

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2019.06.015

桂北地区青钱柳不同时期活性成分分析

郭亮¹, 李晓铁^{2*}, 秦丽凤¹

(1. 桂林市林业科学研究所, 广西 桂林 541004; 2. 桂林林业学校, 广西 桂林 541004)

摘要:以桂北地区种植的青钱柳(*Cyclocarya paliurus*)叶片为实验材料,探究不同采摘时间和采摘树龄下,叶片中可溶性糖、总黄酮、总皂苷的含量差异,寻找较为适合的采摘树龄和采摘时间。利用对比试验和方差分析方法,从3个不同的采摘时间和3个不同的采摘树龄中分别选择出各组分产量较高的组合。试验证明当采摘树龄为4年时,可提取到的可溶性多糖较高,当树龄为两年并且采摘时间在每年11月左右时,可提取到的总黄酮和总皂苷含量较高;该实验探究所选取的本地无性系家系在特定时期可产出较高的可溶性糖、黄酮、皂苷。依据不同的采摘时间和采摘树龄可提高青钱柳叶片的利用率,该实验所选取的青钱柳无性家系可作为优良家系进行选育,为今后青钱柳叶片中活性成分的提取和优良家系的选育打下基础。

关键词:青钱柳;可溶性多糖;总黄酮;总皂苷;方差分析

中图分类号:S792.12 **文献标识码:**A

文章编号:1003-5508(2019)06-0081-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Analysis of Active Ingredients of *Cyclocarya paliurus* in Northern Guangxi

GUO Liang¹ LI Xiao-tie^{2*} QIN Li-feng¹

(1. Guilin Forestry Science Research Institute, Guilin 541004, Guangxi, China;

2. Guilin Forestry School, Guilin 541004, Guangxi, China)

Abstract: Studies were made of the content difference of soluble polysaccharides, total flavonoids and total saponins in leaves pricked from *Cyclocarya paliurus* trees at different ages in different months in Northern Guangxi, aiming to find the suitable tree age and picking time. The combinations with highest yield of each component were selected from three different harvesting time and three different harvesting ages by comparative test and variance analysis. The results showed that the soluble polysaccharides were higher when the tree age was 4 years, the total flavonoids and saponins were higher when the tree age was 2 years and the harvesting time was about November each year. The selected local asexual families could produce higher soluble sugar, flavonoids and saponins in a specific period. At different picking time and tree age, the utilization rate of *C. paliurus* leaves could be improved. The asexual families selected in this experiment could be used as excellent families for breeding, which would lay a foundation for the extraction of Chinese medicinal ingredients from *C. paliurus* leaves and the selection of excellent families in the future.

Key words: *Cyclocarya paliurus*, Soluble polysaccharides, Total flavonoids, Total saponins, Variance analysis

收稿日期:2019-08-22

基金项目:桂林科技攻关项目(2016010305-5)

作者简介:郭亮(1987-),男,山东临沂人,工程师,硕士,主要从事林业研究工作,e-mail:690704326@qq.com。

*通讯作者:李晓铁(1963-),男,广西桂林人,教授级高工,本科,主要从事林业研究工作,e-mail:Lixiaotie168@126.com。

青钱柳(*Cyclocarya paliurus*)又名青钱李,摇钱树等,为胡桃科青钱柳属植物,该属仅包含青钱柳一个品种,是国家Ⅱ级重点保护濒危植物,同时也是冰川四世纪保存下来的珍稀树种,产地主要分布于我国湖南、安徽、江苏、浙江、江西、福建、台湾、湖北、四川、贵州、广西、广东和云南南部^[1]。桂北地区属亚热带湿润季风气候,气候温和,雨量充沛,因此较为适合青钱柳生长。

青钱柳不仅是优良的造林树种和绿化树种,其活性成分还具有丰富的药用价值。近年来随着对青钱柳研究的深入,发现叶片中其含有可溶性多糖、黄酮、皂甙等活性成分。在可溶性多糖研究方面,2001年李磊等利用超声波萃取手段,从青钱柳叶片中提取了1种多糖复合物,并通过试验证明该种多糖复合物具有降血糖的功效^[2];2006年邓小云等利用小鼠慢性皮下肿芽试验,证明多糖物质具有消炎和抗凝血作用^[3]。在黄酮类化合物研究方面,2007年蔡文伟等发现黄酮类化合物具有抗癌和抗肿瘤的功效^[4];2003年曹纬国等研究证明黄酮类化合物在治疗心脑血管疾病、抗病毒和增强机体免疫系统功效方面具有积极作用^[5]。皂甙类化合物具有多种重要的生物活性和广泛的药理作用,例如抗过敏、消炎、抗病毒、治疗白血病等^[6]。

青钱柳叶片中活性成分含量随采摘树龄和采摘时间具有一定的变化规律,本次探究旨在利用对比试验和方差分析法,探究不同采摘树龄和采摘时间下,各组分含量的差异,寻找较为适合的采摘树龄和采摘时间,提高青钱柳叶片的利用率,同时选出优良的无性系家系,为后期探究应用生产打下基础。

1 实验材料及方法的选取

1.1 供试样品及采集地概况

采集地点为桂北地区,采集样品为桂林市花坪保护区本地无性系家系,桂北地区属亚热带湿润季风气候,气候温和,雨量充沛,平均海拔150 m左右,全年无霜期300 d左右,平均气温19℃,年平均降雨量1900 mm,是我国的青钱柳主产区之一(见表1)。

1.2 实验仪器及材料

1.2.1 实验材料

葡萄糖(对照品, Sigma公司), 苯酚(AR, 国药

表1 样品采摘时间、地点及采摘树龄

Tab. 1 Sample picking time, place and tree age

样品编号 Sample number	采摘时间 Picking time	采摘地点 Picking place	采摘树龄/a Picking age/a
1	2017年8月9日	桂林市林业科学研究所	2
2	2017年8月9日	桂林市林业科学研究所	3
3	2017年8月9日	桂林市灵川县大圩镇	4
4	2017年8月9日	桂林市灵川县灵田镇	10
5	2017年11月13日	桂林市林业科学研究所	2
6	2017年11月13日	桂林市林业科学研究所	3
7	2017年11月13日	桂林市灵川县大圩镇	4
8	2017年11月13日	桂林市灵川县灵田镇	10
9	2018年4月12日	桂林市林业科学研究所	2
10	2018年4月12日	桂林市林业科学研究所	3
11	2018年4月12日	桂林市灵川县大圩镇	4
12	2018年4月12日	桂林市灵川县灵田镇	10

集团), 浓硫酸(AR, 厂家), 青钱柳叶片(广西桂林), 石油醚(60~90, AR, 国药集团), 无水乙醇(AR, 广东光华), 芦丁标准品(标准品, 国药集团), 香草醛, 冰醋酸, 甲醇, 正丁醇, 人参皂苷(标准品, 国药集团)。

1.2.2 实验仪器

分光光度计(UV-1800, 岛津), 索氏提取器, 移液枪(20~200 μL、100~1000 μL、500~5000 μL, 德国赫施曼)。

1.3 实验方法

1.3.1 青钱柳叶片中可溶性多糖的提取及测定方法

青钱柳叶片经过除杂、干燥、粉碎后,用多功能提取器在60℃下石油醚脱脂脱色3 h,滤去石油醚,室温晾干后作为提取原料。

用葡萄糖配成50 μg·mL⁻¹的标准溶液。准确移取200 μL、400 μL、600 μL、800 μL、1000 μL标准溶液于各试管中,制作标准曲线。

预处理后的青钱柳叶片经水提、过滤后定容到相应体积,取1 mL滤液加入3 mL无水乙醇,溶液在8000 r·min⁻¹转速下离心10 min,弃去上层清液得到沉淀,用蒸馏水溶解沉淀,准确吸取该溶液50 μL,试管加入500 μL 5%苯酚溶液,混匀后快速加入4.0 mL浓硫酸,振荡混匀80℃水浴20 min进行显色,在490 nm下测定其吸光值,根据所得回归曲线方程计算多糖含量,按以下公式计算多糖得率:青钱柳叶多糖得率=滤液中多糖的质量/青钱柳叶质量×100%。

1.3.2 青钱柳叶片中总黄酮的提取及含量测定方法

用芦丁对照品准确配制 $0.147 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液,移取 0.0 mL , 0.5 mL , 1.0 mL , 1.5 mL , 2.0 mL , 2.5 mL 于 6 只 10 mL 具塞试管中,加入 1 mL 1% 的三氯化铝/甲醇溶液,用甲醇定容,摇匀,放置 15 min ,制作芦丁标准曲线。

精密称取 5 g ,精确到 0.0001 g ,加入 30 mL 甲醇回流 4 h ,过滤,提取 3 次,合并,定容至 100 mL ,取 $50 \mu\text{L}$,具塞试管中,加入 1 mL 1% 的三氯化铝/甲醇溶液,用甲醇定容,摇匀,放置 15 min ,于 410 nm 波长下测定吸光度,根据标准曲线计算青钱柳总黄酮的含量。

1.3.3 青钱柳叶片中总皂苷的提取及含量测定方法

精密称取人参皂苷 16.6 mg ,定容至 10 mL ,吸取人参皂苷 Re 标准溶液 $0 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L}$ 、 $40 \mu\text{L}$ 、 $60 \mu\text{L}$ 、 $80 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L}$,分别置于具塞试管中,于水浴中挥尽溶剂,冷却,再加入 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL 和硫酸磺 1.0 mL ,绘制标准曲线。

精密称取青钱柳叶片 10 g ,置于 250 mL 烧瓶中,加乙醚 40 mL ,水浴回流 2 h ,挥去乙醚的脱脂样品,再用 70% 的乙醇溶液 30 mL 回流至流液无色,乙醚提取液置蒸发皿中,在水浴上浓缩至干,残渣加水 10 mL 使溶解。用 50 mL 水饱和的正丁醇萃取,重复萃取 4 次,合并正丁醇萃取液,用 20 mL 正丁醇饱和水洗涤。正丁醇溶液转移到蒸发皿中,在水浴上浓缩至干,用甲醇溶解残渣并将其转移至 10 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得供试液。

吸取 $20 \mu\text{L}$ 供试液置于具塞试管中,按“标准曲线绘制”项下的操作测定吸光度,在标准曲线上查出相应的总皂甙含量。

1.4 数据的处理

每种样品取 3 株,混合均匀后进行有效成分提取,检测的结果利用 SPSS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 实验结果

将采集的样品送至广西壮族自治区林业科学研究院利用紫外分光光度法进行检测,检测结果如表

2 所示。

表 2 各成分含量检测结果

Tab. 2 Test results of each component content

样品编号 Sample number	样品数量 sample quantity	可溶性多糖含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) soluble polysaccharide content	总黄酮含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) total flavonoids content	总皂苷含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) total saponins content
1	5 株混合样	12.25	36.25	22.04
2	5 株混合样	13.06	34.06	18.74
3	5 株混合样	14.69	31.22	18.52
4	5 株混合样	10.54	26.14	16.30
5	5 株混合样	11.38	40.33	23.15
6	5 株混合样	12.11	38.52	21.33
7	5 株混合样	13.49	34.03	19.04
8	5 株混合样	11.01	30.25	16.42
9	5 株混合样	11.25	34.32	20.28
10	5 株混合样	12.34	32.68	17.66
11	5 株混合样	12.80	29.54	16.43
12	5 株混合样	10.99	25.01	15.02

12 组样品中可溶性多糖含量最高的为样品 3 (可溶性多糖含量为 $14.69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),最低的为样品 12 (可溶性多糖含量为 $10.99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$);样品 5 组合检测到的总黄酮含量最高,为 $40.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;样品 12 总黄酮含量最低,为 $25.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;样品 5 的总皂苷含量最高,为 $23.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,最低为样品 12,含量为 $15.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 结果分析

利用 spss 软件进行方差分析,检验采摘时间和采摘树龄对各成分含量影响的显著程度,结果如表 3:可溶性多糖中采摘时间的 $F = 2.557$, $P = 0.157 > 0.05$,差异不显著,说明不同采摘时间对青钱柳叶片中可溶性多糖含量的影响并不显著,采摘树龄的 $F = 15.935$, $P = 0.003 < 0.01$,差异极显著,说明不同采摘树龄对青钱柳叶片中可溶性多糖含量的影响极其显著;总黄酮中采摘时间的 $F = 68771.677$, $P = 0.000 < 0.01$,说明采摘时间对总黄酮含量具有极显著的影响;采摘树龄的 $F = 165.780$, $P = 0.000 < 0.01$,说明采摘树龄对总黄酮含量同样具有极显著的影响;总皂苷中采摘时间的 $F = 18.613$, $P = 0.003 < 0.01$,采摘树龄的 $F = 48.464$, $P = 0.000 < 0.01$,说明采摘时间和采摘树龄对青钱柳叶片中总皂苷的含量都有极显著的影响。在方差分析中表现为影响显著和影响极显著的成分都需要进行进一步的多重比较分析(见表 3)。

表3 采摘树龄和采摘时间对各成分含量影响的方差分析

Tab.3 Variance analysis of the effect of picking age and time on the content of components

成分 Component	源 Source	Ⅲ类平方和 Class III Square Sum	自由度 Freedom	均方 Mean square	F值 F value	自由度 P Degree of freedom P
可溶性多糖 Soluble polysaccharide	采摘时间 Picking time	1.405	2	0.703	2.557	0.157
	采摘树龄 Picking age	13.131	3	4.377	15.935	0.003
总黄酮 Total flavonoids	采摘时间 Picking time	61.847	2	30.923	165.780	0.000
	采摘树龄 Picking age	168.317	3	56.106	300.781	0.000
总皂苷 Total saponins	采摘时间 Picking time	14.059	2	7.029	18.613	0.003
	采摘树龄 Picking age	54.908	3	18.303	48.464	0.000

表4为采摘时间的多重比较结果,从中可见,总黄酮在 $\alpha = 0.05$ 显著水平下,3个采摘时间都在不同列,说明3个采摘时间之间存在显著差异,最高为2017年11月13日;总皂苷在 $\alpha = 0.05$ 显著水平下

3个采摘时间分布在不同列,证明这3个采摘时间两两之间同样具有显著差异,且2017年11月13日采摘的总皂苷含量最高。

表4 不同采摘时间的多重比较(SNK法, $\alpha = 0.05$)

Tab.4 Multiple comparison between different picking time (SNK, $\alpha = 0.05$)

采摘时间 Picking time	个案数 Number of cases	总黄酮 total flavonoids			总皂苷 total saponins		
		1	2	3	1	2	3
2018年4月12日	4	30.3875			17.3475		
2017年8月9日	4		31.9175			18.9000	
2017年11月13日	4			35.7825			19.9850
显著性 Saliency		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

表5为不同采摘树龄间的多重比较结果,从中可见,可溶性多糖在 $\alpha = 0.05$ 显著水平下,树龄3年、4年、10年不在同一列,3个水平间存在显著差异;两年分别与3年和10年在同一列,说明之间没有显著差异;两年和4年不在同一列,存在显著差

异,最高为4年;总黄酮中4个采摘树龄同样不在同一列,说明四个采摘树龄之间同样存在显著差异,最高为两年;总皂苷中4个采摘树龄同样分布在不同列,证明这4个采摘树龄两两之间同样具有显著差异,且树龄为两年时采摘的总皂苷含量最高。

表5 不同采摘树龄的多重比较(SNK法, $\alpha = 0.05$)

Tab.5 Multiple comparison between different picking age (SNK, $\alpha = 0.05$)

个案数 Number of cases	可溶性多糖 Soluble polysaccharide content			总黄酮 Total flavonoids			总皂苷 Total saponins						
	采摘树龄 Picking age	1	2	3	采摘树龄 Picking age	1	2	3	采摘树龄 Picking age	1	2	3	
3	10a	10.84			10a	27.13			10a	15.91			
3	2a	11.62	11.62		4a	31.59			4a	17.99			
3	3a		12.50		3a		35.09		3a			19.24	
3	4a			13.66	2a		36.97		2a			21.82	
	显著性 Saliency	0.12	0.09	1.00	显著性 Saliency	1.00	1.00	1.00	1.00	显著性 Saliency	1.00	1.00	1.00

3 结论与讨论

本次探究利用方差分析和各个水平间的多重比较,发现青钱柳叶片采摘时间和采摘时的树龄,对可溶性多糖含量,总黄酮含量,总皂苷含量会有一定影响。其中采摘树龄对可溶性多糖含量影响分析中 $F = 15.935, P = 0.003 < 0.01$,表现的差异极显著,而

采摘时间对可溶性多糖含量影响分析中 $F = 2.557, P = 0.157 > 0.05$,差异不显著,因此树龄达到4年时,可溶性多糖含量较多,如果想提取更多可溶性多糖,建议选择4年生青钱柳叶片进行采集;采摘时间和采摘树龄分别对总黄酮含量影响分析中 $P = 0.000 < 0.01$,表现为影响极其显著,采摘时间和采摘树龄分别对总皂苷含量影响分析中P值分别为
(下转第114页)

- [J]. 福建林业科技, 2014, 41(2): 231 ~ 234.
- [15] 姬慧娟, 扶志宏, 张利, 等. 生态毯在地震滑坡区植被恢复中应用效果研究. 四川林业科技, 2014a, 35(2): 4 ~ 8.
- [16] 姬慧娟, 徐国栋, 张利, 等. 地震滑坡区覆盖生态毯对土壤湿度和养分的影响. 四川林业科技, 2014b, 35(6): 47 ~ 50.
- [17] 李银, 刘凤明, 潘元友, 等. 采矿迹地生态修复综合技术[J]. 天津农林科技, 2009, (4): 6 ~ 8.
- [18] 于丹丹, 贾黎明, 贾忠奎, 等. 生态垫及保水剂对废弃砂石坑立地造林的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(6): 99 ~ 104.
- [18] 赵廷华, 牛首业, 郭红超, 等. 新型生态植被毯边坡防护技术水土保持效应研究[J]. 人民长江, 2017, 4(13): 20 ~ 22.
- [20] 杨晓晖, 王小平, 秦永胜. 生态垫在京北石质山区盘山公路边坡绿化工程中应用效果评价[J]. 水土保持研究, 2006, 13(3): 119 ~ 120, 123.
- [21] 顾小华, 丁国栋, 刘胜, 等. 一种新型的高速公路边坡生态防护技术[J]. 水土保持研究, 2006, 13(1): 106 ~ 107.
- [22] 李禄军. 绿洲-荒漠交错带生态垫覆盖下沙丘土壤水分动态及预测[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [23] 李禄军, 蒋志荣, 邵玲玲, 等. 生态垫覆盖对沙丘土壤温度的影响[J]. 水土保持通报, 2009, 29(2): 140 ~ 143.
- [24] 杨越, 曹波, 孙保平, 等. 生态垫对流动沙地土壤温湿度和养分的影响[J]. 水土保持研究, 2008, 15(3): 81 ~ 83 + 87.
- [25] 杨志国, 孙保平, 丁国栋, 等. 应用生态垫治理流动沙地机理研究[J]. 水土保持学报, 2007, 21(1): 50 ~ 53.
- [26] 张利, 周庆, 朱欣伟, 等. 生态毯在沙化区植被恢复中的应用效果研究[J]. 现代园艺, 2014, (22): 10 ~ 12.
- [27] 张利, 李杨红, 范宇, 等. 生态毯覆盖对若尔盖沙化草地土壤环境及植被恢复的影响. 林业与环境科学, 2017, 33(1): 24 ~ 28.

(上接第 84 页)

0.003 和 0.000, 均小于 0.01, 同样表现为影响极其显著, 因此当采摘时间在 11 月中旬, 采摘树龄为两年时, 青钱柳叶片中的总黄酮含量和总皂苷含量较高, 如果想获得更多的皂苷和黄酮, 应选择两年生的青钱柳并在每年的 11 月中旬进行采集。此外探究所选取的桂林市花坪保护区本地无性系家系在可溶性多糖含量、黄酮含量、皂苷含量方面都具有较高的水平, 具有很高的培养价值。

提高青钱柳叶片中活性成分的利用率, 一方面是要选择各组分含量较高的时期进行采摘, 另一方面是需要更为合理高效的提取方法, 本次探究主要侧重于总结各组分的采摘时间, 而在提取方法方面, 主要采用的是前人较为常见的方法, 提取率仍有提

高的空间, 在今后的探究工作中, 将着手探索更为高效便捷的青钱柳活性成分提取方法。

参考文献:

- [1] 黄海明. 青钱柳育苗、造林及加工利用技术[J]. 安徽林业科技, 2015, 41(1): 77 ~ 79.
- [2] 李磊, 谢明勇, 易醒. 青钱柳多糖组分及其降血糖活性研究[J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(4): 484 ~ 486.
- [3] 邓小云, 项登峰, 戴美红, 等. 植物多糖药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2006, 12(9): 86 ~ 88.
- [4] 蔡文伟, 张树珍, 杨本鹏. 龙血树属植物黄酮类和甾体类化合物研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(26): 118 ~ 8121.
- [5] 曹纬国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2241 ~ 2247.
- [6] 张云峰, 魏东, 邓雁如, 等. 三萜皂苷的生物活性研究新进展[J]. 中成药, 2006, 28(9): 1349 ~ 1353.