

组织培养法生产石牌广藿香及其质量分析

莫小路*, 汪小根, 邱蔚芬, 袁亮, 陈瑜珍

(广东省中药研究所, 广东 广州 510520)

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物, 我国南方多省均有引种栽培, 其干燥地上部分为中药广藿香, 是广东省主要的道地药材之一, 具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑的功效^[1]。

广藿香因产地的自然环境、种植习惯等条件的不同, 其形态、气味、质量有所差异, 药材经营上一般将其分为石牌藿香、高要藿香和海南藿香3种, 其中产于广州市郊石牌地区的石牌藿香质量最佳^[1]。广藿香的药用成分主要为挥发油, 有研究认为广藿香可按其挥发油的组分分为酮型和醇型2个化学型, 前者以石牌广藿香为代表, 后者以海南广藿香为代表^[2]。有关研究也证实了石牌藿香和海南藿香在外观形态及内部化学成分上都有较明显的差异^[3,4]。

广藿香在广东地区极少见开花, 主要通过扦插繁殖。原产于石牌的广藿香, 由于城市的发展、耕地的减少以及植物病害影响, 已濒临灭绝, 现仅在东圃黄村及罗岗有少量种植供科研之用。为保护广藿香的种质资源, 作者对石牌广藿香进行了组织培养并获得了成功, 本实验对组织培养法获得的再生植株中挥发油含量及成分进行分析, 并与扦插繁殖的石牌广藿香进行比较。

1 材料

1.1 组培石牌广藿香

实验用石牌广藿香采自本所药用植物标本园, 经本所南药研究室蔡岳文主任中药师鉴定为广藿香 *P. cablin*. (Blanco) Benth.。取幼嫩叶片, 用70%乙醇进行表面消毒30 s, 无菌水清洗3次, 然后用0.1% HgCl₂消毒13 min, 无菌水洗涤5次, 用滤纸吸干叶片表面水分, 在无激素的MS培养基上预培养7 d后, 将无菌叶片外植体切成1 cm²左右的小

块, 置于愈伤组织诱导培养基上, (28 ± 1) °C, 黑暗培养。愈伤组织诱导培养基: MS基本培养基附加0.05 mg · L⁻¹的2,4-D和0.5 mg · L⁻¹的KT, 参照文献方法^[5]。愈伤组织20 d左右继代培养1次, 继代1~2次后的愈伤组织转移至含1 mg · L⁻¹ BA的MS培养基上, 诱导成苗, 无菌苗经20 d左右的蛭石育苗床练苗后, 移栽至地里, 生长3个月后, 苗高达到40~50 cm, 收获, 自然晾干备用, 记为“组培石牌广藿香”。

1.2 扦插石牌广藿香

取生长约7个月的石牌广藿香植株上部10~15 cm高的一段(含顶芽), 扦插于蛭石育苗床1个月, 生根后, 移栽至地里, 生长3个月后, 苗高50~60 cm, 收获, 自然晾干备用, 记为“扦插石牌广藿香A”。生长10个月的苗高70~80 cm, 收获晾干, 记为“扦插石牌广藿香B”。

1.3 前处理方法

上述实验材料全草经自然干燥48 h, 切成1~2 cm长短的小段, 备用。

2 仪器与方法

2.1 仪器与试剂

TRACE GC气相色谱仪, Xcalibur色谱工作站(美国Finnigan公司); 1/10万电子天平(德国Sartorius公司)。内标物: 正十八烷(SIGMA公司); 广藿香醇对照品(中国药品生物制品检定所, 批号772-200003), 广藿香酮(自制, 经高效液相色谱法检验, 纯度达99.58%)。

2.2 色谱条件

DB-1毛细管柱(0.25 m × 30 mm, 0.25 μm), FID检测器, 进样口温度和检测器温度均为230 °C, 程序升温: 初始温度100 °C, 停留1 min后以10 °C · min⁻¹的速度升至180 °C; 载气为高纯氮气, 流速1 mL · min⁻¹, 分流进样, 分流比50:1, 进样量1 μL。

2.3 挥发油测定方法

按《中国药典》2005年版一部附录XD操作。

[收稿日期] 2006-12-18

[通讯作者] *莫小路, Tel: (020) 22846390, E-mail: moxl@gdzy.edu.cn

2.4 对照品溶液的制备

取正十八烷适量,精密称定,加无水乙醇制成 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为内标溶液。另精密称取广藿香醇和广藿香酮对照品适量,分别加无水乙醇制成 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品的溶液,分别精密吸取对照品溶液 0.5 mL ,内标溶液 0.4 mL 置 2 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀。分别吸取以上溶液各 $1 \mu\text{L}$,注入气相色谱仪,连续进样 3 次,以平均峰面积计算广藿香醇和广藿香酮的校正因子。广藿香醇和广藿香酮的校正因子测定结果分别为 1.146 和 1.916。

2.5 供试品溶液的制备^[6]

2.5.1 测定广藿香醇供试品的制备 分别精密吸取组培石牌广藿香、扦插石牌广藿香 A 和 B 3 种挥发油 50, 10, 10 μL , 内标溶液 0.4 mL 置 2 mL 量瓶

中,无水乙醇定容,摇匀。精密吸取以上 3 种供试品各 $1 \mu\text{L}$,注入气相色谱仪,测定广藿香醇的含量。

2.5.2 测定广藿香酮供试品的制备 分别精密吸取组培石牌广藿香、扦插石牌广藿香 A 和 B 3 种挥发油 2, 10, 10 μL , 内标溶液 0.4 mL 置 2 mL 量瓶中,无水乙醇定容,摇匀。精密吸取以上 3 种供试品各 $1 \mu\text{L}$,注入气相色谱仪,测定广藿香酮的含量。

3 结果

3.1 组培石牌广藿香形态特点

组织培养获得的石牌广藿香在试管苗阶段,其形态与海南广藿香试管苗相似,而移栽至地里 2 个月,植株的外形就呈现了石牌广藿香的特点:株型较散生,茎的下部叶片脱落,叶片集中在枝端;茎木质化,叶色老化,叶面皱缩、叶脉深陷,叶肉向上凸(图 1)。

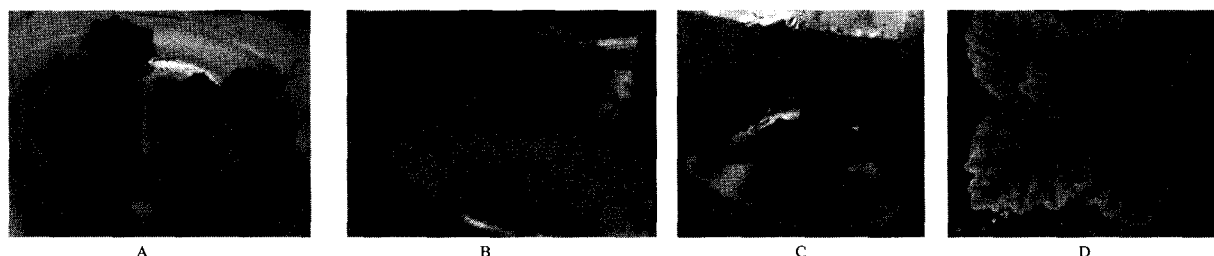


图 1 组培石牌广藿香形态特点

A. 愈伤组织; B. 芽的分化 C. 试管苗; D. 移栽 2 个月后

3.2 组培石牌广藿香与扦插石牌广藿香的挥发油含量比较

比较组培与扦插的石牌广藿香,其挥发油的含量差异较大,组培石牌广藿香中的挥发油质量分数为 1.4%,是相同生长时间的扦插石牌广藿香 A(挥发油质量分数为 0.3%)的 4.6 倍,是生长 10 个月的扦插石牌广藿香 B(挥发油质量分数为 0.84%)的 1.7 倍。

3.3 组培石牌广藿香与扦插苗中的挥发油成份的比较

对组培和扦插的石牌广藿香挥发油成份分析的结果显示,3 个样品挥发油中的广藿香酮的含量均高于广藿香醇的含量,其中,生长 10 个月的扦插石牌广藿香中的广藿香酮含量最高,是广藿香醇的 8.8 倍;组培石牌广藿香的广藿香酮含量最低,但含有很高的广藿香醇(表 1)。

计算各样品每克干重生药中的广藿香酮含量(每克干重生药中的挥发油含量 $\times$ 挥发油中广藿香

表 1 组培与扦插的石牌广藿香挥发油成分比较

样品	$(\bar{x} \pm s, n=3)$ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	广藿香	广藿香醇
组培	231.93 ± 0.03	375.76 ± 0.12
扦插	204.87 ± 0.87	410.30 ± 2.05
扦插	68.31 ± 1.36	604.09 ± 1.48

酮的含量),结果表明,组培的广藿香每克干重生药中所含的广藿香酮为 5.26 mg,高于相同生长时间的扦插石牌广藿香 A(1.23 mg)和生长 10 个月的扦插石牌广藿香 B(5.07 mg)。

4 讨论

罗集鹏等对广藿香的精油组分进行分析研究的结果,产于广州市郊石牌地区的广藿香挥发油中含有较高的广藿香酮,而广藿香醇的含量很低^[2];本单位标本园中种植的原产于石牌的广藿香的挥发油测定结果也表现出了这个规律。本研究通过组织培养技术获得的该广藿香的再生植株在外部形态上与原植物保持了一致的特性,但挥发油的含量大大超

过同样生长时间的扦插石牌广藿香, 并比生长了10个月的扦插广藿香还高0.7倍, 因此, 尽管组培的广藿香挥发油中的广藿香酮含量没有扦插繁殖的高, 但按每克干重生药计算, 还是组培的石牌广藿香中所含的广藿香酮和醇最高。植物组织培养技术应广泛应用到药用植物的生产中, 有人认为组织培养获得的再生植株中, 次生代谢物的含量可能会减少, 而本研究的结果显示, 组织培养技术所提供的石牌广藿香不仅保留了原植物的形态特点, 还提高了其中的次生代谢物含量, 组培石牌广藿香中每克干重生药中的广藿香酮和广藿香醇的含量约为扦插繁殖的4倍, 从栽培生产上来说, 组培苗比传统的扦插苗具

有更高的经济效益。

[参考文献]

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2000:33.
- [2] 罗集鹏, 刘玉萍, 冯毅凡, 等. 广藿香的两个化学型及产地与采收期对其挥发油成分的影响[J]. 药学报, 2003, 38(4):307.
- [3] 李薇, 潘超美, 徐良, 等. 不同产地广藿香特征的观察和比较[J]. 中药材, 2002, 25(7):463.
- [4] 罗集鹏, 曾梅华. 广藿香的形态组织学鉴别研究[J]. 中药材, 2002, 25(3):166.
- [5] 张家明, 郑学勤, 孙雪飘. 广藿香体细胞培养植株再生的研究[J]. 热带作物学报, 1994, 15(1):73.
- [6] 汪小根, 邹玉繁, 王玉生. GC-MS联用技术测定广藿香油中广藿香酮的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(5):582.

[责任编辑 张宁宁]

灵芝提取物对 H22 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的实验研究

赵宏艳¹, 张皖东², 吕诚³, 谭勇³, 鞠大宏¹, 陈士林⁴, 杨大坚⁴,
陈新滋⁴, 吕爱平^{3,4*}

(1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 安徽中医学院 第一附属医院, 安徽 合肥 230031;

3. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700;

4. 深圳市中药药学及分子药理学研究重点实验室, 广东 深圳 518057)

近年来, 从真菌及其代谢产物中提取了多种有效成分, 其抗肿瘤活性已得到国际公认。灵芝是我国传统的补益中药, 具有扶正固本、延年益寿之功效。大量临床及实验研究表明, 灵芝及其提取物具有抗肿瘤、抗血栓及免疫调节等作用^[1-4]。本实验以H22 荷瘤小鼠作为研究对象, 主要从免疫系统的角度, 初步探讨灵芝提取物(GLE)的抗肿瘤机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 昆明远交系清洁级小鼠, 雄性, 体重为18~22 g, 由中国中医科学院实验动物研究中心提供。H22 肝癌细胞株由本院中药研究所王金华赠送。

1.2 药物 灵芝粗提取物(GLCE, 绿谷制药有限公司,

配成102 mg·mL⁻¹的混悬液。此药物浓度是按人日用临床剂量, 经人-小鼠体表面积比值折算成相当于成人临床剂量的2倍), 灵芝细提取物(GLRE, 上海中药现代化研究中心), 环磷酰胺(CTX, 上海华联制药有限公司)。

1.3 试剂及仪器 CD3, CD4, CD8 抗体(eBioscience公司), 1640 培养液(GIBCO公司), 胎牛血清(Hyclone公司), 四甲基偶氮唑盐(MTT, Amresco公司); 酶标仪(芬兰 Labsystems公司), EPICS XL 流式细胞仪(Beckman Coulter公司)。

2 方法

2.1 GLRE 对 H22 细胞体外增殖的影响 调整H22 细胞2×10⁶个/mL, 以0.2 mL接种于小鼠腹腔接种传代。6~8 d后无菌抽取小鼠腹水, PBS洗涤后转入培养瓶培养, 每2 d更换新培养基, 取第2代细胞用于实验。调整为3×10⁴个/mL, 以100 μL/孔接种于96孔培养板, 加入100 μL不同质量浓度的

[收稿日期] 2007-09-27

[通讯作者] * 吕爱平, Tel: (010)64067611, E-mail: lap64067611@

126.com

• 842 •