

- 册. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [2] 许腊英, 毛维伦, 江向东, 等. 荷叶降血脂的开发研究 [J]. 湖北中医杂志, 1996, 4: 42-43.
- [3] 龚康敏, 魏克民, 厉兰娜, 等. 荷叶饮对高脂血大鼠血脂及血流变学的影响 [J]. 河南中医, 1999, 19(2): 28-29.
- [4] 肖华山, 黄代青, 傅文庆, 等. 荷叶对体外氧自由基的清除作用

- 及其对果蝇寿命的影响 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(6): 374-378.
- [5] 胡天喜, 陈季武, 许建营, 等. 云芝糖肽和灵芝多糖清除活性氧的作用 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(5): 465-470.
- [6] 杜力军, 孙虹, 李敏, 等. 荷叶大豆及其合剂调脂活性部位的研究 [J]. 中草药, 2000, 31(7): 526-528.

何首乌毛状根培养及大黄酚的含量测定

王振华, 杜勤, 刘浩, 许晓峰, 张俊荣, 简慧兰*, 李莉*, 曾绍培
(广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510407)

摘要: 目的 测定何首乌毛状根中大黄酚的含量。方法 用发根农杆菌 Ri 15834 菌株感染何首乌茎、叶外植体, 均可诱导出毛状根, 并能合成大黄酚, 采用薄层扫描法测定毛状根中大黄酚。结果 毛状根中大黄酚的含量为 0.0164%。结论 该毛状根具有典型的毛状根形态特征, 大黄酚含量低于何首乌药材。

关键词: 何首乌; 毛状根; 大黄酚

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)08-0695-02

Culturing of hairy root of *Polygonum multiflorum* and determination of its chrysophanol content

WANG Zhen-hua, DU Qin, LIU Hao, XU Xiao-feng, ZHANG Jun-rong,
JIAN Hui-lan, LI Li, ZENG Shao-pei

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou Guangdong 510407, China)

Abstract Object To determine the content of chrysophanol in the cultured hairy root of *Polygonum multiflorum* Thunb.

Methods Hairy root of *P. multiflorum* was induced from stem and leaf explant with agrobacterium rhizogens Ri 15834, and its chrysophanol content determined by TLCs. **Results** The transferred root showed typical hairy characteristics and could synthesize chrysophanol to a content of 0.0164% as determined by TLCs. **Conclusion** Content of chrysophanol in the cultured hairy root was lower than that of the crude medicinal material.

Key words *Polygonum multiflorum* Thunb; hairy root; chrysophanol

何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 是著名的常用传统中药, 药用块根, 具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨等功能。何首乌的化学成分主要有蒽醌类化合物、卵磷脂以及微量元素等。

毛状根培养是植物细胞培养一种新技术。毛状根培养系统具有生长迅速、不需要外源生长激素、产生次生代谢产物稳定等优点。目前已开展毛状根培养药用植物^[1,2]。但关于何首乌毛状根及其有效成分方面的研究未见报道。本研究采用发根农杆菌 Ri 15834 菌株感染何首乌茎、叶外植体, 诱导出毛状根, 并对毛状根中大黄酚进行含量测定。

1 材料与方法

1.1 细菌培养: 取发根农杆菌 Ri 15834 菌株, 接种到 YEB 固体培养基中活化, 然后转移至 YEB 液体

培养基中振荡培养, 使处于指数生长期, 用于转化何首乌。

1.2 外植体制备: 取何首乌茎、叶, 在 75% 乙醇中浸泡 0.5 min, 再用 0.1% 升汞消毒 15 min。无菌水冲洗干净后, 茎切成 1 cm 长的小段, 叶切成 1 cm × 1 cm 的小块, 接种于无激素的 MS 培养基上预培养 48 h 后用于转化。

1.3 毛状根的诱导: 将上述外植体浸入用 MS 培养液稀释 1 倍的农杆菌菌液中 10 min, 取出, 吸干多余液体, 置 MS₀ 为培养基上培养两天后取出, 转入含 500 mg/L 羧苄氨基青霉素的 MS 培养基中, 21℃ 暗箱培养。

1.4 毛状根的培养: 将长度超过 3 cm 的毛状根转移到 MS 固体培养基上继代培养, 以后每 21 d 继代

收稿日期: 2000-09-17

基金项目: 本研究为广东省中医药管理局课题 B96-31 的一部分研究内容

作者简介: 王振华 (1966-), 男, 硕士研究生毕业, 讲师。研究方向: 中药制剂研究、中药质量、标准制订、中药新资源的开发利用。

* 广州中医药大学 98 级中药资源专业本科生

1次,得到生长迅速的毛状根体系。收获毛状根,阴干,备用。

1.5 仪器及试剂: CS-9000薄层扫描仪(日本岛津);硅胶 G(薄层层析用,青岛海洋化工厂);其他试剂均为分析纯。大黄酚对照品由中国药品生物制品检定所提供。定量毛细管(Drummond Scientific Co. USA);何首乌药材购自广东省药材公司饮片厂。

1.6 何首乌药材及毛状根中大黄酚的含量测定

1.6.1 样品及对照品溶液的制备:何首乌毛状根测试液的制备:称取何首乌毛状根 5.15 g,加氯仿 40 mL,回流提取 1 h,共提取 2次,合并滤液,回收氯仿,用氯仿定容至 10 mL,作为供试液 A

何首乌药材溶液的制备:将何首乌药材粉碎,过 40目筛。称取药材粉末 10.00 g,加氯仿 80 mL,回流提取 1 h,共提取 2次,合并滤液,回收氯仿,用氯仿定容至 100 mL,作为供试液 B

对照品溶液的制备:精密称取大黄酚对照品 2.3 mg,用氯仿溶解,并定容至 25 mL

1.6.2 薄层色谱条件:薄层板为含 0.5% CMC-Na 的硅胶 G板,105℃活化 30 min。展开剂石油醚-乙酸乙酯-冰醋酸(10:2:1.5),展开温度 20℃~25℃,实验室相对湿度 75%~85%,上行展开 10 cm,取出晾干。

扫描条件:双波长反射法锯齿扫描, $\lambda_s=435$ nm, $\lambda_R=510$ nm, $S_X=3$,狭缝 1.2 mm×6 mm

1.6.3 标准曲线绘制:定量吸取 1, 2, 3, 4, 5 μ L 对照品液,点于同一薄层板上,按上述薄层色谱条件展开,取出晾干,置扫描仪测定峰面积

1.6.4 稳定性试验:测定层析后的大黄酚对照斑点的峰面积,每隔 20 min 测定 1次,连续测 2 h

2 结果与讨论

2.1 毛状根的诱导和培养:发根农杆菌感染何首乌茎、叶外植体 1星期后,外植体茎节处及叶片边缘叶

脉处出现毛状根,毛状根分枝多,密被白色根毛,在无激素的 MS 固体培养基中能自主生长,紧贴培养基向上生长,生长快速,具有典型的毛状根特征

2.2 何首乌药材及毛状根中大黄酚的含量测定

2.2.1 标准曲线绘制:以峰面积(X)对点样量(Y)进行回归处理,得回归方程 $Y = -0.52 + 1.818 \times 10^{-4} \cdot X$, $r = 0.997$,回归曲线不经过原点。结果表明点样量在 1~5 μ L(相当于 0.092~0.46 μ g)范围内与峰面积呈良好的线性关系。

稳定性实验结果,2 h 内峰面积值稳定

2.2.2 含量测定:分别精密吸取供试液 A、B 及大黄酚对照品溶液,点于薄层板上,按 1.6.2 项下展开、扫描,重复 3次,测定结果何首乌毛状根中大黄酚含量为 0.0164%,何首乌药材中含量为 0.0538%。

在何首乌毛状根中含有与原药材相同的蒽醌类成分——大黄酚,其含量低于原药材,约为其 1/3。这可能与毛状根来源与何首乌茎、叶外植体,而茎、叶中此成分含量原本就比较低的缘故。另外何首乌毛状根培养时间只有 1个多月,而药用何首乌块根需生长多年,因而其大黄酚的含量有所差异。

我们的研究还发现,在营养充足的条件下适时延长毛状根培养时间,在毛状根某些部位上能产生膨大,其表皮颜色明显加深,与何首乌块根的形状非常相似,这种现象在以往毛状根研究中未见有类似的报道,其内部结构、化学成分尚待研究。因此适时延长毛状根的培养时间,进一步优化培养条件,定向培养毛状根的再生块根,毛状根中大黄酚的含量可望有所增加

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):269-270.
- [2] 郑志仁,刘涤,宋纯清,等.黄芪毛状根化学成分和免疫功能活性的研究[J].生物工程学报,1998,14(2):153.

邮 购 信 息

①本草纲目(上、下),230元 ②白话全译本草纲目(吕兰蕙编译)4卷,498元 ③本草纲目药物彩色图谱(谢宗万),298元 ④白话通解黄帝内经(主编张登本),5卷,248元 ⑤现代实用中药新剂型新技术(主编董万言),61元 ⑥中成药临床新用(主编梅全喜),63元 ⑦中药临床新用(主编王辉武),65元 ⑧现代中药药理学(主编王本祥),160元 ⑨中成药名方药理与临床(主编陈奇),110元 ⑩新编中成药手册(二版)(陈馥馨等编),180元 ⑪中药药效与临床(丁兆梦编),78元 ⑫英汉双解中医大辞典(原一祥等编),141元 ⑬中药学(英文版)(刘公望等译),150元 ⑭中成药实用手册(三版)(俞长芳主编),101元 ⑮中国食疗大全(张有睿等编),90元 ⑯中国保健食品的进展(于守洋等主编),135元 ⑰中药大辞典(上、下、附编三册)(江苏新医学院编),210.50元 ⑱中药大辞典(缩印本)(上、下),113.70元 ⑲常用中草药高效液相色谱分析(王慕邹主编),60元

邮购办法:①按书定价汇款,免邮费。挂号发书,保证安全,发票随书寄,汇款时注明所购书名。②汇款地点:邮编:300070 天津市和平区蛇口道同发里底商 11号 金卫医学书店,电话:(022)23522444 ③银行汇款:户名:天津市和平区金卫医学书店,开户行:天津市商业银行建业支行 帐号:065201080054611 * 本刊 2001年 1~6期邮购信息仍有效