

## 引种成都后欧李生长期多酚含量的变化

王智君 (山西省吕梁市科学技术协会, 山西离石 033000)

**摘要** [目的]探究欧李引种成都后其生长期多酚含量的变化,为欧李多酚类物质的研究提供参考。[方法]采用酒石酸铁比色法测定欧李引种成都后的多酚含量。[结果]用95%甲醇提取欧李多酚效果最好,欧李体内的多酚含量并不会在植物体内大量积累,多酚含量在12:00左右温度较高和傍晚时出现较大值,在14:00温度最高时较低,在19℃左右时也较低,当有虫害胁迫时欧李体内多酚含量增加。[结论]多酚对于植物的次生代谢有重要影响,在鲜叶中的含量可以反映植物次生代谢的强度,并反映植物对环境的适应性以及对各种环境胁迫的抵抗力。

**关键词** 欧李;多酚;酒石酸铁比色法;次级代谢

中图分类号 S662.5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)11-0011-04

Changes of Polyphenol Contents of *Prunus humilis* Bunge Introduced in Chengdu during Growing Period

WANG Zhi-jun (Lüliang Association for Science and Technology, Lishi, Shanxi 033000)

**Abstract** [Objective] To explore changes of polyphenol content of *Prunus humilis* Bunge introduced in Chengdu during growing period and provide theoretical basis for researching polyphenol content of *Prunus humilis* Bunge. [Method] We determined the polyphenol content of *Prunus humilis* Bunge introduced in Chengdu during growing period by tartaric acid iron assay. [Result] The polyphenol of *Prunus humilis* Bunge extracted by using 95% methanol was the best, and the content of polyphenol of *Prunus humilis* Bunge would not accumulate internally in plants. The content of polyphenol reached higher in around 12:00 and when the temperature was higher in the evening, it would be the minimum at 14:00 when the temperature was the lowest, and the content was also very low in about 19℃; the content of polyphenol would increase under herbivore stress. [Conclusion] Polyphenol has important effect on metabolism of plant. The content of its fresh leaves of plants can reflect the intensity of secondary metabolism, the reaction of plant adaptation to the environment, and resistance to various environmental stresses.

**Key words** *Prunus humilis* Bunge; Polyphenol; Tartaric acid iron assay; Secondary metabolism

多酚是泛指一类性质不同的多羟基酚(以邻位和连位为主),包括儿茶素类、黄酮及黄酮类化合物、花色素类、酚酸、缩酚酸类多酚化合物的复合体。多酚具有C6-C3-C6结构,广泛存在于各种植物体内<sup>[1-2]</sup>。多酚中的C3部分具有高度的还原特性,所以具有很强的抗氧化能力,多酚具有抗氧化、清除自由基、降血压、降血脂、预防心血管病、抗突变、抗辐射、抑菌、抗癌等功能,并且毒副作用小<sup>[3-7]</sup>。因此,多酚应用前景非常广阔,能用于食品、医药、日化等领域。

欧李引种到成都后<sup>[8]</sup>,各种性状特性可能发生变化。次级代谢产物区别于初生代谢产物有很大不同,初生代谢产物是通过代谢活动所产生的自身生长和繁殖所必需的物质,如多糖、脂类、氨基酸、核苷酸、维生素等<sup>[9]</sup>。生物通过初级代谢,能使各种营养物转化为自身的结构物质、具有生理活性物质或者为生长提供所需能量,所以初生代谢产物通常都是机体生存必不可少的物质,这些物质的合成过程中某个环节发生障碍,轻则可能引起生物生长停止,重则可能导致机体发生突变或者死亡,是一种基本代谢类型。而植物次生代谢产物是植物对环境的一种适应产物,在进化过程中植物与生物和非生物因素长期相互作用的结果。植物次生代谢产物在对环境胁迫的适应、植物间相互竞争、植物抵抗病虫害危害中起到重要作用<sup>[10]</sup>。多酚作为植物重要的次级代谢产物,欧李引种成都后,环境的改变可能会改变欧李的生理过程,能反映欧李对于环境的适应性,对于欧李引种研究有重要意义。同时多酚物质本身具有很大的开发价值,通过研究欧李

体内多酚的含量,研究其是否具有潜在开发提取价值也有重要意义。笔者研究了欧李引种成都后,其生长期多酚含量的变化,以期对欧李引种研究和多酚的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 植物材料。**供试植物材料为2008年秋季山西引种到成都的欧李,试验前1年的3月移栽至花盆中,正常管理。

**1.1.2 主要试剂与仪器。**磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸亚铁、酒石酸钠钾、甲醇、乙醇、丙酮、焦性没食子酸等均由四川成都科龙化工试剂厂提供,均为分析纯。电子天平为上海越平科学仪器有限公司产品;7200可见光分光光度计为尤尼柯(上海)仪器有限公司产品;数显恒温水浴锅为常州澳华仪器有限公司产品。

## 1.2 方法

## 1.2.1 试剂的配制。

**1.2.1.1 磷酸缓冲液的配制。**用电子天平称取71.628g磷酸氢二钠溶于500mL烧杯中,用玻璃杯搅拌溶解,然后倒入1L容量瓶中定容,配制成0.2mol/L磷酸氢二钠母液,再用电子天平称量31.202g磷酸二氢钠溶于500mL烧杯中,用玻璃杯搅拌溶解,倒入1L容量瓶中定容,配制成0.2mol/L磷酸二氢钠母液。分别配制pH6.8和7.5的缓冲液。pH6.8的缓冲液每100mL加入0.2mol/L磷酸氢二钠母液49mL和0.2mol/L磷酸二氢钠母液51mL。pH7.5的缓冲液每100mL加入0.2mol/L磷酸氢二钠母液84mL和0.2mol/L磷酸二氢钠母液16mL<sup>[11]</sup>。上述溶液均存储于棕色瓶中。

**1.2.1.2 酒石酸铁溶液的配制。**用电子天平称量1g硫酸

亚铁和5 g 酒石酸钠钾分别溶解于蒸馏水中,混合后定容至1 L,并储存于棕色瓶中,可稳定10 d<sup>[12-13]</sup>。

**1.2.2 提取液的选择。**取欧李植株新鲜叶片,在电子天平上准确称重,用自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗干净,用不锈钢剪刀快速剪成碎片,置于带塞三角瓶中,分别加入95%甲醇、95%乙醇、无水丙酮试剂5 mL,于沸水中浸提30 min,冷却至室温,取1 mL样品上清液,加入1 mL蒸馏水、2 mL酒石酸铁溶液和6 mL磷酸缓冲液,混合,以试剂作为空白对照,于540 nm波长处测定光密度。

**1.2.3 缓冲液的选择。**不同pH对多酚含量的测定有一定的影响,根据文献报道<sup>[3-6,12-15]</sup>,有选择pH 6.8的磷酸缓冲液,也有选择pH 7.5的磷酸缓冲液。为了确定哪一种缓冲液更合适,加样方法如“1.2.2”,提取试剂为甲醇,分别对pH 6.8和pH 7.5的磷酸缓冲液测定光密度。

**1.2.4 欧李样品多酚含量的测定。**采用酒石酸铁法<sup>[12]</sup>。取新鲜欧李叶片,用电子天平称重,用自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗干净,吸去表面水分后用不锈钢剪刀剪成碎片,置于带塞三角瓶中,加入5 mL 95%甲醇,置于恒温水浴锅中在68℃微沸状态中提取33 min,冷却至室温。用移液枪吸取上清液1 mL加入试管中,再分别加入1 mL蒸馏水、2 mL酒石酸铁和6 mL pH 7.5的磷酸缓冲液,在分光光度计上测定光密度。

**1.2.5 线性关系的考察。**标准品用焦性没食子酸代替多酚标准品,测得多酚含量以没食子酸计。称量焦性没食子酸1 g溶于50 mL蒸馏水中,配制成母液,依次取5、10、15、20、25、30 μL分别加入试管中,向试管中分别加入1 995、1 990、1 885、1 880、1 875、1 870 μL蒸馏水,再依次加入2 mL酒石酸铁和6 mL pH 7.5的磷酸缓冲液,然后立即在7200型可见分光光度计上测定光密度。

## 2 结果与分析

**2.1 标准曲线的绘制**以焦性没食子酸为多酚标准品,求得多酚标准曲线方程为 $y = 1.5089x + 0.0237$ ,回归系数为 $R^2 = 0.9967$ ,线性关系良好(图1)。

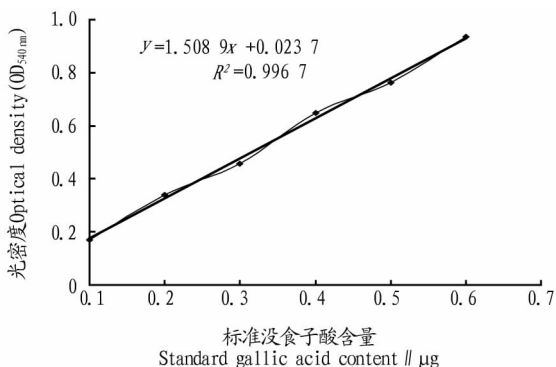


图1 多酚含量的标准曲线

Fig.1 The standard curve of polyphenol content

**2.2 提取液的选择**取欧李植株中部的的新鲜完整叶片,分别用95%甲醇、95%乙醇和无水丙酮提取欧李叶片中的多酚,用焦性没食子酸绘制标准曲线为 $y = 1.5089x + 0.0237$ ,将测得的光密度带入标准曲线求得多酚含量。因为样品提

取液为5 mL,而测定时取样体积为1 mL,所以样品中的总多酚含量为 $X = 5(Y - 0.0237) / 1.5089$ ,多酚含量占欧李取叶重的百分比为 $\eta = X/Z$ 。式中, $X$ 为样品多酚含量; $Y$ 为吸光度; $Z$ 为取样总重。

结果表明,用95%甲醇提取欧李叶片中的多酚效果最好,多酚含量为0.8025%,明显高于95%乙醇和无水丙酮提取(表1)。因此,选择95%甲醇作为提取液。

表1 提取液选择

Table 1 The selection of extract

| 提取试剂<br>Extraction reagent | Z<br>g  | Y     | X<br>μg | η<br>%  |
|----------------------------|---------|-------|---------|---------|
| 95% 甲醇 95% methanol        | 0.213 6 | 0.541 | 1.714   | 0.802 5 |
| 95% 乙醇 95% ethanol         | 0.225 8 | 0.356 | 1.101   | 0.487 7 |
| 无水丙酮 Anhydrous acetone     | 0.223 6 | 0.253 | 0.760   | 0.339 8 |

**2.3 缓冲液的选择**分别取A、B、C、D 4株欧李植株中部的的新鲜完整叶片,缓冲液选择方法同“1.2.2”,用求得的多酚除以4株植株的总质量Z,求欧李叶片多酚含量百分比。

由表2可知,pH 7.5的磷酸缓冲液对欧李多酚含量的测定效果更好,显色反应更加明显,所以选择pH 7.5的磷酸缓冲液作为欧李叶片多酚提取的缓冲液。

表2 缓冲液的选择

Table 2 The selection of buffer solution

| 缓冲液<br>Buffer solution | Z<br>g  | Y     | X<br>μg  | η<br>%  |
|------------------------|---------|-------|----------|---------|
| pH 6.8                 | 0.375 7 | 0.832 | 2.678 44 | 7.129 2 |
| pH 7.5                 | 0.375 7 | 0.892 | 2.877 26 | 7.658 4 |

## 2.4 欧李叶片样品多酚含量

**2.4.1 欧李叶片总多酚含量(以没食子酸计)的测定。**欧李叶片多酚的提取和测定方法同“1.2.2”和“1.2.4”。欧李总多酚在欧李叶片中的百分比为 $\eta_1 = X_1/Z_1$ ,其中 $X_1$ 为测得的多酚含量总和; $Z_1$ 为取样叶片总重。由该公式求得欧李植株中新鲜叶片多酚含量(以没食子酸计)为0.77016%。

**2.4.2 4株欧李植株中多酚含量的测定。**分别将A、B、C、D 4株欧李新鲜叶片的多酚含量相加,除以从A、B、C、D 4株欧李所取叶片总重,测多酚在A、B、C、D 4株植株中的百分比。计算公式为: $\eta = (X/Z) \times 100\%$ 。式中, $\eta$ 为多酚含量百分比; $X$ 为多酚总重; $Z$ 分别为A、B、C、D 4株植株叶片的重量和。经计算,A、B、C、D 4株欧李植株中多酚含量(以没食子酸计)分别为0.79461%、0.76875%、0.80565%和0.65541%。可见,各植株的多酚含量各不相同,但相差不大。

**2.4.3 欧李多酚含量的日变化。**以A、B、C、D 4株欧李植株多酚含量总重占鲜叶的百分比(测定方法同“1.2.2”和“1.2.4”)随时间变化,观察1 d内欧李植物体内多酚含量的变化情况。

由图2可知,欧李叶片中的多酚含量会在一天(白昼)之中随着时间的变化而发生变化。多酚含量从上午开始随着时间的变化而开始增加,到12:00左右达到较大值,然后随

着时间的推移而逐渐呈下降趋势,14:00 左右达到最小值,随后又逐渐增加。

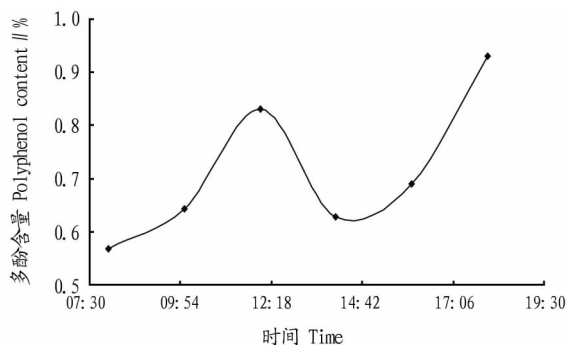


图2 欧李叶片多酚含量的日变化

Fig.2 Daily variation of polyphenol content of *Prunus humilis* Bunge

**2.4.4 欧李生长期叶片多酚含量的变化。**取欧李植株中部的的新鲜完整叶片,每天每次试验共有 A、B、C、D 4 个平行植株,每天第 1 次取材在 09:30 左右,取每天第 1 次取材时 A、B、C、D 4 株欧李植株多酚的平均含量(方法同“1.2.2”和“1.2.4”)。观察多酚在欧李生长期体内的变化情况。

由图 3 可知,多酚作为次级代谢产物,并不会随着欧李生长期的进行在体内积累,但其含量会发生变化,欧李新鲜叶片中的多酚含量在 0.77% 左右。

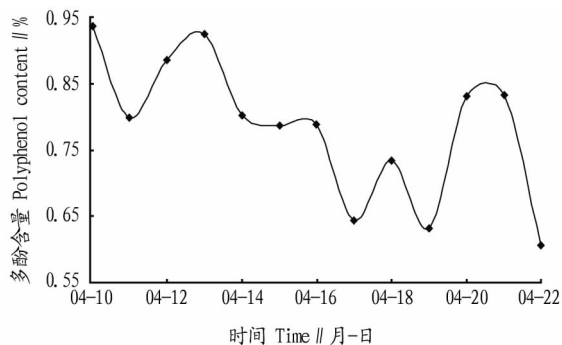


图3 欧李生长期多酚含量变化

Fig.3 The variation of polyphenol content of *Prunus humilis* Bunge during growing period

**2.4.5 气温对欧李多酚含量的影响。**统计得出每次取样时 A、B、C、D 4 株欧李的平均多酚含量随气温的变化情况(方法同“1.2.2”和“1.2.4”),相同温度求所有植株平均值(以温度升序排列)。

由图 4 可知,多酚含量会随着气温的变化而发生变化。在低温或者高温状态下欧李植物体内多酚含量低,在 19 °C 左右时多酚含量也很低,而在 13 和 24 °C 左右多酚含量较高。

### 3 结论与讨论

**3.1 提取液的确定** 用酒石酸铁比色法提取多酚时,磷酸缓冲液的选择有不同配比,大部分研究选择 pH 7.5 的磷酸缓冲液,也有选择 pH 6.8 的磷酸缓冲液。该研究发现,用 pH 7.5 的缓冲液对欧李叶片多酚测定效果较好。选择提取试剂时,有选择 50% 丙酮的,也有选择 80% 乙醇溶液的,还有选

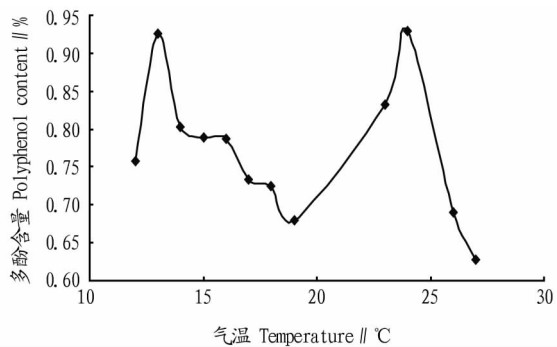


图4 欧李叶片多酚随气温的变化

Fig.4 The variation of polyphenol content of *Prunus humilis* Bunge with change of temperature

择 60% 乙醇溶液的,但大多数多酚研究都是对茶叶多酚的研究。该研究发现,用 95% 甲醇提取欧李叶片多酚效果更好。因此,采用酒石酸铁比色法测定欧李中多酚含量,用 95% 甲醇提取,并用 pH 7.5 的磷酸缓冲液效果最好。

**3.2 多酚测定过程中的注意事项** 在试验过程中偶然发现 4 月 16 日和 4 月 21 日 2 个异常点。在测光密度时发现测出的光密度很大,求得的多酚含量很高,明显大于平均值 0.770 16% (图 5)。观察样品液发现,产生了大量淡绿色絮状沉淀。

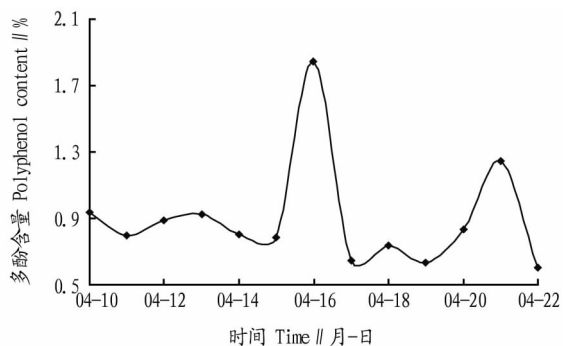


图5 多酚含量随时间的变化

Fig.5 The variation of polyphenol content of *Prunus humilis* Bunge with change of time

4 月 16 日产生大量的淡绿色絮状沉淀,后经过试验验证分析,产生的絮状沉淀为高温状态下生成。验证方法是加入 1 mL 甲醇、2 mL 酒石酸铁和 6 mL 磷酸缓冲液,置于高温状态下观察发现产生极少量白色絮状物,为了确定沉淀是由甲醇还是提取液产生的,将欧李叶片多酚提取液由甲醇换为丙酮提取,将丙酮样品提取液取样 1 mL,加入 2 mL 酒石酸铁,6 mL 磷酸缓冲液,置于高温状态下马上产生大量淡绿色絮状沉淀,所以确定引起大量沉淀物质应该为从欧李叶片提取液中的 1 种物质。4 月 21 日发现光密度增加明显,逐渐产生淡绿色絮状沉淀。后经过试验发现,是由于长时间放置产生的。因此,在提取后测光密度时要特别注意对提取液降温至常温,然后加入酒石酸铁和磷酸缓冲液后马上测光密度,否则将会产生淡绿色絮状沉淀,使光密度增加,导致测得多酚含量增加。但是对于引起产生淡绿色絮状沉淀的物质尚不明确,有待进一步研究。

**3.3 关于多酚次生代谢的环境因素** 初生代谢与次生代谢一样是植物体内重要的生理代谢,而次生代谢物质在协调与环境的关系中有重要作用。对多数植物而言,次生代谢产物的合成与积累往往根据环境的变化而发生变化。根据环境变化来决定合成次生代谢产物的种类和数量,在特定的环境下合成特定的次生代谢产物,或者显著增加特定的次生代谢产物。而几种环境因子可能影响1种次生代谢产物,1种环境因子也可影响几种次生代谢产物的合成和积累,相同环境因子对不同植物的同一次生代谢产物影响效果也不一定相同<sup>[16-17]</sup>。目前,人们环境条件对植株体内次生代谢产物形成和积累诱导作用的生理机制存在不同的认识,提出了不同的诱导机制假说来解释不同环境条件下植物次生代谢的变化,主要的诱导机制假说有碳素/营养平衡(CNB)假说、生长/分化平衡(GDB)假说、最佳防御(OD)假说和资源获得(RA)假说等。这些假说揭示或解释了不同环境条件下植株体内合成和积累规律,但都认为环境胁迫时,次生代谢产物数量增加<sup>[16-17]</sup>。苏文华等<sup>[10]</sup>研究认为在环境胁迫的条件下,植株生长下降,次生代谢产物数量增加,而在良好环境条件下,植株生长快,次生代谢产物数量少,但当环境严重胁迫时,植株生长和次生代谢又都受阻碍。光照、温度、水分、矿物质、CO<sub>2</sub>、虫害等环境因素是影响次级代谢产物的主要原因。黄璐琦等<sup>[9]</sup>研究认为植物在受虫害损伤后,在次生代谢方面最明显的变化是酚类化合物含量的增加,在遮阴条件下,光合作用降低,体内C/N比降低,酚类、萜烯类物质减少。

该研究发现,欧李引种到成都后,欧李植物体内的多酚含量并不会发生明显变化,但可能会随季节发生变化。研究发现欧李叶片中的多酚会在一天(白昼)之中随着时间的变化而发生变化,从上午开始随着时间的变化而开始增加,到12:00左右达到较大值,然后随着时间的推移而呈下降趋势,14:00左右达到最小值,随后又开始增加。通过气温对欧李体内多酚的影响的研究发现,欧李体内多酚随温度也会发生变化,通过综合温度和日变化情况发现,欧李叶片中的多酚含量变化可能和温度有很大关系。分析温度和日变化情况,欧李的次级代谢产物多酚可能在高温和低温情况下都很低,在19℃左右时较低,而在13℃和较高温度时多酚含量较高,这与黄璐琦等<sup>[9]</sup>的研究结果相符合,植物在良好环境条

件(19℃左右)下体内次生代谢产物多酚含量少,在环境胁迫下(13℃和较高温度)植物体内多酚含量较多,环境严重胁迫时(清晨和14:00左右地表温度很高)次生代谢产物多酚含量很低。欧李植株通过体内次生代谢产物的变化以加强对环境变化的适应,所以提取多酚的最佳时间应该在12:00左右和傍晚环境胁迫时,此时多酚在欧李体内积累较多。另外,在观察4株欧李形态后发现,C植株有虫害情况,且其多酚含量也较高,这恰好与虫害胁迫次级代谢产物增加相符合。

#### 参考文献

- [1] 钮伟民,孙力. 保健食品中茶多酚含量的测定[J]. 预防医学文献信息, 2002,8(4):433,467.
- [2] 喻祖文. 茶多酚几种不同提取方式的比较[J]. 中医药导报,2010,16(12):94-95.
- [3] 李南薇,詹金广,陈少航. 茶多酚分离提取和应用研究进展[J]. 天津农业科学,2010,16(4):8-10,14.
- [4] 付晓燕,胡崇琳,田斌强,等. 燕麦发芽过程中酚类物质的变化[J]. 食品科学,2011,32(5):137-142.
- [5] 赵卫星,姜红波,王艳,等. 天然抗氧化剂——茶多酚提取、分离和纯化方法[J]. 广东化工,2010,37(8):7-8.
- [6] 陈根洪. 藤茶总多酚的提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2011,32(6):127-130.
- [7] LIN J K, LIANG Y C. Cancer chemoprevention by tea polyphenols[J]. Pros Natl Sci Counc ROC(B), 2000,24(1):1-13.
- [8] 孙雁霞,躬晓勇,王跃华,等. 欧李在成都地区引种的初期表现[J]. 安徽农业科学,2010,38(10):5068-5069,5177.
- [9] 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.
- [10] 苏文华,张光飞,李秀华,等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的的关系[J]. 中草药,2005,36(9):1415-1418.
- [11] 毕凌霄,廖蓉苏. 不同生长期瑞香狼毒和牛心朴子总黄酮含量研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2505-2507.
- [12] 中国科学院上海植物生理研究所,上海市植物生理学会. 现代植物生理学[M]. 北京:科学出版社,1999:223-224.
- [13] 刘天质,曾玩娴. 白兰地总多酚含量测定方法初探[J]. 酿酒科技,2010(7):96-97.
- [14] 苟小军,徐文俊. 生物化学实验教程[M]. 成都:四川科学技术出版社,2009:243.
- [15] 楠敏,李远志,何洛强,等. 番石榴叶中多酚物质含量测定条件的优化[J]. 农产品加工·学刊,2009(3):181-183.
- [16] BARTO E K, CIPOLLINI D. Testing the optimal defense theory and the growth-differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. Oecologia,2005,146(2):169-178.
- [17] BYERS J E. Effects of body size and resource availability on dispersal in a native and a non-native estuarine snail[J]. J of Exp Mar Biol and Ecol, 2000,248(2):133-150.

## 科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如1990年不能写成90年,文中避免出现“去年”“今年”等写法。小于1的小数点前的零不能省略,如0.2456不能写成.2456。小数点前或后超过4位数(含4位数),从小数点向左右每3位空半格,不用“,”隔开。如18 072.235 71。尾数多的数字(5位以上)和小数点后位数多的小数,宜采用 $\times 10^n$ ( $n$ 为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。