

花期冻害对杜仲花粉营养成分的影响

赵德义¹, 马仁萍², 张鞍灵^{1,*}, 杨吉安², 张康健²

(1. 西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:通过测定花期冻害前后杜仲花粉营养成分和总黄酮含量,研究花期冻害对杜仲花粉营养成分的影响。结果显示,花期低温对花粉蛋白质、蛋白质氨基酸、维生素含量等没有显著的影响;总黄酮含量略有增加,还原糖含量显著增加($P < 0.05$);但花粉游离氨基酸含量却有较明显的减少,蔗糖和粗脂肪的含量极显著的减少($P < 0.01$)。所以,在今后的生产中应尽量采取措施预防花粉冻害。

关键词:杜仲;花粉;营养成分;总黄酮;冻害

文章编号:1000-0933(2009)11-5936-06 中图分类号:Q948 文献标识码:A

Effects of frozen injury in flowering period on nutritional composition of *Eucommia ulmoides* pollen

ZHAO De-Yi¹, MA Ren-Ping², ZHANG An-Ling^{1,*}, YANG Ji-An², ZHANG Kang-Jian²

1 College of Science, Northwest A&F University. Yangling 712100 Shaanxi, China

2 College of Forestry, Northwest A&F University. Yangling 712100 Shaanxi, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(11): 5936 ~ 5941.

Abstract: Effect of frozen injury in flowering period on nutritional composition of *Eucommia ulmoides* pollen was evaluated by determination of the contents of nutritional ingredients and total flavonoids in pollen before and after frozen injury. The low temperature in flowering period didn't have any effect on the contents of proteins, amino acids and vitamins in the pollen, and the contents of total flavonoids increased slightly, and the contents of reducing sugars increased significantly ($P < 0.05$) in the pollen. However, after frozen injury, the levels of free amino acids in the pollen decreased obviously, and the levels of sucrose and crude fats decreased very significantly ($P < 0.01$). In conclusion, frozen injury had an adverse effect on some nutritional ingredients in the pollen, and therefore appropriate measures should be taken to protect *E. ulmoides* pollen against such frozen injury in the process.

Key Words: *Eucommia ulmoides*; pollen; nutritional ingredients; total flavonoids; frozen injury

花粉是植物的繁殖细胞,其营养、药用成分非常丰富,含有多种氨基酸、维生素、酶、微量元素、生物活性物质,有“完全营养素”、“微型营养库”之称。20 世纪 70 年代以来,许多国家对花粉的开发利用日益重视,不断进行深入而全面的研究

杜仲花粉营养成分全面且丰富,具有很高的开发利用价值^[1]。2007 年对杜仲花粉营养成分进行分析时,采样中偶遇急剧降温,致使杜仲花粉在花期受到冻害,所采收的样品一部分是冻前杜仲花粉,另一部分是冻后杜仲花粉。基于未见前人有关这方面的研究报导,故本次研究时将冻前、冻后杜仲花粉样品的营养成分进行了分析比较,研究花期冻害对杜仲花粉营养成分的影响,为杜仲花粉的开发利用提供依据。

基金项目:陕西省科技攻关资助项目(2007K01-11-03)

收稿日期:2009-06-22; 修订日期:2009-08-18

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: linganzh@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料 试剂 仪器

1.1.1 材料来源

试验所用的花粉均采自河南灵宝闫驮杜仲标准化管理示范基地。

河南灵宝地区属暖温带气候,年平均气温 11.0 ~ 14.2 °C, ≥ 10 °C 积温 4530 ~ 5140 °C,

无霜期 200 ~ 210 d,年平均降雨量 550 ~ 700 mm。海拔高度为 800 ~ 1080 m。冬、春温度变幅很大,春季气温回升较快。

2007 年 3 月 25 日寒流袭击,由于寒流入侵而剧烈降温,温度降至 0°C 以下(-3 ~ -5°C),且持续了 3d,水气凝结成霜,使花蕾、花器受冻而形成灾害。雄花受到霜冻后,由黄绿色变成深褐色。

1.1.2 采样时间与方法

2007 年 3 月 5 日开始观察,在 5 个无性系(处理)中随机选择 25 ~ 30 株,挂牌标明。2007 年 3 月 22 ~ 28 日,对挂牌植株,按 5 个无性系分别在各树树冠中部的东、南、西、北 4 个方向采集等量花粉(每株 20g),混合均匀,分别收集,在室内阴干,阴干后过 40 目筛后,装袋封存,备用。

1.1.3 试剂 仪器

日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪(日本,SHIMADZU);UV-2000 型紫外可见分光光度计(龙尼柯仪器有限公司);Model cq860A 型超声波清洗器(天津科贝尔公司);121MB 氨基酸分析仪(Beckman 公司);180-80 原子吸收分光光度计(日本日立公司);VS-KT-P 全自动定氮仪(日本日立公司);芦丁标准品(上海试剂二厂);乙醇、甲醇为分析纯、聚酰胺粉(14-30 目)等。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理方法

样品检测时,将 2007 年 3 月底采收的各无性系样品分别混合均匀,作为各无性系混合样品;从 5 个无性系混合样品中各取等量样品(50g)混合均匀,作为备用样品。

1.2.2 营养成分的测定方法

(1)氨基酸的测定(包括蛋白质氨基酸和游离氨基酸)

蛋白质氨基酸的测定 准确称取 20mg 干燥花粉样品放入水解管中,往水解管中加入 10mL 6mol/L 的 HCl,将其放入冷冻机中冷却至溶液呈固态后取出,再减压封口,将封好口的水解管放在 110°C 的恒温干燥箱内水解 22h 后,取出冷却。打开水解管,将水解液过滤后,用去离子水多次冲洗水解管,将水解液全部转移到 50ml 容量瓶内,用去离子水定容。吸取滤液 1mL 于 5mL 容量瓶内,用真空干燥器在 40 ~ 50°C 干燥,残留物用 1 ~ 2mL 水溶解,再干燥,反复进行两次,最后蒸干,用 1mL pH2.2 的缓冲液溶解,最后于 121MB 型氨基酸分析仪上测定含量。

游离氨基酸的测定 称取破壁处理后的花粉各 2.0g,放入盛有 20mL 75% 乙醇的烧杯中浸提 30min,过滤并用 10mL 乙醇洗涤,洗涤液和滤液合并。滤液蒸发挥去乙醇,再加乙醚除去类脂化合物后进行测定。

(2) 维生素的测定 维生素 B 采用荧光法测定^①;维生素 E 采用高效液相色谱法测定^②;维生素 C 采用 2,6-二氯酚酚滴定法^③

(3) 糖类的测定(还原糖和蔗糖):采用直接滴定法^④

(4) 蛋白质的测定 采用凯氏定氮法^⑤。即称取破壁处理后的花粉各 2.0g,移入干燥的 500mL 定氮瓶

① (GB/T 12391-1990)

② (GB/T 12388-1990)

③ (GB/T 6195-1986)

④ (GB/T 5009.7-1985)

⑤ (GB/T 6432-1994)

中,加入 0.12g 硫酸铜、3g 硫酸钾及 20mL 硫酸,并按同一方法做空白试验。通过蒸馏定氮,再用 N×6125 计算蛋白质的含量。

(5) 粗脂肪的测定 采用索氏抽取法^①

1.2.3 杜仲花粉中总黄酮的测定:

采用我国卫生部 2003 年版的《保健食品检验与评价技术规范》中保健食品中总黄酮的测定方法^[2]。

标准曲线及回归方程:精确称取在 105℃ 下干燥至恒重的芦丁对照品 10mg,用甲醇溶解,摇匀,定容到 100mL,使之成为浓度为 0.1mg/mL 的芦丁标准品溶液。精密吸取芦丁标准溶液(0.1mg/mL):0、1.25、2.5、3.75、5、6.25、7.5、8.75、10mL 与 25mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,于波长 360nm 下测定吸光度,见表 1 和图 1。

表 1 芦丁标准品溶液浓度与吸光度的关系

Table 1 The relation between absorbance and concentration of standard rutin solution								
项目 Item	0	1	2	3	4	5	6	7
浓度 Concentration(μg/mL)	0	5	10	15	20	25	30	35
吸光度 Absorbance	0	0.137	0.272	0.413	0.545	0.674	0.803	0.928

对表 1 中的数据进行回归分析后,得到标准曲线的回归方程为: $C = 37.609A - 0.2324$, 相关系数 $R^2 = 0.9997$, 在 5~35μg/mL 范围内对照品的量与吸光度有良好的线性关系。式中, C 为对照样品浓度(μg/mL), A 为所测得的吸光度。

测定步骤:称取 1g 经破壁处理后的花粉试样,加 75% 的乙醇定容至 25mL,摇匀后,超声提取 20 min,放置 1h 后吸取上清液 1.0mL,于蒸发皿中,加 1g 聚酰胺粉(14~30 目)吸附,再在水浴上挥去乙醇,然后转入层析柱。先用 20 mL 苯洗,苯液弃去,然后用 50 mL 甲醇洗脱黄酮(流速控制在 2~3 滴/10s),定容至 50mL(一般都定容到 25mL,但杜仲花粉中总黄酮的含量较高,若定容到 25 mL,测定的吸光值超过标准曲线的范围,故定容到 50mL),摇匀后在阴暗处放置一小时后(消除干扰)在 360nm 处测定吸收值。同时以芦丁为标准品测定标准曲线,求回归方程,计算试样中总黄酮含量。

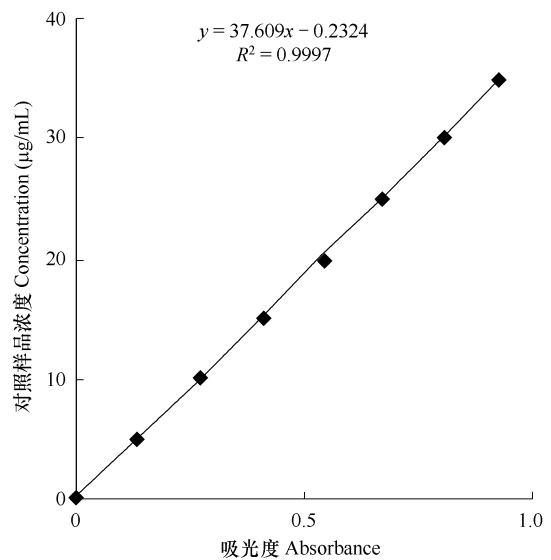


图 1 芦丁标准曲线图

Fig. 1 The standard curve of rutin

2 结果与分析

2.1 花期冻害对杜仲花粉主要营养成分的影响

从表 2 可见,花期冻害对杜仲花粉的蛋白质含量的影响不大($P > 0.05$),但还原糖含量显著增加($P < 0.05$),蔗糖和粗脂肪的含量极显著的减少($P < 0.01$)。

表 2 冻害对杜仲花粉主要营养成分含量的影响(%)

Table 2 Effect of frozen injury on nutritional composition in <i>Eucommia</i> pollen				
项目 Item	蛋白质 Protein	还原糖 Reducing sugar	蔗糖 Sucrose	粗脂肪 Crude fat
冻前花粉 Natural pollen	26.3517 ± 0.1341	12.9933 ± 0.2380 *	7.0033 ± 0.1102 **	3.4100 ± 0.0656 **
冻后花粉 Frosted pollen	26.7043 ± 0.2157	13.5133 ± 0.0702 *	4.5067 ± 0.0777 **	3.1067 ± 0.0306 **
P	0.0740	0.0222	0.0001	0.0019

① (GB/T 14772-1993)

2.2 花期冻害对杜仲花粉中氨基酸含量的影响

氨基酸是评价花粉营养价值高低的重要指标。从表 3 可以看出,冻害前后各蛋白质氨基酸含量虽有升有降,但变化均不很明显。冻害前后杜仲花粉中蛋白质氨基酸总量均为 19g/100g 左右,必需氨基酸的总量也均为 7g/100g 左右。从而可见,花期冻害对杜仲花粉中蛋白质氨基酸的含量影响不大。这与蛋白质氨基酸比较稳定有关。

表 3 冻害对杜仲花粉蛋白质氨基酸含量的影响
Table 3 Effect of frozen injury on amino acid content in *Eucommia* pollen

氨基酸 Amino acid	蛋白质氨基酸含量(g/100g) Amino acid contents		氨基酸 Amino acid	蛋白质氨基酸含量(g/100g) Amino acid contents	
	冻前花粉	冻后花粉		冻前花粉	冻后花粉
	Natural pollen	Frosted pollen		Natural pollen	Frosted pollen
天冬氨酸 Asp	1.618	1.684	* 异亮氨酸 Ile	0.851	0.838
* 苏氨酸 Thr	0.829	0.811	* 亮氨酸 Leu	1.339	1.377
丝氨酸 Ser	0.980	0.929	酪氨酸 Tyr	0.657	0.809
谷氨酸 Glu	2.215	2.308	* 苯丙氨酸 Phe	0.953	1.054
脯氨酸 Pro	1.967	2.318	* 赖氨酸 Lys	1.484	1.479
甘氨酸 Gly	0.794	0.849	组氨酸 His	0.696	0.671
丙氨酸 Ala	1.015	1.035	精氨酸 Arg	2.179	1.862
胱氨酸 Cys	0.174	0.135	必需氨基酸 Essential amino acid	7.029	7.287
* 缬氨酸 Val	1.136	1.253	氨基酸总量 Total amino acid	19.320	19.890
* 蛋氨酸 Met	0.437	0.475			

* 为人体必需氨基酸 Essential amino acid

由表 4 可见,花期冻害后游离氨基酸中除脯氨酸、胱氨酸、缬氨酸外,其余各游离氨基酸含量均有所下降,其中天冬氨酸、组氨酸、精氨酸含量减少较多;从表 4 可见,花期冻害后杜仲花粉中游离氨基酸总量减少了 448mg/100g,其中游离氨基酸中的必需氨基酸总量也有明显减少。从分量和总量来看,花期冻害对杜仲花粉游离氨基酸的影响是比较显著的,也就是说:花期的急剧降温(低温胁迫)会造成游离氨基酸营养成分的较大损失。所以,在以后的生产过程中应尽量采取措施,预防这类情况的发生。

表 4 冻害对杜仲花粉游离氨基酸含量的影响
Table 4 The influence of frost on free amino acid content in *Eucommia* pollen

氨基酸 Amino acid	游离氨基酸含量(mg/100g) Free amino acid content		氨基酸 Amino acid	游离氨基酸含量(mg/100g) Free amino acid content	
	冻前花粉	冻后花粉		冻前花粉	冻后花粉
	Natural pollen	Frosted pollen		Natural pollen	Frosted pollen
天冬氨酸 Asp	140.8	98.59	* 异亮氨酸 Ile	32.45	26.69
* 苏氨酸 Thr	0	0	* 亮氨酸 Leu	21.04	12.06
丝氨酸 Ser	140.30	87.58	酪氨酸 Tyr	16.13	12.28
谷氨酸 Glu	110.90	82.96	* 苯丙氨酸 Phe	10.90	8.260
脯氨酸 Pro	887.20	929.40	* 赖氨酸 Lys	60.36	54.75
甘氨酸 Gly	12.96	9.65	组氨酸 His	129.10	70.79
丙氨酸 Ala	53.41	38.88	精氨酸 Arg	580.70	315.50
胱氨酸 Cys	9.60	9.71	必需氨基酸 Essential amino acid	156.06	133.601789
* 缬氨酸 Val	17.95	20.59	氨基酸总量 Total amino acid	2237	
* 蛋氨酸 Met	13.36	11.25			

* 为人体必需的氨基酸 Essential amino acid

2.3 花期冻害对杜仲花粉中维生素含量的影响

由表 5 和图 2 可见,冻害前和冻害后杜仲花粉中的维生素含量差异不显著。从而可见,低温胁迫对维生素含量影响不大。

表 5 冻害对杜仲花粉维生素含量的影响(mg/100g)

Table 5 Effect of frozen injury on vitamin content in <i>Eucommia</i> pollen							
花粉 Pollen	V _C	V _{B1}	V _{B2}	V _{αE}	V _{δE}	V _{γE}	V _{αE} + δ _E + γ _E
冻前花粉 Natural pollen	135	0.535	1.140	1.648	0.591	1.149	3.388
冻后花粉 Frosted pollen	126	0.528	1.180	1.561	0.935	1.275	3.711

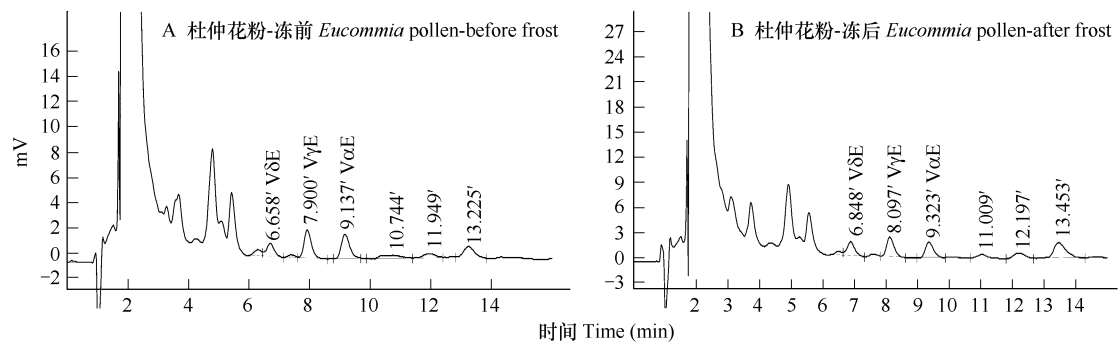


图 2 VE 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatography of VE in the pollen of *E. ulmoides*

2.4 花期冻害对杜仲花粉中总黄酮含量的影响

由表 6 可见,在低温胁迫下,冻害后花粉的总黄酮含量略有增加。

3 结论与讨论

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)为杜仲科杜仲属落叶乔木,在我国 20 多个省(市、自治区)均有分布,栽植面积约 36 万 hm²。其皮、叶、果、花均富含多种天然活性物质,是重要的药用植物,杜仲皮、叶、籽和雄花已开发为药品或保健食品。具有调节血压、降血脂、降血糖、减肥、美容、抗衰老、增强免疫力等功效^[4,5]。杜仲花粉的营养全面且丰富,维生素种类齐全,含量较丰富,总黄酮含量亦较高,是 29 种常见花粉黄酮含量平均值的 1.4 倍^[1]。所以,杜仲花粉无论在保健食品的开发利用方面还是在药用方面都有很高的利用价值。因此,资源丰富且富含黄酮类物质的杜仲花粉是亟待开发的宝贵新资源。

花期冻害(低温胁迫)对杜仲花粉中维生素、蛋白质、蛋白质氨基酸含量等虽没有显著的影响(这与蛋白质和蛋白质氨基酸比较稳定有关),总黄酮含量略有增加,还原糖含量显著增加($P < 0.05$)。但是,杜仲花粉游离氨基酸含量有较明显的减少(游离氨基酸是人体能直接吸收的主要营养成分之一);蔗糖和粗脂肪的含量极显著的减少($P < 0.01$)。所以,在今后的生产中应尽量采取措施预防花粉受冻。

在自然环境条件下,高温、低温、干旱等环境胁迫都有可能对植物造成伤害。在一定程度上,植物对环境胁迫会及时做出反应,次生代谢及其产物是其生化反应基础^[6]。这就是说,次生代谢物的积累和增加是植物普遍的防御机制,可以保护植物免受或少受环境胁迫的危害。环境胁迫(如低温胁迫)会刺激植物防御机制的启动,增加次生代谢物的含量,用于抵抗不良环境的影响^[6],而黄酮类化合物又是植物中非常重要的次生代谢物,在植物忍受环境胁迫中起着各种各样的作用^[6],所以冻后杜仲花粉总黄酮含量在低温胁迫下就会有所增加。而杜仲花粉中还原糖含量的显著增加,可能与低温胁迫下细胞液中还原糖积累增加有关,还原糖的

表 6 冻害对杜仲花粉总黄酮的影响

Table 6 Effect of frozen injury on total flavones content in *Eucommia* pollen

项目 Item	冻前花粉 Natural pollen	冻后花粉 Frosted pollen
含量 Content (mg/100g)	3190	3267

增加可减少液泡中冰的形成、提高细胞膜的抗寒能力^[6]。

References:

- [1] Ma R P,Zhao D Y,Yang J A,*et al.* Nutritional components of *Eucommia ulmoides* pollen. Journal of Northwest Forestry University,2007,22(6): 111—113.
- [2] Ministry of health of the people's republic of China. The standard specification for functional food inspection and evaluation,2003,308.
- [3] Dong J E,Ma B L,Liu L,*et al.* An ultrasonic extraction method of *Eucommia ulmoides* leaves. Journal of Northwest Forestry University,2003,18(3):66—68.
- [4] Zhang K J,Wang L,Ma B L,*et al.* Second Metabolites in China *Eucommia ulmoides*. Beijing: Science Press, 2002. 152—158.
- [5] Edited by Zhang Kangjian,Zhao Deyi,Dong Juan'e. Translated by Liu Guangzhe,Liang Linhuai. Du-zhong,A Globally Fashionable Healthcare Concept,Northwest A&F University Press,2008. 31—118.
- [6] Dong J E,Zhang K J. Plant Secondary Metabolism and Its Regulation. Northwest A&F University Press,2009. 31—40,60—61.

参考文献:

- [1] 马仁萍,赵德义,杨吉安,等. 杜仲花粉营养成分研究. 西北林学院学报,2007,22(6):111~113.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范. 2003,308.
- [3] 董娟娥,马柏林,刘丽,等. 超声波提取杜仲叶有效成分工艺研究. 西北林学院学报,2003,18(3):66~68.
- [4] 张康健,王蓝,马柏林著. 中国杜仲次生代谢物. 北京:科学出版社,2002. 145~161.
- [6] 董娟娥,张康健,梁宗锁著. 植物次生代谢与调控. 陕西杨凌:西北农林科技大学出版社,2009. 31~40,60~61.