

杜仲雄花中次生代谢物合成积累的动态变化

董娟娥, 梁宗锁, 张康健, 孙尚华

(西北农林科技大学, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 对杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.) 雄株不同花期雄花中次生代谢产物含量进行分析测定, 并对杜仲雄花次生代谢的生理基础及不同花期次生代谢产物含量差异进行了探讨。研究表明, 雄花在不同花期次生代谢产物含量均有差异。总黄酮含量在花蕾期最高(4.010%), 始花期最低(2.422%), 从盛花期到末花期逐渐上升; 桃叶珊瑚苷和绿原酸含量均在花蕾期最高(分别为2.351%和1.075%), 盛花期最低(分别为1.463%和0.503%), 至末花期含量上升; 京尼平苷酸含量在始花期最低(0.217%), 从盛花期开始逐渐升高, 至末花期高达1.403%; 次生代谢产物总量也以花蕾期为最高(7.420%)。杜仲雄花的花蕾期和盛花期是兼顾质量和产量的最佳采摘期。

关键词: 杜仲; 雄花; 总黄酮; 桃叶珊瑚苷; 绿原酸; 京尼平苷酸

中图分类号: Q946.8 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2005)04-0007-04

Dynamic changes of secondary metabolites in *Eucommia ulmoides* male flower DONG Juan-e, LIANG Zong-suo, ZHANG Kang-jian, SUN Shang-hua (Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(4): 7-10

Abstract: The contents of secondary metabolites in male flower of *Eucommia ulmoides* Oliv. at different blossoming stages were determined and analyzed. The physiological basis and content difference of the second metabolite in male flower were discussed. The results showed that differences existed in the contents of all second metabolites measured in male flower at different blossoming stages. The content of flavonoids was the highest at the bud stage (4.010%) and the lowest at the initial blossoming stage (2.422%), with a tendency of gradual increment from the fully blossoming stage to the final one; the contents of aucubin and chlorogenic acid were the highest at the bud stage (2.351% and 1.075% respectively), and the lowest at the fully blossoming stage (1.463% and 0.503% respectively), and increased at the final one; the content of geniposidic acid was the lowest at the initial blossoming stage (0.217%), and gradually increased from the fully blossoming stage and reached to 1.403% at the final one; the content of total second metabolites at the bud stage was the highest (7.420%). The results indicated that considering both quality and quantity of male flower, the feasible picking periods were at the bud stage or the fully blossoming stage.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; male flower; total flavonoids; aucubin; chlorogenic acid; geniposidic acid

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)为中国特有的珍贵木本药用植物,是中国珍稀濒危二类保护植物,传统以皮入药。近年来对杜仲叶的研究发现,叶和皮含有相类似的有效成分,可以以叶代皮,并已开发为药品及保健食品^[1]。

目前,花饮料已成为时尚,以植物花为原材料加工的饮料很多。杜仲是雌雄异株植物,杜仲雄花产量很高。研究表明,杜仲雄花中的黄酮类化合物含量高于皮和叶,而且雄花中同样富含绿原酸、桃叶珊瑚苷等活性物质,即富含与叶、皮相类似的有效成分^[1]。因此,杜仲雄花是亟待开发的新资源。

据有关资料统计,杜仲分布在中国20多个省市、自治区,杜仲林面积达 $36 \times 10^4 \text{ hm}^2$,雄株约占1/2,资源蕴藏量十分丰富。对杜仲皮和叶已有深度的开发利用,但对其雄花资源利用的研究尚未开展。目前,有关杜仲中次生代谢物的时空差异研究已有许多报道^[2,3],而对杜仲雄花的次生代谢产物

收稿日期: 2005-01-20

基金来源: 西北农林科技大学青年科研基金项目和略阳嘉木杜仲有限公司中药现代化项目

作者简介: 董娟娥(1968-),女,陕西蒲城人,博士研究生,副教授,主要从事天然产物提取和中药现代化理论与技术方面的教学与研究工作。

的研究很少,雄花中次生代谢产物合成积累动态也未见报道。为此,分析测定了树龄相同并生长在同一环境下的不同花期杜仲雄花次生代谢产物的含量,以期合理利用杜仲雄花资源提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集及处理 在西北农林科技大学林学院杜仲无性系测定林内,选择同一立地条件下生长的、同一株龄的(17 a)优良雄株,即生长健壮、无病虫害的3个无性系(分别为无性系 L0、L1 和 L9),每个无性系均选择3株雄株,挂牌标号。

2004年2月25日开始观察,从花蕾期(3月6日)开始到末花期(4月2日)止,在花蕾期、始花期、盛花期和末花期分别在树冠中部的东、西、南、北4个方向采摘雄花各约100g,按株分别混匀,立即杀青,取出阴干,粉碎后,分别装袋封存,备用。

各花期的判断标准如下:

花蕾期:前一年形成的花芽于第二年春季露出花序蕾(第1个花序上的单花大部分现蕾)时,为花蕾期。

始花期:当观测的植株有1/2以上有1朵或几朵花的花瓣开始完全开放,即为始花期。

盛花期:当观测的植株有1/2以上的花蕾都展开,花蕊散出花粉1/2以上者为盛花期。

末花期:当观测的植株上大部分雄花已凋谢,仅留有少数花,为末花期。

1.1.2 主要仪器及试剂 日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪;UV-2000 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);C9860-010 型超声波清洗器(无锡超声电子设备厂);桃叶珊瑚苷和京尼平苷酸(光谱纯,由出山武教授赠送);绿原酸、芦丁购自中国药品生物制品鉴定所。

1.2 实验方法

1.2.1 桃叶珊瑚苷、总黄酮、绿原酸和京尼平苷酸的提取 采用溶剂提取法^[4]。

1.2.2 桃叶珊瑚苷含量测定 采用改进的对二甲氨基苯甲醛法^[5]。

1.2.3 总黄酮含量测定 采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法^[6]。

1.2.4 绿原酸和京尼平苷酸含量的测定 采用反相高效液相色谱法(HPLC)。色谱条件:色谱柱 Nova-pak C₁₈(4 μ m,4.6 mm \times 150 mm);流动相为 V(甲醇):V(水):V(冰乙酸)=24:75:1,流速 1 mL \cdot min⁻¹;检测波长 240 nm。

2 结果和分析

2.1 杜仲雄花中总黄酮合成积累动态

杜仲雄花不同花期总黄酮含量变化见图1。图1显示,不同花期杜仲雄花总黄酮的积累动态个体间趋于一致,最高含量均出现于花蕾期(4.010%),最低含量出现于始花期(2.422%),从始花期到末花期呈上升趋势。研究证实,杜仲叶片 PAL 酶活性与绿原酸、总黄酮的含量存在显著正相关关系,即 PAL 酶活性越高,总黄酮和绿原酸的含量就越高^[7]。PAL 酶是植物次生代谢中莽草酸途径的起始酶,主要催化由苯丙素代谢产生各种酚类物质的第一步,是酚类物质代谢的关键酶。可以推测,杜仲雄花中的 PAL 酶活性与黄酮类化合物和绿原酸的含量也存在一定的相关关系。另一方面,花蕾期是杜仲雄花细胞分化生长的旺盛时期,黄酮类化合物代谢旺盛,使总黄酮含量较高。

2.2 杜仲雄花中桃叶珊瑚苷合成积累动态

杜仲雄花不同花期桃叶珊瑚苷含量变化见图2。结果表明,不同个体的雄花在不同花期桃叶珊瑚苷的合成积累均表现为花蕾期最高(2.351%);始花期次之;盛花期含量最低,仅为1.463%。

杜仲雄花单生于小枝基部,无花被,先叶开放。在花芽分化为花蕾时,叶芽未萌动,整株营养集中用于花芽的分化,由于该时期植株所供给的营养充分,转换为次生代谢物的底物充足,次生代谢物的生物合成作用也增强,使桃叶珊瑚苷的含量在花蕾期较高。从盛花期到末花期时,叶芽开始萌动,营养渐趋分散,底物逐渐缺乏,致使次生代谢物含量较低。

2.3 杜仲雄花中绿原酸合成积累动态

杜仲雄花不同花期绿原酸含量变化见图3。图3显示,杜仲不同个体雄花的绿原酸含量在花蕾期最高(1.075%),始花期次之,盛花期为最低(0.503%)。这与金银花中绿原酸含量在花蕾期最高的研究结论相一致^[8]。

2.4 杜仲雄花中京尼平苷酸的积累动态

杜仲雄花不同花期京尼平苷酸含量变化见图4。由图4可见,杜仲雄花不同花期京尼平苷酸的含量在始花期最低,仅为0.217%;从盛花期开始含量迅速升高,持续至末花期,京尼平苷酸的含量最高,达到1.403%。

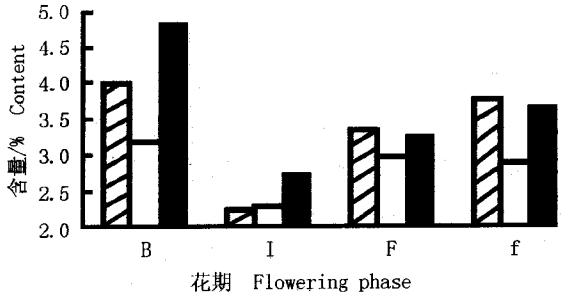


图1 杜仲雄花不同花期总黄酮含量的动态变化

B: 花蕾期 Bud stage; I: 始花期 Initial blossoming stage; F: 盛花期 Fully blossoming stage; f: 末花期 Final blossoming stage

Fig. 1 Dynamic change of flavonoid content in male flower of *Eucommia ulmoides* Oliv. at different stages

由以上结果可以看出,杜仲雄花中不同次生代谢物合成积累的高峰期和低谷期均不一致。总黄酮、桃叶珊瑚苷和绿原酸的含量在花蕾期最高,而京尼平苷酸的含量在花蕾期最低,末花期最高。由于各次生代谢物的合成代谢途径、合成酶等的差异导致了各种成分合成积累量的差异。

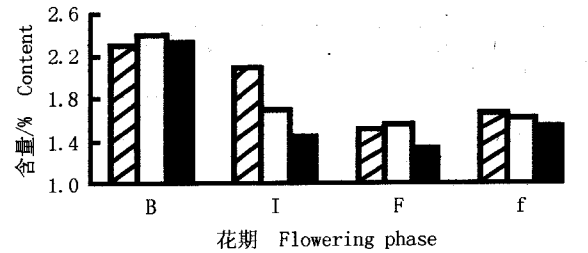


图2 杜仲雄花不同花期桃叶珊瑚苷含量的动态变化

B: 花蕾期 Bud stage; I: 始花期 Initial blossoming stage; F: 盛花期 Fully blossoming stage; f: 末花期 Final blossoming stage

Fig. 2 Dynamic change of aucubin content in male flower of *Eucommia ulmoides* Oliv. at different stages

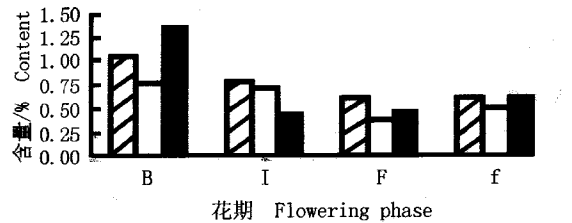


图3 杜仲雄花不同花期绿原酸含量的动态变化

B: 花蕾期 Bud stage; I: 始花期 Initial blossoming stage; F: 盛花期 Fully blossoming stage; f: 末花期 Final blossoming stage

Fig. 3 Dynamic change of chlorogenic acid content in male flower of *Eucommia ulmoides* Oliv. at different stages

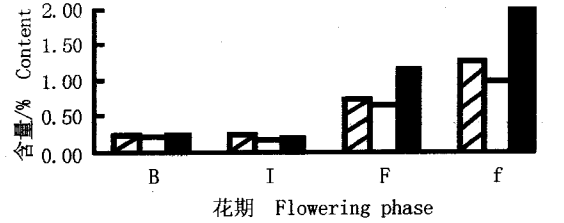


图4 杜仲雄花不同花期京尼平苷含量的动态变化

B: 花蕾期 Bud stage; I: 始花期 Initial blossoming stage; F: 盛花期 Fully blossoming stage; f: 末花期 Final blossoming stage

Fig. 4 Dynamic change of geniposidic acid content in male flower of *Eucommia ulmoides* Oliv. at different stages

2.5 杜仲雄花中次生代谢产物总量的动态分析

杜仲雄花中次生代谢产物总量及其方差分析和多重比较结果见表1、表2和表3。

由表1可看出,不同花期各次生代谢产物总量(即绿原酸、总黄酮、桃叶珊瑚苷和京尼平苷酸含量之和)在花蕾期出现最高值(7.420%),始花期为最低(4.940%),从盛花期到末花期逐渐升高。

不同无性系间(L0、L1和L9)杜仲雄花中次生代谢产物含量差异不显著;总黄酮、京尼平苷酸的含量在不同花期期间差异显著;而绿原酸和桃叶珊瑚苷含量差异不显著(表2)。

表1 杜仲雄花中次生代谢产物总含量分析¹⁾
Table 1 Analysis on the content of the total second metabolites in male flower of *Eucommia ulmoides* Oliv.¹⁾

无性系 Clone	不同花期的含量/% Content in different stages				\bar{X}
	B	I	F	f	
L0	7.613	5.940	6.178	7.252	6.746
L1	6.580	4.863	5.531	5.929	5.726
L9	8.785	4.650	6.575	7.796	6.951
\bar{X}	7.420	4.940	6.095	6.992	

¹⁾ 次生代谢产物总量为不同花期雄花中总黄酮、桃叶珊瑚苷、绿原酸和京尼平苷酸含量之和 The total second metabolite content is the sum of contents of flavonoids, aucubin, chlorogenic acid and geniposidic acid; \bar{X} : 平均含量(%) Average of content; B: 花蕾期 Bud stage; I: 始花期 Initial blossoming stage; F: 盛花期 Fully blossoming stage; f: 末花期 Final blossoming stage.

多重比较结果显示,花蕾期和始花期次生代谢产物总量有显著差异($D = 2.5014^{**}$),盛花期次生代谢产物总量与花蕾期和末花期无显著差异(表3)。在采样的过程中观察发现,盛花期的产量远远大于其他花期。综合产量和次生代谢产物含量两方面因素,花蕾期和盛花期是杜仲雄花的最佳采收期。

表2 不同无性系间及不同花期间杜仲雄花中次生代谢产物含量的方差分析¹⁾

Table 2 Variance analysis on the contents of second metabolites in male flower of *Eucommia ulmoides* Oliv. among different clones and blossoming stages¹⁾

变异来源 Variation source	F 值 F value			
	总黄酮 Total flavonoid	桃叶珊瑚苷 Aucubin	京尼平苷酸 Geniposidic acid	绿原酸 Chlorogenic acid
无性系间	4.860 0	0.709 7	1.790 4	1.235 5
花期间	9.981 5 *	4.569 5	26.284 3 *	3.854 5

¹⁾ 无性系间: Among clones $F_{0.05(2,6)} = 5.14$; 花期间: Among blossoming stages $F_{0.05(3,6)} = 4.76$; *: $P < 0.05$

表3 杜仲雄花中次生代谢产物总含量的多重比较¹⁾

Table 3 Multiple comparison among the contents of total second metabolites in male flower of *Eucommia ulmoides* Oliv.¹⁾

	\bar{X}_B	\bar{X}_f	\bar{X}_F	\bar{X}_I
\bar{X}_I	2.501 4 * * *	1.834 8	0.936 9	
\bar{X}_F	1.564 5	0.897 9		
\bar{X}_f	0.666 6			

¹⁾ B: 花蕾期 Bud stage; I: 始花期 Initial blossoming stage; F: 盛花期 Fully blossoming stage; f: 末花期 Final blossoming stage; $D = 1.982 5$; $Q_{\alpha(3,8)} = 4.04$; * * *: $\alpha = 0.05$

3 结论和讨论

近年来的研究发现,所有旺盛生长的细胞内都存在着次生代谢物的不断合成和转化^[9-11],杜仲雄花芽细胞的分化生长也不例外。但是,杜仲雄花次生代谢物的合成积累与杜仲叶不同,杜仲叶次生代谢物的合成积累受杜仲树体生长速率所影响^[7],而杜仲雄花是先叶开放,此时叶片还未长出,不能进行光合作用,作为年生长周期中的初生代谢还未开始,也就是说杜仲雄花中的次生代谢物合成积累是在树体旺盛的初生代谢来临前就开始了,而花芽的萌动是靠树体先年贮存的营养启动的,可以推测,杜仲雄花中的次生代谢也是靠树体内贮藏的初生代谢底物在关键酶活化后的作用下而启动的,因此,花蕾期次生代谢物合成旺盛。随着叶芽的萌动,营养分散,初生代谢底物不足,次生代谢的生物合成随之下降,因而

从始花期开始,次生代谢产物的含量有所下降。

杜仲雄花次生代谢产物的合成积累与其花芽分化进程存在着一定的相关关系。总黄酮含量在花蕾期为最高,始花期为最低,然后呈上升趋势,从盛花期到末花期逐渐趋于稳定;桃叶珊瑚苷和绿原酸含量的变化趋势相似,均在花蕾期出现最高值,从始花期到末花期差异不明显,至末花期含量略有回升;而京尼平苷酸含量则从花蕾期到末花期一直呈上升趋势。当冬季来临时,树体生理活动减弱,呼吸代谢减慢,生长抑制剂等激素增多,次生代谢物可能因内源和外源因素的调节,使代谢物更多处于代谢上不活泼的“库”中,没有发生转移,却在叶、芽中慢慢积累起来^[9,10]。这就是说,翌年花芽萌动、芽细胞强烈分化前,芽中就积存有(没有发生转移)次生代谢物。由此可推测,花蕾期次生代谢产物合成积累出现的高峰期可能与先年的积累有一定的关系。

杜仲雄花产量高,黄酮等生物活性成分丰富,是亟待开发利用的新资源。开发利用雄花(若以雄花作为花饮料)时,则花蕾期(次生代谢物含量最高)和盛花期(产量最高、次生代谢物含量较高)为兼顾质量和产量的最佳采摘期。

参考文献:

- [1] 张康健,董娟娥,马柏林,等. 杜仲次生代谢部位差异性的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(6): 12-16.
- [2] 张康健,马希汉,马梅,等. 杜仲叶次生代谢物生长积累动态的研究[J]. 林业科学, 1999, 35(2): 15-20.
- [3] 汤诗杰,贺善安,盛宁,等. 不同地理种源杜仲叶片中丁香脂素二糖甙和京尼平甙酸含量的分析[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(2): 58-59.
- [4] 董娟娥,马柏林,仝小林,等. 提高杜仲叶中主要活性物质提取率的研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(1): 64-67.
- [5] 董娟娥,马柏林,贾二红. 杜仲叶中桃叶珊瑚苷测定方法的研究[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(1): 56-58.
- [6] 冯煦,李鸿英. 北柴胡与烟台柴胡黄酮成分比较研究[J]. 中草药, 1990, 21(8): 5-6.
- [7] 张康健,王蓝,马柏林,等. 中国杜仲次生代谢物[M]. 北京:科学出版社, 2002. 152-163.
- [8] 赵玉俐,李鹏,成玉怀. 新疆地产金银花中绿原酸含量测定[J]. 石河子医学院学报, 1995, 17(1): 15-16.
- [9] 梁峥,郑光植. 高等植物的次生代谢[J]. 植物生理学通讯, 1981(1): 14-21.
- [10] 哈本J.B. 黄酮类化合物[M]. 戴伦凯,谢玉如,等译. 北京:科学出版社, 1983. 1-50.
- [11] 张康健,董娟娥. 药用植物次生代谢[M]. 西安:西北大学出版社, 2001. 1-3.

(责任编辑:惠红)