

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2013-0192



青海沙棘总三萜含量与 树龄和部位的关系

王文娟

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008)

摘要:研究了不同树龄不同部位的青海沙棘(*Hippophae rhamnoides*)总三萜含量的差异。用超声提取作为沙棘总三萜的制备方法,以熊果酸为对照品,采用分光光度法作为沙棘总三萜的测定方法。结果表明,不同树龄的沙棘、沙棘不同部位总三萜含量均差异显著($P < 0.05$),其中,沙棘幼苗叶中总三萜含量最高。植株部位和树龄对次生代谢产物积累均有重要影响。青海沙棘幼苗叶对于总三萜的开发具有较大的价值。

关键词:青海沙棘;总三萜;分光光度法

中图分类号:Q949.9;Q945.48

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2014)02-0342-04

Total triterpenes in different parts of *Hippophae rhamnoides* with different ages in Qinghai Province

WANG Wen-juan

(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract: A research was conducted to study the total triterpenes distribution among different ages and different parts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) from Datong County, Qinghai Province. The total triterpenes were extracted by ultrasonic extraction process and determined by spectrophotometry, ursolic acid used as control sample. The results showed that, the content of total triterpenes in sea buckthorn seedling leaf was highest among all of the samples. Furthermore, plant age and parts played important role in accumulation of plant secondary metabolites. It indicated that, sea buckthorn leaf was more valuable for the exploitation and development of total triterpenes.

Key words: sea buckthorn; total triterpenes; spectrophotometry

Corresponding author: WANG Wen-juan E-mail: wjwang@nwipb.ac.cn

沙棘(*Hippophae rhamnoides*),青海俗称黑刺,胡颓子科沙棘属落叶灌木或小乔木^[1]。沙棘属浅根型树种,耐干旱瘠薄,抗逆性强,水平根系发达,扎根能力特别强,可快速串根、萌蘖而迅速覆盖地表,保持坡面水土,拦蓄径流泥沙。当沙棘被泥沙掩埋后,茎上还可萌发不定根,具有耐沙埋的特性。因此,沙棘是我国西北干旱半干旱区植树造林与生态恢复首选的先锋树种之一^[2-3]。此外,沙棘还具有较高的药用与经济价值,可抗过敏、增强免疫、护肝、降

脂及抗氧化等,其主要成分有维生素、黄酮类及萜类化合物^[4]等。沙棘在我国南北均有分布,总面积超过 2.13×10^4 km²^[5]。青海省目前拥有天然沙棘林面积5.3万hm²,其中人工沙棘林面积7.3万hm²,而未成林造林面积7.4万hm²,沙棘产业的发展具有很大潜力^[6]。

随着各地对沙棘资源的日益重视,沙棘的引种栽培面积也逐渐扩大,同时对沙棘病虫害的研究也日益增多。据报道,沙棘害虫种类有72种,主要害

*收稿日期:2013-04-11 接受日期:2013-09-03

通信作者:王文娟(1984-),女,山东泰安人,工程师,硕士,主要从事植物学研究。E-mail: wjwang@nwipb.ac.cn

虫 25 种,其中发生量较大、危害时间较长的种类有沙棘木蠹蛾(*Holcocerus hippophaecolus*)、沙棘象(*Curculio hippophaes*)和红缘天牛(*Asias halodendri*)等^[7-8]。沙棘发生严重虫害的区域主要有辽宁、内蒙古、山西和甘肃等地^[9-10]。青海虽然也种植有很大面积的沙棘,但鲜见沙棘虫害发生,这可能与当地沙棘中的植物次生代谢物质的含量有关。植物源萜类是一类重要的植物次生代谢物质,对植食性昆虫有良好的趋避效果,或对害虫有引诱、毒杀等功能^[11],同时具有芳香性,令人乐于接受,更重要的是其是天然产物、毒性低、刺激性小、对环境无害,使用安全^[12],因此,萜类化合物常被用作农药^[13]。三萜是一类极为重要的萜类化合物,例如,葫芦素是一类四环三萜类化合物,葫芦素 B 可有效抑制美洲斑潜蝇成虫的产卵和取食,减轻其幼虫的危害^[14];苦瓜(*Balsam pear*)叶片中的 3 种四环三萜类化合物对多种害虫的取食有抑制作用^[15];楝科植物中的三萜类化合物具有广谱的抗病杀菌作用,楝科植物对菜粉蝶和粘虫等昆虫有强烈的杀虫作用,其中主要作用成分是一种呋喃三萜类物质,即川楝素^[16]。目前,刘书景^[17]对沙棘中单萜和倍半萜等挥发物及其抗虫机制做了初步研究,但对沙棘中萜类物质特别是三萜的研究还较少,未见测定沙棘中总三萜含量的报道。植物次生代谢物质的含量不但与产地有关,植株部位和生长期对其积累也有重要影响^[18]。熊果酸是存在于天然植物中的一种典型三萜类化合物,本研究以熊果酸为标准品^[19-20],测定青海沙棘根、茎、叶中总三萜的含量,以期为开发沙棘三萜类物质和寻找害虫趋避剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

沙棘样品于 2009 年 10 月 16 日采集自青海省大通县天然林(海拔 2 838 m, 101° 37' 28. 7" E, 36° 56' 18. 3" N),经鉴定为胡颓子科沙棘属植物沙棘的亚种,中国沙棘(*H. rhamnoides* subsp. *sinensis*)。

1.2 仪器设备

721 型数显可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司,用于在选定的波长下测定吸光度值),HH-4 恒温水浴锅(国华电器有限公司),101A-2 电热鼓风恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司),DU640 核酸蛋白分析仪(Beckman Coulter,用于全

波长扫描以确定最大吸收峰位置),RE-52AAA 型旋转蒸发器(上海嘉鹏科技有限公司),CCULAB 万分之一电子天平(Satorius Group),FW200 高速万能中药粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.3 试剂

95%乙醇,无水乙醇,5%香草醛-冰乙酸溶液(5.0 g 香草醛溶于冰乙酸中,稀释至 100.0 mL),冰乙酸,高氯酸均为国产分析纯。

1.4 试验方法

1.4.1 样品溶液的制备 成年沙棘茎、叶采集于主干离地面 1.50 m 处,采集后剁碎;成年沙棘根从靠近地表位置刨出,洗净,剁碎;其根、茎、叶鲜质量均在 300.0 g 以上,置于 101A-2 电热鼓风恒温干燥箱中,105 °C 杀青,再于 75 °C 下烘干至质量恒定,用万能中药粉碎机粉碎,置于 0 °C 下保存备用。沙棘幼苗株高约 1.50 m,直径 1.5~2.0 cm,挖取整株幼苗,摘取叶子,齐地面斩断主干,洗净树根,剁碎根和茎,将其粉碎并于 75 °C 下干燥。成年沙棘及沙棘幼苗根、茎、叶各准确称取 3.00 g,每样称 10 份($n=10$),用 100.0 mL 的 95%乙醇超声提取 20 min,抽滤,滤渣再用 100.0 mL 的 95%乙醇超声提取 20 min,合并滤液,用旋转蒸发器回收乙醇,残留物放冷至室温,用无水乙醇溶解并定容至 50.0 mL,分别准确吸取 3.0 mL 置于 50.0 mL 具塞刻度试管中,用无水乙醇定容,摇匀,沸水浴挥发去无水乙醇,冷却,加入 5%香草醛-冰乙酸溶液 0.20 mL,高氯酸 0.80 mL^[21-22],于 60 °C 水浴中加热 15 min,冷却至室温,用冰乙酸定容至刻度,摇匀,制得根、茎、叶各 10 份的样品溶液^[23]。

1.4.2 熊果酸溶液的制备 准确称取 105 °C 干燥至质量恒定的熊果酸 10.0 mg,置于 10.0 mL 容量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释定容,摇匀,得浓度为 1.0 mg · mL⁻¹的熊果酸溶液。

1.4.3 测定波长的确定 熊果酸溶液加 5%香草醛-冰醋酸 0.20 mL 和高氯酸 0.80 mL 后,在 360~1 000 nm 波长范围内进行扫描,在 548 nm 处有最高吸收峰,确定测定波长为 548 nm。

1.4.4 熊果酸吸光度值测定 准确吸取熊果酸溶液 0.20、0.40、0.60、0.80 和 1.00 mL 分别置于 5.0 mL 具塞刻度试管中,得到编号为 1、2、3、4 和 5 的 5 个不同熊果酸含量的溶液,沸水浴蒸干无水乙醇,冷却,加入 5%香草醛-冰乙酸溶液 0.20 mL,高氯酸

0.80 mL,于60℃水浴中加热15 min,冷却至室温,用冰乙酸定容至刻度,摇匀,在548 nm波长处测定吸光度值(以不加熊果酸溶液而直接加5%香草醛-冰醋酸0.20 mL,高氯酸0.80 mL,用冰乙酸定容的混合溶液为空白对照)。

1.4.5 标准曲线绘制 以熊果酸溶液不同熊果酸含量(mg)为横坐标,其吸光度值为纵坐标,用Excel软件作图得到标准曲线,其回归方程为 $y = 0.8295x - 0.0403$, $R^2 = 0.9994$ 。在0.20~1.00 mg范围内,熊果酸含量(mg)与其吸光度呈良好的线性关系。

1.4.6 样品总三萜的测定 吸取样品溶液0.50 mL,滴入1.0 cm比色皿,采用721型数显可见分光光度计,在波长548 nm处测定样品溶液的吸光度(以不加样品溶液而直接加5%香草醛-冰醋酸0.20 mL,高氯酸0.80 mL,用冰乙酸定容至刻度的混合溶液为空白对照)。通过回归方程计算,求出0.50 mL溶液中的三萜的含量(mg),记为 m_1 ,用公式 $m = 5.000 m_1 / 3$ 求得总三萜含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。式中, m 为总三萜的量。

2 结果

2.1 精密度试验

吸取供试品溶液1份,根据1.4.6连续测定5次,相对标准偏差(RSD)为1.63%。

2.2 稳定性试验

吸取供试品溶液,分别按1.4.6操作,在0~90 min内每隔10 min测定吸光度值,显示在40 min内稳定,RSD为1.67%。故应在显色后40 min之内测定其吸收值。

2.3 重复性试验

称取沙棘幼苗叶5份,每份10 g,按1.4.1方法制备,根据1.4.6测定,RSD为0.55%。

2.4 加样回收率试验

取已知含量的供试品溶液0.5 mL共4份于具磨口的试管中,分别加入0.1 mL对照品溶液,按前述显色,测吸光度,计算三萜酸的含量,平均回收率为99.5%,RSD为1.30%。

2.5 样品测定结果

OR中总三萜含量的RSD值为6.78%,YR中总三萜含量的RSD值为0,OS中总三萜含量的RSD值为4.96%,YS中总三萜含量的RSD值为

3.93%,OL中总三萜含量的RSD值为6.80%,YL中总三萜含量的RSD值为1.35%,均较小(表1)。

成年沙棘根、茎和叶中总三萜含量依次为0.026 8、0.019 0和0.015 2 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而沙棘幼苗根、茎和叶中的总三萜含量依次为0.007 0、0.012 3和0.167 7 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。成年沙棘与沙棘幼苗之间根、叶中的总三萜含量差异显著,而将不同部位作为处理因素时,成年沙棘根与茎、叶之间总三萜含量差异显著,沙棘幼苗根、茎、叶之间总三萜含量差异显著($P < 0.05$)。总的来看,成年沙棘根和茎的总三萜含量均高于沙棘幼苗,而成年沙棘叶片中总三萜含量却显著低于沙棘幼苗(表1)。

表1 成年沙棘及沙棘幼苗不同部位总三萜含量及RSD值
Table 1 Total triterpenes content and RSD in different parts of *H. rhamnoides*

部位 Part	均值 Mean/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
YL	0.167 7 \pm 0.002 3a	1.35
OR	0.026 8 \pm 0.001 8b	6.78
OS	0.019 0 \pm 0.000 9c	4.96
OL	0.015 2 \pm 0.001 0c	6.80
YS	0.012 3 \pm 0.000 5c	3.93
YR	0.007 0 \pm 0.000 0d	0.00

注:OR为成年沙棘根,YR为沙棘幼苗根,OS为成年沙棘茎,YS为沙棘幼苗茎,OL为成年沙棘叶,YL为沙棘幼苗叶。同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: OR, OS, OL indicate root, stem and leaf of old *H. rhamnoides* respectively, while YR, YS, YL indicate root, stem and leaf of young *H. rhamnoides* respectively. Different lower case letters within the same column indicated significant difference at 0.05 level.

3 讨论

萜类化合物是植食性昆虫为害诱导的主要挥发物组分^[24],可作为指示信号,使同种或异种植食性昆虫产生逃避或趋向行为,从而起到直接防御的作用^[25],还可以通过吸引捕食性和寄生性天敌的方式发挥重要作用^[26]。故而,萜类化合物大多也是调节植物、植食性昆虫及其天敌三者间相互关系的生物活性物质。目前,对萜类化合物的生态学功能还了解得很少^[24],有待进一步研究。同时,虽然针对沙棘中单萜和倍半萜等挥发物及其抗虫机制的初步研究有所报道^[17],但对沙棘中三萜的研究还较少。植物产地、植株部位、生长期和树龄对次生代谢产物积累都有重要影响^[27-29],本研究表明,不同树龄的沙棘、沙棘的不同部位之间,总三萜的含量差异均显著,且以

沙棘苗叶中总三萜的含量最高。青海沙棘很少遭受病虫害,其次代谢物质的含量与低海拔区域的沙棘^[30-31]相比,可能是最高的。本研究对不同树龄不同部位的青海沙棘总三萜含量进行比较研究,可为今后沙棘三萜化合物的研究提供一定的依据。

另外,本研究依据香草醛与高氯酸与三萜类化合物反应生成有色化合物的原理,在 548 nm 处测定吸光度,所得标准曲线线性良好,且样品质量控制的 RSD 值较小,结果表明,本次试验所用方法操作简便,结果准确。

参考文献

- [1] 郑杰. 青海沙棘产业发展应注意的问题[J]. 青海科技, 2008(4): 6-10.
- [2] 刘志杰. 沙棘生态建设开发推进我国水土流失治理进程[J]. 草业科学, 2002, 19(12): 50.
- [3] 马超德, 尹伟伦, 陈敏, 骆有庆. 黄土高原砂岩区河岸带沙棘林营造与管护技术的研究[J]. 草业科学, 2006, 23(8): 1-5.
- [4] 马惠茹, 赵玉娥, 郝向阳, 赵智香, 程建国. 沙棘护肝作用的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2009(8): 202-203.
- [5] 任宪威. 树木学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997: 364-366.
- [6] 扎西卓玛. 青海沙棘产业发展前景展望与思考[J]. 青海农牧业, 2009(3): 30-31.
- [7] 陈孝达, 张学武. 沙棘昆虫种群结构及综合防治研究[J]. 陕西林业科技, 2000(2): 36-39.
- [8] 陈孝达, 党心德, 张润志. 沙棘象生物学特性及防治的研究[J]. 林业科学, 1993, 29(1): 72-76.
- [9] 宗世祥, 姚国龙, 骆有庆, 许志春, 王涛. 沙棘主要蛀干害虫种群生态位[J]. 生态学报, 2005, 25(12): 3264-3270.
- [10] 马超德. 当前我国防治沙棘林木蠹蛾虫害的探讨[J]. 沙棘, 2003(2): 15-17.
- [11] 李霞. 萜类化合物对植物的化感作用[J]. 通化师范学院学报, 2006(2): 80-81.
- [12] 王宗德, 陈金珠, 宋湛谦, 姜志宽, 韩招久, 陈超. 四元环萜类化合物的合成及其驱蚊活性的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(3): 347-349.
- [13] 占爱瑶, 由香玲, 詹亚光. 植物萜类化合物的生物合成及应用[J]. 生物技术通讯, 2010(1): 131-135.
- [14] 朱靖静, 邹坤. 葫芦素类四环三萜化合物的研究进展[J]. 三峡大学学报, 2009(5): 82-87, 108.
- [15] 向亚林, 凌冰, 王国才. 苦瓜茎叶中葫芦烷三萜化合物对小菜蛾幼虫的拒食作用[J]. 华南农业大学学报, 2009(3): 13-17.
- [16] 谷文祥. 萜类化合物的生态特性及其对植物的化感作用[J]. 华南农业大学学报, 1998(4): 108-112.
- [17] 刘书景. 沙棘挥发物及其抗虫机制的初步研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [18] 李彦, 周晓东, 楼浙辉, 肖相元. 植物次生代谢产物及其影响其积累的因素研究综述[J]. 江西林业科技, 2012(3): 53-60.
- [19] 皮文霞, 蔡宝昌, 郭胜伟, 张弦. 分光光度法测定山茱萸制剂中总三萜酸的含量[J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(2): 99-100.
- [20] 江绍琳, 江绍玫, 曾令聪. 分光光度法快速测定灵芝中总三萜含量[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 634-636.
- [21] 纵伟, 夏水文, 崔宝良. 薄层分离——分光光度法测定大叶紫薇叶中的总三萜含量[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 222-225.
- [22] 杨志彬, 刘海, 郭兰. 紫外分光光度法测定大花暗罗叶和枝中总三萜的含量[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(5): 1154-1158.
- [23] 张咏梅, 晏石娟, 曹致中, 贾蕴琪, 沈静. 4 种豆科牧草总皂苷含量的测定及其生长过程中含量的变化[J]. 草业科学, 2009, 26(8): 122-127.
- [24] 娄永根, 程家安. 虫害诱导的植物挥发物: 基本特性、生态学功能及释放机制[J]. 生态学报, 2000, 20(6): 1097-1106.
- [25] Howell C R, Hanson L E, Stipanovic R D, Puckhaber L S. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*[J]. Phytopathology, 2000, 90: 248-252.
- [26] Turlings T C J, Benrey B. Effects of plant metabolites on the behavior and development of parasitic wasps[J]. Eco-Science, 1998, 5: 321-333.
- [27] 杨蓓芬, 金则新, 邵红, 李钧敏. 七子花不同器官次生代谢产物含量的分析[J]. 植物研究, 2007, 27(2): 229-232.
- [28] 李建辉, 金则新, 陈波, 蒋鑫淼, 王海东. 濒危植物夏蜡梅叶片次生代谢产物含量的动态分析[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(2): 28-30.
- [29] 张九东, 雷颖虎, 冯宁, 田先华, 杨海鹰. 陕西省秦巴山区红豆杉中紫杉醇含量研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2009, 37(4): 76-81.
- [30] 杨永清. 沙棘(*Hippophae rhamnoides*)在低温和增强 U-VB 胁迫下的生态生理反应[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.
- [31] 谢久祥, 林恭华, 都玉蓉, 巨海兰, 索有瑞, 张同作. 青海沙棘不同部位总黄酮含量比较研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(B12): 45-48, 77.

(责任编辑 武艳培)