

Analysis of Shikimic Acid Content in the Needle of *Larix gmelinii* by HPLC

Wenbo Gao, Lili Li, Xinqi Du, Guoqiang Cui, Fengli Chen

Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang
Email: tangzh@nefu.edu.cn

Received: Dec. 11th, 2015; accepted: Dec. 24th, 2015; published: Dec. 30th, 2015

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

In this paper, the dynamic change of shikimic acid contents in the needle of *Larix gmelinii* during a year was studied using the method of HPLC. The fresh pine needle from the upper, middle and lower parts of 5 *Larix gmelinii* trees with the same age was collected from middle of March to middle of November in 2015. The weight per sample was 300.0 g. The samples collected in the same month were homogeneous mixing and dried in the shade. Before using, the sample was grounded and sieved into homogeneous size. The dried sample powder was mixed with methonal for ultrasonic treatment to extract shikimic acid. The extract was concentrated and re-solved for analysis of HPLC. The results showed that the shikimic acid contents in the needle of *Larix gmelinii* ranged from 0.04% to 0.44%, while the contents of shikimic acid in *Larix gmelinii* changed during different months. The highest content reached 0.44% in the middle of June, with the time increasing; the lowest content reached 0.04% in November. The paper determines the contents of shikimic acid contents in the needle of *Larix gmelinii*, in order to find a good substitute of raw materials for industrial production of shikimic acid.

Keywords

Shikimic Acid, Needle, *Larix gmelinii*, Content

HPLC法测定兴安落叶松针叶中莽草酸含量

高文博, 李丽丽, 杜新奇, 崔国强, 陈凤丽

东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨
Email: tangzh@nefu.edu.cn

收稿日期：2015年12月11日；录用日期：2015年12月24日；发布日期：2015年12月30日

摘要

本文采用高效液相色谱法(HPLC)对北方常见松科树种兴安落叶松针叶中莽草酸含量及其全年动态变化进行分析。从2015年5月份开始采摘新鲜松针叶片，采样时间为每月15日，选取5株树龄相近的兴安落叶松树，每次分别从同株树的上、中、下三个部位各采集新鲜叶片300.0 g，直至本年11月针叶脱落为止。所采集松针叶片按照采集月份分为7份，混合均匀，阴干。干燥叶片研磨粉碎后，采用超声辅助法，用甲醇提取针叶中的莽草酸，提取液经减压浓缩，甲醇复溶后，进行HPLC检测分析。HPLC检测结果表明：兴安落叶松针叶中莽草酸平均含量全年变化范围为0.04%~0.44%。在不同时期，兴安落叶松针叶中莽草酸的含量不同，在6月中旬含量达到最大值0.44%，而11月份达到最低值0.04%。本文对兴安落叶松针叶中莽草酸的含量进行初步测定，并为工业上生产莽草酸的原料找到良好的替代品。

关键词

莽草酸，针叶，兴安落叶松，含量

1. 引言

莽草酸为一种白色结晶性粉末，易溶于水，难溶于氯仿、苯和石油醚；具有抗炎和镇痛作用，并可影响花生四烯酸代谢抑制血小板聚集，抑制动、静脉血栓及脑血栓形成[1]；自禽流感疫情受到世界的普遍关注后，治疗其特效药物磷酸奥司米韦(Oseltamivir Phosphate)日益受到重视，而合成这种药物的重要中间体就是莽草酸[2]-[6]。传统的制备工艺都是从八角茴香中提取分离莽草酸的[7]，但由于八角茴香在全球仅少数地区才有分布，在我国只有4个省份生长，却占全世界90%以上的总产量。通常只在3月~5月收获[8]，且我国种植八角茴香主要用于食品调料，导致制备莽草酸原料资源极度缺乏。同时，野生八角茴香的应用受地理与自然条件的限制，野生八角茴香产量有限。基于八角茴香受到产量与成本等方面的影响因此寻找新的莽草酸资源变得极为重要。在不影响植物生长的前提下，适当采摘针叶作为替代八角茴香分离莽草酸的原料，将可解决八角茴香资源匮乏的难题。

兴安落叶松(*Larix gmelinii* Rupr.)在东北大小兴安岭地区分布极为广泛，是东北主要树种之一，被广泛应用在建筑、造纸、木材加工等行业。东北松科植物兴安落叶松的主要利用部位为木质部，而针叶往往作为废弃物未加利用。有研究曾报道松叶中含有莽草酸[9]，而兴安落叶松针叶中提取莽草酸却鲜有报道，鉴于东北兴安落叶松的广泛分布以及莽草酸的重要药用价值，开展兴安落叶松针叶中莽草酸含量的系统分析，对松科植物兴安落叶松的综合开发利用具有重要价值。为此，本文以人工栽培的兴安落叶松针叶为材料，通过高压液相色谱法(HPLC)检测其针叶中药用中间体莽草酸含量及其动态变化，以为兴安落叶松植物资源的综合开发利用提供科学依据。

2. 研究地区与研究方法

2.1. 研究地概况

研究地位于黑龙江省哈尔滨市东北林业大学校园(N45°43.096', E126°38.036')，年平均气温3.5℃，无霜期140天，年日照时数2500小时，年降水量480mm。

2.2. 仪器与材料

2.2.1. 实验仪器

717 型自动进样高效液相色谱仪, 包括 1525 二元泵和 2487 型紫外光检测器, 美国 Waters 公司产品; KQ-250DB 型台式数控超声波清洗器, 购自昆山市超声仪器有限公司; BS124S 电子天平, 购自北京赛多利斯仪器系统有限公司; 3K30 型离心机, 美国 SIGMA 公司产品。

2.2.2. 实验材料和试剂

兴安落叶松经东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室王文杰教授鉴定为目标树种。在人工培育样地内选择 5 株树龄为 25 年左右的兴安落叶松。采样时间为 2015 年 5 月~11 月, 每月中旬 15 号, 分别摘取同株上、中、下三个部位的新鲜落叶松叶片 300.0 g, 将每月采摘的样品混合均匀, 按照采摘月份将样品分为 7 份, 阴干。将干燥后的样品分别粉碎, 筛取粒径为 200~300 μm 部分备用。莽草酸对照品购自 Sigma 公司; 色谱分析用二次蒸馏水自制, 其它试剂为国产分析纯。

2.3. 莽草酸的提取检测方法

2.3.1. 分析方法

采用高效液相色谱(HPLC)方法检测, 其色谱条件为: 0.01% 硫酸水溶液, 色谱柱为 AichromBond-AQ C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 213 nm, 进样量 10 μL 。

2.3.2. 标准曲线的绘制

精密称取莽草酸标准品 20.00 mg, 用甲醇溶解并于 10 mL 容量瓶中定容, 得到浓度为 2 mg/mL 的标准品储备液。将标准品储备液稀释成不同浓度进行 HPLC 检测, 对标准品浓度和峰面积进行线性回归, 得回归方程: $y = 30457411x + 41136$, $r^2 = 0.9998$, 且莽草酸标准品在 0.2~2 mg/mL 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3. 样品中莽草酸的含量测定

精确称取不同月份样品粉末 2 g, 并与 40 mL 甲醇混匀, 超声 30 min·次⁻¹, 共 3 次, 每次超声后过滤, 合并滤液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩并定容至 20 mL, 分别取样 1 mL, 离心(离心条件: 温度 25 $^{\circ}\text{C}$; 速度 12,000 r·min⁻¹; 时间 5 min), 取上清液检测, 每样重复进样 3 次, 将峰面积取平均值, 代入回归方程, 计算莽草酸含量。

本试验中所有试验均重复 3 次, 每个实验结果均为平均值 \pm 标准偏差(SD)。各结果的平均值采用方差(ANOVA)分析(SPSS17.0)进行比较分析。

3. 结果与讨论

3.1. 兴安落叶松针叶莽草酸含量变化规律

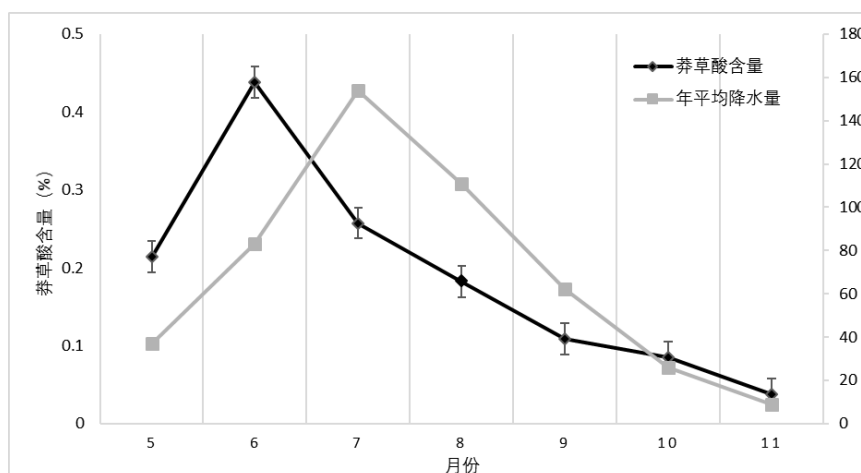
由表 1 可以看出, 从 5 月新叶萌发至 11 月针叶停止生长, 兴安落叶松针叶中莽草酸含量随时间变化规律明显。5 月中旬, 所测莽草酸含量为 0.21%, 五月中旬到 6 月中旬, 莽草酸含量呈增长趋势, 增加幅度较大, 并达到全年峰值 0.44%。六月中旬至七月中旬, 兴安落叶松针叶中莽草酸含量急剧下降, 下降到 0.26%。七月中旬到十一月中旬, 莽草酸含量持续下降, 到十一月中旬, 莽草酸含量已经降低到 0.04%, 为全年最低值。纵观, 莽草酸含量的全年变化, 呈先增加后降低的趋势。因此采摘新鲜叶片提取莽草酸最佳的时间为每年六月中旬。此部分实验结果稳定, 可为莽草酸的进一步研究提取可靠的理论依据。

3.2. 莽草酸含量与年平均降水量的关系

如图 1 所示兴安落叶松针叶中莽草酸含量随时间变化趋势与 2015 年哈尔滨年平均降水量趋势图。图

Table 1. The content of shikimic acid in the needle of *Larix gmelinii* in different months**表 1.** 不同月份兴安落叶松中莽草酸的含量

采集时间	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月
莽草酸含量(%) \pm SD	0.21 \pm 0.03	0.44 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03	0.18 \pm 0.04	0.11 \pm 0.04	0.09 \pm 0.04	0.04 \pm 0.05

**Figure 1.** The relationship between shikimic acid contents of needle of *Larix gmelinii* and mean annual precipitation**图 1.** 兴安落叶松针叶中莽草酸含量与年平均降水量关系

中随着时间的增加,兴安落叶松针叶中莽草酸含量随着降水量的增加而逐渐增加。在5月,当年生新叶休眠芽刚刚萌发,处于初级代谢产物合成最为旺盛时期,而莽草酸含量与净光合速率在一定程度上呈现反比例关系,因此新叶中莽草酸含量均较低;而在6月,光照增强、光照时间延长以及降水量、温度的增加,激活了植物体相关各种酶的活性,这个时间内也致使植物叶片生长旺盛,并使莽草酸含量在叶片中积累并达到峰值[10]。随着时间的增加,东北进入到暑期,温度降水量等条件继续增强,植物叶片的生长也达到饱和阶段,此时土壤湿度、光照以及温度等条件更加适宜植物体木质部的生长,也使得叶片中的莽草酸含量逐渐降低。直到进入十一月中旬,兴安落叶松代谢速率逐渐降低,兴安落叶松松叶开始脱落,叶片中的莽草酸含量也达到最低值。

笔者认为,兴安落叶松属于北方特有树种,喜强光、多水的环境,随着降水量、光照、温度的增加,植物体内各种酶活性被激活,这也为植物的生长提供了必要的前提。6月份植物体主要生长叶子部分,这也为次级代谢产物莽草酸在叶子中的积累奠定基础。直到降水量、温度、光照量的增加,植物的代谢速率继续加快,但叶子中光合作用速率加快,快速的将糖类运输到植物体其他部位,这就导致落叶松针叶内莽草酸含量逐渐降低,11月底,北方气候不再适宜植物的生长,大量脱落酸作用导致叶片脱落,植物叶片中的莽草酸也达到最低。

4. 结论

本研究中,虽然兴安落叶松莽草酸含量不算高,但作为我国东北地区主要的速生丰产林造林树种,其分布面积广,每年都有大量针叶产出,在短时期内可大量收集,有利于采收和利用,可为实际生产的成本的降低提供了良好的生产材料,松科植物针叶来源更广泛、成本更低、更有利于莽草酸的生态化生产与利用,并有效弥补莽草酸原料不足的缺点,补充原料储备,也可以更有效的利用现有资源,降低工业生产成本,且不会破坏植物体本身,有利于生态保护。

基金项目

林业公益性行业科研专项(201304601)资助。

参考文献 (References)

- [1] 刘永友, 廖晓峰. 莽草酸的研究进展[J]. 化工时刊, 2007, 21(3): 54-57.
- [2] 程能能, 陈斌艳, 王永铭. 新型口服抗流感药——奥司他韦[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 11(1): 57-59.
- [3] John, J., Frederick, G., Peter, S., *et al.* (2002) Efficacy and Safety of the Oral Neuraminidase Inhibitor Osetamivir in Treating Acute Influenza. *JAMA*, **283**, 1016-1019.
- [4] John, C.R., Kenneth, M.K., Michael, J.P., *et al.* (1998) Practical Total Synthesis of the Anti-Influenza Drug GS-4104. *Journal of Organic Chemistry*, **6**, 45-46.
- [5] Federspiel, M., Fischer, R., Hennig, M., *et al.* (1999) Industrial Synthesis of the Key Precursor in the Synthesis of the Anti-Influenza Drug Oseltamivir Phosphate. *Organic Process Research & Development*, **43**, 266-268.
<http://dx.doi.org/10.1021/op9900176>
- [6] Becker, M.W., Chapman, H.H., Kelly, D.E., *et al.* (1999) Preparation of Carbocyclic Compounds. WO, 9955664.
- [7] 林海祿, 彭雪娇, 罗明标, 等. 八角茴香中莽草酸超声提取工艺研究[J]. 食品科技, 2007, 5(4): 76-78.
- [8] 李伟, 曹庸. 八角茴香及其提取物莽草酸的研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2007, 24(3): 1-5.
- [9] 俞静静, 李风华, 陈素红, 吕圭源. HPLC 法测定不同产地马尾松和不同种属松叶中莽草酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 52-53.
- [10] 刘伟. 金露梅属 2 种植物的主要有效成分与生态因子的相关性研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012.