

遮荫对忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量的影响

全妙华 余朝文 欧立军 陈东明

(怀化学院 生命科学系/民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室/
湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室,湖南 怀化,418008)

摘要 探讨不同光照强度条件下忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量变化,为忽地笑规范化栽培提供科学依据。采用 HPLC 方法测定了 100% 自然光、50% 遮荫和 85% 遮荫条件下忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量。3 种不同光强下忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量均表现为:50% 遮荫 > 85% 遮荫 > 100% 自然光,其中在 50% 遮荫条件下其含量均最高,与 100% 自然光的相比,分别提高了 35.88% 和 20.56%,差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。稳定性及回收率实验结果表明:HPLC 法测定忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量效果好,稳定性强,方法可靠;适度遮荫(如 50% 遮荫)可以提高忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量。忽地笑适宜在一定遮荫环境下栽培。

关键词 忽地笑; 遮荫; HPLC; 石蒜碱; 加兰他敏

中图分类号 R 282.2

文章编号 1007-4333(2012)04-0058-04

文献标志码 A

Effect of shading on contents of lycorine and galantamine in the bulb of *Lycoris aurea*

QUAN Miao-hua, SHE Chao-wen, OU Li-jun, CHEN Dong-ming

(Department of Life Sciences/Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources/
Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-Western Medicinal Plant and Ethnobotany,
Huaihua University, Huihua 418008, China)

Abstract Changing of lycorine and galantamine contents in the bulb of *Lycoris aurea* under different light intensity conditions were analyzed in order to provide scientific information for cultivation of *Lycoris aurea*. Contents of lycorine and galantamine in the bulbs under 100% natural light, 50% shading and 85% shading were determined by HPLC. The contents of lycorine and galantamine in the bulbs under the three different conditions were as following: 50% shading > 85% shading > 100% natural light. The contents of lycorine and galantamine under 50% shading were both the highest, and increased 35.88% and 20.56% compared with those under 100% natural light, respectively with high significant level ($P < 0.01$). The results determined by HPLC were highly repeatable, indicating that the method used in this study was reliable. Proper shading, such as 50% shading, increased contents of lycorine and galantamine in the bulb of *Lycoris aurea*. Thus *Lycoris aurea* was suitable for cultivation under moderate shading.

Key words *Lycoris aurea*; shading; HPLC; lycorine; galantamine

忽地笑 (*Lycoris aurea* (L' Her.) Herb.), 又名黄花石蒜, 为石蒜属中一种重要的多年生草本植物, 是一种传统的药用植物^[1]。其鳞茎中含较丰富的石蒜碱、加兰他敏、力可拉敏等生物碱, 可用于治疗食物中毒、风湿性关节炎等, 特别是加兰他敏用于

治疗老年性痴呆症、重症肌无力和小儿麻痹后遗症具有良好疗效^[2-4]。有文献报道忽地笑鳞茎中加兰他敏、石蒜碱等生物碱含量在石蒜属植物中位居前列, 是提取加兰他敏等药用成分的良好原料药^[5-7]。近几年来, 由于制药工业的大量加工, 原分

收稿日期: 2012-03-02

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金项目(11K051); 湖南省科技计划重点项目(2009FJ2008)

第一作者: 全妙华, 副教授, 主要从事植物生理生化等研究, E-mail: hhqmh100@163.com

布广、蕴藏量多的忽地笑野生资源急剧减少。因此,开展忽地笑人工栽培研究对该野生资源的保护和利用具有十分重要的指导意义。

生物碱是一类重要的植物次生代谢产物,是植物在长期进化中与环境(生物的与非生物的)相互作用的结果^[8-9]。光照作为植物生长发育过程中一个重要的环境因子,不仅作为能源而且还以环境信号的形式控制着植物的形态建成与生理生化代谢。光照强度的改变也影响植物的次生代谢过程^[10-11]。目前,对忽地笑的研究主要集中在化学成分、药理药效等方面^[12-14],但有关环境因子对忽地笑药用成分影响的研究鲜见报道^[15-17]。本试验通过设计不同遮荫处理对忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量的影响分析,确定有利于石蒜碱、加兰他敏等生物碱积累的光照条件,旨在为优质忽地笑的引种驯化和规范化栽培提供理论基础和实践指导。

1 材料与方法

1.1 研究用主要材料、仪器及试剂

忽地笑采自湖南省怀化地区同一产地的同一品系,经鉴定为石蒜属忽地笑(*Lycoris aurea* Herb.)。2009年8月,选取同样大小种球分别植入自然光和2种不同程度遮荫环境下共3个光照强度处理区中,小区面积各3 m²,栽植株行距为15 cm×20 cm。遮荫环境采用不同层黑色遮荫网进行遮光处理形成,3个光照强度处理区的相对透光率分别为100%(自然光,未遮荫)、50%(相当于50%遮荫)和15%(相当于85%遮荫)。设3次重复。试验期间,各处理区均采取同样的常规管理。2010年8月,于同一天采集各样地忽地笑鳞茎,洗净,65℃烘干,粉碎,过60目筛备用。

分析仪器:LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津)、DU-800紫外扫描分光光度计(美国贝克曼库尔特公司)和AL104分析天平(上海衡平仪器仪表厂)。主要试剂:加兰他敏标准品(纯度≥99%,美国Sigma公司),石蒜碱标准品(纯度≥98%,北京恒元启天化工技术研究院);甲醇为色谱纯;磷酸、盐酸和氯仿等试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 石蒜碱和加兰他敏标准品溶液的制备

准确称取石蒜碱和加兰他敏标准品各12.50 mg,用甲醇配制成浓度均为500 μg/mL的石蒜碱和加兰他敏溶液各25 mL,经0.45 μm微孔滤膜过

滤后即得。

1.2.2 忽地笑样品液的制备

准确称取各样品1.0 g,置于索氏提取器中,加甲醇100 mL在80℃水浴中加热回流3 h^[18],过滤;滤液用旋转蒸发仪旋干,残余物用2%盐酸10 mL溶解,过滤;滤液用1%氨水调pH至10.0,再用氯仿萃取3次,每次15 mL,合并氯仿液,再旋干;残余物用甲醇溶解,定容至10 mL,经0.45 μm微孔滤膜过滤后作为样品液。

1.2.3 波长扫描

以甲醇为空白对照,将加兰他敏标准液和样品液在200~600 nm波长范围内进行扫描。结果显示两者均在(288±2) nm处有最大吸收值,且吸收峰相似,故本试验选择288 nm为检测波长。

1.2.4 色谱条件探索

忽地笑样品液采用HPLC法进行分离纯化和含量测定。为了获得更好的试验效果,在设置二元浓度梯度基础上,进一步探索最佳流动相(含0.1%磷酸的水溶液-甲醇)比值,以期确定其最佳色谱条件。

1.2.5 忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量测定

1)线性关系考察。准确配制石蒜碱和加兰他敏2种标准品溶液,其质量浓度梯度为20.0、40.0、60.0、80.0和100.0 μg/mL。分别精密量取石蒜碱和加兰他敏标准品溶液各20 μL注入液相色谱仪,重复进样5次,记录峰面积,以浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,石蒜碱和加兰他敏的回归方程分别为 $y=41\ 652x-11\ 406$ ($R^2=0.999\ 5$)和 $y=49\ 171x-69\ 194$ ($R^2=0.999\ 1$)。

2)石蒜碱和加兰他敏含量测定。准确量取各样品溶液20 μL,按确定的色谱条件进行洗脱,记录峰面积,重复5次,根据回归方程计算含量。

2 结果与分析

2.1 色谱条件

通过多次洗脱实验,建立的色谱条件如下:色谱柱Agilent Eclipse XDB-C18(150 mm×4.6 mm),检测波长288 nm,流动相含0.1%磷酸的水溶液-甲醇(65:35),柱温25℃,流速1.0 mL/min,进样量20 μL。石蒜碱和加兰他敏标准液的色谱保留时间分别为6.178和10.805 min(图1),可见在该色谱条件下,石蒜碱和加兰他敏2种化合物的分离效果良好。

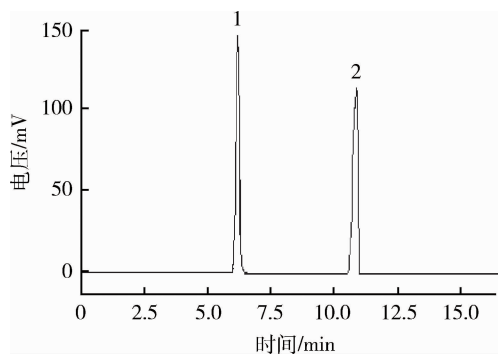


图1 石蒜碱(1)和加兰他敏标准品(2)的色谱图

Fig.1 Chromatogram of lycorine (1) and galantamine standard (2)

2.2 方法学考察

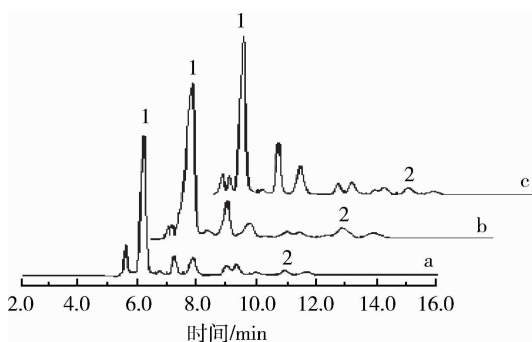
1) 精密度试验。分别准确吸取质量浓度均为 $100.0 \mu\text{g/mL}$ 的石蒜碱和加兰他敏标准液各 $20 \mu\text{L}$, 按确定的色谱条件进行洗脱, 记录峰面积, 计算得平均峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.68% 和 0.65% ($n=5$)。表明仪器精密度良好。

2) 稳定性试验。准确吸取样品溶液 $20 \mu\text{L}$, 按上述色谱条件分别于 0、2、4、6 和 8 h 进样进行洗脱, 记录峰面积, 计算得平均峰面积的 RSD 为 0.76% ($n=5$)。表明该样品液至少在 8 h 内稳定。

3) 加标回收率试验。准确称取 3 种不同忽地笑样品各 1.0 g , 分别加入适量的石蒜碱和加兰他敏标准品, 按“1.2.2”项下方法进行提取和制备溶液, 记录峰面积, 计算得回收率分别为 98.85% 和 98.97% ($n=5$)。说明其回收率考察符合测定要求。

2.3 不同光强条件下忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量变化

按上述确定的色谱条件对各样品进行分离纯化和含量测定。100% 自然光、50% 遮荫和 85% 遮荫条件下忽地笑样品液的色谱图如图 2, 石蒜碱和加兰他敏含量变化情况如图 3。由图 3 可知, 100% 自然光、50% 遮荫和 85% 遮荫条件下忽地笑鳞茎中石蒜碱含量分别为 302.1 、 410.5 和 $317.5 \mu\text{g/g}$, 加兰他敏含量分别为 60.3 、 72.7 和 $63.5 \mu\text{g/g}$, 并且在这 3 种不同光强下其鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量均表现为: $50\% \text{ 遮荫} > 85\% \text{ 遮荫} > 100\% \text{ 自然光}$, 其中在 50% 遮荫条件下石蒜碱和加兰他敏含量均最高, 与 100% 自然光的相比, 分别提高了 35.88% 和 20.56% , 通过软件 SPSS 16.0 进行方差分析, 差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。



a 为 100% 自然光(对照); b 为 50% 遮荫; c 为 85% 遮荫。

图2 忽地笑样品液的石蒜碱(1)和加兰他敏(2)色谱图

Fig.2 Chromatogram of lycorine (1) and galantamine (2) of *Lycoris aurea*

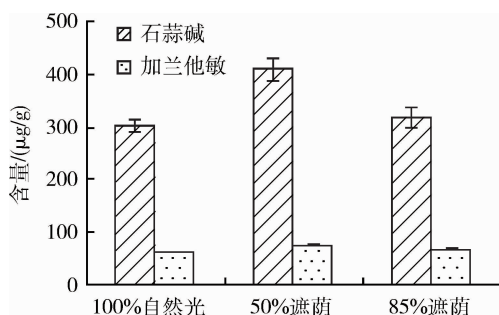


图3 忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量

Fig.3 Contents of lycorine and galantamine in the bulb of *Lycoris aurea*

3 结论与讨论

1) 本试验采用色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C18 ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$), 检测波长 288 nm , 流动相含 0.1% 磷酸的水溶液-甲醇 ($65:35$), 进样量 $20 \mu\text{L}$ 等条件建立的 HPLC 法, 对忽地笑鳞茎中复杂的化学成分进行分离纯化与测定, 获得了较好的实验效果。通过方法学考察研究表明, 实验重现性好, 稳定性强, 方法可靠, 可为忽地笑等石蒜属植物的石蒜碱、加兰他敏等生物碱含量测定提供新的检测方法。

2) 光照在植物的生长发育中起着十分重要的作用, 对于喜光植物来说, 荫蔽一般会影响到其生长发育; 而对于耐阴植物, 适度荫蔽有利于其生长和发育^[19]。大量研究表明, 光照、温度等环境因子既影响植物的光合、呼吸与蒸腾, 也影响植物次生代谢产物的形成和积累^[20-22]。一些研究表明, 适宜的光照强度能促进植物同化产物的积累, 从而利于次生代谢产物的合成; 光照强度的减弱诱导生物碱的积累

而使植物组织中生物碱含量增加^[23-24];如适当遮荫,人参根中皂甙^[25]、喜树幼苗叶片中喜树碱^[26]等次生代谢产物的含量均有不同程度的提高。本研究结果表明,50%遮荫环境条件下忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏含量均显著高于100%自然光(对照),说明光照是影响石蒜碱和加兰他敏合成的主要环境因子之一,适度遮荫可以提高忽地笑鳞茎中石蒜碱、加兰他敏等生物碱含量;结合遮荫试验前期研究结果发现,适度遮荫(50%遮荫)不仅有利于忽地笑植株生长和发育,而且其叶片的光合能力明显增强,有利于光合产物的积累^[27]。这些研究结果与上述文献报道的相关结论一致。但是也有研究表明,光强的增加有利于生物碱的合成^[28],如全光照有利于黄檗幼苗的小檗碱、药根碱等生物碱含量积累^[29]。唐中华等^[30]研究结果表明,长春花叶片中文朵灵和长春质碱含量在弱光条件下呈显著增加趋势,而它们的耦合产物长春碱合成和积累却受到抑制。从上述相关文献研究结果来看,光强对植物组织中生物碱合成的影响并不一致,甚至有相反的结果。可见,光强对生物碱等次生代谢产物合成的影响并不一定只是简单地通过初生代谢产物调控来实现的,还可能与其次生代谢过程中某些关键限速酶,如吲哚-3-甘油磷酸裂解酶(BX1)、酪氨酸/多巴脱羧酶(TYDC)、小檗碱桥酶(BBE)等^[8]的表达或抑制等因素有关,具体机理还有待深入研究。

综上所述,植物组织中生物碱等次生代谢产物的积累与光照条件有密切的关系。适度遮荫能够显著地增加忽地笑鳞茎中石蒜碱和加兰他敏的含量。这一结果对于以获取石蒜碱、加兰他敏等生物碱为目的的忽地笑栽培有一定的指导意义。

参 考 文 献

- 钱嘯虎,徐垠,胡之璧,等.中国植物志(第16卷第1分册)[M].北京:科学出版社,1985:16-27
- 马广恩.加兰他敏治疗老年性痴呆的研究概况[J].药学进展,1998,22(2):153-156
- 王晓燕,黄敏仁,韩正敏,等.石蒜属植物忽地笑中化学成分的GC-MS分析[J].中草药,2007,38(12):188,217
- 袁菊红,胡绵好.石蒜属种质资源及其开发利用研究(综述)[J].亚热带植物科学,2009,38(2):79-84
- 袁菊红,胡绵好,夏冰.石蒜属不同种间生物碱含量差异性研究[J].江西农业大学学报,2010,32(3):560-565
- 邓传良,周坚.石蒜属植物生物碱研究概况[J].中国野生植物资源,2004,23(6):13-14
- 谢峻,谈锋,冯巍,等.石蒜属植物分类鉴别、药用成分及生物技术应用研究进展[J].中草药,2007,38(12):1902-1905
- 王莉,史玲珍,张艳霞,等.植物次生代谢物途径及其研究进展[J].武汉植物学研究,2007,25(5):500-508
- 李承森.植物科学进展(第1卷)[M].北京:高等教育出版社,1998:293-304
- 韩忠明,赵淑杰,刘翠晶,等.遮荫对3年生东北铁线莲生长特性及品质的影响[J].生态学报,2011,31(20):6005-6012
- 佟璐,张宝友,唐中华,等.弱光胁迫对大田长春花生物量分配及次生代谢的影响[J].植物研究,2011,31(2):227-230
- 袁菊红.石蒜属化学成分及其提取、检测方法研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(2):684-686,692
- 茹巧美,裴真明,郑海雷.忽地笑多糖的体外抗氧化和抑菌活性研究[J].中药材,2008,31(10):1536-1540
- 秦昆明,李笑,徐昭,等.石蒜碱及其衍生物的药理作用研究概况[J].北京联合大学学报:自然科学版,2009,23(1):6-10
- 项忠平,魏绪英,蔡军火.石蒜属植物研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(3):1460-1462,1467
- 朱重胜,谢树禄.石蒜植物的种质资源、药用开发及其快速繁育[J].江西林业科技,2008(5):41-42
- 谢孔平,谷海燕.石蒜属植物的引种选育及快繁研究进展[J].资源开发与市场,2010,26(3):242-245
- 吴彦,周守标,万安.石蒜中总生物碱提取条件研究[J].生物学杂志,2007,24(1):61-62
- 王云贺,韩忠明,韩梅,等.遮荫处理对东北铁线莲生长发育和光合特性的影响[J].生态学报,2010,30(24):6762-6770
- 董娟娥,梁宗锁.植物次生代谢物积累量影响因素分析[J].西北植物学报,2004,24(10):1979-1983
- El-shazly A M, Dora G, Wink M. Alkaloids of *Haloxylon salicornicum* (Moq.) Bunge ex Boiss[J]. Pharmazie, 2005, 60(12):949-952
- 陈泉,李建国.栽培因子影响长春花生物碱含量的研究进展[J].热带农业科学,2009,29(4):49-53
- Hoeft M, Verpoorte R, Beck E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply[J]. Oecologia, 1996, 107:160-169
- Salmore A K, Hunter M D. Environmental and genotypic influences on isoquinoline alkaloid content in *Sanguinaria canadensis* [J]. J Chem Ecol, 2001, 27:1729-1747
- 张治安,徐克章,王英典,等.不同光强下人参植株中淀粉、可溶性糖和参根皂甙的含量变化[J].植物生理学通讯,1994(2):115-116
- 王洋,戴绍军,阎秀峰.光强对喜树幼苗叶片次生代谢产物喜树碱的影响[J].生态学报,2004,24(6):1118-1122
- 全妙华,李爱民,陆金婷,等.遮荫对石蒜属植物忽地笑光合特性的影响[J].中国农学通报,2011,27(10):144-148
- Koshiishi C, Kato A, Yoshida Y, et al. Purine alkaloid biosynthesis in young leaves of *Camellia sinensis* in light and darkness[J]. J Plant Res, 2000, 113:217-221
- 李霞,王洋,阎秀峰.光强对黄檗幼苗三种生物碱含量的影响[J].生态学报,2009,29(4):1655-1660
- 唐中华,郭晓瑞,于景华,等.弱光对长春花幼苗中可溶性糖、生物碱及激素含量的影响[J].生态学报,2007,27(11):4419-4424