

· 资源与鉴定 ·

外源镁对冬季迟缓期的艾纳香生物量和有效成分含量的影响

王丹, 范佐旺, 庞玉新*, 胡璇, 袁蕾, 李小婷, 马青松, 孙懂华, 于福来

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 农业部华南作物基因资源与种质创制重点
开放实验室, 海南省艾纳香工程技术研究中心, 海南 儋州 571737)

[摘要] 目的: 考察外源镁对冬季生长迟缓期的艾纳香生物量和有效成分含量的影响。方法: 选择一年生艾纳香种子苗为试验材料, 以七水合硫酸镁提供镁元素, 在冬季艾纳香生长迟缓期进行3次施肥, 测定艾纳香的株高、地径、叶长和叶宽等生长指标以及生物量。采用UV测定艾纳香不同部位总黄酮含量, 检测波长500 nm。采用GC测定艾纳香叶片中*l*-龙脑含量, 程序升温(起始温度80℃, 保持2 min; 以5℃·min⁻¹升温至100℃, 继以20℃·min⁻¹升温至200℃), 进样口温度220℃, FID检测器温度240℃, 进样量0.6 μL, 分流比9:1。结果: 外源镁提高了冬季生长迟缓期的艾纳香的生长指标, 极显著提高了地径、叶长和叶宽, 显著增加了艾纳香叶、茎和根的生物量。10 g·L⁻¹镁处理的艾纳香叶片和茎生物量分别为226.47, 140.40 g, 依次为空白组(CK)叶片(22.45 g)和茎(26.57 g)生物量的10.09, 5.28倍; 15 g·L⁻¹镁处理下的艾纳香叶片和茎生物量分别为244.88, 146.02 g。外源镁对艾纳香不同部位中总黄酮和*l*-龙脑质量分数提高无促进作用或影响不显著, 但增加了二者质量的积累, 10, 15 g·L⁻¹镁处理下的*l*-龙脑质量分别是CK的8.5, 10.0倍。结论: 在冬季生长迟缓期施加镁, 可促进艾纳香的生长和生物量积累, 显著提高其总黄酮和*l*-龙脑的质量。

[关键词] 镁; 艾纳香; 迟缓期; *l*-龙脑; 总黄酮; 生物量

[中图分类号] R283.6; [R282.2]; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0075-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040075

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141229.1030.002.html>

[网络出版时间] 2014-12-29 10:30

Effect of Exogenous Magnesium on Biomass and Contents of Effective Constituents of *Blumea balsamifera* in Slow Growth Period of Winter WANG Dan, FAN Zuo-wang, PANG Yu-xin*, HU Xuan, YUAN Lei, LI Xiao-ting, MA Qing-song, SUN Dong-hua, YU Fu-lai (Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Hainan Provincial Engineering Research Center for *Blumea balsamifera*, Danzhou 571737, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of exogenous magnesium (Mg) on biomass and contents of effective constituents of *Blumea balsamifera* in slow growth period of winter. **Method:** One-year-old *B. balsamifera* seedlings were applied with MgSO₄·7H₂O which supplied Mg in slow growth period of winter three times. Height, ground diameter, length of leaf, width of leaf and biomass were measured. UV was adopted to determine the content of total flavonoids in different parts of *B. balsamifera* with detection wavelength of 500 nm. The content of *l*-borneol in leaves of *B. balsamifera* were determined by GC, initial temperature was 80℃ for 2 min, then warmed to 100℃ by 5℃·min⁻¹ at 4 min, and warmed to 200℃ by 10℃·min⁻¹ at 10 min. Temperature of injection port was 220℃ and FID detector temperature was 240℃, injection volume was 0.6 μL and split ratio was 9:1. **Result:** Exogenous Mg significantly enhanced growth indexes of this plant, especially of ground diameter,

[收稿日期] 20140617(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403035, 81374065)

[第一作者] 王丹, 博士, 副研究员, 从事中药材(南药)规范化生产及其质量调控机制研究, Tel: 0898-23301253, E-mail: wang_dan1414@163.com

[通讯作者] * 庞玉新, 博士, 副研究员, 从事南药资源研究与开发, Tel: 0898-23300268, E-mail: blumeachina@126.com

length and width of leaf. As a result, exogenous Mg increased significantly biomasses of leaves, stems and roots, respectively. Biomasses of leaves and stems under $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg treatment were 226.47 g and 140.40 g, which were 10.09 and 5.28 times compared with the control black treatment (CK), respectively. Biomasses of leaves and stems under $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg treatment were 244.88 g and 146.02 g. However, exogenous Mg could not enhance or affect indistinctively the mass fraction of total flavonoids and *l*-borneol, but it increased qualities of total flavonoids and *l*-borneol significantly. Qualities of *l*-borneol under 10, $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg treatments were 8.5 and 10.0 times by comparing with CK, respectively. **Conclusion:** Exogenous Mg can promote plant growth and biomass accumulation, significantly increase qualities of total flavonoids and *l*-borneol in *B. balsamifera* in slow growth period of winter.

[Key words] magnesium; *Blumea balsamifera*; slow growth period; *l*-borneol; total flavonoids; biomass

艾纳香具有祛风除湿、温中止泻、活血解毒等功效^[1-2],主要含有挥发油和黄酮类化合物,挥发油的主要成分为*l*-龙脑^[3-5]。除传统临床应用外,艾纳香是精制艾片(天然冰片)和艾纳香油的原料^[6-8]。近年由于对艾纳香原料需求量猛增,导致该药材野生资源已不能满足市场需求,故采用人工栽培以解决野生资源短缺的问题^[9],但栽培艾纳香中*l*-龙脑、总黄酮含量及其药材产量均低于野生资源。施肥是提高药材产量和质量的有效途径,但有关艾纳香施肥研究的报道较少。何元农等^[10]施用农家肥(圈肥、油枯和柴灰)、一元化肥(尿素、过磷酸钙和氯化钾)及复合肥种植艾纳香,结果发现施肥组较对照组经济产量和生物产量均有所增加,且有效成分含量不减;其中氮肥主要增加生物产量,得油率和*l*-龙脑含量与钾肥用量呈正相关关系,但与磷肥的直接关系不显著。何元农等^[11]研究发现氮肥可增加艾纳香药材的产量和有效成分含量。

镁是合成植物叶绿素的必需元素,可显著促进植物生长,促进药用植物有效成分的积累,但目前尚未见有关镁对艾纳香生长和有效成分积累的报道。故本实验在前期研究基础上,选择海南处于生长迟缓期的冬季艾纳香为研究对象,考察不同浓度外源镁对艾纳香生长指标、生物量及有效成分质量分数和单株质量影响的肥效,以期在证明肥效的同时,充分证明镁肥对艾纳香生长的促进作用,为该药材的后续施肥系统研究提供参考。

1 材料

7890A型气相色谱仪(FID型氢火焰离子化检测器,G4513A型16位自动进样器,美国安捷伦科技公司),CPA225D型电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司),2012-PCS型紫外分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。左旋龙脑对照品(阿法埃莎化学有限公司,批号10147015,纯度>98%),芦

丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号100080-200707,纯度92.5%),水杨酸甲酯(天津光复精细化工研究所),试剂均为分析纯。选择一年生艾纳香种子苗,经中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所庞玉新副研究员鉴定为菊科植物艾纳香*Blumea balsamifera*。于2014年1月27日开始,每隔10 d进行艾纳香叶面喷施镁肥,共施肥3次,2014年3月7日取样,以七水合硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)提供镁元素,设置镁质量浓度分别为5,10,15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,另外空白组(CK)不做任何处理。

2 方法与结果

2.1 生长指标的测定 将艾纳香植株按根、茎、叶分别取样,用直尺和卷尺分别测量株高、地径、叶长和叶宽,阴干后用天平分别测定艾纳香根、茎、叶的生物量。

2.2 总黄酮含量的测定

2.2.1 对照品溶液的配制 精密量取芦丁对照品约10 mg,置50 mL量瓶中,加入适量甲醇,置水浴上微热使溶解,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,得227.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液。

2.2.2 标准曲线绘制 精密量取2.2.1项下对照品溶液1,2,3,4,6,8 mL,分别置于25 mL量瓶中,各加水至10 mL,加5%亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加4%氢氧化钠溶液10 mL,加水定容至刻度,摇匀,放置15 min,以相应试剂溶液为空白,于500 nm处测定吸光度(A)。以质量浓度(C)为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $A = 12.102C - 0.0009$ ($R^2 = 0.9997$),线性范围9.104~72.832 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

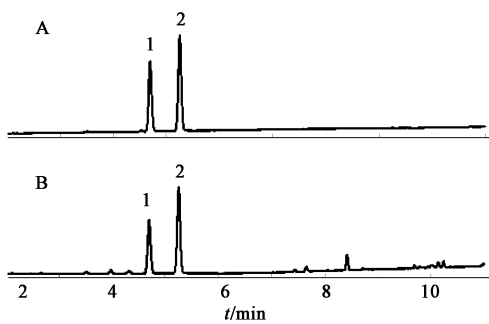
2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取艾纳香叶、茎和根(过20目筛)粉末各1.0 g,分别置于具塞锥形瓶中,加甲醇溶液50 mL,称定质量,冷浸30 min,超声(80 Hz)提取30 min,放冷,加甲醇补足减失的质

量,摇匀,过滤,即得。

2.2.4 样品测定 按照精密度、稳定性、重复性和加样回收试验进行方法学考察,结果表明该方法稳定、准确。取 2.2.3 项下供试品溶液按 2.2.2 项下方法测定,计算艾纳香不同部位中总黄酮含量。

2.3 左旋龙脑的含量测定

2.3.1 色谱条件 HP-5 石英毛细管色谱柱(0.32 mm × 30 m, 0.25 μm),程序升温(起始温度 80 °C,保持 2 min;以 5 °C · min⁻¹升温至 100 °C,继以 20 °C · min⁻¹升温至 200 °C),进样口温度 220 °C, FID 检测器温度 240 °C,进样量 0.6 μL,分流比 9:1,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. *l*-龙脑; 2. 水杨酸甲酯

图 1 艾纳香叶片 GC

Fig. 1 GC of *Blumea balsamifera* leaves

2.3.2 供试品的制备 精密称定艾纳香叶片粉末(过 20 目筛)约 2.0 g,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入乙酸乙酯 25 mL,称定质量,超声(40 kHz)提取 30 min,放冷,用乙酸乙酯补足减失的质量,摇匀,静置,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.3 线性关系考察 精密称定 *l*-龙脑对照品约 100 mg,加乙酸乙酯溶解并定容至 100 mL,得 1.061 g · L⁻¹ 对照品溶液。精密称定水杨酸甲酯约 250 mg,加乙酸乙酯定容至 250 mL 作为内标液。精密量取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,各加入内标溶液 1.0 mL,加乙酸乙酯定容至刻度,得系列混合对照品溶液。按 2.3.1 项下色谱条件测定,以 *l*-龙脑质量浓度为横坐标, *l*-龙脑与水杨酸甲酯的峰面积比为纵坐标,得回归方程 $Y = 14.823X + 0.0129$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围 0.01061 ~ 0.2122 g · L⁻¹。

2.3.4 精密度试验 取艾纳香叶片,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 6 次,结果 *l*-龙脑与水杨酸甲酯的相对峰面积 RSD 2.1%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取同一艾纳香叶片 5 份,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,结果 *l*-龙脑含量的 RSD 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取艾纳香叶片 1 份,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,室温放置,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.3.1 项下色谱条件测定,结果 *l*-龙脑与内标物的相对峰面积 RSD 0.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 加样回收率试验 精密称定 6 份已知 *l*-龙脑含量的艾纳香叶片粉末约 1.0 g,各精密加入 *l*-龙脑对照品约 1.5 mg,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,结果见表 1,表明该方法准确可靠。

表 1 艾纳香中 *l*-龙脑的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of *l*-borneol in *Blumea balsamifera*

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.000 37	1.52	1.51	3.07	102.65	100.99	2.4
1.001 95	1.51	1.56	3.12	103.21		
1.007 46	1.50	1.51	3.02	100.66		
1.009 66	1.50	1.61	3.07	97.52		
1.007 03	1.53	1.56	3.07	98.72		
1.007 57	1.50	1.57	3.12	103.19		

2.4 数据分析 采用 excel 进行数据录入及图表绘制,采用 SPSS 16.0 软件进行统计与单因素方差分析,并运用 Duncan 检验法进行多重比较。

2.5 外源镁对艾纳香生长指标的影响 方差分析结果表明,在不同浓度镁处理下,艾纳香的地径、叶长和叶宽在各组间差异极显著,株高在各组间差异不显著。由表 2 可知,较 CK 处理相比,不同质量浓度镁处理对艾纳香地径、叶长和叶宽的增加具有显著促进作用。5, 10, 15 g · L⁻¹ 镁处理下的地径和叶宽均显著高于 CK,地径分别增加了 34.21%, 52.90%, 51.59%,叶宽分别增加了 100.99%, 95.54%, 107.92%。

2.6 外源镁对艾纳香生物量的影响 方差分析结果表明,不同浓度镁处理下,艾纳香叶、茎和根的生物量在各组间差异极显著,10, 15 g · L⁻¹ 镁处理的艾纳香叶和茎生物量均极显著高于 5 g · L⁻¹ 镁处理组和 CK,见图 2。10 g · L⁻¹ 镁处理下的艾纳香叶片和茎生物量分别为 226.47, 140.40 g,依次为 CK 叶片(22.45 g)和茎(26.57 g)生物量的 10.09, 5.28 倍;

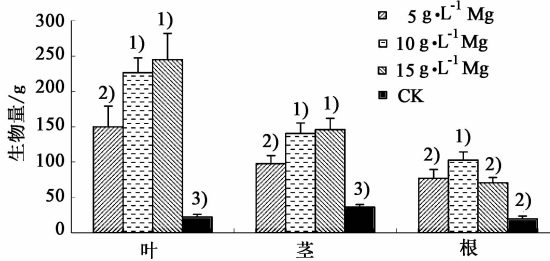
表 2 外源镁对艾纳香生长指标的影响

Table 2 Effect of exogenous Mg on growth indexes of *Blumea balsamifera*

外源镁质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	株高	地径	叶长	叶宽
5	$25.66 \pm 0.50^{1,2)}$	$7.18 \pm 0.46^{1)}$	$12.92 \pm 0.36^{1,2)}$	$4.06 \pm 0.12^{1)}$
10	$24.18 \pm 3.50^{1,2)}$	$8.18 \pm 0.22^{1)}$	$12.85 \pm 1.03^{1,2)}$	$3.95 \pm 0.23^{1)}$
15	$26.58 \pm 2.98^{1)}$	$8.11 \pm 0.45^{1)}$	$13.33 \pm 2.67^{1)}$	$4.20 \pm 0.66^{1)}$
0	$22.57 \pm 1.33^{2)}$	$5.35 \pm 1.07^{2)}$	$7.73 \pm 2.46^{2)}$	$2.02 \pm 0.89^{2)}$

注: ^{1), 2)} 分别表示 Duncan 统计学分析以所有组别中最大的数值为对照, 其他数值和他相比, 在 0.05 水平上的差异显著性。

15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理下的艾纳香叶片和茎生物量分别为 244.88, 146.02 g, 依次为 CK 艾叶香叶片和茎生物量的 10.91, 5.50 倍, 差异极显著。5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理下叶、茎的生物量虽然极显著低于 10, 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理组, 但仍极显著高于 CK, 分别是 CK 的 6.68, 2.68 倍。10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理组的艾纳香根生物量最高, 极显著高于其他 3 组。



注: ^{1), 2), 3)} 表示不同处理组间在 0.05 水平差异显著 (图 3, 4 同)。

图 2 外源镁对艾纳香不同部位生物量的影响

Fig. 2 Effect of exogenous Mg on biomasses in different parts of *Blumea balsamifera*

2.7 外源镁对艾纳香不同部位总黄酮含量的影响 方差分析结果表明, 在不同质量浓度镁处理下, 艾纳香叶中总黄酮质量分数在各组间差异极显著, 而茎和根中总黄酮质量分数在各组间差异不显著。CK 艾纳香叶中总黄酮质量分数最高 (2.23%), 显著高于其他 3 个处理组, 与 5, 10, 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理组相比, 分别增加了 132.29%, 36.81%, 70.23%, 见图 3; 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理组显著高于 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理组, 增加了 67.79%。艾纳香叶、茎和根中总黄酮质量在各组间差异极显著, 见图 4。10, 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理下的叶、茎和根中总黄酮质量均显著高于 CK 和 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁组。但 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理组样品叶和茎中总黄酮质量极显著高于 CK。

2.8 外源镁对艾纳香叶片中 *l*-龙脑含量的影响 方差分析表明在不同质量浓度镁处理下, 艾纳香叶中 *l*-龙脑质量分数在各组间差异不显著, 但质量差异极显著。5, 10, 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理组及 CK 的艾纳香

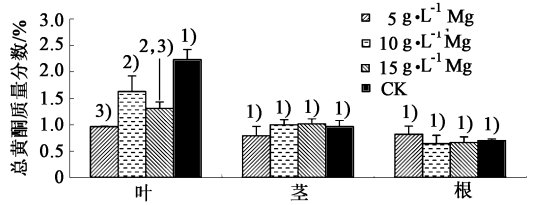


图 3 外源镁对艾纳香不同部位总黄酮质量分数的影响

Fig. 3 Effect of exogenous Mg on mass fraction of total flavonoids in different parts of *Blumea balsamifera*

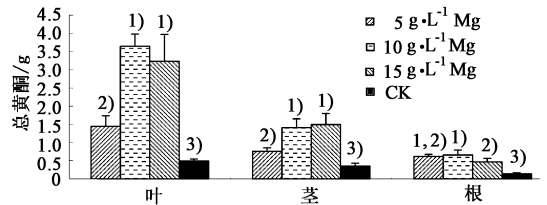


图 4 外源镁对艾纳香不同部位总黄酮质量的影响

Fig. 4 Effect of exogenous Mg on quality of total flavonoids in different parts of *Blumea balsamifera*

叶片中 *l*-龙脑质量分别为 0.23, 0.34, 0.40, 0.04 g; 质量分数依次为 0.15%, 0.15%, 0.16%, 0.16%。

3 讨论

镁作为继氮、磷、钾之后植物的第四大营养元素, 是植物生长发育必需的重要中量元素, 其供给水平直接影响着植物的生长发育和生物量积累^[12]。本文选择在海南的冬季施肥, 此时是艾纳香生长的迟缓期, 结果发现 CK 的艾纳香幼苗生长迟缓, 大部分的植株停止生长, 叶长和叶宽未增加, 甚至叶片已脱落。而施加外源镁处理的艾纳香植物生长旺盛, 叶、茎和根都显著增加, 叶宽显著高于 CK 处理; 继而显著提高了艾纳香叶、茎和根生物量, 其中 10, 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁处理组的影响最显著。这可能是由于镁是植物叶片叶绿素的组成成分, 外源镁的施加有助于叶绿素的合成, 进而促进植物的光合作用, 促进植物生长和生物量增加^[13]。

何元农等^[14] 研究证实 1~2 月是艾纳香生长迟缓期, 3 月为恢复生长期, 本文研究发现外源镁对冬

季迟缓期艾纳香叶中总黄酮质量分数的提高无促进作用,对茎和根影响不显著。植物次生代谢过程是一个持续而动态的过程,前期研究发现10~11月是海南产艾纳香总黄酮相对含量积累最高的时期,而1~2月总黄酮相对含量较低,积累缓慢。故推测可能是由于冬季艾纳香生长迟缓期时,外源镁对总黄酮相对含量积累影响较小,对植物初生代谢影响较大,进而导致总黄酮绝对含量显著增加。研究发现在海南冬季艾纳香生长迟缓期施加外源镁,对叶片中*l*-龙脑质量分数的影响不显著,但显著提高了该成分的质量,即镁显著增加了单株艾纳香叶片中*l*-龙脑积累量。同时,本文证实在海南冬季艾纳香生长迟缓期,外源镁促进艾纳香生物量积累速率要快于*l*-龙脑的积累。

[参考文献]

[1] 袁媛,庞玉新,王文全,等. 中国艾纳香属植物资源与民族药学研究[J]. 热带农业科学, 2011, 31(4): 22-27.

[2] 王丹,付万进,庞玉新,等. 艾纳香油过敏性和急性毒性实验研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(12): 2499-2502.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:82.

[4] Saewan N, Koysomboon S, Chantrapromma K. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC[J]. J Med Plants Res, 2011, 5

(6):1018-1025.

[5] Nessa F, Ismail Z, Mohamed N. Xanthine oxidase inhibitory activities of extracts and flavonoids of the leaves of *Blumea balsamifera* [J]. Pharm Biol, 2010, 48(12):1405-1412.

[6] 庞玉新,王文全,张影波,等. 药用植物艾纳香基因组DNA提取方法研究[J]. 广西植物, 2009, 29(6): 763-767.

[7] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:738.

[8] 王嵩,赵永恒,周毅生,等. 艾纳香挥发油栓的制备工艺及体外溶出度研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10):1805-1810.

[9] 王丹,侯俊玲,万春阳,等. 中药材施肥研究进展[J]. 土壤通报, 2011, 42(1):225-228.

[10] 何元农,丁映,洗福荣,等. 肥料种类对艾纳香生物产量和有效成分含量的影响[J]. 贵州农业科学, 2005, 33(5):53-57.

[11] 何元农,丁映,洗福荣,等. 艾纳香产量和有效成分含量对氮素营养的反应[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(2):28-30.

[12] 李鹏飞,周冀衡,郭汉华,等. 养分亏缺对烤烟主要香气前体物含量的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2009, 35(5):474-479.

[13] 靳晓琳,马翠兰,陈立松. 植物缺镁研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2012, 8(2):118-122.

[14] 何元农,丁映,洗福荣,等. 艾纳香生长发育特性的初步观测[J]. 贵州农业科学, 2005, 33(2):19-23.

[责任编辑 刘德文]