

安开龙,李德坤,周大铮,等. 五味子果实生长发育及化学成分动态变化研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):234-239.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.080

五味子果实生长发育及化学成分动态变化研究

安开龙¹, 李德坤^{2,3}, 周大铮^{2,3}, 李仁⁴, 叶正良², 郭巧生¹

(1. 南京农业大学中药材研究所, 江苏南京 210095; 2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410;
3. 天津市中药注射剂新技术开发与应用重点实验室, 天津 300410; 4. 辽宁鑫泰药业有限公司, 辽宁抚顺 113200)

摘要:以辽宁省产五味子为研究对象,在7—9月果实发育期采样,测定不同生长阶段果实的外观性状及主要化学成分变化,用主成分分析方法对不同生长期的五味子品质进行综合评价,并结合产地实际情况确定五味子适宜采收期。结果表明,在整个生长过程中,不同化学成分变化趋势不同;木脂素成分在一定时间内呈现先升高后降低的趋势,整体呈现倒“V”形分布,其中8月上旬果实中木脂素成分含量最高;辽宁省产地的五味子适宜采收期在9月上旬。

关键词:五味子;化学成分;动态变化;主成分分析;采收期

中图分类号:S567.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)01-0234-05

五味子[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.]为五味子属多年生左旋落叶木质藤本植物,是我国温带针叶阔叶混交林带区域和暖温带落叶阔叶林区域经历第四纪冰川时期而保留下来的第三纪古老植物种之一^[1],主要分布于中国东北和华北、朝鲜半岛、日本及俄罗斯远东等地区,其干燥成熟果实作药用已有2 000多年的历史。目前,北五味子被广泛用于制药、造酒、饮料产业中,是具有重要经济价值的药用植物,开发利用前景极为广阔。我国五味子主要分布于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、山东、山西、宁夏、甘肃9省(区)^[2]。

近年来,关于菘蓝、菊花、山茱萸、中华苦蕒菜等生长发育和次生代谢合成积累、成分积累动态研究已有报道,对指导药材采收、科学种植及资源合理利用具有一定意义。但是,有关五味子果实的生长发育及次生代谢物合成积累动态研究未见有文献报道。因此,本试验通过对五味子果实期间外观发育和主要化学成分含量的动态变化进行研究,明确五味子果实期间主要化学成分的变化动态,以期为提高产地药材产品质量提供科学依据,为北五味子药材质量标准的建立、控制及合理开发利用提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

材料采自辽宁省新宾县,经南京农业大学中药材研究所郭巧生教授鉴定为五味子。在五味子开花坐果到果实成熟整个发育过程中共取样6次。在首次采样时,随机选择生长状况良好、长势一致、无病害植株做好标记;后续采样时,从标记植株上随机剪取无病虫害果穗放入低温样品箱,尽快带回实验室;将样品混匀,洗净、擦干,随机选取测定。

收稿日期:2014-03-26

基金项目:国家科技重大专项(编号:2013ZX09402202)。

作者简介:安开龙(1988—),男,甘肃武威人,硕士,主要从事中药材质量控制研究。E-mail:2011104185@njau.edu.cn。

通信作者:郭巧生,博士,教授,主要从事药用植物资源开发研究。E-mail:gqs@njau.edu.cn。

1.2 仪器与试剂

Waters alliance 2695 型高效液相色谱单元、Waters 2489 型紫外/可见光检测器、Empower 2 工作站,美国 Waters 公司生产;XS 105 型电子分析天平、AL 204 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;KQ-5200 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司生产;WK 1000A 高速粉碎机,山东省青州市精诚医药装备有限公司生产;DGG 101-1BS 电热鼓风干燥箱,天津市天宇实验仪器有限公司生产;Milli-Q A10 超纯水系统,美国 Millipore 公司生产;pH 计、磁力搅拌机、游标卡尺、常规玻璃仪器等,国产。

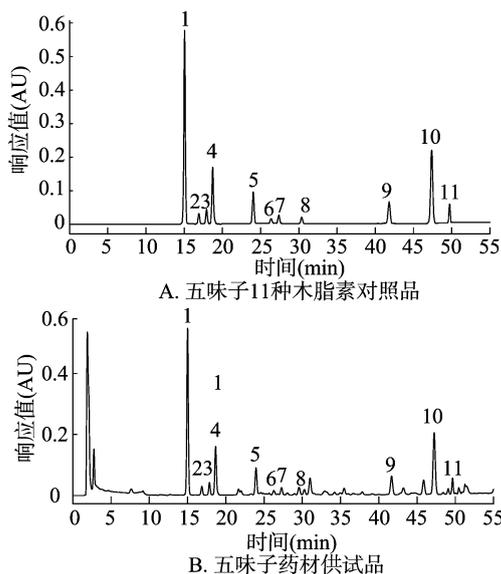
五味子醇甲(批号:110857-200709,纯度 $\geq 99\%$)、五味子酯甲(批号:111529-200503,纯度 $\geq 99\%$)、五味子甲素(批号:110764-200609,纯度 $\geq 98\%$)、五味子乙素(批号:110765-200710,纯度 $\geq 99\%$)对照品,购自中国食品药品检定研究院;五味子醇乙、五味子丙素、5-羟甲基糠醛(5-HMF)对照品,纯度 $\geq 98\%$,购自天津马克生物技术有限公司;戈米辛 D、戈米辛 G、戈米辛 J,纯度 $\geq 98\%$,购自天津一方科技有限公司;当归酰戈米辛 H、当归酰戈米辛 Q,纯度 $\geq 98\%$,自制。分析纯维生素 C,国产;L-苹果酸、柠檬酸对照品,美国 Supelco 公司;莽草酸对照品,纯度大于 98.8%,批号:14800,上海晶纯试剂有限公司;分析纯磷酸二氢钾、草酸,天津市风船试剂科技有限公司;色谱纯磷酸,天津市光复精细化工研究所;硫酸(优级纯),国产;萘酮,国药集团化学试剂有限公司;色谱纯乙腈、甲醇,纯度 $\geq 99.9\%$,德国 Merck 集团。

1.3 试验方法

1.3.1 五味子果实生长发育 分别随机抽取 50 个五味子鲜果果实和 50 粒种子。以游标卡尺测定鲜果和种子的最宽处(横径)与最长处(纵径)尺寸;采用量筒排水法,以加入果实或种子前后的水位差分别作为鲜果和种子的体积;以电子天平测定鲜果果实和种子的质量(鲜质量)及果实和种子烘至恒重时的质量(干质量)。

1.3.2 木脂素类成分测定 采用液相色谱仪进行测定,色谱条件^[3]为:Waters alliance 2695 型高效液相色谱单元,Waters 2489 型紫外/可见光检测器,Empower 2 工作站,Waters

Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱; 柱温为 30 ℃, 检测波长为 218 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量为 10 μL。结果如图 1 所示。



1—五味子醇甲; 2—戈米辛D; 3—戈米辛J; 4—五味子醇乙; 5—当归酰戈米辛H; 6—当归酰戈米辛Q; 7—戈米辛G; 8—五味子酯甲; 9—五味子甲素; 10—五味子乙素; 11—五味子丙素。

图1 五味子木脂素对照品和供试品的 HPLC 结果

1.3.3 酸类成分测定 维生素 C、L-苹果酸、莽草酸、柠檬酸含量测定采用液相色谱仪。维生素 C 含量测定的色谱条件: Prevail™ Organic Acid 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 草酸, 等度洗脱; 流速为 1 mL/min, 检测波长为 244 nm, 柱温为 30 ℃。结果如图 2 所示。L-苹果酸、莽草酸、柠檬酸含量测定的色谱条件: Prevail™ Organic Acid 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为 0.01 mol/L 磷酸二氢钾水溶液, 用一定浓度磷酸调节 pH 值为 3.0, 等度洗脱; 流速为 1 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 30 ℃。结果如图 3 所示。总酸含量采用电位滴定法测定。

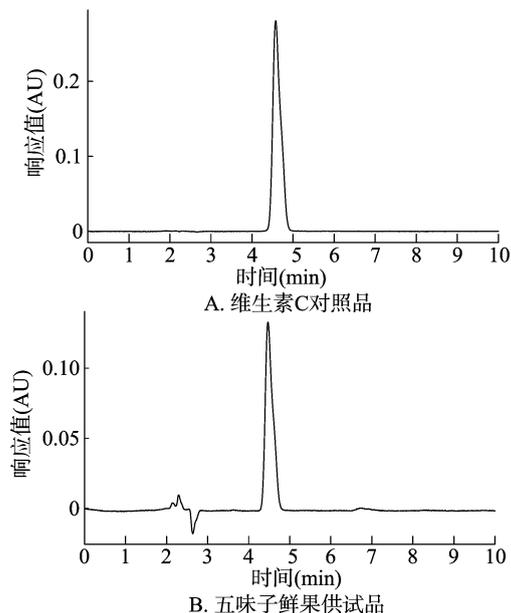


图2 维生素 C 标准品与五味子样品含量的 HPLC 结果

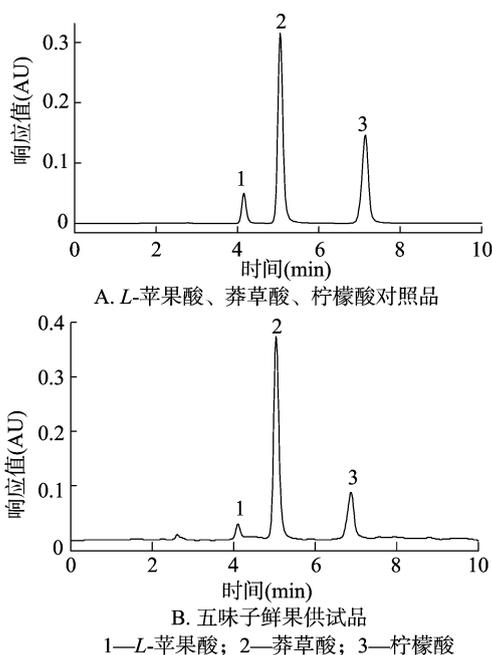


图3 L-苹果酸、莽草酸、柠檬酸等有机酸成分的 HPLC 结果

1.3.4 总糖含量测定 总糖含量采用硫酸-蒽酮比色法测定。

1.3.5 5-羟甲基糠醛(5-HMF)测定 取 4 份 10 g 五味子鲜果匀浆, 分别加水 20 mL, 进行以下处理: (1) 密封于 4 ℃ 冰箱中, 冷浸提取 5-HMF 24 h; (2) 加入定量 5-HMF 标准品, 密封于 4 ℃ 冰箱中, 冷浸提取 5-HMF 24 h; (3) 密封于 4 ℃ 冰箱中, 冷浸提取 5-HMF 24 h, 再超声提取 40 min; (4) 加入定量 5-HMF 标准品, 密封于 4 ℃ 冰箱中, 冷浸提取 5-HMF 24 h, 再超声提取 40 min。采用液相色谱仪对提取液进行测定, 色谱条件为: Diamonsil C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈: 水 = 8:92, 等度洗脱; 流速为 1 mL/min, 检测波长为 284 nm, 柱温为 30 ℃。

1.3.6 不同生长期五味子综合评价 选择与五味子产量和功效密切相关的果实与种子干质量、纵横径、体积及木脂素类、总糖、有机酸等成分含量共 26 个指标, 建立五味子不同生长期综合评价体系, 运用主成分分析方法对五味子不同生长期样品进行多指标分析。

2 结果与分析

2.1 五味子果实与种子的生长发育

2.1.1 果实生长发育动态 由表 1 可见, 在生长期, 果实的横径、纵径、干质量、鲜质量、体积大部分都呈现不断增加的趋势, 且除含水量各指标基本在 9 月中旬达到最大值; 果实颜色由绿色或黄绿色逐渐变为红色或鲜红色, 其中 8 月底至 9 月初为五味子红色变色期; 7 月中旬, 五味子果实横径、纵径分别为采收时(9 月 15 日)的 67.2%、74.1%, 体积为采收时的 55.9%, 干质量为采收时的 28.3%, 6 月份的迅速生长对五味子浆果大小有着基础性的作用; 8 月 10 日, 采收的样品中已有红色出现, 但大部分还为黄绿色; 8 月末, 果实已基本变红, 但还有少许绿色; 9 月上旬, 果皮红色加深, 并伴随果实变软, 果实横径、纵径、体积、鲜质量无明显变化。

表1 五味子鲜果各生长发育阶段果实的外观指标($\bar{x} \pm s, n=3$)

采样日期 (月-日)	颜色	50个果实鲜质量 (g)	50个果实干质量 (g)	纵径 (mm)	横径 (mm)	50个果实体积 (cm ³)	含水量 (%)
07-12	绿色或黄绿色	19.63 ± 0.50e	2.15 ± 0.03f	9.43 ± 0.12e	7.90 ± 0.05d	23.67 ± 1.53d	89.06 ± 0.17a
08-10	黄绿色夹杂红色	28.85 ± 1.26d	4.21 ± 0.05e	11.20 ± 0.11d	10.20 ± 0.06c	31.67 ± 0.58c	85.41 ± 0.14b
08-31	红色略带绿色	40.24 ± 1.03c	6.66 ± 0.07d	12.14 ± 0.19c	11.15 ± 0.20b	36.67 ± 1.53b	83.24 ± 0.12c
09-05	红色或鲜红色	43.01 ± 1.18b	7.35 ± 0.02c	12.34 ± 0.16bc	11.26 ± 0.28b	40.33 ± 2.31a	83.17 ± 0.18c
09-10	红色或鲜红色	45.10 ± 0.33a	7.45 ± 0.01b	12.53 ± 0.11ab	11.61 ± 0.13a	41.67 ± 2.08a	83.49 ± 0.19c
09-15	红色或鲜红色	44.61 ± 1.29ab	7.59 ± 0.03a	12.72 ± 0.05a	11.75 ± 0.12a	42.33 ± 1.52a	83.44 ± 0.22c

注:同列数据后不同小写字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。表2、表3、表4同。

2.1.2 种子生长发育动态 由表2可见,种子的横径、纵径、干质量、体积整体上随果实生长发育而增大,含水量在一定时间内逐渐降低。7月上旬,种子的横径、纵径达到采收时的97%,说明种子在坐果后生长很快,在6月末已经基本形成,此时种皮较脆,含水量较高,颜色呈现黄色,其干质量为采收时的32.1%;8月上旬,种子颜色略有加深,基本呈现成熟种

子的颜色,且硬度增加,干物质积累迅速,为采收时的70.9%,较7月份增加1倍多,但种子的横径、纵径变化不大;9月上旬,种子干质量为采收时的96%,这说明物质积累已经基本完毕,颜色也已成为成熟种子的颜色,9月5日至15日,种子横径、纵径变化已不明显。

表2 五味子鲜果种子各生长发育阶段指标($\bar{x} \pm s, n=3$)

采样日期 (月-日)	颜色	50粒种子鲜质量 (g)	50粒种子干质量 (g)	纵径 (mm)	横径 (mm)	50粒种子体积 (cm ³)	含水量 (%)
07-12	浅黄色	1.49 ± 0.03d	0.43 ± 0.01e	4.92 ± 0.05c	4.05 ± 0.04b	1.43 ± 0.06c	71.22 ± 0.15a
08-10	黄色	1.63 ± 0.02c	0.95 ± 0.04d	4.90 ± 0.03c	4.06 ± 0.05b	1.57 ± 0.06b	41.38 ± 0.11b
08-31	黄色	1.49 ± 0.09d	1.26 ± 0.02c	5.01 ± 0.05b	4.14 ± 0.04a	1.83 ± 0.06a	30.64 ± 0.14c
09-05	黄色或棕黄色	1.73 ± 0.05b	1.28 ± 0.02bc	5.02 ± 0.01ab	4.16 ± 0.04a	1.87 ± 0.06a	27.12 ± 0.16e
09-10	黄色或棕黄色	1.88 ± 0.07a	1.31 ± 0.01ab	5.09 ± 0.05a	4.18 ± 0.05a	1.90 ± 0.06a	29.93 ± 0.15d
09-15	黄色或棕黄色	1.83 ± 0.03a	1.34 ± 0.02a	5.09 ± 0.02a	4.18 ± 0.02a	1.93 ± 0.06a	27.01 ± 0.13e

2.2 五味子鲜果木脂素类成分含量变化动态

由表3可见,整个生长期内,五味子鲜果木脂素类成分成分呈现先升高后降低或后期略有回升趋势,整体呈现倒“V”形分布;五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛H、五味子甲素、五味子乙素5种木脂素成分含量相对较高。7月份,各木脂素成分含量已达到一定水平,这是由于木脂素类成分大部

分存在于种子中,7月份种子已基本成型;8月初,木脂素各成分含量急剧增加,木脂素各成分含量相对最高;8月末,木脂素含量又有所降低,此时正值五味子红色素形成、果实由绿转红的阶段;9月,不同木脂素成分表现出不同的变化趋势,这可能是由于不同木脂素成分在果实中的生理作用不一样,不同木脂素在果实成熟过程中参与了生理生化反应。

表3 五味子鲜果木脂素各成分的含量($n=3$)

采样日期 (月-日)	五味子醇甲(%)		戈米辛D(%)		戈米辛J(%)		五味子醇乙(%)		当归酰戈米辛H(%)		当归酰戈米辛Q(%)	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
07-12	0.364f	0.55	0.058f	1.72	0.068b	1.47	0.168c	0.59	0.098e	1.02	0.038b	1.63
08-10	0.791a	1.64	0.100a	1.00	0.070a	1.43	0.210a	0.95	0.182a	1.65	0.050a	1.86
08-31	0.546e	0.73	0.076d	1.32	0.056d	1.79	0.153e	1.74	0.121d	1.74	0.032c	1.74
09-05	0.591d	1.02	0.064e	1.56	0.053e	1.89	0.157d	0.64	0.121d	0.83	0.026d	1.84
09-10	0.643c	1.69	0.079c	1.27	0.057d	1.75	0.153e	1.31	0.141b	0.71	0.027d	1.70
09-15	0.671b	0.92	0.098b	1.02	0.060c	1.67	0.199b	0.50	0.130c	0.74	0.022e	1.55
采样日期 (月-日)	戈米辛G(%)		五味子酯甲(%)		五味子甲素(%)		五味子乙素(%)		五味子丙素(%)		木脂素总和(%)	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
07-12	0.059b	1.69	0.036e	1.86	0.080e	1.25	0.230e	0.87	0.057b	1.75	1.256e	2.62
08-10	0.068a	1.47	0.067a	1.49	0.148a	1.35	0.337a	1.48	0.063a	1.59	2.086a	2.21
08-31	0.057c	1.75	0.054b	1.74	0.120c	1.67	0.274c	1.46	0.055c	1.81	1.544d	1.17
09-05	0.050d	1.83	0.041c	1.58	0.132b	1.52	0.250d	1.87	0.055c	1.79	1.540d	1.30
09-10	0.050d	1.68	0.039d	1.42	0.147a	1.36	0.268c	1.12	0.062a	1.61	1.676c	1.73
09-15	0.049d	1.74	0.032f	1.66	0.113d	0.88	0.314b	1.83	0.058b	1.57	1.752b	1.47

2.3 五味子鲜果维生素C、酸类成分、糖含量变化动态

由表4可见,在五味子部分生长期内,果实维生素C含量

呈现降低趋势,7月初至8月末急剧降低;L-苹果酸在7月份未检测到,可能是由于含量较低或者还未生成,8月份开始

逐渐积累,9月份含量持续增加;莽草酸含量在7月份时较高,随果实生长发育呈现一定程度的降低趋势;柠檬酸在7月份时含量较低,8月份急剧增加,后随果实成熟,含量略有降低;果实总酸含量总体表现出升高趋势,这是由于随果实生长发育,从果实以外器官运输到浆果中的酸逐渐增加,同时浆果本身合成酸的能力逐渐增强,从而导致浆果中酸含量逐渐升高;果实总糖含量在9月初达到最高值,随果实成熟又有所下

降,这是由于浆果生长前期,进入浆果中的糖分除用来提供能源、用于浆果的呼吸作用和细胞的增殖与增大,还被用来合成细胞壁、原生质等,因此,五味子早期糖分含量较低,始熟期后,果实以外的器官运输到浆果中的糖分增加,或可能由多糖、有机酸向单糖转变而使其糖含量提高,但在果实转色期后总糖含量又有所下降。

表4 不同生长期五味子鲜果维生素C、酸类成分、糖的含量(n=3)

采样日期 (月-日)	维生素C(%)		L-苹果酸(%)		莽草酸(%)		柠檬酸(%)		总酸(%)		总糖(%)	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
07-12	0.498a	1.20	未检出	-	6.513a	0.71	7.082e	1.65	8.80d	1.14	3.91f	2.95
08-10	0.379b	1.32	未检出	-	4.379b	0.75	13.709b	1.67	14.03c	1.50	8.13e	3.11
08-31	0.269c	1.12	1.450d	1.86	2.626d	0.91	14.403a	1.65	16.38b	1.16	17.81b	2.18
09-05	0.272c	1.47	3.137c	1.69	2.712c	0.99	13.814b	1.84	14.44c	2.15	23.08a	3.45
09-10	0.258d	1.38	3.795b	1.79	1.845f	1.74	11.833d	1.83	16.21b	2.59	14.25d	2.98
09-15	0.265c	1.25	4.336a	1.45	2.026e	1.77	12.540c	1.71	18.23a	1.92	16.62c	3.14

2.4 五味子鲜果5-HMF成分测定

试验结果(图4)表明,加入标准样品的2种提取液均检出5-HMF;标准品加样冷浸提取和超声提取,回收率分别为99.22%、98.94%。这说明试验采用的方法能够使5-HMF稳定存在,5-HMF并非五味子的原始积累成分。

2.5 主成分分析

主成分分析结果表明,F1、F2、F3主成分因子在五味子质量评价中起着主导作用,3个主成分的累积贡献率达95.10%,能够较客观地反映五味子的质量,故选取主成分F1、F2、F3进行分析。依据五味子不同生长期样品主成分因子得分结果,以每个主成分所对应的特征值作为权重计算综合模型F(表5),并按照得分值进行排序,综合得分越高,表明果实越成熟,品质越好,但如果实过于成熟,会导致植株落穗、落果从而减产,同时在采收运输过程中会导致果实大量破损,从而导致在干燥过程中有害成分5-HMF含量过高而影响药材品质。综合辽宁省产地实际情况,建议9月上旬五味子果实全部变红即可采收,此时,不但外观色泽符合传统用药习惯,成分含量也能达到药典规定要求,且不含有害成分5-HMF;另外,比传统采收时间提前7d左右,避开了产地农忙时节,降低了采收成本,保证了药材质量。

3 结论与讨论

3.1 采样时间的确定

辽宁产地五味子一般于5月中下旬开花,花期15d左右,6月上旬初见果形,9月中旬开始采收。由于考虑五味子果实发育早期果粒相对较小,难以形成产量,不具有实际应用

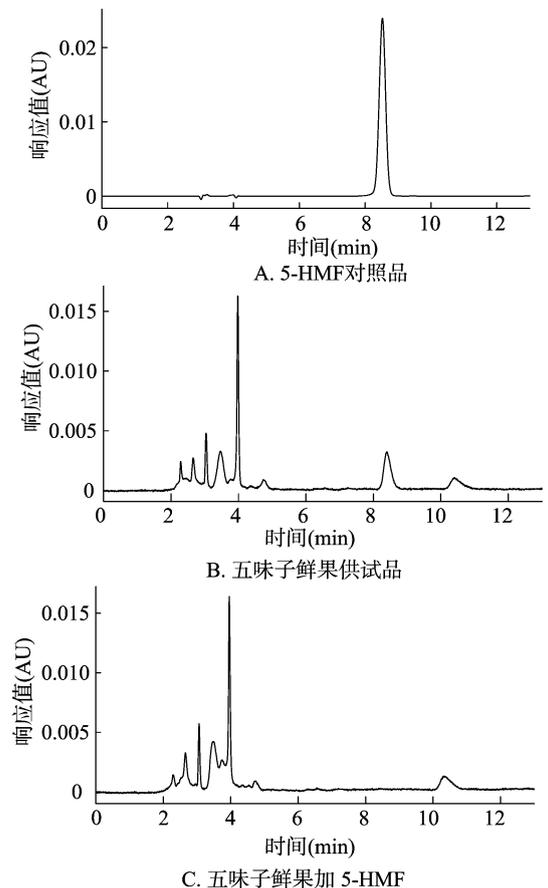


图4 五味子鲜果与5-HMF HPLC结果

表5 不同生长期五味子主成分分析得分及排名

生长时期 (月-日)	F1		F2		F3		F	
	得分	排名	得分	排名	得分	排名	得分	排名
07-12	-6.69	6	-2.72	6	0.65	2	-4.63	6
08-10	-2.53	5	5.30	1	-0.33	4	0.12	5
08-31	1.11	4	-0.66	4	-1.69	6	0.32	4
09-05	2.16	3	-1.80	5	-1.23	5	0.61	3
09-10	2.75	2	-0.27	3	0.57	3	1.55	2
09-15	3.20	1	0.17	2	2.03	1	2.04	1

价值,因此试验选择在7月、8月上旬各采样1次,8月末五味子果实成熟前期适当增加采样次数,在8月31日至9月15日采样4次,重点考察成熟期阶段果实和种子及其化学成分的变化。

3.2 果实生长发育

果实大小是果实外观品质的重要指标,与果实纵径、横径的发育密切相关。坐果后,果实经过连续的细胞分裂、细胞膨大会表现出一定的生长动态。果实细胞分裂与膨大除受遗传因素制约外,还受内源激素、营养物质及环境、土壤等因素的影响^[4]。种子是浆果产生激素的中心,五味子种子在6月份就已基本形成,因此开花前期的营养水平关系到种子的发育,进而影响到果实大小。目前,关于气象环境因素调控果实生长发育的研究较少,如刘实等在长春地区针对气象因子对北五味子生长特性的影响进行了研究^[5],相关基础研究还相对薄弱。

3.3 五味子果实生长期主要化学成分含量的动态变化

药用植物中所含的有效成分是防病、治病的物质基础,多为植物的次生代谢产物。药用植物在生长发育过程中,有效成分的合成积累呈现一定的规律性。组成木脂素的单体主要有桂皮酸(偶有桂皮醛)、桂皮醇、丙烯苯和烯丙苯4种^[6],木脂素类成分是叶片次生代谢的产物^[7]。9月中旬,五味子植株叶片大部分仍然保持绿色,这说明良好的栽培管理降低了叶片的病虫害危害,能够保证果实木脂素含量达到较高的水平。在整个生长发育阶段,五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素含量相对较高,而五味子醇甲、当归酰戈米辛H、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素为入血成分^[8-9],将这几个成分纳入质量控制指标更为合理。不同产地采收的五味子木脂素含量差异很大^[10],这可能与种质、气候环境、栽培措施等不同有密切关系。

果实生长过程中,有机酸含量的增减与磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)等关键酶发挥作用密不可分。有机酸在果实自身代谢中参与光合作用、呼吸作用,以及合成酚类、氨基酸、酯类和芳香物质等^[11],果实发育过程中的有机酸代谢及其变化,影响着成熟果实的有机酸含量。果实有机酸代谢是一个极为复杂的过程,有机酸含量及组成是内在遗传特性、外在自然环境因子和栽培措施等多因素共同作用的结果。有文献报道,五味子果实中含有酒石酸、奎尼酸^[12-13]。在本试验样品中,只发现含有L-苹果酸、莽草酸、柠檬酸,这可能是由于不同的种质处在不同栽培环境条件所引起的,这也为五味子产地差异化鉴别提供了可能。

五味子鲜果花色苷主要成分为矢车菊-3-O-木糖鼠李糖苷^[14],糖对花色苷形成有极为重要的作用。9月5日前后,辽宁省五味子糖类成分达到1个峰值,此时正值五味子浆果红色素形成期,因此,要促进果实色泽发育,需要提高果实的含糖量。

3.4 5-HMF成分定性测定

有文献报道,5-HMF可能引发结肠小囊异常生长^[15],产生一定程度的基因毒性^[16-17],对人体横纹肌和内脏有损害,能与人体蛋白质结合产生蓄积中毒^[18]。试验采用冷浸法和超声提取法的同时,运用回流法提取,考察不同时期五味子形成5-HMF的条件,结果表明,不同生长期的五味子样品回

流提取液一直存在5-HMF,而鲜果超声和冷浸提取液中未检出,这说明五味子在加热过程中很容易产生5-HMF。鲜果中不存在5-HMF,这为寻找低含量5-HMF的加工方法提供了思路。

3.5 五味子适宜采收期的确定

研究早期,往往以单一的五味子醇甲作为五味子质量控制指标来评价其质量,随着五味子药理研究的不断深入,研究者逐渐认识到五味子发挥药效的物质不单单是五味子醇甲,而是多个成分的协同作用,除木脂素类成分外,多糖类和有机酸类成分也是五味子物质基础的重要组成部分。五味子多糖在保肝、抗疲劳、降血脂、抗突变等方面具有一定疗效^[19],有机酸类成分对心血管系统疾病具有潜在的临床应用价值^[20]。单一比较某种化学成分含量的高低也不能完全说明五味子的品质。

主成分分析是一种较为客观的评价方法,根据每个主成分的得分来衡量指标的程度和地位,进而构建综合评价函数,对研究对象进行综合评价,在研究过程中不需要人为确定指标权重,减少了人为误差。本试验根据主成分分析的理论和方法,对不同生长期五味子进行综合评价,摆脱了单独以五味子醇甲含量评价五味子的片面性,同时避免了人为划定权重的影响。对五味子产量和质量相关联的26个指标运用多指标综合评价模式对五味子适宜采收期进行研究,结果表明,辽宁省产地应于9月上旬开始采收五味子,需在15~20d采收完毕。若不及时采收,五味子果实过度成熟变软,会自动脱落,给采收带来困难;同时,9月正是辽宁省产地农忙时节,五味子药材采收需要大量的人力,过迟采收不利于劳动力的资源配置。

参考文献:

- [1] 韩联生,纪萍. 北五味子的资源研究与开发[J]. 中国林副特产,1997(3):37-39.
- [2] 孙成仁. 北五味子与华中五味子分布区订正[J]. 中国中药杂志,1993,18(1):10-12,61.
- [3] 王薇丹,叶正良,宋丽丽,等. 五味子液相色谱指纹图谱的研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(21):2871-2873.
- [4] 王春飞,郁松林,肖年湘,等. 果树果实生长发育细胞学研究进展[J]. 中国农学通报,2007,23(7):386-390.
- [5] 刘实,李爱民,郭春明,等. 北五味子物候的观测及气象要素影响[J]. 东北林业大学学报,2009,37(12):39-42.
- [6] 罗永明. 天然药物化学[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2011:88.
- [7] 苗高健,张正海,李爱民,等. 北五味子叶片木脂素类成分含量变化研究[J]. 特产研究,2011,33(3):58-60.
- [8] 陈颖. 北五味子质量分析及其木脂素类成分药动学研究[D]. 杭州:浙江大学,2008:33-45.
- [9] 王宝莲. 中药五味子成分的药代动力学及代谢研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2009:16-40.
- [10] 沈文,叶正良,郭巧生. 东北不同产地五味子药材品质研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(22):3016-3020.
- [11] 陈发兴,刘星辉,陈立松. 果实有机酸代谢研究进展[J]. 果树学报,2005,22(5):526-531.
- [12] 康宏玲. 高效液相色谱法测定北五味子中主要成分的研究[D]. 沈阳:东北大学,2008:39-60.

孙建梅,郑桂红,刘缠民,等. 硫酸镍对鲫鱼肝胰脏和肠中酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):239-241.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.081

硫酸镍对鲫鱼肝胰脏和肠中酶活性的影响

孙建梅, 郑桂红, 刘缠民, 张宏亮, 黄 璁, 冯照军

(江苏师范大学生命科学学院, 江苏徐州 221116)

摘要:为了评价水环境中 Ni^{2+} 对鱼类的影响,并为预防和治理淡水渔业水质资源的镍污染提供一定的理论依据,采用静水生物测试法,研究 0、10、25、50、100 mg/L $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对鲫鱼肝胰脏和肠中酶活性的影响。结果表明:低浓度的 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对肝胰脏中脂肪酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶有激活作用,在高浓度时呈抑制作用;而对碱性磷酸酶一直表现为抑制作用。低浓度的 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对肠中胰蛋白酶、脂肪酶、ACP 和 AKP 有激活作用,高浓度时呈现出抑制作用。

关键词:硫酸镍;鲫鱼;肝胰脏;肠;酶活性

中图分类号: S965.117;S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)01-0239-03

随着工业的迅速发展,大量的铅、镉、镍、汞等重金属随污水流入江海湖泊,严重破坏了水域生态环境,影响鱼类的正常生长繁殖^[1]。目前,关于镍和其他重金属毒理学的研究多集中在致死浓度与水生动植物体内镍的积累量等方面,而重金属离子对鱼类消化酶活性影响的研究较少^[2]。因此,本研究以野生鲫鱼肝胰脏和肠中脂肪酶、胰蛋白酶、AKP 和 ACP 为指标,研究不同浓度的 NiSO_4 对鲫鱼肝胰脏和肠中酶活性的影响,旨在研究 Ni^{2+} 对鱼类消化酶的影响机制,为保证鱼类的健康和防治环境污染提供一定的理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 野生鲫鱼,购自江苏徐州文沃市场,选择健康活泼、体表完好的鲫鱼 100 尾,体长 (9 ± 2) cm、体质量 (20 ± 2) g/尾,随机分为 5 组,分别为 0、10、25、50、100 mg/L

NiSO_4 ^[3]。放养于室内水族箱中,每箱 88 L 水,以充分曝气 3 d 的自来水作为静水水源,24 h 持续充氧,溶氧量为 6 mg/L,保持水温 (23 ± 1) °C、pH 值 6.8。采用静水法将鲫鱼预饲养 1 周,预试验期间死亡率低于 5%,试验前 24 h 停止饲喂,试验期间不换水。

1.1.2 药品和试剂 蛋白定量测试盒(100T/96 样)、脂肪酶测试盒(50T/48 样)、胰蛋白酶测试盒(50T/48 样)、酸性磷酸酶(ACP)测试盒(50T/48 样),以上均为南京建成生物工程研究所产品;碱性磷酸酶(AKP)测试盒(50T/48 样),0.9%生理盐水, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

1.1.3 试验仪器 YV-7504 单光束紫外-可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)、电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)、BS 124S 型电子天平[0.1 mg~120 g,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、玻璃匀浆器、微量移液枪(1、0.1 mL)等。

1.2 试验方法

随机抽取毒性试验 96 h 之后的鲫鱼(至少 3 尾),解剖取样,对肝胰脏中各指标进行测定,评价 NiSO_4 对鲫鱼的影响。

1.3 数据处理

试验数据用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行处理。组间数据的两两比较采用配对样本进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 表示差异显著、极显著。

收稿日期:2014-03-07

基金项目:江苏省徐州市科技计划(编号:XF11C051);江苏省化学生物学优势学科基金(编号:PAPD)。

作者简介:孙建梅(1962—),女,江苏徐州人,副教授,从事动物学的教学和科研工作。

通信作者:郑桂红,女,山东鄒城人,博士研究生,讲师,从事动物生理学的教学和科研工作。E-mail: ghzhengh@163.com。

[13]李 丽,肖永庆,于定荣,等. HPLC 测定五味子中 3 种有机酸的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3286-3289.

[14]吴 夏,景 浩. 随机质心映射法优化五味子鲜果花色苷提取工艺及其稳定性研究与结构的鉴定[C]//中国食品科学技术学会第七届年会论文摘要集,2010:59-60.

[15]Zhang X M, Chan C C, Stamp D, et al. Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose [J]. Carcinogenesis, 1993, 14(4): 773-775.

[16]Surh Y J, Tannenbaum S R. Activation of the maillard reaction product 5-(hydroxymethyl) furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination[J]. Chemical Research in Toxicology,

1994,7(3):313-318.

[17]Durling L J, Busk L, Hellman B E. Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(4): 880-884.

[18]迟 文,张昌斌,曹永红,等. 限制 5-羟甲基糠醛生成条件的探讨[J]. 人民军医药学专刊,1998,14(2):101-104.

[19]何嘉凝,单提昆,吴文君,等. 五味子多糖的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2012,11(1):38-42.

[20]汤喜兰,刘建勋,李 磊. 中药有机酸类成分的药理作用及在心血管病中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5): 243-246.