5~25 μm。色素块多散在,棕色或红棕色,形状、大小及颜色深浅不一。薄壁细胞类圆形,内含丰富的糊粉粒及脂肪油滴,偶见散在的油滴。

2.2 浸出物、总灰分、酸不溶性灰分和水分的测定

2.2.1 测定方法 浸出物测定参照《中国药典》2010年版一部附录XA浸出物测定法,采用热浸法测定醇溶性浸出物,稀乙醇为溶剂;总灰分、酸不溶性灰分测定参照《中国药典》2010年版一部附录IXK灰分测定法;水分测定参照《中国药典》2010年版一部附录IXH水分测定法(烘干法)。

2.2.2 测定结果 12批样品的浸出物、总灰分、酸不溶性灰分和水分的测定结果见表1。

2.3 薄层色谱鉴别

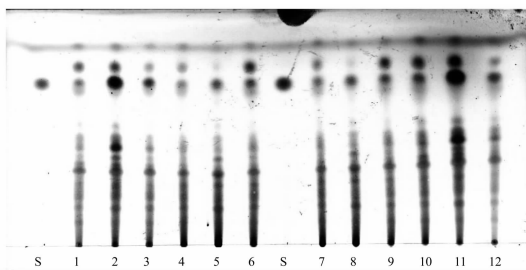
2.3.1 对照品溶液的制备 取异海松酸对照品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取松塔粉末1 g,加乙酸乙酯10 mL,加热回流30 min,过滤,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯3 mL使溶解,作为供试品溶液。

2.3.3 薄层色谱条件及结果 吸取上述两种溶液各8 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-乙酸(9:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茴香醛-浓硫酸试剂,在150 °C烘烤至斑点显色。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,见图1。

表 1 松塔药材各检查项目及药材异海松酸质量分数 %

No.	药材批次	来源	水分	总灰分	酸不溶性灰分	浸出物	异海松酸
1	100928	大理巍山	10.73	1.01	0.17	4.71	0.242 6
2	101008	大理巍山	10.75	1.05	0.19	4.28	0.253 4
3	101123	大理巍山	10.26	1.03	0.16	4.64	0.242 1
4	101224	大理巍山	10.81	1.11	0.18	4.58	0.258 5
5	110121	大理巍山	10.65	1.08	0.16	4.49	0.263 4
6	110226	大理巍山	10.76	1.04	0.19	4.52	0.246 6
7	100920	大理下关	10.33	1.03	0.17	4.50	0.257 6
8	101014	大理洱源	9.89	1.05	0.16	4.62	0.249 8
9	101002	楚雄武定	9.28	1.11	0.23	4.92	0.245 2
10	101005	楚雄大姚	9.37	1.11	0.21	5.28	0.254 3
11	110503	昆明宜良	9.50	1.05	0.17	4.97	0.262 9
12	110508	昆明嵩明	9.57	1.04	0.18	5.22	0.265 4



1~12. 松塔样品; S. 异海松酸对照品

图 1 松塔样品薄层色谱图

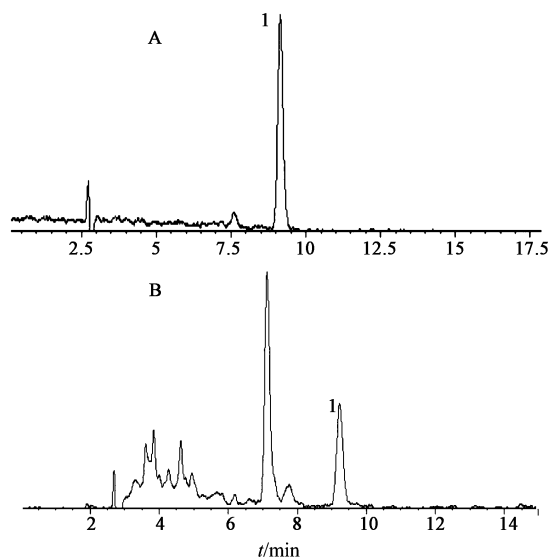
2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-2% 冰醋酸水溶液 (90:10) 为流动相, 流速 0.9 mL·min⁻¹, 柱温 25 ℃, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL。色谱柱的理论板数按异海松酸计算不低于 5 000, 分离度 > 1.5, 见图 2。

2.4.2 对照品溶液制备 取异海松酸对照品 12 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 使成为 1.260 5 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.4.3 供试品溶液的制备 称取松塔粉末 (4 号筛) 约 1.0 g, 精密称定, 各加入 15 mL 石油醚回流提取 30 min, 提取液过滤, 滤液蒸干, 精密加入 5 mL 甲醇溶解残渣, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 备用。

2.4.4 线性关系考察 精密量取对照品储备液 2.0 mL 置 5 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 配成 0.504 2 g·L⁻¹ 的对照品; 分别精密吸取上述对照品溶液 2, 5, 10, 12, 15, 18, 20 μL 注入高效液



A. 对照品; B. 样品; 1. 异海松酸

图 2 异海松酸对照品和松塔样品 HPLC

相色谱仪中, 测定峰面积。以异海松酸进样量 (μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 244.99X + 6.656 3$ ($r = 0.999 7$), 测定结果显示, 异海松酸进样量在 1.008 4 ~ 10.084 0 μg 线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 精密吸取异海松酸对照品溶液 (0.504 2 g·L⁻¹) 10 μL, 重复进样 6 次, 测得异海松酸色谱峰峰面积 RSD 0.19%, 显示具有良好的精密度。

2.4.6 重复性试验 精密称取云南松塔干燥粉末 6 份 (约 1.0 g), 按 2.4.3 项下操作, 精密吸取 10 μL 进样检测, 结果得样品中异海松酸含量的 RSD 1.26%, 表明方法的重复性较好。

2.4.7 稳定性试验 取供试液, 在 2.4.1 项色谱条件下, 于 0, 4, 8, 12, 24 h 分别测定异海松酸峰面积, 计算峰面积的 RSD 0.78%, 表明供试液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.8 加样回收率试验 称取同一批云南松塔粉末 9 份, 约 1.0 g, 精密称定, 分别加入异海松酸对照品适量, 按照 2.4.3 项下制备方法处理, 依法测定, 计算, 结果见表 2。

2.4.9 样品测定 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以外标法计算含量见表 1。色谱图见图 2。

3 讨论

3.1 薄层色谱条件的选择 分别考察了不同的展开系统, 如环己烷-三氯甲烷-丙酮、三氯甲烷-乙酸、

表2 异海松酸加样回收率

样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
2.366	4.827	97.62		
2.346	4.865	99.94		
2.451	4.893	96.87		
2.301	4.765	97.74	98.56	1.34
2.423	4.921	99.08		
2.277	4.801	100.11		

注:加入量均为2.521 mg。

苯-乙酸乙酯-乙酸、环己烷-乙酸乙酯-乙酸等,结果表明环己烷-乙酸乙酯-乙酸(9:1:1)作为展开剂斑点清晰、分离度好。考察了3种不同品牌的薄层板,硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂),硅胶G薄层板(青岛美高集团有限公司),自制硅胶G薄层板,均可对松塔中异海松酸成分进行定性鉴别。按照试验所得薄层色谱条件,考察本品在温度15~29℃、相对湿度为40%~70%展开时,对薄层色谱结果的影响。结果表明,在上述温度、相对湿度范围内对该薄层色谱结果无明显影响。

3.2 异海松酸 HPLC 定量测定条件的选择

3.2.1 样品溶液制备方法 对提取溶液(甲醇、乙醇、石油醚、水)、提取方法(超声、回流、温浸)、提取时间(30,60,90,120min)及料液比(10,15,20倍)进行考察,最终确定提取方法为用15倍量石油醚回流提取30 min。

3.2.2 色谱条件优化 考察了不同色谱柱 Agenglite XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)、Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)和 Phenomenex Gemini C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),其中 Phenomenex Gemini C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)柱对松塔中异海松酸成分分离效果较好,柱效高,故选择该柱进行含量测定。考察了不同流动相系统(甲醇-水、甲醇-2%冰醋酸、乙腈-2%冰醋酸),结果甲醇-2%冰醋酸、乙腈-2%冰醋酸均可达到分离效果,考虑乙腈成本较高,故最终确定用甲醇-2%冰醋酸(90:10)洗脱系统进行分离。考察了不同流速(0.9,0.95,1.0 mL·min⁻¹)、不同柱温(25,30,35℃),确定最佳流速为0.9 mL·min⁻¹,

柱温25℃。通过紫外全波长扫描确定异海松酸最大吸收为210 nm,在此波长处基线也较为平稳,故选择210 nm为检测波长。在上述条件下测得异海松酸以及RSD、分离度均符合定量测定要求。

《中国药典》1977年版仅对松塔药材进行了性状描述,缺乏定性、定量指标。本研究对12批松塔药材进行定性、定量研究,结果表明,各样品中均可检出活性成分异海松酸,因此选择异海松酸为指标成分建立松塔药材的质量标准,方法简便、快速、可靠,为松塔药材质量标准的制定提供依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,1977:334.

[2] Sakagami H, Konno K, Sato T, et al. Induction of antimicrobial activity by antitumor substances from pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc [J]. *Anticancer Res*, 1988, 8(4):581.

[3] Sakagami H, Ikeda M, Unten S, et al. Antitumor activity of polysaccharide fractions from pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc [J]. *Anticancer Res*, 1987, 7(6):1153.

[4] Kurakata Y, Sakagami H, Takeda M, et al. Mitogenic activity of pine cone extracts against cultured splenocytes from normal and tumor-bearing animals [J]. *Anticancer Res*, 1989, 9(4):961.

[5] Hiroshi N, Yoshiaki I, Mineko I, et al. Suppression by a pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb et Zucc of mammary tumour virus in milk of mice. [J]. *Anticancer Res*, 1992, 12:845.

[6] Sakagami H, Konno K, Nonoyama M. Anti-HIV agents; U S, 4, 985, 249 [P]. 1991-01-15.

[7] Patrick K L, Janet D, Hideaki T. Modification of human immunodeficiency viral replication by pine cone extracts [J]. *Aids Res Hum Retroviruses*, 1990, 6(2):205.

[8] Nagata K, Sakagami H, Harada H, et al. Inhibition of influenza virus infection by pine cone antitumor substances [J]. *Antiviral Res*, 1990, 13(1):11.

[9] 杨鑫,丁怡,张尔明,等. 华山松松塔化学成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(7):518.

[责任编辑 顾雪竹]