

中国盾叶薯蓣主要居群种质分析*



黄春洪, 杭悦宇*, 周义锋, 郭可跃, 李 正

(江苏省中科院植物研究所 江苏省植物迁地保护重点实验室,
江苏 南京 210014)

HUANG C H

摘 要: 应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)对中国重要的甾体激素药源植物盾叶薯蓣具有代表性的 9 个野生居群和 3 个栽培居群的薯蓣皂苷元含量进行了测定,分析了经引种至江苏南京栽培 1 a 后各居群薯蓣皂苷元含量变化、根茎的年生长量以及根茎含水量。结果表明:薯蓣皂苷元含量及其栽培前后含量变化与盾叶薯蓣种质有关,不同种质之间差异较大;栽培居群根茎生长量明显高于野生居群。薯蓣皂苷元含量及其变化与根茎中水分含量无明显相关性。薯蓣皂苷元含量的遗传稳定性应作为优良种质筛选的首要标准。

关键词: 盾叶薯蓣; 居群; 薯蓣皂苷元; 反相高效液相色谱法

中图分类号: Q949.718.27

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2003)02-0068-05

ANALYSIS ON QUALITY OF SOME MAIN POPULATIONS OF *DIOSCOREA ZINGIBERENSIS* IN CHINA

HUANG Chunhong, HANG Yueyu, ZHOU Yifeng, GUO Keyue, LI Zheng

(*Jiangsu Provincial Key Lab for Plant ex. Situ. Conservation, Institute of Botany, Jiangsu
Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: By RP-HPLC method, diosgenin content of *Dioscorea zingiberensis* collected from 9 wild populations and 3 cultured populations in China were determined. The change of diosgenin content and weight of rhizoma were also tested after introduced from their native sites to Nanjing, Jiangsu Province and cultivated for a year. The result showed that diosgenin content in a year and the annual enlargement of root vary among different populations. *D. zingiberensis* of cultured populations has significant root enlargement and less diosgenin content than those of wild populations. In addition, the diosgenin content and its change are not correlated with water content. It concludes that the hereditary maintenance of diosgenin content should be considered as the principal criterion in selection of cultivar.

Key words: *Dioscorea zingiberensis*; population; diosgenin; RP-HPLC

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* Wright.)为薯蓣科薯蓣属植物,是以林地为生境的我国特有植物。其根茎俗称黄姜,主要的有效成分为薯蓣皂苷元。薯蓣科植物为世界上提取合成激素类药物和避孕药前体的最重要的植物原料,全世界薯蓣类植物薯蓣皂苷元含量在 1% 以上的仅有 30 余种,重量法测得盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元单株最高含量达 16.15%^[1]。因此盾叶薯蓣是薯蓣科植物中最优良的薯蓣皂苷

* 收稿日期: 2002-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270108); 江苏省农业科技攻关项目(BE2001356)

作者简介: 黄春洪(1979-),男,江西新余人,硕士研究生,从事药用植物遗传多样性方面的研究。

* 通讯联系人: E-mail: hangyueyu@21cn.com

元资源植物。随着皂素工业的发展和国际市场对薯蓣皂素需求量的增加,野生的盾叶薯蓣资源已经不再能够满足生产需求,盾叶薯蓣药材的获取正逐渐从野生向栽培转变。但由于种质和栽培措施问题,栽培的盾叶薯蓣薯蓣皂苷元含量多在 1% 以下,难以达到工业生产的要求。为了解决这一问题,除了进行生态因素对薯蓣皂苷元影响的研究^[2-3]以外,研究者们还对种质本身的一些因素及其变化开展了研究,如丁志遵^[1]等将武当山的高含量野生盾叶薯蓣(薯蓣皂苷元含量为 7%) 分别引种于江苏南京和浙江仙居,盾叶薯蓣植株生长良好,但薯蓣皂苷元含量分别下降了 4% 和 5%; 与此相比较,朱延钧等^[4]将武当山的高含量野生盾叶薯蓣在武当山本地栽培 2 a 后,薯蓣皂苷元的平均含量下降了 2.4%,说明除去生态因素外,盾叶薯蓣种质的遗传稳定性是决定栽培盾叶薯蓣薯蓣皂苷元含量高低的主要因素。长期以来,人们在栽培种质的选取上是单纯的以筛选高含量种质为目标,而忽视了薯蓣皂苷元含量的遗传稳定性,致使栽培中种质不断退化,含量逐年下降,因此薯蓣皂苷元含量成为整个皂素生产的瓶颈,使生产成本提高,制约了工业的扩大生产。

本研究根据盾叶薯蓣在我国的资源分布情况,结合丁志遵^[1]、怀志萍^[3]等的研究结果对盾叶薯蓣分布区进行了合理的区划,选择了 12 个代表居群(9 个野生和 3 个栽培的),并在南京趋同栽培 1 a,通过对栽培前及栽培 1 a 后各居群薯蓣皂苷元平均含量测定比较、根茎含水量与薯蓣皂苷元的相关性、各居群根茎年生长量比较及与薯蓣皂苷元的相关性等研究,从中国盾叶薯蓣较全面的居群分析的角度,分析和探讨盾叶薯蓣种质与有效成分薯蓣皂苷元的相关性,以利于盾叶薯蓣的科学采集、栽培和开发。

薯蓣皂苷元的含量测定,国内外报道的方法有多种,经典方法有:重量法^[5]、比色法^[6]、库仑法和薄层扫描法^[7];现代方法有:气相色谱法^[8-9]、高效(正相,反相)液相色谱法^[10-12]以及毛细管气相色谱法^[13]等。经典的方法对仪器要求不高,但灵敏度低,分离效果差。由于此类皂苷的种类繁多,在各种薯蓣植物中的含量不一^[1],因此经典的方法很难对薯蓣皂苷元准确测定。色谱的方法可以很好地排除相关物质的干扰,但由于薯蓣皂苷元沸点高,气相色谱条件要求苛刻,因此也不被普遍使用。本研究根据薯蓣皂苷元极性大的特点,建立了一套改良的反相高效液相色谱的方法,对盾叶薯蓣中的薯蓣皂苷元进行了测定。

1 实验部分

1.1 实验材料

分析材料取自于 9 个野生居群和 3 个栽培居群(见表 1),2002 年 11 月中旬取材,均为 2 a 生根茎段,每居群取 10 个单株。60 °C 干燥至恒重,打粉,混合。

根茎生长量测定采用称重法:在分析材料处理之前,将表 1 中各居群,每居群取 10 个单株,洗净,去根,晾干,天平称重。取样和测定时间为 2002 年 11 月中旬。

1.2 薯蓣皂苷元提取及供试品溶液配制

称取上述经过处理的盾叶薯蓣根茎粉约 4 g,置圆底烧瓶内,加入 2 mol/L 硫酸 100 mL,90 °C 水浴加热回流水解 4 h。水解毕,冷却,过滤,残渣用饱和的 Na₂CO₃ 溶液中和,用蒸馏水洗至中性,回收,60 °C 下真空干燥。干燥后的粉末用滤纸打包,置索氏提取器中,80 °C 条件下用石油醚热提取 6 h。提取溶液加热挥去石油醚,并真空干燥,得到薯蓣皂苷元粗提物,甲醇(分析纯)溶解,定容置 50 mL 容量瓶中。

1.3 试剂、仪器及色谱条件

实验用试剂甲醇、硫酸、石油醚(60~90 °C)皆为分析纯。薯蓣皂苷元标准品购自中国生物制品检定所。

HPLC 仪:Agilent 1100 series;色谱柱为 Agilent Eclips DC-C₁₈ 柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm);流动相:甲醇(经超声浴抽气 30 min),流速:1 mL/min, DAD 检测器,检测波长:208 nm,柱温:30 °C,进样量 5 μL。

1.4 标准品溶液的配制

准确称取薯蓣皂苷元标准品,用流动相(甲醇)配制成 1.33 mg/mL 的对照品溶液。

2 实验方法学考察

2.1 线性范围与标准曲线

薯蓣皂苷元标准品溶液进样量分别为 1、2、3、4、5 和 6 μL 。薯蓣皂苷元的量在 1.33~ 7.98 μg 的范围内, 线性关系良好。回归方程:

$$Y = 234.5X + 9.865$$

式中: Y —峰面积积分值; X —薯蓣皂苷元标准品质量, μg 。 $R = 0.9999$ 。

2.2 精密度实验

取薯蓣皂苷元标准品, 重复进样 2 μL 4 次, 测定峰面积, 计算相对标准偏差(RSD)为 2.99%。平均保留时间为 6.852 min, RSD 为 0.73%。

2.3 溶液稳定性试验

取同一供试品溶液在 1 d 内重复进样 3 次, 10 d 后再次进样, 测定峰面积, 计算峰面积的日内和日间相对标准偏差(RSD), 分别为 3.61% 和 6.5%, 保留时间的变异系数分别为 0.64% 和 1.15%。说明供试品溶液在所测期间基本稳定。

2.4 回收率试验

精密称取同一批号样品 3 份, 分别加入精密称取的薯蓣皂苷元标准品 2 mg, 按上述步骤操作, 定容至 10 mL, 进样 5 μL 测定, 回收率为 97% ($n = 3$)。

3 结果与讨论

3.1 实验方法学

实验方法学考察表明: 该试验重复性好, 精密度和准确性高, 薯蓣皂苷元标准溶液和样品溶液能长时间保持稳定。本实验条件下, 能很好地将薯蓣皂苷元峰与杂质峰分开(见图 1), 保证了测定结果的准确性。

3.2 各居群薯蓣皂苷元含量及引种前后含量变化

HPLC 测定的结果见表 1。结果表明, 2001 年四川云阳盾叶薯蓣野生居群的薯蓣皂苷元平均含量较高, 达到 1.71%; 四川的营山、湖南永顺及安化的野生居群薯蓣皂苷元平均含量超过 1%。在南京栽培 1 a 后, 大部分居群薯蓣皂苷元平均含量略有升高, 尤其是 3 个栽培居群, 均有升高, 最多升高达 1 倍(湖北保康栽培居群)。野生居群薯蓣皂苷元平均含量栽培后有升有降。

9 个野生居群中, 云阳和武当山居群含量下降显著, 这与丁志遵^[1]、朱延钧^[4]等的研究结果相一致。但值得注意的是, 朱延钧等的栽培试验是在野生盾叶薯蓣的原产地——武当山进行的, 外因(生长条件)对薯蓣皂苷元含量的影响降至最小, 薯蓣皂苷元含量的下降显然和其种质有关。可见, 在评价一份种质是否适合作栽培种时, 薯蓣皂苷元含量高低不应该作为首要指标, 种质的含量是否能够稳定遗传或在栽培区能否保持才是最重要的指标。将盾叶薯蓣从野生居群引种至自然不分布的江苏省, 栽培试验表明: 宜昌、万源、营山、永顺和安家居群 2 年生根茎薯蓣皂苷元含量保持稳定或略有增长, 可以说明这些居群有着比云阳、武当山等居群更稳定的遗传特性。

3.3 各居群根茎年生长量比较及与薯蓣皂苷元含量的的关系

2 年生根茎重量(质量)测定分析结果表明, 栽培居群根茎年平均增重率均比野生居群高, 安康居群平均增重率最高, 为原种茎的 21.43 倍。野生居群中宜昌、营山两个种群根茎平均增重率最高, 均增重 10 倍左右。各居群单株间的增重率差异很大, 变异系数(C. V.)均大于 10%, 结果见表 2(其中, 取样时间为 2001 年 11 月~ 2002 年 1 月, $n = 10$)。

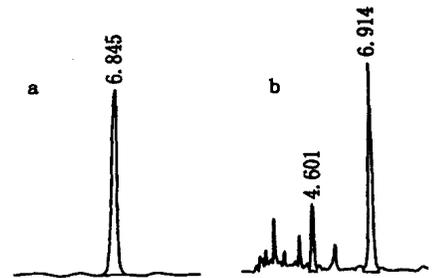


图 1 薯蓣皂苷元 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of diosgenin

a: 标准品 authentic diosgenin

b: 样品 sample(crude extract of diosgenin)

表 1 不同居群盾叶薯蓣薯蓣皂苷元平均含量及含水量

Table 1 Diosgenin content and water content in rhizoma of *D. zingiberensis* sampled from different populations

序号 No.	样品来源 sampling place	海拔/m altitude	习性 habitat	薯蓣皂苷元含量 diosgenin content/ %		含水量 water content/ %	
				2001. 11	2002. 11	2001. 11	2002. 11
1	湖北郧西 Yunxi, Hubei	210	栽培 cultured	0. 8	0. 91	57. 2	67. 9
2	湖北保康 Baokang, Hubei	200	栽培 cultured	0. 52	1. 10	68. 4	60. 3
3	陕西安康 Ankang, Shanxi	580	栽培 cultured	0. 61	0. 71	66. 5	66. 4
4	湖北宜昌 Yichang, Hubei	300	野生 wild	0. 4	0. 63	68. 7	41. 4
5	陕西留坝 Liuba, Shanxi	760	野生 wild	0. 86	0. 78	65. 5	66. 9
6	四川万源 Wanyuan, Sichuan	700	野生 wild	0. 91	1. 22	63. 3	68. 6
7	四川营山 Yingshan, Sichuan	450	野生 wild	1. 17	1. 55	73. 8	74. 5
8	重庆云阳 Yunyang, Chongqing	240	野生 wild	1. 71	0. 84	60. 4	75. 7
9	湖南永顺 Yongshun, Hunan	600	野生 wild	1. 03	1. 04	62. 5	67. 1
10	湖南安化 Anhua, Hunan	350	野生 wild	1. 04	1. 00	63. 7	64. 9
11	陕西白河 Bahe, Shanxi	680	野生 wild	—	1. 29	—	66. 3
12	湖北武当山 Wudangshan, Hubei	1100	野生 wild	4. 15 ¹⁾	1. 94	—	68. 2

1) 该种质为丁志遵研究员提供, 薯蓣皂苷元含量为重量法测得。

表 2 盾叶薯蓣不同居群根茎年生长率比较

Table 2 Annual change of roots' weight of *D. zingiberensis* among different populations

序号 No.	样品来源 sampling place	平均增重倍数 average of enlargement times	标准差 standard deviation	变异系数/ % coefficient of variation
1	郧西 Yunxi	15. 92	15. 80	99. 25
2	保康 Baokang	10. 64	8. 43	79. 23
3	安康 Ankang	21. 43	18. 69	87. 21
4	宜昌 Yichang	10. 38	10. 82	104. 23
5	留坝 Liuba	8. 68	3. 96	45. 62
6	万源 Wanyuan	7. 87	5. 41	68. 74
7	营山 Yingshan	9. 60	8. 46	88. 13
8	云阳 Yunyang	6. 91	4. 56	66. 00
9	永顺 Yongshun	7. 40	3. 28	44. 32
10	安化 Anhua	4. 06	5. 67	139. 66

3 个栽培居群中, 安康居群的平均增重率最高, 但含量最低。野生居群中根茎年增重率最高的为宜昌居群, 但薯蓣皂苷元含量是所有野生居群中最低的, 可见高含量、高产量难以在同一份种质中体现。怀志萍等^[3]在湖北武当山地区的研究结果也表明: 盾叶薯蓣根茎鲜重与含量的相关系数为 $R = -0.4329$, $r_{0.05, 11} = 0.5760$, 相关性不显著。产量和含量两个性状之间是否存在消长规律有待于进一步研究。

3.4 薯蓣皂苷元含量与水分含量相关性

从表 1 不难看出, 大部分居群栽培后水分含量上升。两年度的测定结果表明: 薯蓣皂苷元含量的变化和根茎中水分含量变化有关, 基本上成反比变化, 如保康居群, 薯蓣皂苷元含量升高, 水分含量下降; 相反的, 云阳居群薯蓣皂苷元含量下降 0.87%, 水分含量增加了 15.3%。根据表 1, 分别计算出各居群薯蓣皂苷元含量与水分含量变化值, 回归分析:

$$Y = 2.467 - 14.041x$$

式中: Y —水分含量变化百分数; X —薯蓣皂苷元含量变化百分数。

结果显示, $R = 0.7710$, 两者的相关性不明显。

关于水分含量和薯蓣皂苷元含量的关系, 丁志遵^[1]等曾经对武当山的 233 个野生盾叶薯蓣单株的薯蓣皂苷元和含水量进行了测定, 统计结果认为: 薯蓣皂苷元含量高, 根茎含水量也高。谭远友^[14]等对栽培的盾叶薯蓣分雌雄株进行了单株全年的含水量和薯蓣皂苷元含量的检测, 认为根茎含水量与皂苷元含量之间无一致关系。本试验的测定结果反映的是从野生到栽培过程中盾叶薯蓣根茎含水量和薯蓣

皂苷元含量的变化关系,认为盾叶薯蓣含量变化与水分含量变化呈负相变化,两者相关性不显著。与前者结果不一致,还可能是因为本实验采取的是混合取样,材料来源不同,未能反映单株的变异相关性。含水量和薯蓣皂苷元含量关系复杂,两者的相关性(单株分析)是否显著,以及是否能够依据水分含量来评判薯蓣皂苷元含量、作为筛选高含量种质的一种便利方法需要更多的实验来证明。

4 结 论

4.1 本研究采用的薯蓣皂苷元提取和测定方法快速准确,分离效果好,样品溶液能长时间保持稳定,重复性好。

4.2 薯蓣皂苷元含量及其栽培前后含量变化与盾叶薯蓣种质有关,不同种质之间差异较大;栽培居群根茎生长量明显高于野生居群。除环境因素外,薯蓣皂苷元的含量稳定性与其遗传因素有关。

4.3 综合薯蓣皂苷元含量和根茎年增重倍数两个因素,认为栽培居群中保康居群、野生居群中营山居群种质较好。

4.4 薯蓣皂苷元含量与根茎中的水分含量有一定的相关性,其内在联系有待于深入研究。

致谢:丁志遵、秦慧贞研究员提供部分实验材料,在论文的撰写过程中,得到2位专家的指导,在此特表谢忱!

参考文献:

- [1] 丁志遵,唐世蓉,秦慧贞,等. 甾体激素药源植物[M]. 北京:科学出版社,1983.
- [2] 丁志遵,胡同钰,王年鹤,等. 土壤因素对小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣根茎中薯蓣皂苷元含量的影响[A]. 南京中山植物园论文集[C]. 南京:江苏科技出版社,1983. 133-134.
- [3] 怀志萍,丁志遵,贺善安,等. 盾叶薯蓣薯蓣皂苷元含量与气候因素的相关性研究[J]. 药学报,1989,24(9):702-706.
- [4] 朱延钧,树立华,张国才. 武当山盾叶薯蓣生态环境及其分布规律[J]. 资源开发与市场,1998,14(3):124-125.
- [5] 唐世蓉,张涵庆,庞自洁,等. 薯蓣科植物甾体皂苷元的含量和鉴定[J]. 植物学报,1979,21:171-176.
- [6] SLACK S C, MEDER W J. Colorimetric assay for diosgenin and related compounds[J]. Analytical Chemistry, 1961, 33(4): 625-627.
- [7] 徐礼焱,刘爱茹. 薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的测定[J]. 药学报,1984,19(2):141-145.
- [8] 陶 莉,达晖宁,达世禄. 盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的气相色谱测定[J]. 中草药,1991,22(6):252-253.
- [9] ROZANSKI A. A simplified method of extraction of diosgenin from *Dioscorea* Tubers and its determination by using gas liquid chromatography[J]. Analyst, 1972, 97(11):968-972.
- [10] 赵景婵,郭治安,成小飞,等. 穿龙薯蓣中薯蓣皂苷元的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志,2000,20(1):27-28.
- [11] 达世禄,唐祥怡,达晖宁. 盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的高效液相色谱测定[J]. 色谱,1992,10(2):98-99.
- [12] 都述虎,王晓华,夏重道,等. RP-HPLC法测定穿龙薯蓣总皂苷中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国药科大学学报,2001,32(1):37-40.
- [13] 都述虎,王晓华,夏重道,等. 穿龙薯蓣总皂苷中薯蓣皂苷元含量的毛细管气相色谱法研究[J]. 药物分析杂志,2001,21(2):116-119.
- [14] 谭远友,余展深,齐迎春,等. 栽培盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元含量与质量的动态变化[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2000,18(1):17-18.