

《中国药典》2005年版第一部对丹参药材中丹参酮Ⅱ_A和丹酚酸B的含量要求是按干燥品计算不少于0.2%和3.0%。而有文献报道^[5],河北安国地产丹参药材和河北行唐的丹参药材丹参酮Ⅱ_A质量分数分别为0.04%和0.05%,而丹酚酸B为2.89%和3.74%。本实验的材料,无论是毛状根还是原药材,其丹参酮Ⅱ_A的含量都达不到药典要求。而水溶性的丹酚酸B的含量相对较高,而且,毛状根中比药材的含量还要高,可作为丹参水溶性制剂的原料,以扩大药用资源。

为保证实验的可控性,本实验对培养基的量和接种毛状根的量都有控制,尽量将误差减少到最低。在实际生产中,有报道可以用一些气升式反应器^[2],增长倍数远远高于实验室培养。根据本实验的结果,在固体培养基中培养的毛状根,收获时应选择6周比较

合适,此时毛状根的增长倍数大,而有效成分相对来说也比较高。这些结果对进一步研究丹参毛状根的生产、药理、药效等提供了科学的参考依据。从而为系统的研究丹参毛状根性状打下了基础。

[参考文献]

- [1] 张荫麟,宋经元,吕桂兰,等.丹参毛状根培养的建立和丹参酮的产生[J].中国中药杂志,1995,20(5):269.
- [2] 邱德有,宋经元,马小军,等.丹参毛状根生物反应器大规模培养的研究[J].分子植物育种,2004,2(5):702.
- [3] 黄炼栋,胡之璧,刘 涤.丹参毛状根中水溶性酚酸类化合物的产生简报[J].植物生理学报,1997,33(4):260.
- [4] 中国药典[S].一部.2005:52.
- [5] 金樟照,祝 明,张文婷,等.不同产地丹参水溶性成分和脂溶性成分指纹图谱测定及相关性研究[J].中草药,2004,35(10):1176.

[责任编辑 张宁宁]

冬凌草组织培养物中主要次生代谢产物积累动态的研究

苏秀红,董诚明*,王伟丽,冯卫生

(河南中医学院 中药学院,河南 郑州 450008)

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Henmsl.) Hara 为唇形科香茶菜属多年生植物。许多学者对冬凌草化学成分、药理作用及临床疗效进行了研究,发现其中主要抗癌、抗菌活性成分为二萜类化合物(冬凌草甲素、冬凌草乙素)和多酚类化合物迷迭香酸,并对其作了较深入的研究^[1-3]。萜类物质积累与分布不仅具有较强的组织特异性,而且与植株的生长发育存在着一定的相关性。迷迭香酸作为冬凌草水溶性部分中主要的有效成分,具有较好的抗菌、消炎、止痛的功效^[3]。对彩色紫苏 *Coleus blumei* Benth. 和洋苏草 *Salvia officinalis* L. 等一些植物的研究表明培养细胞中迷迭香酸含量远远超过原植物,因此,利用生物

技术生产迷迭香酸的研究越来越受到人们的关注^[4]。有关冬凌草组织培养的研究虽然已有相关报道^[5,6],但对其培养物中主要次生代谢产物及其积累规律的报道甚少。为此本实验在对冬凌草组织培养过程系统研究的基础上,探讨了冬凌草培养物中主要次生代谢产物冬凌草甲素、迷迭香酸的积累规律,为进一步利用生物技术生产冬凌草次生代谢产物的研究提供一些必要的基础资料,同时亦为其大规模的生产提供科学依据。

1 材料

冬凌草叶片2006年8月中旬采集于河南中医学院药用植物种植园内,经董诚明教授鉴定为 *R. rubescens*。冬凌草甲素、迷迭香酸对照品均为河南中医学院冯卫生教授所赠,纯度为99.8%。

2 方法

2.1 愈伤组织的诱导

取冬凌草幼嫩叶片,自来水冲洗,于超净台上用75%乙醇中消毒30s,之后用0.1%升汞溶液消毒

[收稿日期] 2007-02-28

[基金项目] 国家“十五”、“十一五”科技项目(2004BA721A25,2006BA106A15-3)

[通讯作者] *董诚明, Tel: (0371) 65680041, E-mail: dcm371@hactcm.edu.cn

7~8 min,用无菌水冲洗5~6次后将叶片切成0.5 cm²小块。接种于MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹培养基中,诱导愈伤组织的产生。其中含蔗糖3%,pH 5.8,培养条件为(25±1)℃,光照12 h·d⁻¹。

2.2 丛生芽的诱导、生长、生根及快繁培养

将冬凌草愈伤组织切成0.3 cm²的小块,接种到MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹(蔗糖3%,pH 5.8)芽诱导培养基中。之后接种于MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹(蔗糖3%,pH 5.8)芽生长培养基中。待丛生芽约2 cm高时,接种到MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹(蔗糖3%,pH 5.8)培养基上培养30 d后,植株约5~6 cm高。培养条件同上。

2.3 组织培养过程中冬凌草甲素、迷迭香酸含量的测定

2.3.1 取样时期 分别于外植体接种前(培养0 d)、愈伤组织启动时(培养2~3 d)、愈伤组织形成时(培养7 d)、细胞分化初期(接种到分化培养基上10 d)、芽分化初期(接种到分化培养基上12~13 d)、芽分化期(接种到分化培养基上15 d)、丛生芽(接种到分化培养基上20 d)、再生植株等几个代表性的时期取样测定冬凌草组培物中冬凌草甲素、迷迭香酸的含量。

2.3.2 冬凌草甲素、迷迭香酸的HPLC条件 样品的制备:样品置于60℃恒温干燥箱中干燥至恒重,用研钵研成粉末,精密称取0.25 g样品,加20 mL甲醇,超声提取2次,每次30 min,合并2次滤液,水浴蒸干,用甲醇溶解剩余物并定溶于5 mL量瓶中,作为供试样品。

色谱条件:岛津20-A高效液相色谱仪,SPA-20检测器。Sphermage-80色谱柱(4 mm×250 mm)反相柱。冬凌草甲素检测波长238 nm,流速为0.5 mL·min⁻¹。流动相为甲醇-水溶液(50:50),柱温为25℃,对照品溶液1.01 mg·mL⁻¹。每个样品测定3次,进样量为10 μL。样品中的冬凌草甲素含量均为3次进样的平均值。迷迭香酸检测波长335 nm,流速为0.8 mL·min⁻¹。流动相为甲醇-0.5%的磷酸水溶液(45:55),柱温为30℃,对照品溶液0.58 mg·mL⁻¹。每个样品测定3次,进样量为10 μL。

方法学考察:冬凌草甲素: $Y = 876.14X + 10.122$, $r = 0.9998$,线性范围在0.152~1.52 μg·

mL⁻¹,精密度RSD 0.58%,平均回收率为99.1%,RSD 0.4%;迷迭香酸 $Y = 144.875X + 55.454$, $r = 0.9992$,在0.3~3 μg·mL⁻¹,精密度RSD为0.82%,平均回收率为98.7%,RSD 0.6%。

3 结果与分析

3.1 冬凌草组织培养过程

冬凌草叶片接种到MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹愈伤组织诱导培养基上2~3 d后,叶片逐渐皱缩、变厚,并从中部隆起,预示着愈伤组织诱导启动的开始,约1周后,从叶缘切口长出淡绿色愈伤组织。随着培养时间的延长,叶片周围逐渐形成大量的淡绿色的细胞团,并将外植体覆盖。挑选生长旺盛的愈伤组织,接种到分化培养基上培养约10 d后,可见淡绿色的愈伤组织中间颜色逐渐变浅而成为较为透明的乳白色,而周围愈伤组织颜色越来越深。培养12~13 d后即可形成肉眼可见的芽点。随后芽点逐渐增多,20 d后愈伤周围形成大量的丛生芽,将丛生芽转到生长培养基中约2 cm高时,将其转接到快繁及生根培养基中,随着培养时间的延长,植株下部会形成根,并在其叶腋处萌发出侧芽,30 d后植株约5~6 cm高。

3.2 组织培养过程中冬凌草甲素积累动态

冬凌草组织培养过程中冬凌草甲素含量与其细胞形态分化密切相关(表1)。刚从植株上采集的幼嫩叶片的冬凌草甲素质量分数为0.770%,诱导培养2~3 d后(愈伤组织启动)时,冬凌草甲素质量分数迅速降低为0.200%,随着培养时间的延长,当叶片切口周围,形成大量愈伤组织时,冬凌草甲素进一步降低为0.020%,将其接种到分化培养基上培养10 d后,冬凌草甲素进一步降低为0.000%,培养12~13 d后,愈伤周围形成肉眼可见的芽点,此时,冬凌草甲素仍为0.000%,随后芽点逐渐增多,此时,冬凌草甲素上升为0.002%,培养20 d后,愈伤周围形成大量的丛生芽,冬凌草甲素迅速上升为0.043%,当丛生芽经过生长、生根及快繁培养基培养形成约5~6 cm高植株时,冬凌草甲素上升为0.540%。由此可见冬凌草甲素的合成是受细胞生长发育的严格调控。

3.3 组织培养过程中迷迭香酸积累动态

新鲜采集的幼嫩叶片外植体,迷迭香酸质量分数为0.810%,诱导培养2~3 d后(愈伤组织启动时),迅速上升为1.350%,当叶片切口周围,形成

表1 组培苗再生过程中冬凌草甲素的质量分数 %

取样时期	冬凌草甲素
叶片外植体接种前	0.770
愈伤组织启动时	0.200
愈伤组织形成时	0.020
细胞分化初期	0.000
芽分化初期	0.000
芽分化期	0.002 1
丛生芽	0.043
再生植株	0.540

大量愈伤组织时,迷迭香酸继续上升为2.190%,之后愈伤组织接种到分化培养基上培养10 d后,迷迭香酸却迅速降低为0.380%,继续培养2~3 d后,愈伤周围形成肉眼可见的芽点时,迷迭香酸又开始上升为0.490%,随后芽点逐渐增多,此时,迷迭香酸继续上升为1.510%,当愈伤周围的不定芽逐渐增多,形成大量的丛生芽时,迷迭香酸又下降为1.180%,当丛生芽经过生长、生根及快繁培养基培养形成约5~6 cm高植株时,迷迭香酸降为0.990%(表2)。

表2 组培苗再生过程中迷迭香酸的质量分数 %

取样时期	迷迭香酸
叶片外植体接种前	0.810
愈伤组织启动时	1.350
愈伤组织形成时	2.190
细胞分化初期	0.380
芽分化初期	0.490
芽分化期	1.510
丛生芽	1.180
再生植株	0.990

4 讨论

萜类物质生物合成在植物发育过程中由于控制时间和地点的不同使这一过程的调控变得较为复杂,总的来说可分为空间调控和阶段调控^[7]。其中的阶段调控主要是指萜类化合物的产生与植物的发育过程密切相关。大量的研究结果也证明了这一点。如药用植物青蒿中有效成分青蒿素的形成、积累及分布不仅具有较强的组织特异性,而且与植株的生长发育(尤其是开花)存在着一定的相关性。辣椒中的辣椒素只有在生殖生长的后期才能在果皮中合成并积累^[8]。本研究对冬凌草组织培养过程中冬凌草甲素含量的变化表明,培养过程中随着细胞脱分化的进行冬凌草甲素含量逐渐降低,在细胞分化初期、芽分化初期含量最低为零,随着植物器官的再生,冬凌草甲素含量逐渐上升,这说明甲素的合

成可能与冬凌草植株内特定的组织或器官有关,而愈伤组织细胞往往缺少特定组织或器官,使得其次生代谢产物-冬凌草甲素的合成不能够进行。而随着植物组织、器官的逐渐形成,特别是丛生芽及再生植株形成后,甲素含量逐渐升高,说明甲素的合成与植物的茎、叶器官的形成有着密切的关系。而再生植株中冬凌草甲素的含量低于其野生品,可能是由于培养过程中,细胞内外条件的改变而导致控制次生代谢产物合成的基因差异性表达所致。另外,生态环境如气候、土壤、地形和生长周期等对药用植物的有效成分的积累也有较大的影响。

研究表明蔗糖浓度对迷迭香酸的合成有很强的促进作用^[4],而蔗糖在培养基中其作用主要是提供碳源,由此推测迷迭香酸的积累可能与培养物中碳源有关。本研究表明叶片培养初期(愈伤诱导启动时、愈伤形成时),迷迭香酸含量迅速上升,这可能是叶片外植体吸收培养基中的蔗糖,导致蔗糖进入细胞的比例迅速上升,从而引起迷迭香酸的大量积累。但是进入芽分化期后,由于代谢速率加快导致植物细胞中碳源相对减少,从而使迷迭香酸含量下降,当芽出现分化后迷迭香酸含量又开始增加,可能是由于光合作用使细胞中的碳源增加所致,当进入植株再生过程时由于生长发育进入转型期导致其体内碳源下降致使迷迭香酸含量降低,但具体原因尚值得进一步探讨。

本实验是作者在对冬凌草组织培养过程系统研究的基础上(筛选出冬凌草愈伤组织诱导、芽分化、芽生长的最佳培养基),对其培养物中主要次生代谢产物及其积累规律进行的研究。但近年来有关药用植物组织培养中次生代谢产物生产的研究表明,通过改变培养条件、调节培养基的组成,可大大提高培养物中次生代谢产物的含量^[9]。有关这方面的工作,本实验室也开展了相关研究,其具体结果将另文报道。

[参考文献]

- [1] 左海军,李丹,吴斌,等.冬凌草的化学成分及其抗肿瘤活性[J].沈阳药科大学学报,2005,22(4):258.
- [2] 李钦,冯卫生.冬凌草化学成分、药理作用及开发研究进展[J].河南中医学院学报,2003,18(6):31.
- [3] 陈随清,董诚明,郑晓珂,等.冬凌草不同采收期迷迭香酸的含量变化[J].河南中医学院学报,2003,18(6):29.
- [4] 黄炼栋,胡之璧,刘涤.迷迭香酸生产的生物技术研究[J].国外医药·植物药分册,1997,12(3):104.

- [5] 魏景芳,李冬杰,张进献,等.冬凌草的组织培养与快速繁殖[J].安徽农业科学,2005,33(7):1227.
- [6] 李冬杰,魏景芳,许宁,等.植物生长物质对冬凌草愈伤组织生长及褐化的影响[J].安徽农业科学,2006,34(6):1118.
- [7] 郝宏蕾,朱旭芬,曾云中.类异戊二烯的生物合成及调控[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2002,28(2):224.
- [8] 陈大华,叶和春,李国风,等.植物类异戊二烯代谢途径的分子生物学研究进展[J].植物学报,2000,42(6):551.
- [9] 刘春朝,王玉春,康学真,等.适于青蒿芽生长和青蒿素积累的光、温和培养方式探讨[J].植物生理学报,1999,25(2):105.

[责任编辑 张宁宁]

丹皮中微量元素对药材质量的影响

郭敏¹, 陈卫平², 徐迎春^{1*}, 程家高³, 张桂花⁴

(1. 南京农业大学中药材研究所, 江苏南京 210095; 2. 南京农业大学农学院, 江苏南京 210095;
3. 安徽铜陵高科技农业示范园, 安徽铜陵 244131; 4. 菏泽市农科所 高新技术研究室, 山东菏泽 274000)

丹皮来源于毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮^[1], 在我国应用历史悠久。生长于安徽铜陵凤凰山一带的凤丹 *P. ostii* T. Hong et J. X Zhang 已有近 500 年的历史, 是中药丹皮中的最优品种类型, 其根皮以“条粗长直、肉厚粉足、木心细、亮心多、久贮不变色、久煎不发烂”而成为著名的道地药材, 山东、湖南、重庆及安徽亳州等地均有大面积引种栽培。

近年来随着微量元素对人体的药理作用得到证实, 微量元素也成为药材道地性研究的热点, 但是多数研究仅从微量元素的药效方面来分析其对道地药材质量的影响^[2,3], 忽略了微量元素与有机成分的关系。本研究通过对安徽省铜陵县凤凰山、安徽省亳州市、山东省菏泽市、湖南省邵阳县、重庆市垫江县 5 个产区的同一种质(均为凤丹品种类型)的药材外观和化学成分的考察, 比较其质量差异, 揭示“道地药材”的质优所在。采用电感耦合等离子体-原子发射光谱(ICP-AES)对药材中 22 种微量元素含量进行测定, 对各微量元素含量和丹皮各质量指标作相关性分析, 探索微量元素对丹皮药材质量形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2006 年 9、10 月在安徽省铜陵县凤凰山、安

徽省亳州市谯城区十九里镇、山东省菏泽市小留镇、重庆市垫江县太平镇和湖南省邵阳县邵家坪镇 5 个产地的四年生凤丹种植基地采集植株样(编号分别为 ATD, ABD, SHD, CDD, HSD), 每地随机采集 5 株, 样品经南京农业大学园艺学院王广东副教授鉴定, 为凤丹品种类型。去掉地上部分, 用清水洗净根系表面泥土, 测量主根长度、径粗和木心粗度后, 以蒸馏水、去离子水分别快速淋洗 3 遍, 剥下根皮, 60℃烘干, 粉碎, 过 60 目尼龙筛。

1.2 方法

1.2.1 丹皮外观性状的测定 分别测其主根长度、粗度(离根茎交接至末端的 1/3 处横切)、木心粗度(与测粗度的位置对应), 韧粗 = (粗度 - 木心粗)/2, 韧木比 = 韧粗/木心粗。

1.2.2 丹皮酚提取及含量测定 参照 2005 年版《中国药典》^[1], 甲醇超声提取, HPLC 测定, DIONEX SUMMIT P680A 液相色谱仪(美国戴安公司), 色谱柱 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 0.5 μm), 流动相 甲醇-水 (45:55), 柱温 28℃, 进样量 20 μL, 检测波长 274 nm。

1.2.3 多糖提取及含量测定 具体参照文献[4], 苯酚-硫酸法测定。

1.2.4 微量元素测定 浓 HNO₃-HClO₄ (5:1) 消煮, 采用电感耦合等离子体-原子发射光谱仪 Iris Advantage ICP-AES (美国热电公司) 测定铝 (Al)、砷 (As)、硼 (B)、钙 (Ca)、镉 (Cd)、钴 (Co)、铬 (Cr)、铜 (Cu)、铁 (Fe)、钾 (K)、锂 (Li)、镁 (Mg)、锰 (Mn)、

[收稿日期] 2007-01-23

[通讯作者] * 徐迎春, Tel: (025) 84396370, E-mail: xu-yech@

163.com