

贯叶连翘的水培及其代谢产物检测

刘晓娜, 张秀清, 孙君社*

中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

摘要: 水培可诱导贯叶连翘组培苗生根能力强, 根活力也增加; 生根苗在 1/6MS 培养液中培养 6 周后的金丝桃素(HP)、假金丝桃素(PHP)和贯叶金丝桃素(HF)含量分别比基质[腐质土+蛭石(1:1)]中培养的提高 10.13%、16.00% 和 61.36%。

关键词: 贯叶连翘; 水培; 代谢产物; 金丝桃素

Hydroponic Culture and Determination of Metabolites in Common St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)

LIU Xiao-Na, ZHANG Xiu-Qing, SUN Jun-She*

College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: Hypericin (HP), pseudohypericin (PHP) and hyperforin (HF) were measured from common St. John's wort (*Hypericum perforatum*) shoots which were cultured in 1/2MS, 1/4MS and 1/6MS liquid media respectively, compared with vermiculate and humus soil medium. The results showed that rooting rate and roots activity were higher in liquid media than those in agar. HP, PHP and HF were increased by 10.13%, 16.00% and 61.36% respectively from the plantlets in hydroponic culture with 1/6 MS nutriment, after they were transferred to the liquid and soil (vermiculate and humus soil by half) for 6 weeks.

Key words: common St. John's wort (*Hypericum perforatum*); hydroponic culture; metabolites; hypericin

贯叶连翘又名贯叶金丝桃、圣约翰草, 是藤黄科(Clusiaceae)金丝桃属(*Hypericum*)植物, 为多年生草本植物; 主要分布于我国的华东、中南、西南、西北等地(中国科学院中国植物志编委会 1990)。贯叶连翘中的活性成分主要是金丝桃素(hypericin, HP)、假金丝桃素(pseudohypericin, PHP)和贯叶金丝桃素(hyperforin, HF)等化学物质(Chatterjee等 1998; Thiede和Walper 1994), 这些物质具有抗抑郁、抗病毒、抑菌等多种药理作用(尚若锋和梁建平 2005; 王泽剑等 2003; 许以明和陆传宗 2004)。在欧洲一些国家, 贯叶连翘作为镇静剂、抗炎药和烫伤药等广泛使用(侯团章 2004)。贯叶连翘主要以野生和大田种植为主, 由于HP等植物有效成分的合成易受外界环境的温度、相对湿度、光照以及土壤中微量元素含量变化的影响(Böttcher等 2003; Murch等 2003; Southwell和Bourke 2001), 进而影响商品化贯叶连翘提取物的产品质量(Ang等 2002)。采用人工繁殖贯叶连翘, 可以有效避免气象条件、病虫害和土壤等因素导致的不利影响, 促进生物量增加和有效成分的合成。此外, 植物水培有促进营养

物质吸收、水分充分供应、植物生物量增加快和管理方便等特点, 目前在鲜切花和蔬菜培养中已得到快速发展和应用, 但水培技术在中草药植株培育中的研究, 尤其是水培条件下中草药活性成分代谢变化的研究报道较少。本文研究水培条件下贯叶连翘组培苗诱导生根规律、生根植株移栽于基质与水培 2 种条件下的 HP、PHP 和 HF 代谢变化以及贯叶连翘植株水培的基本培养条件, 为其进一步工业化生产积累基础资料。

材料与amp;方法

贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.)种子(中国药用植物研究所植物园供给)用 4.5%次氯酸钠浸泡 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 接入 MS 无激素固体培养基中, 20 d 后将萌发芽接入含有 0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ IBA 的 MS 琼脂培养基中继代培养, 继代培养周期 25 d。MS 培养基中含 0.6% 琼

收稿 2006-08-04 修定 2006-11-29

资助 国家自然科学基金(20506029)。

*通讯作者(E-mail: sunzh435@163.com; Tel: 010-62737501)。

脂和3%蔗糖。所有培养置于 (25 ± 2) °C组培室中,光照强度为 (72.35 ± 2.96) $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

检测生根和根活力时,将继代组培苗切成 $20\sim 25\text{ mm}$ (带有 $3\sim 4$ 个节点),分别接入MS、MS(氮含量减半,1/2N)的固体或液体生根培养基中,添加 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA,置于转速为 90 rpm 的水平旋转摇床振荡培养诱导生根,25 d后统计生根率和平均生根数,并采用TTC法(张治安等2004)测定根系活力。

贯叶连翘组培苗在含有 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的MS液体培养基中诱导生根14 d后,敞开瓶口炼苗 $5\sim 7\text{ d}$,取出植株并冲洗干净,分别移栽入腐殖土+蛭石(1:1)的基质及1/2MS、1/4MS和1/6MS营养液中,于 (25 ± 2) °C、光照强度为 (72.35 ± 2.96) $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的条件下培养。基质培养的每2 d浇灌1次自来水;植株扦插于带孔泡沫塑料板上,根部浸在营养液中培养,1周更换营养液1次;2种方法均罩塑料薄膜防止失水。培养2周后,分别剪去顶端以促进腋芽生长;培养6周后,剪取植物顶端约 10 cm 的茎叶部分用高效液相色谱(HPLC)检测PHP、HP及HF的含量。

以HPLC检测时,取冷冻干燥 18 h 的样品,经研钵研磨后称取 0.2 g 样品,加入 10 mL 含2%吡啶的甲醇溶液,并于冰浴中超声波提取 15 min ,以 $4\ 000\times g$ 冷冻离心 15 min ,得到的上清提取液经 $0.45\ \mu\text{m}$ 尼龙膜过滤后用于HPLC分析。所有提取过程尽量避光和保持低温,防止提取物的光和热分解。

采用日本岛津高效液相色谱分析检测,SCL-10 A控制器和SPD-M10A检测器,Diamonsil C 18($5\ \mu\text{m}$, $4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$)色谱柱;进样量为 $20\ \mu\text{L}$,流动相为乙腈和 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三乙胺乙酸缓冲液(80:20),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。HF(97.0%,德国Alexis公司)于波长 290 nm 处检测,HP(95.0%,美国Fluka公司)和PHP(98.0%,德国Alexis公司)于波长 588 nm 处检测。以甲醇为溶剂配制HF(2.5 、 5.0 、 10.0 、 25.0 和 $50.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、PHP(5.0 、 7.5 、 10.0 、 25.0 、 50.0 和 $75.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和HP(1.0 、 2.0 、 4.0 、 6.0 和 $10.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)标准溶液。峰面积与浓

度标准曲线相关性($R^2>0.99$)为: $y=8.846\times 10^{-5}x+3.755\times 10^{-2}$ (HF), $y=2.922\times 10^{-5}x+1.082$ (PHP), $y=8.375\times 10^{-6}x+0.436$ (HP); x 为峰面积, y 为浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

生根试验中每个处理用100个外植体,重复3次;水培和移栽试验的每个处理为 $40\sim 50$ 个外植体,重复2次。数据分析采用One-Way Anova和t检验(SPSS 11.0)。

结果与讨论

1 培养基种类和培养方式对贯叶连翘组培苗生根的影响

3种不同培养条件下,贯叶连翘组培苗都可在1周内形成不定根,固体和液体培养基中的生根率均为90%左右,差异不显著(图1-a)。植物在静置水培条件下诱导的根活力最高为 0.433 mg

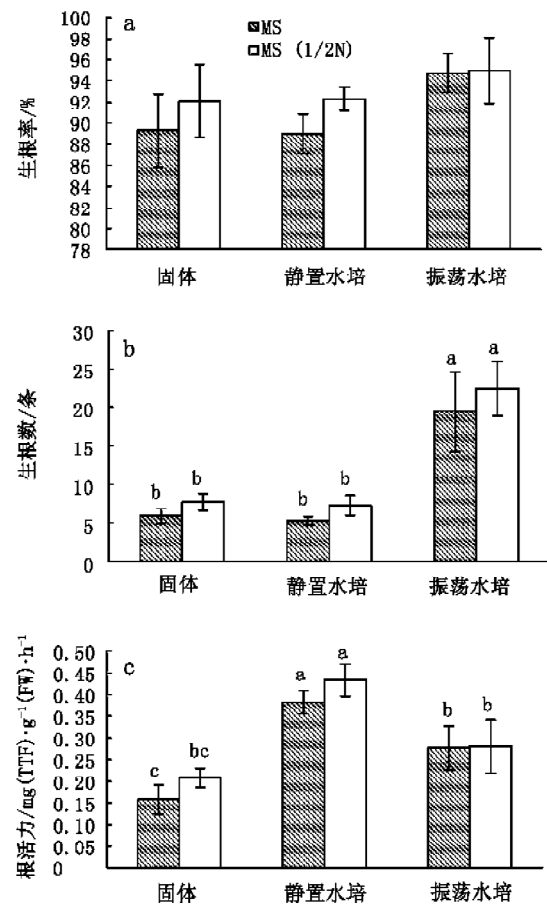


图1 培养基种类和培养方式对贯叶连翘生根的影响

Fig. 1 Effects of different media and culturing methods on rooting of *H. perforatum*

图中相同字母表示差异不显著($P<0.05$)。

(TTF)·g⁻¹ (FW)·h⁻¹, 分别是振荡水培和固体培养诱导的1.5和2.5倍。振荡水培可提高平均生根数, 单个植株最高可诱导出25条根(主根与侧根之和), 显著高于固体和静置水培的。静置水培的生根数与固体培养的差异不显著。MS (1/2N)与MS培养基的组培苗生根率、生根数和根活力差异也不显著。

2 培养基质对贯叶连翘生根苗代谢产物含量的影响

生根苗经驯化后, 分别移入1/2MS、1/4MS和1/6MS营养液和腐殖土+蛭石(1:1)的基质中, 培养6周的过程中, 水培苗节点的增加速度和新腋

芽分化都高于基质培养的。在1/6MS营养液生长的水培苗, 其PHP、HP和HF的含量均显著高于基质移栽苗(表1), HF含量提高61.36%, PHP和HP分别提高16.00%和10.13%。1/6MS营养液中培养的贯叶连翘, 其PHP含量比1/2MS提高12.34%, HF含量也有提高但差异不显著。3种营养液对贯叶连翘的HP含量影响差异不显著。水培苗的PHP和HP含量均比继代组培苗的低1倍左右, 显著降低, 而HF含量却有增加, 说明贯叶连翘中PHP和HP的代谢途径可能是相同, 而HF的代谢途径可能不同。

表1 不同基质培养的贯叶连翘生根苗中PHP、HP和HF含量变化

Table 1 Changes in PHP, HP and HF of *H. perforatum* plantlets in different media

培养条件	PHP含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	HP含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	HF含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)
继代组培苗	1440.50±69.75 ^a	95.37±7.23 ^a	10.79±1.98 ^b
1/2MS水培	742.14±29.67 ^c	71.29±3.59 ^b	16.41±1.28 ^a
1/4MS水培	794.10±31.79 ^b	70.08±4.03 ^b	17.17±1.12 ^a
1/6MS水培	846.58±42.36 ^b	68.25±2.04 ^b	18.25±1.56 ^a
蛭石+腐殖土	729.84±21.72 ^c	61.97±2.22 ^c	11.31±0.98 ^b

同列中相同字母表示差异不显著($P<0.05$)。

总之, 贯叶连翘可以水培代替基质培养, 其根活力增强, 植物生长速度快, PHP、HP和HF含量高; 环境因素可以人工控制, 这就避免了环境因素对其药用成分含量的影响。

参考文献

侯团章(2004). 中草药提取物(第1卷). 北京: 中国医药科技出版社, 28
 尚若锋, 梁建平(2005). 防治禽流感及其他RNA病毒的新兽药——金丝桃素. 畜牧市场, (10): 42
 王泽剑, 梁翠玲, 王志铭(2003). 圣约翰草提取物的临床研究进展. 国外医学: 脑血管疾病分册, 11(3): 212~214
 许以明, 陆传宗(2004). 人类免疫缺陷病毒(HIV)的空间结构及金丝桃酮素诱导的HIV光敏损伤的Raman光谱研究. 中国科学(C辑), 34(5): 444~458
 张治安, 张美善, 蔚荣海主编(2004). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业科学技术出版社, 36~37
 中国科学院中国植物志编委会(1990). 中国植物志(第50卷, 第2分册). 北京: 科学出版社, 60~61

Ang CY, Cui Y, Chang HC, Luo W, Heinze TM, Lin LJ, Mattia A (2002). Determination of St. John's wort components in dietary supplements and functional foods by liquid chromatography. J AOAC Int, 85 (6): 1360~1369
 Böttcher H, Günther I, Kabelitz L (2003). Physiological postharvest responses of common Saint-John's wort herbs (*Hypericum perforatum* L.). Postharvest Biol Technol, 29 (3): 342~350
 Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Muller WE (1998). Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. Life Sci, 63 (6): 499~510
 Murch SJ, Haq K, Rupasinghe HPV, Saxena PK (2003). Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Environ Exp Bot, 49 (3): 251~257
 Southwell IA, Bourke CA (2001). Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). Phytochemistry, 56: 437~441
 Thiede HM, Walper A (1994). Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* extracts and hypericin. J Geriatr Psych Neurol, 1: 54~56