

两种倍性水平菘蓝的生药学研究

第二军医大学药学院(上海 200433) 乔传卓* 戴富宝 崔熙 李玲
李红方 吴正权

摘要 菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. ($2n=14$) 和它的人工四倍体 ($2n=28$) 的生药学研究结果表明, 2种倍性水平菘蓝的根、叶生药性状及组织特征均有显著差异。发现该植物的染色体加倍产生的巨型性特征不仅在器官之间发展不平衡, 而且在同一器官的不同组织之间发展也不平衡。四倍体高产品系与原二倍体相比, 在接近收获期叶中靛蓝含量提高1.79%~3.11%, 是原二倍体的近2倍或3倍, 靛玉红含量也有明显提高, 叶中多糖含量与原二倍体相当; 根中多糖含量比原二倍体略低1%左右, 但总氨基酸含量比原二倍体提高了4.8%。

关键词 菘蓝 大青叶 板蓝根 二倍体 四倍体 生药学

菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的人工四倍体于1987年育成, 并形成了2个生物学性状不同的品系, 保存下来的B₃品系叶中靛蓝、靛玉红含量比二倍体叶中提高的幅度虽不大, 但却显示了极好的增产性能^[1]。为了进一步提高活性成分含量并改善其园艺性状, 经过连续两代的单株选育, 终于形成了稳定高产, 药材品质得以进一步改善的新品系。这个高产品系已在上海郊县进行了大面积推广, 田间试验结果表明四倍体叶增产25%以上, 根增产10%~18%。为了保证临床合理用药和制定药品标准提供依据, 今报道2种倍性基原的大青叶和板蓝根的生药学研究结果。

1 材料和方法

菘蓝的二倍体、四倍体高产品系均采自栽培在相同条件下试验地(上海县曹行乡), 活性成分积累动态分析样品均为同年06-20播种, 自10-01日起间隔半个月采集1次, 每次各品系均随机采收5株, 自然干燥。其它实验材料均取收获期的样品。显微标本的制作, 取新鲜根和叶、经FAA固定液固定, 石蜡切片。叶表面片用水合氯醛透化。

1.1 靛蓝与靛玉红的含量测定: 高效液相色谱仪Waters510/590泵, 680自动梯度控制器, 490程控多波长检测器, 740色谱微处理器及U6k进样器; 甲醇、氯仿均为分析纯, 水为去离子二次重蒸馏水, 靛蓝标准品为Merck产品, 靛玉红标准品由四川中药研究所提供。分析条件, 色谱柱Lichrosorb RP-18(10 μ m), 流动相为甲醇-水(60:40v/v), 流速15ml/min, 紫外检测波长292nm, 灵敏度1A UFS, 纸速0.1cm/min, 外标法定量。靛蓝校正因子 0.47254×10^{-7} , 靛玉红校正因子 0.182026×10^{-7} ^[2]。

1.2 多糖含量测定: 采用苯酚-浓硫酸法^[3]。无水葡萄糖、苯酚、浓硫酸均为分析纯。5%苯酚溶液的配制, 取苯酚加铝片少许蒸馏后所得精制品配制。比色波长490nm, 回归方程 $Y = 382.74A - 3.96$ $r = 0.9994$, 板蓝根多糖换算因素 $f = 1.552$; 大青叶多糖换算因素 $f = 4.025$ 。百分含量按下列公式计算:

$$\text{多糖含量} = \frac{(382.96A - 3.96) \text{ug} \times 50 \times f}{W \times 10 \text{ug}} \times 100\%$$

A = 吸收度, W = 称重(样品), f = 换算因素

*Address: Qiao Chuanzhuo, College of Pharmacy, Second Military Medical College, Shanghai

1.3 氨基酸分析：日立，835-50型高速氨基酸分析仪。样品前处理：游离氨基酸，0.02 mol/L盐酸溶解样品，提取完全，离心过滤，上机测定。水解氨基酸，酸水解测定除色氨酸以外的其它氨基酸，碱水解测定色氨酸。

2 实验结果

2.1 生药的性状鉴定：

2.1.1 根的性状比较，四倍体根，呈圆柱形，稍扭曲，长10~30cm，直径0.3~1.3cm，表面灰黄色，有纵皱纹及枝根痕，皮孔横长；根头部显著膨大，顶端有盘状凹陷的茎痕，周围有轮状排列的暗绿色叶柄残基和密集的疣状突起；质略软而实，易折断，断面平整，皮部黄白色，木部黄色，形成层环深棕色。

本品与原二倍体根的性状相似，不同点在于本品主根粗壮，分枝偏多，根头部膨大尤其甚，其上的叶残基大而粗糙，折断面较平坦（图1，A）。

2.1.2 叶的性状比较：四倍体叶极皱缩，表面灰绿色；完整的叶片呈长圆形，长20~35cm，宽4~12cm，全缘或微波状，先端钝圆，基部渐狭下延至叶柄成翼状，叶脉于背面隆起；叶柄长3~7cm，腹面略呈槽状，基部略膨大；质脆，易碎。

本品也与二倍体叶类似，不同点在于本品叶柄粗大而短，为叶全长的1/3左右，叶片显著宽大而厚实（图1，B、C）。



图1 板蓝根、大青叶药材图

A-2种倍性水平板蓝根 左-二倍体根 右-四倍体根

B-四倍体大青叶 C-二倍体大青叶

2.2 生药的组织鉴定：

2.2.1 根的组织比较：四倍体根（直径1cm）的横切面，木栓层2~10列木栓细胞；皮层狭窄；韧皮部宽广，射线宽5~8列细胞；形成层成环；木质部导管1~3列，导管直径约90 μ m，平均直径50~56 μ m，木部纤维束可见，纤维直径可达50 μ m，分布于导管周围。根头部的横切面，木栓层可达30余列细胞；皮层及韧皮部外缘常见1~3个石细胞，类圆形，多角形或卵形、直径可达70 μ m，单个散在或群集；射线宽5~10列细胞；木部纤维束较多，纤维直径可达65 μ m，平均直径11~14 μ m；髓部宽广。薄壁细胞中可见淀粉粒。

本品与二倍体根组织特征类似，不同点在于导管数量略少，木部纤维数量也显著减少，但导管、纤维的直径均相对增大，根头部的木纤维尤为明显。二倍体导管平均直径为40~44 μ m，木部纤维于根头部平均直径为9~11 μ m。四倍体根头部木纤维最大直径可与周围的导管相比拟（图2）本品薄壁细胞中淀粉粒显著少于二倍体。

2.2.2 叶的组织比较：四倍体叶上表皮表面观，表皮细胞呈多角形、类长方形或不规则形，直径20~136 μ m，垂周壁较平直，细胞壁呈链珠状增厚，平周壁可见微细角质层纹理。下表皮细胞呈长方形，长多角形或不规则形，垂周壁稍弯曲，呈链珠状增厚。气孔为不等式，长圆形，长径38~44 μ m，副卫细胞3~4个。厚角组织纵切面观呈长条形，直径50~103 μ m，

角隅处明显增厚。叶肉及表皮细胞中含淀粉结晶，呈细小颗粒状或片状，常聚成堆。橙皮甙结晶类圆形或针簇状。

本品与二倍体叶组织特征类似，不同点在于表皮细胞、气孔、栅状细胞等极显著同步增大，单位面积的表皮细胞为350~490/mm，显著小于二倍体600~700/mm（图3）。

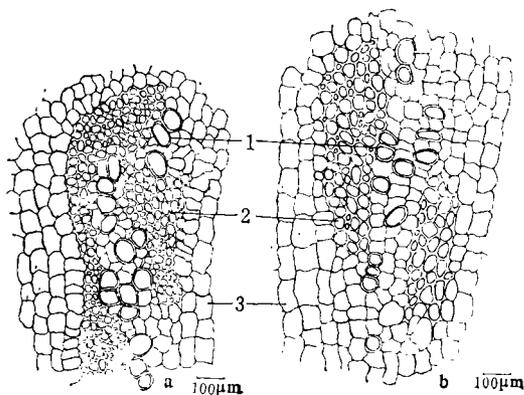


图2 板蓝根根头部横切面部分详图

a-二倍体 b-四倍体
1-导管 2-纤维 3-木射线

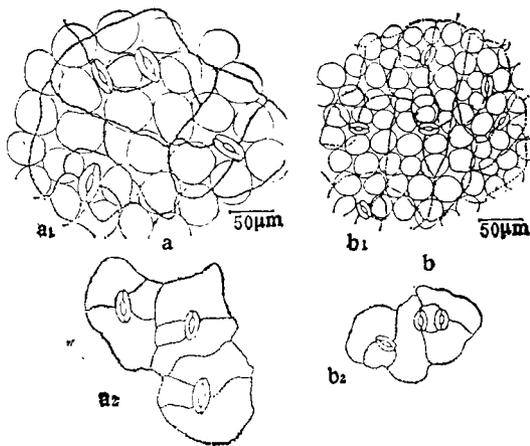


图3 板蓝根2种倍性水平叶表面观的比较

a-四倍体 a₁-上表皮 a₂-下表皮
b-二倍体 b₁-上表皮 b₂-下表皮

2.2.3 2种倍性水平大青叶靛蓝、靛玉红的积累动态比较：2种倍性水平大青叶靛蓝、靛玉红积累动态比较结果见表1。

2.2.4 2种倍性水平板蓝根、大青叶多糖积累动态比较：结果见表2、表3。

表1 2种倍性水平叶靛蓝和靛玉红的积累动态比较

品系	采收日期	成分含量			
		靛蓝 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	CV% ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	靛玉红 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	CV%
二倍体	10-11	3.38 ± 1.17	34.70	1.91 ± 0.46	23.87
	10-15	2.52 ± 1.20	47.76	1.28 ± 0.50	39.37
	11-01	1.07 ± 0.82	76.68	0.58 ± 0.49	83.96
	11-15	1.03 ± 0.52	50.19	0.49 ± 0.16	31.83
	12-01	1.14 ± 0.53	46.39	0.92 ± 0.51	55.00
	12-15	2.24 ± 0.88	39.13	1.56 ± 0.74	47.50
四倍体	10-01	3.76 ± 2.67	70.61	1.93 ± 0.65	28.86
	10-15	2.79 ± 1.40	50.11	1.95 ± 0.41	21.07
	11-01	2.39 ± 1.75	73.22	0.83 ± 0.31	38.19
	11-15	1.22 ± 0.60	49.42	0.58 ± 0.26	44.13
	12-01	4.25 ± 2.59	60.91	1.32 ± 0.23	17.65
	12-15	4.03 ± 1.87	46.40	1.65 ± 0.34	20.84

表2 2种倍性水平根中多糖积累动态比较

品系	采收日期	成分含量
		($\bar{x} \pm s\%$, n=5)
二倍体	10-01	19.99 ± 1.20
	10-15	19.23 ± 1.54
	11-01	23.54 ± 0.75
	11-15	20.78 ± 1.07
	12-01	19.31 ± 1.19
	12-15	23.86 ± 0.63
四倍体	10-01	18.41 ± 0.79
	10-15	18.09 ± 1.24
	11-01	21.97 ± 2.35
	11-15	20.48 ± 1.19
	12-01	18.81 ± 1.07
	12-15	22.57 ± 1.02

2.2.5 2种倍性水平板蓝根游离氨基酸、水解氨基酸的分析测定：氨基酸的分析测定结果见表4。

表3 2种倍性水平叶中多糖积累动态的比较

品系	采收日期	成分含量
		($\bar{x} \pm s\%$, n=5)
二倍体	10-01	22.56 ± 1.04
	10-15	20.46 ± 1.52
	11-01	21.78 ± 0.64
	11-15	21.38 ± 1.42
	12-01	21.01 ± 0.73
	12-15	22.85 ± 0.82
四倍体	10-01	22.44 ± 0.73
	10-15	20.25 ± 1.89
	11-01	21.17 ± 0.72
	11-15	19.35 ± 1.41
	12-01	21.40 ± 0.80
	12-15	22.93 ± 0.70

表4 根中游离氨基酸和水解氨基酸的分析结果

氨基酸	二倍体		四倍体	
	游离	水解	游离	水解
门冬氨酸	0.059	0.738	0.018	0.666
苏氨酸	0.552	0.411	0.327	0.456
丝氨酸	0.084	0.322	0.068	0.323
谷氨酸	0.190	1.234	0.280	0.958
脯氨酸	1.656	1.666	4.322	0.282
甘氨酸	0.015	0.313	0.016	0.335
丙氨酸	0.067	0.335	0.013	0.321
胱氨酸	0.024	0.043	0.048	0.030
缬氨酸	0.119	0.487	0.230	0.583
蛋氨酸	0.027	0.111	0.067	0.113
异亮氨酸	0.053	0.276	0.056	0.325
亮氨酸	0.025	0.462	—	0.494
酪氨酸	0.029	0.156	0.026	0.143
苯丙氨酸	0.073	0.347	0.193	0.335
赖氨酸	0.146	0.569	0.054	0.533
组氨酸	0.122	0.258	0.103	0.235
色氨酸	—	0.034	—	0.036
精氨酸	5.508	5.530	5.396	5.454
总 量	8.749	13.292	11.220	15.612

3 讨论

以菘蓝为植物基原的板蓝根、大青叶组织鉴别研究已有一些报道[4~6]。对相同栽培条件下收获的2种倍性板蓝根和大青叶的组织学观察表明,没有发现质的差异,其差异

主要为量的方面。植物染色体多倍化带来的巨型性生物学特征,在菘蓝的不同器官之间的表现是极不均衡的,如叶的巨型性明显大于根,因而叶的增产效应明显大于根。这种不均衡性同样也反映在组织学特征上,更值得注意的是在同一器官的不同组织之间也不均衡,如根中的薄壁组织细胞增大不甚明显,而导管增大不及纤维明显。2种倍性水平根和叶中的含有物,如淀粉粒、靛蓝结晶、橙皮甙结晶颗粒的形态及大小均无改变,唯有四倍体根中淀粉粒数量明显少于二倍体。

为了全面考查2种倍性水平的板蓝根、大青叶的品质,对叶中的靛蓝、靛玉红、多糖及根中的多糖含量动态作了比较,并比较了根中游离氨基酸、水解氨基酸的组成与含量。从表1可以看出,叶中靛蓝、靛玉红成分在各个采收期四倍体均高于二倍体,尤其在12月上旬和中旬,临近采收期靛蓝含量可达二倍体的2倍或近3倍,靛玉红成分也显著高于二倍体,这对改善药材质量有重要意义。本次含测值较1987年所测的值低^[1],其原因是前次实验样品为鲜叶经80℃烘干所致。由于靛蓝、靛玉红成分都由存在于鲜叶中的菘蓝甙水解产物吡咯经氧代聚合而成^[7],而这种氧化聚合过程需一定的温度条件。本实验考虑到大青叶生产的实际情况,采用了自然干燥法。

曾有报告板蓝根多糖无论对特异性免疫和非特异性免疫,体液免疫和细胞免疫均有一定的促进作用^[8],故用多糖积累作为评价指标之一。测定结果表明,2个倍性水平大青叶多糖含量在各采收期含量均无显著性差异,而且有相似的积累动态。在10月初,12月中均有1个高峰期,从药材生产实际来看,后一含量高峰最有意义。2个倍性水平根的多糖积累动态也较相似,在11月初和12月中均有一个含量高峰。尤以12月中旬为最高。这与余中仁等观察的还原糖含量于12月下旬冬至到翌年1月的全年最低温度时期含量最高较接近^[9]。从测定结

(下转第429页)

厚、外突形成网脊，外壁内陷形成网眼（图，E₂）。b）芸苔子：种皮表皮细胞表面观棕色，多角形。扫描电镜下可见其为近球形，表面有较大的网状纹理（图，F₁）。局部放大可见种皮表皮细胞多角形，垂周壁较薄，外突形成网脊，外壁内陷形成网眼，外壁外方有网状角质纹理（图，F₂）。

3 结论与讨论

3.1 几组易混种子类中药电镜表面扫描的主要区别点：见表。

表 几组易混种子类中药电镜表面扫描的主要区别

区别点	种皮细胞形状	垂周壁特征	表面特常
酸枣仁			有许多不规则凹窝
枳椇子			有许多乳头状突起
韭菜子	不规则形、多角形	壁薄、微内陷	平行的纹理，外壁附有角质突起
葱子	多角形	壁厚、微内陷 可见胞间联丝	细小网状纹理，外壁外角质层较均匀
芥子	类多角形	壁厚、外突	细小网状纹理
芸苔子	多角形	壁薄、微突出	较大的网状纹理，外壁外被网状角质纹理

3.2 种子表面附着的细小泥沙颗粒，很不易清洗掉，实验用水清洗后又用无水乙醇清洗2~3次，从照片上看仍不够彻底，今后应进一步改进清洗方法或者选用刚从果实上取出的种子固定，实验用葱子即是未污染的新鲜材料，照片比较理想。

参 考 文 献

- 1 中国医学科学院药物研究所，等.中药志.第二版.北京：人民卫生出版社，1984. 362. 374. 475. 535. 621. 666
- 2 凌云，中国中药杂志，1989，14（11）：12
（1994-03-07收稿）

（上接第426页）

果尚可以看出，2种倍性水平板蓝根均有较高的多糖含量，但四倍体在各个时期均偏低1%左右。在板蓝根制剂生产中（如板蓝根注射剂、板蓝根冲剂）多用乙醇沉淀除去多糖，说明多糖成分仅是其活性成分之一，为了充分利用这一资源，改进大青叶和板蓝根制剂的工艺显然是必要的。

为了评价2个倍性水平的板蓝根，还比较了游离氨基酸和水解氨基酸，表4所列结果表明选育出的这个高产品系氨基酸组成与原二倍体基本相同，但总氨基酸含量比原二倍体增加了4.8%，其中脯氨酸增加幅度最大。

十字花科板蓝根的品质评价尚无可靠的理化指数，作者还将采用药理学方法进一步评价。

参 考 文 献

- 1 乔传卓，等.植物学报，1989，31（9）：678
- 2 戴富宝，等.药学学报，1986，21（11）：868
- 3 Dubois M, et al. Analytical chem, 1956, 28（3）：350
- 4 赵达文，等.常用中药材组织粉末图解.北京：人民卫生出版社，1991. 18
- 5 崔熙，等.中药材，1992，15（5）：17
- 6 中国医学科学院药物研究所，等.中药志.第1册.北京：人民卫生出版社，1979. 453
- 7 Epstein E, et al. Nature, 1967, 126: 547
- 8 许益民，等.中西医结合杂志，1991，11（6）：357
- 9 余中仁，等.中草药，1986，17（1）：37
（1994-09-29收稿）

purified with the method of SDS- phenol and their amounts were measured with UV-VIS spectrophotometry. The results showed that the mean testes weight in the experimental groups was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$ or 0.05). The amount of RNA and DNA in the experimental groups, especially in the medium dose Xuanju compound treated group, Xuanju water extract group and Chinese traditional medicine group were more than that in the control group.

(Original article on page 416)

Pharmacognostical Studies on the Two Ploidy Level of Indigowoad (*Isatis indigotica*)

Qiao Chuanzhuo, Dai Fubao, Cui Xi, et al

Morphological and histological characteristics of the root (Banlanqon) and leaf (Daqingye) of *Isatis indigotica* Fort. derived from the autotetraploid ($2n=28$) and its parent diploid ($2n=14$) were compared macroscopically and microscopically. Results showed that expression of polyploidy gigantism resulting from chromosome duplication were evident not only among organs but also among tissues of the same organ. Leaves of the tetraploid contained $1.79\sim 3.11\mu\text{g}/\text{mg}$ more indigo than the diploid near the harvest time. Increase of indirubin was also obvious. Polysaccharide in the leaf showed no much difference but that in the root was doubled and total amino acid was increased by 4.8%.

(Original article on page 423)

Distinction of Several Pairs of Easily Confusable Herbal Seeds Under Scanning Electron Microscope

Zhang Shuhua, Wang Li, et al

Easily confusable seed of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* (Bunge) Hu and *Hovenia acerba* Lindl., *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng. and *A. fistulosum*, *Sinapis alba* L. and *Brassica campestris* L. were examined under scanning electron microscope. Results showed that, 1.) irregular nests were present on the surface of semen *Z. jujuba* var. *spinosa*, while papillae appeared on the surface of semen *H. acerba* Lindl.; 2.) Cells of seed coat of semen *A. tuberosum* were irregularly shaped or polygonic with protruding cutin on its peridium, while that of semen *A. fistulosum* were polygonic with connecting fibers between cells; 3.) cells of semen *S. alba* L. were similarly polygonic, with thick and protruding vertical perine, while that of semen *B. campestris* L. were also polygonic, but its vertical perine were thinner and less protruding, its peridium shranked in side and was covered with cutinous nets veins.

(Original article on page 427)

Herbological Studies on "Male" and "Female" Heshouwu

Zhan Xuefeng

The saying that the herbal Heshouwu were present in "male" and "female" forms was studied as for its trivocal name, pharmacognosy and drug action. Results of the study showed that the so-called "female" Heshouwu is actually *Cynanchum bungei* Decne and the "male" form is *Polygonum multiflorum*. Coincidentally, the historical origin of such saying was briefly discussed.

(Original article on page 431)