

参照苋科植物 rRNA 基因 ITS 片段序列确定, 所得 DNA 序列输入计算机后, 用 Clustal W 软件对序列进行对位排列, 并输入人工校对。以尽量减少排列所需缺失的数目。得到的序列用 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 1.02) 软件进行系统发生分析。在图中 18 S, 26 S 及 5.8 S 用阴影部分所示, “·”表示具相同碱基, “-”表示缺失, 序列上方的数字为排序后的各碱基的位置编号。

2.5 碱基序列大小: 共测得 16 个牛膝样品 ITS-1, 5.8 S rDNA 和 ITS-2 全序列 18 S rDNA 基因 3' 端和 26S rDNA 基因 5' 端部分碱基序列, 共约 630 bp。其中 ITS-1 约为 230 bp, 5.8 S rDNA 约为 160 bp, ITS-2 约为 209 bp (见表 2)。

表 2 ITS-1, 5.8 S rDNA, ITS-2 的碱基大小及 G+ C 的含量

Table 2 Size and G+ C contents of ITS-1, 5.8 S rDNA, and ITS-2 sequence

样品	ITS-1		5.8 S rDNA		ITS-2		总计
	/bp	G+ C/%	/bp	G+ C/%	/bp	G+ C/%	
1	231	51.3	160	50.6	209	52.6	600
2	231	51.3	160	50.6	206	56.8	597
3~16	231	51.3	160	50.6	206	56.8	597

### 3 讨论

3.1 通过对 16 个牛膝样品序列分析可知, 不同产地牛膝基因变异不大, 种间有明显差异, 且差异均在 ITS-区内, 川牛膝 ITS-1 有差异, 土牛膝 ITS-1 及 ITS-2 均有差异, 说明 ITS 区易变异。此方法可用于牛膝种间及真伪品鉴别, 不能用于鉴别道地药材。

3.2 牛膝属苋科植物牛膝含大量牛膝多糖, 在提取 DNA 时与 DNA 一起沉淀, 常常像凝胶一样, 很难去除, 并抑制随后 PCR 中 DNA 多聚酶的活性。通

过 DNA 纯化的方法可以去除这些物质。其药用部位为根茎类且多糖含量高, 故药材提取量要大, 用 5 mL 离心管, 大体积抽提。

3.3 实验过程中发现, 提取的 DNA 用 5 μL 点样电泳检测, 有时并不能看到 DNA, 但并不意味着没有抽提到 DNA。可以继续 PCR 扩增。将 DNA 模板适当增多, 有时同样可得到好的 PCR 扩增产物。只有检测不到 PCR 扩增产物才能确定没有抽提到 DNA。

3.4 PCR 扩增产物用试剂盒纯化后, 如果电泳检测产物仍不纯, 一般可采取提高反应条件 (如退火温度), 切胶纯化、克隆纯化等措施。本实验的 3 号样品即采用克隆技术才达到良好的测定效果。

### References:

- [1] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed.
- [2] Wang X Q, Li Z N. The application of sequence analysis of rDNA fragment of the systematic study of the subfamily Cyrtandroideae (Gesneriaceae) [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1998 (36): 97.
- [3] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 1995 (82): 247-277.
- [4] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implication for biogeography and concerted evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995 (92): 6813.
- [5] Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier M F, et al. Molecular phylogeny of the genus *hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 1998 (15): 345.
- [6] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. A new approach for the identification of a Chinese traditional medicine, "Chuan-xiong" by 18 S ribosomal RNA gene sequences [J]. *Phyto-medicine*, 1996 (3): 387.

## 盾叶薯蓣根状茎不同部位和不同生长期薯蓣皂苷元含量的差异性研究

曹玉芳<sup>1,2</sup>, 王太霞<sup>1,3</sup>, 胡正海<sup>1\*</sup>

(1. 西北大学植物研究所, 陕西 西安 710069; 2. 莱阳农学院生命科学学院, 山东 莱阳 265200;

3. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453002)

摘要: 目的 揭示盾叶薯蓣根状茎不同部位和不同生长期中皂苷的积累与分布以及薯蓣皂苷元含量的差异。方法 组织化学和高效液相色谱法 (HPLC)。结果 皂苷主要分布在基本组织内, 有小维管束分布的区域皂苷积累最丰富, 薯蓣皂苷元的含量也最高; 其次是无维管束分布的区域; 有大维管束分布的区域皂苷积累最少, 薯蓣皂苷元的含量最低。结论 雄株 3 个区域的皂苷元含量均明显的高于雌株, 雌雄同株其含量介于雄株和雌株之间。

\* 收稿日期: 2003-08-30

作者简介: 曹玉芳 (1963—), 男, 山东莱西市人, 博士生, 副研究员, 主要从事植物学、药用植物学和结构植物学的教学与科研工作, 已发表论文章 30 余篇。Tel: (0535) 2922145

\* 通讯作者 E-mail: zhenghaihu@yahoo.com.cn

关键词: 盾叶薯蓣; 组织化学; HPLC; 薯蓣皂苷元

中图分类号: R286.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)05-0562-04

## Studies on diversity of diosgenin in different part of rhizome of *Dioscorea zingiberensis* in various growing period

CAO Yu-fang<sup>1,2</sup>, WANG Tai-xia<sup>1,3</sup>, HU Zheng-hai<sup>1</sup>

(1. Institute of Botany, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. College of Life Science, Laiyang Agricultural College, Laiyang 265200, China; 3. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

**Abstract:** **Object** To study the accumulation and distribution of dioscin in the different part of rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright and the differences of its diosgenin. **Methods** Histochemistry has been used to study the accumulation and distribution of dioscin in the different part of rhizome and diosgenin was determined by HPLC. **Results** Dioscin distributed mainly in ground tissue. The amount of dioscin accumulated in the plant part from the region distributed with small vascular bundle (SVB) is the most abundant, and the diosgenin is also the highest in the same region; both of them in the region with no vascular bundle (NVB) are next to that of SVB; the amount of dioscin accumulated in the region distributed with big vascular bundle (BVB) is the lowest, and the diosgenin is the lowest in the same region too. **Conclusion** Diosgenin in every region of the three of male rhizome is higher than that of female rhizome and diosgenin in every region of the three of monoecism is between those of male and female rhizome.

**Key words:** *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; histochemistry; HPLC; diosgenin

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 又名黄姜、火藤根, 多年生缠绕草质藤本植物, 隶属于薯蓣科薯蓣属根状茎组, 为我国特有种。该属植物的根状茎中含有丰富的薯蓣皂苷元, 是重要的甾体激素类药源植物, 盾叶薯蓣由于其含量高为我国主要药源植物。其水溶性甾体皂苷成分对心肌缺血、胸痹、高脂血症等有明显的治疗作用<sup>[1]</sup>, 生药具有清肺止咳, 利湿通淋, 通络止痛, 解毒消肿的功能<sup>[2]</sup>。目前, 薯蓣皂苷元是 300 多种甾体激素类药物合成的起始原料<sup>[2]</sup>。对它的研究已有甾体皂苷的分离鉴定<sup>[3,4]</sup>、薯蓣皂苷元的测定方法<sup>[5,6]</sup>、胚胎发育<sup>[7]</sup>、根状茎的发育解剖<sup>[8]</sup>、薯蓣皂苷元含量与气候因子的相关性<sup>[9]</sup>等报道。但有关盾叶薯蓣根状茎不同部位其皂苷的分布与积累、薯蓣皂苷元含量的差异尚未见报道。本实验利用组织化学和 HPLC 法对盾叶薯蓣根状茎不同部位和不同生长期其皂苷的积累与分布以及薯蓣皂苷元的含量进行了系统研究。

### 1 材料与方法

1.1 材料: 盾叶薯蓣, 采于西北大学植物研究所实验材料繁殖园。材料采集的时期分别为: 盛花期、果期、枯萎前期。

1.2 仪器: 薯蓣皂苷组织化学定位研究的实验材料, 用 LEICA CM1850 冷冻切片仪进行冷冻切片, 切片厚度为 30~40  $\mu\text{m}$ , 用三氯化铋的浓盐酸溶液或三氯化铋的高氯酸溶液<sup>[10]</sup>进行显色, 在 LEICA

DMLB 显微镜下观察并照相。HP 1100 高效液相色谱仪。

### 1.3 薯蓣皂苷元含量的测定

1.3.1 色谱条件: 柱为 Zorbax SB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为甲醇-水(95:5); 流速 1 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长 208 nm; 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。

1.3.2 对照品溶液的配制: 薯蓣皂苷元对照品由西部植物化学国家工程研究中心提供(纯度 98%)。准确称取干燥后的薯蓣皂苷元对照品 5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容至刻度, 得浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液。

1.3.3 样品溶液的制备: 测定薯蓣皂苷元含量的根状茎样品在 60  $^{\circ}\text{C}$  的恒温箱内烘干至恒重。粉碎后准确称取 1 g, 置入索氏提取仪中用 60 mL 甲醇提取至馏出液无色。回收溶剂, 加 20 mL 2 mol/L HCl, 水浴回流 4 h。溶液冷却后, 用 30 mL 氯仿分 3 次萃取, 合并氯仿萃取液, 回收溶剂, 用甲醇溶解并定容为 10 mL, 经 0.45  $\mu\text{m}$  膜滤过后制成样品溶液, 供进样用。取 3 次重复的平均值, 作为每个样品的含量。

### 2 实验结果

2.1 根状茎的结构及其皂苷的组织定位: 盾叶薯蓣根状茎的横切面由外到内是由周皮、基本组织和分散在基本组织中的维管束构成<sup>[8]</sup>。基本组织最外围有一圈约 1~1.5 mm 厚的薄壁组织区域, 无维管束

分布。其内为基本组织的内部区域,有维管束分布,其中,外侧的维管束较小、排列较稀疏;中心部位散生排列的维管束较大,排列较紧密。

根状茎切片与显色剂作用 1~2 min 以后,其因皂苷浓度和含量的不同而呈现浅红色到深红色的颜色反应。

周皮及其以外的保护组织中无显色反应,说明没有皂苷的积累。基本组织细胞中显示出含有皂苷的红色液滴。在外围没有维管束分布的基本组织中,细胞内含皂苷的液滴呈浅红色,靠外侧的皂苷的液滴较大,数量少,而靠近内侧的细胞中液滴大小不一,但是数量多。在有维管束分布的基本组织中,小维管束分布部位的基本组织细胞中皂苷的积累最丰富,细胞中红色液滴数量最多,大小不一,最大的红色液滴也分布在此部分。在有较大维管束分布的基本

组织细胞中红色液滴相对较小,数量少,含皂苷的液滴大多沿细胞壁分布。二年生根状茎皂苷的积累与分布情况与一年生根状茎中皂苷的分布基本相同,但是所含皂苷液滴的大小比一年生根状茎中的大而且多,呈深红色。显示皂苷的积累与分布较一年生的丰富。

以上结果表明,有小维管束分布的基本组织中皂苷的积累最多,其次是没有维管束分布的基本组织,中心部位大维管束分布的基本组织最少;二年生根状茎中皂苷的积累比 1 年生的根状茎的多。

组织化学研究结果初步表明了皂苷在根状茎内的存在部位及其含量的丰富程度。为进一步证实上述研究,采用了高效液相色谱仪对根状茎中薯蓣皂苷元的含量进行了测定。

2.2 测定薯蓣皂苷元含量的高效液相色谱图:见图 1。

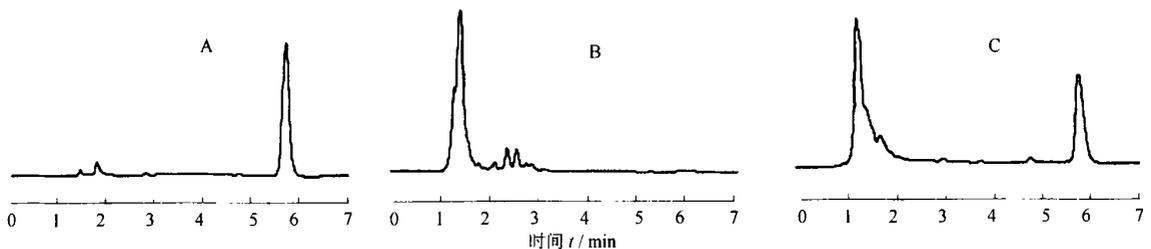


图 1 对照品(A),根状茎甲醇提取液(B),根状茎甲醇提取液水解后(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), rhizome methanol extractive (B), and rhizome methanol extractive after hydrolysis (C)

2.3 不同性别、不同部位根状茎中薯蓣皂苷元含量的差异:在地上缠绕茎枯萎前期(11月中旬),分别取该种植物的雌株、雄株和雌雄同株由根茎营养繁殖的 1 年生根状茎。根状茎去掉外面的栓皮层后,将无维管束分布的基本组织、有小维管束分布的基本组织、中心部分有较大的维管束分布的基本组织 3 个部分分割后分别测定薯蓣皂苷元的含量。结果见表 1。

表 1 不同性别、不同部位根状茎中薯蓣皂苷元的含量

Table 1 Diosgenin of rhizome in different part of male, female, and monoecism

不同部位	无维管束分布区	小维管束分布区	大维管束分布区
	NVB/ %	SVB/ %	BVB/ %
雌株	1.87	1.98	1.80
雄株	2.47	2.85	2.37
雌雄同株	2.31	2.57	2.20

由表 1 可以看出,在雌株、雄株和雌雄同株,各自不同部位之间薯蓣皂苷元的含量有较明显的差异。无论是雌株、雄株还是雌雄同株都以小维管束分布的区域含量最高,其次是没有维管束分布的区域,

在根状茎中心部位有大维管束分布的区域薯蓣皂苷元的含量最低。雌株、雄株和雌雄同株 3 者的相同部位之间,薯蓣皂苷元含量也有很明显的差异。无论是在无维管束分布的区域、小维管束分布的区域还是大维管束分布的区域,雌株与雄株之间的差异比较大,雄株的含量较显著的高于雌株的含量。雌雄同株根状茎 3 个不同区域薯蓣皂苷元的含量在雌株和雄株之间,但是其含量与雌株之间的差异较大而与雄株之间的差异较小。

2.4 不同生长期根状茎中薯蓣皂苷元含量的测定:分别于盛花期(6月下旬)、果期(9月中旬)、枯萎前期(11月中旬)取 1 年生和 2 年生由根茎营养繁殖的根状茎,其薯蓣皂苷元含量测定的结果见表 2。1 年生和 2 年生根状茎薯蓣皂苷元含量的差异如图 2。结果表明,2 年生根状茎在盛花期薯蓣皂苷元的含量最高,果期的含量低,在枯萎前期皂苷元的含量又有回升。1 年生根状茎薯蓣皂苷元的含量呈逐渐上升的趋势,枯萎前期含量最高。每个生长发育期,2 年生根状茎薯蓣皂苷元的含量都比 1 年生的含量高。

表 2 1 年生和 2 年生根状茎薯蓣皂苷元的含量

Table 2 Diosgenin in annual and biennial rhizomes

样品采收期	根状茎薯蓣皂苷元含量 / %	
	1 年生	2 年生
盛花期	1.53	2.88
果期	1.76	2.35
枯萎前期	2.29	2.68

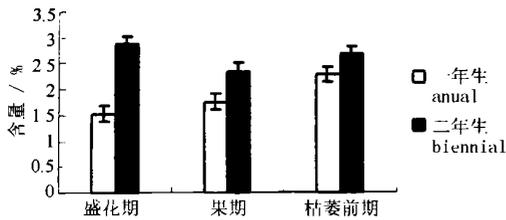


图 2 1 年生和 2 年生根状茎薯蓣皂苷元含量的差异

Fig. 2 Differences of diosgenin between annual and biennial rhizomes

### 3 讨论

有关皂苷的组织化学研究, 一些学者曾报道过人参、西洋参和绞股蓝人参皂苷在组织中的积累动态<sup>[11, 12]</sup>, 并根据其与显色剂反应产生颜色深浅的变化来确定组织中人参皂苷含量的高低。笔者在对盾叶薯蓣根状茎进行组织化学研究中发现有类似的结果。关于皂苷的存在位置, 西洋参根中人参皂苷主要分布于周皮和韧皮部中, 其中以分泌道内最多, 人参根中人参皂苷不仅存在于韧皮部中, 还存在于木质部导管附近的薄壁细胞和木射线细胞中<sup>[11]</sup>。绞股蓝中人参皂苷主要分布在营养器官的同化组织及韧皮部薄壁细胞中<sup>[12]</sup>。对盾叶薯蓣根状茎的组织化学研究表明, 薯蓣皂苷主要分布在基本组织薄壁细胞中, 又以有小维管束分布的基本组织中积累最多, 其次是无维管束分布的基本组织, 中心部位有大维管束分布的基本组织最少。

通过 HPLC 法对根状茎中薯蓣皂苷元含量的测定, 进一步证实: 有小维管束分布的区域薯蓣皂苷元的含量最高, 其次是没有维管束分布的区域, 中心部位有大维管束分布的基本组织含量最低; 2 年生根状茎薯蓣皂苷元的含量高于 1 年生的含量。所得结果与组织化学研究的结果完全一致。同时发现不同性别的植株之间薯蓣皂苷元含量的差异也是非常明显的, 在基本组织的 3 个不同的区域内雄株的含量都较显著的高于雌株的含量, 而雌雄同株 3 个不同的区域内薯蓣皂苷元的含量均在雄株和雌株之间。

其原因可能与开花结实有关。丁志遵等<sup>[13]</sup>认为薯蓣皂苷元的变化与地下根状茎营养物质的积累与消耗有一定关系。雄株根状茎中薯蓣皂苷元含量高于雌株, 很可能雄株开花所消耗的营养物质要比雌株开花、结实所消耗的营养物质少, 从而使二者薯蓣皂苷元含量不同。

### References:

- [1] Tang S R, Wu Y F, Pang Z J. Isolation and identification of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* Wright [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1983, 25(6): 556-561.
- [2] Kang A L, Sun W J, Tang Y S, et al. TLCs determination of new saponin and dioscin in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23(2): 59-60.
- [3] Liu C L, Chen Y Y, Tang Y F, et al. Isolation and identification of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* Wright [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1984, 26(3): 283-289.
- [4] Liu C L, Chen Y Y. Isolation and identification of original saponins from fresh *Dioscorea zingiberensis* Wright [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1985, 27(1): 68-74.
- [5] Tao L, Da H N, Da S L. Gas chromatograph determination of diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1991, 22(6): 252-253.
- [6] Da S L, Tang X Y, Da H N, et al. RP-HPLC determination of diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1992, 10(2): 98-99.
- [7] Qin H Z, Li B Y, Wu Z J. An embryological study of *Dioscorea zingiberensis*: its characteristics and evolutionary significance [J]. *Bulletin of Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-sen* (南京中山植物园研究论文集) [C]. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1991.
- [8] Cao Y F, Lin R, Hu Z Z. Studies on the developmental anatomy of rhizome in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Acta Bot Boreal—Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(2): 297-303.
- [9] Huai Z P, Ding Z Z, He S A, et al. Research on correlations between climatic factors and diosgenin content in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24(9): 702-706.
- [10] Hardman R. Antimony trichloride as a test reagent for steroids, especially diosgenin and yamogenin in plant tissue [J]. *Stain Technology*, 1972, 47(4): 205-208.
- [11] Hu Z H, Shu H W. The relationship between the root development of American ginseng and the accumulation of main medicinal substances [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(9): 162-164.
- [12] Lin R, Cao Y F, Hu Z H. Anatomical structure of vegetative organs and histochemical localization of ginsenosides in *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Acta Bot Boreal—Occident Sin* (西北植物学报), 2002, 22(4): 796-800.
- [13] Ding Z Z, Tang S R, Qin H Z, et al. *Plants of Steroid Hormone* (甾体激素源植物) [M]. Beijing: Science Press, 1983.