

Effects of irrigation volume on growth and quality of *Lonicera japonica*

XU Ying-chun^{1,2}, ZHANG Jia-bao², JIANG Qi-ao^{1,2}, ZHOU Ling-yun², XU Lin-guo¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Soil Science, China Academy Sinica, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of irrigation volume on the growth and quality of *Lonicera japonica*. **Method:** Different volume of irrigation water was applied to the potted *L. japonica* before the first florescence of honeysuckle in order to keep the relative moisture content of the soil as 100%, 80%, 50%, 30%, and observe the growth and development of shoot and leaves, yield and quality of honeysuckle. **Result:** As the of irrigation volume was reduced, the internodal elongation of shoot and the increase of the knot were restrained, and the yield of honeysuckle dropped. But the content of chlorogen acid in the buds treated by 80% irrigation volume was not affected, while that of the other treatment all decreased. The moisture contents of the leaves treated by 30% irrigation volume was significantly lower than that of the CK, while the specific leaf weight (SLW) increased significantly comparing to the CK. The content of chlorophyll in the leaves of 50% and 30% increased, while the ratio of chlorophyll A and B fell significantly. The content of dissoluble suger in the leaves of 80% and 50% irrigation volume was much higher than that in the CK. The results also showed that, the content of dissoluble protein in the leaves of 30% irrigation volume increased comparing with that in 50%, and the content of proline in leaveas of 30% irrigation volume increased significantly. **Conclusion:** Using less irrigation volume(keeping 80% of relative moisture content of the soil) does not affect the quality of honeysuckle, but decreased dry weight of honeysuckle. It is necessary to take irrigation management during cultivation of honeysuckle.

[Key words] *Lonicera japonica*; irrigation quantity; shoot; leaves; quality of honeysuckle

[责任编辑 张宁宁]

虎杖野生植株及组织培养物中白藜芦醇 和虎杖苷含量的比较

于树宏, 查建蓬, 詹文红, 张嫡群*

(河北医科大学药学院, 河北石家庄 050017)

[摘要] **目的:**比较白藜芦醇和虎杖苷在不同来源的虎杖材料中含量积累的差异,以期筛选出适宜的培养材料用于进一步的代谢调控研究。**方法:**采用反相高效液相色谱法对不同样品中白藜芦醇及虎杖苷的含量同时进行检测。**结果:**在多年生野生植株和室内人工栽培幼苗中,白藜芦醇和虎杖苷均在植物根及根茎部特异性累积,其含量要远远高于叶片和茎段。其中,以室内人工栽培 3 个月的幼苗中有效成分含量较高,虎杖苷的积累量为 1.27%,是野生植株的 1.25 倍,白藜芦醇含量(0.401%)则接近野生植株水平。从虎杖的各种组织培养物中也可检测到白藜芦醇和虎杖苷的存在,但是二者含量的高低与培养物的生长速度、生理状况及发育时期密切相关。在几种培养物中,以毛状根的培养最具潜力,离体培养 30 d 后,其干重增长率为 8.29,分别是自然根和悬浮细胞的 8.4 倍和 192.8 倍,而且还可积累一定量的虎杖苷(0.037%)和白藜芦醇(0.007%)。**结论:**所建立的分析检测方法,具有快速、简便和准确的特点,尤其适于大批量生物样品的同时测定。在几种不同来源的虎杖材料中,毛状根是适宜大规模

[收稿日期] 2005-04-26

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(C2005000741)

[通讯作者] *张嫡群, Tel: (0311)86266335

模培养并可持续收获有效成分的培养物。

[关键词] 虎杖;白藜芦醇;虎杖苷;反相高效液相色谱法

[中图分类号] S 567 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2006)08-0637-05

白藜芦醇(resveratrol)及其糖苷——虎杖苷(polydatin)均为植物体天然产生的二苯乙烯类化合物,现代药理研究表明,二者对人体具有强心扩血管、抑制血小板凝集、降血脂、抗病毒和增强机体免疫力等作用^[1-3],更为重要的是其特异性地针对癌细胞具有杀伤力而不影响正常细胞^[4]。

但受栽培地区的自然环境、土壤条件以及采收季节等影响,不同产地的虎杖在白藜芦醇及虎杖苷的含量上存在较大差别,严重制约着其在应用上的数量和质量^[5-8]。利用植物组织培养技术可迅速获得不同的人工培养物,如愈伤组织、悬浮细胞系、毛状根和组培苗等,但针对虎杖组织培养物中白藜芦醇和虎杖苷的含量检测尚未见到相关报道。

白藜芦醇和虎杖苷在植物体内可以相互转化^[9],因此单独以醇或苷的含量作为药材质量评价指标不够全面。在已报道的文献中即便能够对醇和苷同时定量检测,也往往需要更换提取及色谱条件^[10],操作繁琐。本研究采用小体积 1 次超声提取的方法,以甲醇-水(50:50)为色谱流动相,即可对白藜芦醇及虎杖苷 2 种成分同时进行快速定量检测,特别适用于生物技术研究中大量样品的含量动态监测及代谢调控筛选工作。

1 材料与方 法

1.1 材 料

多年生虎杖植株采自河北师范大学生命科学学院植物园内(以下简称野生植株),经该院植物学教研室李敏讲师鉴定为虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc,分别取其叶片、茎段、根及根茎等部位;虎杖无菌组培苗分别培养在增殖培养基(MS + TDZ 0.05 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹)、生长培养基(MS + CPPU 0.1 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹)及生根培养基(1/2 MS + NAA 1.0 mg·L⁻¹)中,生长 30 d 后不同部位取材;虎杖室内栽培植株为已生根的无菌组培苗经炼苗后移栽于盛有蛭石的花盆中,在培养室内生长 3 m;虎杖愈伤组织由无菌苗茎段诱导获得,置于不同培养基中,在光照或黑暗条件下生长;虎杖细胞悬浮培养系由浅粉色疏松愈伤组织继代获得;虎杖毛状根由发根农杆菌 ATCC15834 感染无菌

苗叶片后获得(已经 PCR 鉴定其转基因性质,结果另文发表)。

1.2 仪器与试剂

KNAUER 高效液相色谱仪, K-2501 型紫外检测器(德国);BF-2002 色谱工作站(北京北分瑞利分析仪器集团有限公司);TGL-16G 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);A&D GR-202 型精密电子天平(日本)。

白藜芦醇对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 111535-200301);虎杖苷对照品购自天津尖峰天然产物研究开发有限公司(纯度 98%);乙醇为化学纯,甲醇为色谱纯,水为蒸馏水或亚沸蒸馏水。

TDZ(*N*-苯基-*N'*-噻二唑-5-脒,纯度 ≥ 98%)和 CPPU[*N*-苯基-*N'*-(4-吡啶基)脒,纯度 ≥ 93%]均购自四川省兰月科技开发公司。

1.3 白藜芦醇及虎杖苷的提取

将新鲜材料在 45 ℃ 恒温干燥至恒重后,用研钵研成细粉,过 60 目筛。精密称取 0.5 g 样品细粉,置 5 mL 具塞离心管中,精密加入 50% 乙醇 4 mL,超声提取 30 min,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液 0.45 μm 微孔滤膜过滤,续滤液避光保存待测。

1.4 色 谱 条 件

色谱柱 Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-水(50:50);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 300 nm;进样量 20 μL;柱温为室温。

1.5 检测指标

干重增长率 = (收获干重 - 接种干重) / 接种干重

按外标峰面积法计算各样品中白藜芦醇及虎杖苷的含量。

2 结果与讨论

2.1 白藜芦醇及虎杖苷含量检测方法的建立

2.1.1 不同材料样品的 HPLC 图谱比较 按 1.3 方法分别制备各样品溶液,10 μL 进样分析,色谱图见图 1。经与对照品比对,确定在毛状根及愈伤组织中含有白藜芦醇及虎杖苷成分,而与野生虎杖根部样品的比较发现,保留时间在 2~4 min 内的色谱峰明显升高,推测会有极性较强的新化合物产生,需经进一步的研究证实。

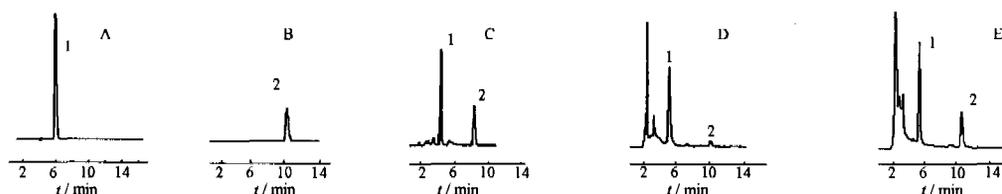


图 1 不同材料样品的 HPLC 图

A. 虎杖苷对照品; B. 白藜芦醇对照品; C. 野生虎杖根部; D. 毛状根; E. 愈伤组织; 1. 虎杖苷; 2. 白藜芦醇

表 1 索氏、回流及超声提取效率的比较 ($n=3$)

方法	取样量 /g	时间 /h	体积 /mL	白藜芦醇		虎杖苷	
				含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%
索氏	0.4	8	75	0.526	2.4	5.01	1.0
回流	0.2	0.5	25	0.531	0.7	4.97	1.1
超声	0.2	0.5	4	0.490	1.1	4.55	2.0

2.1.2 标准曲线的制备 分别精密称取白藜芦醇及虎杖苷对照品适量,用甲醇配成系列含量的对照品溶液。按照上述色谱条件分别进样 $20 \mu\text{L}$,以浓度为横坐标 (X),峰面积值为纵坐标 (Y)绘制标准曲线。结果显示,白藜芦醇在 $6.2 \sim 31.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好,回归方程 $Y = 1.14 \times 10^8 X - 1.489 \times 10^5$ ($r = 0.998$);虎杖苷在 $4.55 \sim 40.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好,回归方程为 $Y = 7.597 \times 10^7 X + 8.155 \times 10^2$ ($r = 0.9993$)。

2.1.3 精密度试验 取野生虎杖根部样品溶液连续进样 5 次,测得白藜芦醇及虎杖苷的 RSD 分别为 0.6% 和 0.5%,表明精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 取样品溶液,每隔 2 h 进样测定 1 次,共测定 5 次,测得白藜芦醇及虎杖苷的 RSD 分别为 1.7% 和 1.4%,说明样品在 8 h 内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验 分别称取 5 份野生虎杖根部样品粉末适量,处理后测定该样品中白藜芦醇的平均含量为 0.490%, RSD 1.1%;虎杖苷平均含量为 4.55%, RSD 2.0%,表明该测定方法重复性良好。

2.1.6 加样回收率试验 精密称取野生虎杖根部样品粉末适量,分别加入一定量的白藜芦醇及虎杖苷对照品溶液,按照上述方法处理并进样测定。白藜芦醇和虎杖苷的平均回收率分别为 98.1%, 99.2%, RSD 分别为 2.5%, 1.9%,测定次数分别为 5 次。实验表明回收率符合要求。

2.1.7 提取方法的比较 精密称取野生虎杖根部样品粉末适量,分别采用 50% 乙醇索氏提取、回流提取和超声提取,比较三者对白藜芦醇及虎杖苷提取效率方面的差异。结果表明(表 1),超声提取的效率能够达到索氏及回流提取水平的 91% ~ 93%,因此从提高样品分析效率及减少试剂消耗等方面考虑,本实验适宜采用快速简便的超声提取法。

2.2 多年生野生虎杖植株与室内人工栽培幼苗各部位中白藜芦醇及虎杖苷含量的比较

利用上述建立的提取和分析方法,对多年生的

野生虎杖植株与短期室内人工培养的虎杖幼苗各部位中白藜芦醇和虎杖苷的含量进行了检测,结果表明:白藜芦醇和虎杖苷的产生具有明显的器官特异性,其在植株的根及根茎部大量合成,而在叶片及茎段中含量甚微,这与传统用药部位相符。在培养室内特定的温度、湿度、光照周期及营养条件下生长 3 个月的虎杖幼苗,其根及根茎部虎杖苷的含量为 1.27%,是野生植株的 1.25 倍,白藜芦醇的含量 (0.401%) 则接近野生植株水平。

2.3 虎杖组培苗不同发育时期、不同部位中白藜芦醇和虎杖苷积累的动态变化

实验监测了虎杖组培苗在不定芽增殖、快速生长及生根的不同发育阶段,其基部以及地上部分白藜芦醇和虎杖苷的动态积累情况。结果表明,处于增殖期培养时,地上部分的丛生芽中会积累较多的虎杖苷 (0.19%),而基部白藜芦醇含量较高 (0.079%)。幼苗快速生长时期,基部及幼苗中虎杖苷的含量会明显下降,白藜芦醇几乎检测不到。转入生根培养基后,不断萌生的白色幼根中虎杖苷的积累达到最高值 (0.56%),而此时幼苗中虎杖苷及白藜芦醇的含量接近于丛生芽的水平。

2.4 不同虎杖愈伤组织中白藜芦醇及虎杖苷含量的比较

来源于茎段的虎杖愈伤组织在不同的培养条件下会形成颜色、质地、生长速度以及有效成分含量等不同的培养物。实验发现,在无激素 SH 培养基 (SH_0) 上培养的愈伤组织极易褐化且生长缓慢,其中白藜芦醇的含量较高,但不利于虎杖苷的积累。采用一定含量的 TDZ ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理可有效刺激

愈伤组织的增殖生长及虎杖苷的合成,但在生长最快的粉红色愈伤组织中白藜芦醇和虎杖苷的含量均较低,见表2。不同颜色的愈伤组织按照白藜芦醇含量高低排序依次为:红褐色>浅褐色>浅粉色>绿色>灰白色>粉红色;按照虎杖苷含量高低排序为:绿色>浅粉色>灰白色>浅褐色>粉红色>红褐色,其中,较适宜用作建立细胞悬浮培养系的起始材料是浅粉色疏松愈伤组织。

表2 不同培养条件下虎杖愈伤组织中
白藜芦醇及虎杖苷含量的比较

培养基	培养条件	颜色	质地	生长速度	白藜芦醇 /%	虎杖苷 /%
SH ₀	光照	红褐色	硬实	最慢	0.039	0.012
	黑暗	浅褐色	疏松	慢	0.028	0.033
SH + TDZ _{0.05}	光照	粉红色	疏松	最快	0.002	0.023
		绿色	硬实	较快	0.012	0.111
	黑暗	浅粉色	疏松	快	0.019	0.110
		灰白色	疏松	快	0.006	0.087

2.5 虎杖毛状根、自然根及悬培细胞在生长速率及有效成分积累方面的比较

虎杖毛状根由于转入了发根农杆菌 Ri 质粒,因此具有不依赖激素的自主生长特性,在无激素 MS 液体培养基中连续黑暗振荡培养 30 d 后,始终保持较高的生长活力,其干重增长率为 8.29,分别是自然根和悬培细胞的 8.4 倍和 192.8 倍(图 2)。自然根和悬培细胞由于缺乏激素的维持,生长一段时间后逐渐褐化死亡。

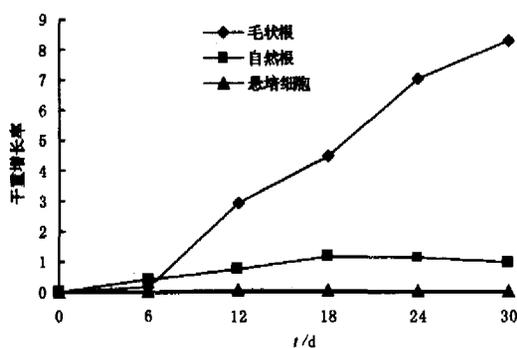


图2 虎杖毛状根、自然根及悬培细胞干
重增长率的比较

培养 30 d 后,虎杖毛状根、自然根及悬培细胞在白藜芦醇及虎杖苷的总积累量上差异不大,但是在醇和苷的组成比例上有较大的不同。在生长停滞、衰老褐化的自然根及悬培细胞中均含有较多的白藜芦醇(0.011%~0.017%),而在生长旺盛的毛

状根中白藜芦醇含量较低(0.007%),但虎杖苷的积累量却大幅提高,可达到 0.037%。

3 结论与讨论

3.1 本实验采用 RP-HPLC 首次对虎杖野生植株及其组织培养物中白藜芦醇和虎杖苷的含量进行了比较,并通过精密性、稳定性、重复性及加样回收率等实验,证明该检测方法准确可靠。

3.2 通过对索氏、回流及超声提取效率的比较,证明本实验采用的小体积 1 次超声提取的方法具有提取效率较高、杂质干扰少以及简便快速等优点,特别适于大批量生物样品的分析。

3.3 在虎杖愈伤组织、毛状根等培养物中检测到白藜芦醇和虎杖苷成分,说明其具有与原植物药相同的代谢能力。此外,与野生虎杖植株根部样品色谱图比较的结果表明,在这些培养物中还可能出现了新的化合物,对于这些新物质的化学结构及生物活性还有待进一步研究。

3.4 白藜芦醇和虎杖苷在植物的根及根茎部特异性合成,其存在状态和含量高低还与植物材料所处的发育时期、生理状况及生长速度等因素有关,在生长缓慢、褐化衰老的组织培养物中往往会积累较高含量的白藜芦醇,而在增殖旺盛的器官中虎杖苷的含量则较高。

3.5 利用组织培养手段获得的虎杖无菌组培苗虽然具有繁殖率高、生长速度快等优点,但由于生长环境相对单一而稳定,导致“逆境物质”白藜芦醇和虎杖苷合成能力下降。组培苗在室内经过一段时间的人工培养后,又能够迅速“恢复”其代谢能力,有效成分的含量接近甚至超过多年生野生植株的水平,这一现象为充分发挥组织培养技术在药用植物资源开发和研究中的优势作用开启了思路。

3.6 毛状根作为一种独特的转基因产物,具有其他组织培养物不可比拟的生长优势。虽然在其生长过程中积累的白藜芦醇和虎杖苷含量较低,但是通过定向诱导的代谢调控技术有望得到进一步的提高。

[参考文献]

- [1] Kimura Y, Okuda H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* roots prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularisation in Lewi lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr*, 2001, 131:1844.
- [2] Gusman J, Malonne H, Ghanem A. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, 2001, 22:1111.

- [3] Frankel E N, Bosanek C A, Meyer A S, et al. Commercial grape juices inhibit *in vitro* oxidation of human low-density-lipoproteins. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(3): 834.
- [4] 王征, 罗泽民, 邓林伟. 白藜芦醇的药理作用机理和合成途径. *天然产物研究与开发*, 2003, 15(2): 178.
- [5] 陈雷, 杨福全, 张天佑, 等. 虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇甙的高速逆流色谱分离提纯及其分析. *分析测试学报*, 2000, 19(4): 60.
- [6] 曹庸, 于华忠, 李国章, 等. 虎杖不同季节、不同组织部位白藜芦醇含量动态变化研究. *中国药理学杂志*, 2004, 39(5): 337.
- [7] 曹庸, 张敏, 于华忠, 等. 气象因子和矿质元素对虎杖根茎白藜芦醇含量的影响. *应用生态学报*, 2004, 15(7): 1143.
- [8] 俸灵林, 郑昕, 包文芳, 等. RP-HPLC法同时测定虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇苷的含量. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(6): 534.
- [9] 白杨, 潘隽丽, 苏薇薇. 白藜芦醇与白藜芦醇甙的研究进展. *中药材*, 2004, 27(1): 55.
- [10] 周建军, 张宏杰, 杨培君, 等. 汉中地区虎杖中白藜芦醇苷及苷元含量的测定. *中草药*, 2002, 33(5): 414.

Contents comparison of resveratrol and polydatin in the wild *Polygonum cuspidatum* plant and its tissue cultures

YU Shu-hong, ZHA Jian-peng, ZHAN Wen-hong, ZHANG Di-qun
(College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the contents of resveratrol and polydatin in some materials of *Polygonum cuspidatum* from various sources, so to screen and obtain the suitable cultures for the following metabolism regulation study. **Method:** RP-HPLC method was applied to simultaneously assay resveratrol and polydatin in different samples. **Result:** By the modified methods of extraction and determination, large amount of materials were screened. The results indicated that the contents of resveratrol and polydatin in root and rhizome were evidently higher than those in the leave and stems. The content of polydatin in the seedlings cultured indoor for three months was 1.27% and showed a 1.25-time increase than that in the wild plants, while the content of resveratrol (0.401%) approached that in the wild plants. Both of resveratrol and polydatin could be examined from different tissue cultures of *P. cuspidatum*, such as the sterile seedlings, callus, suspended cells and hairy roots, and the levels of them were closely related to the growth speed, physiological status and developmental phase. Hairy roots had the highest potentiality in several tested cultures and the increase rate of dry weight was 8.29 when cultured *in vitro* for 30 days, and showed a 8.4-fold and a 192.8-fold increase compared with those of natural roots and suspended cells, respectively. The content of polydatin in the hairy roots was up to 0.037% and that of resveratrol was 0.007%. **Conclusion:** The established analysis method is rapid, simple and accurate, especially adapted to the simultaneous determination of resveratrol and polydatin in massive biological samples. Hairy-root cultures have the superiority among the tested materials of *P. cuspidatum* and are suitable for the large-scale biomass and consistent production of efficient constituents.

[Key words] *Polygonum cuspidatum*; resveratrol; polydatin; RP-HPLC

[责任编辑 张宁宁]

封面图片简介

茄科植物莨菪 *Hyoscyamus niger* L.。一年或二年生草本,高可达1米,全体被有黏性腺毛和柔毛;基生叶常丛生成莲座状,茎生叶互生,基部半抱茎,叶片长圆形,边缘羽状深裂或浅裂;花单生叶腋,常于茎端密集,花冠漏斗状,黄绿色,具紫色脉纹,雄蕊5,不等长,花药深紫色;蒴果藏于宿萼内,卵球形,成熟时盖裂;种子细小,扁卵形或扁肾形,表面具细密隆起的网状纹理。花期6~7月,果期8~9月。莨菪常生于林边、田野、路旁等处,有少量栽培。主要分布于河北、河南、内蒙古及东北、西北诸省区。

莨菪种子入药为中药天仙子,始载于《神农本草经》,原名莨菪子,列入下品。李时珍释其名谓:“其子服之,令人狂狼放宕,故名”。天仙子味苦、辛,性温,有大毒。功能解痉止痛、安神定喘,用于胃痉挛疼痛、喘咳、癫狂。天仙子主要含莨菪碱和东莨菪碱,均系抗胆碱药。
(北京大学药学院 陈虎彪)