

大量元素氮胁迫对五味子木脂素类成分含量的影响

宋 新, 丁 璞, 李先宽, 陈 婷, 陈 靓, 王 冰

(辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600)

摘 要:以五味子为试材,研究了大量元素氮胁迫对五味子果实木脂素类成分含量的影响。结果表明:处理2(5月16日、7月2日分别施多肽尿素0.042、0.084 kg/m²)的五味子中五味子甲素、五味子丙素含量最高,分别为1.97、1.11 mg/g,显著高于其它处理组;处理3(5月16日、7月2日分别施多肽尿素0.084、0.168 kg/m²)的五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲含量最高,分别为9.46、3.01、2.15 mg/g,显著高于其它处理;空白五味子乙素含量最高,显著高于其它处理,为1.99 mg/g;表明适宜的大量元素氮胁迫有利于五味子中木脂素含量的积累。

关键词:五味子;氮胁迫;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)06-0155-04

氮是植物体内许多重要有机化合物的组成成分,尤以蛋白质和核酸最为重要,因为它们是植物生长发育和生命活动的基础物质。五味子为木兰科植物五味子 [*Schisandra chinensis* (Turez.) 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]。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]、抗肿瘤^[5]、抗炎^[6]、抗氧化^[7]等药理作用,其中经人工合成提炼的有效成分五味子丙素经人工合成提炼而成“联苯双酯”已在临床应用于治疗肝炎^[8]。关于大量元素氮胁迫对五味子果实形态、千粒重、产量、木脂素含量的影响尚鲜见报道。该试验采用氮胁迫因素多个水平,对五味子的次生代谢产物木脂素类成分含量影响进行研究,筛选出大量元素氮胁迫的处理组进行分析,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

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:2013-11-19

Effect of Different Amount of Nitrogen Fertilizer on Reproductive Traits and Yield Traits of *Atractylodes japonica*

ZHUANG Yun, MA Yao, MEI Dong-jiao

(Jilin College of Science and Technology of Agriculture, Jilin, Jilin 132109)

Abstract: Taking *Atractylodes japonica* as material, 5 treatments, 5 kg/667m² (N1), 10 kg/667m² (N2), 15 kg/667m² (N3), 20 kg/667m² (N4), 25 kg/667m² (N5) were set to discussing application of different amount of nitrogen fertilizer on the effect of *Atractylodes japonica* reproductive traits and yield traits with no fertilizer as CK, the fertilizer amount in favour of *Atractylodes japonica* and high yield were studied. The results showed that the fertilizer on the yield and quality of *Atractylodes japonica* had greatly improved. Compared with no fertilizer control, the effect of different fertilizer application on yield reached significant difference or extremely significant level. The best application amount of 15 kg/667m² (N3).

Key words: *Atractylodes japonica*; reproductive traits; yield traits; fertilizer application amount

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:多肽尿素(N 含量 46.6%,山西天泽煤化工集团股份有限公司);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;甲醇为分析纯、乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计 选择长势一致的三年生五味子,采用随机区组设计,共设 3 个处理,1 个空白对照(CK)。每 8 株 1 个处理。氮胁迫的时间为 2012 年 5 月 16 日、2012 年 7 月 4 日,多肽尿素应施于植株下方 16~26 cm,土施后,随即用水淋洗苗木并使尿素溶解后随水分下渗到苗木根部土层中(表 1)。

表 1 不同多肽尿素施加量氮胁迫试验

	urea application			
	处理 1(CK)	处理 2	处理 3	处理 4
5 月 16 日	—	0.042	0.084	0.336
7 月 2 日	—	0.084	0.168	0.672

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)。

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、

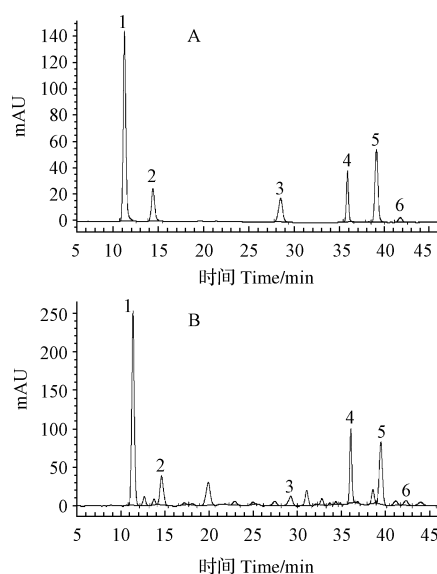


图 1 五味子对照品(A)和五味子样品(B)HPLC 图

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;5. 五味子乙素;6. 五味子丙素。

Fig. 1 HPLC of reference substance of *Schisandra* (A) and sample (B)

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

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,取续滤液即得。

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测定。以进样量为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,经线性回归,线性回归方程见表 2。

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。

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 1.3.3 供试品溶液制备方法制得供试品溶液,按 1.3.2 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、

表 2 被测木脂素成分的线性范围和线性关系

Table 2 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

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 不同处理胁迫对五味子醇甲含量的影响

由表 3 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的次序为处理 3>处理 2>处理 1>CK，各处理之间均达到差异显著水平($P<0.05$)。处理 3 较含量最低的 CK 高 104.76%，说明处理 1、处理 2、处理 3 胁迫对五味子醇甲的积累具有促进作用，有利于提高五味子

品质。

2.2 不同处理胁迫对五味子醇乙含量的影响

由表 3 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的次序为处理 3>处理 2>处理 1=CK，各处理之间均达到差异显著水平($P<0.05$)。处理 3 较含量最低的 CK 高 140.8%。说明处理 1、处理 2、处理 3 氮胁迫处理有助于五味子醇乙的积累，有利于提高五味子品质。

2.3 不同处理胁迫对五味子酯甲含量的影响

由表 3 可知，处理 3 的五味子酯甲含量显著高于其它处理，各处理对五味子酯甲影响的次序为处理 3>处理 1>处理 2=CK，差异显著($P<0.05$)。处理 3 较含量最低的处理 2 高 155.95%，较 CK 高 150%。说明处理 1、处理 2、处理 3 的氮胁迫处理对五味子酯甲含量的积累具有促进作用，有利于五味子品质的提高。

2.4 不同处理胁迫对五味子甲素含量的影响

由表 3 可知，处理 2 五味子中木脂素五味子甲素的含量显著高于其它处理，各处理对五味子酯甲影响的次序为处理 2>处理 3=CK>处理 1，差异显著($P<0.05$)。处理 2 较含量最低的处理 1 高 97%。这就说明处理 2 对五味子甲素的积累具有促进作用，有利于五味子品质的提高。

2.5 不同处理组胁迫下五味子乙素含量的影响

由表 3 可知，CK 的五味子乙素的含量最高，其它处理都低于 CK，各处理组对五味子乙素影响的次序为 CK>处理 3>处理 1>处理 2，差异显著($P<0.05$)。这就说明处理 1、处理 2、处理 3 对五味子乙素的积累都起到了抑制作用。

表 3 不同多肽尿素处理胁迫对五味子 6 种木脂素含量的影响

Table 3 Effect of polypeptide urea on the content of 6 lignans of *Schisandra chinensis* fruits

处理	五味子醇甲含量	五味子醇乙含量	五味子酯甲含量	五味子甲素含量	五味子乙素含量	五味子丙素含量	总木脂素含量
1	4.71±0.012c	1.32±0.024c	1.08±0.038b	1.00±0.012c	1.31±0.017c	0.04±0.010c	9.59±0.18d
2	8.08±0.012b	1.92±0.023b	0.84±0.035c	1.97±0.021a	0.36±0.021d	1.11±0.029a	14.27±0.12b
3	9.46±0.015a	3.01±0.032a	2.15±0.037a	1.33±0.0215b	1.63±0.023b	0.21±0.006b	17.80±0.048a
CK	4.62±0.020d	1.25±0.029c	0.86±0.026c	1.39±0.026b	1.99±0.017a	0.16±0.012b	10.28±0.013c

注：表中同一参数同列数据相同字母表示在 $P=0.05$ 水平上经 LSD 检验差异不显著。

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

2.6 不同处理胁迫下五味子丙素含量的影响

由表3可知,处理2的五味子丙素的含量最高,各处理对五味子酯甲影响的次序为处理2>处理3=CK>处理1,各处理差异显著($P<0.05$)。处理2的五味子丙素的含量较含量最低的处理1高23.09倍,较CK高85.59%。这说明处理2对五味子丙素的积累具有促进作用,有利于五味子品质的提高。

3 结论与讨论

该试验采取HPLC法对2012年9月16日采集的处理1、处理2、处理3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同时测定。研究结果显示,该6种木脂素对不同胁迫量的尿素处理具有不同的响应,其中处理3最有利于对五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲含量的积累,处理2最有利于五味子丙素的积累释液配施底肥处理对的五味子酯甲的积累最有利,处理3对五味子总木脂素含量的积累最有利。目前,对于如何提高五味子木脂素含量,只有通过不同的炮制方法才能实现^[8-12],而在根生产源上如何提高五味子木脂素成分却鲜见报道。

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,该研究为五味子药材的现代化生产提供了具有实际意义的理论基础,也可为中药材质量的可控性研究奠定基础。

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] Lin T, Liu G, 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.
- [3] 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.
- [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] 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.
- [6] 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.
- [7] 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, 217.
- [8] 福宝. 联苯双酯在防治肝炎中的作用及其防反跳措施[C]//中华中医药学会学术年会-创新优秀论文集, 2002: 251-252.
- [9] 崔九成, 宋小妹, 蔡艳, 等. 酒蒸南五味子炮制原理初探[J]. 中成药, 2005, 27(2): 176-178.
- [10] 田建红. 不同炮制方法对五味子中木脂素类成分含量的影响[J]. 药事进展, 2009, 33(6): 267-270.
- [11] 逢世峰, 郑培和, 许世泉, 等. 炮制对北五味子木脂素类成分的影响[J]. 中成药, 2011, 33(2): 284-286.
- [12] 周艳, 祁英杰, 闫小玉, 等. 北五味子及其不同炮制品中6种木脂素类成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3449-3452.

Effect of Major Nutrient Elements Nitrogen Stress on Lignans Content of *Schisandra chinensis* Fruits

SONG Xin, DING Pu, LI Xian-kuan, CHEN Ting, CHEN Liang, WANG Bing

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

Abstract: Taking *Schisandra chinensis* as material, the effect of major nutrient elements nitrogen on effective components lignans were studied. The results showed that the content of deoxyschisandrin, schisandrin C under treatment 2 (0.042, 0.084 kg/hm² polypeptide urea were applied at May 16th and July 2th) were significantly higher than the other treatment groups and the content were respectively 1.97, 1.11 mg/g. The content of schisandrin, schisandrol B, schisantherin A under treatment 3 (0.084, 0.168 kg/m² polypeptide urea were applied at May 16th and July 2th) were significantly higher than the other treatment groups and the content were respectively 9.46, 3.01, 2.15 mg/g. The highest content of schisandrin B was the CK *Schisandra chinensis* fruits and the content was 1.99 mg/g which was significantly higher than the other treatment groups. The effect major nutrient elements nitrogen stress on the content of lignans of *Schisandra chinensis* fruits was more significant.

Key words: *Schisandra chinensis*; nitrogen stress; lignans