文章编号:1001-6880(2011)03-0482-04

野生坚龙胆及其组培苗中龙胆苦苷的含量分析

朱宏涛[1,2],郑传伟[2],赵 平[2,3],李 元[1,4],杨崇仁[2],张颖君[2*]

[1]云南农业大学植物保护学院,昆明 650201;[2]中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室,昆明 650204;[3]西南林学院资源学院,昆明 650224;[4]云南农业大学资源与环境学院,昆明 650201

摘 要:利用含有 α-萘乙酸(NAA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)和激动素(KT)等激素的 MS 固体培养基,对野生坚龙胆进行组培苗诱导培养。同时,应用高效液相色谱技术对野生坚龙胆和其组培苗的根、茎和叶中的龙胆苦苷进行含量分析和比较研究。结果发现,野生坚龙胆中的龙胆苦苷主要储存于根部,而组培坚龙胆中龙胆苦苷在根中的含量甚微,主要集中在茎、叶部位,且在出根初期组培坚龙胆叶中的龙胆苦苷含量近似于或略大于野生坚龙胆根中的含量。研究结果提示,坚龙胆中的绿色组织是龙胆苦苷合成的部位,这些部位同时具有龙胆苦苷的储藏功能。

关键词:坚龙胆;龙胆苦苷;高效液相色谱分析

中图分类号:Q946 **文献标识码**:A

Content Analysis of Gentiopicroside in Wild and Tissue Culture Seedlings of *Gentiana rigescens*

ZHU Hong-tao[1,2],ZHENG Chuan-wei[2],ZHAO Ping[2,3],LI Yuan[1,4],YANG Chong-ren[2],ZHANG Ying-jun[2*]

[1]*College of Plant Protection,Yunnan Agricultural University,Kunming 650201,China*;[2]*State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China,Kunming Institute of Botany,Chinese Academy of Sciences,Kunming 650204,China*;[3]*Faculty of Resources,Southwest Forestry University,Kunming 650224,China*;[4]*College of Resources and Environment,Yunnan Agricultural University,Kunming 650201,China*

Abstract: Tissue culture seedlings of Gentiana rigescens were carried out in the MS's media with NAA,6-BA and KT. The content of gentiopicroside in leaves,stems and roots of tissue culture seedlings and wild plants were analyzed by HPLC. It was noticed that plentiful gentiopicroside accumulates in roots of wild plants,but hardly in roots of tissue culture seedlings. However,the content of gentiopicroside in leaves of tissue culture seedlings was higher or almost same as that in the wild roots. The results suggested that gentiopicroside was synthesized in the leaves and stored in the leaves simultaneously.

Key words: Gentiana rigescens; gentiopicroside; HPLC analysis

坚龙胆(Gentiana rigescens Franch. ex. Hemsl.)属龙胆科(Gentianaceae)龙胆属植物,又称滇龙胆,以根入药,最早载于明代《滇南本草》,是《中华人民共和国药典》收载中药龙胆基源之一,主产于云南、四川等地,是西南地区中药龙胆的主流品种。我国古时即用之,《本经》中记载,龙胆具有"主骨间寒热,惊癎邪气,续绝伤,定五脏,杀蛊毒"的功效[1]。

坚龙胆的化学成分与其它龙胆属植物类似,主要为环烯醚萜苷类化合物,如龙胆苦苷、当药苦苷、当药苷、马钱子酸等。此外,还含有三萜配糖体,包括达玛烷型四环三萜、乌苏烷型和何帕烷型五环三萜等,黄酮类、酚类和甾醇类化合物等[2-6]。其中,龙胆苦苷(Gentiopicroside)是坚龙胆根中的主要活性成分,具有保肝利胆、健胃、促进肠胃消化功能、抗氧化、抗炎、抗菌、升血糖以及兴奋中枢神经系统作用等[7-10]。随着市场需求不断扩大,坚龙胆野生资源被濒临枯竭。我们曾利用组织培养手段对野生坚龙胆的腋芽进行了诱导、筛选,通过培养条件的优化,建立无性繁殖培养系,获得的完整植株并移栽成功[11]。本论文采用高效液相色谱技术对组织培养方法繁殖的坚龙胆各部位龙胆苦苷的含量进行分析测定,并与野生坚龙胆植株中龙胆苦苷的含量进行比较,为建立高含量龙胆苦苷植物培养系及对坚龙

收稿日期:2009-09-25 接受日期:2010-04-20

* 通讯作者 Tel:86-871-5223235;E-mail:zhangyj@mail.kib.ac.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胆茎叶资源的利用提供科学依据。

1 实验部分

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 快速繁殖植物材料

坚龙胆样品为昆明市北郊大马山采集的野生坚龙胆植株(昆明植物研究所杨崇仁研究员鉴定),取其肥壮腋芽作为原始繁殖材料,取经过组织培养形成的植株的根、茎和叶为龙胆苦苷含量分析的样品。

1.1.2 供含量分析的野生坚龙胆样品

样品采自昆明市北郊大马山,株高约 25 cm,基部主茎木质化、茎粗约 3 mm,主根消失、侧根发达、侧根长约 10 cm。

1.1.3 标准品

龙胆苦苷标准品由本研究组分离得到,其结构通过波谱、光谱等手段得以鉴定,纯度≥99%。

1.1.4 仪器和试剂

Waters 高效液相色谱仪(Waters 2695);Photodiode Array Detector(Waters 2996);试剂:色谱纯乙腈,分析纯冰乙酸,超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 坚龙胆快繁苗的培养

将采回的植株用碱性肥皂水洗去表面污泥后用清水洗净,再用蒸馏水冲洗 1 ~2 次。取其顶芽和腋芽在 75% 的乙醇溶液中浸泡 2 min 后取出,用无菌水冲洗 3 ~4 次,以无菌滤纸吸干,再置于 0.1% 的升汞($HgCl_2$)溶液中浸泡 40 min,用无菌水冲洗 5 ~6 次,以无菌滤纸将水吸干。用解剖刀和镊子在无菌超净工作台中拨去灭菌时损伤的腋芽和顶芽鳞片,将保留部分自中间部位剖开,接种在 MS + 6-BA(1.0 mg/L) + NAA(0.2 mg/L) + KT(0.1 mg/L) 的培养基中进行诱导培养。诱导成苗后,将其重新接种到 1/2MS + NAA(1.0 mg/L) + 6-BA(0.1 mg/L) 的固体培养基中进行不定根的诱导和培养,培养至 30 d 时生根[11]。不定根长出后 30 和 90 d 分别对坚龙胆组培苗的根、茎、叶中龙胆苦苷的含量进行测定。悬浮不定根材料源自固体培养诱导出的不定根切去其地上部分之后悬浮在 1/2MS + NAA(1.0 mg/L) + 6-BA(0.1 mg/L) 的液体体培养基中,经过五次转代后获得(每 20 d 转代一次)。

1.2.2 HPLC 检测用供试样品的制备

将各部分样品在 40 ℃条件下风干、粉碎,过 60 目筛后各称取约 0.5 g 置于 10 mL 容量瓶中,精密加入甲醇 10 mL、称重,冷浸 24 h,超声 30 min,冷却后用甲醇补足重量,过微孔滤膜(d = 0.45 μm),得供试样品溶液备用。

1.2.3 供试样品中龙胆苦苷的含量测定

各供试样品溶液在下述 HPLC 色谱条件下进行测定,采用面积外标法计算出各样品中龙胆苦苷的含量。

HPLC 色谱条件:色谱柱,Agilent ZORBAX SB-C_{18}(4.6 × 250 mm,5 μm)。流动相,乙腈:0.2% 冰醋酸(8∶92,v/v);流速,1.0 mL/min;检测波长,254 nm;柱温,30 ℃[12]。各供试样品溶液分别稀释 3 倍后取 10 μL 进样,龙胆苦苷的保留时间为 13.5 min。

对照品线性方程的制作:精密称取龙胆苦苷标准品 1.08 mg,甲醇溶解并定容到 2 mL,过微孔滤膜(d = 0.45 μm),分别取滤液 3,7,12,18,25,35,45 μL 进样,通过进样量与色谱吸收峰面积计算出线性方程为:$Y = 785748X + 44709$,$R^2 = 0.9998$。

1.2.4 实验数据的统计分析

各实验数据采用 dps 和 excel 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 野生坚龙胆与生根后 30 d 的组培坚龙胆中龙胆苦苷的含量分析

如图 1 所示,野生坚龙胆中龙胆苦苷的含量依次为根 > 叶 > 茎,且各部分含量的差异极显著($P < 0.01$,$n = 3$)。而在组培坚龙胆中的龙胆苦苷含量则依次为叶 > 茎 > 根,各部分含量的差异也在极显著水平($P < 0.01$,$n = 3$),且培养坚龙胆根中没有检测到龙胆苦苷的存在,而其叶中的含量近似或略高于野生坚龙胆根中的含量。研究结果提示,坚龙胆中龙胆苦苷的生物合成部位可能是在其叶或茎的部

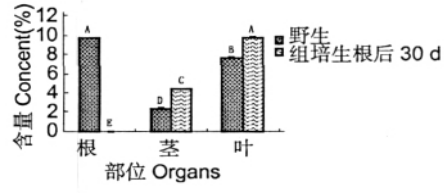

图 1 野生及组培生根后 30 d 的坚龙胆中龙胆苦苷的含量分析

Fig. 1 Content analysis of gentiopicroside in wild and tissue culture seedlings of *G. rigescens* after 30 days rooting

A-E:各部位龙胆苦苷含量差异极显著($P < 0.01$)

A-E: Significant difference of gentiopicroside contents among respective organs at ($P < 0.01$) according to LSR.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

位，而非根内合成。

2.2 培养时间对坚龙胆根中龙胆苦苷含量的影响

对坚龙胆生根后不同培养时间组培苗各部位中的龙胆苦苷含量进行分析，结果表明坚龙胆在生根后30 d，龙胆苦苷主要集中在叶部，其含量为9.75%；在茎中亦有一些分布，其含量为4.43%；但在其根中则检测不到有龙胆苦苷的存在。将同一批组培苗继续培养60 d（即组培生根后90 d），其各部位中龙胆苦苷的含量发生了显著的变化。首先，茎、叶中的含量降低极显著（$P<0.01$，$n=3$）；其次，在继续培养60 d的植株根部检测到了龙胆苦苷的存在，但其含量仅为0.07%（图2）。研究结果说明，在通常的培养条件下龙胆根中不能合成龙胆苦苷，其根中的龙胆苦苷是由地上部分合成后输送下去的。组培坚龙胆叶中的龙胆苦苷含量随着培养时间的增加，从9.7%降至约5.8%，但根中只检测到0.07%，推测由于培养时间较长，已生成的部分龙胆苦苷可能发生进一步的降解或转化为其它物质。

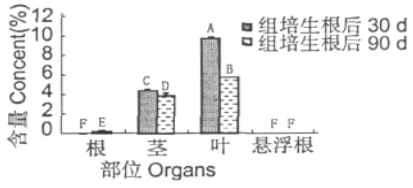

图2 坚龙胆组培生根后30 d和90 d的龙胆苦苷含量分析

Fig. 2 Content analysis of gentiopicroside in tissue culture seedlings of *G. rigescens* after 30 and 90 rooting

A-E：各部位龙胆苦苷含量差异极显著（$P<0.01$）.

A-E: Significant difference of gentiopicroside contents among respective organs at ($P<0.01$) according to LSR.

2.3 龙胆苦苷在坚龙胆植株中的输送规律

通过对实验数据的对比分析发现，野生植株、组培苗生根后30 d的组培苗和组培苗生根后90 d的组培苗等三组植物被测的坚龙胆叶样和茎样中都含有龙胆苦苷，并且龙胆苦苷在叶样中的含量明显高于茎中。但在组培苗根样中，生根后30 d时并没有检测到龙胆苦苷，随着培养时间增加至生根后90 d时我们检测到了根中的龙胆苦苷，并且在根生长时间更长的野生坚龙胆根中检测到龙胆苦苷含量已高至9.68%。而在被切割下来悬浮培养的不定根中，尽管培养时间的延长至生根后的100 d也没有检测到龙胆苦苷的存在（图3），这说明坚龙胆根中的龙胆苦苷是由植株中的绿色器官合成并通过茎杆维管组织的向下输送到根部，再由根部对其进行贮存。

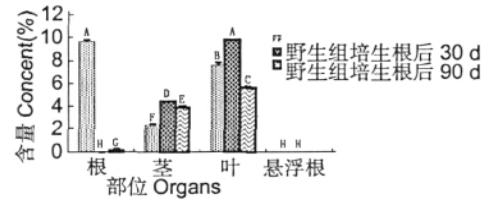

图3 不同时间组培及野生坚龙胆中龙胆苦苷的含量分析

Fig. 3 Content analysis of gentiopicroside in wild and tissue culture seedlings of *G. rigescens* in different growth time

A-E：各部位龙胆苦苷含量差异极显著（$P<0.01$）。

Significant difference of gentiopicroside contents among respective organs ($P<0.01$) according to LSR.

3 讨论

上述研究显示，龙胆苦苷广泛存在于组培坚龙胆植株的绿色器官内，尤其是叶部位，而在培养初期其根中并不含龙胆苦苷。结果表明，龙胆苦苷是由龙胆植物的绿色器官合成并进行储藏和分配。龙胆苦苷是一类裂环环烯醚萜苷类化合物，是牻牛儿基二磷酸酯通过水解和氧化成柠檬醛，再经过环化、水合和氧化形成臭蚁二醛，臭蚁二醛经过烯醇化、羟醛缩合和苷化成环烯醚萜苷，环烯醚萜苷通过环断裂、氧化和内酯化最终形成龙胆苦苷[13]。在整个生物合成过程中以乙酰辅酶A为合成的底物，期间需要一系列酶的催化，植物的绿色器官在进行光合、呼吸作用过程中伴随着多种酶和中间产物的生成，这将有利于龙胆苦苷在叶中的合成。

组培坚龙胆茎中的龙胆苦苷比其叶中含量低，可能是由于茎中叶绿素含量低导致其合成能力也低。此外，组培坚龙胆茎中的龙胆苦苷含量显著高于野生坚龙胆茎中的含量，则可能是由于野生坚龙胆茎中叶绿素含量更低且维管束发达，此时茎更多的作用是对叶合成的龙胆苦苷往根部输送。坚龙胆为多年生草木植物，其根部易受土传病害的侵染，而龙胆苦苷具有很好的水溶性并具有较强的抗菌作用，野生坚龙胆根中龙胆苦苷含量的明显增高，一方面是因为根是其储藏的重要器官，另一方面，高含量的龙胆苦苷在一定程度上具有保护坚龙胆根部不受外界致病微生物的侵染。野生坚龙胆将其根部作为龙胆苦苷的储存器官可能与其长期的生境和进化有关。组培坚龙胆根中龙胆苦苷含量从无到有缓慢产生，这说明龙胆苦苷在植物体内的输送依然遵循从

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

叶子经茎最后运输到根并储存的规律,但在组培坚龙胆中这一过程发生得极慢,这可能是由于植物在无菌条件下龙胆苦苷作为杀菌剂保护其生长的作用不大,减弱了其向下输送的迫切性; 另外,也有可能是因为组培坚龙胆茎杆幼嫩,维管束不发达,很大程度上阻碍了龙胆苦苷的向下输送。

实验结果表明,龙胆苦苷在组培苗生根后 30 d 的叶中含量达到或略大于所分析的野生坚龙胆药用部位,并且组培坚龙胆中次生代谢产物的种类比较单一(图 4),这将为龙胆苦苷的大量制备提供条件。目前,对龙胆苦苷的市场需求日益增大,野生资源连年的采挖已日渐枯竭,不少地方采取了集约化栽培,但集约化栽培易引发各种病害,影响药材的产量,大量农药的施用严重降低药材的质量[14]。快速繁殖可使坚龙胆离土生长,能够减轻病虫害和农药污染。

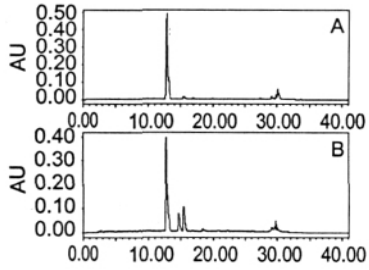

图 4 组培(A)及野生(B)坚龙胆叶甲醇提取物的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC profile of leave extract from tissue culture (A) and wild (B) plants of *G. rigescens*

参考文献

1 Luo JP(罗集鹏),Lou ZC(楼之岑). Investigation and identification of the botanical origins of the traditional Chinese medicinal herb "Longdan"(*Gentiana*). *Acta Pharm Sin*(药学学报),1987,22: 525-532.

2 Jiang RW,Wong KL,Chan YM,*et al*. Isolation of iridoid and secoiridoid glycosides and comparative study on *Radix gentianae* and related adulterants by HPLC analysis. *Phytochemistry*,2005,66: 2674-2680.

3 Kakuda R,Iijima T,Yaoita Y,*et al*. Secoiridoid glycosides from *Gentiana scabra*. *J Nat Prod*,2001,64: 1574-1575.

4 Xu M,Wang D,Zhang YJ,*et al*. Dammarane triterpenoids from the roots of Gentiana rigescens. *J Nal Prod*,2007,70: 880-883.

5 Rodriguez S,Marston A,Wolfender JL,*et al*. Iridoids and secoiridoids in the Gentianaceae. *Curr Org Chem*,1998,2: 627-648.

6 Tang HQ,Tan RX. Glycosides from *Gentiana scabra*. *Planta Med*,1997,63(4): 388.

7 Chen CX(陈长勋),Liu ZW(刘占文),Sun ZR(孙峥嵘),*et al*. Studies on anti-inflammatory effect of gentiopicroside. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2003,34: 814-816.

8 Kumarasamy Y,Nahar L,Sarker SD. Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*. *Fitoterapia*,2003,74(1-2): 151-154.

9 Oztürk N,Baser KHC,Aydin S,*et al*. Effects of *Gentiana lutea* ssp. *symphyandra* on the central nervous system in mice. *Phytother Res*,2002,16: 627-631.

10 Tan RX,Kong LD,Wei HX. Secoiridoid glycosides and an antifungal anthranilate derivative from *Gentiana tibetica*. *Phytochemistry*,1998,47: 1223-1226.

11 Zhu HT(朱宏涛),Chen KK(陈可可),Zhang YJ(张颖君),*et al*. Micro propagation of *Gentiana rigescens*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2004,16: 222-224.

12 Xu M(许敏),Wang D(王东),Zhang YJ(张颖君),*et al*. HPLC analysis of the iridoidal glycoside in *Gentiana rigescens*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2007,19(B05): 9-11.

13 Newman JD,Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol*,1999,34(2): 95-106.

14 Wang XJ(王喜军),Meng XC(孟祥才),Sun HF(孙海峰),*et al*. Development situation of cultivated *Gentiana* and its disease and harming investigation. *Acta Chin Med Pharm*(中医药学报),2005,33(4): 2-4.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net