

山豆根组培苗的质量分析

韦坤华, 李林轩, 王美英, 张占江, 缪剑华

(广西药用植物园, 广西药用植物资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023)

摘要:以山豆根组培生根苗为试材, 采用 TLC 法鉴别其是否存在苦参碱和氧化苦参碱, 并使用 HPLC 法测定其组培苗移栽前后苦参碱和氧化苦参碱的含量。结果表明: 山豆根组培生根苗含有苦参碱和氧化苦参碱, 且与氧化苦参碱和苦参碱对照品色谱相同的位置上, 显示相同的橙红色斑点; HPLC 定量分析结果表明, 山豆根组培苗移栽田间 4 个月含有的苦参碱和氧化苦参碱均低于田间生长 6 个月的山豆根实生苗。

关键词:山豆根; 苦参碱; 氧化苦参碱; 组培苗

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)13-0185-03

山豆根属豆科槐属植物越南槐(*Sophora tonkinensis* Gapnep.) 的干燥根及根茎, 又名广豆根, 为广西著名的道地药材之一, 主产于广西的西南部至西北部, 具清热解毒、消肿止痛之功效^[1]。山豆根的地域分布范围相当狭窄, 常零星生长于石山岩缝之中。自然条件下山豆根的开花结实易受到病虫害影响, 且种子成熟后常自然脱落, 这些特性使得广豆根的种子产量低, 难以满足生产栽培的需要。因此, 目前不少科技工作者尝试使用组织培养技术进行山豆根的离体培养, 以提高广豆根种苗的繁殖速度和种苗质量^[2]。

化学成分分析表明山豆根药材中含有多种生物碱成分, 其中的苦参碱和氧化苦参碱是 2010 版《中国药典》的指标性成分。有研究报道山豆根组培苗根部的 TLC 鉴定可以检出苦参碱成分, 但未检出氧化苦参碱成分^[3]。因此, 现以山豆根组培生根苗为试材, 采用 TLC 法鉴别其是否存在苦参碱和氧化苦参碱, 并使用 HPLC 法测定其组培苗移栽前后苦参碱和氧化苦参碱的含量, 为山豆根资源的进一步研究与开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将山豆根试管丛生芽接种到添加适量 6-BA(6-苄基

腺嘌呤)和 IAA(吲哚乙酸)的 MS 培养基上培养 30 d, 切取已展叶的小芽接种到添加了适量的 NAA、IAA 和 IBA(吲哚丁酸)的 1/2MS 培养基上进行生根培养 2 个月, 切取生根苗的根部作为 TLC 鉴定和 HPLC 测定的试验材料; 山豆根组培苗移栽后在田间生长 4 个月植株(组培试管内生 2 个月, 田间移栽 4 个月, 植株苗龄为 6 个月)的根部以及田间生长半年的实生苗根部作为对照材料。苦参碱对照品和氧化苦参碱对照品购自天津马克生物科技有限公司。试验仪器: Agilent 1260 Infinity LC; 色谱柱: Phenomenex Luna 5 U NH₂ 100 A, 150×4.6 mm; 柱温: 25℃; 流动相: 乙腈: 异丙醇: 3%磷酸(80:5:15); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 210 nm; 进样体积: 5 μL。

1.2 试验方法

1.2.1 山豆根组培生根苗苦参碱和氧化苦参碱的 TLC 鉴定 参照 2010 版《中国药典》^[1], 采用苦参碱、氧化苦参碱对照品作为试验对照, 取山豆根组培生根苗根部的干燥粗粉 1.0 g, 按照药典鉴别方法制备供试液。另取苦参碱对照品和氧化苦参碱对照品, 加氯仿 1 mL 分别配制成含 1 mg/mL 溶液, 作为对照溶液。TLC 检测参照《中国药典》附录 VI B 薄层色谱法, 以氯仿-甲醇-浓氨试液(4:1:0.1)为展开系统展开, 喷以碘化铋钾试剂显色。

1.2.2 山豆根组培生根苗的 HPLC 含量测定 参照 2010 年《中国药典》的方法, 采用苦参碱、氧化苦参碱对照品作为试验对照。取山豆根组培生根苗、田间生长 4 个月的组培苗和实生苗的干燥粉末 1.0 g, 按照药典含量山豆根测定的方法制备供试液。另取苦参碱、氧化苦参碱对照品, 加流动相配分别配制成 0.020 mg/mL 的苦参碱溶液和 0.150 mg/mL 的氧化苦参碱溶液。

第一作者简介:韦坤华(1983-), 女, 博士, 助理研究员, 现主要从事中药生物技术等研究工作。

责任作者:缪剑华(1961-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事药用植物中药学等研究工作。

基金项目:国家发改委中药材扶持资金资助项目(发改运行[2007]2706号); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(桂科自0991025Z)。

收稿日期:2012-04-23

2 结果与分析

2.1 山豆根试管苗根部的苦参碱和氧化苦参碱的 TLC 鉴定

山豆根组培生根苗的根部为浅绿色到灰色,根中含有叶绿素成分,因此其氯仿提取液为浅绿色液体。以氯仿-甲醇-浓氨试液(4:1:0.1)为展开系统,苦参碱对照品和氧化苦参碱对照品为对照进行 TLC 鉴别的结果见图 1。其中 3 号为样品+苦参碱对照品,4 号为苦参碱对照品+氧化苦参碱对照品,5 号为样品+氧化苦参碱对照品,其余的则为纯样品。由 3、4、5 号试验结果对照可知,苦参碱的极性较小,因此在非极性展开系统中的 R_f 值较大,而氧化苦参碱的极性较大, R_f 值较小。由 TLC 谱图结果发现,山豆根试管苗根部的苦参碱斑点较浅,而氧化苦参碱的斑点较深,且非常明显,说明山豆根的试管苗根部均存在上述 2 种成分,但苦参碱的含量较低,而氧化苦参碱的含量较高,这一结果与已报道的文献结果存在差异,可能是由于使用的制备方法与展开方法差异造成的。

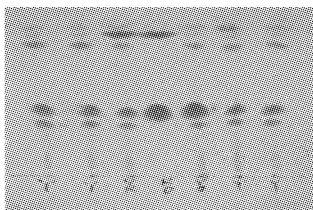


图 1 山豆根试管苗根部的 TLC 色谱图

注:Y:样品,K:苦参碱对照品,O:氧化苦参碱对照品。

Fig. 1 TLC Chromatograms of sample,matrine and oxymatrine

Note: Y: Sample, K: Matrine, O: Oxymatrine.

2.2 山豆根组培生根苗根部的 HPLC 含量测定

山豆根的主要有效成分是苦参碱和氧化苦参碱,根据 TLC 薄层鉴定结果,使用 HPLC 法测定了山豆根试管生根苗根部的苦参碱和氧化苦参碱含量,移栽后田间生长 6 个月的山豆根试管苗和田间生长 6 个月的实生苗作为对照,以比较试管苗的苦参碱和氧化苦参碱含量差异,结果见表 1 和图 2~5。

表 1 山豆根组培苗与实生苗的苦参碱与氧化苦参碱含量

Table 1 The contents of matrine and oxymatrine of

S. tonkinensis Gapnep. Plantlet roots from tissue culture and seeds (n=2)

样本 Sample	苦参碱 Matrine /mg · g ⁻¹	氧化苦参碱 Oxymatrine /mg · g ⁻¹	总量 Total /mg · g ⁻¹
山豆根组培苗 Tissue-cultured plantlet roots	0.321	0.985	1.306
田间生长 4 个月的山豆根组培苗 Roots of tissue-cultured plantlet in the field for four months	0.545	8.609	9.154
田间生长 6 个月的山豆根组培苗 Roots of seedling in the field for six months	0.170	11.686	11.856

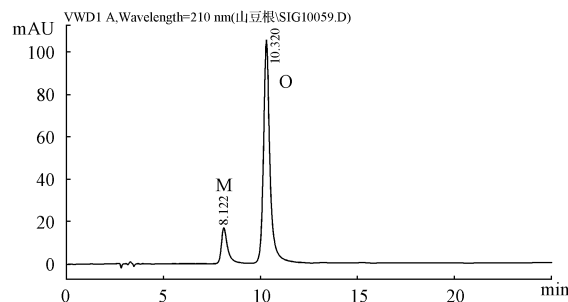


图 2 苦参碱(M)与氧化苦参碱标准品(O)的 HPLC 图谱
Fig. 2 HPLC chromatograms of matrine and oxymatrine

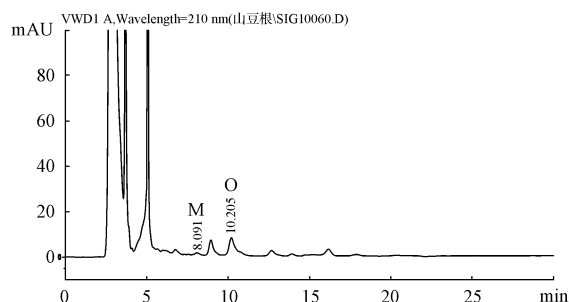


图 3 山豆根试管组培苗根部的苦参碱和氧化苦参碱的 HPLC 图谱

Fig. 3 The HPLC chromatogram of matrine and oxymatrine from tissue-cultured plantlet roots

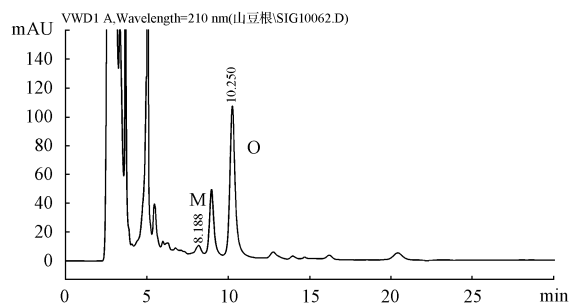


图 4 田间生长 4 个月的山豆根组培苗的苦参碱和氧化苦参碱 HPLC 图谱

Fig. 4 The HPLC chromatogram of matrine and oxymatrine from tissue-cultured plantlet roots in the field for four months

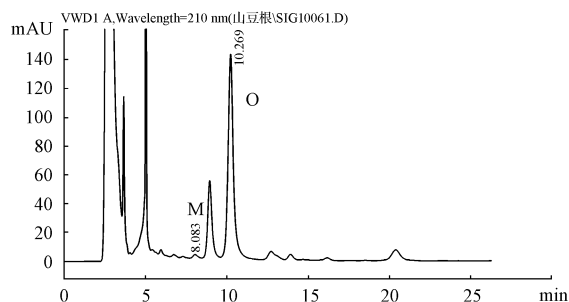


图 5 田间生长 6 个月的山豆根实生苗的苦参碱和氧化苦参碱 HPLC 图谱

Fig. 5 The HPLC chromatogram of matrine and oxymatrine from seedling roots in the field for six months

HPLC 测定结果表明,山豆根组培生根苗、移栽田间生长 4 个月的组培苗以及田间生长 6 个月的实生苗根部均含有苦参碱和氧化苦参碱成分。其中实生苗的苦参碱含量最低,为 0.170 mg/g,但氧化苦参碱含量最高,达到 11.686 mg/g,其总含量为 1.1856%,超过 2010 版《中国药典》山豆根药材总含量 0.70% 的要求。组培生根苗的根部苦参碱与氧化苦参碱含量均较低,分别为 0.0321% 和 0.0985%,总含量仅为 0.1306%,低于 2010 版《中国药典》山豆根药材的质量要求,但这一结果也表明在组织培养过程中,并没有造成苦参碱与氧化苦参碱合成酶缺失或不表达。由于组培苗处在异养、高温环境中,自身代谢水平发生一定变化,从而导致组培苗根部的次生代谢产物积累量降低^[4]。但是将组培生根苗移栽田间,使之由异养营养方式转变为自养营养方式,植株体内的代谢趋向正常,苦参碱和氧化苦参碱含量不断增加。移栽田间栽培 4 个月后的组培苗的苦参碱和氧化苦参碱分别为 0.545 mg/g 和 8.609 mg/g,总含量为 0.9154%,超过了 2010 版《中国药典》山豆根药材的质量要求。苦参碱与氧化苦参碱相较未栽培前的组培苗分别增长了 1.70 倍和 8.74 倍,总含量增长了 7.01 倍,表明植株的营养方式对植株自身次生代谢产物积累具有较大影响。

3 结论与讨论

移栽到田间生长 4 个月的组培苗与田间直接播种生长 6 个月的组培苗苗龄相同,但是苦参碱和氧化苦参碱的含量均存在较大差异,其中移栽后组培苗的苦参碱含量高于实生苗,但氧化苦参碱含量低于实生苗,总含量也低于实生苗。表明移栽的组培苗的次生产物代谢

量与实生苗存在差异。这可能是由于组培苗有 2 个月的时间是处在异养营养状态中,而且移栽田间后还需要经过一段时间的驯化后才能适应自养的营养方式。因此,移栽田间 4 个月的组培苗其生长发育阶段有可能迟于田间生长 6 个月的实生苗,从而造成苦参碱与氧化苦参碱成分之间的差异^[5]。

从 TLC 图谱直观观察发现样品的氧化苦参碱的斑点颜色与氧化苦参碱标准品斑点颜色较接近,而样品苦参碱斑点颜色明显浅于苦参碱标准品斑点颜色,表明样品的氧化苦参碱含量可能高于苦参碱含量^[6]。而 HPLC 含量测定的结果也表明组培生根苗根部的氧化苦参碱含量显著高于苦参碱,为后者的 3.07 倍。HPLC 含量测定结果与 TLC 图谱鉴别结果都表明,山豆根组培苗中确实含有苦参碱和氧化苦参碱成分,这一试验结果为山豆根的进一步研究提供一定的指导意义。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 版)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 覃文流,凌征柱,许鸿源,等. 山豆根组织培养获得再生植株[J]. 中国中药杂志,2005,30(4):303-304.
- [3] 覃文流,凌征柱,许鸿源,等. 广豆根组培苗与野生植株有效成分的对比分析[J]. 中药材,2004,27(8):552-553.
- [4] Huang H P, Gao S L, Chen L L, et al. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Dioscorea zingiberensis*[J]. Pharmacognosy Magazine, 2010, 6(21):51-56.
- [5] Wei K H, Miao J H, Huang H P, et al. Generation of autotetraploid plant of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and its quality evaluation [J]. Pharmacognosy Magazine, 2011, 7(27):200-206.
- [6] 赵磊磊,谢凯,朱盛山,等. 不同产地丹参的 HPLC 和 TLC 图谱分析[J]. 中药材,2007,30(6):646-648.

Analysis on the Quality of Tissue-cultured Plantlets of *Sophora tonkinensis* Gapnep.

WEI Kun-hua, LI Lin-xuan, WANG Mei-ying, ZHANG Zhan-jiang, MIAO Jian-hua

(Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning, Guangxi 530023)

Abstract: With *Sophora tonkinensis* Gapnep tissue culture seedling as material, the presence of matrine and oxymatrine in the tissue-cultured plantlets of *Sophora tonkinensis* Gapnep. were identified by TLC, and also the matrine and oxymatrine contents of tissue-cultured plantlets before and after transplanted were determined by HPLC. The results showed that there were reddish orange spots at the corresponding place of matrine and oxymatrine. The analysis of HPLC showed that both of the tissue-cultured plantlets before transplanted and after transplanted in the field for four months possessed matrine and oxymatrine, but lower than the seedlings from seeds planted in the field for half year. This study demonstrates that the tissue-cultured plantlets of *S. tonkinensis* Gapnep. contain matrine and oxymatrine, and it will provide a good support for follow-up research.

Key words: *Sophora tonkinensis* Gapnep.; matrine; oxymatrine; tissue-cultured plantlet