

盐胁迫对甘草不同组分的影响

万春阳¹, 王 丹¹, 侯俊玲^{1*}, 王文全^{1,2}, 陈惠杰¹, 刘凤波¹

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102

摘要: **目的** 通过分析不同浓度盐胁迫下甘草酸积累量和总糖、粗蛋白、粗纤维、粗脂肪及灰分量的变化以及它们的相关性, 研究盐胁迫对甘草酸积累的影响。 **方法** 采用不同质量浓度 (3、6、9 mg/mL) NaCl 溶液处理一年生盆栽甘草, 分别于 35、70、105 d 取样, 测定甘草酸量, 总糖、粗蛋白、粗纤维、粗脂肪及灰分 5 种组分的量, 分析盐胁迫对各组分比例关系的影响及甘草酸量与各组分量的相关性。 **结果** 盐胁迫 70 d 时, 6、9 mg/mL 盐溶液处理组的甘草酸量显著高于对照 (CK); 6、9 mg/mL 处理组的粗蛋白显著高于 CK, 而 9 mg/mL 处理组的总糖显著低于 CK。盐胁迫 105 d 时, 9 mg/mL 处理组的粗脂肪显著高于 CK; 盐胁迫 70 d 和 105 d 时, 9 mg/mL 处理组的粗脂肪比例显著高于 CK, 但总糖比例明显低于 CK; 盐胁迫 70 d 和 105 d 时, 甘草酸量与粗脂肪、灰分量呈正相关, 与总糖量呈负相关。 **结论** 甘草酸的积累与粗蛋白、总糖量、粗脂肪、灰分量的分配密切相关, 适当的盐胁迫可以刺激甘草内的糖代谢, 加速物质的分解, 促进甘草的次生代谢, 使甘草酸形成并积累。

关键词: 甘草; 盐胁迫; 甘草酸; 总糖; 粗蛋白; 粗纤维; 粗脂肪; 灰分

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2312-05

Effect of salt stress on different components of *Glycyrrhiza uralensis*

WAN Chun-yang¹, WANG Dan¹, HOU Jun-ling¹, WANG Wen-quan^{1,2}, CHEN Hui-jie¹, LIU Feng-bo¹

1. College of Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Engineering Research Center of Good Agricultural Practice for Chinese Crude Drugs, Ministry of Education, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To investigate the effect of salt stress at different concentrations on the accumulative contents of glycyrrhizic acid and five components and their correlations. **Methods** Annual *Glycyrrhiza uralensis* cultivated in the plastic flowerpot was treated with salt at different concentrations (3, 6, and 9 mg/mL). The contents of glycyrrhizic acid, total sugar, crude protein, crude fiber, crude fat and ash were determined after 35, 70, and 105 d treatment. The proportional relationships of five components and the correlation of glycyrrhizic acid and five components were analyzed. **Results** On 70 d after the treatment of 6 and 9 mg/mL salt solution, the glycyrrhizic acid content was extremely higher than that in control group. Crude protein in the treatment groups of 6 and 9 mg/mL salt solution increased significantly compared with that in control group. While total sugar content decreased significantly compared with that in control group. On 105 d, crude fat content in the treatment group of 9 mg/mL salt solution was extremely higher than that in control group. And on 70 and 105 d, the crude fat proportion in the treatment group of 9 mg/mL salt solution was extremely higher than that in control group, while the total sugar proportion was extremely lower than that in control group. The correlation analysis showed that glycyrrhizic acid content had a positive correlation with the content of crude fat and ash, while had a negative correlation with total sugar on 70 and 105 d. **Conclusion** The accumulation of glycyrrhizic acid is closely related to proportion of crude protein, total sugar, crude fat and ash content. The proper salt stress could stimulate sugar metabolisms and accelerate the decomposition of the substance. All of these could promote the secondary metabolism and make the formation and accumulation of glycyrrhizic acid.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; salt stress; glycyrrhizic acid; total sugar; crude protein; crude fiber; crude fat; ash

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 有补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛, 调和诸药的功效^[1], 具有抗炎、抗病毒、增强免疫力、抗血栓等药理活

性^[2-5], 除作为传统药材和现代医药原料外, 甘草还被广泛地应用于食品、烟草、化妆品等领域^[6-7]。这导致甘草野生资源在近 50 年来面积大幅度减

收稿日期: 2011-03-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572328)

作者简介: 万春阳 (1985—), 女, 在读硕士生, 主要从事药材质量形成机制研究。Tel: 13488676268 E-mail: wanchunyang0808@sina.com

*通讯作者 侯俊玲 E-mail: mshjl@126.com

少^[8-11],人工甘草将成为野生甘草的重要替代资源。而甘草酸(glycyrrhizic acid, GA)是评价甘草药材质量优劣的特征性有效成分^[12]。如何使栽培甘草甘草酸量高而稳,是亟待解决的问题。而甘草主要分布于我国三北干旱的盐碱地区,已有研究表明适度的盐胁迫有利于甘草酸的积累^[13-14]。

本实验研究不同盐胁迫条件对甘草酸量以及药材各组分量的影响,并分析盐胁迫下甘草酸积累与各组分分配的关系,从物质粗分角度,探讨盐胁迫对甘草酸积累的作用机制,为甘草规范化生产的盐分调控技术研究提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品采购于内蒙古赤峰市一年生甘草苗,经北京中医药大学王文全教授鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.。

甘草酸单铵盐购自中国药品生物制品检定所,批号为110731,乙腈为色谱纯,磷酸为色谱纯,水为屈臣氏纯净水。

1.2 仪器

Waters 2489 型高效液相色谱仪(新加坡);BP211D 型电子分析天平(Metfller-Toledo Co.,瑞士);KQ500DE 型数控超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);Unico UV—2100 紫外分光光度计(龙尼柯(上海)仪器有限公司);DZKW—C 电子恒温水浴锅。

2 方法

2.1 盐胁迫试验

实验在北京中医药大学校药用植物园中进行,采用蛭石培养法,将生长状况一致的一年生甘草苗根修剪为20 cm,移栽于盛有蛭石细沙混合培养基质的花盆内,每盆培养24株甘草苗。每7天浇灌1次pH为7.0的Hoagland营养液。

待植株生长正常时进行盐胁迫试验,分别用CK及3、6、9 mg/mL NaCl溶液处理,4次重复,每7天添加1次处理液,分别于处理35、70、105 d取样,进行各项指标测定。

2.2 甘草酸的测定

2.2.1 色谱条件^[1] 色谱柱-Dikma Diamonsil OR-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,0~8 min, 19% A; 8~35 min, 50% A; 35~36 min, 100% A。柱温25℃,检测波长237 nm,体积流量1.0 mL/min,

理论塔板数按甘草酸峰计算不低于5 000。该条件下甘草酸单铵盐对照品和甘草样品色谱图见图1。

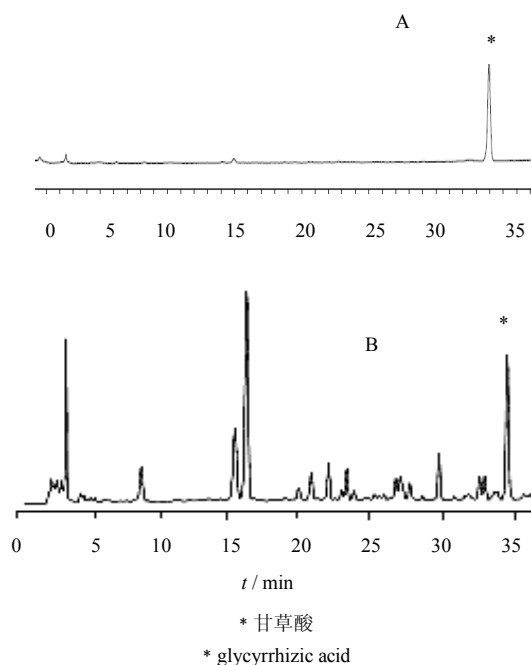


图1 甘草酸单铵盐对照品(A)和甘草样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of glycyrrhizic acid reference substance (A) and *G. uralensis* sample (B)

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定甘草酸单铵盐对照品适量,置于25 mL量瓶中,70%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得0.180 mg/mL对照品溶液,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称定过40目筛的甘草粉末0.100 0 g,于具塞三角瓶中,加入70%乙醇10 mL,闭塞,称其质量,超声提取30 min,放冷,再称质量,用70%乙醇补足损失质量,摇匀,滤过,收集续滤液,过微孔滤膜,得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取甘草酸对照品溶液1、5、7、10、15、20 μL,注入液相色谱仪,测定色谱峰峰面积。以对照品的量(μg)为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,计算回归方程为 $Y=7\,312.79X+59\,888$ ($r=0.998\,2$),线性范围在0.18~3.60 μg。

2.2.5 精密度试验 精密量取盐胁迫试验中处理35 d的9 mg/mL的甘草样品0.1 g,按“2.2.3”项方法制备,分别吸取20 μL,连续进样6次,计算得甘草酸色谱峰面积的RSD为0.341%。

2.2.6 稳定性试验 精密量取盐胁迫试验中9 mg/mL NaCl溶液处理35 d甘草样品0.1 g,按“2.2.3”项方法制备,分别吸取20 μL,分别在0、4、8、12、24、

48 h 时进样, 测定峰面积, 计算 RSD 为 0.325%。

2.2.7 重现性试验 精密量取盐胁迫试验中 9 mg/mL NaCl 溶液处理 35 d 的甘草样品 0.1 g, 按照“2.2.3”项方法制备 5 份, 按“2.2.1”项色谱条件测定, 计算甘草酸质量分数的 RSD 为 0.306%。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取 0.05 g 过 40 目筛的甘草粉末样品, 已知所含甘草酸量, 精密添加同量 0.54 mg 的甘草酸单铵盐对照品按“2.2.3”项方法制备, 按“2.2.1”项色谱条件测定, 计算得加样回收率为 98.60%, RSD 为 2.034%。

2.2.9 样品测定 精密称取过 40 目的甘草粉末样品 0.100 g, 按“2.2.3”项方法制备供试液, 按“2.2.1”项色谱条件, 进样量 20 μ L, 进行测定。

2.3 总糖、粗蛋白、粗纤维、粗脂肪及灰分的测定

总糖量测定采用 3, 5-二硝基水杨酸比色法^[15], 粗蛋白量测定采用凯氏定氮法^[16], 粗纤维量测定采用酸碱洗涤称重法^[16], 粗脂肪量测定采用索氏抽提法^[17], 灰分测定采用高温灼烧法^[15]。

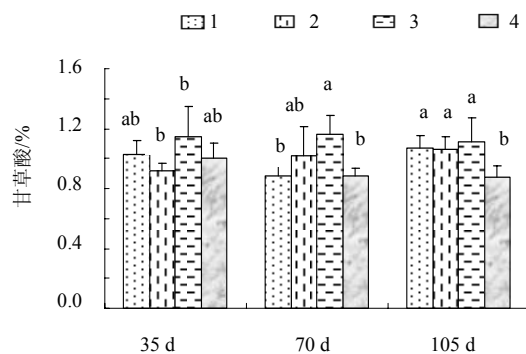
2.4 数据分析

结果用 Excel 输入并作图, 用 SAS 8.0 软件进行统计分析。

3 结果

3.1 盐胁迫对甘草酸积累的影响

在不同时间、不同质量浓度盐胁迫条件下甘草酸的积累量不同, 甘草酸量在 70 d 时, 各处理 6 mg/mL 和 9 mg/mL NaCl 差异显著 ($P < 0.05$), 同时多重比较结果表明 6 mg/mL 和 9 mg/mL 处理组的甘草酸的积累量显著高于 CK 及 3 mg/mL 处理组(图 2)。



1~3-3、6、9 mg·mL⁻¹ NaCl 4-CK

不同字母表示差异达 5% 显著性水平, 下同

1-3-3、6、9 mg·mL⁻¹ NaCl 4-CK

Different lower case letters indicate significances at 5% level, same as follow

图 2 盐胁迫对甘草酸积累量的影响

Fig. 2 Effects of salt stress on accumulative content of glycyrrhizic acid in *G. uralensis*

3.2 盐胁迫对甘草中其他 5 种组分的影响

在甘草中, 除了少量的甘草酸等有效成分以外, 还含有许多其他组分。方差分析结果表明, 处理 35 d 时, 各浓度的盐胁迫对甘草药材中的 5 种物质组分没有显著的影响; 70 d 时, 不同浓度的盐胁迫对总糖和粗蛋白量有显著或极显著影响; 105 d 时, 对粗脂肪量有极显著影响。而多重比较结果表明, 70 d 时, 9 mg/mL 处理组的总糖量显著低于 CK (图 3); 6 mg/mL 和 9 mg/mL 处理组的粗蛋白量显著高于 CK (图 4)。105 d 时, 9 mg/mL 处理组的粗脂肪显著高于 CK (图 5)。而整个处理期间, 粗纤维和灰分量与 CK 相比, 无显著差异 (图 6 和 7)。

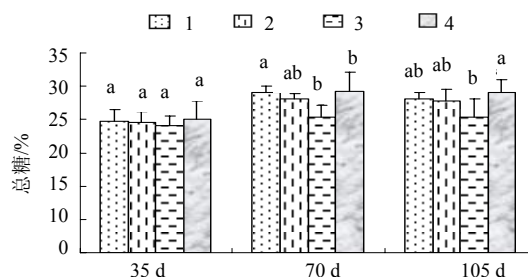


图 3 盐胁迫对甘草总糖量的影响

Fig. 3 Effects of salt stress on total sugar of *G. uralensis*

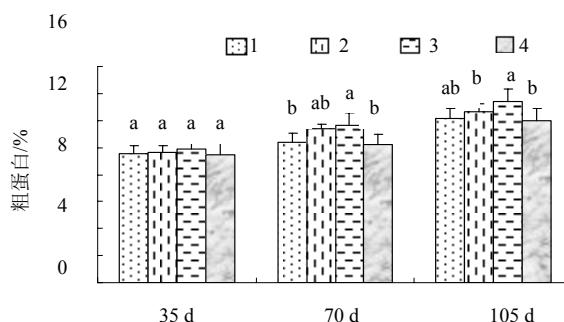


图 4 盐胁迫对甘草粗蛋白量的影响

Fig. 4 Effects of salt stress on crude protein of *G. uralensis*

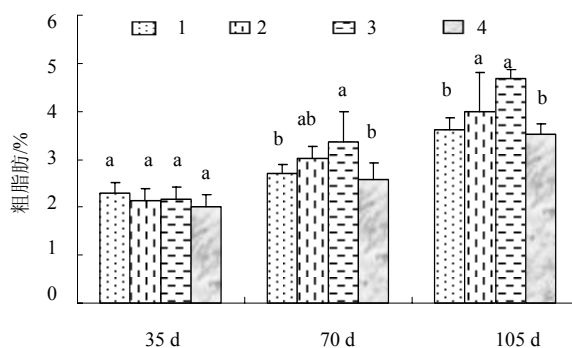


图 5 盐胁迫对甘草粗脂肪量的影响

Fig. 5 Effects of salt stress on crude fat of *G. uralensis*

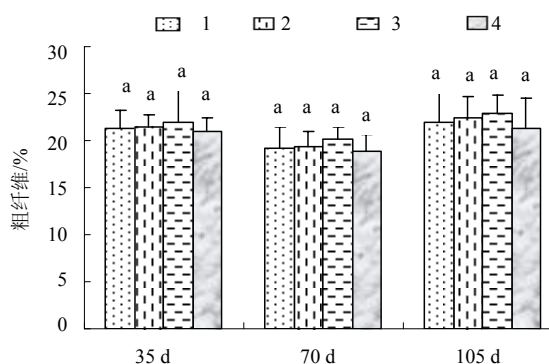


图 6 盐胁迫对甘草粗纤维量的影响

Fig. 6 Effects of salt stress on crude fiber of *G. uralensis*

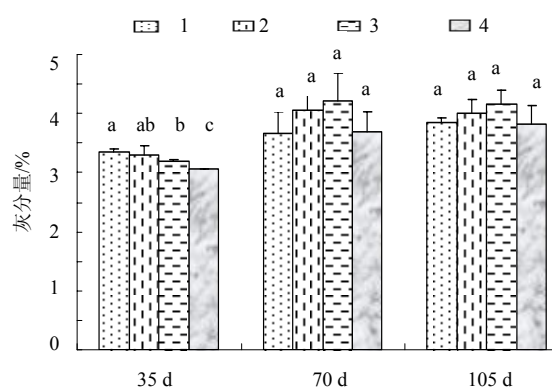


图 7 盐胁迫对甘草灰分量的影响

Fig. 7 Effects of salt stress on ash of *G. uralensis*

3.3 盐胁迫对甘草药材中 5 种组分比例关系的影响

表 1 结果表明,不同质量浓度盐胁迫下,甘草药材中总糖、粗蛋白、粗脂肪、粗纤维及灰分 5 种组分量总和在 50%~70%,这与张继等^[17]的研究结

表 1 盐胁迫对甘草 5 种组分量总和的影响

Table 1 Effects of salt stress on sum of five components in *G. uralensis*

处理	5 种组分量总和/%		
	35 d	70 d	105 d
3 mg·mL ⁻¹ NaCl	56.27±3.27	59.91±1.85	64.62±3.26
6 mg·mL ⁻¹ NaCl	55.94±2.70	60.87±1.30	65.80±4.36
9 mg·mL ⁻¹ NaCl	56.28±3.67	59.77±2.99	65.56±1.70
CK	55.50±3.10	59.28±5.13	64.71±2.09

果相一致,处理 105 d 时,5 种组分量总和约为 70%,量最高,说明胁迫时间越长,越有利于这 5 种组分的积累。以 70 d 和 105 d 取样的甘草为例,分析盐处理对药材中 5 种物质组分比例关系的影响。不同浓度盐胁迫对甘草中 5 种物质组分比例关系的影响结果见表 2 和 3。方差分析和多重比较结果表明,70 d 和 105 d 的 9 mg/mL 处理组的粗脂肪比例显著高于 CK,9 mg/mL 处理的总糖比例明显低于 CK,而灰分、粗纤维和粗蛋白所占比例未表现出差异,说明不同浓度的 NaCl 主要调控了甘草中粗脂肪及总糖间的比例关系。

3.4 盐胁迫下甘草酸与其他 5 种组分的相关分析

为探明盐胁迫对甘草酸积累量与其他组分的关系,对不同盐胁迫下的甘草酸量和各种组分量进行了相关分析(表 4)。根据甘草酸与各种组分之间的相关系数分析可知,甘草酸的量在 35 d 时,仅与粗纤维显著负相关;70 d 时,除粗纤维外,与粗脂肪、灰分及粗蛋白之间呈极显著的正相关关系,

表 2 盐胁迫处理 70 d 对甘草 5 种组分比例关系的影响

Table 2 Effects of salt stress after 70 d on proportional relationships of five components in *G. uralensis*

处理	粗脂肪/%	灰分/%	粗蛋白/%	粗纤维/%	总糖/%
3 mg·mL ⁻¹ NaCl	4.50±0.24 b	6.12±0.73 a	17.32±1.22 a	31.93±3.01 a	40.13±2.30 a
6 mg·mL ⁻¹ NaCl	4.94±0.39 ab	6.65±0.53 a	18.67±0.43 a	31.77±2.16 a	37.97±1.94 a
9 mg·mL ⁻¹ NaCl	5.62±0.89 a	7.05±0.67 a	19.58±1.83 a	33.79±1.23 a	33.94±2.42 b
CK	4.32±0.64 b	6.20±0.42 a	17.25±1.24 a	33.94±2.42 a	40.60±2.17 a

不同字母表示差异达 5% 显著性水平,下同

Different lower case letters indicate significances at 5% level, same as below

表 3 盐胁迫处理 105 d 对甘草 5 种组分比例关系的影响

Table 3 Effects of salt stress after 105 d on proportional relationships of five components in *G. uralensis*

处理	粗脂肪/%	灰分/%	粗蛋白/%	粗纤维/%	总糖/%
3 mg·mL ⁻¹ NaCl	5.61±0.34 b	5.96±0.18 a	18.86±1.79 a	33.84±3.76 a	35.73±2.20 a
6 mg·mL ⁻¹ NaCl	6.04±0.86 b	6.09±0.39 a	19.22±0.81 a	34.07±2.43 a	34.58±1.79 ab
9 mg·mL ⁻¹ NaCl	7.12±0.40 a	6.33±0.51 a	20.46±1.19 a	34.98±3.35 a	31.10±3.59 b
CK	5.43±0.43 b	5.91±0.36 a	18.56±2.01 a	32.91±4.18 a	37.19±3.00 a

表 4 盐胁迫不同时间下甘草酸量与 5 种组分量相关性分析 (n=15)

Table 4 Correlation analysis of glycyrrhizic acid and five components after salt stress for different days (n=15)

处理时间	甘草酸与各组分相关分析 r 值				
	粗脂肪	灰 分	粗蛋白	粗纤维	总 糖
35 d	0.112 8	-0.076 6	0.404 2	-0.532 7	-0.217 3
70 d	0.799 4	0.846 3	0.809 8	0.278 3	-0.809 3
105 d	0.936 1	0.830 8	-0.751 4	-0.965 5	-0.060 2

与总糖极显著负相关;而 105 d 时,与粗脂肪、灰分极显著正相关,与粗蛋白、粗纤维呈极显著的负相关关系。

4 讨论

从植物生理学的角度来看,植物生长的外界环境与栽培技术对植物代谢“源-库-流”之间的平衡影响很大,而“源-库-流”之间关系又对植物体内次生代谢产物的积累具有决定性的作用。根是植物接纳和贮存物质和能量的器官,发挥着代谢“库”的功能^[18]。甘草酸作为甘草植物体内的次生代谢产物之一,其量与药材自身含有的总糖、粗纤维等组分以及淀粉等代谢物质有着必然的联系。外界条件不同,就会引起甘草根中总糖与粗纤维等组分的量及比例关系,影响甘草代谢“库”中物质的积累、分配和竞争能力,代谢源与库能力大小改变了代谢“流”的速率,从而影响甘草酸次生代谢的进程,最终导致甘草酸在甘草植物体内积累受到控制^[19]。

结果表明,盐胁迫提高了粗脂肪、粗纤维、粗蛋白及灰分的量,降低了总糖的量,且随着盐浓度的增加,5 种物质组分的量表现出不同程度的差异。同时,盐胁迫对总糖和粗脂肪的比例分配也具有显著的影响,正是这种对初生代谢产物分配的影响,从而导致对次生代谢产物积累的影响。

处理 70 d 时,方差分析表明,处理组甘草酸量与对照相比有统计学意义,同时相关性分析表明,甘草酸量与粗脂肪和灰分极显著正相关,与粗蛋白及总糖含量极显著负相关,表明甘草酸在甘草植物体内的积累,与粗蛋白及总糖量的消减、粗脂肪和灰分量增长的这种“此消彼长”的分配密切相关,适当的盐胁迫刺激了甘草植物体内的糖代谢,加速了物质的分解,促进了甘草的次生代谢,使得甘草酸形成并积累。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[2] 谢松梅, 崔慧斐. 甘草酸的研究进展 [J]. 食品与药品, 2006, 8(3): 1-5.

[3] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其提取物对呼吸系统的药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 262-267.
[4] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 261-268.
[5] 黄群荣, 马 哲. 甘草酸的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 384-387.
[6] DeKlerk G J, Nieuwenhuis M G, Beutle J J. Hypokalaemia and hypertension associated with use of liquorice flavoured chewing gum [J]. *Br Med J*, 1997, 314: 731.
[7] Nomural T, Fukail T, Akiyama T. Chemistry of phenolic compounds of licorice (*Glycyrrhiza* species) and their estrogenic and cytotoxic activities [J]. *Pure Appl Chem*, 2002, 74: 1199.
[8] 王连喜, 李剑萍, 李 琪, 等. 乌拉尔甘草研究现状与可持续利用对策 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 496-499.
[9] 王文全. 甘草生态学特性及生态环境对其药材质量影响的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2000.
[10] 魏胜利, 王文全, 王 海. 我国中西部地区甘草资源及其可持续利用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 202-206.
[11] 周应群, 陈士林, 赵润怀. 药用甘草植物资源生态学探讨 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1668-1671.
[12] 李若洁, 石 倩, 程彬峰, 等. 甘草酸协同麻黄碱的平喘作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 183-186.
[13] 唐晓敏, 王文全, 杨 全, 等. NaCl 处理对甘草生长、生理指标及药效成分含量的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(2): 172-175.
[14] 杨秀红, 李建民, 董学会, 等. 外源甘草酸对 NaCl 胁迫条件下甘草幼苗生长、根部甘草酸含量以及几种与盐胁迫相关生理指标的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 441-444.
[15] 唐晓敏. 水分和盐分处理对甘草药材质量的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
[16] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
[17] 张 继, 姚 健, 郭守军, 等. 乌拉尔甘草营养成分的分析研究 [J]. 西北植物学报, 1999, 19(6): 181.
[18] 刘长利. 甘草酸在甘草植物体内积累的调控机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2005.
[19] 梁新华. 微量元素对甘草中甘草酸形成与积累影响的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2010.