

· 技术方法 ·

紫茎泽兰9-羧基-10,11-去氢泽兰酮分布积累动态

白洁¹, 曹坳程^{1*}, 郭美霞¹, 刘晓燕¹, 刘小文¹, 梁海², 周波²

¹中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094; ²西昌学院高原与亚热带作物重点实验室, 西昌 615000

摘要 9-羧基-10,11-去氢泽兰酮为紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum*)的主要致肝脏毒性成分及杀虫的生物活性成分。从紫茎泽兰叶片中分离提纯得到9-羧基-10,11-去氢泽兰酮(Euptox A)标准品, 建立了高效液相色谱法测定紫茎泽兰中Euptox A含量的分析方法。采用C₁₈反相色谱柱, 柱温30°C, 以甲醇-水(60:40, v/v)为流动相、流速为0.8 mL·min⁻¹、检测波长为255 nm进行测定。Euptox A在紫茎泽兰中的添加回收率为97.3%–103.7%, 检测限为0.4 μg·g⁻¹。利用建立的方法测定Euptox A在紫茎泽兰体内分布与积累的动态变化规律。结果表明, Euptox A主要分布在紫茎泽兰的叶片中, 且在营养生长期积累量高, 生殖生长期积累量低。该方法快速、简捷, 可用于紫茎泽兰原料及其产品中Euptox A成分的测定。

关键词 9-羧基-10,11-去氢泽兰酮, 紫茎泽兰, 肝毒素, 高效液相色谱

白洁, 曹坳程, 郭美霞, 刘晓燕, 刘小文, 梁海, 周波 (2011). 紫茎泽兰9-羧基-10,11-去氢泽兰酮分布积累动态. 植物学报 46, 470–475.

紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum*)为菊科泽兰属多年生半灌木植物, 原产地为中美洲墨西哥, 自20世纪40年代经中缅、中越边境传入我国云南省, 以其超强的传播能力已在我国特别是西南各省造成严重危害。2005年, 国家林业局调查紫茎泽兰的发生面积达3.7×10⁶ hm², 为我国外来入侵物种之首。对紫茎泽兰防控技术的研究主要采用化学药剂防除(曹坳程等, 2006), 但喷施除草剂给环境造成的污染不容忽视, 且紫茎泽兰生物储量巨大, 化学防除所需成本昂贵。近年来, 对紫茎泽兰化学及营养成分的研究(Bohlmann and Gupta, 1981; Sun et al., 2004; He et al., 2006, 2008)表明, 其含有多种生物活性物质, 如类黄酮、倍半萜烯、苷类、生物碱和香豆素等。紫茎泽兰还含有丰富的营养成分, 如蛋白质、氨基酸、脂肪等, 其中蛋白质含量占干物质总量的19.7%, 与麦麸相当, 脱毒后可作为饲料原料。另外, 紫茎泽兰还可开发成为生物农药、生物有机肥、绿原酸、植物染色剂等产品。紫茎泽兰为有毒杂草, 牛羊食用后可致中毒, 出现体重减轻、肝肾组织器官病变等症状(Oelrichs et al., 1995; 周自玮等, 2006)。对紫茎泽兰开发利用研究的同时, 必须对其毒性进行研究。国外

有研究表明, 9-羧基-10,11-去氢泽兰酮(Euptox A)是紫茎泽兰致肝脏毒性的主要物质(Bohlmann and Gupta, 1981; Kaushal et al., 2001)。本课题组也在实验中证实Euptox A纯品一次性大剂量注入或长期亚慢性喂饲紫茎泽兰提取物(Euptox A含量为7%)的大鼠表现出肝脏中毒, 主要症状为黄疸、肝细胞灶状坏死, 部分肝细胞水肿, 个别汇管区可见少量慢性炎细胞浸润, 急毒评价为低毒(另文发表)。此外, Euptox A还具有杀虫和抑制幼虫生长的作用, 可以作为生物农药开发的活性指标成分。目前, 对紫茎泽兰中Euptox A毒性成分(活性成分)的检测尚未见文献报道。本研究建立了以9-羧基-10,11-去氢泽兰酮为指标成分, 采用高效液相色谱法检测, 液质联用确证紫茎泽兰中肝脏致毒成分的分析方法, 并采用此方法进一步研究揭示了Euptox A在紫茎泽兰体内分布及积累的动态变化规律。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum* Spreng)为四川

收稿日期: 2010-09-15; 接受日期: 2011-03-29

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(No.200803021)

* 通讯作者。E-mail: cresdi@sina.com

省西昌市危害严重的外来入侵植物, 对环境的适应性极强, 在草场、林地、农田、干旱贫瘠的荒坡隙地、岩坎、沟渠边等均能生长。每年开花1次。其物候期为1月中旬至2月下旬孕蕾, 2月下旬至3月中旬现蕾, 3月中旬至4月下旬开花, 4月下旬至5月下旬为休眠期, 6–10月为营养生长期, 其中7–8月生长旺盛, 10月底至11月初基本停止生长。实验所用紫茎泽兰全草系为2009年6月至2010年5月期间采自四川省西昌市马坪坝荒地(海拔约1 500 m)及庐山不同海拔(1 700–2 100 m)林下。将植株不同部位分开, 阴干, 粉碎, 保存于4°C冰箱中备用。

1.2 仪器和试剂

实验仪器有1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司), 包括四元梯度泵、DAD检测器、HPLC2D工作站及柱恒温箱; Bruker Esquire 2000四级杆离子阱检测器; ÄKTA purifier 10层析系统(美国GE公司); Cosmosil C₁₈色谱柱(日本Nacalai公司)。实验试剂包括Euptox A标准品(纯度大于99%, 自制); 甲醇(色谱纯, 美国Tedia公司); 其它试剂均为分析纯。实验用水为Mili-Q超纯水。

1.3 Euptox A标准品制备

Euptox A的提取分离参照文献(Oelrichs et al., 1995; He et al., 2006)并加以改进。将紫茎泽兰叶片阴干, 粉碎成粗粉, 甲醇超声提取, 40°C减压蒸干, 加入少量甲醇溶解, 加水至甲醇含量达20%进行分散, 乙酸乙酯萃取, 减压蒸干, 硅胶拌样, 干法上样进行硅胶柱层析。先用二氯甲烷洗脱除去低极性杂质, 继续用二氯甲烷:乙酸乙酯(98:2, v/v)洗脱, 收集洗脱液, 减压蒸干, 浸膏溶于甲醇:水:三氯甲烷(85:15:5, v/v/v)溶剂中, 上XAD-2大孔树脂柱洗脱, 以除去色素等杂质, 减压除去洗脱剂, 残渣样品进行反复硅胶柱层析得到Euptox A粗品。采用ÄKTA purifier 10 中低压层析系统, Cosmosil C₁₈色谱柱(250 mm×10 mm, 5.0 μm), 流动相为甲醇:水(50:50, v/v), 流速为3.5 mL·min⁻¹, 检测波长为210 nm、254 nm和280 nm。经纯化得到的样品采用UV和MS对比文献数据(Bohlmann and Gupta, 1981; Oelrichs et al., 1995; He et al., 2006)进行结构鉴定。通过HPLC及MS检测, 其纯度大于99%。

1.4 标准溶液的制备

精密称取Euptox A标准品11.1 mg, 用甲醇定容至100 mL作为母液, 分别稀释得到系列浓度梯度, 制作标准曲线。样品保存于4°C冰箱中备用。

1.5 样品制备

精密称取紫茎泽兰不同部位粗粉(叶子0.10–0.25 g, 其它部位包括根、茎、花、种子各1 g), 加入10 mL 40°C甲醇超声提取30分钟。同法提取2次, 合并提取液, 用甲醇定容至25 mL, 溶液过0.45 μm微孔滤膜, 备测。

1.6 色谱和质谱条件

HPLC条件如下: 流动相为甲醇:水=60:40 (v/v); 流速为0.8 mL·min⁻¹; 进样量20 μL; 检测波长为255 nm, 190–400 nm波段全扫描。Cosmosil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

MS条件如下: 电离方式为ESI阳离子电离; 毛细管电压为4.0 kV; 去溶剂温度为300°C; 去溶剂气流为氮气, 600 L·h⁻¹; 碰撞气压为3.0×10⁻⁴ Pa。

2 结果与讨论

2.1 提取条件优化

分别选用乙酸乙酯、丙酮、甲醇、乙醇以及含水甲醇和乙醇作为提取溶剂进行检测。结果表明, 甲醇对Euptox A提取率最高(表1)。通过对溶剂甲醇在提取时间、提取次数、溶剂用量和提取温度等条件进行进一步优化(表2)。所得结果为用10 mL甲醇于40°C超声提取30分钟, 同法提取2次, Euptox A提取完全。

2.2 色谱条件优化

采用DAD检测器对Euptox A标准溶液在190–400 nm波长范围内进行扫描, 发现Euptox A最大吸收波长为197 nm和255 nm, 除去溶剂干扰, 故选择255 nm作为检测波长。选择不同比例的甲醇-水、乙腈-水系统作为流动相进行考察, 当采用60:40(v/v)的甲醇-水系统、流速为1.0 mL·min⁻¹条件时, 目标物与杂质难于完全分离, 因此降低流速至0.8 mL·min⁻¹, 分离度、峰型及分离时间都很理想。Euptox A标样、紫茎泽兰

表1 提取溶剂的优化

Table 1 Optimization of extraction solvent

Solvent	EtoAc	Ethanol	Methanol	Methanol:water (50:50, v/v)	Ethanol:water (50:50,v/v)
Extraction rate (%)	32.1	31.5	61.6	31.4	13.1

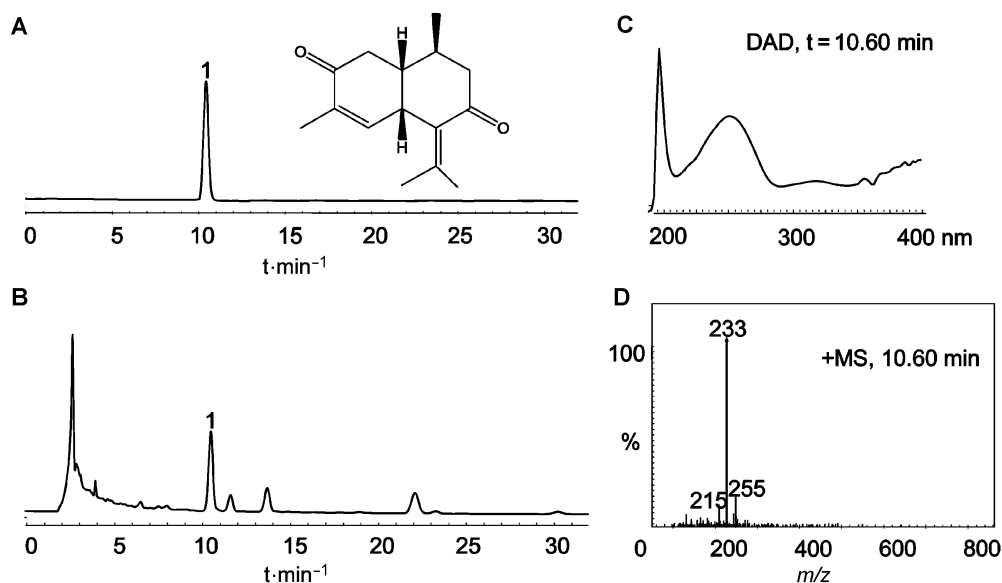


图1 Euptox A标样色谱图及其结构式(A)、紫茎泽兰叶片提取物色谱图(B)及色谱图中峰1的UV吸收谱图(C)和MS图(D)

Figure 1 Structure and HPLC chromatogram of Euptox A (A) and *Eupatorium adenophorum* leaves extract (B), ultraviolet spectrogram of peak 1 in HPLC chromatogram (C) and MS spectra of peak 1 (D)

表2 甲醇提取条件的优化

Table 2 Optimal conditions for methanol extraction

Level	Temperature (°C)	Volume of solvent (mL)	Extraction time (min)	Extraction times
1	40	5	30	1
2	50	10	60	2
3	60	20	120	3

叶片提取物色谱图及Euptox A紫外扫描结果见图1。

2.3 线性关系及检出限

配制的Euptox A标样母液,用甲醇稀释至55.50、22.20、11.10、4.44、2.22和1.11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在优化的实验条件下,Euptox A浓度与峰面积呈良好线性关系,线性方程为 $Y=69\ 404x+10.845$,相关系数 $r^2=0.999$,线性范围为0.028–13.800 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $S/N\geq 10$ 。本方法对Euptox A的检出限为0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.4 精密度与回收率

在相同的实验条件下,分别添加0.4、3.0和6.0 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Euptox A标准品于紫茎泽兰叶片样品中各3次,平均添加回收率在97.3%–103.7%之间,相对标准偏差为2.4%–3.5%。说明本方法对Euptox A检测的重现性好,准确度较高。

2.5 HPLC-MS验证

对Euptox A(图1A)和紫茎泽兰叶片提取物在正离子模式下进行全扫描,找到 $[M+H]^+$ 的准分子离子 $m/z=233$ 。Euptox A在正离子模式质谱条件下易丢失一分子 H_2O 与Na元素结合形成 $[M-\text{H}_2\text{O}+H]^+$ 和 $[M+\text{Na}]^+$,对应的 m/z 分别为215和255。紫茎泽兰叶片提取物的色谱图(图1B)中,峰1通过UV吸收谱图及HPLC保留时间($t_R=10.6$ 分钟)与标准品对照鉴定为Euptox A,通过液质联用的质谱信息,进一步得到验证。

表3 紫茎泽兰样品中Euptox A的含量

Table 3 The content of Euptox A in the plant of *Eupatorium adenophorum*

Collected date (Year-month)	9-oxo-10, 11-dehydroagerophorone content ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	Roots	Stems	Leaves	Flowers	Seeds
2009-06	ND	0.06±0.00	5.08±0.20	—	—
2009-07	0.04±0.00	0.04±0.00	7.98±0.27	—	—
2009-08	ND	ND	8.41±0.31	—	—
2009-10	ND	ND	6.66±0.11	—	—
2009-11	ND	ND	2.76±0.06	—	—
2009-12	ND	ND	3.60±0.15	—	—
2010-01	ND	ND	2.41±0.08	—	—
2010-02	ND	ND	3.68±0.10	—	—
2010-03	ND	0.05±0.00	4.67±0.15	0.28±0.01	—
2010-04	ND	ND	1.34±0.04	0.10±0.00	ND
2010-05	0.04±0.00	0.04±0.00	7.19±0.20	—	—

ND: 未检出 ND: No detection

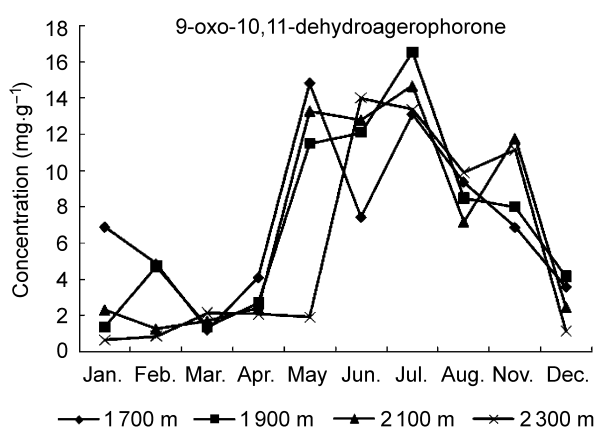


图2 庐山不同海拔高度下紫茎泽兰叶片中Euptox A含量的动态变化

Figure 2 Dynamic curves of Euptox A content in growing leaves of *Eupatorium adenophorum* gathered in four altitudes of Lushan Mountain

2.6 样品测定及Euptox A动态变化规律

利用本实验所建立的测定Euptox A的HPLC分析方法,测定紫茎泽兰植株中不同部位包括根、茎、叶、花和种子中的Euptox A含量。测定结果表明: Euptox A主要存在于紫茎泽兰的叶片中,其它部位含量很少或在此条件下检测不到(表3)。通过对不同月份采集的紫茎泽兰叶片中Euptox A含量动态变化规律的研究,发现处于营养生长期(5—10月,即夏秋季节)的叶片中Euptox A含量较高;而处于生殖生长期(11月至次

年4月,即冬春季节)的叶片中Euptox A含量较低,其中结种子期(4月)含量最低,花期(3月)含量较高(表3)。可见,紫茎泽兰中Euptox A的积累与生长期关系密切。

图2显示,在庐山不同海拔高度下,处于营养生长期的紫茎泽兰叶片中Euptox A的含量普遍高于同时期低海拔荒地上采集的样品。不同海拔高度下采集的叶片中, Euptox A含量差异不大,但不同季节采集的样品中含量差异较大。总体上,处于营养生长期(5—11月)的叶片中Euptox A含量明显高于生殖生长期(12月至次年4月)。7月份采自海拔1 900 m的叶片中Euptox A含量最高,达到 $16.53 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 1月份采自海拔2 300 m的叶片样品中的含量最低,仅为 $0.65 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。高海拔下,叶片样品中Euptox A含量明显偏低的原因,可能是由于此时气温偏低,冬季干枯紫茎泽兰尚未有新叶萌发,导致采集的干枯叶片中Euptox A含量低。

2.7 讨论

紫茎泽兰为有毒外来入侵植物,在其入侵过程中的大面积、高密度扩张性的自然生长过程中,鲜有病虫害发生。植物次生代谢物质是植物在长期进化过程中适应生态环境的结果,是植物自身用于减少昆虫或病原微生物危害的物质基础。本课题组在对紫茎泽兰次生代谢产物及其生物活性的研究中发现,紫茎泽兰叶片的甲醇提取物表现出明显的抑菌、抗病毒、杀虫活性。进一步筛选后明确紫茎泽兰中倍半萜成分和以

Euptox A为主的泽兰酮类衍生物是主要的杀虫活性成分,也是致大鼠肝脏毒性的主要物质。采用本文建立的分析方法对紫茎泽兰中Euptox A的分布和积累的动态研究结果提示:紫茎泽兰作为饲料开发,在夏秋季节采集的原料毒素成分含量高,使用时要保证脱毒彻底;而作为生物农药原料的紫茎泽兰叶片,采集时最好选择在Euptox A含量较高的夏秋季节且在海拔1 700 m以上的山林下。目前紫茎泽兰脱毒饲料及生物有机肥已经进入产业化的生产阶段,但毒性评价主要采用动物实验。生物农药生物测定方面已取得阶段性成果,但尚缺乏质量控制指标。本研究方法和测定结果对入侵植物紫茎泽兰开发利用过程中原料及其产品的质量控制和毒性评价具有重要的现实意义。

参考文献

曹坳程, 芮昌辉, 郭美霞, 袁会珠, 杨代斌, 陈福良, 陈耕, 曾溢曦, 张育森, 林代全, 吴学昌, 魏英, 王华强, 张文吉 (2006). 紫茎泽兰的化学防除及生态修复效果. 安全与环境学报 6(3), 80–85.

周自玮, 段新慧, 徐驰, 奎嘉祥 (2006). 紫茎泽兰饲喂山羊试验研究. 饲料工业 27(19), 25–28.

Bohlmann F, Gupta PK (1981). Six cadinene derivatives

from *Ageratina adenophora*. *Phytochemistry* 20, 1432–1433.

He L, Hou J, Gan ML, Shi JG, Chantrapromma S, Fun HK, Williams LD, Sung HY (2008). Cadinane sesquiterpenes from the leaves of *Eupatorium adenophorum*. *J Nat Prod* 71, 1485–1488.

He L, Yang J, Cao AC, Liu YM, An Y, Shi JG (2006). A new sesquiterpenoid from *Eupatorium adenophorum* Spreng. *Chin J Chem* 24, 1375–1377.

Kaushal V, Dawra RK, Sharma OP, Kurade NP (2001). Biochemical alterations in the blood plasma of rats associated with hepatotoxicity induced by *Eupatorium adenophorum*. *Vet Res Commun* 25, 601–608.

Oelrichs PB, Calanasan CA, Macleod JK, Seawright AA, Ng JC (1995). Isolation of a compound from *Eupatorium adenophorum* (Spreng.) [*Ageratina adenophora* (Spreng.)] causing hepatotoxicity in mice. *Nat Toxins* 3, 350–354.

Sun XY, Lu ZH, Sang WG (2004). Review on studies of *Eupatorium adenophorum*—an important invasive species in China. *J Forest Res* 15, 319–322.

Verma A, Yadava BPS, Sampath KT (1987). Possible use of *Eupatorium adenophorum* Spreng. in animal feeding. *Ind J Anim Nutr* 4, 189–192.

Identification of 9-oxo-10,11-dehydroagerophorone in *Eupatorium adenophorum* by High Performance Liquid Chromatography

Jie Bai¹, Aocheng Cao^{1*}, Meixia Guo¹, Xiaoyan Liu¹, Xiaowen Liu¹, Hai Liang², Bo Zhou²

¹Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China

²Key Laboratory of Plateau and Subtropical Crops, Xichang College, Xichang 615000, China

Abstract We isolated and purified the component of 9-oxo-10,11-dehydroagerophorone (Euptox A), a hepatotoxin and an insecticide constituent, from *Eupatorium adenophorum* leaves by silica gel column chromatography and reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC). We developed an HPLC method for determining Euptox A from *E. adenophorum*, which was confirmed by HPLC-DAD-MS. The chromatographic separation was achieved on a Cosmosil Rp C₁₈ column with methanol:water (60:40, v/v) as the mobile phase, flow rate 0.8 mL·min⁻¹ and wavelength 255 nm. Data were corroborated by HPLC-MS with electro-spray ionization of positive ion mode. The limit of detection for Euptox A was 0.4 µg·g⁻¹. The recoveries were 97.3%–103.7% and relative standard deviations 2.4%–3.5%. Euptox A was mainly distributed in leaves (1.34–8.41 mg·g⁻¹) and only a small amount was detected in flowers, stems, or roots (< 0.06 mg·g⁻¹). Euptox A mainly accumulated in plant leaves in the vegetative period (from May to October), with less accumulation in the reproductive period (from November to the next April). The established HPLC method is simple, quick and could be used for component determination in *E. adenophorum* products for quality control and safety evaluation.

Key words 9-oxo-10,11-dehydroagerophorone, *Eupatorium adenophorum*, hepatotoxin, high performance liquid chromatography

Bai J, Cao AC, Guo MX, Liu XY, Liu XW, Liang H, Zhou B (2011). Identification of 9-oxo-10,11-dehydroagerophorone in *Eupatorium adenophorum* by high performance liquid chromatography. *Chin Bull Bot* **46**, 470–475.

* Author for correspondence. E-mail: cresdi@sina.com