

1.8%复硝酚钠胁迫对五味子木脂素类成分含量的影响

宋 新, 王 冰, 丁 璞, 李 先 宽, 陈 婷, 吴 亚 男

(辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600)

摘 要:以五味子为试材,研究了不同浓度的1.8%复硝酚钠水剂胁迫对五味子果实木脂素类成分含量的影响。结果表明:五味子醇甲、五味子醇乙、五味子丙素含量最高的是1.8%复硝酚钠的3 000倍稀释液配施底肥处理组,分别为9.57、2.68、1.13 mg/g,显著高于其它处理组。五味子甲素、五味子乙素含量最高的是空白对照组,含量分别为3.14、3.30 mg/g,其中空白对照组五味子甲素的含量显著高于其它处理,但空白对照组的五味子乙素的含量与3 000倍稀释液配施底肥处理组之间差异不显著,与其它处理组差异显著。1.8%复硝酚钠水剂的2 000倍稀释液配施底肥处理组的五味子酯甲的含量显著高于其它处理组,含量为1.90 mg/g。

关键词:五味子;1.8%复硝酚钠;木脂素

中图分类号:R 282.710.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0152-04

五味子为木兰科植物五味子(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.)的干燥成熟果实,味酸、辛、微苦,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心等功效^[1]。现代研究表明,五味子中含有的多种木脂素成分被认为是五味子最主要的药理活性成分,具有保肝^[2-3]、抑制中枢系统^[4]、保护心血管^[5]、抗肿瘤^[6]、抗炎^[7]、抗氧化^[8]等药理作用。目前,有文献报道了复硝酚钠胁迫处理,研究其对五味子生物学特性、初生代谢产物的影响^[9-14],但对次生代谢产物影响的报道很少,对五味子木脂素类成分的影响尚鲜见报道。中药材质量研究是目前中药现代化研究的主要内容,而中药材质量控制研究更是最重要内容之一,目前关于生长调节剂对五味子影响的报道较少,而利用生长调节剂和其它胁迫因素人为控制次生代谢产物形成更鲜见报道。复硝酚钠为单硝化愈创木酚钠盐植物细胞赋活剂,能迅速渗透到植物体内以促进细胞的原生质流动,对植物发根、生长、生殖及结果等发育阶段均有不同程度的促进作用。该试验采用不同浓度的1.8%复

硝酸钠胁迫处理,研究其对五味子的次生代谢产物木脂素类成分含量的影响,以期为提高五味子的质量和可控生产打下基础,为中药材现代化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于辽宁省盖州市高屯镇高屯村,北纬40°26'19.2",东经122°36'17.6",为暖温带大陆性季风气候,平均海拔82 m,年平均气温8.8℃,平均有效积温3 743.6℃,总降水量528.8 mm,无霜期6个月,土壤质地为壤土,土壤中铵态氮含量为17 mg/kg,速效钾含量为159 mg/kg,速效磷含量为57 mg/kg,排灌方便。

1.2 试验材料

供试五味子于2012年9月29日采自辽宁中医药大学五味子试验田。

试验仪器:Agilent 1100型高效液相色谱仪(Agilent公司);KQ-250型超声清洗器(昆山超声仪器有限公司);电子天平(瑞士Mettler Toledo AG285、AE240);SL-2D型土壤养分测试仪(北京顺龙科技发展有限公司)。

试验试剂:复硝酚钠为成都皇牌作物科学有限公司1.8%复硝酚钠水剂;对照品五味子醇甲(110857-200507)、五味子甲素(110764-200609)、五味子乙素(110765-200710)、五味子酯甲(111529-200503)购自中国食品药品检定研究院;五味子醇乙、五味子丙素购自成都思科华生物技术有限公司;分析甲醇(天津大茂)、色谱乙腈(美国Fisher),水为重蒸馏水,磷酸二铵购自山东鲁北企业集团总公司,多肽尿素购自山西天泽煤化工集

第一作者简介:宋新(1988-),女,硕士研究生,现主要从事药用植物种质资源及质量评价等工作。E-mail: songxin19880927@126.com.

责任作者:王冰(1952-),男,教授,博士生导师,现主要从事药用植物种质资源及质量评价等工作。E-mail: wangbing1616@163.com.

基金项目:国家科技基础性工作专项重点资助项目(2007FY110600);辽宁省教育厅资助项目(LT2010067)。

收稿日期:2013-10-24

团股份公司。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计 选择长势一致的3 a生五味子,采用随机区组设计,共设6个处理。处理1:1 000倍1.8%复硝酚钠稀释液配施底肥;处理2:2 000倍1.8%复硝酚钠稀释液配施底肥;处理3:3 000倍1.8%复硝酚钠稀释液配施底肥;处理4:1 000倍1.8%复硝酚钠稀释液;处理5:2 000倍1.8%复硝酚钠稀释液;处理6:3 000倍1.8%复硝酚钠稀释液,以清水为对照(CK),每处理8株。复硝酚钠喷施时间分别为2012年5月23日、2012年6月30日、2012年7月24日,采用叶面喷施,要先上后下,先

里后外,喷至有滴液为止。于5月16日施加0.42 kg/5m²尿素作为底肥、7月4日施加0.5 kg/5m²磷酸二铵为底肥。

1.3.2 色谱条件 采用Agilent TC-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~17 min,50%A;17~25 min,50%A→55%A;25~32 min,55%A→75%A;32~37 min,75%A→70%A;37~42 min,70%A→65%A;42~47 min,65%A→50%A),流速1.0 mL/min,检测波长217 nm,柱温30℃,进样量10 μL,记录色谱峰的保留时间和峰面积,用保留时间定性,根据峰面积结果外标法测定(图1)。

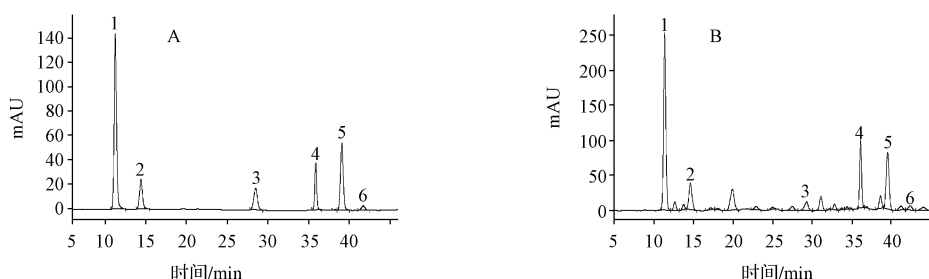


图1 五味子对照品(A)和五味子样品(B)HPLC图

注:1. 五味子醇甲;2. 五味子醇乙;3. 五味子酯甲;4. 五味子甲素;五味子乙素;6. 五味子丙素。

Fig. 1 The chromatograms mixed reference substance of *Schisandra* (A) and sample (B)

Note: 1. Schisandrin; 2. Schisandrol B; 3. Schisantherin A; 4. Deoxyschisandrin; 5. Schisandrin B; 6. Schisandrin C.

1.3.3 溶液的制备 对照品溶液:分别称取对照品五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和五味子丙素适量,精密称定,色谱甲醇超声溶解,补足失重,并定容至25 mL量瓶中,经过0.45 μm的微孔滤膜,依次得到浓度分别为0.2052、0.2092、0.2132、0.1976、0.2036、0.2028 mg/mL的对照品溶液,备用。再分别精密吸取五味子醇甲400 μL、五味子醇乙100 μL、五味子酯甲100 μL、五味子甲素100 μL、五味子乙素200 μL、五味子丙素20 μL,置于1.5 mL EP管中,加甲醇80 μL混合均匀成混合对照品,备用。供试品溶液:取干燥后的五味子果实粉末(干燥至恒重,50目)约0.25 g,精密称定,置于25 mL量瓶中,精密加入甲醇23 mL,30℃超声30 min,取出,冷却至室温,加甲醇定容至刻度线,摇匀,0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

1.3.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品储备液2、5、10、15、20 μL,注入高效液相色谱仪。以进样量为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,经线性回归,测出线性回归方程见表1。

1.3.5 精密度试验 精密吸取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素对照品溶液,按以上色谱条件连续进样6次,记录各自峰面积,并计算其RSD。以对照品峰面积进行计算,得五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五

味子乙素、五味子丙素峰面积的RSD分别为1.2%、1.3%、0.9%、1.1%、1.1%、0.9%,表明仪器进样精密度良好。

表1 被测木脂素成分的线性范围和线性关系

Table 1 Linear ranges and correlation of studied lignans

成分	线性关系	R ²	线性范围/μg
五味子醇甲	$Y=7\ 060.1X+4.5122$	0.9978	0.16416~1.6416
五味子醇乙	$Y=6\ 076.8X-8.8561$	0.9979	0.04184~0.4184
五味子酯甲	$Y=5\ 482.2X-17.0460$	0.9976	0.04264~0.4264
五味子甲素	$Y=6\ 417.4X-1.6220$	0.9979	0.03952~0.3952
五味子乙素	$Y=6\ 431.7X-0.4000$	0.9980	0.08144~0.8144
五味子丙素	$Y=5\ 429.9X+0.9951$	0.9981	0.008112~0.08112

1.3.6 重复性试验 取五味子药材约0.25 g,精密称定,平行6份,按以上供试品溶液制备方法制得供试品溶液,按以上色谱条件测定。五味子药材中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素含量的RSD分别为1.1%、1.2%、1.0%、1.4%、1.4%、1.5%,表明重复性良好。

1.3.7 稳定性试验 精密吸取五味子供试液,按以上色谱条件,分别在0、2、4、6、8、10 h时进样,按峰面积计算得五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素峰面积的RSD分别为1.2%、1.3%、1.5%、1.8%、1.9%、1.7%,表明在10 h内待测组分化学性质稳定。

1.3.8 加样回收率试验 选取已知含量的同一批次五味子果实粉末,每份约 0.1 g,精密称定,分别加入 2.7、0.8、0.6、0.8、1.5、0.1 mL 对照品溶液,按供试品溶液制备方法制备,平行操作此过程,制得 6 份回收率试验供试品溶液,按以上色谱条件进样测定,计算回收率,得 6 种木脂素成分的平均回收率分别为 97.8%、98.4%、99.2%、99.03%、98.6%、100.4%,RSD 分别为 0.9%、0.6%、1.7%、1.5%、0.9%、0.6%。

1.4 数据分析

采用 Excel 进行图表绘制,运用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行统计分析,利用 LSD 多重比较法对不同处理进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度复硝酚钠处理胁迫对五味子醇甲含量的影响

由表 2 可知,处理 3 的五味子醇甲的含量最高,与其它处理间均达到差异显著水平;各处理对五味子醇甲影响依次为处理 3>处理 2>CK>处理 4>处理 6>处理 5>处理 1,各处理之间均达到差异显著水平($P<0.05$)。处理 3 比 CK 高 53.12%,较含量最低的处理 1 高 87.28%。说明 2 000 倍、3 000 倍 1.8%复硝酚钠水剂叶面微肥配施底肥的胁迫处理对五味子醇甲的积累具有促进作用,而 1 000、2 000、3 000 倍 1.8%复硝酚钠水剂叶面微肥喷施胁迫处理与 1 000 倍 1.8%复硝酚钠水剂叶面微肥配施底肥的胁迫处理对五味子醇甲的积累具有很明显的抑制作用。

表 2 不同浓度复硝酚钠处理胁迫对五味子 6 种木脂素含量的影响

Table 2	Effect of compound sodium nitrophenolate stress on lignans contents of six <i>Schisandra chinensis</i> fruits						mg/g
处理	五味子醇甲	五味子醇乙	五味子酯甲	五味子甲素	五味子乙素	五味子丙素	
1	5.11±0.029g	0.97±0.013d	0.95±0.020d	0.79±0.017g	1.87±0.012f	0.31±0.009b	
2	6.82±0.026b	0.94±0.01de	1.90±0.023a	1.47±0.018d	2.81±0.018c	0.15±0.007e	
3	9.57±0.019a	2.68±0.023a	0.91±0.018d	2.52±0.017b	3.28±0.033a	1.13±0.017a	
4	6.01±0.017d	1.56±0.018c	0.58±0.023e	1.25±0.012e	2.90±0.028b	0.15±0.009e	
5	5.42±0.130f	1.73±0.029b	1.38±0.017c	1.14±0.020f	2.37±0.018d	0.27±0.009c	
6	5.78±0.073e	0.92±0.006de	1.58±0.027b	1.99±0.040c	2.30±0.020e	0.25±0.009c	
CK	6.25±0.048c	1.02±0.021d	0.60±0.012e	3.14±0.012a	3.30±0.012a	0.22±0.009cd	

注:表中同列数据后相同字母表示在 $P=0.05$ 水平上经 LSD 检验差异不显著。

Note: Values with the same letter within the same column are not significantly different according to LSD posthoc analysis at $P=0.05$ level.

2.4 不同浓度复硝酚钠处理胁迫对五味子甲素含量的影响

由表 2 可知,CK 五味子中木脂素五味子甲素的含量显著高于其它处理组,各处理组对五味子甲素影响依次为 CK>处理 3>处理 6>处理 2>处理 4>处理 5>处理 1,各处理之间均达到差异显著水平($P<0.05$)。CK 较含量最低的处理 1 高 297.47%。这就说明复硝酚钠的 1.8%水剂的 1 000、2 000、3 000 倍稀释液对五味子甲素的积累都起到了抑制作用。

2.2 不同浓度复硝酚钠处理胁迫对五味子醇乙含量的影响

由表 2 可知,处理 3 的五味子醇乙的含量最高,各处理对五味子醇乙影响依次为处理 3>处理 5>处理 4>CK>处理 1>处理 2>处理 6,处理 1、处理 2、处理 6、CK 之间差异不显著,其它各处理之间均达到差异显著水平($P<0.05$)。处理 3 较 CK 高 162.75%,较含量最低的处理 6 高 191.30%。说明 1 000、2 000 倍 1.8%复硝酚钠水剂叶面微肥喷施胁迫处理与 3 000 倍 1.8%复硝酚钠水剂叶面微肥配施底肥的胁迫处理有助于五味子醇乙的积累,而 1 000、2 000 倍复硝酚钠水剂叶面微肥配施底肥的胁迫处理不利于五味子醇乙的积累。

2.3 不同浓度复硝酚钠处理胁迫对五味子酯甲含量的影响

由表 2 可知,处理 2 的五味子酯甲的含量显著高于其它处理组,各处理组对五味子酯甲影响依次为处理 2>处理 6>处理 5>处理 1>处理 3>CK>处理 4,处理 1 和处理 3 之间差异不显著,CK 和处理 4 之间差异不显著,其它处理组之间达到差异显著水平($P<0.05$)。处理 2 较 CK 高 216.67%,较含量最低的处理 4 高 227.59%。说明 1 000、2 000、3 000 倍复硝酚钠水剂叶面微肥配施底肥的胁迫处理与 2 000、3 000 倍 1.8%复硝酚钠水剂叶面微肥喷施胁迫处理对五味子酯甲含量的积累具有促进作用,而 1 000 倍 1.8%复硝酚钠水剂叶面微肥喷施胁迫处理对五味子酯甲含量的积累效果不显著。

2.5 不同浓度复硝酚钠处理胁迫对五味子乙素含量的影响

由表 2 可知,CK 的五味子乙素的含量最高,除与处理 3 差异不显著外,显著高于其它处理组,其它各处理之间均达到差异显著水平($P<0.05$),各处理组对五味子乙素影响依次为 CK>处理 3>处理 4>处理 2>处理 5>处理 6>处理 1。CK 较含量最低的处理 1 高 75.40%。这就说明复硝酚钠的 1.8%水剂的 1 000、2 000、3 000 倍稀释液对五味子乙素的积累都起到了抑制作用。

2.6 不同浓度复硝酚钠处理胁迫对五味子丙素含量的影响

由表 2 可知,处理 3 的五味子丙素的含量最高,各处理组对五味子丙素影响依次为处理 3>处理 1>处理 5>处理 6>CK>处理 4=处理 2,各处理之间均达到差异显著水平($P<0.05$)。处理 3 的五味子丙素的含量较含量最低的处理 2 和处理 4 高 653.33%,较 CK 高 413.64%。这说明 1 000、3 000 倍复硝酚钠水剂叶面微肥配施底肥的胁迫处理与复硝酚钠的 1.8%水剂的 2 000、3 000 倍稀释液对五味子丙素的积累具有促进作用,2 000 倍复硝酚钠水剂叶面微肥配施底肥的胁迫处理与复硝酚钠的 1.8%水剂的 1 000 倍稀释液对五味子丙素的积累具有抑制作用。

3 结论与讨论

该试验采取 HPLC 法对 2012 年 9 月 29 日采集的五味子在 1.8%复硝酚钠 1 000、2 000、3 000 稀释液胁迫条件下的五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素含量进行了测定。研究表明,这 6 种木脂素对不同稀释倍数的 1.8%复硝酚钠水剂具有不同的响应,其中 1.8%复硝酚钠的 3 000 倍稀释液配施底肥处理对五味子醇甲、五味子醇乙、五味子丙素含量的积累最有利,1.8%复硝酚钠水剂的 2 000 倍稀释液配施底肥处理对的五味子酯甲的积累最有利,而 CK 的五味子甲素、五味子乙素的含量最高。

中药材的有效成分是植物在生长过程中产生的次生代谢产物,而次生代谢产物的产生主要是植物在逆境条件下为了更好的适应生存而形成的特殊保护代谢物质,该试验为五味子药材的现代化生产提供具有实际意义的理论基础,也为中药材质量的可控性研究奠定了基础。

Effect of 1.8% Compound Sodium Nitrophenolate Stress on Lignans Content of *Schisandra chinensis* Fruits

SONG Xin, WANG Bing, DING Pu, LI Xian-kuan, CHEN Ting, WU Ya-nan

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian, Liaoning 116600)

Abstract: Taking *Schisandra chinensis* fruit as material, the effect of plant growth regulator 1.8% compound sodium nitrophenolate diluent stress on effective components lignans contents were studied. The results showed the content of schisandrin, schisandrol B, schisandrin C under compound sodium nitrophenolate 3 000 times 1.8% diluent with base fertilizer were significantly higher than the other treatment groups and the content were respectively, 9.57, 2.68, 1.13 mg/g. The highest content of deoxyschisandrin was the CK *Schisandra chinensis* fruits and the content was 3.14 mg/g which was significantly higher than the other treatment groups. The content of schisandrin B of CK group with 1.8% compound sodium nitrophenolate 3 000 times diluent with base fertilizer treatment was 3.30 mg/g which was significantly higher than other treatment groups. The content of schisantherin A of compound sodium nitrophenolate 2 000 times 1.8% diluent with base fertilizer was 1.90 mg/g which was significantly higher than the other treatment groups.

Key words: *Schisandra chinensis*; 1.8% compound sodium nitrophenolate; lignans

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] 张明华, 陈虹, 李灵芝, 等. 五味子甲素和五味子醇甲对四氯化碳所致肝脏损伤的保护作用[J]. 武警医学, 2002, 13(7): 395-396.
- [3] Mizoguchi Y, Shin T, Kobayashi K, et al. Effect of gomisin A in an immunologically-induced acute hepatic failure mode[J]. *Planta Med*, 1991, 57(1): 11-14.
- [4] 李海涛. 五味子醇甲抑制 6-羟基多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2004, 20(2): 96-98.
- [5] Lin T J, Liu G T, Pan Y. Protective effect of schisanhenol against oxygen radical induced mitochondrial toxicity on rat heart and liver[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 1992, 5(1): 57-64.
- [6] Huang M, Jin J, Sun H, et al. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance of cancer cells by five schizandrin isolated from the Chinese herb *Fructus Schizandrae*[J]. *Cancer Chem Other Pharmacol*, 2008, 62(6): 1015-1026.
- [7] 叶冰, 却翎, 包·照日格图, 等. 干姜-细辛-五味子药对的止咳、抗炎作用研究[J]. 四川中医, 2010(11): 61-62.
- [8] 商红军, 孟宪军, 李斌, 等. 北五味子乙素体外抗氧化及抑菌作用的研究[J]. 食品工业科技, 2012(2): 170-172.
- [9] 沈奕德, 陈幸华, 杨吉琼. 复硝酚钠水剂在妃子笑荔枝上的应用效果[J]. 热带农业科学, 2004, 24(6): 17-20.
- [10] 刘彩迎. 复硝酚钠和外源 NO 对菊花成花与品质的调控效应研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2011.
- [11] 刘海英, 刘彩迎, 王利椿, 等. 复硝酚钠对菊花花芽形成及生理特性的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2011, 39(2): 119-121.
- [12] 于彩莲, 刘波, 燕红, 等. 复硝酚钠及其组分对大豆种子萌发的影响[J]. 大豆科学, 2010, 29(3): 440-443.
- [13] 燕丛, 徐坤. 复硝酚钠、DA-6 配施对生姜产量的影响[J]. 山东农业科学, 2011(7): 73-75, 85.
- [14] 吴建辉, 陈清香, 王泽清, 等. 复硝酚钠对番茄生长的调节效果[J]. 浙江农业科学, 2010(2): 258-259.