

## 反相高效液相色谱法测定植物组织中的水杨酸

邓文红<sup>1</sup> 张凤娟<sup>2</sup> 金幼菊<sup>1</sup>

(1 北京林业大学生物中心 2 河北科技师范学院生命科学系)

**摘要:**以五角枫叶片为实验材料,经预处理后用反相高效液相色谱测定了植物组织中水杨酸的含量.该方法摸索出了使水杨酸与其他酸性(或杂质)组分很好分离的液相色谱条件,建立了植物组织中水杨酸的定性定量方法.用该方法测定水杨酸标样的回收率高于 95%,精密度和重现性均较好(相对标准偏差为 0.42%).用该方法对实际植物样品的分析也取得了较理想的结果.

**关键词:**反相高效液相色谱,水杨酸,五角枫

**中图分类号:**S792.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1522(2007)01-0151-04

DENG Wen-hong<sup>1</sup>; ZHANG Feng-juan<sup>2</sup>; JIN You-ju<sup>1</sup>. **Determination of salicylic acid in the plant tissues using RP-HPLC.** *Journal of Beijing Forestry University* (2007) 29(1) 151-154 [Ch, 10 ref.]

<sup>1</sup> Biology Center of Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

<sup>2</sup> Department of Life Science, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli County, 066600, P. R. China.

Salicylic acid(SA) in the leaves of *Acer mono* was detected by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) after the tissues were pretreated. The analysis method for SA in the plant tissues was established. The recycle rate of this method was higher than 95%. Its relative standard deviation (RSD) was 0.42%. The results showed that SA was well separated from other acidic interferences, and the ideal quantitative data of SA in *A. mono* were obtained.

**Key words** reverse phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC), salicylic acid, *Acer mono*

水杨酸(Salicylic acid, SA)是植物体内含量较低的一种新的植物激素<sup>[1-2]</sup>,它在植物的生长发育中起着重要作用.近年来研究发现:SA 是系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)的重要诱导因子,也是植物受病原菌侵染后活化一系列防御反应途径中的重要信号组分.目前,关于废水、食品、医药中水杨酸含量的测定已有一些报道<sup>[3-10]</sup>,但植物样品中水杨酸含量的测定国内报道极少.本试验以五角枫叶为材料,摸索出用反相高效液相色谱测定植物组织中水杨酸含量的分析方法.

## 1 实验方法

### 1.1 实验材料

以 2 年生五角枫(*Acer mono*)为植物材料,测定

叶片损伤后不同时间内水杨酸的含量.

### 1.2 仪器与试剂

**仪器:**HP1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),系统配置为 G1315B 二极管阵列检测器, G1316A 柱温箱, G1313A 自动进样器, G1311A 四元泵, G1322A 在线脱气机以及 Agilent 色谱工作站.

**试剂:**乙腈为高效液相色谱专用(Fisher 公司);水为用 MILLI-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)处理过的去离子水;醋酸为 AR(分析纯,北京化工厂);水杨酸为 AR(北京化工厂).

### 1.3 色谱分析条件

**色谱柱:**Diamonsil C<sub>18</sub>反相色谱柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm, 迪马公司).流动相为 V(乙腈):V(5%的醋酸水溶液) = 25:75, 等梯度洗脱,流速为

收稿日期:2005-11-30

http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目:“863”国家高新技术研究发展计划(2003249070)、“十五”国家科技攻关项目(2001BA509B0903).

第一作者:邓文红,工程师.主要研究方向:色谱分析.电话:010-62338171 Email: Dengwh@bjfu.edu.cn 地址:100083 北京林业大学生物中心.

责任作者:金幼菊,教授,博士生导师.主要研究方向:化学生态学.电话:010-62338171 Email: youjujin@bjfu.edu.cn 地址:100083 北京林业大学 41 信箱.

1 mL/min;进样体积 10  $\mu$ L;检测波长为 302 nm,光谱记录范围 190~400 nm.用 Agilent 色谱工作站进行图谱分析,包括组分纯度测定和定量计算.

#### 1.4 水杨酸的提取与纯化

称取 0.5 g 五角枫叶片,加入抗氧化剂和适量的 90% 甲醇,低温下研磨成匀浆.置于 0~4 $^{\circ}$ C 抽提,8 000 r/min 离心取上清液.沉淀用 90% 甲醇再次提取 2 次,合并上清液.将上清液平均分成 2 份,分别用于游离水杨酸(free salicylic acid, FSA)和总水杨酸(total salicylic acid, TSA)的测定.上清液浓缩至水相,反复冻融,离心,加入 PVP 除去色素,抽滤.1 份滤液加入等体积的 2 mmol/L HCl,混匀后转入试管,封口,80 $^{\circ}$ C 温浴 1 h,使总水杨酸中结合态的水杨酸酸解为游离水杨酸,以测出其中总水杨酸的含量.然后在两份滤液中分别加入 2 mL 5% 三氯乙酸,用 3 mL V(乙酸乙酯):V(环己烷)=1:1 抽提 3 次,合并有机相,真空干燥至干.以 1.5 mL 70% 甲醇溶解沉淀,5 mL 70% 甲醇平衡 C<sub>18</sub> 小柱后,样品过柱,用 3 mL 70% 甲醇洗脱小柱,收集洗脱液.洗脱液真空干燥至干,250  $\mu$ L 流动相初始液溶解沉淀,过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜,供 HPLC 测定.

#### 1.5 水杨酸的定性及定量测定

根据水杨酸对照品的保留时间和该峰在 190~400 nm 区间的紫外(ultraviolet, UV)光谱对样品中的水杨酸定性.用 Agilent 色谱工作站测定纯度后,依照外标曲线计算水杨酸的含量( $\mu$ g/g 鲜重).

## 2 结果与分析

### 2.1 检测波长的选择

在所设定的扫描区间内,水杨酸最大吸收波长为 237、302 nm(图 1).为使水杨酸测定有最高灵敏度,记录了 237、302 nm 两个波长下的色谱图.从中比较了五角枫提取物在 237 和 302 nm 处的吸收图谱(图 2),发现 302 nm 处杂质干扰吸收和基线噪音均较小,且水杨酸有较好的吸收,最终选定 302 nm 为最佳检测波长.

### 2.2 水杨酸的标准曲线

精确称取水杨酸对照品,用甲醇配制成 6 个不同质量浓度(浓度介于 0.078~198.8  $\mu$ g/mL 之间)的标准溶液,按上述色谱条件依次分析各标准液(见图 3).

### 2.3 样品和水杨酸对照品色谱图比较

图 4A 为五角枫样品分离图谱,图 4B 为加有水杨酸内标的样品图谱,图 5 为水杨酸对照品图谱.所设定的色谱条件可使水杨酸与其他组分很好的分离,水杨酸的保留时间为 17.24 min.

### 2.4 流动相的选择

分别用甲醇-水、甲醇-0.1 mol/L 醋酸水、甲醇-

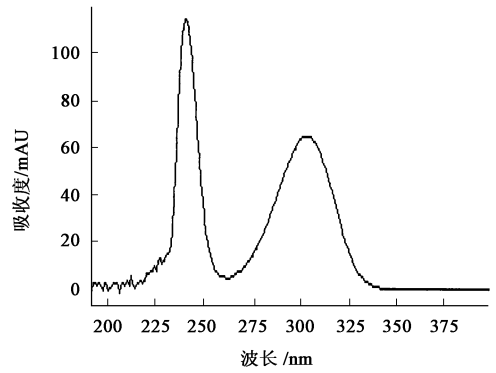


图 1 水杨酸的紫外吸收光谱图  
FIGURE 1 UV absorbance of SA

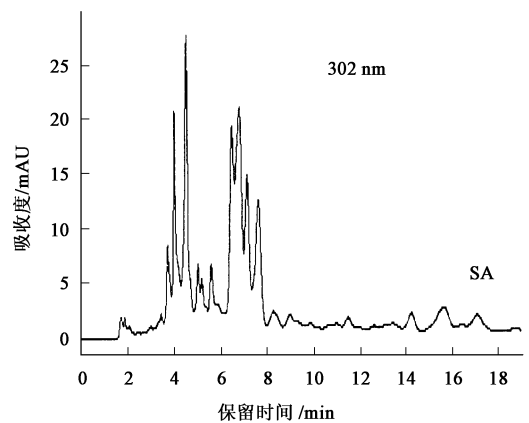
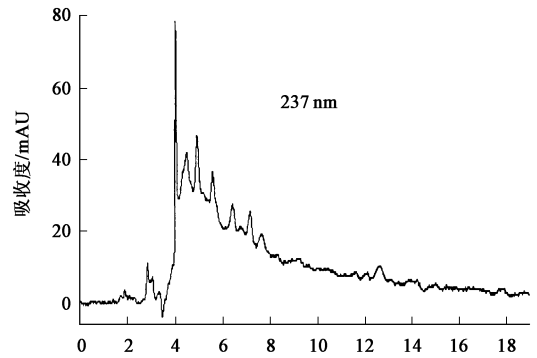


图 2 五角枫提取物在 237 和 302 nm 处的液相色谱图  
FIGURE 2 HPLC profiles of extracts of *A. mono* at the wave length of 237 and 302 nm

5% 醋酸水、乙腈-5% 的醋酸水 4 种流动相对水杨酸样品和对照品溶液进行分离试验.结果表明:以乙腈-5% 的醋酸水作流动相样品可达到比较理想的分离目的(图 4).当流动相流速定为 1 mL/min 时,随着乙腈比例的提高,各组分的保留时间均缩短,分离度降低.当乙腈体积分数大于 30% 时,色谱峰不能完全分离;而小于 15% 时,出峰时间太长,且峰形不好;当乙腈与 5% 的醋酸水的体积比为 25:75 时,水杨酸峰形对称,灵敏度高,重现性好,且与植物样品的本底有良好的分离,无干扰.因此选定体积比为

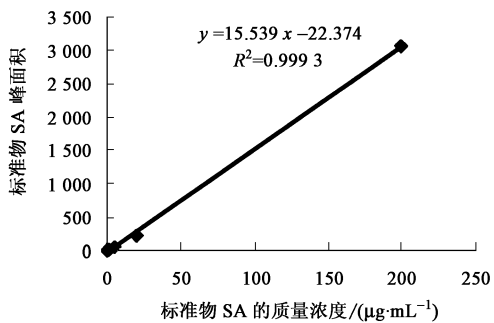


图 3 水杨酸标准曲线

FIGURE 3 Standard curve of SA

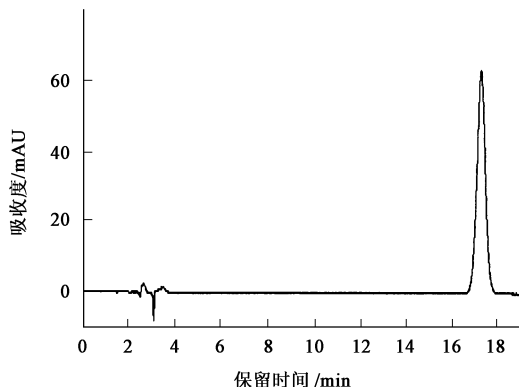


图 5 水杨酸对照品色谱图

FIGURE 5 Chromatogram of SA standard

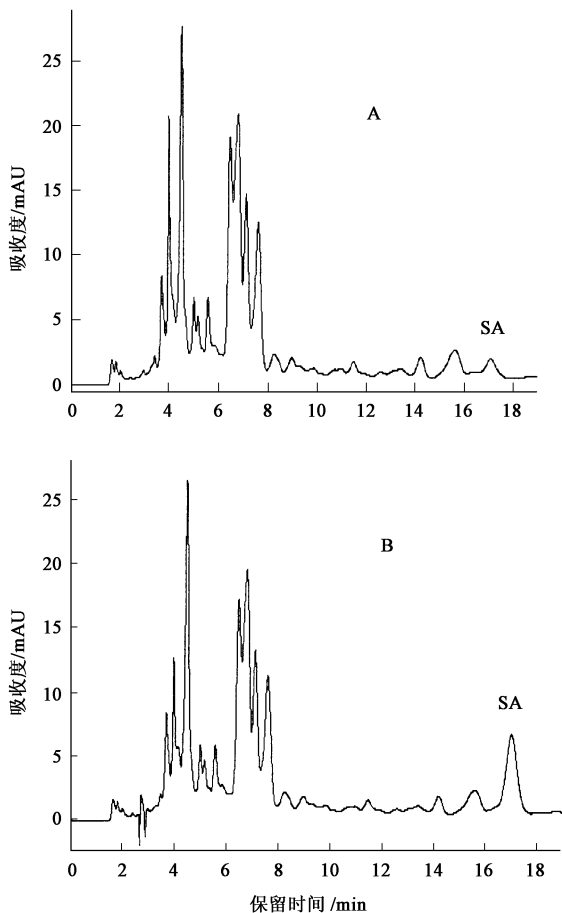


图 4 水杨酸样品色谱图

FIGURE 4 Chromatogram of SA in plant tissues

积累,使色谱系统的反压增大,并降低柱效,故样品分析前需作脱脂处理.常规样品处理采用正己烷、石油醚等非极性有机溶剂进行脱脂,但是用有机溶剂脱脂时间长,操作麻烦,还会在一定程度上造成水杨酸损失,影响分析结果.所以样品前处理过程中使用 C<sub>18</sub> 小柱可以使弱极性物质脂类、蜡质等保留在小柱上,而水杨酸在小柱上不保留,可简单快速地达到样品纯化的目的.另外,通过冻融、加 PVP 等可以除去色素和一些大分子物质.

2.6 方法的精密度

在上述色谱条件下,对同一对照品溶液重复测定 6 次后证实:水杨酸在此测定方法下,峰保留时间波动小于 0.078 min,测得水杨酸峰面积的相对标准偏差为 0.42%.

2.7 方法的回收率

精确称定已知水杨酸含量的样品 0.5 g,准确加入水杨酸对照品溶液,按供试品溶液的制备方法制备样品,测得其回收率为 95.4%~98.7%(表 1,2).

表 1 HPLC 法测定的总水杨酸的回收率

TABLE 1 Recovery rates of TSA by HPLC

测定次数	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	相对标准偏差/%
1	600	1 055.6	95.4	0.94
2	600	1 060.4	96.2	
3	600	1 075.4	98.7	
4	600	1 074.8	98.6	

注:RSD 为相对标准偏差.下同.

表 2 HPLC 法测定的游离水杨酸的回收率

TABLE 2 Recovery rates of FSA by HPLC

测定次数	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	相对标准偏差/%
1	250	415.0	95.6	0.49
2	250	417.5	96.6	
3	250	418.8	97.1	
4	250	419.8	97.5	

2.8 供试样品的稳定性

取水杨酸对照品用甲醇配制成对照品储备液,

25:75 的乙腈与 5% 的醋酸水作为流动相.

2.5 样品前处理

酚类物质在极性有机溶剂中具有较大的溶解度,在甲醇中溶解性较好,故本试验选用 90% 甲醇为提取剂.对于 0.5 g 左右的样品,用 15 mL 浓度在 80% 以上的甲醇溶液 4℃ 抽提 10 h 以上可提取完全,实际选用 90% 甲醇 20 mL、4℃ 抽提 12 h.

植物样品中油脂类物、蜡质、色素等弱极性物质含量较高,这类物质会影响水杨酸的检测,并且在在本实验的流动相条件下不能完全洗脱,在 C<sub>18</sub> 柱上残留

置4℃冰箱保存.在上述色谱条件下,对同一供试品在保存0、24、48、72、96 h后,用当日新配制的对照品溶液按外标法测定,计算出的相对标准偏差小于0.3%,说明供试品在96 h内稳定.

## 2.9 五角枫叶片水杨酸的含量

按照本文所建立的RP-HPLC分析方法,分别对5个不同时间的五角枫叶片中总水杨酸、游离水杨酸的含量进行测定,结果见表3、4.

表3 总水杨酸的含量  
TABLE 3 Contents of TSA

样品	对照	损伤1 h	损伤3 h	损伤6 h	损伤9 h
含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	483.2	725.9	478.0	275.2	320.9
RSD/%	1.79	1.19	4.00	2.27	3.56

注:RSD为相对标准偏差.下表同.

表4 游离水杨酸的含量  
TABLE 4 Contents of FSA

样品	对照	损伤1 h	损伤3 h	损伤6 h	损伤9 h
含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	176.5	81.4	48.3	28.9	34.9
RSD/%	1.76	1.36	1.66	4.13	1.67

## 3 讨 论

用 $\text{C}_{18}$ 反相色谱柱,以甲醇和5%的醋酸水溶液为流动相,能使水杨酸得到较好的分离,这是由于水杨酸属酚酸类化合物,极性大,中性条件下可电离成阴离子,在 $\text{C}_{18}$ 反相色谱柱中保留时间短.在流动相中加入一定量的醋酸可使水杨酸以分子状态存在,此时水杨酸分子可在非极性的反相固定相表面疏水缔合而被保留,从而达到调整保留时间的目的,最终使水杨酸与其他组分分离.

关于水杨酸的提取方法,国内多采用甲醇溶液浸提,不经过任何提纯步骤,直接用高效液相色谱测定其含量<sup>[4-8]</sup>.此方法虽具有提取时间短、简单、快速的特点,但不适合植物材料中水杨酸的测定,主要原因在于植物材料中弱酸类杂质组分较多,对水杨酸的测定干扰较大.

本文关于水杨酸的测定方法灵敏度高、检测限低(达到ng级)、加样回收率达到95%以上.而且简便经济,一般实验室均可进行.

## 参 考 文 献

- [1] RASIN I. Role of salicylic acid in plants [J]. *Ann Rev Plant Physiology Mol Biol*, 1992, 43(5): 439-463.
- [2] RASIN I. Salicylate, a new plant hormone [J]. *Plant Physiol*, 1992, 99: 799-803.
- [3] 金鸣,张银华,黄河,等.血浆中水杨酸的高效液相色谱分析[J]. *中国法医学杂志*, 2004, 19(2): 86-88.

- JIN M, ZHANG Y H, HUANG H, et al. Determination of salicylic acid in human plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2004, 19(2): 86-88.
- [4] 陈文利,欧阳怡德,李蕾.高效液相色谱法测定废水中水杨酸及相关物质的含量[J]. *分析科学学报*, 2003, 19(3): 297-298.
- CHEN W L, OUYANG Y D, LI L. Determination of salicylic acid and its correlation compound using high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Analytical Science*, 2003, 19(3): 297-298.
- [5] 董煜,赵远征,张怡娜.高效液相色谱法测定注射用赖氨匹林中的阿司匹林及游离水杨酸[J]. *色谱*, 2002, 20(3): 277-278.
- DONG Y, ZHAO Y Z, ZHANG Y N. Determination of aspirin and free salicylic acid in lysinipirine injection by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2002, 20(3): 277-278.
- [6] 曾红,孙国详,岑立济.反相高效液相色谱法测定鞣裂平酞剂中水杨酸、间苯二酚、氯霉素的含量[J]. *色谱*, 2001, 19(4): 370-371.
- ZENG H, SUN G X, CEN L J. Determination of salicylic acid, resorcinol and chloramphenicol in junlieping tincture by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2001, 19(4): 370-371.
- [7] 郭兴杰,周密.高效液相色谱法测定皮炎宁酞中间苯二酚和水杨酸的含量[J]. *色谱*, 1998, 16(6): 532-533.
- GUO X J, ZHOU M. Determination of resorcinol and salicylic acid in piyaning tincture by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 1998, 16(6): 532-533.
- [8] 李俊松,万伟中,张淑芳.反相高效液相色谱法同时测定水杨酸原料中水杨酸和微量杂质苯酚含量[J]. *中国医院药学杂志*, 1995, 15(11): 504-505.
- LI J S, WAN W Z, ZHANG S F. Determination of salicylic acid and a few phenol in raw material of salicylic acid by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 1995, 15(11): 504-505.
- [9] 叶芝祥,杨迎春,江奇,等.紫外光谱法同时测定制药废水中苯酚和水杨酸的研究[J]. *光谱实验室*, 2000, 17(3): 274-276.
- YE Z X, YANG Y C, JIANG Q, et al. Research on simultaneous determination of phenol and salicylic acid in pharmaceutical waste water by UV spectrophotometry [J]. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2000, 17(3): 274-276.
- [10] 焦丽芳,李宇展,顾登平,等.分光光度法测定水杨酸的含量[J]. *河北师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 26(6): 606-608.
- JIAO L F, LI Y Z, GU D P, et al. Determination of salicylic acid by UV spectrophotometry [J]. *Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition)*, 2002, 26(6): 606-608.

(责任编辑 赵 勃)