

丹参无菌培养体系构建及有效成分含量的 HPLC 分析

黑小斌^{1,2}, 李欢^{1,2}, 李慧¹, 梁小燕¹, 高静¹, 彭亮¹, 李依民^{1*}, 张岗^{1*}

1. 陕西中医药大学药学院 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046

2. 济川药业集团有限公司, 江苏 泰兴 225400

摘要: 目的 构建丹参无菌培养体系并进行无菌材料有效成分含量测定, 为丹参快繁及次生代谢调控研究提供基础。方法 利用正交实验筛选丹参叶片诱导愈伤组织的激素配比, 并进行芽、根的诱导, 建立组织培养体系; HPLC 法分析有效成分含量。结果 丹参愈伤组织诱导最佳培养基为 MS+6-BA (2.0 mg/L)+NAA (1.0 mg/L)+2,4-D (0.5 mg/L), 最适生芽培养基为 MS+6-BA (2.0 mg/L)+NAA (1.0 mg/L), 生根培养基为 1/2 MS+NAA (0.5 mg/L)。丹参 7 种有效成分在无菌苗、愈伤组织和再生苗中均可检测到, 含量有显著差异 ($P < 0.05$), 其中迷迭香酸与丹酚酸 B 含量较高。结论 成功建立了丹参愈伤组织培养体系并获得生长旺盛的再生苗; 3 种无菌材料有效成分积累存在差异, 为丹参进一步研究奠定基础。

关键词: 丹参; 愈伤组织; 再生苗; 丹参素; 阿魏酸; 咖啡酸; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 丹酚酸 A; 丹参酮 II_A

中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)22-5833-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.021

Construction of aseptic cultural system of *Salvia miltiorrhiza* and determination of active components by HPLC analysis

HEI Xiao-bin^{1,2}, LI Huan^{1,2}, LI Hui¹, LIANG Xiao-yan¹, GAO Jing¹, PENG Liang¹, LI Yi-min¹, ZHANG Gang¹

1. Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Juncan Pharmaceutical Co. Ltd., Taixing 225400, China

Abstract: **Objective** The regeneration system of *Salvia miltiorrhiza* was constructed and contents of active components of the sterile materials were determined, so as to provide the basis for the rapid propagation and secondary metabolism regulation of *S. miltiorrhiza*. **Methods** The optimum hormone ratio for inducing callus was screened by orthogonal test. The buds and roots induction were conducted to establish the tissue culture system. The contents of effective components were evaluated by HPLC analysis. **Results** The suitable medium for callus induction was MS+6-BA (2.0 mg/L)+NAA (1.0 mg/L)+2,4-D (0.5 mg/L). The preferred enrichment medium of adventitious bud induction was MS+6-BA (2.0 mg/L)+NAA (1.0 mg/L). And rooting medium was 1/2 MS+NAA (0.5 mg/L). Seven active components in aseptic seedlings, callus, and regenerated seedlings could be detected with significant differences in different aseptic materials ($P < 0.05$). The contents of rosmarinic acid and salvianolic acid B were higher than the others. **Conclusion** The culture system of *S. miltiorrhiza* was successfully established, and vigor regenerated seedlings were also obtained. The accumulation of active components in the three sterile materials showed difference, laying a foundation for further study in *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; callus; regenerated plantlet; salvianolic acid B; danshensu; caffeic acid; ferulic acid; rosemary acid; salvianolic acid B; salvianolic acid A; tanshinone II_A

丹参源于唇形科鼠尾草属多年生草本植物丹参 《神农本草经》, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦等功效, 临床上广泛用于心脑血管相关疾病的治

收稿日期: 2020-02-05

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (2019JQ-872); 陕西中医药大学校级课题 (2020PG29); 陕西中医药大学新进博士科研启动经费 (104080001); 陕西中医药大学“秦药”品质评价与资源开发学科创新团队项目 (2019-QN01); 陕西中医药大学思邈青年学者项目

作者简介: 黑小斌, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源品质评价与利用。E-mail: 1239111734@qq.com

***通信作者** 张岗, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源品质评价与利用。Tel/Fax: (029)38185165 E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com
李依民, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源品质评价与利用。Tel/Fax: (029)38185165 E-mail: 2051058@sntcm.edu.cn

疗^[1]。现代研究揭示丹参富含亲脂性二萜类和亲水性酚酸类及酮类化合物,具有抗炎^[2]、抗血小板聚集^[3]及抗肿瘤^[4]等药理活性。丹参野生于海拔 120~1 300 m 的山坡、林下草丛或溪谷旁,现多栽培于陕西、河南和安徽等区域,高品质道地丹参药材依然供不应求。丹参种植易受气候以及土壤等环境因素影响,其品质难以评价^[5-6]。因此,如何快速繁育丹参、保存优良种质以及扩大丹参药材资源等成为亟待解决的问题。

随着生物工程的发展,组织培养技术已成功用于药用植物快繁及代谢调控研究^[7]。药用植物中关于外植体、愈伤组织诱导、再生苗分化及其次生代谢规律研究已有相关报道。如防风叶片为诱导愈伤组织的最佳外植体,且通过调节激素配比成功建立稳定高效的再生体系^[8]。丹参组培研究已取得一定进展。丹参幼茎和叶片在含有 1-萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、6-糖基氨基嘌呤(KT)的 MS 上均能诱导产生性状的愈伤组织^[9]。添加 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)的 1/2MS 有利于丹参再生苗的分化^[10]。不同浓度 BA 及培养时间均会引起丹参愈伤组织中隐丹参酮产量的差异^[11]。外源激素浓度及愈伤组织培养时间对丹酚酸 B 含量有显著影响^[12]。水杨酸(SA)处理愈伤组织可促进丹酚酸类物质积累^[13]。因此,丹参愈伤组织及再生苗为其快繁及次生代谢研究建立基础平台。本研究首先进行丹参无菌培养体系的构建,随后建立 HPLC 分析体系,并对无菌材料有效成分进行初步评价,为丹参快繁、细胞培养及有效成分代谢调控研究提供支撑。

1 材料与试剂

1.1 植物材料

丹参种子于 2018 年 10 月采收于陕西商洛天士力公司丹参栽培基地,经陕西中医药大学药学院颜永刚教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的种子。

1.2 试剂

2,4-D(批号 20160908)购自上海国药集团化学试剂有限公司;6-BA(批号 13153)、NAA(批号 J994)购自 Amersco 公司;过氧化氢(H₂O₂, 20180110)、乙醇(批号 20170808)购自天津市天力化学试剂有限公司;MS 培养基(20170303111)购自北京酷来搏科技有限公司。

对照品丹酚酸 B(批号 111562-201716)、咖啡

酸(批号 110885-200102)、阿魏酸(批号 110773-201012)购自中国食品药品检定研究院;丹参素(批号 B20254)、迷迭香酸(批号 B0862)、丹酚酸 A(批号 B0260)、丹参酮 II_A(批号 B20257)购自上海源叶生物科技有限公司。色谱乙腈(批号 20180412)购自上海泰坦科技有限公司。娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

HFsafe-1200-LC 生物安全柜(上海力申有限公司);SPX-250-GB 智能光照培养箱(上海跃进有限公司);Waters2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Waters 2998 PAD 检测器,Empower 3 色谱工作站;GB204 型电子分析天平(北京赛多利斯有限公司);KQ-200KED 超声波清洗机(江苏昆山有限公司);GZX-9140MBE 电热鼓风干燥箱(上海博迅有限公司)。

2 方法

2.1 丹参无菌苗培养

丹参种子用 75%乙醇消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次;10%过氧化氢消毒 10 min,无菌水冲洗 3 次,接种于 MS 固体培养基。

2.2 丹参愈伤组织培养

选择 6-BA、2,4-D、NAA 3 种激素及其不同浓度设计正交实验(表 1),考察丹参叶片愈伤组织诱导最佳激素组合。取 1 个月龄的丹参无菌苗叶片,在生物安全柜里剪切为 0.5 cm² 大小的外植体,接种于含有激素的 MS 固体培养基上,每瓶 10 个叶片,接种 6 个组培瓶,统计诱导率。重复 3 次。培养条件为温度 20 ℃,光照强度 3 000 lx,光照 8 h,黑暗 16 h。

2.3 丹参愈伤组织分化培养

选择 NAA、6-BA 2 种激素及其不同浓度设计生芽实验(表 2),取“2.2”项下培育出 30 d 长势良好的愈伤组织,在生物安全柜里分切成块,接种于含有激素的 MS 培养基进行分化培养,接种 10

表 1 丹参愈伤组织 L9 (3³) 正交试验表

Table 1 L9 (3³) orthogonal test for *S. miltiorrhiza* callus

水平	因素/(mg·L ⁻¹)		
	6-BA(A)	NAA(B)	2,4-D(C)
1	1.0	0.5	0
2	2.0	1.0	0.5
3	3.0	1.5	1.0

表 2 丹参愈伤组织生芽激素配比

Table 2 Budding hormone ratio of *S. miltiorrhiza* callus

处理	激素/(mg·L ⁻¹)	
	6-BA	NAA
1	1.0	0.5
2	1.0	1.0
3	2.0	0.5
4	2.0	1.0
5	3.0	0.5
6	3.0	1.0

个组培瓶，每瓶 2 块愈伤组织，培养 30 d，统计生芽率。重复 3 次。培养条件同“2.2”项下。

2.4 丹参生根及再生苗获得

待“2.3”项下愈伤组织出现大量芽点，继代 2~3 次，待芽高 2~3 cm，将带有愈伤组织的芽，转接于含有 1/2MS+NAA 0.5 mg/L 培养基进行生根培养。待其根诱导出后，将带根幼苗转接于无激素 MS 培养基中，接种 5 个组培瓶，每瓶接种 4 个带根幼苗，培养 30 d，统计存活率。重复 3 次。培养条件同“2.2”项下。

2.5 有效成分的测定

2.5.1 色谱条件 参考文献方法^[14]，略有改良，建立色谱条件：色谱柱为安捷伦 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；流动相由乙腈 (A)-0.2%磷酸水 (B) 组成，梯度洗脱 (0~10 min, 5%~14%A; 10~12 min, 14%~17%A; 12~16 min, 17%~19%A; 16~20 min, 19%~25%A; 20~35 min, 25%A; 35~45 min, 25%~75%A; 45~55 min, 75%~90%A; 55~65 min, 90~5A)。检测波长 286 nm，柱温 30 °C，体积流量 1.0 mL/min。进样量为 10 μL。

2.5.2 对照品溶液制备 精密称取丹参素、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A 对照品适量，甲醇定容为质量浓度分别为 0.124、0.180、0.097、0.912、0.256、0.146、0.186 mg/mL 的对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液 1.0 mL，甲醇稀释 10 倍，得到相应质量浓度的混合对照品溶液。4 °C 保存，备用。

2.5.3 供试品溶液制备 取无菌苗、“2.2”项下丹参愈伤组织、“2.4”项下再生苗，常规方法烘干，粉碎成细粉 (过四号筛)，精密称定 1.000 g，置具塞锥形瓶中，精密吸取 10.0 mL 70% 甲醇。超声处理 45 min (功率 500 W，频率 40 kHz)，用 70% 甲醇补足减失的质量，10 500 r/min 离心 12 min，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，待用。

2.5.4 线性关系考察 精密吸取“2.5.2”项下混合对照品溶液 2、4、6、8、10、15、20 μL，测定并记录色谱图。分别以对照品溶液进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，结果表明线性关系良好。线性回归方程、线性范围和相关系数 (R²) 见表 3。

表 3 7 种成分的标准曲线和线性范围

Table 3 Regression equations and linear ranges of seven constituents

成分	回归方程	线性范围/μg	R ²
丹参素	$Y=2\,577.92X+2\,093.99$	0.45~4.50	0.999
咖啡酸	$Y=65\,705.94X-3\,024.60$	0.90~9.00	1.000
阿魏酸	$Y=67\,141.46X-4\,343.19$	0.34~3.44	1.000
迷迭香酸	$Y=43\,879.87X-2\,177.74$	0.46~4.68	1.000
丹酚酸 B	$Y=5\,714.76X-623.45$	0.16~1.58	0.998
丹酚酸 A	$Y=7\,302.58X-963.74$	0.15~1.54	0.997
丹参酮 II _A	$Y=52\,532.47X+1\,947.54$	0.56~5.60	1.000

2.5.5 精密度试验 取“2.5.2”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，每次进样 10 μL，记录丹参素、阿魏酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A 的峰面积积分值，计算得 RSD 分别为 1.01%、0.43%、0.57%、0.98%、0.42%、0.66%、0.30% 均小于 2.00%，表明仪器精密度良好。

2.5.6 稳定性试验 取丹参无菌苗溶液，分别于制备后的 0、2、4、8、12、16、24 h 进样 10 μL 测定，记录色谱峰面积，计算其 RSD。丹参素、阿魏酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A，RSD 分别为 1.39%、1.73%、1.43%、1.21%、1.95%、1.85%、1.26%，均小于 2.00%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.7 重复性试验 取无菌苗干燥粉末 1.000 g，精密称定，共 6 份，按“2.5.2”项下方法平行制备供试品溶液，分别进样，测定峰面积，计算各成分质量分数。丹参素、阿魏酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A 平均质量分数的 RSD 分别为 1.25%、1.13%、1.32%、1.15%、1.08%、1.39%、1.44%，表明方法的重复性良好。

2.5.8 加样回收率试验 取无菌苗干燥粉末约 1.000 g，精密称定，按“2.5.3”项下方法平行制备 2 份供试品溶液，一份加入等体积的甲醇，另一份加入等体积已知质量浓度的对照品混合溶液，分别进样，测定峰面积，计算各成分的加样回收率。丹参素、阿魏酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A 平均回收率分别为 99.70%、

98.10%、97.30%、103.60%、99.70%、101.40%、100.60%。RSD 分别为 0.58%、1.38%、1.74%、0.59%、1.76%、1.46%、1.56%。

2.6 数据处理

按照公式计算诱导率、生芽率、存活率，SPSS24.0 进行实验数据统计及方差分析。

诱导率=诱导外植体个数/接种数

生芽率=生芽愈伤组织个数/接种数

存活率=存活再生苗个数/接种数

3 结果与分析

3.1 诱导愈伤组织最佳激素组合的筛选

以丹参无菌苗叶片为外植体，筛选诱导愈伤组织最适激素组合。表 4 结果表明，丹参叶片在这 9 种培养基上均能诱导出愈伤组织，但诱导率和愈伤形态有明显差异。处理 7 诱导效果最好，诱导率 87.2%，愈伤组织黄绿色、致密；处理 9 诱导效果最差，诱导率仅 35.0%，外植体褐化甚至死亡，部分产生少量浅黄色愈伤组织。

表 4 不同激素对丹参愈伤组织诱导率的影响 ($n=3$)

Table 4 Effects of different exogenous hormones on callus induction of *S. miltiorrhiza* ($n=3$)

处理	A	B	C	诱导率/%			平均诱导率/%
				重复 1	重复 2	重复 3	
1	3	3	1	68.3	73.3	66.7	69.4
2	1	2	3	38.3	35.0	41.7	38.3
3	3	1	3	58.3	65.0	56.7	60.0
4	1	3	2	56.7	48.3	45.0	50.0
5	2	3	3	53.3	61.7	53.3	56.1
6	3	2	2	71.7	81.7	78.3	79.2
7	2	2	1	85.0	83.3	93.3	87.2
8	2	1	2	78.3	80.0	76.7	78.3
9	1	1	1	35.0	31.7	38.3	35.0
T ₁	123.3	173.3	191.6				
T ₂	221.6	204.7	207.5				
T ₃	208.6	175.5	154.4				
最佳组合	A ₂	B ₂	C ₂				

表 5 丹参愈伤组织诱导率的方差分析

Table 5 Variance analysis of *S. miltiorrhiza* callus induction

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
A	1 900.89	2	950.44	15.62	*
B	204.83	2	102.41	1.68	
C	495.14	2	247.57	4.07	
误差	121.73	2	60.86		

同一因素不同处理间*表示差异显著 ($P<0.05$)

* represent the significant differences among the different treatments under the same factor at $P < 0.05$

方差分析显示(表 5)，6-BA 质量浓度对丹参叶片诱导率有显著影响($P<0.05$)。当 6-BA 质量浓度为 2.0 mg/L，叶片诱导率最高，平均诱导率为 73.8%；由于 NAA 与 2,4-D 质量浓度对丹参叶片诱导率影响不显著，所以选用平均诱导率最高水平作为最优水平，为 A₂B₂C₂。因此，丹参叶片愈伤组织诱导激素为 6-BA (2.0 mg/L) + NAA (1.0 mg/L) +

2,4-D (0.5 mg/L)。

3.2 再生苗培养体系的建立

在“2.2”项下实验过程中发现在处理 7 条件下叶片愈伤诱导率不仅高于其他组别，而且愈伤表面出现大量芽点，据此设计生芽实验。生芽实验结果显示，除处理 2 以外，丹参愈伤组织均会诱导生芽，但诱导率有所差异。处理 4 生芽率最高为 100%，其余处理生芽率大小依次为处理 6>处理 3>处理 5>处理 1，分别为 86.7%、46.7%、30.0%和 13.3%。因此愈伤组织生芽最佳激素配比为处理 4，即 6-BA (2.0 mg/L) + NAA (1.0 mg/L)。生根培养基为 1/2MS + NAA (0.5 mg/L)，结果显示，带少量愈伤组织的幼芽均可以在此处理条件下生根，生根率为 100%。将带根的芽接种于无激素 MS 上，其存活率约为 91.7%，发育良好。至此，建立丹参再生苗培养体系。丹参愈伤组织及再生苗见图 1。



A-1 个月无菌苗 B-叶片外植体 C-30 d 愈伤组织 D-生芽愈伤组织 E-生根幼苗
A-One month aseptic seedlings B-Leaf explants C-Calli at 30 d D-Budding callus E-Rooting plantlet

图 1 丹参无菌苗、叶片外植体、愈伤组织及再生苗

Fig. 1 Aseptic seedlings, petiole explants, callus and regeneration seedlings of *S. miltiorrhiza*

3.3 丹参愈伤组织有效成分定量测定

按照“2.5”项方法测定丹参愈伤组织有效成分含量，色谱图见图 2。HPLC 分析表明，7 种成分在丹参 3 种无菌材料中的含量显著差异 ($P < 0.05$) (表 6)。从表 6 可以看出，不同无菌材料各成分差异积累，除无菌苗中丹酚酸 A 及愈伤组织中迷迭香酸含量最高外，其余成分均为再生苗中含量高，其中丹酚酸 B 质量分数最高 (41.1761 ± 1.5614) mg/g，为无菌苗的 2 倍、愈伤组织的 6 倍；其次为阿魏酸，分别为无菌苗、愈伤组织的 6 倍和 26 倍。而无菌苗与愈伤组织成分含量有共同趋势，均为迷

表 6 各成分在不同无菌材料中含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Content of components in different aseptic materials ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

指标成分	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	无菌苗	愈伤组织	再生苗
丹参素	0.350 4±0.050 0b	0.129 7±0.016 2c	1.055 6±0.045 1a
咖啡酸	0.119 8±0.014 4b	0.042 8±0.002 3c	0.293 6±0.011 2a
阿魏酸	2.339 7±0.219 8b	0.507 2±0.004 7c	13.520 1±0.384 0a
迷迭香酸	20.538 6±0.560 1b	29.299 6±0.793 5a	14.210 8±0.622 5c
丹酚酸 B	19.733 6±3.430 5b	7.516 6±0.809 0c	41.176 1±1.561 4a
丹酚酸 A	5.910 9±1.196 5a	0.848 4±0.118 7b	0.627 9±0.036 42b
丹参酮II _A	0.127 6±0.010 4b	0.429 9±0.009 1a	0.534 6±0.035 9a

同行同一因素不同处理间不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters in the same line represent the significant differences among different treatments under the same factor ($P < 0.05$)

迭香酸含量最高，丹酚酸 B 次之，咖啡酸最低。

4 讨论

药用植物愈伤组织诱导、分化和生根能力差异主要受种质、生理特性及外源激素影响。生长素和细胞分裂素是调节植物愈伤组织的重要激素，二者适当配比能够有效诱导愈伤组织或生芽。丹参相关的愈伤组织及再生体系激素配比已有部分研究。对丹参幼茎、幼叶、花蕾诱导愈伤组织研究表明，6-BA (0.5 mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L) 为幼茎的最佳诱导条件，NAA (0.5 mg/L) + 6-BA (1.0 mg/L) 为最佳分化培养条件，1/2MS+NAA (0.5 mg/L) 为最佳生根培养基^[10]。丹参叶片在 MS + 6-BA (1.0 mg/L) + NAA (0.1 mg/L) 培养基上最易分化芽且在 1/2MS+NAA (0.2 mg/L) + IBA (0.5 mg/L) 下最适生根^[15]。本实验利用正交实验筛选叶片诱导愈伤组织适宜激素组合为 6-BA (2.0 mg/L) + NAA (1.0 mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L)，愈伤组织致密黄绿色，并用 6-BA (2.0 mg/L) + NAA (1.0 mg/L) 以及 1/2MS +

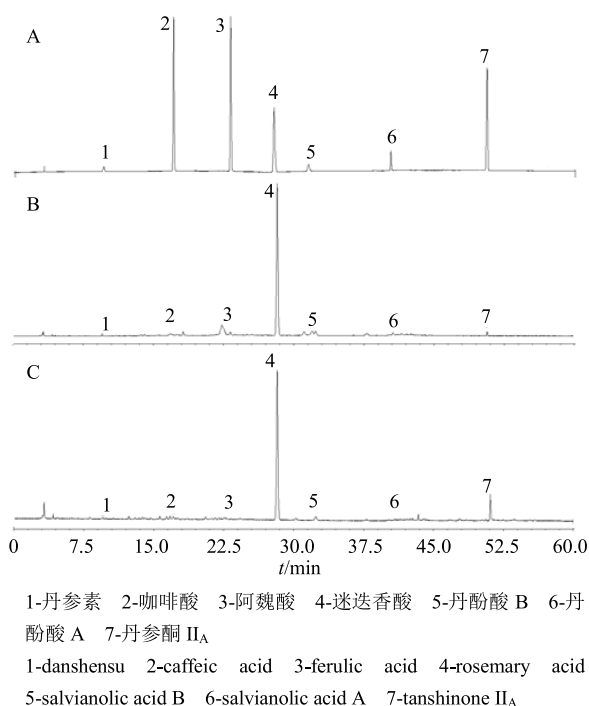


图 2 混合对照品 (A)、丹参无菌苗 (B)、愈伤组织 (C) 的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analyses of mixed reference substances (A), *S. miltiorrhiza* aseptic seedlings (B) and calli (C)

NAA (0.5 mg/L) 进行分化、生根培养, 初步建立丹参再生苗培养体系。该激素组合与已报道的 6-BA、NAA 配比相似^[10-12,15], 能高效诱导丹参优质愈伤组织与再生苗, 为丹参快速繁殖及资源保护提供依据。

愈伤组织中次生代谢物种类及含量变化非常复杂, 受宿主植物自身遗传种质、外植体生理状态、激素配比等因素影响^[16]。利用银杏叶片为外植体诱导的愈伤组织中双黄酮含量明显高于叶片^[17]。2,4-D 与 BA 组合能促进药用蛇床愈伤组织的形成及生长且愈伤组织可用于酚类、黄酮类和邻苯二甲酸类化合物的生产^[18]。丹参幼苗茎诱导的愈伤组织迷迭香酸含量高于叶片且均高于田间种植的野生丹参^[11]; 0.2 mg/L BA 能够促进隐丹参酮含量的积累且培养 60 d 后隐丹参酮的含量最高^[11]。本研究建立了丹参 HPLC 分析体系, 并对丹参无菌材料进行有效成分含量分析, 结果表明 7 种成分均被检测出。相较之下, 无菌苗中丹酚酸 A、愈伤组织中迷迭香酸及再生苗中丹酚酸 B 为三者之中最高, 而丹参素、咖啡酸、阿魏酸与丹参酮 II_A 在 3 种材料中的含量大小次序为再生苗 > 无菌苗 > 愈伤组织, 不同无菌材料体内代谢途径的旺盛程度不同, 说明该愈伤组织与再生苗有效成分含量佳, 为通过生物技术手段实现丹参快繁和探索有效成分合成与调控研究提供基础, 可用于后续丹参及次生代谢物生产实践开发。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 戴新新, 宿树兰, 郭盛, 等. 丹参酮类成分的生物活性与应用开发研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1442-1448.
- [3] Moon C Y, Ku C R, Cho Y H, *et al.* Protocatechuic aldehyde inhibits migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and intravascular thrombosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(1): 116.
- [4] Wang Y, Li J X, Wang Y Q, *et al.* Tanshinone I inhibits tumor angiogenesis by reducing *STAT3* phosphorylation at TYR705 and hypoxia-induced HIF-1 α accumulation in both endothelial and tumor cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 16031-16042.
- [5] Fang X, Guo L, Zhao Q, *et al.* Effect of genotype and environment on *Salvia miltiorrhiza* roots using LC/MS-based metabolomics [J]. *Molecules*, 2016, 21(4): 414.
- [6] Luo H, Kong W, Hu Y, *et al.* Quality evaluation of *Salvia miltiorrhiza* Bge. by ultra high performance liquid chromatography with photodiode array detection and chemical fingerprinting coupled with chemometric analysis [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(9): 1544-1551.
- [7] 黄鑫, 陈万生, 张汉明, 等. 生物技术在药用植物研究与开发中的应用和前景 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2343-2354.
- [8] 付航, 黄涵笠, 王妍, 等. 防风愈伤组织诱导及植株再生体系的建立 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3127-3133.
- [9] Wu C F, Karioti A, Rohr D, *et al.* Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells [J]. *Food Chem*, 2016, 201: 292-297.
- [10] 赵东利, 曹雪梅, 邱桂佳, 等. 丹参的组织培养及植株再生 [J]. 北京农学院学报, 2010, 25(2): 5-7.
- [11] Wu C T, Mulabagal V, Nalawade S M, *et al.* Isolation and quantitative analysis of cryptotanshinone, an active quinoid diterpene formed in callus of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(6): 845-848.
- [12] 柳福智, 董娟娥, 梁宗锁. 外源激素对丹参愈伤组织诱导和有效成分含量的影响 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(5): 151-153.
- [13] Dong J, Wan G, Liang Z. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture [J]. *J Biotechnol*, 2010, 148(2): 99-104.
- [14] Lu L L, Hou S, Zheng T T, *et al.* Simultaneous determination of five hydrophilic and lipophilic components from roots of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 75-79.
- [15] 兰英, 柳敏, 严铸云, 等. 不同地理种源丹参组培快繁及再生苗性状差异比较 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 103-107.
- [16] 房慧勇, 朱虹, 丁海麦, 等. 影响愈伤组织中次生代谢产物含量的因素研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2846-2850.
- [17] 王霞霞, 高平, 李栋, 等. 银杏愈伤组织诱导及其双黄酮含量的测定 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 65-67.
- [18] Adil M, Ren X X, Kang D I, *et al.* Effect of explant type and plant growth regulators on callus induction, growth and secondary metabolites production in *Cnidium officinale* Makino [J]. *Mol Bio Rep*, 2018, 45: 1919-1927.