

### 3 讨论

3.1 在零阶导数光谱图中,金花茶花与茎的乙醇液分别在227nm和257nm有最大吸收且吸收峰较明显,可作为鉴别的依据;而花与茎的氯仿液无明显的吸收峰。

3.2 在一阶、二阶导数光谱图中,金花茶花的乙醇液在200~320nm,氯仿液在200~300nm,茎的乙醇液在200~400nm均有鉴别特征;茎的氯仿液的一阶图谱在200~500nm,600~700nm,二阶图谱在200~300nm均有鉴别特征,整个光谱曲线均有鉴别意义。

3.3 金花茶是中国一级保护的珍稀物种,不仅具有较高的观赏价值,而且具有一定的营养价值和药用价值。本实验研究可为金花茶花与茎药材的鉴定提供参考依据。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社, 1998:49.
- [2] 梁盛业. 金花茶[M]. 北京:中国林业出版社, 1993: 123.

(编辑 陈明伟)

## 牛大力茎段组织培养污染率控制方法的初步研究

时群<sup>1</sup>, 韦大器<sup>1</sup>, 陈丽文<sup>1</sup>, 朱开昕<sup>2</sup>

(1. 钦州市林业科学研究所, 广西 钦州 535000; 2. 钦州市中医院, 广西 钦州 535000)

**摘要:** [目的]进行牛大力茎段组织培养污染率控制方法研究。[方法]采用对比法,优化出最佳方案。[结果]在牛大力茎段组织培养中,外植体表面消毒采用0.1%的升汞溶液(加入1滴吐温-80)灭菌5min后,用50mg/L的头孢唑林钠浸泡10s,用无菌水冲洗5~6次,接种到添加10mg/L头孢唑林钠的MS培养基中培养,污染率能控制在20%;外植体采集季节宜在3月、10月,采摘时间在晴天14:30较好,此时污染率相对最低。[结论]该方法具有可行性,采用该法获得了无菌材料,并从牛大力茎段中诱导出新芽。

**关键词:** 牛大力; 组织培养; 污染率

**中图分类号:** R282.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7486(2007)03-0063-03

牛大力,属蝶形花科鸡血藤属,别名甜牛大力、扒山虎、大力薯、山莲藕,始载于《生草药性备要》,是《广西中药材标准》(1990年版)收录的地方药材,具有补虚润肺,强筋活络的功效,主治肺热,肺虚咳嗽,肺结核,风湿性关节炎,腰肌劳损、慢性支气管炎、慢性肝炎、白带等<sup>[1,2]</sup>。目前在市场上需求量大,是多种中成药的主要原料。近年来,由于两广民间大量使用牛大力做药膳,牛大力野生资源已面临日益枯竭的境地。采用组织培养技术快速繁殖牛大力,有助于解决这一问题。以成熟种子为材料进行组织培养快速繁殖牛大力已有报道<sup>[3]</sup>。由于种子比较难得,而目前选用茎段为外植体进行组织培养研究进展缓慢,除了茎段诱导易褐化外,培养过程中大量污染是导致研究进展缓慢的另一个重要原因。为此,笔者对牛大力茎段组织培养污染率控制的方法进行了初步研究,旨在为牛大力茎段组织培养体系的建立奠定基础。

### 1 材料与方法

1.1 材料 牛大力植株采自钦州市华年堂生物科技有限公司的地道南药规范化生产基地;头孢唑林钠(Cefazolin Sodium, Cef)购自桂林南药股份有限公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 前处理 选取生长健壮、无病虫害的植株,剪取幼嫩枝条做外植体。将采集的外植体剪除叶片,放入容器中,加适量自来水及数滴洗洁精,轻轻摇动,然后在自来水下冲洗2h,放置于超净工作台上。

1.2.2 初代培养茎段表面消毒方式的选择 在超净工作台上,将清洗干净的枝条剪成6~10cm的茎段,共设5个消毒方式进行处理:①用70%的酒精浸泡30s,再用0.1%的升汞溶液灭菌7min;②用70%的酒精浸泡30s,再用0.1%的升汞溶液(加入1滴吐温-80)灭菌7min;③直接用0.1%的升汞溶液(加入1滴吐温-80)灭菌7min;④直接用0.1%的升汞溶液(加入1滴吐温-80)灭菌12min;⑤用0.1%的升汞溶液(加入1滴吐温-80)灭菌5min后,用50mg/L的头孢唑林钠(cef)浸泡10s。消毒后用无菌水冲洗5~6次,在无菌条件下切成1~1.5cm长的带芽茎段或茎尖,接种到MS培养基中,接种后第二天开始记录污染和褐化情况,统计30天。其中经消毒方式⑤处理的茎段污染率和褐化率最为满意。

为进一步研究初代培养基加入抗生素对牛大力茎段组织培养污染率的影响,将经表面消毒方式⑤消毒后的茎段,

收稿日期:2007-04-23

广西医疗卫生重点科研课题(合同编号:重200522)

作者简介:时群(1970-),女,主管中药师,主要从事药用植物组织培养研究与开发

切成1~1.5cm长的带芽茎段或茎尖,接种到附加不同浓度抗生素的MS培养基中,再设3个处理方式:⑥MS+10mg/L Cef;⑦MS+20mg/L Cef;⑧MS对照组。

1.2.3 不同季节的外植体选择试验 分别于2006年3月、7月、10月取当年生不同季节带芽茎段,表面消毒方式采用③,初代培养基选用⑧,接种后第二天开始记录污染和褐化情况,统计30天。

1.2.4 不同时间取材对茎段培养污染率的影响 2007年3月取牛大力当年生的半木质化茎段,取材时间分别为A:阴雨天;B:晴天8:00~9:00;C:晴天14:30。表面消毒方式采用③,初代培养基选用⑧,接种后第二天开始记录污染和褐化情况,统计30天。

## 2 结果与分析

2.1 茎段不同表面消毒方式的效果比较 结果见表1。从表1可以看出,处理⑤消毒效果最好,污染率最低,为45.0%,说明头孢唑林钠起到一定抑菌作用。常规表面消毒法①和②,污染率较高,分别达到90%、80%,褐化率达到95%。而加入吐温污染率略有降低,处理②的污染率比①降低10%。处理④的污染率比处理③降低20%,表明延长消毒时间,能降低污染率,但褐化率上升了15%。处理⑥污染率为20.0%,比对照组⑧下降25%;处理⑦加大抗生素浓度,虽然污染率与处理⑥相同,但褐化率升高了20%。实验结果表明:培养基中添加抗生素头孢唑林钠(10mg/L)能降低污染率。

表1 初代培养茎段表面不同消毒方式试验结果

处理方式	茎段数(个)	污染率(%)	褐化率(%)
1	20	90.0	95.0
2	20	80.0	95.0
3	20	80.0	40.0
4	20	60.0	55.0
5	20	45.0	40.0
6	20	20.0	40.0
7	20	20.0	60.0
8	20	45.0	40.0

注:表中数据为3次重复平均值,下同

2.2 不同季节取材对茎段培养污染率的影响 结果见表2。从表2可以看出,10月份取茎段培养污染率最低,为50.0%。7月份取茎段培养污染率最高,为90.0%。

2.3 不同时间取材对茎段培养污染率的影响 结果见表3。从表3可以看出,不同时间取材对污染率的影响很大。A处理污染率最高,达95.0%;C处理污染率最低,为40.0%。表明取材时间应选在晴天14:30为好。

表2 不同季节的外植体选择试验结果

月份	茎段数(个)	污染率(%)	褐化率(%)
3	20	60.0	35
7	20	90.0	40
10	20	50.0	40

表3 不同取材时间对茎段培养污染率的影响试验

处理	茎段数(个)	污染率(%)
A	20	95.0
B	20	60.0
C	20	40.0

2.4 茎段离体培养效果 按本文优选出来的条件对牛大力进行茎段组织培养,即取当年生10月份带芽茎段,采摘时间在晴天14:30为好,外植体表面消毒后采用0.1%的升汞溶液(加入1滴吐温-80)灭菌5min后,用50mg/L的头孢唑林钠浸泡10s,用无菌水冲洗5~6次,接种到添加10mg/L头孢唑林钠的MS培养基中培养,污染率能控制在20%。效果满意,见图1。

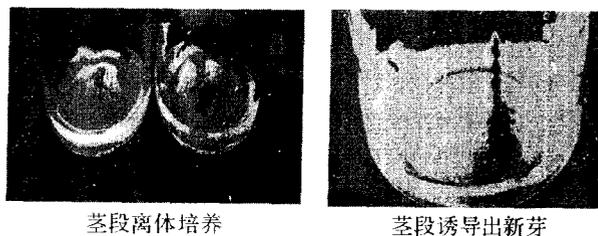


图1 茎段离体培养效果

## 3 讨论

牛大力幼枝表面被有绒毛,获得无菌材料是组织培养成功的前提。加入表面活性剂吐温-80有助于降低污染率。用70%的酒精对外植体进行表面消毒,褐化率达95%,所以建议不用。在固体培养基中添加抗生素,可降低污染率,抗生素浓度视外植体老、嫩程度,头孢唑林钠浓度在10~20mg/L范围内较好。

由于造成污染的具体原因是多方面的,故应具体问题具体分析,本研究采用上述方法控制牛大力茎段组织培养污染率,已成功获得无菌材料并诱导出新芽,可供组培工作者参考。

## 参考文献

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:31~32.

- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 1986:200.
- [3] 王祝年,李志英,徐立,等. 牛大力的组织培养和快速

繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(6):800.

(编辑 陈明伟)

## 用核磁共振二维谱确定芫花素-6-C- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基(2 $\rightarrow$ 1)-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷的双糖结构

韦松, 陈艳, 思秀玲, 许学健

(广西中医学院, 广西南宁 530001)

**摘要:** [目的] 确定一种黄酮双糖苷中双糖的结构。 [方法] 用 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY-45、HSQC 和 HMBC 谱确定双糖的联接位置。 [结果] 鼠李糖联在葡萄糖的 2 位上(1 $\rightarrow$ 2)。 [结论] 采用核磁共振二维谱能明确该双糖的 $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  核的化学位移归属。

**关键词:** 芫花素-6-C- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基(2 $\rightarrow$ 1)-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷; 核磁共振二维谱

**中图分类号:** R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7486(2007)03-0065-02

兔尾草 [*Uraria lagopodioides* (Linn.) Desv. ex DC.] 系豆科植物, 广西民间常用其治疗小儿疳积、淋巴结核、毒蛇咬伤等<sup>[1]</sup>。笔者在研究其生理活性成分时, 分离得一种黄酮双糖苷, 经理化性质和波谱数据分析, 鉴定为芫花素-6-C- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基(2 $\rightarrow$ 1)-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷, 与文献[2]所报道的数据一致, 即当药黄酮-2''-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷。该化合物葡萄糖与苷元以碳苷形式联接, 鼠李糖与葡萄糖又以氧苷形式联接。本实验采用核磁共振二维谱( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY-45、HSQC、HMBC 谱), 确定了其双糖结构, 归属了 $^1\text{H}$ 和 $^{13}\text{C}$ 信号的化学位移。该化合物双糖的核磁共振研究数据尚未见有文献报道。

### 1 实验材料与仪器

**1.1 材料** 兔尾草采自广西天等县, 经刘寿养副教授鉴定为 *Uraria lagopodioides* (Linn.) Desv. ex DC 的全草。

**1.2 仪器** 采用 AV400 超导核磁共振仪, 工作频率:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY-45 谱 400.15MHz; HSQC、HMBC 谱  $^1\text{H}$  400.16MHz,  $^{13}\text{C}$  100.62MHz; 溶剂  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 室温下测定; 弛豫时间 1sec。

### 2 方法与结果

**2.1 方法** 取干燥全草粉碎(7kg), 以 95% 乙醇渗漉, 回收乙醇得浸膏(237g), 将浸膏划分成石油醚溶(70g), 乙酸乙酯溶(14g), 正丁醇溶(39g)三部分。取正丁醇溶部分上硅胶柱, 以氯仿-甲醇洗脱, 得化合物 I (21mg)。

#### 2.2 结果

**2.2.1** 依据 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱可以归属糖上质子。但由于糖上多数质子的化学位移集中在 3~4ppm 之间, 并相互偶合, 对角峰和相关峰在谱上十分拥挤, 相互交盖, 影响辨认。本文的 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱在实验操作时, 已采用改良的脉冲序列,

即将第二个  $90^\circ \times'$  脉冲改为  $45^\circ \times'$  脉冲, 减小对角峰的延伸, 清晰度已大为改善, 但局部仍嫌拥挤。必要时可从 HSQC 谱  $^{13}\text{C}$  化学位移出发, 追踪 $^1\text{H}$ 核的归属, 作为补充, 以提高准确度, 其结果见表 1。

表 1 糖上 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 化学位移归属表

No.	$\delta\text{H}$	$\delta\text{c}$
glu 1''	4.85, m	74.02
2''	4.56, t, 9.0Hz	77.29
3''	3.38, t, 9.0Hz	73.72
4''	3.46, t, 9.0Hz	72.55
5''	3.32, m	82.13
6''	3.74, dd, 11.7、5.5Hz, 3.83, br	63.80
Rha 1'''	5.22, br	102.67
2'''	3.84, br	72.82
3'''	3.36, t, 9.0Hz	73.31
4'''	3.10, t, 9.0Hz	74.15
5'''	2.60, m	70.32
6'''	0.74, d, 6.2Hz	18.68

**2.2.2** HMBC 谱解析: 对照 HSQC 谱, 扣除 HMBC 谱中 $^1\text{J}_{\text{CH}}$ 相关峰, 剩下的将是异核远程偶合 $^2\text{J}_{\text{CH}}$ 、 $^3\text{J}_{\text{CH}}$ 的相关峰, 从图谱中可以观察到 H-2''与 C-1'''、H-1'''与 C-2''的偶合相关峰, 从而证明鼠李糖是联接在葡萄糖的 C-2''上(见图 1)。