

用新技术——亚硝酸盐法和质谱分析技术测定增补UV-B辐射后黄檗总黄酮和生物碱含量

高欣

黑龙江七台河桃山湖国家湿地公园发展中心

【摘要】本文对黄檗增补UV-B辐射强度为 $9.78 \mu\text{w} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$ (高剂量)和 $3.26 \mu\text{w} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$ (低剂量), 分别进行10d (短期)、25d (过渡期)以及40d (长期)的处理, 采用新方法——亚硝酸盐法和质谱分析法, 测定根、茎、叶总黄酮、生物碱含量。研究发现: 增补UV-B辐射可促进黄檗茎和叶片总黄酮积累, 且剂量越高积累的总黄酮含量越高; 处理时间延长, 小檗碱和掌叶防己碱的含量明显升高; 低剂量的UV-B辐射可以提高小檗碱和掌叶防己碱的含量, 一定程度上促进了黄檗幼苗生物碱的合成和积累。

【关键词】UV-B辐射; 黄檗; 总黄酮; 生物碱

【DOI】10.12252/j.issn.2096-6288.2020.02.949

一、研究目的和意义

黄檗 (*Phellodendron amurense* Rupr.) 别名黄菠萝、檠木, 与水曲柳、胡桃楸同被誉为“东北三大硬阔”。长期以来我国经济市场活跃, 尤其是对中药材过度开发利用, 导致对野生黄檗资源大量减少, 目前黄檗已被我国列入渐危物种^[1]。黄檗中的生物碱 (小檗碱、药根碱、掌叶防己碱) 有很高的药用价值^[2], 人工高效培育黄檗既能满足市场需求, 又能使野生黄檗资源得到保护^[3]。近年来用亚硝酸盐法和质谱分析法研究增补UV-B辐射对木本药用植物的生理及有效成分影响的报道很少见。本文通过对药用植物黄檗进行不同时间、不同剂量UV-B辐射处理, 用亚硝酸盐法和质谱分析法测定总黄酮和生物碱含量, 对今后黄檗的优质、高效培育以及黄檗药用资源的开发具有重要意义^[4]。

二、实验设计与方法

(一) 实验设计

实验材料: 8月龄黄檗苗, 实验设置3组, 每组各100盆。CK组: 在自然情况下生长; T1组: 相同条件下增补UV-B, 辐射强度为 $9.78 \mu\text{w} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$, T2组: 增补UV-B, 辐射强度为 $3.26 \mu\text{w} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$ 。均置于 $2\text{m} \times 1\text{m}$ 的不透光的框架内, 每组之间用黑布隔开, 以防干扰。植株上方悬挂40WUV-B (280-310nm) 的紫外灯管, 灯管外部包被0.08mm的醋酸纤维膜, 消除UV-C辐射对实验的影响, 每天照射12h (6:00-18:00)。

(二) 实验方法

1. 总黄酮测定方法。亚硝酸盐法: 取黄檗叶片0.1g剪碎, 加80%的乙醇2ml, 超声20min, 8000r/min离心10min, 取提取液1ml, 加80%乙醇2ml, 再加入5%亚硝酸钠0.5ml, 定容至10ml。放置6min后加入10%硝酸铝0.5ml, 静置数分钟后加入4%NaOH放置15min后, 测定OD510nm的吸光值, 根据实验求出回归方程, 计算总黄酮含量, 单位为 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 。

2. 生物碱测定方法。质谱分析法: 黄檗苗烘干粉碎, 过60目筛, 称取样品0.1g, 加2ml甲醇 (色谱纯) +1%冰醋酸 (色谱纯) 浸泡5小时, 超声4h, 抽取上清液, 离心15min, 取上清再次离心15min。采用质谱分析仪进行测定。色谱条件: A泵: 0.05%甲酸 (色谱纯), B泵: 甲醇。取10ul提取液进行小檗碱、药根碱、掌叶防己碱的质谱检测, 每个样品运行5min。

三、结论

(一) 黄檗根部总黄酮含量

CK组、T1组和T2组, 根部总黄酮含量呈显著性差异 ($P < 0.05$)。实验处理期间黄檗幼苗根部总黄酮含量总体上呈下降趋势, UV-B辐射处理第10d, T1组和T2组较CK组总黄酮含量分别下降了19.45%、7.46%; 第25d, T1组和T2组较CK组分别下降了23.71%、12.40%; 实验处理第40d, T1组较CK组下降了16.49%, T2则与CK组相持平。

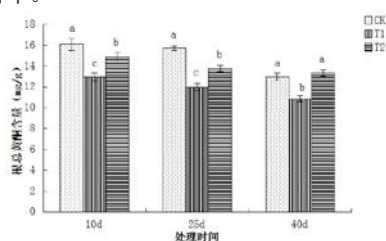


图3-1 不同UV-B处理黄檗幼苗根部总黄酮含量比较

(二) 黄檗幼苗茎部总黄酮含量

CK组、T1组和T2组, 茎部总黄酮含量呈显著性差异 ($P < 0.05$)。10d和25d, T1组、T2组茎部总黄酮含量均高于CK组, 且T1组高于T2组。处理10d, T1组和T2组茎部总黄酮含量较CK组分别增多了34.07%、15.33%; 第25d, T1组和T2组茎部总黄酮含量较CK组分别增多了38.41%、18.48%; 第40d, T2组和CK差异不显著 ($P > 0.05$), T1组则显著低于CK组 ($P < 0.05$), 较CK组下降了7.35%。可能是因为在UV-B辐射下, 促进了黄檗幼苗总黄酮的积累, 以有效吸收过多的紫外辐射, 对自身起到保护作用, 在一定时期内, 辐射剂量越大, 积累的总黄酮物质越多。

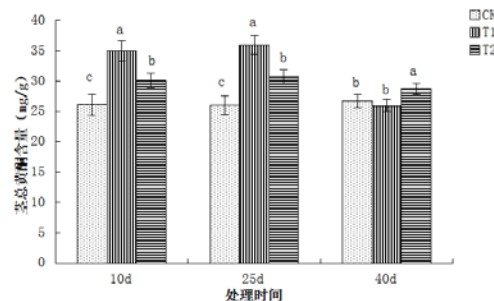


图3-2 不同UV-B处理黄檗幼苗茎部总黄酮含量比较

(三) 黄檗叶片总黄酮含量

CK组、T1组和T2组总黄酮含量呈显著性差异 ($P < 0.05$)。T1组、T2叶片总黄酮含量均显著高于CK组, 且随着UV-B处理的延长T1组和T2组黄檗叶片总黄酮的含量显著升高 ($P < 0.05$), 整个过程中T1组均高于T2组。处理第10d, T1组和T2组分别比CK组叶片总黄酮含量增多22.28%、10.80%; 第25d, T1组和T2组比CK组叶片中总黄酮含量分别增多29.35%、18.45%, 实验处理第40d, T1组和T2组比CK组叶片中总黄酮含量分别增多35.99%、23.26%。

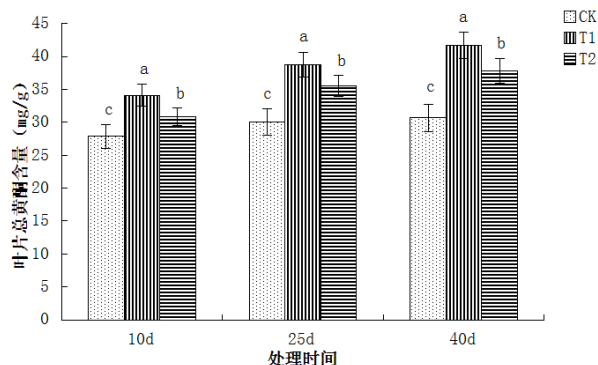


图3-3 不同UV-B处理黄檗幼苗叶片总黄酮含量比较

(四) 黄檗整株总黄酮含量

CK组、T1组和T2组, 黄檗整株总黄酮含量呈显著性差异 ($P < 0.05$)。三组整株幼苗总黄酮含量显著升高, T1组和T2组显著高于CK组, 实验处理10d、25d、40d, 三组幼苗总黄酮含量由高到低依次为T1组、T2组、CK组。

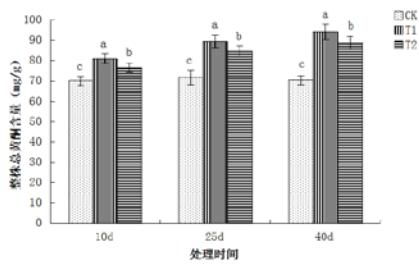


图3-4 不同UV-B处理黄檗幼苗整株总黄酮含量比较

(五) 药根碱含量

CK组、T1组和T2组差异显著 ($P < 0.05$), T1组和T2组的整株药根碱含量总体上呈上升趋势, 并且T1组和T2组始终低于CK组, 实验处理第10d, T1组与T2组分别低于CK组的37.60%、144.83%; 实验处理第25d, T1组与T2组分别低于CK组的141.72%、283.78%; 实验处理第40d, T1组与T2组分别低于CK组的21.95%、14.15%。

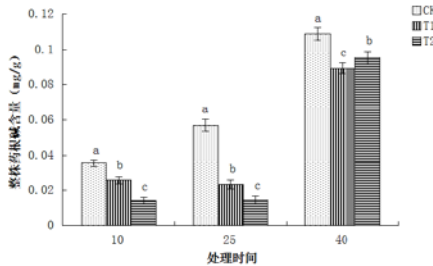


图3-5 不同UV-B处理黄檗整株药根碱含量比较

(六) 掌叶防己碱含量

通过对黄檗整株掌叶防己含量的测定, 结果发现黄檗整株幼苗的掌叶防己碱的含量在辐射处理前期和中期含量变化不明显, 随着UV-B辐射处理时间的延长, 整株幼苗的掌叶防己含量显著升高, T1组与T2组分别较CK组增加了13.01%、17.86%。

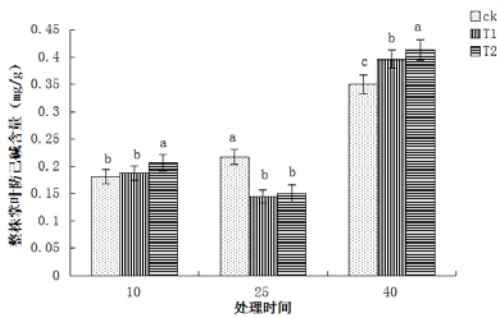


图3-6 不同UV-B处理黄檗整株掌叶防己碱含量比较

(七) 小檗碱含量

CK组、T1组和T2组差异显著 ($P < 0.05$), 小檗碱含量总体呈缓慢升高趋势, 处理前25d, T1组和T2组的整株小檗碱含量低于CK组, 实验处理第10d, T1组和T2组分别低于CK组的76.26%、11.16%; 实验处理第25d, T1组和T2组分别低于CK组的128.64%、98.65%; 实验处理第40d, T1组低于CK组6.76%, T2组则明显高出CK组6.18%。

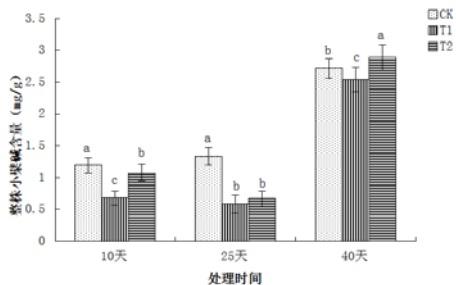


图3-7 不同UV-B处理黄檗整株小檗碱含量比较

四、讨论

大量研究表明增补UV-B辐射可显著影响植物次生代谢产物含量, 植物受到UV-B辐射等逆境伤害时, 会产生一系列保护机制, 以此来减少不利环境对其造成的伤害^[5]。很多研究认为植物在受到UV-B辐射时, 叶片内每一特定的总黄酮对紫外线的不同波段都存在特定的吸收波长, 这就导致UV-B辐射条件下, 不同总黄酮物质积累在含量和速度上所呈现出来的差异性^[5]。植物通常通过改变黄酮类化合物的合成种类、合成途径, 来应对过多的UV-B辐射^[5]。过多的UV-B辐射可使植物叶片内总黄酮含量增加, Warren等对三个树种 (*Pinus ponderosa*, *Quercus rubra*, *Pseudotsuga menziesii*.) 的研究认为, 经过UV-B 辐射处理后三个树种总黄酮的含量明显增加, 且总黄酮的组成成分也发生了明显变化^[6]。本实验对黄檗总黄酮含量的研究结果与其一致。

生物碱是药用植物重要的次生代谢产物, 其合成受植物种类、植物所处的生长发育阶段以及植物所生存的环境等多方面的影响^[5]。质谱分析技术分析植物受UV-B胁迫后生物碱含量的测定, 具有灵敏度高、快速、便于混合物含量分析等优点, 是其他分析技术无法比拟的^[7]。本实验认为低剂量的UV-B辐射刺激了黄檗对紫外吸收物质的合成, 激活了保护酶的活性^[8], 从而使掌叶防己碱和小檗碱的含量增加; 而高剂量的UV-B辐射对黄檗次生代谢产物的合成前体造成了损坏, 从而降低了生物碱的含量^[9]。此外, UV-B辐射对黄檗的影响还体现在处理时间上, 增补UV-B辐射初期, 由于黄檗不能及时调整内部的生物碱合成机制^{[10][11]}, 导致前期生物碱积累量的减少, 而长期的UV-B辐射处理使黄檗逐渐增加了对紫外辐射的适应性^[12], 从而增加了次生代谢产物的积累。

参考文献:

[1] 易雪梅, 姬兰柱. 珍稀濒危物种黄檗的研究现状[J]. 当代农业: 中英文版, 2013

[2] Santos I, Fidalgo F, Almeida J. M. et al. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation[J]. Plant Science, 2004, 167 (4): 925-935.

[3] 王海霞, 刘文哲增强UV-B辐射对喜树幼苗生物量和两种生物碱含量的影响[J], 植物科学学报, 2011, 29 (6): 712-717

[4] Ren J, Duan B, Zhang X, et al Differences in growth and physiological traits of two poplars originating from different altitudes as affected by UV-B radiation and nutrient availability[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 138 (3): 278-288.

[5] 张玉红, 程楷珊, 高欣, 张锡国等. 黄檗幼苗抗氧化物质及生物碱含量对UV-B辐射增强响应[J]. 北京林业大学学报, 2018

[6] Warren J. M., Bassman J. H. Alteration of foliar flavonoid chemistry induced by enhanced UV-B radiation in fieldgrown *Pinus ponderosa*, *Quercus rubra* and *Pseudotsuga menziesii*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2002, 66 (2): 125-133.

[7] He J., Huang L. K., Chou W. S. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on rice and pea plants[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1993, 20: 129-142.

[8] 冯虎元, 安黎哲, 徐世健等. 紫外线-B辐射增强对大豆生长、发育、色素和产量的影响[J]. 华北农业学报, 2013, 21 (5): 79-82.

[9] 刘敏, 李荣贵, 范海等. UV-B辐射对烟草光合色素和几种酶的影响[J]. 西北植物学报, 2007, 27 (2): 291-296.

[10] 牛传坡, 蒋静艳, 黄耀. UV-B辐射对土壤-冬小麦系统碳氮转化的影响[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2007, 26 (4): 470-471.

[11] 李雪梅, 何兴元, 张利红等. 紫外辐射对菜豆不同叶位叶片光合及保护酶活性的影响[J]. 生态学杂志, 2006, 25 (5): 517-520.

[12] 孙令强, 李召虎, 段留生等. UV-B辐射对黄瓜幼苗生长和光合作用的影响[J]. 华北农业学报, 2006, 21 (6): 79-82.