

## 青钱柳叶中黄酮类化合物的地理变异

杨万霞<sup>1</sup>, 余诚棋<sup>1,2</sup>, 方升佐<sup>1</sup>

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏南京 210037; 2. 安徽省林业科技推广总站, 安徽合肥 230001)

**摘要:** 以青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 11 个种源 1 年生苗的叶片为材料, 研究青钱柳叶片中黄酮类化合物的地理变异, 初步筛选出黄酮类化合物质量分数高的优良药用种源。黄酮类化合物各成分用液相色谱测定, 数据采用方差分析、多重比较和相关分析等进行统计分析。结果表明: 青钱柳叶中 3 种黄酮类化合物质量分数紧密相关, 其中山奈酚质量分数高于槲皮素和异槲皮苷。研究的各种源中, 安徽歙县和广西资源种源的黄酮类化合物的质量分数较高, 分别为 6.770 和 6.494 mg·g<sup>-1</sup>, 安徽舒城种源的黄酮类化合物质量分数最低, 仅为 1.230 mg·g<sup>-1</sup>; 以经纬度为自变量, 各成分的质量分数为因变量进行趋势面分析, 青钱柳叶中山奈酚质量分数呈经纬度双向变异, 但其变化幅度随经度变化幅度不如纬度变化大, 其表现出以 108°E 和 27°N 交叉区域为中心向东西递增、向南北递减的趋势, 而槲皮素和异槲皮苷质量分数的变化没有明显的规律性。青钱柳黄酮类化合物较高的优良药用种源为安徽歙县和广西资源种源。图 4 表 3 参 15

**关键词:** 林木育种学; 青钱柳; 山奈酚; 槲皮素; 异槲皮苷; 地理变异

中图分类号: S722.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2009)04-0522-06

## Geographic variation of flavonoid compounds in *Cyclocarya paliurus* leaves

YANG Wan-xia<sup>1</sup>, SHE Cheng-qing<sup>1,2</sup>, FANG Sheng-zuo<sup>1</sup>

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Extension Station-general of Forestry Science and Technology, Anhui Province, Hefei 230001, Anhui, China)

**Abstract:** To select superior medicinal provenances of *Cyclocarya paliurus*, the geographic variation of flavonoid compounds (kaempferol, quercetin, and isoquercetin) in leaves of one-year-old seedlings of 11 provenances was studied. Flavonoid compounds were measured by HPLC. Statistical analyses, such as variance analysis, correlation analysis were used. Results showed a close relationship existed among the three flavonoid compounds with kaempferol content greater than quercetin and isoquercetin. Flavonoid content in Shexian provenance of Anhui (6.770 mg·g<sup>-1</sup>) and Ziyuan provenance (6.494 mg·g<sup>-1</sup>) of Guangxi were higher, whereas Shucheng provenance of Anhui was lowest (1.230 mg·g<sup>-1</sup>). Trend surface analysis of geographic variations was made with longitude and latitude being independent variable, the content of flavonoids compounds being induced variable. The kaempferol showed a center (crossing of 108°E and 27°N)-round variation, with the increase from the center to the west and east, decrease from the center to the north and south. However, there was no significant trend in the variation of quercetin and isoquercetin. The superior medicinal provenances of *Cyclocarya paliurus* is Shexian provenance of Anhui and Ziyuan provenance of Guangxi. [Ch, 4 fig. 3 tab. 15 ref.]

**Key words:** forest breeding; *Cyclocarya paliurus*; kaempferol; quercetin; isoquercetin; geographical variation

---

收稿日期: 2008-07-11; 修回日期: 2009-03-06

基金项目: 江苏省高新技术研究项目(BG2006314)

作者简介: 杨万霞, 讲师, 博士研究生, 从事人工林定向培育等研究。E-mail: yangwanxia02@163.com。通信作者: 方升佐, 教授, 博士生导师, 从事人工林定向培育、生物能源林培育等研究。E-mail: fangsz@njfu.com.cn

青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 又名青钱李、摇钱树等, 高大乔木(高 10~30 m), 系双子叶植物纲 Dicotyledoneae 胡桃科 Juglandaceae 青钱柳属 *Cyclocarya*, 广泛分布于江西、浙江、江苏、安徽、福建、台湾、湖北、四川和贵州等地的山区、溪谷或石灰岩山地<sup>[1-2]</sup>。它是中国特有的单种属植物, 是国家重点保护的濒危植物之一, 属于三类保护植物。青钱柳是集药用、保健、用材和观赏等价值于一身的多用途树种。20世纪 70 年代以来研究发现, 青钱柳有降血压、降血糖、降血脂和抗衰老等药用功效, 是一种很有开发利用前景的珍贵药用树种<sup>[3-5]</sup>。黄酮类化合物亦称类黄酮、生物类黄酮, 是一类多酚类化合物, 种类繁多, 结构复杂多样<sup>[6]</sup>。主要有黄酮黄酮醇类、异黄酮异黄酮醇类、双黄酮类及其他黄酮类等。它广泛存在于蔬菜、水果和药用植物中, 尤其是叶部含量较高, 某些黄酮类化合物对人体具有明显的生物活性和生理作用<sup>[7-8]</sup>。目前, 青钱柳已测出的黄酮类化合物主要有槲皮素、异槲皮苷、山奈酚<sup>[9]</sup>。但是, 青钱柳现有的资源有限, 主要是天然林, 多零星分布于深山老林和一些自然保护区中, 而且国内外尚无大量人工繁殖和栽培的经验, 也很少有这方面的研究报告, 严重影响了青钱柳的开发利用和产业化进程<sup>[10]</sup>。笔者以不同种源青钱柳 1 年生苗的叶片为材料, 探讨青钱柳黄酮类化合物的地理变异, 初步筛选出黄酮类化合物含量高的优良药用种源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2006 年在青钱柳种源分布区中收集了 10 个省的 16 个种源 51 个家系的种子, 2007 年 1 月初对种子进行催芽处理, 待种子露白后, 将它们播入营养钵中进行育苗, 每个营养钵播 2~3 粒种子。6 月初将容器苗移栽至苗床, 株行距为 40 cm × 40 cm。从中选出符合试验要求(苗数 ≥ 30 株)的 11 个种源的 33 个家系(表 1)。

2007 年 9 月 7 日, 分别从每个试验单元内随机采集叶片, 置烘箱中 70 °C 烘干, 粉碎过 60 目筛, 即为供测样品。

### 1.2 主要仪器与试剂

黄酮类化合物测定使用的主要仪器是南京林业大学反相高效液相色谱。实验中使用的标准品槲皮素、山奈酚由中国药品生物制品检定所提供, 异槲皮苷由德国 FLUKA 公司提供; 甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯; 蒸馏水为双蒸馏水。

表 1 11 个青钱柳种源地的地理气候条件

Table 1 Geographical-climatic conditions of 16 *Cyclocarya paliurus* provenances

地点	地理气候条件						家系数/个
	纬度/(°N)	经度/(°E)	海拔/m	年均温/°C	年降水量/mm	无霜期/d	
福建漳浦	24°07'	117°37'	750	21.0	1 500.0	350	4
湖南江华	24°54'	111°42'	650	17.8	1 540.0	308	1
云南昆明	25°02'	102°44'	1 913	14.5	1 000.6	230	4
广西资源	26°02'	110°40'	800	16.4	1 761.1	300	1
贵州黎平	26°13'	109°18'	750	15.6	1 325.9	277	2
贵州剑河	26°31'	108°42'	920	14.5	1 400.0	300	3
江西庐山	29°33'	116°30'	1 000	16.0	1 917.0	260	8
湖北鹤峰	29°48'	110°11'	747	15.8	1 400.0	210	4
安徽歙县	30°07'	118°51'	1 100	8.9	1 480.0	234	1
浙江安吉	30°41'	119°41'	400	14.5	1 476.0	255	4
安徽舒城	31°02'	116°32'	704	15.5	1 027.7	224	1

### 1.3 试验方法

1.3.1 槲皮素与山奈酚质量分数的测定 采用反相高效液相色谱法测定<sup>[11]</sup>: 称取约 1.0 g 干样(准确到 0.000 1 g)于圆底烧瓶中, 精确加入甲醇-250 g·kg<sup>-1</sup> 盐酸(4:1)25 mL, 闭塞, 称量, 沸水浴回流 1 h, 自然冷却后称量, 以甲醇补足损失的质量, 摆匀, 过滤, 再将滤液过 0.45 μm 有机膜, 作为高效液相色谱(HPLC)测试液。

色谱条件: Kromsil C<sub>18</sub> 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-5 g·kg<sup>-1</sup> 磷酸水溶液(55:45); 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 360 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 25 °C; 外标法。

1.3.2 异槲皮苷质量分数的测定 采用反相高效液相色谱法测定<sup>[8]</sup>: 称取约 1.0 g 干样(准确到 0.000 1 g)于圆底烧瓶中, 精确加入 25 mL 体积分数为 70% 甲醇, 80 °C 水浴回流 2 h, 过滤, 再将滤液过 0.45 μm 有机膜, 作为 HPLC 测试液。

色谱条件: Kromsil C<sub>18</sub> 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-5 g·kg<sup>-1</sup> 磷酸水溶液(50:50); 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 360 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 25 °C; 外标法。

### 1.4 数据分析

数据用 Excel 和 Surfer 软件进行统计分析。趋势面分析是以经纬度为自变量, 各性状分别为因变量, 作二元二次多项式回归分析, 其模型为:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1^2 + \beta_4 x_2^2 + \beta_5 x_1 x_2 + \varepsilon_j$$

其中:  $\beta$  为回归系数;  $x_1$  为经度;  $x_2$  为纬度;  $\varepsilon_j$  为随机变量。最后做出等值线-趋势面图, 分析性状的地理变异规律。

## 2 结果与分析

### 2.1 槲皮素

不同种源青钱柳叶片槲皮素质量分数如图 1 所示。11 个种源槲皮素质量分数均值为 0.516 mg·g<sup>-1</sup>, 最高为歙县种源(1.303 mg·g<sup>-1</sup>), 资源、昆明种源其次, 最低为舒城种源(0.131 mg·g<sup>-1</sup>), 最高是最低种源的 9.95 倍。方差分析表明, 不同种源青钱柳叶片槲皮素质量分数达到显著差异。多重比较表明, 安徽舒城与歙县种源的槲皮素质量分数与其他种源存在显著差异, 其他种源之间差异不显著。

### 2.2 山奈酚

不同种源青钱柳叶片山奈酚质量分数如图 2 所示, 各种源山奈酚质量分数均值为 2.867 mg·g<sup>-1</sup>, 其中舒城种源质量分数(0.851 mg·g<sup>-1</sup>)明显低于其他种源(2.534 ~ 3.953 mg·g<sup>-1</sup>), 差值最小也达到 1.683 mg·g<sup>-1</sup>, 最大高达 3.102 mg·g<sup>-1</sup>, 歙县、安吉及资源种源山奈酚质量分数较高。方差分析表明, 不同种源青钱柳山奈酚质量分数达到显著差异。多重比较表明, 舒城种源与资源种源的山奈酚质量分数与其他种源存在显著差异, 其他种源之间差异不显著。

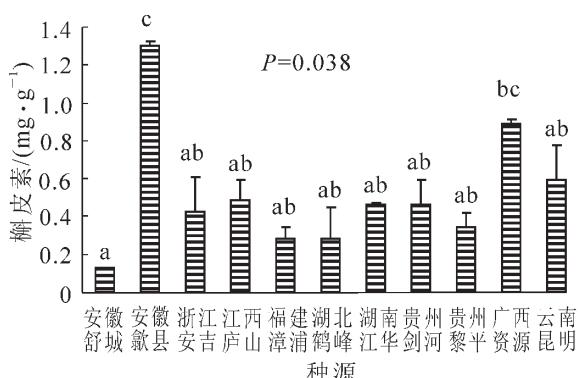


图 1 不同种源青钱柳叶片槲皮素质量分数

Figure 1 Quercetin content of *Cyclocarya paliurus* leaf from different provenances

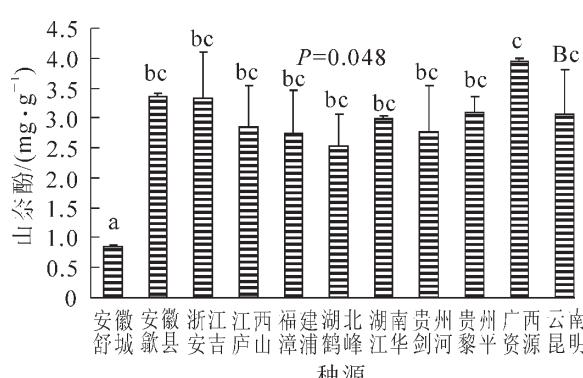


图 2 不同种源青钱柳叶片山奈酚质量分数

Figure 2 Kaempferol content of *Cyclocarya paliurus* leaf from different provenances

### 2.3 异槲皮苷

由图 3 可知, 不同种源青钱柳异槲皮苷质量分数变幅为  $0.253 \sim 2.111 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 最大差值为  $1.858 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 各种源异槲皮苷质量分数均值为  $1.021 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 较高有歙县和资源种源, 而舒城、漳浦、鹤峰及黎平种源较低。方差分析表明, 不同种源青钱柳异槲皮苷质量分数达到显著差异。多重比较表明, 舒城种源与歙县种源的异槲皮苷质量分数与其他种源存在显著差异, 其他种源之间差异不显著。

以上结果表明, 在青钱柳叶中, 3 种黄酮类化合物中, 山奈酚质量分数高于槲皮素和异槲皮苷, 其中安徽歙县和广西资源种源的黄酮类化合物的质量分数较高, 分别为  $6.770, 6.494 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 舒城种源的黄酮类化合物质量分数最低, 仅为  $1.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。3 种黄酮类化合物质量分数之间的相关分析结果如表 2 所示, 槲皮素与山奈酚质量分数之间呈显著正相关, 与异槲皮苷质量分数之间呈极显著正相关; 异槲皮素质量分数与山奈酚质量分数之间也呈极显著正相关, 表明青钱柳叶中 3 种黄酮类化合物——槲皮素、山奈酚、异槲皮苷质量分数的是紧密相关, 即不可能有一种成分单独变化而不引起其他成分变化的情况。

### 2.4 青钱柳叶片中黄酮类化合物的地理变异

青钱柳叶片中黄酮类化合物的质量分数与地理位置的相关分析表明(表 2), 3 种黄酮类化合物的质量分数与经度、纬度都呈不显著的正相关关系。

表 2 青钱柳叶片中黄酮类化合物的质量分数与地理位置的相关关系

Table 2 Correlations of analysis between flavonoids compounds of *Cyclocarya paliurus* leaf and geographical-climatic conditions

因素	槲皮素	山奈酚	异槲皮苷	经度	纬度	海拔
槲皮素	1.000 0					
山奈酚	0.708 6*	1.000 0				
异槲皮苷	0.950 6**	0.735 3**	1.000 0			
经度	0.210 0	0.109 0	0.040 4	1.000 0		
纬度	0.244 4	0.152 0	0.027 4	0.543 7	1.000 0	
海拔	0.221 5	0.061 8	0.371 4	- 0.595 1	- 0.269 9	1.000 0

说明: \* 表示显著水平  $P < 0.05$ , \*\* 分别表示显著水平  $P < 0.01$ 。

为进一步研究青钱柳叶片黄酮类化合物的地理变异规律, 分别以经纬度为自变量, 以叶中槲皮素、山奈酚、异槲皮苷质量分数为因变量作二元二次趋势面分析, 趋势面回归方程及拟合程度的检验见表 3。由表 3 可知, 槲皮素、异槲皮苷的回归方程拟合度不符合要求, 未达到显著水平, 方程不能

表 3 青钱柳叶片黄酮类化合物的趋势面分析  
Table 3 Trend surface analysis of flavonoids compounds in *Cyclocarya paliurus* leaves

指标	趋势面方程	拟合度/%	P 值
槲皮素	$y = 22.934 - 0.659 5 x_1 + 0.936 7 x_2 - 0.000 1 x_1^2 + 0.026 4 x_1 x_2 - 0.071 5 x_2^2$	49.31	0.497
山奈酚	$y = -172.981 - 0.862 4 x_1 + 15.798 0 x_2 + 0.004 9 x_1^2 - 0.002 8 x_1 x_2 - 0.283 3 x_2^2$	84.42	0.046
异槲皮苷	$y = 52.834 - 0.767 0 x_1 - 0.711 0 x_2 - 0.000 9 x_1^2 + 0.036 9 x_1 x_2 - 0.065 4 x_2^2$	51.53	0.461

说明:  $x_1$  和  $x_2$  分别代表经度和纬度。

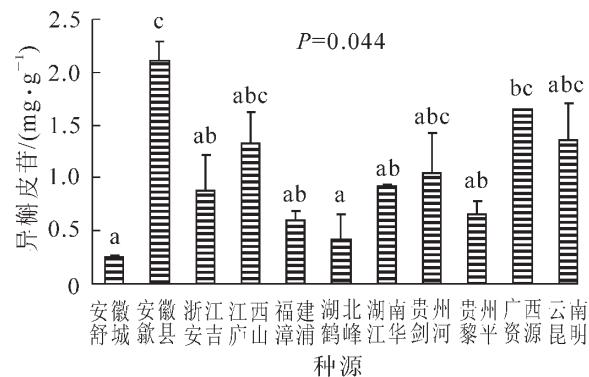


图 3 不同种源青钱柳叶片异槲皮苷质量分数

Figure 3 Isoquercitrin content of *Cyclocarya paliurus* leaf from different provenances

应用,而山奈酚的二元二次回归方程拟合度符合要求且达到显著水平,表明所求的趋势面方程可用。该方程的趋势面如图4所示。

由图4可知,青钱柳叶中山奈酚质量分数呈经纬度双向变异,但其变化幅度随经度变化幅度不如纬度变化大,其表现出以108°E和27°N交叉区域为中心向东西递增,向南北递减的趋势。而槲皮素、异槲皮苷质量分数的变化没有明显的规律性。

### 3 结论与讨论

青钱柳叶中3种黄酮类化合物——槲皮素、山奈酚和异槲皮苷等质量分数紧密相关,其中山奈酚质量分数高于槲皮素和异槲皮苷。在研究的各种源中,安徽歙县、广西资源种源的黄酮类化合物的质量分数较高,舒城种源的黄酮类化合物最低。

研究各性状地理变异规律的基本方法是通过对结果进行相关、线性回归和聚类分析,然后总结提出各性状地理变异规律<sup>[12-14]</sup>。近年来,趋势面分析方法已在研究种源地理变异模拟中取得了较好的效果<sup>[15]</sup>。与传统方法相比,趋势面分析在地理变异的线性相关不显著的情况下,往往能收集到可能存在的非线性相关信息,从而能够更精细地刻画出种源的地理变异趋势。笔者采用相关和趋势面分析方法来探讨青钱柳叶片中黄酮类化合物的地理变异规律,结果表明,青钱柳叶中山奈酚呈经纬度双向变异,但其变化幅度随经度变化幅度不如纬度变化大,其表现出以108°E和27°N交叉区域为中心向东西递增,向南北递减的趋势。而槲皮素、异槲皮苷质量分数的变化没有明显的规律性。

本研究所使用的试验材料有限,没有包括青钱柳的所有种源,今后将随着材料的进一步收集加以完善。同时本文试验黄酮类化合物质量分数只测定了1次,为了更深入地探讨其内在的变化规律,今后的研究会进一步补充和完善。

### 参考文献:

- [1] 谢明勇,李磊.青钱柳化学成分和生物活性研究概况[J].中草药,2001,32(4):365~366.  
XIE Mingyong, LI Lei. Review in studies on chemical constituents and bioactivities of *Cyclocarya paliurus* [J]. *Chin Tradit Herbal Drug*, 2001, 32 (4): 365 ~ 366.
- [2] 方升佐,洑香香.青钱柳资源培育与开发利用的研究进展[J].南京林业大学学报:自然科学版,2007,31(1):95~100.  
FANG Shengzuo, FU Xiangxiang. Progress and prospects on silviculture and utilization of *Cyclocarya paliurus* resources [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2007, 31 (1): 95 ~ 100.
- [3] 李磊,谢明勇,易醒,等.青钱柳多糖组分及其降血糖活性研究[J].江西农业大学学报,2001,23(4):484~486.  
LI Lei, XIE Mingyong, YI Xing, et al. Bioactivity of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk leaves in reducing blood sugar [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2001, 23 (4): 484 ~ 486.
- [4] 李磊,赵丽,谢明勇.青钱柳多糖组分生物活性及其元素化学形态分析[J].厦门大学学报:自然科学版,2003,42(1):73~77.  
LI Lei, ZHAO Li, XIE Mingyong. Bioactivity of reducing blood sugar and elements speciation analysis of the extract from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk leaves [J]. *J Xiamen Univ Nat Sci*, 2003, 42 (1): 73 ~ 77.
- [5] 何明,涂长春,黄起壬,等.梅山降糖神茶对四氧嘧啶糖尿病大鼠的降糖作用[J].中国药学杂志,1996,31(12):723~725.  
HE Ming, TU Changchun, HUANG Qiren, et al. Hypoglycemic effects of Meishanjiangtang Shencha in alloxan diabetic

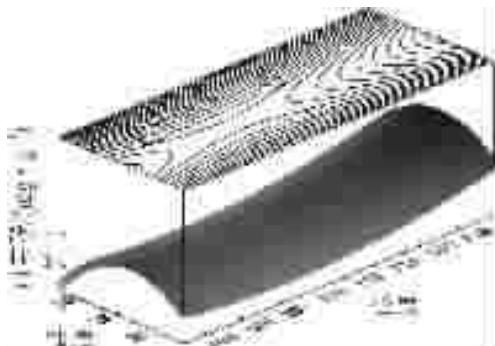


图4 青钱柳叶片山奈酚含量等值线-趋势面图

Figure 4 Contour-trend surface of kaempferol content in *Cyclocarya paliurus* leaves

- rats [J]. *Chin Pharm J*, 1996, **31** (12): 723 – 725.
- [6] 曹纬国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, **23** (12): 2241 – 2247.  
CAO Weiguo, LIU Zhiqin, SHAO Yun, et al. A progress in pharmacological research of flavonoids [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2003, **23** (12): 2241 – 2247.
- [7] 李荣, 李俊. 黄酮类化合物药理活性及其构效关系研究进展[J]. 安徽医药, 2005, **9** (7): 481 – 483.  
LI Rong, LI Jun. Advances in pharmacological research and structure-activity relationship of flavonoids [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2005, **9** (7): 481 – 483.
- [8] 葛明菊, 金则新, 李钧敏, 等. 大血藤黄酮类化合物组成的初步研究[J]. 浙江林学院学报, 2002, **19** (4): 382 – 386.  
GE Minju, JIN Zexin, LI Junmin, et al. A primary study on the flavonoids from *Sargentodoxa cuneata* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2002, **19** (4): 382 – 386.
- [9] 谢明勇, 王远兴, 易醒, 等. 青钱柳叶中黄酮化合物结构及含量研究[J]. 分析化学, 2004, **32** (8): 1053 – 1056.  
XIE Mingyong, WANG Yuanxing, YI Xing, et al. A study on the structure and contents of flavonoids in the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk [J]. *Chin J Anal Chem*, 2004, **32** (8): 1053 – 1056.
- [10] FANG Shengzuo, WANG Jiayuan, WEI Zhaoyang, et al. Methods to break seed dormancy in *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja [J]. *Sci Hort*, 2006, **110** (3): 305 – 309.
- [11] 鞠建明, 段金廒, 钱大伟, 等. 不同栽培模式的银杏叶在不同生长季节中总黄酮醇苷和总内酯的含量变化 [J]. 药物分析杂志, 2003, **23** (3): 195 – 199.  
JU Jianming, DUAN Jinao, QIAN Dawei, et al. A study on the changing rules for total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves in different planting models and growing seasons [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2003, **23** (3): 195 – 199.
- [12] 姚小华, 任华东, 孙银祥, 等. 樟树种源/家系早期性状变异及选择研究[J]. 江西农业大学学报: 自然科学版, 2002, **24** (3): 330 – 335.  
YAO Xiaohua, REN Huadong, SUN Yinxian, et al. A study on juvenile *Cinnamomum camphora*'s genetic variance & dominant selection for provenance/families [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2002, **24** (3): 330 – 335.
- [13] 兰彦平, 顾万春. 北方地区皂荚种子及果实形态特征的地理变异[J]. 林业科学, 2006, **42** (7): 47 – 51.  
LAN Yanping, GU Wanchun. Geographical variation of morphologic characteristics of *Gleditsia sinensis* seeds and legumes in the north region [J]. *Sci Silv Sin*, 2006, **42** (7): 47 – 51.
- [14] 任华东, 姚小华. 樟树种子性状产地表型变异研究[J]. 江西农业大学学报, 2000, **22** (3): 370 – 375.  
REN Huadong, YAO Xiaohua. Study on seeds phenotypic variation in natural range of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2000, **22** (3): 370 – 375.
- [15] 李纪元, 饶龙兵, 杨伟增. 枫杨种源苗期高生长地理变异的趋势面分析[J]. 中南林学院学报, 2003, **23** (1): 15 – 21.  
LI Jiyuan, RAO Longbin, YANG Weizeng. Trend surface analysis of geographic variations for the seedling height of Chinese wing-nut tree (*Pterocarya stenoptera*) provenance [J]. *J Cent South For Univ*, 2003, **23** (1): 15 – 21.