

贯叶金丝桃不同器官的分泌细胞团 分布密度与金丝桃素含量的相关性研究

吕洪飞^{1,2,3}, 胡正海^{2*}

(1. 浙江师范大学生命与环境科学学院, 浙江 金华 321004; 2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 3. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: 目的 研究贯叶金丝桃不同器官的分泌细胞团分布密度和金丝桃素含量及其相关性, 为选择药用成分高的品种和合理的采收部位提供依据。方法 在显微镜下观察透明装片, 统计叶、花萼和花瓣中分泌细胞团的分布密度, 用 HPLC 法分析各器官中金丝桃素含量。结果 根、茎、果实和叶的中部不含金丝桃素类物质, 叶缘部分含金丝桃素 0.145 6%, 花萼含 0.065 3%, 花瓣含 1.268 2%。结论 具有分泌细胞团的器官或部位含有金丝桃素类物质, 且与其分布密度成正相关; 而不具分泌细胞团的器官或部位, 则不含金丝桃素类物质。

关键词: 贯叶金丝桃; 分泌细胞团; 金丝桃素; 高效液相色谱

中图分类号: R 282.13 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-1045-04

Study on correlation between nodule density of different organs and hypericin content in *Hypericum perforatum*

LÜ Hong-fei^{1,2,3}, HU Zheng-hai²

(1. Academy of Life and Environment Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; 2. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3. Institute of Botany, CAS, Beijing 100093, China)

Abstract: **Object** In order to choose high hypericin content variety and its useful part, the study on the correlation between nodule density of different organs and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. was carried out. **Methods** The nodule density of leaf, calyx and petal were observed under a Leica DMLB microscope; the hypericin contents of different organs were determined by HPLC. **Results** Hypericin and its derivatives were not obtained from the root, fruit and leaf central part of *H. perforatum*. The hypericin contents of leaf margin, calyx, petal were 0.145 6%, 0.065 3%, 1.268 2%, respectively. **Conclusion** The organs and parts with nodules contain hypericin and its derivatives. There is positive correlation between the hypericin content and nodule density, but the other organs or parts without nodules don't contain such materials.

Key words: *Hypericum perforatum* L.; nodule; hypericin; HPLC

贯叶金丝桃在许多国家中被作为药用植物, 该植物中含多种药用成分, 如金丝桃素类、槲皮苷、金丝桃苷、芦丁、黄酮醇类、黄酮类、酮类、香豆素类和间苯三酚衍生物(贯叶金丝桃素)等^[1,2]。近年来的研究表明, 该植物所含金丝桃素化合物具有抗抑郁^[3]、抑制中枢神经^[2]和增强免疫功能作用^[4], 金丝桃素和假金丝桃素被证明具有抗病毒和反转录病毒的作用^[5,6], 它们具有抑制线粒体琥珀酸氧化酶活性

和蛋白激酶 C, 从而与抗肿瘤活性有关。由于它具有显著的抗 DNA、RNA 病毒作用, 可用于艾滋病的治疗^[7,8], 从而引起医药界的重视。

分泌结构是金丝桃属植物的共同特征, 该属不同种植物体内分泌结构的类型存在差异^[9]。在贯叶金丝桃中被发现有 3 种内部分泌结构——分泌细胞团(黑色腺体)、分泌囊和分泌道^[10]。组织化学和荧光显微镜观察表明金丝桃素及其衍生物积累在黑色

* 收稿日期: 2003-02-12

基金项目: 国家自然科学基金资助(30070045); 浙江省自然科学基金资助(302101)

作者简介: 吕洪飞(1963-), 男, 浙江省永康市人, 中国科学院植物研究所博士后, 研究方向为药用植物学、植物生殖生态学、植物组织培养、绿色中药材、植物解剖学, 发表论文 50 余篇, 其中被 SCI、EI 收录 3 篇, 5 篇获浙江省自然科学基金优秀论文二等奖, 主持国家自然科学基金 1 项、浙江省自然科学基金 1 项。 E-mail: Luhongfei0164@sina.com

* 通讯作者 E-mail: Huzhenghai@china.com

腺体中,黑色腺体常分布于叶片和花瓣的边缘和花药中^[9, 11, 12]。成熟的分泌细胞团起源于远轴面的一团原始细胞^[9],积累黑色或红色均匀的内含物^[11]。Southwell 发现澳大利亚生长的贯叶金丝桃叶的腺体密度与其金丝桃素的含量相关^[14]。Celarova 等对贯叶金丝桃的金丝桃素含量进行研究时指出金丝桃素积累于多细胞的分泌细胞团中^[15]。本实验对贯叶金丝桃分泌细胞团的分布密度与金丝桃素含量及其相关性进行研究,以期了解其主要药用成分——金丝桃素的分布,为贯叶金丝桃的利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料:贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 采自中国秦岭北部并栽培于西北大学校园内,时间为 2000 年 4 月和 5 月由西北大学任毅教授鉴定。金丝桃素(hypericin)对照品纯度为 90%,由 Sigma 公司提供。

1.2 透明材料法及 FAA 固定材料观察:取植株中部的的新鲜成熟叶片和花萼,切成 5 mm × 5 mm 的小块,投入 5% NaOH 水溶液,在 60 ℃ 温箱中透明 1 ~ 3 h,清水冲洗;取 FAA 固定的花瓣,直接用 1% 番红染色,甘油胶封片。在 Leica DMLB 显微镜观察,并计数 5 ~ 10 枚叶片和花萼各 10 个 10 × 10 视野的分泌囊(道)和分泌细胞团的数目,取平均值除以视野面积(0.025 43 mm²)作为其分布密度。

1.3 植物化学分析方法

1.3.1 样品制备方法:取贯叶金丝桃具分泌细胞团的叶缘部分、仅具分泌囊的叶片中央部分、花萼、花瓣、果实,分别测试,于 60 ℃ 烘箱内恒温烘 12 h。以上烘干材料经研磨后,精确称取 0.5 g,用氯仿提取叶绿素^[15],超声波振荡 30 min,滤过后烘干样品,再用甲醇溶解,超声波振荡 30 min 后滤过定容至 5 mL,进行 HPLC 检测。

1.3.2 HPLC 检测:高效液相色谱仪:Hitachi Pump L—7110, UV—Vis L—7420;色谱柱:ODS RP-C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm);流动相:甲醇-乙腈-0.1 mol/L NaH₂PO₄(800 100 100);流速:1 mL/min;柱温:22 ℃;检测波长:590 nm。采用外标法测定。

2 实验结果

经叶片和花萼及花瓣透明装片观察,叶中分泌细胞团的分布密度为 0.65 个/mm²(图 1),花萼分泌细胞团的分布密度为 0.833 个/mm²(图 2),花瓣分泌细胞团的分布密度为 26.45 个/片(图 3)。在根、茎、果实的横切片和叶的中央部分未见有分泌细胞团的分布(表 1)。

贯叶金丝桃具分泌细胞团的器官(花萼、花瓣)和叶缘,其提取液经 HPLC 法检测都含有金丝桃素及其衍生物,且其含量与叶和花萼中分泌细胞团的密度成正相关。而贯叶金丝桃的果实、根和茎及叶片的中部均无分泌细胞团,未检测到有金丝桃素(图 4-1),从而说明无分泌细胞团的器官或部位,虽具有分泌囊,但均不存在金丝桃素(图 4 和表 1)。

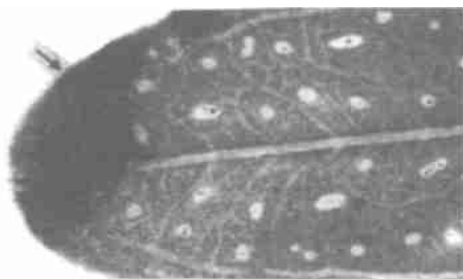


图 1 贯叶金丝桃叶的透明装片(箭头示分泌细胞团的分布)

Fig. 1 Translucent leaf of *H. perforatum*
(arrow shows nodules)

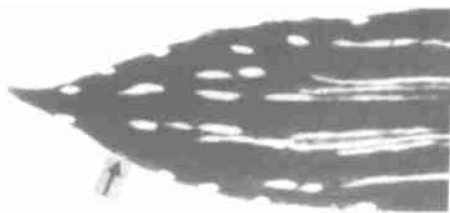


图 2 贯叶金丝桃花萼的透明装片(箭头示分泌细胞团的分布)

Fig. 2 Translucent calyx of *H. perforatum*
(arrow shows nodules)

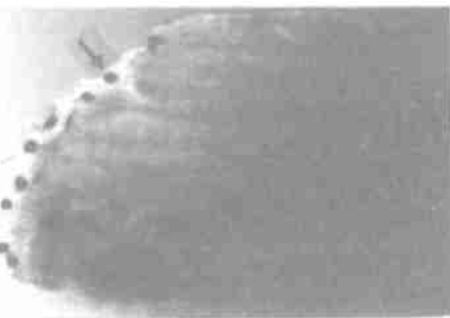


图 3 贯叶金丝桃花瓣的透明装片(箭头示分泌细胞团的分布)

Fig. 3 Translucent petal of *H. perforatum*
(arrow shows nodules)

3 讨论

Curtis 等^[12]在研究贯叶金丝桃和 *H. balearicum* L. 后报道,它们有 2 种分泌结构——分泌细胞团和分泌囊。我们研究了金丝桃、地耳草、黄海棠、元宝草、小连翘、密腺小连翘和贯叶金丝桃等植物的不同器官的解剖结构时发现该属植物具有 3

种分泌结构——分泌细胞团、分泌囊和分泌小管道^[10, 16]。通过对该种药用植物不同器官的纵横切面和透明装片观察, 分泌细胞团存在于贯叶金丝桃的叶、花萼、花瓣和花药的药隔中; 其中, 在叶中呈球形, 在花萼中呈条形。分泌囊分布于叶、花萼、花瓣、果壁中。

Campbell 等对贯叶金丝桃的变异和品种进行形态学、细胞学和化学成分等方面的比较研究, 发现其宽叶品种的叶内金丝桃素含量低和透明腺点少^[17]。Southwell^[14]对贯叶金丝桃不同器官的研究表明其宽叶变种的金丝桃素含量为 370 ~ 580 $\mu\text{g/g}$, 而窄叶的为 1 040 ~ 1 630 $\mu\text{g/g}$, 它们的腺点密度分别为 2.2 和 6.2 个/ mm^2 。其中宽叶变种的主茎、分枝、底叶、顶叶、蒴果、花的金丝桃素含量分别为 40, 120, 290, 380, 730, 2 150 $\mu\text{g/g}$, 其腺体的密度从下到上、从茎叶到花也逐渐增大。因此他认为金丝桃素的产生与腺体有关, 但并未具体指出何种腺点(分泌结构)与金丝桃素有关。

Cellarova 等^[18]对贯叶金丝桃的 R-O 再生的多枝群系和表型变化进行研究。经过 RM 培养基附加 2.22 或 4.4 mn-MBAP 产生多枝苗, 结果表明再生苗发生形态上的变化, 但不影响分枝和含二萜酮类腺点的数目。Cellarova 等^[15]进一步研究了贯叶金丝桃体细胞培养再生植株的腺体密度和金丝桃素的含量变化规律证实了金丝桃素是由黑色腺点合成和积累, 首次提出多细胞腺点(黑色)含金丝桃素。刘文哲等^[11]用组织化学和电镜技术对贯叶金丝桃的分泌结构和金丝桃素积累的关系进行研究, 进一步证实了分泌细胞团是合成和贮存金丝桃素的主要场所。

本实验采用 HPLC 对该种植物不同器官和部位进行系统地研究, 结果发现分泌细胞团是贮藏金丝桃素类物质的唯一场所, 且其含量与分泌细胞团分布密度成正比。这与 Southwell 和 Campbell 报道^[14]的主茎、分枝和果实中含有金丝桃素不同。

由于药用成分金丝桃素类的含量与分泌细胞团分布密度成正比, 花萼和花瓣中金丝桃素类的含量高, 因此采集贯叶金丝桃的最佳时间为盛花期。这将为贯叶金丝桃的栽培和选育高产、优良的品系提供解剖学和植物化学依据。

References:

[1] Pan Y H, Guo B L. Review of medicinal composition of *Hypericum* in China [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1993, 16(8): 40-42.
[2] Hobbs C. St. John's Wort [J]. *Herbal Gram*, 1989, 19: 24-33.
[3] Linde K, Ramirez H, Mulrow C D, et al. St. John'swort for

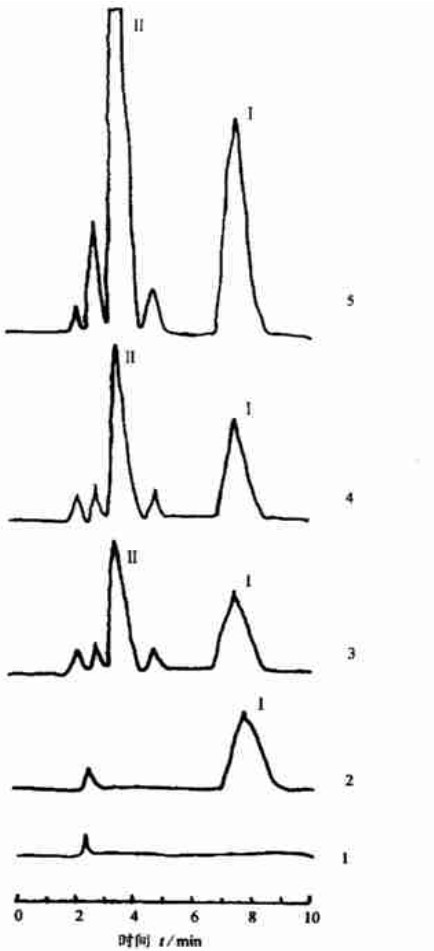


图 4 贯叶金丝桃的 HPLC 图谱

1-果实 2-金丝桃素对照品 3-叶 4-花萼 5-花瓣
1-fruits 2-hypericin 3-leaves 4-calyxes 5-petals

Fig. 4 HPLC chromatograms of *H. perforatum*

表 1 贯叶金丝桃不同器官的分泌细胞团分布密度、金丝桃素和金丝桃素类物质的含量

Table 1 Nodule density of different organs and parts and hypericin content in <i>H. perforatum</i>			
器官与部位	分泌细胞团的分布密度	金丝桃素含量/%	金丝桃素类物质总含量/%
叶	0.65/ mm^2	0.055 5	0.185 5
具分泌细胞团的叶缘	-	0.145 6	0.484 2
仅具分泌囊的叶中部	无	0	0
茎	无	0	0
根	无	0	0
果	无	0	0
花萼	0.833 3/ mm^2	0.065 3	0.221 7
花瓣	26.45/片	1.268 2	5.188 5
花	-	0.517 8	1.456 5

- 无法统计
- "Data are hard to obtain

- depression: an overview and meta-analysis of randomised clinical trials [J]. *Bri Med J*, 1996, 313(7052): 253-258.
- [4] Evstifeeva V A, Sibiryak S V. Immunotropic properties of biologically active products obtained from John'swort (*H. perforatum*) [J]. *Ekspier Klin Form Log*, 1996, 59(1): 51-54.
- [5] Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5230-5234.
- [6] Hudson J B, Lopez-Bazzocchi I, Towers G. Antiviral activities of hypericin [J]. *Antiviral Res*, 1991, 5: 101-112.
- [7] Thomas C, Macgill R S, Miler G C, *et al.* Phytoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase [J]. *Phytochem Phyto Biol*, 1992, 55(1): 47-53.
- [8] Takahashi I, Naknishi S, Kobayashi E, *et al.* Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1989, 165: 1207-1212.
- [9] Lü H F, Hu Z H. Comparative anatomy of secretory structures of leaves in *Hypericum* L. [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 2001, 39(5): 393-404.
- [10] Lü H F, Liu W Z, Hu Z H. Comparative anatomy of secretory structures in leaves of 7 species in *Hypericum* L. [J]. *Acta Bot Boreal-occident Sin* (西北植物学报), 1998, 18(6): 122-127.
- [11] Liu W Z, Hu Z H. The secretory structure of *Hypericum perforatum* and its relation to hypericin accumulation [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41: 369-372.
- [12] Curtis J D, Lersten N R. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. [J]. *New Phytol*, 1990, 114: 571-580.
- [13] Cellarova E, Daxenerova Z, Kimakova K, *et al.* The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum* [J]. *Acta Biotechnol*, 1994, 14: 267-274.
- [14] Southwell I A, Campbell M H. Hypericin content variation in *Hypericum perforatum* in Australia [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(2), 475-478.
- [15] Cellarova E, Daxenrova Z, Kimakova K, *et al.* The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum* [J]. *Acta Biotech*, 1994, 14: 267-274.
- [16] Lü H F, Hu Z H. Studies on the secretory structure of *Hypericum erectum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 32(10): 773-775.
- [17] Campbell M H, May C E, Southwell I A, *et al.* Variation and varietal determination in *H. perforatum* L. (St. John's wort) in New South Wales [J]. *P Prot Quart*, 1992, 7(2): 43-45.
- [18] Cellarova E, Kimakova K, Brutovaska R. Multiple shoot formation and phenotypic changes of R-O regenerants in *H. perforatum* L. [J]. *Acta Biotech*, 1992, 12(6): 445-452.

赤芍 HPLC 指纹图谱的研究

张克荣, 毕开顺*

(沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立赤芍的 HPLC 指纹图谱, 为科学评价与有效控制赤芍质量提供新方法。方法 采用 HPLC 法, 测定了 18 个不同产地赤芍样品。色谱条件: Hypersil C₁₈ 柱 (200 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为乙腈-0.025 mol/L H₃PO₄-四氢呋喃 (9.5 : 90.5 : 1.25), 流速 0.8 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温为室温。结果 本研究建立的分析方法有较好的重复性, 不同产地赤芍药材色谱峰面积比值有一定的差异。结论 色谱指纹图谱分析法能简便快速地区分不同来源的赤芍药材, 为全面控制赤芍药材的质量提供了依据。

关键词: 赤芍; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)11-1048-04

Study on fingerprints of *Radix Paeoniae Rubra* by HPLC

ZHANG Ke-rong, BI Kai-shun

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Object** To study the HPLC fingerprints and establish a sensitive and specific method for controlling the quality of *Radix Paeoniae Rubra* (RPR). **Methods** The HPLC method was applied for quality assessment of RPR. All 18 samples collected from different places were determined. A Hypersil-C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase being acetonitrile-0.025 mol/L H₃PO₄: THF (9.5 : 90.5 : 1.25), flow rate being 0.8 mL/min, detecting wavelength being 254 nm, the column temperature being at room temperature. **Results** This method had a good repeatability and reproducibility,

* 收稿日期: 2003-04-09

作者简介: 张克荣(1975-), 女, 河北省保定市人, 硕士, 现在从事中药质量标准的研究。 E-mail: lkmn-09@163.com

* 通讯作者 Tel: (024) 23843711-3363 E-mail: ksbi@mail.sy.ln.cn