

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.10.005

不同繁殖模式下甘草药用成分含量积累速度差异研究*

郭争争 程瑞婧 杨 丽 王如锋 胡会娟 吴佩根 刘容秀 魏胜利[△]

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘要 目的:系统比较野生甘草无性繁殖的甘草根和人工甘草种子有性繁殖的甘草根中药用成分的积累速度差异情况,为进一步研究影响甘草药用成分积累的基因机制奠定理论基础。**方法:**本研究基于 HPLC 和 UV 等分析方法,比较野生甘草和人工甘草在甘草酸、甘草苷和甘草总黄酮以及其他类成分的含量差异。基于 HPLC 指纹图谱技术,全面分析不同繁殖模式下甘草根的化学信息和内在质量的差异情况。**结果:**除甘草素和异甘草素外,野生甘草不定根中其他三种药用成分和总黄酮的含量均高于人工甘草实生根,经 SPSS 分析,除异甘草素外,其他成分在两组之间均存在显著差异;根据 HPLC 指纹图谱,两种甘草药用成分之间差异显著,相似度为 0.647。**结论:**野生无性繁殖的甘草根和人工有性繁殖的甘草根中主要药用成分含量之间存在显著差异,野生甘草具有快速积累药用成分的功能。本研究结果对于今后人工调控生产优质甘草药材,实现甘草资源的可持续利用具有重要的理论和实践意义。

关键词:甘草;繁殖模式;药用成分;HPLC;积累速度

中图分类号:R282.71;R931.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)10-1816-04

Differences between Different Propagation Modes in the Accumulation Rate of the Content of Medicinal Components in Glycyrrhiza Uralensis Fisch*

GUO Zheng-zheng, CHENG Rui-jing, YANG Li, WANG Ru-feng, HU Hui-juan, WU Pei-gen, LIU Rong-xiu, WEI Sheng-li[△]

(Institute of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100102, China)

ABSTRACT Objective: To systematically compare the difference in the accumulation rate of the content of medicinal components between licorice roots formed by asexual reproduction of wild licorice and sexual reproduction of cultivated licorice. Accordingly, this could be the theoretical basis to further study genetic mechanisms influencing the accumulation of medicinal components. **Methods:** In this study the contents of Glycyrrhizin, Liquiritin and total flavonoids and other types of components in wild and cultivated roots were analyzed by HPLC and UV; And based on HPLC fingerprint technology, the differences in the chemical information and the quality of licorice roots under different propagation modes were comprehensively analyzed. **Results:** Except for the contents of liquiritigenin and isoliquiritigenin, the contents of other three medicinal components and total flavonoids in wild root formed by asexual reproduction are higher than those in cultivated root formed by sexual reproduction. And all the contents of medicinal components but for isoliquiritigenin were different significantly by SPSS analysis; According to HPLC fingerprint, there were significant differences between wild and cultivated roots, and there was a low similarity of 0.647. **Conclusions:** There are significant differences between licorice roots formed by asexual reproduction of wild licorice and sexual reproduction of cultivated licorice in the accumulation rates of the content of medicinal components. And wild licorice has the function to accumulate the contents of medicinal components rapidly. The results could be of important theoretical and practical significance to regulate the production of high quality artificial licorice herbs and realize the sustainable utilization of licorice resource in the future.

Key words: Licorice; Propagation modes; Medicinal components; HPLC; Accumulation rate

Chinese Library Classification(CLC): R282.71; R931.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)10-1816-04

前言

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)是最常用的大宗药材,应用广泛。多年来,商品甘草多来自野生,由于连续多年的过渡采挖,造成环境恶化,野生甘草资源日趋匮乏,而人工甘草已日趋

成为商品甘草的主要来源^[1]。然而,近几年研究表明,在药用成分含量方面,栽培甘草的药材质量普遍不及野生甘草^[2-5]。如何提高栽培甘草的药用成分含量,改善药材质量,已经成为制约甘草资源可持续的重要瓶颈。近年来,基于种质遗传差异^[6,7]、产地环境差异^[8]、栽培模式^[9]、栽培年限与采收期^[10]对甘草药材质

* 基金项目:北京市自然科学基金项目(7122094)

作者简介:郭争争,女,硕士研究生,主要研究方向:中药资源定向培育

△ 通讯作者:魏胜利,电话:010-84738334, E-mail: wsl7491@126.com, Fax: 010-84738611

(收稿日期:2014-10-26 接受日期:2014-11-22)

量的影响均有报道。上述研究结果均对提高栽培甘草的质量有很好的借鉴意义,但是由于甘草育种周期漫长,短期无法解决遗传分化导致的遗传不稳定问题,还没有选育出优质新品种^[1]。干旱、水分盐分以及微量元素的合理施用对于提高甘草药用成分含量具有一定的促进作用^[10],但是也不足以整体改善药材质量达到药典规定的标准。栽培年限和采收期与甘草药材的质量密切相关。通过确定甘草药材最佳采收年限和采收期,能够获得相对优质的药材,但也还是不能从根本上提高甘草酸含量。魏胜利等对来自全国不同栽培产区的 71 份栽培样品和 117 份野生甘草样品的分析发现,栽培甘草的甘草酸含量平均只有 1.73%,而野生甘草平均在 3% 以上,最低也在 2% 以上^[11]。这初步显示,野生甘草具有快速积累药用成分的特性。为验证这一现象,本实验通过田间对比试验,基于 HPLC 和 UV 等分析方法分析甘草中甘草酸、甘草苷、甘草素、异甘草苷和异甘草素和甘草总黄酮的含量,并基于 HPLC 指纹图谱技术,对药材整体进行了对比分析。从而系统比较野生甘草无性繁殖生长 2 年长出的不定根和人工甘草有性繁殖生长 2 年长出的实生根中药用成分积累速度的差异。本研究结果为今后从分子生物学的角度探讨影响甘草中药用成分积累的基因机制奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters-2489 型紫外检测器, Warts-1525 型液相泵, 2707 自动进样器, Breeze-2 数据处理系统), 色谱柱: Diamonsi (R) 钻石 C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); SP-752 PC 型紫外-可见分光光度计电子分析天平(Sartorius BS110S 1/万, BP211D 1/十万; KH500DE 型数控超声波清洗器)。

1.1.2 试剂 甘草酸对照品(中国药品生物制品检定所、甘草苷、甘草素、异甘草苷和异甘草素对照品(上海融禾医药科技有限公司), 纯度均大于 98%; 乙腈及磷酸均为色谱纯; 液相用水为娃哈哈纯净水; 无水乙醇、蒸馏水均为分析纯。

1.1.3 药材 2012 年 4 月于内蒙古杭锦旗采集野生甘草地地下茎, 经北京中医药大学魏胜利副教授鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根及根茎, 并购买野生甘草种子, 按照随机区组设计将甘草地地下茎和甘草种子种植于北京顺义濒危药用植物种质资源保存圃, 并于 2014 年 4 月分别采挖, 50℃ 干燥, 粉碎过 40 目筛, 进行含量分析。

1.2 方法

1.2.1 甘草混合对照品溶液的制备 HPLC 法: 分别精密称取异甘草苷、异甘草素对照品 1.40 mg 和 1.47 mg 置于两个 10 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇溶解并定容至刻度, 然后分别取 5 mL 异甘草苷和 1 mL 异甘草素置于—10 mL 容量瓶中, 然后向此容量瓶中分别精密称取甘草酸对照品 5.73 mg, 甘草苷对照品 2.89 mg, 甘草素对照品 1.13 mg, 70% 乙醇溶解并定容至刻度。即得甘草酸浓度为 0.573 mg/mL, 甘草苷浓度为 0.289 mg/mL, 甘草素浓度为 0.113 mg/mL, 异甘草苷浓度为 0.070 mg/mL, 异甘草素浓度为 0.0147 mg/mL 的对照品贮备液。UV 法: 精密称定甘草苷对照品 2.05 mg, 用 70% 乙醇溶解, 定容于

10 mL 量瓶中, 即得浓度为 0.205 mg/mL 的甘草苷对照品储备液溶液。

1.2.2 甘草药用成分含量测定与分析 参照文献方法^[12]提取甘草样品, 建立 HPLC 分析方法和 UV 分析方法。具体如下: HPLC 法: Diamonsi (R) 钻石 C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A) -0.05 % 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 0 min, 20% A; 8 min, 20% A; 30 min, 38% A; 42 min, 50% A; 45 min, 95% A。流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长为双波长, λ₁ 为 237 nm, λ₂ 为 365 nm, 进样量 10 μL。色谱图见图 1。UV 法: 以甘草苷为对照品, 70% 乙醇溶液为空白, 在 276 nm 下测定吸光度值。

1.2.3 HPLC 指纹图谱的测定 所用高效液相色谱仪为岛津 LC-2010AHT, 色谱柱为 Diamonsi (R) 钻石 C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -1 % 磷酸水 (B), 洗脱程序如下: 0 min, 15% A; 10 min, 25% A; 20 min, 38% A; 70 min, 80% A。流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长为 248 nm, 进样量 15 μL (根据文献^[13,14]确定)。

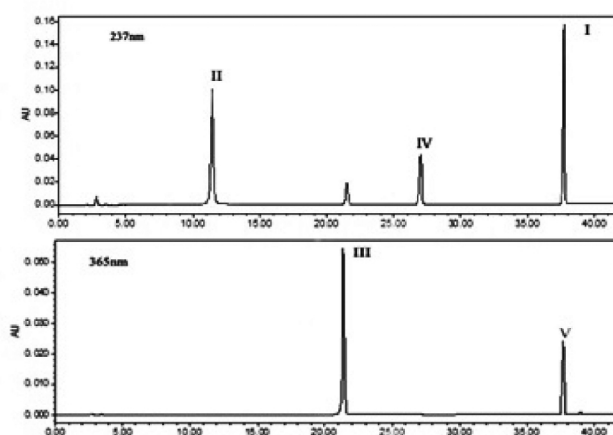


图 1 同时测定甘草中 5 种药用成分(I. 甘草酸; II. 甘草苷; III. 异甘草苷; IV. 甘草素; V. 异甘草素)

Fig. 1 Simultaneous determination of five medicinal components (I, Glycyrrhizin; II, Liquiritin; III, Isoliquiritin; IV, Liquiritigenin; V, Isoliquiritigenin)

1.3 数据处理与分析

应用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 统计软件对数据进行作图和统计分析。应用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” 2004 版软件评价两种繁殖模式下所得甘草药材的指纹图谱。

2 结果

2.1 两种繁殖模式下生长出甘草根中药用成分的含量差异分析

野生甘草无性繁殖长出的不定根和人工甘草有性繁殖长出的甘草实生根中 5 种药用成分和甘草总黄酮含量有差异, 结果如图 2 所示。

野生无性繁殖甘草不定根中五种药用成分除甘草素和异甘草素外, 其他三种药用成分的含量均高于有性繁殖的甘草实生根。其中甘草酸在野生无性繁殖的甘草不定根中平均含量为有性繁殖的甘草实生根中甘草酸平均含量的 1.67 倍, 甘草苷

为 1.86 倍,异甘草苷则为 2.09 倍,甘草总黄酮为 1.36 倍。利用独立样本 T 检验比较两组之间药用成分之间的差异,结果除异甘草素外,其他四种药用成分和甘草总黄酮在两组之间均存在显著差异($P<0.05$)。对其进行相关分析发现,甘草酸和甘草苷、异甘草苷和甘草总黄酮相互之间呈显著正相关($P<0.01$),而甘草素和异甘草素之间呈显著正相关。与参考文献^[15]结果一致。

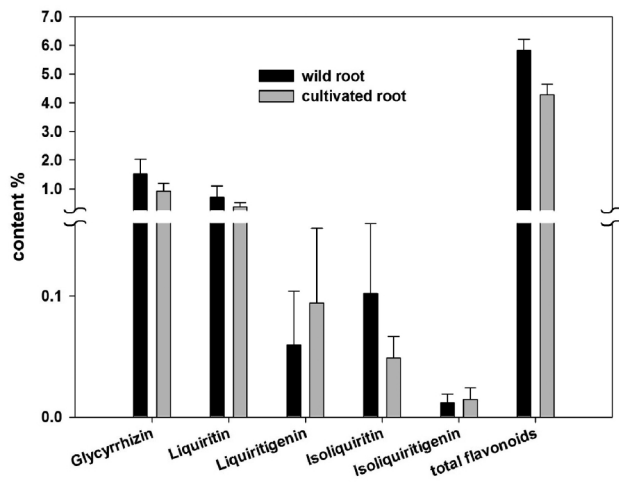


图 2 不同繁殖模式下的甘草根中药用成分的含量

Fig. 2 The content of active components in licorice root between different propagation modes

2.2 两种繁殖模式下的甘草根中药用成分的指纹图谱差异分析

根据 1.2.3 项下指纹图谱测定方法分别测定 20 株野生甘草无性繁殖的甘草不定根和 20 株人工甘草有性繁殖的甘草实生根,以对照指纹图谱生成法,通过国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 版软件,计算两种甘草的 HPLC 图谱与生成对照指纹图谱之间的相似度,结果表明,不同繁殖模式下甘草间相似度均大于 0.85,相似度良好。分别将得到的两种繁殖模式下甘草的对照指纹图谱进行叠加,使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 版”软件进行相似度分析,结果见表 1 和图 3。

比较野生和栽培甘草根的指纹图谱,其在 248 nm 的检测波长下,药用成分之间差异显著,相似度为 0.647。在同样浓度及进样量的情况下,野生甘草的大部分峰的峰面积明显高于栽培品。除此之外,各成分含量相互之间的比例也有差异。野生甘草中甘草酸和甘草苷的峰面积比例与其在栽培甘草中不同,说明两种甘草中化学成分的积累规律并不完全一致,进一步证明了二者在药用成分积累方面存在差异。

表 1 野生甘草不定根和人工甘草实生根对照 HPLC 指纹图谱相似度
Table 1 Semblance of HPLC fingerprint of Wild and cultivated roots

	WR	R	对照指纹图谱 Reference fingerprint
WR	1.000	0.647	0.927
R	0.647	1.000	0.887
对照指纹图谱 Reference fingerprint	0.927	0.887	1.000

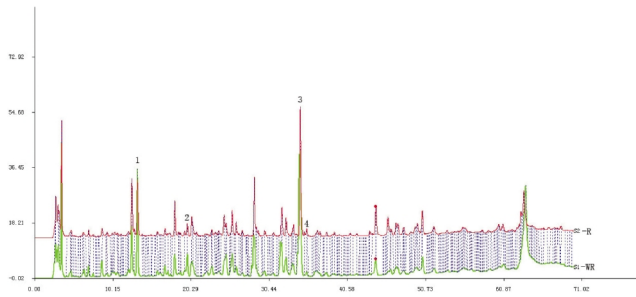


图 3 野生甘草不定根和人工甘草实生根对照指纹图谱评价图(248 nm)
(1, 甘草苷;2, 异甘草苷;3, 甘草酸;4, 异甘草素)

Fig. 3 The reference fingerprint of wild and cultivated roots (248 nm)
(1, Liquiritin; 2, Liquiritin; 3, Glycyrrhizin; 4, Isoliquiritigenin)

3 讨论

一直以来,众多研究学者一直致力于如何提高栽培甘草中甘草酸的含量,但均未取得突破性的进展。对于植物来讲,外界胁迫因子能够在一定程度上改变植物次生代谢产物的合成^[16]。前期有研究表明,甘草中甘草酸的积累受外界环境胁迫影响较大^[17,18]。从基因层面讲,植物在逆境胁迫下,会调控自身产生对抗逆境的抗性功能基因^[19],这些基因调控次生代谢产物的合成。然而,本研究结果发现在相同栽培环境下,野生甘草无性繁殖的不定根和人工甘草有性繁殖的实生根中甘草酸等主要药用成分的积累速度是有差异的,因此,导致产生这种现象的原因是由于调控甘草药用成分合成的基因存在差异,而这些基因的改变正是由于植物本身生长环境有差异造成的。张永刚等^[20]也发现,环境因子能够影响黄芩中黄芩苷的积累。因此,我们提出了“野生甘草药用成分合成惯性”假说。认为野生甘草在长期的生长过程中,经历了多种不利环境的刺激,而这些刺激的累加效应则在某种程度上促进了甘草中药用成分的积累。从基因角度分析,外界刺激的累加效应增加了甘草药用成分合成基因体系的基因表达量,或者是刺激启动了其他对甘草酸等药用成分合成有辅助催化作用的关键酶体系,这种加速效应像“惯性”一样在甘草无性繁殖过程中传递。该假说能很好的解释本实验的研究结果,即当取野生地下茎无性繁殖时,其新生组织具有和母体相同的特性而表现出快速积累甘草酸等药用成分,而人工甘草由于生长条件优越,即便人为给予其逆境胁迫,也会由于时间太短而无法启动快速合成的代谢环节,从而不能快速积累药用成分。目前,从甘草次生代谢产物生物合成途径出发,已经成功找出调控甘草中甘草酸积累的关键酶^[21],本结果为进一步从分子水平探讨野生甘草快速积累药用成分的基因机制奠定一定的理论基础。

参考文献 (References)

[1] 魏胜利,王文全,刘长利,等. 一年生甘草药材产量与甘草酸含量的广义遗传力及其遗传相关性分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 553-557
Wei Sheng-li, Wang Wen-quan, Liu Chang-li, et al. Analysis of broad-sense heritability and genetic correlation of production and content of glycyrrhizin of annual *Glycyrrhiza uralensis* [J]. China journal of Chinese materia medica, 2012, 37(5): 553-557
[2] Yamamoto Y, Majima T, Saiki I, et al. Pharmaceutical evaluation of

- Glycyrrhiza uralensis roots cultivated in eastern Nei-Meng-Gu of China[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(8): 1144-1149
- [3] 赵则海, 杨建建, 曹建国, 等. 野生与栽培乌拉尔甘草不同部位甘草酸含量分析[J]. 植物研究, 2005, 25(04): 444-448
Zhao Ze-hai, Yang Feng-jian, Cao Jian-guo, et al. Analysis on the content of Glycyrrhizic acid in different parts between wild and cultivated Glycyrrhiza uralensis [J]. Bulletin of Botanical Research, 2005, 25(04): 444-448
- [4] Liu J, Wu L, Wei S, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, nutrient uptake and glycyrrhizin production of licorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch)[J]. Plant Growth Regulation, 2007, 52(1): 29-39
- [5] Rauchensteiner F, Matsumura Y, Yamamoto Y, et al. Analysis and comparison of Radix Glycyrrhizae (licorice) from Europe and China by capillary-zone electrophoresis (CZE)[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2005, 38(4): 594-600
- [6] 柴娜, 张颖, 王景安. 不同基因型甘草品质及产量的比较[J]. 草业科学, 2011, 28(9): 1671-1675
Chai Na, Zhang Ying, Wang Jing-an. Comparison of quality and yield of different genotype Glycyrrhiza uralensis [J]. Pratacultural Science, 2011, 28(9): 1671-1675
- [7] Chai N, Zhang Y, Wang J. Comparison of quality and yield of different genotype Glycyrrhiza uralensis[J]. Pratacultural Science, 2011, 28(9): 1671-1675
- [8] 魏胜利, 王文全, 陈秀华, 等. 甘草的耐阴性研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 100-104
Wei Sheng-li, Wang Wen-quan, Chen Xiu-hua, et al. Studies on the shade-endurance capacity of Glycyrrhiza uralensis [J]. China journal of Chinese materia medica, 2005, 30(2): 100-104
- [9] 周香珍, 王文全. 甘草质量差异研究概况 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1394-1396
Zhou Xiang-zhen, Wang Wen-quan. Review on licorices quality differences [J]. China journal of Chinese materia medica, 2011, 36(10): 1394-1396
- [10] 万春阳, 王丹, 侯俊玲, 等. 盐胁迫对甘草不同组分的影响[J]. 中草药, 2011, 42(11): 2312-2316
Wan Chun-yang, Wang Dan, Hou Jun-ling, et al. Effect of salt stress on different components of Glycyrrhiza uralensis [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(11): 2312-2316
- [11] 魏胜利, 王文全, 王继永, 等. 我国不同产区野生与栽培甘草的甘草酸含量及其影响因子的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10): 1341-1345
Wei Sheng-li, Wang Wen-quan, Wang Ji-yong, et al. Preliminary study in glycyrrhizin content and its influencing factors of wild and cultivated in different region of China [J]. China journal of Chinese materia medica, 2012, 37(10): 1341-1345
- [12] 于福来, 刘凤波, 王文全, 等. 甘草种苗质量分级标准研究[J]. 中国现代中药, 2012, 14(12): 36-39
Yu Fu-lai, Liu Feng-bo, Wang Wen-quan, et al. Establishment of seeding classification criteria of licorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch) [J]. Modern Chinese Medicine, 2012, 14(12): 36-39
- [13] 闫永红, 段天璇, 王文全, 等. 野生及栽培甘草 HPLC 指纹图谱[J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 116-120
Yan Yong-hong, Duan Tian-xuan, Wang Wen-quan, et al. Studies on the HPLC Fingerprint of Radix Glycyrrhizae [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2006, 4(2): 116-120
- [14] 段天璇, 于密密, 刘春生, 等. HPLC 法同时测定甘草指纹图谱暨甘草苷、甘草酸含量[J]. 中成药, 2006, 28(2): 161-165
Duan Tian-xuan, Yu Mi-mi, Liu Chun-sheng, et al. Simultaneous determination of glycyrrhizic acid, liquiritin and fingerprint of licorice by RP-HPLC[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2006, 28(2): 161-165
- [15] Guo Z, Wu Y, Wang R, et al. Distribution Patterns of the Contents of Five Medicinal Components in Taproot and Stolon of Glycyrrhiza uralensis Fischer[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2014, 37(7): 1253-1258
- [16] 黄璐琦, 郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(04): 277-280
Huang Lu-qi, Guo Lan-ping. Secondary metabolites accumulating and geoherts formation under environmental stress [J]. China journal of Chinese materia medica, 2007, 32(04): 277-280
- [17] Li W D, Hou J L, Wang W Q, et al. Effect of water deficit on biomass production and accumulation of secondary metabolites in roots of Glycyrrhiza uralensis [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2011, 58(3): 538-542
- [18] Hou J, Li W, Zheng Q, et al. Effect of low light intensity on growth and accumulation of secondary metabolites in roots of Glycyrrhiza uralensis Fisch [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(2): 160-168
- [19] 胡银岗, 马翎健, 宋喜悦, 等. 植物逆境胁迫抗性的功能基因组研究策略[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 943-948
Hu Yin-gang, Ma Ling-jian, Song Xi-yue, et al. Strategies on functional genomics to plant abiotic stress tolerance[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2004, 24(5): 943-948
- [20] 张永刚, 韩梅, 姜雪, 等. 环境因子对黄芩光合生理和黄酮成分影响研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1761-1766
Zhang Yong-gang, Han Mei, Jiang Xue, et al. Effect of environment factors on photosynthetic physiology and flavonoid constituent of Scutellaria baicalensis [J]. China journal of Chinese materia medica, 2014, 39(10): 1761-1766
- [21] 刘颖, 刘东吉, 刘春生. 甘草 HMGR, SQS1, β -AS 合酶基因 CNVs 检测体系的建立[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 283-287
Liu Ying, Liu Dong-ji, Liu Chun-sheng. Establishment of detection system of CNVs HMGR, SQS1, β -AS synthase gene of Glycyrrhiza uralensis [J]. China journal of Chinese materia medica, 2012, 37(3): 283-287