

- the content of gypenoside in *Gynostemma Callus* [J]. *J Anhui Agric Univ* (安徽农业大学学报), 1998, 25(4): 448-451.
- [9] Huo L Y, Xiang F N, Xia G M. A symmetric somatic hybridization between *Peucedanum terebinthace* Fisch and *Bupleurum scorzonrifolium* Willd [J]. *J Shandong Univ—Nat Sci* (山东大学学报·自然科学版), 2000, 35(4): 464-468.
- [10] Sun M X, Yang H Y, Zhou C. Polyethylene glycol-induced fusion of selected pairs of single protoplasts [J]. *Acta Botan Sin* (植物学报), 1994, 36(7): 489-493.
- [11] Ding L, Fu T Z. Progress of study on biotechnology of orchid [J]. *J Northwest Normal Univ—Nat Sci* (西北师范大学学报·自然科学版), 1994, 36(7): 489-493.
- [12] Xiang F N, Xia G M, Chen H M. The studies on asymmetric somatic hybrid between wheat and *Avena* [J]. *Sci Sin (C)* (中国科学·C辑), 2002, 32(4): 299-305.

肉苁蓉药材与盐生肉苁蓉培养细胞的主要成分对比研究

赵琳¹, 郭志刚¹, 刘瑞芝¹, 孙素琴^{2*}

(1. 清华大学 化工系生物化工研究所, 北京 100084; 2. 清华大学 化学系, 北京 100084)

摘要: 目的 研究肉苁蓉药材与盐生肉苁蓉培养细胞的苯乙醇苷类成分差异。方法 利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)和HPLC技术进行成分对比分析。结果 FTIR的分析结果表明, 盐生肉苁蓉培养细胞的红外指纹谱图与肉苁蓉药材具有一定相似性; HPLC的分析结果表明, 盐生肉苁蓉细胞中所含的主要成分和肉苁蓉药材相似, 只是含量有差异。结论 从整体上看, 盐生肉苁蓉培养细胞中所含成分种类较多, 且大部分含量较高, 其中洋丁香酚苷(类叶升麻苷)和松果菊苷的含量大幅度高于肉苁蓉药材。

关键词: 肉苁蓉; 苯乙醇苷; 高效液相色谱; 傅里叶变换红外光谱

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0814-04

Comparison of main constituents of *Herba Cistanche* and cultured cells of *Cistanche salsa*

ZHAO Lin¹, GUO Zhi-gang¹, LIU Rui-zhi¹, SUN Su-qin²

(1. Institute of Biology and Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering;

2. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: **Object** To study the difference of phenylethanoïd glycoside between the cultured cells of *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) Benth. et Hook. f. and *Herba Cistanche*. **Methods** Making comparison by means of FTIR and HPLC technique. **Results** Using the FTIR technique, the infrared spectrum of cultured cell of *C. salsa* was similar to that of native *Herba Cistanche* at a certain extent. The HPLC analysis indicated that the main chemical constituents in cultured cells of *C. salsa* were similar to that of native *Herba Cistanche* while considerable difference of constituents was found between them. **Conclusion** On the whole, there are much more constituents in the cultured cells of *C. salsa* comparing with the native *Herba Cistanche*. The content of echinacoside and acteoside in the cultured cells is much higher than that in the native *Herba Cistanche*.

Key words: *Herba Cistanche*; phenylethanoïd glycoside; HPLC; FTIR

肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Ma 是列当科肉苁蓉属(*Cistanche* Hoffm. et Link)的多年寄生草本植物, 为我国传统的名贵中药, 始载于《神农本草经》, 列为上品^[1]。具有补肾阳, 益精血, 润肠通便等功能; 用于治疗男子阳痿, 女子不孕, 腰膝酸软, 筋骨无力, 肠燥便秘^[2]。近代药理学研究表明, 还能提高机体免

疫功能, 促进DNA合成, 增强体力, 提高智能, 具明显的抗衰老作用^[3]。肉苁蓉主产于我国的内蒙古、新疆、甘肃和宁夏一带^[1], 有“沙漠人参”之美誉, 其主要活性成分为苯乙醇苷类化合物^[4]。目前, 我国肉苁蓉药材基本来自野生资源, 其品质易受气候环境的影响, 近年来由于不合理的大量采掘, 加之寄生植物

* 收稿日期: 2003-10-19

作者简介: 赵琳(1980—), 女, 山东省烟台人, 清华大学化工系硕士研究生, 研究方向为植物细胞培养工程。 Tel: (010) 62785603
E-mail: zhao.lin98@mails.tsinghua.edu.cn

繁殖困难,造成肉苁蓉资源濒临枯竭,已被列为国家二级保护植物,并被收入《国际野生植物保护名录》^[1,5,6]。2001 年 7 月,国家已颁发文件,禁止采挖野生肉苁蓉作为保健品和出口原料^[7],因此,建立肉苁蓉的人工生产方法迫在眉睫。本实验室以盐生肉苁蓉 *Cistanche salsa* (C.A.Mey) Benth. et Hook f 的花瓣作为外植体进行脱分化培养,成功地诱导并驯化出盐生肉苁蓉的高产细胞系,并对适于盐生肉苁蓉愈伤组织生长以及促进其细胞内苯乙醇苷类成分合成的培养条件做了一系列研究。

本实验首先利用傅里叶变换红外光谱技术对肉苁蓉药材和盐生肉苁蓉培养细胞的红外谱图进行对比分析,从宏观上对其成分差异进行初步比较研究;然后又利用 HPLC 技术分析其中松果菊苷、洋丁香酚苷(类叶升麻苷)和 2'-乙酰基洋丁香酚苷的含量以及其他成分的含量。

1 材料与方法

1.1 材料:肉苁蓉细胞为本实验室诱导驯化的盐生肉苁蓉细胞系,选用改良的 Murashige & Skoog (MS) 培养基,添加蔗糖 20 g/L,吲哚乙酸(IAA) 2 mL/L,细胞分裂素(BA) 1 mg/L,Phytigel Gellan Gum 2 g/L。在 25℃避光条件下培养 28 d 后经冷冻干燥备用。肉苁蓉药材为购自北京同仁堂药店的酒苁蓉、济安堂药店的苁蓉片。此外,还有从宁夏盐池县获得的野生盐生肉苁蓉(经北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定),冷冻干燥后用于对比分析。

取以上试验样品经真空冷冻干燥至恒重,充分研磨后各精确称取 0.25 g,置 25 mL 磨口锥形瓶内,加 5 mL 60% 色谱纯甲醇超声提取 30 min,然后在摇床上抽提 6 h (90 r/min, 25℃),静置 30 min 后倒出上清液,4℃下保存。样品残渣再次加入 5 mL 萃取剂反复抽提(每次 6 h) 2 次,合并 3 次萃取液,用滤纸滤过,并稀释 10 倍,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后待测。

1.2 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析:实验选用了 Perkin Elmer 公司的 Spectrum GX 型光谱仪,中红外光源,DTGS 检测器。光谱分辨率为 4 cm⁻¹,测量范围为 4 000~400 cm⁻¹,扫描信号累加 8 次,OPD 速度 0.2 cm/s,扫描过程中及时除去水和 CO₂ 的影响。采用压片法,取肉苁蓉干燥粉末与 KBr 按质量比约 1:200 混和研磨均匀压片,之后测量其红外光谱图。

1.3 HPLC 分析^[8]:试验选用岛津 SPD-10AVP 型高效液相色谱分析系统,Class-vp 工作站,色谱柱

为岛津公司的 Shim-pack PREP-ODS(H)KIT C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相用 1.5% 醋酸水溶液-甲醇,流速为 0.8 mL/min,采用梯度洗脱:甲醇量 8% $\xrightarrow{2\text{ min}}$ 34% $\xrightarrow{25\text{ min}}$ 55% $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 60% $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 27% $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 8%,检测波长为 335 nm,柱箱温度为 40℃,进样量均为 10 μL。

用于定量分析的松果菊苷、洋丁香酚苷和 2'-乙酰基洋丁香酚苷对照品为本实验室分离纯化,由清华大学化学系利用质谱和核磁共振法进行结构鉴定;用于定性分析的 poliumoside、管花肉苁蓉苷 B、肉苁蓉苷 C、肉苁蓉苷 D、异洋丁香酚苷和盐生肉苁蓉苷 A 的样品由北京大学药学院提供。

将松果菊苷、洋丁香酚苷和 2'-乙酰基洋丁香酚苷的对照品溶液按不同量进行分析,质量(Y)对应于色谱峰面积(X)的回归方程分别为:松果菊苷 $Y = -0.01397 + 8.69635 \times 10^{-7}X$, $R^2 = 0.9998$,线性范围:0~3 μg;洋丁香酚苷: $Y = -3.02629 \times 10^{-4} + 7.06271 \times 10^{-7}X$, $R^2 = 0.9998$,线性范围:0~0.8 μg;2'-乙酰基洋丁香酚苷: $Y = -0.00218 + 7.08095 \times 10^{-7}X$, $R^2 = 0.9997$,线性范围:0~0.9 μg。

精密量取样品提取液 0.5 mL,加入对照品溶液 0.5 mL,混和均匀,每种对照品重复 3 次,测定,计算回收率。松果菊苷的回收率为 94.77%,RSD 为 1.89%;洋丁香酚苷的回收率为 102.82%,RSD 为 1.64%;2'-乙酰基洋丁香酚苷的回收率为 101.08%,RSD 为 0.95%。

取混和对照品溶液,连续进样 5 次,测其峰面积,结果见表 1。

表 1 精密度结果(n=5)

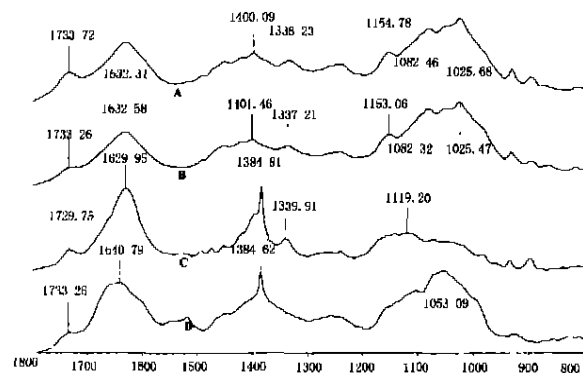
名称	RSD/%
松果菊苷	2.84
洋丁香酚苷	1.08
2'-乙酰基洋丁香酚苷	1.59
Poliumoside	2.03
管花肉苁蓉苷 B	1.99
肉苁蓉苷 C	1.52
肉苁蓉苷 D	1.83
异洋丁香酚苷	2.41
盐生肉苁蓉苷 A	2.05

2 结果与讨论

2.1 天然肉苁蓉与肉苁蓉培养细胞的红外谱图对比:FTIR 可以对样品进行全组份测定,从整体上评价样品质量,在一定程度上弥补了目前对比实验中仅使用部分成分进行质量评价的缺点。图 1 比较了

3种肉苁蓉药材与盐生肉苁蓉培养细胞的指纹区红外谱图(经归一化处理)。从图中可以看到,酒苁蓉红外谱图的较强吸收峰出现在1632, 1082和1026 cm^{-1} ,而苁蓉片红外谱图的较强峰也出现在相同波数附近(1633, 1082和1025 cm^{-1}),从总体上看,二者峰形及相对峰强度都非常相似。此结果表明,虽然两种肉苁蓉制片的炮制方法不同,但是其主要成分的组成基本相同。天然盐生肉苁蓉的红外谱图较强吸收峰出现在1630和1385 cm^{-1} 处,峰形及相对强度与酒苁蓉和苁蓉片有一定差别,说明盐生肉苁蓉与入药的肉苁蓉制片相比,在成分组成上存在一定差异。

与肉苁蓉药材相比,盐生肉苁蓉培养细胞的红外谱图相对简单,其指纹区较强峰出现在1641, 1385和1053 cm^{-1} 。通过比较可见,盐生肉苁蓉培养细胞的红外谱图在1385 cm^{-1} 处的强吸收峰与天然盐生肉苁蓉非常相似,而在1200~1000 cm^{-1} 的峰形与两种肉苁蓉制片具有一定相似性。由于1050 cm^{-1} 附近为苷类化合物的特征吸收峰,从图中可以看出,盐生肉苁蓉培养细胞在此波数附近的吸收峰相对强度大幅度高于天然盐生肉苁蓉,说明在盐生肉苁蓉培养细胞中的苷类化合物相对于天然盐生肉苁蓉已经有了大幅度提高,这一点在以后的HPLC分析结果中也得到了证明。



A-酒苁蓉 B-苁蓉片 C-野生盐生肉苁蓉
D-盐生肉苁蓉培养细胞

A-*C. deserticola* processed with wine B-dried *C. deserticola*

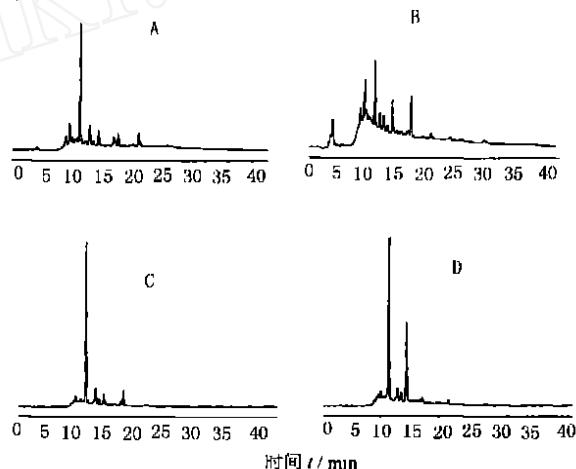
C-wild *C. salsa* D-cultured cell of *C. salsa*

图1 各种肉苁蓉的红外谱图

Fig 1 Infrared spectrogram of various *C. deserticola*

2.2 肉苁蓉药材与盐生肉苁蓉培养细胞中苯乙醇苷类成分比较:由图2的HPLC分析谱图可以看出,酒苁蓉的成分相对复杂,而盐生肉苁蓉培养细胞的主要成分与野生盐生肉苁蓉基本相似。由表2,3可以看出,苁蓉片中各物质的含量明显低于酒苁蓉;

Poliumoside 是从管花肉苁蓉中分离到的苯乙醇苷类化合物,在这两种肉苁蓉制片中均未发现。自古以来,肉苁蓉的主要炮制方法均以酒制为主,以上结果表明,此种炮制法可以有效地减少其活性成分的损失。传统方法炮制的肉苁蓉制片中,3种主要的苯乙醇苷类成分在干物质中总质量分数最高仅为9.5 mg/g,而野生盐生肉苁蓉经过冷冻干燥处理,测得其质量分数为70.4 mg/g。此结果提示,虽然传统的酒炮制方法能够在一定程度上抑制肉苁蓉药材中苯乙醇苷类物质的流失,但也不可避免地使其中一些活性成分含量有所下降。或许可以利用现代科学技术替代原有的传统技术对药材进行干燥及炮制处理,从而使活性成分得到最大程度的保留。



A-酒苁蓉 B-苁蓉片 C-野生盐生肉苁蓉
D-盐生肉苁蓉培养细胞

A-*C. deserticola* processed with wine B-dried *C. deserticola*

C-wild *C. salsa* D-cultured cell of *C. salsa*

图2 HPLC分析图谱

Fig 2 Analysis of HPLC

表2 3种主要苯乙醇苷类物质含量/(mg·g⁻¹)

Table 2 Mass content of three main phenylethanoid glycosides/(mg·g⁻¹)

名称	松果菊苷	洋丁香酚苷	2'-乙酰基 洋丁香酚苷	总量
酒苁蓉	7.5	1.2	0.8	9.5
苁蓉片	0.6	0.4	0.2	1.2
野生盐生 肉苁蓉	60.0	5.4	5.0	70.4
盐生肉苁蓉 培养细胞	63.0	32.2	0.5	95.7

在盐生肉苁蓉愈伤组织细胞中,松果菊苷、洋丁香酚苷和2'-乙酰基洋丁香酚苷3种主要苯乙醇苷类物质的总含量明显高于肉苁蓉药材,达到95.7 mg/g,是酒苁蓉的10.1倍,野生盐生肉苁蓉的1.4

表 3 其他苯乙醇苷类成分的峰面积对比
Table 3 Comparison of peak area for other phenylethanoid glycosides

名 称	Poliumo- side	管花肉 苁蓉苷 B	肉苁蓉 苷 C	肉苁蓉 苷 D	异洋丁香 酚苷	盐 生 肉 苁 蓉 苷 A
酒苁蓉	0 0 1	649.4	21.7	482.3	62.1	69.2
苁蓉片	0 0	59.7	3.2	25.3	4.2	1.2
野生盐 生肉 苁蓉	32.5	635.1	88.4	528.5	37.1	57.3
盐生肉 苁蓉 培养 细胞	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

以盐生肉苁蓉培养细胞内所含各物质的峰面积为 100%，其他样品为相对值

Taking area of substances of cultured *Salsa* cells as 100%, and value of others is relative

倍。其中松果菊苷质量分数为 63.0 mg/g, 是酒苁蓉的 8.4 倍, 野生盐生肉苁蓉的 1.1 倍; 洋丁香酚苷质量分数为 32.2 mg/g, 是酒苁蓉的 26.8 倍, 野生盐生肉苁蓉的 6.0 倍; 而 2'-乙酰基洋丁香酚苷质量分数仅为 0.5 mg/g, 低于酒苁蓉和野生盐生肉苁蓉。Poliumoside、肉苁蓉苷 C、异洋丁香酚苷和盐生肉苁蓉 A 在盐生肉苁蓉愈伤组织细胞中含量较高, 而管花肉苁蓉苷 B 在酒苁蓉中含量较高, 肉苁蓉苷 D 在天然盐生肉苁蓉中含量较高。

上述结果表明, 盐生肉苁蓉培养细胞中所含主要成分和野生盐生肉苁蓉基本相似, 只是含量不同,

从整体上看, 盐生肉苁蓉培养细胞中所含成分种类较多, 且大部分含量较高。考虑到类叶升麻苷和松果菊苷为肉苁蓉中主要的苯乙醇苷类活性成分, 而这两种物质在细胞中的含量均高于天然肉苁蓉, 因此可以利用植物细胞培养的方式, 大量生产盐生肉苁蓉细胞, 然后从中提取苯乙醇苷类活性成分, 作为天然肉苁蓉的替代品。

References:

- [1] Zhu Y H, Luo Z M. Study progress and prospect analysis of *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) [J]. *J H unan Fores Sci Technol* (湖南林业科技), 2000, 27(4): 19-22.
- [2] Zheng H Z, Dong Z H, She J. *Modern Study of Traditional Chinese Medicine* (中药现代研究与应用) [M]. Vol 2. Beijing: Xueyuan Press 1997.
- [3] Jin X L, Zhang Q R. Recent progress in the study on chemical constituents of *Herba Cistanche* [J]. *China J Chin M eter Med* (中国中药杂志), 1994, 19(11): 695-697.
- [4] Tu P F, Chu S W, Zhang Z G, et al. Analysis of phenylethanoid glycosides of *Herba Cistanche* by RP-HPLC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1997, 32(4): 294-300.
- [5] Tu P F, He Y P, Lou Z C. A survey on the origin and resource protection of *Cistanche* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(4): 205-208.
- [6] Tu P F. *Develop the Industrial of Herba Cistanche Tubulosae, Advance the Economy Development and Environment Controlling of Hetian* (发展管花肉苁蓉产业, 促进和田地区经济发展与环境治理) [C]. Urumqi: Chinese Pharmaceutical Association, 2002.
- [7] Li J Z. *Resources Protection and Investigation for Cistanche Plants in Xinjiang* (新疆肉苁蓉属植物的资源调查与资源保护) [C]. Urumqi: Chinese Pharmaceutical Association, 2002.
- [8] Guo Z G, Yu J M, Liu R Z, et al. Studies on culture of *Cistanche salsa* callus and synthesis of phenylethanoid glycosides [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 204-207.

RP-HPLC 法测定五味子中原儿茶酸的含量

许育海¹, 晁若冰*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

五味子是木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill 的干燥成熟果实, 习称“北五味子”, 是一种常用中药, 其味酸, 性甘、温, 归肺、心、肾经, 作用收敛固涩, 益气生津, 补肾宁心^[1]。五味子药材主要含有挥发性成分、木脂素类及酸性成分。关于五味子成分含量测定的文献报道较多, 主要集中于其木质素类成分^[1]和挥发性成分^[2]。有文献报道, 五味子中含有的原儿茶酸, 能降低心肌耗氧量, 拮抗肾上腺素所致的耗氧量增加, 提高心肌耐氧能力, 减

慢心律, 改善缺血中心区的乳酸和 K⁺ 的产生, 显著缩小心肌梗死范围^[3]。五味子及其制剂中原儿茶酸的含量测定尚未见文献报道。本实验建立了 HPLC 法测定五味子药材中原儿茶酸的含量, 结果表明, 该方法简便、准确, 可以用于五味子药材中原儿茶酸含量的测定。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪, SPD-6A V 紫外-可见检测器, 岛津 C-R 4A 色谱数据处

* 收稿日期: 2003-10-05

作者简介: 许育海(1976—), 男, 陕西蒲城人, 现为四川大学华西药学院 2001 级硕士研究生, 研究方向为药品质量的评价与控制。

* 通讯作者 Tel: (028) 85501454 Fax: (028) 85501454 E-mail: chaorb@163.net