

不同种源青钱柳叶黄酮类物质含量的动态变化

楚秀丽 杨万霞 方升佐 尚旭岚 余诚棋

(南京林业大学森林资源与环境学院)

摘要:通过对5个种源青钱柳叶片黄酮类物质生长期动态规律的分析,寻求最适宜的利用时期,并初步筛选优良种源。基于高效液相色谱分析数据,对其功能叶黄酮类物质含量进行统计分析。结果表明:不同月份黄酮类物质含量差异显著,湖南江华和江西庐山种源的最佳采收期为7月,其他种源为10月;不同种源间黄酮类物质含量变异极显著,初步筛选出江华和庐山为优良药用种源。

关键词:青钱柳;种源;黄酮类物质;动态

中图分类号:S718.43 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2011)02-0130-04

CHU Xiu-li; YANG Wan-xia; FANG Sheng-zuo; SHANG Xu-lan; SHE Cheng-qi. **Dynamic change of flavonoids content in *Cyclocarya paliurus* leaves from different provenances.** *Journal of Beijing Forestry University* (2011) **33** (2) 130-133 [Ch. 20 ref.] College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037, P. R. China.

The dynamics of flavonoids content during the growing period of *Cyclocarya paliurus* leaves from five provenances was studied to determine the optimum harvesting time of leaves and to select superior provenances. The content of flavonoids in the leaves was determined with HPLC and the data analyzed by SPSS software. Results indicated that there were significant differences in flavonoids content of leaves among different harvesting months for each provenance. The best harvesting time was in July for Jianghua and Lushan provenances, and in October for the other provenances. Significant differences in the average flavonoids content of leaves were also observed among different provenances, and the Jianghua and Lushan provenances were considered elite ones for medicine use in light of flavonoids content. The obvious differences mentioned above made it necessary to choose the best utilization time and to select superior provenances in order to make full use of *C. paliurus* leaves.

Key words *Cyclocarya paliurus*; provenance; flavonoids; dynamics

青钱柳(*Cyclocarya paliurus*)胡桃科(Juglandaceae)青钱柳属,是我国特有的单种属落叶乔木,集药用、保健、用材和观赏等多种价值于一身。前人研究证实^[1]黄酮类物质是其主要的次生代谢物,并且测出青钱柳叶片所含黄酮类化合物主要有槲皮素、异槲皮苷、山萘酚。据文献记载^[2-4],黄酮类化合物具有降血糖、降血脂、清热解毒、利尿通便、抗菌消炎、抗氧化衰老、消除体内自由基等药理作用。目前,国内对青钱柳黄酮类代谢物的研

究,主要涉及谢明勇等^[1]研究其化学成分结构及药理作用;杨万霞等^[5]对黄酮类化合物地理变异的研究;以及米丽雪等^[6]对营养器官总黄酮含量测定及分布规律的研究。从叶片黄酮类物质优质高产的角度出发,本文研究了不同种源青钱柳叶片黄酮类物质含量的生长期动态规律,以期对青钱柳的药用开发以及育种工作提供技术支持。

收稿日期:2010-05-31

基金项目:国家林业公益性行业科研专项(200904046)、江苏高等学校优秀科技创新团队项目。

第一作者:楚秀丽。主要研究方向:苗木栽培选育。电话:15210646552 Email: xiulic0207@163.com 地址:100091 北京市颐和园后中国林业科学研究院林业所。

责任作者:方升佐,博士,教授,博士生导师。主要研究方向:人工林定向培育。电话:025-85427345 Email: fangsz@njfu.edu.cn 地址:210037 南京市龙蟠路159号南京林业大学森林资源与环境学院。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

1 试验地概况与材料

1.1 试验地概况

试验地设在南京林业大学江苏镇江苗圃基地,其地理坐标为北纬 $32^{\circ}16'40''$ 、东经 $119^{\circ}32'52''$,海拔20 m,地处北亚热带湿润季风区,雨热同季,气候温暖,光照充足,热量丰富。年降水量为1 000 mm,降水主要集中在6—9月,占全年降雨量的60%左右;年平均温度为 14.1°C ,无霜期为220 d;土壤类型为砂壤土,有机质含量为1.77%,水解氮、有效磷、速效钾含量分别为77、14.9、132.6 mg/kg。

1.2 试验材料

本试验采用浙江安吉、湖南江华、云南昆明、安徽清凉峰和江西庐山(分别位于青钱柳自然分布区东、南、西、北及中部)的2年生青钱柳实生苗作移栽材料。2008年3月中旬,将其按一定的方式栽植在镇江采穗圃的苗床上。并于6—10月随机采自各种源内所有家系单株的功能叶,及时杀青烘干、粉碎用于内含物各指标测定。

1.3 试验仪器与试剂

黄酮类化合物测定使用的主要仪器是日本岛津公司生产的LC-10AT液相色谱仪及SPD-10A紫外检测器。标准品槲皮素、山奈酚、异槲皮苷由南京博全科技有限公司提供;甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯;水为去离子水。

2 研究方法

2.1 试验地配置方法

每种源同一家系的移植苗为一个试验单元,其株行距为100 cm \times 120 cm。苗床为南北方向,每床横排2株,各家系在试验苗床上两床并起由北向南依次排开,各床由东向西在田间排开,苗床宽度为180 cm,过道宽度为20 cm,并设置保护行。

2.2 黄酮类物质萃取与分离

准确称经再次烘至恒质量的原样烘干粉1 g左右,精确到0.000 1 g。用高效液相色谱仪对每个提取样重复测3次。算得各黄酮类物质含量均为烘干叶片单位质量含量。

2.2.1 槲皮素与山奈酚的萃取

不少研究采用醇提法测定黄酮类物质含量,山奈酚含有酚羟基,在传统醇提基础上加入酸以利于其析出^[7],因此,参考鞠建明等^[8]对黄酮醇苷的提取方法,称取约1.0 g干样于圆底烧瓶,精确加甲醇和25%盐酸(体积比为4:1)25 mL,闭塞,称重,沸水浴回流1 h,自然冷却称重,以甲醇补足损失质量,摇匀,过滤,再将滤液过0.45 μm 有机膜,作为

HPLC(High performance liquid chromatography)测试液。

2.2.2 异槲皮苷的萃取

参考谢明勇等^[1]的方法。称取约1.0 g干样于圆底烧瓶中,精确加入25 mL 70%甲醇,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流2 h,过滤,再将滤液过0.45 μm 有机膜,作为HPLC测试液。

2.2.3 黄酮类物质的HPLC分析

色谱柱:Kromsil C_{18} 柱(200 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇和0.5%磷酸水溶液(槲皮素与山奈酚萃取液的流动相体积比为55:45;异槲皮苷与山奈酚萃取液的体积比为50:50);流速:槲皮素与山奈酚萃取液上样流速为1 mL/min,异槲皮苷萃取液上样流速为0.800 mL/min;检测波长:360 nm;进样量:10 μL ;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;定量方法:面积外标法。

3 结果与分析

3.1 槲皮素含量动态变化

对5个种源青钱柳叶片槲皮素含量做动态分析表明,江华种源槲皮素含量为6月下旬和10月下旬较高,而7、8和9月下旬相对较低,呈W型折线变化;庐山种源则表现出先升后降再稍升的倒Z型趋势,但昆明、清凉峰和安吉种源槲皮素含量均呈上升趋势,至10月含量最高(图1);10月,江华种源槲皮素含量高达4.763 mg/g,明显比其他种源高;庐山种源槲皮素含量7月最高,为2.010 mg/g。多重比较结果显示,各种源不同月槲皮素含量差异极显著($P=0.000\ 1$),其中7月为庐山种源最佳采叶期,10月为江华、清凉峰、安吉和昆明种源最佳的采叶期。

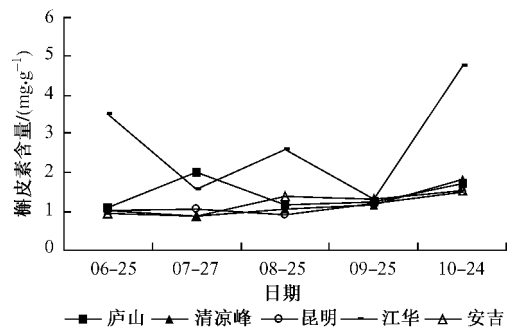


图1 不同种源青钱柳叶片槲皮素含量生长期动态
Fig.1 Dynamics of quercetin content in *Cyclocarya paliurus* leaves among different provenances during the growing period

3.2 山奈酚含量动态变化

从图2可以看出,江华和庐山种源山奈酚含量在7月最高,江华达6.854 mg/g,庐山为5.230 mg/g,随后下降,至9月份含量再次升高,但10月含量低于

7 月;清凉峰和安吉种源的山奈酚含量在 7、10 月出现峰值,分别为 3.090、3.428 mg/g 及 2.220、2.323 mg/g,以 10 月含量较高;而昆明种源分别在 6 月和 10 月含量较高,7、8 月含量都很低。经多重比较可知,各种源的不同月山奈酚含量差异极显著 ($P=0.0001$),清凉峰、安吉和昆明种源最佳采叶期为 10 月,江华和庐山种源可定为 7 月采叶。

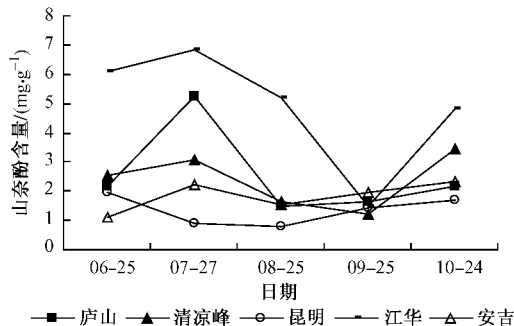


图 2 不同种源青钱柳叶片山奈酚含量生长期动态
Fig. 2 Dynamics of kaempferol content in *Cyclocarya paliurus* leaves among different provenances during the growing period

3.3 异槲皮苷含量动态变化

从图 3 中可知,江华种源叶片异槲皮苷含量月份间差异很大,7 月达到最大含量 (19.000 mg/g)。认为 7 月为江华种源最佳利用期。除安吉种源 10 月含量最高,为 3.353 mg/g (7 月为 3.240 mg/g,差别不大),清凉峰、庐山和昆明种源 7 月含量亦为各自月份最高,分别为 4.520、4.220 和 2.780 mg/g,可定其最佳采叶期为 7 月。可见,各种源叶片异槲皮苷最佳利用期为 7 月。多重比较可知,各种源青钱柳叶片不同月份异槲皮苷含量差异极显著 ($P=0.0001$)。具体数值显示(图 1~3),各种源异槲皮苷含量高于槲皮素和山萘酚含量。

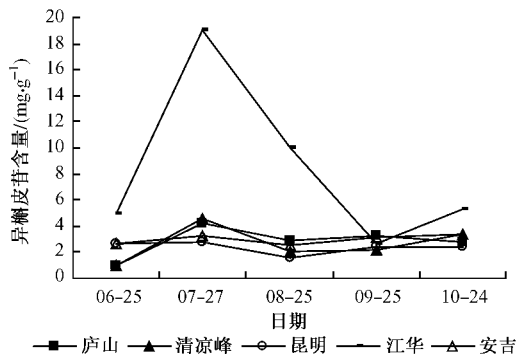


图 3 不同种源青钱柳叶片异槲皮苷含量生长期动态
Fig. 3 Dynamics of isoquercitrin content in *Cyclocarya paliurus* leaves among different provenances during the growing period

由以上分析可知,青钱柳叶片黄酮类物质含量表现出明显的季节规律。不同月份黄酮类物质含量差异显著,反映出气候条件对黄酮类物质积累的影响。

不同月份黄酮类物质在青钱柳体内的积累结果可能与各黄酮单体各自形成的生物特性及光照、温度、土壤条件等气候环境因子有关^[6,9-10]。本课题组对包括该试验种源等更多种源进行生长规律研究发现,7 月底到 9 月为其生长速生期,这一时期青钱柳苗木营养的消耗也可能对黄酮类物质含量造成影响。

3.4 不同种源间叶黄酮类物质含量的差异

对 5 个种源间黄酮类物质叶片单位含量生长期均值(5 个月份含量平均值)差异比较表明(表 1),种源间黄酮类代谢物含量差异均达极显著水平。江华种源叶片各黄酮类物质单位含量在测定种源中均最高,其槲皮素、山萘酚及异槲皮苷含量分别达 2.696、4.882 及 8.219 mg/g。种源间槲皮素、山萘酚及异槲皮苷变幅分别为 1.131~2.696 mg/g、1.361~4.882 mg/g 及 2.438~8.219 mg/g,各黄酮单体最高含量是最低含量的 3~4 倍。可见,进行较优种源选择具有实际意义。通过模糊数学隶属函数法^[11]进行选择(表 2),初步定湖南江华、江西庐山为优良药用种源,并且它们与其他种源黄酮类物质含量间差异均显著。

各种源青钱柳叶片黄酮类含量不仅受光照、土壤条件、温度等生态环境因子影响,也由其自身生物遗传特性决定。本试验各种源青钱柳苗木被栽养在同一苗圃苗床,但各种源黄酮类物质含量差异显著,说明遗传因素在决定黄酮类物质含量方面的作用不可忽视,对青钱柳开展优良药用种源选择具理论依据。

表 1 不同种源青钱柳叶片黄酮类物质含量的差异

Tab. 1 Variation in the flavonoids content in *Cyclocarya paliurus* leaves among different provenances mg·g⁻¹

种源	指标		
	槲皮素	山萘酚	异槲皮苷
庐山	1.389 ± 0.048b	2.561 ± 0.087b	3.263 ± 0.086b
清凉峰	1.189 ± 0.093c	2.344 ± 0.146b	2.899 ± 0.357b
昆明	1.131 ± 0.069c	1.361 ± 0.057c	2.438 ± 0.251c
江华	2.696 ± 0.076a	4.882 ± 0.057a	8.219 ± 0.117a
安吉	1.218 ± 0.098c	1.833 ± 0.065bc	2.994 ± 0.087b
均值	1.525	2.596	3.963
F 值	212.490 **	20.850 **	394.010 **

注: **差异极显著;表中不同小写字母 a、b、c 表示 0.05 水平显著差异。

表 2 各种源黄酮类物质含量隶属值

Tab. 2 Values of subject function for different provenances of *Cyclocarya paliurus*

种源	指标		
	槲皮素	异槲皮苷	山萘酚
庐山	0.165	0.143	0.341
清凉峰	0.037	0.080	0.280
昆明	0	0	0
江华	1.000	1.000	1.000
安吉	0.055	0.096	0.134

4 结论与讨论

青钱柳黄酮类物质单位叶片含量动态有明显的

季节变化规律,槲皮素、山奈酚及异槲皮苷含量都表现出7、10月两个高峰值。庐山种源叶片槲皮素含量在7月最高,其他种源10月含量最高;江华、庐山种源叶片山奈酚7月含量最高,其他种源10月含量最高;各种源叶片异槲皮苷含量最高月份应为7月。Solar等^[12]对普通胡桃(*Juglans regia*)根黄酮类含量季节变化的研究得出同样规律,即黄酮类在夏初有最高含量,直至夏季结束一直呈下降趋势。黄酮类物质抗紫外线,随着紫外线强度增加,植物可能因自我保护而消耗体内黄酮类物质^[13],也是盛夏黄酮类物质含量较低的一个原因。但是Germ等^[14]研究发现,贯叶连翘(*Hypericum perforatum*)叶片黄酮含量随紫外线强度加强而升高。总体上,江华和庐山种源最佳采收期为7月,其他种源为10月。这与胡凤莲等^[10]、江德安等^[15]分别对鱼腥草(*Houttuynia cordata*)中槲皮素含量的动态变化和银杏(*Ginkgo biloba*)营养生长与叶黄酮含量变化规律研究的结论基本一致。同时,不同植物,其生长节律、代谢物质积累的遗传机制以及环境条件的不同也可能导致次生代谢物积累规律的不同。

黄酮类物质含量最高是江华种源,其槲皮素、山奈酚及异槲皮苷的含量分别达2.696、4.882及8.219 mg/g。本试验中青钱柳为2年生苗,其叶片黄酮类单位含量相对于杨万霞等^[5]对青钱柳1年生苗叶片测定的最高含量明显增加,说明青钱柳随着年龄的增大,其叶片黄酮类物质的积累能力也相应提高。这种特性有待于今后继续观测。据文献报道,其他黄酮类物质药用植物如北柴胡(*Bupleurum chinense*)总黄酮含量最高不到4.5%^[16],大龄银杏叶的总黄酮含量最高为0.977%^[17],5年生银杏叶总黄酮最高含量2.46%^[15],杜仲(*Eucommia ulmoides*)叶槲皮素、山奈酚及总黄酮最高含量分别为0.043%、0.021%、0.060%^[18],肉桂(*Cinnamomum cassia*)叶片含槲皮素、山奈酚、异槲皮苷最高分别为18.76、0.91、14.63 $\mu\text{g/g}$ 就被认为具潜力的天然抗氧化剂资源^[19]。可见,青钱柳确实具有很高的药用开发利用价值。

各种源黄酮类物质含量差异极显著,进行黄酮类次生代谢物的优良药用种源选择具有理论依据及现实意义。本结果与余诚棋^[20]对1年生不同种源青钱柳的选择结果稍有不同,余诚棋定为优良药用的种源是云南昆明,在这次评定时,隶属值最小。这种变动的存在可能与入选种源数有关,或者与种源自身稳定性等有关。本次只对5个种源进行初步评定,为了让选择结果更具代表性并验证种源不同年龄的稳定性,以后将开展更多个种源以及同种源多年

试验观测工作。

参考文献

- [1] 谢明勇,王远兴,易醒,等. 青钱柳叶中黄酮化合物结构及含量研究[J]. 分析化学,2004,32(8): 1053-1056.
- [2] 谢明勇,李磊. 青钱柳化学成分和生物活性研究概况[J]. 中草药,2001,32(4): 365-366.
- [3] PETERSON J, DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity[J]. *Nutrition Research*, 1998, 18(12): 1995-2018.
- [4] BAI N S, HE K, ZHOU Z, et al. Flavonoids from *Rabdosia rubescens* exert anti-inflammatory and growth inhibitory effect against human leukemia HL-60 cells[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122: 831-835.
- [5] 杨万霞,余诚棋,方升佐. 青钱柳叶中黄酮类化合物的地理变异[J]. 浙江林学院学报,2009,26(4): 522-527.
- [6] 米丽雪,上官新晨,施利仙,等. 青钱柳营养器官总黄酮含量测定及分布规律研究[J]. 江西农业大学学报,2009,31(5): 896-900.
- [7] 宋秋华,张磊,梁飞,等. 黄酮类化合物提取和纯化工艺研究进展[J]. 山西化工,2007,27(4): 24-27.
- [8] 鞠建明,段金彪,钱大玮,等. 不同栽培模式的银杏叶在不同生长季节中总黄酮醇苷和总内酯的含量变化[J]. 药物分析杂志,2003,23(3): 195-199.
- [9] 李洁. 不同采收期半枝莲中总黄酮含量的比较研究[J]. 中医药导报,2008,14(5): 99,112.
- [10] 胡凤莲,倪细炉,刘文哲. 鱼腥草中总黄酮和槲皮素含量的动态变化[J]. 安徽农业科学,2008,36(10): 4128-4130.
- [11] 乔志霞,沈火林,安岩. 番茄耐高温胁迫能力鉴定方法的研究[J]. 西北农业学报,2006,15(6): 114-120.
- [12] SOLAR A, COLARIĆ M, USENIK V, et al. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.) [J]. *Plant Science*, 2006, 170: 453-461.
- [13] HASHIBA K, IWASHINA T, MATSUMOTO S. Variation in the quality and quantity of flavonoids in the leaves of coastal and inland *Campanula punctata* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006, 34: 854-861.
- [14] GERM M, STIBILI V, KREFT S, et al. Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122: 471-474.
- [15] 江德安,郭秀英. 银杏营养生长与叶黄酮、内酯含量变化规律的研究[J]. 孝感学院学报,2007,27(3): 14-18.
- [16] 谭玲玲,蔡霞,胡正海. 北柴胡各器官中总黄酮动态变化研究[J]. 中草药,2008,39(2): 286-287.
- [17] 李莉,田士林,郑芳. 银杏叶不同时期黄酮含量测定与比较[J]. 安徽农业科学,2006,34(11): 2370,2414.
- [18] 陈立群,杨中林. 不同采收期杜仲叶中3种黄酮成分动态变化研究[J]. 海峡药学,2007,19(4): 29-30.
- [19] PRASAD K N, YANG B, DONG X, et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2009, 10: 627-632.
- [20] 余诚棋. 青钱柳种子形态特征、苗期性状及叶片化学成分的研究[D]. 南京:南京林业大学,2008.

(责任编辑 赵 勃)