

中药九眼独活的研究

包柏林

(解放军第181医院药局 桂林 541002)

摘要 本文综述了中药九眼独活鉴定、资源、化学成分、药理活性、组织培养、酶及遗传学方面的研究进展。

关键词 九眼独活;鉴定;资源;化学成分;药理活性;组织培养;酶;遗传学

Research development of traditional Chinese medicine jiuwanduhuo

Bao Bolin

(Department of Pharmacy, PLA 181st Hospital Guilin 541002)

ABSTRACT Research development on identification, resource, chemical constituents, cell culture, enzyme and genetics of traditional Chinese medicine "jiuwanduhuo" along with pharmacological activities are reviewed in this paper.

KEY WORDS Jiuwanduhuo, identification, resource, chemical constituents, pharmacological activity, cell culture, enzyme and genetics

中药九眼独活具祛风和血、解热镇痛、疏风补虚、利尿消肿之功效,主要用于治疗风湿痹痛、腰膝酸软、头痛目眩等证,在我国有着较为悠久的药用历史。由于该植物开发利用价值大,近年研究报道较多,本文就其鉴定、资源、化学成分、药理学、组织培养、酶及遗传学研究等方面的研究成果综述如下。

一、品种鉴定及资源调查

本草考证发现九眼独活药用始于明代^[1],现在习惯将九眼独活作为中药独活的一个品种使用。长期以来国内对其基源植物存在争议,国外应用也较混乱,日本称食用土当归视为 *Udo*,其根既作为日本独活 *Wa - Dokukatsu*,又作日本羌活 *Wa - Kyohkatsu* 入药(在中国羌活只源于羌活属 *Notopterygium* 植物,而在日本、韩国则还包括山芹属植物 *Ostericum praeteritum* 及食用土当归^[2])。

市场调查发现九眼独活主要在西南地区药用,药材来源于3种五加科偃木属植物:食用土当归 *Aralia cordata* Thunb.、龙眼独活 *A. fargesii* Franch.、柔毛龙眼独活 *A. henryi* Harms,主流品种为食用土当归的根及根茎,龙眼独活仅是混入使用,可能系药源紧张带入的品种,但川、陕、鄂一些草医将其作为九眼独活应用;柔毛龙眼独活仅在鄂西、川西及川西北民间药用。这澄清国内长期将柔毛龙眼独活、食用土当归视为中药九眼独活商品药材基源植物的错误认识。资源调查表明3种九眼独活以野生品为主,主流品种食用土当归主要分布长江流域及以南山区,四川阿坝、甘孜、凉山等州为主产区。长期以来由于只采不种,野生资源受到破坏,作者试种表明野生变家种是可行的,这对野生资源保护和开发药用资源是有意义的。

3 种 九 眼 独 活 在 原 植 物 及 药 材 性 状 上 存 在 较 大 差 异^[3], 化 学 成 分 亦 不 相 同, 薄 层 层 析 表 明 龙 眼 独 活 与 食 用 土 当 归 化 学 成 分 较 接 近; 显 微 鉴 定 发 现 三 者 在 根 韧 皮 部 占 根 横 切 面 的 比 例、簇 晶 的 分 布、本 质 部 分 是 否 分 体 及 分 体 数 目 等 方 面 也 存 在 明 显 差 异^[4]。

二、化学成分研究

(一) 皂 甙

从 日 本 产 食 用 土 当 归 地 上 部 分 分 离 到 11 种 皂 甙 成 分: 3-O-[β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-齐墩果酸、3-O-[β -D-吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-28-O- β -D-吡喃葡萄糖齐墩果酸、3-O-[β -D-吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 4)]- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-28-O- β -D-吡喃葡萄糖齐墩果酸、3-O-[β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]常春藤皂甙元、3-O-[β -D-吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-O-[β -D-吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-28-O- β -D-吡喃葡萄糖常春藤皂甙元、3-O- β -D-吡喃葡萄糖醛酸齐墩果酸、3-O- β -D-吡喃葡萄糖醛酸-28-O- β -D-吡喃葡萄糖齐墩果酸、3-O-[β -D-吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]齐墩果酸、3-O-[β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-28-O- β -D-吡喃葡萄糖齐墩果酸、3-O-[β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-28-O- β -D-吡喃半乳糖齐墩果酸^[5]。

(二) 二 萜 羧 酸

迄 今 为 止 从 食 用 土 当 归 中 分 离 到 9 种 二 萜 羧 酸 成 分: 栲 利 烯 酸、海 松 酸 (又 称 东 北 土 当 归 酸 continentalic acid)、海 松 醇、二 羟 栲 利 烯 酸、7 α -羟 基 海 松 酸、7-酮 海 松 酸、7 β -羟 基 海 松 酸、15 α -羟 基 栲 利 烯 酸、17-羟 基 栲 利 烯 酸^[6]。

至 今 未 从 德 木 属 木 本 植 物 中 分 离 到 以 海 松 酸 为 代 表 的 二 萜 羧 酸 成 分, 此 类 成 分 似 是 该 属 植 物 草、木 本 类 群 的 化 学 分 类 学 依 据。

(三) 聚 乙 炔 化 合 物 Polyacetylenes

从 日 本 产 食 用 土 当 归 地 上 部 分 已 分 离 到 4 种 聚 乙 炔 化 合 物: falcarindiol 及 dehydrofalcarindiol^[5], falcarindiol-8-acetate 及 dehydrofalcarindiol-8-acetate^[7], 从 龙 眼 独 活 根 茎 中 亦 分 离 到 falcarindiol^[8]。

(四) 香 豆 精 成 分

从 龙 眼 独 活 根 茎 中 分 离 到 伞 花 内 酯、秦 皮 乙 素、东 莨 菪 素、东 莨 菪 酮 等 简 单 香 豆 精 成 分^[8], 这 些 香 豆 精 成 分 具 抑 菌、抗 炎、解 痉 镇 痛、祛 风 除 湿 等 作 用, 与 龙 眼 独 活 的 祛 风 除 湿、止 痛、通 经 络 的 传 统 应 用 相 符 合。

(五) 挥 发 油

日 本 产 食 用 土 当 归 鲜 根 含 挥 发 油 0.07%, 从 中 分 离 到 茨 烯、 α -蒎 烯、 γ -松 油 烯、香 桉 烯、月 桂 烯、柠 檬 烯、 α -古 巴 烯、律 草 烯、反 式 及 顺 式 香 桉 烯 水 合 物、松 油 烯-4-醇 等, 其 中 柠 檬 烯 占 30%; 另 从 日 本 产 野 生 及 栽 培 食 用 土 当 归 中 分 离 到 茨 烯、 α -蒎 烯、 β -蒎 烯、香 桉 烯、萹 烯-3, 月 桂 烯、 α -柠 檬 烯、罗 勒 烯 及 对 伞 花 烯, 而 且 野 生 品 挥 发 性 成 分 较 栽 培 品 高 3 倍; 国 产 食 用 土 当 归 根 及 根 茎 含 挥 发 油 约 为 药 材 阴 干 重 的 0.42%, 已 分 析 出 以 三 环 萜 为 主 的 36 种 成 分, 与 日 本 产 者 相 比, 成 分 及 含 量 差 异 较 大^[4]。

日 本 产 食 用 土 当 归 嫩 芽 精 油 含 量 为 鲜 重 的 0.075%, 成 分 有 α -律 草 烯、 δ -芹 子 烯、 α -蒎 烯、 β -蒎 烯、香 桉 烯、月 桂 烯、 α -柠 檬 烯、 β -石 竹 烯 罗 勒 烯、 δ -毕 橙 茄 烯、对 伞 花 烯、松 油 烯-4-醇 等^[9]。

用 吸 香 法-毛 细 管 GC-MS 对 食 用 土 当 归 根 中 的 芳 香 成 分 进 行 研 究, 鉴 定 出 α -葎 草 烯、正 己 醛、 α -蒎 烯、 β -蒎 烯 及 对 伞 花 烯 等 17 种 成 分, 干 根 中 含 0.00025% 牡 丹 酚 (paeonol)^[10]。

食 用 土 当 归 嫩 茎 用 水 搅 匀, 乙 醚 提 取 物

经硅胶层析及气相色谱-质谱分析,日本及朝鲜产者分别含 45 及 114 个化合物, α -蒎烯、 β -蒎烯及香桉烯占挥发油的 84-88%,从朝鲜产者还检测到 1-甲基-4(-1-甲基)苯、3-三癸烯-1-炔、2,3,4,5,6,7-8 氢-1H-茛酚-2 及 8 氢-4-甲基-6(-1-甲基)-3,5-二氧-4a(2H)-萘醌^[11]。

(六)木质素

从食用土当归中分离到木质体,通过光谱及化学降解对其性质进行了研究,IR 及¹³C-NMR 显示其为二噁烷木质体,即愈创木基-丁香醇基木质体的对羟基苯甲酸酯,碱性硝基苯氧化及硫代酸化试验发现丁香醇基、愈创木基分子比率分别为 1.3 及 1.2,表明食用土当归含愈创木基-丁香醇基木质体,但丁香醇基木质体的含量较其它被子植物低^[12]。

(七)维生素

食用土当归嫩芽可供食用,经测定其干品含维生素 E 为 2.68mg/100g,维生素 C 为 17.84mg/100g,而维生素 A、D₃、B₁、B₂ 等则未测出。

加热情况下,当 pH < 6 时嫩芽中维生素 C 的氧化率低,50% 以上的维生素 C 未被氧化^[13]。

(八)氨基酸

食用土当归药材至少含 17 种游离氨基酸,总游离氨基酸含量为 248.20mg/100g,必需氨基酸占总游离氨基酸的 7.8%^[14];嫩芽干品含 19 种水解氨基酸,总含量为 1572mg/100g,低于同属木本植物,必需氨基酸为 630mg/100g,占总量 40.10%,嫩芽中粗总蛋白含量达 19.90%。

(九)微量元素

药材及嫩芽中均含 Cu、Zn、Fe、Mn、Cr、Co、Sr 等微量元素,可作为重要的矿物元素来源,而 Cd、Se、V、Mo 则未测出。常量元素 Ca 含量很高,与解剖学研究发现其组织内

草酸钙簇晶较多是一致的。

(十)其它成分

食用土当归及龙眼独活根及根茎中含有齐墩果酸、三十烷酸等羧酸成分及豆甾醇、谷甾酸等植物甾醇成分。日本人曾用 70% 的乙醇提取食用土当归可食部分后,对醇不溶物测定了蛋白质、果胶质、粗纤维、中性洗涤纤维及灰分的含量^[15]。

三、药理学研究

食用土当归中提取的海松酸及栲利烯酸体外试验对肿瘤细胞株 A₅₄₉、XF₄₉₈、SK-MEL-2 及 HCT15 表现出中等抑制活性^[16];食用土当归根的正己烷提取物体外对 P388D₁ 有细胞毒作用,从中提取的 farcarindiol (I)、dehydrofarcarindiol (II)、farcarindiol-8-acetate (III) 及 dehydrofarcarindiol-8-acetate (IV),对肿瘤细胞株 A₅₄₉、HCT15、DLD1、MCF7、SKOV3、HL60、K542 及 P388D₁ 试验中, I 和 III 表现的细胞毒性较 II、IV 强,提示终端饱和碳链和 3 位羟基对于活性是必要的^[7]。

食用土当归所含海松酸、聚乙炔化合物 farcarindiol 及 dehydrofarcarindiol 均具强抗菌活性^[5]。

口服从食用土当归根中提取的栲利烯酸 300mg/kg 及海松酸 500mg/kg,有镇痛、降低体温、戊巴比妥诱导麻醉持续时间延长、抑制由甲苯丙胺引起的运动失调等显著活性,其中海松酸的上述活性略差于栲利烯酸^[1]。

日本人曾将食用土当归所含的栲利烯酸及海松酸与羌活、独活的止痛活性差异进行研究^[17]。

四、细胞培养研究

食用土当归茎及叶经组织培养可获得花色甙,后者可用于食品加工及软饮料生产,开发利用价值较大,这方面日本学者研究较深入。

用 0.2ppm 异硫氰酸荧光素处理食用土当归培养物,不含花色甙的细胞有肉眼可见的绿色荧光,而含甙细胞荧光消失,在荧光显

显微镜下可将原生质中含花色甙与不含花色甙的细胞区分开,其原理为异硫氰酸荧光素的绿色荧光(max 525nm)与绿色光吸收(max 530nm)抵消,在此基础上发展的流式细胞计数可作为一种筛选含花色甙细胞的方法^[18]。

食用土当归茎或叶 25℃ 用 Murashige - Skoog's 培养基(含 2,4-D)黑暗中培养 2wk,形成的愈伤组织用椰奶培养基培养,收集紫色细胞并用 Murashige - Skoog's 培养基黑暗中培养 3wk,用酸性甲醇提取细胞团(63g),分离到 8.7g 花色素-3-0- $[\beta$ -D-吡喃木糖(1-2)- β -D-吡喃半乳糖甙]。

黑暗中以蔗糖作为碳的来源, NH_4^+ 对 NO_3^- 的摩尔比率保持为 1:4(15mm 总氮),通过补充 NAA 作为植物生长素,激动素作为细胞分裂素,可得到较高的花色甙产量。愈伤组织黑暗中培养 3wk,花色甙的产量为培养物干重的 13.0%,所获总花色甙的 70% 为花青素-3-木糖半乳糖甙^[19]。

从食用土当归茎或叶愈伤组织中筛选出花色甙高产细胞株,通过改变培养基种类、蔗糖浓度和氮的来源、浓度以寻求最佳培养条件;黑暗中用 Linsmaier - Skoog's 培养基(含 1.0mg/l 2,4-D 和 0.1mg/l 激动素),2%(w/w)蔗糖及相应的氮浓度,花色甙最高产量为培养物干重的 10.3%。调整培养基中氮的浓度及 NH_4^+ 对 NO_3^- 比率可获最佳细胞生长及花色甙生产条件^[20]。

从食用土当归培养细胞中分离到一种微量花色甙,经 FAB-MS 及 ^1H , ^{13}C NMR 光谱鉴定其为芍药花甙元-3-0- β -D-吡喃木糖(1-2)- β -D-吡喃半乳糖甙,系主要花色素的 3'-0-甲酯,此外还就培养条件对花色甙组成的影响进行了研究,发现光照、高糖及低硝酸盐可促进主要花色素的甲酯化^[21]。

自食用土当归培养细胞中筛选出一些花色甙高产细胞株,从 3 个不同条件下培养的细胞株提取色素(花色甙),在酸性溶液中考察其色调、热及光稳定性、金属离子的影响和

安全性。该粗色素在 pH2.2-6.0 时呈红色至桔红色, pH7.0-9.0 时呈紫红色至紫色,可保持数小时不变。加热对其色调影响不大,但紫外光对其色调的影响较对紫苏色素的影响大,通过对毒性金属元素的定量分析和其诱变性的生物学试验初步研究了该色素的安全性。应用于一种软饮料的试生产,证明从食用土当归培养细胞中获得的花色甙可作为色素使用^[22]。

食用土当归花色甙高产细胞株的培养已从培养瓶过渡到 10 升玻璃发酵罐、95 升不锈钢发酵罐,最后到实验性 500 升发酵罐。通入 CO_2 ,无光照悬浮培养,花色甙含量为干培养物的 7.0-17.2%(w/w)。在一次 500ml 试验中,培养 16d 后细胞团块增加 26 倍(培养物鲜重 69.2kg),花色甙增加 55 倍(产量 545g,含量为培养物干重的 17.2%)^[23]。

五、酶及遗传学研究

从食用土当归中提取到肉桂醇脱氢酶(CAD),纯化后对其性质进行了研究。发现其仅以肉桂醇及肉桂醛为底物,其 Mr 大致为 72000,含 2 个大小略为不同的亚单位,通过从 N-端用溴化氰裂解得到的肽链弄清其部分氨基酸排列顺序^[24]。

从食用土当归得到编码有肉桂醇脱氢酶亚单位的完整 cDNA 克隆,而且经下述 2 项证明该克隆的一致性:从纯化的食用土当归肉桂醇脱氢酶蛋白中得到的肽链的氨基酸顺序与 cDNA 的核苷酸相关区域高度一致;带有部分 cDNA 的 λ gt11 表达的融合蛋白与纯化的肉桂醇脱氢酶蛋白抗体起反应^[25]。

通过植入从食用土当归 cDNA 或编码肉桂醇脱氢酶基因衍生的抗敏 DNA 得到具有降低肉桂醇脱氢酶活力的转基因植物,其木质体含量低,可降低造纸成本;此外还制备了含抗敏 DNA 的质粒 pUCAD121A 及 pECAD121A33,并用于转基因植物的生产。

参考文献

[1]王忠壮,等. 中药独活、九眼独活及羌活的本草考证和

- 资源调查. 中国中药杂志, 1995; 20(9): 515
- [2] Kohda Hiroshi. Pharmacognostical Studies on Umbelliferous Crude Drug. Shoyakugaku Zasshi, 1983; 37(2): 165
- [3] 王忠壮, 等. 中药九眼独活的商品调查及生药鉴定. 中国中药杂志, 1994; 19(12): 707
- [4] 王忠壮, 等. 中药九眼独活的显微鉴定及化学成分分析. 第二军医大学学报, 1997; 18(2): 202
- [5] Hideaki Kawai, et al. Studies on the structure of Udosaponins A, B, C, D, E and F from *Aralia cordata* Thunb. Chem. Pharm. Bull. 1989; 37(9): 2318
- [6] Shoji Yahara, et al. Mino Diterpenes of *Aralia cordata* Thunb.: 17-hydroxy-ent-kaur-19-oic Acid and Grandifloric Acid. Chem. Pharm. Bull. 1974; 22(7): 1629
- [7] Shin Youngpark, Kim Jinwoong. Cytotoxic Polyacetylenes from *Aralia cordata*. Yakhak Hoechi, 1995; 39(6): 681
- [8] 饶高雄, 孙汉董, 刘启新. 龙眼独活的化学成分. 中国中药杂志, 1996; 21(8): 482
- [9] Ito Tetsuo, et al. Aroma Constituents of Udo (*Aralia cordata* Thunb.) Nippon Noge Kagaku Kaishi, 1981; 55(5): 399
- [10] Hitosi Okagawa, Masataka Moriyasu, Sakea Matsushita et al. Evaluation of crude drug by a combination of enflourage and chromatography (V). Flavor compounds in rhizome of *Notopterygium* sp., and in roots of *Angelica pubescens* and *Aralia cordata*. Shoyakugaku Zasshi. 1990, 44(1): 11
- [11] Massyoshi Sawamura, Mie Soon Lee Kim, Kenichi Shichiri et al. Volatile constituents of Japanese and Korean Udo (*A. cordata* Thunb.) & butterbur (*Petasites japonicus* Miq) Kochi Daigaku Gakujutsu Kenkyu Hokou Nogaku, 1990; 38: 49
- [12] Takashi Hibino, Daisuke Shibata, Takash Ito et al. Chemical properties of lignin from *Aralia cordata*. Phytochemistry, 1994; 37(2): 445
- [13] Masawru Tsujimura, Tomoko Fukuda, Harumi Komatsubara. Ascorbic acid oxidation and residues of vit. C in edible plant after heating. Bitamin. 1990; 64(1): 27
- [14] 王忠壮, 等. 德木属主要药用种总游离氨基酸分析. 西北药学杂志, 1993; 8(3): 112
- [15] Takaaki Manabe. Constituents of alcohol insoluble solids in common fruits and vegetables. Hiroshima Nogyo Tanki Daigaku Kenkyu Hokoku. 1986; 8(1): 53
- [16] Shiyong Ryu et al. In vitro antitumor activity of diterpenes from *Aralia cordata*. Arch. Pharmacol. Res, 1996; 19(1): 77
- [17] Emi Okuyama, et al. Analgesic components of *Notopterygiumincisium* Ting. Chem. Pharm. Bull. 1993; 41(5): 926
- [18] Kazuo Sakamoto, Kumiko Iida, Takash Koyano, et al. Method for selecting anthocyanin-producing by a cell sorter. Planta Medica. 1994; 60(3): 253
- [19] Kazuo Sakamoto, Kumiko Iida, Kimiko Sawamura, et al. Studies on plant tissue cultures, part 82. effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. Phytochemistry, 1993; 37(2): 357
- [20] Kazuo Sakamoto, Kumiko Iida, Sawamura, et al. Anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata* Thunb.. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 1994; 36(1): 21
- [21] Yoshihisa Asada, Kazuo Sakamoto, Tsutomu Furuya, et al. Study on plant tissue cultures. part 99. A minoglycoside from cultured cells of *A. cordata*. Phytochemistry. 1994; 35(6): 1471
- [22] Kazuo Sakamoto, Yoshihisa Asada, Tsutomu Furuya, et al. Study on Plant tissue cultures. 86. Characterization of anthocyanin pigment from cultured cells of *Aralia cordata* and its applications to food colors. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 1993; 40(9): 647
- [23] Yoshinori Kobayashi, Motomu Akita, Kazuo Sakamoto, et al. Large scale production of anthocyanin by *Aralia cordata* cell suspension culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993; 40(2-3): 215
- [24] Takashi Hibino, Daisuke Shibata, Toshiaki Umezawa, et al. Purification and partial sequences of *Aralia cordata* cinnamyl alcohol dehydrogenase. Phytochemistry, 1993; 32(3): 565
- [25] Takashi Hibino, Daisuke Shibata, Chen Jingqing, et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Aralia cordata* cloning of the cDNA and expression of the gene in lignified tissue. Plant Cell Physiology, 1993; 34(5): 659

·敬告作者·

凡向本刊投稿的实验性论文, 必须有中、英文摘要、关键词。引用的参考文献需注明作者、篇名、杂志名、年份、卷、期、页码。药物植物名必须用斜体字标出。来稿请一式二份, 用宋体或正楷打印件。谢谢合作。

《药学实践杂志》编辑部