

宁夏枸杞果实发育过程中黄酮类化合物含量的变化研究

王忠忠, 马 茜, 慕金凤, 张自萍

(宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以 5 a 生“宁杞 1 号”为试材, 利用分光光度法测定了枸杞果实发育过程中总黄酮的含量变化, 采用高效液相色谱法测定了宁夏枸杞果实发育过程中芦丁的含量变化。结果表明: 枸杞果实发育过程中总黄酮及其组分芦丁含量总体呈下降趋势。总黄酮含量在花后 9 d 时达到最高, 之后随果实的发育逐渐下降; 青果期黄酮含量下降较快, 至色变期下降趋势减缓, 成熟期含量趋于稳定。花后 9~19 d 时, 芦丁含量急剧下降, 而花后 19~37 d 期间, 降至最低点 0.012 mg/g, 其后变化不大, 基本趋于稳定。

关键词:枸杞; 果实发育; 黄酮; 芦丁

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0152-04

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科枸杞属植物, 具有很强的耐盐碱、耐瘠薄、抗旱、抗风沙等特性, 集中种植在宁夏、新疆、河北、内蒙古等地区, 是西北生态建设和经济发展的先锋树种, 也是西北干旱地区的重要经济作物^[1]。宁夏枸杞是我国传统名贵中药材, 具有增强免疫力、抗氧化、抗肿瘤等多方面的药理作用^[2-3]。黄酮类化合物是宁夏枸杞的有效成分之一, 具有明显的抗氧化作用^[4-6]。目前对宁夏枸杞黄酮的分离鉴定^[7]、定量测定^[8-9]及药理活性^[10-11]的研究已有较多报道, 但对宁夏枸杞果实发育过程中黄酮类化合物的含量变化规律尚鲜见报道。现采用分光光度法测定了宁夏枸杞果实发育过程中总黄酮的含量变化; 采用高效液相色谱法测定宁夏枸杞果实发育过程中芦丁含量的变化规律, 以期为进一步探索黄酮类化合物的积累机制及其调控作用及宁夏枸杞的优质高产栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 5 a 生“宁杞 1 号”为试材, 于 5 月 16 日用毛线绳标记同天开放的花朵 1 万朵(将毛线段系在花梗处)。

第一作者简介:王忠忠(1986-), 男, 硕士研究生, 现主要从事宁夏枸杞化学成分和活性研究等工作。E-mail: wangzhongzhong2009@163.com.

责任作者:张自萍(1970-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事天然产物分析等研究工作。E-mail: zipingzhang@163.com.

基金项目:国家科技支撑计划子课题资助项目(2009BAI72B03)。

收稿日期:2013-01-28

从开花坐果到果实成熟的整个发育过程中, 共取样 7 次, 每次 3 个重复, 果实发育前期, 采样时间间隔较长, 到成熟期适当缩短取样时间。每重复具体采样时间为花后 9 d(5 月 25 日)、14 d(5 月 30 日)、19 d(6 月 4 日)、25 d(6 月 10 日)、29 d(6 月 14 日)、33 d(6 月 18 日)、37 d(6 月 22 日)。采样时间为上午 8:30~9:30, 分别从标记植株树冠的东、南、西、北 4 个方向以及上、中、下、内、外各个方向采取无病虫害的果实装入冰壶带回实验室, 立即测定有关内在成分指标。

主要仪器:CBM-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); SPD-20A 检测器, 二元梯度泵; LC-Solution 色谱工作站, Milli-Q A10 型纯水仪(MILLIPORE); KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); PB303-E 电子天平(METTLER-TOLEDO 仪器公司)。主要试剂: 甲醇、乙腈为色谱纯, 其它为分析纯。芦丁标准品购自中国药品生物制品检定所。

1.2 试验方法

1.2.1 分光光度法测定枸杞总黄酮含量 实验室前期研究表明, 枸杞黄酮化合物含有芦丁, 参考张颖等^[8]方法, 以芦丁为标准品, 用分光光度计法测定枸杞总黄酮的含量。

1.2.2 芦丁标准曲线的制备 精密量取干燥至恒重芦丁标准品 5.0 mg, 加入 80%乙醇溶解, 定容到 25 mL 容量瓶中, 摇匀, 制成 0.2 mg/mL 的对照品溶液。取上述对照品溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加 0.4 mL 5% NaNO₂, 使之混匀, 放置

6 min;加入 0.4 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,摇匀,放置 6 min,加 4 mL 4% NaOH 试液,加水至刻度定容,摇匀放置 15 min,在 510 nm 处测吸光度,以浓度为纵坐标,吸光度为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.3 宁夏枸杞总黄酮的提取和含量测定 精密称取宁夏枸杞鲜果样品 2.000 g,加 30 mL 80%乙醇,60℃超声提取 2 次,每次 30 min,过滤合并滤液,浓缩至 10 mL,加 20 mL 石油醚萃取去除色素,将下层液用 80%乙醇定容至 50 mL,即为宁夏枸杞黄酮提取液。精密量取宁夏枸杞黄酮提取液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,按 1.2.2 项标准曲线制备方法测定其吸光度值。根据下面公式计算枸杞总黄酮百分含量。枸杞总黄酮含量 = $(C \cdot \text{稀释倍数} \cdot V/M) \cdot 10^{-3} \cdot 100\%$,式中,C:样品黄酮浓度(mg/mL);V:供试样品溶液体积(mL);M:样品质量(g)。

1.2.4 高效液相色谱法测定芦丁含量 宁夏枸杞黄酮类化合物的色谱分析条件:色谱柱:岛津 VP-ODS 250 mm×4.6 mm (5 μm);流动相 A:乙腈:水:乙酸(5:29.5:0.5);流动相 B:乙腈:水:乙酸(70:94.5:0.5);洗脱方式:梯度洗脱;流速:0.5 mL/min;检测波长:342 nm;柱温:30℃;进样量:5 μL 。

1.2.5 供试品溶液制备 精密称取宁夏枸杞鲜果样品 2.000 g,加 30 mL 80%乙醇,60℃超声提取 2 次,每次 30 min,过滤合并滤液。40℃减压浓缩至 10 mL,加 20 mL 石油醚萃取除色素。下层液上 HPD-600 型大孔吸附树脂,静置 1 h,蒸馏水洗脱 30 min,以除去水溶性杂质。再用 50%乙醇洗脱,收集醇洗脱液 50 mL,作为样品的供试品溶液。色谱分析时,供试品溶液过 0.45 μm 有机系微孔滤膜。

1.2.6 标准曲线制备 参考廖国玲等^[9]芦丁标准曲线的制备方法。

1.2.7 分析方法学考察 精密度试验:取 1# 样品的供试品溶液,连续进行 5 次,按 1.2.4 所述色谱条件进行色谱分析,记录色谱图。稳定性试验:取 1# 样品的供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12 h 进样,记录色谱图。重现性试验:分别制备 5 份 1# 样品的供试品溶液,进样并记录色谱图。回收率试验:精密称取已知含量的样品,加芦丁对照品适量,按 1.2.5 供试品溶液的制备方法操作,按 1.2.4 色谱条件进行色谱分析。

1.2.8 样品芦丁含量测定 分别吸取 5 μL 供试品溶液进样,按 1.2.4 色谱条件进行色谱分析,利用 LC-Solution 色谱分析软件对芦丁色谱峰的峰面积和峰高进行积分,根据芦丁对照品回归方程计算芦丁含量。

2 结果与分析

2.1 分光光度法测定芦丁标准曲线

以浓度为纵坐标,吸光度为横坐标,绘制标准曲线。

得线性方程 $C=0.0642A+0.0006$,相关系数 $r=0.9999$,表明芦丁在 0.002~0.080 mg/mL 范围内有良好的线性关系。

2.2 高效液相色谱测定芦丁标准曲线

根据试验结果得芦丁回归方程 $Y=5.491025e-0.05X+3.463745e-0.02$, $r=0.9999$ 。表明芦丁在 0.2~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.3 分析方法学考察

精密度试验:取 1# 样品的供试品溶液,连续进行 5 次,按 1.2.4 所述色谱条件进行色谱分析,记录色谱图。芦丁峰相对保留时间 $\text{RSD}<0.84\%$,相对峰面积 RSD 为 0.55%,表明仪器精密度良好。稳定性试验:取 1# 样品的供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12 h 进样,记录色谱图。芦丁峰相对保留时间 $\text{RSD}<0.75\%$,相对峰面积 RSD 为 1.99%,表明供试品在 12 h 内稳定。重现性试验:分别制备 5 份 1# 样品的供试品溶液,进样并记录色谱图。芦丁峰相对保留时间 $\text{RSD}<0.95\%$,相对峰面积 RSD 为 2.65%,表明方法重现性良好。回收率试验:精密称取已知含量的样品,加芦丁对照品适量,按 1.2.5 供试品溶液的制备方法操作,按 1.2.4 色谱条件进行色谱分析,测定平均回收率分别为 98.6%, RSD 分别为 1.14%。

2.4 宁夏枸杞果实发育过程中总黄酮含量的变化趋势

由图 1 可以看出,宁夏枸杞果实在生长发育过程中总黄酮含量变化规律总体上呈下降趋势,总黄酮含量在青果期最高,达到 11.324 mg/g,之后随着果实的发育,黄酮含量逐渐下降,其积累过程可分为 3 个阶段:在青果期即花后 9~19 d 期间,总黄酮含量下降较快;果实发育至色变期时(花后 19~29 d),其含量先增加后降低,花后 25 d 时为一峰值;近成熟期时(花后 29~37 d),黄酮含量处于最低值,并且趋于稳定。

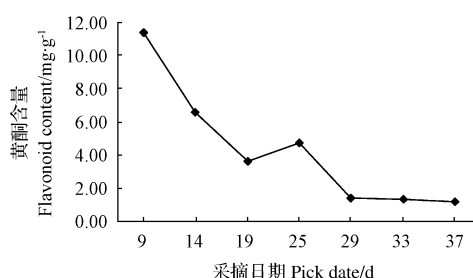


图 1 枸杞果实发育过程总黄酮含量变化趋势

Fig. 1 Change trend chart of total flavonoids content during the fruit development progress of *Lycium barbarum*

2.5 宁夏枸杞果实发育过程黄酮色谱图

根据芦丁对照品的色谱图,确定芦丁峰的保留时间为 45 min(图 2)。不同发育期枸杞果实中黄酮类化合物的色谱图见图 3,由图 3 可以看出,随着果实的发育,芦

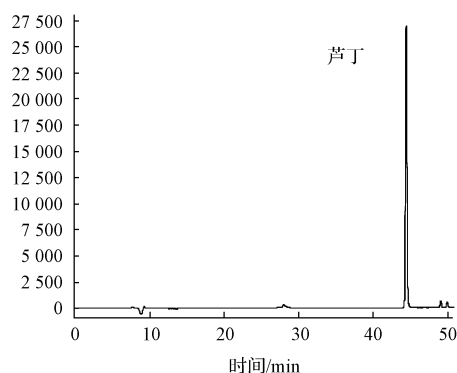


图2 芦丁标准品色谱图

Fig. 2 Rutin standard chromatogram

丁峰高与峰面积逐渐减小,表明枸杞果实发育过程中芦丁的含量呈下降趋势,但随着枸杞果实的发育成熟,黄酮类化合物的组分发生变化。

2.6 宁夏枸杞果实发育过程芦丁含量变化

由图4可知,枸杞果实发育过程芦丁含量的变化总体呈下降趋势。其中芦丁含量在花后9 d时达到最大值0.355 mg/g,随后呈下降趋势,其积累过程与总黄酮略有不同,芦丁其积累过程可分为2个阶段:花后9~19 d时,芦丁含量急剧下降,而花后19~37 d期间,降至最低点0.012 mg/g,其后变化不大,基本趋于稳定。

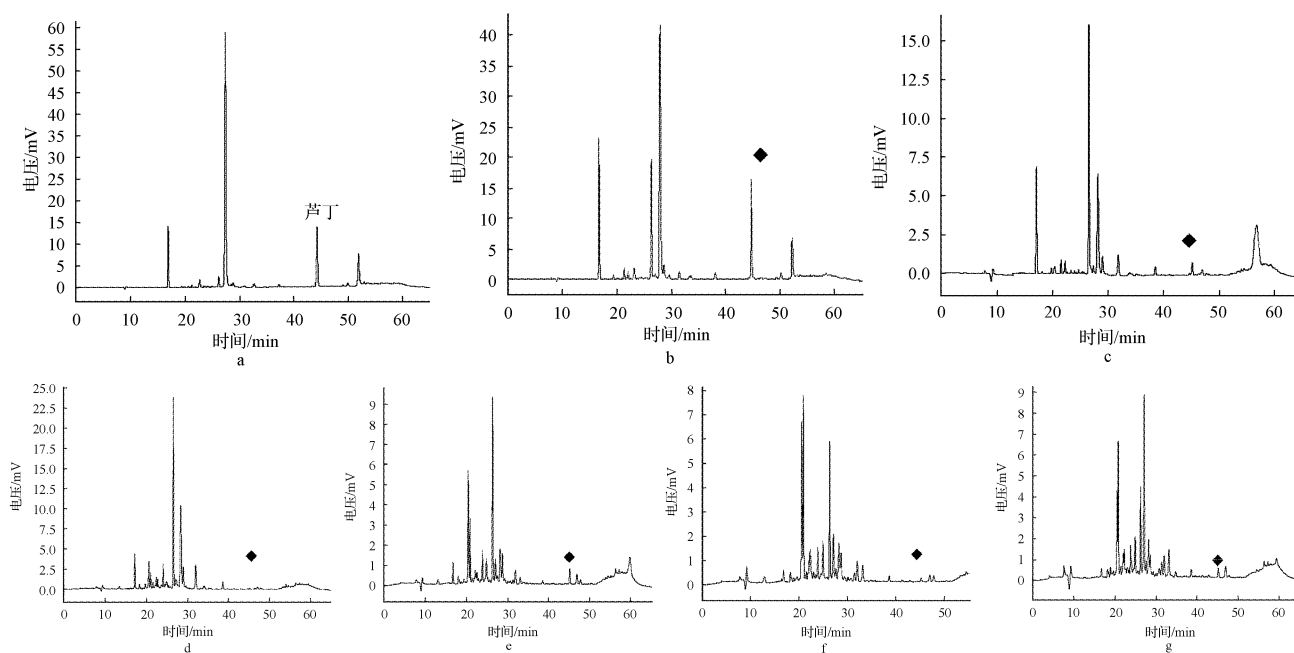


图3 不同成熟期枸杞样品黄酮色谱图

注:a;花后9 d样品;b;花后14 d样品;c;花后19 d样品;d;花后25 d样品;e;花后29 d样品;f;花后33 d样品;g;花后37 d样品。

Fig. 3 The chromatograms of flavonoid in different mature periods of *Lycium barbarum*

Note:a;The samples of 9 days after blossom;b;The samples of 14 days after blossom;c;The samples of 19 days after blossom;d;The samples of 25 days after blossom;e;The samples of 29 days after blossom;f;The samples of 33 days after blossom;g;The samples of 37 days after blossom.

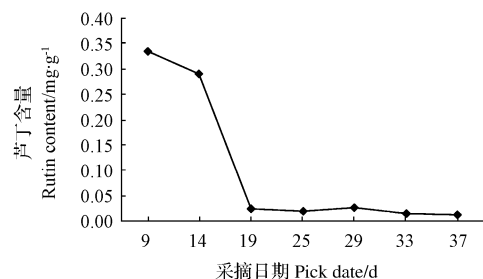


图4 枸杞果实发育过程芦丁含量变化趋势

Fig. 4 Change trend of rutin content during the fruit development progress of *Lycium barbarum*

3 讨论

近年来,有关黄酮类化合物在果实成熟过程中的积

累规律已经在很多物种上有研究。冯美等^[12]对枸杞果实发育过程中果实色素、糖含量的变化研究表明,枸杞果实生长发育过程中叶绿素含量呈下降趋势,类黄酮含量有升有降,至果实成熟时降至最低点,是否与花青苷的合成有关,还有待进一步研究。也有报道指出,黄酮类化合物含量的变化主要与其合成代谢有关,在果实发育后期,其代谢速率可能高于合成速率^[13]。

宁夏枸杞果实发育过程中黄酮类化合物的含量变化之所以呈下降趋势,主要是因为果实形成期和青果期,叶绿素含量较高,光合作用较强,光合产物及其转化产物水平较高,且树体营养丰富,用于合成次生代谢的底物较多,次生代谢物的生物合成作用也较强,致使黄酮含量较高。当果实发育至色变期和成熟期时,光合产

物迅速转化成其它产物,致使光合产物总积累量不够,黄酮类化合物转化的底物相对不够,故含量较低。在生产实践中,可采取如施秋肥、修剪、疏花等措施增加幼果的营养供应和光合作用,以此来增加黄酮类化合物的积累。

枸杞果实成熟时果皮呈红色,主要是由花青苷、类胡萝卜素含量的多少决定,同时叶绿素、类黄酮等其它色素类物质、总酚等次生类物质也影响果皮色泽的最终表现。在果实绿果期间,果皮呈现出叶绿素的颜色,到接近成熟时叶绿素开始降解,表明果实花青苷的迅速形成与前期叶绿素降解有关^[12]。该研究结果表明,随着果实的成熟,黄酮类化合物含量呈下降趋势,与枸杞果实发育过程叶绿素的变化趋势一致,这一结果表明,叶绿素和黄酮类化合物的降解可能都与花青苷的积累存在转化关系。

参考文献

- [1] 白寿宁. 宁夏枸杞研究[M]. 银川:宁夏人民出版社,1998:552-559.
- [2] 孙志刚. 宁夏枸杞药理研究进展[J]. 西北药学杂志,2001,3(16):133-134.
- [3] Li X, Li X, Zhou A. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits *in vitro* [J]. European Polymer Journal,2007,43(2):488-497.
- [4] Luo Q, Cai Y, Yan J, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*[J]. Life Sciences, 2004,76(2):137-149.
- [5] Amagase H, Farnsworth N R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit(Goji)[J]. Food Research International,2011,44(7):1702-1717.
- [6] Nicolec. Antioxidant properties of hydroxy flavones[J]. Free Radical Biology and Medicine,1998,20(1):35-43.
- [7] 张自萍,廖国玲,李弘武. 宁夏枸杞黄酮类化合物 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2008,39(1):103-105.
- [8] 张颖,张立睦,周红英,等. 不同产地枸杞子中黄酮含量的测定[J]. 中国中医药科技,2004,11(2):102-103.
- [9] 廖国玲,张自萍,史晓文. 高效液相色谱法测定不同产地宁夏枸杞中芦丁和绿原酸含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(7):1586-1587.
- [10] 黄元庆,鲁建华,沈泳. 枸杞总黄酮类化合物抗脂质过氧化研究[J]. 卫生研究,1999,28(2):115-116.
- [11] 黄元庆,谭安民,沈泳,等. 枸杞黄酮类化合物清除氧自由基及对小鼠 L1210 癌细胞能量代谢的抑制作用[J]. 卫生研究,1998,27(2):109-111.
- [12] 冯美,宋长冰. 枸杞果实发育过程中果实色素、糖含量的变化[J]. 北方园艺,2005(6):68-69.
- [13] 黄仁华,陆云梅,夏仁学. 纽荷尔脐橙果实发育过程中类黄酮变化与体外抗氧化活性的关系[J]. 食品科学,2009,30(1):35-37.

Changes of Flavonoid Compounds Content During the Fruit Development of *Lycium barbarum* L.

WANG Zhong-zhong, MA Qian, MU Jin-feng, ZHANG Zi-ping

(School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking 5-year-old 'Ningqi No. 1' as material, spectrophotometric method was adopted to determine the changes of total flavones content during growth of *Lycium barbarum*, and HPLC was used to determine the content of rutin. The results showed that the content of flavones and rutin were in decline during the development of *Lycium barbarum*. The content of flavonoid compounds achieved the highest level when 9 days after blossom, then declined with fruit development. The content of flavones declined more rapidly during green fruit period and declined slowing as colour changes period, at this time, the content of flavones was tending towards stability. The content of rutin fell sharply when 9~19 days after blossom, during the 19~37 days after blossom, reduced to the lowest of 0.012 mg/g, the content of rutin was tending towards stability.

Key words: *Lycium barbarum* L.; fruit development; flavonoid; rutin