

文章编号:1001-7380(2015)05-0010-04

高苦楝素含量苦楝优良单株初步选择

教忠意¹, 杨 湘², 何开跃^{2*}

(1. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153; 2. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要:用超声波萃取法提取供试苦楝根皮、茎皮、果实、果梗、叶片和叶柄内的苦楝素,用高效液相色谱法测定苦楝素含量,并采用多重比较和聚类分析等方法进行苦楝高苦楝素含量优良单株初选。结果表明:6个部位中苦楝素含量高低为根皮>茎皮>果实>果梗>叶片>叶柄。初选出适合矮林作业的单株4株,适合果园经营的备选单株6株。

关键词:苦楝;苦楝素;优良单株;高效液相色谱

中图分类号:S792.33 **文献标识码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2015.05.003

Selection of superior individuals of *Melia azedarach* L. for high toosendanin content

JIAO Zhong-yi¹, YANG Xiang², HE Kai-yue^{2*}

(1. Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China;

2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to broaden the application of *Melia azedarach* and guide the related productive practice, fine individuals for high content of toosendanin were selected. The toosendanin was extracted from their velamen, bark, fruit, fruit stalks, leaves and petioles by ultrasonic method. The content of toosendanin was measured by HPLC. Then, fine individuals were primarily selected by multiple comparison and cluster analysis. The result showed that the content of toosendanin was the highest in the velamen and bark, followed by fruit, fruit stalks, leaves and petioles. Four individuals with coppicing and 6 individuals with fruit forest management were primarily determined.

Key words: *Melia azedarach* L.; Toosendanin; Superior individual; HPLC

苦楝(*Melia azedarach* L.)为楝科楝属落叶乔木,其内含物具有杀虫、抑菌活性,至今已被开发应用于医药、生物农药、化妆品和洗涤用品等生产^[1]。苦楝素作为四环三萜类化合物,是苦楝内含物中主要的杀虫活性成分,具有广谱、低毒、低残留等优点^[2-5]。目前,国内苦楝内含物研究多集中于分析、测定和应用,苦楝素含量高的良种选育方面报道不多。陈涵等^[6]比较了福建6个种源和全国17个种源的苦楝皮、果、叶提取物中苦楝素的含量,筛选出了优质种源。柯玉铸^[7]对国内15个苦楝种源进行

研究,筛选出适于矮林作业的优良种源7个;对福建境内选出的128株苦楝优良单株进行测定,筛选出果实中苦楝素含量高的优良单株9株。上述研究以福建种源居多,研究部位以苦楝树皮、叶片和果实为主,未涉及根皮等其他部位。因此,在江苏沿海开发战略实施的背景下,对江苏本地适生苦楝进行各部位苦楝素含量的研究,从源头提高苦楝素产出率,对工农业生产和人们生活水平的提高,以及生态环境的改善都具有重要的意义。

收稿日期:2015-08-10;修回日期:2015-8-30

基金项目:江苏省科技支撑计划项目“速生耐盐楝树优良品种选育”(BE2012347);江苏省林业三新工程项目“耐盐速生楝树新无性系区域试验及栽培技术研究”(LYSX[2014]20)

作者简介:教忠意(1978-),男,辽宁凤城人,副研究员,硕士,主要从事林木遗传育种、园林植物应用和景观生态研究。

* **通信作者:**何开跃(1959-),女,四川重庆人,教授,博士,主要从事植物生理生化研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为江苏省林业科学研究院经过前期优选而获得的具有生长优势的优良苦楝无性系根段扦插繁殖苗,全部生长于江苏省大丰林场同一立地条件下。选取4年生健壮无病虫害的苦楝单株15株,分别编为1~15号,采集苦楝的根皮、茎皮、果实、果梗、叶片和叶柄鲜样。

1.2 试验方法

姜萍等^[8]通过对比研究认为超声波提取法是苦楝素提取的最好方法,因此本试验亦采用此方法。2009年11月15日采集苦楝的根皮、茎皮、果实、果梗、叶片和叶柄,于实验室进行苦楝素的分离。取一定量的苦楝样品,洗净烘干,粉碎过40目筛。然后取粉碎后的上述样品5g,装入圆底烧瓶,加入50mL石油醚,于50℃水浴中进行超声波萃取10min,静置后弃去石油醚,重复3次。再加95%乙醇45mL,50℃超声波萃取40min用滤纸过滤,残渣再用乙醇浸提,重复3次。合并滤液,置于旋转蒸发器中,减压浓缩滤液,挥发去乙醇。浓缩的滤液呈膏状物。苦楝素的定量测定:取上述浓缩的滤液用甲醇溶解,定容至5ml,得样品制备液,过0.45μm滤膜,后置液相色谱所用的样品瓶中,进行HPLC检测,色谱柱:VP-ODS 150×4.6mm,柱温:30℃,流动相:甲醇-H₂O(体积分数60:40),经抽滤后使用,流速:1.0mL/min,UV检测波长:215nm,洗柱时间:5min,进样分析时间20min,记录样品峰中苦楝素峰面积值,用回归方程计算样品中苦楝素的含量。定性方法:保留时间+标准加入法;定量方法:标准曲线法+标准加入法^[9]。

标准曲线的绘制:准确称取一定量的苦楝素纯品于容量瓶中,用甲醇定容,得到1000μg/mL的苦楝素标准贮备液。由苦楝素标准贮备液用色谱级甲醇配置成10,20,30,40,50μg/mL系列质量浓度的标准工作液。将上述系列液分别进样20μL,在液相色谱仪上测定峰面积,用测得的各峰面积与对应的标准溶液的苦楝素浓度绘制标准曲线。

1.3 统计分析

数据处理和表格制作通过Excel软件完成,数据分析通过SPSS15.0和DPS软件完成。

2 结果与分析

2.1 线性相关性测定

在试验选定的色谱条件下,苦楝素标准品色谱如图1所示。在该色谱条件下进行相同体积的进样,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作图可得一条直线,苦楝素的质量浓度在10~50μg/mL之间有很好的线性相关性,线性方程为 $Y = aX + b$, $a = 1.762\ 502\ e^{-0.04}$, $b = 0.190\ 806\ 9$,相关系数为 $R^2 = 0.998\ 400\ 0$ 。

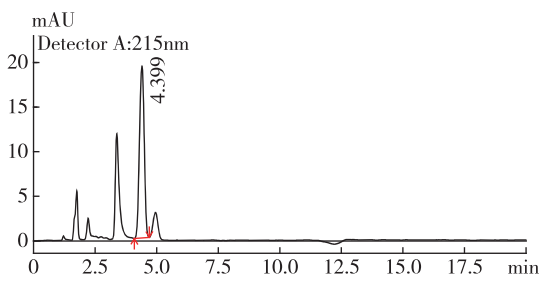


图1 苦楝素的HPLC标准色谱

2.2 不同部位苦楝素含量测定

采集15株供试苦楝的根皮、茎皮、果实、果梗、叶片、叶柄样品,分别测定其苦楝素含量(见表1)。上述参试各苦楝部位中均含有苦楝素,且每个部位中苦楝素含量的变异幅度较大。供试苦楝单株参试部位苦楝素含量均值为0.903~2.336μg/mg,苦楝

表1 供试苦楝6个部位苦楝素含量 μg/mg

单株序号	根皮	茎皮	果实	果梗	叶片	叶柄	平均值
1	2.047	2.187	0.417	0.598	0.214	0.020	0.914
2	1.068	2.027	1.100	0.825	0.079	1.108	1.035
3	2.400	2.668	0.330	0.572	0.132	0.090	1.032
4	3.420	0.271	0.243	0.654	0.320	0.803	0.952
5	1.695	2.111	1.728	0.578	0.139	0.067	1.053
6	1.820	1.607	0.302	0.679	0.989	1.636	1.172
7	2.341	2.356	0.402	0.552	0.862	0.182	1.116
8	2.010	1.286	0.277	0.688	1.071	0.085	0.903
9	1.803	3.777	1.257	0.673	0.084	0.047	1.274
10	2.086	1.479	0.697	0.595	0.943	0.061	0.977
11	1.748	1.736	0.147	1.053	0.950	1.317	1.159
12	2.183	3.846	1.434	1.011	0.015	0.150	1.440
13	2.828	2.357	0.541	0.672	0.947	0.037	1.230
14	5.174	4.758	2.074	0.131	0.727	1.149	2.336
15	1.950	1.406	1.857	0.041	0.933	0.055	1.040

单株苦楝素含量差异较大。苦楝素含量最高的 14 号单株为平均值的 1.99 倍,是含量最低的 8 号单株的 2.59 倍。15 株供试苦楝中,苦楝素含量高于平均值的有 4 株,分别为 14 号、12 号、9 号、13 号,占供试苦楝总数的 26.67%。对供试苦楝 6 个参试部位苦楝素含量进行多重比较(见表 2)可知,苦楝素平均含量由大到小依次为根皮、茎皮、果实、果梗、叶片、叶柄,其中最大值为根皮 2.305 $\mu\text{g}/\text{mg}$,是最小值叶柄含量的 5.08 倍。根皮和茎皮中苦楝素含量均超过 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$,且差异不显著,并与果实、果梗、叶片和叶柄存在显著差异;果实、果梗、叶片和叶柄中苦楝素含量差异不显著。

表 2 供试苦楝 6 个部位中苦楝素含量的多重比较

部位	苦楝素含量 /($\mu\text{g}/\text{mg}$)	部位	苦楝素含量 /($\mu\text{g}/\text{mg}$)
根皮	$2.305 \pm 0.247 \text{ aA}$	果梗	$0.621 \pm 0.068 \text{ bB}$
茎皮	$2.258 \pm 0.295 \text{ aA}$	叶片	$0.560 \pm 0.108 \text{ bB}$
果实	$0.854 \pm 0.171 \text{ bB}$	叶柄	$0.454 \pm 0.113 \text{ bB}$

不同大、小写字母分别表示差异达到 0.01 和 0.05 显著水平。

2.3 用于矮林作业的优良单株选择

分别对参试苦楝的茎皮、叶片和叶柄 3 个部位的苦楝素含量进行聚类分析(见图 2~4)。依茎皮中苦楝素含量聚类分析结果(见图 2),可将参试苦楝划分为 4 类,即苦楝素含量较高的 9 号、12 号和 14 号,苦楝素含量高的 1 号、2 号、3 号、5 号、7 号和 13 号,苦楝素含量一般的 6 号、8 号、10 号、11 号和 15 号,苦楝素含量较低的 4 号。依叶片中苦楝素含量聚类分析结果(见图 3),可将参试苦楝划分为 3 类,即苦楝素含量较高的 6 号、7 号、8 号、10 号、11 号、13 号、14 号和 15 号,苦楝素含量一般的 1 号和 4 号,苦楝素含量较低的 2 号、3 号、5 号、9 号和 12 号。依叶柄中苦楝素含量聚类分析结果(见图 4),可将参试苦楝划分为 3 类,即苦楝素含量较高的 2 号、4 号、6 号、11 号和 14 号,苦楝素含量一般的 7 号和 12 号,苦楝素含量较低的 1 号、3 号、5 号、8 号、9 号、10 号、13 号和 15 号。适合矮林作业的苦楝应具备地上部分苦楝素含量高的特点,又地上部分中尤以茎皮的苦楝素含量最高。综合上述,可初步认为 7 号、9 号、12 号和 14 号供试苦楝单株适于矮林作业。

2.4 用于果林经营的备选单株选择

分别对参试苦楝的果实和果梗的苦楝素含量进行聚类分析(见图 5,6)。依果实中苦楝素含量聚类

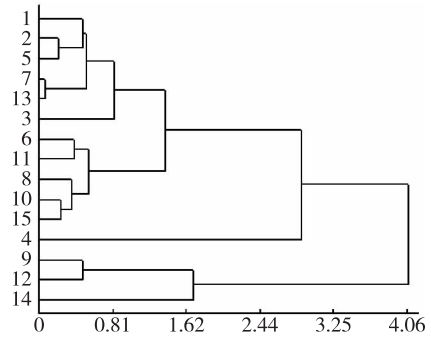


图 2 茎皮苦楝素含量聚类分析

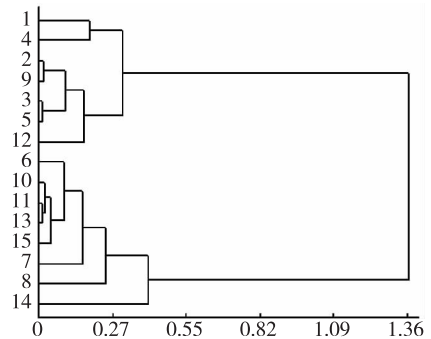


图 3 叶片苦楝素含量聚类分析

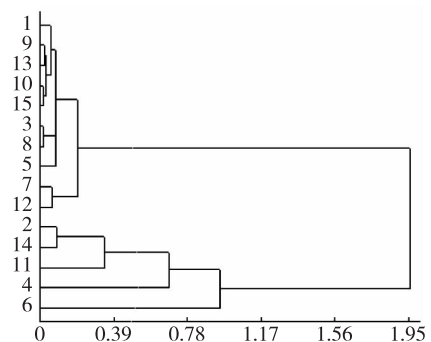


图 4 叶柄苦楝素含量聚类分析

分析结果(见图 5),可将参试苦楝划分为 3 类,即苦楝素含量较高的 5 号、14 号和 15 号,苦楝素含量高的 2 号、9 号和 12 号,苦楝素含量低的 1 号、3 号、4 号、6 号、7 号、8 号、10 号、11 号和 13 号。依果梗中苦楝素含量聚类分析结果(见图 6),可将参试苦楝划分为 4 类,即苦楝素含量较高的 11 号和 12 号,苦楝素含量高的 2 号,苦楝素含量一般的 1 号、3 号、4 号、5 号、6 号、7 号、8 号、9 号、10 号和 13 号,苦楝素含量低的 14 号和 15 号。苦楝素主要集中于苦楝的根皮、茎皮和果实等部位,因此,在实际生产中,苦楝除可用于矮林作业外,果林经营亦是重要的经营方

式之一,且果林经营不破坏植株,仅采收果实,目前应用较广。但因果林经营需结合单株果实产量进行综合评判,因此初步认为2号、5号、9号、12号、14号和15号供试苦楝单株可作为果林经营的备选单株。

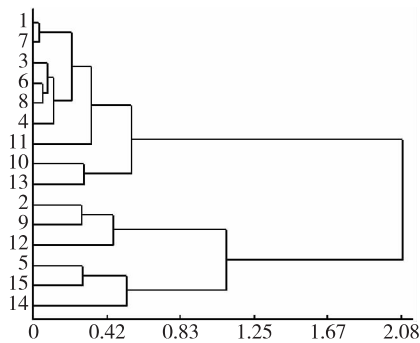


图5 果实苦楝素含量聚类分析

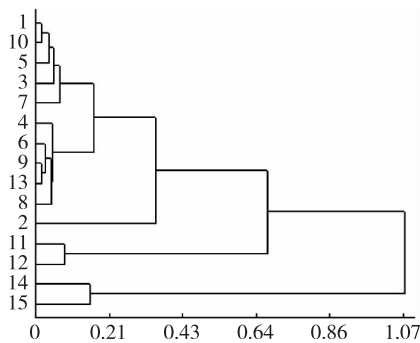


图6 果梗苦楝素含量聚类分析

3 讨论

通过对参试苦楝单株的根皮、茎皮、果实、果梗、叶片和叶柄等6个部位中苦楝素含量的测定,发现各部位均含有苦楝素,且根皮和茎皮中苦楝素含量较高,这与韩玖、张峰、颜滢等^[10-12]的研究结果相似,但与张民力等^[13]试验中关于果实中仅含微量苦楝素或测不出的结论不一致。陈羨德^[14]对苦楝不同部位苦楝素的含量进行测定,结果显示苦楝素的平均含量大小依次为果实>树皮>枝叶,而本试验的结果是苦楝素含量顺序为根皮>茎皮>果实>果梗>叶片>叶柄,其中最大值为根皮2.305 μg/mg,是最小值叶柄含量的5.08倍。

在实际生产经营过程中,矮林作业和果林经营是苦楝素原料林建设常见的2种模式。苦楝萌芽能力强,地上部分生长快,采收方便,且参试苦楝茎皮中苦楝素含量较高,叶片、叶柄等部位也含有苦楝素,经分析初步认为7号、9号、12号和14号供试苦

楝单株适合用于矮林作业。果林经营不破坏树体,对植株生长有利,且经过合理施肥和修剪等措施提高单株果实产量,可为苦楝的综合利用再添新途径,结合前述分析,可初步认为2号、5号、9号、12号、14号和15号供试苦楝单株可作为果林经营的备选单株。

本试验参试苦楝均为经过筛选的具有较强生长势的优良单株,因此,再以其各部位苦楝素含量作为进一步选择的指标,具有一定的生产应用价值。但本试验仅是针对现有资源进行的初步测定和筛选,且单位面积苦楝素产量既与苦楝相关部位苦楝素含量有关,也与其干物质产量等密切相关。因此,扩大筛选范围,深入研究不同模式下的栽培管理技术,努力提高单位面积产量也是今后需要深入研究的内容。

参考文献:

- [1] 教忠意,唐凌凌,隋德宗,等. 苦楝的研究现状与展望[J]. 福建林业科技,2009,36(4):269-274.
- [2] Xu R S, Lin W H, Han J, et al. Studies on the chemical Constituents of *Melia azedarach* [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 1992, 1(2):7-11.
- [3] Nakatani M, Huang R C, Okamura H, et al. Limonoid antifeedants from Chinese *Melia azedarach* [J]. Phytochemistry, 1994, 36(1):39-41.
- [4] Takeya K, Qiao Z S, Hirobe C, et al. Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from *Melia azedarach* [J]. Phytochemistry, 1996, 42(3):709-712.
- [5] 洪燕珍,王宏涛,李 军,等. 苦楝果实中苦楝素的分离及鉴定[J]. 厦门大学学报,2007,46(3):365-368.
- [6] 陈 涵,刘月蓉,牟大庆,等. 苦楝皮、果、叶提取物苦楝素含量分析[J]. 林产化学与工业,2009,29(10):174-178.
- [7] 柯玉涛. 苦楝素含量高的苦楝优良种源及单株选育研究[J]. 福建林学院学报,2009,29(2):139-143.
- [8] 姜 萍,安鑫南. 苦楝素提取方法的比较研究[J]. 林产化学与工业,2005,25(4):79-82.
- [9] 唐 英,郭 惠,胡德斌,等. 超声波提取川楝素的方法研究[J]. 西南民族大学学报,2004,30(6):714-717.
- [10] 韩 玖,林文翰,徐任生,等. 苦楝化学成份的研究[J]. 药学报,1991,26(6):426-429.
- [11] 张 峰,李艳明,原玲芳,等. 苦楝叶中挥发油成分及抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(27):13097-13098,13100.
- [12] 颜 滢,黄 展. 苦楝皮的化学成分研究[J]. 药学实践杂志,2011,29(4):285-286,317.
- [13] 张民力,张 兴,赵喜欢. 中国不同地区楝属植物中川楝素含量测定[J]. 华南农业大学学报,1988,9(3):31-36.
- [14] 陈羨德. 植物源农药原料林苦楝良种选育及其遗传多样性分析[D]. 福州:福建农林大学,2008.