

程兰香,黄永光,周文美,等. 马尾松不同部位中莽草酸的含量分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):260-262.

# 马尾松不同部位中莽草酸的含量分析

程兰香<sup>1,2</sup>, 黄永光<sup>1,3</sup>, 周文美<sup>1,2</sup>, 赵辰路<sup>1,2</sup>, 张建敏<sup>1,2</sup>

(1. 贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州大学化学与化工学院, 贵州贵阳 550025; 3. 贵州省轻工业科学研究所, 贵州贵阳 550007)

**摘要:**采用蒸馏水加热回流提取马尾松不同部位中的莽草酸,用高效液相色谱法测定其莽草酸含量,并比较了不同树龄的马尾松松针中的莽草酸含量。结果表明:马尾松成熟松针中莽草酸的含量高于其他部位,最高为 3.289%,老树皮中莽草酸含量最低,为 0.04%;随着树龄的增长,松针中莽草酸含量逐渐减少,其中树龄为 5 年的马尾松松针中莽草酸含量最高,为 3.435%,树龄为 10 年的马尾松松针次之,为 3.274%。综合考虑,树龄为 10 年的马尾松成熟松针具有较高开发价值。

**关键词:**马尾松;莽草酸;含量测定;高效液相色谱

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2;R284.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2014)03-0260-03

马尾松(*Pinus massoniana*)是我国松属树种地理分布最广的一种,广泛分布于我国亚热带东南部湿润区,其生态环境复杂,变幅很大,是中国最重要的常见树种之一<sup>[1]</sup>。松树药用的代表部位是松针,松针的药用成分高于松树的其他部位,不但含有大量生物黄酮类物质、莽草酸、木脂素,还富多种维生素,现代研究表明松针提取物具有抗氧化、抗突变、降血脂、降血糖等功能<sup>[2-4]</sup>。

莽草酸,化学名为 3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸,是一种易溶于水的白色精细粉末,是各种芳香族化合物的来源,也是一些次生代谢产物的重要原料。莽草酸通过影响花生四烯酸代谢,可作为抗病毒和抗癌药物中间体,不仅抑制动、静脉血栓及脑血栓形成,还能抑制血小板聚集,具有抗炎、镇痛作用<sup>[5]</sup>。

莽草酸最早是从有剧毒的日本八角茴香花朵中分离出来的。在美国大量分布的北美枫香树的树叶和种子中也含有莽草酸,种子中其含量为 3.7%<sup>[6]</sup>。据国外研究报道,几种松树如冷杉、云杉等的针叶中含有莽草酸,欧洲赤松松针中莽草酸含量为 1.6%<sup>[7]</sup>。国外对于马尾松松针中莽草酸的提取与测定几乎没有报道。目前,中国八角茴香是莽草酸主要的提取来源,其含量高达 10% 左右,但是仅从八角茴香里提取,无法满足市场对莽草酸的需求,而且提取成本高<sup>[8]</sup>。此外,莽草酸还可以通过微生物代谢、化学合成、微生物生物转化来产生<sup>[9]</sup>。据报道,马尾松松针中也含有莽草酸,国内对于马尾松松针中莽草酸的提取与测定研究报道较多,但对马尾松不同部位的莽草酸含量测定报道较少,对不同树龄的马尾松松针中莽草酸含量测定尚未报道。为了更合理充分地开发和利用马尾松

资源,筛选更理想的莽草酸提取原料资源来源,科学地实现自然生态建设与资源高效开发利用,对生态林中马尾松不同部位与不同树龄的马尾松松针中莽草酸含量进行了研究分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

马尾松样品,采集于贵州省贵阳市花溪区自然生态林;莽草酸标样(贵州迪大生物有限公司,纯度≥98%);乙腈为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器

LC-10Avp 高效液相色谱仪(日本岛津公司);RE-52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);FA2004N 电子天平(上海菁海仪器有限公司);SHZ-Ⅲ循环水式真空泵(上海亚荣生化仪器厂);电动离心机(常州澳华仪器有限公司);HH-6 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 标样储备液的制备** 精确称取干燥至恒重的莽草酸标样 10.0 mg,置于 100 mL 容量瓶中用超纯水溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度为 0.1 mg/mL 的标样储备液。

**1.3.2 样品供试液的制备** 精确称取已干燥粉碎(过 60 目筛)的马尾松样品(马尾松各部位样品均来自同一条件下的原料,不同树龄的松针均为成熟松针)2.0 g 于圆底烧瓶中,加入 40 mL 蒸馏水 95 ℃ 下回流提取 2.5 h。提取液过滤,离心,在减压水浴装置下浓缩,将浓缩液倒入 100 mL 容量瓶中用超纯水定容至刻度。从容量瓶中移取 1 mL 提取液于 25 mL 容量瓶中用超纯水定容至刻度,临用前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

莽草酸含量 = 提取液中莽草酸的质量/样品的质量 × 100%。

**1.3.3 色谱条件** 岛津 LC-10Avp 型高效液相色谱仪,SPD-10Avp 检测器。色谱柱:Shodex Asahipak NH<sub>2</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流动相:乙腈:2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (体积比 80:20);流速:0.8 mL/min。测定波长 213 nm,柱温 40 ℃。对照品溶液和供试品溶液分别进样 20 μL。

收稿日期:2013-07-09

基金项目:贵州省科技厅重大专项(编号:黔科合重大专项字[2012]601-5)。

作者简介:程兰香(1985—),女,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向为食品资源利用。E-mail:chenglx325@163.com。

通信作者:黄永光,博士研究生,高级工程师。E-mail:772566120@qq.com。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制作

精确量取莽草酸标样储备液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 分别置 10 mL 容量瓶中,加入超纯水稀释至刻度,摇匀,得系列质量浓度的对照品溶液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤待用。分别精确吸取莽草酸对照品溶液 20 μL 注入色谱仪,测得峰面积。以标样峰面积(y)对浓度(x)进行线性回归分析,求出回归方程: $y = 62\,882x + 21\,111$ ,  $r^2 = 0.999\,7$ ,在 5.00 ~ 30.00 μg/mL 的范围内,莽草酸浓度对峰面积有良好的线性关系。

2.2 精密度试验

精确吸取莽草酸标样溶液(20.00 μg/mL)20 μL,重复进样 5 次,测定色谱峰峰面积分别为 1 275 831、1 274 462、1 260 014、1 286 493、1 270 026,其 RSD 为 0.767%,精密度良好,符合分析要求。

2.3 重复性试验

称取马尾松松针粉末(树龄为 10 年左右的成熟松针,过 60 目)2.0 g,按样品测定法重复测定 5 次,测得莽草酸含量分别为 3.228%、3.197%、3.288%、3.256%、3.19%,平均值为 3.262%,RSD 为 1.216%,重复性良好,符合分析要求。

2.4 稳定性试验

取松针供试液,在“1.3.3”节色谱条件下,于 0、4、8、12、24 h 分别测定莽草酸峰面积,分别为 1 645 591、1 630 190、1 655 802、1 649 043、1 638 921,计算峰面积的 RSD 为 0.769%,表明样品供试液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 加样回收试验

精确称取已知含量的马尾松松针粉末 2.0 g,共 5 份,分别精确加入规定量的莽草酸标样,按样品供试液制备及测定法操作,分别进行色谱分析,其平均回收率为 97.621%,RSD 为 0.949%,符合分析要求,结果见表 1。

表 1 莽草酸加样回收试验

样品中莽草酸含量(mg)	加入莽草酸量(mg)	测得莽草酸含量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
66.0462	1.5	67.494	96.520		
66.0264	1.5	67.485	97.240		
66.0198	1.5	67.490	98.013	97.621	0.949
66.0693	1.5	67.554	98.980		
66.0627	1.5	67.523	97.353		

2.6 样品测定

按照“1.3.2”节方法制备样品试液,连续平行测定 3 次,精确吸取样品供试液 20 μL,莽草酸标样储备液 20 μL,分别进入高效液相色谱仪,测定。各样品图谱见图 1,莽草酸平均出峰时间约为 5.8 min。样品测定结果见表 2 和表 3。

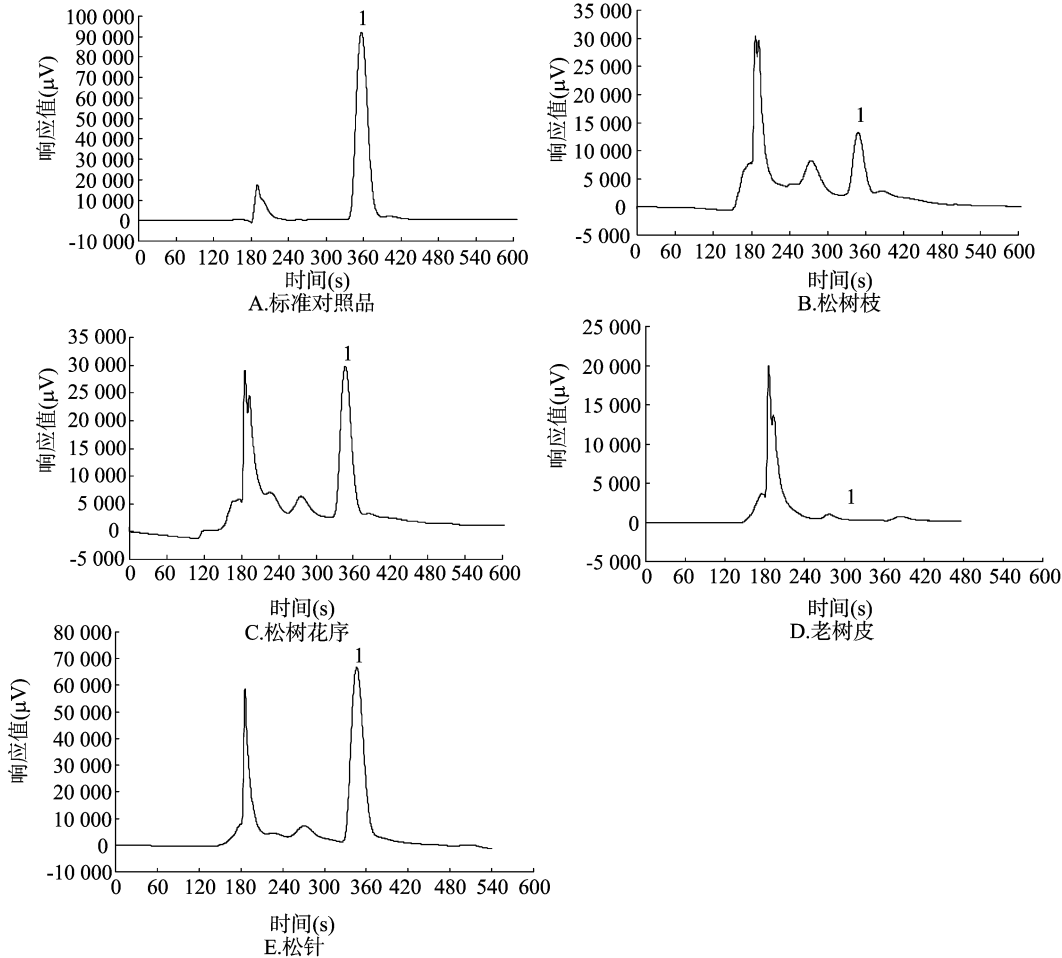


图 1 标准品与松树枝、松树花序、老树皮、松针样品HPLC色谱图

表 2 马尾松不同部位莽草酸的含量分析结果

分析部位	莽草酸含量(%)			
	平行 1	平行 2	平行 3	平均
松树枝	0.647	0.645	0.643	0.645
花序	1.312	1.308	1.310	1.31
老树皮	0.040	0.040	0.039	0.040
嫩松针	1.963	1.962	1.941	1.955
成熟松针	3.282	3.273	3.311	3.289
老松针	1.538	1.527	1.527	1.531

从表 2 可以看出,松针中的莽草酸含量要高于其他部位,是提取莽草酸的主要部位。马尾松的成熟松针莽草酸含量最高,达 3.289%;其次为马尾松的嫩松针,为 1.955%;老松针、松树枝、花序中莽草酸的含量相对较少;老树皮中莽草酸含量最少,几乎为零。可能是因为在马尾松松针中,莽草酸激酶的含量不同或活性的影响结果,导致莽草酸被代谢发生变化。

表 3 不同树龄马尾松松针中莽草酸的含量分析结果

树龄 (年)	莽草酸含量(%)			
	平行 1	平行 2	平行 3	平均
5	3.438	3.437	3.431	3.435
10	3.291	3.276	3.256	3.274
20	3.201	3.18	3.176	3.186
25	0.174	0.172	0.17	0.172

从表 3 可以看出,不同树龄的马尾松松针中莽草酸含量不同,随着树龄的增长,松针中莽草酸含量逐渐减少。树龄为 5 年左右的马尾松松针中莽草酸含量最高,高达 3.435%;树龄为 10 年和 20 年左右的马尾松松针中莽草酸含量相当,但比 5 年左右的要低一些。树龄为 10 年左右树龄的松针的营养成分比较完全,并且采集针叶时不会影响到松树的生长,最大限度地保留了松树的再生能力,适宜作为莽草酸提取的资源。

3 讨论与结论

3.1 样品的预处理以及提取溶剂的选择

据文献报道,莽草酸随着松针存放时间的延长而逐渐减少,可能是因为在莽草酸激酶的作用下,松针中的莽草酸经莽草酸途径代谢生成多种芳香族化合物,为了避免莽草酸的代谢转化,采集的马尾松松针样品应该及时烘干<sup>[10]</sup>。

莽草酸是小分子有机弱酸,易溶于水,在水中的溶解度为 180 g/L,难溶于三氯甲烷、苯和石油醚,并且水的成本较低,提取后无有害有机溶剂残留,经济环保,所以采用水作为提取溶剂。

3.2 样品中莽草酸提取工艺的优化

精确称取同一批马尾松样品干燥粉末 2.5 g,对影响莽草

酸提取效率的 4 个因素进行考察,设计 4 因素 3 水平的正交试验,即提取时间(1.5、2、2.5 h)、提取温度(75、85、95 ℃)、料液比(1:15、1:20、1:25)及原料粒度(40、60、80 目)。试验结果表明:提取时间为 2.5 h,提取温度为 95 ℃,料液比为 1:20,粒度为 60 目,提取效率最高。

3.3 方法的确定与含量分析

采用 HPLC 法测定马尾松样品中莽草酸的含量,该方法准确性、精确度和重复性良好,适合测定松针及其他天然植物中莽草酸的含量。由结果分析可知,马尾松的成熟松针具有较高的开发价值,在不同树龄的马尾松中,数龄为 10 年的马尾松适合开发利用,可以在不破坏植被的情况下最大限度地利用自然资源。

3.4 研究意义

本课题研究对资源的开发和利用提供了研究方法和应用基础参考数据,对马尾松生态林的建设、资源开发、生态修复提供了科学依据,对资源利用的节约化和高效利用均具有重要的综合意义。对于松针中莽草酸的分离纯化、成品制取、提取后废料的资源再利用,本课题组正在进行进一步的深入研究。

参考文献:

[1]李 丹,彭少麟. 马尾松地理种源遗传变异规律研究的综述与分析[J]. 应用生态学报,2000,11(2):293-296.

[2]陈 英,刘成国,赵毓芝,等. 松针功能性成分及应用研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(10):5994-5996.

[3]张 霞,孙爱东. 松针提取物的研究进展[J]. 中国食物与营养,2009(9):23-25.

[4]郑晓珂,王小兰,冯卫生. 松针提取物降血脂作用研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(3):81-82.

[5]顾小文,朱开梅. 莽草酸及其衍生物医学作用的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(6):1099-1101.

[6]Martin E,Duke J,Pelkki M,et al. Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.): extraction of shikimic acid coupled to dilute acid pretreatment[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2010,162(6):1660-1668.

[7]Ghosh S,Chisti Y,Banerjee U C. Production of shikimic acid[J]. Biotechnology Advances,2012,30(6):1425-1431.

[8]张中朋. 八角茴香、莽草酸生产市场概况[J]. 中国现代中药,2006,8(4):41-42.

[9]张军民,傅思武,石晓峰. 微生物代谢合成法在莽草酸及其衍生物研究中的应用[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(1):91-93.

[10]张志琴,刘光明,杨永寿,等. 云南松松针中莽草酸的含量测定[J]. 云南民族大学学报:自然科学版,2012,21(1):10-12.