

三七根际土壤中酚酸类物质的鉴定及含量测定^{*}

吴立洁, 刘 杰, 王文祎, 戴 待, 程新宇, 张子龙^{**}, 杨瑶珺^{**}

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘 要:目的:对云南文山三七根际土壤中酚酸的种类进行鉴定,并对其进行含量测定。方法:采用 HPLC-MS、HPLC 技术,并通过文献和对照品比对,鉴定了云南文山三七根际土壤中酚酸的种类并对其进行含量测定。结果:从三七根际土壤提取液中检测到对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和苯甲酸 6 种酚酸类物质,其中对香豆酸含量最高($24.01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),丁香酸含量最低($1.26 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。6 种酚酸类成分在三七根际土壤中的含量顺序为对香豆酸>香草酸>苯甲酸>对羟基苯甲酸>阿魏酸>丁香酸。结论:三七根际土壤中的酚酸类物质可能为三七植物须根残体腐解产生,也可能是三七根系分泌产生。

关键词:三七 根际土壤 酚酸类物质 含量测定

doi: 10.11842/wst.2014.04.026 中图分类号:R284.1 文献标识码:A

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen 为五加科人参属植物,为我国特有的名贵中药材。三七中含有 70 余种单体皂苷、三七黄酮和三七多糖等多种生理活性物质,对血液系统、心脑血管系统、中枢神经系统和免疫系统等具有良好的药理作用。但三七生长的适应范围较窄,即使在其原产地和主产区的文山州也仅有少数耕地适宜种植三七^[1]。而且三七与同属植物人参、西洋参都存在“忌地”问题,生长期间受多种病害侵袭,连作障碍严重影响了三七的质量和产量,其中根腐病最为严重时产量可损失 70% 以上,严重影响了当地三七种植业的发展。

虽然三七的连作障碍问题近年来受到极大关注,但其连作障碍机理尚不清楚。现有研究表明,化感作用是导致植物连作障碍的重要因素之一^[2,3],而大量研究表明,酚酸类物质是引起连作障碍的重要化感物质^[4-12]。三七连作障碍严重,其根系分泌物中酚酸种类与含量方面的报道却很少。本文采用

HPLC-MS、HPLC 技术,鉴定三七根际土壤中酚酸的种类并对其进行含量测定。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BQ-100 恒温摇床(常州普天仪器制造有限公司),Agilent 1100 型高效液相色谱仪,MSD XCT Plus 质谱仪。

1.2 供试土壤

云南文山三七国际交易市场收集的三七根际新鲜土壤,本底土壤(云南文山当地未种植三七土壤),土壤均为由碳酸盐岩发育而成的红壤。

1.3 对照品和试剂

对香豆酸(批号:20120415)、阿魏酸(批号:20130301)、对羟基苯甲酸(批号:20130508)、苯甲酸(批号:20120221)、丁香酸(批号:ZS0906BA13)和香草酸(批号:20130113),纯度均大于 98%,均购自上海源叶生物科技有限公司。NaOH 和 HCl 为分析纯,甲醇为色谱纯,水为高纯水。

收稿日期:2013-12-16

修回日期:2013-12-29

* 国家自然科学基金委青年项目(81102751):营养胁迫下三七化感作用变化及其与连作障碍机理间的关系研究,负责人:张子龙;北京中医药大学研究生自主课题(2013-JYBZZ-XS-070):连作三七土壤中皂苷的动态含量测定以及皂苷对三七的化感自毒作用研究,负责人:吴立洁。

** 通讯作者:张子龙,副研究员,主要研究方向:中药资源与生态研究;杨瑶珺,教授,主要研究方向:中药鉴定以及质量标准研究。

2 方法和结果

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品溶液

精密称定对照品对羟基苯甲酸 0.002 69 g、阿魏酸 0.002 51 g、4-香豆酸 0.002 65 g、苯甲酸 0.002 13 g、丁香酸 0.002 46 g 及香草酸 0.002 33 g 分别置于 10 mL 容量瓶中，用 80% 甲醇溶解并定容。分别取上述对照品溶液阿魏酸、4-香豆酸、苯甲酸 2 mL，对羟基苯甲酸、丁香酸和香草酸 1 mL 混合置于 10 mL 容量瓶，用 80% 甲醇定容，摇匀即得。

2.1.2 供试品溶液制备

三七根际土壤与本底土壤风干，除去三七须根等杂物，过 24 目筛，各称取 30 g，置于 500 mL 具塞三角瓶中，加入 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 150 mL，120 rpm 振荡提取 3 h，静置 3 h，滤纸过滤。上清液用 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液调至 pH 2.5，再用乙酸乙酯萃取 3 次，合并乙酸乙酯萃取液，45℃ 蒸干，残渣用 2 mL 80% 甲醇溶解，4℃ 避光保存，过 0.22 μm 滤膜，精密吸取 4 μL 注入 HPLC 色谱仪^[13]。

2.2 色谱条件和质谱条件

色谱条件：色谱柱：Thermo C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)，流动相：0.16% 乙酸-水 (A) 和甲醇 (B)，梯度洗脱：0~15 min，5%~20% B；15~20 min，20%~35% B；20~40 min，35%~50% B；40~45 min，50%~95% B；保持 5 min 后回到初始状态，平衡 10 min，流速： $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，检测波长：280 nm，进样量：4 μL，柱温：35℃^[4,5,13]。质谱条件：雾化压力：25 psi，干燥气流速： $8.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ，干燥温度：325℃，扫描范围： m/z 50~400，离子化模式为负模式^[4]。

2.3 线性关系考察

取“2.1.1”项下所制备的混合对照品溶液过 0.22 μm 滤膜，分别精密吸取 6、9、12、15、18、21、24、27 μL 注入 HPLC 色谱仪。以对对照品的含量 (μg) 为横坐标，以峰面积为纵坐标，制作标准曲线，所得线性方程和回归系数见表 1。

2.4 精密度试验

取同一供试对照品，连续 6 次进样，所得结果 RSD 值均小于 2%，表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取 6 份三七根际土壤样品，按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样 4 μL，对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和苯甲酸含量的 RSD 值均小于 3%。

2.6 稳定性试验

取同一供试样品，分别于制样后 0、4、8、12、16、24 h 后，按“2.2”项下色谱条件进样 4 μL，对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和苯甲酸含量的 RSD 值均小于 3%。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的供试品溶液 6 份，分别加入一定含量的对照品，按照“2.2”项下色谱条件进行测定，结果 RSD 值均小于 3%。见表 2。

2.8 三七根际土壤中酚酸类物质的鉴定及含量测定

将三七根际土壤以及本底土壤提取液经处理后，进行 LC-MS 检测。将三七根际土壤提取液的提取离子流图及其对应的二级质谱图 (包括母离子和子离子) 与文献进行比较，确定其中 m/z 为 137、167、197、163、193、121 的离子可能为对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和苯甲酸。根据土壤样品提取液的提取离子流图及其对应的二级质谱图与对照品离子流图及其对应的二级质谱图进行对比，确定三七根际土壤中含有对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和苯甲酸，结果见表 2 和图 1。经 HPLC 测定，三七根际土壤中 6 种酚酸含量见表 3。可知在三七根际土壤中测得的酚酸类成分中对香豆酸含量为最高 (24.01

表 1 6 种酚酸类对照品的线性关系

酚酸类物质	线性方程	R^2	线性范围/μg
对羟基苯甲酸	$Y = 2 \times 10^6 X + 7\,778.5$	0.999 9	0.161 4~0.726 3
香草酸	$Y = 2 \times 10^6 X - 795.46$	0.999 9	0.139 8~0.629 1
丁香酸	$Y = 3 \times 10^6 X + 2\,230.4$	0.999 9	0.147 6~0.664 2
对香豆酸	$Y = 4 \times 10^6 X + 24\,819$	0.999 9	0.318 0~1.431 0
阿魏酸	$Y = 3 \times 10^6 X + 2\,677.5$	0.999 9	0.301 2~1.355 4
苯甲酸	$Y = 4 \times 10^6 X + 2\,815.6$	0.999 9	0.255 6~1.150 2

表 2 加样回收率试验结果

酚酸类物质	样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	平均回收率/%	RSD/%
对羟基苯甲酸	55.6	60	113.2	95.3	2.4
	55.6	60	110.2		
	55.6	60	104.8		
	55.6	60	111.2		
	55.6	60	108.8		
	55.6	60	112.8		
香草酸	195.8	192	380.6	97.2	0.7
	195.8	192	375.8		
	195.8	192	377.4		
	195.8	192	373.2		
	195.8	192	374.3		
	195.8	192	380.3		
丁香酸	25.2	26	50.2	95.6	2.5
	25.2	26	50.1		
	25.2	26	49.8		
	25.2	26	47.8		
	25.2	26	46.7		
	25.2	26	49.1		
对香豆酸	480.2	480	962.8	99.5	1.1
	480.2	480	943.3		
	480.2	480	958.6		
	480.2	480	960.8		
	480.2	480	967.8		
	480.2	480	939.1		
阿魏酸	46.6	45	89.5	96.4	2.8
	46.6	45	91.4		
	46.6	45	91.1		
	46.6	45	86.4		
	46.6	45	84.6		
	46.6	45	86.8		
苯甲酸	105.4	102	217.9	104.3	1.9
	105.4	102	211.4		
	105.4	102	218.2		
	105.4	102	210.8		
	105.4	102	217.3		
	105.4	102	222.3		

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 丁香酸含量最低($1.26\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 酚酸总量达到 $45.44\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。6 种酚酸在三七根际土壤中的含量顺序为对香豆酸>香草酸>苯甲酸>对羟基苯甲酸>阿魏酸>丁香酸,而在云南文山当地未种植过三七的本底土壤中,并未检测到上述 6 种酚酸物质。

3 讨论

药用植物在连作条件下,随着连作年限的增加,根系分泌的某些自毒物质逐渐积累,当积累到一定的程度时,就改变了土壤微环境,尤其是植物残体腐解物与病原微生物的代谢产物对植物产生致毒作用,并连同植物根系分泌物中的自毒物质一起影响植株代谢,最后导致化感自毒作用的发生,引起连作障碍^[14]。三七是连作障碍比较严重的药用植物之一,已有对三七根际土壤的化学成分进行研究^[15,16],证实三七的连作土壤中含有 β -谷甾醇、阿魏酸、人参皂苷 Rh_1 、 Rh_4 、 Rg_1 及三七皂苷 R_1 等化学成分,其中阿魏酸等对于三七种子发芽的化感作用^[17]。

酚酸类成分作为植物组织中一类重要的次级代谢产物,在防御食草动物、微生物、病毒或竞争的植物以及保护植物免受紫外线辐射和氧化

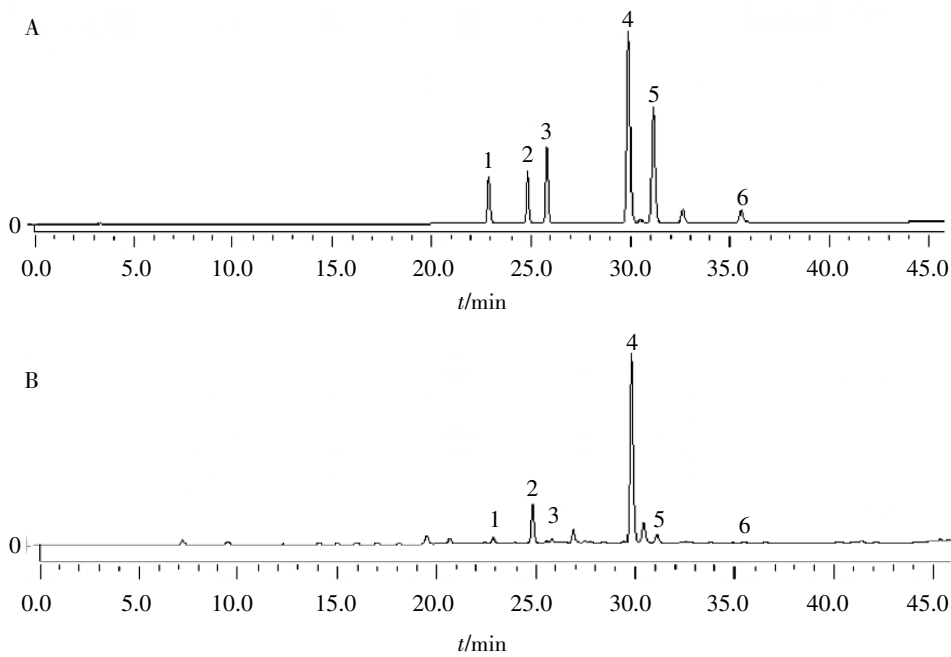


图1 混合对照品及三七土壤样品色谱图

注:A.混合对照品,B.土壤样品;1.对羟基苯甲酸,2.香草酸,3.丁香酸,4.对香豆酸,5.阿魏酸,6.苯甲酸。

表3 三七根际土壤中酚酸类物质的LC-MS检测结果			
酚酸类物质	m/z	保留时间/min	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
对羟基苯甲酸	137	22.6	2.78
香草酸	167	24.9	9.79
丁香酸	197	26.0	1.26
对香豆酸	163	30.3	24.01
阿魏酸	193	31.7	2.33
苯甲酸	121	36.3	5.27

剂等危害方面起着重要作用。本文首次从三七根际土壤中同时检测到对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和苯甲酸6种酚酸类物质,含量介于 $1.26\sim 24.01\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间。黄小芳等^[18]研究发现,苯甲酸能够抑制人参幼苗根系POD酶活性,引起细胞生理活动紊乱。高微微等^[13,19]从西洋参根际土壤中检测到包括上述6种酚酸在内的9种酚酸,并证明香草酸、丁香酸、阿魏酸和香豆酸等酚酸类物质能够抑制西洋参幼苗的生长,还发现香草酸、对香豆酸、丁香酸对西洋参致病菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和根腐菌(*Fusarium solani*)菌丝生长有低促高抑的作用。

本实验材料来源于三七根际抖落下的土壤以及云南文山当地未种植过三七的本底土壤。在本底土壤中,上述6种酚酸均未达到检测限。而在三七根际土壤中,有部分三七须根脱落掺杂在抖落的土壤中。因此,三七根际土壤中的酚酸类物质的来源可能为三七植物须根残体腐解产生,也可能是三七根系分泌产生。这些酚酸类物质残留在种植过三七的土壤中,随着时间的延长越来越多,很可能是造成三七不能连作的重要原因。关于所测到的酚酸类物质对于三七种子以及幼苗生长的化感作用,本课题组将继续深入研究。

参考文献

- 1 陈中坚,孙玉琴,黄天卫,等.三七栽培及其GAP研究进展.世界科学技术-中医药现代化,2005,7(1):67~73.
- 2 张晓玲,潘振刚,周晓锋,等.自毒作用与连作障碍.土壤通报,2007,38(4):781~784.
- 3 李勇,黄小芳,丁万隆.营养元素亏缺对人参根分泌物主成分的影响.应用生态学报,2008,19(8):1688~1693.
- 4 郭修武,李坤,孙英妮,等.葡萄根系分泌物的化感效应及化感物质的分离鉴定.园艺学报,2010,37(6):861~868.
- 5 甄文超,王晓燕,孔俊英,等.草莓根系分泌物和腐解物中的酚酸类物质及其化感作用.河北农业大学学报,2004,27(4):74~78.
- 6 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.江苏农业学报,2013,29(2):240~246.
- 7 Zhou X G, Wu F Z. Artificially applied vanillic acid changed soil microbial communities in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Can J Soil Sci*,2013,93(1):13~21.
- 8 李龙秀.丁香酸对苦瓜种子萌发、幼苗生长的影响.蔬菜,2013(4):56~57.
- 9 黄玉茜,韩立思,杨劲峰,等.花生植株和土壤水浸液自毒作用研究及土壤中自毒物质检测.生态学报,2012,32(19):6023~6032.
- 10 杜静,杨家学,焦晓林,等.氮、磷、钾缺乏对西洋参根分泌物中酚

- 酸类化合物的影响.中国中药杂志,2011,36(3):326~329.
- 11 邵庆勤,李孟良,毕亚玲.酚酸类物质对小麦幼苗生长特性的影响.安徽科技学院学报,2009,23(1):23~26.
 - 12 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.生态环境,2007,16(3):954~957.
 - 13 He C N, Gao W W, Yang J X, *et al.* Identification of autotoxic compounds from fibrous roots of *Panax quinquefolium* L. *Plant and Soil*, 2009, 318(1-2):63~72.
 - 14 张重义,林文雄.药用植物的化感自毒作用与连作障碍.中国生态农业学报,2009,17(1):189~196.
 - 15 周家明,崔秀明,曾鸿超,等.三七根系分泌物的化学成分研究.特产研究,2009,31(3):37~39.
 - 16 周家明,张文斌,杨建忠,等.三七根际土壤化感物质的初步分离鉴定.现代中药研究与实践,2012,26(1):14~16.
 - 17 孙玉琴,陈中坚,韦美丽,等.阿魏酸对三七化感作用的初步研究.特产研究,2008,30(2):39~41.
 - 18 黄小芳,李勇,易茜茜,等.五种化感物质对人参根系酶活性的影响.中草药,2010,41(1):117~121.
 - 19 杨家学,高微微.酚酸类化感物质对两种西洋参病原真菌的作用.中国农学通报,2009,25(9):207~211.

Identification and Content Determination of Phenolic Acids of Rhizosphere Soil of *Panax Notoginseng*

Wu Lijie, Liu Jie, Wang Wenyi, Dai Dai, Cheng Xinyu, Zhang Zilong, Yang Yaojun

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Phenolic acids of rhizosphere soil of *Panax notoginseng* were identified and the contents were determined. HPLC-MS and HPLC were used. Compared with the literature and standard reference, identification and content determination were given on phenolic acids of rhizosphere soil of *Panax notoginseng* in Wenshan, Yunnan province. The results showed that six types of phenolic acids were detected from the extract of rhizosphere soil of *Panax notoginseng*, which were p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and benzoic acid. The content of p-coumaric acid showed the highest concentration of $24.01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, while syringic acid had the lowest concentration of $1.26 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. The sequence of content in the rhizosphere soil of *Panax notoginseng* from top to bottom was p-coumaric acid, vanillic acid, benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, ferulic acid and syringic acid. It was concluded that the rhizosphere soil of *Panax notoginseng* contained six types of phenolic acids, which were p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and benzoic acid.

Keywords: *Panax notoginseng*, rhizosphere soil, phenolic acids, content determination

(责任编辑 叶丽萍 张志华, 责任译审 王 晶)