

利于生根,增加光照强度,能刺激植株产生通过光合作用而进行自养的能力^[8]。因此,需要 3 000 lx 的光强,并且日照时间为 16 h/d 有利于炼苗。移栽之前,要进行预栽培,要保持一定的温度、光照和湿度。这样能提高成活率。成活率可达 83% 以上。

3 小结

从当前的趋势来看,组织培养应用于制药主要有两个领域:(1)生产天然的植物成分;(2)外供化合物的生物转化。我们现已建立了粉花绣线菊的组织培养系统,下一步是借助它,通过饲喂前体,弄清二萜生物碱的生物合成途径。从而达到大量生产的目的。同时,粉花绣线菊的变异性强,品质不稳定,我们建立的快繁技术可帮助大量生产。另外,我们还可以利用愈伤组织诱导生成体细胞胚,进行种质保存。相关的进一步研究工作正在进行之中。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1978-1979,1992.
- [2] 郝小江,聂磊,孙航,等. 粉花绣线菊复合群的化学分类 [J]. 云南植物研究,1997,19(3): 297-303.
- [3] Wang B G, Li L, Yang X S, *et al.* Three new diterpene alkaloids from *Spiraea japonica* [J]. Heterocycles, 2000, 53: 1343-1350.
- [4] Shen Z Q, Chen Z H, Li L, *et al.* Antiplatelet and antithrombotic effects of the diterpene spiramine Q from *Spiraea japonica* [J]. Planta Medica, 2000, 66: 287-289.
- [5] Li L, Nei J L, Shen Z Q, *et al.* Neuroprotective effects in Gerbils of spiramine T from *Spiraea japonica* [J]. Planta Medica, 2001, 67(2): 142-145.
- [6] 卜学贤,陈维伦. 试管苗的玻璃化现象 [J]. 植物生理学通讯, 1987(5): 13-18.
- [7] Kevers C. Th. Gasp Soluble membrane and wall peroxidases phenylalanine ammonia-lyase and lignin changes in relation to vitrification of camation tissue cultured in vitro [J]. J Plant Physiology, 1998, 118: 41-48.
- [8] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京:中国农业大学出版社,1996.
- [9] 黄健秋,卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养 [J]. 植物学通报,1994,11(1): 34.
- [10] 颜昌敬. 植物组织培养手册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1990.

良种银杏幼苗叶质量分析(I)

杨义芳,王晖,夏野鹰

(江西省药物研究所,江西南昌 330029)

摘要:目的 进行良种银杏幼苗叶质量分析。方法 采用 HPLC 方法测定银杏叶总黄酮含量。结果 实生苗 6 月份含量明显高于 8 月份与 11 月份,极显著地高于嫁接苗;2 岁树龄实生苗总黄酮含量是 50 年树龄的 2.5~3.8 倍。嫁接苗 6 月份高于 8 月份,雌性高于雄性。结论 活性成分含量与生长季节、树龄、培育方式、生长环境、基地条件等诸因素有关。

关键词: 良种银杏幼苗叶;银杏黄酮;高效液相色谱;质量分析

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-1033-04

Analysis on quality of leaves of improved *Ginkgo biloba* seedling sprout I

YANG Yi-fang, WANG Hui, XIA Ye-ying

(Jiangxi Institute of Materia Medica, Nanchang Jiangxi 330029, China)

Abstract **Object** To examine the quality of leaves from the improved *Ginkgo biloba* L. seedling sprout. **Methods** Total flavonoids in the leaves were determined by HPLC. **Results** Flavonoids in the leaves of seedling sprout were apparently higher in June than in August and November, and were much higher than grafting seedling sprout which was also higher in June than in August. 2-year-old tree contained 2.5 to 3.8 times more flavonoids than 50-year-old tree. The content of female trees were higher than that of male. **Conclusion** The content of active flavonoids were related to the season, age, breeding, environment and geographic conditions, *etc.*

Key words leaves from improved *Ginkgo biloba* L. seedling sprout; flavonoids; HPLC; quality analysis

银杏叶 *Ginkgo biloba* L. 产品风靡全球,在我国就有数十种之多,银杏叶提取物干浸膏生产企业

有二百余家,对银杏叶的需求量日益增多。为了缓解银杏叶紧缺,扩大药物资源,全国各地纷纷进行大面积速生丰产银杏种植,但其银杏叶质量分析未见报道。本文就江西 3个县 8地银杏良种壮苗基地及江西农大等采穗圃银杏叶活性成分含量进行测定与分析,以便评价不同银杏育苗基地条件类型、不同生长期、生长量、雌雄银杏幼苗叶的质量。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 仪器: Waters 公司高效液相色谱仪, 510泵, 680控制仪、481紫外检测器。

1.2 试药: 甲醇为色谱纯试剂,其它均为分析纯试剂。银杏叶分别于 1997年 6,8,11月采集于江西农大、安义、靖安、奉新等 3县 9个不同良种基地或采穗圃(种源均系同一批从山东郯城调入,定株 2年)及南昌八一公园(树龄约 50年)。采集方式: 每采样点面积约为 10 m²,在同采样点典型采集生长量最大、居中、最小的苗木,从样株不同方位和部位均匀采取各约 200 g叶,经 60℃烘干,粉碎,过 60目筛,备用。对照品: 槲皮素(中国药品生物制品检定所),山萘酚与异鼠李素(SIGMA 公司)。

1.3 色谱条件: 流动相为甲醇-水(50:50),磷酸调至 pH2.5,流速 1.0 mL/min,色谱柱 Hypersil ODS C₁₈柱(4.6 mm×300 mm,粒径 5μm),室温,检测波长 360 nm,灵敏度 0.05 AUFS。

1.4 样品处理: 取样品约 2 g,精密称定,置磨口锥形瓶中,精密加 70%乙醇 25 mL,塞紧,超声处理 30 min,冷却,滤过,弃初滤液,精密吸取续滤液 10 mL,置圆底烧瓶中,加乙醇 10 mL和 5.5%盐酸 20 mL,水浴回流 2 h,冷却,定量转移至 50 mL量瓶

中,并用乙醇定容至刻度,摇匀,用 0.8μm的微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液作为供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 标准曲线: 对照品槲皮素含量为 9.52μg/mL,山萘酚为 9.64μg/mL,异鼠李素为 9.98μg/mL,分别注入 2.5,5.0,10.0,20.0,40.0,60.0μL于色谱仪,记录色谱图,以进样量(μg)对峰面积回归。3种对照品线性范围、回归方程及相关系数分别为: 槲皮素 0.024~0.57μg, $C=3.8506\times 10^{-5}A-6.008\times 10^{-5}$, $r=0.9998$; 山萘酚 0.024~0.58μg, $C=3.4116\times 10^{-5}A-3.7153\times 10^{-3}$, $r=0.9996$; 异鼠李素 0.025~0.60μg, $C=3.9691\times 10^{-5}A-5.4681\times 10^{-3}$, $r=0.9994$ 。

2.2 精密度: $RSD\%$ ($n=5$)分别为: 槲皮素 2.2,山萘酚 1.4,异鼠李素 3.0,总黄酮苷元 1.4。

2.3 重现性: $RSD\%$ ($n=7$)分别为: 槲皮素 1.9,山萘酚 1.7,异鼠李素 2.6,总黄酮苷元 1.2。

2.4 稳定性考察: 6 h内测定总黄酮含量下降不到 1%。

2.5 槲皮素的加样回收率: 平均回收率为 98.7%, $RSD=4.0\%$ ($n=5$)。

2.6 样品测定: 分别吸取对照品甲醇溶液(每 1 mL含槲皮素 0.032 mg)与供试品溶液各 20μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,槲皮素色谱峰之后的二个主要峰依次为山萘酚与异鼠李素色谱峰;银杏叶总黄酮含量按各苷元峰面积×转换因子(槲皮素 2.51,山萘酚 2.64,异鼠李素 2.39)之和,以槲皮素计算^[1],即得。

2.6.1 实生苗银杏叶总黄酮测定见表 1,2。

表 1 6,8月采收的实生苗银杏叶总黄酮含量 %

编号	产地	生长茂盛含量		生长中等含量		生长矮小含量		各采样点平均含量		每县平均含量	
		6-14	8-15	6-14	8-15	6-14	8-15	6-14	8-15	6-14	8-15
1~ 3	安义县太平乡	2. 43	1. 79	2. 48	1. 83	2. 54	1. 02	2. 48	1. 55	2. 39	1. 26
4~ 6	安义县桃花 -1	2. 53	1. 48	2. 64	1. 01	2. 38	1. 06	2. 52	1. 18		
7~ 9	安义县桃花 -2	1. 89	0. 84	2. 31	1. 26	2. 33	1. 01	2. 18	1. 04		
10~ 12	靖安县乡田艺场	2. 12	1. 64	2. 16	1. 49	1. 88	1. 56	2. 05	1. 56	2. 02	1. 47
13~ 15	靖安县园艺场	2. 03	1. 39	1. 86	1. 36	2. 08	1. 38	1. 99	1. 38		
20~ 22	奉新县山东	2. 46	2. 12	2. 44	1. 72	2. 58	1. 69	2. 49	1. 84		
23~ 25	奉新县坪上增家	2. 53	1. 60	2. 61	1. 36	2. 43	1. 60	2. 52	1. 52	2. 45	1. 61
26~ 28	奉新县港下村	2. 34	1. 65	2. 51	1. 42	2. 15	1. 33	2. 33	1. 47		
不同生长状态的平均含量 ($\bar{x}\pm s$)		2. 29± 0. 25	1. 56± 0. 37	2. 38± 0. 26	1. 43± 0. 26	2. 30± 0. 24	1. 33± 0. 27				
24个样品的总平均含量 ($\bar{x}\pm s$)		2. 32± 0. 23	1. 44± 0. 30								

注: 表中的结果系 2次测定的平均值(下表均同)

由不同生长状态的平均含量比较说明: 6月份中等(2.38%)>矮小(2.30%)>茂盛(2.29%),但差异不太明显;8月份茂盛(1.56%)>中等(1.43%)>矮小(1.33%)。表 2可见,11月份采集

同一种植地,黄叶明显高于绿叶。由表 1,2说明不同生长地,尽管在同一县内含量亦有明显差异。不同生长期含量差异尤为明显,6月份高出 8月份 61%,11月份略高于 8月份。

2.6.2 嫁接苗银杏叶总黄酮测定: 见表 3

结果表明 6月份高于 8月份,雌性高于雄性。不同来源与生长地含量也存在差异。

2.6.3 测定结果的比较: 见表 4

表 2 11月 15日采收实生苗银杏叶

总黄酮含量测定结果			%
编号	产地	含量	
7~ 9	安义县桃花-2	1.64	
10~ 12	靖安县乡田园艺场	1.68	
13~ 15	靖安县园艺场	1.56	
	靖安县平均值	1.62	
23~ 5	奉新坪上增家(黄叶)	1.69	
23~ 25	奉新坪上增家(绿叶)	1.43	
26~ 28	奉新港下村(黄叶)	2.05	
26~ 28	奉新港下村(绿叶)	1.76	
	奉新县平均值	1.73	
	3县 7个样品平均值 ($\bar{x} \pm s$)	1.69 ± 0.19	

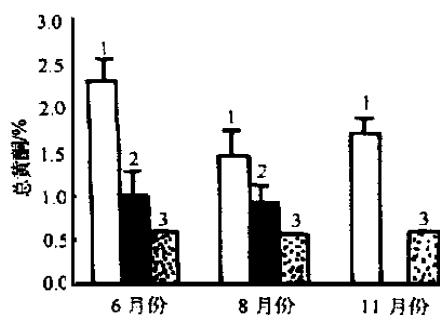
结果表明,实生苗显著高于嫁接苗,尤其 6月份采集的高 1倍多。良种银杏幼苗叶高于公园种植银杏叶数倍之多。Q: K: I的比值不尽相同,其中实

表 4 不同采收期及类型银杏叶总黄酮含量测定结果的总结

类别	06-14采收		08-15采收		11-15采收	
	平均含量 (%)	Q: K: I	平均含量 (%)	Q: K: I	平均含量 (%)	Q: K: I
实生苗	2.32 ± 0.13 ¹ (0.76 ± 0.13) ¹ (0.08 ± 0.012)		1.44 ± 0.18 ¹ (0.79 ± 0.18) ¹ (0.08 ± 0.012)		1.69 ± 0.16 ¹ (0.86 ± 0.16) ¹ (0.08 ± 0.007)	
嫁接苗	1.01 ± 0.17 ² (0.43 ± 0.17) ² (0.17 ± 0.04)		0.91 ± 0.11 ² (0.5 ± 0.11) ² (0.17 ± 0.04)		-	
公园种植 (树龄约 50年)	0.61 ± 0.22 ³ (0.85 ± 0.22) ³		0.57 ± 0.22 ³ (1.13 ± 0.22) ³		0.58 ± 0.21 ³ (0.94 ± 0.21) ³	

* Q: 槲皮素; K: 山萘酚; I: 异鼠李素; Q: K: I为各苷元的峰面积积分值比值 ($\bar{x} \pm s$),下同。

2.6.4 测定结果的分析: 见图 1~ 3



1-实生苗 2嫁接苗 3公园种植
图 1 实生苗、嫁接苗和公园种植 (约 50 年树龄)银杏叶总黄酮含量比较

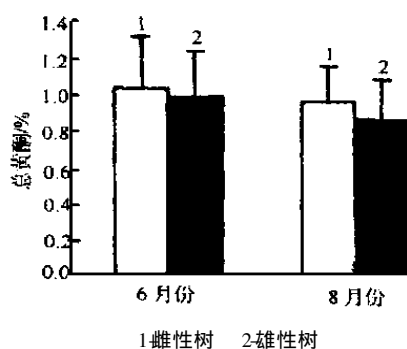


图 2 嫁接苗雌雄总黄酮含量比较

生苗 I比公园种植低 1倍多,嫁接苗则相近似,但嫁接苗 K比公园种植及实生苗低 1倍左右。

表 3 嫁接苗银杏叶总黄酮含量测定结果

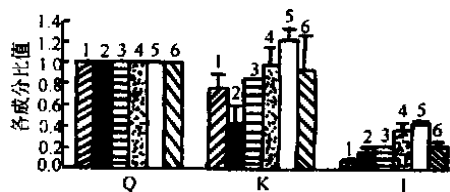
编号	嫁接地	来源	性别	含量	
				6-14	8-15
16	靖安县园艺场	波阳	雌	1.08	1.06
17	靖安县园艺场	波阳	雄	1.35	1.17
18	靖安县园艺场	万载	雌	1.16	1.15
19	靖安县园艺场	万载	雄	1.13	-
	靖安县平均值			1.18	1.13
29	江西农大	南康	雌	1.14	1.03
32	江西农大	南康	雄	0.82	0.87
30	江西农大	信丰	雌	1.28	0.87
31	江西农大	信丰	雄	0.74	0.74
33	江西农大	铅山	雄	0.86	0.66
34	江西农大	铅山	雌	0.51	0.68
	农大均值			0.89	0.81
	雌性均值			1.03	0.96
	雄性均值			0.98	0.86
	总均值 ($\bar{x} \pm s$)			1.0 ± 0.26	0.9 ± 0.20

年与 10余年树龄分别为,6月份: 0.469%, 0.755%; 8月份: 0.424%, 0.707%。上述良种银杏幼苗叶总黄酮含量毫无疑问与树龄有关,但是否完全取决于此,有待研究。银杏良种壮苗基地 6月至 10月份为叶生长旺盛期,就总黄酮含量而言宜 6月份采收,尽管文献报道 4月份叶含量最高^[3],但此时并非叶生长旺盛期。嫁接苗总黄酮含量明显低于实生苗,所以发展速生丰产银杏叶不宜采用嫁接方法,这可能亦与树龄有关。

3.2 银杏叶制剂黄酮中 3个主要苷元槲皮素、山萘

3 小结与讨论

3.1 银杏良种壮苗基地定植 2年银杏叶总黄酮含量高出公园生长约 50年银杏树数倍。我们曾对江西省等 3省收购银杏叶 12个样品同法进行了测定,其平均含量为 0.58%^[2],似乎提示经过良种优选的品种,定植 2年即可获得高含量活性成分的银杏叶。最近仲英^[3]报道了不同树龄与月份总黄酮含量,30余



1-实生苗 2-嫁接苗 3-公园种植 4-国内制剂^[4] 5-国外制剂^[7] 6-国外提取物^[5]

注:实生苗及嫁接苗均采用 06-14采集的数据,公园种植采用 08-15采集的数据。

图 3 不同类型银杏叶及不同来源制剂黄酮苷元 Q:K:I 比值的比较

酚、异鼠李素含量之比 $1:(0.98 \pm 0.16):(0.38 \pm 0.07)^{[4]}$ 和 $1:(1.06 \pm 0.23):(0.29 \pm 0.02)^{[5]}$, 国内学者认为二者比值与质量有一定关系。瑞士学者 Hasler 和 Sticher 早已注意到此, 银杏叶黄酮苷元比值为 $1:2:0.75$, 银杏提取物为 $1:(0.94 \pm 0.32):(0.24 \pm 0.03)^{[6]}$, 3 个不同生产厂家银杏叶制剂 $1:(1.2 \pm 0.10):(0.43 \pm 0.02)^{[7]}$, 与我国学者及我们^[2]以前分析结果较一致。本次实验结果实

生苗 I 值低于文献 3 倍, 嫁接苗 K 值低 1 倍, 是否与栽培期过短, 还是与类型有关, 尚待探讨。

3.3 综上所述, 良种银杏幼苗叶总黄酮含量与生长季节、树龄、培育方式、生态环境和产地条件等诸因素有关。8 月份银杏生长量似乎与含量有一定关联。

参考文献:

- [1] Sticher O. Quality of *Ginkgo* preparations [J]. *Planta Med* 1993, 59: 2-11.
- [2] 杨义芳, 王 晖, 夏野鹰, 等. 银杏叶质量标准研究 [J]. *安徽中医学院学报*, 1997, 16(5): 46-47.
- [3] 仲 英, 唐文照, 丁杏苞, 等. 不同树龄的银杏叶在不同生长季节中银杏总黄酮和总内酯的含量变化 [J]. *中草药*, 1993, 30(12): 909-910.
- [4] 陶巧凤. 不同厂家的银杏叶片黄酮含量的比较与分析 [J]. *中国现代应用药学杂志*, 1999, 16(1): 47-48.
- [5] 王新宏, 王智华, 范广平, 等. HPLC 法测定银杏制剂成分 [J]. *中成药*, 1996, 18(9): 36-37.
- [6] Hasler A, Ticher O, Meier B. High-performance liquid chromatographic determination of five widespread flavonoid aglycones [J]. *J Chromatogr*, 1990, 508(1): 236-240.
- [7] Hasler A, Ticher O, Meier B. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1992, 605(1): 41-48.

天师栗茎芽组织培养研究

郑小江, 刘金龙

(湖北民族学院资源与环境科学系, 湖北 恩施 445000)

摘要: 目的 研究其组培技术, 为工厂化育苗提供依据。方法 采用不同浓度的 MS 无机盐, 不同浓度的 MS 有机成分, 对其进行生根和生茎芽、叶的效果研究。结果 $1/2$ 改良 MS 无机盐 + 肌醇 100 mg/L + 烟酸 0.5 mg/L + 盐酸吡哆醇 0.5 mg/L + 盐酸硫胺素 0.1 mg/L + 6-BA 1 mg/L + 甘氨酸 2 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 蔗糖 2% + 琼脂 0.8% + VC 0.1 mg/L 对愈伤组织形成及茎芽分化生长效果显著; $1/8$ 改良 MS 无机盐 + 肌醇 100 mg/L + 烟酸 0.5 mg/L + 盐酸吡哆醇 0.5 mg/L + 盐酸硫胺素 0.1 mg/L + 甘氨酸 2 mg/L + 蔗糖 1% + 琼脂 0.7% + 活性碳 600 mg/L + IBA 0.5 mg/L + VC 0.1 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L 对生根效果显著。结论 以上结果分别为天师栗茎芽组培中愈伤组织形成与茎芽生长和生根的适宜培养基配方; 愈伤组织形成与茎芽生长和生根的生长素浓度与细胞分裂素浓度比为 $0.5:1 \text{ mg/L}$ 和 $0.5:0.2 \text{ mg/L}$ 较合适; 高无机盐浓度抑制生根, $1/8$ MS 改良无机盐浓度生根最佳; VC 可消除组培中因茎芽分泌的酚类氧化物在培养基中过量积累, 而对茎芽和根生长的不良影响; 茎芽和根的分化在微酸至中性培养基中效果较好。

关键词: 天师栗; 茎芽; 组织培养

中图分类号: R282.13

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2001)11-1035-04

Studies on tissue culture for bud of stem in *Aesculus wilsonii*

ZHENG Xiao-jiang, LIU Jin-long

(Department of Resource and Environment Science, Hubei Institute for Nationalities, Enshi Hubei 445000, China)

Key words *Aesculus wilsonii* Rehd.; bud of stem; tissue culture

天师栗 *Aesculus wilsonii* Rehd 落叶乔木, 湖北

省保护树种^[1]。湖北恩施州木林子、星斗山保护区有

收稿日期: 2001-04-25

作者简介: 郑小江 (1958-), 男, 山东淄博人, 湖北民族学院资源与环境科学系 (原林学系) 副教授, 中国林学会高级会员, 硕士生导师。研究方向: 野生植物资源开发利用。地址: 湖北省恩施市三孔桥路 29 号。Tel 0718-8430564