

摘 要

附子是我国传统中药和四川地道性药材,为毛茛科乌头属乌头(*Aconitum carmichaeli* Debx.)的子根,具有重要的药用价值。针对植物激素在农业上的应用取得了重要成果,采用江油主栽品种为材料,2007-2008年在西南科技大学校园内进行大田试验。研究了在苗期和子根膨大期喷施 GA、IAA、6-BA、KT、NAA 和清水对附子农艺性状,生理指标和品质的影响,以期在改善附子生长发育和农艺性状、提高丰产性和品质、附子 GAP 栽培等提供依据,为植物激素在药用植物中的应用提供范例。取得的主要研究结果如下:

1、GA、NAA、IAA 对附子的株高、叶片数、茎围、总生物量、子根生物量和茎叶生物量在发育的过程中有明显的增加作用。激素对附子各组织中的含水量、干物质率、子根个数的影响不大。激素对附子子根产量有较大影响,有明显增产作用。GA、IAA、NAA 对子根和 1+2 子根产量有明显的增产效应。相关性分析和聚类分析表明,GA、IAA、NAA 对附子的农艺性状影响最大,6-BA 和 KT 的作用不明显。

2、激素对叶绿素、CAT、POD 和脯氨酸都有影响,但激素作用的规律性不强。激素对 GPT 和 GOT 的影响有差异性,两种酶的活性在发育过程中呈现上升趋势。

3、激素处理后附子子根中淀粉、游离氨基酸、可溶性蛋白质、总糖,可溶性糖和多糖的含量有显著的影响。收获时不同组织中乌头类总生物碱含量也不同:子根>茎叶>须根>母根。激素对附子不同组织中乌头类总生物碱的含量有影响,但对整个植株中的总生物碱的含量影响不大。激素对附子不同组织中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的含量也有明显的差异性。

附子不同部位的附子灵含量中子根中最高,须根次之,茎叶中的含量最低,母根的含量略高于茎叶。激素对不同组织中的附子灵含量的影响也有显著的差异性。

关键词: 附子 植物激素 生物碱 附子灵 高效液相色谱 质谱

Abstract

Radix Aconiti Lateralis Preparata is a Chinese traditional medical herb, whose original plant is *Aconitum carmichaeli* Debx. It's the child tubers of *Aconitum carmichaeli* Debx. *Radix Aconiti*. has the high medical value. The plant hormones has obtained the important results on the agriculture. The experiment which used the main species of Jiangyou was carried out on the campus of Southwest University of Science and Technology in 2007-2008. The thesis studied the effects on agronomic characteristics, physiological parameters and quality of *Radix Aconiti*. after spraying GA, IAA, 6-BA, KT, NAA and water at the seedling growing period and tubers expanding period. The objectives was improve the agronomic characteristics, increase yield and provide a basis for the cultivation of GAP of *Radix Aconiti*. It also provide a example for the plant hormones application on the other medicinal plants. The main tests results as follow:

(1) GA, NAA and IAA had significant effects on the plant height, leaves number, stem girth, total biomass, biomass of child tuber and biomass of stems and leaves of *Radix Aconiti*. in the growth and development. The effects of hormones on the water content and dry matter percentage in different tissues and child tubers were not significant. The results showed that GA, IAA and NAA had significant effects on the increment of yields of the 1+2 child tubers and tubers. It also showed that GA, NAA and IAA had obvious effects on the agronomic characteristics, but 6-BA and KT had not by analysis of correlation and cluster.

(2) All the hormones had the effects on the chlorophyll, CAT, POD and proline, but the regularity was not obvious. The effects of hormones on the GPT and GOT was significant. The activities of GPT and GOT was increased in the growth and development.

(3) Effects of plant hormones on the determination of starch, total amino acids, soluble protein, total sugar, soluble sugar and polysaccharide of child tubers were obvious. The total alkaloids content in different tissues at harvest was: child tubers > stems and leaves > fibrous tubers > mother tubers. It has not effects on the total alkaloids of the plant. The determination of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in different tissue after spraying different hormones had the obvious

difference.

The content of fuziline in different tissues was: child tubers>fibrous tubers mother tubers>stems and leaves. The effects of plant hormones on the determination of fuziline in different tissues of *Radix Aconiti*. was significant.

Key words: *Radix Aconiti Lateralis Preparata*; Plant Hormones ; Alkaloids ; Fuziline ; HPLC ; MS

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得西南科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签 名：

日 期：

关于论文使用和授权的说明

本人完全了解西南科技大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文的复印件，允许该论文被查阅和借阅；学校可以公布该论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。
(保密的学位论文在解密后应遵守此规定)

签 名：

导师签名：

日 期：

1 绪论

附子为毛茛科植物乌头 (*Aconitum carmichaeli* Debx) 的子根, 味辛、热, 有毒, 入心、脾、肾经, 始载于《神农本草经》, 被誉为“回阳救逆第一品药”, 主要分布于四川、陕西、安徽等地, 多为栽培品种, 野生种多分布于长江中、下游地区。

附子作为传统中草药, 具有回阳救逆、补火助阳、散寒之功效, 用以“阳衰欲脱、身凉肢冷脉微欲绝、阳痰、宫冷、心腹冷痛、虚含吐泻、阴含水肿、阳虚外感、寒湿痹痛”等症状。现代药理研究表明, 附子具有强心、抗炎、抗肿瘤、抗衰老、镇静、镇痛、提高免疫力、抗癌等作用。附子的主要有效成分为乌头类生物碱: 乌头碱(aconitine)、新乌头碱(mesaconitine) 与次乌头碱(hypaconitine)等。除此之外, 附子的多糖成分具有降低胰岛素的作用, 水溶部分具有治疗内毒素休克的作用, 浸出液具有抑菌作用^[1,2]。

1.1 附子生物学特性

附子为多年生草本, 高 60~150cm。块根通常 2 个, 栽培时可达 4~15 个, 呈倒卵圆形至倒卵形, 茎直立, 圆柱形, 叶互生, 叶片卵圆状五角形, 坚纸质或略革质, 掌状三裂几达基部。总状圆锥花序; 花蓝紫色, 花瓣盔形; 雄蕊多数; 心皮 3~5 离生, 蓇葖果长圆形^[3]。花期 9~10 月, 果期 10~11 月; 染色体基数为 8, *A.carmichaeli* Debx.为八倍体 ($2n=64$), 国内研究^[4,5]发现有六倍体和八倍体 ($2n=48, 64$)。杨亲二研究发现了我国的栽培品种有四倍体 ($2n=32$)^[6]。

1.1.1 附子发育特性

附子为乌头的子根, 从发育来源上, 附子实质上是一个具有膨大主根的“更新芽”, 川乌附子和北乌头附子的研究进一步证实了这一点^[7,8]。附子是兼块根无性繁殖和种子有性繁殖两种方式的植物, 但是在栽培上药农多用无性繁殖。附子在四川 12 月中旬栽种后, 须根首先生长; 2 月中旬植株出苗, 茎、叶开始生长, 不定根开始发生并形成子根。3~4 月植株茎、叶生长加快, 子根大量形成, 是植株营养器官生长的关键时期。5~7 月, 子根迅速膨大, 根、茎、叶生长最快, 生物量增长最多, 是植株获得高产的关键阶段一直持续 2 个月, 叶面积、子根数、须根量等达生长周期最大值, 是子根的最佳收获期; 植株开始抽苔、孕育花蕾, 根、茎、叶生长和块根膨大减慢, 进入生殖生长阶段; 8 月中旬, 子根和植株生物总量达生长周期最大值; 7~8 月是花粉和

子房发育的关键时期。9 月中旬植株开花,形成果实;11 月中旬后,果实成熟,蓇葖果裂开、种子脱落。根、茎、叶、花、果实等主要器官的生长和发育依次发生和交替建成,主要性状的生物量可建立有效的生长曲线,表现为典型的 S 曲线^[9]。

1.1.2 附子的种类和分布

乌头属植物全球约有 350 余种,在亚洲,欧洲和北美洲的亚热带和温带地区都有分布。我国乌头属植物约 160 余种,分布于除海南以外的各省区,主要分布于云南北部、川西和藏东部的高山地带区;东北各省及河北、山西、内蒙古等亦有较大量分布;在四川有大量的栽培,有附子的中药材生产质量管理规范(GAP)种植基地;在长白山地区近年有较大量栽培。我国乌头属植物分为三个亚属:牛扁亚属、乌头亚属和露蕊乌头亚属^[10],其中乌头亚属植物品种约 147 种,牛扁亚属约 21 种,露蕊乌头亚属只有 1 种。乌头属药用植物(如附子、川乌)主要来源于乌头亚属。

1.2 附子的主要活性成分

附子在我国传统医学中应用广泛、历史悠久。早在《神农本草经》中就有附子的记载,《伤寒论》、《金匱要略》中的很多方剂也含附子,以后历代本草书中大多有附子的记载。附子的化学成分的研究主要集中在二十世纪七、八十年代,该项研究主要体现在对该植物化学成分的提取、分离及鉴定三个方面。

1.2.1 生物碱类

过去人们研究结果表明其主要活性成分为生物碱,其中大多是二萜型生物碱,包括 C₁₈, C₁₉ 和 C₂₀ 三大类。其中 C₁₉ 类型属去甲基二萜生物碱,大部分含有 1-2 个酯化的醇羟基,酯基多由醋酸、苯甲酸及其衍生物或黎芦酸等构成,双酯型生物碱毒性很大,为该类植物中主要毒性和活性成分,在炮制或进入机体的过程中转化产物比较复杂。我国学者从六十年代开始研究,国内外也都有报道,其公认的代表性乌头生物碱为乌头碱的结构(图 1-1),研究成果如下:1965 年,陈燕等报道从附子中分离得到次乌头碱(hypaconitine)、乌头碱(aconitine)、新乌头碱(mesacontine)、塔拉地萨敏(talatisamine),以及两种新生物碱-川乌碱甲和川乌碱乙(karakoline)^[11];1966 年,日本学者岩佐准三等从我国产乌头中又分离出卡乌头碱(carmichaeline)^[12];1978 年,日本今野

等从北海道伊达产的附子中分离一种具弱强心作用的昆常碱^[12]；1982 年陈泗英等又从附子中分得到尼奥灵(neoline)、宋果灵(songorine)、附子灵(fuziline 即为 15- α -OH neoline)^[13]；1976 年，在附子的水溶性成分中，Kosuge 等首先从日本附子中分离出有强心作用的微量有效成分 dl-去甲乌药碱(demethylcoclanrinhihenamine)^[12]。随后，在 1982 年，陈迪华等从附子中分得了去甲乌药碱的类似物，只是在 C 环上多一个-OH，以及去甲猪毛菜碱(salsolinol 简称 Sal)^[14]。1982 年，Konno C^[15]等从中国附子中还得到了

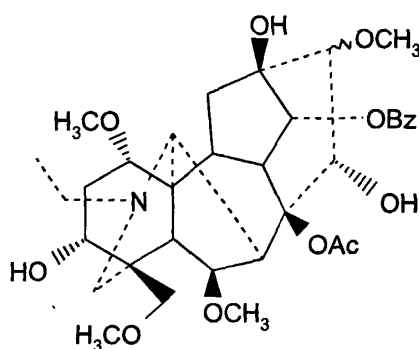


图 1-1 乌头碱结构式

Fig. 1-1 Structural formula of aconitine

monoacety Italatisamine、senbusime A、B、C 及四个脂类生物碱 lipoaconitine, lipohypaconitine, lipomesaconitine, lipodeoxyaconitineo。1983 年周远鹏报道附子中含有苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine)、苯甲酰中乌头原碱(benzoylmesaconine)、苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine)^[16]。1984 年，王洁之，韩公羽从江油附子中分离得到海帕乌头碱，美沙乌头碱，卡拉可林，北乌头碱，同是也分离得到了乌头碱，附子灵等 7 中二萜类生物碱^[17]。Konno 等从日本附子中还得到另一种心血管活性物质，氯化甲基多巴胺(coryneine chloride)具有明显的升压和强心作用^[18]。1984 年，横田正宾从江油附子中分离得到消旋去甲乌药碱(higenamine)^[12]。1992 年张卫东等又分离得到新江油乌头碱(neojiangyouconitme)、尿嘧啶、华北乌头碱、黄草乌头碱^[19]。杨华元等分得附子亭(fuzitine)^[20]。1995 年王宪楷等又得到一种新生物碱 N-CHO C₁₉-二萜生物碱^[21]。

四川江油产的附子中脂溶性部分有乌头碱，美沙乌头碱中乌头碱按、新

乌头碱、海帕乌头碱、尼奥灵、卡拉可林、北乌碱、附子灵；水溶性部分可得到新江油乌头碱，宋果灵盐酸盐、附子亭，及具有强心活性的尿嘧啶、也得到川乌碱乙，尼奥灵。其中新江油乌头碱和附子亭为新化合物，北乌碱、宋果灵盐酸盐和尿嘧啶为首次发现^[22]。附子中除生物碱外，还含有附子脂酸、附子磷脂酸钙、 β -谷甾醇、脂肪酸酯、多糖等成分。

附子灵(fuziline)是附子中二萜生物碱的主要成分之一，云南大理栽培的川乌所加工的附片毒性低而疗效较好，1982 年陈泗英等首次从大理栽培的附子中分离得到了尼奥宁(neoline)，准葛而乌头碱(songorine)和附子灵三种成分，并做了结构鉴定(图 1-2)，研究表明附子灵在附子的药理药效中有重要的作用^[13]。随后人们逐渐的从四川江油的附子中也分离得到了附子灵^[17]，但

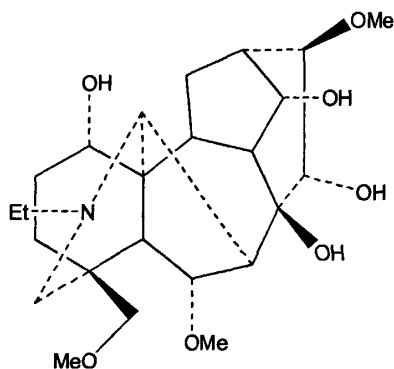


图 1-2 附子灵结构式

Fig.1-2. Structural formula of fuziline

是人们对附子灵的研究中侧重于提取分离和结构鉴定的研究，对附子灵含量测定的研究还未见报道。根据附子灵的结构可知，没有共轭结构，没有生色和助色基团，我们预试验结果也表明附子灵的紫外吸收比较弱，这给附子灵含量的测定带来了困难，这可能是人们未展开含量测定的原因之一。

1.2.2 多糖

多糖是一种由单糖组成的天然大分子化合物，是组成生物高分子家族中的一个最丰富多彩的成员，已知的天然多糖化合物约有 300 多种，广泛存在于动物，植物，微生物和海藻中，如真菌多糖、植物多糖、动物多糖、藻类多糖、细菌多糖等^[23]。60 年代前后，多糖作为广谱免疫促进剂引起人们极大的兴趣，人们逐渐发现多糖具有复杂的多方面的生物活性和功能。近年来，

各地学者从多个方面对多糖的功效进行了较为深入的研究主要体现在以下几个方面：1、对免疫系统的作用，包括对细胞免疫的作用，对体液免疫的作用，对细胞因子的影响，对机体第二信使水平的影响；抗肿瘤作用；抗氧化衰老作用；抗病毒作用；抗骨髓抑制作用等^[24-31]。

国内外对于附子中有效成分的研究，主要集中在生物碱方面，有关附子多糖的研究主要是在多糖的药理药效、分离纯化、含量测定三个方面。1986 年，Konno 报道了从日本乌头的根中分离出了具有降血糖作用的多糖成分^[32]，结合中药附子的多种临床应用和一些不能完全被生物碱成分解释的药理作用表明另一类生物活性成分—多糖很可能也在乌头属植物的药物治疗应用中也发挥了重要的作用。近年来关于附子多糖的研究成为了一个新的热点，关于药理作用，提取工艺和含量测定都取得了新的进展。附子多糖成分具有降低胰岛素作用^[33]，药理实验研究^[34]表明附子多糖对脂溶性生物碱有明显的拮抗作用。附子多糖与阿霉素能诱导肿瘤细胞凋亡，激活并促进 T 细胞转化和 NK 细胞的杀伤活性，增强机体的免疫功能，发挥抗肿瘤的协同作用。附子多糖作用的小鼠，能增大小鼠脾脏重量，提高了荷瘤小鼠的淋巴细胞转化能力和 NK 细胞活性，提高了抑癌基因 p53 和 Fas 的表达，并且提高了肿瘤细胞凋亡率，附子多糖和酸性多糖有显著的抑瘤作用，其作用机制主要是增强机体的细胞免疫功能，诱导肿瘤细胞凋亡和调节癌基因的表达^[35]。附子多糖对运动性疲劳恢复^[36]，降血脂作用^[37]，防治环磷酰胺骨髓抑制都有很好的作用。

附子多糖水提工艺中加水量对附子粗多糖的提取影响最为明显^[33]，其次为提取次数。附子粗多糖定量研究多以葡萄糖为对照品，采用硫酸-苯酚法和蒽酮-硫酸法测定其中葡萄糖的含量。

1.3 生物碱含量的测定方法

生物碱类成分是附子中的主要成分，关于生物碱研究较多的是含量的测定方法，主要集中在乌头类总生物碱，乌头碱，酯型生物碱等成分的测定。

1.3.1 乌头类总生物碱含量的测定方法

(1) 中和法

中和法是测定生物碱含量的经典方法，为 1990 年版中国药典所采用。刘成基等用直接滴定法和回滴定法分别测定用不同方法处理的川乌^[38]，结果表明，直接滴定法终点突破不明显，难于判断，易产生误差，而用回滴定法较

准确。2000 年版药典亦采用回滴定法测定川乌中总生物碱的含量。

(2) 酸性染料比色法

酸性染料比色法是利用生物碱与酸性染料反应生成离子对, 再进行比色测定的方法。根据所用酸性染料的不同, 又分为溴麝香草酚蓝法、溴甲酚绿法、甲橙提取比色法等。利用酸性染料比色法测定生物碱总量时, 要注意符合比尔定律的含量范围, 水相 pH 的选择, 呈色的稳定性。从稳定性考虑, 甲橙提取比色法优于溴甲酚绿法, 溴甲酚绿法优于溴麝香草酚蓝法^[39-42]。

(3) 导数分光光度法

可设定不同的求导阶数清除干扰组分的吸收, 利用导数分光光度法, 样品经乙醇提取后, 不经分离即可直接测定, 测定结果与药典法比较, 无显著差异, 但该法更灵敏、准确、简便, 且提取溶剂乙醇比氯仿对人体更安全^[43,44]。

(4) 交流示波极谱滴定法

1992 年, 王玉华等采用交流示波极谱滴定法, 测定了草乌及那如-3 中总乌头生物碱的含量, 此方法测定终点直观、准确, 但受 pH 值的影响较大^[45]。

1.3.2 酯型生物碱含量的测定方法

(1) 改良盐酸羟胺-高氯酸铁比色法

1977 年, 国外曾报道利用酯型生物碱与羟胺反应生成羟肟酸, 再与 Fe^{3+} 反应生成紫红色的络合物, 进行比色的方法。钱忠直在此基础上进行了改良, 即在显色后, 加入一定量 PH 值为 0.5 的高氯酸水溶液, 使空白无色, 消除了干扰, 提高了检出灵敏度^[46]。

(2) 复合缓冲纸色谱-紫外比色法

1965 年, 日本学者吉田初代报道, 在滤纸的不同区域涂布不同 PH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, 以苯-石油醚(5:1)上行展开, 荧光下观察斑点位置, 剪取各部位, 洗脱后比色, 测定含量^[47]。

(3) 离子选择电极法

刘万忠等合成四苯硼乌头碱, 制成对乌头碱敏感的全固态电化学检测器, 对制川乌、草乌和小活络丸中三中双酯型乌头生物碱总量进行了测定, 并对

乌头碱水解动力学进行了初步研究^[48]。从实验方法看,用电极法测定乌头中乌头总碱的含量,方法简便,检测灵敏呢,快捷,重现性、稳定性好,成本廉价,乌头碱水解产物对其测定无干扰,是一种很有前途的方法。

1.3.3 乌头碱含量的测定方法

利用酯型总生物碱含量作为指标控制乌头、附子的毒性,也不太合理。因为酯型总生物碱包括单酯型生物碱和双酯型生物碱,而这两种生物碱的毒性大小不同,单酯型生物碱的毒性仅为双酯型生物碱毒性的 1/5-1/10,如果这两种生物碱的配比不同,即使相同量的酯型总生物碱也回表现出不同的毒性,在以往的研究中有单独测双酯型生物碱中乌头碱含量的方法。

(1) 薄层荧光法

1991 年庞志功等利用该法测定了雪上一支蒿中乌头碱的含量,结果与紫外法的结果差异不大,精密度高 ($RSD=1.39\%$),回收率为 95.8% ^[49]。该法灵敏度高,分析速度快但需要特殊仪器-荧光分光光度计。

(2) 纸上电泳分离-洗脱分光光度法

陆履雯等用氨水碱化样品,用氯仿提取总生物碱,再用纸上电泳方法分离出乌头类生物碱,用紫外分光光度法,测定含量,该法乌头碱的回收率为 97.3% ,变异系数为 1.51% ,重现性好,分离效果好,但所需时间长^[50]。

(3) 薄层扫描法

蔡宝昌等利用氨水碱化样品,用氯仿提取总生物碱,用正己烷:醋酸乙酯: 95% 乙醇 ($6.4:3.6:1$) 并伴有氨蒸汽为展开剂,用碘蒸汽熏法描计斑点位置,待碘蒸汽挥发后,置 $230nm$ 下测小耳钉乌头碱的紫外吸收度,以积分曲线的高度计算乌头碱的含量。薄层扫描仪,具有专属性强,准确度高的特点^[51]。

(4) PVC 膜电极法

该法操作简便,碱性水解产物对测定干扰少,电极的重现性好,如果采用盐酸法制备样品,不需要采用有机溶剂提取的繁琐过程。该法的缺点是:在方法学上还不够成熟,需要对浸泡时间及过滤等环节进一步考证,且制备乌头碱-PVC 膜电极比较麻烦^[52]。

1.3.4 双酯型生物碱含量的测定方法

仅以乌头碱的含量为指标,不能控制乌头,附子的毒性,因为双酯型生物碱是乌头,附子的主要毒性成分,附子中所含的毒性生物碱有乌头碱、中乌头碱、次乌头碱等多种生物碱,这些双酯型生物碱毒性相当,而乌头碱只是这些双酯型生物碱的组分之一。因此单以乌头碱的含量为指标,无法真是反应乌头、附子的毒性大小,而且不同产地的乌头,附子中所含的双酯型生物碱的种类也不同。例如甘肃、广西乌头中只含中乌头碱,北京乌头中只含中乌头碱和次乌头碱,四川乌头、附子中三种生物碱都有^[53]。因此检测酯型生物碱的含量就显的比较重要。

(1) 双波长薄层扫描法

双波长薄层扫描法可以灵活选用展开剂,使乌头碱、中乌头碱、次乌头碱达到良好分离,该法具有设备简单、操作方便、灵敏度高、分辨率强的特点,广泛用于中药及其制剂的分析鉴别^[54]。赵东霞利用薄层扫描测定了通痹止痛胶囊中乌头碱的含量,结果表明,测定方法的平均加样回收率为 100.38%,精密度 RSD 为 2.74%,方法简便、可行、重现性好,可利用本制剂的质量控制等^[55]。瞿发林等建立痛得安胶囊中中乌头碱的含量测定方法,该法采用双波长薄层扫描法,以正己烷-乙酸乙酯-无水乙醇-氨水(12:8:2.5:0.5)为展开剂,碘化铋钾为显色剂,测定该制剂中中乌头碱的含量,结果显示,线性范围为 1-6 μg ,平均回收率为 94.8%,RSD 为 2.03%,方法操作简便,结果可靠,实用,适合该制剂中中乌头碱的含量测定^[56]。

(2) 高效液相色谱法

高效液相色谱法是在经典液相色谱法的基础上,于 60 年代后期引入了气相色谱理论而迅速发展起来的。它与经典液相色谱法的区别是填料颗粒小而均匀,小颗粒具有高柱效,但会引起高阻力,需用高压输送流动相,故又称高压液相色谱法,又因分析速度快而称为高速液相色谱法。HPLC 因其柱效高、分离好、稳定方便,能同时测定几种乌头碱的含量,故应用最多。紫外检测器(UV)是高效液相色谱法中最常用的检测器,因其灵敏度高,稳定性好,线性范围宽等优点广泛应用。

1981 年, Hiroshi Hikion 等首次在 ODS 柱上,用磷酸盐缓冲溶液(PH=2.7)-四氢呋喃(89:11)作流动相,分离了乌头类生物碱^[57]。高效液相色谱法中,其它常用的流动相系统有甲醇-水-氯仿-三乙胺^[58,59]、甲-水-氯-二乙胺^[60]、甲-水-乙腈、甲醇-碳酸铵-二氯甲烷^[61]、碳酸铵-四氢呋喃、甲醇-水-乙腈-十二烷基

磺酸钠^[62]、乙腈-四氢呋喃-醋酸铅等。乌头碱在二氯甲烷中比较稳定，而在甲醇中则不稳定，一星期就发生分解，因此在用高效液相法测定双酯型生物碱含量时，用二氯甲烷比较好。另外在样品提取过程中，应注意操作应迅速，如果时间过长，则乌头碱水解，影响测定结果。国内最早使用 HPLC 测定乌头生物碱的是王慕邹等^[63]，他们在 YWG-C18 柱上以甲醇-水-氯仿-三乙胺（70:30:2:0.1）为流动相，以甲基萘为内标测定了多种乌头、草乌及其炮制品种双酯型生物碱含量。高效液相色谱法用样量少，准确度高，在微量分析中占有优势。现在人们利用高效液相测定双酯型生物碱主要集中在新乌头碱，乌头碱和次乌头碱三种成分的检测，其他成分的检测还未见报道。

（3）质谱和色谱联用法

液相-质谱联用，气相-质谱联用在中成药的检测中比较常见，在生物碱的检测中也有报道。质谱和色谱联用是目前检测生物碱最灵敏的方法，被广泛用于中药及生物样品中乌头碱的分析^[64]。王兆基^[65]等采用液相色谱-质谱联用法测定乌头属药材及中成药中乌头类生物碱含量，探讨了用 LC-MS 联用法测定乌头属药材及有关中成药中乌头碱、次乌头碱和中乌头碱含量的方法。应用优化后的实验条件及采用多反应检测扫描方式，结果表明，被分析样品中各乌头碱浓度在 0.05-0.4mg/l 范围内，色谱峰面积与浓度有良好的线性关系，此方法亦应用于 14 个不同的乌头属药材及 10 个不同的中成药样品中乌头碱含量的检测。Wada Kaji^[66]采用高效液相-大气压化学电离-质谱（HPLC/APCI/MS）方法对二萜类生物碱和去甲二萜类生物碱进行定量分析，通过选择性离子监测（SIM）扫描方式对考布素等生物碱进行定量分析，证实了无性繁殖乌头中生物碱含量的等同性。

（4）电喷雾电离串联质谱

电喷雾电离串联质谱(ESI-MS) 是近年来发展起来的软电离技术，具有高灵敏度、特异性强、操作简便快速等优点，克服了液相的选择性差和只能定性定量考察少数化合物的缺点，已经应用于附子成分的定性和鉴定^[67]。乌头碱类二萜生物碱在电喷雾质谱条件下形成质子化分子，每个准分子离子峰代表一种生物碱，其归属可通过文献数据和串联质谱数据进一步确定，准分子离子峰的相对丰度可以近似地反映出同类生物碱的相对含量，所得质谱图在准分子离子峰的种类和丰度上具有很好的重复性^[68]。该方法在川乌，附子中成药中生物碱的检测上已经开始逐渐的应用^[69,70]。

(5) 高效毛细管电泳法

该法与 HPLC 相比, 具有分离时间更短、杂质干扰更少、使用有机溶剂少操作简便等优点, 满足乌头类药材分析的要求, 且获得的结果令人满意。该法已被香港工业署组织的中药质量控制实验室用 做有毒中药材的质量管理控制是一种很有应用前景的分析方法^[71]。

1.4 附子毒性及药理作用

1.4.1 附子的药理作用

(1) 强心作用

去甲乌药碱是附子的强心成分之一, 小管卓夫等首先从日本附子中分离得到, 并经离体蛙心实验证明有增强收缩力的作用, 认为是附子的强心成分, 但含量甚微。药理研究证明去甲乌药碱为弱的 β -肾上腺素能兴奋剂^[16], 能兴奋豚鼠离体心房, 增加收缩频率, 加快心率。另外从附子中分离得到的其它一些成分也有强心活性如氯化甲基多巴胺为 α -肾上腺素能受体激动剂, 具有明显强心作用, 氯化甲基多巴胺的作用与兴奋神经节或节前纤维有关^[72]。去甲猪毛菜碱也有一定强心作用, 是弱的 β 受体兴奋剂。对心率和心律的影响实验表明, 附子能加强心肌收缩力, 加快心率, 增强心输出量, 增强心肌耗氧量, 降低心脏做功效率的作用^[73]。附子中强心成分去甲乌药碱对心率失常动物模型有一定的治疗和预防作用, 表明去甲乌药碱可对抗缓慢型心律失常^[74]。近期有研究证实去甲乌药碱在适当剂量范围内具有明显的正力性和正时性作用, 并伴有舒张压轻度下降, 对心率的促进作用比多巴酚丁胺更显著, 有可能成为一种有前途的临床心脏负荷试验药物。

(2) 抗炎作用

附子的抗炎成分是二萜类乌头碱, 在不同的动物模型上也证实了乌头碱类生物碱的抗炎作用。赵保文^[75]指出, 附子的抗炎作用的机理主要是通过抑制蛋清、角叉菜胶、甲醛等所致大鼠足肿胀, 抑制醋酸所致毛细血管通透性亢进, 抑制肉芽肿形成及佐剂性关节炎。

(3) 镇静、镇痛作用

具有镇静、镇痛作用实验研究表明, 生附子镇痛作用较好, 而炮制附子镇痛作用减弱。口服生附子能抑制大鼠尾部加压引起的疼痛和腹腔注射酒石

酸铈钾或乙酸引起的扭体反应^[76]，而炮制附子则无此作用，结果表明附子的镇痛成分为乌头碱类生物碱。此外，附子对神经系统、对体温有一定影响，还具有镇静作用。

（4）抗肿瘤作用

诱导肿瘤细胞凋亡，董兰凤^[77]等研究结果表明附子多糖的抑瘤机制主要是通过增强机体的细胞免疫功能，诱导肿瘤细胞凋亡和上调抑癌基因的表达等多种因素发挥抗肿瘤作用。

（5）抗衰老作用

张涛^[78]等研究结果表明，附子能提高老年大鼠血清总抗氧化能力及抗氧化酶活性，降低自由基代谢产物的含量，提高组织中酶的活性，改善细胞膜的流动性，表明附子可提高机体抗自由基能力，减少脂质过氧化，从而保护细胞膜的完整和功能，起到延缓衰老的作用。

（6）其他药理作用

附子多糖成分具有降低胰岛素的作用，它的水溶部分对内毒素休克具有治疗作用，浸出液具有抑菌作用^[79]。

1.4.2 乌头类生物碱的毒性反应

川乌、附子、草乌为乌头属常用中药，民间也用同属植物雪上一枝蒿、铁棒锤、黄头乌头等治疗疾病^[80]，以上植物中主要成分是生物碱，其中以乌头碱、中乌头碱、次乌头碱等为主，其中乌头碱是乌头属植物中存在最普遍的。现在药理学研究表明，乌头碱具有镇痛、麻醉、消炎、降压的作用^[81]，但其毒性强、其致死量为 2-5mg，从染毒至死亡只需 8min-4h^[82]。乌头碱的小鼠灌胃、皮下注射、腹腔注射和静脉注射的 LD₅₀ 分别为 1.8mg/kg、0.27-0.38mg/kg、0.3-0.38mg/kg 和 0.12-0.27mg/kg；中乌头碱的小鼠灌胃、皮下注射、腹腔注射和静脉注射的 LD₅₀ 分别为 1.9 mg/kg、0.20-26 mg/kg、0.21-0.30 mg/kg 和 0.1-0.13 mg/kg；次乌头碱分别为 5.8 mg/kg、1.19 mg/kg、1.10 mg/kg 和 0.47 mg/kg，可见次乌头碱的毒性最小。乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的毒性作用性质相似，中毒特征是呼吸抑制和心率失常^[83]。给小鼠静脉注射乌头碱、中乌头碱和次乌头碱引起心率失常的剂量分别为 20 μg/kg、15 μg/kg 和 72 μg/kg，维持时间分别为 40、54 和 7min^[84]。乌头类生物碱属于二

萜类生物碱,以乌头碱型为主,其 C_{18} 、 C_{14} 的羟基常和乙酸或苯甲酸结合成酯,这种双酯型生物碱是乌头属中药中毒性最强的成分。当其水解掉一个酯键,变成单酯型生物碱时,毒性降低;当两个酯键均水解掉,变成胺醇型生物碱时,毒性很小。这就是中药乌头(附子)炮制的原理^[85-92]。由于乌头碱毒性强,中毒量与治疗量接近,又因个体差异及炮制原因引起中毒死亡的事故常有发生。乌头碱中毒的主要临床表现为口唇、舌及四肢麻木,流涎、恶心、呕吐、头昏眼花、面色苍白、肢冷脉弱,进而出现呼吸困难,四肢抽搐及昏迷,尿便失禁,血压下降或测不到,心率失常或可出现严重心率紊乱,乃至猝死。乌头碱的神经毒性的表现为:(1)对中枢神经系统先兴奋后抑制,严重的还能引起休克;(2)对周围神经先兴奋后麻痹;(3)抑制血管运动中枢,引起血压下降。乌头碱对心脏的毒性最为明显,其机理一是兴奋迷走神经,引起窦房节抑制,房室传导阻滞,从而导致心率减慢;二是直接对心脏的毒性作用,引起心律失常。其心律失常的特点是多样易变,以频发室性早搏最常见,且为多源性,并易形成二联律及阵发性室速、扭转型室速,甚至发展为室颤^[93-97]。

1.5 附子栽培研究

附子作为一种常用中药,资源、加工炮制、化学成分、药理药效及安全评价一直受到重视,但是栽培的研究相对较晚,研究的人也较少。肖小河等^[98,99]对南瓜叶乌头和花叶子乌头在产量和抗性方面的研究发现:在总生物碱含量和微量元素含量等内在品质之间无显著差异;认为生产上应大力推广产量稳定但抗逆性较好的花叶子乌头类型;乌头单株产量与土壤全磷、铜和锌的含量密切相关,而乌头总生物碱含量则与土壤磷、铜、铁和锌的含量密切相关。陈辛等^[100]对江油产栽培附子进行了研究,认为附子种和须根的生物碱含量高,应加以利用。侯大斌^[9]研究了乌头母根重量,打顶留叶,修根等栽培措施对块根产量的影响。

乌头的花为紫色或蓝色,欧洲将乌头的一个种-双兰菊(*Aconitum napellus*)开发为切花,为了提高产量满足对切花和盆栽的需求,对乌头的栽培进行了大量的研究^[101-103]。花和块根的产量受环境条件和种子本身质量的影响^[104-106],发现母株的花朵质量对后代第二年的花朵和子根生长势和质量是相一致的,相应的种用块根(母根)的大小将对第二年的开花质量和子根产量产生重要影响。同时母根大小与第二年的植株高度、主花序长度、茎秆直径和每株的花朵数量密切相关。用于繁殖的块根大小是影响花生长的主要因素,在块根种

子大小与出芽、生长、开花和子根产量之间存在显著正相关^[107,108]。因此,建议块根繁殖时使用小块根(小于 10g),但切花生产时则应使用大块根,增加种子块根的大小也会增加乌头的繁殖系数。乌头的生长和开花还会受到日照长度的显著影响,长日照条件下,茎和主花序长度将会加倍,而每花序的花朵数量也会增加,但开花时间会推迟。研究还发现开花后 4-6 周时子根重量达到最大,这时子根主芽开始伸长;块根种达到 30-40g 时的花的质量最好,而低于 5g 时植株很少开花,小块根、少根系量和少光照均不利于植株开花,大的块根种会增加子根数,小的块根种则有利于提高生长比例,气温高于 27℃或更高时,植株停止生长,在 22℃或略低时,植株生长良好^[109]。*Aconitum apellus* 的块根栽种深度对出芽和植株生长、茎秆高度对子根形成均有影响^[110,111]。附子是兼块根无性繁殖和种子有性繁殖两种方式的植物,对附子的有性繁殖影响因素的研究认为,环境因素和群体密度对附子植物的繁殖能力影响较大,增加群体密度有利于其提高繁殖能力^[112,113]。

1.6 植物激素在农作物上的应用

植物从种子萌发、生根、长出枝叶到开花结实、衰老、脱落、休眠的整个生长发育过程中,不仅需要无机物和有机物作为细胞生命活动的结构物质和营养物质,还需要一些特殊的有机物质来调控体内的各种代谢过程即植物激素。植物激素是指在植物体内合成,能从产生部位输送到其他部位,对生长发育产生显著调节作用的一类微量有机物质。至今发现的天然植物激素有五大类,即生长素类(IAA)、赤霉素类(GA),细胞分裂素类(CTK)、脱落酸(ABA)和乙烯(ETH)。植物激素的微量存在便可影响和有效调控植物的生长和发育,包括从生根、发芽到开花、结实和成熟等一切生命过程^[114]。在农业生产上,它不仅影响作物的生育进程,增加产量和改进品质,而且可调节作物与环境的相互关系,增强作物的抗逆性,诱导抗性基因表达^[115]。早在 20 世纪 30 年代植物激素就开始在农业生产上应用,但主要限制于吲哚乙酸等生长素类,到 40-50 年代随着生长调节剂的不断合成,使调节剂的应用与发展进入了一个新的领域,80 年代以来,国内外对植物生长调节剂的研究不断深入,并迅速应用于农、林和园艺生产中,如促进植物发芽、生根、促粟、诱导开花、防落花落果、提高产量和品质等方面都有广泛的应用^[116-118]。

1.6.1 植物激素对农作物生长及产量的影响

在现代农业生产中,用植物生长物质调节已成为控制植物生长发育的手

段, 现已广泛应用于作物、果树、蔬菜、花卉和林业等方面, 获得巨大的社会效益和经济效益。卜新华^[119]等发现: 作物喷施十二烷基类生长调节剂有利于改善作物营养, 延长功能叶片寿命, 增强干物质积累, 增加千粒重, 提高产量。张宏纪^[120]等认为: 小麦抽穗期叶面喷洒低浓度的 2, 4-D, 小麦的千粒重、产量都有提高, 蛋白质、湿面筋含量有一定增加, 其幅度分别为 0.6%, 1.7%。不同激素可以以不同的方式调节小麦旗叶的衰老, 影响小麦产量构成因素水平, 其中 6-BA 和 PP33 能够提高单位面积穗数, 明显延缓叶片衰老, 增加了穗粒数和千粒重, 使构成产量的三因素之间比例协调合理, 产量较高; TIBA 可以明显提高叶绿素含量并明显提高千粒重; GA 和 NBT 对延缓旗叶衰老有一定作用, 但增产效果不明显^[121]。

1.6.2 植物激素对农作物酶活性的影响

几乎所有的代谢反应都是酶催化进行的, 因此代谢调节实际上就是通过酶进行调节。陈石根^[122]等指出在生物体内酶的调节包括酶量(或酶合成水平)的调节和酶活性的调节。李秀菊^[123]等研究表明, 在干旱条件下用缩节安、化控二号和多效唑浸种处理的小麦幼苗 SOD 酶活性高于对照, 浇水后, 用生长调节剂处理的叶片 SOD 酶活性仍高于对照, 这有助于减轻膜脂过氧化, 维持细胞正常生理功能。王敏^[124]等采用盆栽试验, 研究了在模拟干旱胁迫下几种植物生长调节剂对玉米幼苗生长的影响, 结果表明喷施植物生长调节剂可促进玉米幼苗的生长, 苗高、根长、根数、叶面积、根冠比较对照均有明显增加, 同时还提高了幼苗的叶绿素含量、脯氨酸含量和过氧化物酶活性, 使植株的抗旱能力增强。赵东升^[125]试验表明: GA、G-ABA、S-ABA 三种生长调节物质均可以使亚麻体内 ATP 和 PAL 活性得到提高, 从而影响亚麻的生长发育。王月英^[126]探讨植物激素对花卉的影响得出合理浓度的生根粉处理可显著提高植株活力根数及减少烂根。

有关研究结果表明, IAA 可以促进小麦光合作用, 促进韧皮部的运输以及促进叶片同化物的输出^[127]; GA 能促进作用和籽粒对同化物的吸收^[128]; CTK 决定着胚乳细胞的数目和大小, 它能促进籽粒的发育和提高粒重^[129,130]; ABA 在高浓度条件下(> 10-6mol/L)抑制旗叶中同化物的装载, 而低浓度的 ABA 能促进同化物的装载, 在籽粒中能加快脱水, 促进成熟^[131]; 关于乙烯的研究报道较少, 沈岳清^[132]研究表明它能促进贮存物质的动员, 能促进籽粒的早熟和增加粒重^[133]。近 20 年来, 植物激素已逐渐成为栽培措施中的常规技术, 它与传统栽培技术的主要区别是传统技术以改善作物生育环境(如肥水管理、株行

配置等)为主,而化学控制技术则直接调控作物本身,因而能有效地达到“控制”生长发育的目的^[134]。

1.7 植物激素对生物碱含量的影响

植物药是药用植物的全体或部分器官,植物药材含有的生物碱,胺类,萜类,黄酮类,醌类,皂苷,强心苷等活性物质大多数是次生代谢产物。探讨次生代谢产物在药用植物体内合成积累的机制和影响因素,对于栽培生产过程中采取有效措施对其加以调控,以达到提高活性物质的含量,提高药材的品质,增加药效有非常重要的意义。影响药用植物次生代谢的因素主要有:遗传因素(植物进化水平,亲缘关系和种属差异,个体差异和个体发育阶段)和环境因素(光照,温度,水分,海拔高度,土壤和生物因素)^[135]。环境因素对植物的代谢影响用多种,激素也是重要的一种,激素农业上对作物的生长发育和品质的影响有重要的作用,激素对药用植物的次生代谢产物会有一定的影响,而激素对生物碱的影响的研究报道主要集中在离体培养和细胞培养中。

植物激素极大地影响组织细胞的生长和分化,因而对培养细胞的次生代谢影响也很大。生长素类如 2,4-D, NAA, IAA 等均可抑制吲哚生物碱的积累,尤其是 2,4-D,而细胞分裂素类如 BAP 和 KT 则可刺激一些冠瘤组织细胞和悬浮培养细胞的生物碱合成,尤其在去掉生长素的培养基中加有 KT 可显著刺激,但这似乎也随细胞系和处理方法的不同而不同。添加 2,4-D 可促进长春花培养细胞的分裂生长,却显著抑制生物碱生产,NAA 和 GA3 抑制生物碱,IAA 可促进生物碱和生物量的积累,BAP 则使细胞生物碱积累达到最大,而 IAA 则使生物碱量和生物量产量达到最大^[136,137]。在长春花中研究生长调节剂和生物碱关系的较多,Zenk 等^[138]人先在添加 2,4-D 和 KT 的 LS 基本培养基(生长培养基)中使长春花组织细胞的生物量达到最大,然后转入添加 IAA 和 6-BAP 及 8%的蔗糖和一定的 L-色氨酸的 MS 基本培养基(生产培养基)中进行生物碱的生产,使两个高产细胞系 S 和 A 的生物碱产量分别达到 20g/L,组织干重、62mg/L 的蛇根碱和 26g/L 组织干重、77mg/L 的蛇根碱、264mg/L 的阿吗碱。Smith 等^[139]在添加 NAA 和 KT 及 5%蔗糖的 MS 基本培养基中生产长春花生物碱,它可使生物量和生物碱含量同时达到理想的水平,ABA 的添加可刺激长春花培养细胞的长春质碱和阿吗碱的合成和积累,但不影响其生长。

Lindsey 等^[140]研究了 2 种茄科植物细胞培养过程中细胞生长、分化和生物碱积累的关系。当愈伤组织从含高浓度生长素培养基转入低生长素培养基时,

生物碱和叶绿素的含量下降,而细胞生长率增加。Mavituna F 发现在培养基中附加 2,4- D 时,对长春花培养细胞中生物碱的合成有抑制作用,而包含有 NAA 和 KT 的生产培养基,能够提高细胞生长率和增加生物碱的产量,仅加入 6-BA 时,细胞产量下降但能诱导生物碱的合成^[141]。

1.8 植物激素在附子上的应用

植物激素在附子大田栽培上的应用还未见报道,主要集中在离体培养上的应用。胡延玉和伍光庆^[142]等用 6-BA 0.05 mg/L、NAA 0.01-0.1 mg/L、GA 0.05-0.1 mg/L、培养基加入维生素 B1、维生素 B6、烟酸、肌醇、生物素、肌氨酸、酪蛋白水解物等多种有机物,得到了茎尖培养的幼株,带腋芽茎段的愈伤组织和芽丛,芽丛转移后可以生根,腋芽分化伸长成小苗。关文灵^[143]以乌头的块根诱导出试管苗叶片为外植体,在添加 BA, KT, NAA 等不同激素配比的 MS 培养基上培养直接诱导不定芽的产生,并成功的在不加任何激素的 1/2MS 培养基上得到生根植株。但是关于离体培养的研究主要侧重于外植体的选择,培养条件的优化和驯化栽培上^[142-146],还未见对生物碱等次生代谢产物的研究报道。

综上所述,化学调控作为低投入高产出的一种农业实用技术,在很多作物上已经被推广利用,而在药用植物上尚未形成系统的技术体系,前人研究最多的是在药用植物的快速繁殖和再生体系的建立中使用了植物激素,对药用植物的品质和活性成分有较明显的影响。但是在药用植物的田间栽培种植上利用的很少,对生长发育、品质和次生代谢产物的影响前人几乎没有报道。课题主要是研究外源植物激素对附子的生长调节以改善生长性状、提高抗逆性,从而提高丰产性和品质,为附子的种植、规范化管理,提高此生代谢产物含量,减少毒性产物量等方面提供依据。

附子是一种著名传统中药和川产道地中药材,具有良好的药效,国内外享有很高的盛誉,市场一直需求很大。化控技术应用到附子栽培上,有利于改善附子的生长发育,农艺性状提高丰产性和品质,为附子田间管理和提高活性成分的含量提供依据,对附子 GAP 的产业化生产和植物激素在其他药用植物应用的研究都有重要的意义。

2 材料与方法

2.1 试验材料、设计与设备

2.1.1 试验材料

试验材料：来自四川江油附子 GAP 基地的主要栽培种，由侯大斌教授鉴定为乌头属乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx。

2.1.2 试验设计

试验材料种植在西南科技大学校内试验田。试验田土壤特性：全氮含量为 0.14%，速效氮含量为 111.50mg/kg，速效磷含量为 32.785mg/kg，速效钾含量为 89.29mg/kg，有机质 5.19mg/kg。

选取附子质量在 10-15 克均匀的附子，株距 20 cm，行距 30 cm 种植，随机区组，三次重复，每个小区 9 m² 种植。底肥：2000kg/亩农家肥、200kg/亩油枯、50kg/亩高效磷肥，按附子生产要求进行田间管理，每月除一次草。激素选用：赤霉素(GA): 60 mg/L、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA):40 mg/L、萘乙酸(NAA):30 mg/L、3-吲哚乙酸(IAA): 20 mg/L、6-糠氨基嘌呤(KT): 25 mg/L、对照(清水)分别在 2008 年 3 月 25 和 2008 年 4 月 24 日喷施，6 月 27 日收获。

2.1.4 主要仪器与设备

Varian 1200LC/MS 液相色谱-质谱联用仪(带紫外检测器, 美国 Varian 公司); 旋转蒸发仪(Buchi 公司); 电子分析天平(Sartorius 公司); 优普超纯水制造系统(上海优普实业有限公司); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); T6 普析通用新世纪紫外分光光度计(北京普析); TU-1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析); 中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱(上海福玛实验设备有限公司); 高速冷冻离心机(eppendorf 公司); 低速离心机 80-2(常州国华电器); 电热恒温水浴锅 HHS216(常熟医疗器械)。

2.1.5 主要药品和试剂

甲醇、冰醋酸、高氯酸、氨水、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、磷酸、氯仿、甲苯、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮、硫酸、考马司亮蓝 G-250、愈创木酚、氯化钠、高锰酸钾、抗坏血酸、L-脯氨酸、茚三酮、蒽酮、蔗糖、牛血清蛋白 BSA、淀粉、溴甲酚绿、无水葡萄糖等试剂均为国产分析纯。

乌头碱 (NO. 110797-200404), 新乌头碱(NO. 110799-200404), 次乌头碱 (NO. 110798-200404)对照品购买于中国药品生物制品检定所。附子灵对照品由本课题组从附子中分离纯化得到, 其结构经 TLC, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 以及 MS 确证, 纯度分析达 99%以上。

2.2 测定指标和方法

2.2.1 农艺性状

试验材料于 2008 年 3 月 24, 4 月 10, 4 月 25, 5 月 10, 5 月 25, 6 月 10 和 6 月 27 采样, 共采样 7 次, 每次随机采样 15 株, 先测定植株的外部形态指标, 然后用自来水清洗干净阴干, 测定植株各部分的生物量鲜重, 再装入牛皮袋放入烘箱, 现在 105°C 烘 30min, 再在 60°C - 70°C 下烘至恒重, 测定各生物量干重, 各组织粉碎装入密封袋备用。

测定分析的主要农艺性状有: 株高、茎围 (直径)、叶片数、子根数、生物量、茎叶生物量、子根生物量、干物质、含水量, 小区产量、1+2 产量等

2.2.2 生理指标的测定

(1) 叶绿素含量的测定: 浸泡法^[147,148]。

(2) 过氧化物酶活性测定: 愈创木酚^[149]。

(3) 过氧化氢酶活性测定: 紫外分光光度法^[150]。

(4) 脯氨酸含量测定: 茚三酮显色法^[149]。

(5) 谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性测定: 取 0.1g 叶片用 1mL 0.05mol/L pH7.2 的 Tris-HCL 缓冲液, 13000r/min 离心 20min, 保存在 4°C 的冰箱中, 用南京建成生物工程研究所生成的检测试剂盒测定单位组织的酶活力, 以卡门氏单位作为酶活力单位。

2.2.3 品质测定

(1) 游离总氨基酸含量测定: 茚三酮比色法^[149]。

(2) 可溶性蛋白质含量测定: 考马斯亮蓝法^[149]。

(3) 可溶性糖含量测定: 蒽酮比色法^[150]。

(4) 总糖含量测定: 蒽酮比色法^[151]。

(5) 淀粉含量测定: 蒽酮比色法^[150]。

(6) 多糖含量测定: 硫酸-蒽酮比色法^[151-154]。

① 附子多糖的提取、纯化

称取干燥的附子粉 200g, 加入适量 80%乙醇, 回流提取 3h, 抽滤, 药渣挥尽乙醇后, 沸水提取 2 次, 每次 1h, 合并提取液, 浓缩至 200mL, 加 95% 乙醇使醇含量达到 80%, 于 4℃冰箱中醇沉过夜, 离心 (5000 r/min, 10 min), 沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤, 得到粗多糖。用热水将粗多糖溶于水, 用 Sevage 法 (氯仿:正丁醇=5:1) 除蛋白, 重复 3 次 (用考马斯亮蓝法测得无蛋白为止)。流水透析后, 蒸发浓缩至 200mL, 加 95%乙醇使醇含量达到 80%, 于 4℃冰箱中醇沉过夜, 离心, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤, 真空干燥, 称重, 计算得率。

② 标准溶液的配制: 精密称取 105℃干燥至恒重的葡萄糖标准品 0.1g, 蒸馏水溶解后, 定容至 1L。精确移取此溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL, 分别置于具塞试管中, 用蒸馏水补置 2mL 摇匀, 配成系列标准溶液。

③ 0.2 % 蒽酮试剂的配置: 取分析纯蒽酮 0.1g, 溶于 50 mL 的浓硫酸中, 当日配置使用。

④ 标准曲线的绘制: 分别向标准溶液的各支试管中加入 5 mL 的蒽酮试剂, 逐管放入沸水浴中准确加热 7 分钟, 放入冰浴中冷却至室温, 用 1 cm 的比色皿在 620nm 下测定吸光值。

⑤ 换算因子的测定: 精密称取附子多糖 100mg, 溶于 1L 容量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 1mL 于具塞试管中, 按照蒽酮—硫酸法方法测定吸光度, 根据回归方程计算多糖浓度中葡萄糖的浓度 C, 按下式计算出换算因子 f。 $f = C \cdot D / W$ 。式中为 W 多糖质量(mg), C 为葡萄糖浓度($\mu\text{g/mL}$), D 为稀释倍数。测得换算因子 $f = 4.83$ ($n=5$, $\text{RSD}=2.67\%$)。

⑥ 样品溶液的制备: 精密称取附子样品 1.0g, 加入 150mL 80%乙醇回流提取 3h, 抽滤, 残渣挥尽乙醇后, 用 100mL 水提取 1h, 2 次, 离心 (5000r/min, 10min), 上清液定容到 250mL 的容量瓶中, 为样品液。

⑦ 重现性试验: 精密称取附子粉 5 份, 每份 1g, 按照⑥下的方法同时制取 5 份样品溶液。精密移取各样品溶液各 1mL 分别置于具塞试管中, 按照④下的方法测定吸光度, 计算附子多糖含量。

⑧ 稳定性试验: 按⑥下样品溶液制备方法制备, 吸取 1mL 于具塞试管中, 按照④下的方法测定吸光度, 每隔 1h 测定 1 次, 连续 6h, 考察其稳定性。

(7) 生物碱含量的测定

① 乌头类总生物碱含量测定：酸性染料比色法^[155,156]。

② 新乌头碱、乌头碱和次乌头碱含量测定

测定方法：RP-HPLC 法

a 样品制备的优化

处理 1：药典法。

处理 2：将附子药材粉碎，过 60 目筛，取药材粉末 0.5g，加浓氨试液 2mL 润湿，加乙醚 20mL，超声处理 50min，过滤，并用乙醚洗涤 3 次，每次 10 mL，收集、合并所有滤液，水浴挥干溶剂。加入甲醇溶解残渣，过滤，定容到 10ml 的容量瓶，作为供试品溶液。

处理 3：精密称取样品 0.5g，滴加浓氨水 2mL 浸润，再加入 20mL 二氯甲烷，超声处理 50min，过滤，浓缩，用二氯甲烷定容到 10mL 的容量瓶中。

处理 4：精密称取样品 0.5g，加 95%的乙醇 50mL，加热回流 2h，回收溶剂，残渣用 20mL，pH2-3 的盐酸溶液溶解，用 10mL 的氯仿萃取 3 次，除去氯仿层，用 NaOH 溶液调节水溶液的 pH 值到 9-10，再用氯仿萃取 3 次，蒸干氯仿，用甲醇定容到 10mL 的容量瓶中，作为供试溶液。

处理 5：精密称取样品 0.5g，滴加浓氨水 2mL 浸润，加入 95%的乙醇 20mL，超声处理 50min，以下步骤与处理 4 相同。

b 对照品溶液的制备

分别精密称取新乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品适量，分别置 10 ml 的容量瓶中，用乙腈溶解并定容，摇匀，得各单一成分对照溶液，作为储备液，其他不同浓度的对照品溶液由储备液稀释得到。

c 色谱条件

美国 Zorbax extend-C₁₈(150mm×4.6mm, 5.0μm)色谱柱；流动相为乙腈-0.1%乙二胺；梯度洗脱，时间程序为 0→15→30→35→60min，乙腈体积分数相应为 35%→50%→75%→35%→35%；流速为 1 ml/min；柱温为 30℃；检测波长 240nm。

③ 附子灵含量的测定

测定方法：RP-HPLC-MS 法

a 供试溶液的制备：取附子粉 0.2g，加入到 10ml 的容量瓶中，再加入 10ml

的甲醇，35℃超声 50min，放置过夜，取适量的溶液取适量用 0.45μm 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液（避光，储存在冰箱中）。

b 对照品溶液的制备：分别精密称取附子灵对照品适量，分别置 25ml 的容量瓶中，用甲醇溶解并定容，摇匀，作为储备液，其他不同浓度的对照品溶液由储备液稀释得到。

c 分离条件

色谱条件：色谱柱：polarisC18，5μm，50×2.0mm，柱温 25℃；流动相：甲醇/水=90/10，流速：0.2ml/min；进样量：5μl。质谱条件：离子化方式为正离子电喷雾离子化（ESI）；Needle voltage positive 6000 V；Spray shield voltage positive 600V；Capillary 96V；Drying gas temperature 280℃；m/z=454.3。

3 结果与分析

3.1 激素对附子农艺性状的影响

3.1.1 激素对附子株高的动态影响

株高是营养体生长的主要表现之一，株高的长势的快慢，是附子生长发育过程中内在协调性强弱的外在表现。

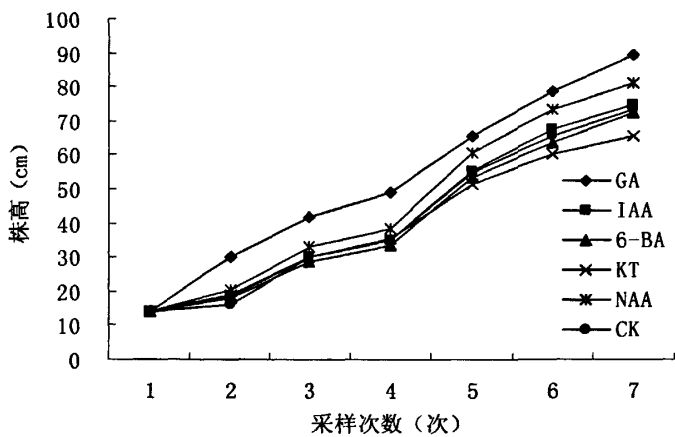


图 3-1 激素对附子株高的影响

Fig. 3-1 Effects of hormones on plant height of *Radix Aconiti*.

不同的激素处理对附子株高的影响存在较大差异（图 3-1），第一次喷施后，各种激素的株高都高于对照，GA 和 NAA 的株高分别为 29.97 cm 和 20.62cm(CK 为 16.24)；IAA（18.63cm）较对照增加了 2.39 cm；两种细胞分裂素 6-BA（17.95 cm）和 KT（18.74 cm）处理的株高和对照的差异不显著。附子进入四月中旬以后，株高的增加呈现较快的趋势，CK 的增速为 1.32 cm/d，在这个时期 IAA 和 NAA 的处理的株高的增加速度最快为：1.35 cm/d 和 1.49 cm/d，其它激素处理的低于对照。随后株高的增加速度逐渐的减慢（CK 为 0.70 cm/d），但是 GA 和 NAA 两激素处理的株高在后期的增加速度仍较高（分别为 0.87 cm/d 和 0.86 cm/d），说明这两种激素对附子的株高有明显的增加作用；两种细胞分裂素的速度为：0.66 cm/d 和 0.60 cm/d，低于对照。在整个生长期 内 GA 和 NAA 两处理始终高于对照和其他激素处理，两细胞分裂素除初期略高于对照外，其余生长期都低于对照，IAA 处理与对照的差异不显著。

3.1.2 激素对附子茎围的动态影响

茎围能直接反映附子茎杆的健壮程度，与附子营养密切相关。不同的激素处理对附子的茎围的影响有明显的差异性。如图 3-2 所示，在第一次喷施后 NAA，IAA 的处理茎围增速最高为 0.1mm/d（CK 为 0.07 mm/d），6-BA 和 KT 的增速为 0.06 mm/d 和 0.05 mm/d，略低于对照，GA 处理的茎围增速最慢(0.04 mm/d)。在四月上旬到五月下旬是茎围增粗的高峰期，在此期间各激素处理的增速的差异不显著基本稳定维持在 0.06-0.09 mm/d 之间，GA 的增速最低为 0.06mm/d，KT 最高（0.09mm/d），其他激素和对照的差异不显著。进入六月份后茎围的增速逐渐的减低为 0.02mm/d，激素间的差异在这期间的增速也稳定。激素对茎围的影响主要是喷施后短期内的差异比较显著，后来的增速激素间的差异不显著。

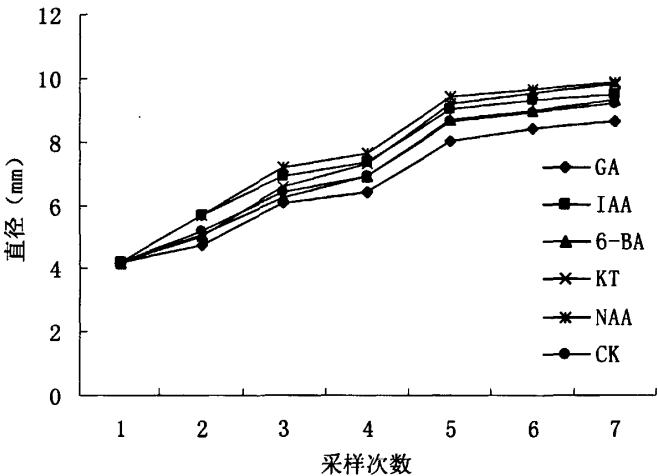


图 3-2 激素对附子茎围的影响

Fig. 3-2 Effects of hormones on stem girth of *Radix Aconiti*.

3.1.3 激素对附子叶片数的动态影响

叶片是附子光合作用的重要器官，它的发生既与自身生长发育规律有关，又受外界环境条件的影响。如图 3-3 所示，在生长初期叶片数主要在增加，激素间的差异不大。但是 4 月 25 号以后，激素间对附子叶片数的影响呈现了差异性。GA 和 NAA 两处理的叶片数达到了 10-11 片左右，明显的多于其它处理和对照差异显著；其他激素处理和对照的叶片数维持在 8-9 片之间，与对照

差异不显著。

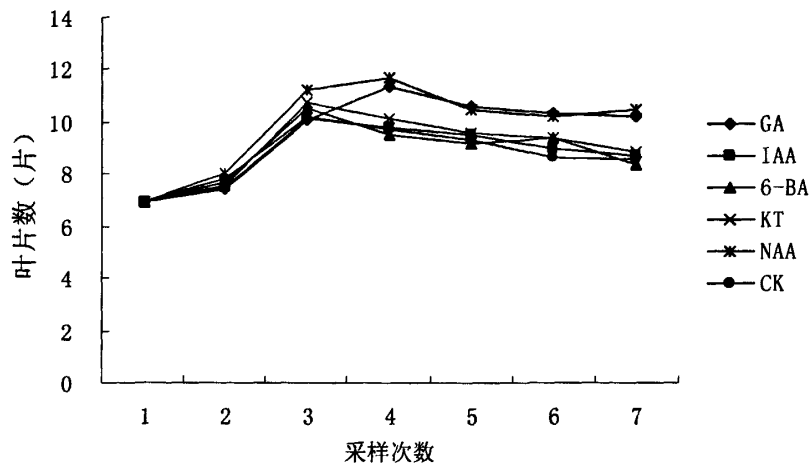


图 3-3 激素对附子叶片数的影响

Fig. 3-3 Effects of hormones on leaves number of *Radix Aconiti*.

3.1.4 激素对子根个数的动态影响

激素对附子子根数的影响（图 3-4），各激素间的差异不显著。子根个数前，中期增加，后期减少是因为发育形成较晚的幼小子根的生长活性小于发育较早的子根，其得到营养供应较少，其中部分子根因营养供应不足而脱落。

3.1.5 激素对附子总生物量的动态影响

如图 3-5 所示，激素对附子生物量的影响在前期的影响不大，只有 NAA 处理的总生物量和对照的差异显著，到四月下旬时为 48.83g/株(CK 为 42.80 g/株)，比对照增加了 6.03 g/株；GA 处理的最低为 39.27 g/株，减少了 3.53 g/株；其他激素处理的和对照的差异不显著。进入五月份后各激素处理的附子生物量的增速呈现了明显的差异性。GA 在四中旬到五月份下旬生物量处在高峰期，达到 1.64g/d 株；到六月份后和 NAA 处理的影响比较接近分别为 1.33g/d 株和 1.27g/d 株；IAA 处理对生物量的影响和 GA 相似，在五月中旬到六月上旬时增加的高峰期为 1.49g/d 株，但是在六月份中旬以后增加量处在一个缓慢期（0.99 g/d 株）。6-BA，KT 和对照（CK）的差异不明显，在中后期生物量增速分别为 0.83 g/d 株、0.61 g/d 株和 0.85 g/d 株，两者的生物量都低于对照。

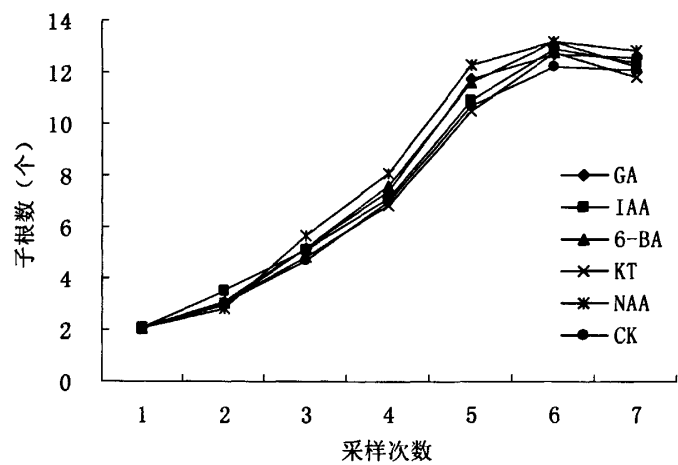


图 3-4 激素对附子子根个数的影响

Fig. 3-3 Effects of hormones on child tubers number of *Radix Aconiti*.

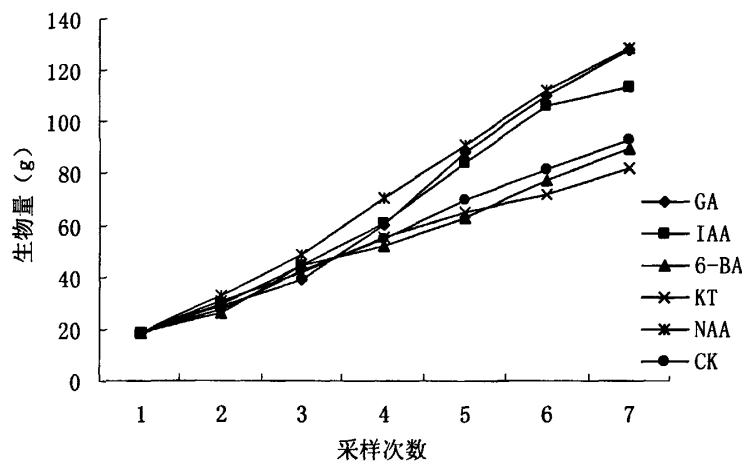


图 3-5 激素对附子生物量的影响

Fig. 3-5 Effects of hormones on biomass of *Radix Aconiti*.

3.1.6 激素对附子子根生物量的动态影响

子根是从靠近母根的茎基部腋芽长出乳白色突点状不定根逐渐膨大形成，有吸收土壤中的水分和矿物质的功能，同时也是最后收获的重要部位，

因此研究激素对子根鲜重动态影响有重要的意义。激素对子根的影响和整个植株的趋势相似，在前期影响不大，五月份中旬后到收获时是子根鲜重增加的重要时期，因此在这段时期内激素对子根的影响表现的也尤为明显。GA 处理在五月份的中下旬和收获前有一个高峰期，日增加量分别为在 0.656g/d 和 0.77g/d，随后子根的重量一直是最高；IAA 处理在四五月份都保持平稳的增加态势，在收获前有一个增加的高峰期，日增长量为 0.77g/d；NAA 处理的子根增加量比较稳定（0.39 g/d），随然在收获前有明显的增加趋势（0.49 g/d），但是低于 GA 和 IAA 两处理；6-BA 和 KT 两处理（0.35 g/d 和 0.30 g/d）和对照（0.29 g/d）的增加趋势相似，对子根的产量的影响也不明显。

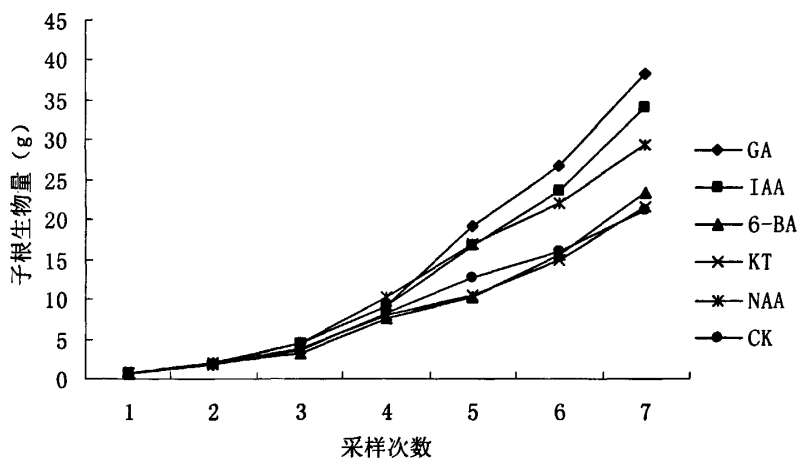


图 3-6 激素对附子子根生物量的影响

Fig. 3-6 Effects of hormones on biomass of child tubers of *Radix Aconiti*.

3.1.7 激素对附子茎叶生物量的动态影响

茎叶是附子进行光合作用的主要器官，其发育状况直接决定和影响整个植株的生长发育。不同激素对附子茎叶生物量的影响来看（图 3-7），前期激素间的差异不显著。NAA 处理的茎叶生物量在各处理中最高，在第三次采样时为 23.79 g/株（CK 为 19.66 g/株），增加了 4.13 g/株，随后茎叶生物量的增速为 0.63 g/d 株，这与 NAA 对附子株高和茎围有明显的增加作用有关；GA 处理在四月份下旬到五月份下旬，有一生长的高峰期(0.87 g/d 株)，随后增加缓慢(0.30 g/d 株)；IAA 处理在五月份后的在增速较稳定（0.54 g/d 株），GA、NAA 和 IAA 三种激素对茎叶生物量的影响在中后期和对照的差异达到显著水

平。6-BA (0.27 g/d 株) 和 KT (0.31 g/d 株) 对附子茎叶的影响和对照 (0.35g/d 株) 的差异不大, 生物量明显低于对照, 这可能是两种细胞分裂素对株高, 叶片数和茎围有一定的抑制作用引起的。

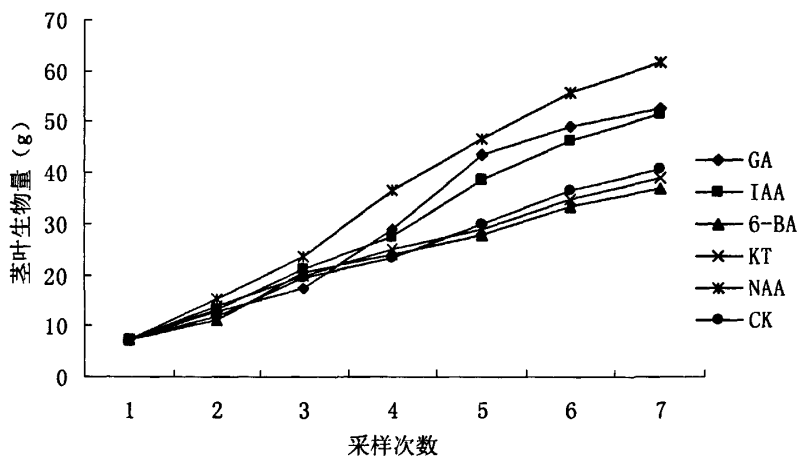


图 3-7 激素对附子茎叶生物量的影响

Fig. 3-7 Effects of hormones on biomass of stems and leaves of *Radix Aconiti*.

3.1.8 激素对子根含水量的动态影响

不同激素对子根含水量的影响见图 3-8, 各激素对子根的含水量的影响和对照的差异不大, 子根刚形成时含水量最高接近 90%, 随后逐渐的下降, 到收获时含水量逐渐的趋于稳定, 含水量稳定在 60%-70%之间。

3.1.9 激素对茎叶含水量的动态影响

激素对附子茎叶中含水量的变化影响不大 (见图 3-9), 整体趋势是逐渐的下降。前期含水量在 80%-90%之间, 前期中 GA 处理的含水量最低, 均低于其他对照和处理。六月份以后各个处理和对照的含水量逐渐趋于稳定, 维持在 70%-80%之间。

3.1.10 激素对附子收获时农艺性状的影响

植物激素对附子农艺性状的影响见表 3-1, 不同的激素对附子的生长特性有明显的作

水平，NAA 对叶片数影响也达到显著水平。这与前人研究的生长素促进细胞的形成伸长，GA 加速细胞的伸长生长，从而使植株高度明显增加的结果一致。细胞分裂素（6-BA、KT）对附子农艺性状基本上作用不大，跟对照的差异不显著，而且对茎叶生物量有一定的抑制作用。

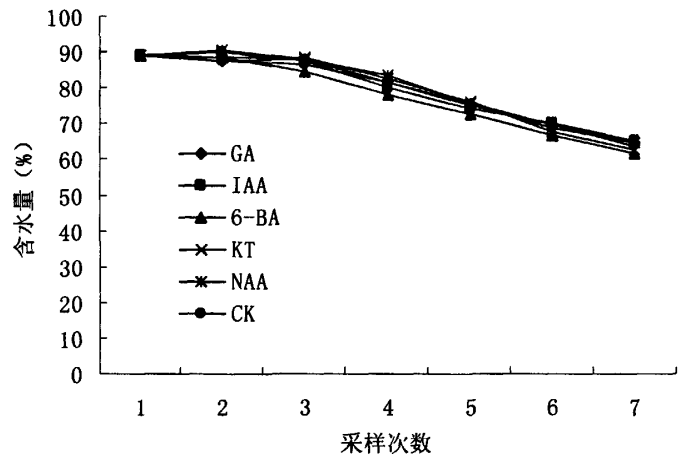


图 3-8 激素对附子子根含水量的影响

Fig. 3-8 Effects of hormones on water content of child tubers of *Radix Aconiti*.

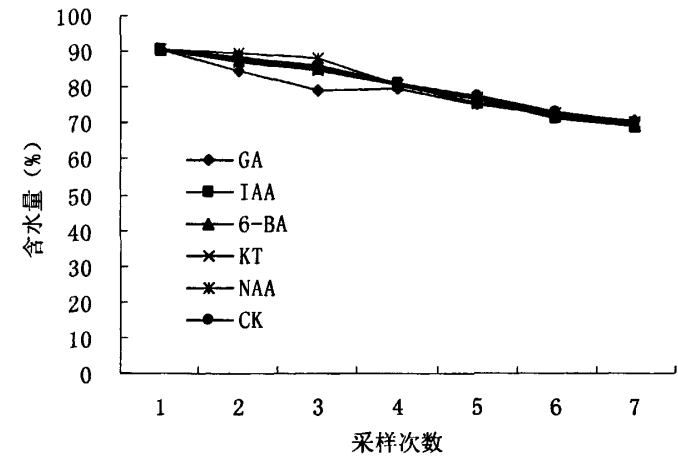


图 3-9 激素对附子茎叶含水量的影响

Fig. 3-9 Effects of hormones on water content of stems and leaves of *Radix Aconiti*.

表 3-1 附子收获时农艺性状方差分析表

Tab. 3-1 Variance analysis of agronomic characteristics of *Radix Aconiti.* at harvest

处理	株高 (cm)	茎围 (mm)	叶片数(个)	生物量 (g)	茎叶生物量(g)
GA	94. 5a	8. 67d	10. 2a	128. 7a	51. 7b
NAA	86. 2b	9. 87a	10. 5a	129. 3a	61. 8a
IAA	80. 0bc	9. 50b	8. 7b	114. 0ab	52. 8b
6-BA	78. 4c	9. 33c	8. 3b	89. 6b	37. 0d
KT	77. 1c	9. 80a	8. 9b	82. 7b	39. 0cd
CK	70. 0d	9. 20c	8. 5b	93. 3ab	40. 7c

注：字母表示处理间在 5%水平下的差异显著水平，相同的字母表示两处理间没有差异，不同的字母表示处理间差异显著。

3.1.11 激素对附子收获时不同组织中含水量的影响

激素对附子各组织中的含水量的影响不大（见图 3-10）。附子各组织中含水量最高的是须根在 76%-83%之间，其次是茎叶（含水量为 70%左右），含水量最低的是子根（61%-65%），母根的含水量为 65%-69%之间。附子各组织中含水量的的大小为须根>茎叶>母根>子根。

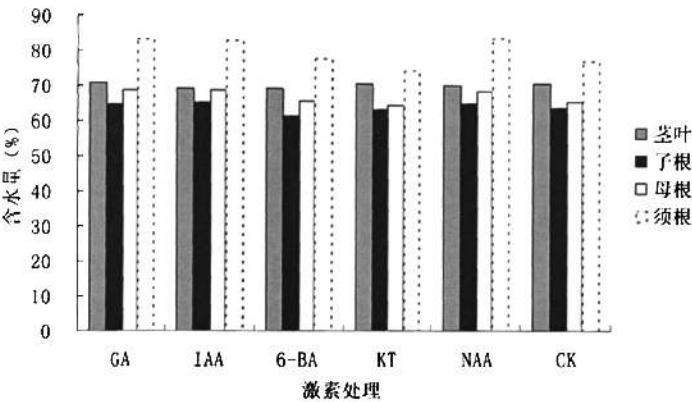


图 3-10 激素对附子收获时不同组织中含水量的影响

Fig.3-10 Effects of hormones on water content in different tissues of *Radix Aconiti.* at harvest

3.1.12 激素对附子收获时不同组织中干物质的影响

激素对附子不同组织干物质的影响（见图 3-11），各激素在附子的各组织中差异都不显著。附子不同组织中干物质率最高的是子根在 35%-38%之间，其次是母根（31%-35%），干物质率最低的是子根（17%-24%），茎叶的干物质率在 29%-31%之间。各组织间干物质率的顺序为子根>母根>茎叶>须根。

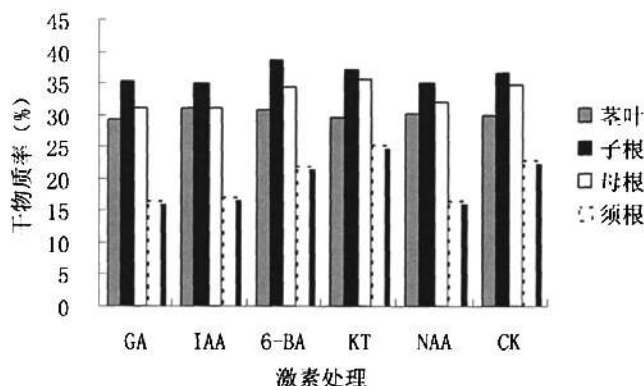


图 3-11 激素对附子收获时不同组织的干物质率的影响

Fig. 3-11 Effects of hormones on dry matter percentage in different tissues of *Radix Aconiti*. at harvest

3.1.13 激素对附子产量的影响

激素对附子子根产量有较大影响，有明显增产作用(表 3-2)。GA 的增产效果最为明显，小区平均产量为 6.7kg，增产量达到 81.1%。IAA、NAA 两种生长素的作用也比较明显，但效果略低于 GA，小区的平均产量分别为 6.0kg 和 5.2kg，增产 62.2%和 40.5%。激素 KT 和 6-BA 的作用不是很明显，小区的平均产量分别是 4.1 kg 和 3.8 kg。附子子根产量方差分析结果（表 3-3），区组间 $F=0.306 < F_{0.05}$ ，区组间子根产量没有差异；处理间 $F=30.504 > F_{0.01}$ ，不同处理间存在极显著差异，说明不同的激素处理对附子子根的产量有明显的影。经最小显著差数法（LSD）分析（见表 3-2），GA、IAA、NAA 三种激素处理与对照间存在极显著差异，而 6-BA、KT 处理与对照间差异不显著；GA、IAA 和 NAA 处理间显著差异。

3.1.14 激素对附子 1+2 子根产量的影响

激素对附子第 1+2 子根产量也有明显影响(表 3-4)。GA、IAA 和 NAA 对

1+2 子根产量的增产效果明显，小区的平均产量分别为 4.1kg、3.7kg 和 3.5kg，增产幅度分别为 70.8%、54.1%和 45.8%，GA 和 NAA 处理间差异极显著，IAA 与 GA、NAA 差异不显著。6-BA 和 KT 对 1+2 子根的产量无显著影响。6-BA、KT 和对照间的差异在两水平下都不显著。通过 LSD 法分析：激素对 1+2 子根在子根总重中占的比例差异不显著，说明激素对 1+2 子根产量在总产量中的比例没有增加，激素对附子产量的增加，是通过所有子根的产量的增加来体现的。

表 3-2 附子产量分析表（n=3）

Tab. 3-2 Analysis of child tubers yields of <i>Radix Aconiti</i> . (n=3)			
处理	平均产量（kg）	增产量（%）	差异显著性
GA	6.7	81.1	Aa
IAA	6.0	62.2	ABb
NAA	5.2	40.5	Bc
6-BA	4.1	10.8	Cd
KT	3.8	2.7	Cd
CK	3.7		Cd

表 3-3 附子 1+2 子根产量方差分析表

Tab. 3-3 Variance analysis of 1+2 child tubers yields of <i>Radix Aconiti</i> .							
试验	变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
子根产量	区组间	2	0.0933	0.0467	0.306	4.10	7.56
	处理间	5	23.285	4.6570	30.504	3.33	5.64
	误差	10	1.5267	0.1527			
	总变异	17	24.905				
1+2 子根产量	区组间	2	0.0811	0.0406	0.503	4.1	7.56
	处理间	5	9.0844	1.8169	22.554	3.33	5.64
	误差	10	0.8056	0.0806			
	总变异	17	9.9711				

表 3-4 附子 1+2 子根产量分析表

Tab. 3-4 Analysis of 1+2 child tubers yields of *Radix Aconiti*.

处理	平均产量 (kg)	占子根重 (%)	增产量 (%)	差异显著性
GA	4.1	60.6	70.8	Aa
IAA	3.7	62.5	54.2	Aab
NAA	3.5	67.2	45.8	Ab
6-BA	2.4	58.8		Bc
KT	2.4	62.4		Bc
CK	2.4	64.3		Bc

3.1.15 激素对附子收获时子根个数的影响

激素对附子子根个数的影响和多重比较（表 3-5），在 5%水平下 NAA 处理对子根个数有增加作用，另外四种激素对子根的影响，它们之间和与对照都没有差异。在 1%的水平下五种激素对子根个数的差异都不显著。

表 3-5 附子子根个数分析表

Tab. 3-5 Analysis of child tubers number of *Radix Aconiti*.

处理	平均数 (个)	差异显著性
NAA	12.8	Aa
GA	12.5	Aab
IAA	12.3	Aab
6-BA	12.2	Aab
CK	12.0	Aab
KT	11.8	Aab

3.1.16 收获时农艺性状的相关性分析

收获时附子的农艺性状（表 3-7）和对照的农艺性状间的相关性分析（表 3-6）来看，茎围和其他农艺性状的相关性都没有达到显著；株高与叶片数、子根个数、总生物量、子根生物量均成正相关，都达到显著水平，其中与总

表 3-6 收获时附子农艺性状的相关性分析(*, p<0.05; **, p<0.01)

Tab. 3-6 Correlation analysis of agronomic characteristics of <i>Radix Aconiti</i> . at harvest(*, p<0.05; **, p<0.01)										
相关系数	茎围	株高	叶片数	子根数	茎叶生物量	总生物量	子根生物量	茎叶含水量	子根含水量	产量
茎围	1									
株高	-0.6	1								
叶片数	-0.04	0.76*	1							
子根个数	-0.09	0.81*	0.77*	1						
茎叶生物量	0.09	0.71	0.85*	0.88**	1					
总生物量	-0.23	0.90**	0.84*	0.91**	0.94**	1				
子根生物量	-0.46	0.83*	0.6	0.63	0.71	0.86*	1			
茎叶含水量	-0.39	0.32	0.46	-0.07	0.02	0.1	0.06	1		
子根含水量	-0.04	0.62	0.65	0.61	0.88**	0.83*	0.75	0.12	1	
茎叶干物质	0.39	-0.32	-0.46	0.07	-0.02	-0.1	-0.06	-1.00**	-0.12	1
子根干物质	0.04	-0.62	-0.65	-0.61	-0.88**	-0.83*	-0.75	-0.12	-1.00**	0.12
1+2 产量	-0.69	0.53	0.05	0.2	0.11	0.37	0.75	-0.14	0.17	0.14
产量	-0.64	0.52	0.1	0.81*	0.16	0.41	0.80*	-0.09	0.26	0.09

表 3-7 植物激素对附子收获时农艺性状的影响

Tab. 3-7 Effects of hormones on the agronomic characteristics of <i>Radix Aconiti</i> . at harvest										
处理	茎围	株高	叶片数	子根数	茎叶生物量	总生物量	子根生物量	茎叶含水量	子根含水量	产量
GA	8.67	89.47	10.2	12.5	52.67	128.67	38.33	70.7	64.7	35.3
IAA	9.50	75.00	8.7	12.3	51.67	114.00	34.00	69.0	65.1	34.9
6-BA	9.33	72.13	8.3	12.2	37.00	89.60	23.40	69.2	61.5	38.5
KT	9.80	65.40	8.9	11.8	39.00	82.67	21.67	70.3	62.9	37.1
NAA	9.87	81.13	10.5	12.8	61.67	129.33	29.33	69.8	64.9	35.1
CK	9.20	73.40	8.5	12.1	40.67	93.27	21.20	70.2	63.4	36.6

生物量的相关性达到极显著水平；叶片数与子根个数、茎叶生物量、总生物量的相关性都达到显著水平；子根数与茎叶生物量、总生物量的相关性都达到极显著水平，与产量也成正相关性，并达到显著；茎叶生物量与总生物量、子根含水量达到极显著水平，同时与子根干物质成负相关；总生物量与子根生物量、子根含水量成正相关性，达到显著水平，与子根干物质成负相关；子根生物量只与产量的相关性达到显著；茎叶、子根的含水量和干物质都呈现负相关；1+2 子根的产量和产量的相关性最高，相关系数达到 0.99，说明附子的产量主要是 1+2 子根的产量，这也是附子在栽培中采用修根等措施，增加 1+2 子根产量的原因。其他的农艺性状之间的相关性都没有达到显著水平。

3.1.17 聚类分析

不同的激素处理对附子农艺性状的效应有明显的差异，采用聚类分析对不同的激素进行分类。由图 3-12 可知激素 IAA 和 NAA 效应接近；激素 KT 对农艺性状的作用可对照的差异不明显；6-BA 的效应大于 KT 和对照，但是小于 IAA 和 NAA；作用最明显的是 GA。GA, NAA, IAA 对附子的农艺性状的作用相似，6-BA 和 KT 两激素的作用不明显。

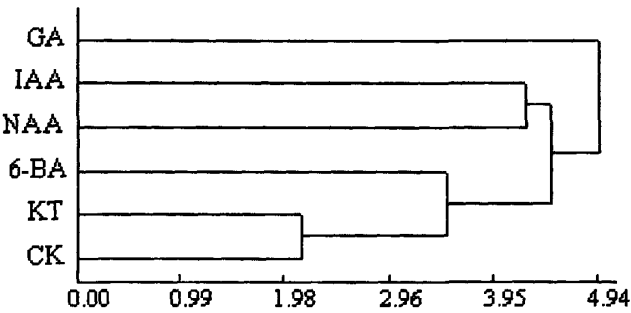


图 3-12 激素对附子农艺性状影响的聚类分析图

Fig. 3-12 Cluster analysis of effects of hormones on agronomic characteristics of *Radix Aconiti*.

3.2 激素对附子生理性状的影响

3.2.1 激素对附子叶绿素含量的影响

叶绿素是叶绿体的重要组成部分，是植物叶片进行光合作用的主要物质基础，在一定范围内叶绿素含量的高低直接影响叶片的光合作用能力，同时叶绿素含量的高低也是叶片功能持续期长短的重要标志。

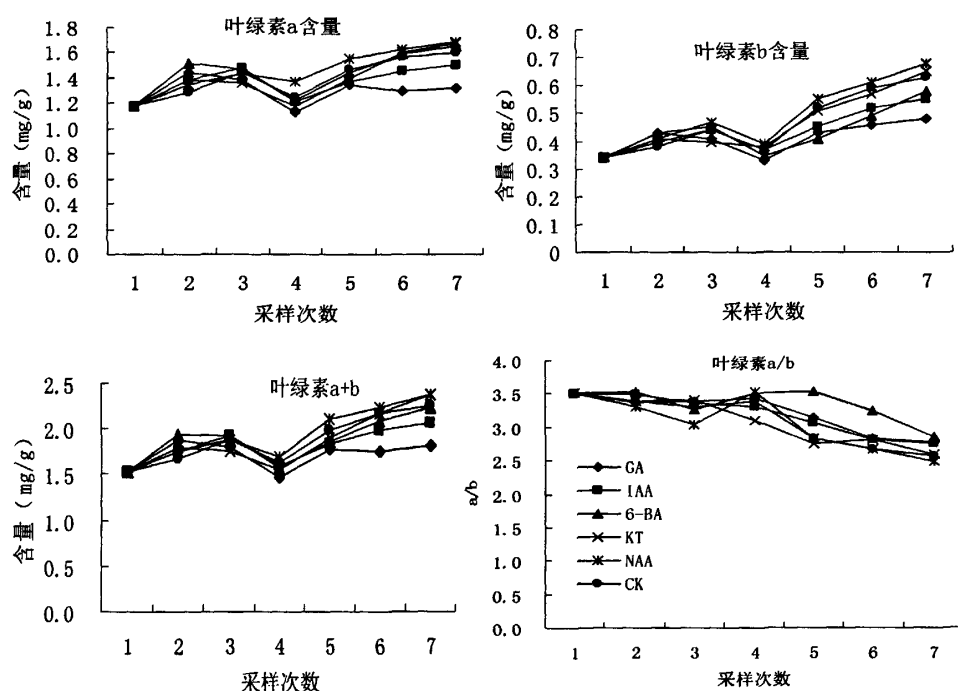


图 3-13 激素对附子叶片中叶绿素 a, b, a+b, a/b 的影响

Fig. 3-13 Effects of hormones on the chlorophyll a, b, a+b, a/b in the leaves of *Radix Aconiti*.

由图 3-13 可知，不同激素对附子生育期内叶绿素的变化，叶绿素 a 的变化比较平稳，在生长初期有明显的升高外，在后期都比较平稳，各激素处理的叶绿素 a 的含量都维持在 1.4mg/g 左右。在前期叶绿素 a 的含量差异不大，第一次喷施后 6-BA 对叶绿素 a 的含量有一个短时间内的迅速升高；GA 在后期对叶绿素 a 的含量有抑制作用；IAA 对叶绿素 a 含量的影响和 GA 有相似之处；NAA 对叶绿素 a 含量在后期始终有增加的作用。由方差分析可知：收获

时 NAA, KT 对叶绿素 a 的含量有显著的增加作用 (分别增加了 4.97%和 4.35 %); 6-BA 和对照间的差异不显著; IAA 和 GA 对叶绿素 a 的含量有显著的抑制作用 (分别比对照减少了 6.21%和 17.39%)。在生长过程中叶绿素 a 的含量有一次明显的降低, 可能是因为连续的降雨, 促使叶绿素 a 的合成受阻, 同时分解的速度增加, 因此含量有短时间的降低。不同的激素处理间比较可知: 两种细胞分裂素、NAA 对叶绿素 a 的含量有增加的作用, GA、IAA 对叶绿素 a 的含量有抑制作用。

表 3-8 收获时附子叶片中叶绿素和类胡萝卜素方差分析表

Tab.3-8 Variance analysis of chlorophyll and carotenoids the leaves of *Radix Aconiti.* at harvest

处理	叶绿素 a (mg/g)	叶绿素 b (mg/g)	叶绿素 a+b (mg/g)	叶绿素 a/b	类胡萝卜素 (mg/g)
NAA	1.69Aa	0.68Aa	2.37Aa	2.49Cd	0.48Aa
KT	1.68Aa	0.65Aa	2.37Aa	2.58Bbc	0.47Aa
6-BA	1.65Aab	0.58Cc	2.23Bb	2.84Aa	0.47Aa
CK	1.61Bb	0.63Bb	2.25Bb	2.56Bc	0.47Aa
IAA	1.51Cc	0.55Dd	2.07Cc	2.75Aab	0.46Ab
GA	1.33Dd	0.48Ee	1.82Dd	2.77Aa	0.47Aa

叶绿素 b 的含量在附子生长过程中总的趋势是增加。激素间对叶绿素 b 的含量也有明显的差异, NAA 对叶绿素 b 的含量有增加作用, KT 和对照相比也有增加作用; 6-BA 在收获前对叶绿素 b 的含量有显著的增加作用; IAA 和 GA 对叶绿素 b 的含量也有抑制作用。收获时激素间的比较可知: NAA 和 KT 对叶绿素 b 有显著的增加, 分别比对照增加了 7.94%和 3.18%; 6-BA、IAA、GA 对叶绿素 b 都有抑制作用, 较对照分别减少了 7.94%、12.70%和 23.81%。

叶绿素 a+b 的含量的趋势和叶绿素 b 的含量的趋势相似, 由于叶绿素 a 含量变化平稳, 叶绿素 b 的含量呈增加的趋势, 不同激素对叶绿素 a+b 的含量的影响与激素对叶绿素 a、b 含量的影响相似, NAA、KT 对叶绿素 a+b 的含量有增加的作用, 6-BA 对其影响不大; IAA 和 GA 有抑制作用。这与前人研究的细胞分裂素和 NAA 对叶绿素有增加作用, 而赤霉素, 生长素对植物叶

片的叶绿素的增加不是普遍的比较相似。

叶绿素 a/b 总的趋势呈现下降趋势，但在降雨的过程中 NAA 对叶绿素 a 的降解有阻止作用，对叶绿素 b 含量和其他激素差异不大，因此 a/b 的值较大；不同激素间处理对 a/b 的影响不是很明显，下降的趋势也很平稳；但是 6-BA 对附子后期叶绿素 b 的含量有明显的增加作用，因此 a/b 的下降的趋势较其他激素剧烈。

3.2.2 激素对附子类胡萝卜素含量的影响

总类胡萝卜素的含量随着附子生育期的推进呈上升的趋势（图 3-14），不同的激素处理间对类胡萝卜素的含量影响不显著，不同激素在附子的不同时期对其含量的影响也不同。6-BA 和 KT 在整个发育期内，对类胡萝卜素都有增加的作用，但在收获前 6-BA 对其含量有减少的作用；NAA 对其含量的影响，都低于对照；GA 和 IAA 处理的附子中类胡萝卜素的含量与对照的含量差异不显著。收获时不同处理间的差异不显著。在第 4 次样时激素处理的含量都明显的低于对照（降雨），说明激素对叶类胡萝卜素含量在此条件下有降低作用。

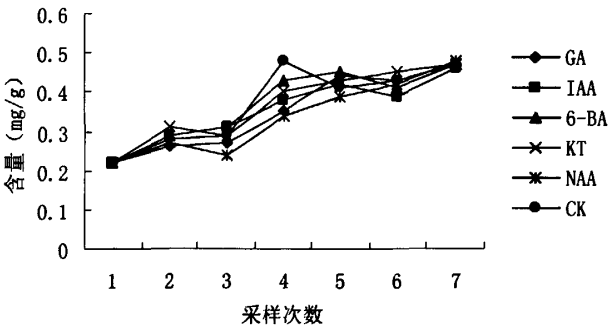


图 3-14 激素对附子叶片中类胡萝卜素含量的影响

Fig. 3-14 Effects of hormones on the ditermination of carotenoids

类胡萝卜素在整个生育期内呈上升的趋势，这与它在光合作用的功能相关，附子收获时，营养生长达到最大，此时子根的生物产量达到最大，是附子的最佳收获时期。但是附子的生殖生长还没有进行，附子叶片还进行同化作用，所以类胡萝卜素的含量呈现上升的趋势。

3.2.3 激素对过氧化氢酶(CAT)的影响

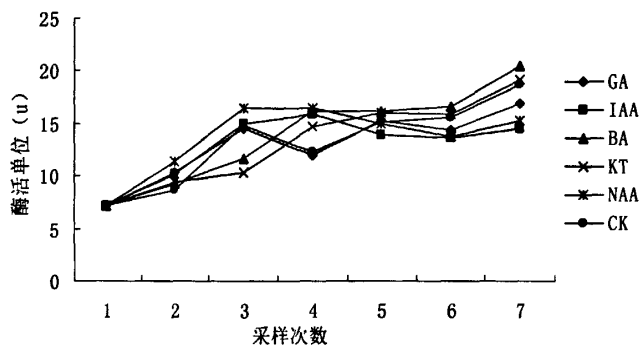


图 3-15 激素对 CAT 活性的影响

Fig.3-15 Effects of hormones on the activity of CAT

附子生长过程中过氧化氢酶活性的影响(图 3-15)。过氧化氢酶活性的变化趋势是前期升高，中期变化变化平稳，后期略有升高。前期升高可能是因为植物处在生长的高峰期，细胞代谢比较旺盛，因此酶的活性逐渐升高；中期植株体内的各种代谢处在一个平衡时期，在没有逆境的条件下，变化不明显；后期稍微升高，可能是进入夏季温度逐渐升高和部分叶片的衰老引起了过氧化氢酶活性有升高的趋势。

不同激素对附子发育过程中 CAT 酶活性的影响可知，NAA 对苗期的活性有显著的提高作用，高于其他激素，在中后期却开始抑制了其活性，收获时明显低于对照；IAA 和 GA 在前期和对照相比差异不明显，在进入五月中旬后对 CAT 的活性也开始有抑制作用，收获时也明显的低于对照；6-BA 和 KT 在前期对酶的活性有抑制作用，但在四月份以后对其有逐渐增加其活性的作用，在收获时对过氧化氢酶的活性增加的最大；两种细胞分裂素相比 6-BA 对 CAT 活性的增加作用要高于 KT。

3.2.4 激素对过氧化物酶（POD）的影响

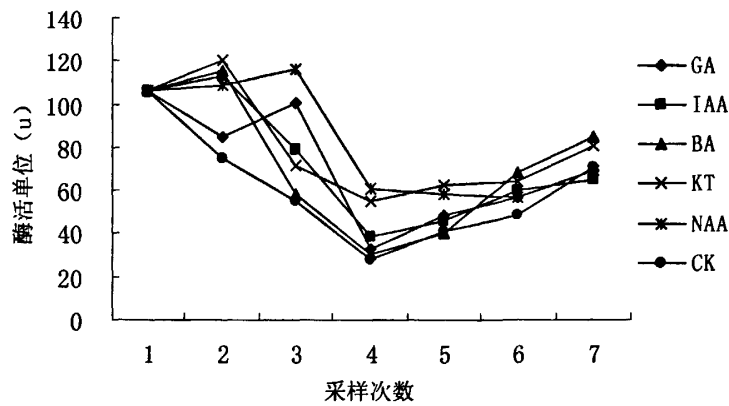


图 3-16 激素对 POD 活性的影响

Fig.3-16 Effects of hormones on the activity of POD

过氧化物酶活性在附子生长发育的变化趋势是前期逐渐降低，中后期有升高的趋势。苗期 POD 活性较高，可能是因为气温比较低，植株较小，长势较弱的缘故。同时，POD 酶在植物体内有两重性的作用，一方面是对植物的保护作用；另一方面是它参与叶绿素的降解、活性氧的产生，并能引发膜脂过氧化，为一种伤害性反应^[157,158]，因此在苗期的活性有逐渐降低的趋势；中后期活性逐渐的升高，可能是因为温度升高和中后期叶片有部分的衰老引起的。植物不同发育阶段的 POD 同工酶可能受基因调控或其它水平的调控，不同作物或品种所含 POD 机制可能不同，有些可能只包含有一种机制，有些则可能 2 种机制都有。

不同激素对附子生长发育过程中 POD 活性的影响（图 3-16），在植株的整个发育时期各激素处理的 POD 活性均高于对照。苗期 6-BA、KT 对 POD 活性的提高作用较明显，高于其他激素处理；IAA、NAA 和 GA 也有提高作用，但是效果低于两中细胞分裂素，三种激素比较 NAA>IAA>GA。苗期 POD 酶活性降低时 NAA 和 GA 有一个突然的增加的作用在中后期，6-BA、KT 对 POD 酶活性的增加作用逐渐的增强；其他激素和对照在后期的差异逐渐的缩小，收获时 IAA、NAA、GA 处理的 POD 活性均低于对照。

3.2.5 激素对脯氨酸含量的影响

当用磺基水杨酸提取植株中的脯氨酸时，脯氨酸游离于其中，然后用酸

性茛三酮加热处理后，溶液即成为红色，用甲苯萃取溶液中的色素，色素的深浅即表示脯氨酸含量的高低。脯氨酸标准曲线的浓度和吸光度见下表：

表 3-9 标准脯氨酸的浓度与吸光度

Tab.3-9 Concentration and absorbance of proline						
浓度（ μ g/ml）	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.053	0.102	0.166	0.239	0.287	0.333

以脯氨酸的浓度（ μ g/ml）为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，求得回归方程： $y=0.0579x-0.0061$ ， $r=0.9945$ ，脯氨酸的浓度在 $0.5-6 \mu$ g/ml 范围内，其吸收度与浓度呈良好的线性关系。

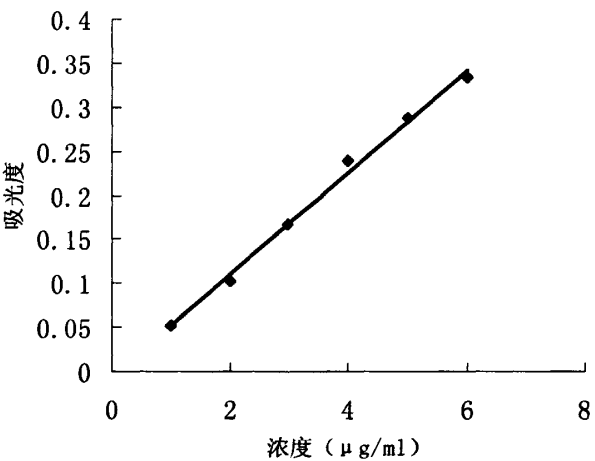


图 3-17 脯氨酸标准曲线

Fig. 3-17 Standard curve of proline

不同激素对附子生长过程中脯氨酸含量变化的影响（图 3-18），在整个过程中各激素处理的脯氨酸含量都在 $3-6.5 \mu$ g/g 之间，变化不是很大，比较平稳，说明附子在生长过程中没有受到环境的胁迫。不同激素处理间也有不同，6-BA 处理的植株在整个发育过程中对脯氨酸的含量有抑制作用，含量都低于其他

激素处理和对照；KT 和 NAA 两处理对脯氨酸含量影响的差异不明显，含量变化相似，在收获时脯氨酸的含量明显的高于其他处理和对照；GA 和 IAA 两处理的影响具有不稳定性，在不同时期含量变化的幅度比较大，GA 处理的脯氨酸含量在发育过程的大部分时间都小于对照。

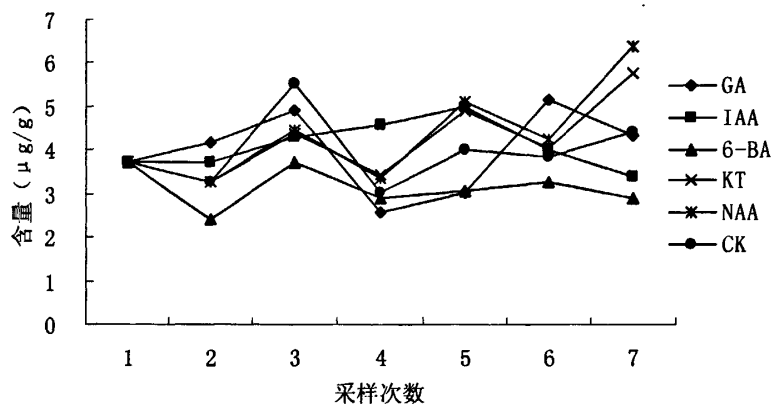


图 3-18 激素对脯氨酸含量的影响

Fig. 3-18 Effects of hormones on the ditermination of praline

3.2.6 激素对谷草转氨酶（GOT）活性的影响

谷草转氨酶在附子整个生育期内呈现上升的趋势，但是上升的比较平缓，在前期和中期基本上保持平稳（图 3-19）。不同的激素间对 GOT 的活性作用也不同，GA 处理在第一次喷施激素后 GOT 的活性有个明显的增加，在中期却明显的低于其他激素和对照，后期又呈现了明显上升的趋势，收获时高于其他处理和对照。IAA、6-BA、KT 和 NAA 在生长过程中对 GOT 的影响呈现了中等水平，和对照的差异不显著，在中后期 IAA 比较稳定基本上维持在一个水平，在最后有稍微的升高。第四次采样时活性的降低可能是有连续的阴雨天气引起。

3.2.7 激素对谷丙转氨酶(GPT)活性的影响

谷丙转氨酶是植物体内另外一种参与氮转化的酶。谷丙转氨酶在附子的发育过程中比较平稳，第三次采样时有明显的增加，第四次采样时有减低外

(可能是有连续的阴雨天气引起)。GA 对 GPT 的影响比较明显，在几种激素处理间处于中上水平，在生长过程中起伏不大；IAA 处理对 GPT 的影响最平稳，在生长中基本上都保持在一个水平上；KT 处理对 GPT 活性有较大的起伏性，在前期有增加的作用，后期有抑制的作用，说明该激素可以增加附子苗期 GPT 的活性；6-BA 和 NAA 两处理的影响比较接近，对 GPT 的影响基本上是抑制作用，都低于其他激素处理和对照，但 NAA 处理在后期有增加其活性的作用。

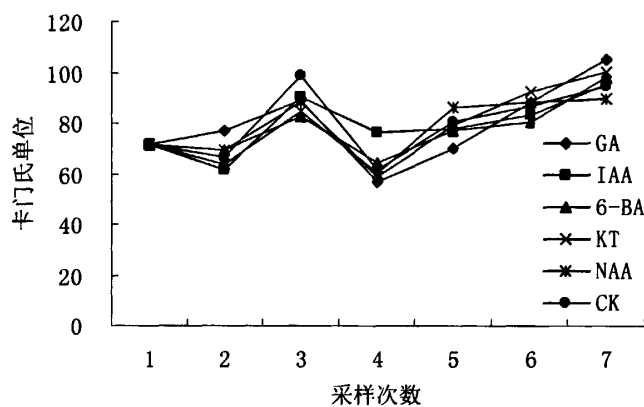


图 3-19 激素对附子 GPT 活性的影响

Fig. 3-19 Effects of hormones on the activity of GPT

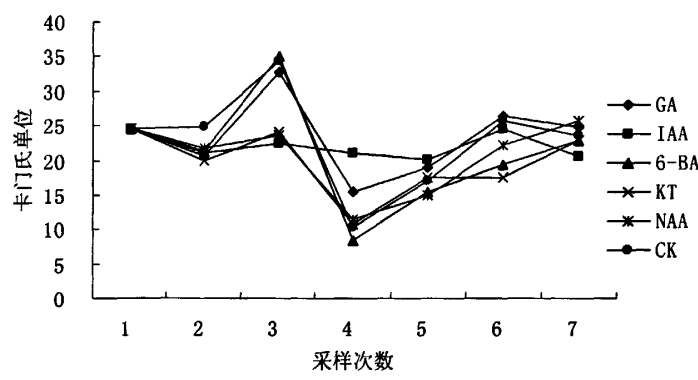


图 3-20 激素对附子 GPT 活性的影响

Fig. 3-20 Effects of hormones on the activity of GPT

3.3 激素对附子品质的影响

3.3.1 激素对淀粉含量的影响

淀粉是由葡萄糖残基组成的多糖，酸性条件下加热使其水解成葡萄糖，在浓硫酸的作用下单糖脱水生成糠醛类化合物，利用蒽酮试剂与水解的化合物发生显色反应，可利用比色法测定淀粉的含量，标准曲线的淀粉含量和吸光度见下表：

表 3-10 标准淀粉含量及吸光度						
Tab. 3-10 Content and absorbance of control starch						
淀粉含量/ μg	0	40	80	120	160	200
吸光度	0	0.206	0.403	0.609	0.828	1.010

以淀粉的含量（ μg ）为纵坐标，以吸光度 X 为横坐标，绘制标准曲线，求得回归方程： $y=196.5x-0.0837$ ， $r=0.9996$ ，淀粉含量在 $2\text{-}50\mu\text{g/ml}$ 范围内，其吸收度与淀粉含量呈良好的线性关系。

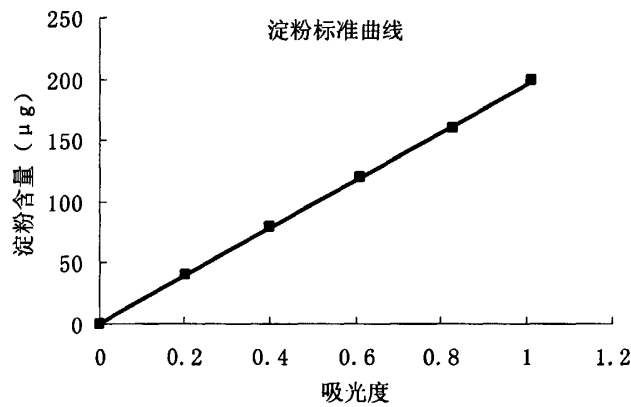


图 3-21 可溶性淀粉标准曲线

Fig. 3-21 Standard curve of soluble starch

淀粉是附子中含量最高的成分，也是主要物质，淀粉含量的高低与附子

产量有明显的关系，因此研究淀粉含量，对研究激素对附子产量，1+2 子根产量都有重要的意义。

表 3-11 淀粉含量方差分析表

Tab.3-11 Variance analysis of the determination of starch						
变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	F _{0.05}	F _{0.01}
区组间	2	1.2532	0.6266	1.347		
处理间	5	888.6227	177.7245	382.017		
误差	10	4.6523	0.4652			
总变异	17	894.5282				

表 3-12 淀粉含量分析表

Tab.3-12 Analysis of the determination of starch				
处理	含量 (%)	淀粉增加量 (%)	差异显著性	
			5%	1%
NAA	66.47	13.26	a	A
CK	58.69		b	B
GA	56.86	-3.12	c	B
6-BA	51.14	-12.86	d	C
KT	47.02	-19.88	e	D
IAA	46.59	-22.32	e	D

不同激素处理的附子中淀粉含量见表 3-12，由方差分析表（表 3-11）可知，激素处理的区组间差异不显著，处理间差异达到极显著水平。五种激素处理中只有 NAA 处理的淀粉含量最高（66.47%）且比对照增加 13.26%，其他四种激素处理的附子中淀粉含量都明显的低于对照并且达到的显著水平，说明激素对附子的淀粉含量有明显的作用。GA 处理的附子淀粉含量是 56.86%，比对照减少了 3.12%，与对照的差异达到显著水平。两种细胞分裂素处理的淀粉含量分别为 51.14%和 47.02%，比对照减少了 12.86%和 19.88%，

两处理间差异达到极显著水平，说明不同的细胞分裂素对淀粉含量的影响也有不同的作用。IAA 的抑制作用在五种激素中最为明显，淀粉含量为 46.59%，与对照减少了 22.32%。

3.3.2 激素对总糖含量的影响

蒽酮比色法是测定植物样品中总糖的一个灵敏、快速、简便的方法。蒽酮不仅能和单糖也可以与双糖、糊精、淀粉等作用。糖类在较高的温度下被硫酸作用脱水生成糠醛或糠醛衍生物后与蒽酮缩合成蓝色化合物，蒽酮反应生成的颜色与糖量成正比。在多糖测定中以葡萄糖为标准品，葡萄糖含量和吸光度如下表：

表 3-13 标准葡萄糖含量及吸光度							
Tab. 3-13	Concentration and absorbance of control glucose						
葡萄糖含量/μg	0	10	20	30	40	60	80
吸光度	0	0.017	0.035	0.053	0.076	0.110	0.148

以葡萄糖的含量（μg）为纵坐标，以吸光度 X 为横坐标，绘制标准曲线，求得回归方程： $y=536.38x+0.6471$ ， $r=0.9992$ ，葡萄糖含量在在 10-160 μg/ml 范围内，其吸收度与葡萄糖的浓度呈良好的线性关系。

总糖是指附子中的还原糖以及在硫酸蒽酮法测定条件下能水解成还原性的蔗糖，麦芽糖等的成分。糖类是附子中的第二大主要成分，激素对附子总糖的影响非常明显，各种激素处理的附子总糖含量（见表 3-14）。通过方差分析可知区组间差异不显著，处理间差异显著，同时各处理间和处理与对照间差异都达到了极显著水平。各种激素处理中 IAA 对多糖含量的增加作用最为明显（含量为 31.35%），比对照增加了 74.5%；KT、GA、6-BA 三种激素处理的附子总糖含量分别 25.97%、24.40%、22.36%，分别较对照增加了 44.5%、35.8%、24.4%，三种处理间的差异都达到极显著水平。五种激素中 NAA 对总糖含量的增加最小，含量为 19.37%，比对照增加了 7.79%。激素对附子中总糖的含量影响非常的显著，各种激素对总糖的含量都有增加作用。

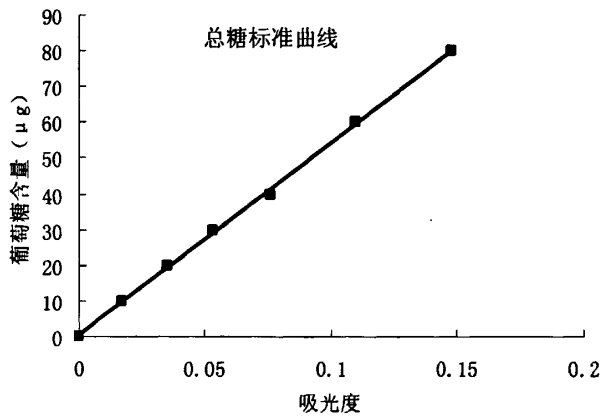


图 3-22 总糖标准曲线

Fig. 3-22 Standard curve of total sugar

表 3-14 总糖含量分析表

Tab. 3-14 Analysis of the determination of total sugar

处理	总糖含量 (%)	总糖增加量 (%)	差异显著性	
			5%	1%
IAA	31.35	74.5	a	A
KT	25.97	44.5	b	B
GA	24.40	35.8	c	C
6-BA	22.36	24.4	d	D
NAA	19.37	7.79	e	E
CK	17.97		f	F

3.3.3 激素对附子可溶性糖含量的影响

可溶性糖是附子主要同化物和运输物质，它主要包括蔗糖、葡萄糖和果糖，它在源中合成，再转移到库中，经过代谢合成淀粉和氨基酸。可溶性糖还有提高细胞渗透浓度来启动 ABA 的合成，进而诱导有关抗逆蛋白的合成，从而增加抗性的功能。可溶性糖含量用蒽酮比色法测定，用蔗糖作为对照品，蔗糖含量和吸光度见表 3-15。

以蔗糖的含量（ μg ）为纵坐标，以吸光度 X 为横坐标，绘制标准曲线，求得回归方程： $y=164.81x+1.9861$ ， $r=0.9987$ ，蔗糖含量在在 $10\text{-}100\mu\text{g/ml}$ 范围内，其吸收度与蔗糖的浓度呈良好的线性关系。

表 3-15 蔗糖含量及吸光度

Tab. 3-15 Concentration and absorbance of sucrose						
蔗糖含量/ μg	0	20	40	60	80	100
吸光度	0	0.102	0.226	0.344	0.475	0.601

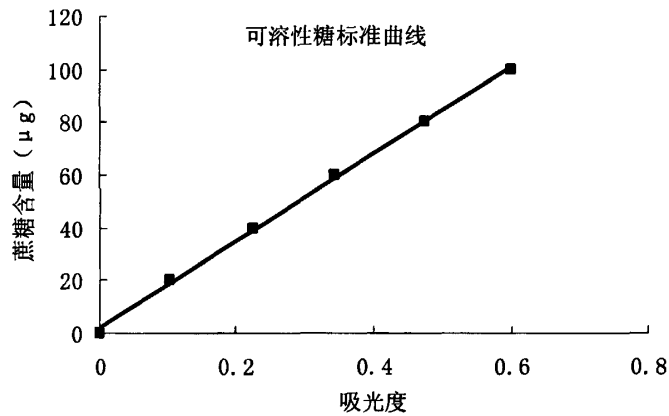


图 3-23 可溶性糖的标准曲线

Fig. 3-23 Standard curve of soluble sugar

不同激素处理的可溶性糖的含量（图 3-24）。通过方差分析可知区组间差异不显著，处理间差异显著。五种激素对可溶性糖的含量的影响达到极显著水平，各激素处理可溶性糖含量都低于对照。五种激素中，6-BA、KT 两种细胞分裂素处理的附子可溶性糖含量在五种激素中处于较高水平，含量分别为 12.57%和 12.49%，分别比对照低 0.868%和 1.498%，两者的差异不显著，但是 KT 处理和对照间的差异达到极显著水平，6-BA 处理和对照的差异不显著。IAA 和 GA 两种处理在五种激素中处于中等水平，可溶性糖的含量分别为 11.79%和 11.73%，与对照相比含量分别下降了 7.02%和 7.49%，两处理间差异不显著。NAA 处理对可溶性的含量（11.28%）影响最为明显，比对照下降

了 11.04%。

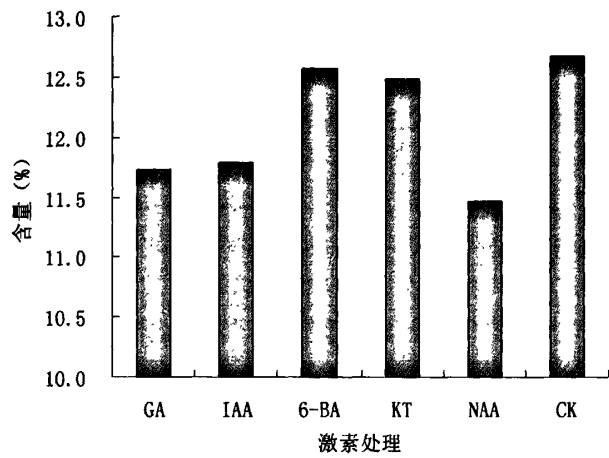


图 3-24 激素对附子中可溶性糖含量的影响

Fig. 3-24 Effects of hormones on the ditermination of soluble sugar

3.3.4 激素对可溶性蛋白质含量的影响

考马斯亮蓝 G-250 测定蛋白质含量属于染料结合法，考马斯亮蓝在稀酸溶液中，与蛋白质的疏水微区结合后变为青色，最大吸光度在 595nm，在一定浓度范围内蛋白质的含量和吸光度成正比，如下表：

表 3-16 标准蛋白质含量及吸光度						
Tab. 3-16 Concentration and absorbance of control protein						
蛋白质含量/μg	0	20	40	60	80	100
吸光度	0	0.113	0.228	0.334	0.427	0.520

以蛋白质的浓度（μg/ml）为纵坐标，以吸光度 X 为横坐标，绘制标准曲线，求得回归方程：y=191.44x-1.7522，r=0.9977，每管的氮含量在 10-160 μg/ml 范围内，其吸收度与氨基酸浓度呈良好的线性关系。

植物体内的可溶性蛋白质含量是一个重要的生理生化指标，同时蛋白质也是附子的重要的品质指标之一，因此研究附子子根中可溶性蛋白质含量对附子的品质，以及储藏加工，质量控制都有重要的意义。

附子中可溶性蛋白质含量（图 3-26），由方差分析可知，区组间的差异不显著，处理间差异显著。不同激素处理的附子中蛋白质含量有明显的差异性都低于对照的含量。附子对照中蛋白质含量为 4.403mg/g，激素处理中 NAA 的可溶性蛋白质含量最高含量为 4.379 mg/g，与对照差异不显著，说明 NAA 处理对蛋白质含量影响不大；两种细胞分裂素 6-BA、KT 在五种激素处理中蛋白质含量处于中等水平，含量分别为 4.270 mg/g 和 4.208 mg/g，与对照差异达到极显著水平，比对照含量分别减少 3.02%和 4.29%，但两种激素间的差异不显著，说明这两种激素对蛋白质含量的作用相同；IAA 和 GA 两处理对蛋白

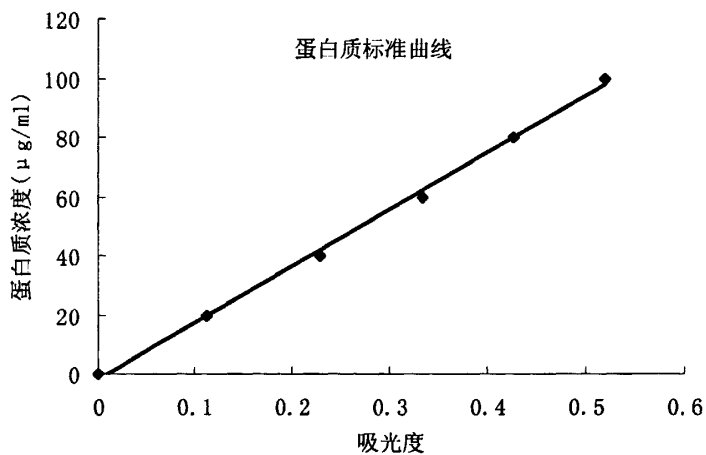


图 3-25 蛋白质标准曲线

Fig. 3-25 Standard curve of protein

质的含量有明显的抑制作用，含量分别为 4.167 mg/g 和 4.001 mg/g，明显的低于对照和其他激素处理，与对照相比蛋白质含量下降了 5.36%和 9.13%，两者的差异也达到了极显著水平，GA 处理的抑制作用最明显，显著的高与其他激素，说明附子中可溶性蛋白质含量对不同激素处理的敏感程度不同。

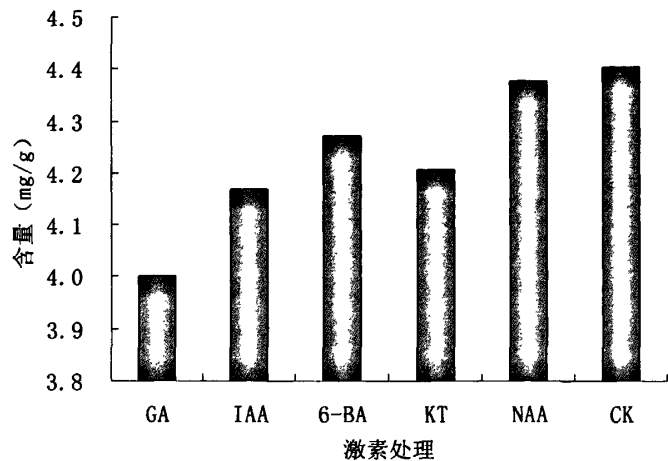


图 3-26 激素对附子中可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 3-26 Effects of hormones on the ditermination of soluble protein

3.3.5 激素对游离氨基酸总量的影响

氨基酸与茚三酮共热时，可以生成蓝紫色的二酮茚胺，在一定的范围内吸光度与氨基酸浓度成正比（表 3-16）。

表 3-16 标准氨基酸含量及吸光度

Tab. 3-16 Concentration and absorbance of control amino acid						
每管含氮量/ μg	0	1	2	3	4	5
吸光度	0	0.049	0.096	0.149	0.196	0.254

以氨基酸的浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）为纵坐标，以吸光度 X 为横坐标，绘制标准曲线，求得回归方程： $y=19.823x+0.042$ ， $r=0.9991$ ，每管的氮含量在 $2\text{--}50\mu\text{g/ml}$ 范围内，其吸收度与氨基酸浓度呈良好的线性关系。

氨基酸是组成蛋白质的基本单位，也是蛋白质的分解产物。植物根系吸收，同化的氮素主要以氨基酸和酰胺的形式运输。所以测定植物组织中游离氨基酸的含量对于研究根系生理、氮素代谢有一定得意义。

不同激素对附子子根中游离总氨基酸含量的影响由方差分析表可知，区组间 $F=0.260<F_{0.05}$ ，处理间差异不显著。不同激素处理见的差异显著，各个处理间都达到极显著水平。GA，KT 两处理的附子子根的游离氨基酸总量含量最高分别达到 0.9832 和 0.9267mg/g ，比对照的氨基酸含量分别增加 23.6%

和 16.5%；细胞分离素 6-BA 和生长素 IAA 处理处在中等水平，氨基酸含量分别为 0.8860 和 0.8455 mg/g，比对照的氨基酸含量分别增加 11.4%和 6.31%；NAA 处理的氨基酸含量在五种激素处理中最低，只有 0.7728 mg/g，比对照减少 2.83%，仅在 5%水平下与对照的差异显著。五种激素处理对附子游离氨基酸含量除 NAA 外都明显高于对照对照，同时差异都达到极显著水平，说明激素对氨基酸有明显的影响。

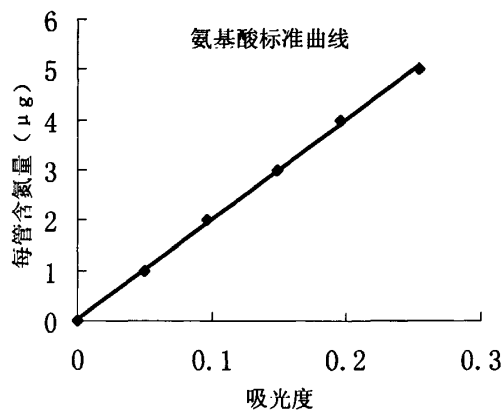


图 3-27 氨基酸标准曲线

Fig. 3-27 Standard curve of amino acid

表 3-17 游离氨基酸含量分析表

Tab. 3-17 Analysis of the determination of free amino acid				
处理	含量 (mg/g)	氨基酸增加量 (%)	差异显著性	
			5%	1%
GA	0.9832	23.6	a	A
KT	0.9267	16.5	b	B
6-BA	0.8860	11.4	c	C
IAA	0.8455	6.31	d	D
CK	0.7953		e	E
NAA	0.7728	-2.83	f	E

3.3.6 激素对多糖含量影响

采用蒽酮—硫酸法。以糖浓度(C, $\mu\text{g/L}$)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线 (图 3-28), 得回归方程 $A=0.0052x-0.0027$, $r=0.9992$, 葡萄糖在 $5\sim100\mu\text{g/L}$ 与吸光度呈良好的线性关系。

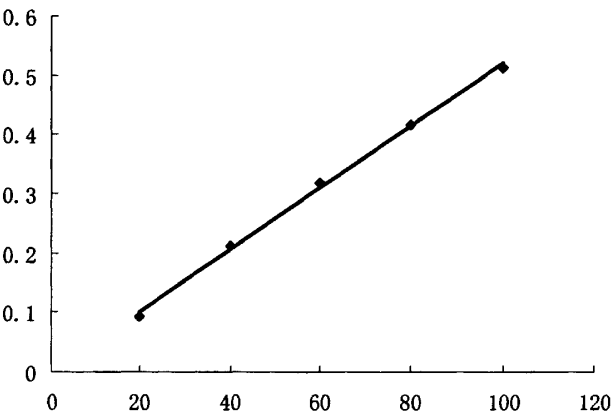


图 3-28 多糖标准曲线

Fig.3-28 Standard curve of polysaccharide

(1) 重现性试验

结果表明该检测方法的重现性较好, $RSD=1.83\%$ 。

表 3-18 附子多糖含量测定重现性结果

Table3-18 Reproduction test of polysaccharide

编 号	1	2	3	4	5
多糖含量(%)	3.38	3.45	3.29	3.34	3.41

(2) 稳定性试验

吸光度在 6h 内无明显变化, 比较稳定, $RSD=1.70\%$ 。

表 3-19 附子多糖含量测定稳定性结果

Table 3-19 Stability test of polysaccharide

时间(h)	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.602	0.598	0.579	0.608	0.594	0.590

(3) 加样回收试验

精密称取 5 份附子样品各 1.0g，分别加入约 30mg 多糖，按照“2.2.3 中多糖含量测定中④”操作，测得吸光度，计算回收率（R）。回收率=90.4%，RSD=1.58%(n=5)。

表 3-20 附子多糖测定回收试验结果

Table 3-20		Analysis of content of recovery of polysaccharide					
编 号	取样量	原含量	加样量	测定量	回收率	平均回	RSD%
	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(%)	收率(%)	
1	1.004	32.56	29.99	62.55	92.1	90.4	1.58
2	1.003	33.07	29.32	62.37	88.6		
3	1.006	33.71	30.10	63.81	89.3		
4	1.000	33.82	30.60	64.42	90.5		
5	1.001	33.76	30.82	64.58	91.3		

(4) 激素对附子多糖含量的影响

精密吸取样品液 1 mL 于具塞试管中，按照蒽酮-硫酸法测定吸光度，按回归方程计算样品液中葡萄糖的浓度，按照下面公式计算附子粉中多糖的含量。样品中含量(%) = (CD / W Rf) × 100%。式中：C 为样品液中葡萄糖的浓度，D 为稀释倍数，f 为换算因子，W 为样品质量，R 为回收率。各处理样品中多糖含量和方差分析表见表 3-21。

激素对附子多糖的含量的影响（表 3-21，22），区组间的方差分析可知： $F=0.091 < F_{0.05}$ ，说明多糖含量在区组间没有差异；处理间 $F=106.248 > F_{0.05}$ ，说明不同的激素间差异具有明显的差异性，多糖对不同激素的敏感性存在差异。GA，NAA 对多糖含量的提高最为显著，平均含量分别是 37.00 mg/g 和 36.40 mg/g，比对照增加了 10.68%和 8.88%，与其它激素和对照的差异达到极显著；两种细胞分裂素对多糖含量的影响也有显著的增加，但作用低于 GA、NAA，含量分别为 35.02 mg/g 和 34.90 mg/g，增加量分别是 4.76%和 4.40%，与对照的差异也达到极显著。IAA 对多糖含量有明显的抑制作用，多糖含量仅为 32.13 mg/g。几种激素的作用效果 GA、NAA>KT、6-BA>CK>IAA。

表 3-21 多糖含量方差分析表

Tab. 3-21 Variance analysis of the determination of polysaccharide						
变异来源	DF	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
区组间	2	0.0181	0.0091	0.091	4.10	7.56
处理间	5	52.9451	10.589	106.248	3.33	5.64
误差	10	0.9966	0.0997			
总变异	17	53.9598				

表 3-22 激素对附子多糖含量影响分析表

Tab. 3-22 Analysis of the effects of hormones on the ditermination of polysaccharide				
处 理	均值 (mg/g)	增加量 (%)	差异显著性	
			5%	1%
GA	37.00	10.68	a	A
NAA	36.40	8.88	a	A
KT	35.02	4.76	b	B
6-BA	34.90	4.40	b	B
CK	33.43		c	C
IAA	32.13	-3.89	d	D

3.3.7 激素对附子中生物碱含量的影响

3.3.7.1 激素对附子中乌头类总生物碱含量动态的影响

酸性染料比色法是利用生物碱和酸性染料反应生成离子对进行比色的方法。利用乌头碱标品作为对照做标准曲线，吸光度和浓度见下表 3-23。

标准曲线建立：以乌头碱的浓度 (μg/ml) 为纵坐标，以吸光度 X 为横坐标，绘制标准曲线，求得回归方程：y=22.733x-0.142，r=0.9997，乌头碱含量在 2-20μg/ml 范围内，其吸收度与乌头碱浓度呈良好的线性关系。

表 3-23 乌头碱浓度及吸光度

Tab. 3-23 Concentration and absorbance of aconitine							
吸光度	0	0.098	0.186	0.361	0.526	0.718	0.882
浓度 (μ g/ml)	0	2	4	8	12	16	20

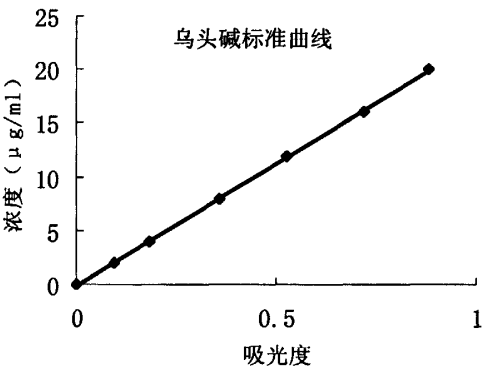


图 3-29 乌头碱准曲线

Fig. 3-29 Standard curve of aconitine

乌头类总生物碱回收率测定：取子根附子粉 0.1g 左右共 5 份，每份准确加入标准储备液使乌头碱的加入量为：0.4mg，按照样品溶液制备方法制备供试溶液后测定。结果表明：乌头碱的平均加样回收率 99.86%，RSD=1.62%（n=5）。

表 3-24 乌头类总生物碱测定回收试验结果

Table 3-24 Analysis of content of recovery of total alkaloids							
编 号	取样量 (g)	原含量 (mg)	加样量 (mg)	测定量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD%
1	0.102	0.8526	0.400	1.2514	99.7	99.86	1.62
2	0.101	0.8503	0.400	1.2435	98.3		
3	0.100	0.8299	0.400	1.2403	102.6		
4	0.106	0.8503	0.400	1.2479	99.4		
5	0.107	0.9071	0.400	1.3043	99.3		

(1) 激素对子根中乌头类总生物碱含量的动态影响

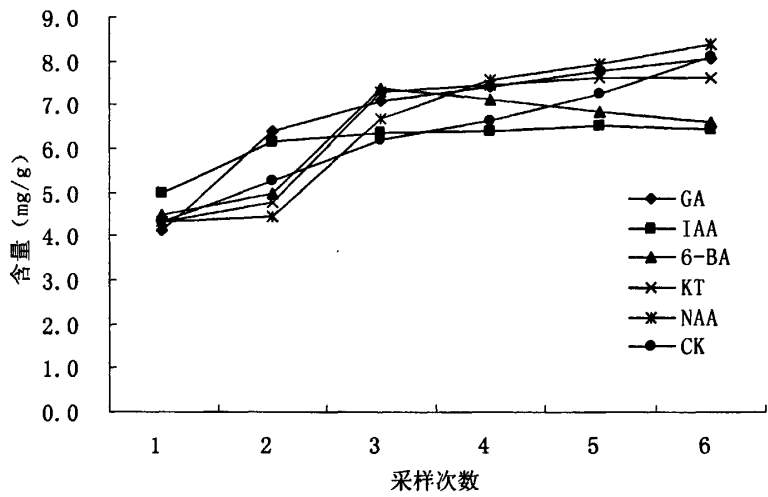


图 3-30 激素对附子子根中乌头类总生物碱含量的动态影响

Fig. 3-30 The dynamic effects of hormones on the ditermination of total alkaloids in child tubers

附子中乌头类生物总碱含量的变化趋势碱是逐渐升高，不同激素处理间对附子总生物碱的动态变化也有差异性（图 3-30）。GA 处理在前期比较低，中后期含量逐渐的升高，在后期和对照的含量差异不大；IAA 处理的附子乌头类生物总碱含量比较稳定，在中后期的时候含量几乎不变；两种细胞分裂的差异比较大，6-BA 和 KT 在前期含量比较相似，但在后期 6-BA 处理的含量逐渐的降低，而 KT 的含量比较稳定，同时有上升的趋势但比较缓慢；NAA 处理对生物碱的变化起伏比较大，前期抑制，后期有增加的作用；在收获的时候 NAA 处理的含量最高，GA 和对照相似；其他激素处理的含量低于对照。

(2) 激素对茎叶中乌头类总生物碱含量的动态影响

附子茎叶中乌头类总生物碱的含量呈现了前期逐渐的升高，后期稳定略有升高的趋势（图 3-31）；不同激素处理间的变化趋势也有不同。GA 处理的附子茎叶中乌头类生物碱在前期含量较低在后期逐渐的稳定的趋势；IAA 和 6-BA 两激素处理的茎叶中总生物碱在前期含量增加，但在后期含量逐渐的降低，收获时含量明显的低于其他激素和对照；KT 和 NAA 两处理的茎叶中的

生物碱含量变化趋势和其他激素与对照的相似，两激素处理的总生物碱含量差异不显著。但各激素处理的茎叶中的总生物碱的含量都低于对照。

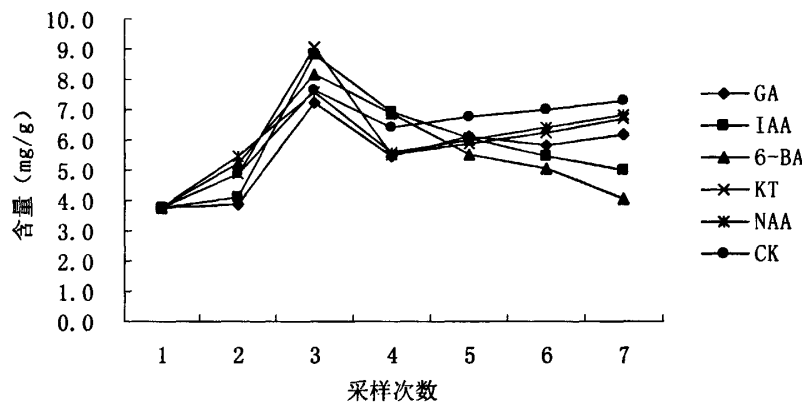


图 3-31 激素对附子茎叶中乌头类总生物碱含量的影响

Fig. 3-31 The dynamic effects of hormones on the ditermination of total alkaloids in stems and leaves

(3) 激素对母根中乌头类总生物碱含量的动态影响

母根中乌头类总生物碱的含量呈现下降的趋势，对照中总生物碱的含量在整个发育过程中生物碱的含量都低于各处理的含量（图 3-32）。激素处理间含量的变化和对照的变化趋势相同，各处理的变化起伏不大，只有 GA 处理的在后期含量下降的很明显。各激素处理的含量的趋势是：KT>NAA>IAA>6-BA>CK >GA。

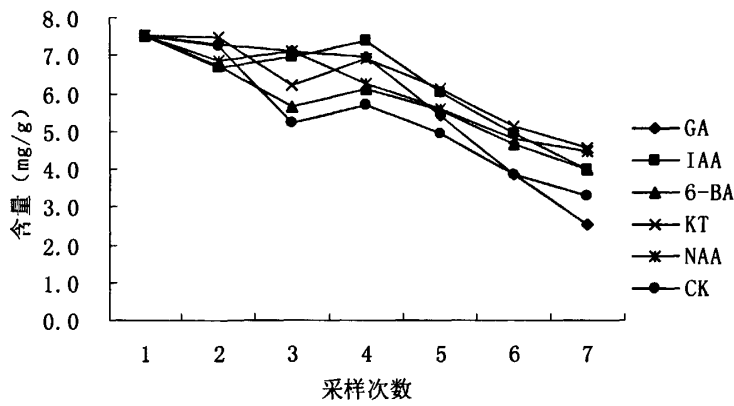


图 3-32 激素对母根中乌头类总生物碱含量的影响

Fig.3-32 The dynamic effects of hormones on the ditermination of total alkaloidsin mother tubers

3.3.7.2 激素对附子收获时不同组织中乌头类总生物碱含量的影响

(1) 激素对附子子根中乌头类总生物碱含量的影响

激素对收获时子根中乌头类总生物碱含量的影响（表 3-25，表 3-26），由方差分析表可知区组间的差异不显著，各处理间的差异达到极显著水平。NAA 处理的附子总生物碱含量最高（8.391mg/g），比对照增加了 3.57%，但差异不显著。其他各激素处理的含量都低于对照，GA、KT 两处理的总生物碱含量分别是 8.079 mg/g 和 7.630 mg/g，其差异也未达到极显著水平，说明 NAA、GA、KT 三激素对附子中乌头类总生物碱的含量影响不大。6-BA 和 IAA 两处理的生物总碱含量分别为 6.615 mg/g 和 6.431 mg/g，分别比对照减少了 18.35% 和 20.62%，与对照和其他激素处理的差异也达到极显著水平，但两处理间的差异不显著。

(2) 激素对收获时附子茎叶中乌头类总生物碱含量的影响

植物激素对附子茎叶中乌头类总生物碱含量的影响（见表 3-27），由方差分析可知区组间差异不显著，处理间差异显著。各激素处理对附子中总生物碱含量的影响都低于对照，NAA 在各激素处理中总生物碱含量最高（6.848mg/g），较对照减少了 5.84%，差异不显著；其次为 KT 和 GA 两处理

的附子茎叶中总生物碱含量分别为 6.697 mg/g 和 6.163 mg/g, 较对照分别减少了 7.91%和 15.26%, KT 与对照间差异不显著, GA 与对照间差异达显著水平,

表 3-25 子根中乌头类总生物碱方差分析表

Tab. 3-25 Variance analysis of the determination of of total alkaloids in child tubers

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	F _{0.05}	F _{0.01}
区组间	2	0.1014	0.0507	0.880	4.10	7.56
处理间	5	10.3722	2.0744	36.019	3.33	5.64
误差	10	0.5759	0.0576			
总变异	17	11.0495				

表 3-26 激素对子根中乌头类总生物碱含量影响分析表

Tab. 3-26 Analysis of the effects of hormones on the ditermination of total alkaloids in child tubers

处理	含量 (mg/g)	增加量 (%)	差异显著性	
			5%	1%
NAA	8.391	3.57	a	A
CK	8.102		a	A
GA	8.079	-0.283	a	A
KT	7.630	-5.54	b	A
6-BA	6.615	-18.35	c	B
IAA	6.431	-20.62	c	B

三种激素处理间的差异不显著, 说明这三种激素处理对附子茎叶中总生物碱的含量差异不大。IAA 和 6-BA 两处理对茎叶中总生物碱的含量有显著的抑制作用, 含量分别为 4.984 mg/g 和 4.033 mg/g, 分别比对照下降了 31.47%和 44.55%, 两处理与其他处理和对照的差异达到显著水平, 但两处理间的差异不显著。

表 3-27 激素对茎叶中乌头类总生物碱含量影响分析表

Tab. 3-27 Analysis of the effects of hormones on the ditermination of total alkaloids in stems and leaves

处理	含量 (mg/g)	减少量 (%)	差异显著性	
			5%	1%
CK	7.273		a	A
NAA	6.848	5.84	ab	A
KT	6.697	7.91	ab	A
GA	6.163	15.26	b	A
IAA	4.984	31.47	c	B
6-BA	4.033	44.55	d	B

(3) 激素对收获时附子母根中乌头类总生物碱含量的影响

表 3-28 激素对母根中乌头类总生物碱含量影响分析表

Tab. 3-28 Analysis of the effects of hormones on the ditermination of total alkaloids in mother tubers

处理	含量 (mg/g)	增加量 (%)	差异显著性	
			5%	1%
KT	4.556	38.65	a	A
NAA	4.476	26.59	a	A
6-BA	4.018	22.28	b	B
IAA	3.984	21.24	b	B
CK	3.286		c	C
GA	2.559	-22.12	d	D

不同激素对附子母根中乌头类总生物碱含量的影响（见表 3-28），由方差分析可知区组间的差异不显著，处理间的差异达到显著水平。除 GA 外，其他激素处理的附子母根中总生物碱的含量都高于对照。KT 和 NAA 两处理的母

根中总生物碱含量最高，含量为 4.556mg/g 和 4.476mg/g，分别比对照增加了 38.65%和 26.59%，与对照和其他激素处理的差异达到极显著水平；其次为 6-BA 和 IAA 两处理的含量分别为 4.018mg/g 和 3.984mg/g，分别比对照增加了 22.28%和 21.24%，与对照的差异也达到极显著水平；GA 处理对母根的生物碱有明显的抑制作用，含量为 2.559 mg/g，比对照减少了 22.12%。

(4) 激素对收获时附子须根中乌头类总生物碱含量的影响

不同激素对附子须根中乌头类总生物碱含量的影响（见表 3-29），通过方差分析可知区组间差异不显著，处理间差异显著。须根中总生物碱的含量除 KT 外，其他激素处理的含量都低于对照，KT 处理的附子中须根总生物碱含量为 5.435mg/g，比对照增加了 14.57%，同对照的差异性达到显著水平；6-BA 和 GA 两处理的须根中总生物碱含量在各激素处理中处于中等水平含量分别为 4.554mg/g 和 4.336mg/g，比对照分别减少了 4.64%和 8.60%，6-BA 处理和对照的差异性不显著，GA 处理和对照的差异显著，6-BA 和 GA 两处理的差异性不显著；IAA 和 NAA 两处理的含量最低，含量分别为 3.784mg/g 和 3.744mg/g，比对照减少了 20.24%和 21.08%，和对照的差异性显著，两处理间的差异不显著。

表 3-29 激素对须根中乌头类总生物碱含量影响分析表

Tab. 3-29 Analysis of the effects of hormones on the ditermination of total alkaloids in fibrous tubers

处理	含量（mg/g）	增加量（%）	差异显著性	
			5%	1%
KT	5. 435	14. 57	a	A
CK	4. 744		b	B
6-BA	4. 554	4. 64	bc	BC
GA	4. 336	8. 60	c	C
IAA	3. 784	20. 24	d	D
NAA	3. 744	21. 08	d	D

(5) 激素对收获时附子不同组织中乌头类总生物碱含量的比较

激素对附子不同组织中乌头类总生物碱含量的影响有明显的不同（表 3-30，图 3-33），呈现了激素对不同组织影响的差异性，在各组织中总生物碱含量的趋势是子根>茎叶>须根>母根。激素对附子整个植株总生物碱的含量的影响也有明显的差异，各组织的总生物碱的总和中各激素的差异不大，KT 激素含量最高（24.317 mg/g），比对照增加了 3.89%；其次为 NAA 和 GA 两处理，含量为 23.460 mg/g 和 21.137 mg/g，较对照含量增加了 0.23%和-9.69%；6-BA 和 IAA 两处理的含量在各处理中最低：19.221 mg/g 和 19.182 mg/g，较对照减少了 17.88%和 18.05%。通过比较激素对附子各组织中的生物总碱的含量，可以知道激素对生物碱在附子各组织中的分配有影响，但是对整个植株中生物碱的含量影响不大。

表 3-30 激素对附子不同组织中生物总碱含量影响分析表

Tab. 3-30 Analysis of the effects of hormones on the ditermination of total alkaloids in different tissues

处理	含量 (mg/g)				
	子根	茎叶	母根	须根	总和
GA	8.079	6.163	2.559	4.336	21.137
IAA	6.431	4.984	3.984	3.783	19.182
6-BA	6.615	4.033	4.018	4.554	19.221
KT	7.630	6.697	4.556	5.435	24.317
NAA	8.391	6.848	4.477	3.744	23.460
CK	8.102	7.273	3.287	4.744	23.406

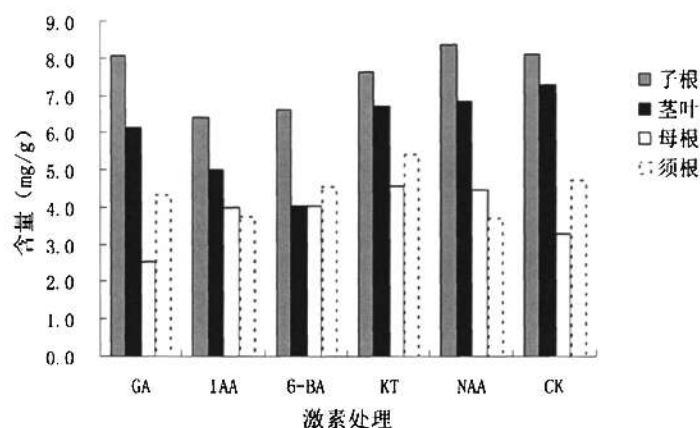


图 3-33 激素对附子不同组织中乌头类总生物碱含量影响的比较

Fig. 3-33 Comparison of the total alkaloids in different tissues of Radix Aconiti by hormones treatment

3.3.7.3 激素对附子不同部位中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱含量的影响

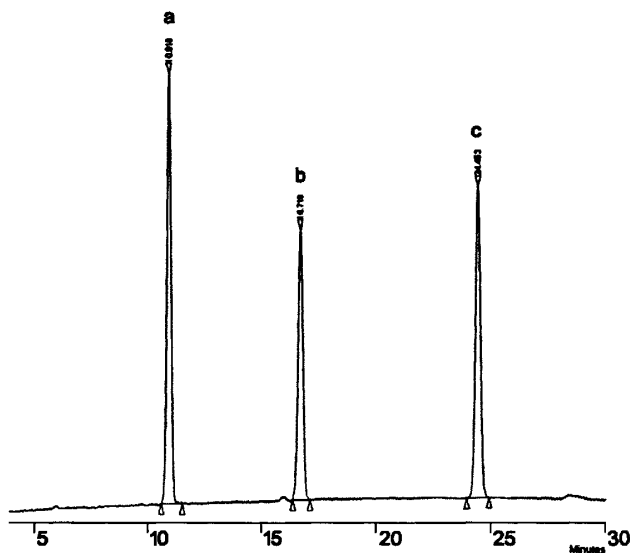
(1) 高效液相测定法的条件优化

① 检测波长的选择

在已有的文献报道中, 三种生物碱的混合溶液的最大吸收波长有 230 nm、235 nm、240 nm 三种^[156]。将三种生物碱的三种溶液适量混合后检测, 最大的吸收波长为 240nm。同时在此波长下峰面积最大, 达到基线分离, 基线也更稳定, 确定检测波长为 240 nm。

② 流动相的选择

新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的极性由强到弱, 在反相高效液相中, 由于醇-水系统热力学和可压缩性因素, 在梯度洗脱时, 易导致基线漂移, 同时甲醇的洗脱能力不强, 因此, 在实验中选择了洗脱能力较强的乙腈作为流动相。流动相中加入乙二胺可以防止分离过程出现拖尾现象, 达到改善色谱峰形和提高分离度的目的。比较不同配比乙腈-0.1 %乙二胺溶液对新乌头碱、乌头碱、次乌头碱保留时间、分离度及峰形的影响, 当乙腈的比例过大时, 出峰虽然早, 但是三个峰的分离效果不好。最后确定流动相为上述的色谱条件时, 三种生物碱的分离效果最优, 分离效果图见图 3-34。



a. 新乌头碱; b. 乌头碱; c. 次乌头碱

图 3-34 对照品的 RP-HPLC 图

Fig. 3-34 RP-HPLC chromatograms of reference substance

③ 线性关系的考察

准确吸取新乌头碱、乌头碱、次乌头碱储备液适量分别置于 10ml 容量瓶中，用乙腈稀释到刻度，振荡均匀，作为对照品稀释液。在同一色谱条件下分别进对照品稀释液 20.0 μ l，确定标准物质的保留时间。然后各取一定体积储备液配成不同浓度的混合标准溶液，分别平行测定 3 次（均进样 20.0 μ l），以平均峰面积 Y 为纵坐标，质量浓度 X (μ g/ml) 为横坐标进行线性回归，各物质的回归方程，相关系数和线性范围见表 3-31。

④ 不同样品制备方法的生物碱含量

在上述色谱条件下，取不同处理的样品制备溶液适量，用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过，取 20 μ l 为进样量，分别平行进样三次，以平均峰面积，按回归方程激素浓度。不同处理方法测得的三种生物碱的含量见表 3-32。不同的样品处理方法中处理 2 的提取率最高，三种生物碱的含量在各处理方法中均是最

高。

表 3-31 三种生物碱的回归方程，相关系数和线性范围

Table3-31 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of three kinds of alkaloids

化合物	回归方程	相关系数	线性范围
新乌头碱	$Y=0.1512X-0.0505$	0.9998	2.1-120 $\mu\text{g/ml}$
乌头碱	$Y=0.1248X-0.0274$	0.9997	1.5-160 $\mu\text{g/ml}$
次乌头碱	$Y=0.1829X-0.0872$	0.9993	2.3-120 $\mu\text{g/ml}$

表 3-32 不同处理方法的生物碱含量 (n=3)

Table3-32 The determination of alkaloids in different sample preparations (n=3)

处理	新乌头碱 ($\mu\text{g/g}$)	乌头碱 ($\mu\text{g/g}$)	次乌头碱 ($\mu\text{g/g}$)
1	1243.45	270.42	807.78
2	1329.43	380.99	1321.73
3	763.29	134.52	718.56
4	75.60	41.41	86.67
5	406.15	89.65	251.58

⑤ 精密度试验

精密吸取处理 2 的供试溶液 20 μl ，重复进样 5 次，进行测定。结果表明新乌头碱、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.04%、1.47%、1.01%。

⑥ 稳定性试验

对处理 2 供试溶液在 8h 之内每隔 1h 进行考察，结果表明新乌头碱、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.60%、1.72%、1.23% (n=9)。

⑦ 重现性试验

精密称量干燥附子粉末 0.5g 共 5 份，按照处理 2 样品制备后，进行测定。结果表明新乌头碱、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.35%、2.07%、1.29%。

⑧ 加标回收试验

精密称量干燥附子粉末 0.5g 共 5 份，每份分别准确加入各标准储备液，使新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的加入量分别为 450 μ g、200 μ g、400 μ g。按④进行测定。结果表明新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的平均加样回收率 (n=5) 分别为 99.1%、99.4%、99.2%；RSD 分别为 1.64%、1.97%、1.75%。

不同组织中三种生物碱含量的测定 取干燥的附子粉 0.5g (n=3)，按照处理 2 的方法制备样品，在上述色谱条件下测定附子中三种生物碱的含量。

(2) 激素对子根中三种生物碱含量的影响

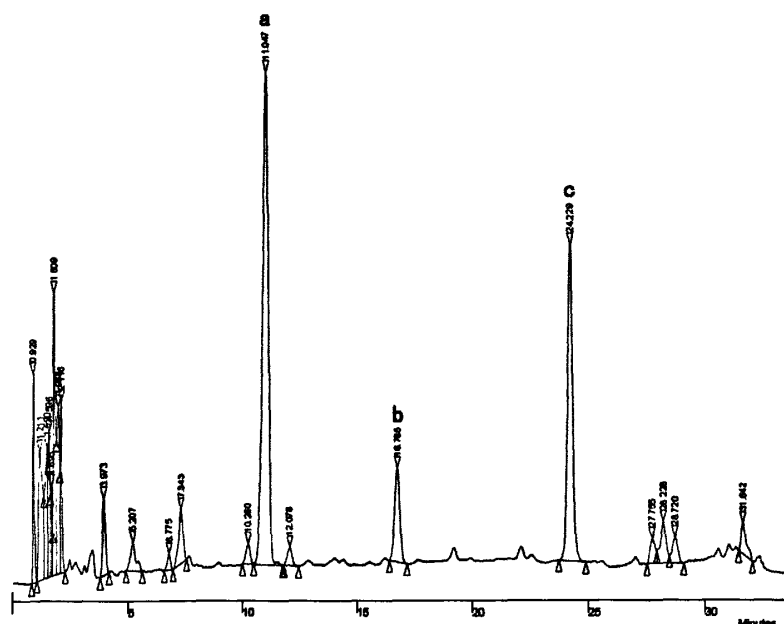


图 3-35 附子子根中三种生物碱 RP-HPLC 图

Fig. 3-35 RP-HPLC chromatograms of three alkaloids in child tubers

不同激素处理对附子子根中三种生物碱含量的影响(见表 3-33, 图 3-36), 三种生物碱中新乌头碱含量最高, 乌头碱的含量最低, 次乌头碱的含量处于中等水平, 但是对照中次乌头碱的含量最高, 新乌头碱含量次之, 乌头碱含量最低。激素处理后三种生物碱的含量总和都小于对照, 三种生物碱的单一含量出 NAA 处理的新乌头碱和乌头碱含量高于对照外, 其他激素处理的都低于对照, 说明激素对子根中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱含量有抑制作用。激素处理间生物碱含量也有明显的不同,NAA 处理的含量最高(1603.84 $\mu\text{g/g}$), 比对照减少了 13.05 $\mu\text{g/g}$; IAA 处理的含量(1318.83 $\mu\text{g/g}$) 比对照减少了 298.06 $\mu\text{g/g}$; 6-BA 和 KT 处理的含量差异不大(分别为 1294.00 $\mu\text{g/g}$ 和 1295.33 $\mu\text{g/g}$), 分别较对照减少了 322.89 $\mu\text{g/g}$ 和 321.56 $\mu\text{g/g}$; GA 处理的三种生物碱含量最低(973.33 $\mu\text{g/g}$), 比对照减少了 643.56 $\mu\text{g/g}$, 接近 39.8%。两种生长素处理的三种生物碱含量最高, 两种细胞分裂素处于中等, GA 处理的含量最低, 总的趋势是 CK> NAA> IAA> KT> 6-BA>GA。

表 3-33 不同激素处理的附子子根中三种生物碱含量 (n=3)

Table3-33 The determination of three alkaloids in in child tubers by hormones treatment (n=3)

处理	含量($\mu\text{g/g}$)			
	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱	总和
GA	465. 28	177. 77	330. 27	973. 33
IAA	651. 93	198. 19	468. 70	1318. 83
6-BA	610. 93	174. 82	508. 25	1294. 00
KT	627. 90	184. 35	483. 08	1295. 33
NAA	783. 44	224. 06	596. 33	1603. 84
CK	681. 63	204. 09	731. 16	1616. 89

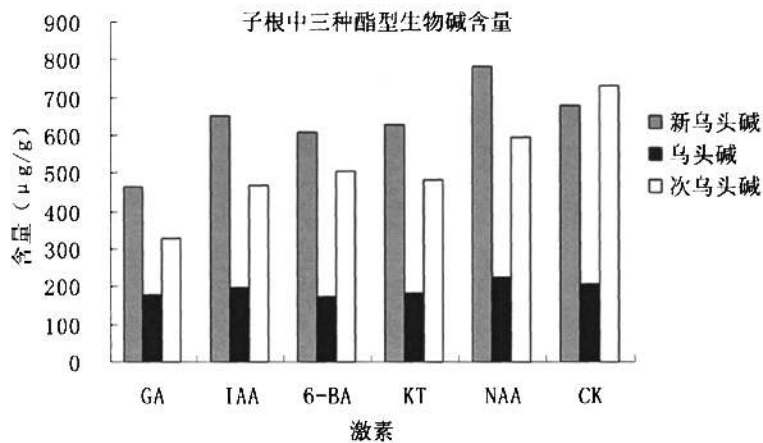


图 3-36 激素处理的子根中三种生物碱含量的比较

Fig. 3-36 Comparison of the three alkaloids in child tubers by hormones treatment

(3) 激素对附子茎叶中三种生物碱含量的影响

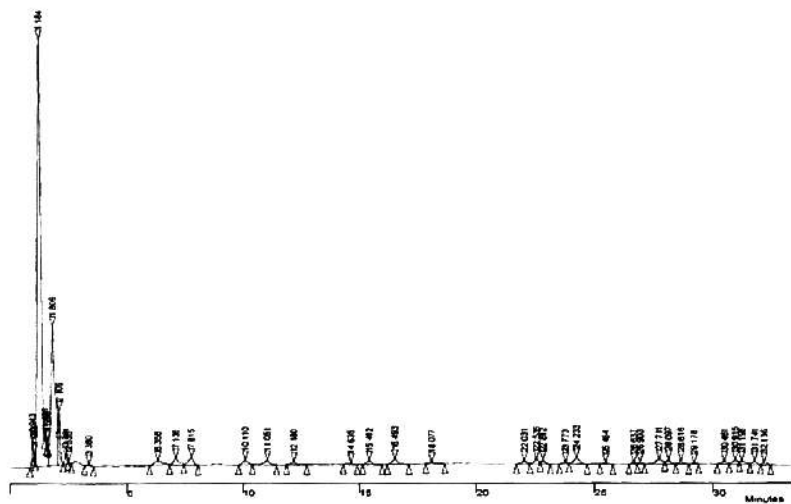


图 3-37 附子茎叶中三种生物碱的 RP-HPLC 图

Fig. 3-37 RP-HPLC chromatograms of three alkaloids in stems and leaves of *Radix Aconiti*.

由图 3-37 可知，附子茎叶中三种生物碱的含量太少，在峰面积的积分中

无法积出，因此可以认为附子茎叶中没有含有三种双酯型生物碱，其他类型的生物碱还有待进一步的研究。

(4) 激素对附子母根中三种生物碱含量的影响

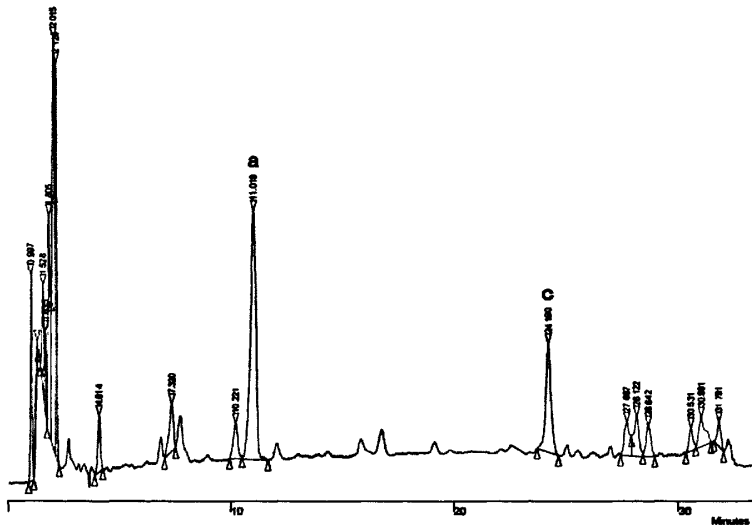


图 3-38 附子母根中三种生物碱 RP-HPLC 图

Fig. 3-38 RP-HPLC chromatograms of three alkaloids in mother tubers of *Radix Aconiti*.

表 3-34 激素处理的附子母根中两种生物碱含量 (n=3)

Tab. 3-34 The determination of two alkaloids in in child tubers by hormones treatment (n=3)

处理	含量 ($\mu\text{g/g}$)		
	新乌头碱	次乌头碱	总和
GA	195. 21	122. 28	317. 49
IAA	267. 32	170. 10	437. 42
6-BA	103. 58	92. 62	196. 19
KT	168. 34	168. 66	337. 00
NAA	220. 66	128. 75	349. 41
CK	85. 62	79. 49	165. 11

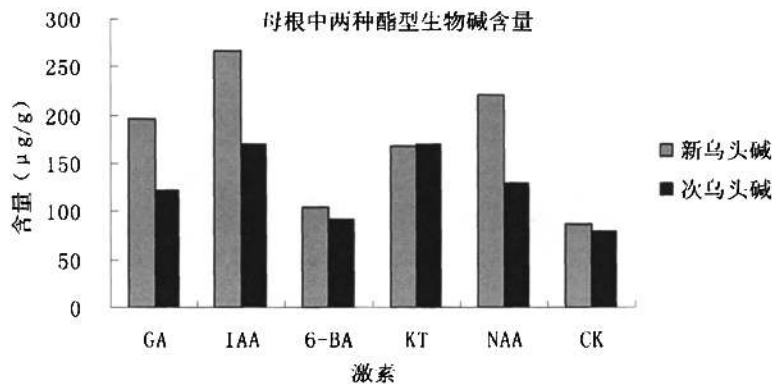


图 3-39 激素处理的母根根中两种生物碱含量的比较

Fig. 3-39 Comparison of the two alkaloids in mother tubers by hormones treatment

激素处理对附子母根中三种生物碱含量的影响（表 3-34，图 3-38），在母根中没有检测到乌头碱，只有新乌头碱和次乌头碱。激素对母根中新乌头碱和次乌头碱的含量都高于对照的含量，在各激素处理中，KT 处理的次乌头碱含量略高于新乌头碱含量外，其他处理和对照中新乌头碱的含量都高于次乌头碱。各激素处理中 IAA 中两种含量的总和最高（437.42μg/g），比对照增加了 272.31μg/g（164.92%），该处理的新乌头碱和次乌头碱的含量在各处理中的含量也最高（267.32μg/g 和 170.10μg/g）；其次为 NAA 处理的两种生物碱含量为 349.41μg/g，比对照增加了 184.65μg/g，比对照的含量高出了一倍；KT 和 GA 处理的两种生物碱含量分别为 337.00μg/g 和 317.49μg/g，比对照增加了 171.89μg/g 和 152.38μg/g，两者的含量是几乎是对照的两倍，KT 处理中新乌头碱和次乌头碱的含量几乎相同；6-BA 处理中的新乌头碱和次乌头碱的含量最低（196.19μg/g），仅比对照增加了 31.08μg/g。激素对母根中生物碱含量的影响可以表明激素可以增加母根中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的含量。

（5）激素对附子须根中三种生物碱含量的影响

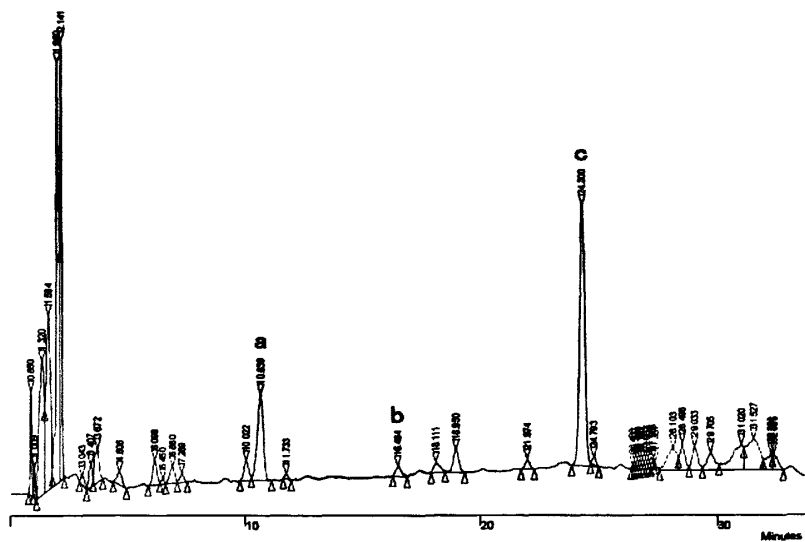


图 3-40 附子须根中三种生物碱 RP-HPLC 图

Fig.3-40 RP-HPLC chromatograms of three alkaloids in fibrous tubers of *Radix Aconiti*.

表 3-35 激素处理的附子须根中三种生物碱含量 (n=3)

Tab.3-35 The determination of three alkaloids in fibrous tubers by hormones treatment (n=3)

处理	含量 ($\mu\text{g/g}$)			
	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱	总和
GA	237. 63	74. 38	1342. 38	1654. 39
IAA	149. 96	103. 47	499. 26	752. 68
6-BA	59. 04	56. 34	301. 51	416. 88
KT	58. 75	102. 59	185. 20	346. 54
NAA	72. 61	78. 32	226. 01	376. 93
CK	143. 03	48. 35	457. 91	649. 29

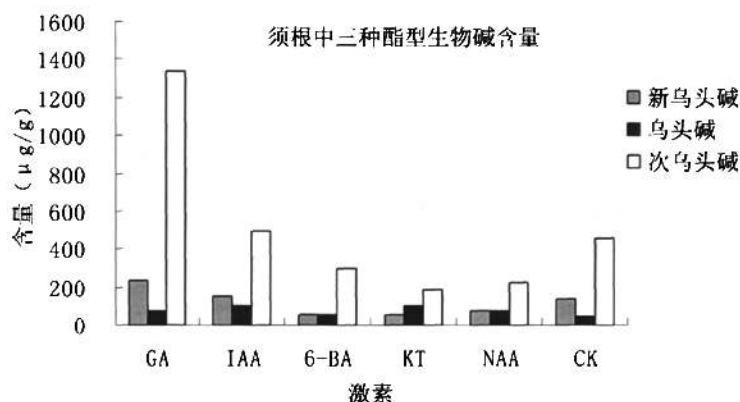


图 3-41 激素处理的母根根中两种生物碱含量的比较

Fig. 3-41 Comparison of the three alkaloids in fibrous tubers by hormones treatment

须根中三种生物碱的含量差异比较明显，次乌头碱的含量比另外两种高许多。激素处理的附子须根的三种生物碱含量差异也比较明显，含量最高的是 GA 处理，三种生物碱含量的总和为 $1654.39\mu\text{g/g}$ ，几乎是对照的 2.5 倍，其中次乌头碱的含量达到了 $1342.38\mu\text{g/g}$ ，是对照中次乌头碱含量的 3 倍；IAA 处理的三种生物碱含量是 $752.68\mu\text{g/g}$ ，比对照增加了 15.92%；6-BA、KT 两种细胞分裂素处理中生物碱的含量有一定的差异（分别为 $416.88\mu\text{g/g}$ 和 $346.54\mu\text{g/g}$ ），分别比对照减少了 $232.41\mu\text{g/g}$ (35.79%) 和 $302.75\mu\text{g/g}$ (46.63%)；NAA 处理中生物碱含量为 $376.93\mu\text{g/g}$ ，较对照下降了 41.95%，上述结果表明须根是次乌头碱的主要存在部位，GA 处理可以提高附子须根中次乌头碱的含量。

（6）激素对附子植株中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的影响

不同的激素处理对附子不同部位的新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的含量影响不同。三种生物碱主要存在于附子的地下部分，主要存在与子根中，其次是须根中，母根中的含量最低。激素对整个植物的三种生物碱含量(表 3-36)，GA 和 IAA 两处理的三种生物碱的含量 ($2945.20\mu\text{g/g}$ 和 $2508.93\mu\text{g/g}$) 高于对照，分别比对照增加了 21.14% 和 3.19%，GA 处理增加含量主要是增加了须根中次乌头碱的含量，而 IAA 处理的含量和对照几乎没什么差异；NAA 处理的附子三种生物碱的含量为 $2330.18\mu\text{g/g}$ ，较对照下降了 4.16% 与对照的含量

差异不大；6-BA 和 KT 两处理的含量明显的低于对照（1907.07μg/g 和 1978.87μg/g），分别比对照下降了 21.56%和 18.61%，但是量处理间的含量差异不大，说明两种激素对三种生物碱的作用类似，结果表明 GA 处理增加了三种生物碱的含量，IAA 和 NAA 两处理与对照含量差异不大，6-BA 和 KT 抑制了附子中三种生物碱含量。

表 3-36 激素处理的附子整个植株中三种生物碱的含量（n=3）
Tab. 3-36 The determination of three alkaloids in the plant by

Hormones treatment (n=3)									
处理	子根 (μ g/g)			母根 μ g/g		须根 μ g/g			小计
	新乌		次乌	新乌	次乌	新乌		次乌	
	头碱	乌头碱	头碱	头碱	头碱	头碱	乌头碱	头碱	μ g/g
GA	465.28	177.77	330.27	195.21	122.28	237.63	74.38	1342.38	2945.20
IAA	651.93	198.19	468.70	267.32	170.10	149.96	103.47	499.26	2508.93
6-BA	610.93	174.82	508.25	103.58	92.62	59.04	56.34	301.51	1907.07
KT	627.90	184.35	483.08	168.34	168.66	58.75	102.59	185.20	1978.87
NAA	783.44	224.06	596.33	220.66	128.75	72.61	78.32	226.01	2330.18
CK	681.63	204.09	731.16	85.62	79.49	143.03	48.35	457.91	2431.29

3.3.7.4 激素对附子不同组织中附子灵含量的影响

（1） 附子灵测定方法的确定

用甲醇溶解附子灵，以甲醇作对照，扫描紫外吸收光谱图（图 3-37）。附子灵在整个子紫外区的吸收强度都比较弱，只有在 240nm 左右有吸收峰，但吸收强度较弱。以 240nm 为附子灵的检测波长用 RP-HPLC 法测定附子中附子灵的含量。附子灵的标准品在合适的分离条件下的高效液相图（图 3-38），附子灵在该条件下只有溶剂峰，未能检测到附子灵，说明用 RP-HPLC 法测定附子中附子灵含量不科学。因此改用 RP-HPLC-MS 法测定附子灵的含量。

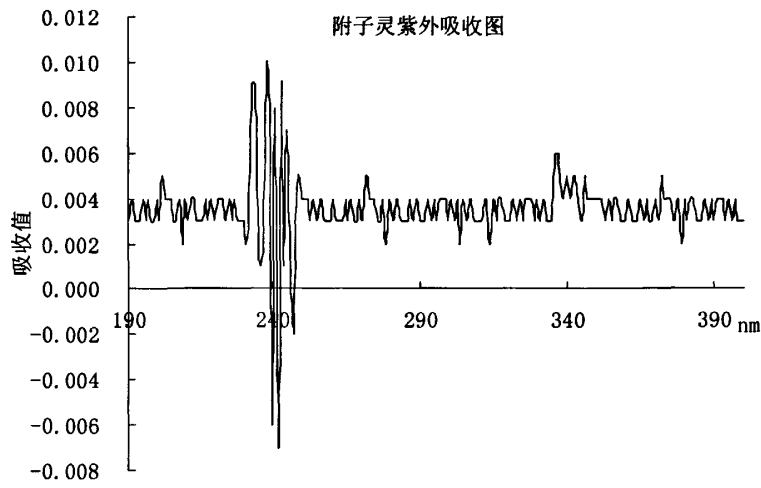


图 3-42 附子灵紫外吸收光谱

Fig.3-42 Ultraviolet absorption spectrum of fuziline

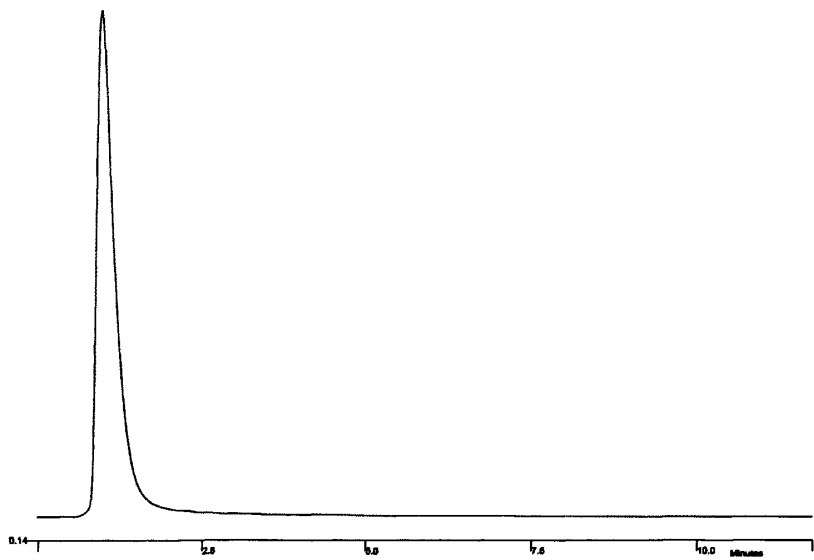


图 3-43 附子灵 RP-HPLC 图

Fig.3-43 RP-HPLC chromatograms of fuziline

(2) RP_HPLC-MS 法分离条件的优化

① 线性关系和检出限的考察

准确吸取附子灵的以附子灵的储备液适量分别置于 25ml 容量瓶中，用甲醇稀释到刻度，振荡均匀，作为对照品稀释液。在同一分离和质谱条件下分别进对照品稀释液 5.0 μ l，三次。以浓度 (μ g/ml) 为横坐标，以三次峰面积的平均值为纵坐标，绘制标准曲线，求得回归方程： $y=1.3352x+0.0399$ ， $r=0.9999$ ，附子灵含量在 0.7774-10 μ g/ml 范围内，其吸收度与乌头碱浓度呈良好的线性关系。检出限 ($S/N=3$) 为 0.078 μ g/ml。

② 分离效果

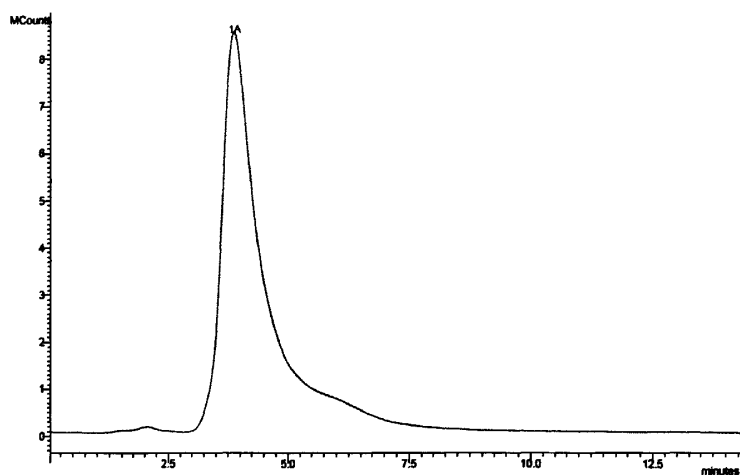
将对照品 5.0 μ l，根据对照品的主要特征离子质量和质量色谱峰的保留时间进行定性分析，再根据附子对照品的曲线进行定量分型，计算后得到样品中附子灵的含量。在上述色谱及质谱条件下标准样品的分离图 (图 3-39)，该条件下分离效果较好，适合附子灵的药物分析研究。

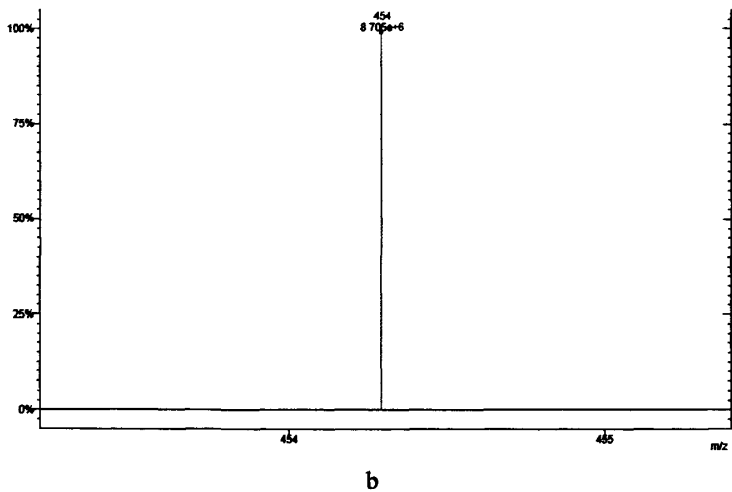
③ 精密度试验

精密吸取附子的供试溶液 5 μ l，重复进样 5 次，进行测定。结果表明新附子灵碱峰面积的 RSD 为：1.21%。

④ 稳定性试验

对附子供试溶液在 24h 之内每隔 4h 进行考察，结果表明附子灵峰面积的 RSD 为：1.67%。(n=7)。





a 总离子流色谱图; b 离子峰

图 3-44 附子灵对照品质谱图

a Total ionic chromatographic;b Ion peak

Fig. 3-44 MS of the control fuziline

⑤ 重现性试验

精密称附子干燥粉末 0.2g 共 5 份，按照附子灵样品制备供试溶液后，进行测定。结果表明附子灵峰面积的 RSD 为：1.78%。

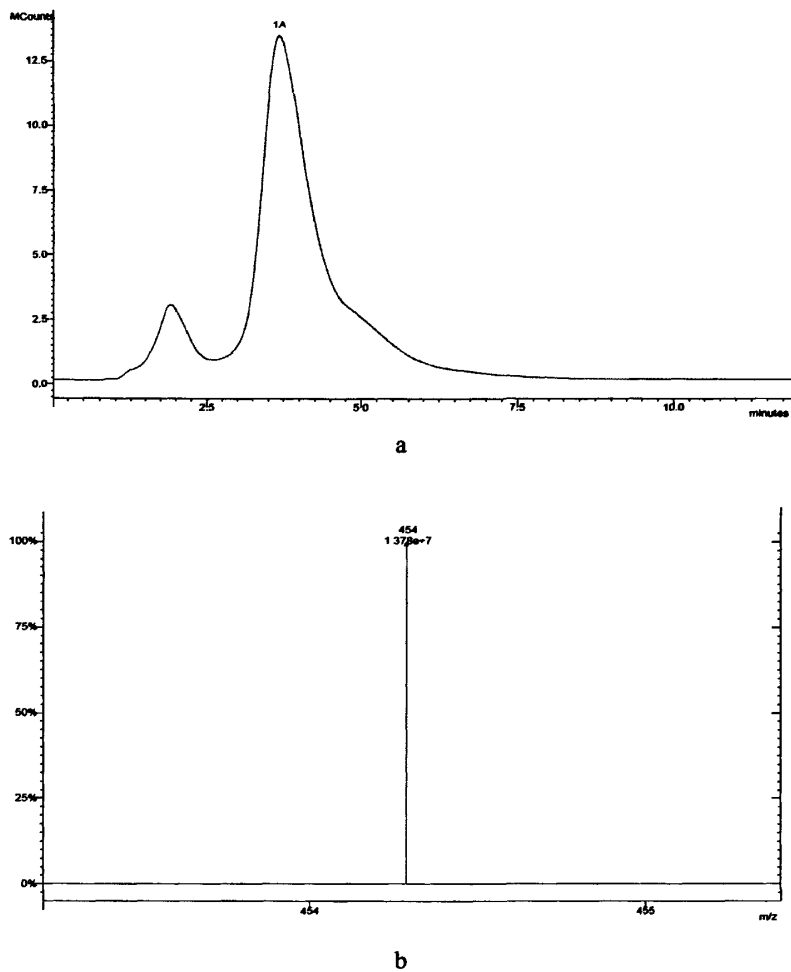
⑥ 加标回收试验

精密称量附子干燥粉末 0.2g 共 5 份，每份分别准确加入各标准储备液，使新附子灵加入量为 50μg。按 2.1 制备供试溶液后进行测定。结果表明附子灵平均加样回收率（n=5）为 87.98%；RSD 为 1.69%。

⑦ 样品含量测定

称取不同组织附子干燥粉 0.2g 三份，按照附子灵样品制备供试溶液后，在上述分离条件和质谱条件下测定。

(3) 激素对附子子根中附子灵含量的影响



a 总离子流色谱图; b 离子峰

图 3-45 子根中附子灵质谱图

a Total ionic chromatographic;b Ion peak

Fig. 3-45 MS of the fuziline in the child tubers

激素对子根中附子灵含量的影响（图 3-41），激素处理的子根中附子灵含量都略高于对照。NAA 处理的子根中附子灵含量最高（360.45 $\mu\text{g/g}$ ），比对照（276.24 $\mu\text{g/g}$ ）增加了 30.48%；其次为 KT 处理的子根含量为 329.24 $\mu\text{g/g}$ ，比对照增加了 19.19%；GA、IAA、6-BA 处理的子根中含量分别为 317.31 $\mu\text{g/g}$ 、315.31 $\mu\text{g/g}$ 、320.32 $\mu\text{g/g}$ ，三种处理的附子灵含量差异不大，比对照增加了

14.87%，14.14%、15.96%，表明几种激素除 NAA 外其他激素处理间的差异不显著，激素处理可以增加附子中附子灵的含量。

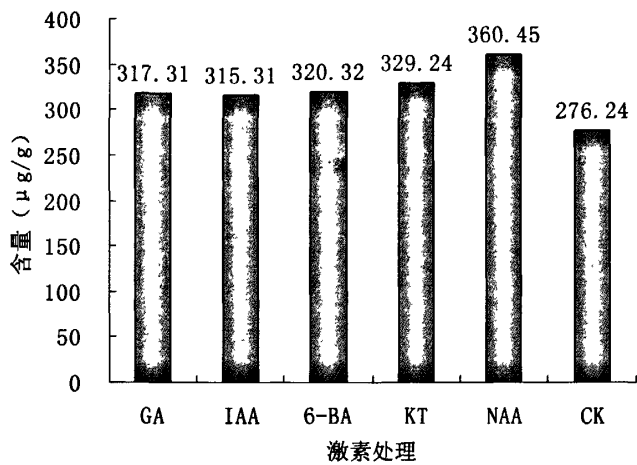
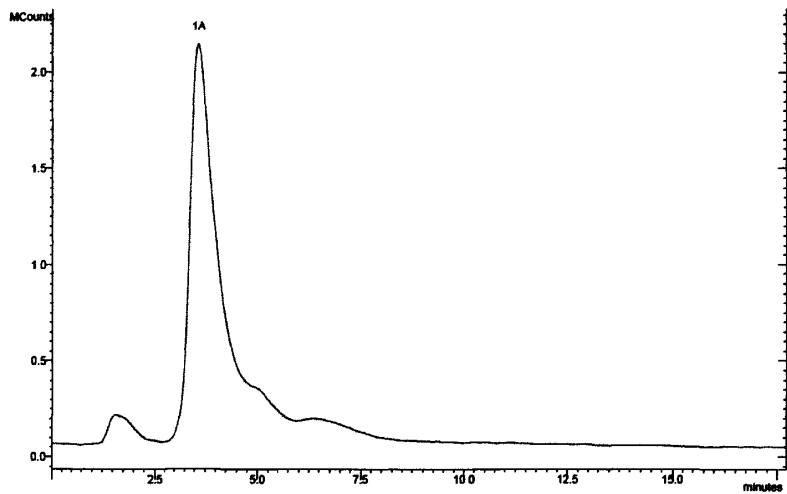


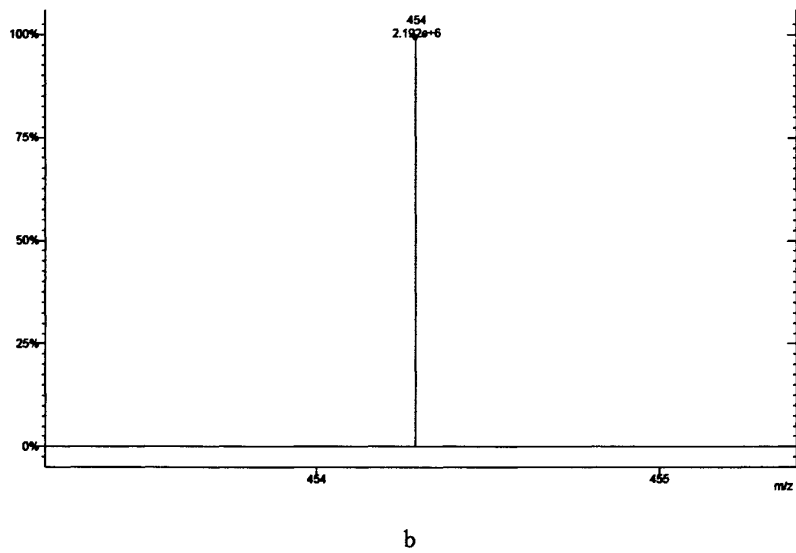
图 3-46 激素处理的子根中附子灵含量比较

Fig.3-46 Comparison of the fuziline in child tubers by hormones treatment

(4) 激素对附子茎叶中附子灵含量的影响



a



a 总离子流色谱图；b 离子峰

图 3-47 茎叶中附子灵质谱图

a Total ionic chromatographic;b Ion peak

Fig. 3-47 MS of the fuziline in the stems and leaves

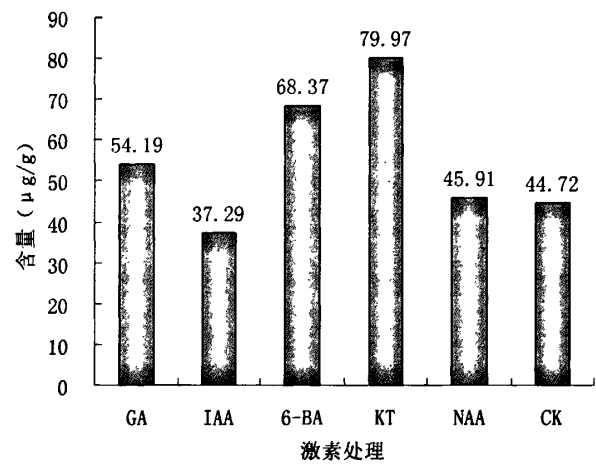
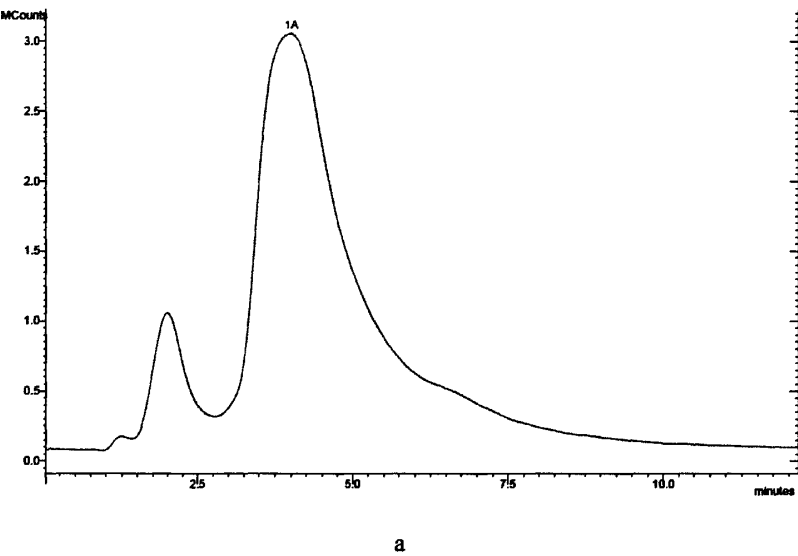


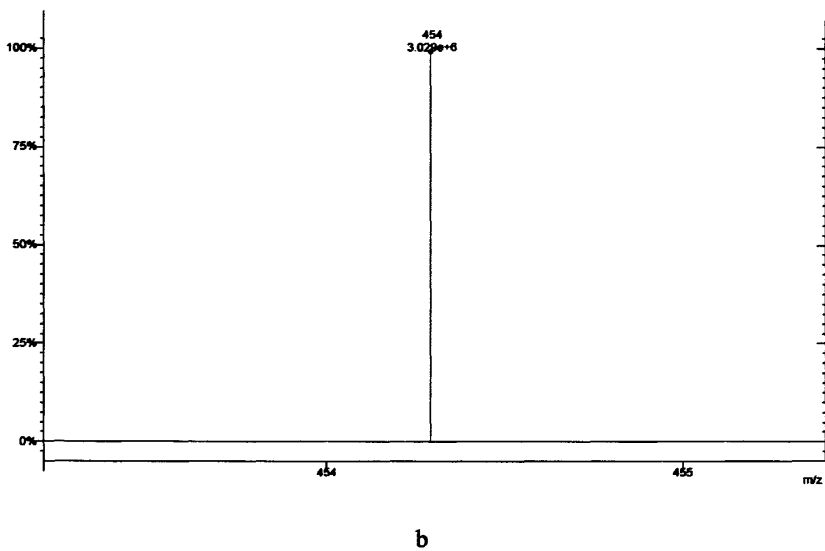
图 3-48 激素处理的茎叶中附子灵含量比较

Fig. 3-48 Comparison of the fuziline in stems and leaves by hormones treatment

附子茎叶中附子灵的含量在不同的激素间差异比较明显，KT 和 6-BA 两种激素对茎叶中附子灵含量有增加作用，含量分别为 79.97 $\mu\text{g/g}$ 和 68.37 $\mu\text{g/g}$ ，比对照增加了 78.82%和 52.88%，增加的幅度比较大；其次为 GA 处理，附子灵含量为 54.19 $\mu\text{g/g}$ ，较对照增加了 21.18%；NAA 处理的附子灵含量和对照的相差不大，每克比对照增加了 1.19 μg ；IAA 处理的附子灵含量在个激素中的含量最低（37.29 $\mu\text{g/g}$ ），同时还低于对照 16.6%，表明激素对附子茎叶中附子灵含量的影响有明显的差异。

(5) 激素对附子母根中附子灵含量的影响





a 总离子流色谱图; b 离子峰

图 3-49 母根中附子灵质谱图

a Total ionic chromatographic;b Ion peak

Fig. 3-49 MS of the fuziline in the mother tubers

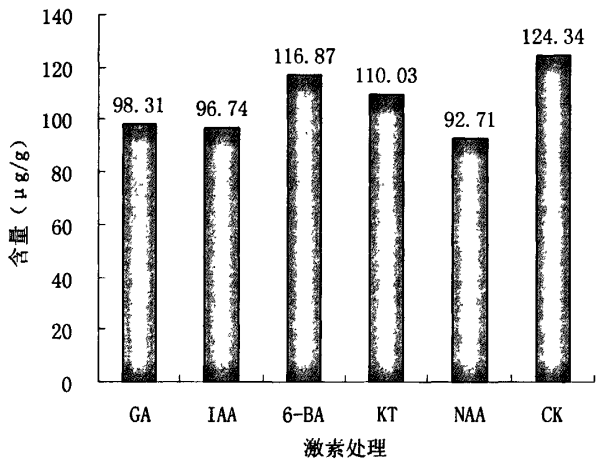


图 3-50 激素处理的母根中附子灵含量比较

Fig. 3-50 Comparison of the fuziline in mother tubers by hormones treatment

激素处理的附子母根中附子灵的含量都低于对照 (124.34 $\mu\text{g/g}$), 在各激

素中两种细胞分裂素（6-BA，KT）处理的附子灵含量最高分别为 116.89 $\mu\text{g/g}$ 和 110.03 $\mu\text{g/g}$ ，含量分别比对照下降了 6.01%和 11.51%；GA、IAA、NAA 三处理的含量比较接近含量分别比对照减少了 20.93%、22.20%、25.44%。

(6) 激素对附子须根中附子灵含量的影响

不同激素对须根中附子灵含量的影响（图 3-47）差异比较显著，GA 处理的含量为 272.08 $\mu\text{g/g}$ ，比对照（260.36 $\mu\text{g/g}$ ）增加了 4.50%；其次为 KT 处理的须根中的含量比对照减少了 1.53%，GA 和 KT 与对照的含量都比较接近，表明这两种激素对附子须根中附子灵含量的影响不大；IAA、6-BA、NAA 处理的附子灵的含量都明显的低于对照，分别减少了 17.10%、16.93%、39.81%，表明了 NAA 处理抑制了须根中附子灵的含量。

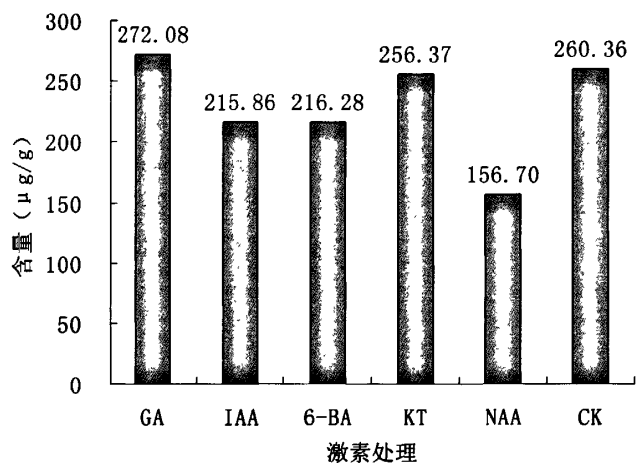
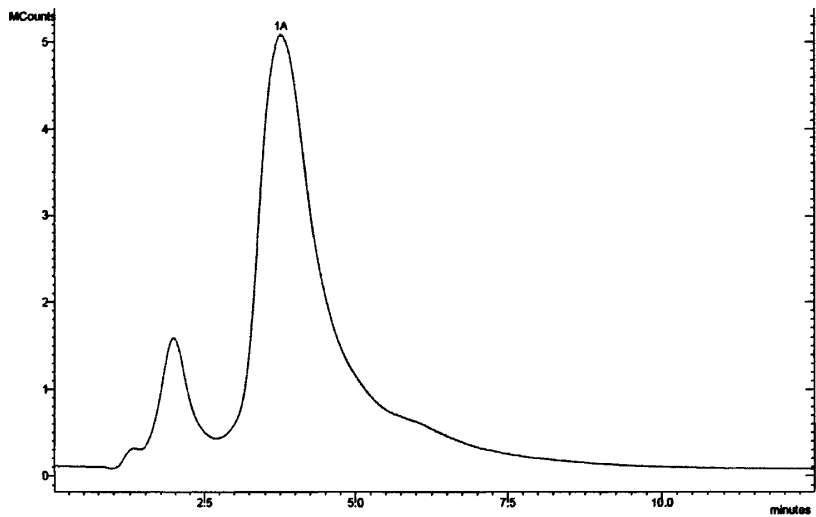
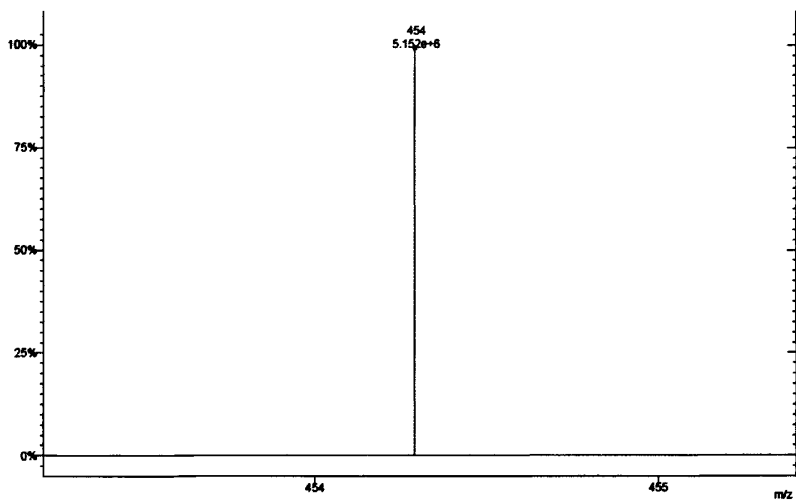


图 3-52 激素处理的须根中附子灵含量比较

Fig. 3-52 Comparison of the fuziline in fibrous tubers by hormones treatment



a



b

a 总离子流色谱图；b 离子峰

图 3-51 须根中附子灵质谱图

a Total ionic chromatographic;b Ion peak

Fig.3-51 MS of the fuziline in the fibrous tubers

(7) 激素对附子植株中附子灵含量的影响

表 3-37 激素对附子植株中附子灵含量的影响（单位：μg/g）

Tab.3-37 Effect of hormones on the determination of fuziline in the plant

处理	子根	茎叶	母根	须根	小计
GA	317.31	54.19	98.31	272.08	741.89
IAA	315.31	37.29	96.74	215.86	665.20
6-BA	320.32	68.37	116.87	216.28	721.85
KT	329.24	79.97	110.03	256.37	775.61
NAA	360.45	45.91	92.71	156.70	655.77
CK	276.24	44.72	124.34	260.36	705.67

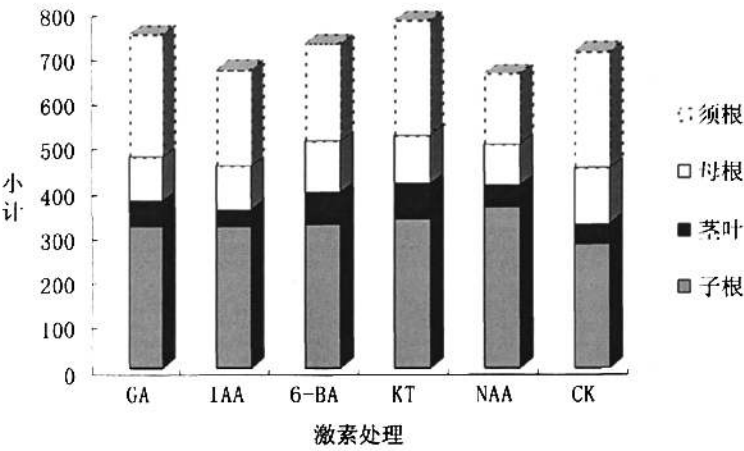


图 3-53 附子植株中附子灵含量的比较

Fig.3-53 Comparison of the fuziline in the plant by hormones treatment

附子不同部位的附子灵含量中子根中的含量最高，须根次之，茎叶中的含量最低，母根的含量略高于茎叶，表明了附子灵的含量在不同的部位有显著的差异性。激素对附子整个植株中附子灵含量的影响不是很明显，KT、GA、6-BA 处理的含量分别比对照增加了 9.91%、5.13%、2.29%，表明该几种激素对附子整个植株中附子灵含量的影响不大；IAA 和 NAA 两处理的含量分别比对照下降了：5.73%和 7.07%。上述结果表明激素对附子整个植株中附子灵的含量

含量影响不大。但是，激素处理间的差异比较明显，KT 比 NAA 处理的植株中附子灵含量增加了 18.27%，比 IAA 处理的附子灵含量增加了 16.60%，其他激素间的差异不显著。

3.3.8 品质指标的相关性分析

激素对附子子根品质的影响（表 3-38），品质间的相关性分析(表 3-39)。由相关性分析可知，在对照中游离的氨基酸含量与可溶性蛋白的含量呈正相关，总糖与可溶性蛋白成正相关，与多糖含量成负相关并且两者的相关性都达到极显著水平；可溶性蛋白的含量与多糖的含量呈负相关，其它品质指标与乌头类生物碱的相关性不大，说明附子中次生代谢产物的生成与附子中的主要成分的关系不大，可能与环境的关系比较大。

激素处理后品质之间的相关性发生了变化(表 3-40)，说明激素对附子的不同品质指标有显著的影响。GA 处理的附子中游离氨基酸与总糖的含量成正相关，与可溶性糖负相关；IAA 处理后游离氨基酸含量与可溶性糖的含量成正相关；6-BA 处理后总糖与可溶性糖、淀粉，可溶性糖与总糖的含量呈正相关，可溶性蛋白的含量与生物碱成负相关；KT 处理后游离氨基酸与蛋白质的含量负相关，淀粉与生物碱成负相关，总糖与淀粉成正相关；NAA 处理后只有可溶性蛋白与氨基酸成负相关。激素处理的游离氨基酸的含量与蛋白质的含量成负相关，表明激素可以抑制游离氨基酸向可溶性蛋白的转化。

表 3-38 植物激素对附子品质的影响

Tab. 3-38 Effect of hormones on the quality of <i>Radix Aconiti</i> .							
处理	氨基酸 (mg/g)	总糖 (%)	可溶性糖 (%)	淀粉 (%)	蛋白质 (mg/g)	多糖 (mg/g)	乌头类总生 物碱(mg/g)
GA	0.9832	24.40	11.73	57.90	4.00	37.00	8.079
IAA	0.9267	31.36	11.79	47.30	4.17	36.40	6.431
6-BA	0.8860	22.36	12.56	52.15	4.29	35.02	6.615
KT	0.8455	25.97	12.49	47.80	4.23	34.90	7.630
NAA	0.7728	19.38	11.28	66.50	4.41	33.43	8.391
CK	0.7953	17.97	12.67	59.55	4.42	32.13	8.102

3.3.9 品质指标的聚类分析

不同激素对附子品质的影响由聚类分析可知，6-BA 和 KT 两激素对附子品质的效应接近；NAA 与 CK 的影响相似；IAA 作用效应大于两细胞分类素，小于对照；对附子品质影响最为显著的是 GA。激素对附子的品质的影响差异较大，对不同的指标呈现了不同的作用。

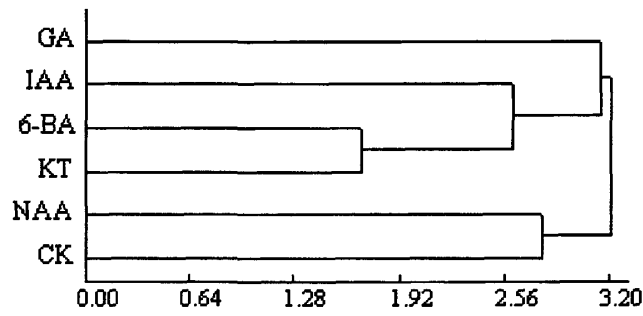


图 3-54 激素对附子品质影响的聚类分析图

Fig. 3-54 Cluster analysis of effects of hormones on quality

表 3-39 对照附子品质间的相关性分析

Tab. 3-39 Correlation analysis of quality of control <i>Radix Aconiti</i> .							
相关系数	氨基酸	总糖	可溶性糖	淀粉	蛋白质	多糖	生物碱
氨基酸	1						
总糖	0.54	1					
可溶性糖	-0.24	0.26	1				
淀粉	0.09	0.55	-0.05	1			
蛋白质	-0.76*	0.95**	0.11	0.41	1		
多糖	-0.51	-0.90**	0.04	-0.39	-0.88**	1	
生物碱	0.37	-0.28	0.2	-0.28	-0.1	0.53	1

注： **为相关系数在 P=0.01 下显著； *为相关系数在 P=0.05 下显著

表 3-40 植物激素对品质指标间相关性的影响

Tab. 3-40 Effect of hormones on the Correlation analysis of quality of *Radix Aconiti*.

相关系数	氨基酸	总糖	可溶性糖	淀粉	蛋白质	多糖	生物碱
氨基酸	1						
总糖	0.98** (GA)	1					
可溶性糖	-0.80* (GA)	0.78* (6-BA)	1				
	0.86* (IAA)						
淀粉		0.82* (6-BA)	0.82* (6-BA)	1			
		0.94** (KT)					
蛋白质	-0.81* (KT)				1		
多糖						1	
生物碱				-0.76* (KT)	0.95** (NAA)		1
					-0.87** (6-BA)		

注：表中未显示的表示两指标间的无相关性，显示的表示两品质间的相关性达到显著或极显著；括号内的激素表示该显著性是有此激素处理后引起。

4 讨论

植物的生长发育,无不受到体内(或体外)激素的调控。因此,在栽培植物时,不能不重视激素的生理效应。在上世纪 30 年代发现生长素以来,关于植物激素的研究进展很快,激素用于调节植物的生长发育,促进农业生产,尤其在果树、蔬菜、花卉等园艺作物上应用较多。例如控制萌发、生长、促进插枝生根、控制脱落、疏花疏果、促进座果、催熟果实等,在改善产品品质、提高产量、节省劳力、提高功效等各方面已取得一定的效果。

随着科学技术的发展和农业生产的需要,为农业生产提供新技术,用植物激素控制作物的生长发育,将逐渐成为农业生产的重要措施之一。但植物激素处理的效果,因作物的种类、品种、长势及生育期的不同而异,又与使用方法、使用时期、部位浓度及环境条件的不同有关。

植物激素的使用是一个非常复杂的问题,通过喷施外源激素必然会使植株体内内源某些激素间的平衡失调,从而影响植物的生长发育和品质。在研究外源植物激素对植株生长发育和品质的影响中,所给外源激素的剂量为理论使用量,由于激素是微量效应,对外界环境比较敏感,在实际操作中,自然、人为等原因所造成的剂量损失无法估计。因此植株对外源激素的真正合适的接受量是以后研究的重点。附子喷施外源激素必然会使植株体内某些激素间的平衡失调,而这种关系的改变必然会引起农艺性状、生理、品质甚至生态效应的改变。不同激素对附子的生长发育呈现了明显的差异性,说明附子对不同的外源激素的敏感程度有差异。下面就对喷施外源激素对附子生长过程中农艺性状,生理指标和品质的影响做一探讨。

4.1 关于激素对附子农艺性状的影响

4.1.1 关于激素对附子外观特征的影响

与根系生长发育紧密相关的地上部分的农艺性状是附子生长的外观表征,其指标的变化是植株生长发育过程中内在协调性强弱的外在表现,附子生长快慢,从某种程度上反映了其内在生理代谢的强弱,研究附子外观性状的变化规律,有助于从表观方面研究附子内部代谢规律。

株高、茎围、叶片数、生物量等农艺性状是营养体生长的主要表现,在附子整个生长期,各外观特性生长速度是不一致的,大体符合作物大周期规律即初期慢、中期快、后期慢的特性,呈现 S 型生长曲线。激素的处理对附子的农艺性状影响比较明显,也说明了农艺性状对激素的敏感程度。不同的

激素的处理也呈现了明显的差异性。GA 和 NAA 两种激素对附子的株高、叶片数、生物量、茎叶生物量都有明显的增加作用，这与前人研究的作用相似^[118,119]，但是两激素对茎围的作用却明显不同；GA 处理的茎秆直径最小，可能是因为 GA 对株高的作用过于显著，而有相关性分析可知株高和茎围呈现负相关；NAA 的对株高虽然有增加作用，但是作用低于 GA，同时 NAA 为生长素对茎围也有一定的促进作用，这与前人研究的作用比较接近^[159]。两种细胞分裂素的作用对附子的外部特征的影响不太明显，各指标和对照的差异都不显著，这与前人的研究有冲突的地方^[114,116,160]，主要的原因可能是激素的作用有品种的差异性；人们过去的研究侧重于在逆境条件下两激素对作物的抗性的增加而表现出的特性，在正常环境下的作用还有待进一步的研究。IAA 的作用最明显的是对叶面积的影响比较显著，增加了叶片数和叶面积，因此增加了生物量，这与杜明华^[161]研究的 IAA 的作用比较相似。各种激素对附子的不同组织的含水量和干物质率的作用比较相似，作用都不显著。

4.1.2 关于激素对附子产量的影响

已有研究表明^[162-167]，生长素和赤霉素对植物的生长都有明显作用；GA 能够促进 RNA 和蛋白质的合成，促进光合作用，增加干物质的积累量，同时促使光合同化物质向储藏部位运转，有“增源、畅流、扩库”的作用；而且赤霉素对马铃薯块茎的重量有增加作用，而且认为赤霉素的这种提高块茎重量的作用可能是通过调节植株体内 6-BA 的平衡来实现的；脱落酸和细胞分裂素类物质是马铃薯块茎形成的主要刺激物；生长素在块茎（根）形成中的作用和报道很少，观点也不一致。

本试验结果表明：GA、NAA、IAA 对附子的农艺性状、附子产量、1+2 子根产量都有显著作用；6-BA、KT 对附子的影响不大，甚至对一些生长性状还有抑制作用；几种激素对附子不同部位含水量影响不大。赤霉素和生长素对附子地上部分的影响，增加了附子的光合作用和同化能力，对附子的产量有重要的作用。6-BA 和 KT 对离体植物的生长发育，延缓衰老等方面作用比较明显，但对连体植物的作用说法不一，对附子作用不明显。细胞分裂素对农作物的块根的形成有刺激作用，但是在试验中发现 6-BA 和 KT 对子根数和产量都没有增加作用，可能是两种激素在连体植物内的主要合成部位在植物的根部，而在附子生长的过程中根部合成了足够的细胞分裂素，外源的施加增加了激素的浓度，对子根的生长起到了抑制作用。激素对附子子根数没有影响，是由误差引起的差异不显著还是由激素的浓度引起的还有待进一步研

究。试验可以说明,在附子农艺性状和产量的作用上,不同的激素的效益存在显著差异。

4.2 关于激素对附子生理指标的影响

叶绿素含量的变化也反应的附子生长发育的一个趋势,附子出苗后随着气温的不断升高,酶活性升高,叶绿素含量呈现增加的趋势。当附子营养器官逐渐的成熟,子根逐渐膨大的时期,叶绿素含量变化比较平稳。叶绿素 a 与叶绿素含量之比在前期变化不大,多维持在 3.2 左右,后期随着 b 含量的增加呈现下降的趋势,这与前人研究的植物体内叶绿素的变化较为相似。前期叶绿素 a 与叶绿素之比相对较高,有利于吸收低温下的长波光;而后期叶绿素 b 含量增加,有利于吸收夏季的短波光^[168]。因此在附子的育种上可以筛选前期 a/b 比值高、后期叶绿素 a/b 比值低的品种,这样既能增加光合产量,又能延长叶片的功能期,从而积累更多的有机物,获得较高的产量。已有研究^[121]6-BA 和 KT 可以延缓植物叶片的衰老,提高植物叶片中叶绿素含量,但是在本实验结果中没有明显的作用,而激素间的作用差异也不显著,可能是在六月下旬附子收获时,附子还处在生长的高峰期,产量达到了最高,是收获的最佳时期,但是附子还未进行生殖生长等发育阶段,因此叶片并未表现出衰老的趋势,激素对叶片的衰老作用也没有表现出来。

类胡萝卜素(Carotenoids)是一类重要的植物色素,在自然界中广泛存在于各种植物中,通常是指 C₄₀ 的碳氢化合物(胡萝卜素)和它们的氧化衍生物(叶黄素)两大类色素的总称^[169,170]。类胡萝卜素具有提高光合效率、抑制和清除自由基的作用^[171]。类胡萝卜素在光合作用过程中起光吸收和光保护两种作用,一方面,类胡萝卜素是光合作用中光传导途径和光反应中心的重要结构成分,担当叶绿体光合天线的辅助色素,类胡萝卜素分子能吸收可见光,形成激发态的类胡萝卜素分子,再将能量传递给叶绿素。这样类胡萝卜素分子吸收了光合作用中所需的能量;另一方面,类胡萝卜素分子在高温、强光下能通过叶黄素循环,可将具有高度活性的单线态氧 ¹O₂ 中的能量以热的形式释放出来,使之转变为基态氧,从而对光合生物起到必不可少的保护作用^[172,173]。类胡萝卜素也是合成植物激素 ABA 的前体^[174]。附子叶片中总的类胡萝卜素含量呈现上升的趋势,这与类胡萝卜素的功能相关。外源激素对类胡萝卜素含量的影响的差异不大。

植物在生长发育的过程中细胞通过多种途径产生各种自由基和活性氧,生物体内重要的活性氧,自由基有单线态氧(O₂)、过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴

离了(O_2^-)、羟自由基(OH)和脂质过氧化物(ROOH 或 ROOH')等^[175],使细胞的正常代谢不能顺利进行。同时,植物在长期的进化中细胞本身具有防止自由基、活性氧早期形成的非酶机制和清除自由基、活性氧的酶促防御系统。在正常情况下,细胞内自由基、活性氧的产生与清除处于动态平衡状态,自由基、活性氧浓度很低,不会引起伤害。但在植物衰老劣变过程中,特别是处于干旱、高盐分等逆境条件下,这种平衡遭到破坏,结果自由基和活性氧的浓度超过了伤害“阈值”,导致蛋白质、核酸、酶结构的氧化破坏,特别是膜脂中的不饱和双链酸最易受自由基的攻击发生过氧化作用。过氧化过程产生新的自由基,从而进一步促进膜脂质过氧化,膜的完整性受到破坏,表现在膜透性增大和离子泄漏,最后导致植物伤害或死亡^[176,177]。植物在长期的系统进化过程中,细胞内形成了防御活性氧、自由基毒害的保护机制。其中起主要作用的是活性氧清除酶系,过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等是活性氧清除酶系统的重要保护酶。它们能有效地阻止高浓度氧的积累,防止膜脂的过氧化作用,延缓植物的衰老,使植物维持正常的生长和发育。因此,植株体内活性氧含量和清除酶的活性均可作为植物生长和生理的重要指标。POD 作为植物体内不但作为活性氧的清除酶和保护酶,植物体中 H_2O_2 的清除需要依赖 CAT 和 POD 两种保护酶的共同作用。POD 在植株内作用具有非专一性,它既与叶绿素降解和膜脂过氧化有关,又是细胞防御活性氧毒害酶系统的成员之一,同时还参与木质素的形成;POD 不但能清除过氧化物,还能使脂质过氧化产物 MDA 转变为正常的脂肪酸^[175]。POD 对植物延缓衰老,维持正常的生长和发育有重要的意义。

激素间对两种保护酶的影响的差异性不大,总体是在前期 NAA、IAA、GA 处理的活性比较高,而三种激素处理的附子植株的农艺性状明显由于其他激素和处理,这可能与激素提高了附子中这两种酶的活性,对植株的发育保护作用。但在后期 6-BA 和 KT 两种激素处理的叶片中两种酶的活性开始呈现上升趋势,这可能与两种激素对作物衰老有延缓的作用有关。特别是 6-BA 的上升比较迅速,可能是随着气温的升高,叶片的衰老体内的自由基等的含量升高,而 6-BA 的作用显现出来。

植物体内脯氨酸含量与植物逆境生理关系密切,在低温、盐渍、干旱、大气污染、微生物感染等环境胁迫条件下,游离脯氨酸含量骤然增加,特别是由干旱引起的胁迫时植物通过积累一定量的脯氨酸,降低植物体内的水势来维持体内的水分平衡。植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗渗透胁迫能力的强弱,抗渗透胁迫性强的品种往往积累较多的脯氨酸。在植

物细胞生理干旱时,脯氨酸的增加有助于细胞或组织持水,从而减少水分的散失。当植物细胞受到渗透胁迫时,脯氨酸通过保护生物大分子的功能结构,为生理生化反应提供足够的自由水和活性物质,从而提高植物对逆境的适应能力^[178,179]。在植物衰老时体内的脯氨酸含量也会积累。最近的研究也指出脯氨酸代谢是沟通 C/N 代谢和渗透胁迫的桥梁^[180]。

在试验中发现激素对附子中脯氨酸的含量没有规律性,激素间的差异性不大,整个发育过程中脯氨酸的含量都维持在 3-6.5 $\mu\text{g/g}$ 之间,脯氨酸的含量较低,说明附子在发育的过程中没有受到环境的胁迫。

谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)是植物体内重要的两种酶,它们可以催化相应的有机酸合成氨基酸,也可以催化氨基酸通过转氨、脱氢的步骤而降解,是植物体内氮代谢和氨代谢的关键酶^[181]。研究发现,GOT 和 GPT 活性高低与植物体内游离氨基酸含量、蛋白质代谢等氮代谢的活跃程度成正相关^[182],即 GOT 和 GPT 活性越高植株生长越旺盛。本实验中发现在整个发育的过程中两种酶的活性一直呈现上升的趋势,说明植株一直处于生长状态,但是前期的活性要高点,说明前期植株发育要更旺盛,这也与采样的部位有关。由于采样的部位是叶片,在前期中叶片的发育比较旺盛,因此两种酶的活性也比较高。当叶片发育到一定程度,植株的地上部分处在平衡时,地下的部分的生长开始旺盛,此时可能根中的两种酶的活性会高于叶片。激素对两种酶的活性的影响与激素对附子农艺性状的影响也呈现了相关性。

4.3 关于激素对附子品质的影响

4.3.1 关于激素对附子糖类、蛋白质、氨基酸的影响

激素对农作物品质的影响过去研究报道的比较多。激素处理后附子不同品质指标间的相关性发生了变化,说明激素对附子品质指标的含量有影响。激素对淀粉的含量影响中除 NAA 处理明显的高于对照外,其它激素处理的都低于对照,总糖和多糖的含量都高于对照,结果与郭芳军^[183]研究的激素对烤烟中糖类物质有增加作用比较接近,说明激素在一定程度上改变了糖在附子内的存在形式。激素对可溶性蛋白质的含量都有抑制作用,这与秦武发^[184]、张劲松^[185]研究的激素对小麦中可溶性蛋白含量有增加作用相悖,与董建华^[186]研究的激素花生的可溶性蛋白的含量有减少的作用相似,说明了激素对不同作物作用的差异性,同时激素增加了附子内游离氨基酸的总量,蛋白质和氨基酸的含量却明显的呈现负相关,说明激素改变了氮的存在形态或者在

氨基酸向蛋白质的转化的过程中起到了一定的作用。

糖类物质在生物代谢的过程中可以为氨基酸的合成提供羧基,植物体内含量的高低以及代谢程度都会影响氨基酸的含量。GA、IAA 处理后附子中游离氨基酸与总糖,可溶性糖的相关性发生了变化,说明两激素可能对附子中糖的代谢与氨基酸的合成有影响。两种细胞分裂素和 NAA 处理后游离氨基酸的含量与蛋白质,生物碱的含量都成负相关。植物体的蛋白质,生物碱的合成与氨基酸的代谢,转化都密不可分,说明这三种激素对附子体内氮的代谢有明显的影晌。

4.3.2 关于激素对附子中生物碱含量的影响

激素对附子体内不同组织中乌头类总生物碱和新乌头碱、乌头碱、次乌头碱三种生物碱的含量有明显的影晌。乌头类总生物碱的含量中子根的含量最高,而母根的含量最低,茎叶和须根的含量居中,但生产上附子主要的收获部位是子根和母根,茎叶和须根都被遗弃,试验表明两部位有较高的利用价值。激素对整个植株中总生物碱的含量影晌不大,只有 6-BA 和 KT 两种激素抑制了总生物碱的含量,原因可能与两种激素对附子产量的影晌相似。GA、IAA、NAA 三种激素对植株中总生物碱的含量影晌不大,说明三种激素影晌了生物碱在附子不同部位的分布,但对整个植株中总生物碱的含量影晌不大。

从新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的含量来看,除须根外的部位中,新乌头碱是主要成分,这与陈熾^[1]研究的新乌头碱是附子生物碱中的主要成分相同。三种双酯型生物碱在不同组织中的分布差异比较明显,只在子根和须根中可以检测到三种生物碱,但须根中的次乌头碱含量最高,茎叶中没有三种生物碱,母根中没能检测到乌头碱。茎叶中没有检测到三种生物碱可能是因为茎秆和叶片中中纤维组织含量比其它组织的纤维含量高,双酯型生物碱含量明显低于其它组织。茎叶中的乌头类总生物碱含量较高说明非双酯型生物碱的含量可能比较高,应该值得关注,也是以后研究的重点。乌头碱是附子中毒性最大的成分,而母根在附子的生长过程中起到的只是一个源的作用,可能对附子的发育还有保护作用,乌头碱在发育的过程中可能发生了代谢或是转移,因此没有检测到。须根中次乌头碱含量和三种生物碱的总含量都比较高,可能因为须根的主要作用是吸收土壤中的水分和营养、淀粉、糖类等物质比较少,因此生物碱的含量相对比较高;根据前人研究的其他药用植物中次生代谢产物的分布可知主要在木质部、韧皮部和周皮等组织^[187,188],而附子须根的主要作用是起吸收和输导作用,这些组织是须根的主要构成,由于

附子的组织化学与次生代谢产物的具体的合成途径还不清楚, 因此生物碱在不同组织中的差异性还有待人们进一步的研究, 该结果也为附子组织化学的研究提供了基础。GA 处理的须根中次乌头碱含量明显的高于其他处理, 几乎为对照的 3 倍, 可能是 GA 对附子须根的组织结构有所改变的结果, 但是具体原因还有待进一步的研究。

附子灵是附子中的非双酯型生物碱, 激素对附子整个植株中的含量影响不大, 也改变了它在不同组织中的含量。附子的组织化学的研究工作还尚未进行, 不同激素处理的不同组织中次生代谢产物的含量呈现的差异性是有激素引起的还是有其在不同组织中的部分引起的还有待进一步研究。

4.4 关于生物碱含量的测定方法

高效液相测定附子中生物碱的含量中样品的制备方法主要是超声和加热回流两种。加热回流往往时间长, 步骤较多, 过程中流失的生物碱较多, 测得含量较低。因此在高效液相测定生物碱含量的样品制备中应该尽量减少操作的步骤。三种生物碱是碱性成分, 药材粉末的碱化程度会影响到提取率, 因此, 本试验用氨水湿润, 再加入不同的提取试剂, 超声使药材分散, 易于溶剂渗透, 使得提取效率提高。超声时间影响到脂溶性生物碱的提取效率, 本实验比较了在同一频率及温度条件下的超声时间, 发现在 50min 时的提取率最高, 时间加长后提取率差异不大, 因此本实验选择 50min 为超声时间。

标准品的溶解, 前人用的主要是在非极性有机溶剂甲醇、乙醇中, 但是在试验中发现标准品的混合液 12h 后, 在主峰的附近会出现杂峰说明生物碱在这些溶剂中可能发生醇解反应, 因此本试验的结果建议若在短时间内检测三种生物碱含量可选用甲醇为溶解剂, 但综合各种比较以后用乙腈溶解样品。

液质联用技术能够将色谱的强分离性能与质谱的强鉴定有时结合, 克服了色谱检测中对紫外吸收比较弱和无的缺点。附子灵的极性比较大, 因此在试验中溶剂和流动相的选择中使用甲醇。供试溶液的制备过程中, 探讨了不同超声时间对附子灵提取率的影响, 在 10、20、30、40、50min 不同超声时间的测定中发现, 附子灵的提取率呈增长趋势, 但是 50min 后的提取率变化不大。

本试验样品处理用甲醇超声法提取方法简单、容易操作, 液相和质谱联用的方法测附子灵方法回收率较高、操作简单、稳定性好、重现性好、精密度高, 是附子中附子灵含量测定的优良方法。该方法为附子中附子灵含量测定和成分研究提供了科学的依据。

结 论

1 农艺性状

(1) 植物激素对附子农艺性状有显著影响。GA、NAA 两激素对附子的株高和叶片数在发育的过程中有明显的增加作用；NAA、KT、IAA 对茎围有显著的增粗作用，GA 处理对茎围有显著的抑制作用；GA、NAA、IAA 对总生物量，子根生物量和茎叶生物量有明显的增加作用，6-BA、KT 对总生物量和茎叶生物量有抑制作用；激素对附子各组织中的含水量，干物质率，子根个数的影响都不明显。

(2) GA、IAA 和 NAA 对附子产量性状有显著影响。GA 对附子子根产量增产效果最大，IAA 和 NAA 的增产作用次之。激素 KT 和 6-BA 的作用不明显。GA、IAA 和 NAA 对 1+2 子根产量的增产效果明显，6-BA 和 KT 对 1+2 子根的产量无显著影响。

(3) 相关性分析和聚类分析表明，GA、IAA、NAA 三种激素的作用相似，对附子的农艺性状影响最大，6-BA 和 KT 的作用不明显。

2 生理指标

(1) 不同的植物激素对附子叶绿素存在不同程度的影响。附子发育过程中叶绿素 a, b, a+b 呈现上升的趋势，a/b 是下降的趋势。激素对叶绿素影响在前期不明显，在后期表现出差异性。收获时 NAA、KT、6-BA 对叶绿素 a, b, a+b 的含量都有显著的增加作用，IAA、GA 有抑制作用。IAA, GA、6-BA 对 a/b 的值有增加的作用。类胡萝卜素含量在发育过程中呈现上升的趋势，激素对类胡萝卜素的含量的影响作用不大。

(2) 植物激素对附子生理生化指标影响上存在明显的差异性。CAT 活性在发育过程的趋势是前期和后期上升，中期平稳；POD 是前期呈现下降，中后期升的趋势；脯氨酸含量在整个过程中都是平稳的趋势，维持在一定的范围内。激素对这三种生理指标的影响规律性不强。

GOT 活性附子整个生育期内呈现上升的趋势，在前期和中期基本上保持平稳。GA 处理在后期增加了 GOT 活性，IAA, 6-BA, KT 和 NAA 在生长过程中对 GOT 的影响作用不大。GPT 在附子的发育过程中比较平稳，GA 对 GPT 的活性有明显的增加；IAA 增加了它的稳定性；KT 处理对 GPT 活性有较大的起伏；6-BA 和 NAA 两对 GPT 的活性有抑制作用。

3 品质指标

(1) 植物激素对附子糖类、蛋白和淀粉含量有显著影响。除 NAA 外, 其他激素处理对附子子根中游离氨基酸含量都有增加作用。GA, NAA, 6-BA, KT 对多糖含量都有显著的增加作用。NAA 处理对淀粉含量增加作用, 其他四种处理显著的抑制了淀粉的含量。激素对总糖含量的都有增加作用, 但各激素处理都降低了可溶性糖的含量。6-BA, KT, IAA 和 GA 降低了附子中可溶性蛋白质的含量。

(2) 植物激素对附子中生物碱含量有明显的影响。

乌头类总生物碱含量在附子不同组织中变化动态也不同, 子根呈现上升趋势; 茎叶中是前期上升, 中后期下降; 母根呈现下降趋势。收获时不同组织乌头类总生物碱含量也不同: 子根>茎叶>须根>母根。6-BA, KT 和 IAA 处理对子根中乌头类总生物碱含量有抑制作用。各激素对茎叶中总生物碱的含量都有抑制作用。6-BA, KT, IAA 和 NAA 对母根中总生物碱的含量有增加作用。6-BA, GA, IAA 和 NAA 对须根中乌头类总生物碱含量有抑制作用。激素对整个植株中总生物碱的含量影响不大。

附子不同组织中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的含量不同, 母根中未检测到乌头碱, 茎叶中三种生物碱都没有检测到, 子根中新乌头碱是主要成分, 须根中是次乌头碱是主要成分。激素对子根中三种生物碱的含量影响不大。激素对母根中新乌头碱和次乌头碱的含量有增加作用。GA 和 IAA 两处理增加了须根中三种生物碱的含量; 6-BA, KT 和 NAA 减少了须根中三种生物碱的含量。

子根中附子灵含量最高, 须根次之, 茎叶中的含量最低, 母根的含量略高于茎叶。激素对子根中附子灵含量有增加作用。KT、6-BA、GA 处理增加了附子茎叶中附子灵的含量, IAA 降低了茎叶中附子灵的含量。激素处理降低母根中附子灵的含量。除 GA 外, 其他处理降低了的须根中附子灵的含量。激素对附子整株中附子灵的含量有一定的影响。

致 谢

本论文是在侯大斌教授的悉心指导下完成。从试验课题的确定，试验方案的实施到试验结果的研究分析、撰写论文，都倾注了导师大量的心血，得到导师具体细心的指导和帮助。侯老师渊博的学识、严谨求实的治学态度、探索不止的敬业精神，以及宽容无私、正直坦荡、谦虚谨慎的高尚品德和平易近人的生活态度给我留下了深刻的印象，是我学习的楷模，并将鞭策我在科学探索的道路上奋发进取。三年来，侯老师对我生活上无微不至的帮助和关怀也让我终生难忘。在论文完成之际，谨向导师三年来对我的指导、支持、关心和爱护表示衷心的感谢和诚挚的敬意。祝导师万事如意，身体健康！

在论文完成的过程中，本课题组的袁小红副教授，马林副教授，贺新生教授，舒晓燕老师对试验方案提出了宝贵意见，以及试验中无私指导和帮助给了我很好的启发，使我少走了弯路，减少了错误，在这里本人向他们表示真诚的感谢！

特别感谢绵阳师范学院的阮期平教授在地震后给我提供了试验的条件，保证了试验顺利完成。感谢西南科技大学分析测试中心的索志荣老师，在液相，质谱测试和分析中的帮助。

整个试验过程还得到了实验室管理员姚老师，秦老师的大力支持，师弟王博，师妹徐敏，同届的王惠，许源等同学的帮助，在此一并表示衷心的感谢。感谢在试验过程中我们植物 06 级的同学们互相帮助，才共同度过了的艰苦试验阶段和地震的日子。

感谢三年来生科院领导的关怀和支持，感谢给我教诲的所有任课老师！

感谢所有朋友的关爱！

最后要特别感谢我的家人，正是他们对我无微不至的关心和默默无闻的支持、鼓励，我才顺利完成了大学及硕士阶段的学业。

赵祥升

2009 年 4 月 10 日

参考文献

- [1] 朱林平. 附子药理作用研究进展[J]. 中华实用中西医杂, 2004, 4(17): 2464-2466
- [2] 董兰凤, 张英俊, 刘京生, 等. 附子多糖与阿霉素长循环热敏脂质体的抗肿瘤作用及其机制探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(4): 458-462
- [3] 赵卫俐. 药用植物生产技术 [M]. 中国农业大学, 2001
- [4] Shang X M, Li Z L. Chromosome studies of 10 species of *Aconitum* in China[J]. *Acta Phytotax. Sin.*1984,22:378—385
- [5] Yang Q E, Gu Z J, Wu Z Y, et al. A karyomorphological study of some Yunnan *Aconitum* species (*Ranunculaceae*) [J]. *Bot Mag Tokyo*, 1989: 1838—1850
- [6] Yang Q E, Wang X Q, Hong D Y. A karyotype study of 7 species of *Aconitum* L from China. [J]. *Pl. Res. Environ*, 1993, 2: 33—38
- [7] 秦明珠. 江苏产三种乌头的生药性状与组织构造[J]. 南京中医学院学报, 1991, 7(4): 230—231
- [8] Dong Z M, Li Zheng L. Developmental studies on the seed and seedling of *Aconitum Kusnezoffii* Reichb[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1990, 32(1): 7—12
- [9] 侯大斌. 川乌 (*A. carmichaeli*) 的生物学与遗传多样性研究 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2005, 5
- [10] 张卫东, 韩公羽, 梁华清, 等. 国内外对中药附子成分与活性的研究[J]. 药学实践杂志, 1996(2): 91
- [11] 陈熾, 朱元龙, 朱任生. 中国乌头的研究 IV, 川乌、附子中的生物碱. 药学学报, 1965, 12(7): 435-439
- [12] 陈昌霞. 附子茎叶生物碱含量测定及运用研究[D]. 四川农业大学, 2006
- [13] 陈泗英, 刘玉青, 王济承. 云南栽培川乌的生物碱成分[J]. 云南植物研究, 1982, 4(1): 73
- [14] 陈迪华, 李慧颖, 宋维良. 中国附子成分研究 II, 白附片的化学成分[J]. 中草药, 1982, 13(11): 481
- [15] Konno C, Shiruasaka M, Hikion H. Structure of senbusine A,B,C, Diterpenic alkaloids of *Aconitum Carmichaeli* roots from China[J]. *J Nat Prod*, 1982, 45(2): 128
- [16] 周远鹏. 附子及其主要成分的药理作用和毒性[J]. 药学学报, 1983, 18(5): 394-400
- [17] 王洁之, 韩公羽. 江油附子脂溶性生物碱的研究[J]. 药学学报, 1985, 20(1): 71-73

-
- [18] Konno C, Shiruasaka M, Hikion H. Cordio active principle of *Aconitum Carmichaeli* roots[J]. *Planta Medica*, 1979, 35: 150
- [19] 张卫东, 韩公羽, 梁华清, 等. 四川江油附子生物碱成分的研究[J]. *药学学报*, 1992, 27 (9): 670
- [20] 杨华元, 张兰桐. 附子注射液的含量测定[J]. *中成药研究*, 1984, 5: 12
- [21] 王宪楷, 赵同芳, 赖盛. 中坝鹅掌叶附子中的生物碱研究. *中国药学杂志*, 1995, 30(12): 716-718
- [22] 徐嗽海, 赵洪峰, 徐雅娟等. 四川江油附子强心成分研究[J]. *中草药*, 2004, 35 (9): 964-966
- [23] 周永. 多糖类抗肿瘤作用的研究进展[J]. *国外医学卫生学分册*, 2001, 28(3): 129-132
- [24] HO C Y, Lo T W, Leung K N, et al. The immunostimulating activities of anti-tumor polysaccharide from KI capsular (polysaccharide) antigen isolated from *Klebsiella pneumo- niae*[J]. *Im- munopharmacology*. 2000, 46: 1-13
- [25] Xu C, Wang X , Wang B, et al. The effect of blockage of macrophage on tumoruppressive activity of polyactin B[J]. *Chin Med J (Engl)*, 1998, 11: 861-863
- [26] Leung M Y, Fung K P, Choy Y M. The isolation and characterization of animmuno modulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*[J]. *Immun opharmacology* 1997, 35: 255-63
- [27] Wasilauskas B L, Cameron J A. Tumor hemorrhagic properties of surface components of *Salmonella typhimurium* mutants[J]. *Cancer*, 1971, 27: 217-222
- [28] Li X M, Ma Y L, Liu X J. Efect of the *Lycium barbarian* polysaccharides on age related oxidative stress in aged mice[J]. *Ethnopharmacol*, 2006, 10: 201-213
- [29] 齐春会, 张永祥, 陈保文, 等. 枸杞多糖体外对正常及衰老小鼠免疫细胞功能的作用及作用机理的初步研究[J]. *中国免疫学杂志*, 1999, 15(9): 419-424
- [30] Kim GY, Choi G S, Lee S H, Park Y M.. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from peritoneal macrophages[J]. *Ethnopharmacol*, 2004, 95: 69-76
- [31] Keller R, Keist R, Gustafson J E. Antitumor activity of bacteria and bacterial products: enhancement of the tumor-protective effect of bacteria by lipoteichoic acid[J]. *Cancer Lett* , 1994, 82: 99-104
- [32] Konno C, Murayama M, Sugiyama K, et al. Isolation and Hypoglycemic Activity of
-

- Aconitans A ,B ,C and D ,Glycans of Aconitum carmichaeli Roots[J]. Plants Med, 1985, 51 (2): 160-161
- [33] 马鸿雁, 刘小彬. 附子粗多糖提取工艺的优化 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16 (1): 22-23
- [34] 董兰凤, 刘京生. 附子多糖与阿霉素蛋白磁微球靶向治疗的抗肿瘤协同作用[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34 (4): 549—553
- [35] 董兰凤, 刘京生, 等. 附子多糖对 H22 和 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9 (9): 654—658
- [36] 刘占锋, 吴伟康. 附子多糖抗运动性疲劳与心肌损伤的作用及机制研究 [A]. 第五届基础理论研究专业委员会学术研讨会论文集 [C] 中国中西医结合学会. 2006
- [37] 唐娟, 吴伟康. 附子多糖降血脂作用及其机制研究 [A]. 第五届基础理论研究专业委员会学术研讨会论文集 [C] 中国中西医结合学会. 2006
- [38] 刘成基, 林革, 魏长根, 等. 川乌炮制前后总生物碱、酯型生物碱含量的变化[J]. 中药通报, 1985, 10 (7): 22
- [39] 熊天琦, 廖工铁, 谢刚林, 等. 离子对萃取-分光光度法测定乌头类生物碱含量的研究[J]. 四川医学院学报, 1985, 16 (1): 24-28
- [40] 王玉珍, 沙明, 孔淑萍, 等. 小活络丸中乌头生物碱的含量测定和双酯型生物碱的限量检查[J]. 中成药研究, 1988, 6: 10-11
- [41] 汪海孙. 风湿骨痛丸中乌头总生物碱的含量测定[J]. 中成药研究, 1988, 4: 14-15
- [42] 黄天俊, 金虹. 甲橙提取比色法测定药材和成药中总生物碱[J]. 中国药学杂志, 1991, 26 (12) : 733-736
- [43] 龙沛霞, 王玉珍. 一阶导数紫外分光光度法测定制川乌、制草乌、附子中生物碱含量[J]. 中草药, 1996, 27 (9): 531-532
- [44] 徐思文. 二阶导数光谱法测定三七伤药片中乌头总碱的含量[J]. 中成药, 1990, 12 (6): 11-12
- [45] 王玉华, 王伟, 刘笑融, 等. 交流示波极谱滴定法测定草乌及那如-3 中总生物碱的含量[J]. 中草药, 1992, 23 (10): 521
- [46] 钱忠直. 乌头及其炮制品制剂中剧毒性成分 Aconitine 等含量测定的研究[J]. 中草药, 1982, 13(11): 15-18
- [47] 张国红, 由会玲, 刘云肖. 乌头生物碱含量测定方法的现况[J]. 河北中医药学报, 2000, 15 (1): 45-47
- [48] 刘万忠, 左阿玲. 全固态乌头碱电化学检测器的研制及其在流动注射分析中的应用[J]. 药学报, 1992, 27 (4): 294-298

-
- [49] 庞志功,汪宝琪,沈万香,等. 薄层-荧光法测定雪山一支蒿中乌头碱的含量[J]. 中国中药杂志, 1991, 16 (8): 485
- [50] 陆履雯, 黄坚, 余维平, 等. 三七伤药片中生物碱含量测定[J]. 中成药, 1983 (1): 19
- [51] 慕宝昌, 叶定江. 草乌炮制前后乌头碱的含量分析[J]. 中成药, 1985 (10): 14
- [52] 武凤兰, 洪星, 苏德森. 乌头碱-PVC 膜电极的制备与应用[J]. 沈阳药学院学报, 1988, 5 (3): 199-203
- [53] 童玉懿. 乌头类生药生物碱的高压液相色谱法测定[J]. 中国中药杂志, 1990, 15 (2): 42
- [54] 王柯, 童玉懿. 乌头类生物碱中主要生物碱的薄层光密度法测定[J]. 药学学报, 1990, 25 (5): 387-390
- [55] 赵冬霞. 薄层扫描法测定通痹止痛胶囊中乌头碱的含量[J]. 云南中医学院报, 2003, 23 (2): 19-21.
- [56] 瞿发林, 丁青龙, 章杰兵. 双波长薄层扫描法测定痛得安胶囊中乌头碱的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17 (5): 390-391
- [57] Hikino H, et al. Determination of aconitine alkaloids by HPLC[J]. Chromatogr, 1981, 2 (11), 123
- [58] 邹恩济, 冯国庆. 高效液相色谱法测定蒙成药草乌制剂中乌头碱的含量[J]. 中成药, 1992, 14(2): 17-18
- [59] 童玉懿. 民间用草乌类生药中一些生物碱的鉴别与含量测定[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(1): 42-44
- [60] 朱瑞龙, 王白露, 李君实. TLC-HPLC 法测定小活络丸内中乌头碱、次乌头碱、乌头碱的含量[J]. 中成药, 1996, 18 (10) : 13-14
- [61] 张兴华, 王志军. 高效液相色谱法测定家兔血液中乌头碱[J]. 中国医药工业杂志, 1989, 20 (5) : 211-213
- [62] 彭波, 杨华元, 刘世瑞. 反相离子对高效液相色谱法测定川乌和附片中乌头类生物碱的方法研究[J]. 药物分析杂志, 1995, 15(6): 13-16
- [63] 王慕邹, 李百龙, 高凤英. 五头种主要生物碱的高效液相色谱测定[J]. 药学学报, 1983, 18 (9): 689-694.
- [64] 王勇, 刘淑莹. 乌头类生物碱的质谱研究进展[J]. 质谱学报, 2002, 23(2): 112-119
- [65] 王兆基, 何绍基, 徐树棋. 液相色谱/质谱/质谱联用法测定乌头属药材及中成药中乌头类生物碱含量[J]. 分析化学, 2001, 29 (4): 391-395
- [66] Wada K, Mori T, Kawahara N. Application of liquid chromatography-atmospheric
-

- pressure chemical ionization mass spectrometry to de differentiation of stereoisomeric diterpenoid alkaloids[J]. Chem Pharm Bull, 1997, 48(7): 1065-1074
- [67] 许庆轩, 王勇, 刘志强, 等. 草乌中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26 (4): 638-641
- [68] 王勇, 宋凤瑞, 金东明, 等. 复方中药四逆汤中乌头碱类二萜生物碱的电喷雾串联质谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25 (1): 85-89
- [69] 越皓, 皮子凤, 赵宇峰, 等. 电喷雾串联质谱分析附子炮制中的化学成分变化[J]. 分析化学研究报告, 2007, 35 (7): 959-963
- [70] 越皓, 皮子凤, 赵宇峰, 等. 附子不同配伍药对中生物碱成分的电喷雾质谱分析[J]. 药学报, 2007, 42 (2) : 201-205
- [71] 孙爱民, 陈德华, 毕培曦. 高效毛细管电泳法测定中草药川乌、草乌中乌头碱的含量[J]. 色谱, 1999, 17 (1): 67-69
- [72] 韩公羽. 四川江油附子新的强心成分[J]. 第二军医大学学报, 1989, 10: 94
- [73] 黄能惠. 附子注射液和去甲乌药碱对心血管作用比较[J]. 中国药理学报, 1980, 1: 34-39
- [74] 姜文卿. 附子 1 号对缓慢性心率失常作用初步临床观察[J]. 中华心血管病杂志, 1980, 8(2): 95-98
- [75] 赵保文. 附子、川乌、草乌的炮制加工及药理作用比较[J]. 首都医药, 2000, 7 (4): 33-34
- [76] 张明发. 温里药温经止痛的药理研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 7 (1): 29-32
- [77] 董兰凤. 附子多糖对 H22 和 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003 , 9(9): 14-17
- [78] 张涛. 附子对老年大鼠抗氧化系统影响的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2001, 21(2): 135- 136
- [79] 张卫东. 国内外对中药附子成分与活性的研究[J]. 药学实验杂志, 1996, 14 (2): 91 -94
- [80] 吉林中医药研究所. 长白山植物药志[M]. 吉林: 吉林人民出版社, 1982, 356
- [81] 杜贵友, 方文贤主编. 有毒中药现代化研究与合理应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 556-567
- [82] 陈冀胜, 郑硕主编. 中国有毒植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 465-498
- [83] 周远鹏, 江京莉. 附子的研究-VI. 附子中乌头碱及其有关化合物的药理作用[J]. 药理与临床, 1992, 8(5): 45-49

-
- [84] 周远鹏, 刘文化, 曾贵云, 等. 乌头碱及其类似物的毒性和对心脏收缩功能的影响[J]. 药学报, 1984, 19(9): 641-646
- [85] 李洪, 朱祯祿. 附子的水解程度测定[J]. 中国药业, 1998, 7(12): 20-21
- [86] 秦永刚, 张美荣, 张建平, 等. 不同蒸煮时间对附子强心作用及心脏毒性的影响[J]. 医学信息, 2002, 15(10): 618
- [87] 马骋, 蔡宝昌, 陈龙. 草乌几种炮制品的毒性实验比较[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(4): 216-22
- [88] 吴荣祖. 附子减毒与增效-中药附子传统加工工艺创新研究[J]. 药品评价, 2005, 2(5): 380-38
- [89] 李荣宗. 附子、川乌、草乌的合理炮制经验[J]. 海峡药学, 2001, 13(2): 49-50
- [90] 傅梅红, 章春宜, 毛淑杰. 炮制对关白附有毒成分次乌头碱含量影响研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(5): 280-282
- [91] 朱林平. 附子毒性研究概况[J]. 江西中医药, 2004, 35(6): 53-55
- [92] 刘道平. 炮制对附子中化学成分的影响[J]. 山东医药工业, 2001, 20(2): 25
- [93] 阮海林, 陆宁. 乌头碱中毒的特点及治疗[J]. 广西医科大学学报, 2000, 17(1): 160
- [94] 邢青林, 刘棋. 乌头碱中毒的病案讨论[J]. 中国疗养医学, 1998, 7(1): 50-51
- [95] 杨晓敏主编. 实用急性中毒手册[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1991: 25
- [96] 李宗浩主编. 现代急救医学[M]. 杭州: 浙江科学出版社, 1993: 40
- [97] 肖小河, 陈士林, 陈善墉. 乌头种内变异的初步研究[J]. 资源开发和利用, 1991, 14(5): 18-20.
- [99] 肖小河, 陈士林, 尹国萍, 等. 乌头品质生态学研究[J]. 中药材, 1990, 13(11): 3-5
- [100] 陈辛, 夏文娟, 方娜娜, 等. 江油栽培附子综合利用探讨[J]. 中草药, 1992, 23(10): 523-524.
- [101] Watad A A, Ecker R, Barzilay A. *Aconitum* as a flowering pot plant [J]. Scientia-Horticulturae (Netherlands), 1993, 56(2): 175-179
- [102] Watad A A. Effect of day length and shadowing on growth, flowering and bulb production of *Aconitum*[J]. Hassadeh (Israel), 1993, 73(4): 435-438
- [103] Watad A A, Kochba M, Nissin A, et al. Improvement of *Aconitum napellus* micro-propagation by liquid culture on floating membrane rafts[J]. Plant-Cell-Reports (Germany) 1995, 14(6): 345-348
- [104] DeHertogh A A, Le Nard M. The Physiology of Flower Bulbs [J]. Elsevier, Amsterdam-
-

- am, 1993, 335-342
- [105] Lurie G. Acontium and its growing[J]. Hassadeh(israel), 1993, 73(11): 1260-1261
- [106] Lurie G, Borochoy A, Watad A A, et al. Aconitum: effect of environmental conditions on growth ,flowering and tuber production[J]: Acta-Horticulturae. 1997, 430: 233-240
- [107] Han S S, Halevy A H, Sachs R M, et al. Flowering and corm yield of brodiaea in response to temperature,photoperiod, corm size, and planting depth[J]. Am Soc,1991, 116(1): 19 -22
- [108] Doss R P, Christian J K. Relationship between bulb size, apexsize and flowering in bulbous Iris cv. Ideal.[J]. Physiologia Plantarum, 1992, 45(1): 215-218
- [109] Abed A Watad, Gidon Luria and Amihud Borochoy. Aconitum: effects of environmental conditions and tuber size on growth, flowering and tuber production[J]. ScientiaHorticulturae, 1999, 81(2): 135-147
- [110] Watad A A, Ozeri Y, Hagiladi A , et al . Aconitum: effect of cutting height on for mation of tubers[J]. Hassadeh, 1991, 71(1): 90-91
- [111] Hagiladi A, Umiel N, Ozeri Y, et al. The effect of planting depth in emergence and development of some geophytic plants[J]. Acta-Horticulturae, 1992, 32 (5): 131-137
- [112] Utelli A B, Roy B A, Baltisberger M. Molecular and morphological analyse of European Aconitum species(Ranunculaceae)[J]. Plant systematics and Evolution, 2000, 22 (4): 195-212
- [113] Utelli A B, Roy A. Pollinator abundance and behavior on *Aconitum lycoctonum* (Ranunculaceae):An analysis of the quantity and quality components of pollination [J]. Nordic Ecological Society Oikos, 2000, 89(3): 461-470
- [114] 潘瑞炽, 李玲. 植物生长发育的化学控制[M]. 广东: 高等教育出版社, 1995, 4-5
- [115] T D Ho. Hormonal Regulation of Gene Expression[J]. Plant Growth Regul, 1993, 12: 197-205
- [116] 魏福香. 植物生长调节剂的发展状况[J]. 安徽农业科学, 1999, 3: 11-12
- [117] 杨兴洪, 陈翠容. 植物生长调节剂在棉花上的研究应用概况及展望[J]. 山东农业大学学报. 1996, 27 (2): 236-239
- [118] 周凤兰, 陈泽光, 张吉川, 等. 浅谈植物生长调节剂在农业生产上的应用[J]. 吉林农业科技, 1997, 4: 76-79
- [119] 卜新华, 牛柱贞. 几种新型植物生长调节剂的药效试验[J]. 山西农业科学, 2002,

- 30 (1): 64
- [120] 张宏纪, 张举梅. 植物生长调节剂和根外施肥对小麦品质的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2003, (3): 7-10
- [121] 李春喜, 尚玉磊. 不同植物生长调节剂对小麦衰老及产量构成的调节效应[J]. 西北植物学报, 2001, 21 (5): 931-936
- [122] 陈石根, 周润琦主编. 酶学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001
- [123] 李秀菊. 植物生长调节剂浸种对小麦幼苗抗旱性的影响[J]. 河南职业技术学院学报, 2003, 31 (2): 16-19
- [124] 王敏. 抗旱剂对玉米出苗和幼苗生长的影响[J]. 中国农学通报, 2003, 19 (2): 33-36
- [125] 赵东升. 生长调节物质对亚麻产质量影响及其机理研究[D]. 东北农业大学硕士学位论文, 2005
- [126] 王月英. 生长调节物质及营养液对 5 种水培花卉的影响[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23 (2): 232-235
- [127] Cliffford P E, Offer C E, Patrick J W. Growth regulators have rapid effects on photosynthate unloading from seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. [J]. Plant Physiol, 1986, 8: 635-637
- [128] 王桂林, 梁振兴. 小麦粒重行车过程中内源 ABA 和 GA 的变化及其调节[J]. 北京农业大学学部, 1991, 17(增刊): 109-114
- [129] Biswas A K. Manipulation of senescence, source-sink relationship and yield of wheat by growth regulating chemicals India[J]. Plant Physiol, 1988, 2: 152-157
- [130] Herzog H. Source and sink during the reproductive period of wheat: development and its regulation with special reference to cytokinins[J]. Berlin and Hamburg: Parey, Scientific Publishers. 1986: 1-8
- [131] Schussler J R, Brenner M L, Brun W A. Relationship of endogenous abscisic acid to sucrose level and seed growth rate of soybeans[J]. Plant Physiol, 1981, 67: 774-779
- [132] 沈岳清, 方敏初, 盛敏智. 乙烯利对小麦光合能力和物质运输等方面的影响[J]. 植物学报, 1980, 22 (2): 55 -62
- [133] Beltrano J, Carbone A, Montaldi E R, et al. Ethylene as promoter of wheat grain maturation and ear senescence[J]. Plant Growth Regul, 1994, 15: 107-112
- [134] 田晓莉, 于运华, 段留生, 等. 作物化学控制技术的增产潜力[J]. 作物杂志, 1997, 4: 7-9
- [135] 张永清, 商庆新. 药用植物次生代谢与中药材 GAP[J]. 中药材栽培研究, 2005,

- 7 (2): 67-73
- [136] Misawa M, Goodbody A E. Production of Antitumor Compounds by Plant Cell Cultures In *Catharanthus roseus*[J]. Plant Cell Culture Secondary Metabolism, 1993, 11: 123-138
- [137] Moreno PRH, Vander Heijden R, Verpoorte R. Relation between hormone and secondary metabolism in *Catharanthus roseus* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 42: 1-25
- [138] Zenk M H, El-Shagi H, Arens H, et al. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspensions cultures of *Catharanthus roseus*[J]. Plant tissue Cell culture and its Biotechnological application, 1995, 7: 27-44
- [139] Smith J I, Amouzou E, Yamaguchi A, et al. Effect of hormone on secondary in *Catharanthus roseus* [J]. Biotech, 1988, 10: 568
- [140] Laurain D, Chenieux J C, Guiller JT. The relationship between growth rate, different increment and alkaloid accumulation in cell cultures[J]. Experimental Botany, 1983, 34(145): 1055-1065
- [141] Mavituna F. Introduction to plant biotechnology[J]. Plant Cell Biotechnology, Berlin: Springer – Verlag, 1988, 1-14
- [142] 胡延玉, 伍光庆. 乌头的组织培养与再生植物. 植物生理学通讯, 1985, (5): 37-40
- [143] 关文灵. 乌头植株再生体系的建立[J]. 中草药, 2003, 3 (6): 561-563
- [144] 林静, 何毅. 乌头组织快繁的技术探讨[J]. 贵州科学, 1998, 16 (2): 120-123
- [145] 瞿素萍. 组织培养法快速繁殖川乌头种苗[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23 (4): 62-63
- [146] 李路娥. 江油附子离体培养的初步研究[D]. 四川师范大学硕士论文, 2006
- [147] 张宪政. 植物叶绿素含量测定—丙酮乙醇混合液法[J]. 辽宁农业科学, 1986, 3: 26-28
- [148] 唐延林, 黄敬峰, 王人潮. 水稻不同发育时期高光谱与叶绿素和类胡萝卜素的变化规律[J]. 中国水稻科学, 2004, 18 (1): 59-66
- [149] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000, 164-165
- [150] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000, 168-169
- [151] 王秀奇, 秦淑媛, 高天慧, 等. 基础生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999, 103-105
- [152] 舒晓燕, 刘慧, 梁静, 等. 川附子粗多糖提取工艺的研究[J]. 中药材, 2006, 29 (12):

- 1349 -1352.
- [153] 阮期平, 高长健, 李华隆, 等. 附子多糖 F I 的分离纯化及部分理化性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(1): 46-49
- [154] 马鸿雁, 刘小彬, 李楠, 等. 附子粗多糖提取工艺的优化[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(1): 22-23
- [155] 李云霞, 孙照, 郭艳玲. 酸性染料比色法测定川乌、草乌中总乌头生物碱的含量[J]. 中成药, 2000, 22(9): 662-663
- [156] 黄建明, 郭济贤, 孙明明, 等. 草乌中生物碱含量测定方法的研究[J]. 中药材, 2002, 25(12): 878-880
- [157] 曾韶西, 王以柔, 刘鸿先. 低温光照下与叶绿素降解有关酶促反应[J]. 植物生理学报, 1991, 17(2): 177-182
- [158] 杨淑慎, 高俊凤. 活性氧、自由基与植物的衰老[J]. 西北植物学报, 2001, 21(2): 215-220.
- [159] 朱中华, 段留生, 玛雪梅等. 内源激素对小麦叶片衰老调控的系统分析[J]. 作物学报, 1998, 24(2): 176-181
- [160] 董永华, 史吉平, 李广敏, 等. 外施 6-BA 和 ABA 提高玉米幼苗抗旱能力的作用及效果[J]. 西北植物学报, 1998, 18(2): 202-206
- [161] 杜明华, 何忠仁, 杜长玉. 不同生长素对西芹产量及其性状和生理指标的影响[J]. 内蒙古农业科技, 2006, 4: 46-47
- [162] Vreugdenhil D and Strik PC. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*) [J]. *Physiol Plant*, 1989, 75: 525 - 531
- [163] Hammes PS and Nel PC. Control mechanisms in the tuberization process[J]. *Potato Research*, 1975, 18: 262 - 272
- [164] 刘梦芸, 蒙美莲. GA₃、IAA、CTK 和 ABA 对马铃薯块茎形成调控作用的研究[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1997, 18(2): 16 - 20
- [165] Palmer CE and Smith OE. Effects of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *solanum tuberosum* L. cultured in vitro[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1970, 11: 303 - 314
- [166] 宋占午. 细胞分裂素对块茎形成的影响[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 1992, 28(1): 55 - 60
- [167] 郭华春, 沙本才, 余杨. 赤霉素打破种薯休眠对马铃薯生长及产量的影响[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(6): 336-337
- [168] 牛立元, 茹振钢. 小麦叶片叶绿素含量系统变化规律研究[J]. 麦类学报, 1999,

- 19 (2): 36-39
- [169] Zhu C F, Koiwa H, Yamamura S. Expression of early carotenogenic genes in *Gentiana*[J]. IBRC Report, 1999, 38: 1024-1027
- [170] Schmidt-dannen C, Umeno D, Arnold F H. Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 750 - 753
- [171] Goodwin T W, Britton G. Distribution and analysis of carotenoids[A]. Goodwin T W. Plant Pigments [C], London: Academic Press, 1988, 24: 305 - 314
- [172] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 188 - 196.
- [173] 范立梅. 类胡萝卜素的生物学功能[J]. 生物学通报, 2001, 36 (4): 10
- [174] Rock C D, Zeewartj A D. The ABA mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7496 - 7499
- [175] 杨淑慎, 高俊凤, 活性氧、自由基与植物的衰老[J]. 西北植物学报, 2001, 21 (2): 215-220
- [176] 王爱国, 邵从本, 罗广华, 等. 大豆下胚轴线粒体的衰老与膜脂的过氧化作用[J]. 植物生理学报, 1988, 14 (3): 269
- [177] 张继澍. 植物生理学[M]. 西安: 世界图书出版社, 1999: 363-365
- [178] 刘道宏. 植物叶片的衰老[J]. 植物生理通讯, 1983, 2: 1-19
- [179] 汤章城. 逆境条件下植物脯氨酸的累积及其可能的意义[J]. 植物生理通讯, 1984, (1): 15-21
- [180] 孙学彬, 李祥莲, 刘庆, 等. 外源植物激素对野生大豆幼苗期抗旱能力影响的初步研究[J]. 生命科学仪器, 2008, 6 (9): 36-40
- [181] 陈煦. 不同栽培法对水稻产量和品质作用效果与机理的比较研究[D]. 2006, 湖南农业大学
- [182] 彭辉辉, 刘强, 蓉湘民, 等. 不同栽培法对晚稻氨基酸含量影响及其机理的研究[J]. 2006, 22 (11): 112-117
- [183] 郭芳军, 韩锦峰, 张建忠. 喷施生长素对烤烟酶活性和化学成分的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22 (8): 279-281
- [184] 秦武发, 董永华, 张彩英. 植物激素对小麦品质的影响[J]. 河北农业大学学报, 1996, 19 (4): 93-95
- [185] 张幼松, 商振清, 韩建民. 干旱条件下小麦叶面喷施 6 - BA 和 KT 对小麦子粒品质和产量的影响[J]. 河北农业大学学报, 2001, 21 (4): 28-31
- [186] 董建华, 陈定光, 王秉忠. 植物激素对花生种子活力指数、过氧化物酶及可溶性

蛋白质的影响[J]. 热带作物学报, 2000, 21(2): 23-28

- [187] 高玲玲, 刘文哲. 远志根的形态发生及组织化学研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16 (1): 1-9
- [188] 卜晓英. 虎杖营养器官与愈伤组织结构及白藜芦醇组织化学定位研究[D]. 湖南农业大学, 2007
-

攻读学位期间发表的与学位论文相关学术论文 及研究工作

参与研究工作

- [1] 参与国家科技支撑项目(2006BAE01A01-12)《附子二萜生物碱杀虫先导化合物的创新与优化研究》
- [2] 四川省农作物育种攻关课题 (NO.2006YZGG12-22) 和绵阳市重点科技 (NO.06S041-05) 主要研究人员。

学术论文

- [1] 赵祥升, 侯大斌*, 王惠, 许源, 舒晓燕. 植物激素对附子产量的影响[J]. 湖北农业科学, 2008, 47 (12): 1467-1468
- [2] 赵祥升, 王惠, 许源, 侯大斌*. 江油附子多糖含量的测定[J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (2): 650-651
- [3] 赵祥升 侯大斌*, 舒晓燕. 植物激素对附子多糖含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (7): 2-4
- [4] 赵祥升, 侯大斌*, 许源, 王惠, 舒晓燕. 附子离体苗中生物碱含量的测定[J]. 中草药 (增刊), 2008. (已接受)
- [5] 赵祥升, 侯大斌*. 不同样品制备方法对 RP_HPLC 测定附子生物碱含量的影响[J]. 中国药房, 2009. (已接受)
- [6] 侯大斌, 赵祥升, 王惠, 许源. 附子不同组织中生物碱含量的测定[J]. 西南科技大学学报 (自然科学版), 2009, 24 (1): 98-102
- [7] 舒晓燕, 赵祥升, 侯大斌*. 附子不同贮藏条件下中相关品质的变化分析[J]. 中药材, 2009, 32 (1): 29-31
- [8] 舒晓燕, 赵祥升, 侯大斌*. 两种炮制方法对附子品质影响的研究[J]. 湖北农业科学, 2009, 48 (3): 704-706
- [9] 许源, 侯大斌*, 杨海君, 赵祥升, 等. 中乌头碱衍生物的合成及其杀虫活性测定[J], 安徽农业科学, 2009, 37 (9): 3890-3892
- [10] 许源, 侯大斌*, 王惠, 赵祥升, 等. 中乌头碱的丙酰化修饰研究[J]. 时珍国医国药, 2009 (已接受)
- [11] 王惠, 侯大斌*, 杨海君, 赵祥升, 等. 两种宋果灵酯化产物的合成及其杀虫活性[J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (9): 3888-3889
- [12] 王惠, 侯大斌*, 杨海君, 赵祥升, 等. 中乌头碱结构中磺酰基的引入及其杀虫活性的测定[J]. 湖北农业科学, 2009, 48 (3): 718-720