

黄皮素内酯II在黄皮植物体的分布及对稗草生化代谢的影响

卢海博^{1,2}, 万树青^{1*}

(1. 农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学昆虫毒理研究室, 广州 510642;
2. 河北北方学院农林科技学院, 张家口 075131)

摘要 [目的]测定黄皮素内酯II(2',3'-epoxyanisolactone)在黄皮[*Clausena lansium* (Lour.) Skeels]植株的花、枝叶和果核中的含量,明确其对稗草生化代谢的影响。[方法]采用液相色谱法进行含量的测定,小杯法培养供试稗草。[结果]黄皮素内酯II在花粗提物中的含量较少,仅为0.43%,在枝叶和果核中的含量分别为3.33%和3.21%。黄皮素内酯II处理稗草植株,处理后稗草根中蛋白含量和氨基酸含量与未经处理存在明显的差异,在50 μg/mL的浓度下,可以显著地降低稗草植株内的蛋白含量和增加植株内的氨基酸含量。当处理浓度为50、25、12.5、6.25、3.125 μg/mL时,样品中的含氮量分别为1.402 8、1.317 2、1.250 2、1.128 7、0.903 2 mg/g,比对照0.832 1 mg/g均有所增加。黄皮素内酯II处理后,稗草的蛋白含量与对照相比有所下降,处理浓度为50、25、12.5、6.25、3.125 μg/mL时,蛋白含量比对照分别降低75.91%、66.43%、62.43%、58.57%和58.03%。[结论]黄皮素内酯II对稗草代谢有一定影响。

关键词 黄皮素内酯II; 含量; 稗草; 代谢

中图分类号: S 482.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2012.01.006

The distribution of 2',3'-epoxyanisolactone in different organ of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels and biochemical and metabolic effect on *Echinochloa crusgalli* L.

Lu Haibo^{1,2}, Wan Shuqing¹

(1. Key Lab of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education; Insect Toxicity Lab, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Department of Agricultural Science, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, China)

Abstract [Objective] The content of 2',3'-epoxyanisolactone in three different organ of *Clausena dunniana* were tested, the biochemical and metabolic effect on *Echinochloa crusgalli* L. were investigated. [Method] The content of 2',3'-epoxyanisolactone were analyzed by HPLC analyzing, bioassay of *E. crusgalli* was tested by small glass method. [Result] The result indicated that there are 0.43% in flower, 3.21% in seeds and 3.33% in the leaf and bark, respectively. The result of assay on metabolism to *E. crusgalli* indicated that 2',3'-epoxyanisolactone could cause the weakness of vigor and functions of root systems, and the decrease of total amount of protein of *E. crusgalli*, 2',3'-epoxyanisolactone could increase the quantity of amino acid, with the series of concentration of 2',3'-epoxyanisolactone: 50 μg/mL, 25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 6.25 μg/mL and 3.125 μg/mL, the quantity of amino acid of controlled seeding were 1.402 8 mg/g, 1.317 2 mg/g, 1.250 2 mg/g, 1.128 7 mg/g and 0.903 2 mg/g respectively, which was higher than the control at 0.832 1 mg/g. Protein quantity of controlled seeding of *E. crusgalli* decrease 75.91%, 66.43%, 62.43%, 58.57% and 58.03% compared to the control respectively. [Conclusion] The result indicated that 2',3'-epoxyanisolactone has influence on *E. crusgalli*.

Key words 2',3'-epoxyanisolactone; amount; *Echinochloa crusgalli*; metabolism

收稿日期: 2011-02-28 修订日期: 2011-05-11

基金项目: 广东省自然科学基金(990703, 010319); 华南农业大学农药及化学生物学教育部重点实验室资助课题(2005); 广州市科技计划项目(2010Y1-27)

* 通信作者 Tel: 020-85285813; E-mail: wanshuqing1953@yahoo.com.cn

随着生产力水平的提高,我国除草剂发展迅速,但大部分除草剂是化学合成药剂,施用以后由于化学残留问题经常对下茬作物造成药害,所以开发高效、低毒、对环境安全的除草剂就非常重要。从植物中寻找具有农药活性的化合物,是开发环境和谐农药的一条重要途径^[1-5]。众所周知,以天然除虫菊和烟碱为先导化学物,人工合成开发出现代拟除虫菊酯类和新烟碱类杀虫剂并已取得广泛的应用就是一个很好的例子。

黄皮为芸香科(Rutaceae)黄皮属(*Clausena*)植物。本属植物全世界约有30种,分布于热带、亚热带地区,我国有近10种,分布于长江以南各省,以云南南部、广东、广西、海南及台湾等省分布较为集中,资源丰富。黄皮为南方特有的水果并兼有药用价值,具有保肝降脂、解痉、抑菌及抗癌等生物活性^[6-7]。除药用外,人们也在农业应用方面展开了一系列的研究,徐汉虹^[8]等发现齿叶黄皮(*Clausena dumiana* Lévl.)精油具有杀虫作用并分离得到其杀虫主要成分为爱草脑。万树青^[9-10]等发现,黄皮[*C. lansium* (Lour.) Skeels]果核甲醇提取物对农田主要杂草具有抑制生长活性。对黄皮的甲醇提取物进行研究,并采用活性跟踪的方法对其活性成分进行分离,具有除草作用的化合物为黄皮素内酯Ⅱ(2',3'-epoxyanisolactone,结构为图1)。结果表明,在80 μg/mL时,黄皮素内酯Ⅱ对稗草(*Echinochloa crusgalli* Linn.)的根长、茎长和鲜重抑制率分别为96.00%、84.71%和89.85%,其IC₅₀值分别为66.9、78.4 μg/mL和133.0 μg/mL^[11-12]。表明黄皮素内酯Ⅱ对稗草具有显著的抑制活性,作为植物源除草剂具有一定的开发和应用前景。黄皮素内酯Ⅱ在国内为首次从黄皮中分离并确定其具有除草活性,为了科学合理利用黄皮资源,为开发新型除草剂提供依据,作者对黄皮植株地上部位黄皮素内酯Ⅱ的含量进行测定,并测定该化合物对稗草生理生化代谢的影响。

1 材料和方法

1.1 试验材料

稗草(*E. crusgalli* L.)属禾本科,稗属。种子采于华南农业大学农场,置于冰箱内4℃保藏备用。

黄皮素内酯Ⅱ:黄皮的果核、枝叶和花分别采自华南农业大学昆虫毒理室标本园,在花期采集枝叶和花,成熟期采集种子,阴干后粉碎,用甲醇浸泡提取,*m*(粉碎物):*V*(甲醇)=1:3,旋转蒸发仪浓缩后得其粗提物,然后对粗提物进行硅胶柱层析和薄层

层析后,分离纯化得白色结晶,经核磁共振氢谱(¹HNMR)(500 MHz)和核磁共振碳谱(¹³CNMR)(125 MHz)分析后,综合以上特征并参考文献报道鉴定为黄皮素内酯Ⅱ(由中国科学院华南植物园魏孝义研究员进行结构鉴定)。

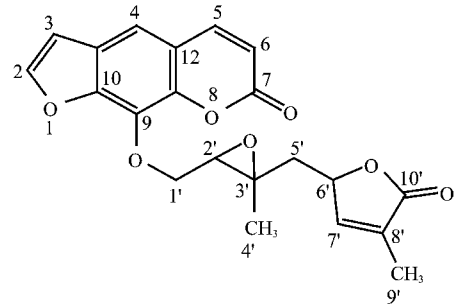


图1 黄皮素内酯Ⅱ

1.2 黄皮素内酯Ⅱ含量的测定

标准工作曲线的制作:称取黄皮素内酯Ⅱ,用甲醇(100%)分别配制200、100、50、25 μg/mL和12.5 μg/mL的标样,过滤后经HP-1100型高效液相色谱仪(美国惠普公司生产)进行检测,在212 nm检测各浓度的峰面积和出峰时间,重复3次,建立相应的色谱条件。并以物质浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准工作曲线。

色谱条件:色谱柱为HP Hypersi ODS C₁₈ 250 × 4.0 mm(i. d) 5 μm;柱温:室温;流动相:*V*(甲醇):*V*(水)=75:25;流速:1.0 mL/min;检测波长:212 nm;进样量10 μL;保留时间:约3.906 min。

分别配制黄皮素内酯Ⅱ的浓度梯度,浓度分别为200、100、50、25、12.5 μg/mL,在上述检测条件下测定各浓度的峰面积,以其浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

在仪器完全稳定的状态下,取一含量为98.52%黄皮素内酯Ⅱ的样品,连续进样6次,计算出标准偏差和变异系数。

5 mL浓度为100 μg/mL黄皮素内酯Ⅱ样品溶液中,添加浓度为100 μg/mL黄皮素内酯Ⅱ标准品3、4、5、6、7、8 mL,则添加的质量分别是0.300、0.400、0.500、0.600、0.700 mg和0.800 mg,进样分析后,扣除样品中原有的黄皮素内酯Ⅱ的含量,计算分析方法的准确度。

含量的测定:分别称取0.05 g枝叶、花和果核的粗提物各3份,用10 mL甲醇(100%)溶解,微孔滤膜(孔径0.45 μm)过滤后,采用上述液相色谱条件进行检测。

1.3 氨基酸总量的测定

参考山东农业大学的方法^[13],稍加改进。

药剂的设计: 称取一定量的甲醇萃取物, 用 1 mL N,N-二甲基甲酰胺和少量吐温-80 溶解后, 加蒸馏水配成 0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 mg/mL 5 个浓度, 以 1 mL N,N-二甲基甲酰胺和少量吐温-80 为对照。

稗草的培养(小杯法): 取 25 mL 的小烧杯, 往杯内加入小玻璃珠, 以铺满烧杯底部为宜, 振动小烧杯使玻璃珠面达到平整, 再往珠面上垫上一层新华牌定性滤纸, 滤纸大小与杯口内径大小一致, 选取发芽一致的稗草种子 20 粒, 用镊子均匀地放在滤纸上, 烧杯内加入 5 mL 配制好的不同浓度的萃取物液, 重复 3 次, 放在光照培养箱中 28 ℃ 恒温下培养。10 d 后观察结果。

氨基酸样品提取液的制备: 10 d 后取出各处理的稗草植株, 用剪刀剪下叶片和根部, 并将其剪成碎片(2 mm 左右)。迅速称取样品 0.15 g, 重复 3 次, 加入 10 mL 蒸馏水, 加热至沸, 冷却后用单层滤纸过滤备用。

样品氨基酸含量的测定: 吸取上述样品提取液 1 mL, 加入 1 mL 水合茚三酮溶液, 在 80 ℃ 恒温水浴中加热 15 min, 取出后用 pH5.0 的柠檬酸缓冲液稀释至 10 mL, 在 721 型分光光度计 610 nm 处测定吸光密度值, 再从标准曲线上查出相应的氨基酸微克数。根据公式分别求出每克鲜样品含氮量, 根据公式计算含氮量比。

$$\text{每克鲜样品含氮量}(\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V_i}{W \times L}$$

式中, C 为由标准曲线查出每毫升提取液中氨基态氮含量(微克); V_i 为样品提取液经稀释后的体积(mL); L 为测定时取样品液毫升数; W 为样品。

$$\text{含氮比} = \frac{\text{处理的含氮量}}{\text{对照的含氮量}} \times 100\%$$

1.4 样品蛋白含量的测定

以牛血清白蛋白为标准蛋白, 按照邹琦^[14]的方法进行蛋白含量的测定: 前处理方法同 1.3, 称取稗草植株 0.15 g, 重复 3 次。放入研钵中, 加入 1.5 mL 蒸馏水, 研磨成匀浆, -4 ℃ 13 000 r/min 下冷冻离心 15 min。吸取上清液 0.02 mL 放入具塞试管, 加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液和 0.98 mL 蒸馏水, 在 595 nm 下测定 A 值, 查得蛋白含量。按公式计算样品中的蛋白含量。

$$\text{样品中蛋白含量}(\text{mg/g}) = \frac{C \times V_i}{V_1 \times W \times 1\,000}$$

式中, C 为查标准曲线值(μg); V_i 为提取液总体积(mL); W 为样品鲜重(g); V_1 为测定时加样量(mL)。

2 结果与分析

2.1 黄皮素内酯 II 在黄皮不同组织中的含量测定

在给定的液相色谱检测条件下测定各浓度的峰面积, 以其浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得到黄皮素内酯 II 的高效液相色谱工作曲线为 $y = 37.936x + 94.54$, 相关系数为 $R = 0.9999$ 。

在仪器完全稳定的状态下, 取一含量为 98.52% 的样品, 连续进样 6 次, 计算出标准偏差 0.145 1, 变异系数 0.147 2%。

添加一定质量的黄皮素内酯 II 标准品进样分析后, 扣除样品中原有的黄皮素内酯 II 的含量, 测定出回收率分别是 98.49%、100.18%、99.68%、99.72%、100.09% 和 99.73%, 平均回收率为 99.65%。

分别配制黄皮的花、枝叶和果核的粗提物 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度, 在设定的检测条件下测定各部分中化合物黄皮素内酯 II 的含量, 测定结果见表 2。结果表明, 黄皮素内酯 II 在花粗提物中的含量较少, 仅为 0.43%, 在枝叶和果核中的含量分别为 3.33% 和 3.21%。这说明黄皮素内酯 II 在黄皮枝叶和果核中的含量较高, 且枝叶材料容易获取, 为从枝叶中提取黄皮素内酯 II 的可行性提供了条件。本试验所用材料枝叶和花取于花期, 果核取于成熟期, 所以枝叶中黄皮素内酯 II 的含量较高是仅限于花期这个时期取样的。

表 1 化合物黄皮素内酯 II 在黄皮不同组织的含量¹⁾

部位	峰面积/mAU	含量/%
花	(259.1 ± 0.52)c	0.43
枝叶	(1 359.1 ± 5.36)a	3.33
果核	(1 311.9 ± 7.45)b	3.21

1) 表内数据为 3 次重复平均值 $\bar{X} \pm S.E.$, 同列数据后标有相同字母者表示在 5% 水平差异不显著(DMRT 法); 2) 各部位的测定浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 对稗草氨基酸代谢的影响

植物根系吸收、同化的氮素主要以氨基酸和酰胺的形式进行运输, 测定氨基酸总量是研究植物根系生长和整个生长发育的一个指标。黄皮素内酯 II 在设定的 0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 mg/mL 的浓度梯度下, 对稗草植株中的氨基酸含量有一定的影响, 样品含氮量分别为 1.402 8、1.317 2、1.250 2、1.128 7 mg/g 和 0.903 2 mg/g, 比对照 0.832 1 mg/g 均有所增加, 且各处理与对照差异显著。试验结果表明黄皮素内酯 II 使稗草的氨基酸含量有一定的增加, 氨基酸是合成蛋白质等营养物质的基础, 而试验中观察到

理稗草表现为顶端生长点钝化、畸形,植株矮小,根部不发达,表现出营养供应不足。分析原因可能是黄皮素内酯Ⅱ阻碍了稗草氨基酸转化为蛋白质的过程,使氨基酸在一定时期内表现为积累。

表2 黄皮内酯Ⅱ处理稗草氨基酸含量的变化

浓度/mg · mL ⁻¹	样品含氮量/mg · g ⁻¹	含氮比
0.5	(1.402 8±0.04)a	1.7
0.25	(1.317 2±0.34)b	1.6
0.125	(1.250 2±0.11)b	1.5
0.062 5	(1.128 7±0.54)c	1.4
0.031 25	(0.903 2±0.02)d	1.1
CK	(0.832 1±0.01)e	—

2.3 对稗草植株蛋白代谢的影响

分别设定 0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 mg/mL 5 个浓度梯度处理稗草植株。结果表明,各处理稗草的蛋白含量与对照相比都有所下降,在处理浓度下,蛋白含量比对照分别降低75.91%、66.43%、62.43%、58.57%和 58.03%。且各处理蛋白含量均与对照差异显著。这一结果结合 2.2 中的结果表明黄皮素内酯Ⅱ对稗草植株内氨基酸转化为蛋白质有一定的影响,导致蛋白含量降低,从而影响到稗草的正常生长。

表3 黄皮素内酯Ⅱ处理稗草蛋白含量的变化

处理浓度/mg · mL ⁻¹	蛋白含量/mg · g ⁻¹	降低率/%
0.5	(16.17±0.01)e	75.91
0.25	(22.53±0.02)d	66.43
0.125	(25.21±0.04)c	62.43
0.062 5	(27.81±0.01)b	58.57
0.031 25	(28.17±0.02)b	58.03
CK	(67.11±0.02)a	—

3 讨论

化学除草不仅造成环境污染,还会对作物或非靶标生物产生药害以及产生严重的抗药性问题。植物次生代谢物质是生物间协同进化的结果,易于在自然界循环中降解,而且次生代谢物质具有多样性和复杂性的特点,不容易产生抗性。因此,从自然界生物中寻找具有除草活性的化合物,已成为研发环境相容性除草剂的一条重要途径。例如,除草剂环庚草醚(通用名为 cinmethylin)是来源于植物性化合物 1,4-桉树脑;而捷利康公司开发的新型除草剂 Triketones,则是来自植物的次级代谢产物 Leptosperme。天然产物不同寻常的结构特征使其拥有与传统除草剂不同的作用靶标^[15-16]。因此,对有植物毒性

的天然产物进行研究,有望发现具有新型作用机制的除草化合物,从而开发出新型安全的除草剂。

除草活性测定表明,黄皮植物体内次生代谢产物黄皮素内酯Ⅱ对稗草生长具有显著抑制作用,经过测定它主要分布在植物的枝叶内,这为合理利用这种化合物提供了依据。黄皮素内酯Ⅱ在国内首次从该植物中分离,经试验测定对稗草植株生长具有很好的抑制活性。本试验研究结果表明,经黄皮素内酯Ⅱ处理后,稗草植株内的氨基酸含量升高,蛋白含量降低,这是稗草植株在受到刺激后,体内的蛋白质代谢受到干扰,很可能是黄皮素内酯Ⅱ抑制稗草植物生长的作用机制之一,为寻找新的除草靶标,开发新农药奠定基础。

参考文献

- [1] 李亮亮,李天来,张恩平. 作物化感作用研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(25):7738-7740.
- [2] 林嵩,翁伯琦. 外来植物化感作用研究综述[J]. 福建农业学报,2005,20(3):202-210.
- [3] 潘瑞乐,朱兆仪. 黄皮属药用植物研究进展[J]. 国外医药:植物药分册,1990,5(6):243-247.
- [4] 闫少羽,崔承彬,姚新生. 黄皮属植物生物碱的研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2002,12(3):179-186.
- [5] 赵志英,雷彩霞,臧爱梅. 植物源除草剂研究进展[J]. 山东农业科学,2010(6):91-93.
- [6] 申竹芳,陈其明,刘海帆,等. 黄皮香豆精的降血糖作用[J]. 药学学报,1989,24(5):391-392.
- [7] 潘瑞乐,朱兆仪. 黄皮属药用植物研究进展[J]. 国外医药:植物药分册,1990,5(6):243-247.
- [8] 徐汉虹,赵善欢,朱亮锋,等. 齿叶黄皮精油的杀虫作用与有效成分研究[J]. 华南农业大学学报,1994,15(2):56-60.
- [9] 万树青,陈兴聪,杨天梁. 几种植物提取物光活化他感生长抑制作用研究[J]. 杂草科学,2004(1):5-9.
- [10] 万树青,郑大睿. 几种植物提取物对萝卜蚜的光活化杀虫活性[J]. 植物保护,2005,31(6):55-57.
- [11] 卢海博. 黄皮提取物对稗草抑制活性及有效成分研究[D]. 广州:华南农业大学,2006.
- [12] Lakshmi V,Prakash D, Raj K, et al. Monoterpenoid furanocoumarin lactones from *Clausena anisata*[J]. Phytochemistry, 1984,23:2629.
- [13] 山东农学院. 植物生理学实验指导[M]. 济南:山东省科学技术出版社,1995:108-109.
- [14] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995:129-130,163-164,173-174.
- [15] 付颖,叶非. 生物源除草剂研究与使用进展[J]. 农药,2002,41(5):7-10.
- [16] 刘长令,韩亮,李正名. 以天然产物为先导化合物开发的农药品种(3)-除草剂[J]. 农药,2004,43(1):1-4.