

## 罗布麻叶中黄酮类成分的定位与相对定量

许 虎<sup>1</sup>, 王 媚<sup>1</sup>, 刘训红<sup>1\*</sup>, 徐建亚<sup>2</sup>, 傅兴圣<sup>1</sup>, 周逸芝<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210046)

**摘要:** 为探讨罗布麻不同生长年限植株上不同部位叶中黄酮类成分的分布与相对含量变化, 利用激光共聚焦显微技术对 7 月份采收的罗布麻 1~3 年龄植株上部、中部、下部的叶中黄酮类成分进行组织定位和相对定量。所记录数据经正态性、方差齐性检验后进行方差分析 (ANOVA), 并使用 LSD 检验作多重比较。结果显示黄酮类成分主要分布在叶脉维管束木质部导管壁、叶脉上下方厚角组织、表皮细胞及外方蜡质层。统计分析表明罗布麻叶中黄酮类成分的含量在不同年龄植株上不同部位之间有一定的差异。

**关键词:** 罗布麻; 叶; 黄酮; 定位与相对定量; 激光共聚焦显微技术

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 08-1004-04

## Location and relative quantity of flavonoids in the leaf of *Apocynum venetum*

XU Hu<sup>1</sup>, WANG Mei<sup>1</sup>, LIU Xun-hong<sup>1\*</sup>, XU Jian-ya<sup>2</sup>, FU Xing-sheng<sup>1</sup>, ZHOU Yi-zhi<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. First College of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**Abstract:** In this study, laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used to determine the location and relative quantity of flavonoids in the leaves of *Apocynum venetum* L. from the top, middle and basal parts of the branch. The leaves of the plants of one, two and three years old, separately, were collected in July. ANOVA and LSD test were employed in the statistical analysis. The results indicated that flavonoids located mainly in xylem conduit of vein, collenchyma, epidermic cells and cuticle. The data of flavonoids contents under statistical analysis showed that difference existed in the leaves of different parts and different ages. This study provided the reliable scientific material about the analysis of the ecological and the exploitation of the leaves of *Apocynum venetum* L.

**Key words:** *Apocynum venetum*; leaf; flavonoid; location and relative quantity; laser scanning confocal microscopy

罗布麻叶为常用中药, 系夹竹桃科植物罗布麻 (*Apocynum venetum* L.) 的干燥叶, 具平肝安神、清热利水之功效, 主治肝阳眩晕、心悸失眠、浮肿尿少、高血压、神经衰弱、肾炎浮肿等症; 其叶亦作茶饮, 具

清凉去火、防止头晕等保健作用<sup>[1]</sup>。现代药理研究<sup>[2]</sup>表明, 罗布麻叶具有降血压、降血脂、增强免疫、抗衰老等作用, 其主要活性成分为槲皮素、异槲皮苷、金丝桃苷、紫云英苷等多种黄酮类化合物。

关于黄酮类成分的组织化学定位研究, Tan 等<sup>[3]</sup>报道用荧光显微镜观察黄酮荧光诱导剂诱导后的柴胡叶片进行黄酮类成分的组织化学定位。黄酮类成分一般不具有自发荧光, 需要加入荧光诱导剂后进行观察。激光共聚焦显微镜 (laser scanning confocal

收稿日期: 2011-01-25.

基金项目: 江苏省中医药局科技项目 (LZ09020); 南京中医药大学基础研究基金项目 (09XJC05); 盐城市 2008 年科技发展计划项目 (YK2008081).

\*通讯作者 Tel: 86-25-85811511, Fax: 86-25-85811524,

E-mail: liuxunh1959@sohu.com

microscope, LSCM) 综合了普通光学显微镜和荧光显微镜的功能, 克服了荧光显微镜分辨率差的缺点, 实现了无损伤连续的光学切片和真实三维结构的重现, 并配备微机数字化分析系统和电子摄影系统, 可进行组织化学成分的定性与定量等测定。本文利用激光共聚焦显微镜的特点和技术优势, 研究罗布麻叶中黄酮类成分的细胞形态结构及其动态分布, 初步对 7 月份采收的不同生长年限 (1 年龄、2 年龄、3 年龄) 和不同部位 (上部、中部、下部) 的罗布麻叶进行了黄酮类成分的组织定位和相对定量, 为罗布麻的生态分析以及罗布麻叶的合理利用提供科学依据。

## 材料与方法

**材料** 罗布麻叶于 2010 年 7 月采自南京中医药大学药用植物园。原植物野生于江苏省盐城市射阳县洋马镇近海边的滩涂上, 后栽培于南京中医药大学药用植物园。选取 1 年龄、2 年龄、3 年龄罗布麻植株, 分别采收成熟分枝的上部嫩叶、中部成熟叶和基部成熟叶为实验材料。经南京中医药大学刘训红教授鉴定为夹竹桃科植物罗布麻 (*Apocynum venetum* L.) 的叶, 凭证样本留存在南京中医药大学中药鉴定实验室。

**荧光参数的测定** 精密称取槲皮素、金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁对照品 (均购置于中国药品生物制品检定所) 0.1 mg, 分别用 80% 甲醇溶解在 10 mL 量瓶中得供试液; 另取新鲜的罗布麻叶于研钵中碾碎, 过滤取滤液即得细胞原液。

取上述供试液各 1 mL 于比色皿中, 另外加入 1 mL 的自制磷酸缓冲溶液 (pH = 6.5, 溶液中另含 NaCl 的质量浓度为 1%) 和 1 mL NA 溶液 (二苯基硼酸-2-氨基乙酯, 80% 甲醇溶解, 质量浓度为 0.1%), 混匀后置日本岛津 RF-5301 型荧光分光光度计中检测各供试液的激发波长和发射波长, 并结合激光共聚焦显微镜的光源条件, 选择最佳激发波长和发射波长进行激光共聚焦实验。

**组织切片的制备和观察** 选取不同年龄 (1~3 年) 的采自成熟分枝的上部、中部和基部的鲜罗布麻叶, 从叶片的中部横切成宽 3 mm 的小片 (保留中脉和叶缘), 然后在 -20 °C 下包埋, 用 Leica CM 1900 型冰冻切片机制片 (切片厚度为 10 μm), 粘片后置保温盒中冷冻保存。观察之前需对切片进行荧光诱导处理, 在切片上滴加一滴含 NaCl 的磷酸缓冲液, 片刻后滴加 NA 试剂一滴, 盖上盖玻片, 同时去掉多

余的试液, 5 min 后观察。观察所用仪器为 Leica TCS SP5 型激光共聚焦显微镜。随机选取 10~30 个视野下的中柱和叶肉, 摄像并记录荧光平均强度及荧光总强度数值。

**统计学处理** 所得数据中每组随机选取 10 个数据, 采用 SPSS 16.0 数据分析软件, 经正态性、方差齐性检验后进行方差分析 (ANOVA), 并使用 LSD 检验作多重比较。

## 结果

### 1 所测成分的荧光参数

荧光分光光度计测得各物质 (芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素、细胞原液) 的最大激发波长分别为 439、437、438、455 和 429 nm。测得各成分的最大发射波长及相应的峰高分别为: 芦丁 542 nm (34.7)、金丝桃苷 545 nm (41.2)、异槲皮苷 541 nm (59.7)、槲皮素 547 nm (155.2) 和细胞原液 520 nm (146.5)。

### 2 罗布麻叶中黄酮类成分的分布

通过观察, 7 月份采收的不同年龄不同部位的罗布麻叶中黄酮成分的组织分布具有明显的规律性。黄酮类成分主要分布在叶脉维管束木质部导管壁、叶脉上下方厚角组织 (图 1A)、表皮细胞及外方蜡质层 (图 1B)。通过带透射效果的图片信息可以看出, 加含有 1% NaCl 的缓冲液导致细胞的质壁分离, 发现在表皮和厚角组织细胞中强的荧光主要出现在原生质体和细胞核中 (图 1C)。

### 3 罗布麻叶中黄酮类成分动态变化

不同年限不同部位罗布麻叶的实验结果随机抽样得到的数据, 经统计学分析处理, 结果见表 1。

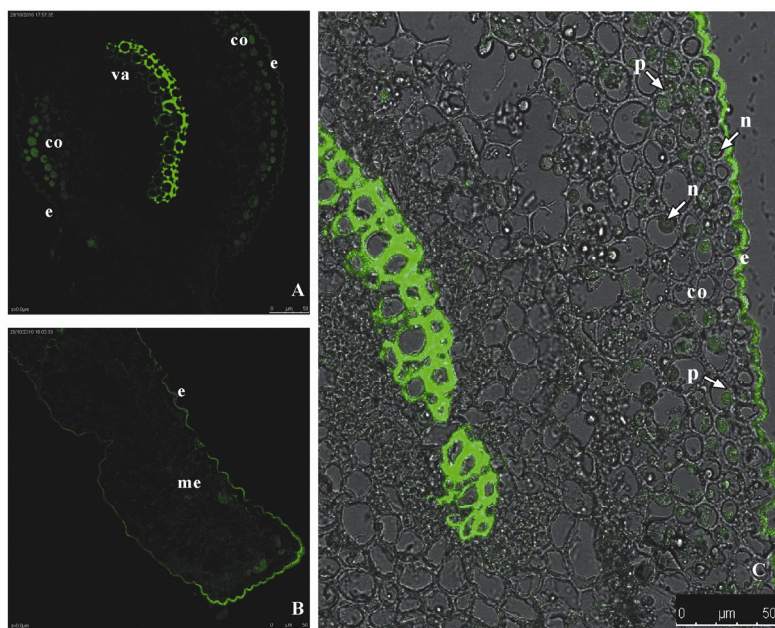
**Table 1** Comparison analysis of the leaves on different parts of *Apocynum venetum* L. of different age ( $n = 10$ ). a: Comparing to middle leaf,  $P < 0.05$ ; b: Comparing to lower leaf,  $P < 0.05$ ; c: Comparing to upper leaf,  $P < 0.05$

| Group       | One-year old            | Two-year old               | Three-year old             |
|-------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Upper leaf  | 13.1 ± 2.6              | 11.6 ± 1.1 <sup>a, b</sup> | 12.7 ± 2.4                 |
| Middle leaf | 12.0 ± 3.0              | 16.8 ± 2.7                 | 12.2 ± 2.5                 |
| Lower leaf  | 20.0 ± 5.0 <sup>a</sup> | 16.7 ± 2.1                 | 19.0 ± 4.0 <sup>a, c</sup> |

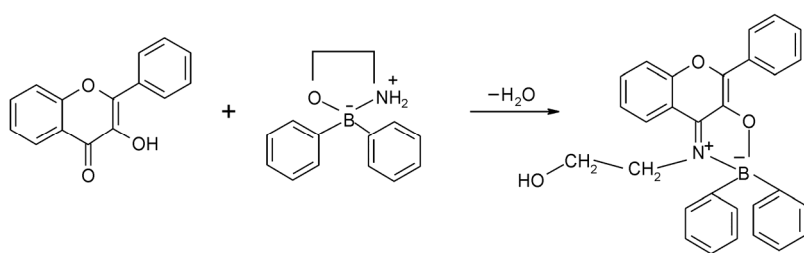
## 讨论

### 1 黄酮类成分荧光诱导剂的选择

黄酮类成分一般不具有自发荧光, 可通过加入荧光诱导剂诱使该类成分产生荧光。本实验通过对黄酮类成分常用的荧光诱导剂: 氨水、三氯化铝的甲醇



**Figure 1** Location of flavonoids in the leaves of *Apocynum venetum* L. (staff gauge represents 50  $\mu\text{m}$ ). (A) The main vein of the leaf under LSM; (B) The mesophyll of the leaf under LSM; (C) The picture of the main vein with transmission effect under LSM. co: Collenchyma; e: Epidermis; me: Mesophyll; n: Nucleus; p: Protoplast; va: Vascu



**Figure 2** Reaction between 3-hydroxy-flavone and NA (diphenylboric acid 2-aminoethyl ester)

液和 NA 甲醇液分别进行激光共聚焦优选实验。结果显示, 氨水试剂对黄酮成分产生荧光强度太弱, 灵敏度低; 三氯化铝试剂容易造成黄酮类成分从植物组织中溶出, 导致定位不准确, 该原因可能是由于三氯化铝溶液染色时不能同时用磷酸缓冲液保护组织, 磷酸缓冲液的 pH 值偏中性, 和三氯化铝溶液混合产生胶体, 直接影响荧光诱导; NA 试剂能明显增强黄酮成分的荧光, 已作为黄酮类成分荧光诱导剂应用于植物组织和细胞的化学定位<sup>[4-6]</sup>。

## 2 激光共聚焦实验的发射光谱波长的选择

有关罗布麻叶中黄酮类成分的组织化学定位尚未有报道。利用荧光分光光度计对罗布麻叶中主要的黄酮化合物单体及细胞原液 NA 试剂染色后进行全波长扫描 (200~700 nm), 得到相应的激发峰和发射峰; 结果发现, 槲皮素在最大激发光激发下的荧光强度最强, 是金丝桃苷和异槲皮苷各自荧光强度的 3 倍左右, 而细胞原液的荧光强度与槲皮素接近, 说明在

各个物质中槲皮素的荧光强度对于总黄酮的荧光强度贡献最大, 结合激光共聚焦显微镜的条件, 选择 458 nm。发射波长的具体数据已在结果中给出, 实验选择 520~560 nm 时, 荧光具有较高的灵敏度和特异性。为了排除罗布麻叶中其他自发荧光物质的干扰, 在不加荧光诱导剂的情况下, 通过使用建立的条件在激光共聚焦显微镜下观察, 结果发现视野中并未出现荧光。黄酮类化合物和 NA 试剂反应生成具有荧光的物质<sup>[7]</sup>, 反应结构式见图 2。罗布麻叶中黄酮类化合物主要为黄酮醇和黄烷醇类, 由于黄烷醇类不具有 4 位羰基, 不能生成此荧光物质, 可排除黄烷醇类酚性化合物对实验结果的干扰。该实验条件可以反映黄酮类成分在罗布麻叶中的分布和相对定量。

## 3 黄酮类化合物在罗布麻叶中的组织定位

黄酮类成分主要分布于叶脉维管束木质部导管壁、叶脉上下方厚角组织、表皮细胞及外方蜡质层。在厚角组织细胞和表皮细胞中, 黄酮类成分明显存

在于原生质体和细胞核中。Hutzler 等<sup>[4]</sup>通过研究发现黄酮类化合物出现在表皮细胞中; Stavroulaki 等<sup>[8]</sup>发现该类化合物储藏在角质层; Sheahan 等<sup>[9]</sup>在植物细胞的细胞核中也发现了黄酮类成分。本实验首次发现罗布麻叶中黄酮类成分还积累在厚角组织细胞以及导管壁上。另外相关研究<sup>[10, 11]</sup>表明, 植物通过在表皮以及蜡质层对黄酮类成分的积累来对抗紫外线的照射, 从而保护叶肉组织。而罗布麻植物广布于我国华北和华东地区, 而且多生于盐碱荒地和沙漠边缘, 可能黄酮类成分在罗布麻叶中的组织积累和分布特点正是罗布麻植物适应能力强的原因之一。

#### 4 罗布麻叶中黄酮类成分的相对含量变化

通过对罗布麻叶的荧光平均强度“10~30 组观察值的平均±标准误差, 单位: 像素荧光强度 (Pixel intensity)”的结果进行统计学分析, 罗布麻叶中黄酮类成分相对含量在相同年龄的不同部位之间存在差异, 在不同年龄的相同部位之间差异不明显。其中一年生和三年生植株下部叶的含量明显高于上部叶和中部叶; 二年生植株上部叶的含量明显少于其他部位叶的含量。而且一、二、三年生的植株的下部叶中黄酮含量普遍高。从黄酮类化合物在罗布麻叶中的分布发现, 导管壁和叶片的厚角组织是黄酮类化合物主要积累的部位。导管和厚角组织在下部叶 (成熟叶) 中发育最成熟, 结合本实验的数据不难发现黄酮类化合物在下部叶中积累较多。建议在采收罗布麻叶时应多采收下部成熟叶。

#### References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia 2010. Part 1 (中国药典 2010 版: 一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 196.
- [2] Xiao PG. Modern Chinese Materia Medica: Vol 3 (新编中药

- 志: 第三卷) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 463–467.
- [3] Tan LL, Hu ZH, Cai X, et al. Histochemical localization and the content compare of main medicinal components of vegetative organs in *Bupleurum chinense* DC. [J]. J Mol Cell Biol (分子细胞生物学报), 2007, 40: 214–222.
- [4] Hutzler P, Fischbach R, Heller W, et al. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy [J]. J Exp Bot, 1998, 49: 953–965.
- [5] Karioti A, Kitsaki CK, Zygouraki S, et al. Occurrence of flavonoids in *Ophrys* (Orchidaceae) flower parts [J]. Flora, 2008, 203: 602–609.
- [6] Tattini M, Gravano E, Pinelli P, et al. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation [J]. New Phytol, 2000, 148: 69–77.
- [7] Kartnig T, Göbel I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2-aminoethyl ester [J]. J Chromatogr A, 1996, 740: 99–107.
- [8] Stavroulaki V, Nikolopoulos D, Liakopoulos G, et al. The pattern of cuticular blue-fluorescing phenolics deposition during the development of *Prunus persica* leaves [J]. Flora, 2007, 202: 261–267.
- [9] Sheahan JJ. Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) [J]. Am J Bot, 1996, 83: 679–686.
- [10] Schnitzler JP, Jungblut TP, Heller W, et al. Tissue localization of UV-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of *Scots pine* seedlings [J]. New Phytol, 1996, 132: 247–258.
- [11] Hoerner RS, Weissenböck G. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels [J]. Phytochemistry, 2003, 64: 243–255.