

不同产地牛蒡种子发芽实验及萌发初期牛蒡苷与苷元的积累动态研究

许亮, 窦德强, 康廷国*, 康凯, 刘杨楠

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要:目的 研究49个不同产地的牛蒡种质资源的干粒质量、发芽势、发芽率及萌发初期的牛蒡苷与苷元的积累动态。方法 在培养箱中进行种子发芽实验。HPLC法测定萌发种芽中牛蒡苷与苷元的量, 色谱柱为Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(线性梯度洗脱: 0 min, 水 55%; 10 min, 水 46%; 20 min, 水 30%); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm。结果 成熟饱满的牛蒡种子干粒质量、发芽势、发芽率高, 萌发初期的牛蒡苷的量下降, 牛蒡苷元的量升高。结论 本实验建立的方法为牛蒡子药材的质量评价提供参考。

关键词:牛蒡; 牛蒡苷; 牛蒡苷元; HPLC; 发芽率

牛蒡 *Arctium lappa* L. 为菊科药用植物, 其干燥成熟果实为中药牛蒡子, 是一味临床常用中药, 具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功效, 用于治疗风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛等^[1]。牛蒡的根、茎、叶也具有药用价值, 其根被视为强身保健蔬菜, 深受消费者喜爱, 出口到日本、韩国。牛蒡药食两用, 牛蒡子和牛蒡根是卫生部公布的《关于进一步规范保健食品原料管理的通知》中可用于保健食品的物品, 具有广阔的开发应用前景。牛蒡果实为瘦果, 也称其为种子。本实验对不同采集地的牛蒡种质资源的发芽特性及萌发初期的牛蒡苷与苷元的积累动态进行研究。

1 发芽实验

1.1 材料: 不同产地牛蒡的种子均为自采, 经康廷国教授和王冰教授鉴定, 保存于辽宁中医药大学药学院药用植物教研室, 见表1。

1.2 方法

1.2.1 干粒质量: 干粒质量是评价种子质量的一个重要指标, 随机选取1000粒种子称质量, 每个产地重复两次, 求平均质量, 见表1。

1.2.2 发芽势与发芽率: 选取不同产地的种子放在经水浸湿的铺有双层滤纸的培养皿中, 用纱布覆盖, 置于培养箱中在25℃下培养, 每天用已经准备好的清水早晚换水。每次培养种子100粒, 重复2次, 计算平均发芽势与发芽率, 结果见表1。

发芽势 = (规定天数内发芽种子的粒数 / 供试种子数) × 100%

发芽率 = (发芽的种子数 / 供试种子数) × 100%

2 牛蒡种子萌发初期牛蒡苷与苷元的量的变化

2.1 仪器与试剂: Agilent 1100 高效液相色谱仪; 四元泵; 在线脱气机; 柱温箱; 牛蒡苷对照品(批号110819-200505)购于中国生物制品鉴定所、牛蒡苷元对照品为实验室自制, 经过结构鉴定, 纯度符合要求, 供试品来源于辽宁沈阳。

2.2 色谱条件: 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(线性梯度洗脱: 0 min, 水 55%; 10 min, 水 46%; 20 min, 水 30%); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 25℃。理论塔板数不低于3000。

2.3 对照品溶液的制备与纯度检查: 精密称定干燥至恒重的牛蒡苷和苷元对照品, 加甲醇溶解并定容至刻度, 分别配成1.149 mg/mL的牛蒡苷对照品溶液和0.519 mg/mL的牛蒡苷元对照品溶液。经峰面积归一化法测定牛蒡苷的质量分数为99.68%和牛蒡苷元为99.01%, 色谱图见图1。

2.4 供试品溶液的制备: 将供试品干燥并粉碎, 过60目筛, 取粉末0.5g, 精密称定, 置50mL量瓶中, 加甲醇45mL, 在超声波发生器内提取20min(150W, 20kHz), 取出放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀。经微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得。色谱图见图1。

2.5 线性关系的考察

2.5.1 牛蒡苷线性范围考察: 精密称定干燥至恒重的牛蒡苷加甲醇溶解并定容, 配成1.149 mg/mL的牛蒡苷对照品溶液。精密吸取4、6、8、10、12、14 μL分别注入液相色谱仪, 测定牛蒡苷的色谱峰面积, 以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 得牛蒡苷回归

* 收稿日期: 2009-01-06

基金项目: 科技部资助项目(2005DKA21004); 国家十一五攻关课题(2006BAI009B02-6)

作者简介: 许亮(1978—), 男, 辽宁沈阳人, 讲师, 博士研究生在读, 主要从事中药生药的学与科研工作, 研究方向为中药资源研究与新药开发。Tel: (0411) 87586004 E-mail: xul@nutcm.edu.cn

* 通讯作者 康廷国 Tel: (0411) 87586028 E-mail: kangtg@linutcm.edu.cn

方程为 $Y = 540.83 X - 937.02$, $r = 0.9999$, 表明牛蒡苷在 $4.596 \sim 16.086 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.5.2 牛蒡苷元线性范围考察:精密称定干燥至恒重的牛蒡苷元加甲醇溶解并定容,配成 0.0519 mg/mL 的牛蒡苷元对照品溶液。精密吸取 2、4、6、

8、10、12 μL 分别注入液相色谱仪,测定牛蒡苷元的色谱峰面积,以进样量为横坐标,以峰面积为纵坐标,得回归方程为 $Y = 38.257 X - 24.926$, $r = 0.9998$ 。牛蒡苷元在 $0.1038 \sim 0.6228 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

表 1 不同产地牛蒡干粒质量、发芽势与发芽率

Table 1 Weight of a thousand seeds, germination tendency, and germination percentage of burdock from different origins

	采集地点	千粒质量 /g	发芽势			发芽率 /%	
			第 6 天 /%	第 10 天 /%	第 10 天 /%		
黑龙江	佳木斯	9.59	43.33	71.33	77.33	77.33	
	伊春	10.66	76.67	89.67	91.00	91.00	
	富锦	8.53	63.33	82.33	84.00	84.00	
	阿城	8.97	54.33	77.00	78.67	78.67	
	五常县	10.19	26.00	80.00	84.67	84.67	
	尚志县	9.96	78.67	84.33	84.67	84.67	
	牡丹江	9.80	81.67	91.33	92.00	92.00	
吉林	四平	9.97	19.67	88.67	88.67	88.67	
	辽源	8.53	32.33	83.33	90.67	90.67	
	梅河口	10.99	92.67	93.67	94.33	94.33	
	通化	10.38	58.00	60.67	76.00	76.00	
	白山	8.03	69.33	89.67	89.67	89.67	
	抚松	8.47	52.67	85.33	89.00	89.00	
	靖宇	9.11	82.33	96.33	97.00	97.00	
	桦甸	10.03	79.00	94.33	95.00	95.00	
	胶河	9.92	68.33	85.67	86.67	86.67	
	敦化	7.55	85.00	94.67	94.67	94.67	
辽宁	延吉市	6.97	57.33	82.00	83.67	83.67	
	沈阳	9.79	67.67	89.33	90.67	90.67	
	本溪县	9.87	47.00	92.00	92.00	92.00	
	恒仁	9.06	67.67	82.33	82.33	82.33	
	宽甸	7.00	47.67	80.00	80.00	80.00	
	凤城	8.70	70.67	86.00	86.00	86.00	
	岫岩	10.51	30.33	82.00	84.33	84.33	
	铁岭	8.45	89.67	95.00	95.67	95.67	
	辽宁	清源	10.62	56.67	89.67	89.67	89.67
		北宁	8.88	81.67	82.33	83.33	83.33
大连		7.89	65.50	88.50	88.50	88.50	
新宾		10.90	57.33	79.00	88.00	88.00	
浙江		杭州淳安	7.77	71.00	76.00	76.67	76.67
		建德	9.83	66.00	69.33	72.67	72.67
江苏		徐州丰县	10.98	76.67	86.00	86.00	86.00
		临沂苍山	10.78	75.67	76.33	82.00	82.00
山东		临沂苍山	10.78	75.67	76.33	82.00	82.00
		宝鸡太白	9.34	59.67	74.00	75.00	75.00
陕西	安康宁陕	8.28	87.00	88.67	88.67	88.67	
	宝鸡眉县	8.11	62.00	74.00	74.00	74.00	
甘肃	定西渭源	9.74	87.67	98.67	99.00	99.00	
	天水麦积	5.94	10.33	27.67	30.33	30.33	
甘肃	陇南武都	9.22	88.25	93.00	93.25	93.25	
	定西岷县	11.70	70.33	88.33	88.33	88.33	
甘肃	宕昌县	8.23	75.00	88.67	89.00	89.00	
	承德	6.83	67.33	81.67	83.00	83.00	
河北	承德	6.83	67.33	81.67	83.00	83.00	
	禹州	8.76	11.67	29.00	29.00	29.00	
河南	禹州	8.76	11.67	29.00	29.00	29.00	
	滦州	7.30	68.67	84.33	84.33	84.33	
四川	雅安	6.40	41.00	70.67	75.67	75.67	
	松潘	12.80	67.33	94.33	94.67	94.67	
湖北	恩施	7.63	83.67	92.67	93.00	93.00	
	神农架	8.27	39.33	68.67	71.00	71.00	
湖北	巴东	7.08	72.00	73.33	76.33	76.33	

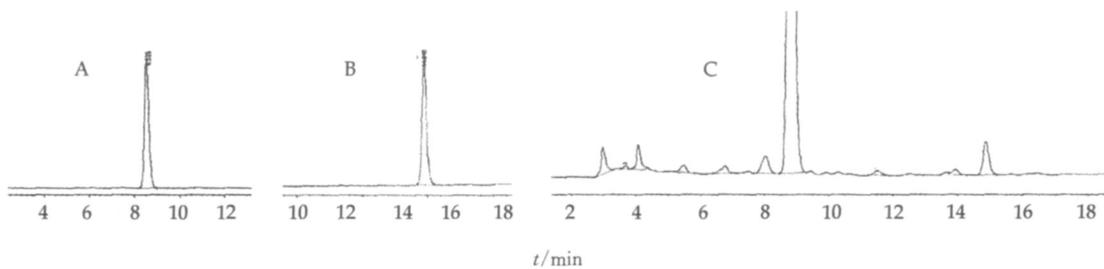


图 1 牛蒡苷(A)、牛蒡苷元(B)加样品(C) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatogram of arctin (A), arctigenin (B), and sample (C)

2.6 精密度试验:在上述色谱条件下对同一供试品溶液连续进样 6 次,记录牛蒡苷和牛蒡苷元的峰面积,牛蒡苷峰面积 $RSD = 2.17\% (n = 6)$;牛蒡苷元峰面积 $RSD = 1.82\% (n = 6)$,精密度良好。

2.7 稳定性试验:在室温条件下,精密吸取同一供试品溶液,按样品测定方法在 0、2、4、6、8 h 时间间隔内分别测定牛蒡苷和苷元的峰面积,牛蒡苷 $RSD = 1.72\% (n = 5)$,牛蒡苷元 $RSD = 1.70\% (n = 5)$ 。结

果表明,牛蒡苷和苷元在 8 h 内基本稳定,符合有关规定。

2.8 重现性试验:按样品测定方法对同一批样品制备 5 份供试液,测定其质量分数计算牛蒡苷 $RSD = 1.37\% (n = 5)$,牛蒡苷元 $RSD = 1.19\% (n = 5)$ 。结果表明,重现性试验符合有关规定。

2.9 加样回收率试验:精称 6 份已知牛蒡苷和苷元量的供试样品 0.25 g ,分别加入等量的牛蒡苷和牛

莨菪元对照品。按样品测定项下方法处理,计算回收率,结果牛蒡苷和苷元的平均回收率分别为 97.86% 和 98.33%,RSD 分别为 1.58% 和 1.74%。

2.10 样品的测定:按照供试品溶液的制备方法分别对生长第 4、6、8、10、12、20 天的牛蒡芽进行制备,分别取 10 μL 进样。测定牛蒡苷和苷元的色谱峰面积,计算不同生长天数牛蒡芽干品中牛蒡苷和牛蒡苷元的量 (n=2) 见表 2,图 2。

表 2 不同生长天数牛蒡芽的牛蒡苷和苷元的量
Table 2 Content of arctin and arctigenin in burdock bud at different growth days

生长天数 / d	牛蒡苷 / %	RSD / % (n=2)	牛蒡苷元 / %	RSD / % (n=2)
4	5.764	1.23	1.214	1.30
6	5.899	1.30	0.748	0.94
8	6.245	1.02	1.643	1.29
10	6.769	0.57	1.353	0.62
12	3.903	1.08	4.013	1.10
20	4.196	1.03	6.031	1.05

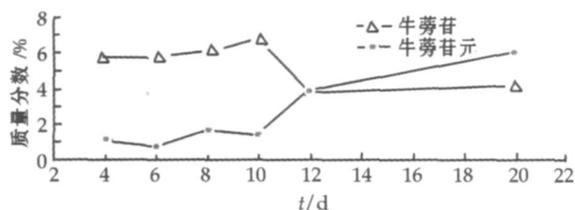


图 2 牛蒡种子萌发初期牛蒡苷与苷元量变化趋势

Fig 2 Change trend of arctin and arctigenin content in burdock bud at primary germination of seed

3 结论与讨论

种子的发芽程度是评价种质的一个重要指标,

种子越成熟饱满其发芽率越高。在本课题的研究中采集了我国不同产地的牛蒡种质资源^[2],对 49 个产地的牛蒡测定了种子的干粒质量、发芽势和发芽率。干粒质量平均值为 9.07 g,超过 10 g 以上的有 12 个产地,最低值 5.94 g 为甘肃天水麦积区,最高值 12.80 g 为四川松潘。发芽率平均值为 84%,第 6 天发芽比较旺盛,第 10 天发芽接近完全,当不再有发芽种子出现计算发芽率,发芽率高于 90% 有 14 个产地,其中甘肃定西市渭源县的最高达 99%,高于 80% 有 37 个产地,低于 70% 有 2 个产地为河南禹州和甘肃天水麦积区,分别为 29.00% 和 30.33%。还通过 SPSS11.5 进行统计,发现这 3 项指标与对应采集地的牛蒡子药材中牛蒡苷具有显著正相关性,与牛蒡苷元的量成负相关性,即干粒质量、发芽势、发芽率越高牛蒡苷的量越高,符合对牛蒡子的传统质量评价,成熟饱满的牛蒡子药材质量好。牛蒡子在萌发初期代谢会发生变化,过氧化物酶的谱带加深,一些原有谱带缺失,一些新的谱带出现^[3],而本实验表明牛蒡苷随着种子的发芽生长的量下降,牛蒡苷元反而上升,是否由于该类酶的变化引起的需要进一步研究。对于其炮制原理“杀酶保苷”的解释、合理的贮藏也具有一定意义。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
[2] 许亮,吕智,刘淼,等. 中国牛蒡种质资源植被调查与采集[J]. 现代中药研究与实践,2008,6(22):22-24.
[3] 高文远,李志亮,肖培根. 牛蒡种子萌发初期的代谢研究[J]. 中国中药杂志,1998,10(23):594-595.

HPLC 法测定不同品种苦荞麦中的手性肌醇

彭镰心,勾秋芬,邹亮,赵钢*

(成都大学生物产业学院,四川成都 610106)

摘要:目的 建立苦荞麦中手性肌醇的定量测定方法,并比较不同品种苦荞麦中手性肌醇的量。方法 NH₂ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温 30 。流动相 70% 乙腈,体积流量 1.0 mL/min。结果 手性肌醇在 1.340 ~ 8.040 μg,峰面积与进样量具有良好的线性关系,回归方程 A = 65.017 C - 6.019, r = 0.999 5 (n = 6), 平均回收率为 96.74%。不同品种的苦荞麦中手性肌醇量差异较大,其中量最高的为“威 93-8”。结论 本法简便、准确、重现性好,可用于苦荞麦的质量控制。

关键词:苦荞麦;手性肌醇;RP-HPLC

* 收稿日期:2008-10-17

基金项目:国家科技“十一五”支撑项目(2006BAD02B06-02);四川省中医药管理局重点项目(200675)

作者简介:彭镰心(1981—),男,助教,硕士,从事少数民族药物的研究和教学工作,发表论文 20 余篇。

Tel:(028)80278728 13540201551 E-mail:g2peng@sina.com