

## 刺五加叶中次生代谢物在生长季的动态累积研究

全亚倩<sup>1</sup>, 高兴蕾<sup>1</sup>, 唐中华<sup>2</sup>, 周雅欣<sup>1</sup>, 程程<sup>2</sup>, 范桂枝<sup>1\*</sup>

1. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

**摘要:** 目的 明确刺五加 *Acanthopanax senticosus* 叶中次生代谢物在生长季内的动态积累规律, 为不同用途叶片的精准采收提供理论依据。方法 运用比色法和非靶代谢组学技术, 分析刺五加叶中黄酮、多酚和皂苷等代谢物的动态累积特征。结果 基于叶片的形态发育特征将生长季划分为 13 个时期 (L1~L13), 总黄酮、总多酚、总三萜及总皂苷含量呈现 L3 (展叶盛期) 和 L11 (7 月末) 双峰积累模式, 其中 L11 期各组分含量达最大值, 较 L1 期分别提升 8.02、1.68、1.61 和 1.63 倍。基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析显示, 与 L3 期相比, L11 期苯丙烷和类黄酮生物合成通路特异性上调, 光信号分子 (FAD、光黄素) 与防御相关化合物 (芥子碱、槲皮素糖苷) 协同积累, 而核苷酸合成前体显著减少。此外, 《中国药典》质控指标紫丁香苷在 L11 期的相对含量较 L3 期增加 2.51 倍; **结论** 刺五加叶中次生代谢的累积具有显著的发育阶段依赖性, 其中 L11 期是高富集期, 这为刺五加叶片的精准利用提供了代谢组学依据。

**关键词:** 刺五加; 叶; 次生代谢物; 动态积累; 非靶代谢组学; 总黄酮; 总多酚; 总三萜; 总皂苷

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)09-3538-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.09.022

## Dynamic study on accumulation of secondary metabolites in leaves of *Acanthopanax senticosus* during growth season

TONG Yaqian<sup>1</sup>, GAO Xinglei<sup>1</sup>, TANG Zhonghua<sup>2</sup>, ZHOU Yaxin<sup>1</sup>, CHENG Cheng<sup>2</sup>, FAN Guizhi<sup>1</sup>

1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China

2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract: Objective** To clarify the dynamic accumulation pattern of secondary metabolites in the leaves of *Acanthopanax senticosus* during the growth season, providing theoretical support for precision-guided leaf harvesting tailored to different usage purposes. **Methods** Colorimetric method and untargeted metabolomics technology were used to analyze the dynamic accumulation characteristics of metabolites such as flavonoids, polyphenols and saponins in the leaves of *A. senticosus*. **Results** The growth season was divided into 13 stages (L1—L13) based on leaf morphodevelopmental traits. Total flavonoids, polyphenols, triterpenoids, and saponins exhibited bimodal accumulation peaks at L3 (the peak leaf expansion stage) and L11 (the end of July), with maximum contents at L11, reaching 8.02-, 1.68-, 1.61-, and 1.63-fold increases, respectively, compared to L1. KEGG enrichment analysis revealed that, relative to L3, L11 showed specific upregulation of phenylpropanoid and flavonoid biosynthesis pathways, coupled with synergistic accumulation of light signaling molecules (FAD, lumiflavin) and defense-related compounds (sinapine, quercetin glycosides), while nucleotide synthesis precursors significantly decreased. Additionally, the pharmacopoeial quality control indicator syringin increased by 2.51-fold in L11 relative to L3. **Conclusion** The secondary metabolism of *A. senticosus* leaves exhibits significant developmental stage-dependence, among which the L11 stage is a high-enrichment period, this provides metabolomic evidence for the precise utilization of *A. senticosus* leaves.

**Key words:** *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms; leaf; secondary metabolites; dynamic accumulation; untargeted metabolomics; total flavonoids; total polyphenols; total triterpenoids; total saponins

收稿日期: 2025-12-02

基金项目: 黑龙江省种业创新项目 (ZQTYB231700002); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2572023CT11-02)

作者简介: 全亚倩, 硕士研究生, 从事植物细胞工程领域研究。E-mail: 2252113828@qq.com

\*通信作者: 范桂枝, 教授, 从事植物细胞工程领域研究。E-mail: gzfb325@126.com

刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 是五加科的传统药用植物, 主要分布于中国东北、河北、山西等地。在《本草纲目》中, 它被赞誉为“宁得一把五加, 不用金玉满车”; 在黑龙江, 它被列为“龙九味”之首, 享有“寒地龙药”的美誉<sup>[1]</sup>。根据《卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知》(卫法监发〔2002〕51号), 刺五加被列入可用于保健食品的物品名单<sup>[2]</sup>。现代药理学研究证实, 刺五加的根、茎、叶、果实等组织部位均具有显著药用价值, 且不同部位的活性成分组成及药理作用存在显著差异<sup>[3-4]</sup>。刺五加的根和茎富含皂苷类成分, 具有免疫调节和抗疲劳作用<sup>[5]</sup>; 叶片中黄酮类和酚酸类物质尤为突出, 表现出显著的抗氧化和神经保护活性<sup>[6]</sup>; 果实富含多糖和黄酮等活性物质, 具有补中益精和坚筋骨等作用<sup>[7]</sup>。近年来随着研究的深入, 刺五加叶片的药用潜力逐渐凸显, 但其次生代谢物的动态积累规律及资源利用价值尚未得到系统性阐明。

非靶代谢组学通过质谱、核磁共振等高通量技术无偏向性检测生物体内全谱代谢物, 结合统计分析和数据挖掘解析代谢组成与网络, 可捕捉未知及低丰度代谢物, 助力发现新通路、生物标志物<sup>[8-9]</sup>。该方法已在药用植物研究中取得显著成果, 例如杨晓萌等<sup>[10]</sup>成功鉴定怀珍珠菊中 80 种代谢物, 发现 19 种特征性差异成分; 罗朝丹等<sup>[11]</sup>揭示芒果不同成熟阶段萜类代谢的动态变化; 杨秀娟等<sup>[12]</sup>则在当归中系统解析了 1 072 个代谢物的组织特异性分布。这些案例为刺五加次生代谢物的研究提供了理论参考依据。本研究针对刺五加叶片次生代谢物动态积累规律不明的科学问题, 以幼苗叶片为研究对象, 在完整生长周期内根据形态发育特征建立 L1~L13 共 13 个时序梯度。通过整合比色法与非靶向代谢组学技术, 系统分析黄酮、多酚、皂苷等关键次生代谢物的时序变化规律。研究成果将构建刺五加叶片动态代谢数据库, 为刺五加药用资源开发提供科学依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

3 年生刺五加盆栽幼苗用于不同发育期叶片的采样和分析, 自 2022 年 3 月起, 选取生长一致、无虫害、苗高 30 cm 左右的刺五加幼苗, 采集 L1 (芽开放期)、L2 (展叶始期)、L3 (展叶盛期)、L4 (春色叶呈现始期) 和 L5 (春色叶变色期) 5 种不同发育阶段的叶片; 从 2022 年 5 月 15 日~8 月 30 日,

每隔 15 d 采样, L6~L7 分别为 5 月份中旬和下旬采样、L8~L9 分别为 6 月份中旬和下旬采样、L10~L11 分别为 7 月份中旬和下旬采样、L12~L13 分别为 8 月份中旬和下旬采样。中旬为每月的 15 号, 下旬为每月的最后 1 天。5 g/重复, 3 次重复, 取样之后液氮速冻处理, 保存于-80 °C 以备后续实验测定。刺五加叶片在生长季的变化见图 1。

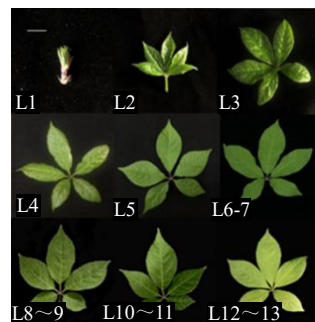


图 1 刺五加叶片在 1 个生长季内的表型变化

Fig. 1 Phenotypic changes in *A. senticosus* leaves during a growing season

### 1.2 试剂及仪器

BSA124S 型电子天平 (德国赛多利斯公司); SPARK 型多功能酶标仪 (奥地利帝肯公司); QT20500K 型系列台式超声波清洗机 (天津市瑞普电子仪器公司); SYG-A2-6 型电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); H1750R 高速台式冷冻离心机 (长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司); 美国沃特世 (Waters 公司) Acquity UPLC I-Class Plus 超高效液相色谱仪、Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪及 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。

默克 (Merck) LC-MS 级甲醇、乙腈; 天津市永大化学试剂有限公司分析纯乙醇、甲醇和醋酸乙酯等; 对照品芦丁 (批号 KB384982)、没食子酸 (批号 B20851)、齐墩果酸批号 (J24HB17960) 购于上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均≥98%。

## 2 方法

### 2.1 总黄酮含量测定<sup>[13]</sup>

称取 0.1 g 样品, 按料液比 1:20 g/mL 加入 60%乙醇, 于 400 W 功率超声提取 30 min, 4 000 r/min 离心 10 min。取 1 mL 上清液, 依次加入 0.3 mL 5%亚硝酸钠、0.3 mL 10%硝酸铝 (静置 5~6 min), 后加 4 mL 4%氢氧化钠溶液, 用 60%乙醇定容至 10 mL, 于 510 nm 测定吸光度 (*A*) 值<sup>[13]</sup>。以芦丁为对照品, 以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 以质量浓

度为横坐标 ( $X$ ), 建立标准曲线方程为  $Y=5.492 7 X+0.003 8$ ,  $R^2=0.998 0$ 。

## 2.2 总多酚含量测定<sup>[14]</sup>

称 0.1 g 样品, 按料液比 1:20 g/mL 加 70% 甲醇, 70℃ 水浴提取 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液用 70% 甲醇定容至 10 mL, 移取 1 mL 待测液, 加 5 mL 2% 福林酚试剂, 摇匀静置 5~8 min; 加 4 mL 7.5% 无水碳酸钠溶液, 用水定容至 10 mL, 室温避光放置 40 min 后于 765 nm 测定  $A$  值<sup>[14]</sup>。以没食子酸为对照品, 以  $A$  值为纵坐标 ( $Y$ ), 以质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 回归方程为  $Y=5.164 5 X+0.081 2$ ,  $R^2=0.997 1$ 。

## 2.3 总三萜含量测定<sup>[15]</sup>

称取 0.1 g 样品, 按料液比 1:20 g/mL 加 95% 乙醇, 70℃ 水浴 1 h, 于 40℃、10 kHz 超声提取 40 min, 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液 70℃ 浓缩蒸干, 用 2 mL 醋酸乙酯复溶。移取 100~200  $\mu$ L 待测液蒸干, 加 200  $\mu$ L 5% 香草醛-冰醋酸和 800  $\mu$ L 高氯酸, 70℃ 水浴 15 min, 冷却后用醋酸乙酯定容至 5 mL, 于 551 nm 测定  $A$  值<sup>[15]</sup>。以齐墩果酸为对照品, 以  $A$  值为纵坐标 ( $Y$ ), 质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 回归方程为  $Y=4.576 4 X-0.008 4$  ( $R^2=0.999 0$ )。

## 2.4 总皂苷含量测定

称取 0.1 g 样品, 按料液比 1:20 g/mL 加 60% 甲醇, 超声提取 2 次 (每次 20 min), 取 600  $\mu$ L 滤液蒸干, 去离子水溶解后用正丁醇萃取 3 次。合并正丁醇层蒸干, 150  $\mu$ L 甲醇复溶得到样品液。移取 100  $\mu$ L 样品液蒸干, 加 0.5 mL 8% 香草醛乙醇溶液和 5 mL 浓硫酸, 60℃ 水浴 10 min, 冰浴 15 min 后于 538 nm 测定  $A$  值<sup>[16]</sup>。以齐墩果酸为对照品, 以  $A$  值为纵坐标 ( $Y$ ), 质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 回归方程为  $Y=4.751 7 X-0.011 9$ ,  $R^2=0.990 2$ 。

## 2.5 非靶代谢组学分析

**2.5.1 样品前处理** 称取 50 mg 刺五加叶片粉末, 加入含内标的甲醇-乙腈-水 (2:2:1) 提取液, 依次经涡旋、低温研磨、超声破碎、-20℃ 静置 1 h 及 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液并真空干燥。残留物用乙腈-水 (1:1) 复溶, 2 次离心后取上清液用于检测。

**2.5.2 色谱条件** 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m), 流动相为含 0.1% 甲酸水溶液 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱序:

0~10 min, 2%~98% B; 10~13 min, 98% B; 13~15 min, 98%~2% B。体积流量 400  $\mu$ L/min, 进样量 1  $\mu$ L, 柱温 40℃。

**2.5.3 质谱条件** 通过 Waters Xevo G2-XS QTOF 质谱仪检测, 电喷雾离子源 (ESI) 参数为毛细管电压 2 500 V (正模式) /-2 000 V (负模式), 锥孔电压 30 V, 离子源温度 100℃, 脱溶剂气温度 500℃, 脱溶剂气流量 1 000 L/h。质核比 ( $m/z$ ) 扫描范围 50~1 200, 采用 2 V 低能量及 10~40 V 高能量碰撞诱导解离双通道采集数据。

**2.5.4 数据处理** 原始数据经 MassLynx V4.2 软件采集, 通过 Progenesis QI 软件进行峰提取、保留时间校正及峰对齐, 结合 METLIN 数据库、公共代谢组数据库及自建标准品库进行代谢物鉴定。定性标准为母离子质量偏差 $\leq 1\times 10^{-4}$ 、碎片离子偏差 $\leq 5\times 10^{-5}$ , 并辅以理论碎片离子匹配验证; 定量分析采用内标校正归一化法, 确保数据准确性。

## 2.6 数据统计分析

数据使用 SPSS 27.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, 美国), 采用 Duncan 检验法 ( $P<0.05$ ) 进行差异显著性检验, 利用 GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, 美国) 进行绘图; 使用 TBtools-II v2.225 进行热图绘制, 使用 Excel 进行占比图绘制。

## 3 结果与分析

### 3.1 刺五加叶中次生代谢物的累积变化

在 1 个生长季内, 刺五加叶片中的黄酮含量呈现双峰型增长模式, 从 L1 期的 24.35 mg/g 开始逐步上升, 于 L3 期达到首个峰值 50.12 mg/g (为 L1 期的 2.06 倍), 之后经历波动变化, 至 L11 期迎来第 2 峰值 195.35 mg/g (达 L1 期的 8.02 倍), L13 期回落至 101.47 mg/g。多酚含量则表现为持续递增趋势, 从 L1 期的 118.03 mg/g 起步, L3 期出现首个峰值 155.10 mg/g (为 L1 期的 1.31 倍), 并在 L11 期达到最高值 198.79 mg/g (为 L1 期的 1.68 倍), L13 期小幅降至 171.20 mg/g。三萜含量整体呈平缓上升态势, 在 L11 期累积量达到最大值 62.28 mg/g (为 L1 期的 1.61 倍)。皂苷含量变化呈现 3 峰型上升趋势, L3 期出现首个峰值 61.99 mg/g, 经过中间波动后, L11 期达到第 3 峰值 88.75 mg/g (为 L1 期的 1.63 倍)。由此可见, L11 期 (7 月末) 为黄酮、多酚、皂苷的含量峰值期及三萜的高累积期; 除三萜外, 其余成分也均在 L3 期出现早期小峰值, 见图 2。

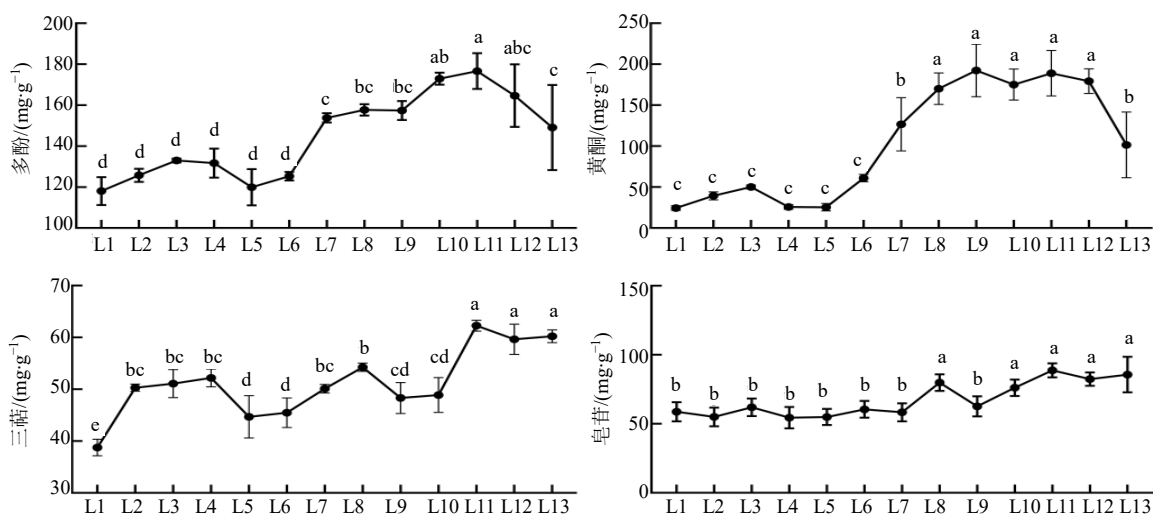


图2 刺五加叶中次生代谢物含量在1个生长季中的变化趋势

Fig. 2 Seasonal dynamics of secondary metabolite content in *A. senticosus* leaves

### 3.2 刺五加叶中代谢物的非靶向代谢组分析

采用非靶向代谢组学技术对 L3 和 L11 期刺五加叶中的代谢物分析发现，正离子模式 (ESI<sup>+</sup>) 下鉴定出 2 102 种代谢物，负离子模式 (ESI<sup>-</sup>) 下检测到 1 696 种。经 HMDB 数据库注释，匹配到 1 895 种已知代谢物 (图 3)。代谢物类群分布显示，脂质及类脂分子数量最多，达 629 种，占总

鉴定代谢物的 33.19%；其次为有机酸及其衍生物 (250 种，占 13.19%) 和苯丙素与聚酮类化合物 (240 种，占 12.66%)，有机杂环化合物以 12.03% 的比例位列第 4。该结果表明刺五加叶片代谢物具有丰富的化学多样性，脂质及类脂分子、有机酸、苯丙素类等可能是其叶片发育过程中的主要代谢产物类别。

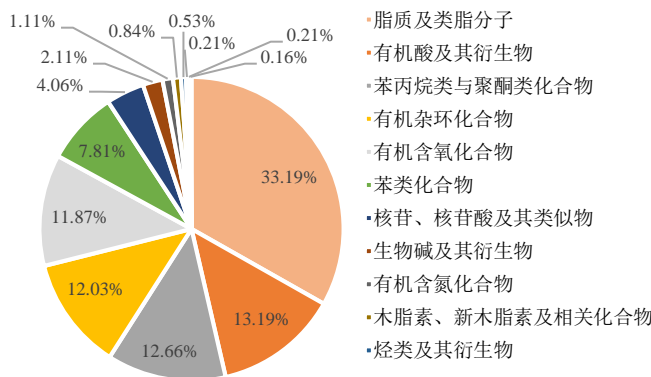


图3 刺五加叶中代谢物的分类和占比

Fig. 3 Metabolite composition in *A. senticosus* leaves

### 3.3 刺五加叶在 L3 与 L11 期差异代谢物的 KEGG 富集分析

基于刺五加 L3 与 L11 期叶片的非靶代谢组学分析，PCA 显示 2 组样本显著分离 (PC1=45.51%，PC2=14.34%) (图 4)，表明上述 2 个发育阶段间代谢物积累差异显著。在鉴定的 3 798 种代谢物中，共鉴定出 2 019 种显著差异代谢物 (VIP≥1 且 P<0.05)，其中 L11 期呈现 1 065 个代谢物特异性积累，954 个代谢物显著下调 (图 4)。利用 KEGG 数

据库对差异代谢物进行注释，选取通路中注释到差异代谢物最多的前 20 条目信息绘制如图 4 所示，差异代谢物主要富集在植物次生代谢产物的生物合成、苯丙素生物合成、嘌呤代谢、嘧啶代谢和类黄酮生物合成以及异黄酮的生物合成等通路上。

### 3.4 刺五加叶在 L3 与 L11 期的前 20 差异代谢物分析

L11 与 L3 期相比，叶中特异性富集的前 20 个差异代谢物主要分为 3 大模块 (图 5)：(1) 光信

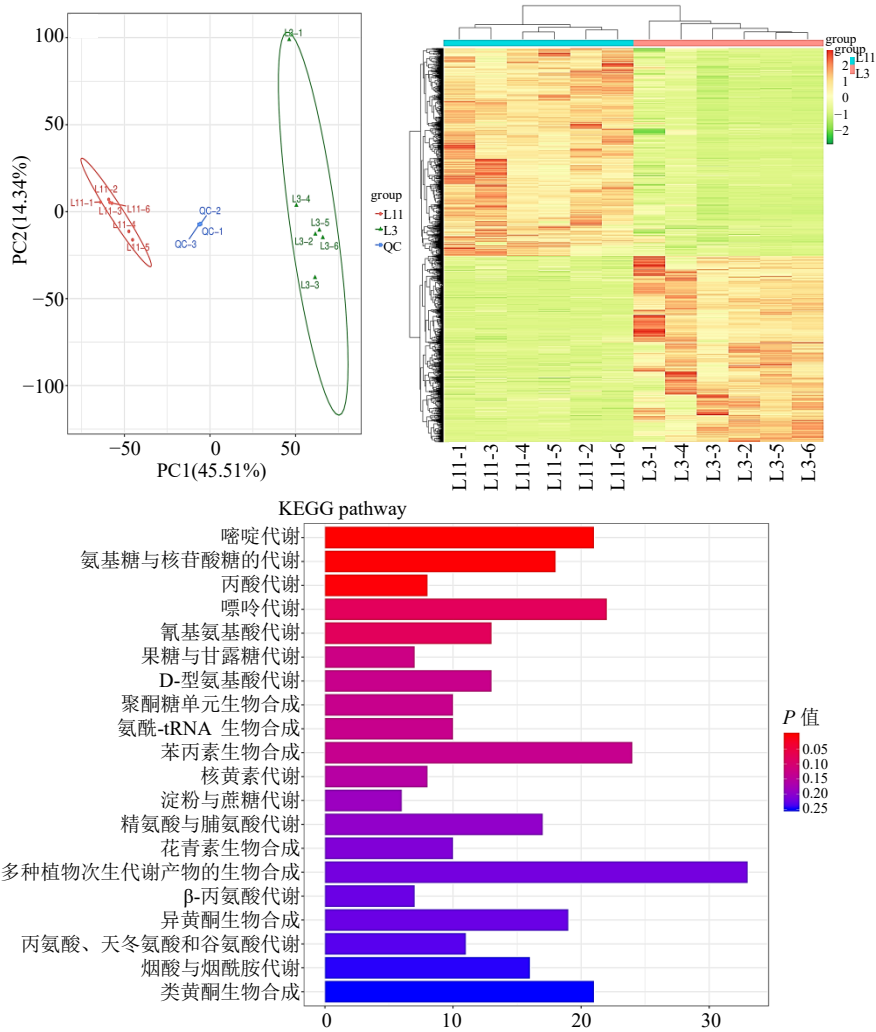


图 4 刺五加叶在 L3 和 L11 期中差异代谢物的 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of differentially accumulated metabolites in *A. senticosus* leaves at stages L3 and L11

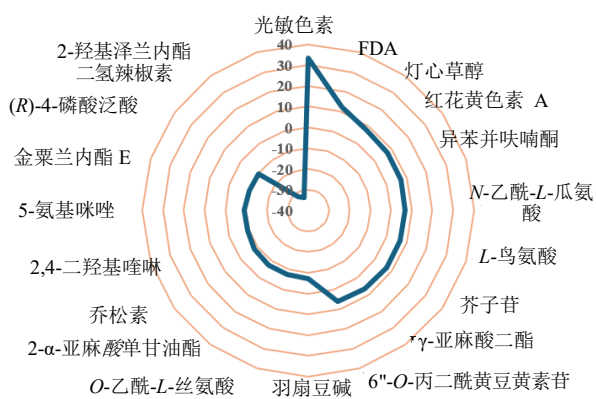


图 5 刺五加叶在 L3 与 L11 期的前 20 差异代谢物分析  
Fig. 5 Top 20 differentially accumulated metabolites in *A. senticosus* leaves between stages L3 and L11

号调控模块：光敏色素 lumichrome 与辅酶 FAD 的显著积累；(2) 次生代谢物模块：芥子苷 (硫苷类) 显

著增加，而二氢辣椒素 (辛辣素前体) 及萜类内酯 (金粟兰内酯 E、2-羟基泽兰内酯) 则显著降低；苯丙烷通路衍生物 (灯心草醇、异苯并呋喃酮) 与黄酮类 (乔松素、6"-O-丙二酰黄豆黄素苷) 的同步显著上调；(3) 发育相关调控模块：嘌呤/嘧啶合成前体 5-氨基咪唑和 (R)-4-磷酸泛酸显著下调、O-乙酰-L-丝氨酸也显著下调，而 L-鸟氨酸则显著上调。

### 3.5 刺五加叶中酚类化合物在 L3 与 L11 期的含量

L11 期与 L3 期相比共检测到 17 个显著性差异代谢物 ( $VIP \geq 1, P < 0.05$ ), 其中 10 个代谢物表达量显著上调 ( $FC \geq 1.46$ ), 7 个代谢物显著下调 ( $FC \leq 0.61$ )。[6]-姜酚 ([6]-gingerol)、芥子醇 (sinapyl alcohol)、3-甲氧基-4-羟基苯乙二醛 (3-methoxy-4-hydroxyphenylglycolaldehyde)、3-甲氧酪胺 (3-methoxytyramine) 和曲米多克斯 (trimidox) 等 5 种代谢物上调最为显著，其含量分别达到 L3 期的 7.99、

3.31、3.03、2.78、2.61倍；二氢辣椒素(dihydrocapsaicin)、辛弗林(synephrine)、3-(4-羟基苯基)-1-丙醇[3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol]、2-乙基苯

酚(2-ethylphenol)和香芹酚(carvacrol)呈现显著下调趋势,其表达量较L3期分别下降了230%、5%、13%、46%和46%,见图6。

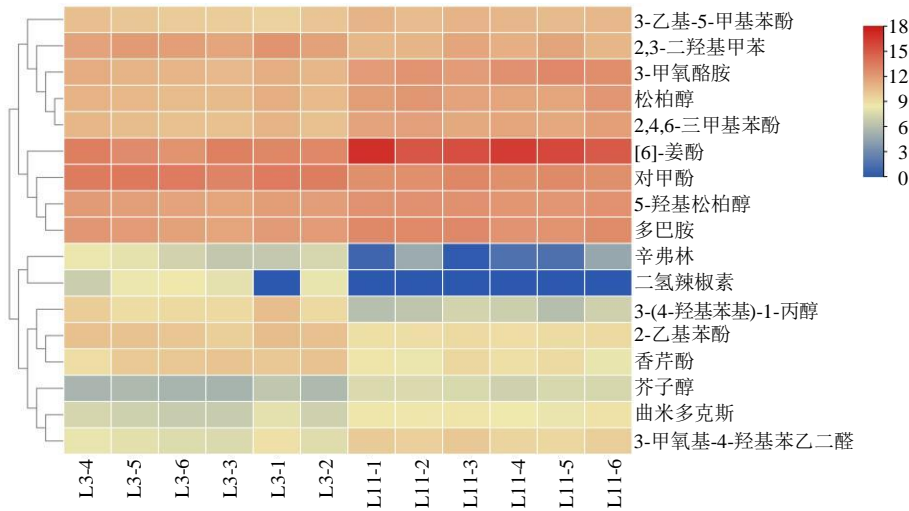


图6 刺五加叶在L3与L11期的酚类化合物相对含量

Fig. 6 Phenolic compounds content in *A. senticosus* leaves at stages L3 and L11

### 3.6 刺五加叶在L3与L11期的黄酮类化合物变化趋势分析

刺五加叶片发育至L11期时,与L3期相比共有47种代谢物呈现显著丰度差异( $FC \geq 1.46$ 或 $FC \leq 0.61$ )。在显著上调代谢物中,槲皮素-3-O-槐糖苷(baimaside)、山柰酚(kaempferol)、异鼠李素(isorhamnetin)、短叶松素(pinobanksin)及黄豆黄苷(glycitin)丰度增幅最为显著,其含量较L3期分别提升了39.36、36.45、13.41、12.48、11.74倍。

与此同时,樱花素(sakuranin)、水仙苷(narcissin)、乔松素(pinostrobin)、染料木素(genistein)和根皮苷(phlorizin)则呈现显著下调趋势,分别较L3期降低95.2%、95.3%、99.6%、87.6%和83.0%。此外,飞燕草素(delphinidin, 10.01倍)、槲皮苷(quercitrin, 4.08倍)及芦丁(rutin, 4.31倍)表现出特异性积累特征,而木脂素类椴树苷(tiliroside, 0.46倍)与黄酮苷类黄芩苷(baicalin, 0.46倍)丰度显著降低,见图7。

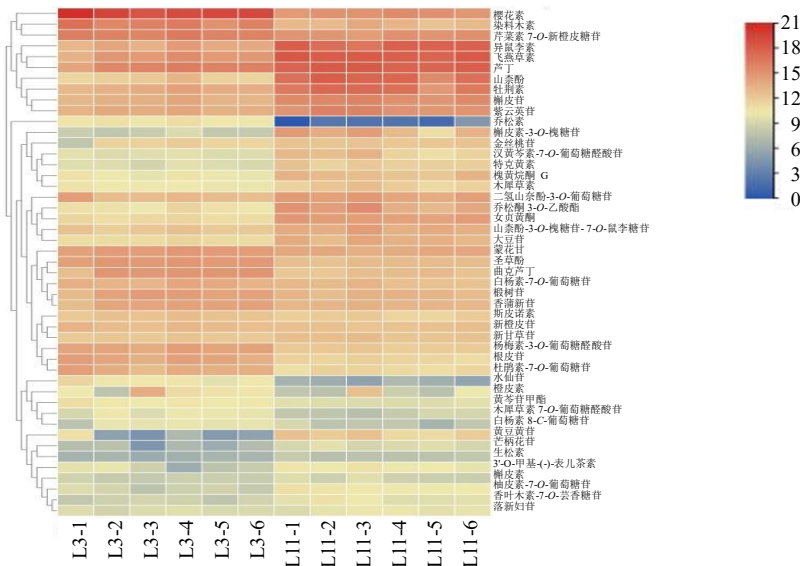


图7 刺五加叶在L3与L11期的黄酮类化合物相对含量

Fig. 7 Flavonoids content in *A. senticosus* leaves at stages L3 and L11

### 3.7 刺五加叶在 L3 与 L11 期的萜类化合物变化趋势分析

刺五加叶片发育至 L11 期时，与 L3 期相比共有 5 种三萜代谢物呈现显著丰度差异 ( $FC \geq 1.46$  或  $FC \leq 0.61$ )，其中  $\alpha$ -香树脂酮 ( $\alpha$ -Amyrone)、三七皂苷 T1 (notoginsenoside T1)、人参三醇 (panaxatriol)、二氢普利弗罗昔元 A (dihydropriverogenin A) 呈增加趋势，而山楂酸 (maslinic acid) 呈降低趋势。见图 8。

共鉴定到其他萜类化合物 46 种，其中 13 种倍半萜、9 种单萜和 7 种二萜类化合物。在显著上调代谢物中，(E)-4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯 [(E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene]、 $\beta$ -紫罗兰醇 ( $\beta$ -ionol) 和 大豆皂苷 Ba (soyasaponin Ba) 丰度增幅最为显著；

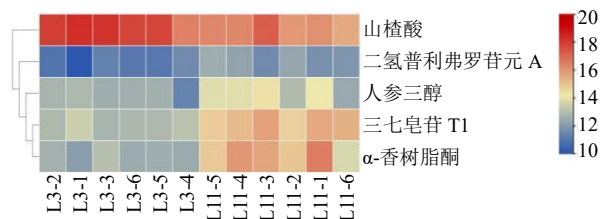


图 8 刺五加叶在 L3 与 L11 期的三萜类化合物相对含量  
Fig. 8 Triterpenoids content in *A. senticosus* leaves at stages L3 and L11

而赤霉素 A51 代谢物 (gibberellin A51-catabolite)、(1R,2R,4R)-二氢香芹醇 [(1R,2R,4R)-dihydrocarveol] 和赤霉素 A34 代谢物 (gibberellin A34-catabolite) 丰度降幅最为显著，见图 9。

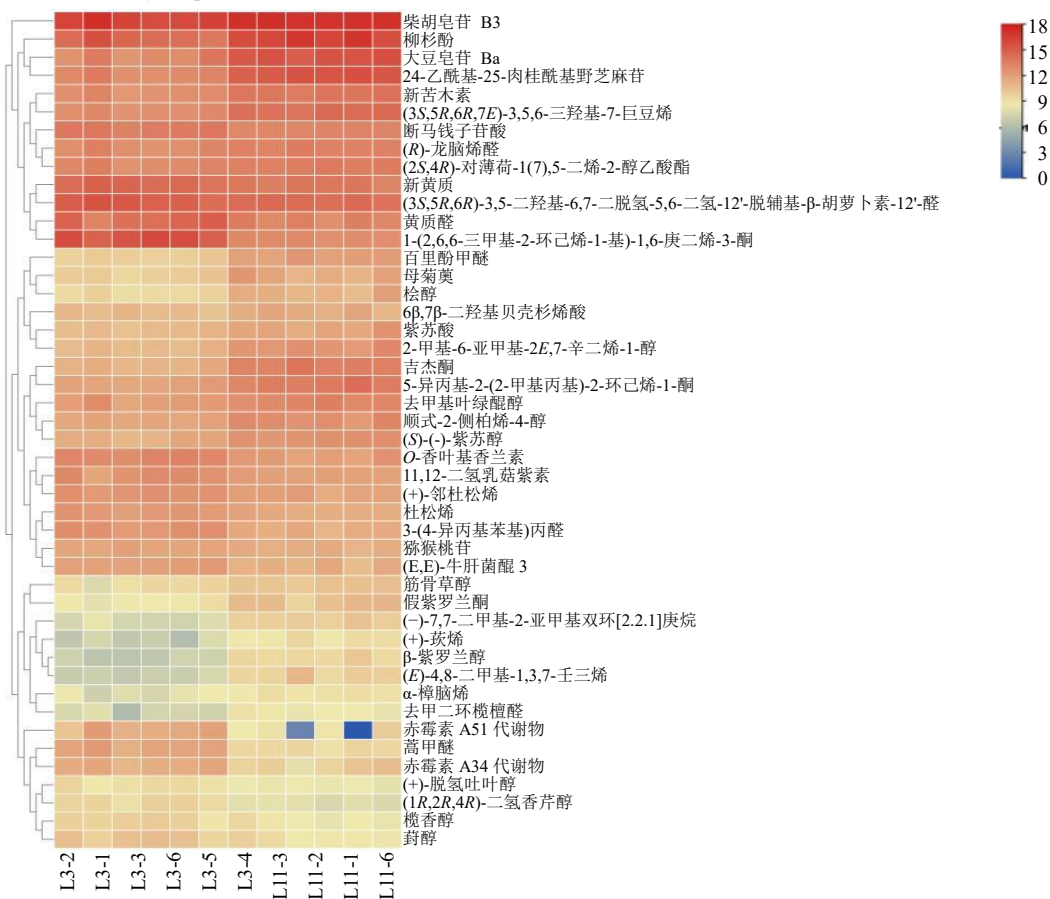


图 9 刺五加叶在 L3 与 L11 期的其他萜类化合物相对含量  
Fig. 9 Other terpenoids content in *A. senticosus* leaves at stages L3 and L11

### 3.8 刺五加叶在 L3 与 L11 期的生物碱和香豆素类化合物变化趋势分析

刺五加叶片发育至 L11 期时，与 L3 期相比共有 12 种生物碱 (图 10) 和 4 种香豆素 (图 11) 呈现显著丰度差异 ( $FC \geq 1.46$  或  $FC \leq 0.61$ )。在生物碱中，

去乙酰氧长春胺 (desacetoxyvindoline) 羽扇豆碱盐 (lupinate) 和阿义马林 (ajmaline) 丰度显著增加，而羽扇豆宁 (lupinine)、文多灵 (vindoline) 和阿马里斯 (jalicine) 则显著降低；在香豆素中，秦皮甲素 (aesculin) 和异嗪皮啶-7-O-葡萄糖苷 (isofraxidin-7-O-

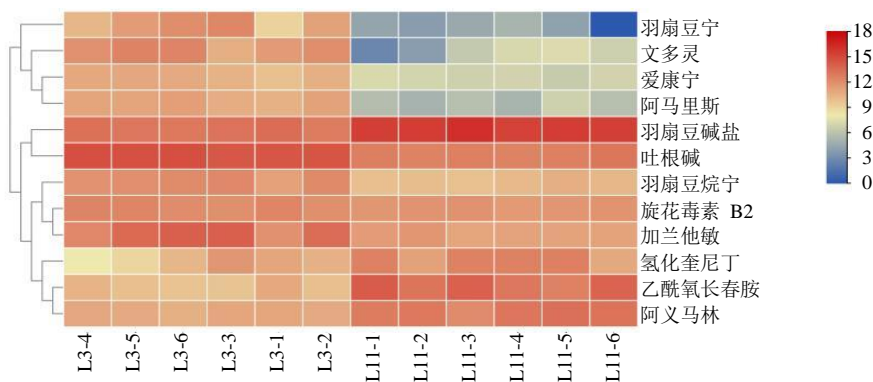


图 10 刺五加叶在 L3 与 L11 期的生物碱相对含量

Fig. 10 Alkaloids content in *A. senticosus* leaves at stages L3 and L11

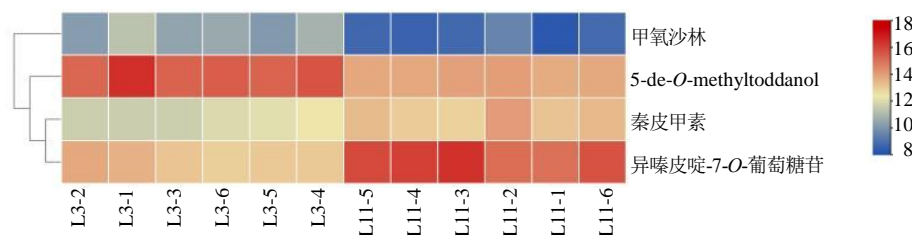


图 11 刺五加叶在 L3 与 L11 期的香豆素相对含量

Fig. 11 Coumarins content in *A. senticosus* leaves at stages L3 and L11

glucoside) 丰富显著增加, 而甲氧沙林 (methoxsalen) 和 5-de-O-methyltoddanol 则显著降低。

### 3 讨论

本研究基于 3 年生刺五加幼苗叶片形态学特征, 将单一生长季划分为 13 个发育时期 (L1~L13)。L1~L5 为叶片形态建成关键阶段, 依次经历芽开放期的初始伸长展开、展叶始期的内折紧簇、展叶盛期的叶面积激增与反卷形态, 至春色叶呈现期叶柄伸长、小叶张开并显现深绿光泽, 最终于春色叶变色期完成平展定型。L6~L13 期 (5~8 月) 叶色呈“浅-深-浅”周期性变化, 与光合作用效率动态形成形态学关联。该发育分期与植物叶片经典发育模式一致<sup>[17]</sup>, 为深入研究刺五加叶片发育过程中次生代谢物的动态变化提供了精确的时间节点。

刺五加叶片中总黄酮、总多酚和总皂苷的累积表现出显著的发育阶段特异性协同规律。上述 3 类成分均在展叶中期 (L3 期) 出现早期防御性小峰值, 含量分别为 L1 期的 2.06、1.31、1.14 倍; 并在 7 月末的叶片成熟期 (L11 期) 达到年度含量峰值, 分别为 L1 期的 8.02、1.68、1.63 倍。总三萜的累积虽未形成多峰波动, 但其在 L11 期的累积量达到 62.28

mg/g, 为全生长季的最大值, 是 L1 期含量的 1.61 倍。这一结果与孟祥才等<sup>[18]</sup>和代吉瑞等<sup>[19]</sup>的研究结果一致, 上述研究通过 HPLC 技术发现刺五加叶片总黄酮在 7 月末至 8 月初出现含量高峰, 总皂苷在生长季呈现相似的累积趋势。本研究中黄酮类成分的首次累积高峰 (L3 期) 与部分文献报道的 5 月份存在差异, 主要原因可能与本研究较高的采样频率 (间隔 10 d) 及精细化的发育分期标准有关。

植物次生代谢物不仅是传统医药和天然产物的重要来源, 更是植物适应环境、抵御生物胁迫及协调生长发育的关键介质。由此可见, 不同次生代谢物的累积轨迹分化与刺五加叶片不同生长阶段的生理需求密切相关。在展叶盛期 (L3 期), 刺五加叶片处于反卷扩展的结构脆弱期, 易受到紫外辐射 (UV-B) 和植食性生物的伤害, 此时黄酮、酚类及皂苷的快速合成可能构成了植物初生防御系统的重要组成部分<sup>[20]</sup>。而在 L11 期的叶片衰老启动阶段, 叶片的光合功能进入稳定期, 次生代谢通路的碳资源分配显著增强, 促使多种活性成分同步达到峰值, 这一现象与“碳同化-次生代谢平衡”理论高度吻合<sup>[17]</sup>, 即当植物的碳固定能力达到平台期时, 过剩的碳源会优先向次生代谢产物合成方向转移,

以增强成熟器官的化学防御能力和抗氧化功能。

基于非靶标代谢组学对 2019 个差异代谢物的分析, 刺五加叶片 L11 期与 L3 期的代谢功能模块表现出显著分化。KEGG 通路富集显示, L11 期苯丙素生物合成、黄酮及黄酮醇合成通路显著激活, 与总黄酮、总多酚的含量峰值一致, 表明次生代谢通路的协同活化驱动多种成分同步积累。槲皮素衍生物及山柰酚在 L11 期的富集, 与李俊萍等<sup>[21]</sup>的 HPLC 定量结果一致, 验证了代谢组数据可靠性。L11 期富集的 Lumichrome 及 FAD, 与光信号通路通过 bZIP 转录因子调控三萜皂苷合成关键酶 (如  $\beta$ -香树脂醇合成酶) 的分子机制一致<sup>[22]</sup>, 揭示光照通过转录调控激活次生代谢关键基因表达。此外, 嘌呤/嘧啶前体下调与 L-鸟氨酸上调, 表明叶片发育后期氮素代谢从核酸合成转向次生代谢底物供应<sup>[23]</sup>, 为黄酮、多酚、皂苷等含氮成分的合成提供物质基础。

尽管在检测中未发现异嗪皮啶, 但其次生代谢产物异嗪皮啶-7-O-葡萄糖苷的积累量在 L11 期达到 L3 期的 5.53 倍, 这一结果提示该阶段糖基转移酶活性增强, 可能通过催化糖苷化反应促进次生代谢产物的结构修饰及细胞内运输储存<sup>[24]</sup>。值得关注的是, 陆珞等<sup>[25]</sup>对临江野生刺五加叶的研究显示, 丁香苷含量在 4~5 月达到峰值, 与本研究结果存在差异, 推测可能与采样植株的年龄差异或生境条件相关, 进一步表明刺五加叶片代谢物累积模式的多样性及环境响应特征。此外, 《中国药典》2025 年版规定刺五加茎或块茎中紫丁香苷含量不得少于 0.050%。由于本实验采用非靶代谢组学分析, 无法进行绝对定量, 因此暂无法与药典标准直接比较, 后续需通过标品进行绝对定量验证, 但本研究仍为刺五加叶的食用营养价值评估提供了重要参考。

综上所述, 刺五加叶片的次生代谢过程具有显著的发育阶段依赖性, 本研究提出以 L3 期 (活性组分合成期) 和 L11 期 (活性成分高富集期) 为核心的差异化采收策略。研究结果不仅为刺五加叶片资源的精准利用提供了物候学依据, 也为《中国药典》质控指标的季节性优化及刺五加次生代谢产物合成机制的深入解析奠定了重要基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 仝梓莹, 冯文斌, 曹贵阳, 等. 黑龙江道地药材刺五加药用价值与资源评估研究 [J]. 中国中医药图书情报杂志, 2025, 49(2): 29-33.

- [2] 国家卫生健康委员会. 卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知 (卫法监发 (2002) 51 号) [Z]. 2002-02-28.
- [3] 于淼, 刘玉龙, 王冰, 等. 刺五加抗肿瘤活性成分作用机制及其临床应用 [J]. 中草药, 2024, 55(22): 7897-7906.
- [4] Song C, Duan F Y, Ju T, *et al.* Eleutheroside E supplementation prevents radiation-induced cognitive impairment and activates PKA signaling via gut microbiota [J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 680.
- [5] 王佳佳, 王莹, 谢莹, 等. 刺五加药理作用研究进展 [J]. 特产研究, 2023, 45(6): 173-177.
- [6] 李强, 张若冰, 杨玉赫, 等. 刺五加叶化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药学研究, 2023, 42(7): 495-501.
- [7] 王欣宇, 林花, 刁春妍, 等. 刺五加果生物活性及其应用进展 [J]. 农业与技术, 2023, 43(3): 10-13.
- [8] 吴郁, 曲翔汝, 杨丹, 等. 广泛非靶向代谢组学解析小麦抗条锈病反应中叶绿体代谢产物 [J]. 中国农业科学, 2025, 58(7): 1333-1343.
- [9] Zhang J G, Zhang Y, Zhang W W, *et al.* Differential metabolites analysis in *Lycium barbarum* and *Platycodon grandiflorus* fermented wine by untargeted metabolomics [J]. *Appl Food Res*, 2024, 4(2): 100631.
- [10] 杨晓萌, 赵楠, 刘欣欣, 等. 基于非靶向代谢组学的怀珍珠菊和野菊花化学成分差异性分析 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6496-6507.
- [11] 罗朝丹, 冯春梅, 李建强, 等. 基于 GC-MS 非靶向代谢组学分析不同成熟度 '台农一号' 芒果香气物质 [J]. 中国农业科学, 2025, 58(3): 564-581.
- [12] 杨秀娟, 魏江霞, 杨志军, 等. 基于 UHPLC-QE-MS 非靶向代谢组学的当归不同药用部位差异代谢物分析 [J]. 药学学报, 2025, 60(4): 1093-1102.
- [13] Wolfe K, Wu X Z, Liu R H. Antioxidant activity of apple peels [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(3): 609-614.
- [14] Pastrana-Bonilla E, Akoh C C, Sellappan S, *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(18): 5497-5503.
- [15] 姜洋, 孙菲菲, 詹亚光, 等. 一氧化碳对白桦悬浮细胞生长和三萜累积的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3681-3686.
- [16] 初旸. 刺五加细胞培养体系的建立与有效成分积累的调控研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [17] Coley P D, Bryant J P, Chapin F S. Resource availability and plant antiherbivore defense [J]. *Science*, 1985, 230(4728): 895-899.
- [18] 孟祥才, 王喜军, 孙晖, 等. 刺五加活性成分积累规律及其质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2021-2025.

- [19] 代吉瑞, 王春玲, 李芝, 等. 刺五加叶片皂苷类成分动态积累规律研究 [J]. 中药材, 2019, 42(3): 547-551.
- [20] Wink M. Plant secondary metabolism: Diversity, function and its evolution [J]. *Nat Prod Commun*, 2008, 3(8): 1934578X0800300801.
- [21] 李俊萍, 王雪梅, 孙海峰, 等. 刺五加叶黄酮类成分动态积累及其与环境因子的相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2563-2568.
- [22] Li C, Jiao M Y, Zhao X Y, *et al.* bZIP transcription factor responds to changes in light quality and affects saponins synthesis in *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 279: 135273.
- [23] Hirel B, Le Gouis J, Ney B, *et al.* The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: Towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(9): 2369-2387.
- [24] Breton C, Šnajdrová L, Jeanneau C, *et al.* Structures and mechanisms of glycosyltransferases [J]. *Glycobiology*, 2006, 16(2): 29R-37R.
- [25] 陆珞, 阎墨, 赵晓红, 等. HPLC法测定不同采收期刺五加叶中丁香苷的含量 [J]. 人参研究, 2011, 23(3): 15-18.

[责任编辑 时圣明]