

# 乌桕叶片及其乳汁中酚类物质比较分析

顾雪<sup>1,2</sup>, 王毅<sup>1\*</sup>, 任明迅<sup>1</sup>, 高少雄<sup>3</sup>, 朱琳<sup>4</sup>, 丁建清<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生植物与流域生态重点实验室, 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 山东农业大学生命科学学院, 山东泰安 271018; 4. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018)

**摘要:** 大戟科乌桕(*Triadica sebifera*)是我国南方重要的经济和绿化树种。分析了乌桕叶片乳汁中单宁和类黄酮的含量,并与叶片中单宁和类黄酮的含量进行对比。研究发现,在乳汁和叶片中共同检测到的2种单宁和2种类黄酮物质,它们在叶片中的浓度远远高于乳汁中的浓度。这表明乌桕中的单宁和类黄酮这类防御物质主要存在于叶片中。乌桕各种种群单宁与类黄酮含量都有显著差异,这可能是不同种群所处的生态环境以及面临植食昆虫的不同而导致的。

**关键词:** 乌桕; 乳汁; 单宁; 类黄酮; 抗性

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)06-0590-06

## Phenolic Chemical Analyses in Leaves and Latex of *Triadica sebifera*

GU Xue<sup>1,2</sup>, WANG Yi<sup>1\*</sup>, REN Ming-Xun<sup>1</sup>, GAO Shao-Xiong<sup>3</sup>, ZHU Lin<sup>4</sup>, DING Jian-Qing<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Botany and Watershed Ecology, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; 4. College of Plant Protection, Shandong Agriculture University, Taian, Shandong 271018, China)

**Abstract:** *Triadica sebifera* (Euphorbiaceae) is an important economic and ornamental tree species in South China. Here, we analyzed and compared tannins and flavonoids content in both tallow leaves and latex. We found that the content of two tannins and two flavonoids in latex were lower than those in leaves. This indicated that most tannins and flavonoids existed in tallow leaves. We also found that tannins and flavonoids content differed among seven populations, which may be associated with different habitats and herbivores.

**Key words:** *Triadica sebifera*; Latex; Tannins; Flavonoids; Resistance

乌桕(*Triadica sebifera* (L.) Roxb.)为大戟科落叶乔木,主要分布于我国黄河以南各省区,是重要的油料树种和绿化树种。乌桕种子中提取的柏脂和梓油都被广泛应用于能源和化工产业,其根、叶和树皮具有重要的药用价值,乌桕木材可作为家具和雕刻等用材。此外,乌桕树形整齐,春秋季叶色红艳夺目,是园林绿化中重要的护堤、庭荫及行道树种<sup>[1]</sup>。

乌桕叶片含有多种酚类、萜类化学物质<sup>[2-5]</sup>,其中的单宁、类黄酮等物质具有重要的抑菌和抗虫作用<sup>[6-8]</sup>。单宁主要通过抑制昆虫的消化吸收能力

来防御昆虫<sup>[9]</sup>,而类黄酮的防御功能主要体现在过滤紫外线、刺激或抑制取食以及化感和毒性作用等方面<sup>[10,11]</sup>。但是关于乌桕乳汁化学成分的研究还鲜有报道。乳汁是从植物受到机械损伤或植食者取食的位置流出的液体<sup>[12]</sup>。被子植物中大约有40个科的2万多个物种含有乳汁,常见有罂粟科、桑科、大戟科、番木瓜科、夹竹桃科、旋花科、菊科、桔梗科等<sup>[13]</sup>。植物乳汁中含有的各种次生化合物如类黄酮、单宁、萜类、生物碱等,以及各种蛋白质类如蛋白酶、几丁质酶和葡萄糖苷酶等,对多种植食性昆虫都有毒性<sup>[12-16]</sup>,是植物的一种重

收稿日期: 2012-12-11, 修回日期: 2013-03-17。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973计划)(2012CB114104)。

作者简介: 顾雪(1990-),女,硕士研究生,研究方向为入侵生物学(E-mail: wanyu213@163.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wangyiwang@aliyun.com)。

要防御方式。但涉及乌桕叶片乳汁化学成分及其防御作用的研究报道较少。

本研究通过对国内乌桕不同种群中2种酚类物质(单宁和类黄酮)的含量进行分析,探索各个种群乌桕叶片和叶片乳汁中化学物质的差异,同时研究乌桕乳汁与叶片在防御昆虫方面的作用。该研究结果对进一步揭示乌桕体内的次生代谢物质及其抗虫作用将具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2011年秋季,我们采集到7个乌桕(*Triadica sebifera*)种群的种子,它们分别来自贵州桃花岛、广西桂林、浙江杭州、江苏南京、江西鹰潭、四川青城山和广东阳山。用洗衣粉溶液浸泡种子以去掉种子外的蜡质层,然后将种子在4℃条件下层积40 d<sup>[7]</sup>。2012年4月,将种子放在温室中萌发,后将幼苗移栽到苗盆中,每株植物罩上透明的纱网以隔绝昆虫。

2012年7月进行乳汁、叶片采集。从每个种群中随机挑选3盆大小一致的乌桕幼苗。用灭过菌的剪刀从叶片基部剪下,用玻璃毛细管吸取流出的乳汁,然后移入灭过菌的微量离心管中。一株苗上收集的所有叶片乳汁都放在一个称过重的离心管中,用分析天平称取离心管中乳汁的重量。乳汁样品放在冰箱-20℃条件下保存备用。采集完乳汁的叶片用信封收集,烘干后用于化学物质分析。

### 1.2 方法

采用高效液相色谱法对乌桕叶片乳汁和叶片的化学物质进行分析。我们主要分析其中5种类黄酮单体化合物(异槲皮苷、山奈苷、槲皮苷、槲皮素、山奈酚)和4种单宁类化合物(没食子酸、单宁酸、儿茶素、鞣花酸)的含量。分析仪器为Dionex ultimate 3000 HPLC仪(美国Dionex公司),所用色谱柱为ZORBAX Eclipse Plus C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(美国Agilent公司)。

#### 1.2.1 样品处理

将乌桕叶片乳汁溶解在400 μL的过膜水中,稀释10倍后过0.45 μm的水系滤膜,取100 μL滤液进行HPLC分析。

将烘干后的乌桕叶片用研钵磨碎。准确称取50 mg样品,用甲醇:0.1%磷酸(1:1 V/V)萃取24 h,2500 r/min离心30 min,取上清液过0.45 μm的有机滤膜。取100 μL滤液直接进行HPLC分析。

#### 1.2.2 色谱条件

单宁类物质:流动相A为甲醇,B为0.1%磷酸;梯度洗脱程序为:0~7.5 min,A:B=30:70;8~17 min,A:B=55:45;流速为1.0 mL/min;检测波长:没食子酸、单宁酸和儿茶素为279 nm,鞣花酸为260 nm<sup>[7]</sup>。

类黄酮类物质:流动相A为甲醇,B为0.04%磷酸,梯度洗脱程序为:0~10 min,A:B=48:52;10.5~18.5 min,A:B=65:35;流速为1.0 mL/min;检测波长均为254 nm<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.3 数据计算分析

根据仪器测得的峰面积以及测量的样品质量,经标准曲线方程换算,最后得到乌桕叶片乳汁中单宁和类黄酮化学成分的质量分数,单位均为μg/g。采用方差分析(ANOVA)来检验各种群间乳汁与叶片中单宁和类黄酮含量的差异。所有数据采用SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, US)进行分析。

## 2 研究结果

### 2.1 单宁

从乌桕叶片乳汁中检测到2种单宁类物质:儿茶素和没食子酸,单宁酸和鞣花酸未检测到。其中,四川种群乳汁中的儿茶素含量最高(为201.4 μg/g),杭州种群含量最低(为41.2 μg/g)(图1:A);而没食子酸只在广西、江苏、四川和广东4个种群的叶片乳汁中检测到,广西种群乳汁中没食子酸含量最高(为55.6 μg/g)(图1:A)。各种群之间,叶片乳汁中单宁含量都有显著差异( $p<0.05$ ,表1)。

从乌桕叶片中检测到3种单宁类化合物:单宁酸、儿茶素和没食子酸,鞣花酸未检测到。其中,四川种群中叶片单宁酸含量最高(为4942.6 μg/g)(图1:B),且种群间差异显著( $p<0.01$ ,表1);各种群间叶片儿茶素含量的差异不太显著( $p>0.05$ ,

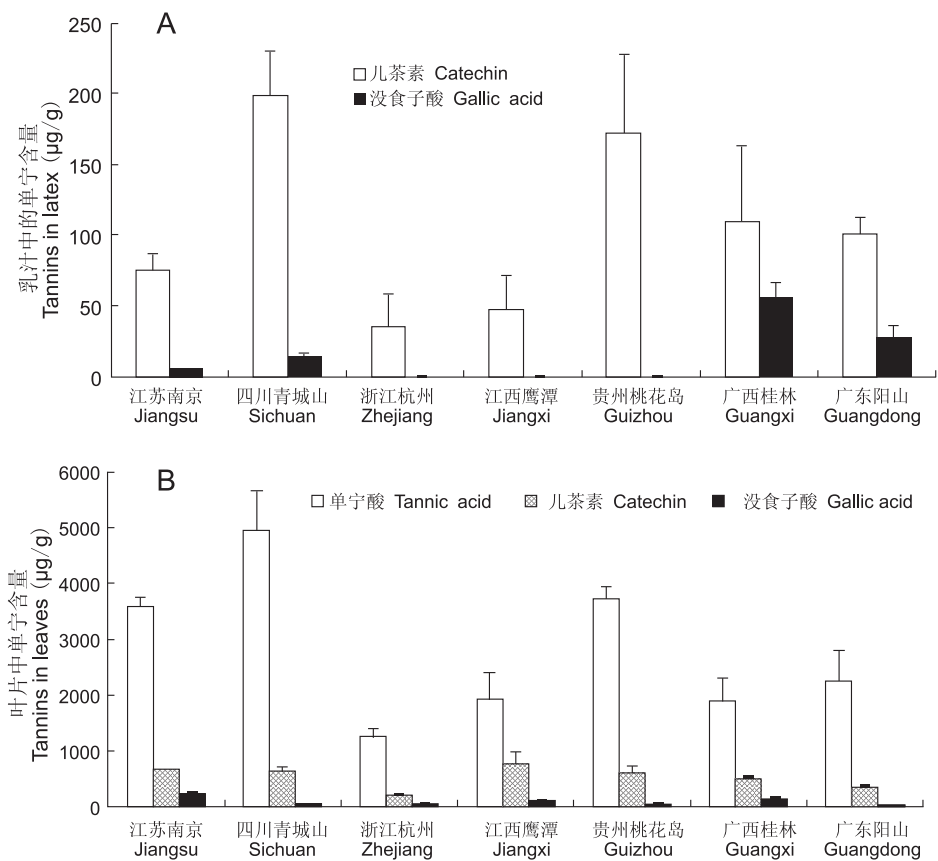


图 1 乌桕不同地理种群叶片乳汁 (A) 与叶片 (B) 的单宁含量 (种群按纬度由高到低排列)  
Fig. 1 Comparison of tannins content in latex (A) and leaves (B) among seven tallow populations  
(Populations sorted by latitude in descending order)

表 1 乌桕各种群间叶片乳汁和叶片中单宁含量的方差分析  
Table 1 ANOVA testing for the differences in tannins in tallow leaf and latex among seven populations

因素 Factor	乳汁 Latex				叶片 Leaves					
	儿茶素 Catechin		没食子酸 Gallic acid		儿茶素 Catechin		没食子酸 Gallic acid		单宁酸 Tannic acid	
	df	<i>p</i>	df	<i>p</i>	df	<i>p</i>	df	<i>p</i>	df	<i>p</i>
种群 Population	6	0.036	3	0.047	6	0.053	6	0.000	6	0.000

表 1); 江苏种群叶片没食子酸含量最高 (为 342 µg/g), 广东种群叶片没食子酸含量最低 (为 51.6 µg/g) (图 1: B), 各种群间, 叶片没食子酸含量的差异显著 ( $p < 0.01$ , 表 1)。

2.2 类黄酮

从乌桕叶片乳汁中检测到 3 种类黄酮物质: 山奈酚、异槲皮苷和槲皮苷, 槲皮素和山奈苷未检测到。其中, 贵州种群叶片乳汁中山奈酚的含

量最高 (为 82.1 µg/g), 广西种群含量最低 (为 34.6 µg/g) (图 2: A), 各种群间, 叶片乳汁山奈酚的含量有显著差异 ( $p < 0.05$ , 表 1); 而各种群间叶片乳汁中异槲皮苷和槲皮苷的含量差异均不显著 ( $p > 0.05$ , 表 2)。

从乌桕叶片中检测到 4 种类黄酮物质: 山奈苷、异槲皮苷、槲皮素和槲皮苷, 山奈酚未检测到。其中, 四川种群叶片中山奈苷的含量最高 (为 6019.4 µg/g), 浙江种群含量最低 (为 984.2 µg/g) (图 2: B), 各种群间, 叶片中山奈苷的含量差异显著 ( $p < 0.01$ , 表 2); 江苏种群叶片异槲皮苷的含量最高 (为 5094.2 µg/g), 四川种群含量最低 (为 679.1 µg/g) (图 2: B), 各种群间, 叶片异槲皮苷的含量差异显著 ( $p < 0.01$ , 表 2); 江苏种群叶片中槲皮素的含量最高 (为 247.4 µg/g), 贵州种群含量最低 (为 79.2 µg/g) (图 2: B), 各种群间, 叶片中槲皮素的含量差异显著 ( $p < 0.05$ ,

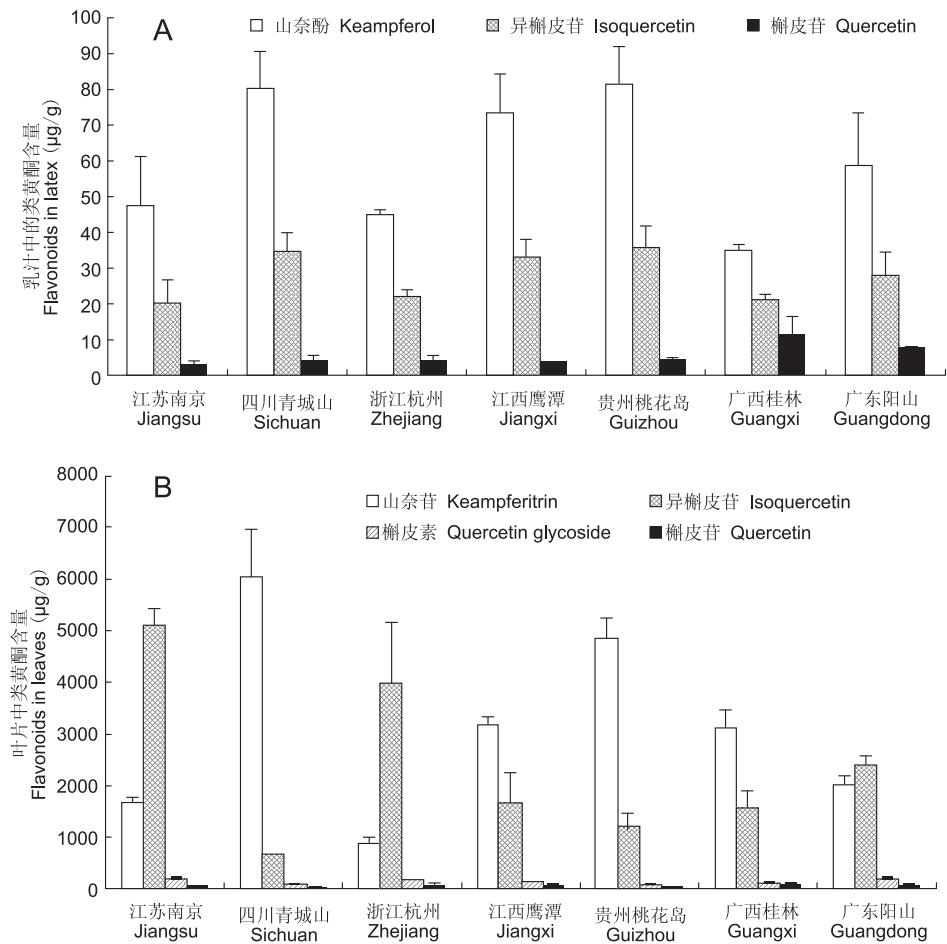


图 2 乌柏不同地理种群叶片乳汁 (A) 与叶片 (B) 的类黄酮含量 (种群按纬度由高到低排列)

Fig. 2 Comparison of flavonoids content in latex (A) and leaves (B) among seven tallow populations (Populations sorted by latitude in descending order)

表 2 乌柏各种群间叶片乳汁和叶片中类黄酮含量的方差分析

Table 2 ANOVA testing for the differences in flavonoids in tallow leaf and latex among seven populations		乳汁 Latex			叶片 Leaves			
因素 Factor	df	山奈酚 <i>p</i> 值 Kaempferol <i>p</i> -value	异槲皮苷 <i>p</i> 值 Isoquercetin <i>p</i> -value	槲皮苷 <i>p</i> 值 Quercetin <i>p</i> -value	山奈苷 <i>p</i> 值 Kaempferitrin <i>p</i> -value	异槲皮苷 <i>p</i> 值 Isoquercetin <i>p</i> -value	槲皮素 <i>p</i> 值 Quercetin glycoside <i>p</i> -value	槲皮苷 <i>p</i> 值 Quercetin <i>p</i> -value
种群 Population	6	0.034	0.145	0.136	0.000	0.000	0.040	0.219

表 2)；各种群间叶片槲皮苷含量差异不显著 ( $p>0.05$ , 表 2)。

2.3 乌柏叶片乳汁和叶片中单宁与类黄酮含量的比较

从总体上看，乌柏叶片乳汁中儿茶素和没食子酸的含量都显著低于叶片中这两种单宁的含量 ( $p<0.01$ ) (图 3: A, 表 3)。并且，叶片乳汁中槲皮苷和异槲皮苷的含量也都显著低于叶片中这 2 种类黄酮的含量 ( $p<0.01$ ) (图 3: B, 表 3)。

3 讨论

植物产生乳汁是植物通过物理或化学的方式对昆虫进行防御的策略。由于植物本身的特性以及昆虫种类的不同，不同植物在乳汁的化学组成上可能出现差异<sup>[12,13]</sup>。例如，在番木瓜科、桑科、夹竹桃科、大戟科和旋花科等植物的乳汁中发现了对昆虫有毒的半胱氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶；桔梗科、桑科和罂粟科的植物中含有多种有毒的生物碱

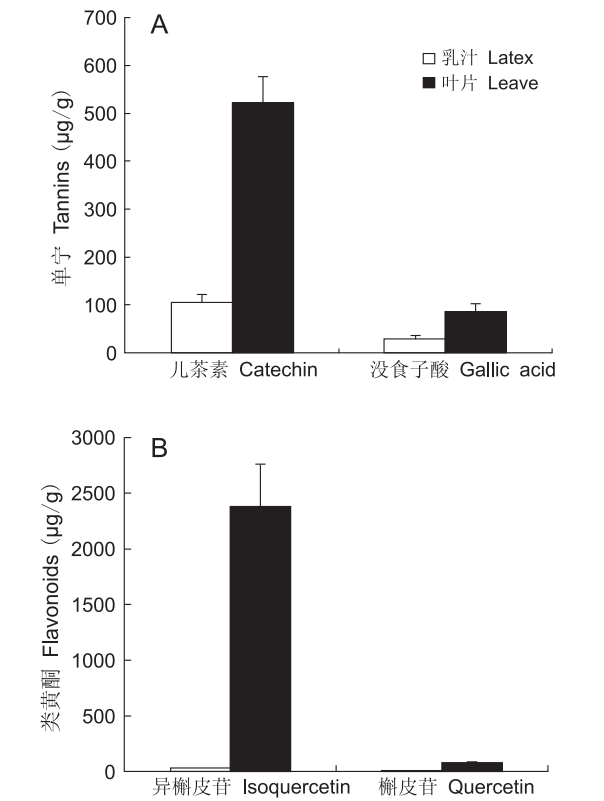


图 3 乌柏乳汁与叶片中单宁(A)和类黄酮(B)含量的差异  
Fig. 3 Differences in tannins (A) and flavonoids (B) content between latex and leaves

表 3 乌柏叶片与叶片乳汁中单宁和类黄酮含量的方差分析  
Table 3 ANOVA testing for the differences in tannins and flavonoids between tallow leaf and latex

因素 Factor	单宁 Tannins				类黄酮 Flavonoids			
	儿茶素 Catechin	没食子酸 Gallic acid	异槲皮苷 Isoquercetin	槲皮苷 Quercetin	异槲皮苷 Isoquercetin	槲皮苷 Quercetin	异槲皮苷 Isoquercetin	槲皮苷 Quercetin
	df	p	df	p	df	p	df	p
叶片 vs. 乳汁 Leave vs. latex	1	0.000	1	0.005	1	0.000	1	0.000

类，如吗啡、模拟糖生物碱、白屈菜碱等。酚类物质是在植物中起防御作用的一类次生代谢化合物，主要包括单宁、类黄酮、木质素等等<sup>[13]</sup>。已有研究报道了乌柏叶片中含有大量的单宁和类黄酮等酚类物质，并起到了防御昆虫和病菌的重要作用<sup>[2-7,17,18]</sup>。本研究首次在乌柏叶片乳汁中检测到单宁和类黄酮这两类酚类物质。我们的研究发现，乌柏叶片乳汁中这 2 种酚类物质的含量均显著低于叶片中这 2 类物质的含量(图 3)。我们推测，乌柏体内用于防御食叶昆虫的酚类化学物质主要存在于叶片中，而乌柏乳汁中的其它防御化学物质及其抗

性作用有待深入研究。

已有研究表明，从乌柏叶乙醇提取物的醋酸乙酯萃取物中可以提取槲皮素、山奈酚、异槲皮苷、没食子酸和鞣花酸等物质<sup>[4,5,18]</sup>，而本研究在乌柏叶片中未检测到山奈酚和鞣花酸。这可能是因为在研究中的乌柏叶样品是用流动相(甲醇与 0.1%磷酸)萃取后直接离心，与之前的分离方法不同<sup>[4,18]</sup>所致。此外，不同的检测仪器及其对应的色谱条件也会导致物质鉴定的差异。因此还应当进一步优化检测方法，以得到更加准确的分析结果。

Salminen 等<sup>[9]</sup>认为单宁是通过抑制昆虫的消化吸收能力来防御昆虫的，主要用于防御专食性的昆虫<sup>[19]</sup>；而类黄酮物质的防御功能主要体现在过滤紫外线、刺激或抑制取食以及化感和毒性作用等方面<sup>[10,11]</sup>，主要用于防御广食性昆虫<sup>[19]</sup>。本研究发现，乌柏不同种群间，无论是乳汁还是叶片中，其单宁和类黄酮含量均有显著差异。此外，各种群化学物质的变化情况与其对应的纬度高低没有明显的相关性(图 1、图 2)。这可能是因为在不同的乌柏种群面对的植食性昆虫不同，因而植物体内相应的防御化学物质含量也会出现差异。下一步有望通过详细调查各乌柏种群主要天敌昆虫的类型与密度等，进一步确定化学防御物质变化的原因。

参考文献：

[ 1 ] 张建民, 薛大阵, 李冬林. 乌柏的经济价值与壮苗培育[J]. 特种经济动植物, 2010, 10: 34-35.

[ 2 ] 陈玉, 杨光忠, 张世琰. 乌柏化学成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5): 114.

[ 3 ] 霍光华, 高荫榆, 陈才水. 乌柏属植物化学成分研究综述[J]. 江西林业科技, 2002, 4: 37-39.

[ 4 ] 霍光华, 高荫榆. 乌柏叶主要黄酮类物质的定性定量[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 280-283.

[ 5 ] 柳润辉, 孔令义. 乌柏叶酚性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 1213-1215.

[ 6 ] 霍光华, 高荫榆, 陈明辉. 乌柏叶抑菌活性功能成分的研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(3): 52-56.

[ 7 ] Wang Y, Siemann E, Wheeler G S, Zhu L, Gu X, Ding J. Genetic variation in anti-herbivore chemical defenses in an invasive plant[J]. J Ecol, 2012, 4: 894-904.



[ 8 ] 彭小列, 刘世彪, 张丽, 杨珂. 乌柏叶提取物的体外抑菌试验[ J ]. 湖南农业科学, 2011, 9: 105–107.

[ 9 ] Salminen J P, Karonen M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach[ J ]. *Funct Ecol*, 2011, 25: 325–338.

[ 10 ] Harborne J, Williams C. Advances in flavonoid research since 1992[ J ]. *Phytochemistry*, 2000, 55: 481–504.

[ 11 ] Iwashina T. Flavonoid function and activity to plants and other organisms[ J ]. *Biol Sci Space*, 2003, 17: 24–44.

[ 12 ] Konno K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein[ J ]. *Phytochemistry*, 2011, 72: 1510–1530.

[ 13 ] Agrawal A A, Konno K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory[ J ]. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 2009, 40: 311–331.

[ 14 ] Sessa R A, Bennett M H, Lewis M J, Mansfield J W, Beale M H. Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species[ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 26877–26884.

[ 15 ] Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex[ J ]. *Plant J*, 2004, 37: 370–378.

[ 16 ] Konno K, Ono H, Nakamura M, Tateishi K, Hirayama C, Tamura Y, Hattori M, Koyama A, Kohno K. Mulberry latex rich in antidiabetic sugar-mimic alkaloids forces dieting on caterpillars[ J ]. *PNAS*, 2006, 103: 1337–1341.

[ 17 ] Huang W, Siemann E, Wheeler S G, Zou J, Carrillo J, Ding J. Resource allocation to defense and growth are driven by different responses to generalist and specialist herbivory in an invasive plant[ J ]. *J Ecol*, 2010, 98: 1157–1167.

[ 18 ] 王洪庆, 赵春阳, 陈若芸. 乌柏叶化学成分研究[ J ]. 中国中药杂志, 2007, 32( 12 ): 1179–1181.

[ 19 ] Müller-Schärer H, Schaffner U, Steinger T. Evolution in invasive plants: implications for biological control[ J ]. *Trends Ecol Evol*, 2004, 19: 417–422.

( 责任编辑: 张 平 )