

不同生境和年龄沙地柏茎叶中鬼臼毒素含量的 SFE-HPLC 分析*

程俊侠^{1a, b}, 苏世平², 杨永志³, 陈存根^{1b}, 张 兴^{1a, 4}

(1 西北农林科技大学 a 无公害农药研究服务中心; b 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省治沙研究所, 陕西 榆林 719000; 3 陕西榆林大保当臭柏自然保护区, 陕西 榆林 719300;

4 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对采自我国北方沙区 7 种不同生境(固定沙地、流动沙地、阳坡、阴坡、凸地、人工林和凹地)的沙地柏茎叶中鬼臼毒素含量进行了 SFE-HPLC 分析, 结果表明: (1) 7 种不同生境(按上述顺序)间沙地柏茎中鬼臼毒素平均含量分别为 2 512, 2 031, 2 328, 1 993, 2 567, 2 029 和 2 493 mg/g, 无显著性差异; 而在 7 种不同生境(按上述顺序)间沙地柏叶中鬼臼毒素平均含量分别为 8 613, 8 451, 8 303, 8 134, 8 012, 6 748 和 6 282.3 mg/g, 存在显著差异; (2) 7 种不同生境沙地柏叶中鬼臼毒素含量均明显高于茎; (3) 不同年龄沙地柏茎、叶中鬼臼毒素含量差异极显著, 茎中含量最高 5 211 mg/g, 最低只有 0 358.9 mg/g, 叶中最高为 9 268 mg/g, 最低为 5 186 mg/g; 按鬼臼毒素含量从高到底排序依次为: 1 年生叶 > 2 年生叶 > 1 年生茎 > 2 年生茎 > 3 年生茎。

[关键词] 沙地柏; 茎叶; 生境; 鬼臼毒素; SFE-HPLC

[中图分类号] Q 946.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)04-0057-04

沙地柏(*Sabina vulgaris* Ant.) 为柏科(Cupressaceae)圆柏属常绿匍匐灌木, 少数为乔木, 亦称叉子圆柏、臭柏、新疆圆柏及爬地柏等^[1], 是西北干旱半干旱沙区的一种重要治沙“乡土树种”; 对维护该区生态环境具有重要意义^[2]。同时, 沙地柏也是北方城市园林建设的一种新型绿化树种^[3, 4]。张兴等^[5, 6]在对我国西北地区杀虫植物筛选中, 首先发现并报道了其杀虫活性, 并进一步对沙地柏种子进行了系统研究, 证明鬼臼毒素物质是其主要活性成分之一, 具有较大的开发利用前景。

鬼臼毒素类物质是一类重要的生理活性物质, 除具杀虫活性外, 还有抗癌^[7]及除草^[8, 9]活性。目前临床上大量使用的抗癌药物 VP-16、VP-23 等均以天然鬼臼毒素为合成原料, 从而使其主要的原料来源小檗科(Berberidaceae)鬼臼亚科(Podophylloideae)植物资源面临枯竭^[10], 寻找替代植物资源成为解决这一问题的有效途径之一。沙地柏在我国分布广泛, 资源丰富, 有望成为鬼臼毒素类物质的主要天然资源。

对于沙地柏及其主要次生代谢物质鬼臼毒素类

化合物的综合开发利用而言, 明确其不同生境及植株不同部位和不同器官鬼臼毒素的含量是十分必要的。西北农林科技大学无公害农药研究服务中心对沙地柏种子中的鬼臼毒素类物质, 如鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素、苦鬼臼、表鬼臼等鬼臼类物质的分离纯化技术及其活性都进行了研究, 同时对鬼臼和脱氧鬼臼毒素的有关毒理进行了研究。但由于种子 3 年才能成熟, 因而利用种子作为植物源农药来源显然是不够的, 还有必要对沙地柏茎叶中鬼臼毒素含量进行研究。为此, 本研究对采自我国北方沙区 7 种不同生境的沙地柏茎叶中鬼臼毒素含量进行了 SFE-HPLC 分析, 以明确生态环境与沙地柏合成积累鬼臼毒素之间的关系, 为其进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 沙地柏茎、叶于 2003-12 采自陕西榆林大保当臭柏自然保护区。用烘箱在 60℃ 条件下烘干, 粉碎过 30 目(0.6 mm)筛, 保存于低温冰箱

* [收稿日期] 2004-09-22

[基金项目] 国家“863”科技攻关计划项目(2001AA 246016); 国家科技攻关计划“西部开发”重大项目(2004BA 901A 14)

[作者简介] 程俊侠(1980-), 女, 陕西白水人, 在读硕士, 主要从事化学生态研究。

[通讯作者] 张 兴(1951-), 男, 陕西周至人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物化学农药研究与开发。

(- 45)备用。

1.1.2 主要仪器 超临界流体萃取系统: ISCOTM 2-10 萃取仪, 260D 柱塞泵及泵控仪, 2 mL /m in 同轴加温限流管及其控制仪。

高效液相色谱系统: WatersTM 600E 泵, 996 PDA 紫外检测器, Millennium 色谱管理工作站。

1.1.3 化学试剂 鬼臼毒素标准品, 纯度大于 95%, 由兰州大学化学化工学院田暄教授提供 CO₂, 纯度不低于 99.9%, 陕西省兴平化工厂生产。分析纯级甲醇、二氯甲烷等试剂, 西安试剂厂生产。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 选择固定沙地、流动沙地、阳坡、阴坡、凸地、人工林和凹地等 7 种不同生境, 采集沙地柏 1 年生、2 年生和 3 年生茎及 1 年生和 2 年生叶。采用超临界 CO₂ 萃取技术(SFE)对不同沙地柏材料进行萃取, 并用高效液相色谱仪(HPLC)定量分析各萃取物中鬼臼毒素的含量。每处理设 3 次重复。采用二因素完全随机等重复试验方差分析法, 对试验结果进行统计分析。

1.2.2 沙地柏茎叶中鬼臼毒素超临界 CO₂ 萃取条件 采用先静态后动态的萃取方式, 静态萃取时间 5 min, 萃取压力 41.37 MPa, 萃取仓温度为 35 , 样品量为 1.0 g; 动态萃取 CO₂ 流量为 40 mL, 流速为 1.0 mL /m in, 限流管温度 60~ 65 , 收集溶剂为二氯甲烷。

1.2.3 萃取物中鬼臼毒素含量的高效液相色谱分析方法 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 反相柱; 流动相为甲醇-水(体积比)= 65:35, 流速为 1 mL /m in; 检测波长为 217 nm, 在此条件下鬼臼毒素与其他杂质峰分离度良好。配制不同浓度梯度鬼臼毒素标准液, 建立标准曲线, 采用外标法测定鬼臼毒素含量。

2 结果与分析

2.1 沙地柏茎中鬼臼毒素含量

从表 1 可以看出, 7 种不同生境间沙地柏 1 年生茎中鬼臼毒素含量无显著性差异, 7 种生境间 2 年生茎中鬼臼毒素含量间也无显著性差异。1 年生和 2 年生茎中鬼臼毒素含量分别为 2.893~ 5.211 mg/g, 1.522~ 2.669 mg/g; 而 3 年生茎中鬼臼毒素含量存在显著性差异, 流动沙地中鬼臼毒素含量仅有 0.358 9 mg/g, 而阴坡高达 1.355 mg/g, 在 5% 水平上流动沙地和阴坡间有显著性差异。同时, 从表 1 还可以看出, 在不同生境中, 随着年龄的增长, 沙地柏茎中鬼臼毒素含量逐年降低且降低程度不一。其中阴坡沙地柏茎中鬼臼毒素含量下降比较缓慢, 从 1 年生的 2.893 mg/g 降至 3 年生的 1.355 mg/g; 而固定沙地和流动沙地中降低较明显, 分别从 4.668 mg/g 降至 1.118 mg/g 和从 4.212 mg/g 降至 0.358 9 mg/g。以生境和年龄为变异来源, 对沙地柏茎中鬼臼毒素含量进行方差分析表明, 生境对沙地柏茎中鬼臼毒素含量无显著性影响。

表 1 不同生境和年龄沙地柏茎中鬼臼毒素的含量

Table 1 The content of the podophyllotoxin in *S. vulgaris* stems in different habitats and age conditions mg/g

生境 Habitat	1 年生 Annual	2 年生 Biennial	3 年生 Triennial	平均值 Means
固定沙地 Settled sands	4.668 aA	1.750 aB	1.118 abcC	2.512 a
流动沙地 Movable sands	4.212 aA	1.522 aB	0.358 9 cC	2.031 a
阳坡 Sunny slope	3.501 aA	2.301 aB	1.182 abcC	2.328 a
阴坡 Shady slope	2.893 aA	1.732 aB	1.355 aC	1.993 a
凸地 Protruding lands	3.987 aA	2.669 aB	1.045 abcC	2.567 a
人工林 Artificial woods	3.465 aA	1.974 aB	0.648 abcC	2.029 a
凹地 Concave lands	5.211 aA	1.710 aB	0.558 0 bcC	2.493 a

注: 1. 鬼臼毒素含量为 3 次重复的平均值。2. 表中大写字母表示同行间的差异。标不同大写字母者, 表示鬼臼毒素含量有显著性差异($P < 0.05$), 标相同大写字母者, 表示鬼臼毒素含量无显著性差异($P > 0.05$), 下表同。3. 表中小写字母表示同列间的差异。标不同小写字母者, 表示鬼臼毒素含量有显著性差异($P < 0.05$), 标相同小写字母者, 表示鬼臼毒素含量无显著性差异($P > 0.05$), 下表同。

Note: 1. Each value corresponds to the average of 3 replications. 2. In the table capital letters mean the different of the line, line followed by the different capital letter are significantly different ($P < 0.05$), followed by the same capital letter are not significantly different ($P > 0.05$), next table is same. 3. In the table m in is letters mean the different of the line, line followed by the different m in is letter are significantly different ($P < 0.05$), followed by the same capital letter are not significantly different ($P > 0.05$), next table is same.

由表 1 可知, 不同年龄沙地柏茎中鬼臼毒素含量间有极显著性差异。在 7 种生境中, 按鬼臼毒素含量从高到底排序依次为: 1 年生茎 > 2 年生茎 > 3 年生茎。在 1 年生茎中鬼臼毒素含量最高达 5.211

mg/g, 在 3 年生茎中鬼臼毒素含量最高只有 1.355 mg/g。

2.2 沙地柏叶中鬼臼毒素含量

从表 2 可以看出, 沙地柏 1 年生叶中鬼臼毒素含量在 7 种不同生境间无显著性差异, 鬼臼毒素含量在 7.379~9.268 mg/g; 2 年生叶中鬼臼毒素含量在 7 种不同生境间有显著差异, 流动沙地鬼臼毒素含量最高为 8.200 mg/g, 人工林中鬼臼毒素含量最低为 5.186 mg/g。对叶中鬼臼毒素含量的方差分析表明, 生境对沙地柏叶中鬼臼毒素含量有显著性影响。表 2 结果还表明, 在固定沙地和流动沙地中, 1 年生和 2 年生沙地柏叶中鬼臼毒素含量无显著性差异。固定沙地 1 年生叶中鬼臼毒素含量为 7.566 mg/g, 而 2 年生叶中为 7.126 mg/g; 流动沙地中 1 年生鬼臼毒素含量为 8.703 mg/g, 2 年生叶中为 8.200 mg/g。而其他 5 类生境中 1 年生叶与 2 年生叶中鬼臼毒素含量均有显著性差异。

表 2 不同生境、年龄沙地柏叶中鬼臼毒素含量

Table 2 The content of the podophyllotoxin in *S. vulgaris* leaves in different habitats and age conditions

生境 Habitat	mg/g		
	1 年生 Annual	2 年生 Biennial	平均值 Means
固定沙地 Settled sands	7.566 aA	7.126 abA	8.613 a
流动沙地 Movable sands	8.703 aA	8.200 aA	8.451 a
阳坡 Sunny slope	8.189 aA	5.307 bB	8.303 ab
阴坡 Shady slope	8.966 aA	7.635 aB	8.134 ab
凸地 Protruding land	9.248 aA	7.977 aB	8.012 ab
人工林 Artificial woods	7.379 aA	5.186 bB	6.748 bc
凹地 Concave land	9.268 aA	7.602 abB	6.282 3 c

3 小结与讨论

3.1 生境与沙地柏中鬼臼毒素含量的关系

本研究结果表明, 沙地柏中鬼臼毒素含量与生境之间的相互关系比较复杂, 不同生境沙地柏茎中鬼臼毒素含量无显著性差异, 而不同生境沙地柏叶中鬼臼毒素含量有显著差异。有研究^[11, 12]表明, 环

境对植物次生代谢物质含量有明显影响, 如小麦萎焉时小麦中的脱落酸含量可增加 40 倍^[11], 盐生植物和盐生植物由非盐生条件逐步转移至高盐分环境中, 都能诱导脯氨酸生成量的逐步增加^[12]等。鬼臼毒素作为沙地柏中的一种次生代谢物质, 从理论上说其在植株中的含量必然会受到生境的影响, 但本研究结果表明, 生境对茎中鬼臼毒素含量影响不显著。这可能是由于本研究仅测试比较了气候、土壤等条件相一致的大范围内不同小生境的沙地柏样品, 也可能是鬼臼毒素并不是沙地柏产生环境抗逆性的主要次生代谢物质。为此, 有必要在更大范围内, 如在甘肃、青海、新疆、内蒙古和陕西等沙地柏分布区进行采样, 系统地分析生境与沙地柏茎、叶中鬼臼毒素含量间的关系, 探讨生境中那些因子对鬼臼毒素含量起决定性作用。

3.2 沙地柏中鬼臼毒素的主要积累器官

本研究结果表明, 在 7 种不同生境中随年龄增长, 沙地柏茎和叶中鬼臼毒素积累量降低, 按鬼臼毒素含量从高到底排序依次为: 1 年生叶>2 年生叶>1 年生茎>2 年生茎>3 年生茎。沙地柏叶中鬼臼毒素含量明显高于茎中, 说明沙地柏中的次生代谢物质鬼臼毒素在幼苗或新生的组织器官中积累较多。植物的幼苗或新生的组织器官中含有大量的活性物质, 同时在这些幼苗或新生的组织器官中所含的次生代谢物质的量比植物中其他部位要高得多^[13, 14]。鬼臼毒素作为沙地柏植物中的一种重要的次生代谢物质, 其在沙地柏中的积累规律与一般植物的次生代谢物质在其体内的积累规律是一致的。

3.3 沙地柏的综合利用

本研究结果表明, 在 7 种不同生境中, 沙地柏茎和叶中鬼臼毒素积累量随着年龄增加而降低, 在幼苗中鬼臼毒素含量最大。而沙地柏有繁殖快, 再生能力强的生物学特性^[15], 因此可以进行人工栽培^[16~18]或有计划地采集其嫩枝叶, 提取鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素等鬼臼毒素类物质和精油等成分, 用于医药或农药研究开发, 这有利于人类在进行可持续性生态环境保护的同时有效地利用沙地柏资源, 以达到“双赢”的目的。

[参考文献]

[1] 中国植物志编委会 中国植物志第七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978 359- 360
[2] 魏凤国 中国珍稀固沙造林树种——沙地柏采种育苗调查报告[J]. 内蒙古林业科技, 1980, (3): 8- 12
[3] 赵正龙, 刘培华 适宜北方地区的绿篱树种——臭柏[J]. 陕西林业科技, 1983, (1): 69- 71

- [4] 孙丽华, 李保卫 西北地区生态园林重要树种——叉子圆柏[J]. 内蒙古农业大学学报, 2002, 23(3): 120- 121.
- [5] 张 兴, 付昌斌 新杀虫植物砂地柏研究进展[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(4): 53- 57.
- [6] 张 兴, 冯俊涛, 陈安良, 等 砂地柏杀虫作用研究概况[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(4): 130- 134.
- [7] Lars Bohlin, B rje Ros 6 Podophyllotoxin derivatives: drug discovery and development[J]. Drug Discovery Today, 1996, 1(8): 343- 351.
- [8] Arinoto M, Matsuura S, Muro C, et al Inhibitory activity of podophyllotoxin and matairesino-derivative lignans on the root growth of *B rassica campestris*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58: 189.
- [9] Oliva A, Moraes R M, Watson S B, et al A ryltetralin lignans inhibit plant growth by affecting the formation of mitotic microtubular organizing centers pesticide[J]. Biochemistry and Physiology, 2002, 72: 45- 54.
- [10] 杨显志, 邵 华, 张玲琪, 等 鬼臼毒素资源研究现状[J]. 中草药, 2001, 32(11): 1042- 1044.
- [11] Michael W ink Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective[J]. Phytochemistry, 2003, 64: 3- 19.
- [12] 杜近义, 胡国赋, 秦际威 植物次生代谢物的生态学意义[J]. 生物学杂志, 1999, 16(5): 9- 10.
- [13] Rob Verpoorte Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development[J]. DDT, 1998, 5: 232- 238.
- [14] 顾德兴 次生代谢物质和共同进化[J]. 生物学通报, 1990, (8): 13- 15.
- [15] 张国盛, 董 智 臭柏生物生态学特性及生长繁殖的研究综述[J]. 内蒙古林学报, 1997, 19(2): 69- 75.
- [16] 邬建华, 李玉珊 砂地柏露地压条繁殖试验报告[J]. 锡林郭勒林业科技, 1984, (1): 8- 10.
- [17] 陕西省林科所延安树木园 叉子圆柏扦插育苗试验初探[J]. 陕西林业科技, 1983, (1): 35- 40.
- [18] 刀子俊, 符亚儒, 何忠义 臭柏播种育苗试验[J]. 陕西林业科技, 1984, (4): 42- 43.

SFE-HPLC analysis of podophyllotoxin content in the stem and leave of *Sabina vulgar* of different habitats and ages with

CHENG Jun-xia^{1a, b}, SU Shi-ping², YANG Yong-zhi³, CHEN Cun-gen^{1b}, ZHONG Xing^{1a, 4}

(1 a Biotechnological Pesticides Research and Development Center; b College of Resource and Environmental Science,

Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Institute of Sand-control, Yulin, Shaanxi 719000, China; 3 Dabaodan Nature Savin Reserve, Shennu, Shaanxi 719300, China;

4 Shaanxi Research Center of Biopesticide Engineering and Technology, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper the content of podophyllotoxin among stems and leaves of *Sabina vulgar* grown at 7 different habitats (settled sands, movable sands, sunny slope, shady slope, protruding lands, artificial woods, concave lands) in the sand district of North China were compared using supercritical fluid extraction (SFE) and high performance chromatography (HPLC). The results are as follows: (1) In these different 7 habitats (in the same order with the above), the contents of podophyllotoxin were 2 512, 2 031, 2 328, 1 993, 2 567, 2 029, 2 493 mg/g respectively. So the habitats exhibited little influences on the content of podophyllotoxin in the stems however, In these 7 habitats different (in the same order with the above) the contents of podophyllotoxin were 8 613, 8 451, 8 303, 8 134, 8 012, 6 748, 6 282.3 mg/g respectively. Thus the habitats exhibited significant influences on the content of podophyllotoxin in the leaves (2) The content of podophyllotoxin among leaves was higher than that among stems obviously in all different habitats; (3) There were notable differences in the content of podophyllotoxin among stems and leaves of different ages. For instance, in the stems the highest content was 5 211 mg/g and the lowest contents 0 358.9 mg/g. In the leaves the highest content was 9 268 mg/g and the lowest content 5 186 mg/g. And the contents decreased in the following order: annual leaves > biennial leaves > annual stems > biennial stems > triennial stems.

Key words: *Sabina vulgaris*; stems and leaves; habitat; podophyllotoxin; supercritical fluid extraction-high performance chromatography