

显,主要是因为 Sb5 子座普遍比 Sb1 的大。这可能是由于青山湖湿润的环境不但有利于多糖合成,也有利于竹黄菌的生长,形成较大子座。

2.9.3 不同采样点短穗竹上单个竹黄多糖的量比较:不同采样点短穗竹上生长的单个竹黄多糖与竹红菌甲素的量见表 2。

表 2 不同采样点短穗竹上单个竹黄多糖与竹红菌甲素的量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Content of polysaccharide and hypocrellin A in each *S bambusicola* stroma parasitizing at *B densiflorum* from different sampling areas ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

编号	多糖/(mg·个 ⁻¹)	竹红菌甲素/(μg·个 ⁻¹)
Sb1	6.35±0.14 Jj*	10.62±0.16 Ce
Sb5	8.59±0.16 Ee	9.23±0.21 Ee
Sb6	9.21±0.19 Cc	8.40±0.18 Ff
Sb7	8.42±0.20 Ff	9.23±0.25 Ee
Sb8	7.96±0.11 Hh	10.30±0.13 Dd
Sb9	6.89±0.14 Ii	2.62±0.05 Ll
Sb10	4.50±0.05 Kk	6.47±0.10 Ii
Sb11	7.88±0.12 Hh	6.77±0.13 Hh
Sb12	6.92±0.08 Ii	5.31±0.10 Jj
Sb13	9.07±0.09 Dd	3.22±0.07 Kk
Sb14	8.16±0.18 Gg	16.60±0.29 Aa
Sb15	12.43±0.21 Aa	7.48±0.17 Gg
Sb16	10.25±0.23 Bb	11.22±0.24 Bb

* 不同大写字母标注的数字表示在 0.01 水平差异极显著,不同小写字母标注的数字表示在 0.05 水平差异显著

* Data marked with different capital letters mean very significant difference at 0.01 level, data marked with different small letters mean significant difference at 0.05 level

由表 2 可见,除个别差异性不显著外,大多数不同采样点短穗竹上寄生的竹黄在同一时期不论是多糖还是竹红菌甲素的量均存在极显著的差异,可见

竹黄中这 2 种主要有效成分的量受环境的影响较大。那么不同采样点短穗竹上单个竹黄多糖与竹红菌甲素的量之间是否存在相关性,分析结果表明相关性系数 $R=0.143 < R_{0.01}=0.641$,可见两者之间的相关性不显著,可能是因为多糖与竹红菌甲素的合成途径不同。

3 讨论

经查阅国内外文献,未见有关竹黄菌子座多糖量的报道。本实验分析比较了不同来源竹黄的多糖量,并进行了差异性与相关性分析,不但初步揭示了竹黄多糖的变化规律,而且为中药材竹黄的开发利用提供了一定的理论依据与指导。

在竹黄多糖的测定中,多糖的提取工艺与测定方法对结果的准确性至关重要,而对于竹黄多糖的提取与分析,很少有现成的文献可供参考,本实验经过试验摸索,筛选出了以上的工艺与方法,经验证其精密度、重现性、稳定性、回收率等均较理想,证明试验方法稳定可行。

参考文献:

- [1] 林海萍,黄小波,毛胜凤,等.野生竹黄菌生物学性状研究[J].中草药,2008,39(9):1407-1409
- [2] Cheng T F, Jia X M, Ma X H, et al. Phylogenetic study on *Shiraia bambusicola* by rDNA sequence analyses [J]. *J Basic Microbiol*, 2004, 44(5): 339-350
- [3] 李 聪,谢金伦,陈远腾.肉座菌科三种药用真菌的化学成分分析比较[J].中草药,2000,31(4):260-261
- [4] 陈佳佳,扶教龙,顾华杰,等.竹黄多糖 BSP-1 的组成和抗氧化活性分析[J].食品研究与开发,2008,29(8):120-123
- [5] 陈佳佳,扶教龙,胡翠英,等.竹黄多糖的提取工艺及清除自由基活性研究[J].江苏农业科学,2008(2):196-198
- [6] 林海萍,吴美芳,季伟强.不同来源竹黄中竹红菌甲素比较研究[J].中草药,2005,36(增刊):251-254
- [7] 刘桂萍.冬虫夏草多糖测定方法的研究进展[J].药学实践杂志,2008,26(1):53-54
- [8] 高丽娟.黑木耳中多糖的测定[J].中国医药工业杂志,2003,34(3):144-145

促进剂组合对中国红豆杉细胞悬浮培养紫杉醇合成的影响

李千雄^{1,2},张京维^{1,2},骆雪兰^{1,2},侯云屏^{1,2},黄巧明^{1,2*}

(1 梅州市杉维生物医药工程研究有限公司,广东 梅州 514031; 2 紫杉醇产业工程技术研究开发中心,广东 梅州 514031)

摘要:目的 研究中国红豆杉 *Taxus chinensis* 细胞悬浮培养中蔗糖、柠檬酸三铵、水杨酸和氨基酸前体组合对细胞生长和紫杉醇(taxol)积累的影响。方法 采用 $L_9(3^4)$ 设计试验,考察了第 9 天添加蔗糖(10、16、22 g/L)、柠檬酸三铵(0、154、1 540 mg/L),第 21 天添加蔗糖(20、26、0 g/L)和不同时间组合添加水杨酸及氨基酸前体 4 个因素对红豆杉细胞悬浮培养和紫杉醇合成的影响。结果 当在细胞培养的第 0 天添加 1.67 mg/L 硝酸银,第 9 天添加 10 g/L 蔗糖,第 9 天添加 1 540 mg/L 柠檬酸三铵,紫杉醇达到最高,在此最优组合处理时紫杉醇质量浓度达到 39.2 mg/L,相对于最差组合处理的(2.1 mg/L)时提高 18.7 倍。结论 促进剂组合对中国红豆杉细胞悬浮培养的生长和紫杉醇的合成都有很明显的影

* 收稿日期:2009-11-04

基金项目:中小企业创新基金(国防科发计字[2008]434号);山区及东西两翼技术创新项目(2007915226)

作者简介:李千雄(1972—),男,广东省五华人,1994年毕业于四川大学大学生物工程微生物专业,生物技术工程师,主要从事红豆杉植物细胞大量培养生产紫杉醇的研究。Tel: (0753) 2183210 Fax: (0753) 2183269 E-mail: ganxiongli@hotmail.com

关键词: 中国红豆杉; 促进剂; 紫杉醇; 正交设计

中图分类号: Q943.1; S791.49

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1552-04

采用红豆杉植物细胞悬浮培养方法来生产紫杉醇是生产紫杉醇原料药的一条很有希望的途径, 经过专家们十多年的研究, 已经证明细胞培养方法生产紫杉醇中诱导子(如甲基茉莉酮酸、硝酸银、水杨酸、壳聚糖等)、氨基酸前体(Bhe、Lys、Trp、Gly等)、各种碳源(蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、D-果糖等)和营养物质(柠檬酸三铵、水解酪蛋白、水解乳蛋白等)等都对红豆杉细胞生长和紫杉醇积累有明显的影响^[1-4], 以前研究中已经证明, 在细胞培养的前期添加硝酸银、在细胞培养的中期添加水杨酸、在细胞培养的后期添加氨基酸前体, 能协同促进中国红豆杉细胞培养中紫杉醇合成^[5]。本实验在此基础上, 继续采用正交实验设计, 研究在水杨酸、硝酸银、氨基酸前体这些促进剂合适的添加时间前提下, 重点研究柠檬酸三铵的添加浓度和不同时间蔗糖的添加浓度对红豆杉细胞生长和紫杉醇合成的影响, 并研究柠檬酸三铵、蔗糖、水杨酸和氨基酸前体的最佳添加浓度和添加时间的组合效果。

1 材料与方法

1.1 细胞株和培养条件^[5]: 供试材料为梅州市杉维生物医药工程研究有限公司组培实验室诱导筛选并继代培养保存的高含紫杉醇的中国红豆杉细胞株^[6], 以 B₅ 为基本培养基^[7], 添加 1 mg/L NAA、0.2 mg/L 6-BA、30 g/L 蔗糖、100 mg/L Vc 和 292.8 mg/L 谷氨酰胺作为继代培养基。继代时采用 250 mL 的三角瓶, 内装 50 mL 的继代培养基, 接入 50 mL 培养 14 d 的悬浮培养细胞, 然后将摇瓶均匀置于 (24 ± 1) °C 的恒温室内的摇床上, 以 120 r/min 转速进行振荡培养, 细胞培养 14 d 后作为种子做正交试验。

1.2 正交试验设计

1.2.1 因素和水平: 根据 4 因素 3 水平 L₉(3⁴)^[8] 正交试验表设计试验, 其中因素 A 表示第 9 天添加蔗糖的浓度, 分别为 10、16、22 g/L, 因素 B 表示第 21 天添加蔗糖的浓度, 分别为 20、26、0 g/L, 因素 C 表示第 9 天添加柠檬酸三铵的浓度, 分别为 0、154、1540 mg/L; 因素 D 为 2 mg/L 水杨酸和氨基酸(10 mg/L phe、10 mg/L lys、15 mg/L trp、10 mg/L 氨基乙酸)前体的添加时间, 第 I 组试验在第 17 天添加 2 mg/L 水杨酸后第 20 天再添加氨基酸前体; 第 II 组试验在第 26 天添加 2 mg/L 水杨酸后第 30 天再添加氨基酸前体; 第 III 组作为对照组不添加。

1.2.2 因素配制和添加方法: 配制浓度为 400 g/L 的蔗糖溶液, 灭菌后按表 1 设计的时间和浓度添加; 柠檬酸三铵配制溶液后, 调溶液 pH 至 5.8, 用 0.22 μm 过滤器无菌滤过后添加; 水杨酸和氨基酸配制溶液后各自用 0.22 μm 过滤器无菌滤过后添加。

1.3 柠檬酸三铵、蔗糖、水杨酸和氨基酸前体的组合试验: 采用的生产培养基与继代培养基相同, 250 mL 的三角瓶装 100 mL 的生产培养基, 无菌滤过接入 7 g 鲜细胞(相当于 0.4 g 干细胞), 在细胞培养的 0 天时添加 1.67 mg/L 的硝酸银^[9], 根据表 1 进行试验, 细胞培养到第 37 天收获, 取样检测细胞的生物量和培养液中的紫杉醇量。

表 1 正交试验设计

Table 1 Orthogonal test design

水平	因 素			
	A/(g · L ⁻¹)	B/(g · L ⁻¹)	C/(mg · L ⁻¹)	D/d
1	10	20	0	17+ 20
2	16	26	154	26+ 30
3	22	0	1540	不添加

1.4 测定方法

1.4.1 细胞鲜质量的测定: 细胞培养物用 120 目尼龙筛网滤过, 细胞用蒸馏水冲洗 3 次后, 再用干纱布吸干细胞表面水分, 在托盘天平上称其质量。

1.4.2 细胞干质量的测定: 鲜细胞置于恒温烘箱中, 60 °C 烘干至恒重, 用分析天平称其质量。

1.4.3 培养液中紫杉醇的测定: 取 10 mL 培养液, 加入等体积的 10 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并萃取液并减压回收二氯甲烷, 干物质用甲醇溶解定容后用 HPLC 检测。采用 Waters HPLC, 分离柱是反相硅胶柱(Novapak C₁₈, 150 mm × 3.9 mm, 4 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水(29:27:44), 柱温为 35 °C, 体积流量 1 mL/min, 洗脱时间 11 min, 在 227 nm 用紫外检测器检测, 紫杉醇定量采用外标法, 每次进样量为 5 μL, 紫杉醇标准品为 SIGMA 公司生产。

2 结果与讨论

2.1 正交试验: 结果见表 2。

2.2 促进剂对中国红豆杉细胞培养生物量的影响

2.2.1 促进剂对中国红豆杉细胞培养鲜质量的影响: 表 2 试验结果表明, A₃B₂C₂D₁ 组合时细胞鲜质量最高, 即第 9 天添加 22 g/L 蔗糖和 154 mg/L 的柠檬酸三铵, 第 21 天添加 26 g/L 蔗糖和第 17 天添加 2 mg/L 水杨酸与第 20 天添加氨基酸复合液。

表 2 中国红豆杉培养正交实验结果

Table 2 Experimental results of cell suspension culture of *T. chinensis* by orthongonal design

组 合	因 素				结 果		
	A	B	C	D	鲜质量/ (g · L ⁻¹)	干质量/ (g · L ⁻¹)	培养液中紫杉醇/ (mg · L ⁻¹)
1	1	1	1	1	233 0	9 00	2 10
2	1	2	2	2	297 2	17 60	7 52
3	1	3	3	3	209 6	11 40	39 20
4	2	1	2	3	257 4	17 20	11 50
5	2	2	3	1	298 8	13 20	17 20
6	2	3	1	2	226 8	13 00	17 70
7	3	1	3	2	256 0	15 80	12 50
8	3	2	1	3	250 4	16 60	14 40
9	3	3	2	1	306 4	17 00	6 24
鲜质量 I (g · L ⁻¹)	246 60	248 80	236 73	279 40			
鲜质量 II (g · L ⁻¹)	261 00	282 13	287 00	260 00			
鲜质量 III (g · L ⁻¹)	270 93	247 60	254 00	239 13			
干质量 I (g · L ⁻¹)	12 67	14 00	12 87	13 07			
干质量 II (g · L ⁻¹)	14 47	15 80	17 27	15 47			
干质量 III (g · L ⁻¹)	16 47	13 80	13 80	15 07			
紫杉醇 I (mg · L ⁻¹)	16 27	8 70	11 40	8 51			
紫杉醇 II (mg · L ⁻¹)	15 47	13 04	8 42	12 57			
紫杉醇 III (mg · L ⁻¹)	11 05	21 05	22 97	21 70			

I 代表水平 1 之和的平均值, II 代表水平 2 之和的平均值, III 代表水平 3 之和的平均值

I indicates average of sum of results in level 1, II indicates average of sum of results in level 2, III indicates average of sum of results in level 3

2 2 2 促进剂对中国红豆杉细胞培养干质量的影响: 表 2 试验结果表明, A₃B₂C₂D₂ 组合时细胞干质量最高, 即第 9 天添加 22 g/L 蔗糖和 154 mg/L 的柠檬酸三铵, 第 21 天添加 26 g/L 蔗糖、以及第 26 和 30 天组合添加 2 mg/L 水杨酸与氨基酸复合液。

2 3 促进剂对中国红豆杉细胞培养紫杉醇合成的影响: 表 2 结果表明, A₁B₃C₃D₃ 组合紫杉醇量最高, 细胞培养的第 9 天不宜添加过多的蔗糖, 以添加 10 g/L 蔗糖紫杉醇量最高, 添加蔗糖浓度越高, 紫杉醇量越低; 细胞培养的第 9 天添加柠檬酸三铵效果最好, 以添加 1 540 mg/L 的柠檬酸三铵时紫杉醇量最高, 添加 154 mg/L 的柠檬酸三铵时与对照比较反而要低; 细胞培养的第 21 天以不添加蔗糖时紫杉醇量最高, 添加蔗糖浓度越高, 紫杉醇量越低; 细胞培养的前期不宜添加水杨酸和诱导子和氨基酸前体类物质, 过早添加水杨酸诱导子和氨基酸前体类物质时抑制紫杉醇合成; 从正交试验的组合项 3 可以看出此实验结果, 最优组合时紫杉醇达到 39. 2 mg/L, 比最差组合项 1 的 2 1 mg/L 高 18 7 倍。

3 讨论

正交试验结果表明, 不同时间蔗糖的添加浓度、第 9 天添加柠檬酸三铵的浓度、水杨酸和氨基酸前体的添加时间对红豆杉植物细胞培养的生长和紫杉

醇的合成都有很明显的影响; 同时添加蔗糖和柠檬酸三铵时, 培养液中高浓度的蔗糖抑制了柠檬酸三铵的促进效果, 只有在培养液蔗糖浓度较低时, 柠檬酸三铵促进紫杉醇合成的效果才比较明显; 低浓度的柠檬酸三铵不起作用, 只有较高浓度的柠檬酸三铵才起到促进作用。试验结果还表明, 水杨酸和氨基酸前体应该在后期添加好, 跟前期试验结果相一致^[5]。众多研究文献已经证明蔗糖、柠檬酸三铵、水杨酸和氨基酸前体单独添加时都能明显促进紫杉醇的合成^[1-4], 但本次实验没有发现蔗糖、柠檬酸三铵、水杨酸和氨基酸进行组合实验时出现协同促进作用, 可能这些因素之间会有比较复杂的相互作用, 不同促进剂浓度和不同促进剂添加时间的组合能影响紫杉醇的合成。将在此试验的基础上继续深入研究多种因素组合对红豆杉细胞培养生长和紫杉醇合成的影响。

参考文献:

[1] 胡 萍, 元英进. 添加诱导子和紫杉醇合成前体物对红豆杉细胞培养的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(5): 223-225

[2] 元英进, 许 晖, 王传贵, 等. 前体饲喂东北红豆杉细胞强化紫杉醇生产研究[J]. 中草药, 1997, 28(增刊): 9-11

[3] 吴奇君, 梅兴国, 周志强, 等. 前体对东北红豆杉细胞悬浮培养紫杉醇合成的影响[J]. 生命科学研究, 2001, 5(2): 146-148

[4] 未作君, 苗志奇, 元英进, 等. 柠檬酸铵对紫杉醇生物合成途径的诱导作用研究[J]. 中草药, 2001, 32(3): 213-215

[5] 李干雄, 李志良, 曾腾锋, 等. 几种促进剂的添加时间对中国红

- 豆杉细胞悬浮培养紫杉醇合成的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 5(20): 876-879
- [6] 李志良, 李干雄, 饶秋容, 等. 红豆杉细胞培养中紫杉醇高产细胞株的筛选及其稳定性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 62-65
- [7] Gamborg O L, Miler R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells [J]. *Expt Cell Res*, 1968, 50: 151-158.
- [8] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1985
- [9] 未作君, 胡宗定, 元英进. 硝酸银作用下南方红豆杉细胞悬浮培养生产紫杉醇动力学研究[J]. 化学反应工程与工艺, 2000, 16(4): 313-318

羊开口药材的名实考证

蒋受军¹, 钟小清², 吕高荣², 张南平³, 邹节明^{2*}, 肖新月^{3*}

(1 广西壮族自治区药品检验所, 广西南宁 530021; 2 桂林三金药业股份有限公司, 广西桂林 541004;

3 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要:目的 对民间常用中药材羊开口原植物来源进行考证。方法 考查本草文献中羊开口原植物和药用部位的记载及附图, 野外调查羊开口药材原植物的来源, 通过产地药农收集羊开口原植物标本, 核对原植物标本并咨询分类专家。结果 目前市场上羊开口原植物来源是野牡丹科展毛野牡丹和野牡丹的根, 部分地区同时混杂多花野牡丹和毛稔的根。结论 为更好地制定羊开口新的药材质量标准, 并为羊开口药材收购提供依据, 保证羊开口药材的质量。

关键词: 羊开口; 植物来源; 资源调查

中图分类号: R281

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1555-03

2010年版《中国药典》^[1]附录收载羊开口为展毛野牡丹(广州植物志又名肖野牡丹) *Melastoma normale* D. Don 的根^[1]。展毛野牡丹收载于《南宁市药物志》、《福建民间草药》、《陆川本草》、《万县中草药》、《云南中草药选》、《广西本草选编》等地方性本草中;《全国中草药汇编》、《中药大辞典》、《中华本草》等大型综合性本草对肖野牡丹和野牡丹分别进行了论述, 并对各省地方性本草分别进行了综合论述。羊开口是 20 世纪 50 年代到 70 年代从民间用药整理出来的一味民间药材, 并由于中成药的生产和利用逐渐成为大宗商品药材。羊开口有野牡丹根(福建、四川)、痢疾罐(贵州)、白爆牙郎、大金香炉(广西)、老虎杆(重庆万县)等多种别称。羊开口收载于《广西中药材标准》1990 年版, 味甘、酸、涩, 性温, 具有收敛、止血、解毒的功效, 用于泄痢、崩漏带下、内外伤出血^[2]。羊开口是三金片系列中成药产品的重要原料, 年产销量为 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ kg, 药材主产于广西、云南、贵州、四川、福建、重庆等省市, 是上述省市酸性土壤的优势植物品种。羊开口药材产销集中度较高、商业流动性较低, 主要用于中成药生产的原料。为了保证中成药生产及羊开口药材的

质量, 对羊开口商品药材进行原植物来源调查和考证。

1 羊开口药材植物来源调查、药材性状鉴定及相近种植物分类检索表

1.1 羊开口药材植物来源调查: 笔者通过近几年的中草药资源调查及对主产区羊开口药材植物来源专项调查发现, 目前羊开口药材的商品主要来源于展毛野牡丹及同属植物野牡丹 *M. candidum* D. Don 的根, 同时在部分产区同属植物多花野牡丹 *M. affine* D. Don 和毛稔 *M. sanguineum* Sims 的根亦作为羊开口使用。羊开口分布区域比较窄, 主要分布在广西灵川以南, 贵州独山、铜仁以南, 重庆万县以南, 四川泸州以南, 福建三明以南, 云南南部和广东大部分地区的狭窄区域及东南亚部分国家。通过调查研究产区药农采集羊开口标本, 初步鉴定后, 装订标本, 并在广西植物研究所标本馆进行标本核对, 并由广西壮族自治区植物研究所李光照研究员对标本进行最终鉴定。通过对产地实地调查研究和采集的标本鉴定后, 发现羊开口药材的主要植物来源为展毛野牡丹和野牡丹的根。在羊开口产地, 羊开口阳枝(产地习惯将羊开口地上不带茎叶的粗茎

* 收稿日期: 2009-12-15

作者简介: 蒋受军, 男, 副主任药师, 博士研究生。

* 通讯作者 邹节明 Tel: (0773) 5842588 E-mail: zjm@sanjin.com.cn

肖新月 Tel: (010) 67095432 E-mail: xiaox y@nicpbp.org.cn