

光照强度对广西莪术挥发油及莪术醇含量的影响

陈旭, 曾建红

(桂林医学院药学院, 广西桂林 541004)

摘要: 采用水蒸气蒸馏法(XD)提取广西莪术挥发油, 气相色谱法测定莪术醇的含量, 并用 SPSS10.0 统计分析软件对数据进行分析, 以探讨光照强度对主要有效成分挥发油和莪术醇生物合成途径的影响。结果表明光照强度为 85% 时, 莪术挥发油和莪术醇含量最高, 二者之间相关性显著。分析认为光照强度对莪术主要有效成分生物合成与积累影响显著, 莪术挥发油和莪术醇生物合成的最适光照强度为 85%。

关键词: 广西莪术; 光照强度; 挥发油; 莪术醇; 生物合成

中图分类号: Q541 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)05-0694-04

Effect of light intensity on volatile oil and crucumol content in *Curcuma kwangsiensis*

CHEN Xu, ZENG Jian-Hong

(Pharmaceutical School, Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

Abstract: The volatile oil of *Curcuma kwangsiensis* was distilled by the steam distillation (XD) and the crucumol was determined by GC, and then the data was analysed by SPSS10.0 in order to discuss the effect of light intensity on bio-synthetic pathway of volatile oil and crucumol. The results showed that when the light intensity was 85%, the volatile oil and crucumol content were the highest, the correlation were significant between the two. The analysis showed that, the effect of light intensity on the biosynthesis and accumulation was remarkable and the suitable light intensity was 85%.

Key words: *C. kwangsiensis*; light intensity; volatile oil; crucumol; biosynthesis

广西莪术(*Curcuma kwangsiensis*)为姜科多年生草本植物, 主产于广西、云南、四川等地(中华人民共和国药典委员会, 2005)。广西莪术以干燥根茎入药, 其主要有效部位为根茎和根。中药莪术中富含挥发油, 具有较好的抗肿瘤、抗炎、抗病毒作用, 其抗肿瘤有效成分主要为 β -榄香烯、莪术醇、莪术酮、莪术二酮和异莪术醇等萜类化合物。植物的次生代谢是植物在进化过程中对复杂的外界环境变异适应和选择的结果。因此, 药用植物中次生代谢成分的形成和积累除了由其遗传特性所决定外, 还与其生态环境因素密切相关。在植物化学生态研究中, 光照强度是广泛受到重视的生态因子, 它影响着许多植

物的次生代谢过程。如生于阳坡的金银花中绿原酸的含量高于阴坡(陈强等, 1994); 颠茄在露天栽培时的阿托品含量为 0.70%, 而隐蔽条件下则为 0.38% (陶曙红等, 2003)。对于萜类化合物的积累, Langenheim(1994)报道光照强度的增加会促进萜类化合物的积累, 而 N、P、K 减少, 将使萜类化合物的含量下降。因此, 研究光照对莪术倍半萜类化合物——挥发油及主要活性成分莪术醇生物合成代谢的影响, 有助于了解莪术挥发油及莪术醇的生物合成过程和生态因子的关系, 为增加莪术有效成分在植物体的富集, 提高药材的品质, 为莪术的良种选育、规范化种植和质量控制提供理论支撑。

收稿日期: 2008-03-13 修回日期: 2008-06-20

基金项目: 广西自然科学基金 (0447101) [Supported by Natural Science Foundation of Guangxi (0447101)]

作者简介: 陈旭(1966-), 女, 湖南隆回人, 副教授, 主要从事中药及中成药质量标准及标准物质的研究, (E-mail) chenxu@glmc.edu.cn.

1 试验材料与仪器

1.1 试验材料与田间设计方法

选种质来源一致、栽培条件相同、无病虫害植株,以消除个体差异对试验的影响。将试验材料栽植于桂林永乐中药材种植基地。在自然光照条件下,采用增加塑料纱网层数的办法降低光照强度,设置的纱网层数分别为 0、1、2、3、4、5 层,对照为全光照。每小区遮盖面积 1.0 m^2 ,随机区组设计,3 次重复。6 月上旬晴天的中午阳光直射时测定光照强度。各处理对应的相对透光光强分别为:对照 100%(CK)、85%(A)、72%(B)、62%(C)、42%(D)、32%(E)、18%(F)。试验材料开始遮荫处理的时间为 5 月上旬,试验结束时取被遮盖下方中心部位的根茎用于室内测定分析。材料采收后洗净、切片、晒干、打碎,干燥器储藏备用。所有药材经本教研室鉴定为姜科姜黄属植物广西莪术。

1.2 仪器与试剂

IM-2D 照度计;Agilent 6890N 气相色谱仪;FA1004 型电子天平;调温加热器;挥发油测定器及回流冷凝装置一套。莪术醇对照品(中国药品生物制品检定所,批号 1018520104)。本实验所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取

挥发油的提取及出油率的测定根据 2005 年版《中华人民共和国药典(一部)》附录 XD 挥发油测定法,分别称取上述不同遮荫处理方式生长的广西莪术药材 50 g,置 1 000 mL 圆底烧瓶中,加水 400 mL 及数粒玻璃珠,振摇均匀,浸泡 2 h,连接挥发油测定器与回流冷凝管,自冷凝管上端加水使充满挥发油测定器的刻度部分并溢流入烧瓶为止,置加热套中,设定加热温度为 $130\sim 140\text{ }^{\circ}\text{C}$,缓缓加热至微沸 7 h,冷却 10 min,开启挥发油测定器下端活塞,将水缓缓放出,至油层上端到达刻度 0 线上面 5 mm 处为止。放置 1.5 h,再开启活塞使油层下降至其上端恰与刻度零线平齐,读取挥发油量体积。

2.2 色谱条件及系统适用性试验

HP-5($0.32\text{ mm}\times 30\text{ m}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$)石英弹性毛细管柱,进样口温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$,FID $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,不分流,流速

$1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;程序升温,初始 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 4 min,以 $3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ (朱亚尔等,2006)。在此色谱条件下,莪术醇峰与其它峰能有效分离,如图 1。

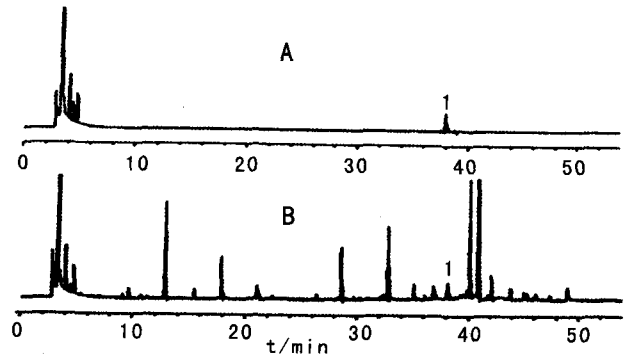


图 1 广西莪术挥发油色谱图

Fig. 1 Chromatogram picture of volatile oil from *C. kwangsiensis*

A. 对照品; B. 样品; 1. 莪术醇。

A. Reference substance; B. Sample; 1. Crucumol.

2.3 对照品溶液的制备

精密称取莪术醇对照品 2.5 mg,置于 5 mL 容量瓶中,加醋酸乙酯分别制成 $2\,000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.4 样品溶液的制备

分别精密称取 10 g 不同遮荫处理广西莪术药材粉末,置 500 mL 圆底烧瓶中,加水 300 mL,挥发油提取法同“2.1 项”,管中加醋酸乙酯 2 mL 提取 2 次,每次 4 h,分别用醋酸乙酯将挥发油转移至 10 mL 容量瓶中,醋酸乙酯至刻度,摇匀,即得。

2.5 线性关系考察

精密吸取高含量的 $2\,000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 莪术醇对照品溶液 0.2、0.4、2、4、10 mL 置 10 mL 容量瓶中,加醋酸乙酯定容至刻度,摇匀,精密取 $1\text{ }\mu\text{L}$,注入气相色谱仪,以峰面积为纵坐标,莪术醇量为横坐标,进行线性回归,得线性方程 $Y=2.09X-21.67$, $r=0.999\,8$,表明莪术醇在 $40.0\sim 2\,000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 具有良好的线性关系。

2.6 精密度试验

分别取同一份对照品溶液,按“2.2 项”设定的色谱条件,连续进样 6 次,测定峰面积,精密度 $\text{RSD}=0.34\%$,表明精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一份对照品溶液,分别于 0、1、2、4、8、16、24 h 按“2.2 项”设定的色谱条件进样分析,结果样品 $\text{RSD}=1.67\%$,被测成分在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验

精密称取同一样品 10 g,6 份,按“2.4 项”制备样品溶液,以上述色谱条件测定,结果 RSD = 1.8%,方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

称取已测得含量的样品 5 g,共 12 份,置 500 mL 圆底烧瓶中,精密加入 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液高、低含量各 6 份,加水 300 mL,按“2.4 项”制备样品溶液,按“2.2 项”设定的色谱条件进行测定,以测得的峰面积计算含量及回收率,结果高、低含量的回收率分别为 98.0%(RSD=2.0%),100.5%(RSD=1.9%)。

2.10 样品挥发油和莪术醇含量的测定

按上述条件提取和测定不同遮荫处理样品挥发油和莪术醇的含量,用 SPSS10.0 统计软件对数据进行统计分析,结果见表 1、图 2。

表 1 不同光照强度下挥发油和莪术醇的含量
Table 1 The volatile oil and crucumol content under different light intensity

相对光照强度 Relative light intensity	挥发油含量 Volatile oil content (%)	莪术醇含量 Crucumol content (%)
CK	2.2450±0.0230	0.0483±0.0423
A	2.4297±0.0344 *	0.0485±0.0501
B	1.2920±0.0134 *	0.0231±0.0142 *
C	1.0580±0.0030 *	0.0224±0.0336 *
D	1.4750±0.0310 *	0.0361±0.0601 *
E	0.8120±0.0812 *	0.0048±0.0801 *
F	0.9117±0.0521 *	0.0049±0.0251 *

注:与 CK 比较,* $P<0.05$ 有显著差异。
Notes: Comparing with the CK,* $P<0.05$ showed significant difference.

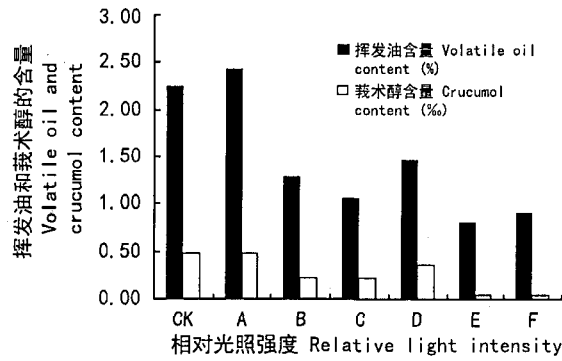


图 2 光照强度对挥发油和莪术醇含量的影响
Fig. 2 Effect of light intensity on volatile oil and crucumol content

光照强度对广西莪术挥发油和莪术醇的含量影

响较大。挥发油和莪术醇的含量并不是随着光照强度的增加而线性增加,而是存在一个最适光强,处在这一临界光强条件下的挥发油和莪术醇的含量最高,大于或小于这一临界光强,其含量下降。

CK、A、B、C、D、E、F 的挥发油含量分别是 2.245 0%、2.429 7%、1.292 0%、1.058 0%、1.475 0%、0.812 0%、0.911 7%,不同的遮荫处理与 CK 比较,挥发油含量差异均达到显著水平($P<0.05$)。以对照 CK 挥发油含量为 100%,处理 A、B、C、D、E、F 挥发油含量分别为 108.23%、57.55%、47.135%、65.71%、36.17%、40.61%,可以看出适度遮荫(相对透光光强为 85%)明显提高了挥发油含量。

CK、A、B、C、D、E、F 的莪术醇含量分别是 0.048 3%、0.048 5%、0.023 1%、0.022 4%、0.036 1%、0.004 8%、0.004 9%,不同的遮荫处理与 CK 比较,处理 A 与对照 CK 莪术醇含量无显著差异($P>0.05$),其它处理与对照 CK 莪术醇含量均有显著差异($P<0.05$)。可以看出适度遮荫(相对透光光强为 85%)是莪术醇生物合成的最宜光照条件。

2.11 挥发油与莪术醇含量相关性分析

选择处理 A 的样品按上述条件提取和测定挥发油和莪术醇含量,用 SPSS10.0 进行统计分析。采用 Quadratic 模型回归分析可知,F 值的显著水平为 0.000 0,二者存在显著相关性,故回归方程有统计意义。二者的回归方程为: $y=2.04-0.85x+0.17x^2$ ($R^2=0.999\ 9$)。

3 讨论

光照强度对植物次生代谢物的生物合成和积累过程起重要作用,这已被不同试材的试验结果证实(钱大玮等,2001;冷平生等,2002;王华田等,2002)。光照强度对植物花色素、黄酮及内酯含量等次生代谢物有显著的影响,适度遮荫促进次生代谢产物在植物体内富集。莪术挥发油和莪术醇含量随着光照梯度的变化表现出相似的变化趋势,在一定光照范围内存在一最适光照强度,高于或低于这一光照强度,莪术挥发油和莪术醇含量降低,这一光照强度即为 85% 自然光照强度。然而,对药用植物中有效成分起作用的是生态环境中各因子(包括光照、温度、土壤、水分等)的综合作用。因此,有关温度、土壤、水分等生态因子对广西莪术挥发油和莪术醇含量的影响有待进一步的研究。

莪术油中主要活性成分为倍半萜(sesquiterpene, C₁₅)类化合物,研究已表明,倍半萜类化合物是萜类化合物(terpenoid)的一种,在植物体内萜类化合物的甲羟戊酸(mevalonate pathway, MVA)合成途径中,3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA Reducase, HMGR)是萜类生物合成途径中的关键酶,决定了下游萜类产物合成与积累的量。Chappell & Nable(1987)在研究中发现, HMGR 活性的急剧提高可以诱导倍半萜环化酶活性,同时提高倍半萜植物抗毒素的产量。在本实验中,相对光照强度在 85% 时,挥发油和莪术醇的含量最高,我们推测,一方面光照改变了莪术的生长环境,它通过自身调控,使同化物在其体内的积累与分配发生了改变,使莪术挥发油中的倍半萜类化合物积累增加。另一方面,光照可能对倍半萜类化合物合成的关键酶基因产生了影响,但是否影响了 HMGR 基因的活性还需进一步研究。

经回归分析莪术挥发油和莪术醇含量二者之间存在显著相关性,这一现象表明它们的合成途径有可能存在相似之处,验证了倍半萜类化合物是莪术挥发油中的主要成分。

参考文献:

- 中华人民共和国药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社:194
- Chappell J, Nable R. 1987. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor[J]. *Plant Physiol*, **85**:46
- Langenheim JH. 1994. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles[J]. *J Chem Ecol*, **20**(6):1 223—1 227
- Leng PS(冷平生), Su SC(苏淑叙), Wang TH(王天华), et al. 2002. Effects of light intensity and light quality on photosynthesis, flavonol glycoside and terpene lactone contents of *Ginkgo biloba* seedlings(光强与光质对银杏光合作用及黄酮苷与萜类内酯含量的影响)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境学报), **11**(1):1—4
- Li Q(李强), Ren Q(任茜), Zhang YL(张永良). 1994. Effects of ecological environment, collecting stages and storage time on chlorogenic acid content of *Loiricera Jerdinandii* French(生境、采收期、贮藏时间等因素对秦岭金银花绿原酸含量的影响)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **19**(10):594—595
- Qian DW(钱大玮), Ju JM(鞠建明), Zhu LY(朱玲英), et al. 2002. Study on changing rules for total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves at different ages of tree and collecting seasons(不同树龄银杏叶在不同季节中总黄酮和总内酯的含量变化)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), **33**(11):1 025—1 027
- Tao SH(陶曙红), Wu FE(吴凤镔). 2003. Effect of ecological environment on active constituents of medicinal plants(生态环境对药用植物有效成分的影响)[J]. *Nat Product Res Develop*(天然产物研究与开发), **15**(2):174—177
- Wang HT(王华田), Xie BD(谢宝东), Jiang YZ(姜岳忠), et al. 2002. Effect of solar irradiation intensity on leaf development and flavonoid and terpene content in *Ginkgo biloba* leaves(光照强度对银杏叶片发育及黄酮和内酯含量的影响)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*(江西农业大学学报), **24**(5):617—622
- Zhu YE(朱亚尔), Zhu XP(朱晓平). 2006. Determination of curcuminol in *Rhizoma Curcumae* by GC(毛细管色谱法测定莪术中莪术醇的含量)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **31**(5):72—74
- Li H(李恒). 1988. The aquatic vegetation in the Qiluhu Lake(杞麓湖水生植被)[J]. *J Yunnan Univ: Nat Sci*(云南大学学报:自然科学), **Suppl.**(增刊):81—86
- Li H(李恒). 1988. The aquatic vegetation and flora in Changhu lake(长湖水生植被和水生植物区系)[J]. *J Yunnan Univ: Nat Sci*(云南大学学报:自然科学), **Suppl.**(增刊):119—123
- Shen LX(沈立新), Liang LH(梁洛辉). 2005. Assessment on the resources and environmental situation of plants and animals in Beihai wetland(腾冲北海湿地动植物资源及其环境状况评价)[J]. *Fore Res Man*(林业资源管理), (2):61—79
- Wu HT(武海涛), Lu XG(吕宪国). 2005. A review on the study of wetland assessment in China(中国湿地评价研究进展与展望)[J]. *World Fore Res*(世界林业研究), **18**(4):49—53
- Wu ZY(吴征镒). 1991. The areal-types of chinese genera of seed plants(中国种子植物属的分布区类型)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **增刊 IV**:1—139, 141—178
- Wu ZY(吴征镒). 1993. The areal-types of chinese genera of seed plants(中国种子植物属的分布区类型)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **Suppl. IV**(增刊 IV):1—139, 141—178
- Yang GH(杨桂华). 1988. The physical geography features of Yuhu Lake and Changhu Lake(月湖、长湖的自然地理特征)[J]. *J Yunnan Univ: Nat Sci*(云南大学学报:自然科学), **Suppl.**(增刊):13—18
- Yuan J(袁军), Gao JX(高吉喜), Lu XG(吕宪国), et al. 2002. Assessment on wetland resources in Namucuo and counter measures for conservation and rational use(纳木错湿地资源评价及保护与合理利用对策)[J]. *Res Sci*(资源科学), **24**(4):29—34

(上接第 649 页 Continue from page 649)