

脱毒怀地黄块茎梓醇及营养成分的分析

张楠¹, 张晓丽^{1,2}, 曹香林¹, 李萍¹, 李明军^{1,2*}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要:目的 对怀地黄脱毒后品质进行评价。方法 以怀地黄“85-5”脱毒试管苗和未脱毒试管苗的块茎为材料, 对其梓醇及营养成分的量进行分析。结果 脱毒试管苗块茎的梓醇量高于未脱毒试管苗块茎, 但不同的脱毒株系间梓醇量存在较大差异, 其中梓醇量最高的株系可达 6.43%, 较对照增加 33.13%; 脱毒试管苗块茎中, 粗脂肪、粗蛋白质的量均得到提高。结论 怀地黄脱毒后品质得到显著改善。

关键词:怀地黄; 脱毒苗; 块茎; 梓醇; 营养成分

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)08-1311-03

怀地黄 *Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis* (Chao et Schih) Hsiao 为玄参科植物怀地黄的根茎, 是我国出口的大宗药材之一, 在药材上可分为鲜地黄、生地黄和熟地黄 3 种。鲜生地味甘, 性寒, 能清热、凉血、生津; 生地味甘、微苦, 性寒, 能滋阴清热、凉血、止血; 熟地黄味甘, 性微温, 能滋阴补肾, 补血调经^[1]。怀地黄不仅药用价值很高, 而且广泛用于食疗、食补, 如怀地黄泡菜、怀地黄脯、怀地黄酒等加工产品已投放市场, 并收到了很好的效果^[2]。但由于怀地黄在生产中长期采用营养繁殖, 病毒感染严重, 导致其品质和产量下降, 从而造成品种退化^[3]。脱毒快繁技术能显著改善中药材品种农艺性状, 提高中药材产量和质量^[4]。近年来, 本实验室对怀地黄的脱毒快繁及产业化技术进行了系统的研究^[5,6], 使怀地黄产量得到大大提高。对于地黄的品质, 一直以来都用梓醇作为评价指标, 而关于怀地黄脱毒后品质的评价, 目前尚未见报道。本实验对同一栽培环境下脱毒和未脱毒怀地黄梓醇及其营养成分的量进行了测定和比较, 旨在筛选出高产优质的脱毒株系, 为脱毒怀地黄的进一步推广应用提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料: 实验材料为怀地黄优良品种“85-5”, 经温县农科所王天亮高级农艺师鉴定。

以大田“85-5”为对照, 脱毒株系为河南师范大学“四大怀药”组织培养研究室育出的脱毒试管苗(经分子检测确定已脱除 TMV 病毒), 未脱毒材料

为实验室继代培养的“85-5”试管苗。所有材料均种植在河南省武陟县阳光农业园区, 统一管理, 同时采收。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备: 鲜地黄采挖后, 洗净泥土, 切成薄片, 置 60℃ 烘箱中干燥 48 h, 粉碎后过 40 目筛。

1.2.2 仪器与试剂: SSIPC2000 型高效液相色谱仪, 梓醇对照品购自河南省食品药品检验所, 乙腈、磷酸、甲醇均为色谱纯。

1.2.3 色谱条件: 色谱柱为 C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1 磷酸溶液 (1:99), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温 25℃, 进样量 10 μL。在此条件下, 各样品中梓醇与其他峰均能达到基线分离, 且色谱图一致, 只是梓醇峰大小不同, 对照品及样品(脱毒地黄块茎)的色谱图见图 1。

1.2.4 对照品溶液的制备: 精密称取梓醇对照品 4.65 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液备用。

1.2.5 供试品溶液的制备: 精密称定样品 0.4 g, 置锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流提取 1.5 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 浓缩至近干, 残渣用流动相溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 并用流动相稀释至刻度, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得^[7]。

1.2.6 标准曲线的绘制: 精密吸取上述对照品溶液

* 收稿日期: 2008-10-19

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (0423032100, 0623030700); 河南省基础与前沿技术研究 (082300430180); 河南师范大学应用科学与技术研究基金 (2005 Y04)

作者简介: 张楠 (1983—), 女, 河南安阳人, 硕士。E-mail: zhangnanyang@163.com

*通讯作者 李明军 Tel: (0373) 3328189 E-mail: limingjun2002@263.net

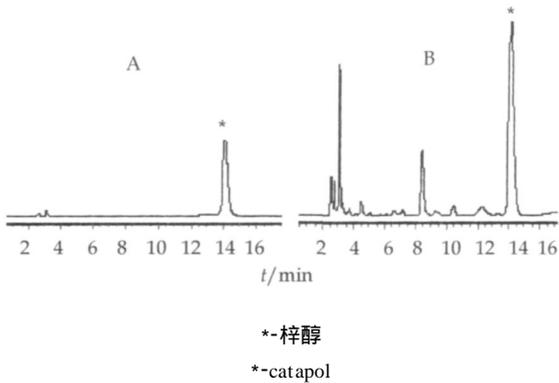


图 1 怀地黄梓醇对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of catapol reference

substance (A) and sample (B) in *R. glutinosa*

0. 1、0. 2、0. 4、0. 6、0. 8、1、2 mL 置 2 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。将梓醇质量浓度分别为 0. 046 5、0. 093、0. 186、0. 279、0. 372、0. 465、0. 930 mg/mL 的对照品溶液,分别精密注入 10 μ L 进行测定,以质量浓度 (X) 对峰面积值 (Y) 做回归计算,回归方程: $Y = 3 \times 10^6 X + 22\ 690$, $r = 0. 999\ 5$,线性范围 0. 465 ~ 9. 3 μ g。

1. 2. 7 精密度试验:取同一对照品溶液,连续进样 5 次,每次 10 μ L,测定梓醇峰面积,结果 RSD 为 0. 73%,表明精密度良好。

1. 2. 8 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10 h 精密吸取 10 μ L 进样,测定梓醇峰面积,结果 RSD 为 0. 47%,表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

1. 2. 9 重现性试验:取同一样品 5 份,制备供试品溶液,进样测定,计算梓醇质量分数,结果其 RSD 为 2. 70%,表明样品重现性良好。

1. 2. 10 回收率试验:精密称取已测定梓醇量的样品 0. 18 g,梓醇标准品 0. 18 mg,置同一锥形瓶中,按供试品溶液制备方法制备、测定,平行实验 5 次,结果平均回收率为 102. 70%,RSD 为 1. 11%。

1. 2. 11 样品测定:分别精密吸取供试品溶液 10 μ L,进样,根据峰面积计算梓醇的量。

1. 3 营养成分量的测定^[8]:每个样品平行称取 3 份,每份 1 g,准确至 0. 000 2 g,重复 3 次测定,取平均值。

粗脂肪的测定:索氏浸提法。

粗蛋白质的测定:凯氏定氮法。

粗灰分的测定:干灰化法。

钙的测定:高锰酸钾标准溶液滴定法。

总磷量的测定:钼蓝法。

1. 4 数据处理:试验数据用 Excel 和 SPSS 统计软

件进行计算和分析,以(平均值 \pm 标准差)表示,并对平均数用邓肯氏新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2. 1 梓醇量的测定:对所有样品梓醇的量进行了测定,结果见表 1。

表 1 样品梓醇量测定结果(按干燥品计算)(n=2)

Table 1 Determination of catapol in samples (calculated by dried samples) (n=2)

块茎类别	株系编号	梓醇/ %	增加幅度/ %
普通试管苗块茎	a	4. 92	1. 86
大田种植苗块茎	CK	4. 83	-
脱毒试管苗块茎	A1	6. 43	33. 13
	A2	5. 57	15. 32
	A3	5. 58	15. 53
	A4	5. 64	16. 77
	A5	5. 50	13. 87
	A6	5. 22	8. 07

增加幅度 = (株系量 - CK 量) / CK 量

Increase rate = (content of plantlet - content of CK) / content of CK

由表 1 可以看出,6 个脱毒株系块茎梓醇的量均高于对照,但增加幅度不同,其中 A1 量最高,增加幅度可达 33. 13%,A4 次之。未脱毒株系块茎梓醇量也高于对照,但增加幅度较小,仅为 1. 86%。因此,梓醇量为脱毒试管苗块茎 > 普通试管苗块茎 > 大田种植苗块茎。

2. 2 营养成分量的测定:对所有样品营养成分的量进行了测定,结果见表 2、3。由表 2 可以看出,粗脂肪的量以 A2、A5 最高,但除对照与其有显著性差异外,其他均与其无显著性差异,整体来看,脱毒试管苗和普通试管苗块茎粗脂肪的量均高于对照,但两者间无显著性差异。

表 2 样品粗脂肪、粗蛋白质、粗灰分量测定结果

Table 2 Determination of crude fat, crude protein, and crude ash of samples

块茎类别	株系编号	粗脂肪/ %	粗蛋白质/ %	粗灰分/ %
普通试管苗块茎	a	0. 821 \pm 0. 081 AB	6. 766 \pm 0. 316 C	3. 806 \pm 0. 184 B
大田种植苗块茎	CK	0. 624 \pm 0. 052 B	5. 034 \pm 0. 122 E	3. 789 \pm 0. 114 B
脱毒试管苗块茎	A1	0. 812 \pm 0. 065 AB	7. 313 \pm 0. 048 B	4. 369 \pm 0. 033 A
	A2	0. 956 \pm 0. 069 A	6. 784 \pm 0. 170 C	4. 347 \pm 0. 142 A
	A3	0. 823 \pm 0. 086 AB	8. 899 \pm 0. 134 A	4. 189 \pm 0. 010 A
	A4	0. 806 \pm 0. 128 AB	6. 128 \pm 0. 170 D	2. 340 \pm 0. 020 D
	A5	0. 909 \pm 0. 072 A	7. 113 \pm 0. 061 BC	2. 886 \pm 0. 022 C
	A6	0. 768 \pm 0. 067 AB	7. 405 \pm 0. 073 B	3. 603 \pm 0. 085 B

同列内相同字母表示经邓肯氏新复极差法检验在 $P = 0. 01$ 水平上差异不显著(表 3 同)

Means within columns followed by same letter are not significantly different at $P = 0. 01$ level by Duncan's new multiple test, Table 3 is same

表3 样品钙、磷测定结果

Table 3 Determination of Ca and P in samples

块茎类别	株系编号	钙/ %	磷/ %	钙/磷
普通试管苗块茎	a	0.691 ± 0.048 AB	0.142 ± 0.010 E	4.915 ± 0.701 ABC
大田种植苗块茎	CK	0.614 ± 0.044 BC	0.177 ± 0.001 BC	3.461 ± 0.230 CD
脱毒试管苗块茎	A1	0.719 ± 0.053 AB	0.204 ± 0.001 A	3.523 ± 0.283 CD
	A2	0.500 ± 0.040 C	0.163 ± 0.003 CD	3.068 ± 0.225 D
	A3	0.820 ± 0.073 A	0.161 ± 0.002 D	5.104 ± 0.512 AB
	A4	0.754 ± 0.033 AB	0.157 ± 0.003 D	4.791 ± 0.259 ABC
	A5	0.721 ± 0.055 AB	0.185 ± 0.007 B	3.920 ± 0.446 BCD
	A6	0.768 ± 0.075 AB	0.127 ± 0.001 F	6.039 ± 0.571 A

粗蛋白质的量各样品间差异较大, A3 量最高(8.899%), 与其他处理均达到极显著差异; 对照最低, 仅为 5.034%。整体来看, 脱毒试管苗和普通试管苗粗蛋白质的量均高于对照, 达到极显著性差异。

粗灰分的量各样品间差异也较为明显, A1 的量最高, 但与 A2、A3 无显著差异; A4 的量最低, 与其他处理均达到极显著性差异。整体来看, 只有 A4、A5 低于对照, 其他均高于对照或与对照差异不显著。

由表 3 可以看出, 钙的量各样品间差别不大, A3 的量最高达 0.82%, 与 A1、A4、A5、A6、a 均无显著差异; A2 的量最低。整体来看, 只有 A2 低于对照, 其他高于对照与对照差异不显著。

磷的量各样品间差别较大, A1 的量最高, 其次为 A5; A6 的量最低, 与其他处理均达到极显著性差异。整体来看, 脱毒试管苗和普通试管苗块茎磷的量与对照相比无明显规律。

钙磷比各样品间差别较大(3.068~6.039), 表明地黄中钙多磷少。

综合以上分析, 脱毒试管苗块茎中, 粗脂肪、粗蛋白质的量都得到了不同程度的提高, 大部分脱毒株系的钙的量也得到提高, 粗灰分和磷量没有得到明显提高。

3 讨论

病毒感染是植物中较普遍的一类病害, 尤其是以无性繁殖的中药材, 由于病毒的积累, 引起品种退化, 严重影响中药材产量与质量。因此, 消除和控制病毒感染, 是提高中药材产量和质量的一项重要措施^[4]。脱毒技术即是通过茎尖培养、热处理等方式

脱除病毒, 从而获得无毒种苗的一种有效方法, 该技术已广泛应用于农业生产。脱毒苗田间种植后, 性状表现良好, 产量得到提高, 这在人参果^[9]、马铃薯^[10]和草莓^[11]等植物上已经得到证实。近年来, 本实验室将脱毒怀地黄种苗应用于大田生产, 也发现其产量大幅度提高(另文发表), 同时作者又对其品质进行了研究。

梓醇为地黄的主要有效成分, 是环烯醚萜单糖苷, 具有降血糖、利尿和缓泻作用^[12], 是目前《中国药典》中对地黄成分唯一有明确规定的物质。关于地黄中梓醇量的测定已有报道^[13], 但对怀地黄脱毒后梓醇及其营养成分的变化尚未报道。本研究发现, 脱毒块茎中梓醇的量较对照有较大的提高, 但不同的脱毒株系间增加幅度不同, 还发现脱毒块茎中粗脂肪、粗蛋白质的量也得到了不同程度的提高, 这些均表明脱毒后怀地黄的品质得到了一定程度的改善, 这一结果为脱毒怀地黄的推广应用和进一步的开发利用提供了重要的参考依据。

参考文献:

- [1] 马汴梁, 何银堂, 程正祥. 四大怀药养生与临证妙用 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2003.
- [2] 焦作市科学技术局. 四大怀药 [M]. 郑州: 中原农民出版社, 2004.
- [3] 陈德思, 刘田才, 吴爱吕, 等. 地黄病毒病及对退化影响 [J]. 中草药, 1985, 16(19): 28-31.
- [4] 帅光仕. 脱毒快繁技术与中药材生产 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(12): 882-883.
- [5] 李明军, 杜琳, 张晓丽, 等. 怀地黄脱毒培养及快速繁殖 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(增刊): 131-134.
- [6] 李明军, 张晓丽, 杜琳, 等. 怀地黄试管苗脱毒技术研究 [J]. 河南师范大学学报, 2008, 36(2): 103-106.
- [7] 中国药典 [S]. 一部, 2005.
- [8] 刘福岭, 戴行钧. 食品物理与化学分析方法 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1987.
- [9] 翟进升, 邹爱兰, 吕献锦, 等. 人参果脱毒苗增产效果研究 [J]. 安徽农业科学, 2004, 32(3): 491-495.
- [10] 李军. 马铃薯种质资源脱毒后特性鉴定及亲本利用评价 [J]. 中国马铃薯, 2007, 21(5): 261-265.
- [11] 高山林, 梁静. 草莓脱毒苗田间栽培试验 [J]. 中国南方果树, 2003, 32(3): 53-54.
- [12] 王太霞, 李景原, 胡正海. 地黄的形态结构与化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 585-587.
- [13] 李更生, 刘长河, 王惠森. 不同产地的地黄中梓醇含量比较 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 126-128.