

影响九华山千层塔石杉碱甲含量的 主要环境因子分析

石 玮, 罗建平^①, 赵晓丹

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要: 为了确定九华山千层塔 [*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.] 的最佳采收期和采收部位, 根据千层塔不同部位的石杉碱甲含量及各环境因子的变化趋势, 运用灰色关联分析法对影响九华山千层塔石杉碱甲含量的主要环境因子进行了分析。结果表明, 千层塔各部位的石杉碱甲含量不同, 其中根中的含量最低, 叶和茎中的含量较高; 4 月份叶和茎中的石杉碱甲含量最高, 分别为 0.055 9 % 和 0.044 4 %。影响九华山千层塔石杉碱甲含量的主要环境因子是根际土壤有机质含量、全氮含量和全磷含量, 温度和降水量与石杉碱甲含量变化的相关性最小。研究结果表明, 在九华山, 千层塔的最佳采收期为 4 月份, 最佳采收部位是叶和茎。

关键词: 千层塔; 石杉碱甲; 环境因子; 九华山

中图分类号: R282.2; Q948.11 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)03-0058-05

Analyses on key environmental factors influencing huperzine A content of *Huperzia serrata* in Jiuhua Mountain SHI Wei, LUO Jian-ping^①, ZHAO Xiao-dan (Department of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(3): 58-62

Abstract: To determine the optimal harvesting time and the best plucking organs, the key environmental factors influencing huperzine A content of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. were investigated by the grey correlation analysis based on the changes of huperzine A content in different parts of *H. serrata* and the environmental factors in Jiuhua Mountain. The results showed that the huperzine A content in different parts was varied, in which the content in root was the lowest, while the contents in leaf and stem were higher. In April, the huperzine A content in leaf and stem reached the highest with 0.055 9 % and 0.044 4 %, respectively. The key environmental factors influencing huperzine A content of *H. serrata* in Jiuhua Mountain were the contents of organic matter, TN and TP in the rhizosphere soil, and temperature and rainfall showed the least correlation with huperzine A content. It is suggested that the optimal harvesting time of *H. serrata* is at April in Jiuhua Mountain, and leaf and stem are the best plucking organs.

Key words: *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.; huperzine A; environmental factor; Jiuhua Mountain

千层塔 [*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.] 又名蛇足石杉, 是一种重要的野生药用植物资源, 其体内所含的生物碱——石杉碱甲 (huperzine A) 是高效治疗重症肌无力和老年痴呆症药品的主要药源^[1]。千层塔中的石杉碱甲含量极低, 加之千层塔孢子的萌发周期长、生长极缓慢, 因此该野生药用植物资源远远不能满足市场需要。尽管国内外学者对石杉碱甲及其衍生物和类似物的合成进行了大量的研究工作^[2], 但迄今为止基本没有得到比天然石杉碱甲活

性更好的衍生物和类似物。由于在用组织培养法生产石杉碱甲的培养过程中存在内生菌污染和再生困难等问题, 因而研究进展迟缓^[3-4]。有研究者发现, 不同区域生长的千层塔中石杉碱甲的含量不同^[5],

收稿日期: 2007-08-21

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (00041508); 合肥工业大学科学研究发展基金资助项目 (043001F)

作者简介: 石 玮 (1977—), 女, 安徽六安人, 硕士, 讲师, 主要从事药用植物生物技术研究。

^① 通讯作者 E-mail: yyluo97@yahoo.com.cn

且环境因子能影响石杉碱甲的合成^[6]。

作者以安徽省千层塔资源较丰富的九华山为考察地,对产自九华山的千层塔全草不同部位的石杉碱甲含量的月变化进行了测定,同时分析了产地各环境因子(温度、降雨量和根际土壤养分等)与千层塔中石杉碱甲含量的关系,以期确定九华山地区千层塔的最佳采收期和最佳采收部位,为在九华山进行千层塔的人工栽培提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

于2005年1月至12月在安徽省九华山凤凰松采集新鲜的千层塔 [*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.] 全草及其根际土壤样品,每月采集1次,千层塔种类由合肥工业大学生物与食品工程学院罗建平教授鉴定。将千层塔全草分成根、茎和叶3部分,50℃烘干,粉碎后过20目筛,备用。根际土壤样品50℃烘干,粉碎后用于土壤养分测定。

实验用石杉碱甲标准品购自Sigma公司,纯度为99.8%。甲醇为色谱级,水为双蒸水,其余试剂均为分析纯。实验地的月均温和降雨量数据资料由安徽省青阳县气象站提供。

1.2 方法

1.2.1 石杉碱甲的提取和测定

1.2.1.1 标准曲线的绘制 参照文献[7]的方法进行标准曲线的测定。精密称取2.5 mg 石杉碱甲标准品,用 $V(\text{甲醇}):V(0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 醋酸铵}) = 32:68$ 混合溶剂溶解,配制成浓度为 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的石杉碱甲标准品贮备液,再用相同的混合溶剂稀释成浓度分别为5、10、20、40和50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准品溶液,按照下列色谱条件分别进行高效液相色谱分析,进样量20 μL 。以峰面积 Y 对浓度 C 绘制标准曲线,并进行线性回归分析,获得石杉碱甲标准品浓度与峰面积的线性回归方程。

1.2.1.2 高效液相色谱分析 参照文献[7]的方法进行高效液相色谱分析。实验过程中使用的色谱仪均为Waters高效液相色谱仪。色谱柱:Purospher STAR C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm);流动相: $V(\text{甲醇}):V(0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 醋酸铵}) = 32:68$,使用冰醋酸调节pH值,使流动相的pH值达到pH 6.0;流速1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长308 nm;柱温为室温;

进样量20 μL 。

1.2.1.3 样品溶液的制备和测定 参照文献[7]的方法进行样品溶液的制备。精密称取样品干粉1 g,加入到25 mL 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸溶液中,超声波浸提2 h;浸提液用定性滤纸过滤后,再用0.45 μm 微孔滤膜过滤;吸取一定的量滤液,用0.5 mL 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸溶液稀释,4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,上清液即为样品溶液。采用外标法按上述高效液相色谱条件对各样品溶液分别进行高效液相色谱分析,进样量20 μL 。

1.2.2 土壤养分的测定 参照文献[8]的方法测定土壤样品中各养分的含量。土壤有机质含量采用重铬酸钾稀释热法测定;土壤全氮含量采用半微量凯氏法测定;土壤全磷含量采用 $\text{HClO}_4 - \text{H}_2\text{SO}_4$ 法测定;土壤中铵态氮含量采用KCl浸提-蒸馏法测定;土壤中硝态氮含量采用还原蒸馏法测定;土壤中有效磷含量采用 $\text{NH}_4\text{F} - \text{HCl}$ 法测定。

1.3 数据处理

分别以根、茎和叶中的石杉碱甲含量作为参考序列,应用SPSS 13.0软件进行灰色关联分析^[9],并对数据进行均值化处理,筛选出影响九华山千层塔石杉碱甲含量的主要环境因子。

2 结果和分析

2.1 石杉碱甲标准品线性关系考察

实验得到的石杉碱甲标准品溶液的回归方程为: $Y = 26\,115.9C - 12\,048.9$, $r = 0.999\,8$,在5~50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,石杉碱甲浓度与峰面积呈良好的线性关系。HPLC分析结果表明,在与标准曲线测定一致的条件下,样品中的石杉碱甲和其他成分可有效分开,其在HPLC图谱上的保留时间与标准品一致。

2.2 千层塔不同部位石杉碱甲含量及各环境因子的月变化

不同月份九华山千层塔的根、茎和叶中石杉碱甲含量及各环境因子的月变化见表1。由表1可以看出,九华山千层塔各部位的石杉碱甲含量不同,根中石杉碱甲的含量相对较低,叶和茎中石杉碱甲的含量明显高于根,叶和茎中的石杉碱甲含量基本为0.03%~0.04%,而根中的石杉碱甲含量则为0.01%~0.02%。同一部位不同月份石杉碱甲含量

也有较大变化,在1月至5月以及9月至12月间波动较明显。4月份千层塔茎和叶中的石杉碱甲含量均为全年最高,分别达到0.044 4%和0.055 9%。千层塔根中石杉碱甲含量的最高值出现在1月份,为0.024 5%;最低值出现在8月份,仅为0.008 7%。

由表1还可以看出,在温度和降雨量均较高的5月份和6月份,九华山千层塔的石杉碱甲含量相对偏低;而在月平均温度16℃、降雨总量为最高月份的75%(230.0 mm)的4月份,九华山千层塔的石杉碱甲含量最高。由此可见,较高的温度和湿度不利于千层塔中石杉碱甲的积累。

根际土壤养分测定结果(表1)表明,全年根际土壤的有机质含量为10~14 mg·g⁻¹,且4月份至7月份根际土壤的有机质含量偏高,全年最高值出现在4月份,达到13.84 mg·g⁻¹;全氮最高含量出现在4月份,为0.77 mg·g⁻¹,其中铵态氮含量为0.012 69 mg·g⁻¹,硝态氮含量为0.003 18 mg·g⁻¹;全磷含量变化与叶中石杉碱甲含量变化趋势相似,全磷含量为0.35~0.49 mg·g⁻¹,4月份土壤中全磷含量为0.47 mg·g⁻¹,其中有效磷含量仅为0.013 52 mg·g⁻¹。

表1 不同月份九华山千层塔石杉碱甲含量及各环境因子的变化
Table 1 Changes of huperzine A content in *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. and environmental factors in different months at Jiuhua Mountain of Anhui Province

月份 Month	不同部位石杉碱甲含量/% Huperzine A content in different parts			降雨总 量/mm Total rainfall	平均温 度/℃ Mean temperature	根际土壤中各养分的含量/mg·g ⁻¹ Nutrient content in rhizosphere soil					
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf			有机质 Organic matter	全氮 TN	全磷 TP	铵态氮 NH ₄ -N	硝态氮 NO ₃ -N	有效磷 Avail-P
1	0.024 5	0.033 4	0.035 9	111.1	1.0	10.21	0.57	0.39	0.007 10	0.004 73	0.008 20
2	0.022 4	0.022 8	0.045 6	110.7	8.0	10.10	0.58	0.46	0.008 92	0.004 35	0.009 66
3	0.015 3	0.022 5	0.037 3	63.8	8.0	10.93	0.61	0.45	0.009 30	0.005 30	0.010 63
4	0.018 1	0.044 4	0.055 9	230.0	16.0	13.84	0.77	0.47	0.012 69	0.003 18	0.013 52
5	0.012 6	0.028 2	0.033 9	306.1	19.4	12.45	0.63	0.49	0.015 47	0.002 83	0.017 29
6	0.010 2	0.033 2	0.031 2	305.5	21.6	12.96	0.70	0.47	0.017 85	0.002 67	0.013 51
7	0.012 0	0.031 4	0.030 2	150.4	26.1	12.63	0.72	0.39	0.010 15	0.004 42	0.010 95
8	0.008 7	0.029 1	0.040 6	265.7	24.4	10.55	0.68	0.45	0.014 00	0.004 10	0.009 23
9	0.009 9	0.028 1	0.040 9	62.2	20.0	11.12	0.62	0.45	0.013 30	0.005 43	0.008 98
10	0.016 3	0.040 6	0.032 0	18.5	15.0	10.90	0.59	0.42	0.008 05	0.006 58	0.009 02
11	0.009 3	0.029 1	0.037 9	131.5	11.5	10.57	0.59	0.35	0.007 70	0.005 10	0.008 37
12	0.021 3	0.034 6	0.040 1	77.7	4.7	10.11	0.56	0.40	0.008 40	0.005 82	0.008 75

2.3 九华山各环境因子与千层塔石杉碱甲含量的灰色关联分析

分别以九华山千层塔根、茎和叶中的石杉碱甲含量作为参考序列进行灰色关联分析,对数据进行均值化处理后,获得的灰色关联系数和灰色关联度大小排序结果分别见表2、表3和表4。灰色关联分析结果表明,各环境因子对千层塔根中石杉碱甲含量的影响程度由大到小依次为:全磷含量、有机质含量、全氮含量、硝态氮含量、有效磷含量、铵态氮含量、温度、降水量;各环境因子对千层塔茎中石杉碱甲含量的影响程度由大到小依次为:有机质含量、全氮含量、全磷含量、有效磷含量、硝态氮含量、铵态氮含量、降水量、温度;各环境因子对千层塔叶中石杉碱甲含量的影响程度由大到小依次为:全氮含量、全磷含量、有机质含量、有效磷含量、硝态氮含量、铵态

氮含量、温度、降水量。以上结果显示,影响九华山千层塔石杉碱甲含量的主要环境因子是根际土壤中的有机质含量、全氮含量和全磷含量,温度和降水量与千层塔石杉碱甲含量变化的相关性最小。

3 结论和讨论

在九华山千层塔茎和叶中石杉碱甲的含量明显高于根,这与孙远明得出的“地上部分石杉碱甲含量大于地下部分”的结果一致^[5]。在4月份,千层塔茎和叶中的石杉碱甲含量都达到全年的最高值,且叶中的含量大于茎,所以在九华山地区千层塔的最佳采收期为4月份,最佳采收部位应为叶和茎。也有报道称,在其他地区,4月份采集的千层塔茎部石杉碱甲的含量高于叶片^[10]。这种差别反映出不同地

表 2 九华山千层塔根中石杉碱甲含量与环境因子的灰色关联分析
Table 2 Grey correlation analysis of huperzine A content in root of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. and environmental factors in Jiuhua Mountain of Anhui Province

月份 Month	灰色关联系数 Grey correlation coefficient							
	有机质 Organic matter	全氮 TN	全磷 TP	铵态氮 NH ₄ -N	硝态氮 NO ₃ -N	有效磷 Avail-P	温度 Temperature	降雨量 Rainfall
1	0.523	0.523	0.525	0.450	0.578	0.482	0.338	0.470
2	0.573	0.583	0.656	0.545	0.603	0.580	0.459	0.512
3	0.946	0.945	0.984	0.836	0.849	0.986	0.631	0.573
4	0.994	1.000	0.882	0.963	0.616	0.937	0.888	0.730
5	0.760	0.845	0.734	0.580	0.795	0.505	0.623	0.406
6	0.636	0.656	0.664	0.508	0.908	0.578	0.501	0.376
7	0.722	0.707	0.893	0.865	0.826	0.783	0.447	0.816
8	0.699	0.621	0.636	0.532	0.715	0.740	0.423	0.407
9	0.718	0.719	0.680	0.589	0.600	0.820	0.531	0.766
10	0.874	0.846	0.886	0.702	0.689	0.776	0.942	0.454
11	0.723	0.724	0.814	0.910	0.612	0.835	0.834	0.772
12	0.605	0.602	0.622	0.554	0.864	0.575	0.422	0.469
Id ¹⁾	0.731 1	0.731 0	0.748 0	0.669 5	0.721 3	0.716 4	0.586 6	0.562 6
排序 Sort	2	3	1	6	4	5	7	8

1) Id: 关联度 Incidence degree.

表 3 九华山千层塔茎中石杉碱甲含量的灰色关联分析
Table 3 Grey correlation analysis of huperzine A content in stem of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. and environmental factors in Jiuhua Mountain of Anhui Province

月份 Month	灰色关联系数 Grey correlation coefficient							
	有机质 Organic matter	全氮 TN	全磷 TP	铵态氮 NH ₄ -N	硝态氮 NO ₃ -N	有效磷 Avail-P	温度 Temperature	降雨量 Rainfall
1	0.781	0.781	0.785	0.587	0.965	0.666	0.370	0.636
2	0.781	0.757	0.633	0.863	0.715	0.765	0.766	1.000
3	0.703	0.704	0.642	0.810	0.564	0.676	0.776	0.663
4	0.751	0.746	0.642	0.701	0.451	0.800	0.647	0.868
5	0.746	0.860	0.713	0.529	0.681	0.447	0.577	0.346
6	0.874	0.927	0.950	0.596	0.556	0.737	0.583	0.383
7	0.838	0.811	0.859	0.896	0.959	0.954	0.427	0.978
8	0.995	0.800	0.836	0.620	0.964	0.907	0.441	0.418
9	0.872	0.876	0.799	0.642	0.660	0.918	0.553	0.546
10	0.638	0.618	0.646	0.514	0.787	0.567	0.687	0.333
11	0.992	0.993	0.835	0.728	0.742	0.806	0.807	0.901
12	0.736	0.729	0.770	0.639	0.764	0.676	0.429	0.497
Id ¹⁾	0.809 0	0.800 1	0.759 2	0.677 1	0.734 0	0.743 3	0.588 6	0.630 8
排序 Sort	1	2	3	6	5	4	8	7

1) Id: 关联度 Incidence degree.

区千层塔在代谢方式和代谢规律上存在差异。

有机质是土壤养分的主要来源,在石杉碱甲含量最高时,土壤有机质含量也处于高峰。灰色关联分析结果表明,有机质对千层塔中的石杉碱甲含量影响较大。氮素水平对石杉碱甲的影响较明显,在石杉碱甲含量最高的 4 月份,土壤中的全氮含量也处于峰值。对于不同的氮源形式,通过灰色关联分析还发现硝态氮比铵态氮更有利于石杉碱甲在千层塔体内的积累。关于磷素对生物碱含量的影响,有报道称,生物碱含量随磷浓度的增加而增加,但当磷浓度过高时,生物碱含量下降^[11]。本实验中,作者也观察到与之相似的研究结果,当有效磷含量最高

表 4 九华山千层塔叶中石杉碱甲含量的灰色关联分析
Table 4 Grey correlation analysis of huperzine A content in leaf of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. and environmental factors in Jiuhua Mountain of Anhui Province

灰色关联系数 Grey correlation coefficient								
月份 Month	有机质 Organic matter	全氮 TN	全磷 TP	铵态氮 NH ₄ -N	硝态氮 NO ₃ -N	有效磷 Avail-P	温度 Temperature	降雨量 Rainfall
1	0.956	0.956	0.962	0.687	0.864	0.792	0.413	0.752
2	0.675	0.694	0.840	0.626	0.732	0.688	0.488	0.570
3	1.000	0.998	0.912	0.846	0.765	0.977	0.592	0.526
4	0.725	0.720	0.626	0.680	0.447	0.769	0.630	0.389
5	0.748	0.859	0.715	0.535	0.707	0.453	0.583	0.352
6	0.655	0.684	0.696	0.489	0.737	0.577	0.480	0.339
7	0.658	0.641	0.852	0.819	0.774	0.725	0.379	0.762
8	0.834	0.995	0.987	0.737	0.806	0.767	0.502	0.473
9	0.887	0.883	0.974	0.808	0.835	0.976	0.675	0.482
10	0.840	0.876	0.826	0.875	0.499	0.998	0.770	0.462
11	0.926	0.925	0.781	0.689	0.822	0.757	0.756	0.838
12	0.841	0.832	0.884	0.720	0.701	0.766	0.469	0.549
Id ¹⁾	0.812 1	0.838 6	0.838 0	0.709 2	0.724 1	0.770 4	0.561 4	0.541 2
排序 Sort	3	1	2	6	5	4	7	8

1) Id: 关联度 Incidence degree.

时,千层塔根、茎和叶中的石杉碱甲含量普遍不高,而全磷含量与叶中的石杉碱甲含量变化相似,即石杉碱甲含量随磷含量的增加而相应提高,但在全磷含量最高的月份石杉碱甲含量则下降。

经过对实验结果的综合分析,作者认为比较适宜九华山地区千层塔中石杉碱甲积累的环境条件为:月平均温度约为 16 ℃、月降雨总量约为 230 mm;土壤有机质含量约为 13.84 mg · g⁻¹、全氮含量约为 0.77 mg · g⁻¹、铵态氮含量约为 0.012 69 mg · g⁻¹、硝态氮含量约为 0.003 18 mg · g⁻¹、全磷含量约为 0.47 mg · g⁻¹、有效磷含量约为 0.013 52 mg · g⁻¹。可以参考这些环境因子数据并结合九华山地区环境土壤条件进行千层塔的人工栽培。同时,还需要对其他相关因子的影响进行进一步的摸索和实践,如水质、矿质元素的种类和含量、内生菌的影响等^[6-12],并且还要结合千层塔生长量的变化进行分析比较,以期筛选出适合九华山地区千层塔优质高产的栽培条件。此外,虽然千层塔中石杉碱甲含量的变化与环境因子的综合作用有一定的关系,但其具体的效应尚不清楚,还有待进一步的考察和研究。

参考文献:

[1] 余红英,孙远明,杨跃生. 草药蛇足石杉的研究进展[J]. 中

草药, 2001, 32(3): 279-281.

- [2] 曾繁星, 蒋华良, 杨玉社. 石杉碱甲合成与结构改造的研究进展[J]. 化学进展, 2000, 12(1): 63-76.
- [3] 盛束军, 徐建中, 王志安, 等. 千层塔扦插繁殖研究[J]. 资源开发与市场, 2000, 16(5): 268-269, 293.
- [4] 沈晓霞, 俞旭平, 盛束军. 千层塔茎尖组织培养灭菌方法的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 458-459.
- [5] 孙远明, 余红英, 杨跃生, 等. HPLC 法测定蛇足石杉中石杉碱甲的含量[J]. 中草药, 2002, 33(12): 1078-1080.
- [6] 李沛玲, 黄朝表, 郭水良, 等. 浙江及临近地区蛇足石杉依存环境的初步研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(3): 211-216.
- [7] 王 峻, 吴 伟, 潘胜利. HPLC 法测定 6 种石杉科植物中石杉碱甲的含量[J]. 中草药, 2003, 34(7): 607-608.
- [8] 吕英华, 秦双月. 测土与施肥[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 48-70.
- [9] 邓聚龙. 灰色预测与决策[M]. 湖北: 华中理工大学出版社, 1992: 105-108.
- [10] 王 峻, 潘胜利. 湖南省石杉属植物中石杉碱甲含量的研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(21): 1616-1618.
- [11] Malinowski D P, Belesky D P, Hill N S, et al. Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) [J]. Plant and Soil, 1998, 198(1): 53-61.
- [12] 石 玮, 罗建平, 丁振华. 千层塔内生真菌分离鉴定的初步研究[J]. 中草药, 2005, 36(2): 281-283.