

的来源并确定为道地药材。

本实验比较了不同提取溶剂(95%乙醇、70%乙醇、45%乙醇、50%甲醇、甲醇)的水浴回流、索氏提取、超声提取等不同提取方法的提取效果,同时还考察了不同提取时间的提取效果。结果表明,以甲醇为提取溶剂,当超声提取 20 min 时,各色谱峰的响应值不再增加,且方法稳定,重现性好。

本实验采用 200 nm 作为检测波长。紫菀酮的结构特殊^[4],具有末端吸收。有文献报道^[5]在 316 nm 下进行检测,紫菀酮在此波长下无吸收,所得图谱不能涵盖紫菀中的特征成分。本研究经 HPLC-DAD 分析,得到三维全波长紫外扫描图,根据图谱选择各成分紫外吸收均较强的波长,除突出紫菀酮色谱峰特征外,也同时突出其他特征。

中药化学成分的多多样性与复杂性是其发挥疗效的物质基础,在其有效成分尚未被阐明的情况下,只

采用单一或少数几个成分做指标进行质量评价,往往不能全面反映其质量情况。而仅仅通过指纹图谱又不能阐明其成分的确切含量,本实验以有效成分之一的紫菀酮为内参照进行定量并结合指纹图谱进行全面评价,为全面评价中药材质量提供了一种有效手段。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Lu Y H, Wang Z T, Ye W C, et al. Research on chemical composition of *Aster tataricus* L. f. [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 29(2): 97.
- [3] Lu Y H, Dai Y, Wang Z T, et al. Effective position and constituents of disphlegm and codein from *Aster tataricus* L. f. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 360.
- [4] Xiao P G. *Modern Chinese Materia Medica* (新编中药志) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [5] Zhou J H, Wu W P, Xie Z M, et al. HPLC Fingerprints of *Radix Asteris* and quantitation assay [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27(8): 562.

牛膝营养器官中蜕皮甾酮的积累动态研究

李金亭^{1,2}, 滕红梅¹, 胡正海^{1*}

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:目的 揭示蜕皮甾酮在牛膝不同营养器官中的积累规律。方法 高效液相色谱法。结果 在牛膝根、茎和叶 3 种营养器官中都含有蜕皮甾酮,但不同器官中蜕皮甾酮的量有显著差异。幼嫩的器官中蜕皮甾酮的量较高,随着营养器官发育成熟,其蜕皮甾酮的量随物候期的变化差异显著。至采收期(11月)时,牛膝营养器官中蜕皮甾酮的量为:叶>根>茎。结论 牛膝根中蜕皮甾酮的量高峰与其产量高峰一致,都在 11 月初地上部分枯萎时,因此,此时应为牛膝的适宜采收期,与传统的牛膝采收期相吻合。但此时叶和茎中也含有较高量的蜕皮甾酮,因此,建议对牛膝地上部分进行综合开发利用。

关键词:牛膝;营养器官;蜕皮甾酮;高效液相色谱

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)10-1570-04

Accumulation dynamic of ecdysterone in vegetative organs of *Achyranthes bidentata*

LI Jin-ting^{1,2}, TENG Hong-mei¹, HU Zheng-hai¹

(1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Key words: *Achyranthes bidentata* Blume; vegetative organs; ecdysterone; HPLC

牛膝是苋科的多年生草本植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 的干燥根,主产于河南省怀庆府地区,故称为怀牛膝。具有补肝肾、强筋骨、活血逐瘀、引血下行之功效。牛膝根内含有皂苷类、甾酮

类、多糖类、甜菜碱等多种药用成分,其中蜕皮甾酮为其主要活性成分之一。蜕皮甾酮广泛存在于 80 个科的植物中^[1],具有促进蛋白质的合成、抑制由于药物引起的血糖升高、降低血浆胆固醇作用、使受损的

收稿日期:2007-01-17

基金项目:陕西省教育厅专项科研基金资助项目(JK177);河南省自然科学基金资助项目

作者简介:李金亭(1962-),女,河南新乡人,高级实验师,博士研究生,主要从事药用植物学研究。 E-mail: Ljt66882004@126.com

* 通讯作者 胡正海 Tel: (029)88302684

细胞再生等作用^[2-6],与牛膝“补肝肾,强筋骨”功效相吻合。有关蜕皮甾酮分离鉴定、化学结构和生物活性及其在不同植物中的分布、积累和测定等方面已有许多研究报道^[7-12],但有关蜕皮甾酮在牛膝营养器官中的积累规律报道较少。本实验用高效液相色谱法对牛膝根、茎、叶在生长发育过程中蜕皮甾酮的积累规律进行了研究,为牛膝的科学栽培、合理采收及综合开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料:牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 种子由河南温县农科所提供,于2006年6月23日播种于西北大学生物园内,7月初出苗。分别于8~12月每月上旬随机取牛膝全株的根、茎、叶于60℃烘干后粉碎,过40目筛备用。由于12月气温较低,叶子已完全干枯脱落,故未取此时期的叶。

1.2 仪器与条件:日本岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪,SPD-10Avp 检测器,Class-VP 工作站;色谱柱 VP-ODS(150 mm×4.6 mm);流动相为甲醇-水-冰醋酸(45:55:0.05);体积流量 0.9 mL/min;室温;检测波长 248 nm。蜕皮甾酮对照品购于中国药品生物制品检定所,批号:111638-2000402。

1.3 标准曲线的绘制:精密称取蜕皮甾酮对照品适量,加甲醇溶解配制成 1 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 10、30、50、70、120 μL,加甲醇定容至 1 mL,分别进样 20 μL,重复 3 次,以峰面积的

平均值为纵坐标,质量为横坐标,得蜕皮甾酮回归方程为: $Y = 549\,767X - 49\,028$, $r = 0.996$,线性范围: 0.2~2.4 μg。

1.4 样品溶液的制备和测定:分别称取供试样品 0.5 g(每个样品 3 份),加甲醇 10 mL,超声提取 40 min,滤去残渣,并用甲醇洗涤容器和残渣数次,减压浓缩至干,加甲醇定容至 3 mL,摇匀,微孔滤膜(0.22 μm)滤过,吸取 20 μL 进样测定,所得结果代入回归方程计算即得蜕皮甾酮的量。

1.5 精密度试验:对同一蜕皮甾酮对照品溶液连续进样 5 次,每次 20 μL,计算得峰面积的 RSD 为 1.391%。

1.6 重现性试验:精密称取 5 份同一样品粉末,制备供试品溶液进行测定,蜕皮甾酮质量分数 RSD 为 2.40%。

1.7 稳定性试验:取供试品溶液在室温下保存,分别在 0、2、4、6、8 h 测定蜕皮甾酮峰面积,得 RSD 为 2.40%。

1.8 加样回收率试验:精密称取样品 5 份,分别加入蜕皮甾酮对照品适量,制备供试品溶液,进行测定,计算平均回收率为 98.22%。

2 结果

2.1 蜕皮甾酮高效液相色谱图:从图 1 中可以看到,牛膝的根、茎、叶中均含有蜕皮甾酮。

2.2 不同发育时期牛膝营养器官中蜕皮甾酮的积

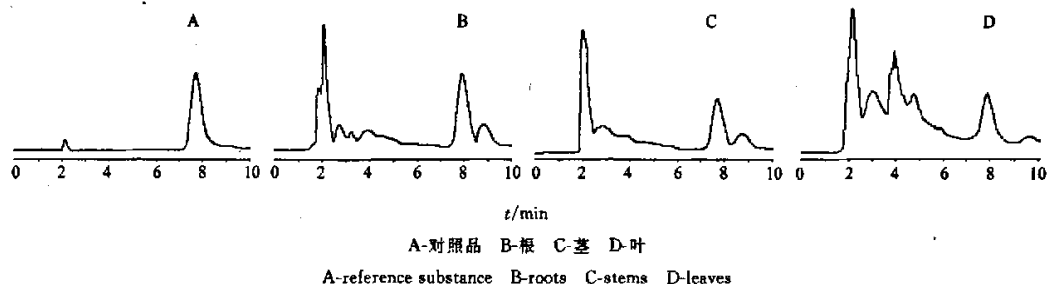


图 1 蜕皮甾酮对照品和牛膝样品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of ecdysterone reference substance and different organs samples of *A. bidentata*

累动态:采用高效液相色谱法,分别测定了不同发育时期牛膝根、茎、叶中蜕皮甾酮的积累动态,其测定结果见表 1 和图 2。可以看出,不同发育时期牛膝的各组织器官中蜕皮甾酮的量随植株生长期的变化而有较大波动。

在整个生长过程中,牛膝根中蜕皮甾酮的量呈“高-低-高”的变化趋势:8月初,牛膝处于营养生长期,地上部分生长旺盛,其蜕皮甾酮的量较高(0.222 mg/g);8月15~20日牛膝进入生殖生长期,开始

表 1 不同发育时期牛膝各器官中蜕皮甾酮的量
Table 1 Ecdysterone in different vegetative organs of *A. bidentata* at various growth periods

样品采集 时间/月	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)			
	根	茎	叶	种子
8	0.222	0.352	0.555	
9	0.172	0.443	0.443	
10	0.150	0.145	0.462	
11	0.237	0.193	0.455	3.914
12	0.214	0.098		

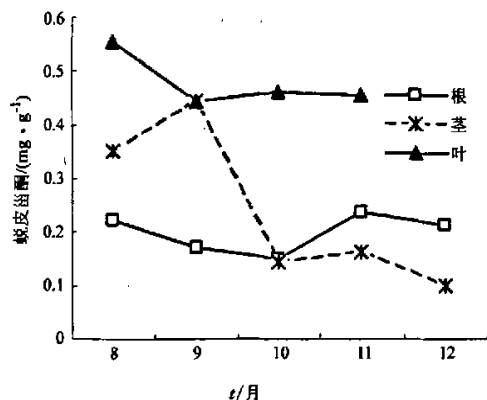


图2 不同发育时期牛膝营养器官中蜕皮甾酮的积累动态

Fig. 2 Accumulation trends of ecdysterone in different organs of *A. bidentata* at various growth periods

抽穗、开花,蜕皮甾酮的量逐渐下降,至10月初达全年的最低峰(0.150 mg/g);随着果实逐渐发育成熟,根中蜕皮甾酮的量又逐渐升高,至11月份时达全年的最高峰(0.237 mg/g),12月时其量稍有下降,但幅度不大。

牛膝幼叶中的蜕皮甾酮量最高(0.555 mg/g),随着叶发育成熟及叶面积的增大其量有所下降,以后基本处于稳定水平(0.462~0.455 mg/g)。而其茎中蜕皮甾酮的量波动最大,8月初处于叶和根之间(0.352 mg/g),随后快速上升,至9月初与叶中蜕皮甾酮的量相当,以后又呈逐渐下降的趋势,至10月初降至0.145 mg/g,与根中的量相当;此后的变化趋势和根相似。11月采集成熟的果实,测定其种子中蜕皮甾酮的量为3.914 mg/g,远远高于牛膝营养器官中蜕皮甾酮的量。

3 分析与讨论

由表1和图2可以看出,牛膝营养器官中蜕皮甾酮的量随植株生长期的变化而有较大波动,表明物候期是影响牛膝营养器官中蜕皮甾酮积累的主要因素之一。关于蜕皮甾酮在植物体不同器官中的分布,Savchenko等^[13]曾发现在短柄野芝麻(*Lamium album*L.)的幼叶、幼茎、侧芽及花和种子中蜕皮甾酮量最高。对牛膝不发育时期各营养器官中蜕皮甾酮的HPLC测定结果表明,8月初牛膝处于营养生长期,其根、茎、叶中蜕皮甾酮量均较高,它们间的量差异依次为叶>茎>根。此时地上部分含有较高量的蜕皮甾酮,可能对抵御昆虫的侵害具有一定的保护作用。

8月15~20日牛膝由营养生长期转入生殖生

长期,开始抽穗、开花,叶中的蜕皮甾酮不断转运到茎及花中,因此叶中的量逐渐下降,而茎中则不断升高。9月初时茎、叶中的量基本达到一致,以后叶中蜕皮甾酮的量基本趋于稳定水平,而茎中则快速下降,至10月初时与根中的量相当,以后的变化趋势和根相似,呈先升高而后下降的趋势。在整个生长过程中,牛膝根中蜕皮甾酮的量呈“高-低-高”的变化趋势,10月初其量最低(0.150 mg/g),11月初量最高(0.237 mg/g),12月时其量稍有下降,但幅度不大。而其成熟种子中蜕皮甾酮的量最高,为3.914 mg/g。这可能是由于9月份为牛膝的盛果期,其生殖器官的生长发育使营养物质的消耗增加,致使茎和根中蜕皮甾酮的量不断下降。另外,由于牛膝根和果实的迅速生长期是相互重叠的,均需消耗大量的营养物质,从而导致根中蜕皮甾酮的量有所下降。

随着果实逐渐发育成熟,对营养物质的消耗相对减少,根、茎中蜕皮甾酮的量又逐渐升高,至11月份时达到高峰。根据笔者的研究,牛膝根的增长、加粗、三生维管束圈数、主要药用成分三萜皂苷总量及根的生物产量均在出苗后约120 d(即11月份)达到高峰^[14],此时地上部分逐渐进入枯萎期,但其茎、叶中仍含有相当高的蜕皮甾酮,其蜕皮甾酮量为叶>根>茎。11月份牛膝植株的地上部分临近枯萎,而根经过了生长高峰期,其蜕皮甾酮量与生物量均达到高峰,应为牛膝根的最佳采收期,这一研究结果也与传统习惯的采收期相吻合。在传统用药时,牛膝仅以根经不同炮制而入药,地上部分全部舍弃。但此时地上部分的茎叶中仍含有大量的蜕皮甾酮,这与李鸿英、张华^[15,16]等的报道是一致的。在资源日益紧张的今天,对牛膝地上部分的舍弃是一种浪费,建议对牛膝的茎进行综合开发利用。

References:

- [1] Xu X Y, Zheng Y M, Wang L. Advances in studies on phytoecdysones [J]. *J Biol* (生物学杂志), 2005, 22(4): 12-15.
- [2] Michael D, Courreur T, Lenserts V, et al. Effects of ecdysterone on the differentiation of normal human keratinocytes in vitro [J]. *Eur J Dermatol*, 1994, 4(7): 558.
- [3] Otaka T. Chromosomal action of ecdysone [J]. *Nature*, 1980, 285(12): 435.
- [4] Catalan R E, Martinez A M, Aragones M D. In vitro effect of ecdysterone on protein kinase activity [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1982, 71B(2): 301.
- [5] Takei M, Endo K, Nishimoto N, et al. Effect of ecdysterone on histamine release from rat peritoneal mast cells [J]. *Pharm Sci*, 1991, 80(4): 309.
- [6] Chen Q, Xia Y P, Qiu Z Y. Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro [J]. *Life Sci*, 2006, 78(10): 1108-1113.
- [7] Kiyoshi O, Tetsuo K, Kinya N, et al. Biosynthesis of O-hy-

- droxyecdysone in *Ajuga hairy roots*; fate of 6- α and 6 β -hydrogens of lathosterol [J]. *Bioorg Med Chem*, 1999, 7: 2925-2930.
- [8] Ryo H, Yoshinori F. Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga hairy roots*; the possibility of 7-ene introduction at a late stage [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53: 733-737.
- [9] Zakirova R P, Malikova M K. Accumulation dynamics of ecdysterone and carbohydrates in callus tissue of *Ajuga turkestanica* [J]. *Chem Nat Comp*, 2001, 37(3): 266-268.
- [10] Tamara S, Pensri W, Vladimir S, et al. Distribution and identities of phytoecdysteroids in the genus *Briza* (Gramineae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1998, 26: 781-791.
- [11] Chadin I, Volodin V, Whiting P, et al. Ecdysteroid content and distribution in plants of genus *Otamogeton* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, 31: 407-415.
- [12] Zhang C Y, Liang S W, Zhang G Q. Determination of ecdys-
terone in *Achranthes bidentata* from different locations [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2001, 36(10): 699-700.
- [13] Tamara S, Michaela B, Satyajit D S, et al. Phytoecdysteroids from *Lamium* spp.: identification and distribution within plants [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2001, 29: 891-900.
- [14] Li J T, Hu Z H, Peng L, et al. Structural development of root and their relationship to accumulation of triterpenoid saponins in *Achranthes bidentata* Bl. [J]. *J Mol Cell Biol* (分子细胞生物学报), 2007, 40(2): 121-129.
- [15] Li H Y. Determination of ecdysterone in stems and leaves of *Achranthes bidentata* [J]. *Technol Chin Med Mater* (中药材科技), 1982 (3): 30.
- [16] Zhang H, Zhang Z Z, Wei Y. Study on contents of ecdysterone in *Achranthes bidentata* of different sources and variation [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2000, 23(12): 734-735.

香鳞毛蕨配子体发育及快速繁殖的研究

黄庆阳¹, 樊锐锋², 袁 强¹, 常 缨^{1,3*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040;
3. 黑龙江省农业科学院博士后工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086)

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott 是鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物。香鳞毛蕨对皮肤病的治疗效果显著, 是具有极大的开发潜力和应用前景的纯天然中药^[1~3]。香鳞毛蕨在中国以黑龙江省为分布中心, 主要生长在高寒地区的滑石坡、火山岩裂隙中。近年来, 香鳞毛蕨的药用价值受到了广泛的关注, 但是人为干扰使其野生资源正遭到严重的破坏, 因此对香鳞毛蕨资源的保护性研究更具有必要性和紧迫性。应用蕨类植物孢子进行组织培养, 是快速繁育种苗的有效途径^[4]。王全喜^[5]、Momose^[6]等对鳞毛蕨科植物的配子体发育进行了大量的研究, 但是关于香鳞毛蕨配子体形态发育的研究尚未见报道。本实验通过对香鳞毛蕨配子体发育和培养模式的研究, 建立了香鳞毛蕨的快速体系, 为提出香鳞毛蕨引种栽培策略、实现香鳞毛蕨植物资源的可持续利用奠定了基础。

1 材料和方法

香鳞毛蕨采自黑龙江省五大连池市二池的火山熔岩的岩缝间。取成熟的孢子置于 1.5 mL 离心管内, 滴入无菌水, 充分振荡使成悬浮液, 4 000 r/min

离心 1 min, 使孢子全部沉淀, 弃去上清液。离心管内再滴入约 1.0 mL 的 0.1% HgCl₂ 溶液, 灭菌 2 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 用上述离心方法获得无菌的孢子悬浮液。

采用不同的培养方法, 包括固体培养基培养、液体培养基培养和土壤培养 3 种。

固体培养基采用 MS、1/2MS、1/4MS 和改良的 Knop's 配方 (NaH₂PO₄ 0.2 g、KNO₃ 0.2 g、MgSO₄ 0.2 g、Ca(NO₃)₂ 0.8 g、蒸馏水 1 000 mL), 琼脂浓度为 1%。培养基分装三角瓶中, 高压灭菌 (121 ℃、15 min) 后备用。待原叶体长出性器官后每 3 天用无菌水冲洗, 以促进受精。

液体培养基培养是将 MS、1/2MS、1/4MS 和改良 Knop's 液体培养基直接分装在三角瓶中, 高压灭菌 (121 ℃、15 min) 后备用。

土壤培养是将过细筛草炭土和细沙以体积为 1:1 比例均匀混合后放入底部钻有孔的塑料盘 (大小为 25 cm×20 cm×5 cm) 内, 基质厚度约 3 cm, 将基质表面整平、压实后, 将塑料盘放入装有水的平盘中泡水, 待基质表面湿润后取出备用。待原叶体长出

收稿日期: 2007-01-12

基金项目: 黑龙江省博士后科研启动基金资助项目 (LHK-04051); 东北农业大学科学研究启动基金和黑龙江省农业科学院博士后科研启动基金资助

作者简介: 黄庆阳 (1981-), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 主要从事资源植物学和植物分子生物学研究工作。

Tel: (0451) 55190410 E-mail: huangqingyang@163.com

* 通讯作者 常 缨 E-mail: chang_ying72@163.com