

基于物质组分分配研究钼对甘草酸积累的影响

王丹^{1,2}, 万春阳^{2,3}, 王文全^{2,4,5*}, 侯俊玲^{2,5*}, 彭芳², 刘凤波²

1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

3. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

4. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100094

5. 药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102

摘要: **目的** 基于物质分配研究钼对药材中甘草酸积累的影响并探讨其机制。**方法** 采用盆栽蛭石的试验方法, 以一年生的甘草移栽苗为实验材料, 共设置4个钼质量浓度水平, 分别为0、0.52、5.2、10.4 mg/L, 其中0.52 mg/L为正常Hoagland营养液中钼的质量浓度。每周向盆内浇灌营养液, 以达到处理的目的。分别在处理35、70、105 d取样, 测定甘草中甘草酸的相对量和绝对量以及总糖、粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、灰分等物质组分量。**结果** 钼对甘草酸的相对量影响不显著, 但是对其绝对量的影响显著, 施钼可以提高甘草中总糖、粗蛋白和灰分的量以及5种主要物质组分量总和, 降低粗脂肪的量, 对粗纤维的影响不显著。甘草酸相对量与粗蛋白为显著正相关。甘草酸绝对量与粗纤维为极显著负相关, 与灰分、粗脂肪和物质总和为极显著正相关, 与总糖为显著正相关。**结论** 甘草酸的积累与粗纤维、粗脂肪、灰分、总糖的分配密切相关, 适当质量浓度的钼可以刺激甘草内的总糖、粗脂肪等物质的合成, 进而促进甘草的次生代谢, 导致甘草酸的积累。

关键词: 钼; 甘草; 甘草酸; 物质组分; 积累机制

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)08-1037-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.023

Effect of molybdenum on accumulation of glycyrrhizic acid based on material ingredients distribution

WANG Dan^{1,2}, WAN Chun-yang^{2,3}, WANG Wen-quan^{2,4,5}, HOU Jun-ling^{2,5}, PENG Fang², LIU Feng-bo²

1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

3. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China

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

Abstract: Objective To investigate the effects of molybdenum (Mo) on the accumulation of glycyrrhizic acid (GA) in medicinal materials based on the material ingredients distribution and explore the mechanism. **Methods** The transplants of one-year-old *G. uralensis* were subjected to Mo at four concentration (0, 0.52, 5.2, and 10.4 mg/L) culturing in vermiculite, among which 0.52 mg/L was used as the normal concentration in the complete Hoagland nutrition solution. The solution was irrigated to the pots every week. The relative and absolute contents of GA, and the contents of total sugar, crude protein, crude fiber, crude fat, and ash were determined on the day 35, 70, and 105 after treatment, respectively. **Results** The influence of Mo on the relative contents of GA was not significant while significant to the absolute content of GA. The application of Mo could increase the contents of total sugar, crude protein, ash, and the total material ingredients, but decrease the contents of crude fat. There is no difference in the crude fiber. The

收稿日期: 2012-08-11

基金项目: 国家公益性(中医药)行业科研专项项目(201107009-03)

作者简介: 王丹(1982—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事药用植物资源与培育及其质量调控研究。Tel: (0898)23301873 E-mail: wang_dan1414@163.com

*通信作者 王文全, 博士生导师, 教授。Tel: (010)57833195 E-mail: wwq57@126.com

侯俊玲, 教授。Tel: (010)84738623 E-mail: mshjl@126.com

relative content of GA had significant positive correlation with the crude protein. The absolute content of GA had extremely significant negative correlation with the crude fiber, and it had extremely significant positive correlation with ash, crude fat, and total material ingredients. It showed a significant positive correlation with total sugar. **Conclusion** The accumulation of GA closely relates to the distribution of crude fiber, crude fat, ash, and total sugar. The Mo at appropriate concentration could stimulate the formation of sugar and crude fat, and then promote the secondary metabolism of *G. uralensis*. All above could lead to the formation and accumulation of GA.

Key words: molybdenum; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; glycyrrhizic acid; material ingredients; accumulation mechanism

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 为豆科甘草属多年生植物,具有补脾益气,祛痰止咳,缓急止痛,清热解毒,调诸药等功效^[1],是中药中使用最为广泛的药用植物^[2],其药材质量的优劣影响甘草的临床疗效,而甘草酸是评价甘草药材质量优劣的主要药用活性成分^[3]。近年来,由于野生甘草资源的严重破坏,栽培甘草成为代替野生甘草的必然^[4-5]。但是栽培甘草中甘草酸量在全国各产区之间差异较大,且平均质量分数低于野生甘草,达不到《中国药典》2010 版的标准^[6-8]。目前,有研究发现叶面喷施钼可以提高甘草酸量。而在甘草中,甘草酸等药用活性成分只占药材总质量的百分之几,而比例较大的是总糖、粗纤维、粗蛋白、粗脂肪、灰分等物质组分,是这些物质构成了药材的整体。通常所说的药用活性成分量,是指药用活性成分质量占药材质量的百分比,也就是相对所有物质组分的质量百分比,因此,任何一种物质组分的变化都会对这个相对值产生影响^[9-11],因此,本实验研究钼对甘草酸以及药材物质组分积累的影响,探索物质组分分配对甘草酸积累影响的机制。

1 材料及仪器

1.1 材料

以一年生甘草移栽苗为实验材料,该幼苗采自内蒙古赤峰,经北京中医药大学王文全教授鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.。

1.2 仪器与试剂

Waters 2489 型高效液相色谱仪(沃特世科技上海有限公司);FW100型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司);DHG—9140A鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);KQ500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BP211D型电子分析天平(北京赛多利斯系统有限公司);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(上海树立仪器仪表有限公司);SZF—06脂肪测定仪(上海新嘉电子有限公司);CXC—60粗纤维测定仪(1 mm 孔径分样筛,上海新嘉电子有限公司);KDY—9830

凯氏定氮仪(上海新嘉电子有限公司);马弗炉(在200~800℃可调,北京市永光明医疗仪器)。

甘草酸单铵盐(批号110731)购自中国药品生物制品检定所,甘草酸和甘草苷对照品实验室自制,质量分数大于98%。乙腈为色谱纯,磷酸为色谱纯,其它试剂为分析纯,水为屈臣氏纯净水。

2 方法

2.1 样品的处理

试验在北京中医药大学校内进行,2010年5月18日将甘草苗移栽于花盆中,盆高35 cm、盆口直径35 cm,盆底直径25 cm,基质为蛭石和沙土(6:1),移栽苗生长状况尽量保持一致,每盆18株,然后将花盆埋入土中。每周向基质中浇灌 Hoagland 营养液以提供植物所需的养分。营养液的组成为136.0 mg/L KH_2PO_4 , 510.0 mg/L KNO_3 , 820.0 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 49.0 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.86 mg/L H_3BO_3 , 0.08 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.22 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.52 mg/L $\text{Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.81 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.5 mg/L Fe-EDTA 提供铁元素。用稀 NaOH 和稀 HCl 调 pH 值至 7.0^[12]。实验初期向盆中浇灌上述的完全营养液,6月10日待植株生长正常时,进行不同质量浓度的钼处理试验,分别设置对照、3个钼质量浓度 0.52、5.2、10.4 mg/L,其中 0.52 mg/L 为 Hoagland 全营养液中钼质量浓度,并在此质量浓度的基础上设置 10 倍和 20 倍的钼水平以及未施钼的处理。按照完成随机区组试验,每个处理重复 4 次。分别在处理 35 d(生长期)、70 d(生长旺盛期)、105 d(落叶期)后取样。

2.2 指标测定方法

总糖量测定参考《生物化学实验方法和技术》采用中的 3,5-二硝基水杨酸比色法^[13],粗纤维量测定利用粗纤维仪采用酸碱洗涤称重法测定;粗脂肪量测定采用粗脂肪仪测定;粗蛋白量测定参考采用凯氏自动定氮仪法;灰分测定参考《中国药典》2010 年版一部采用高温灼烧法^[14];甘草酸量测定参考《中国药典》2010 年版一部。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Dikma Diamonsil-C₁₈

分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 0~8 min, 19%A; 8~35 min, 50%A; 35~36 min, 100%A; 36~40 min, 19%A。柱温 25 ℃, 检测波长为 237 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 按甘草酸峰计算理论塔板数>4 000。由于《中国药典》2010 版一部中的方法同时测定甘草中的主要药效成分甘草酸和甘草苷, 因此, 本实验同时采用甘草苷和甘草酸作为对照品, 对照品和样品色谱图见图 1。

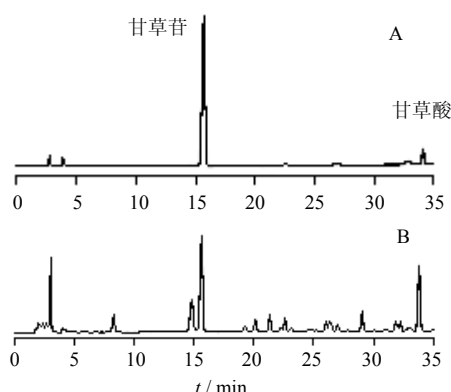


图1 对照品(A)和甘草样品(B)的色谱图
Fig.1 Chromatogram of reference substance (A) and *G. uralensis* sample (B)

2.2.2 对照品溶液制备 分别精密称定甘草酸和甘草苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得甘草酸 0.180 mg/L 和甘草苷 0.125 mg/L 的对照品溶液, 备用。

2.2.3 供试品溶液制备 精密称定过 0.28 mm 筛的甘草粉末 0.100 0 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 10 mL, 密塞, 称质量, 超声提取 30 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定质量, 用 70%乙醇补足损失的质量, 摇匀, 滤过, 收集续滤液, 过微孔滤膜, 即得。

进行精密度、稳定性、重复性和加样回收试验等方法学考察结果均良好。

为更好地描述钼对甘草酸积累作用, 本实验引入了相对量和绝对量的概念。甘草酸相对量指 100 个单位质量的甘草药材中所含甘草酸的单位质量数, 即质量百分比量, 即通常所说的甘草酸量。甘草酸单株产量为绝对量, 指单株药材所含甘草酸的质量, 即甘草酸单株产量。

相对量=甘草酸质量 / 甘草药材质量

甘草酸单株产量=甘草酸相对量 / 100×单株药材生物量×1 000

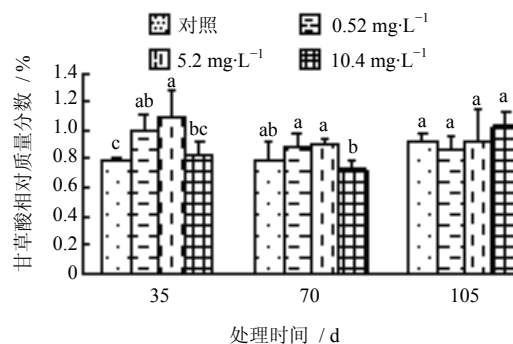
2.3 数据分析

应用 Excel 进行数据录入及图表的绘制, 采用 SPSS 16.0 软件进行统计与 One-way ANOVA 方差分析, 并用 Duncan 检验法进行多重比较。

3 结果与分析

3.1 钼对甘草酸相对量和绝对量的影响

3.1.1 甘草酸相对量的变化 在处理 35 d 和 70 d 时, 各处理间差异显著 ($P<0.05$)。在处理 35 d 时, 5.2 mg/L 处理的甘草酸相对量最高。在处理 70 d 时, 0.52 mg/L 和 5.2 mg/L 处理的甘草酸相对量最高, 显著高于 10.4 mg/L 处理 21.92%和 23.29% (图 2)。这说明在处理的前期钼对甘草酸相对量的增加作用明显, 而随着处理时间的延长, 作用减弱。并且随着钼的质量浓度的增加, 甘草酸相对量呈现出先增加后降低的趋势, 0.52 mg/L 和 5.2 mg/L 对甘草酸相对量的促进作用较明显。



不同小写字母表示处理间在 0.05 水平有显著差异, 下同
Different lower-case letters mean significant differences among treatments at 0.05 level, same as below

图2 不同质量浓度的钼处理对甘草酸相对量的影响
Fig.2 Effect of Mo treatment at different concentration on relative content of GA

3.1.2 甘草酸绝对量的变化 在处理 35 d 和 70 d 时, 不同浓度的钼对甘草酸绝对量影响显著 ($P<0.05$) (图 3)。在处理 35 d 时, 0.52 mg/L 和 5.2 mg/L 处理的甘草酸绝对量最高, 显著高于对照组。在处理 70 d 时, 5.2 mg/L 处理的甘草酸绝对量最高, 为 35.12 mg/株, 与对照组和 10.4 mg/L 处理相比显著增加了 40.14%和 19.99%。在处理 105 d 时, 钼对甘草酸绝对量的增加促进作用极显著 ($P<0.01$), 随着钼质量浓度的增加而增加。此时, 5.2 mg/L 和 10.4 mg/L 最高, 与对照组和 0.52 mg/L 相比, 分别显著增加了 45.83%、40.82%和 69.20%、63.39%。这说明钼对甘草酸绝对量的增加有促进作用, 并且随着处

理时间的延长, 钼质量浓度越高, 促进作用越显著。

3.2 钼对甘草中5种物质组分量的影响

3.2.1 甘草总糖量的变化 随着处理时间的延长, 甘草药材中总糖量逐渐增加(图4)。在处理35 d和70 d, 各处理间差异不显著。在处理105 d时, 10.4 mg/L处理的总糖量最高(34.46%), 与对照组(26.58%)相比, 显著增加了29.65%。这说明经过一定的处理时间, 钼可以增加甘草中总糖的量, 促进其积累。

3.2.2 甘草药材粗蛋白量的变化 随着钼处理质量浓度的增加, 粗蛋白量随之增加(图5)。在处理70 d时, 10.4 mg/L处理的粗蛋白量最高, 显著高于其他3个处理。在处理105 d时, 5.2 mg/L和10.4 mg/L

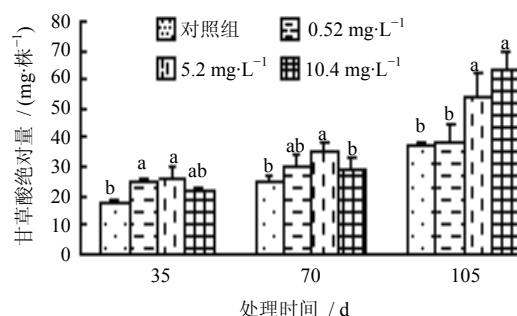


图3 钼处理对甘草酸绝对量的影响

Fig. 3 Effect of Mo treatment on absolute content of GA

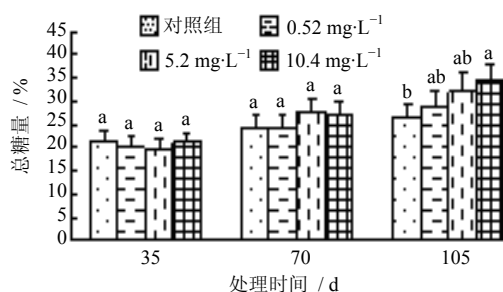


图4 钼处理对总糖量的影响

Fig. 4 Effect of Mo treatment on content of total sugar

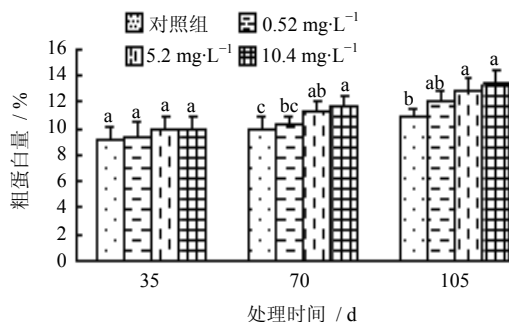


图5 钼处理对粗蛋白量的影响

Fig. 5 Effect of Mo treatment on content of crude protein

处理显著高于对照组, 分别增加了19.67%和24.49%。随着处理时间的延长, 钼对甘草中粗蛋白积累的促进作用更加显著。

3.2.3 甘草药材粗纤维量的变化 在整个实试验处理过程中, 钼对甘草中粗纤维量的影响作用不显著, 见图6。

3.2.4 甘草药材粗脂肪量的变化 在处理70 d和105 d时, 随着钼处理浓度的增加, 粗脂肪量逐渐降低, 10.4 mg/L处理时达到最低。然而, 各处理间差异不显著, 见图7。

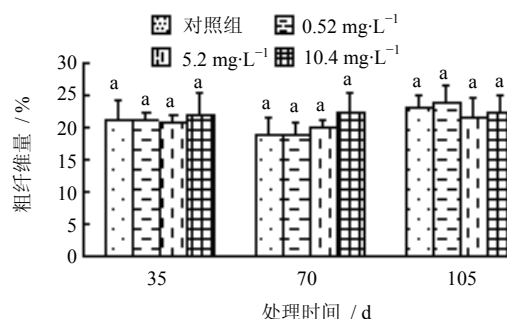


图6 钼处理对粗纤维量的影响

Fig. 6 Effect of Mo treatment on content of crude fiber

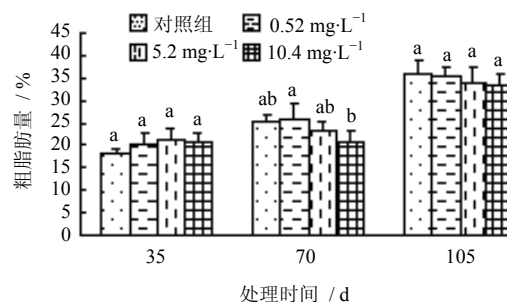


图7 钼处理对粗脂肪量的影响

Fig. 7 Effect of Mo treatment on content of crude fat

3.2.5 甘草药材灰分量的变化 在整个试验处理过程中, 钼对甘草灰分的影响差异极显著($P < 0.01$)。在处理105 d时, 10.4 mg/L处理的灰分量最高, 显著高于其他处理, 较对照组、0.52、5.2 mg/L处理分别显著增加了28.40%、38.12%、10.67%, 见图8。

3.3 钼对甘草药材5种物质组分总和的影响

在处理70 d时, 10.4 mg/L处理5种物质质量总和最高, 与对照组和0.52 mg/L相比, 显著增加了12.92%和13.14%(图9)。在处理105 d时, 5.2 mg/L和10.4 mg/L处理的5种物质组分量总和最高, 分别为74.64%和77.27%, 显著高于对照组处理9.78%和13.65%, 各处理间显著差异($P < 0.05$)。

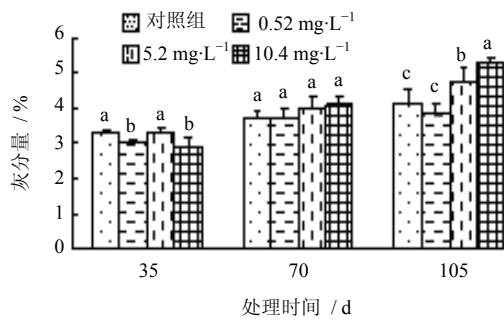


图8 钼对灰分量的影响

Fig. 8 Effect of Mo treatment on content of ash

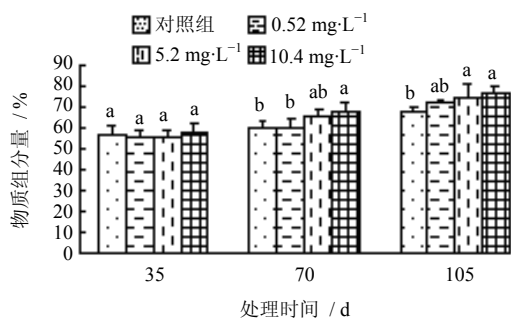


图9 不同质量浓度钼对5种物质组分量总和的影响

Fig. 9 Effect of Mo at different concentration on total contents of five material ingredients

3.4 甘草酸量与物质组分间的相关分析

甘草酸相对量与粗蛋白呈显著的正相关关系 (0.425)。甘草酸绝对量与灰分、粗脂肪和物质组分量总和呈现出极显著的正相关关系, 相关系数分别为 0.540、0.519 和 0.755, 与总糖为显著正相关关系 (0.468), 这说明甘草酸绝对量随其增加而增加, 然而与粗纤维呈现出极显著负相关 (-0.639), 随着粗纤维量的增加甘草酸绝对量降低。

4 讨论

钼是高等植物生长所必需的重要微量元素, 钼在高等植物中的主要生理功能为钼酶的重要组成, 这些钼酶在植物很多代谢过程如 C-、N-、S-循环中起着重要的作用^[15-16]。本研究证实, 钼可以改变甘草中 5 种主要物质组分及其总和的积累、分配, 进而影响甘草酸的积累。钼可以通过改变甘草植株的生长和生理过程, 进而影响甘草的初生代谢过程, 导致甘草药材中的主要物质组分的积累和分配的变化, 并最终对甘草酸的积累产生影响。施钼可以提高甘草药材中总糖、粗蛋白和灰分的量以及 5 种主要物质组分量总和, 降低粗脂肪的量, 对粗纤维的

影响不显著。甘草酸相对量与粗蛋白呈现出显著正相关关系。甘草酸绝对量与粗纤维为极显著负相关, 与灰分、粗脂肪和物质总和为极显著正相关, 与总糖为显著正相关。

目前, 有关钼对甘草根中主要物质组分的研究已有报道。但是多采用叶面喷施的方式。刘长利^[6]采用蛭石营养液培养实验, 叶面喷施钼的方式进行研究, 结果表明, 施钼降低了甘草根中总糖、粗纤维和粗脂肪的量, 但是差异不显著, 同时, 与对照相比, 施钼处理的粗蛋白的量增加了 25.43%, 这一结果与本实验结果类似。钼对粗纤维和粗脂肪的影响不显著, 显著提高粗蛋白的积累。这可能是由于二者均采用了盆栽蛭石的培养方式, 避免外界土壤等环境对物质组分可能造成的影响。但是由于钼元素的施加方式不同, 可能造成甘草植株对钼元素的吸收差异, 并且由于植物本身的差异, 导致结果的不完全相同。梁新华^[17]也证实了叶面施钼可以对甘草根中物质组分产生影响, 与对照组相比, 0.15% 的钼显著增加了甘草根中粗纤维 16.44%, 同时 0.1% 和 0.15% 的钼元素显著增加了根中粗脂肪的量, 分别增加了 31.31% 和 26.44%, 然而对粗蛋白的影响差异不显著, 与本实验的结果不一致。这可能由于该试验是采用大田的培养方式, 土壤中各种元素的丰、缺会对植物产生很大的影响, 而钼本身为微量元素, 植物对其吸收和利用很小, 因此, 会导致钼对甘草中物质组分影响结果的不同。同时, 在本研究中发现, 钼对甘草酸的相对量增加影响不显著, 这与刘长利^[6]的研究结果不一致。这可能与取样时间及试验材料有关。但是研究发现, 钼能够显著提高甘草酸的绝对量, 这说明虽然钼对甘草酸的相对量的积累作用不显著, 但是钼实际提高了每株甘草药材中的甘草酸的量, 促进了甘草酸的积累。根据本研究结果, 这可能是由于甘草酸在植物体内的积累过程中, 与粗纤维的消减, 灰分、粗脂肪和总糖等物质的积累增加的这种“物质间此消彼长”的分配密切相关。适当的钼可以协调植物代谢“源-库-流”之间的平衡, 影响甘草药材中甘草酸的积累。

参考文献

- [1] 刘丽萍, 任翠爱, 赵宏艳. 甘草酸的免疫调节作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 272-276.
- [2] 周应群, 陈士林, 赵润怀. 药用甘草植物资源生态学研究探讨 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1668-1671.
- [3] 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.
- [4] Lu H Y, Liu J M, Zhang H C, *et al.* Ri-mediated transformation of *Glycyrrhiza uralensis* with a squalene synthase gene (GuSQS 1) for production of glycyrrhizin [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2008, 26(1): 1-11.
- [5] Hou J L, Li W D, Zheng Q Y, *et al.* Effect of low light intensity on growth and accumulation of secondary metabolites in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38(2): 160-168.
- [6] 刘长利. 甘草酸在甘草植物体内积累的调控机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2005.
- [7] Wang D, Wan C Y, Hou J L, *et al.* Effect of different concentrations of Mo on yield and accumulation of active constituents of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Agric Sci Technol*, 2010, 11(11/12): 17-20.
- [8] 杨全, 王文全, 魏胜利, 等. 不同变异类型甘草中甘草苷及甘草酸量比较研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1087-1090.
- [9] 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.
- [10] 万春阳, 王丹, 侯俊玲, 等. 盐胁迫对甘草不同组分的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2312-2316.
- [11] 刘长利, 王文全. 干旱胁迫对甘草酸积累影响的物质组分分配机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2852-2853.
- [12] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [13] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2002.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [15] Liu H G, Hu C X, Sun X C, *et al.* Interactive effects of molybdenum and phosphorus fertilizers on photosynthetic characteristics of seedlings and grain yield of *Brassica napus* [J]. *Plant Soil*, 2010, 326: 345-353.
- [16] Marieta H, Maria G, Ira S, *et al.* Nitrogen assimilatory enzymes and amino acid content in inoculated foliar fertilized pea plants grown at reduced molybdenum concentration [J]. *J Plant Nutr*, 2007, 30: 1409-1419.
- [17] 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.