

含喜树碱植物水培根系化感化合物的分离分析

林贤伟¹, 谭杰安^{1,2}, 刘展眉¹, 程杏安¹, 蒋旭红¹

(¹仲恺农业工程学院天然产物化学研究所, 广州 510225;

²华南师范大学化工与环境学院, 广州 510225)

摘要:本研究旨在探明喜树碱植物水培体系中化感物质的种类及其长期积累对植物生产的作用。建立了喜树幼苗和野生型蛇根草水培体系根系分泌物的新分离富集方法:首先以硅胶填充固相萃取柱萃取水培液根系分泌物,然后取出填充硅胶加到硅胶层析柱上层进行柱层析分离,再经洗脱后,用GC-MS技术分析不同组分的洗脱液。从喜树水培根系分泌物中检测到1,1,2,2-四氯乙烷、N,N-二甲基苯胺、二苯铬等11种化感物质;在广州蛇根草水培根系分泌物中检测到邻苯二甲酸二丁酯、苯酚、二苯铬等14种化感物质。2种含喜树碱植物水培根系分泌物中化感物质的大量分离富集和分析,为清除水培体系的生长抑制物、优化水培体系、实现喜树碱的高效生物合成奠定基础。

关键词:喜树;广州蛇根草;喜树碱;水培体系;化感化合物

中图分类号:Q94

文献标志码:A

论文编号:casb17040042

Analysis and Separation of Allelopathic Compounds from Hydroponic Root of Plants with Camptothecin

Lin Xianwei¹, Tan Jie'an^{1,2}, Liu Zhanmei¹, Cheng Xing'an¹, Jiang Xuhong¹

(¹Research on Natural Products Chemistry, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225;

²School of Chemical Engineering and Environment, South China Normal University, Guangzhou 510225)

Abstract: The purpose of this study is to identify the types of allelopathic compounds in a hydroponic system and clarify the effects of their long time accumulation in hydroponic root system on plants. A new technology of separating and enriching root secretions from *acuminata* seedlings and wild *Ophiorrhiza cantoniensis* cultivated was established: the solid phase extraction column filled with silica gel was used to extract root secretions from the hydroponic solution; then the silica gel was taken out and added in the top of the silica column chromatography for column chromatography isolation. After elution, the GC-MS was used to analyze the eluant with different constituents. 11 allelopathic compounds were found in root secretions of *Camptotheca acuminata* Decne such as 1,1,2,2-tetrachloroethane, N,N-Dimethylaniline, dibenzene-chromium and so on. 14 allelopathic compounds were identified in root secretions of *Ophiorrhiza cantoniensis* Hance such as Dibutyl phthalate, Dioctyl phthalate, dibenzene-chromium and so on. The isolation, enrichment and analysis of allelochemicals in root secretions of two plant species containing camptothecin laid the foundation for eliminating growth inhibitors of hydroponic system and optimizing hydroponic system.

基金项目:国家自然科学基金项目“在线富集生物反应器培育特异性花生毛状根合成白藜芦醇”(201376281),“新型苦参碱衍生物的分子优化合成、杀虫活性构效关系及机理研究”(21406274);广东省大学生创新训练项目“花生壳白藜芦醇提取工艺优化及种间含量分析”(201411347034),“几种天然产物对黑色素瘤细胞增殖及其黑色素合成机制的影响”(201511347056)。

第一作者简介:林贤伟,男,1992年出生,硕士,主要从事天然产物化学研究。通信地址:510225 广州市海珠区仲恺农业工程学院英东楼606, Tel: 020-89013783, E-mail: 295471485@qq.com。

通讯作者:程杏安,男,1981年出生,副教授,博士,主要从事天然产物化学研究。通信地址:510225 广州市海珠区仲恺农业工程学院英东楼606, Tel: 020-89013783, E-mail: anzai_28@163.com; 蒋旭红,女,1969年出生,教授,博士,主要从事天然产物化学及功能材料合成研究。通信地址:510225 广州市海珠区仲恺农业工程学院英东楼606, Tel: 020-89013783, E-mail: jiangxh69@163.com。

收稿日期:2017-04-10, **修回日期:**2017-06-14。

Key words: *Camptotheca acuminata* Decne; *Ophiorrhiza cantoniensis* Hance; camptothecin; hydroponic system; allelopathic compounds

0 引言

喜树碱 (*Camptothecin*, CPT) 是从喜树 (*Camptotheca acuminata* Decne) 中发现的一种重要抗癌活性生物碱^[1], 后来在蛇根草类植物中也发现一定含量。它是迄今发现的唯一通过抑制拓扑异构酶发挥细胞毒性的天然活性成分^[2-5]。市场对喜树碱类抗癌药物的需求非常大, 而大规模化学全合成和体外生物合成的难度较大, 大量采集喜树等植物资源提取喜树碱, 是目前获得喜树碱的重要途径。然而, 长期盲目采集会致使生态环境的破坏^[6], 以及植物资源的浪费, 不符合当今环保要求。当前利用生物合成手段是连续生产植物次生代谢物新的途径。毛状根在离体培养条件下表现出次生代谢产物的合成能力, 某些产物的产量甚至高于正常植物, 国内外现已成功地培养出喜树、青蒿、南美蟛蜞菊等药用植物的毛状根。人参皂甙、黄连素等已通过毛状根培养得以工业化生产^[7]。贾黎明等^[8]利用循环水根系分泌物收集装置成功在栽培条件下无损根系、实时、连续、富集、定量、准确收集根系分泌物, 在7天时间收集到根系分泌物中的多种氨基酸, 并达到可检出的量。本课题组也成功建立了喜树和广州蛇根草 (*Ophiorrhiza cantoniensis* Hance) 等含喜树碱类植物水培体系, 并分析确认这些水培体系根系分泌物中含有喜树碱和金丝桃苷等活性代谢产物。然而根系分泌物中除了具有药用价值的活性次生代谢成分外, 也可能存在一些具有不同活性功能的化感物质, 包括杀虫活性, 抑菌活性, 除草活性, 自毒作用等^[8-12]。其中, 部分化感物质对植物的生长抑制作用给生产带来一定的负面影响, 比如根系分泌物中化感物质引发药用植物的连作障碍^[9-13], 化感物中的酚酸类化合物能影响水稻^[10,13]等植物的代谢途径, 产生自毒现象从而阻碍生长^[4,11]。因此, 植物水培根系分泌中的这部分化感物质长期积累对植物生长具有抑制作用, 探明水培体系中的化感物质, 对优化植物水培体系具有重要意义。本研究建立一种喜树幼苗和野生型广州蛇根草水培体系根系分泌物的新分离富集方法, 利用气质联用 (GC-MS) 技术对喜树和广州蛇根草水培体系的根系化感物质进行较为全面分析, 为进一步优化喜树和蛇根草的水培体系, 探寻高效生物合成喜树碱的途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

喜树幼苗和野生型广州蛇根草分别采集于仲恺农

业工程学院校园内喜树母株周围和广东肇庆鼎湖山。

1.2 实验设备

Agilent 1200型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); Agilent 7890A-5975C型气质联用仪(安捷伦科技有限公司); DLSB-5L/25低温冷却液循环泵(巩义市予华仪器有限责任公司)、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)、RE-201D旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.3 水培体系的构建

1.3.1 喜树幼苗水培体系构建的探究 选取50 cm左右长势优良的幼苗, 挖取时不伤根, 一组洗净根部泥土, 置于户外培养, 一组根部保留部分泥土, 置于楼顶遮阳棚内培养, 一组根部保留泥土, 置于楼底树荫下遮阳棚内培养, 加水没过根部, 每个培养箱加水量约4 L, 预培养7天, 生长稳定后开始计算培养时间。

1.3.2 广州蛇根草水培体系构建的探究 蛇根草经采集后置于清水中预培养3天, 挑选长势良好的植株, 用蒸馏水轻轻冲洗附于根部的泥土杂质, 尽量不伤根。一组放置于楼顶遮阳棚内培养, 一组置于通风透光的室内培养, 一组置于楼底树荫下遮阳棚内培养。加水没过根部, 每个培养箱加水量约4 L。

1.4 水培液的收集与富集

1.4.1 喜树幼苗水培液的收集与富集 水培60天后, 合并收集水培液, 过滤除去固体杂质。以硅胶作为填充料, 利用SPE固相萃取, 批量富集水培液至吸附平衡, 更换硅胶富集完毕后收集含根系分泌物的硅胶, 45℃烘干, 4℃保存备用。

1.4.2 蛇根草水培液的收集与富集 水培45天后, 合并收集每盆蛇根草培养液, 后续操作同上。

1.5 根系分泌物的分离

1.5.1 喜树根系分泌物的分离

(1)装柱与上样。取200~300目经前处理的硅胶, 加入石油醚, 匀浆法装柱, 高度约30 cm, 使用3~4倍柱体积石油醚冲洗柱子。取20 mL浓缩粗品的硅胶粉, 用少量石油醚稀释混匀, 缓慢的加入层析柱中, 重复上述操作使柱体充分密实。继续在样品硅胶上加入2 cm厚的柱层析硅胶(防止加液时激起硅胶样品导致平面被破坏)。

(2)梯度洗脱。配制不同比例的洗脱液(表1), 进行梯度洗脱, 每次加入50 mL洗脱液, 为了有效的分离纯化, 溶剂极性的递增程度和用量主要根据各段流出

液的HPLC色谱检测决定。流出液分段收集并做好记录,其中1~72号样品每50 mL收集一次流出液、73~81号样品每100 mL收集一次。将收集到的流出液转移至梨形瓶,45℃旋转蒸发至干。加入1.5 mL乙腈,超声振荡溶解。用0.22 μm 有机相滤膜过滤后供色谱分析。

表1 洗脱液配比及用量

洗脱液梯度	用量/mL	样品编号
石油醚:乙酸乙酯(1:0)	300	1~6
石油醚:乙酸乙酯(9:1)	300	7~12
石油醚:乙酸乙酯(8:2)	300	13~18
石油醚:乙酸乙酯(7:3)	300	19~24
石油醚:乙酸乙酯(6:4)	300	25~30
石油醚:乙酸乙酯(5:5)	300	31~36
石油醚:乙酸乙酯(4:6)	300	37~42
石油醚:乙酸乙酯(3:7)	300	43~48
石油醚:乙酸乙酯(2:8)	300	49~54
石油醚:乙酸乙酯(1:9)	300	55~60
乙酸乙酯:乙醇(1:0)	300	61~66
乙酸乙酯:乙醇(9:1)	300	67~72
乙酸乙酯:乙醇(8:2)	300	73~75
乙酸乙酯:乙醇(7:3)	300	76~78
乙酸乙酯:乙醇(6:4)	300	79~81

1.5.2 蛇根草根分泌物的分离

(1)装柱与上样。取200~300目经过前处理的硅胶,加入石油醚,匀浆法装柱,高度约30 cm,使用3~4倍柱体积石油醚冲洗柱子。取3~4 g含浓缩粗品的硅胶粉,用少量石油醚稀释混匀,缓慢的加入层析柱中,重复上述操作使柱体充分密实。继续在样品硅胶上加入2 cm柱层析硅胶(防止加液时激起硅胶样品导致平面被破坏)。

(2)梯度洗脱。配制不同比例的洗脱液(表2),进行梯度洗脱,洗脱液用量与和极性同样由HPLC分析结果决定。流出液分段收集并做好记录,每40 mL收集一次。将收集到的流出液转移至梨形瓶,35℃旋转蒸发至干,加入1.5 mL乙腈,超声震荡溶解。用0.22 μm 有机相滤膜过滤后供色谱分析。

1.6 高效液相色谱(HPLC)检测

色谱条件:色谱柱为Kromasi I100-5C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);紫外检测波长254 nm;流动相为乙腈/水(V/V,40/60),流动相在使用前超声脱气,并经0.22 μm 滤膜过滤,流速1 mL/min;柱温28℃;进样量20 μL 。

表2 洗脱液配比及用量

洗脱液梯度	用量/mL	样品编号
石油醚:乙酸乙酯(1:0)	200	1~5
石油醚:乙酸乙酯(9:1)	300	6~13
石油醚:乙酸乙酯(8:2)	400	14~23
石油醚:乙酸乙酯(7:3)	400	24~33
石油醚:乙酸乙酯(6:4)	400	34~43
石油醚:乙酸乙酯(5:5)	400	44~53
石油醚:乙酸乙酯(4:6)	400	54~63
石油醚:乙酸乙酯(3:7)	400	64~73
石油醚:乙酸乙酯(2:8)	400	74~83
石油醚:乙酸乙酯(1:9)	400	84~93
石油醚:乙酸乙酯(0:1)	300	94~100
乙醇:氯仿(0:1)	400	101~110
乙醇:氯仿(1:9)	400	111~120
乙醇:氯仿(2:8)	400	121~130
乙醇:氯仿(3:7)	400	131~140
乙醇:氯仿(4:6)	400	141~150
乙醇:氯仿(5:5)	400	151~160
乙醇:氯仿(6:4)	400	161~170
乙醇:氯仿(7:3)	400	171~180
乙醇:氯仿(8:2)	400	181~190
乙醇:氯仿(9:1)	400	191~200
乙醇:氯仿(1:0)	300	201~208

1.7 气相色谱质谱联用(GC-MS)检测

色谱条件:色谱柱30 m \times 0.25 mm,0.33 μm SE-30弹性石英毛细管柱。程序升温:初始温度50℃,保持2 min,以5℃/min的速率升至150℃,保持5 min,再以5℃/min的速率升至220℃,保持10 min。进样口温度250℃,载气为氦气,分流比40:1,柱前压68 kpa,进样量1 μL 。

质谱条件:离子源EI,离子源温度230℃,电子能量70 eV,接口温度270℃,溶剂延迟3 min,离子扫描范围50~800 amu。

2 结果与讨论

2.1 水培根系分泌物的分离富集方法

以硅胶作填充剂填充固相萃取柱富集水培液的代谢物,然后取出吸附代谢物的硅胶加到硅胶层析柱上层进行柱层析分离,喜树水培根系分泌物洗脱过程如表1,以石油醚:乙酸乙酯、乙醇:乙酸乙酯不同配的比例进行梯度洗脱,按洗脱液组分收集洗脱液,旋蒸浓缩,利用GC-MS技术对分离组分进行分析,当洗脱液为石油醚:乙酸乙酯=9:1时,分离出的化感物质最多,达到4

种,其次是当洗脱液为石油醚:乙酸乙酯=1:0时,分离出3种化感物质。蛇根草水培根系分泌物洗脱过程如表2,以石油醚:乙酸乙酯、乙醇:氯仿的不同配比进行洗脱,当洗脱液为以乙醇:氯仿=1:0时,分离得到化感物质最多,达到8种,其次是当洗脱液为以乙醇:氯仿=2:8、乙醇:氯仿=4:6时,都分离得到5种化感物质。

2.2 喜树水培根系分泌物中化感物质的分析

利用GC-MS对喜树水培根系分泌物进行分析,结果如表3。检测到11种化感物质,分别是环庚三烯酮、4-氧代-7,7-二硝基-4,5,6,7-四氢(2H)苯并三唑、二苯铬、1,1,2,2-四氯乙烷、2,4-二叔丁基苯酚、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯、邻苯二甲酸二异丁酯、N-甲基苯胺、苯胺和N,N-二甲基苯胺。其中环庚三烯酮具有杀虫活性;4-氧代-7,7-二硝基-4,5,6,7-四氢(2H)苯并三唑具有除草活性;1,1,2,2-四氯乙烷、邻苯二甲酸二丁酯、N,N-二甲基苯胺、二苯铬具有自毒作用。

2.3 蛇根草水培根系分泌物中化感物质的分析

利用GC-MS对蛇根草水培根系分泌物进行分析,结果如表3。在蛇根草根系分泌物中分离检测到14种化感物质,分别是1,1,2,2-四氯乙烷、N,N-二甲基苯胺、邻苯二甲酸二异丁酯、邻苯二甲酸二丁酯、苯酚、二苯铬、邻苯二甲酸二异辛酯、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、2,4-二叔丁基苯酚、9-亚甲基-9H-芴、邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯、3-甲基邻苯二酚、十六酸甲酯、2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)、十二烷基乙二醇。其中环庚三烯酮具有杀虫活性;4-氧代-7,7-二硝基-4,5,6,7-四氢(2H)苯并三唑具有除草活性;1,1,2,2-

四氯乙烷、邻苯二甲酸二丁酯、N,N-二甲基苯胺、苯酚、二苯铬具有自毒作用。

邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异丁酯在每个洗脱比例中都出现,这2种物质分离富集效果不明显,洗脱剂类型、及比例方面需要做出调整。可以适当提高洗脱液的极性,保证其他化感物质在得到良好的分离的同时,这2种物质也能得到分离,实现高效梯度分离。

3 讨论与结论

近年来,植物根系分泌物中化感物质的分析研究引起了不少研究者的兴趣,针对不同植物建立了一些分离分析方法。有研究者为了鉴定花生根系分泌物化感物质,通过XAD24树脂吸附柱吸附分泌物,随后分别用乙醚、甲醇各200 mL洗脱,收集洗脱液,减压浓缩至干,溶于10 mL丙酮(色谱纯)中,用GC-MS检测。分离检测到邻苯二甲酸、苯甲醛、草酸、对乙基苯甲酸等化感物质^[14]。徐鹏^[15]采用GC-MS法从百合根系分泌物中分离检测到邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二异辛酯等化感物质。王芳^[16]从茄子根系分泌物、残茬和重茬土壤中同时检测到邻苯甲酸的多种衍生物。胡元森等^[17]从黄瓜根系分泌物中分离检测到苯甲酸、对羟基苯甲酸,香草酸,阿魏酸,苯丙酸等苯甲酸的衍生物等化感物质,并对其化感作用进行研究。为了研究喜树和水培体系中的喜树碱、羟基喜树碱和金丝桃苷等药用成分。程杏安等^[18-19]先用大孔树脂吸附根系分泌物,再把大孔树脂作为填充剂在固相萃取柱中将其吸附的代谢物洗脱,将浓缩的洗脱液以洗脱剂乙酸乙酯与石油醚、乙醇与水在硅胶层析柱中分离,最后GC-

表3 喜树苗根系分泌物中的化感化合物

柱层析洗脱梯度	保留时间/min	中文名称	英文名称	相似度/%
石油醚:乙酸乙酯(1:0)	14.59	环庚三烯酮	2,4,6-Cycloheptatrien-1-one	86
	15.13	4-氧代-7,7-二硝基-4,5,6,7-四氢(2H)苯并三唑	4-Oxo-7,7-dinitro-4,5,6,7-tetrahydro(2H)benzotriazole	72
	37.74	二苯铬	Chromium, bis(eta.6-benzene)-	72
石油醚:乙酸乙酯(9:1)	8.19	1,1,2,2-四氯乙烷	Ethane, 1,1,2,2-tetrachloro-	96
	24.33	2,4-二叔丁基苯酚	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	97
	40.07	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate	96
	46.16	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester	91
石油醚:乙酸乙酯(7:3)	40.07	邻苯二甲酸二异丁酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	80
石油醚:乙酸乙酯(3:7)	13.44	N-甲基苯胺	Aniline, N-methyl-	95
乙酸乙酯:乙醇(8:2)	10.81	苯胺	Aniline	90
乙酸乙酯:乙醇(6:4)	13.61	N,N-二甲基苯胺	Benzenamine, N,N-dimethyl-	72

表4 蛇根草根系分泌物的化感化合物

柱层析洗脱梯度	保留时间/min	中文名称	英文名称	相似度/%
石油醚:乙酸 乙酯(7:3)	8.1837	1,1,2,2-四氯乙烷	Ethane, 1,1,2,2-tetrachloro-	96
	13.6074	N,N-二甲基苯胺	Benzenamine, N,N-dimethyl-	94
	37.7035	邻苯二甲酸二异丁酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	87
	40.0723	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate	78
乙醇:氯仿(2:8)	8.4289	1,1,2,2-四氯乙烷	Ethane, 1,1,2,2-tetrachloro-	91
	10.8794	苯硒酚	Benzeneselenol	86
	38.8473	二苯铬	Chromium, bis(eta.6-benzene)-	72
	40.0724	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate	97
	44.957	邻苯二甲酸二异辛酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	91
乙醇:氯仿(4:6)	37.7037	邻苯二甲酸二异丁酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	86
	40.0724	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate	94
	46.1659	邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	94
乙醇:氯仿(4:6)	24.3564	2,4-二叔丁基苯酚	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	94
	37.3115	9-亚甲基-9H-芴	9H-Fluorene, 9-methylene-	93
	37.7035	邻苯二甲酸二异丁酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	91
	40.0723	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate	90
	43.3289	邻苯二甲酸单 (2-乙基己基)酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) esteroxylate	91
乙醇:氯仿(1:0)	11.6798	3-甲基邻苯二酚	1,2-Benzenediol, 3-methyl-	78
	24.3406	2,4-二叔丁基苯酚	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	96
	36.4785	十六酸甲酯	Hexadecanoic acid, methyl ester	97
	37.7037	邻苯二甲酸二异丁酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	91
	40.0725	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate	97
	42.9966	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	Phenol, 2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-4-methylphenol)	96
	46.1987	邻苯二甲酸二异辛酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	91
	48.6328	十二烷基乙二醇	Ethanol, 2-(dodecyloxy)-	93

MS 分析, 检出目标活性成分和 6 种化感物质。以上所提的研究都是单一的固相萃取或树脂吸附分离, 本研究在分离富集方法上先用硅胶做填充剂进行固相萃取富集水培根系代谢物, 再将吸附后的硅胶加到硅胶层析柱中, 以不同比例的乙酸乙酯与石油醚、乙酸乙酯与乙醇、乙醇与氯仿作为洗脱液进行柱层析梯度分离, 最后以 GC-MS 对各分离组分进行分析。从喜树幼苗、蛇根草根系分泌物中分别分离检测到 11、14 种化感物质。该方法不仅总体工艺流程简单, 而且还分离检测出更多的化感物质。在洗脱体系方面, 以往运用不同配比的乙酸乙酯与石油醚、乙醇与水做洗脱剂相比, 本研究以不同配比的乙酸乙酯与石油醚、乙酸乙酯与乙醇、乙醇与氯仿做洗脱剂, 分离到更多化感物质。如当乙酸乙酯:乙醇=(8:2), 乙酸乙酯:乙醇=(6:4)时分离到苯胺与 N,N-二甲基苯胺, 当乙醇:氯仿=(1:0)时, 分离到

十六酸甲酯、2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)、邻苯二甲酸二异辛酯、十二烷基乙二醇。可见通过不断调整, 改进优化分离富集体系, 可以分析到更多化感物质。在吸附材料上, 先用硅胶做填充剂进行固相萃取, 硅胶对于极性大的物质吸附效果较好, 对于低极性物质吸附效果较差, 在这一步上, 有些低极性化感物质可能由于没有被硅胶吸附从而导致后续没有被检测到。程杏安等^[18-19]先用大孔树脂吸附根系分泌物, 再把大孔树脂作为填充剂在固相萃取柱中将其吸附的代谢物洗脱, 在喜树碱水培液中检测出了正二十一烷等本研究没分离检测到的低极性物质。另外, 本研究是将喜树碱、蛇根草根系水培液过滤后直接过硅胶固相萃取柱, 硅胶为一多孔性物质, 分子中具有硅氧烷的交链结构, 同时在颗粒表面又有很多硅醇基。硅胶吸附作用的强弱与硅醇基的含量多少有关, 硅醇基能够通过氢键的

形成而吸附水分,因此硅胶的吸附力随吸着的水分增加而降低。所以直接用根系水培液过固相萃取柱,含水量太高会对硅胶的吸附产生影响。以后研究可以先通过旋转蒸发把水除掉,以少量的有机溶剂溶解,再过固相萃取柱,这样的吸附效果会更好。

植物分泌的化感物质,如喜树和蛇根草根系分泌的二苯铬,其具有自毒作用,根据李彦斌等^[20]、李建勇等^[21]的研究,植物的化感物质的自毒作用不仅是直接抑制植物的生长,且其还能作为碳源,促进了病原微生物的繁殖,减弱或消除了某些有益菌的拮抗作用,使有害菌增殖,从而造成病害的严重发生。笔者通过分离检测喜树、蛇根草根系分泌的化感物质,对其中有自毒作用的物质及时进行清除,保证植物的生长不会被抑制,旺盛生长。收集分离到的化感物质,笔者下一步实验可以通过添加不同浓度具有自毒作用的物质来研究其对喜树、蛇根草根系分泌物对其幼苗生长,生理变化的影响。

本研究建立了从喜树幼苗和广州蛇根草水培体系根系分泌物中分离和分析化感物质的方法,实现了2种植物根系分泌物化感物质的大量分离富集和分析,分别从喜树幼苗、蛇草根的水培根系分泌物中分离鉴定出11和14种化感物质,为清除含喜树碱植物水培体系的生长抑制物,优化水培体系,实现喜树碱的高效生物合成奠定基础。

参考文献

- [1] 皮妍,蒋科技,乔守怡,等.喜树碱的生物合成途径和代谢调控[J].植物生理学通讯,2009,45(11):051-060.
- [2] 雷英杰,刘鸿.喜树碱的全合成研究进展[J].合成化学,2000,8(2):124-129.
- [3] 刘菲.喜树悬浮培养体系的建立及喜树碱含量的调控研究[D].长沙:湖南农业大学,2010.
- [4] 谢星光,陈晏,卜元卿,等.酚酸类物质的化感作用研究进展[J].生态学报,2014(22):1-15.
- [5] Hsiang Y, Hertzberg H R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. *Biol Chem*,1985,260:14873-14878.
- [6] 黄雪菊,林希,李沙,等.药用植物资源生态研究进展[J].四川环境,2014,33(4):146-153.
- [7] 邱德有,宋经元,马小军,等.丹参毛状根生物反应器大规模培养的研究[J].分子植物育种,2004,2(5):699-703.
- [8] 贾黎明,冯菊芬,文学军,等.循环水根系分泌物收集技术的研究及应用[J].北京林业大学学报,2003,25(6):6-10.
- [9] 张重义,林文雄.药用植物的化感自毒作用与连作障碍[J].中国农业生态学报,2009,17(1):189-196.
- [10] 陈龙,张美玲,辛明月,等.外源酚酸对盆栽大豆苗期生长发育影响研究[J].中国农业通报,2014,30(24):129-132.
- [11] 王茂胜,康冀川,汪汉成,等.根系提取物对烤烟的自毒作用研究[J].中国土壤与肥料,2014(4):91-96.
- [12] 丁海燕,程智慧.大蒜化感作用及利用研究进展[J].中国蔬菜,2014(9):11-16.
- [13] 顾元,常志州,于建光,等.外源酚酸对水稻种子和幼苗的化感效应[J].江苏农业学报,2013,29(2):240-246.
- [14] 李忠,江立庚,唐荣华,等.花生根系分泌物的鉴定和化感作用研究[J].华南农业大学学报,2015,36(5):48-53.
- [15] 徐鹏.百合根系分泌物的化感作用研究及化感物质鉴定[D].杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [16] 王芳.茄子连作障碍机理研究[D].北京:中国农业大学,2003.
- [17] 胡元森,李翠香,杜国营,等.黄瓜根分泌物中化感物质的鉴定及其化感效应[J].生态环境,2007,16(3):954-957.
- [18] 程杏安,刘展眉,周煜喆,等.喜树水培体系中喜树碱、羟基喜树碱及其他组分的初步鉴定[J].中国农学通报,2014,30(1):37-41.
- [19] 程杏安,刘展眉,邓儒杰,等.蛇根草水培体系中喜树碱、金丝桃苷及其他组分的初步鉴定[J].广东农业科学,2013,19:94-97.
- [20] 李彦斌,李建国,谷冬艳.植物化感自毒作用及其在农业中的应用[J].农业环境科学学报,2007,26(增刊):347-350.
- [21] 李建勇,张瑞明.植物化感作用及其在农业上的应用[J].上海农业科技,2016(4):21-23.