

后的共有峰 该峰是原儿茶醛,对应的保留时间为 33.71 min ($RSD=1.5\%$)。因此,宜将丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱分为两个区:从开始到保留时间 33.71 min 的区域称为非指纹区;33.17~80 min 之间的区域称为指纹区。指纹区具有鉴别功能和半定量功能,而非指纹区主要用于半定量。这一分区的重要性在于简化繁杂的指纹图谱识别程式,同时利于中药材有效成分的特征鉴别。

利用上述技术对从四川中江 GAP 丹参基地所取的 246 个样品进行了研究。结果表明:对 46 个不同部位样品识别准确率为 99%,对 200 个不同等级丹参识别准确率为 98.5%。而对 38 个不同来源的丹参及伪品能全部鉴别出来。而条形码中指纹区和非指纹区的划分可简化图谱识别程式,从而为丹参的真伪优劣和品质评价提供特征性方法。但本文只是初步的结果,特别是对于不同等级样品间的比较结果还有待大量样品的实践验证。

3 结论

3.1 本实验所建立的丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱有较高的稳定性、精密度和良好的重现性。290~300 nm 波长的指纹图谱能反映较多的指标成分信息量。其中含量 18 个共有指纹峰,其相对保留时间的 $RSD < 1.18\%$,主要峰面积 $RSD < 25\%$ 。能用于直接评价不同产地丹参的质量。

3.2 用归一化数学法处理 HPLC 指纹图谱得到不同类别丹参的典型指纹条形码图。该图简单明了,能直观快捷地对不同等级和质量的丹参做出评价,并

对不同来源及真伪丹参做出准确鉴别。

3.3 指纹条形码中指纹区和非指纹区的划分可简化图谱识别程式,从而为丹参的真伪优劣和品质评价提供特征性方法。

References

- [1] XU R S. *Danshen-Biology and Its Application* (丹参生物学及其应用) [M]. Beijing: Science Press, 1990.
- [2] DU G H, Zhang J T. Research development on the active ingredients of savianolic acids in Danshen [J]. *Basic Med Sci Clin* (基础医学与临床), 2000, 20(5): 10-14.
- [3] Zhou C X, Luo H W, Dan Y Z. Studies on the water-soluble components from Danshen [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, 30(6): 411-416.
- [4] Lu Y R, Yeap Foo L. Polyphenolic of *Salvia a* review [J]. *Phytochemistry*, 2000, 59: 117-140.
- [5] Yokozawa T, Lee T, Ouar H, et al. Haemodynamic effects of magnesium lithospermate B in rats with renal failure [J]. *Phytother Res*, 1992, 6: 187-192.
- [6] Liu J, Shen H M, Ong C N. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Cancer Lett*, 2000, 153: 85-93.
- [7] Chen X R, LU J B, Shi H P. New development of Danshen pharmacology [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2001, 21(1): 44-45.
- [8] Xie B S. On the feasibility of application of chromatographic fingerprint identification to herbal medication [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(6): 391-394.
- [9] Tu P E. Discuss for establishing fingerprinting of Chinese medicinal materials and its injection by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 2(7): 516.
- [10] Sha M, Wang J Y, Cao A M, et al. Application of HPLC fingerprint technique in quality control of new drug of Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(2): 181-183.
- [11] Regulation for Fingerprinting Technology of Chinese Traditional Medicine Injection [S]. 2000.

野葛幼叶细胞悬浮培养生产葛根素等异黄酮类化合物的研究

张春荣^{1,2},李玲^{1*}

(1. 华南师范大学生命科学学院,广东 广州 510631; 2. 中山大学生命科学学院,广东 广州 510275)

摘要:目的 建立野葛幼叶细胞悬浮培养体系。方法 将由野葛幼叶外植体诱导的愈伤组织进行悬浮培养,研究了悬浮培养物生长的动态和葛根素及总异黄酮类化合物产量积累的动态。结果 细胞在培养的第 1~5 天为对数生长期,第 8 天时细胞干重达最大值。葛根素的合成与细胞生长呈紧密偶联型,在第 8 天时葛根素产量达最大值。总异黄酮类化合物的积累与葛根素积累存在一定差异,异黄酮类化合物的总产量在第 10 天最大值。结论 野葛幼叶细胞悬浮培养体系中总异黄酮类化合物的产量高于野生原植株,葛根素产量低于野生原植株。

关键词:野葛;悬浮培养;葛根素;异黄酮类化合物

中图分类号: R282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)07-0653-05

* 收稿日期: 2002-11-18

基金项目: 1999 年教育部优秀青年教师项目 (003062); 广东省科技计划项目 (C11703)

作者简介: 张春荣 (1976-), 男, 山东淄博人, 中山大学在读博士研究生, 研究方向为植物发育及分子生物学。

E-mail: zhangchun@eyou.com

* 通讯作者 Tel (020) 85211378 E-mail: bioliling@eyou.com

Production of puerarin and other isoflavones in cell suspension cultures in leaves of *Pueraria lobata* seedling

ZHANG Chun-rong^{1,2}, LI Ling¹

(1. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. College of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract **Object** To establish cell suspension culture system in leaves of seedling of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. **Methods** The callus induced from leaf explants of *P. lobata* seedling were suspended in liquid medium. The time courses of cell growth and yields of puerarin and isoflavones were studied. **Results** The log phase of the cell cultures' growth was from 1st d through 5th d. The dry weight accumulation reached highest on 8th d. The production of puerarin was highly coupled with the cell growth. The yield of puerarin reached highest on 8th d. However, the accumulation of total isoflavones was different from that of puerarin. The yield of total isoflavones reached the highest on 10th d. **Conclusion** The yield of total isoflavones in cell suspension culture system is higher than that in wild plants, while the yield of puerarin is lower than that in wild plants.

Key words *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; suspension culture; puerarin; isoflavones

野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 为葛属 *Pueraria* DC. 多年生草质藤本植物, 是我国及东亚国家传统的药食两用资源。其有效成分主要是葛根素、大豆苷、大豆苷元等异黄酮类化合物, 在临床上广泛用于治疗高血压、冠心病、心绞痛、心率不齐、视网膜血管阻塞、突发性耳聋以及伤寒、温热头痛、烦热消渴、泄泻、痢疾、癍疹不透等疾病^[1]。植物细胞工程是可持续性开发利用植物资源的重要措施。本实验室已经建立了野葛愈伤组织诱导^[2]和子叶细胞悬浮培养体系, 结果表明, 培养物中葛根素等异黄酮类化合物的含量低于野生原植物株^[3]。本实验以野葛幼叶为材料建立了细胞悬浮培养体系, 研究了葛根素及总异黄酮类化合物积累的动力学过程, 旨在为野葛细胞工程生产葛根素等异黄酮类化合物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料: 刚成熟的野葛绿色荚果, 采自华南师范大学生物园, 经常规表面消毒, 取出种子进行萌发。无菌苗去除根部, 接入 MS 固体培养基, 于温度 (25±2) °C、光照度 2 000~2 500 lx 光照 12 h/d 条件下培养。

1.2 悬浮细胞培养体系的建立: 无菌苗长出 4~5 片真叶后, 剪取幼叶, 接入含 1 mg/L NAA, 2 mg/L BA, 30 g/L 蔗糖的 MS 固体培养基 (简称为 MS+NAA+BA₂) 上诱导愈伤组织。愈伤组织在含 0.5 mg/L 4-PU, 30 g/L 蔗糖的 MS 固体培养基上培养 (简称为 MS+4-PU_{0.5})。每 15 d 继代一次。继代培养若干次后 (6 次以上), 选取结构疏松、生长迅速的淡黄色愈伤组织, 接入含 1 mg/L 2, 4-D 1 mg/L

NAA 0.5 mg/L KT 和 0.2% 水解酪蛋白 (casin hydrolysates, CH), 20 g/L 蔗糖的 B₅ 液体培养基 (简称为 B₅+2, 4-D+NAA+KT_{0.5}+0.2% CH) 中振荡培养。每 250 mL 三角瓶中装 45 mL 培养液, 接种量约为 5.0 g/L (条件培养液与新鲜培养液的比例约为 1:1), 继代周期为 3 d。继代培养 4 次后, 接种量改为 3.5 g/L (条件培养液与新鲜培养液的比例约为 1:2), 继代周期改为 5 d。悬浮培养条件: 温度 (25±2) °C、全天光照, 光照度 500 lx, 转速 110~130 r/min, 振幅 2 cm。

1.3 悬浮细胞生长的测定: 细胞培养物继代后, 每天收集悬浮培养物, 烘干后称量其干重 (DW)。每次实验取 4 瓶, 连续测定 12 d, 试验重复 2 次。细胞生长过程的参数处理参照应佩清等^[5]和梅乐和等^[6]的方法: 细胞干重表示为 X , 生物浓度表示为 $C_X = X/V$, 细胞产率 = $(C_{X_{max}} - C_{X_0}) / C_{X_{max}} \times 100\%$, 对数生长期, 直线 $\ln(X/X_0) = \mu t$ 的斜率表示细胞的比生长速度 μ , 细胞的倍增时间 $t(d) = (\ln 2) / \mu$ 。

1.4 总异黄酮类化合物和葛根素含量的测定: 参照刘慧丽^[4]的方法。总异黄酮类化合物用 95% 乙醇提取, 紫外分光光度法测定其含量。葛根素用无水乙醇提取, 高效液相色谱法测定其含量。

色谱条件: Beckman System Gold 高效液相色谱仪 (125 型 Solvent Module 泵, 168 型 System Gold Model 紫外检测器); 大连 Elite Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 柱温: 25 °C; 柱压: 15.2~19.3 MPa; 流动相: 甲醇-水 (85:15); 流速

1. 0 mL/min; 检测波长: 248 nm; 进样量: 20 μ L

细胞培养物及培养液中葛根素或异黄酮类化合物总产量 ($Y_{总}$) 的计算: $Y_{总} = Y_{胞} \times C_x + Y_{液}$ 其中, $Y_{胞}$ 为细胞中次生代谢物的产量, 单位为 mg/g, C_x 为细胞培养物的生物量, 单位为 g/L, $Y_{液}$ 为培养液中次生代谢物的产量, 单位为 mg/L

2 结果与分析

2.1 野葛种子萌发及幼叶愈伤组织的诱导: 刚成熟的野葛种子萌发速度很快, 培养至第 2 天, 18.7% 的种子的下胚轴突破种皮, 至第 12 天, 萌发率达 66.08% 并趋于恒定 (图 1)。

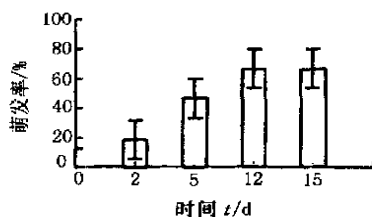


图 1 不同培养天数野葛种子的萌发率

Fig. 1 Germination rate of *P. lobata* seeds cultivated for different days

野葛无菌苗幼叶外植体经 MS+ NAA₁+ BA₂ 固体培养, 7 d 左右开始形成愈伤组织, 愈伤组织在黑暗或弱散光下培养呈淡黄色, 结构疏松, 生长较为迅速, 但用同种培养基继代时, 愈伤组织表面易褐化, 转入 MS+ 4-PU₀ 培养基继代几天后, 重新呈现正常的淡黄色。

2.2 野葛幼叶细胞悬浮培养体系的建立: 将结构疏松、生长迅速的淡黄色愈伤组织接入液体培养基中, 经振荡培养, 愈伤组织极易分散成较小的细胞团块。植物悬浮细胞之间存在着协同作用, 较大的起始接种量 (5.0 g/L) 有利于愈伤组织适应液体悬浮培养条件和保持细胞活力。继代 4 次后, 愈伤组织逐渐成为较小的细胞团块, 并且适应了液体培养环境, 这时就可减少接种量 (3.5 g/L), 并延长继代周期, 以提高细胞产率。反复继代 8~10 次以后, 愈伤组织逐渐成为颗粒均一、分散良好、生长迅速的悬浮培养体系。

细胞悬浮培养初期, 培养物较少, 较低的转速 (110 r/min) 即可使培养物全部悬浮起来, 转速过高 (140 r/min) 反而增大了剪切力, 容易伤害细胞; 随着培养时间的延长, 细胞培养密度和培养液粘度增大, 培养液中氧的传输能力降低, 这时, 增加转速才能使培养物全部悬浮, 否则, 细胞将因缺氧而过早进入衰亡期。摇床转速的设定以刚好能将培养物全部悬浮起来为宜。

2.3 野葛悬浮细胞生长动态: 野葛幼叶细胞悬浮培养的生长曲线近为“S”形 (图 2)。接种量为 3.5 g/L 时, 细胞生长的延滞期较短, 约为 1 d。培养的第 1~5 天为对数生长期, 细胞迅速增殖, 比生长速度 μ 为 0.27, 细胞倍增时间 $t(d) = 2.57 d^{-1}$ 。第 5 天后, 细胞生长速度减慢, 但细胞干重仍在增加, 至第 8 天, 细胞干重达最大值, $C_{xmax} = 12.58$ mg/L, 细胞产率为 72.18%。第 8 天后, 细胞生长进入稳定期, 细胞干重停止增加。

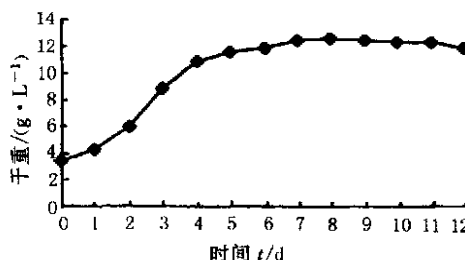


图 2 野葛幼叶细胞悬浮培养生长动力学曲线

Fig. 2 Dynamic curve of dry weight accumulation of cell suspension cultures in leaves of *P. lobata* seedling

2.4 野葛悬浮细胞及培养液中总异黄酮和葛根素的积累: 图 3 表明, 野葛细胞接入新鲜培养液后, 培养物中葛根素含量随细胞生长增殖而不断积累, 第 8 天达最大值, 之后, 细胞生长进入稳定期, 葛根素含量逐渐降低。培养液中葛根素含量的变化趋势与细胞中葛根素的积累趋势相同, 在第 8 天达最大值。8 d 以后, 随着细胞中葛根素合成的停止, 细胞和培养液中的葛根素含量均下降。细胞和培养液中葛根素的总产量在第 8 天时达最大值, 为 103.85 mg/L (图 4)。

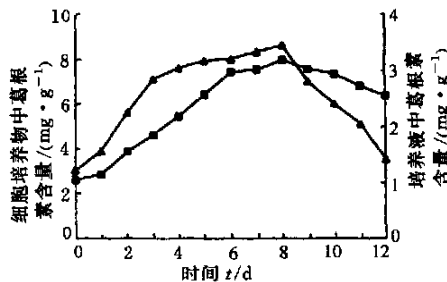


图 3 野葛幼叶悬浮细胞及培养液中葛根素积累的动力学曲线

Fig. 3 Dynamic curve of puerarin contents in cell suspension cultures or medium in leaves of *P. lobata* seedling

野葛细胞接入新鲜培养液后, 细胞内总异黄酮类化合物随培养物生长量的增加而不断积累, 细胞进入稳定期后, 总异黄酮类化合物的积累速度加快, 第 10 天达到最大值 (129.05 mg/g) (图 5)。10 d 以

后,细胞内总异黄酮类化合物的含量迅速降低,细胞接入后,培养液中的总异黄酮类化合物的含量也逐渐上升,这可能是细胞受新环境刺激的结果,直到第5天细胞生长速度减慢后,培养液中总异黄酮类化合物的含量才逐渐降低(图5)。细胞及培养液中异黄酮类化合物的总产量在第10天时达最大值,为1.59 g/L(图6)。

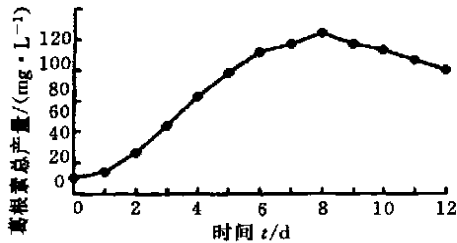


图4 野葛幼叶悬浮细胞和培养液中葛根素总产量积累的动力学曲线

Fig. 4 Dynamic curve of total yield of uerarin in cell suspension cultures and medium in leaves of *P. lobata* seedling

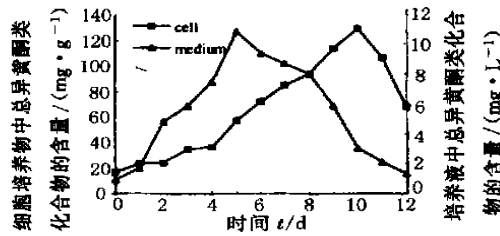


图5 野葛幼叶悬浮细胞及培养液中总异黄酮类化合物积累的动力学曲线

Fig. 5 Dynamic curve of total isoflavonces contents in cell suspension cultures or medium in leaves of *P. lobata* seedling

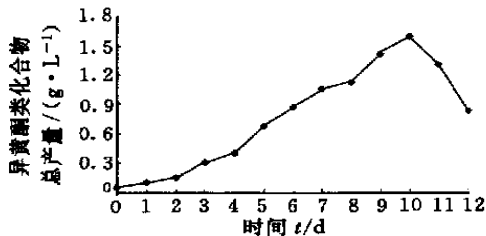


图6 野葛幼叶悬浮细胞和培养液中异黄酮类化合物总产量积累的动力学曲线

Fig. 6 Dynamic curve of total yield of isoflavonces in cell suspension cultures and medium in leaves of *P. lobata* seedling

3 讨论

在自然条件下,完全成熟的野葛种子存在生理休眠现象,萌发率仅为1%,在人工气候箱中萌发率也仅为6%~17%^[7]。本实验发现刚成熟的野

葛种子萌发率可达66.08%。可以推测,野葛种子在完熟过程中可能产生了抑制萌发的物质。

植物细胞次生代谢物的生产和细胞生长之间存在偶联型、半偶联型和非偶联型3种关系^[5]。比较图2和图3,4可知,野葛幼叶悬浮细胞中葛根素的合成与细胞的生长呈紧密偶联型,这与野葛子叶细胞中葛根素的合成与细胞生长的关系相同^[3],因此,这两个体系均不需要进行二步培养(即根据细胞生长和次生代谢物合成的不同需求,先将细胞在适于细胞生长的培养基和环境条件下培养一段时间,再转入适于次生代谢物生产的培养基中培养^[6])。

在野葛幼叶细胞悬浮培养体系中,细胞培养物和培养液中葛根素含量均在第8天达最大值,此时细胞和培养液中葛根素总产量为103.85 mg/L。野葛悬浮细胞及培养液中总异黄酮类化合物积累的动力学曲线与葛根素积累的动力学曲线存在一定差异(图5,6)。细胞进入稳定期后,总异黄酮类化合物仍在积累,第10天时达最大值。培养液中的总异黄酮类化合物的含量则在第5天既逐渐降低。细胞和培养液中异黄酮类化合物的总产量在第10天达最大值,为1.59 g/L。与刘慧丽^[3]所建立的野葛子叶细胞悬浮培养体系相比较,野葛幼叶悬浮细胞中葛根素和总异黄酮类化合物的含量均大大高于野葛子叶悬浮细胞,后者的最高含量分别为1.34和52.4 mg/g;野葛幼叶悬浮细胞中葛根素和总异黄酮类化合物的分泌能力也高于野葛子叶悬浮细胞,后者培养液中的总异黄酮类化合物最高含量为4.8 mg/L,葛根素则几乎测不到。与野生葛根相比^[3],野葛幼叶悬浮细胞中总异黄酮类化合物的含量(129.05 mg/g)已超过野生葛根中的总异黄酮类化合物的含量(68.7 mg/g),而葛根素含量(7.98 mg/g)则低于野生葛根中的葛根素含量(12.6 mg/g)。野葛幼叶悬浮细胞及培养液中葛根素的总含量占异黄酮类化合物总含量的9.22%,子叶悬浮细胞中葛根素含量占总异黄酮类化合物含量的2.55%,而在野生植株中,葛根素含量最高,占总异黄酮类化合物含量的18.34%^[3]。由此可见,随着细胞类型和培养条件的不同,细胞悬浮培养体系中异黄酮类化合物的种类和比例与野生植株不同。

根据本实验结果,野葛幼叶细胞悬浮培养体系优于子叶细胞悬浮培养体系,但该体系中葛根素含量仍低于野生植株,由于葛根素是野葛的主要药用成分,因此有必要从改进培养方式和代谢调控等方面^[8,9]对野葛幼叶细胞悬浮培养体系进行深入研究,

以期提高其葛根素含量,为野葛细胞培养生产葛根素的工业化提供技术支持

References

[1] Peng J L, Ma M X, An H X, et al. On the research in the exploitation of *Pueraria* DC. and its synthetical utilization prospect [J]. *Resour Dev Market* (资源开发与市场), 2000, 16(2): 80-82.

[2] Yu S H, Li L. Tissue culture of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and plantlet regeneration [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境), 1999, 8(1): 63-64.

[3] Liu H L, Li L. Cell Cultures of *Pueraria lobata* (Willd.): growth and production of isoflavones and puerarin [J]. *South Afr J Bot*, 2002, 68: 542-544.

[4] Ying P Q, Xu J F, Su Z G. Studies on characteristic and kinetics of *Salvia miltiorrhiza* crown gall tissue culture [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, 5

(5): 478-482.

[5] Mei L H, Yao S J, Lin D Q. *Technology in Biochemical Production* (生物生产工艺学) [M]. Beijing: Science Press, 1999.

[6] Cui T B, Guo Y, Lin W T. The ways to enhance the production of secondary metabolites by plant cell culture [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 2001, 37(5): 479-482.

[7] Susko D J, Mueller J P, Spears J F. An evaluation of methods for breaking seed dormancy in kudzu (*Pueraria lobata*) [J]. *Can J Bot*, 2001, 79(2): 197-203.

[8] Verpoorte R, Heijden R, Hoopen H J G, et al. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals [J]. *Biotechnol Lett*, 1999, 21: 467-479.

[9] Yeoman M M, Yeoman C L. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells [J]. *New Phytol*, 1996, 134: 553-569.

化橘红黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱研究

陈志霞¹, 林 励², 孙冬梅^{3*}

(1. 广东省药品检验所, 广东 广州 510180; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 3. 广东省中医研究所, 广东 广州 510095)

摘要: 目的 研究不同品种和产地化橘红药材黄酮类成分的色谱指纹图谱分析方法。方法 应用 HPLC 法以柚皮苷为参比, 以相对保留时间和峰面积百分比为参数, 建立 10 个样品的 HPLC 指纹图谱。结果 标示出 30 多个峰, 且不同品种化橘红 (毛橘红和光橘红) 的图谱存在较大的差异。结论 该方法准确、重现性好, 适用于化橘红药材的质量控制与鉴定。

关键词: 化橘红; 黄酮类成分; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)07-0657-05

HPLC fingerprint of flavonoids in *Exocarpium Citri Grandis*

CHEN Zhi-xia¹, LIN Li², SUN Dong-mei³

(1. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China; 2. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 3. Guangdong Institute of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

Abstract Object To establish the HPLC fingerprint of flavonoids in *Exocarpium Citri Grandis* (ECG). **Methods** HPLC fingerprint of ten samples were established. The naringin was used as standard. The relative migration time and the percentage of peak area were used as parameters. **Results** More than 30 peaks occurred on the HPLC fingerprint of flavonoids of ECG. The fingerprints of *C. grandis* 'Tomentosa' and *C. grandis* had obvious differences. **Conclusion** The method is simple and accurate with a good reproducibility. It could be used for quality control and identification of ECG.

Key words *Exocarpium Citri Grandis* (ECG); flavonoids; HPLC; fingerprint

化橘红是芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* 'Tomentosa' 或柚 *C. grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮。具散寒、燥湿、利气、消

痰作用, 临床用于治疗风寒咳嗽、喉痒痰多、食积伤酒、呕恶痞闷等症^[1]。是广东名贵特产药材。来源于植物化州柚的又名毛橘红, 来源于植物柚的又名光

* 收稿日期: 2002-11-19

基金项目: 广东省科技计划项目 (A301020101)

作者简介: 陈志霞 (1975-), 女, 湖北省武汉市人, 硕士, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: (020) 81863096