

用成分有关。由于我国是乙肝病毒高发地区,对叶下珠的需求与日俱增,加之对叶下珠的组织培养技术研究还甚少,利用叶下珠愈伤组织培养技术来提取愈伤组织药用有效成分有待于进一步研究,能否进一步通过器官分化途径再生出完整的植物,正在试验中,以期减少对自然资源的采挖压力。

参考文献:

[1] 方雷,任丽娟.叶下珠属植物化学和药理研究概况[J].国外医药:植物药分册,1992,7(6):249.

[2] 韩晓玲,秋小冬,王冰雪,等.叶下珠茎节组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2006,42(4):679.

[3] 马新宇,裴俊俊.叶下珠药理研究综述[J].齐鲁药事,2006,25

(2):104-105.

[4] 彭建明,管志斌,张丽霞,等.苦味叶下珠家化种植技术[J].现代中药研究与实践,2005,19(4):18-19.

[5] 沈志强,陈蓬,段理,等.叶下珠有效部位对凝血系统的影响[J].中草药,2004,35(5):539-542.

[6] Thyagarajan S P, Subramanina S, Thirunalasundari T, et al. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus [J]. *Lancet*,1998,331(12):764.

[7] David W U. Callus induction in *Phyllanthus species* and inhibition of viral DNA polymerase and reverse transcriptase by callus extracts [J]. *Plant Cell Rep*,1991,10(9):461-466.

[8] 江苏省植物组织培养研究协会.经济植物组织培养实用技术[M].南京:江苏科学技术出版社,1988.

[9] 马林,杨国涛,李军.黄山药愈伤组织的诱导与分化[J].广西植物,2006,26(1):97-100.

空心莲子草的高效毛细管电泳指纹图谱研究

师磊,朱红,王佳馨,马卓,刘焱文*

(湖北中医学院 中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室,湖北 武汉 430061)

摘要:目的 利用高效毛细管电泳技术建立空心莲子草药材的指纹图谱。方法 采用60 cm×75 μm 毛细管柱,以50 mmol/L 硼砂溶液-50 mmol/L 磷酸盐溶液为缓冲液,运行电压为20 kV,检测波长220 nm,柱温25 ℃。结果 建立的指纹图谱中共有18个共有峰,且方法学考察符合规定的标准。结论 该法准确简便,可作为控制空心莲子草药材内在质量的有效手段。

关键词:空心莲子草;高效毛细管电泳;指纹图谱

中图分类号:R282.7 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2008)11-1726-04

HPCE Fingerprint of *Alternanthera philoxerodes*

SHI Lei, ZHU Hong, WANG Jia-xin, MA Zhuo, LIU Yan-wen

(Province and Ministry Co-Established Key Laboratory of Resource Science and Complex Prescription in Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Abstract: **Objective** To investigate the high performance capillary electrophoresis (HPCE) fingerprint of *Alternanthera philoxerodes*. **Methods** Separation was performed on a 60 cm × 75 μm uncoated capillary with 50 mmol/L borate solution-50 mmol/L phosphate solution (pH 8.76) as HPCE buffer. The running voltage was 20 kV, the detection wavelength was 220 nm and temperature 25 ℃. **Results** Fingerprint was established with 18 common peaks. **Conclusion** The method is accurate, simple, and suitable to the quality control of *A. philoxerodes*.

Key words: *Alternanthera philoxerodes* (Mart.) Griseb.; HPCE; fingerprint

空心莲子草 *Alternanthera philoxerodes* (Mart.) Griseb. 为苋科莲子草属 (*Alternanthera* Forst.) 多年生宿根草本植物,又名空心苋、螃蜞菊、水花生等^[1]。曾收载于《中国药典》1997年一部,具有清热解毒、凉血利尿的功效。现代药理研究表明,空心莲子草具有抗流感病毒^[2]、流行性出血热病

毒^[3]、抗乙型肝炎病毒^[4]等多种抗病毒药理作用。空心莲子草药材在我国资源丰富,分布广泛,各地品质差异较大。然而,到目前为止,对于空心莲子草药材的品质研究尚未见报道,本实验室运用高效毛细管电泳技术对采自湖南、湖北、江苏、浙江、江西、福建等6个省份10个不同地市的空心莲子草进行指纹图

收稿日期:2008-03-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470194)

作者简介:师磊(1981—),男,河南安阳人,现为湖北中医学院在读硕士研究生,主要从事中药及其制剂有效成分的研究。

Tel:(027)88920834 E-mail:shilei2967627@163.com

*通讯作者 刘焱文,教授,博士生导师。Tel:(027)62623577 E-mail:ywliu@puplic.wh.hb.cn

谱研究,旨在找出空心莲子草药材在不同生长地区及不同生态环境下的品质差异,为空心莲子草的质量评价提供一定的科学依据。

1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 毛细管电泳仪(美国贝克曼库尔特公司),包括 32Karat 工作站,二极管阵列紫外检测器,自动进样器,未涂层毛细管总长60 cm,有效长度45 cm,内径75 μm;BP-211D型十万分之一分析天平;万分之一分析天平(METTLER TOLEDO AL204)。

对照品穆坪马兜铃酰胺、异茜草素、莲子草素均为本实验室自制、HPLC法测定其质量分数98%以上。实验用水为二次蒸馏水,甲醇、醋酸乙酯、石油醚为分析纯(上海振兴化工一厂)。空心莲子草分别采自湖北、湖南、江苏、浙江、江西、福建6省,经湖北中医学院中药鉴定教研室吴和珍副教授鉴定为苋科莲子草属植物空心莲子草。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:取空心莲子草粉末(过4号筛)10 g,精密称定置于锥形瓶中,加入甲醇溶液100 mL精密称质量,浸渍1 h后,40℃超声提取30 min,室温静置20 min,再称定其质量,用甲醇溶液补足减失质量,摇匀,静置后滤过,取续滤液75 mL置于蒸发皿中,水浴加热挥去甲醇,量取蒸馏水20 mL溶解,转移至分液漏斗中,先以石油醚萃取3次(50、50、40 mL),弃去石油醚液,水液再加入醋酸乙酯萃取3次(50、50、40 mL),弃去水液,合并醋酸乙酯液,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解,定容至10 mL,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取穆坪马兜铃酰胺1.35 mg、异茜草素1.01 mg、莲子草素1.22 mg,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。对照品高效毛细管电泳图谱见图1-A。

2.3 毛细管电泳条件:未涂层毛细管柱(60 cm×75 μm,有效长度为45 cm),以50 mmol/L硼砂溶液-50 mmol/L磷酸盐溶液(pH 8.76)为运行缓冲液,运行电压为20 kV,检测波长220 nm,柱温25℃。进样前,毛细管先用0.1 mol/L NaOH、重蒸水各冲洗3 min,再以运行缓冲液冲洗2 min。压力进样,压力为0.5 kPa,进样时间为5 s。

2.4 指纹图谱的确立

2.4.1 共有指纹峰的建立:按照上述供试品溶液制备方法,将所采集到空心莲子草药材制成供试品溶

液,每个样品进样2次,记录时间1 h,发现电泳图在25 min后没有峰出现,又通过空白对照试验发现前8 min内为溶剂峰,故记录8~25 min内电泳图。通过对药材与对照品二者的毛细管电泳图谱进行比较,确认了3号峰为穆坪马兜铃酰胺,6号峰为异茜草素,7号峰为莲子草素。以异茜草素为参照物,计算10批药材电泳图中各峰的相对迁移时间,通过对相对迁移时间比较与RSD计算,确定了18个共有峰。药材高效毛细管电泳图谱见图1-B。

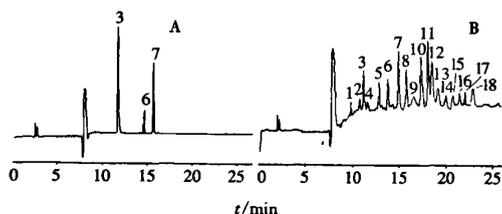


图1 对照品(A)和药材样品(B)HPCE图

Fig. 1 HPCE Fingerprint spectra of reference substance(A) and *A. philoxerodes* (B)

2.4.2 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样5次,共有指纹峰的相对保留时间RSD<2.84%,共有峰相对峰面积RSD<3.03%。

2.4.3 重现性试验:取同一产地药材按供试品溶液制备方法平行制备空心莲子草供试液5份,在高效毛细管电泳仪上进样分析,共有峰相对保留时间RSD<2.25%,共有峰相对峰面积RSD<3.78%。

2.4.4 稳定性试验:取一新制备的供试品溶液于0、2、4、8、12、24 h测定其峰面积,共有峰相对保留时间RSD<2.05%,共有峰相对峰面积RSD<3.32%。

2.4.5 不同产地空心莲子草药材的指纹图谱比较:取10批不同产地空心莲子草药材,制成供试品溶液,然后按照上述毛细管电泳色谱条件测定,结果见表1、2及图2。

3 讨论

3.1 检测波长的选择:本实验通过对一供试品进行紫外检测器全波长扫描,确定了214、220、274及325 nm。而后,通过毛细管电泳仪的检测,发现在检测波长220 nm下,基线比较稳定,出峰较多,且各峰之间的分离度较好,确定220 nm为本实验的检测波长。

3.2 运行缓冲液的选择:本实验通过对硼砂缓冲液(10~100 mmol/L)、磷酸盐缓冲液(10~100 mmol/L)、硼砂-磷酸盐缓冲液进行比较,发现硼砂-磷酸盐缓冲液分析效果最好,电泳图中出峰最多。再通过考察缓冲液pH值8.50、8.58、8.68、8.76、9.18

表1 不同产地空心莲子草的指纹图谱中共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peak in fingerprint of *A. philoxerodes* from different habitats

产地	相对保留时间																	
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16	峰17	峰18
福建福州	0.712	0.786	0.821	0.845	0.943	1.000	1.074	1.157	1.216	1.265	1.330	1.346	1.399	1.444	1.514	1.546	1.574	1.623
福建厦门	0.711	0.787	0.835	0.834	0.946	1.000	1.086	1.155	1.219	1.276	1.326	1.348	1.394	1.435	1.529	1.542	1.543	1.646
江西九江	0.725	0.734	0.833	0.855	0.939	1.000	1.076	1.158	1.244	1.263	1.318	1.364	1.376	1.433	1.544	1.546	1.525	1.631
江西鹰潭	0.713	0.781	0.821	0.849	0.943	1.000	1.070	1.159	1.245	1.264	1.334	1.340	1.399	1.434	1.515	1.546	1.555	1.642
湖南怀化	0.712	0.789	0.831	0.887	0.944	1.000	1.082	1.154	1.213	1.264	1.326	1.343	1.395	1.432	1.522	1.536	1.562	1.655
湖北武汉	0.710	0.786	0.821	0.845	0.943	1.000	1.087	1.157	1.216	1.265	1.330	1.346	1.399	1.444	1.514	1.546	1.574	1.623
湖北黄石	0.712	0.789	0.831	0.887	0.944	1.000	1.072	1.154	1.213	1.264	1.326	1.343	1.395	1.432	1.562	1.546	1.562	1.655
浙江宁波	0.729	0.776	0.847	0.859	0.941	1.000	1.074	1.148	1.249	1.261	1.345	1.327	1.393	1.434	1.535	1.543	1.522	1.643
江苏徐州	0.710	0.781	0.839	0.867	0.950	1.000	1.072	1.151	1.232	1.265	1.327	1.344	1.398	1.413	1.542	1.546	1.545	1.629
江苏南京	0.714	0.781	0.821	0.849	0.943	1.000	1.070	1.159	1.245	1.264	1.334	1.340	1.399	1.434	1.515	1.546	1.555	1.642

表2 不同产地空心莲子草的指纹图谱中共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative retention peak area of common peak in fingerprint of *A. philoxerodes* from different habitats

产地	相对峰面积																	
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16	峰17	峰18
福建福州	0.248	0.327	1.037	0.111	0.518	1.000	2.410	1.706	0.102	2.446	3.251	3.390	1.447	1.362	0.670	0.027	0.276	1.043
福建厦门	0.081	0.252	0.451	0.072	0.269	1.000	0.985	0.587	0.186	0.625	1.499	1.050	0.919	0.092	0.085	0.099	0.093	0.873
江西九江	0.205	0.251	0.974	0.165	0.618	1.000	1.926	1.219	0.449	2.015	0.735	5.121	0.447	0.358	0.386	0.214	0.196	1.096
江西鹰潭	0.075	0.248	0.461	0.072	0.268	1.000	0.963	0.532	0.143	0.639	1.474	1.068	0.923	0.125	0.078	0.121	0.083	0.882
湖南怀化	0.256	0.336	1.127	0.131	0.538	1.000	2.346	1.516	0.091	1.326	3.091	3.129	1.661	1.321	0.557	0.110	0.221	1.171
湖北武汉	0.244	0.223	0.642	0.224	0.743	1.000	1.747	1.359	0.519	2.116	0.899	4.341	0.582	0.343	0.357	0.354	0.118	1.236
湖北黄石	0.082	0.245	0.467	0.065	0.256	1.000	0.956	0.577	0.145	0.645	1.503	1.058	0.920	0.114	0.093	0.102	0.091	0.863
浙江宁波	0.201	0.315	1.097	0.081	0.486	1.000	2.357	1.924	0.137	2.116	3.546	3.633	1.574	1.315	0.842	0.534	0.642	1.257
江苏徐州	0.145	0.453	0.642	0.132	0.425	1.000	1.466	1.422	0.472	2.425	2.657	1.143	0.432	0.438	0.632	0.434	0.634	1.543
江苏南京	0.243	0.527	1.424	0.423	0.264	1.000	2.343	1.163	0.423	2.242	3.346	3.543	1.454	1.643	0.353	0.363	0.426	1.426

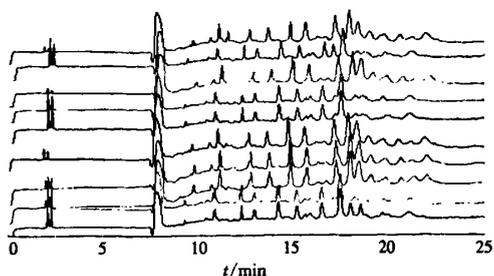


图2 不同产地10批样品指纹图谱叠加图

Fig. 2 HPLC Fingerprint spectra of ten batches of *A. philoxerodes* from different habitats

及9.50时的分离效果,发现pH值在8.76时,各组分分离度最高,且具有良好的重现性。因此,本实验采用50 mmol/L 硼砂溶液用50 mmol/L 磷酸盐溶液调节pH至8.76。

3.3 运行电压的选择:本实验考察了分离电压分别为8、12、16、20、25 kV时的电泳分离效果,发现在8、12 kV下分离速度比较慢,分析时间延长到45 min以后且分离效果不佳。在16、25 kV下,虽然分析时

间缩短,但是分离效果不好,且基线飘移严重。在20 kV下,25 min之内可以较好地完成分离,且重现性好,故最终确定分离电压为20 kV。

3.4 共有峰面积与总峰面积比值的计算:对各样品的峰面积进行统计,计算各样品指纹图谱中的18个共有峰的总面积各占总峰面积的比值。结果显示所有样品的共有峰总面积占总峰面积的比值均大于90%,满足指纹图谱的技术要求。

3.5 不同产地空心莲子草指纹图谱的比较:由表1、2可以看出,不同产地空心莲子草药材虽然在化学成分组成上有较好的相似性,但在组成成分的量上确有较大差异,尤其表现在10、11、12号共有峰上。江苏、浙江地区这三种化合物在同一植物中量接近,且每种化合物地区之间量相差不大;福建、江西地区这三种化合物在同一植物中量相差很大,且每种化合物地区之间量也有较大差距。这说明空心莲子草药材的品质受地域和生态环境的影响很大,不同地区之间的药材品质差异较大。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.1977.
 [2] 邓麟瑞,朱景玉,徐惠堂,等.空心莲子草抑制流感病毒的实验研究[J].中华微生物和免疫杂志,1984,4(3):172-176.
 [3] 曲春枫,杨占秋,向进敏.空心莲子草有效部位对流行性出血热病毒感染乳鼠的保护作用[J].中国中药杂志,1983,18(5):304-305.
 [4] 熊舜华,程化奇,黄天善,等.螃蟹菊对乙型肝炎患者染色体及GPT、HBsAg 聚细胞改变的观察[J].湖北医学院学报,1986,7(2):140-142.

甘肃道地黄芪种苗的离体快繁研究

张延红¹,何春雨^{2*},刘晓博¹,杜 孜¹,陈红刚¹

(1.甘肃中医学院 药学系,甘肃 兰州 730000; 2.甘肃省冬小麦研究所,甘肃 兰州 730020)

摘 要:目的 筛选出适于无菌短枝快繁的培养基及研究试管苗移栽驯化技术。方法 以MS为基本培养基添加不同质量浓度的BA和NAA,对黄芪的不同外植体进行组织快繁研究。结果 一年生植株的带芽茎段在MS+BA 0.1 mg/L 培养基上短枝长势最好;一年生植株的新生芽和两年生植株的带芽茎段,在MS+BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上均能产生丛生芽。将短枝接种于1/2MS+0.1%活性炭或1/2MS+NAA 1.5 mg/L+0.1%活性炭的培养基上,经诱导产生有效根。小苗经沙培驯化后,移栽成活。结论 利用蒙古黄芪的无菌短枝快繁优良种苗是一种经济、快速、可行的育苗方式。

关键词:黄芪,离体快繁;无菌短枝;炼苗;移栽

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1729-04

黄芪 *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 为豆科黄芪属多年生草本植物,以根入药,是常用大宗中药材^[1],也是甘肃道地药材之一。甘肃陇西就素有“中国黄芪之乡”的美称。近年来,由于市场需求量逐年增加,野生资源日渐匮乏,采用育苗移栽进行人工栽培成为黄芪的主要来源^[2]。但是黄芪生长周期长、种子硬实现象严重^[3],且易受黄芪小蜂危害,所以播种时用种量大、繁殖系数低,造成药农经济成本增加。同时,黄芪种植历史悠久,传统栽培中往往不重视优良性状的选育,存在性状变异多、品系混杂严重等现象,对药材产量和品质产生不良影响^[4]。目前,陇西地区育苗也出现了一定困难,一年生小苗易遭受病虫害侵染,导致根部出现黑斑甚至断根。因此,寻找一种新的育苗方式迫在眉睫。

利用植物组织培养的方法,采用黄芪带腋芽及顶芽的茎段作外植体,进行植物离体快繁,可于短期内获得大量遗传性状一致的幼苗,比用种子繁殖节省育苗空间和成本,成苗迅速且便于集中精细管理^[5]。虽然国内外对黄芪的组织培养有一些报道,但主要研究愈伤诱导和植株再生,利用短枝进行快繁种苗未见报道。本试验旨在建立黄芪无菌短枝快繁

的育苗体系。

1 材料与方 法

1.1 材料采自甘肃陇西县马河镇产一年和二年生黄芪,经林丽高级实验师鉴定,剪取实生苗的新生芽及地上茎段。

1.2 短枝诱导:用软毛刷及洗衣粉水轻轻刷洗黄芪枝条,然后用流水冲洗12 h。在超净工作台上先用75%乙醇漂洗30 s,然后用2%次氯酸钠溶液灭菌10 min,再用0.1%升汞溶液灭菌10 min,最后用无菌水冲洗5次,接种于添加不同质量浓度6-BA及NAA的培养基上。将材料置于室温25℃、光照时间13 h/d左右、光照强度2 000 lx的条件下培养。

1.3 根的诱导:当短枝长到6~8 cm高时,切除基部较老化部分,然后将形态学下端近节处插入生根培养基中,在与1.2项相同的培养条件下诱导生根^[6]。生根培养基为1/2MS培养基添加不同质量浓度NAA和0.1%活性炭。

1.4 炼苗和移栽:当短枝基部形成较发达的根系后,打开瓶塞,炼苗2 d,然后轻轻取出小苗,小心洗去根部的培养基^[6],然后将试管苗栽植于蛭石-河沙-腐殖土(5:4:1)的基质中,用打孔的透明塑料杯罩住保湿。用半透明塑料膜遮荫,每日喷水2次,

收稿日期:2008-01-11

基金项目:本科生毕业专项基金资助

作者简介:张延红(1977-),女,讲师,硕士,主要从事药用植物育种和组织培养方面的研究和教学工作。

* 通讯作者 何春雨 Tel:13919459087 E-mail:hchy@lzc.edu.cn