侧柏树干的超临界 CO_2 萃取物组分分析及双条杉天牛的 EAG 反应*

武晓颖[1]　王　骏[1]　刘　寰[2]　董立京[2]　金幼菊[1**]

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院　北京　100083; 2. 北京市林业保护站　北京　100029)

Chemical analysis and electroantennogram responses in *Semanotus bifasciatus* adults to *Platycladus orientalis* volatiles extracted by SFE. WU Xiao-Ying[1], WANG Jun[1], LIU Huan[2], DONG Li-Jing[2], JIN You-Ju[1**] (1. *College of Biological Sciences and Technology*, *Beijing Forest University*, Beijing　100083, China; 2. *Beijing Forestry Protection Center*, Beijing　100029, China)

Abstract　The volatiles from phloem and xylem of *Platycladus orientalis* (L.) were extracted by supercritical fluid extraction (SFE) and sohlet's extraction methods (SEM), and analyzed by GC-MS. For extracts by SFE, 21 chemicals were identified by GC/MS, among them sesquiterpenes and their oxides composed as the major part, whereas monoterpenes were not detected. For SEM, 23 chemicals were identified. In the phloem volatiles, the high-boiling point chemicals such as resin acids and diterpenes were the major part with very little monoterpenes and sesquiterpenes. However, in the xylem volatiles, sesquiterpenes and their oxides composed the major part also. *Semanotus bifasciatus* (Motschulsky) had electroantenogram (EAG) responses to both extracts by SFE and SEM, whereas the responses to SFE's extracts were much stronger than to SEM's, and their differences were statistically significant. So, the thujopsene and cedrol from *P. orientalis* may be the active component to attract *S. bifasciatus*.

Key words　*Platycladus orientalis*, *Semanotus bifasciatus*, supercritical fluid extraction (SFE), GC/MS, EAG

摘　要　利用超临界 CO_2 萃取法和索氏提取法分别提取侧柏 *Platycladus orientalis* (L.)的韧皮部和木质部挥发物,经 GC/MS 分析其成分,结果表明:超临界 CO_2 萃取物中检测到的 21 种组分中以倍半萜烯及其氧化物为主,没有检测到单萜类物质;索氏提取法检测到 23 种组分,韧皮部中检测到的组分以高沸点的树脂酸和二萜等为主,单萜烯和倍半萜及其氧化物含量较低;木质部中以倍半萜烯及其氧化物为主。将不同提取样品进行双条杉天牛 *Semanotus bifasciatus* (Motschulsky)的触角电位反应,结果表明:2 种方法的萃取物均能引起天牛的 EAG 反应,但以超临界萃取物引起的 EAG 反应较强,且与索氏提取物的反应值差异显著。罗汉柏烯和雪松醇可能是侧柏植物中引诱双条杉天牛的重要活性组分。

关键词　侧柏,双条杉天牛,超临界 CO_2 萃取,GC/MS,EAG

侧柏(*Platycladus orientalis* (L.) Franco)为我国特有常绿乔木,在北方城市的绿化中占有重要的地位。近年来我国大部分地区的侧柏都受到双条杉天牛 *Semanotus bifasciatus* (Motschulsky)的严重危害。行为学研究表明,侧柏饵木对双条杉天牛有强引诱作用。基于该特点,分析其寄主植物侧柏的挥发物组成,从中提取活性成分,用于林间引诱双条杉天牛已成为近年来的研究热点之一[1~4]。已有研究表明,侧柏植物中的单萜组分 α-蒎烯、β-蒎烯及其 1∶1 的混合物[1]、香桧烯、侧柏醇、柠檬烯[3]等对天牛无引诱活性。为了进一步研究侧柏植物中诱虫的活性组分,获得有效的双条杉天牛植物源引诱剂,本研究采用超临界 CO_2 萃

* 北京市科委课题(D0705002040391)。

** 通讯作者, E-mail: youjujin@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2006-10-17, 修回日期: 2006-12-08,
接受日期: 2007-01-10

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

取法提取了侧柏挥发物，对其进行了成分分析和生物测定，并与传统索氏提取法进行了比较，旨在利用超临界萃取法提取出较多的侧柏植物活性组分，并筛选出对双条杉天牛有明显 EAG 反应的活性组分，为系统筛选侧柏活性组分提供新的思路和途径。

超临界 CO_2 萃取技术（supercritical fluid extraction, SFE）是近 30 年发展起来的一种新型提取分离技术，可以从植物材料中直接萃取出所需的挥发物成分，综合了溶剂萃取和蒸馏 2 种功能的特点，具有萃取效率高，萃取产物无溶剂残留等优点；与吸附—热脱附方法比较，其萃取物可以直接用于生物测定[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

侧柏：2006 年春季采于北京十三陵林场；选用长 1 m 直径 10 cm 的侧柏木段。

双条杉天牛成虫：由北京林业大学资源与环境学院森林培育与保护实验中心提供。

1.2 仪器设备

超临界 CO_2 流体萃取机：CL-2 型（北京合世科贸有限责任公司生产）；气相色谱仪：Trace™ 2000 GC（CE INSTRUMENT 公司）；质谱仪：Voyager MS（FINNIGAN, Thermo-Quest 公司）；触角电位仪（electroantenogram, EAG）：荷兰 Syntech 公司产品，包括 Syntech IDAC-232 直流交流放大器、Syntech CS-55 刺激放大器、Syntech-15 微动操作仪和 3 个不同尺寸的昆虫触角固定器等，Syntech 数据分析记录软件为 EAG2000。该仪器由北京林业大学资源与环境学院森林培育与保护实验中心提供。

1.3 试验方法

1.3.1 挥发物的萃取：超临界 CO_2 萃取法。将侧柏树干分为韧皮部和木质部，用小型粉碎机粉碎，每次称取样品 250 g 装入不锈钢制作的网筒内，将网筒放入 2 L 的萃取釜内。设定萃取釜压力 15 Mpa，温度 40 ℃；分离釜压力 5 Mpa，温度 40 ℃。当样品在萃取釜内静态保持 1 h 后，开始动态提取。同时打开萃取釜的出气阀门和分离釜的进气阀门，当分离釜压力升到 5 Mpa 时，打开分离釜出气阀门，保持在恒温恒压下进行动态萃取约 6 h，期间 CO_2 流量保持在 25 L/min。萃取完成后，从分离釜出口接收萃取物，萃取物为黄褐色膏状，具有浓郁的侧柏香气。

索氏提取法。称取 250 g 粉碎样品装入滤纸筒，置于抽提筒中，加入二氯甲烷溶剂 300 mL 反复抽提 5 次，所得萃取液用无水 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩，得到澄清的黄色挥发油，有淡淡的侧柏香气。

1.3.2 触角电位测定：将双条杉天牛雄虫或雌虫的触角从基部切下，端部切掉 2 ~ 3 mm，触角两端连接在粘有电极胶的凝胶电极上；触角悬在“L”形玻璃管管口外 0.5 cm 处，处于连续、湿润的空气气流（流速为 100 mL·s^{-1}）中。每次取 10 μL 待测样品均匀地滴在 0.5 cm×3 cm 滤纸条上，置于巴斯德管中。用于脉冲刺激的气体流量为 2 mL·s^{-1}，刺激时间为 0.2 s，每 2 次刺激之间间隔 30 ~ 60 s，同 1 根触角上每个样品重复测试 3 次，为了减少昆虫之间的个体差异，每个样品做 3 个触角重复。

1.3.3 EAG 数据处理：EAG 的大小通过测量 EAG 波形向下的峰值幅度获得的。为了消除不同触角造成的个体差异，本试验以 10 μL 的 3—蒈烯的 EAG 反应值为参照。同时，为了消除空气、二氯甲烷造成的影响，将 10 μL 的二氯甲烷的 EAG 反应值作为空白（CK）。每一种样品测量前和测量后都要测定参照和 CK 值。将样品 EAG 测量值减去 CK 的平均值，得到样品 EAG 反应的绝对值；参照值减去前后所测 CK 的平均值，得到样品 EAG 反应的标准值；将绝对值除以标准值后再乘 100，得到样品的 EAG 反应的相对值[6]。用 LSD 多重比较统计分析双条杉天牛对不同样品的触角电位相对值的差异。

1.3.4 GC/MS 分析：（1）样品处理 取膏状超临界萃取物约 1 g（索氏提取挥发油 1 μL）于具塞试管中，加入 100 μL 乙酸乙酯充分溶解。取上层澄清液。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

(2)分析条件。GC:色谱柱:VF-5 Low Bleed/MS 柱(30 m×0.32 mm×0.35 μm),程序升温:50℃(1 min)→5℃/min→150℃→10℃/min→290℃(10 min);进样口温度 280℃;载气为 He,流速为 1.5 mL/min;无分流进样;进样量 0.2 μL。

MS:电离方式:EI,70eV;接口温度:250℃;源温:190℃;发射电流:150 μA;全扫描,每次扫描所用时间 0.5 s,扫描范围:m/z29~540;数据采集时间从 3 min 开始。

(3)挥发物的鉴定　采用 XCALIBUR 1.2 版本软件,NIST 98 谱图库兼顾色谱保留时间进行挥发物成分的定性。通过总离子流(TIC)的面积归一化法得到各类挥发物的相对含量来定量。

2　结果与分析

2.1　不同方法提取的侧柏挥发物的组分分析

分别用超临界 CO_2 萃取和索氏提取法对侧柏挥发物进行提取的结果表明:2 种提取方法所检测到的挥发物从组分到含量均有一定的差异。

超临界 CO_2 萃取侧柏的韧皮部和木质部样品中检测到 21 种组分,主要包括倍半萜烯及其氧化物、醇类、酮类、树脂酸类和二萜等高沸点的组分。韧皮部中主要组分为罗汉柏烯(44.36%)和雪松醇(37.84%),二者比例约为 5∶4 存在,其他酮、醇、酸等物质仅占 17.8;木质部中罗汉柏烯(57.72%)与雪松醇(15.70%)的比例约为 4∶1;其他组分约占 26.2%(表 1)。用此法萃取的侧柏韧皮部和木质部挥发物中均未检测到单萜成分。

索氏提取物中检测到 23 种组分,其中有 4 种单萜、倍半萜烯及其氧化物、树脂酸和二萜等高沸点的组分,但是没有检测到超临界萃取物中的 Widdrol hydroxyether 和氧化型石竹烯。韧皮部中罗汉柏烯(5.54%)与雪松醇(2.63%)比例约为 2∶1,而酮、醇、酸等高沸点物质的相对

表 1　不同方法提取的侧柏的挥发物的成分

化合物	超临界 CO_2 萃取法		索氏提取法	
	韧皮部(%)	木质部(%)	韧皮部(%)	木质部(%)
莽烯	ND	ND	0.30	TR
α-蒎烯	ND	ND	0.49	TR
柠檬烯	ND	ND	TR	TR
α-萜品烯	ND	ND	TR	TR
雪松烯	1.18	0.78	0.27	0.35
石竹烯	0.93	0.50	0.25	0.36
雪松-8(15)-烯	0.39	0.38	0.19	0.20
罗汉柏烯	44.36	57.72	5.54	59.72
α-长叶蒎烯	0.78	1.03	0.13	0.60
对-(1,2,2-三甲基环戊基)甲苯	0.37	0.49	0.10	0.39
未知化合物 1	1.80	1.27	TR	0.36
widdrol hydroxyether	1.11	0.67	ND	ND
表蓝桉醇	1.41	1.22	0.11	0.82
雪松醇	37.84	15.70	2.63	13.89
氧化Ⅱ型香橙烯	1.96	1.90	ND	MD
库贝醇	1.99	1.55	0.10	0.64
α-桉叶醇	0.34	0.36	0.14	0.24
α-红没药醇	0.50	0.74	TR	0.18
氧化型石竹	1.02	1.94	TR	TR
13α 甲基-13 乙基-罗汉松-7-烯-3-酮	0.13	0.85	1.72	0.94
14-异丙基-8,11,13-三甲基-13-罗汉松烯醇	0.34	4.22	24.52	0.84
松香酸	0.25	1.23	16.90	9.91
labda-8(20)13(16)-14-trien-18-oic acid, 15, 16-epoxy-	TR	1.66	31.69	5.31
未知化合物 2	0.31	1.72	14.58	2.92
未知化合物 3	2.54	3.46	TR	2.07

注:未知化合物:谱图库中未检索到的化合物,ND:未检测到 Not detected,TR:相对含量<0.1%。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

含量比例较高，约占总含量的 87.8%；木质部中罗汉柏烯（59.72%）与雪松醇（13.89%）比例约为 4∶1，醇类、酮类、酸类等其他物质约占 20%（表 1）。

韧皮部中的 13α 甲基－13 乙基－罗汉松－7－烯－3－酮、14－异丙基－8，11，13－三甲基－13－罗汉松烯醇、松香酸、labda-8（20）13（16）-14-trien-18-oic acid，15，16-epoxy-和未知化合物 2 这 5 种化合物的含量在索氏提取法样品中高于超临界 CO_2 萃取物，其余组分均低于超临界 CO_2 萃取物；从木质部组分来看，2 种方法提取的样品中各物质的含量基本相同。

2.2 双条杉天牛的触角电位反应

分别用超临界萃取法和索氏提取法提取的侧柏韧皮部和木质部样品为气味源刺激双条杉天牛触角，所得 EAG 测定结果表明：4 种样品均能引起双条杉天牛雌雄虫的 EAG 反应。其中以雄虫触角对超临界萃取的木质部样品 EAG 反应最高，韧皮部样品次之，索氏提取法的 2 个样品反应值最低；而雌虫则对超临界萃取韧皮部的样品反应最高，木质部次之，索氏提取法样品最低。雌雄虫的 EAG 值对比来看，除索氏提取法提取的木质部的样品 EAG 值是雌虫高于雄虫外，其他 3 种样品均表现为雄虫 EAG 值高于雌虫。从合并的雌雄虫平均触角电位值分析，双条杉天牛对韧皮部的超临界 CO_2 萃取物的 EAG 反应值最高（1.12±0.38 mV），其次是木质部（1.01±0.26 mV），并且二者均显著高于索氏提取的韧皮部（0.13±0.04 mV）和木质部（0.43±0.06 mV）样品（表 2）。

表 **2** 双条杉天牛成虫对 **4** 种样品的触角电位反应

样品	EAG 的相对平均值（mV）		EAG 平均值（mV）
	雄虫	雌虫	
超临界萃取法—韧皮部	0.79±0.07	1.40±0.62	1.12±0.38a
超临界萃取法—木质部	0.83±0.17	1.23±0.45	1.01±0.26a
索氏提取法—韧皮部	0.07±0.03	0.19±0.05	0.13±0.04b
索氏提取法—木质部	0.50±0.07	0.36±0.10	0.43±0.06b

注：表中数据为平均数±SD，数据后不同字母表示差异显著。

3 结论与讨论

本研究中超临界萃取物为膏状物，索氏提取样品为油状物，经 GC/MS 鉴定分析后，与前人研究[3,7]相比，其相同组分有 α－蒎烯、柠檬烯、雪松烯、石竹烯、罗汉柏烯、雪松醇，库贝醇、α－桉叶醇、13α 甲基－13 乙基－罗汉松－7－烯－3－酮。考虑到样品产地、样品处理过程以及仪器设备的检测灵敏度差异等因素的影响，这些稳定出现的化合物有可能是侧柏的特征性组分。

超临界萃取样品中还可以检测到一些树脂酸和二萜等高沸点组分，但没有检测到单萜类物质，这可能是由于动态提取时间较长，造成了一些低沸点物质如单萜的丢失和一些热不稳定的挥发性成分发生氧化、分解或聚合等变化，尽管超临界萃取法在系统密闭的惰性环境中萃取。鉴于上述原因，在进行超临界萃取工艺技术时应加入乙醇等改性剂以提高溶解度，增加物质溶解度的选择性，进而使挥发油中低沸点组分数有所增加[8]。索氏提取韧皮部样品中有些高沸点的醇、酮、酸类物质含量远远高于超临界萃取法。这可能是由于溶剂的相似相溶效应，经过索氏提取法中的渗透、溶解、分配、扩散等一系列物理过程将样品中高沸点组分提取了出来。

2 种提取方法相比，虽然采样效果存在一定的差异，但是都采集到了大量的倍半萜类物质及其氧化物，这些物质可以认为是侧柏植物中特征性组分。超临界萃取法具有萃取效率高、萃取物无溶剂影响且生物活性高的优点，是一种明显优于传统提取法的高效优质的活性成分提取方法。

经过比较不同提取样品对天牛的 EAG 反应，结果表明，超临界法萃取韧皮部的样品对天牛的 EAG 反应值最高（1.12±0.38 mV），木质

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

部的样品次之(1.01±0.26 mV)。二者中主要组分罗汉柏烯与雪松醇的比例分别是5∶4和4∶1。索氏提取法的木质部和韧皮部样品对天牛的EAG反应值分别为(0.43±0.06 mV)和(0.13±0.04 mV),与天牛对超临界CO_2萃取样品的反应有显著差异。索氏提取法的木质部中罗汉柏烯:雪松醇约为4∶1;高分子量的醇类、酮类、酸类等其他物质约占20%。韧皮部中罗汉柏烯:雪松醇约为2∶1,而酮、醇、酸等高分子量物质相对含量比例较高,约占总含量的87.8%,该样品的EAG值反应最低。超临界萃取样品中含有较高比例的倍半萜烯类物质,样品中没有溶剂的影响,更接近侧柏植物的真实成分组成;而索氏提取法所得挥发油中由于含有比例较高的高分子量醇、酮、酸等非挥发性成分,可能会屏蔽昆虫对其他活性成分的反应而影响了样品的刺激作用[9]。

侧柏的挥发性物质对双条杉天牛有一定的刺激作用,由于不同样品中所含活性成分和含量的差别,对双条杉天牛的EAG反应值不同。蔡世民等的研究表明侧柏植物中的单萜α-蒎烯、β-蒎烯及其1∶1的混合物对天牛无引诱活性[1];本研究中具有较高比例倍半萜类组分罗汉柏烯和雪松醇的样品对天牛表现出明显的EAG反应。因此可以初步判断α-蒎烯、β-蒎烯可能是侧柏植物中的主要组成成分,而一定比例的罗汉柏烯和雪松醇是引起天牛明显触角电位反应的活性组分,也可能是侧柏植物引诱天牛的重要组分。这2种活性组分如何影响天牛的行为反应,其他组分是否也有引诱作用仍有待于进一步研究。解决这些问题进而根据研究中的活性引诱组分进行人工合成引诱剂,用于林间防治双条杉天牛,减轻天牛对侧柏植物的危害,具有十分重要的意义。

参 考 文 献

1 蔡世民,黄平一,黄竞芳. 北京林业大学学报,1989,**11**(3):71~78.
2 孙月琴,骆有庆,金幼菊. 见吴孔明,陈晓峰主编,昆虫学研究进展. 北京:中国科学技术出版社,2000. 220~224.
3 孔祥波,张真,王鸿斌,杨杰,胡玉田. 林业科学研究,2005,**18**(3):260~266.
4 王婷,周成刚,李波,申卫星,王新花. 山东农业科学,2005,(1):44~47.
5 张凤娟,武晓颖,王骏,金幼菊. 分析测试学报,2005,**24**(5):78~81.
6 王明,伍德明,阎云花,吴才宏,迪拉娜·艾山,等. 华中农业大学学报,1999,**18**(4):311~316.
7 冯永华,李建中. 林业科技,1988,(4):26~29.
8 廖劲松,郭勇. 食品技术,2002,**12**:12~15.
9 肖春,杜家纬,张钟宁. 江西农业学报,2002,**12**(3):27~31.

《遗传学报》和《遗传》杂志

《遗传学报》、《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物学研究所主办、科学出版社出版的核心期刊,已被美国化学文摘(CA)、生物学数据库(BIOSIS)、生物学文摘(BA)、医学索引(Medical Index)、俄罗斯文摘杂志(AJ)以及NCBI、CABI等20多种国内外重要检索系统与数据库收录。刊登内容包括遗传学、发育生物学、基因组学、细胞生物学以及分子进化。读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研与教学人员、研究生、大学生、中学生物学教师等。

2005年,《遗传学报》获得第三届国家期刊奖提名奖,2006—2007年,连续获得中国科协精品科技期刊工程项目(B类)资助。自2007年起,《遗传学报》的外文刊名变更为 *Journal of Genetics and Genomics*。

《遗传学报》(ISSN 1673-8527, CN11-5450/R)为月刊,全年12期,国内邮发代号2-819,国外发行代号:M63。2008年定价50元,全年600元。期刊中文网址:遗传学报.cn

《遗传》(ISSN 0253-9772, CN11-1913/R)为月刊,全年12期。国内邮发代号2—810,国外发行代号:M62。2008年定价40元,全年480元。期刊中文网址:遗传.cn

欢迎订阅,欢迎网上注册投稿,欢迎发布广告。

联系地址:北京市安定门外大屯路:中国科学院遗传与发育生物学研究所编辑室

主 编:薛勇彪;编辑室主任:李绍武 E-mail:ycxb@genetics.ac.cn;yczz@genetics.ac.cn

邮政编码:100101;电话/传真:(010)64889354,64807669

http://www.Chinagene.cn;http://jgenetgenomics.org;中国遗传网.cn

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n