

不同采收期连翘挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的比较[△]

张淑蓉*, 裴晓丽, 王华阳(山西中医学院中药学院, 太原 030024)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4469-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.18

摘要 目的: 建立测定连翘挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的方法, 并比较不同采收期连翘中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的差异。方法: 采用水蒸气蒸馏法提取连翘挥发油, 以毛细管气相色谱法测定挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯的含量。色谱柱为HP-5弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m), 载气为氮气, 程序升温, 进样口温度为230 $^{\circ}$ C, 检测器(FID)温度为250 $^{\circ}$ C。以环己酮为内标物, 用内标法定量。结果: α -蒎烯、 β -蒎烯的质量浓度分别在0.164 0~0.820 0、0.502 0~2.510 0 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 6、0.999 4); 二者精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%; 平均加样回收率分别为100.99%、96.61%, RSD分别为2.19%、2.07% (n 均为9)。结论: 该方法简便、快速、准确, 可用于连翘挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的测定。各采收期连翘挥发油出油率及 α -蒎烯和 β -蒎烯含量以7月中下旬为最高。

关键词 连翘; 挥发油; α -蒎烯; β -蒎烯; 毛细管气相色谱法; 含量测定; 采收期

Comparison of the Contents of α -pinene and β -pinene in Volatile Oil of *Forsythia suspensa* in Different Harvest Periods

ZHANG Shu-rong, PEI Xiao-li, WANG Hua-yang (School of TCM, Shanxi College of TCM, Taiyuan 030024, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of α -pinene and β -pinene in volatile oil of *Forsythia suspensa*, and to compare the contents of α -pinene and β -pinene of *F. suspensa* in different harvest periods. METHODS: Vapour-distillation was employed to extract volatile oil from *F. suspensa*. The contents of α -pinene and β -pinene of volatile oil in *F. suspensa* were determined by GC. The determination was performed on HP-5 capillary column (30 m×0.25 mm×0.25 μ m) using nitrogen as carrier gas by temperature programming. The injector temperature was 230 $^{\circ}$ C, and the temperature of FID was 250 $^{\circ}$ C. The test was quantitatively analyzed by internal standard method using cyclohexanone as internal standard. RESULTS: The linear range was 0.164 0-0.820 0 mg/ml for α -pinene ($r=0.999 6$) and 0.502 0-2.510 0 mg/ml for β -pinene ($r=0.999 4$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. Average recoveries were 100.99% (RSD=2.19%, $n=9$) and 96.61% (RSD=2.07%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and suitable for the content determination of α -pinene and β -pinene in volatile oil of *F. suspensa*. The contents of α -pinene and β -pinene from volatile oil of *F. suspensa* in the middle and late of July are the highest.

KEY WORDS *Forsythia suspensa*; Volatile oil; α -pinene; β -pinene; Capillary GC; Content determination; Harvest period

- [4] Wang KJ, Yang CR, Zhang YJ. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*) [J]. *Food Chem*, 2007, 101(1):365.
- [5] Poon SL, Leu SF, Hsu HK, et al. Regulatory mechanism of *Toona sinensis* on mouse leydig cell steroidogenesis [J]. *Life Sci*, 2005, 76(13):1 473.
- [6] Hseu YC, Chen SC, Lin WH, et al. *Toona sinensis* (leaf extracts) inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) -induced angiogenesis in vascular endothelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(1):111.
- [7] Yang HL, Chang WH, Chia YC, et al. *Toona sinensis* extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human premyelocytic leukemia cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(12):1 978.
- [8] 沈玉萍, 钟雄雄, 余筱洁, 等. 中药香椿叶的化学成分研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(1):22.
- [9] Shen Y, Yin H, Chen B, et al. Validated reversed phase-high performance liquid chromatography-diode array detector method for the quantitation of rutin, a natural immunostimulant for improving survival in aquaculture practice, in *Toona sinensis* folium [J]. *Pharmacogn Mag*, 2012, 8(29):49.
- [10] 李争玲, 王旭波, 冉顶诗, 等. 香玲子的化学成分研究 [J]. *中国药房*, 2013, 24(27):2 540.
- [11] Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids [J]. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33(12):1 061.
- [12] Hsieh TJ, Wang JC, Hu CY, et al. Effects of rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(5):581.
- [13] Cheng KW, Yang RY, Tsou SCS, et al. Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon [J]. *J Funct Foods*, 2009, 1(3):253.

(收稿日期:2013-08-03 修回日期:2013-08-26)

△基金项目:山西省科技攻关项目(No.20120313015-4)

*教授, 硕士研究生导师。研究方向:中药活性成分分析及药效物质基础。电话:0351-2272269。E-mail:zhangsr62@163.com

连翘 (*Forsythiae Fructus*) 为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 秋季果实初熟尚带绿色时采收, 除去杂质, 蒸熟, 晒干, 习称“青翘”; 果实熟透时采收, 晒干, 除去杂质, 习称“老翘”^[1]。挥发油类成分是连翘抗菌、抗病毒作用的主要有效成分。连翘挥发油中主要含有 α -蒎烯 (α -pinene)、 β -蒎烯 (β -pinene)、 β -水芹烯 (β -phellandrene)、对-聚伞花烯 (p-cymene)、芳樟醇 (linalool) 等^[2]。目前, 对不同采收期连翘药材中挥发油及 α -蒎烯、 β -蒎烯含量的比较研究尚未见报道。因此, 本试验以水蒸气蒸馏法提取连翘挥发油, 参考相关文献^[3-6]建立了同时测定 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的毛细管气相色谱 (GC) 法, 并用于不同采收期连翘挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的比较研究。

1 材料

1.1 仪器

4890 型 GC 仪 (美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂

α -蒎烯对照品 [阿拉丁试剂 (上海) 有限公司, 纯度: 98%]; β -蒎烯对照品 (美国 Alta Aesarg 公司, 纯度: 99%); 环己酮、乙酸乙酯等试剂均为优级纯。

1.3 药材

连翘药材于 2011 年 7—10 月采于山西太原, 由山西中医药大学中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为连翘 *F. suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: HP-5 弹性石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μ m); 程序升温: 初始温度 50 $^{\circ}$ C, 以 5 $^{\circ}$ C/min 升温至 86 $^{\circ}$ C, 保持 3 min, 再以 20 $^{\circ}$ C/min 升温至 220 $^{\circ}$ C, 保持 1 min; 进样口温度: 230 $^{\circ}$ C; 检测器 (FID) 温度: 250 $^{\circ}$ C; 载气 (氮气) 流速: 1.0 ml/min; 采用分流进样, 分流比: 18:1; 空气流速: 350 ml/min; 氢气流速: 40 ml/min; 尾吹气流速: 34 ml/min。在此条件下, α -蒎烯、 β -蒎烯以及内标物环己酮的色谱峰与样品中其他成分色谱峰可达到基线分离。色谱见图 1。

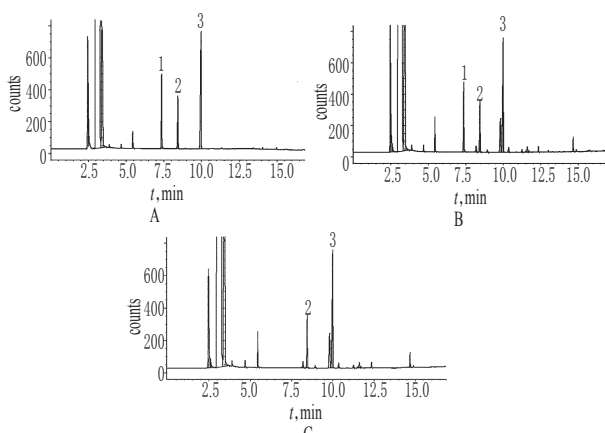


图 1 气相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品+内标; C. 供试品; 1. 环己酮; 2. α -蒎烯; 3. β -蒎烯

Fig 1 GC chromatograms

A. substance control; B. test samples+internal standard; C. test samples; 1. cyclohexanone; 2. α -pinene; 3. β -pinene

2.2 溶液的制备

2.2.1 挥发油的提取 将连翘药材粉碎成粗粉, 取 100 g, 精密

称定, 置圆底烧瓶中, 加水 700 ml 浸泡 0.5 h, 用水蒸气蒸馏法提取挥发油。连续回流 5 h, 收集到的挥发油用无水硫酸钠干燥后除去固体不溶物, 挥发油精密称定。不同采收期连翘挥发油的出油率见表 1。

表 1 样品含量测定结果 (n=3)

Tab 1 Results of content determination of samples (n=3)

样品编号	样品采收期	出油率, %	α -蒎烯质量分数, %		β -蒎烯质量分数, %	
			挥发油中	药材中	挥发油中	药材中
1	2011-07-07	1.52	14.70	0.224	46.90	0.713
2	2011-07-19	1.88	16.00	0.300	49.70	0.934
3	2011-07-31	1.71	15.60	0.267	49.20	0.841
4	2011-08-15	1.68	14.30	0.240	44.90	0.754
5	2011-08-27	1.56	16.70	0.260	49.70	0.775
6	2011-09-08	1.16	16.60	0.192	47.90	0.556
7	2011-10-04	1.33	16.90	0.225	49.20	0.654
8	2011-10-22	0.49	15.20	0.075	48.90	0.240

2.2.2 内标贮备液的制备 精密量取环己酮 0.5 ml, 置 50 ml 量瓶中, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 10 μ l/ml 的内标贮备液。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 分别取对照品 α -蒎烯 5 mg、 β -蒎烯 16 mg, 精密称定, 置同一 10 ml 量瓶中, 加 1 ml 内标贮备液, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 制成环己酮、 α -蒎烯、 β -蒎烯质量浓度分别为 1 μ l/ml、0.5 mg/ml、1.6 mg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液的制备 取连翘挥发油 30 mg, 精密称定, 置 10 ml 量瓶中, 加 1 ml 内标贮备液, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3 线性关系考察

取 α -蒎烯、 β -蒎烯对照品各适量, 置同一 10 ml 量瓶中, 用乙酸乙酯溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 α -蒎烯、 β -蒎烯质量浓度分别为 8.2、25.1 mg/ml 的混合对照品贮备液。分别精密吸取混合对照品贮备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加 1 ml 内标贮备液, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 1 μ l, 注入 GC 仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以 α -蒎烯或 β -蒎烯的质量浓度 (x) 为横坐标, α -蒎烯或 β -蒎烯峰面积与内标物的峰面积比值 (y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得 α -蒎烯的回归方程为 $y=1.358 1x+0.041 1$ ($r=0.999 6$, $n=5$), 线性范围为 0.164 0~0.820 0 mg/ml; β -蒎烯的回归方程为 $y=1.270 4x+0.107 3$ ($r=0.999 4$, $n=5$), 线性范围为 0.502 0~2.510 0 mg/ml。

2.4 精密度的试验

精密吸取混合对照品溶液 1 μ l, 注入 GC 仪, 按上述色谱条件连续进样测定 6 次。结果显示, α -蒎烯和 β -蒎烯峰面积的 RSD 分别为 0.65% 和 0.64% (n 均为 6), 表明仪器精密性良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样 1 μ l, 按上述色谱条件测定。结果显示, α -蒎烯和 β -蒎烯峰面积的 RSD 分别为 1.45% 和 0.92% (n 均为 6), 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.6 重复性试验

取同一批连翘药材 (3 号样品) 适量, 按“2.2.1”项下方法平行取样提取 6 次, 得平均出油率为 1.71%, RSD=1.69% ($n=6$); 再取同一连翘挥发油适量, 按“2.2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件分别进样测定。结果显示, α -

蒎烯的平均质量分数为 15.45%, RSD=2.69% (n=6); β -蒎烯的平均质量分数为 49.20%, RSD=2.84% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的连翘挥发油(3号样品)20 mg, 共9份, 分别精密称定, 置于10 ml量瓶中, 1~3号中分别加入 α -蒎烯质量浓度为3.0 mg/ml、 β -蒎烯质量浓度为10.0 mg/ml的混合对照品溶液0.8 ml, 4~6号分别加入该混合对照品溶液1.0 ml, 7~9号分别加入1.2 ml, 再分别加入内标贮备液1 ml, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件分别进样测定, 计算加样回收率, 结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

测定成分	挥发油取样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}/\%$	RSD,%
α -蒎烯	20.12	3.11	2.40	5.59	103.39	100.99	2.19
	19.94	3.08	2.40	5.51	101.22		
	20.31	3.14	2.40	5.50	98.42		
	20.92	3.23	3.00	6.29	101.93		
	20.47	3.16	3.00	6.11	98.25		
	20.62	3.19	3.00	6.23	101.47		
	21.08	3.26	3.60	7.01	104.25		
	20.45	3.16	3.60	6.70	98.35		
	20.26	3.13	3.60	6.79	101.66		
	β -蒎烯	20.12	9.90	8.00	17.59		
19.94		9.81	8.00	17.54	96.62		
20.31		9.99	8.00	17.49	93.72		
20.92		10.29	10.00	20.13	98.37		
20.47		10.07	10.00	19.51	94.39		
20.62		10.15	10.00	19.90	97.55		
21.08		10.37	12.00	22.36	99.91		
20.45		10.06	12.00	21.47	95.07		
20.26		9.97	12.00	21.70	97.77		

2.8 样品含量测定

取各批连翘药材粉末各适量, 分别按“2.2.1”项下方法提取挥发油, 再按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液。精密吸取对照品溶液和供试品溶液各1 μ l, 注入GC仪, 按上述色谱条件测定, 计算不同采收期连翘挥发油和药材中 α -蒎烯和 β -蒎烯的含量, 结果见表1; 不同采收期连翘中挥发油出油率与 α -蒎烯、 β -蒎烯含量的变化见图2。

3 讨论

从试验结果可以看出, 不同采收期的连翘药材中挥发油出油率及 α -蒎烯和 β -蒎烯的含量存在明显差异, 且三者呈现类似的规律性变化; 8批不同采收期的连翘药材中挥发油出油率及 α -蒎烯和 β -蒎烯的含量均以7月中下旬最高。此结果与笔者前期测定的不同采收期青翘中连翘酯苷、连翘苷和芦丁的含量变化趋势一致^[7], 即连翘药材中苯乙醇苷类、木脂素类、黄酮

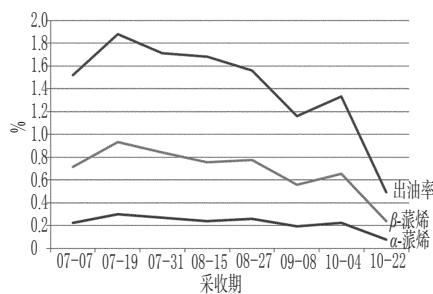


图2 不同采收期连翘中挥发油出油率与 α -蒎烯、 β -蒎烯含量的变化

Fig 2 Content changes of α -pinene and β -pinene in volatile oil of *F. suspensa* in different harvest periods

类及挥发性成分均以7月份含量最高, 以此时采收为宜。

本试验依据连翘挥发油及 α -蒎烯、 β -蒎烯的性质特点, 确定环己酮、萘和樟脑为备选内标物。经考察比较, 环己酮的沸点与 α -蒎烯和 β -蒎烯接近, 在两者之前出峰且与其他组分可达到基线分离, 又具有低毒的性质, 故最终确定环己酮为内标物。

文献报道测定连翘挥发油中有效成分的含量多采用GC法, 且采用外标法定量。由于GC法进样量少, 外标法误差较大, 故本试验采用环己酮作内标物, 用内标法定量, 消除了外标法在进样量、仪器稳定性等方面造成的误差, 使准确度、精密度得到了很大的提升。

综上, 本方法简便、快速、准确, 可用于连翘挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 159.
- [2] 孔杰, 姚健, 达文燕. 连翘挥发油化学成分的研究[J]. 西北师范大学学报, 2001, 37(4): 77.
- [3] 张文杰, 白旭东. 气相色谱法测定复方连翘油软胶囊中 α -蒎烯与 β -蒎烯的含量[J]. 实用药物与临床, 2007, 10(3): 191.
- [4] 张淑蓉, 裴晓丽, 裴香萍, 等. 山西地道连翘挥发油GC指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2729.
- [5] 裴晓丽, 张淑蓉, 王秀文, 等. 不同产地连翘中挥发油及其 β -蒎烯含量的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1): 127.
- [6] 王小琳, 陈彬华, 高原连翘抗病毒软胶囊中 β -蒎烯的GC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(2): 112.
- [7] 张淑蓉, 裴香萍, 闫艳, 等. 不同采收期青翘和连翘叶中活性成分的比较研究[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2940.

(收稿日期: 2013-01-07 修回日期: 2013-09-13)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊, 欢迎投稿、订阅