

七子花叶片次生代谢产物含量的动态分析

杨蓓芬， 金则新， 李钧敏

(台州学院 生态研究所,浙江 临海 317000)

摘 要:采用分光光度法对七子花叶片不同生长时期的黄酮、鞣质、生物碱、皂甙、绿原酸等 5 种次生代谢产物的含量进行测定与分析。结果表明:黄酮、皂甙、鞣质、绿原酸含量的变化曲线均为“双峰型”,最大值分别为现在 5 月中旬和 8 月中旬;皂甙和鞣质含量的变化幅度较小,黄酮和绿原酸的含量变化幅度较大。生物碱含量的变化规律与其他 4 种次生代谢产物含量不同,其总的趋势是逐渐下降,直至落叶,但在 8 月中旬(盛花期)出现一个小的波峰。总量与黄酮、绿原酸与鞣质之间存在极显著的相关性,绿原酸与总量、皂甙之间、鞣质与皂甙之间、生物碱与黄酮之间均存在显著相关性。七子花叶片中黄酮、皂甙、生物碱、鞣质、绿原酸之间存在着类似的合成途径或共同的中间代谢产物;黄酮、生物碱的含量较高。

关键词:七子花;次生代谢产物;含量 ;动态

中图分类号:Q946. 8 文献标识码:A 文章编号:1001-7461(2008)06-0155-04

Dynamic Analysis of the Secondary Metabolites Contents in the Leafblades
of *Heptacodium miconioides*

YANG Bei-fen, JIN Ze-xin, LI Jun-min

(Ecology Institute of Taizhou University, Linhai, Zhejiang 317000,China)

Abstract:To determine the contents of 5 secondary metabolites, such as flavonoids, tannins, alkaloids, saponin and chlorogenic acid in the leaves of *Heptacodium miconioides* at different growth periods, the spectrophotometry was used to detemine the contents of 5 secondary metabolites. The results showed that the change curves of flavonoids, saponins, tannins and chlorogenic appeared double peaks type. The two maximum values were reached in the middle of May and August respectively, while the minimum value was reached at the middle of June. The change scales of saponins and tannins were no significant, while those of flavonoids and chlorogenic acid were large. The change rule of alkaloids was different from the others. On the whole, the trend of alkaloid was declined until the leaves fell, while there was a small peak in the middle of August (the blooming period). There were extremely significant correlations between the total contents and the contents of flavonoids, chlorogenic acid, and tannins. There was also significant correlation between the content of chlorogenic acid and the total content, the content of chlorogenic acid, between the content of saponins and tannins, between the content of alkanoids and flavonoids. The secondary metabolits in the leaves of *H. miconioides* could regulate and control the grwoth of plant in every stage. The contents of the flavonoids and alkanoids were relatively high.

Key words:*Heptacodium miconioides*; secondary metabolites; content;dynamic

次生代谢是植物在长期进化与环境相互作用的 争能力、协调与环境的关系上充当重要的角色,其产
结果,次生代谢产物在植物提高自身保护和生存竞 生和变化比初生代谢产物与环境具有更强的相关性

收稿日期:2008-03-06 修回日期:2008-07-13
基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(399203);台州市科技局资助项目(044205)
作者简介:杨蓓芬,女,副教授,主要从事植物学教学与研究工作。

和对应性^[1]。次生代谢产物主要有生物碱、萜类、黄酮类、酚类、醌类、甙及皂甙类。目前,对次生代谢产物的研究主要集中在对它的合成途径、积累、基因工程、植物组织器官中的分布、生态因子对它的影响以及生物活性和功效等方面^[2-6],为次生代谢产物的利用奠定了基础。

七子花(*Heptacodium miconioides*)为我国特有的落叶小乔木,属忍冬科单种属植物,是国家首批二级重点保护植物。七子花的树姿优美、花期长、7朵花轮生且具香味,可以作为优良的园林和绿化树种,但其分布非常狭窄,并有不断缩小的趋势。目前,研究人员对七子花的种群结构、分布格局、光合特性和遗传多样性^[7]等方面进行了研究,但对七子花的次生代谢产物方面的研究较少,仅见对其黄酮含量和成分的分析^[8]。通过对七子花叶片的黄酮、皂甙、鞣质、生物碱和绿原酸的含量进行动态分析,初步探讨七子花的次生代谢产物的含量与生长季节的关系,为七子花的保护、栽培和合理利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

材料采自浙江省临海市境内的括苍山,该地属亚热带湿润季风气候,年平均气温 10.5~12.5℃,年降水量 1 700~2 027 mm,山地土壤系腐殖质丰富的黄壤土。主峰米筛浪海拔 1 382.4 m,种群分布地点是离主峰不远的双夹水坑(海拔 950 m)。七子花在 3、4 月开始萌芽、展叶,进入叶片生长季节,6 月底到 8 月为花期,之后叶子逐渐变黄,10 月下旬叶子全部脱落。

1.2 材料

2004 年 4—10 月,每月中旬采集位置相对固定的七子花叶片。采集时,用湿布包裹,保鲜袋封装,立即带回实验室。将材料洗净,105℃杀青 30 min,70℃干燥至恒重,研磨后经过 0.25 mm 金属网筛,将烘干样品放入磨口广口瓶,置于干燥器中保存,备用^[9]。

芦丁、绿原酸、小檗碱、没食子酸、人参皂甙 Rb 购自中国药品生物制品检定所。

吸光度采用日本岛津 UV2401-PC 紫外-可见分光光度计测定。

1.3 方法

1.3.1 黄酮提取与测定^[10] 取七子花叶片样品 0.1 g,加入 5 mL 甲醇,80℃水浴回流提取 2 h,离心取上清液,残渣加 5 mL 甲醇重复提取 2 次,合并

3 次上清液,定容至 25 mL。取 1 mL,置 10 mL 离心管中,加入 4 mL 0.1 mol·L⁻¹三氯化铝—甲醇溶液,摇匀,在 420 nm 处测定吸光度。每个样品重复 3 次。

以芦丁为标准品,称取芦丁 10 mg,用甲醇定容至 10 mL,配成浓度为 1 mg·mL⁻¹的芦丁对照品溶液;分别取芦丁对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 放入 10 mL 容量瓶中,均加甲醇至刻度,摇匀后分别取 1 mL 放入 6 支 10 mL 的离心管中,加入 4 mL 0.1 mol·L⁻¹三氯化铝—甲醇溶液,摇匀,在 420 nm 处测定吸光值。以芦丁浓度为横坐标,相应的吸光值为纵坐标,得到黄酮标准曲线: $y = 8.036\ 2x - 0.001\ 6$, $R^2 = 0.997\ 5$ 。其线性浓度范围为 0.02~0.10 mg·mL⁻¹。

1.3.2 鞣质抽提与测定^[11] 取七子花叶片样品 0.1 g,加水 25 mL,微火煮沸 30 min,放冷过滤至干燥锥形瓶中,残渣加水重复提取 2 次,合并 3 次过滤液,并定容至 25 mL。吸取 1 mL 提取液,加入 24 mL 蒸馏水,再加入 2 滴 5%鞣红溶液,用 0.01 mol·L⁻¹高锰酸钾溶液滴定,溶液从蓝色变成绿色再变为黄色为终点。每个样品均重复 3 次。鞣质标准曲线的取得以没食子酸为标准品,方法与黄酮相同,得到标准曲线为: $y = 0.013\ 6x + 0.000\ 3$, $R^2 = 0.999\ 9$ 。其线性浓度范围为 0.02~0.06 mg·mL⁻¹。

1.3.3 生物碱抽提与测定^[12] 取七子花叶片样品 0.1 g,加入 90%乙醇(v/v)5 mL,85℃水浴回流提取 0.5 h,离心,取上清液,残渣加 5 mL 90%乙醇重复提取 2 次,合并 3 次上清液,再用 90%乙醇定容至 25 mL。取提取液 1.4 mL,置于加入 4 mL 氯仿的分液漏斗中,加入 7.2×10^{-4} mol·L⁻¹溴甲酚绿(pH=4.42)缓冲溶液 0.6 mL,振摇 1 min,静置 1 h,取澄清的氯仿液,以试剂空白作对照,于 417 nm 处测定吸收度。每个样品重复 3 次。生物碱标准曲线的取得以小檗碱为标准品,方法与黄酮的相同,得到标准曲线为: $y = 6.600\ 0x - 0.010\ 2$, $R^2 = 0.999\ 9$ 。其线性浓度范围为 0.03~0.08 mg·mL⁻¹。

1.3.4 总皂甙的提取与测定^[13] 取七子花叶片样品 0.1 g,加入无水乙醇 5 mL,85℃回流提取 6 h,离心取上清液,残渣加 5 mL 无水乙醇重复提取 2 次,合并 3 次上清液,挥去溶剂后加 2 mL 水使其溶解,再加 2 mL 乙醚进行萃取,取水层,放入 80℃干燥箱中,待干燥后用甲醇定容至 25 mL,取 1 mL 置 25 mL 容量瓶中,挥去溶剂后,加入 0.2 mL 5%香

草醛冰醋酸溶液,再加入 0.8 mL 高氯酸,于 70℃ 水浴加热 20 min,取出,冷却,加 5 mL 冰醋酸,以试剂空白作对照,于 560 nm 波长处测其吸光度。每个样品重复 3 次。总皂甙标准曲线的取得以人参皂甙 Rb 为标准品,方法与黄酮的相同,得到标准曲线为 $y=27.763\ 0x+0.090\ 1$, $R^2=0.971\ 6$ 。其线性浓度范围为 0.002~0.010 mg·mL⁻¹。

1.3.5 绿原酸的提取与测定^[14] 取七子花叶片样品 0.1 g,加入 95%乙醇 5 mL,回流提取 2 h,离心取上清液,残渣加 5 mL95%乙醇重复提取 2 次,合并 3 次上清液,定容至 25 mL,取 1 mL,置 25 mL 容量瓶中,加入 0.2 mol·L⁻¹ HCl 定容至刻度,摇匀,以试剂空白为对照,在 324 nm 处测定吸光度。每个样品重复 3 次。绿原酸标准曲线的取得以绿原酸为标准品,方法与黄酮的相同,得到标准曲线为: $y=57.868\ 0x-0.006\ 1$, $R^2=0.991\ 4$ 。其线性浓度范围为 0.002~0.010 mg·mL⁻¹。

1.4 数据处理

测定结果用 SPSS11.5 for Windows 数据分析系统进行统计分析,对 5 种次生代谢产物的含量进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 七子花叶片次生代谢产物含量的动态变化

由图 1 可知,七子花叶片中黄酮、皂甙、生物碱、鞣质和绿原酸含量随季节而变化,其中,鞣质含量变化较其他 4 种次生代谢产物的含量变化平稳,这是因为鞣质主要是增加叶片的湿度,与植物的自身防御功能有关,而括苍山平均气温较低,七子花植株上的虫子较少,因而鞣质的含量变化不大。

黄酮、皂甙、鞣质和绿原酸含量的变化规律相似,变化曲线均呈“双峰”型,5 月中旬和 8 月中旬分别达到高峰值,6 月中旬最低,这与文献资料^[15]基本一致。皂甙和鞣质含量的变化幅度较小,黄酮和绿原酸的含量变化幅度较大。图 1 还表明,4—5 月,七子花叶片生长迅速,代谢旺盛,黄酮、鞣质、绿原酸、皂甙含量均在增加;5—6 月是叶片生长最快的时期,叶片中光合产物迅速转变为其他物质,而此时括苍山的气温较低、光照强度较弱,光合作用的速率较低,使合成这 4 种次生代谢产物的底物相对不足,含量下降^[16];7—8 月,叶片发育成熟,叶片的生长处于低谷期,枝叶繁茂,叶绿素含量增加,光照强度较强,光合作用速率较高,4 种次生代谢产物的底物增加,合成作用增强,含量增高,达到全年的最高水平。8 月以后,气温降低,叶片逐渐衰老变黄,代谢减弱,

4 种次生代谢产物含量呈下降趋势,直至落叶。表明黄酮、鞣质、绿原酸、皂甙是以碳为基础的次生代谢产物,与植物体内的 C/N 比呈正相关。生物碱含量的变化规律与其他 4 种次生代谢产物含量不同,曲线总的趋势是逐渐下降,但在花盛期(8 月中旬)出现一个小的波峰,然后继续下降直至落叶,表明生物碱是以氮为基础的次生代谢产物,与植物体内的 C/N 比呈负相关^[17]。

由图 1 知,黄酮、皂甙、生物碱、鞣质和绿原酸的平均含量分别为 2.215%、0.510%、1.927%、1.615%和 3.076%。黄酮、皂甙、鞣质、绿原酸的最大值出现在 8 月中旬(盛花期),最大值分别为 2.859%、0.666%、1.884%和 4.481%。生物碱的最高含量为 2.844%。与银杏^[18]、苦参^[19]相比,七子花叶片中黄酮、生物碱的含量较高,具有一定的开发利用价值。

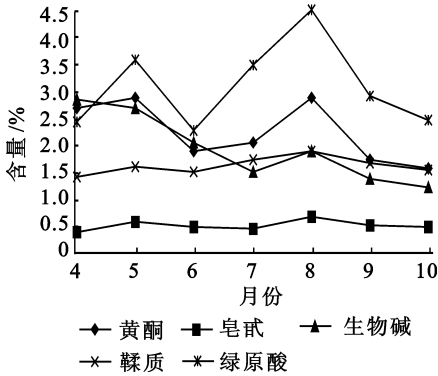


图 1 七子花叶片次生代谢产物含量的变化
Fig.1 The changes of the contents of secondary metabolites in the leaves of *H. miconioides*

2.2 七子花叶片次生代谢产物含量的相关性

从表 1 可以看出,5 种次生代谢产物的总量与黄酮含量存在极显著的正相关,与绿原酸含量存在显著正相关;绿原酸含量与鞣酸含量有极显著相关性,与皂甙含量有显著相关性;鞣酸含量与皂甙含量之间有显著相关性;生物碱含量与黄酮含量存在显著相关性;其他次生代谢产物含量两两之间均没有显著相关性。

表 1 七子花叶片次生代谢产物含量的相关性^①

	metabolites in the leaves of <i>H. miconioides</i>					
	黄酮	皂甙	生物碱	鞣质	绿原酸	总量
黄酮	1.000					
皂甙	0.306	1.000				
生物碱	0.861*	-0.075	1.000			
鞣质	0.102	0.823*	-0.376	1.000		
绿原酸	0.488	0.838*	-0.005	0.910**	1.000	
总量	0.921**	0.616	0.621	0.477	0.780*	1.000

① * 为 $P<0.05$ 水平; * * 为 $P<0.01$ 水平。

3 结论与讨论

七子花的次生代谢在叶片整个生长过程中,尤其是七子花的展叶和开花生理过程中呈现动态变化,说明它们在植物生长的每一个阶段都起着重要的调节和控制作用^[2]。七子花叶片中黄酮、皂甙、生物碱、鞣质、绿原酸存在着不同程度的正相关和负相关。另外,七子花的叶片中黄酮、生物碱的含量较高,具有一定的开发前景,最适采摘期为 8 月中旬。

七子花叶片中黄酮、皂甙、生物碱、鞣质和绿原酸的含量在叶片的生长过程中均出现变化。黄酮、皂甙、鞣质、绿原酸的变化曲线均为“双峰型”,8 月中旬分别达到全年的最大值;其中皂甙和鞣质含量的变化幅度较小,黄酮和绿原酸的含量变化幅度较大;生物碱含量的变化规律与其他 4 种次生代谢产物含量不同,这主要是因为黄酮、皂甙、鞣质、绿原酸是以氮为基础的次生代谢产物,生物碱是以碳为基础的次生代谢产物,它们在生物合成、运输、积累等方面既有一定的相关性,同时又受到多种环境因素胁迫,存在着相对的独立性^[2,20],如高温、紫外辐射等因素均能促进黄酮的积累^[21]。这些次生代谢产物具体的合成和积累机理有待进一步研究。

综上所述,七子花叶片中次生代谢产物对植物的生长起着重要的调节和控制作用。七子花叶片中黄酮、皂甙、生物碱、鞣质、绿原酸之间存在着类似的合成途径或共同的中间代谢产物。七子花叶片中黄酮、生物碱的含量较高。

参考文献:

[1] 阎秀峰. 植物次生代谢生态学[J]. 植物生态学报, 2001, 25(5): 369-340.

[2] 何水林, 郑金贵, 王晓峰, 等. 植物次生代谢: 功能、调控及其基因工程[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 558-563.

[3] 赵则海, 于景华, 杨逢建, 等. 人为扰动对乌拉尔甘草不同部位甘草酸与总黄酮含量的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(12):

2799-2803.

[4] 刘世彪, 胡正海. 绞股蓝龙须茶的人参皂甙含量组织定位及皂甙含量的季节变化[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 388-392.

[5] 常艳旭, 苏格尔. 锁阳不同生长期鞣质含量的动态研究[J]. 中药材, 2005, 28(8): 643-645.

[6] 蔡青年, 王宇, 张青, 等. 小麦不同抗蚜虫品种(系)中吲哚生物碱的含量变化[J]. 应用生态学报, 2004, 15(3): 537-539.

[7] 俞建, 于明坚, 金孝锋, 等. 浙江省七子花资源现状及保护建议[J]. 浙江大学学报(理学版), 2003, 30(3): 314-326.

[8] 金则新, 李钧敏. 七子花总黄酮含量及成分分析[J]. 浙江林学院学报, 2003, 20(4): 357-359.

[9] 何维明, 钟章成. 绞股蓝种群次生代谢产物的动态及其生态学意义[J]. 云南植物研究, 1998, 20(4): 434-438.

[10] 彭晓春, 王辉宪, 刘文萍, 等. 湘西杜鹃花根黄酮类化合物含量测定[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2000, 21(1): 11-12.

[11] 王璐, 王晓, 施大文. 中药锁阳鞣质含量的测定[J]. 上海医科大学学报, 1996, 23(2): 150.

[12] 李惠芬, 卢继新, 张晓梅, 等. 五种不同产地天仙子总生物碱的含量分析[J]. 中草药, 1999, 30(8): 5825-83.

[13] 丁之恩, 严平. 西洋参茎叶总皂甙的提取分离研究[J]. 经济林研究, 2000, 18(1): 58-59.

[14] 邢俊波, 李萍, 温德良. 不同物候期金银花中总绿原酸的积累动态研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(7): 456-459.

[15] 苏建荣, 罗香, 杨文云, 等. 元宝枫叶内黄酮、绿原酸含量动态变化研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(4): 496-499.

[16] 王冬梅, 李琰, 王敏茹, 等. 山楂叶总黄酮生长积累动态及提取工艺研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 2083-2087.

[17] 黄璐琦, 郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 277-280.

[18] 张迪清, 何照范. 银杏叶资源[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 17.

[19] 周维仁, 李优琴, 薛飞, 等. 苦参植株中总生物碱的分布及含量测定[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(2): 57-58.

[20] 严秀峰, 王洋, 李一蒙. 植物次生代谢及其与环境的关系[J]. 生态学报, 2007, 27(6): 2554-2562.

[21] WANG W J, LI X Y, ZU Y G. Dynamic feature of flavonoids content in different organs of larch (*Larix Gmelinii*) [J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 89-92.