

孟婷婷, 彭艳玲, 王钰玺, 等. 乌拉尔甘草悬浮细胞培养物有效成分的提取[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 63–66.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.017

乌拉尔甘草悬浮细胞培养物有效成分的提取

孟婷婷, 彭艳玲, 王钰玺, 李雅丽

(内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 内蒙古包头 014010)

摘要:甘草为豆科多年生草本植物, 化学成分复杂, 具有多种生物学活性与药理学活性, 广泛应用于临床、食品、保健品、化妆品等行业。以悬浮培养的乌拉尔甘草细胞为研究对象, 采用双因素无重复试验法对悬浮细胞的有效成分提取方法进行优化, 结果表明: 选取 70% 乙醇作为提取剂, 在料液比 1 g : 10 mL 的提取条件下, 乌拉尔甘草中的 2 大类有效成分——三萜皂苷类化合物、黄酮类化合物都得到充分析出; 在此提取条件下, 悬浮细胞中黄酮类化合物的含量为 0.020 0 g/g, 大约是野生乌拉尔甘草根粉中黄酮类化合物含量的 23%。

关键词:乌拉尔甘草; 悬浮细胞; 有效成分; 提取; 黄酮类化合物

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0063-03

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 被称为“众药之王”, 有广泛的药理学活性, 是多种中成药与配方制剂的主要成分, 同时也因为其特有的甜味而作为食品添加剂 (低热值甜味剂) 广泛应用在食品行业, 国内外市场需求量很大^[1-4]。近些年来, 由于无序采挖、生态环境恶化, 造成甘草主产区野生资源濒临枯竭^[5], 表现在栽培品种收获期过长、病虫害严重、质量低下, 导致甘草资源面临危机。植物细胞培养技术因具备不占用土地、培养周期短、培养条件和环境人工可控等优势, 成为现有的植物资源替代生产天然药物途径中最有潜力的方法之一^[6-7]。在对甘草细胞进行离体悬浮培养的过程中, 细胞内有效成分的提取是一个主要的研究内容, 充分高效地分离出细胞培养物中的有效成分是下一步应用的保证^[8]。本研究以产自内蒙古鄂尔多斯市达拉特旗的乌拉尔甘草种子获得的离体悬浮培养细胞为材料, 通过双因素无重复试验筛选悬浮细胞有效成分的提取工艺, 以期促进甘草细胞大规模培养, 加快工业化生产天然药物的进程。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料为乌拉尔甘草种子, 购自内蒙古鄂尔多斯市达拉特旗。主要试剂为芸香苷标准品, 购自中国药品生物制品检定所, 纯度 92.5%; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

BRANSON 超声波清洗器, 必能信超声 (上海) 有限公司; 722 可见分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海跃进医疗器械厂; YP502N 电子天平, 上海

精密科学仪器有限公司; Synergy™ HT 多功能酶标仪, BioTek。

1.3 试验设计

对乌拉尔甘草悬浮培养细胞有效成分的提取采用全面试验设计法进行优化, 全面试验设计法是对所选取的试验因素的所有水平组合全部实施 1 次以上试验, 此方法适用于单因素和双因素试验, 可获得全面试验信息, 准确地估计各试验因素主效应的大小及各因素之间各级交互作用效应的大小^[9]。从有效成分提取的影响因素中抽取 2 个主要因素设置均匀水平, 本试验分别以甲醇、乙醇作为提取剂, 采用超声提取法, 选择提取剂质量分数 (10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%)、料液比 (g : mL, 1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45、1 : 50) 2 个主要影响因素, 分别设计 10 个水平, 进行双因素无重复试验。

1.4 乌拉尔甘草悬浮细胞供试样品的制备

将生长 1 个周期 (21 d) 的乌拉尔甘草悬浮细胞用布氏漏斗抽滤后, 用无菌水冲洗, 去除表面残留的培养基, 置于 37 ℃ 恒温烘箱中烘干至恒质量, 研磨成粉末后过 100 目筛得乌拉尔甘草细胞粉末。准确称取 180 份 0.5 g 的甘草粉末于 180 个 100 mL 的三角瓶中, 依据所设计的双因素无重复试验, 按不同料液比 (影响因素 A) 加入不同浓度提取剂 (影响因素 B), 放置 24 h 过夜后, 置于超声清洗器中超声提取 30 min, 超声后的料液立即置于漏斗过滤得滤液, 静置, 取上清样于 4 ℃ 冰箱中保存^[10]。

1.5 酶标仪法检测

采用酶标仪检测供试样品。分别吸取 5 μL 样品溶液, 点入 96 孔点样板中, 加入 245 μL 超纯水混匀, 依次放入酶标仪检测槽中。分别在 254、377、410 nm 波长下检测样品的吸光度 $D_{254\text{ nm}}$ 、 $D_{377\text{ nm}}$ 、 $D_{410\text{ nm}}$, 以不加样品组为对照。

1.6 细胞培养物中黄酮类化合物测定

1.6.1 芸香苷标准样品的制备 准确称取干燥至恒质量的芸香苷标准品并用甲醇溶解, 配成 0.1 mg/mL 的芸香苷标准品溶液。分别取 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 芸香苷标准品溶液置于 7 支试管中, 添加 5 mL 甲醇、0.5 mL 10% KOH 溶液, 充分摇匀显色 5 min 后, 用甲醇定容至 10 mL, 摇

收稿日期: 2014-10-21

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31460064); 内蒙古自然科学基金 (编号: 2013MS051); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (编号: NJZY13152)。

作者简介: 孟婷婷 (1991—), 女, 河南开封人, 硕士研究生, 主要从事药用植物生物技术研究。E-mail: wymtt1991@163.com。

通信作者: 李雅丽, 博士, 教授, 主要从事植物次生代谢调控研究。E-mail: btliali@126.com。

匀,用分光光度计检测 410 nm 处的吸光度 $D_{410\text{ nm}}$ 。

1.6.2 黄酮类化合物测定 各取出 0.2 mL 制备好的 5 批乌拉尔甘草悬浮细胞供试样品溶液,分别置于 5 支 10 mL 试管中,各加 5 mL 甲醇,0.5 mL 10% KOH 显色剂,显色 5 min 后,定容到 10 mL,用分光光度计检测其在 410 nm 处的吸光度 $D_{410\text{ nm}}$ 。同时制备 1 份野生甘草根粉样品作为对照^[11]。

2 结果与分析

2.1 不同提取剂条件所得提取液的 $D_{254\text{ nm}}$

254 nm 是甘草中主要成分——以甘草酸为代表的三萜皂苷类化合物的主要检测波长。如图 1 所示,采用 60% 甲醇、90% 甲醇作为提取剂,料液比为 1 g : 10 mL 时,在 254 nm

处有较大吸光度;以 70% ~ 90% 乙醇作为提取剂,料液比 1 g : 10 mL、1 g : 15 mL 时,在 254 nm 处有较大吸光度。

2.2 不同提取剂条件所得提取液的 $D_{377\text{ nm}}$ 、 $D_{410\text{ nm}}$

377、410 nm 是甘草中另外一大类主要成分——以甘草苷为代表的黄酮类化合物的主要检测波长,如图 2 所示:以 80% 甲醇作为提取剂,料液比 1 g : 10 mL 时,在 377 nm 处有最大吸光度;以 70% 乙醇作为提取剂,料液比 1 g : 10 mL 时,在 377 nm 处有最大吸光度。如图 3 所示,以 80%、90% 甲醇作为提取剂,料液比 1 g : 10 mL 时,在 410 nm 处有较大吸光度;以 70% 乙醇作为提取剂,料液比 1 g : 10 mL 时,在 410 nm 处有最大吸光度。

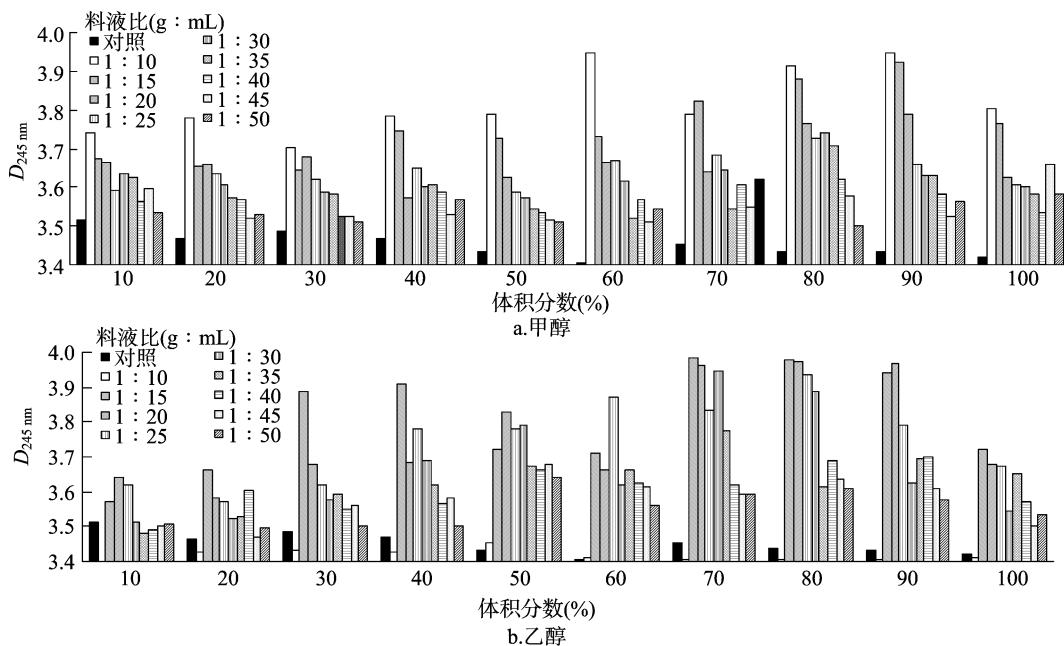


图1 以不同浓度甲醇(乙醇)为提取剂在不同料液比下提取液的 $D_{254\text{ nm}}$

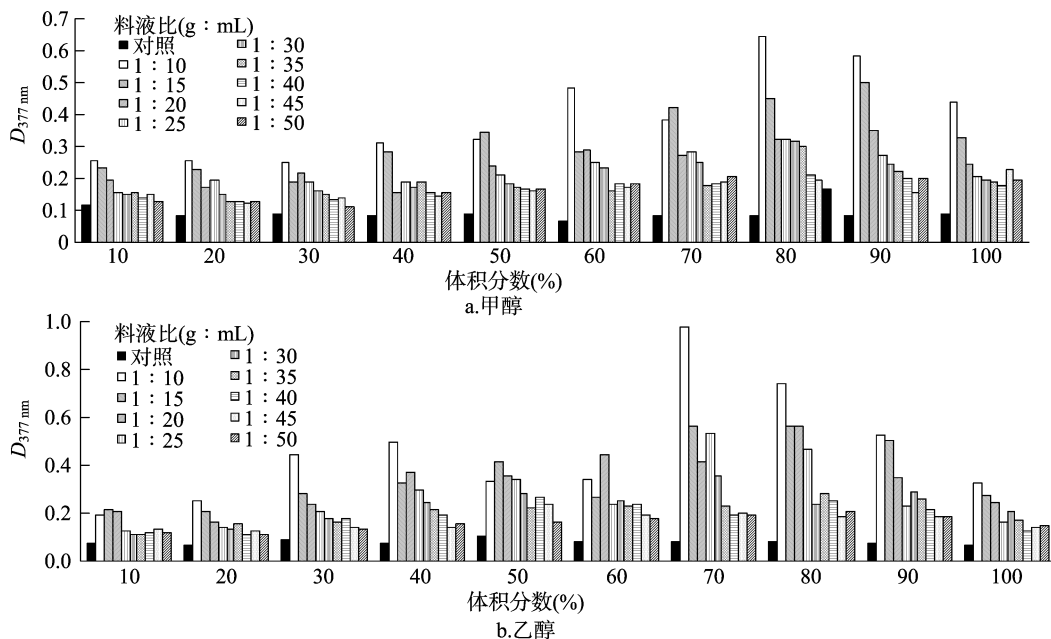


图2 以不同浓度甲醇(乙醇)为提取剂在不同料液比下提取液的 $D_{377\text{ nm}}$

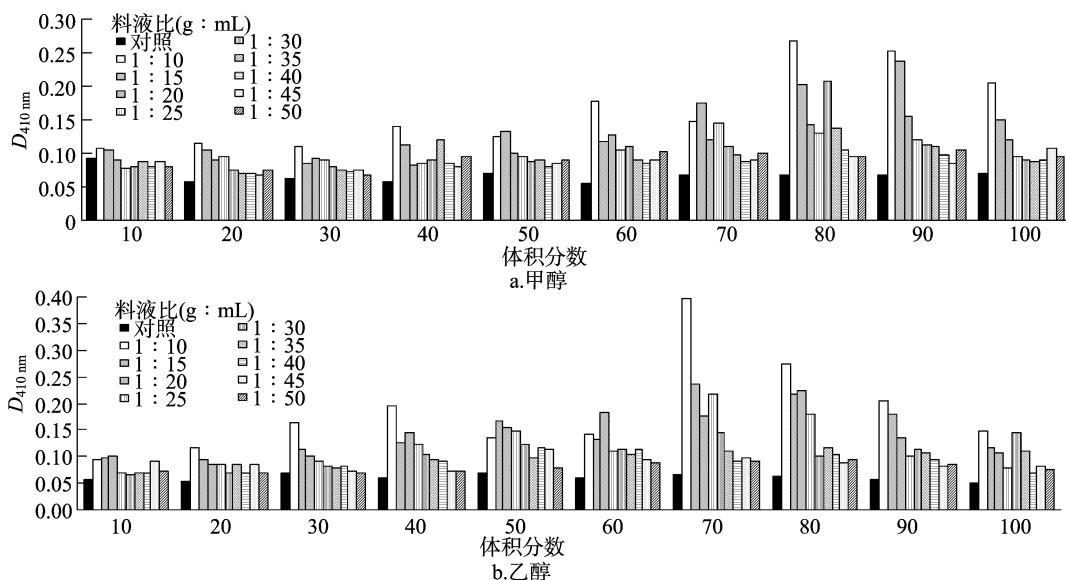


图3 以不同浓度甲醇(乙醇)为提取剂在不同料液比下提取液的 $D_{410\text{nm}}$

综合以上 3 个波长下所测的样品光吸光度,确定选取 70% 乙醇作为提取剂,在料液比 1 g : 10 mL 条件下,提取液在 254,377,410 nm 处均有较大吸光度,表明甘草悬浮细胞中的主要有效成分无论是三萜皂苷类化合物还是黄酮类化合物都能被充分地析出。

2.3 细胞培养物中黄酮类化合物的测定

2.3.1 芸香苷标准曲线的绘制 以芸香苷溶液浓度为横坐标、对应的吸光度为纵坐标,用 Origin 8.0 绘制标准曲线,并得到标准方程 $D=4.1257C+0.08298$, $r^2=0.998$ (D 为吸光度, C 为芸香苷标准品浓度),详见图 4,表明芸香苷标准品浓度与 $D_{410\text{nm}}$ 呈良好的线性关系。

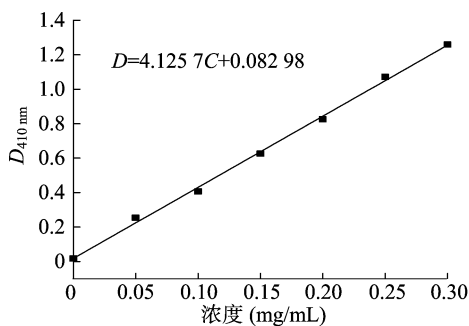


图4 芸香苷溶液标准曲线

2.3.2 乌拉尔甘草悬浮细胞中黄酮类化合物的含量 5 份乌拉尔甘草悬浮细胞供试样品溶液经分光光度计检测后结果如表 1 所示,根据悬浮培养的“2.3.1”节所得标准品的回归方程计算,乌拉尔甘草细胞中黄酮类化合物的含量是 0.020 0 g/g,同法测得野生乌拉尔甘草根粉中黄酮类化合物的含量是 0.088 0 g/g,悬浮乌拉尔甘草细胞中黄酮类化合物含量大约是野生乌拉尔甘草根粉中黄酮类化合物含量的 23%。

3 结论

以产自内蒙古鄂尔多斯市达拉特旗的乌拉尔甘草种子通

表 1 乌拉尔甘草悬浮细胞供试样品显色后在 410 nm 处吸光度 $D_{410\text{nm}}$

编号	$D_{410\text{nm}}$	甘草黄酮含量(g/g)
1	1.652	0.019 8
2	1.675	0.020 1
3	1.674	0.020 1
4	1.666	0.020 0
5	1.671	0.020 0
平均		0.020 0
$RSD(\%)$		0.560 0

过植物组织培养技术获得的离体悬浮细胞为研究对象,通过双因素无重复试验筛选了乌拉尔甘草悬浮细胞培养物有效成分提取的最佳工艺。甘草具有多种生物学活性与药理学活性,而起主要作用的有效成分通常被认为是三萜皂苷类和黄酮类化合物。试验结果表明,以 70% 乙醇为提取剂、料液比 1 g : 10 mL 的条件下超声提取,甘草中的主要有效成分得到充分析出。

分析了悬浮乌拉尔甘草离体细胞中黄酮类化合物的含量,结果表明:悬浮培养的乌拉尔甘草细胞中的黄酮类化合物含量是野生乌拉尔甘草中黄酮类化合物含量的 23%。虽然悬浮培养的乌拉尔甘草细胞中黄酮类化合物总含量远低于野生乌拉尔甘草,但悬浮培养周期短,仅需 3 周,而野生甘草生长周期长达 4 ~ 5 年;此外,悬浮培养方便、快捷、易人工控制,避免了病虫害等其他自然因素的影响。因此,利用甘草细胞大规模培养生产黄酮类化合物为缓解甘草野生资源危机提供了可行的途径^[12]。

参考文献:

- [1]Zhang Q Y,Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan - Cao (licorice) [J]. Journal of chromatography A,2008,1216 (11):1954 - 1969.
- [2]惠寿年,董阿玲. 国内对甘草化学成分的研究进展[J]. 中草药,1999,30(4):313 - 315.

李 慧. 红颜草莓的离体培养与快速繁殖[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 66–68.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.018

红颜草莓的离体培养与快速繁殖

李 慧

(江苏联合职业技术学院淮安生物工程分院, 江苏淮安 223200)

摘要:以红颜草莓的茎尖作为外植体,研究了外植体的消毒方法、激素组合对其离体培养与快速繁殖的影响。结果表明,幼茎段在 0.1% 氯化汞 + 3 滴吐温 - 80 溶液中浸泡 5 min 灭菌效果最好;茎尖以 0.35 mm 大小为宜;诱导丛生芽的最适培养基为:MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA;诱导试管苗生根的最适培养基为:1/2MS + 0.1 mg/L IBA。

关键词:草莓;离体培养;不定芽;快速繁殖

中图分类号: S668.404+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0066-03

红颜又称日本 99、红颊,是日本静冈县用章姬与幸香杂交育成的早熟草莓栽培品种。叶片大、新茎分枝多,结果能力强,果实品质好,果粒个大,果形、果色、价格明显优于丰香草莓。是春节前后集采摘、鲜食为一体的休闲旅游消费农产品,深受广大果农和顾客的喜爱。但是,红颜草莓苗不抗白粉病,不易育苗,幼苗一旦染病,几天内将全军覆没。因此,试管苗的繁育将有很大的市场前景。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2014 年 12 月至 2015 年 4 月进行。供试材料红颜草莓苗引自淮安怡园果蔬种植专业合作社(实生苗 2014 年 9 月栽植在江苏联合职业技术学院淮安生物工程分院花卉实训中心的无土栽培槽内)。

1.2 试验方法

1.2.1 表面灭菌试验 于晴天的下午取供试红颜草莓刚抽出的匍匐茎的幼茎段(母株要健壮、无病),流水冲洗泥土、灰尘。在无菌条件下,先用 75% 乙醇浸泡 20~30 s,无菌水冲洗 3~4 次,再转入 0.1% 氯化汞溶液 + 2 滴吐温 - 80 分别浸泡

8、5、4、2 min,无菌水冲洗 5~8 次。在以上的过程中要不断摇动,以去除附在外植体表面的气泡。用消毒滤纸吸干水珠后,将茎尖接种于诱导培养基中,调整 pH 值至 5.6~5.8。每个灭菌处理各接种 50 瓶,1 个外植体/瓶,20 d 后观察记录外植体的污染、死亡、无菌成活生长等情况。

1.2.2 茎尖分化能力试验 取“1.2.1”节试验最佳处理,在双目显微解剖镜下剥去苞片和幼叶,将茎尖接种于 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 培养基中^[1]。接种外植体 1 个/瓶,30 d 后观察记录茎尖分化情况。

1.2.3 芽诱导试验 取“1.2.2”节试验中最佳的茎尖剥制处理分别接种于以 0.5 mg/L 6-BA 为基础的附加不同种类生长素(0.2 mg/L)配成的培养基、以 0.2 mg/L NAA 为基础的附加不同种类生长素及细胞分裂素(0.5 mg/L)配成的培养基中^[2],每个处理各接种 30 瓶,1 个外植体/瓶,30 d 后开始调查记录幼芽分化情况。培养基配比如下:(1) MS + 0.5 mg/L 6-BA;(2) MS + 0.5 mg/L 6-BA + CNAA;(3) MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA;(4) MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IBA;(5) MS + 0.2 mg/L NAA;(6) MS + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA;(7) MS + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT;(8) MS + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BZEA。

1.2.4 继代培养与扩大繁殖 将长至 1~2 cm 的丛生芽每 4~6 株切成 1 块,转入不同浓度配比的 6-BA 和 NAA 配成

plant cell suspension and hairy root cultures[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(3): 461–477.

[8] 郑 成,李 卫,杨 铃. 植物有效成分微波萃取的研究进展[J]. 世界科技研究与发展, 2006, 28(5): 52–61.

[9] 程艳芹,孙秀梅,张兆旺,等. 均匀设计法优选甘草的半仿生提取工艺条件[J]. 中药材, 2007, 30(5): 598–601.

[10] 邓引梅,宋发军,崔永明,等. 甘草叶总黄酮提取工艺[J]. 中南民族大学学报:自然科学版, 2008, 27(1): 41–43.

[11] 王 磊,杨 英,周圆圆,等. 甘草细胞培养物黄酮含量测定方法的建立[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3046–3047.

[12] Sheludko Y V. Recent advances in plant biotechnology and genetic engineering for production of secondary metabolites[J]. Cytology and Genetics, 2010, 44(1): 52–60.

收稿日期: 2015-04-14

基金项目: 2014 年江苏省农业三新工程(编号: SXGC[2014]141)。

作者简介: 李 慧(1971—),女,江苏宿迁人,硕士,教授,主要从事园艺作物的组织培养研究。E-mail: lihui710623@163.com。

[3] 贾国惠,贾世山. 甘草中黄酮的药理作用研究进展[J]. 中国药理学杂志, 1998(9): 3–6.

[4] Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, et al. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata* [J]. Phytochemistry, 1998, 48(1): 125–129.

[5] 董静洲,易自力,蒋建雄. 我国药用植物资源研究概况[J]. 医学研究杂志, 2006, 35(1): 67–69.

[6] Vanisree M, Lee C Y, Lo S F, et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures[J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2004, 45(1): 1–22.

[7] Cai Z, Kastell A, Knorr D, et al. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from