

桃儿七不同部位 2 种木脂素含量的动态研究

李艳玲^{1,2}, 宁祎^{1,2}, 徐文华^{1,3*}, 周国英^{1,3}

(1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 中国科学院 藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810001)

[摘要] 采用超声提取和 HPLC 测定栽培植株与野生植株桃儿七不同部位中 4'-去甲基鬼臼毒素和鬼臼毒素的含量, 结果表明, 栽培植株各部位 4'-去甲基鬼臼毒素含量依次为叶柄 > 根, 叶中未检测到此物质; 野生植株不同部位 4'-去甲基鬼臼毒素含量依次为须根 > 茎 > 根状茎 > 叶, 果实中未检测到此物质; 栽培植株和野生植株不同部位鬼臼毒素含量均为根 > 茎 > 叶 (> 果实); 桃儿七栽培植株各部位 2 种木脂素含量随季节变化呈 W 型, 以 7 月份采收时含量最高。

[关键词] 桃儿七; HPLC; 木脂素; 动态变化; 次生代谢

Dynamic study on two lignans contents in different parts of *Sinopodophyllum hexandrum*

LI Yan-ling^{1,2}, NING Yi^{1,2}, XU Wen-hua^{1,3*}, ZHOU Guo-ying^{1,3}

(1. Northwest Plateau Biology Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Xi'ning 810001, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xi'ning 810001, China)

[Abstract] The contents of two lignans, namely 4'-demethylpodophyllotoxin and podophyllotoxin in cultivated and wild *Sinopodophyllum hexandrum* plants were extracted by ultrasonic action and determined by HPLC. According to the result showed, the order of parts of cultivated plants containing 4'-demethylpodophyllotoxin from high to low is as follows: stem > root, no 4'-demethylpodophyllotoxin was detected in leaves of cultivated plants; The order of parts of wild plants 4'-demethylpodophyllotoxin from high to low is as follows: lateral root > petiole > rhizome > leaf, no 4'-demethylpodophyllotoxin was detected in fruit. The order of parts of cultivated and wild *S. hexandrum* containing podophyllotoxin from high to low is as follows: root > petiole > leaf (> fruit). Both of the lignan contents in different parts of cultivated plant varied in a "W" curve with the changes in seasons, with the highest content in July.

[Key words] *Sinopodophyllum hexandrum*; HPLC; lignan; dynamic change; secondary metabolism

doi: 10.4268/cjcm20150940

桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying 是小檗科 Berberidaceae 桃儿七属 *Sinopodophyllum* 单种属植物, 属多年生草本。喜阴湿环境, 通常生长在海拔较高的平坦山谷及土壤中富含腐殖质的林下、林缘或草灌丛中。在我国主要分布在中部从

陕西太白山区由北向南沿横断山脉两侧的中高山及青藏高原地带, 海拔约 1 500 ~ 4 500 m^[1-2]。藏医用桃儿七果实入药, 可调经活血、保胎、消肿、止痛。中医以其根及根状茎入药, 具有祛痰止咳、抗肿瘤、抗免疫等作用^[3-5]。近年来其野生资源急剧下降, 为

[收稿日期] 2014-11-10

[基金项目] 中国科学院“西部之光”人才培养计划重点项目(2009); 中国科学院“西部之光”人才培养计划重点项目择优后续支持项目(2013)

[通信作者] * 徐文华, 副研究员, 硕士生导师, Tel: 13619719278, E-mail: whxu@nwipb.cas.cn

[作者简介] 李艳玲, 硕士研究生, E-mail: hanluxieyang@163.com

《中国珍稀濒危保护植物名录》中的三级保护植物(稀有种),并被《中国红皮书》收录^[6]。

桃儿七的主要抗癌药用成分4'-去甲基鬼臼毒素和鬼臼毒素等为木脂素类物质中的环木脂内脂,属次生代谢产物^[7]。次生代谢是植物应对环境胁迫进行的生理活动,在协调植物与环境的关系上具有重要作用。目前国内外对桃儿七活性成分的研究主要集中在分离提取体系的建立^[8]、化学成分的分
离^[9-10]、活性成分含量变化的影响因素^[11]、以及利用组织培养和细胞工程来生产鬼臼毒素^[12-14]。但对栽培植株活性成分含量测定方面的研究还未见报道。本研究主要采用HPLC对桃儿七栽培植株各部位2种活性物质木脂素进行含量测定,通过分析各部位2种木脂素的含量及动态变化,并与野生植株进行比较,明确桃儿七药材人工栽培植株的最佳用药部位以及最佳采集时间,希望能够为生产急需濒危药材桃儿七的规范化、标准化人工种植以及药材资源的综合开发利用提供理论与技术支撑。

1 材料

1.1 仪器与试剂 美国Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司);AG204电子分析天平(梅特勒公司);4'-去甲基鬼臼毒素对照品(纯度>99.2%,批号111792)和鬼臼毒素对照品(纯度>99.2%,批号111645)购自中国食品药品检定研究院;甲醇、无水乙醇(分析纯),乙腈(色谱纯)均购于山东禹王实业有限公司化工分公司;自制超纯水。

1.2 供试样品 栽培植株采自青海省海东地区乐都县马营乡桃儿七人工种植基地,野生植株采自乐都县下北山林场,经中国科学院西北高原生物研究所徐文华副研究员鉴定,为小檗科桃儿七属植物桃儿七*S. hexandrum*。于2012年5—10月,每月中旬进行采样,每次采集30株栽培植株,从中随机选取20株;同年7月中旬,在种植基地附近的下北山林场分别采集30株野生植株,随机选取20株。将样品植株洗净后用去离子水冲洗擦干,置于室内阴凉通风处自然阴干,分别称量栽培植株5—10月地上和地下生物量干重并统计求其平均值。将野生植株分为根状茎、须根、茎、叶和果实5部分;栽培植株由于生长年限较短,尚未形成果实,且须根和根状茎不易分割,故仅分为根(含须根和根状茎)、叶柄、叶3

部分。样品分别粉碎,过60目筛后备用。

2 方法

2.1 HPLC分析条件 Agilent EsclipseXDB C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈-水(27:73)为流动相,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,检测波长290 nm,采集时间25 min。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取4'-去甲基鬼臼毒素对照品2.0 mg、鬼臼毒素对照品1.3 mg,分别置于10 mL量瓶中,用分析甲醇溶解并稀释至刻度线,摇匀,配制成质量浓度分别为0.20、0.13 g·L⁻¹的单一对照品溶液。经0.45 μm微孔滤膜过滤后,分别吸取以上对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10、12、14 μL,注入高效液相色谱仪进行检测。

2.3 供试样品溶液的制备 各样品粉末分别称取约0.5 g,精确记录,置于具塞锥形瓶中,准确加入10 mL甲醇,在45℃,120 W条件下进行超声处理40 min,过滤后,残渣加入10 mL甲醇重复提取,共3次,将3次滤液合并于25 mL量瓶中,冷却后定容,摇匀后经0.45 μm微孔滤膜过滤后即供试样品溶液,3次重复。

2.4 线性关系分析 按照2.1项下色谱条件分别测定4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素的峰面积,对2种对照品溶液以色谱峰面积*A*和进样量*C*(μL)进行线性回归,得到4'-去甲基鬼臼毒素回归方程为: $Y = 122.65X - 14.357$, $r = 0.9999$ 。鬼臼毒素回归方程为: $Y = 50.870X - 2.4$, $r = 1.000$ 。结果表明4'-去甲基鬼臼毒素在0.40~2.80 μg具有良好的线性关系,鬼臼毒素在0.26~1.82 μg具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 分别精密吸取2种对照品溶液10 μL,重复5次,进行精密度试验测定。得4'-去甲基鬼臼毒素峰面积的RSD为0.82%,鬼臼毒素峰面积的RSD为1.6%,表明该方法精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一批样品,按照2.3项下方法进行重复性试验,得到5份供试样品溶液,分别对其2种木脂素含量进行测定,得到4'-去甲基鬼臼毒素峰面积的RSD为0.96%,鬼臼毒素峰面积的RSD为1.1%,表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取供试样品溶液在0、3、6、9、12 h后分别进行测定,得4'-去甲基鬼臼毒素峰面积的RSD为0.53%,鬼臼毒素峰面积的RSD为0.74%,表明该方法稳定性良好。

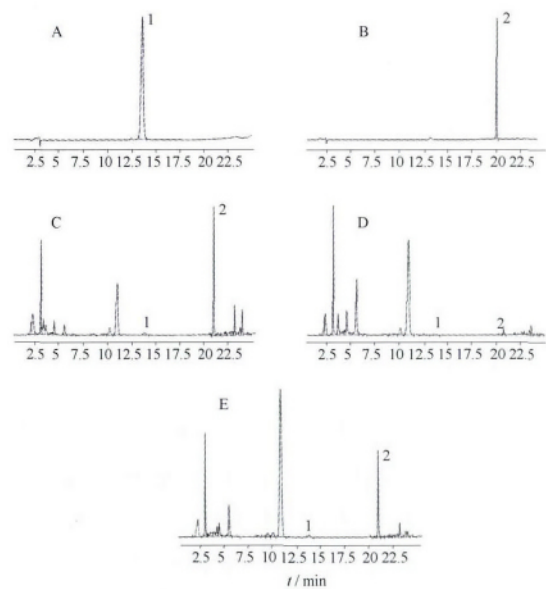
2.8 加样回收试验 精密称取 2.0 g 已知 4'-去甲基鬼臼毒素含量的样品(质量分数 $0.188 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 分别准确加入 1.0 2.0 3.0 mL 的 4'-去甲基鬼臼毒素对照品溶液, 按 2.3 项下方法制备成供试品溶液, 测定含量, 重复 5 次, 计算平均回收率。精密称取 0.2 g 已知鬼臼毒素含量的样品(质量分数 $1.443 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 分别准确加入 1.0 2.0 3.0 mL 的鬼臼毒素对照品溶液, 按 2.3 项下方法制备成供试品溶液, 测定含量, 重复 5 次, 计算平均回收率。结果 4'-去甲基鬼臼毒素的平均回收率为 99.08%, RSD 2.2%, 鬼臼毒素的平均回收率为 99.46%, RSD 1.1%。

2.9 供试样品溶液的测定 按照 2.1 项下色谱条件进行供试样品溶液的测定, 在 290 nm 条件下得出 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、栽培桃儿七根、野生桃儿七的根状茎、须根的 HPLC 图(图 1)。每个样品做 3 个平行样, 计算各样品活性成分含量。

2.10 数据分析 运用 SPSS 20.0 和 Excel 2013 对试验数据进行处理和统计分析。

3 结果与分析

3.1 桃儿七栽培与野生植株不同部位 4'-去甲基鬼臼毒素含量的比较 桃儿七植株中 4'-去甲基鬼臼毒素的含量在各部位之间的含量差异较大。野生植株各部位 4'-去甲基鬼臼毒素的含量由高到低依次为须根 > 茎 > 根状茎 > 叶, 果实中未检测到此物质, 这与野生植株各部位鬼臼毒素含量的分布基本相同。其中, 须根、茎与根状茎、叶 3 组之间 4'-去甲基鬼臼毒素的含量呈显著性差异, 茎和根状茎之间



A. 4'-去甲基鬼臼毒素对照品; B. 鬼臼毒素对照品; C. 栽培桃儿七根; D. 野生桃儿七根状茎; E. 野生桃儿七须根; 1. 4'-去甲基鬼臼毒素; 2. 鬼臼毒素。

图 1 对照品及样品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances and samples

4'-去甲基鬼臼毒素的含量差异不显著。须根中 4'-去甲基鬼臼毒素含量最高, 达 $0.568 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 是其他部位的 2~3 倍。栽培植株各部位 4'-去甲基鬼臼毒素的含量依次为叶柄 > 根, 叶中未检测到此物质, 这与栽培植株各部位鬼臼毒素含量的分布特点有所不同, 可能与 4'-去甲基鬼臼毒素在植物体内具体的合成转运机制和植株生长环境干扰有关^[7,15](表 1)。

表 1 样品中 4'-去甲基鬼臼毒素和鬼臼毒素的含量测定($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Analytical results of 4'-demethylpodophyllotoxin and podophyllotoxin in samples($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

部位	4'-去甲基鬼臼毒素		鬼臼毒素	
	野生	栽培	野生	栽培
须根	$0.568 \pm 0.037a$	0.295 ± 0.019	$10.54 \pm 0.084a$	$7.958 \pm 0.144a$
根状茎	$0.188 \pm 0.017b$		$1.443 \pm 0.028b$	
茎(或叶柄)	$0.259 \pm 0.014b$	0.858 ± 0.004	$1.733 \pm 0.274b$	$2.740 \pm 0.811b$
叶	$0.119 \pm 0.026c$	-	$0.540 \pm 0.160c$	$0.698 \pm 0.405c$
果实	-	/	$0.323 \pm 0.024c$	/

注: 同一列数据中字母不同表示两者间差异性显著($P < 0.05$), 字母相同则表示两者间差异性不显著; / . 未检测此项; - . 未检测到。

3.2 桃儿七栽培与野生植株不同部位鬼臼毒素含量的比较 野生植株和栽培植株各部位均含有鬼臼毒素, 且各部位之间的鬼臼毒素含量差异较大。野

生植株各部位鬼臼毒素的含量由高到低依次为须根 > 茎 > 根状茎 > 叶 > 果实。其中, 根状茎与茎之间的鬼臼毒素含量差异性不显著, 叶和果实中鬼臼

毒素含量差异性不显著,故这5个部位可以分为3组,即须根、根状茎和茎、叶和果实,这3组之间的鬼臼毒素含量呈显著性差异。须根的鬼臼毒素质量分数最高,达 $10.538 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,是其他部位的6.2~35倍。桃儿七栽培植株不同部位鬼臼毒素含量分布结果与野生植株基本相同,除未形成果实外,含量高低同样依次为根>叶柄>叶。各部位之间的鬼臼毒素含量呈显著性差异。栽培植株根中的鬼臼毒素质量分数最高,达 $7.958 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,是其他部位的3~11.4倍(表1)。

桃儿七根状茎是茎变态的一种,属于茎类。桃儿七药材野生和栽培植株不同部位的鬼臼毒素含量均为根>茎>叶。这与马绍宾^[15]和白亚民等^[16]研究的关于桃儿七野生植株不同部位鬼臼毒素含量的测定结果基本吻合。但是与杜微^[17]测定结果不同,该研究表明野生桃儿七不同部位鬼臼毒素含量依次为根>种子>茎叶,这可能是由于测定方法、供试样品产地等不同而造成测定结果有所差异^[18-19]。鬼臼毒素的含量从植株的根到叶和果实,依次逐渐减少,这可能与木脂素类物质主要分布于植物的木材(特别是心材)部位有关^[7],根中木质部居多,故根中鬼臼毒素含量最高,根状茎和茎及叶柄其次,这与中医上主要取其根及根状茎入药相符^[3]。

3.3 桃儿七栽培植株不同部位2种木脂素含量与生物量的动态关系 桃儿七栽培植株各部位2种木脂素含量随季节变化均呈现W型变化,其中以7月采收时2种木脂素成分含量最高。桃儿七为多年生草本,5月中上旬出苗,5月下旬至6月上旬开花,8—9月果实成熟,随后地上部分逐渐枯萎凋落,地下部分停止生长进入休眠期^[2]。桃儿七地上部分从5月开始增长,至7月达到最大值 1.872 g ,随后开始下降,至10月完全枯萎凋落;地下部分5—7月迅速增长,7—9月地上部分开始衰老,致使地下部分增长缓慢,至9月地下部分生物量达到最大值 5.606 g ,9月中下旬以后,由于地上部分产生的初生代谢产物不足以维持植株的生长,地下根部能量开始消耗,从而导致地下部分生物量降低。由以上分析可以看出,桃儿七5—7月为快速生长阶段,在7月达到生长高峰期,7月以后生长缓慢,逐渐至凋落(图2、3)。

结合图2、3可以推测,在5月份生长季开始阶段,桃儿七植株快速生长,初生代谢活动逐渐加强,

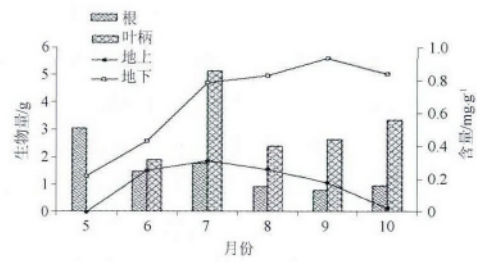


图2 4'-去甲基鬼臼毒素含量与植株生物量的动态关系
Fig. 2 Relationship between the dynamic accumulations of 4'-demethylpodophyllotoxin and biomass

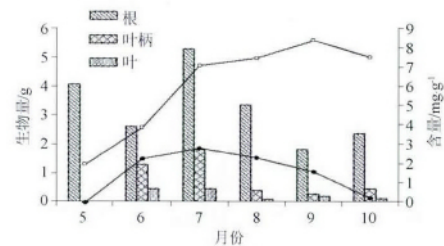


图3 鬼臼毒素含量与植株生物量的动态关系
Fig. 3 Relationship between the dynamic accumulations of podophyllotoxin and biomass

产生大量有机物供植株生长,从而减少了次生代谢生产所需的底物,导致5—6月2种木脂素类成分含量降低,6—7月之前初生代谢活动旺盛,为次生代谢提供大量的底物,次生代谢物的生物合成也随之加强,致使7月份植株体内含量最高;随后初生代谢活动减小,进而底物逐渐减少,依据植物的生活史对策^[20],大部分能量用来转化成有机物并储存于地下部分,以供植物度过漫长寒冷的冬季,故从7月之后,次生代谢产物含量逐渐降低;9月后植株进入休眠期,2种木脂素含量开始升高,这可能与木脂素是病菌侵害的产物、植物的生长繁殖对策等原因有关^[7, 20]。

4 讨论

由以上结果及多种植物次生代谢产物含量积累的动态变化^[21-23]可以看出,植物次生代谢产物的产量与初生代谢活动具有密切的关系。同时,木脂素类物质作为植物的次生代谢产物,具有多种药理作用,最佳防御假说认为次生代谢产物在植物体内的作用是用于防御被捕食,高蓉等^[24]研究表明鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素对分月扇舟蛾均有一定的拒食、毒杀和抑制生长等作用。也有学者研究表明,木脂素在受病菌侵害的木质部含量较高,木脂素类物

质也可能是病理产物^[7]。马绍宾等^[15]在进行桃儿七分布格局与生态适应性关系研究时表明: 生存环境恶劣的桃儿七植株主要是通过提高体内防御性物质的含量来抵抗动物及病菌的侵害。达到性成熟的桃儿七植株在 7 月份果实开始形成, 为防御被捕食同时为果实形成提供营养物质, 植株各部位活性成分含量相对较高。综上结果可以推测: 适当的环境胁迫可以有效促进桃儿七次生代谢产物的合成。本研究结果表明: 在药用植物桃儿七的栽培过程中, 其药材最佳采集时间为 7 月中旬, 最佳采集部位为根部。同时, 给予合适的生长环境和特定的环境刺激可能会提高桃儿七药材木脂素类物质的产量。

[参考文献]

- [1] 赵纪峰, 刘翔, 王昌华, 等. 珍稀濒危药用植物桃儿七的资源调查[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1255.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 249.
- [3] 强巴赤烈, 嘎玛曲佩, 占堆, 等. 中华本草·藏药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- [4] 袁菊丽. 太白七药桃儿七研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(5): 95.
- [5] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 568.
- [6] 虞泓. 珍稀植物桃儿七[J]. 植物杂志, 1999(3): 6.
- [7] 周汉荣. 中药资源学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 57.
- [8] Wang P, Liu Y, Chen T, et al. One-step separation and purification of three lignans and one flavonol from *sinopodophyllum emodi* by medium-pressure liquid chromatography and high-speed counter-current chromatography[J]. *Phytochem Anal*, 2013, 24(6): 603.
- [9] Zhao C Q, Huang J, Nagatsu A, et al. Two new podophyllotoxin glucosides from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(6): 773.
- [10] Sun Y J, Li Z L, Chen H, et al. Three new cytotoxic aryltetralin lignans from *Sinopodophyllum emodi* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(12): 3794.
- [11] Li M F, Li W, Yang D L, et al. Relationship between podophyllotoxin accumulation and soil nutrients and the influence of Fe^{2+} and Mn^{2+} on podophyllotoxin biosynthesis in *Podophyllum hexandrum* tissue culture [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2013, 71: 96.
- [12] Vanisree M, Lee C Y, Lo S F, et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 2004, 45(1): 1.
- [13] Alam E A. *In vitro* cultures for the production of some anticancer agents (review article) [J]. *Life Sci*, 2013, 10(9s): 297.
- [14] Rajesh M, Sivanandhan G, Subramanyam K, et al. Establishment of somatic embryogenesis and podophyllotoxin production in liquid shake cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle [J]. *Ind Crop Prod*, 2014, 60: 66.
- [15] 马绍宾, 胡志浩, 李俊. 桃儿七生化生态适应的初步研究[J]. 生态学杂志, 1997, 16(3): 67.
- [16] 白亚民, 徐建中. 桃儿七中鬼臼脂素的高效液相色谱法分离与含量测定[J]. 中药通报, 1988, 13(5): 39.
- [17] 杜微. 桃儿七种子成分分析和不同组织鬼臼毒素含量的比较研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [18] 熊文勇, 魏朔南, 岳明. HPLC 分析桃儿七中鬼臼毒素的含量[J]. 中成药, 2010(5): 875.
- [19] 黄坤, 蒋伟, 赵纪峰, 等. 濒危药用植物桃儿七中鬼臼毒素和总木脂素含量测定[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10): 1360.
- [20] 马绍宾, 徐正尧, 胡志浩. 桃儿七繁殖生物学研究[J]. 西北植物学报, 1997, 17(1): 49.
- [21] 赵则海, 曹建国, 李庆勇, 等. 黑龙江省西部乌拉尔甘草总黄酮含量的动态变化研究[J]. 植物研究, 2004(2): 235.
- [22] 张康健, 马希汉, 马梅, 等. 杜仲叶次生代谢物生长积累动态的研究[J]. 林业科学, 1999(2): 18.
- [23] 曹建国, 赵则海, 李庆勇, 等. 刺五加丁香苷和总黄酮含量及其季节动态[J]. 植物学通报, 2006(3): 269.
- [24] 高蓉, 狄旭东, 杨振德, 等. 4 种鬼臼毒素类似物对分月扇舟蛾的生物活性研究[J]. 农药, 2004, 43(9): 424.

[责任编辑 张燕]