

杜仲雄花生长发育动态及活性成分量变化

杜庆鑫^{1,2}, 魏艳秀^{1,2}, 李 钦³, 刘攀峰^{1,2}, 杜红岩^{1,2*}

1. 中国林业科学研究院 经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003

2. 国家林业局 杜仲工程技术研究中心, 河南 郑州 450003

3. 河南大学药学院, 河南 开封 475004

摘 要: 目的 建立杜仲 *Eucommia ulmoides* 雄花 6 种活性成分的测定方法, 分析杜仲雄花生长发育动态及活性成分的变化规律。方法 采用超声法进行提取, 采用 AlCl_3 比色法测定总黄酮, 采用 HPLC 法测定其他 6 种成分, 色谱柱为 Thermo hypersil gold 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.5%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 检测波长: 206 nm (0~15 min)、236 nm (15~55 min)、255 nm (55~100 min); 体积流量 1.0 mL/min。结果 花径、花高、鲜质量、干质量、雄蕊长度和雄蕊数均在盛花期达到最大值; 总黄酮、绿原酸以及活性成分总量均以花蕾期最高, 始花期最低; 桃叶珊瑚苷量总体呈下降趋势; 京尼平苷酸量花蕾期最低, 至盛花期达到最高值, 末花期有所下降; 京尼平苷、异槲皮苷和紫云英苷量均以盛花期最高, 始花期最低。结论 花期对杜仲雄花形态、产量、活性成分量及质量均有很大影响, 为杜仲雄花质量控制及相关产品开发提供了重要依据。

关键词: 杜仲雄花; 生长发育; 桃叶珊瑚苷; 京尼平苷酸; 京尼平苷; 绿原酸; 异槲皮苷; 紫云英苷; HPLC; 动态变化

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)13-2746-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.13.025

Dynamic changes of development and active ingredients content of male flower of *Eucommia ulmoides*

DU Qing-xin^{1,2}, WEI Yan-xiu^{1,2}, LI Qin³, LIU Pan-feng^{1,2}, DU Hong-yan^{1,2}

1. Non-timber Forest Research and Development Center of Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, China

2. The Eucommia Engineering Research Center of National Forestry Administration, Zhengzhou 450003, China

3. Pharmaceutical College, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of six active ingredients in *Eucommia ulmoides* male flowers, and analyze the dynamic changes of male flower development and active ingredients content of *E. ulmoides*. **Methods** The active ingredients were extracted by the ultrasound-assisted process, the content of total flavonoids was determined by AlCl_3 colorimetric method and other six ingredients were determined by HPLC, the samples were separated on a Thermal hypersil gold column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution of methanol-0.5% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL/min, the UV wavelength was set at 206 nm (0—15 min), 236 nm (15—55 min), and 255 nm (55—100 min). **Results** Flower diameter, flower height, fresh weight, dry weight, stamen length and stamen number all reached the maximum at full bloom stage; The contents of total flavonoids, chlorogenic acid and total active ingredients were the highest at the bud stage and the lowest at the initial flowering stage; The content of aucubin showed a tendency of gradual decrease; The content of geniposidic acid was the lowest at the bud stage and reached the highest at full bloom stage, and decreased at the end of flowering phase; The content of geniposide, isoquercitrin and astragaline were the highest at full bloom stage and the lowest at the initial flowering stage. **Conclusion** Flowering stage had a great impact on morphology, yield, active ingredients content and quality of *E. ulmoides* male flowers, which could provide important information for quality control and product development of *E. ulmoides* male flowers.

Key words: male flowers of *Eucommia ulmoides*; development; aucubin; geniposidic acid; geniposide; chlorogenic acid; isoquercitrin; astragaline; HPLC; dynamic changes

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 为杜仲科 树种和药用植物, 广泛分布于亚热带至温带的 27 (Eucommiaceae) 杜仲属植物, 是我国特有的经济 个省 (市、区) [1-2]。杜仲雌雄异株, 雄株占 40%~

收稿日期: 2016-11-23

基金项目: 国家“十二五”农村领域科技计划课题研究任务合约 (2012BAD21B0502)

作者简介: 杜庆鑫 (1991—), 男, 在读硕士, 研究方向为经济林育种栽培。Tel: 15238396809 E-mail: duqingxin20102325@163.com

*通信作者 杜红岩 (1963—), 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向为杜仲育种栽培与综合利用。Tel: (0371)65997259 E-mail: dhy515@126.com

60%，雄花产量高，易于采集^[3]。已有研究表明，杜仲雄花富含与杜仲皮、叶相类似的活性成分，主要有桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、黄酮类化合物（如异槲皮苷和紫云英苷等），具有抗菌、消炎、镇痛、抗病毒、抗氧化、降血压、降血糖及保护心脑血管等功效^[4-6]。

杜仲雄花资源开发利用具有广阔的市场前景，以杜仲雄花为原料开发出的杜仲雄花茶、杜仲雄花酒、杜仲雄花功能饮料等产品已投入市场，具有良好的医疗保健功能，备受消费者青睐^[7]。目前，有关杜仲雄花中活性成分的研究报道较多^[8-9]，而对于与雄花产量、活性成分量等密切相关的雄花生长发育规律等缺乏系统的研究。为此，本实验对杜仲雄花生长发育动态、活性成分量变化等进行系统研究，以揭示杜仲雄花生长发育及活性成分量积累规律，为确定杜仲雄花适宜采收期、合理利用杜仲雄花资源及相关产品质量控制提供依据。

1 仪器与材料

HJJH 游标卡尺（西南精密量具有限公司）；JA-3003 千分之一天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；电子计重秤（江苏凯丰集团有限公司）；Cary 300 紫外-可见分光光度计（Agilent）；Shimadzu LC-20A 型高效液相色谱仪（日本岛津）；SPD-20A 紫外检测器（日本岛津）；HG-91013SA 型电热恒温鼓风干燥箱（上海三发科学仪器有限公司）；AG135 型十万分之一电子天平（METTLER TOLEDO）；HT-300BQ 型数控超声波清洗器（济宁恒通超声电子设备有限公司）。桃叶珊瑚苷（批号 K02N7B23963、质量分数 98.8%），京尼平苷酸（批号 Y20S7H21459、质量分数 98.3%），京尼平苷（批号 Y08N7Y37、质量分数 98.5%），绿原酸（批号 R29J6F1、质量分数 99.4%），异槲皮苷（批号 P29S6F3858、质量分数 99.4%），紫云英苷（批号 Y27J7H9634、质量分数 99.0%），芦丁（批号 L27J7H9536、质量分数 99.0%）对照品购自上海源叶生物科技有限公司；甲醇为色谱纯，其他试剂均为国产分析纯。

杜仲雄花采自中国林业科学研究院原阳试验基地杜仲基因库，选择长势良好的 3 个杜仲雄株无性系（编号 10601x、10594x 和 10497x），每个无性系选择典型样株 4 株，2016 年 3 月 16 日~3 月 30 日隔 1 d 采集 1 次，共采样 8 次，每次选择树冠中部的东、西、南、北 4 个方向采摘雄花各约 10 簇，低

温冷藏带回实验室，保存备用。用于活性成分测定的样品置于电热恒温鼓风干燥箱 60 ℃烘干，粉碎过 60 目筛。经中国林业科学研究院经济林研究开发中心杜红岩研究员鉴定为杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的雄花。

2 方法与结果

2.1 形态性状的测定

随机选取 10 簇雄花，花径、花高、雄蕊长度用游标卡尺测定，精确到 0.01 mm；鲜质量、干质量（均为单花质量），用电子天平称量，精确到 0.001 g，雄蕊数直接计数。

2.2 AlCl₃ 比色法测定总黄酮^[10]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 20.0 mg 芦丁对照品，105 ℃干燥至恒定质量，用 60%乙醇溶解，定容至 200 mL，配成含 100 μg/mL 芦丁的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取杜仲雄花粉末 0.100 g，加入 60%乙醇，料液比 1:30，超声 30 min，离心后取上清液，以 60%乙醇定容至 10 mL，得杜仲雄花样品提取液。

2.2.3 标准曲线绘制及线性关系考察 准确吸取芦丁对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL，移入 10 mL 刻度比色管中，依次加入 pH 3.6 的醋酸-醋酸钠缓冲液 3 mL，0.1 mol/L AlCl₃ 溶液 3 mL，用 60%乙醇定容至 10 mL，快速摇匀，室温放置 30 min，在 400 nm 处测定吸光度，以芦丁质量浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（Y），绘制标准曲线，得回归方程为 $Y=0.0206X-0.014$ ($R^2=0.9997$)，表明对照品在 5.0~30.0 μg/mL 内线性关系良好。

2.3 指标性成分的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo hypersil gold (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，以甲醇（A）-0.5%磷酸水溶液（B）为流动相，梯度洗脱，0~30 min，5%~15% A；30~70 min，15%~30% A；70~100 min，30%~54% A；检测波长 206 nm (0~15 min)、236 nm (15~55 min)、255 nm (55~100 min)；体积流量 1.0 mL/min；进样量 8 μL；柱温 30 ℃。对照品和样品的色谱图见图 1。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取桃叶珊瑚苷对照品 2.80 mg、京尼平苷酸对照品 1.40 mg、绿原酸对照品 2.80 mg、京尼平苷对照品 1.60 mg、异槲皮苷对照品 0.60 mg、紫云英苷对照品 0.60 mg，置同一 5 mL 的量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，即得混合对照品溶液。

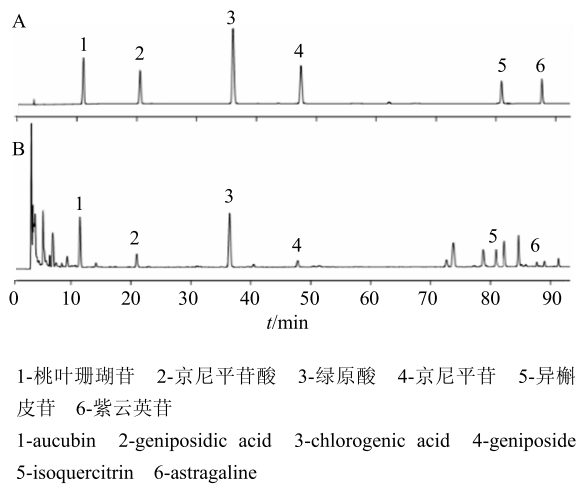


图 1 混合对照品 (A) 和杜仲雄花样品 (B) HPLC 图
 Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and male flower of *E. ulmoides* sample (B)

2.3.3 供试品溶液的制备 称取杜雄花粉 0.100 g, 加入 50% 的甲醇溶液 2.5 mL, 称定质量, 超声 40 min, 放至室温, 称定质量, 用 50% 的甲醇补足减失质量后摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3.4 标准曲线的绘制及线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μL 进样, 测定其峰面积。分别以进样量为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到各对照品回归方程 (表 1)。

表 1 回归方程及线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges

对照品	回归方程	R^2	线性范围/μg
桃叶珊瑚苷	$Y=6.0 \times 10^5 X + 11\ 980$	0.999 9	0.56~5.60
京尼平苷酸	$Y=3.8 \times 10^5 X + 11\ 553$	0.999 9	0.28~2.80
绿原酸	$Y=1.0 \times 10^6 X + 39\ 526$	0.999 9	0.56~5.60
京尼平苷	$Y=5.3 \times 10^5 X + 21\ 454$	0.999 9	0.32~3.20
异槲皮苷	$Y=2.8 \times 10^5 X + 10\ 358$	0.999 9	0.12~1.20
紫云英苷	$Y=2.4 \times 10^5 X + 8\ 860.3$	0.999 9	0.12~1.20

2.3.5 精密度试验 取对照品溶液按“2.3.1”项下色谱条件进行分析, 连续进样 5 次, 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、异槲皮苷、紫云英苷峰面积 RSD 分别为 1.19%、1.08%、1.22%、1.36%、1.15%、1.30%, 表明精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取供试品溶液于 0、4、8、12、16、20 h 进样, 按“2.3.1”项下色谱条件进行分析, 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、异槲皮苷、紫云英苷峰面积 RSD 分别为 1.01%、0.95%、

0.89%、1.10%、10.1%、1.07%, 表明供试样品溶液稳定性较好。

2.3.7 重复性试验 取 6 份同一批次杜仲雄花样品, 各 0.100 g, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.3.1”项下色谱条件进行分析, 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、异槲皮苷、紫云英苷质量分数分别为 1.52%、0.74%、1.45%、0.29%、0.27%、0.06%, RSD 分别为 1.28%、0.88%、0.82%、1.01%、1.17%、1.31%, 表明该方法重复性较好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取杜仲雄花粉 5 份, 每份 0.100 g, 分别加入相应的对照品适量, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.3.1”项下色谱条件进行分析, 计算桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、异槲皮苷、紫云英苷的回收率分别为 98.02% (RSD=1.15%)、98.38% (RSD=1.04%)、97.82% (RSD=1.17%)、97.9% (RSD=1.09%)、97.36% (RSD=1.00%)、97.46% (RSD=1.20%)。

2.4 杜仲雄花生长发育动态分析

不同采集日期 3 个杜仲无性系雄花生长发育动态见图 2。根据杜仲雄花花期^[11]和采集日期, 将 3 月 16 日和 3 月 18 日归为花蕾期; 3 月 20 日归为始花期; 3 月 22 日、3 月 24 日、3 月 26 日归为盛花期; 3 月 28 日和 3 月 30 日归为末花期。杜仲雄花花径 (图 2-A)、花高 (图 2-B)、鲜质量 (图 2-C)、干质量 (图 2-D)、雄蕊长度 (图 2-E) 和雄蕊数 (图 2-F) 变化趋势基本一致, 从花蕾期到盛花期逐渐增大, 至末花期减小, 但是增大或减小的幅度略有不同, 其中, 花径、花高和雄蕊长度从花蕾期到盛花期增加缓慢, 盛花期最大, 分别为 17.84、21.41、10.50 mm, 由盛花期到末花期呈现缓慢减小的趋势。鲜质量、干质量和雄蕊数从花蕾期到盛花期呈现快速增大的趋势, 至盛花期最大, 分别为 0.71 g、0.15 g 和 140 个, 由盛花期到末花期急剧下降, 且末花期鲜质量、干质量最小, 雄蕊数目最少, 分别仅为 0.39 g、0.06 g 和 51 个。

2.5 杜仲雄花活性成分量动态变化分析

不同采集日期 3 个杜仲无性系雄花活性成分量动态变化见图 3。杜仲雄花总黄酮 (图 3-A)、绿原酸 (图 3-D) 及活性成分总量 (图 3-H) 均以花蕾期最高, 质量分数均值分别为 32.82、13.49、66.54

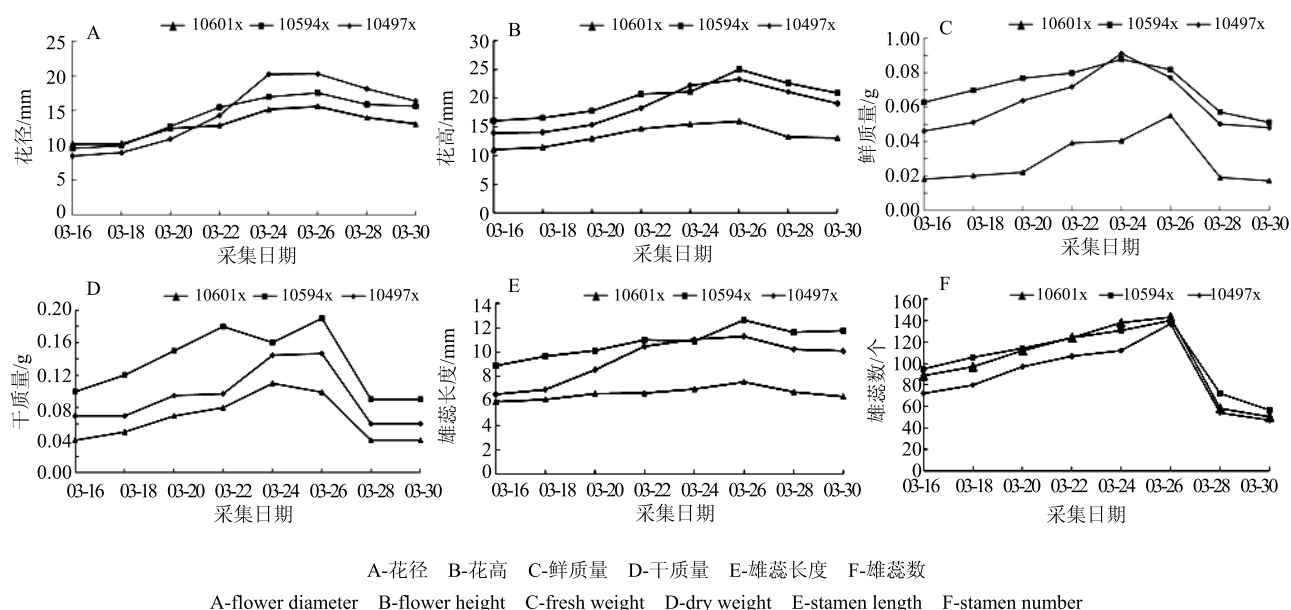


图 2 不同采集日期杜仲雄花生长发育动态变化

Fig. 2 Dynamic changes of male flower development of *E. ulmoides* at different picking dates

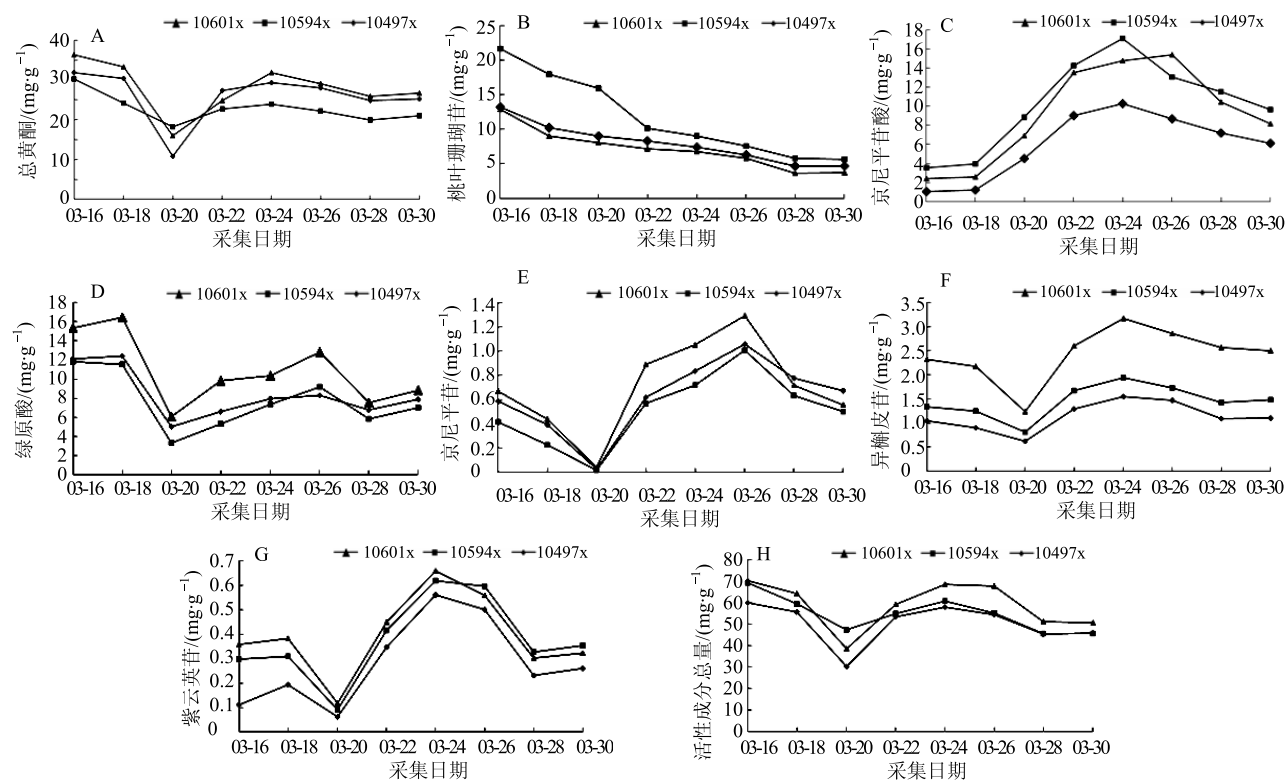


图 3 不同采集日期杜仲雄花活性成分动态变化

Fig. 3 Dynamic changes of active ingredients content of *E. ulmoides* male flowers at different picking dates

mg/g, 到始花期下降至最低, 始花期到盛花期逐渐升高, 末花期有所下降。桃叶珊瑚苷质量分数(图 3-B)花蕾期最高, 平均为 15.90 mg/g, 从花蕾期到末花期总体呈下降趋势, 并趋于稳定。京尼平苷酸量(图 3-C)花蕾期最低, 从花蕾期开始逐渐上升, 至盛花期达到最高, 平均质量分数为 14.05 mg/g, 盛花期到末花期略有下降。京尼平苷(图 3-E)、异槲皮苷(图 3-F)和紫云英苷量(图 3-G)从花蕾期开始下降, 始花期最低, 随后逐渐增加, 盛花期达到最高, 平均质量分数分别为 1.12、2.22、0.61 mg/g, 盛花期到末花期有所下降。

3 讨论

杜仲雄花中含有丰富的活性成分, 多个成分的测定可以更好地控制中药的质量, 且中药多成分质量控制已成为发展的趋势^[12], 采用单一波长进行检测, 某些成分可能达不到其最大吸收峰。本实验在前人研究的基础上, 采用变波长 HPLC 法同时测定杜仲雄花中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、异槲皮苷及紫云英苷等 6 种活性成分, 将桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、异槲皮苷、紫云英苷对照品溶液置于 190~400 nm 进行全波长扫描, 桃叶珊瑚苷最大吸收波长为 206 nm, 京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷最大吸收波长为 236 nm, 异槲皮苷和紫云英苷最大吸收波长为 255 nm。采用该方法各成分分离效果较好, 方便快捷, 可为杜仲雄花质量控制提供一定的参考。

本实验通过对不同采集时期杜仲雄花主要形态性状及活性成分的测定结果表明, 花径、花高、鲜质量、干质量、雄蕊长度和雄蕊数均在盛花期达到其生长发育的最大值。总黄酮、绿原酸以及活性成分总量均以花蕾期最高, 其次是盛花期, 始花期量最低; 桃叶珊瑚苷量也以花蕾期最高, 但总体呈下降趋势, 至末花期最低; 京尼平苷酸量花蕾期最低, 至盛花期达到最高值, 末花期有所下降; 京尼平苷、异槲皮苷和紫云英苷量变化趋势相近, 从花蕾期开始逐渐下降, 至始花期达到最低值, 始花期到盛花期逐渐上升并达到最高值, 盛花期到末花期略有下降。杜仲雄花中总黄酮、桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、异槲皮苷及紫云英苷等活性成分是次生代谢的产物, 在植物生长发育过程中, 植物会通过减少生长的机会来促进次生代谢产物的合成积累,

即植物生长缓慢时期, 代谢减弱, 底物充足促使次生代谢产物迅速积累^[13-14]。冬季杜仲花芽进入休眠期, 次生代谢产物会在花芽中积累, 由于杜仲雄花先叶开放, 第二年春季, 花芽萌动时次生代谢产物还没有发生转移, 因此花蕾期次生代谢产物量较高。随后叶芽萌动, 需要大量营养物质, 导致次生代谢产物合成降低, 始花期次生代谢产物量大幅下降, 随着叶片展开, 光合作用增强, 初生代谢产物迅速积累, 促进了次生代谢产物合成增加, 因此在盛花期杜仲雄花次生代谢产物量出现了另一个高峰期。

在杜仲雄花相关产品开发过程中, 既要考虑到主要有效成分的量, 又要考虑到雄花的形态及产量。花期对杜仲雄花形态、产量、活性成分量及质量均有很大影响, 虽然花蕾期主要有效成分量最高, 但是这一时期杜仲雄花产量较低, 雄蕊较小, 在加工雄花茶时, 会影响到产量和外观; 而盛花期杜仲雄花主要有效成分量也很高, 且花量大, 主要形态形状均达到其生长发育的最大值。综合杜仲雄花形态、产量、活性成分量和质量, 在杜仲雄花相关产品开发过程中, 盛花期为最佳采收期, 即 3 月 22 日~3 月 26 日。另一方面, 杜仲花粉是十分珍贵的植物花粉资源, 在以杜仲花粉为利用目的时, 在盛花期向末花期转变的过渡时期最好, 即 3 月 27 日~3 月 28 日。由于不同产地杜仲雄花开放时间各异, 因此要根据其生长发育阶段确定最佳采收期, 以更好地开发利用杜仲雄花资源。

参考文献

- [1] 杜红岩, 胡文臻, 俞 锐, 等. 杜仲产业绿皮书 [M]. 北京: 社会科学文献出版社, 2013.
- [2] 杜红岩. 中国杜仲图志 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2014.
- [3] 白喜婷, 朱文学, 罗 磊, 等. 杜仲雄花及花中总黄酮含量的测定 [J]. 食品科技, 2008(4): 186-188.
- [4] 吴 敏, 赵 阳, 马志刚, 等. 果园化栽培模式杜仲雄花、果实和叶片产量的调查分析 [J]. 林业科学研究, 2014, 27(2): 270-276.
- [5] 丁艳霞, 郭洋静, 任莹璐, 等. 杜仲雄花中黄酮类化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 323-327.
- [6] 杨林军, 黄文平, 吴永忠, 等. 杜仲板皮和枝皮中 4 种有效成分差异性比较 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 584-587.
- [7] Dong J E, Ma X H, Zhuo R F, *et al.* Effects of microwave

- drying on the contents of functional constituents of *Eucommia ulmoides* flower tea [J]. *Indus Crops Prod*, 2011, 34(1): 1102-1110.
- [8] 赫锦锦, 张木生, 杜红岩, 等. 分光光度法测定杜仲雄花中总黄酮的含量 [J]. 河南大学学报: 医学版, 2011, 30(1): 11-13.
- [9] 郭洋静, 丁艳霞, 许兰波, 等. HPLC 法同时测定杜仲雄花中 5 种活性成分 [J]. 中成药, 2014, 36(10): 2131-2134.
- [10] 范杰平. 柿叶中有效成分的提取与分离研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [11] 董娟娥, 梁宗锁, 张康健, 等. 杜仲雄花中次生代谢物合成积累的动态变化 [J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(4): 7-10.
- [12] 黄勤挽, 王 瑾, 苏 娟, 等. 双波长 HPLC 法同时测定杜仲雄花中 3 种成分的含量 [J]. 中国药房, 2011, 22(27): 2565-2567.
- [13] Barto E K, Cipollini D. Testing the optional defense theory and the growth-differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Oecologia*, 2005, 146(2): 169-178.
- [14] 杨春霞, 黄丽莉, 朱培林, 等. 杜仲叶中 3 种主要活性成分的动态变化 [J]. 南方林业科学, 2015, 43(1): 8-10.