

茅苍术种子内源抑制物分离及生物活性分析

陈鹏旭^{1,2,①}, 廖盼华^{1,①}, 王帆^{1,2}, 陈雨¹, 印敏¹, 冯煦¹, 王奇志^{1,2}, 管福琴^{1,②}

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物资源研究与利用重点实验室
江苏省中药材生态种植与高值化利用工程研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023]

摘要: 为探明茅苍术(*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.)种子的内源抑制物,采用系统溶剂分离法对茅苍术种子甲醇浸提液进行分离,共得到石油醚相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相、甲醇相和水相5个分离相;以小白菜品种‘矮脚黄’(*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* ‘Aijiaohuang’)种子为受试对象,对茅苍术种子甲醇浸提液、不同分离相及6种可能内源抑制物进行生物活性检测。结果表明:在茅苍术种子甲醇浸提液及二氯甲烷相、乙酸乙酯相和甲醇相处理下,‘矮脚黄’的种子发芽率和胚根长度均显著($P<0.05$)低于对照组(超纯水)。从茅苍术种子甲醇浸提液的石油醚相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相和甲醇相中共分离鉴定出37种化合物,其中,酯类、酚类、有机酸类、醇类、醛酮类、苯类、甘油类、醚类和烷类分别有8、6、6、5、4、3、2、2和1种。在 $1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二甲酸二丁酯、2-甲氧基-4-乙炔基苯酚、(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-2-甲氧基四氢-2*H*-吡喃-3,4,5-三醇、(9*E*,11*E*)-共轭亚油酸、棕榈酸和硬脂酸处理下,‘矮脚黄’的胚根长度显著低于对照组,其中,邻苯二甲酸二丁酯和2-甲氧基-4-乙炔基苯酚处理组‘矮脚黄’胚根长度的抑制率分别为50.59%和60.81%,半抑制浓度分别为 623.09 和 $136.01\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综上所述,邻苯二甲酸二丁酯和2-甲氧基-4-乙炔基苯酚可能是导致茅苍术种子发芽率低的主要内源抑制物。

关键词: 茅苍术; 内源抑制物; 生物活性检测; 邻苯二甲酸二丁酯; 2-甲氧基-4-乙炔基苯酚

中图分类号: Q946.8; Q948.12; S567.21⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2025)02-0097-07
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2025.02.11

Isolation and biological activity analysis of endogenous inhibitors in *Atractylodes lancea* seeds CHEN Pengxu^{1,2,①}, LIAO Panhua^{1,①}, WANG Fan^{1,2}, CHEN Yu¹, YIN Min¹, FENG Xu¹, WANG Qizhi^{1,2}, GUAN Fuqin^{1,②} [1. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Jiangsu Province Engineering Research Center of Eco-cultivation and High-value Utilization of Chinese Medicinal Materials, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2025, 34(2): 97-103

Abstract: To explore the endogenous inhibitors in *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. seeds, the methanol extracts of *A. lancea* seeds were separated by using the systematic solvent partitioning method, and a total of five separation phases were obtained, namely petroleum ether phase, dichloromethane phase, ethyl acetate phase, methanol phase, and aqueous phase; taking the seeds of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* ‘Aijiaohuang’ as the test subjects, biological activity detections were conducted for the methanol extracts of *A. lancea* seeds, different separation phases, and six potential endogenous inhibitors. The results show that the seed germination rate and radicle length of ‘Aijiaohuang’ under treatments of methanol extracts of *A. lancea* seeds, dichloromethane phase, ethyl acetate phase, and methanol phase

收稿日期: 2024-06-04

基金项目: 江苏省林业科技创新与推广项目(LYKJ[2020]24; LYKJ[2020]09); 江苏省中国科学院植物研究所自主科研经费项目(JSPKLB2022030); 句容市科学技术局农业技术创新基金面上项目(ZA32311)

作者简介: 陈鹏旭(1999—),男,河南开封人,硕士研究生,主要从事天然产物活性成分研究与开发工作。

廖盼华(1987—),女,江西新干人,硕士,实验师,主要从事药用植物栽培工作。

① 共同第一作者

② 通信作者 E-mail: fqguan@jib.ac.cn

引用格式: 陈鹏旭, 廖盼华, 王帆, 等. 茅苍术种子内源抑制物分离及生物活性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2025, 34(2): 97-103.

are significantly ($P < 0.05$) lower than those of the control group (ultrapure water). A total of 37 compounds are isolated and identified from the petroleum ether phase, dichloromethane phase, ethyl acetate phase, and methanol phase from the methanol extracts of *A. lancea* seeds, among which, esters, phenols, organic acids, alcohols, aldehydes and ketones, benzenes, glycerins, ethers, and alkanes are 8, 6, 6, 5, 4, 3, 2, 2, and 1 types, respectively. The radicle length of 'Aijiaohuang' under treatments of $1\ 000\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dibutyl phthalate, 2-methoxy-4-vinylphenol, (2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-2-methoxytetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol, (9*E*,11*E*)-conjugated linoleic acid, palmitic acid, and octadecanoic acid is significantly lower than that of the control group, among which, the inhibitory rates of radicle length of 'Aijiaohuang' of dibutyl phthalate and 2-methoxy-4-vinylphenol treatment groups are 50.59% and 60.81%, respectively, and the half inhibitory concentrations are 623.09 and 136.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. In conclusion, dibutyl phthalate and 2-methoxy-4-vinylphenol may be the primary endogenous inhibitors causing low germination rate of *A. lancea* seeds.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; endogenous inhibitor; biological activity detection; dibutyl phthalate; 2-methoxy-4-vinylphenol

茅苍术 [*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.]，又称南苍术，主要分布于江苏、湖北、安徽、河南、浙江、江西等省份，以江苏茅山为传统道地产区^[1]。茅苍术的根状茎具有燥湿健脾、祛风散寒、明目的功效，可治疗湿阻中焦、脘腹胀满、泄泻、水肿等症^[2]，也是防治严重急性呼吸综合征和新型冠状病毒感染的必备中药材之一^[3]。近年来，由于山地开垦和过度采挖等原因，茅苍术的分布面积及种群数量明显衰退，已被列为江苏省濒危药用植物^[4]。在自然条件下，茅苍术种子出苗率低、幼苗生长缓慢且存活率低^[5]。因此，亟需明确导致茅苍术种子繁殖障碍的内部原因，为提高其种子繁殖效率提供基础资料。

植物内源抑制物一般指存在于植物体内或由植物分泌的化学成分，主要存在于种子或果实中，并通过阻碍种子吸水、抑制种子呼吸和酶活性、阻碍胚生长等方式阻止同种或异种的种子萌发^[6]。侯皓然等^[7]认为，种子内源抑制物可能是造成茅苍术种子繁殖障碍的一个主要原因，但内源抑制物的具体成分尚不清楚。鉴于此，本研究采用系统溶剂分离法对茅苍术种子甲醇浸提液进行分离，对各分离相进行生物活性测定和气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析，并对筛选的可能内源抑制物进行生物活性检测，以期对茅苍术种子生物学和有性繁殖研究奠定基础，为茅苍术种子发芽率和整齐性提高提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试茅苍术种子购自湖北省英山县种植户，种子

成熟饱满，千粒质量为 11.5 g。生物活性检测实验使用小白菜品种‘矮脚黄’ (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* ‘Aijiaohuang’) 的成熟饱满种子，种子发芽率大于或等于 85.0%。

1.2 方法

1.2.1 茅苍术种子甲醇浸提液的制备 取茅苍术种子 100 g，粉碎后加入 300 mL 体积分数 80% 甲醇溶液（确保溶液没过种子粉末），密封后于 25 °C 浸提 24 h，期间多次搅拌；超声（功率 100 W）提取 1 h，连续提取 3 次；合并提取液，50 °C 减压浓缩至无甲醇味；用超纯水定容至 $0.5\ \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，于 4 °C 保存、备用。

1.2.2 茅苍术种子甲醇浸提液的生物活性分析 用适量超纯水将制备的种子甲醇浸提液分别稀释成 0.1、0.2 和 $0.4\ \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的待测溶液；取不同质量浓度的待测溶液各 3 mL，分别加入铺有双层滤纸的培养皿（直径 9 cm）内。以相同体积超纯水为对照（CK），每个培养皿随机放入 50 粒‘矮脚黄’种子，置于 25 °C 培养箱内进行种子萌发实验。每个处理 3 个培养皿，视为 3 个重复。以胚根突破种皮作为种子发芽的判定标准，在培养 48 h 统计发芽种子数，计算发芽率（ R ），计算公式为 $R = (n_g/n_t) \times 100\%$ ，式中， n_g 为发芽种子数， n_t 为供试种子总数；使用直尺（精度 1 mm）测量胚根长度。

1.2.3 茅苍术种子内源抑制物的分离 采用系统溶剂分离法^[8]对茅苍术种子甲醇浸提液进行萃取分离。依次用等体积的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯进行萃取，每种溶剂萃取 3 次，得到石油醚相（2.64 g）、二氯甲烷相（1.01 g）、乙酸乙酯相（1.79 g）和水相；将水相减压浓缩后，加入 200 mL 甲醇溶解，溶解部分为

甲醇相 (3.78 g), 剩余残渣用超纯水溶解, 即水相 (3.66 g)。将各分离相分别用 BUCHI R-210 旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司) 进行蒸发浓缩, 用 JY6002 电子天平 (精度 0.01 g, 上海良平仪器仪表有限公司) 准确称量后, 使用相应试剂分别定容至 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。

1.2.4 各分离相的生物活性分析 取上述分离相提取液各 3 mL, 分别加入铺有双层滤纸的培养皿内; 除水相外, 其余分离相处理组均待溶剂完全挥发后, 加入 3 mL 超纯水; 以相同体积超纯水为对照 (CK), 采用 1.2.2 中的方法进行种子萌发实验。每个处理 3 个培养皿 (视为 3 个重复), 每个培养皿随机放入 50 粒 ‘矮脚黄’ 种子。在培养 24、48 和 72 h 统计种子发芽情况, 并计算发芽率。在培养 48 和 72 h 测量胚根长度。

1.2.5 各分离相的化学成分分析 取上述茅苍术种子甲醇浸提液的石油醚相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相、甲醇相提取液各 200 μL , 用相应溶剂分别定容至 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经有机相滤膜过滤后, 得到各分离相的供试样品溶液。

采用 Agilent 8860-5977B 气相色谱质谱联用仪 (美国 Agilent 公司) 对各分离相的供试样品溶液进行 GC-MS 分析^[9-11]。色谱条件: Agilent 19091S-433 柱 (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm); 进样口温度 $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 载气为高纯氮气; 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 $1 \mu\text{L}$ 。升温程序: 起始温度 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min; 以 $5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速率升至 $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min; 再以 $8 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速率升至 $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 接着以 $5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速率升至 $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。质谱条件: 离子源 EI, 进样器温度 $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测器温度 $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 离子源温度 $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 电离能 70 eV, 溶剂延迟时间 2.8 min, 质量扫描范围 m/z 20~550, 扫描时间 10 min。使用 Agilent MassHunter Qualitative 软件将 GC-MS 检测结果与 NIST17.L 数据库进行对比, 得到各成分的保留时间、名称和分子式, 并计算相对含量。

1.2.6 可能内源抑制物的生物活性分析 从已鉴定化合物中选出可能对 ‘矮脚黄’ 种子发芽具有抑制作用的化合物, 利用上海麦克林生化科技股份有限公司生产的标准品进行生物活性检测。将各标准品分别配制成 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的待测标准品溶液, 以超纯水为对照 (CK), 采用 1.2.2 中的方法进行种子萌发实验, 在培养 48 h 测量胚根长度。每个处理 3 个培养

皿 (视为 3 个重复), 每个培养皿 50 粒 ‘矮脚黄’ 种子。计算不同处理组的胚根长度抑制率 (R), 计算公式为 $R = [(l_{\text{ck}} - l_i) / l_{\text{ck}}] \times 100\%$, 式中, l_{ck} 为对照组胚根长度, l_i 为处理组胚根长度。

选择胚根长度抑制率大于 50% 的处理组的化合物标准品, 制成 1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列溶液, 按照上述方法测定并计算抑制率。每个处理 3 个培养皿 (视为 3 个重复), 每个培养皿 50 粒 ‘矮脚黄’ 种子。以标准品溶液浓度为 x 轴, 胚根长度抑制率为 y 轴进行线性拟合分析, 利用获得的拟合方程计算每种化合物的半抑制浓度。

1.3 数据分析

采用 EXCEL 2023 软件和 SPSS Statistics 26.0 软件进行数据分析。

2 结果和分析

2.1 茅苍术种子甲醇浸提液对 ‘矮脚黄’ 种子萌发的影响

检测结果 (表 1) 表明: 随着茅苍术种子甲醇浸提液质量浓度升高, ‘矮脚黄’ 种子的发芽率和胚根长度均逐渐降低。0.1、0.2 和 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲醇浸提液处理组的种子发芽率分别为 73.3%、35.7% 和 6.3%, 均显著 ($P < 0.05$) 低于对照组 (超纯水), 且各组间的种子发芽率差异显著。3 个甲醇浸提液处理组的胚根长度均显著低于对照组, 尤其是 0.2 和 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲醇浸提液处理组, 胚根长度分别仅为 0.13 和 0.10 cm。说明茅苍术种子甲醇浸提液中含有强烈抑制 ‘矮脚黄’ 种子发芽和胚根生长的化合物, 且这种抑制作用具有剂量效应。

表 1 茅苍术种子甲醇浸提液对 ‘矮脚黄’ 种子萌发的影响 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾
Table 1 Effects of methanol extracts of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. seeds on seed germination of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* ‘Aijiaohuang’ ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

甲醇浸提液质量浓度 / ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Mass concentration of methanol extracts	发芽率 / % Germination rate	胚根长度 / cm Radicle length
CK	85.3 \pm 4.2a	1.39 \pm 0.09a
0.1	73.3 \pm 3.1b	0.42 \pm 0.08b
0.2	35.7 \pm 4.5c	0.13 \pm 0.03c
0.4	6.3 \pm 2.5d	0.10 \pm 0.03c

¹⁾ CK: 超纯水 Ultrapure water. 同列中不同小写字母表示在不同处理组间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant differences ($P < 0.05$) between different treatment groups.

2.2 茅苍术种子甲醇浸提液各分离相对‘矮脚黄’种子萌发的影响

统计结果(表2)表明:实验期间,5个分离相处理组的种子发芽率均低于对照组(超纯水),其中,二氯甲烷相、乙酸乙酯相、甲醇相处理组的种子发芽率在培养24、48和72 h显著($P<0.05$)降低,石油醚相

和水相处理组的种子发芽率仅在培养24 h显著降低。5个分离相处理组的种子发芽率从高到低依次为水相、石油醚相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相、甲醇相,说明这5个分离相中,甲醇相对‘矮脚黄’种子发芽的抑制作用最强,而水相对‘矮脚黄’种子发芽的抑制作用较弱。

表2 茅苍术种子甲醇浸提液不同分离相对‘矮脚黄’种子萌发的影响($\bar{X}\pm SD$)¹⁾

Table 2 Effects of different separation phases from methanol extracts of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. seeds on seed germination of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* ‘Aijiaohuang’ ($\bar{X}\pm SD$)¹⁾

分离相 Separation phase	不同时间的发芽率/% Germination rate at different times			不同时间的胚根长度/cm Radicle length at different times	
	24 h	48 h	72 h	48 h	72 h
超纯水 Ultrapure water (CK)	77.3±7.6a	85.3±5.0a	93.3±2.3a	2.35±0.14a	3.76±0.18a
石油醚相 Petroleum ether phase	51.3±9.0bc	77.3±7.0ab	80.0±9.2ab	0.96±0.26c	1.07±0.30c
二氯甲烷相 Dichloromethane phase	44.7±6.4c	66.7±8.1b	72.7±9.9b	1.68±0.08b	1.71±0.07b
乙酸乙酯相 Ethyl acetate phase	19.3±9.9d	31.3±7.6c	42.7±6.4c	1.00±0.28c	1.09±0.34c
甲醇相 Methanol phase	9.3±1.2d	15.3±5.0d	20.7±9.0d	0.44±0.07d	0.49±0.04d
水相 Aqueous phase	60.7±9.2b	80.0±4.0a	80.7±4.0ab	0.55±0.08d	0.57±0.07d

¹⁾ 同列中不同小写字母表示在不同处理组间差异显著($P<0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant differences ($P<0.05$) between different treatment groups.

由表2还可见,5个分离相处理组的胚根长度均显著低于对照组;5个分离相处理组的胚根长度从高到低均依次为二氯甲烷相、乙酸乙酯相、石油醚相、水相、甲醇相,说明这5个分离相中,甲醇相对‘矮脚黄’胚根伸长生长的抑制作用最强,水相次之,二氯甲烷相对‘矮脚黄’胚根伸长生长的抑制作用最弱。

2.3 茅苍术种子甲醇浸提液各分离相化学成分分析

2.3.1 石油醚相化学成分分析 检测结果(表3)表明:茅苍术种子甲醇浸提液石油醚相中13种化合物的相对含量大于1%,包括苯类化合物正丙基苯和2-甲基丙基苯,酚类化合物2,4-二叔丁基苯酚和2,2'-亚甲基双-4-甲基-6-叔丁基苯酚,酯类化合物棕榈酸甲酯、亚油酸甲酯、(Z)-油酸甲酯、9-十八烯-12-炔酸甲酯和油酸酰胺,有机酸类化合物棕榈酸、(9E,11E)-共轭亚油酸、反油酸和亚麻酸。其中,(9E,11E)-共轭亚油酸的相对含量最高,亚油酸甲酯的相对含量次之,其余化合物的相对含量多小于5%。

2.3.2 二氯甲烷相化学成分分析 检测结果(表4)表明:茅苍术种子甲醇浸提液二氯甲烷相中11种化合物的相对含量大于1%,包括酚类化合物2,4-二叔丁基苯酚和5-(3-羟基丙基)-2,3-二甲氧基苯酚,酯类化合物棕榈酸甲酯和亚油酸甲酯,醇类化合物硬脂醇和1-十九烷醇,有机酸类化合物棕榈酸、硬脂酸

和亚麻酸,甘油类化合物2-亚麻酰基-rac-甘油和2-单棕榈酸甘油。其中,硬脂酸的相对含量最高,棕榈酸和亚麻酸的相对含量较高,其余化合物的相对含量基本小于5%。

表3 茅苍术种子甲醇浸提液石油醚相中化合物(相对含量大于1%)的种类及相对含量¹⁾

Table 3 Types and relative contents of compounds (relative content greater than 1%) in petroleum ether phase from methanol extracts of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. seeds¹⁾

化合物 Compound	MF	t/min	RC/%
正丙基苯 <i>n</i> -propylbenzene	C ₉ H ₁₂	6.83	7.50
2-甲基丙基苯 2-methylpropyl-benzene	C ₁₀ H ₁₄	8.39	2.26
2,4-二叔丁基苯酚 2,4-di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	21.59	1.39
棕榈酸甲酯 Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	27.48	3.52
棕榈酸 Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	28.00	5.32
亚油酸甲酯 Methyl linoleate	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	29.93	14.33
(Z)-油酸甲酯 (Z)-methyl oleate	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	29.99	2.48
(9E,11E)-共轭亚油酸 (9E,11E)-conjugated linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	30.57	17.51
反油酸 Elaidic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	30.61	3.76
9-十八烯-12-炔酸甲酯 9-octadecen-12-ynoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	30.75	7.07
亚麻酸 Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	31.33	4.86
油酸酰胺 Oleic acid amide	C ₁₈ H ₃₅ NO	33.87	1.28
2,2'-亚甲基双-4-甲基-6-叔丁基苯酚 2,2'-methylenebis-4-methyl-6-dimethylethyl phenol	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	34.79	4.26

¹⁾ MF: 分子式 Molecular formula; t: 保留时间 Retention time; RC: 相对含量 Relative content.

2.3.3 乙酸乙酯相化学成分分析 检测结果(表 5)表明:茅苍术种子甲醇浸提液乙酸乙酯相中有 12 种化合物的相对含量大于 1%,包括酚类化合物 2-甲氧基-4-乙基苯酚和 β -生育酚,醛酮类化合物 2-羟

表 4 茅苍术种子甲醇浸提液二氯甲烷相中化合物(相对含量大于 1%)的种类及相对含量¹⁾

Table 4 Types and relative contents of compounds (relative content greater than 1%) in dichloromethane phase from methanol extracts of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. seeds¹⁾

化合物 Compound	MF	t/min	RC/%
2,4-二叔丁基苯酚 2,4-di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	21.66	1.13
5-(3-羟基丙基)-2,3-二甲氧基苯酚 5-(3-hydroxypropyl)-2,3-dimethoxyphenol	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	27.21	3.67
棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	27.56	1.22
棕榈酸 Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	28.19	11.55
硬脂醇 Stearyl alcohol	C ₁₈ H ₃₈ O	28.51	1.02
亚油酸甲酯 Methyl linoleate	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	30.03	5.29
硬脂酸 Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	30.93	28.68
1-十九烷醇 1-nonadecanol	C ₁₉ H ₄₀ O	31.46	1.52
亚麻酸 Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	31.66	10.35
2-单棕榈酸甘油 2-palmitoylglycerol	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	36.17	1.01
2-亚麻酰基-rac-甘油 2-linoleoyl-rac-glycerol	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	39.49	3.67

¹⁾ MF: 分子式 Molecular formula; t: 保留时间 Retention time; RC: 相对含量 Relative content.

表 5 茅苍术种子甲醇浸提液乙酸乙酯相中化合物(相对含量大于 1%)的种类及相对含量¹⁾

Table 5 Types and relative contents of compounds (relative content greater than 1%) in ethyl acetate phase from methanol extracts of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. seeds¹⁾

化合物 Compound	MF	t/min	RC/%
丙基戊基醚 Propylpentyl ether	C ₈ H ₁₈ O	3.60	1.55
γ -丁内酯 γ -butyrolactone	C ₄ H ₆ O ₂	5.99	1.62
二聚甘油 Diglycerol	C ₆ H ₁₄ O ₅	7.35	1.99
2,3-二氢苯并呋喃 2,3-dihydrobenzofuran	C ₈ H ₈ O	15.61	2.03
2-甲氧基-4-乙基苯酚 2-methoxy-4-vinylphenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	17.94	1.13
2-羟基-6-甲基苯甲醛 2-hydroxy-6-methyl benzaldehyde	C ₈ H ₈ O ₂	20.43	26.25
3-乙酰基-2-羟基-2,4,6-环庚三烯-1-酮 3-acetyl-2-hydroxy-2,4,6-cycloheptatrien-1-one	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	20.77	1.06
棕榈酸 Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	28.03	1.97
邻苯二甲酸丁基-3-己酯 Phthalic acid butyl hex-3-yl ester	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	28.16	1.13
亚油酸甲酯 Methyl linoleate	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	30.08	21.59
(9E, 11E)-共轭亚油酸 (9E, 11E)-conjugated linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	30.54	2.15
β -生育酚 β -tocopherol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	38.28	6.17

¹⁾ MF: 分子式 Molecular formula; t: 保留时间 Retention time; RC: 相对含量 Relative content.

基-6-甲基苯甲醛和 3-乙酰基-2-羟基-2,4,6-环庚三烯-1-酮,酯类化合物亚油酸甲酯、 γ -丁内酯、邻苯二甲酸丁基-3-己酯,有机酸类化合物棕榈酸和(9E, 11E)-共轭亚油酸,苯类化合物 2,3-二氢苯并呋喃,醚类化合物二聚甘油和丙基戊基醚。其中,2-羟基-6-甲基苯甲醛的相对含量最高,亚油酸甲酯的相对含量次之,其余化合物的相对含量多小于 2%。

2.3.4 甲醇相化学成分分析 检测结果(表 6)表明:茅苍术种子甲醇浸提液甲醇相中有 10 种化合物的相对含量大于 1%,包括酯类化合物邻苯二甲酸二丁酯,醇类化合物丙三醇、1,1-二甲基乙基-4-甲基-3-哌啶醇和(2S, 3R, 4S, 5S)-2-甲氧基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三醇,酚类化合物 5-(3-羟基丙基)-2,3-二甲氧基苯酚,烷类化合物氯甲氧基-2-甲基丙烷,醛酮类化合物 2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮和 5-羟甲基糠醛,有机酸类化合物 2-丁酮酸和(9E, 11E)-共轭亚油酸。其中,(2S, 3R, 4S, 5S)-2-甲氧基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三醇的相对含量最高,其余化合物的相对含量基本小于 5%。

2.4 茅苍术种子可能内源抑制物的生物活性分析

选出邻苯二甲酸二丁酯、2-甲氧基-4-乙基苯酚、(2S, 3R, 4S, 5S)-2-甲氧基四氢-2H-吡喃-3,4,

表 6 茅苍术种子甲醇浸提液甲醇相中化合物(相对含量大于 1%)的种类及相对含量¹⁾

Table 6 Types and relative contents of compounds (relative content greater than 1%) in methanol phase from methanol extracts of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. seeds¹⁾

化合物 Compound	MF	t/min	RC/%
氯甲氧基-2-甲基丙烷 Chloromethoxy-2-methyl propane	C ₅ H ₁₁ ClO	5.71	6.97
2-丁酮酸 2-ketobutyric acid	C ₄ H ₆ O ₃	8.18	3.66
丙三醇 Glycerin	C ₃ H ₈ O ₃	10.14	1.39
2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	C ₆ H ₈ O ₄	13.23	4.44
5-羟甲基糠醛 5-hydroxymethylfurfural	C ₆ H ₆ O ₃	15.93	1.35
1,1-二甲基乙基-4-甲基-3-哌啶醇 1,1-dimethylethyl-4-methyl-3-piperidinol	C ₁₀ H ₂₁ NO	20.49	1.04
(2S, 3R, 4S, 5S)-2-甲氧基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三醇 (2S, 3R, 4S, 5S)-2-methoxytetrahydro-2H-pyrano-3,4,5-triol	C ₆ H ₁₂ O ₅	23.80	26.57
5-(3-羟基丙基)-2,3-二甲氧基苯酚 5-(3-hydroxypropyl)-2,3-dimethoxyphenol	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	27.21	1.04
邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	28.17	3.45
(9E, 11E)-共轭亚油酸 (9E, 11E)-conjugated linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	30.57	1.51

¹⁾ MF: 分子式 Molecular formula; t: 保留时间 Retention time; RC: 相对含量 Relative content.

5-三醇、(9E,11E)-共轭亚油酸、棕榈酸、硬脂酸6种可能内源抑制物,对1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下‘矮脚黄’的胚根长度进行比较。结果(表7)显示:与对照组(超纯水)相比,6种化合物处理组的胚根长度均显著($P<0.05$)下降,说明这6种化合物对‘矮脚黄’胚根伸长生长的抑制作用强。其中,2-甲氧基-4-乙烯基苯酚的抑制作用最强,邻苯二甲酸二丁酯次之,2个处理组的胚根长度抑制率分别为60.81%和50.59%;其余处理组的胚根长度抑制率均低于50%。

表7 茅苍术种子甲醇浸提液分离相中6种化合物对‘矮脚黄’胚根长度的影响($\bar{X} \pm \text{SD}$)¹⁾
Table 7 Effects of six compounds in methanol phase from methanol extracts of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. seeds on radicle length of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* ‘Aijiaohuang’ ($\bar{X} \pm \text{SD}$)¹⁾

化合物 Compound	胚根长度/cm Radicle length	胚根长度抑制率/% Inhibitory rate of radicle length
超纯水 Ultrapure water (CK)	2.04±0.09a	
邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	1.01±0.17cd	50.59±8.57ab
2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 2-methoxy-4-vinylphenol	0.80±0.23d	60.81±11.05a
(2S,3R,4S,5S)-2-甲氧基四 氢-2H-吡喃-3,4,5-三醇 (2S,3R,4S,5S)-2-methoxytetrahydro- 2H-pyrano-3,4,5-triol	1.58±0.27b	22.20±13.30c
(9E,11E)-共轭亚油酸 (9E,11E)-conjugated linoleic acid	1.36±0.16bc	33.30±7.91bc
棕榈酸 Palmitic acid	1.60±0.30b	21.22±14.68c
硬脂酸 Octadecanoic acid	1.30±0.22bc	35.95±10.64bc

¹⁾ 同列中不同小写字母表示在不同处理组间差异显著($P<0.05$)
Different lowercases in the same column indicate the significant differences ($P<0.05$) between different treatment groups.

拟合结果表明:2-甲氧基-4-乙烯基苯酚和邻苯二甲酸二丁酯的拟合方程分别为 $y=4.3501+0.3066x$ ($R=0.9977$)和 $y=4.3870+0.2196x$ ($R=0.9982$),半抑制浓度分别为136.01和623.09 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论和结论

研究人员通常采用供试植物种子的水提液或醇提液测试其对非休眠植物种子萌发的影响^[12]。本研究结果表明:茅苍术种子甲醇浸提液对‘矮脚黄’种子发芽和胚根伸长生长总体上有显著的抑制作用,说明茅苍术种子中含有醇溶性内源抑制物,这可能是茅苍术田间出苗率低及幼苗生长缓慢的一个重要原因^[7]。本研究进一步分离得到石油醚相、二氯甲烷

相、乙酸乙酯相、甲醇相和水相5个分离相,其中,甲醇相、乙酸乙酯相、二氯甲烷相对‘矮脚黄’种子发芽率和胚根长度均有显著的抑制作用,说明茅苍术种子甲醇浸提液中的这3个分离相不但含有抑制种子发芽的化合物,还含有抑制胚根生长的化合物。

植物内源抑制物种类较多,主要包括酯类^[13-15]、酚类^[16]、有机酸类^[17]、激素类(脱落酸^[18])、醌类^[19]、醛酮类^[20]、不饱和内酯类^[21]、醚类^[22]、挥发性芳香植物油^[23]及乙烯^[24]等。本研究从茅苍术种子甲醇浸提液的石油醚相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相和甲醇相中共分离鉴定出37种化合物,包括酯类、酚类、有机酸类、醇类、醛酮类、苯类、甘油类、醚类和烷类。其中,酯类化合物有8种,分别为棕榈酸甲酯、亚油酸甲酯、(Z)-油酸甲酯、9-十八烯-12-炔酸甲酯、油酸酰胺、 γ -丁内酯、邻苯二甲酸丁基-3-己酯和邻苯二甲酸二丁酯;酚类化合物有6种,分别为2,4-二叔丁基苯酚、2,2'-亚甲基双-4-甲基-6-叔丁基苯酚、5-(3-羟基丙基)-2,3-二甲氧基苯酚、2-甲氧基-4-乙烯基苯酚、 β -生育酚和5-(3-羟基丙基)-2,3-二甲氧基苯酚;有机酸类化合物有6种,分别为棕榈酸、(9E,11E)-共轭亚油酸、反油酸、亚麻酸、硬脂酸和2-丁酮酸;醇类化合物有5种,分别为硬脂醇、1-十九烷醇、丙三醇、1,1-二甲基乙基-4-甲基-3-哌啶醇、(2S,3R,4S,5S)-2-甲氧基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三醇,其中(2S,3R,4S,5S)-2-甲氧基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三醇仅存在于甲醇相中,且在甲醇相中的相对含量最高;醛酮类化合物有4种,分别为2-羟基-6-甲基苯甲醛、3-乙酰基-2-羟基-2,4,6-环庚三烯-1-酮、2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮和5-羟甲基糠醛;苯类化合物3种,分别为正丙基苯、2-甲基丙基苯和2,3-二氢苯并呋喃;甘油类和醚类化合物各2种,前者包括2-亚麻酰基-rac-甘油和2-单棕榈酸甘油,后者包括二聚甘油和丙基戊基醚;烷类化合物仅氯甲氧基-2-甲基丙烷1种。

已有研究表明:邻苯二甲酸二丁酯、2-甲氧基-4-乙烯基苯酚、亚油酸、硬脂酸和棕榈酸能够抑制植物种子萌发^[13,15,25-28]。因此,选择茅苍术种子中这5种化合物以及甲醇相中含量最高的化合物(2S,3R,4S,5S)-2-甲氧基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三醇进行生物活性测定。结果表明:在1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理条件下,邻苯二甲酸二丁酯、2-甲氧基-4-乙烯基苯酚、(2S,3R,4S,5S)-2-甲氧基四氢-2H-吡喃-3,4,5-

三醇、亚油酸、棕榈酸和硬脂酸均可显著抑制‘矮脚黄’胚根伸长生长,其中,邻苯二甲酸二丁酯和2-甲氧基-4-乙炔基苯酚的抑制活性较强,半抑制浓度分别为623.09和136.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由此推测,这2种化合物可能是导致茅苍术种子发芽率低的主要内源抑制物。

总之,茅苍术种子在自然状态下萌发率低,不仅与外界环境有关,还与种子内源抑制物(如邻苯二甲酸二丁酯、2-甲氧基-4-乙炔基苯酚等)有关。

参考文献:

- [1] 欧阳臻,江涛涛,缪亚东,等. 苍术的化学成分、道地性和药理活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1936-1938.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 168-169.
- [3] 杨洋,梅全喜,张书亚,等. 苍术在瘟疫防治中的研究与应用[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(8): 214-218.
- [4] 蒋玲. 濒危药用植物茅苍术转录组学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017: 20.
- [5] 黄日晴,王鑫晶,玉猛,等. 苍术繁殖技术研究进展[J]. 河北农业大学学报, 2022, 45(3): 75-81.
- [6] 孔祥海. 抑制物质与种子休眠[J]. 龙岩师专学报, 2002, 20(6): 50-52.
- [7] 侯皓然,巢建国,谷巍,等. 茅苍术种子醇溶性内源性抑制物的初步研究[J]. 中药材, 2016, 39(4): 717-719.
- [8] 朱铭玮,邹雨婷,李永荣,等. 油用牡丹‘凤丹’种子内源抑制物研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2019, 39(6): 64-70.
- [9] 尚旭岚,徐锡增,方升佐. 青钱柳种子休眠机制[J]. 林业科学, 2011, 47(3): 68-74.
- [10] 伏秦超,刘超,王颖,等. 肉果秤锤树核果甲醇提取液发芽抑制物质研究[J]. 北方园艺, 2015(2): 6-9.
- [11] 孙晓刚,丁言,郭太君,等. 凤丹胚乳内源抑制物质活性及其成分的GC-MS鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(5): 177-184.
- [12] 孙佳,郭江帆,魏朔南. 植物种子萌发抑制物研究概述[J]. 种子, 2012, 31(4): 57-61.
- [13] GAO M, QI Y, SONG W, et al. Effects of di-*n*-butyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate on the growth, photosynthesis, and chlorophyll fluorescence of wheat seedlings [J]. Chemosphere, 2016, 151: 76-83.
- [14] GAO M, DONG Y, ZHANG Z, et al. Growth and antioxidant defense responses of wheat seedlings to di-*n*-butyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate stress [J]. Chemosphere, 2017, 172: 418-428.
- [15] 孙淑,张晓琦,赵乐,等. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸单丁酯对小麦种子萌发及幼苗保护酶活性的影响[J]. 华北农学报, 2020, 35(增刊): 145-151.
- [16] 李立君,赵婷婷,钱存梦,等. 内源抑制物对乌桕种子萌发的影响[J]. 东北林业大学学报, 2022, 50(12): 9-14.
- [17] GALLAGHER R S, ANANTH R, GRANGER K, et al. Phenolic and short-chained aliphatic organic acid constituents of wild oat (*Avena fatua* L.) seeds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 218-225.
- [18] SANO N, MARION-POLL A. ABA metabolism and homeostasis in seed dormancy and germination [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22: 5069.
- [19] RIETVELD W J. Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species [J]. Journal of Chemical Ecology, 1983, 9(2): 295-308.
- [20] MISHYNA M, LAMAN N, PROKHOROV V, et al. Identification of octanal as plant growth inhibitory volatile compound released from *Heracleum sosnowskyi* fruit [J]. Natural Product Communications, 2015, 10(5): 771-774.
- [21] BRUNO L, TALARICO E, CABEIRAS-FREIJANES L, et al. Coumarin interferes with polar auxin transport altering microtubule cortical array organization in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. root apical meristem [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22: 7305.
- [22] LI K, CHEN J, ZHU L. The phytotoxicities of decabromodiphenyl ether (BDE-209) to different rice cultivars (*Oryza sativa* L.) [J]. Environmental Pollution, 2018, 235: 692-699.
- [23] ZHELJAZKOV V D, JELIAZKOVA E A, ASTATKIE T. Allelopathic effects of essential oils on seed germination of barley and wheat [J]. Plants, 2021, 10: 2728.
- [24] 莫云容,张培欣,朱海山,等. 外源乙烯对不同品种辣椒种子萌发的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2016, 30(2): 268-273.
- [25] 王萌,瞿彩丽,张燕,等. 茅苍术根际自毒物质鉴定及其对幼苗生长的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2023, 25(2): 47-51.
- [26] DARABI H R, MOHANDESSI S, BALAVAR Y, et al. A structure-activity relationship study on a natural germination inhibitor, 2-methoxy-4-vinylphenol (MVP), in wheat seeds to evaluate its mode of action [J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2007, 62(9/10): 694-700.
- [27] 王浩宇,高云鹏,朱铭玮,等. 内源抑制物对加拿大紫荆种子萌发的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2022, 46(5): 104-112.
- [28] 尚旭岚,孙容,徐锡增,等. 青钱柳种子不同部位发芽抑制物质的测定[J]. 林业科技开发, 2011, 25(5): 29-32.

(责任编辑:佟金凤)