

菰蓝花期靛蓝、靛玉红和多糖分布规律研究

唐晓清, 王康才, 陈 暄

南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095

摘 要: 目的 考察菰蓝花期不同部位的靛蓝、靛玉红和多糖的积累分布情况。方法 采用 HPLC 法测定菰蓝花蕾期及盛花期 2 个阶段植株不同部位中靛蓝、靛玉红量, 并采用苯酚-硫酸法测定各部位的多糖量。结果 靛蓝、靛玉红在叶中分布较多, 根、茎、花中较少, 其中基部叶的量最高。花蕾期叶中靛蓝、靛玉红量均高于盛花期, 花中靛蓝、靛玉红量高于花蕾中的量。多糖在菰蓝全株均有分布, 花蕾期根中量最高, 盛花期地上部分的上端高于下端。结论 花期的菰蓝体内有靛蓝、靛玉红的分布, 且主要分布于叶片内, 花蕾期靛蓝、靛玉红总量高于盛花期的总量; 多糖在菰蓝中分布有一定的规律, 花蕾期根中多糖分布较多, 地上部分多糖量有增加趋势。

关键词: 菰蓝; 花期; 靛蓝; 靛玉红; 多糖

中图分类号: R282.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)07-1425-04

Distribution regulation of indigo, indirubin, and polysaccharides of *Isatis indigotica* at florescence

TANG Xiao-qing, WANG Kang-cai, CHEN Xuan

Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Key words: *Isatis indigotica* Fort.; florescence; indigo; indirubin; polysaccharides

菰蓝 *Isatis indigotica* Fort. 为十字花科两年生植物, 以其根入药为板蓝根, 叶入药为大青叶^[1], 为临床配方及制剂的大宗药材。菰蓝中含有生物碱类(如靛蓝、靛玉红)、有机酸类、氨基酸类、喹唑酮类、芥子苷类及腺苷、多糖等多种化合物^[2-3]。靛蓝、靛玉红具有保肝、抗菌等多种药理活性^[4], 而靛玉红还具有一定的抗肿瘤作用^[5]。板蓝根多糖具有免疫调节作用, 能促进 T 细胞、B 细胞、NK 细胞等免疫细胞的功能, 有调血脂作用^[6]。栽培菰蓝以根入药, 每年 11~12 月份采收, 以叶入药在种植当年采收 2~3 次, 留种的菰蓝则需越冬通过冬季的低温春化后结实。目前对菰蓝营养生长方面的研究报道较多^[7-10], 但对第 2 年花期植株有效成分的研究鲜有报道, 为此本研究针对花期(花蕾期和盛花期)菰蓝植株不同部位的靛蓝、靛玉红、多糖量及其在植株体内的积累及分布情况进行研究, 为生殖生长期菰蓝的生理代谢提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究在南京农业大学实验基地进行, 菰蓝种子经本所王康才教授鉴定为菰蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的种子。试验采用盆栽, 于 2009 年 5 月播种, 以复合有机肥作基肥, 于 2010 年 3 月 15 日和 4 月 1 日采集花蕾期和盛花期的菰蓝植株 20 株, 分为根部(根、芦头)、茎(下段、中段和上段)、叶(基生叶、下段茎生叶、中段茎生叶和上段茎生叶)与花(花蕾和花)4 个部分共 10 份样品, 将各单株的每一个部分分别混合, 置于烘箱(50 ℃)内烘干至质量恒定, 粉碎过 60 目备用。

1.2 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(UV/VIS 检测器 SPD-20A, N2000 色谱工作站), 靛蓝(批号 110716-200610)、靛玉红(批号 110717-200604)对照品由中国药品生物制品检定所提供。氯仿为分析纯, 甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

收稿日期: 2010-11-16

基金项目: 江苏省高技术项目(BG2005316)

作者简介: 唐晓清(1970—)女, 副教授, 博士, 主要研究方向为药用植物栽培与质量控制。Tel: 13912943846 E-mail: xqtang@njau.edu.cn

1.3 靛蓝、靛玉红的测定

1.3.1 色谱条件 色谱柱 VP-ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (75:25) 为流动相, 体积

流量 1.0 mL/min, 检测波长为 285 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL, 外标法计算。在该色谱条件下, 靛蓝、靛玉红的分离效果良好, 见图 1。

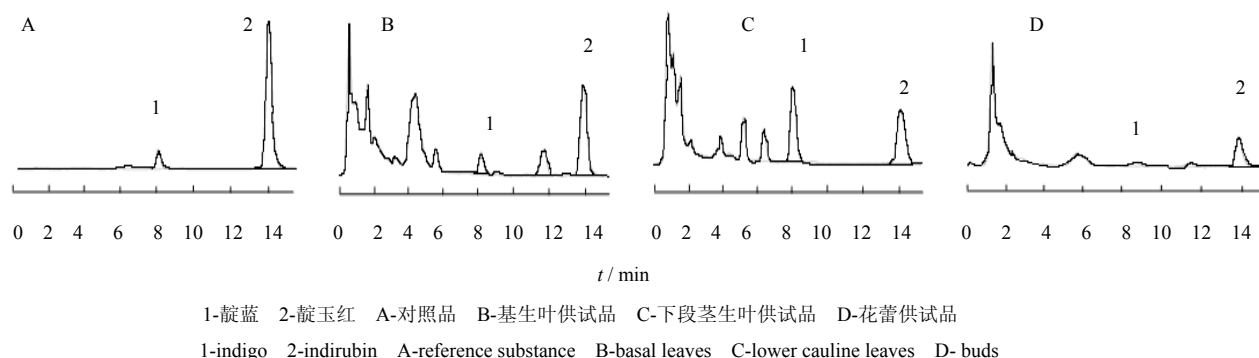


图1 靛蓝、靛玉红的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of indigo and indirubin

1.3.2 对照品溶液制备 精密称取靛蓝、靛玉红各 1.0 mg, 用甲醇溶解, 并稀释、定容至 50 mL 量瓶中。微孔滤膜滤过, 即得。

1.3.3 供试品溶液制备 精密称取不同部位的粉末各 0.25 g, 每个部位重复 5 次, 分别置于索氏提取器中, 加氯仿浸泡 15 h 后, 水浴加热回流至无色, 将提取液置旋转蒸发器中, 回收氯仿至干, 残留物用甲醇分次溶解并转移至 100 mL 量瓶中定容, 摇匀, 过微孔滤膜滤过, 即得。

1.3.4 线性关系考察 分别吸取 1、2、4、6、10、14、18 μL 靛蓝、靛玉红对照品溶液依次进样, 测定峰面积。以峰面积值为纵坐标, 以进样量为横坐标, 进行线性回归, 靛蓝的标准曲线: $Y=3 \times 10^{-6}X-0.0033$, $r=0.9997$ ($n=3$), 线性范围为 20~280 μg; 靛玉红标准曲线: $Y=3 \times 10^{-7}X-0.0028$, $r=0.9998$ ($n=3$), 线性范围为 40~200 μg。

1.3.5 精密度试验 精密吸取靛蓝和靛玉红标准溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 重复进样 5 次, 测得峰面积的 RSD 分别为 2.12%、1.04%。

1.3.6 重现性试验 取花蕾期的下段茎生叶粉末各 0.25 g, 按“1.3.3”项方法制备供试品溶液, 取 10 μL 注入液相色谱仪测定, 靛玉红峰面积的 RSD 为 2.68%, 靛蓝峰面积的 RSD 为 3.23%。

1.3.7 稳定性试验 取花蕾期基生叶供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 间隔 2 h 连续进样 6 次, RSD 为 2.4%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

1.3.8 加样回收率试验 精密称取靛蓝、靛玉红各 0.5 mg, 置于基生叶提取后的样品中, “1.3.3”项方

法制备供试品溶液进行测定, 计算回收率, 靛蓝的回收率为 97.23%, RSD 为 3.61% ($n=5$); 靛玉红的回收率为 102.54%, RSD 为 4.32% ($n=5$)。

1.3.9 样品测定 分别吸取各供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪测定。

1.4 多糖的测定

采用苯酚-硫酸法^[11]测定多糖量。以葡萄糖为对照品, 以峰面积值为纵坐标, 每次葡萄糖质量浓度为横坐标, 其回归方程为 $Y=0.0679X+0.0002$, $r=0.9993$ ($n=3$)。计算换算因子: $f=W/C \times D$, W 为实际多糖质量 (mg), C 为多糖水解后葡萄糖质量浓度 (mg/mL), D 为多糖的稀释倍数, 测得 $f=3.1951$ 。样品中多糖量则按回归方程求出葡萄糖质量浓度, 再按下式计算样品中多糖量: 多糖量 = $C \times D \times f/M$, C 为样品液中葡萄糖的质量浓度, D 为样品溶液的稀释倍数, M 为样品质量。

1.5 方差分析

所有数据分析均采用 DPS 软件进行, 方法采用 Duncan's 新复极差测验的多重比较。

2 结果与分析

2.1 菰蓝花期不同部位的靛蓝量分析

花期菰蓝不同部位的靛蓝分布有一定的规律, 花蕾期与盛花期靛蓝主要存在于叶片部分, 与其余部位靛蓝、靛玉红量间存在极显著差异 ($P<0.01$), 结果见表 1 和 2, 其中以下段茎生叶量较高, 分别为 7.72、2.57 mg/g; 不同叶片部位靛蓝量高低依次为: 下段茎生叶 > 中段茎生叶 > 基生茎生叶 > 上段茎生叶。盛花期叶片中的靛蓝量均低于花蕾期的

表 1 靛蓝、靛玉红与多糖量在菰蓝花蕾期不同部位中分布的显著性分析 (SSR 多重比较, $n=5$)
Table 1 Significant analysis on indigo, indirubin, and polysaccharide in bud stage of different parts of *I. indigotica* (SSR multiple comparison, $n=5$)

不同部位	靛蓝/(mg·g ⁻¹)	靛玉红/(mg·g ⁻¹)	多糖/%	不同部位	靛蓝/(mg·g ⁻¹)	靛玉红/(mg·g ⁻¹)	多糖/%
根	0.00 eD	0.00 dC	3.42 aA	基生叶	4.43 cC	0.66 bA	2.43 bABC
芦头	0.36 eD	0.01 dC	1.14 dE	下段茎生叶	7.72 aA	0.96 aA	1.07 dE
下段茎	0.04 eD	0.00 dC	1.02 dE	中段茎生叶	5.89 bB	0.69 bA	1.59 cdCDE
中段茎	0.00 eD	0.00 dC	1.23 dDE	上段茎生叶	3.61 dC	0.37 cB	2.22 bcBCD
上段茎	0.13 eD	0.00 dC	2.72 abAB	花蕾	0.34 eD	0.00 dC	2.43 bABC

不同字母表示差异分别达 0.05 和 0.01 显著水平
Different letters indicate 0.05 and 0.01 significance levels, respectively

表 2 靛蓝、靛玉红与多糖量在菰蓝盛花期不同部位中分布的显著性分析 (SSR 多重比较) ($n=5$)
Table 2 Significant analysis on indigo, indirubin, and polysaccharide in flowering stage of different parts of *I. indigotica* (SSR multiple comparison, $n=5$)

不同部位	靛蓝/(mg·g ⁻¹)	靛玉红/(mg·g ⁻¹)	多糖/%	不同部位	靛蓝/(mg·g ⁻¹)	靛玉红/(mg·g ⁻¹)	多糖/%
根	0.00 eE	0.00 dD	1.24 cdeBC	基生叶	1.48 cC	0.22 bB	1.51 bcAB
芦头	0.12 fF	0.00 dD	1.84 aA	下段茎生叶	2.57 aA	0.32 aA	1.09 efBC
下段茎	0.01 fF	0.00 dD	0.89 fC	中段茎生叶	1.96 bB	0.23 bB	1.45 bcAB
中段茎	0.00 fF	0.00 dD	1.14 defBC	上段茎生叶	1.20 dD	0.12 cC	1.73 abA
上段茎	0.04 fEF	0.00 dD	1.74 abA	花	0.12 eE	0.01 dD	1.41 cdAB

不同字母表示差异分别达 0.05 和 0.01 显著水平
Different letters indicate 0.05 and 0.01 significance levels, respectively

量, 两个时期的不同部位的叶片靛蓝量间存在显著差异 ($P<0.05$)。芦头、下段茎、上段茎和花蕾中的量较低, 根与中段茎则未检出靛蓝。

2.2 菰蓝花期不同部位的靛玉红量分析

花期菰蓝不同部位的靛玉红分布也存在一定的规律, 花蕾期与盛花期靛玉红主要存在于叶片部分, 与其余部位靛玉红量间存在极显著差异 ($P<0.01$), 结果见表 1 和 2, 其中以下段茎生叶的量较高, 分别为 0.96、0.32 mg/g; 不同叶片部位靛玉红量高低依次为: 下段茎生叶>中段茎生叶>基生茎生叶>上段茎生叶。盛花期叶片中的靛玉红量均显著低于花蕾期的量 ($P<0.05$)。花蕾期的根、下段茎、中段茎、上段茎和花蕾中未检出靛玉红。花蕾期芦头中检出极微量的靛玉红, 但盛花期的芦头中未检出靛玉红, 盛花期花中检出极微量靛玉红。

2.3 菰蓝花期不同部位的多糖量分析

花期菰蓝不同部位的多糖分布存在较大的差异 (表 1、2), 花蕾期以上段茎中的量较高, 与基生叶、花蕾间存在显著差异 ($P<0.05$), 与其余各部位间存在极显著差异 ($P<0.01$)。多糖量由高到低的顺序为: 根>上段茎>花蕾>基生叶>上

段茎生叶>中段茎生叶>中段茎>芦头>下段茎生叶>下段茎。盛花期各部位的多糖量均有所下降, 以芦头、上段茎、上段茎生叶中的多糖量较高, 与基生叶、中段茎生叶、花的多糖存在显著差异 ($P<0.05$), 与根、中段茎、下段茎生叶和下段茎的多糖量间存在极显著差异 ($P<0.01$) (表 2), 多糖量高低依次为: 芦头>上段茎>上段茎生叶>基生叶>中段茎生叶>花>根>中段茎>下段茎生叶>下段茎。

两个时期比较盛花期根部的多糖量显著下降, 但是芦头的多糖增加; 茎部分的多糖量变化为: 下段茎与中段茎的量差异不显著 ($P>0.05$), 但上段茎的多糖量以盛花期更低; 叶片部分多糖量的变化较小, 下段茎生叶、中段茎生叶和上段茎生叶的多糖量间无显著差异 ($P>0.05$), 盛花期基生叶的多糖量显著低于花蕾期的基生叶; 盛花期的花中多糖量显著低于花蕾期花中多糖量。

3 讨论

3.1 靛蓝、靛玉红分布规律与代谢研究

菰蓝通过低温春化后, 其营养供给和生长中心发生改变, 代谢活动加强, 表现出靛蓝、靛玉红等

有效成分高峰期出现在营养生长高峰期之后^[12]。靛蓝的生成是色氨酸水解酶和萘双加氧酶共同作用的结果^[13],吴芸等^[14]证实萘双加氧酶是一种诱导酶(可能被萘酚或水杨酸诱导)。在嫩叶中植株通过糖基化产生糖苷或外加5-酮葡萄糖酸产生大青素C来保护双氧羟基吲哚,糖苷是在液泡中由UDP-葡萄糖和羟基吲哚合成而来,当叶片衰老或受损伤时,前体被水解酶打断,从大青素B和糖苷释放出羟基吲哚,并自发地被空气氧化为靛蓝。吲哚醌是羟基吲哚或双氧羟基吲哚在氧气充足条件下的一个副产物,其中双氧羟基吲哚来自大青素C,羟基吲哚和吲哚醌缩合形成靛玉红^[13-15]。由靛蓝、靛玉红的生物合成途径可知,大青叶中的靛蓝、靛玉红量与叶片的生长时期关系极为密切,即在叶片生长至即将衰老时是两种成分合成积累的高峰期。本实验研究也可以看出靛蓝、靛玉红主要在植株下部的叶中积累,主要是因为下部叶为老叶即将衰老,两种成分积累多,而上部叶为新叶处于营养生长旺盛期,积累少。而开花后靛蓝、靛玉红量少于花蕾期的量,表明盛花期大量代谢产物被消耗,后期合成靛蓝、靛玉红的底物量可能降低,故靛蓝、靛玉红在盛花期量少于花蕾期。

3.2 多糖分布规律与代谢研究

多糖按在生物体内的作用分两类,一类为水不溶多糖,主要形成动植物支持组织,例如甲壳素、纤维素、果胶等。另一类为动植物的贮藏养料,例如肝糖原、淀粉、菊糖等。菰蓝由营养生长转为生殖生长需消耗大量营养物质,植株中部分多糖被分解利用。而本实验结果也显示菰蓝地上部分的上段部分中多糖量多于下段部分,同时花蕾期和盛花期比较,前期整株量多于后期,而且花蕾期根中多糖分布高于其他部位,开花后根中量降低,根茎量升高,表现出根部积累的糖分等物质有向地上部转移的趋势。由此推测可能是由于花蕾期为满足植物生殖生长对营养物质的需要,多糖等营养成分向植株上部转移。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 张磊,许铁峰,谭秋敏,等.四倍体菰蓝转抗虫基因研究 I.根瘤农杆菌介导的转基因菰蓝[J].中草药,2003,34(3):258-261.
- [3] 肖珊珊,金郁,孙毓庆.板蓝根化学成分、药理及质量控制研究进展[J].沈阳药科大学学报,2003,20(6):455.
- [4] Fang J G, Liu Y H, Wang W Q, *et al.* The anti-endo-toxic effect of o-aminobenzoic acid from *Radix Isatidis* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(5): 593-597.
- [5] Barbara C S, Mirza M H, Barbara H K, *et al.* Transient induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 human breast cancer cells by indirubin [J]. *Biochem Pharm*, 2003, 66: 2313.
- [6] 夏新中,肖静,石国芳,等.板蓝根多糖对宿主抵抗鼠伤寒沙门菌感染能力的影响[J].武汉大学学报:医学版,2007,28(3):348-350.
- [7] 叶青,梁宗锁,董娟娥.不同播期菰蓝的生长及结籽差异性研究[J].中草药,2006,37(6):1089.
- [8] 陈怡平.微波辐射对菰蓝种子生理及幼苗发育的影响[J].中草药,2005,36(6):915-917.
- [9] 李博华,张汉明,丁如贤,等.四倍体菰蓝毛状根培养系统的建立及外界因子对其生长的影响[J].中草药,2000,31(2):132-134.
- [10] 王文颇,朱小平,李彦生,等.菰蓝营养生长期干物质积累与氮、磷、钾吸收动态的研究[J].中国中药杂志,2005,30(15):1195.
- [11] 唐晓清,王康才,陈暄,等.不同产地来源菰蓝根生物量、蛋白与多糖含量比较[J].江苏农业学报,2007(3):224.
- [12] 龚明贵.菰蓝有效成分合成积累动态与含量差异性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [13] Ensley B D, Ratzkin B J, Osslund T D, *et al.* Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* result in the biosynthesis of indigo [J]. *Science*, 1983, 222: 167.
- [14] 吴芸,张素琴,马国华,等.萘质粒转移到大肠杆菌中合成靛蓝的研究[J].遗传学报,1989,16(4):318.
- [15] Thierry M, Estelle E, Patrick C, *et al.* Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad) [J]. *Photosynthesis*, 2001, 58: 897.