

- 咖啡酸酯含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2): 239-240.
- [12] 邵清松, 郭巧生, 张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1971-1975.
- [13] 郭丁丁, 马逾英, 唐琳, 等. 白芷种质资源遗传多样性的 ISSR 研究[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1627-1630.
- [14] 张春平, 何平, 胡世俊, 等. 黄连遗传多样性 ISSR 分析[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1630-1634.
- [15] 廖丽, 郭巧生. 夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1131-1135.
- [16] 张春平, 何平, 王瑞波, 等. 三角叶黄连 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 中草药, 2009, 40(2): 280-284.
- [17] 罗明信, 伍贤进, 彭帅, 等. 12 种翻白草种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药, 2008, 39(5): 748-751.
- [18] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76: 5269-5273.

北柴胡移栽试管植株与种子植株中皂苷的动态分析

郝建平¹, 王丽荣¹, 徐笑飞¹, 秦雪梅², 张丽增², 赵玉臣^{3*}

(1 山西大学 生命科学院, 山西 太原 030006; 2 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006;
3 山西省药物培植场, 山西 绛县 043610)

摘要:目的 为应用离体快速繁殖技术进行北柴胡优良种质选育提供实验依据。方法 应用分光光度法测定北柴胡移栽试管植株不同生长期的根、茎叶中柴胡总皂苷的量, 应用柱前衍生化 HPLC-UV 法测定柴胡皂苷 a 和 d 的量, 并以同型、同时的种子植株作为对照。结果 北柴胡试管植株根、茎叶中柴胡总皂苷及皂苷 a 和 d 的量在试管苗阶段最低, 在一年生植株中最高, 在两年生植株中的营养生长期次高, 在花期、果期、枯萎期依次降低; 在根中的量远高于茎、叶; 引种自山西左权的移栽试管植株的量均高于引种自山西陵川和万荣的类型; 移栽试管植株根、茎叶中的量均高于相同类型的种子植株中的量。结论 离体快速繁殖是纯化北柴胡种质和提升药材品质、提高药材产量的有效方法; 快速繁殖植株具有优良的遗传稳定性, 选择综合性状好的种质作为繁殖的起始材料, 能够保证后代性状的优良和整齐一致; 果期二级花序的种子成熟期为移栽试管植株根的适宜采收期。

关键词: 北柴胡; 试管植株; 种子植株; 柴胡皂苷

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1527-04

Dynamic analysis of saikoside in test-tube plants of *Bupleurum chinense* compared with seeding plants

HAO Jian-ping¹, WANG Li-rong¹, XU Xiao-fei¹, QIN Xue-mei², ZHANG Li-zeng², ZHAO Yu-chen³

(1 School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2 Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3 Cultivating Herbs Farm of Shanxi Province, Jiang County 043610, China)

Abstract: **Objective** To provide a scientific basis for breeding on *Bupleurum chinense* by rapid propagation method *in vitro*. **Methods** Pre-column derivatization HPLC-UV and visible-spectrophotometry methods were used to determine the contents of saikosaponin a, saikosaponin d, and saikosaponins in the root and aerial part of test-tube plants of *B. chinense* in different growing periods, and compared with seeding plants of same breeding and growing periods. **Results** The contents of saikosaponins, saikosaponin a, and saikosaponin d were minimum in roots, stems, and leaves of plantlets. They were the uppermost in annual test-tube plants, and were the second at vegetative growth phase of biennial test-tube plants. The contents were reduced ordinally at bud forming phase, seed ripening phase, and wilting phase of biennial test-tube plants. The content in the root was much higher than that in aerial part of test-tube plants. The contents of test-tube plants which were introduced from Shanxi Zuoquan were higher than which from Shanxi Wanrong and Lingchuan. The content in method of *B. chinense* breeding was an effective way to maintain and improve the yield in roots, stems, and leaves of test-tube plants were higher than those in seeding plants. **Conclusion** The rapid propagation *in vitro* is an effective method for purifying germplasm of *B. chinense* and ascending honewort medicinal material quality and yield. The genetic stability of rapid

* 收稿日期: 2009-11-11

基金项目: 山西省科技攻关计划项目(20100311091)

作者简介: 郝建平(1959-), 男, 山西省忻州市人, 山西大学生命科学学院副教授, 硕士研究生导师, 主要从事植物细胞工程的教学和研究工作, 已发表相关研究论文 70 余篇。 E-mail: jphao@sxu.edu.cn

propagation plants are excellent, so the starting material should have excellent comprehensive traits to ensure offspring with good characters and uniformity. The seed maturing stage in the secondary inflorescence is suitable harvest time for the root.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; test-tube plants; seeding plants; saikosaponin

近年来,国家出台了一系列促进中医药现代化的政策和规定,对中医药产业的扶持力度不断加大,对中药材的种植和药材质量提出了更高的要求。北柴胡是我国的传统常用大宗药材,主要以干燥根入药。在北柴胡人工种植中,普遍存在种源混杂和种子成熟度不均一、发芽率低等问题,种质纯化、品种选育以及资源的保护已经成为柴胡产业可持续发展的关键问题。离体快速繁殖方法是北柴胡优良种质培育的有效手段^[14]。本研究测定了不同生长期北柴胡试管苗移栽植株根、茎叶中柴胡总皂苷及皂苷

a 和 d 的量,并与相同类型的种子植株进行了比较,为确定移栽试管植株的生药品质以及离体快速繁殖技术应用于优良种质的选育提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料来源: 试验用北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 试管植株由本课题组自行培育并移植至田间; 种子植株分别种植于山西太谷、绛县和左权,由山西农业大学农学院王玉庆教授和山西省药物培植场赵玉臣主管中药师鉴定(表 1)。

1.2 仪器与试剂: UV 2602 紫外可见分光光度计,

表 1 北柴胡材料来源
Table 1 Sources of *B. chinense*

样品代号	样 品	生长年限	生长期	取材地	原产地
LB试	试管苗	1	生根 2 个月	组培室	山西陵川
LB移	移栽试管植株	1	移入田间 5 个月	试验田	山西陵川
LB蕾	移栽试管植株	2	营养生长期	试验田	山西陵川
LB花	移栽试管植株	2	花期	试验田	山西陵川
LB果	移栽试管植株	2	果期	试验田	山西陵川
LB枯	移栽试管植株	2	枯萎期	试验田	山西陵川
WB移	移栽试管植株	2	花期	试验田	山西万荣
ZB移	移栽试管植株	2	花期	试验田	山西左权
LB太	种子植株	2	花期	太谷	山西陵川
WB太	种子植株	2	花期	太谷	山西万荣
LB绛	种子植株	2	花期	绛县	山西陵川
WB绛	种子植株	2	花期	绛县	山西万荣
ZB左	种子植株	2	花期	左权	山西左权

Waters 1525 高效液相色谱仪, Waters 2487 双波长紫外检测器, Breeze 色谱工作站。

柴胡皂苷 a 和 d 标准品(质量分数均为 98%)由中国药品生物制品检定所提供,乙腈为迪马公司产色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法

应用李媛媛等^[5]建立的分光光度法和柱前衍生化 HPLC-UV 法分别测定柴胡总皂苷及柴胡皂苷 a

和 d 的量。

3 结果与分析

3.1 北柴胡中柴胡总皂苷及皂苷 a 和 d 的测定: 对一年生陵川移栽试管植株根进行测定。图 1 为对照品和样品的 HPLC 色谱图。

由图 1-C 可以看出,在 8 min 时开始出第 1 个吸收峰,即柴胡皂苷 d; 12 min 时开始出第 2 个吸收峰,为柴胡皂苷 a。

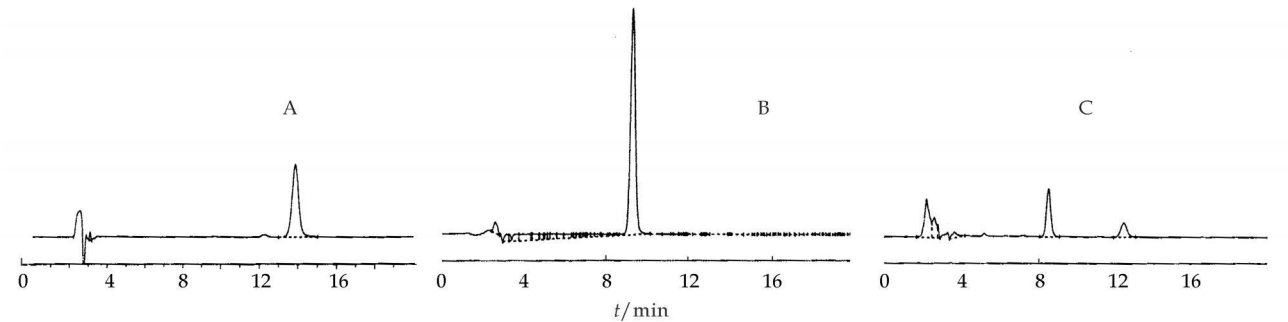


图 1 柴胡皂苷 a(A)、d(B)和陵川移栽试管植株根样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of saikosaponin a (A), saikosaponin d (B), and sample-root of Lingchuan test-tube plants (C)

3.2 陵川北柴胡试管植株在不同生长期中根、茎叶中皂苷量的变化: 如表 2 所示, 在陵川北柴胡试管植株的整个生长期中, 试管苗阶段根、茎叶中柴胡总皂苷、皂苷 a 和 d 的量均处于最低水平, 根中柴胡总皂苷的量为 0.094 7%, 皂苷 a 为 0.005 5%, 皂苷 d 为 0.006 2%; 茎叶中 3 种皂苷的量均低于 0.001 0%。试管苗各营养器官中皂苷的量均低于“柴胡总皂苷不低于 1.00%, 皂苷 a 不得低于 0.100%、皂苷 d 不得低于 0.200%”的质量标准^[5]。北柴胡试管苗年繁殖系数达 1×10^8 株, 繁殖速度快^[1-2], 主要以营养生长为主, 使得次生代谢产物的合成量很少, 因而在试管苗生长阶段柴胡总皂苷、皂苷 a 和 d 的量很低。表 2 不同生长期试管苗(陵川)根、茎叶中柴胡皂苷 a 和 d 的量

Table 2 Determination of saikosaponins a and d in roots, stems, and leaves of Lingchuan test-tube plants in different growing periods

样品	根			茎 叶		
	柴胡皂 苷 a/ %	柴胡皂 苷 d/ %	柴胡总 皂苷/ %	柴胡皂 苷 a/ %	柴胡皂 苷 d/ %	柴胡总 皂苷/ %
LB试	0.005 5	0.006 2	0.094 1	-	-	-
LB移	0.201 5	0.364 7	1.967 3	0.039 6	0.054 7	0.235 1
LB蕾	0.189 1	0.362 4	1.893 0	0.037 2	0.054 9	0.207 4
LB花	0.162 9	0.334 6	1.734 6	0.027 7	0.049 7	0.196 3
LB果	0.158 3	0.326 9	1.602 8	0.020 9	0.024 3	0.180 5
LB枯	0.132 9	0.274 1	1.496 3	0.010 2	0.012 5	0.106 7

一年生和两年生陵川北柴胡移栽试管植株根中的柴胡总皂苷、皂苷 a 和 d 的量均大于质量标准^[5], 其中一年生移栽试管植株中柴胡总皂苷、皂苷 a 和 d 的量分别达到 1.967 3%、0.201 5% 和 0.364 7%, 均高于两年生移栽试管植株。在两年生移栽试管植株中, 营养生长期中柴胡总皂苷、皂苷 a 和 d 的量最高, 分别为 1.893 0%、0.189 1% 和 0.362 4%; 在花期、果期较低; 枯萎期处于最低水平, 分别为 1.496 3%、0.132 9% 和 0.274 1%。这一规律与沈志滨等^[6]在北柴胡种子植株中所得到的结果基本一致。柴胡皂苷主要分布在北柴胡根部的维管形成层和次生韧皮部中^[7], 虽然一年生植株根的半径小于两年生的, 但其韧皮部与木质部面积之比大于后者^[6], 因此, 一年生移栽植株的皂苷的量高于两年生的植株。移栽试管植株生长旺盛, 花序数和果序数多^[3], 在花期和果期以生殖生长为中心, 影响到柴胡皂苷的合成与积累。枯萎期植株为越冬做准备而使高分子物质分解转化, 使皂苷的量降低^[8]。由表 2 可以看出, 在陵川北柴胡试管植株的各生长期中, 茎叶中的柴胡皂苷的动态变化规律与根中的基本一

致, 但远远低于根中的量。

3.3 陵川北柴胡移栽试管植株根的适宜采收期: 一年生陵川北柴胡移栽试管植株根产量低, 两年生移栽植株在营养生长期和花期根的产量持续增加。综合考量根产量和种子产量等经济效益影响因素, 营养生长期和花期均不宜作为根的主要采收期。果期的柴胡皂苷的量较营养期和花期低, 但高于枯萎期, 因此可以考虑在果期采收根。北柴胡属于有限花序、无限分枝型植株^[9], 各级花序的种子成熟不同步, 种子主要来自顶花花序、一级花序和二级花序, 根长、根质量在花、果期仍然在增长和增加。因此, 选择二级花序种子的成熟时期作为根的采收期比较适宜。

3.4 陵川、万荣及左权北柴胡试管植株中柴胡皂苷量的比较: 如表 3 所示, 原产于三地的两年生的北柴胡移栽试管植株根中的柴胡总皂苷、皂苷 a 和 d 的量均高于茎叶。根中柴胡总皂苷和皂苷 d 的量以左权北柴胡最高, 分别达到 2.102 1% 和 0.487 1%, 其次为万荣北柴胡, 陵川北柴胡的量最低; 皂苷 a 的量为万荣北柴胡> 左权北柴胡> 陵川北柴胡, 但万荣北柴胡与左权北柴胡中的量相差不大, 分别为 0.188 3% 和 0.187 4%。茎叶中柴胡总皂苷和皂苷 a 的量为左权北柴胡> 陵川北柴胡> 万荣北柴胡, 皂苷 d 的量为陵川北柴胡> 左权北柴胡> 万荣北柴胡。北柴胡中的主要活性成分为总皂苷类, 皂苷 a 和 d 仅仅是其活性较高的成分, 评价药材质量以总皂苷为主, 兼顾皂苷 a 和 d 的量^[10]。左权北柴胡移栽试管植株根、茎叶中皂苷的量最高。北柴胡移栽试管植株不同类型间存在柴胡皂苷量的差异, 说明种源是影响移栽试管植株皂苷量多少的主要因素。因此, 在应用离体快速繁殖技术进行种质纯化和品种选育时, 应当选择综合性状优良、有效成分量高的类型作为起始材料。

表 3 花期移栽试管植株与种子植株的柴胡皂苷 a 和 d 的量

Table 3 Determination of saikosaponins a and d in roots and aerial part of test-tube plants and seeding plants at bud forming phase

样品	根			茎 叶		
	柴胡皂 苷 a/ %	柴胡皂 苷 d/ %	柴胡总 皂苷/ %	柴胡皂 苷 a/ %	柴胡皂 苷 d/ %	柴胡总 皂苷/ %
LB花	0.162 9	0.334 6	1.734 6	0.027 7	0.049 7	0.196 3
WB移	0.188 3	0.368 7	1.685 2	0.025 6	0.031 5	0.176 0
ZB移	0.187 4	0.487 1	2.102 1	0.029 0	0.041 3	0.197 4
LB太	0.133 4	0.254 3	1.497 5	0.013 6	0.011 9	0.132 1
WB太	0.117 8	0.271 2	1.629 0	0.013 8	0.028 0	0.109 4
LB缙	0.128 4	0.285 9	1.520 6	0.009 4	0.017 9	0.184 0
WB缙	0.148 9	0.358 1	1.681 3	0.021 3	0.030 1	0.163 9
ZB左	0.186 7	0.482 3	2.046 8	0.028 1	0.032 4	0.188 9

3.5 两年生移栽试管植株与种子植株皂苷量的比较: 由表 3 可以看出, 两年生北柴胡移栽试管植株的根、茎叶中柴胡总皂苷及皂苷 a 和 d 的量均高于其同类型的种子植株中的量, 说明在北柴胡移栽试管植株中皂苷的量较种子植株具有优势。移栽试管植株的根为诱导产生的不定根(图 2-A), 与种子植株具分枝的直根(图 2-B)相比, 多条直径基本相等的根有效地提高了根中韧皮部与木质部面积的比值, 从而提高了柴胡皂苷的量, 提高了单株根的产量和质量。

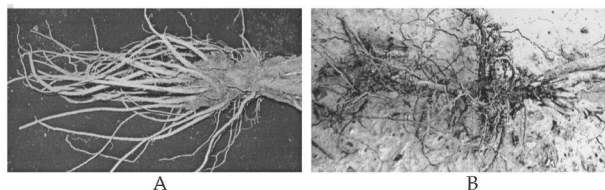


图 2 两年生陵川北柴胡移栽试管植株(A)和种子植株(B)的根

Fig. 2 Root of biennial test tube plants (A) and seedling plants (B) of Lingchuan *B. chinense*

4 结论

北柴胡移栽试管植株根的产量高, 根中各种皂苷的量均高于质量标准, 亦高于同类型种子植株中的量; 茎叶中的皂苷的量与种子植株相当。此外, 试管苗的年繁殖系数高、生长周期短^[1,2], 移栽至田间后表现出优良的植物学性状^[3]。因此, 离体快速繁殖方法是选育优良北柴胡种质、提高药材产量和品质的有效途径。

北柴胡移栽试管植株柴胡皂苷的动态变化规律为试管苗期的量最低, 一年生植株的量高于两年生的, 营养生长期、花期、果期、枯萎期的量依次降低。综合根和种子产量等因素, 确定果期二级花序种子成熟时期为根的适宜采收期。

北柴胡移栽试管植株具有良好的遗传稳定性。选择综合性状优良、有效成分量高的种质作为起始材料, 能够从源头上保证后代具有优良的性状和药材品质。

在北柴胡移栽试管植株的茎、叶中也含有柴胡皂苷, 其量与种子植株相当, 故亦可全草入药。

参考文献:

- [1] 郝建平, 徐笑飞, 杨东方, 等. 北柴胡快速繁殖及种子萌发条件研究[J]. 中草药, 2008, 39(5): 752-756
- [2] 郝建平, 徐笑飞. 柴胡组织培养快速育苗方法[P]. 中国: ZL 200710139679.2, 2009-12-09.
- [3] 李 博, 郝贵茹, 郝建平, 等. 北柴胡移植试管植株与种子植株植物学性状分析[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1634-1637.
- [4] 郝建平, 徐丽霞, 杨东方. 北柴胡愈伤组织诱导分化及不定芽增殖条件研究[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1234-1238
- [5] 李媛媛, 秦雪梅, 王玉庆, 等. 柱前衍生化法评价不同品种和产地柴胡药材和饮片质量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 237-240
- [6] 沈志滨, 刘建军, 刘鸣远. 柴胡根中有效成分积累动态规律分析[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2001, 17(1): 16-18
- [7] 谭玲玲, 胡正海, 蔡 霞, 等. 北柴胡营养器官中主要化学成分的组织化学定位及其含量比较[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(4): 214-222
- [8] 谭玲玲. 药用柴胡的结构发育与主要药用成分积累的研究[D]. 西安: 西北大学, 2008
- [9] 于 英, 王秀全, 包玉晓, 等. 北柴胡生长发育规律的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(5): 523-527
- [10] 孟祥才, 孙 晖, 杨 舸, 等. 打顶对北柴胡产量和质量的影响[J]. 中药材, 2008, 31(3): 336-337

马比木的显微荧光组织学定位及其中喜树碱的变化研究

吕江明¹, 刘世彪^{2*}, 蔡其辉², 田向荣^{2*}

(1. 吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000; 2. 吉首大学 植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 目的 对马比木 *Nothaptyes pittosporoides* 中的喜树碱进行组织学定位, 并测定不同产地、不同生长季节和不同部位的马比木中喜树碱的量。方法 采用荧光显微技术进行喜树碱的定位, 高效液相色谱法进行测定。Hypersil ODS₂ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水(6:4)为流动相梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 20 ℃, 检测波长 254 nm。结果 马比木中喜树碱主要积累于根部和茎部的韧皮部的分泌细胞内; 喜树碱的量具有季节性变化规律, 夏季低, 春秋高; 细根中喜树碱的量最高, 主根次之, 主茎、幼茎及叶的量依次递减。结论 马比木喜树碱主要贮藏于根部树皮内, 不同产地、不同季节、不同部位的马比木植物中的喜树碱量差异较大。

关键词: 马比木; 喜树碱; 组织定位

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1530-05

* 收稿日期: 2009-11-21

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(09JJ3051); 湖南省生态学重点建设学科开放基金项目(JSS2009Z03)

作者简介: 吕江明(1955—), 男, 湖南凤凰人, 高级实验师, 主要从事药物学研究。Tel: (0743) 8759168 E-mail: ljm5928@163.com

* 通讯作者 刘世彪 Tel: (0743) 8564416 E-mail: liushibiao_1@163.com