

多样性的 16.9%,多态性是由于扩增条带的丢失和增加引起的。引物 T13765 扩增出 7 个条带,其中两条产生了多态性。相对于对照组,乌新号在 350 bp 产生了一个额外的条带并且在 50 bp 缺失了一条带。表明乌新号甘草与对照组相比产生了基因多态性变化,乌新号和对照组在基因数量、大小,以及 DNA 扩增片段密度上有本质的区别。生理特性分析结合 ISSR 分析表明乌新号和野生物种是不同基因类型,这些变化表明乌新号是一个具有前景的品种,并且能在将来广泛应用。

前期对乌新号甘草主要生物活性成分的量进行分析,结果表明乌新号甘草一年生根中甘草酸、甘草苷和甘草多糖的量分别是同期野生的 2.44、1.25、1.26 倍,而且在乌新号中检出了甘草次酸,而在野生的一年生甘草中未检出甘草次酸^[2]。李慧超等^[9]测定了内蒙古扎鲁特地区栽培的甘草一年生根中甘草酸的质量分数为 3.93 mg/g,要低于乌新号的 4.45 mg/g,乌新号中甘草苷的量和内蒙古赤峰 3 年生甘草中甘草苷的质量分数相当,这些说明所选育的乌新号其主要生物活性成分积累速度较快。

本实验研究乌新号种子的发芽率和活力实验表明,其种子的发芽率、活力和萌发中的过氧化物酶

的活性要明显高于野生的对照组,前期研究表明乌新号甘草根中的主要生物活性成分的量也高于野生甘草,这克服了一些甘草种植栽培中的关键问题,预示着乌新号具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Fiore C, Eisenhut M, Ragazzi E. A history of the therapeutic use of liquorice in Europe [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 99: 317-324.
- [2] 李克峰,高文远,陈海霞. 选育甘草乌新号主要生物活性成分的含量分析 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32 (5): 447-448.
- [3] Paterson A, Brubaker C, Wendel J. A rapid method for extraction of (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11 (2): 122-127.
- [4] Vardhini V B, Rao R. S. S. Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum [J]. *Plant Growth Regulat*, 2003, 41: 25-31.
- [5] Sharma P, Dubey R. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings [J]. *Plant Growth Regulat*, 2005, 46: 209-221.
- [6] Radotic K, Ducic T, Mutavdzic D. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium [J]. *Environ Exper Bot*, 2000, 44: 105-113.
- [7] 汤菊香,李广领,彩改玲,等. 花生种子活力与生理生化性态关系的研究 [J]. *河南农业大学学报*, 2005, 39 (3): 300-303.
- [8] 高文远,李志亮,尚培根. 甘草种子萌发初期过氧化酶的研究 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23: 212-219.
- [9] 李慧超,于淑华,闫凤杰,等. 高效液相色谱法测定野生甘草及栽培甘草中甘草酸的含量 [J]. *中国药事*, 2002, 16 (5): 304.

白术不同采收期内酯、和量的动态变化研究

白岩^{1,2},陈磊¹,王晓妮¹,杨潮锋¹,何福基¹,田薇¹

(1. 浙江林学院林业与生物技术学院,浙江 临安 311300; 2. 河北农业大学农学院,河北 保定 071001)

摘要:目的 以白术内酯、和量的量作为指标,考察不同采收期白术内酯量的动态变化,为其标准化栽培及采收加工技术提供科学依据。方法 采用 HPLC 法测定白术中的 3 种内酯成分。白术内酯和色谱柱: xBridge-C₁₈ 柱;流动相:甲醇-水(65:35);检测波长:220 nm;体积流量:1.0 mL/min;白术内酯色谱柱: Kromasil-C₁₈ 柱;流动相:甲醇-水(80:20);检测波长:276 nm;体积流量 0.6 mL/min。结果 白术内酯、和平均回收率分别为 103.52%、88.16%和 99.61%;RSD 分别为 0.37%、1.8%和 0.16%。不同采收期白术内酯、和量的变化与采样时期具有相关性。结论 白术中白术内酯量最高的时期在 5 月下旬至 6 月上旬摘蕾前。

关键词:白术内酯;白术内酯;白术内酯;高效液相色谱法;采收期

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)01-0129-03

白术始载于《神农本草经》,被列为上品,以菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz 的二年生干燥根茎入药^[1],为“浙八味”之一。白术具有燥湿利水、和胃安胎的功效,其内酯类

成分具有较强的增强唾液淀粉酶活性的作用^[2],可调节胃肠道功能以及促进营养物质的吸收^[3],为白术的主要活性成分。本研究利用 HPLC 法对不同采收时期白术根茎中内酯类成分进行测定,明确白

收稿日期:2009-03-10

基金项目:白术良种选育中其药效成分的定量控制(20070947)

作者简介:白岩(1977-),女,吉林长春人,浙江林学院林业与生物技术学院讲师,博士,主要从事中药资源开发与利用、药用植物栽培与药用植物生理的研究和教学工作。 Tel:(0571)63741273 Fax:(0571)63741273 E-mail: baiyan814@yahoo.com.cn

术内酯、和的动态变化过程,同时与根茎产量因素结合,确定较佳采收时期,有助于白术药材的适时采收和加工提取,并使其质量控制体系更加完善,得以获得药用价值与经济价值的双重效益。

1 仪器和试剂

Waters 2487 型高效液相色谱仪(Waters 公司);Waters 515 型 HPLC 泵(Waters 公司);2487 型紫外检测器(Waters 公司)。白术内酯(中国药品生物制品检定所)、白术内酯(上海顺勃生物工程有限公司,质量分数 $\geq 98\%$)、白术内酯(中国药品生物制品检定所)。

白术待测样品种植于浙江林学院百草园,每隔 15 d 采挖样品 30 株,根茎于 45 ~ 50 ℃ 烘干至恒重

后求单株平均干质量,粉碎,过 80 目筛,装袋,置于干燥器内备用。所有样品经浙江林学院林业与生物技术学院何福基教授鉴定均为菊科苍术属白术。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:白术内酯和的色谱柱为 xBridge-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(65 : 35);检测波长 220 nm;柱温为室温;体积流量:1.0 mL/min^[4-6];进样量:10 μL。白术内酯 色谱柱:Kromasil-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(80 : 20);检测波长:276 nm;柱温:室温;体积流量:0.6 mL/min^[7];进样量:10 μL。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取白术内酯、

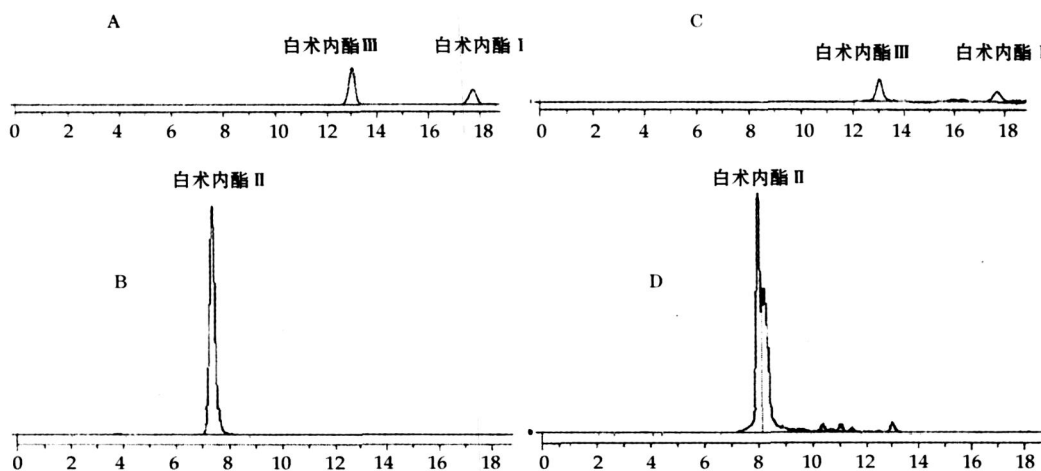


图1 白术内酯和混合对照品(A)、白术内酯对照品(B)和白术样品(C、D) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of atractylenolides and reference substance (A), atractylenolides reference substance (B), samples at 220 nm (C), and samples at 276 nm (D)

和对照品 2.58、1.42 和 7.78 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成白术内酯、和质量浓度分别为 0.311 2、0.057 和 0.113 2 mg/mL 的混合对照品溶液,放入冰箱待用。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取白术药材粉末 1.0 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加入甲醇 40.0 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液浓缩至小体积,以甲醇转移并定容至 10 mL,摇匀,得供试品溶液,放入冰箱中待测(进样前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过)^[8]。

2.4 线性关系:精密吸取白术内酯、和混合对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL,加甲醇定容至 10 mL,摇匀。按 2.1 色谱条件进行分析,分别以色谱峰面积(y)对质量浓度(x)绘制标准曲线。结果表明:白术内酯、和分别在 3.112 ~ 311.2、0.57 ~ 57.0 和 1.132 ~ 113.2 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系,回归方程分别为

$y = 58\,920x + 44\,748$ 、 $y = 592\,892x + 26\,886$ 、 $y = 41\,310x + 86\,102$, r 分别为 0.999 8、0.999 4 和 0.999 8。

2.5 精密度试验:取同一质量浓度的白术内酯、和混合对照品溶液,重复进样 5 次,每次进样 10 μL,计算峰面积的 RSD 值分别为 0.23%、0.66% 和 0.66%。

2.6 重现性试验:取同一白术粉末样品各约 1.0 g,精密称定,按 2.3 方法操作,制备供试品溶液 5 份,按 2.1 色谱条件测定各样品的峰面积,计算白术内酯、和质量分数的 RSD 值,分别为 1.67%、3.0% 和 1.43%,表明方法重现性良好。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 在 2.1 色谱条件下进样分析,计算白术内酯、和的 RSD 分别为 0.77%、0.6% 和 1.97%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验:称取已测定量的同一药材粉末约 1.0 g,精密称定,分别精密加入 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mL 的混合对照品溶液,按 2.3 方法操作,配制成高、中、低及空白 4 个水平的供试品溶液,在 2.1 色谱条件下分析,计算回收率。白术内酯、和的平均回收率分别为 103.52%、88.16%和 99.61%;RSD 分别为 0.37%、1.8%和 0.16%。

2.9 样品测定:取不同采收期白术样品各约 0.5 g,精密称量,按 2.3 方法分别制备供试样品溶液,进样量为 10 μ L。以外标法计算白术内酯、和的量,结果见表 1。

3 讨论

3.1 不同采收期白术内酯、和量的变化规律:本研究对不同采样时期的 14 批白术药材进行内酯类成分测定,首次明确了白术根茎中白术内酯、和的变化规律。结果表明,白术内酯、和和内酯总量最高值均出现在 5 月下旬,并且大大高于刘伟祥等^[9]提出的初步规定,即白术内酯、和分别不得小于 0.150、0.200 和 0.100 mg/g,3 者总计不得少于 0.500 mg/g,结合白术田间管理发现,此时为白术现蕾期;6 月上旬进行摘蕾后,白术内酯量下降;6 月下旬第 2 次现蕾后,白术内酯、和量有所回升,各项指标高于规定;7 月初第 2 次摘蕾后,内酯量再次下降,并伴随根茎膨大期在低水平波动。由于白术内酯、和的量均在白术现蕾期最高,推测其动态变化与白术现蕾有关,为首次发文报道。

表 1 白术不同采收时期白术内酯、和量的测定结果 (n=4)

Table 1 Determination of atractylenolides, , and in *A. macrocephala* at various harvest periods (n=4)

采收时期	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	内酯	内酯	内酯	内酯总量
4 月下旬	0.141	0.176	0.159	0.476
5 月上旬	0.293	0.248	0.347	0.888
5 月下旬	0.740	0.394	0.972	2.106
6 月上旬	0.109	0.177	0.191	0.477
6 月下旬	0.242	0.211	0.578	1.031
7 月上旬	0.089	0.096	0.241	0.426
7 月下旬	0.128	0.115	0.342	0.585
8 月上旬	0.122	0.074	0.328	0.524
8 月下旬	0.044	0.041	0.067	0.152
9 月上旬	0.031	0.043	0.078	0.152
9 月下旬	0.032	0.046	0.082	0.160
10 月上旬	0.038	0.032	0.089	0.159
10 月下旬	0.035	0.032	0.072	0.139
11 月中旬	0.038	0.030	0.122	0.190

3.2 白术内酯量动态积累及采收时间的确定:确定药材采收期需将有效成分积累与产品器官的生长动态相结合,白术内酯量高峰期与根茎产量高峰期不一致,故以有效成分量与产量乘积最大时作为最佳采收期^[10],计算结果见表 2。

表 2 不同采收时期单株白术的白术内酯、和产量计算结果(n=4)

Table 2 Results of atractylenolides, ,and in *A. macrocephala* per plant at various harvest periods (n=4)

采收时期	产量/(mg·株 ⁻¹)				
	单株根茎产量	单株内酯	单株内酯	单株内酯	单株总内酯
4 月下旬	4.311	0.608	0.759	0.685	2.052
5 月上旬	5.752	1.685	1.426	1.996	5.108
5 月下旬	6.382	4.723	2.515	6.203	13.440
6 月上旬	7.733	0.843	1.369	1.477	3.689
6 月下旬	8.457	2.047	1.784	4.888	8.719
7 月上旬	10.934	0.973	1.050	2.635	4.658
7 月下旬	13.404	1.716	1.541	4.584	7.841
8 月上旬	15.069	1.838	1.115	4.943	7.896
8 月下旬	13.967	0.615	0.573	0.936	2.123
9 月上旬	15.178	0.471	0.653	1.184	2.307
9 月下旬	16.684	0.534	0.767	1.368	2.669
10 月上旬	17.279	0.657	0.553	1.538	2.747
10 月下旬	20.402	0.714	0.653	1.469	2.836
11 月中旬	22.339	0.849	0.670	2.725	4.244

由表 2 可以看出,在 5 月下旬采收的样品中,白术内酯、和和内酯总产量均为最高;6 月下旬单株白术内酯产量次之;7 月上旬~11 月中旬采收的样品中内酯产量逐渐减少。参照以上结果可初步得出结论,如果白术药用以内酯类成分为主,可将 5 月下旬至 6 月上旬(摘蕾之前)确定为最佳采收时期,从而确保其质量与产量,使药用价值与经济价值均有增加。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 郝延军,桑育黎,李宝林,等.白术内酯及白术内酯对唾液淀粉酶活性的影响[J].时珍国医国药,2006,17(9):1617-1618.
- [3] 李伟,崔小兵,李璇,等.白术健脾有效成分研究[J].南京中医药大学学报:自然科学版,2006,22(6):366-367.
- [4] 李伟,文红梅,张爱华,等.白术质量标准研究-HPLC法测定 2 种白术内酯的含量[J].药物分析杂志,2001,21(3):170-172.
- [5] 文红梅,张爱华,王莉,等.炮制对白术中白术内酯含量的影响[J].中药材,1999,22(3):125-126.
- [6] 文红梅,李伟,吴皓,等.炮制对白术中白术内酯含量的影响[J].中国中药杂志,1997,22(11):662-663.
- [7] 文红梅,李伟,崔小兵,等.炮制对白术中白术内酯的含量的影响[J].中药材,2006,29(5):497-498.
- [8] 黎琼红,马兴田,谢晨,等.白术药材的指纹图谱研究[J].中草药,2007,38(6):929.
- [9] 刘伟祥,黎琼红,谢晨,等.HPLC法测定白术中的白术内酯、和[J].中草药,2007,38(8):1261-1262.
- [10] 杨继祥,田义新.药用植物栽培学(第二版)[M].Vol 8.北京:中国农业出版社,2005.