

中药白芍愈伤组织的培养及其中芍药苷的测定

凌庆枝¹, 董丽辉¹, 章聪敏¹, 高莉莉¹, 江海龙², 冯定军², 周海滨²

(1. 浙江医药高等专科学校, 浙江宁波 315100; 2. 宁波立华制药有限公司, 浙江宁波 315174)

摘要 [目的] 建立中药白芍愈伤组织培养的方法, 并测定其中芍药苷的含量。[方法] 以白芍叶、茎为外植体, 接种于不同的愈伤诱导培养基和继代培养基上培养愈伤组织, 并提取愈伤组织中的芍药苷, 用 TLC 和 HPLC 法测定愈伤组织中芍药苷的含量。[结果] 适合白芍茎的诱导愈伤培养基是 1/2MS + 0.2 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA, 叶的最适诱导培养基是 1/2MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L 6-BA, 白芍愈伤继代培养适合培养基为 1/2MS + 0.1 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA。经 HPLC 测定每克干白芍愈伤组织中的芍药苷含量为 0.068 9 mg。[结论] 中药白芍的叶和茎可诱导形成愈伤组织, 且形成的愈伤组织中含有芍药苷。

关键词 白芍; 愈伤组织; HPLC; 芍药苷

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)11-04705-04

Study on Callus Culture of *Paeonia lactiflora* pall and Determination of Paeoniflorin in Callus

LING Qing-zhi et al (Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo, Zhejiang 315100)

Abstract [Objective] To establish the methods of callus culture, and determine the content of paeoniflorin in callus cells of *Paeonia lactiflora* pall. [Method] Leaves and stem sterilized were cut into tissue pieces and inoculated on different induction medium and regeneration medium. Paeoniflorin was extracted from callus and the content of paeoniflorin was determined by TLC and HPLC. [Result] The results showed that medium of 1/2MS + 0.2 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA were fit for stem callus induction, and medium of 1/2MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L 6-BA were fit for leaves callus induction. Regeneration medium of callus is 1/2MS + 0.1 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA. The content of paeoniflorin of callus is 0.068 9 mg/g by HPLC. [Conclusion] Leaf and stem of *Paeonia lactiflora* pall could be induced to form callus. There are paeoniflorin in callus cells of *Paeonia lactiflora* pall.

Key words *Paeonia lactiflora* pall; Callus; HPLC; Paeoniflorin

白芍(*Paeonia lactiflora* pall)属于毛茛科芍药属植物,别名芍药,又名将离、婪尾春,其根可入药。白芍性味酸、苦,微寒,入肝、脾经,有养血敛阴、平肝止痛、调和营卫之效,常用于血虚肝旺、胁痛、腹痛、月经不调之症^[1],其药用在我国已有十分悠久的历史。

白芍主要含有芍药苷、牡丹酚、芍药内酯苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷等化学成分,芍药苷为其主要成分^[2]。目前,以白芍提取的有效成分芍药苷为主要成分的帕夫林,已作为第一个治疗风湿性关节炎的抗炎免疫调节中药应用于临床^[3],在治疗风湿性关节炎上疗效显著。但白芍一般生长 4~5 年才可收获入药,生长周期长,且不同产地的白芍质量参差不齐,其有效成分种类和含量差异大,难以控制,成为工业制药的巨大隐患^[4]。组织培养制备中药的有效成分,既可降低成本,又可进行有效质量控制,是实现中药现代化的有效途径之一^[5-7]。

该试验以白芍的茎、叶为外植体诱导愈伤组织,继而继代培养,并建立白芍愈伤组织中芍药苷的提取与高效液相测定方法,旨在为白芍中药的现代化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料。白芍(*Paeonia lactiflora* Pall)植株采自宁波立华制药有限公司安徽省亳州市白芍种植园,植株室外盆栽,取植株上幼嫩叶片、茎等部位为外植体。

1.1.2 仪器与试剂。KS-600 EI 型超声波清洗机(宁波海曙

科生超声设备有限公司);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学);MLS-3780 高压蒸汽灭菌器(日本三洋电机株式会社);YJ-875 净化工作台(苏州金信净化设备工程有限公司);PQX 型多段人工气候箱(宁波东南仪器有限公司);TLC 板(GF254,烟台江友硅胶开发有限公司);DIONEX-3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司)。芍药苷对照品由中国食品药品检定研究院提供;色谱纯乙腈购自天津市四友精细化学品有限公司;试验所用其他化学试剂均为国产分析纯。琼脂、植物激素等为国产生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒及愈伤组织的诱导。取幼嫩的白芍外植体,流水冲洗 2 h,用 1% 浓度的去污粉浸泡 10 min,流水冲洗 3 h,在超净工作台上,用 3.5% 次氯酸钠溶液对外植体进行消毒,15 min 后用无菌水荡洗 6 次,将消毒过的外植体置于添加不同浓度植物激素组合(表 1)及 7 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖且 pH 均为 6.0 的 1/2MS 培养基上培养。培养条件为:温度 25 ℃,湿度 60%,光照强度 2 000 lx,光周期 12 h/d。

茎愈伤组织诱导率(%) = 茎诱导出愈伤组织的外植体数/接种茎外植体数 × 100%。

叶愈伤组织诱导率(%) = 叶诱导出愈伤组织的外植体数/接种叶外植体数 × 100%。

1.2.2 愈伤组织的继代培养。为有效控制白芍愈伤褐化速度,使愈伤组织更好的生长继代,试验将已诱导成功的白芍愈伤转接至添加不同激素组合的 1/2MS 继代培养基上,每天观察并记录愈伤的生长情况、愈伤开始褐化的天数及白芍愈伤长势。

1.2.3 白芍愈伤组织中芍药苷的提取。白芍愈伤组织的继

基金项目 宁波市鄞州区科技项目资助课题[鄞科(2010)101 号]。

作者简介 凌庆枝(1963-),男,安徽合肥人,教授,博士,从事生物技术制药研究,E-mail:lingqingzhi@sina.com。

收稿日期 2013-04-02

代周期约为 40 d,收获培养 40 d 的愈伤组织,称重,记为生长鲜重,然后在 60 ℃ 的烘箱中烘干至恒重记为干重;称取白芍愈伤组织干品 10 g,加 50% 乙醇 100 ml,超声提取 40 min,冷却后真空浓缩备用。

1.2.4 愈伤组织中芍药苷的薄层层析检测。采用 2 cm × 10 cm 的硅胶板进行检测,展开剂为:氯仿/甲醇/水(体积比 30:10:0.2),显色剂为:0.1% 香草醛硫酸溶液。用毛细管直接将 0.4 μl 样品和芍药苷标准品点在距薄层板一端约 1 cm 处,点完干燥后将板置于展开液中,待展开到离板另一端约 1 cm 处取出层析板,自然干燥。待溶剂基本挥发后,用喷雾器喷上显色剂,吹干,记录斑点,测 R_f 值。

1.2.5 愈伤组织中芍药苷高效液相色谱测定。采用 DI-ONEX-3000 色谱系统进行测定,Hypersi-ODS2 柱(5 μm,4.6 mm × 250 mm),色谱条件为:流动相为乙腈:0.1% 磷酸 = 14:86(V/V);流速 1 ml/min;进样量 10 μl;柱温 25 ℃,检测波长 230 nm。

1.2.5.1 线性关系考察。称取芍药苷标准品 6.00 mg,于 10 ml 的容量瓶中用甲醇溶解置刻度。分别吸取芍药苷标准品溶液 100、500、1 000、1 500、2 000 μl 置于 10 ml 容量瓶中稀释至刻度,样品用流动相稀释成 10 ml 的溶液,膜过滤备用,根据芍药苷标准品色谱峰的保留时间对样品定性,以峰面积与对应浓度绘标准曲线,并计算样品中芍药苷的含量。

1.2.5.2 精密度试验。按上述色谱条件精密吸取同一份标准品溶液 10 μl,连续进样 5 次进行测定。

1.2.5.3 重复性试验。按上述色谱条件,对同一批样品分

别制备 5 份供试品溶液,各吸取 10 μl 进样测定。

1.2.5.4 稳定性试验。取同一份供试品溶液在上述色谱条件下,分别在 1、2、4、8、12、24 h 时各进样 10 μl 进行测定。

1.2.5.5 回收率试验。采用加样回收测定法:称取已知含量的同一批样品 9 份,精密称定,分别精密加入相同量的芍药苷标准品溶液,按上述色谱条件进样,计算回收率。

2 结果与分析

2.1 白芍愈伤组织的诱导 由表 2 可看出,外植体诱导愈伤中 2、5、6 号培养基均可达到 100% 茎愈伤诱导率,在培养中配方 5 诱导茎出愈伤组织较快,而且诱导的愈伤组织较大,长势好(图 1A);配方 2、6 诱导茎愈伤组织较快,且诱导的愈伤组织在 4~5 d 开始变褐色,有褐化的趋势;配方 3、4 诱导茎愈伤组织的诱导率较低。因此,最佳茎段诱导愈伤组织培养基配方为 1/2MS + 0.2 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA。外植体叶的愈伤组织诱导率普遍比茎段的诱导率低,且其诱导的愈伤组织 3~4 d 就开始褐化。培养基配方 2 诱导叶的愈伤率最高,达 67.8%(图 1B)。

表 1 不同激素浓度的白芍愈伤诱导培养基

培养型 编号	激素浓度 // mg/L			
	2,4-D	NAA	6-BA	ZT
1	0.1	0.1	2.0	0
2	1.0	0	1.5	0
3	0.5	0.5	2.0	0
4	0	0.5	0	1.0
5	0.2	0.2	2.0	0
6	0	0.2	2.0	0

表 2 不同培养基白芍愈伤组织诱导影响

培养基 编号	茎开始肿 大天数 // d	叶开始肿 大天数 // d	茎出愈伤 天数 // d	叶出愈伤 天数 // d	外植体茎 愈伤率 // %	外植体叶 愈伤率 // %	愈伤颜色	外植体开始 褐化天数 // d
1	8	8	11	无	75.0	0	淡绿色	4~5
2	8	6	17	26	100	67.8	淡绿色	3~4
3	7	8	18	29	33.3	37.6	淡绿色	4~5
4	9	6	18	无	25.0	无	淡绿色	3~4
5	5	无	13	38	100	57.7	淡绿色	3~4
6	7	无	15	35	100	23.7	淡绿色	4~5

2.2 愈伤组织的继代培养 褐化是植物材料受伤后,体内释放的酚类物质在酚氧化酶的作用下被氧化成褐色的醌类物质的结果^[8],而醌类物质通过聚合作用产生有色物质从而导致组织呈褐色,这种褐色物质会逐渐扩散到培养基中,毒害整个外植体组织^[9]。在组织培养过程中往往会因为褐化严重而造成愈伤组织难以继代保存^[10],以至是否褐化对某些植物的组织培养能否成功起决定性的作用。为使愈伤组织能有效多次的继代,试验对继代培养基进行了研究,由表 3 可看出 7 号激素组合能有效抑制酚类物质的产生,愈伤的开始褐化时间,有利于白芍愈伤的继代培养,因此白芍愈伤继代培养应选用 7 号培养基。

2.3 白芍愈伤组织中芍药苷薄层层析结果 将白芍愈伤组织芍药苷提取样品和芍药苷标准品点样层析,结果(图 2)显示,白芍愈伤组织芍药苷提取物样品的迁移率与芍药苷标准品相同,均为 0.797。

表 3 不同浓度激素培养基对白芍愈伤继代的影响

编号	激素组合 // mg/L				从诱导愈伤到 褐化的时间 // d
	2,4-D	NAA	6-BA	ZT	
1	0.1	0.1	2.0	0	61
2	1.0	0	1.5	0	29
3	0.1	0.1	0	0.5	31
4	0	0.5	0	1.0	35
5	0	0.5	1.0	0	42
6	0.1	0.5	0	0.5	58
7	0.1	0.5	0	1.0	129

2.4 白芍愈伤组织的芍药苷的高效液相色谱测定

2.4.1 标准曲线试验。采用不同浓度标准品的峰面积与对应浓度绘制标准曲线,得到回归方程: $y = 0.164x + 0.2410$, $r^2 = 0.9996$,发现芍药苷在 6~120 μg/ml 有良好的线性关系。根据芍药苷标准品色谱峰的保留时间(图 3)对样品定

性,计算样品中芍药苷(图4)的含量为 68.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

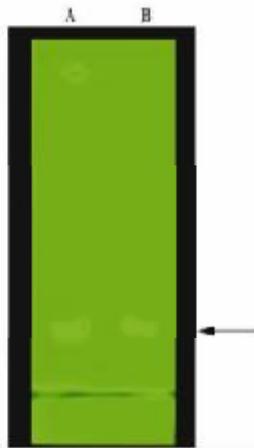
复进样 5 次,计算峰面积的积分值,结果得到 $RSD = 1.53\%$ 。

2.4.2 精密性试验。精密量取芍药苷对照品溶液 10 μl ,重



注:A. 茎诱导的愈伤组织;B. 叶诱导的愈伤组织。

图 1 白芍的愈伤组织



注:A. 白芍愈伤组织中芍药苷;B. 芍药苷标准品。

图 2 白芍愈伤组织中芍药苷的 TLC 分析

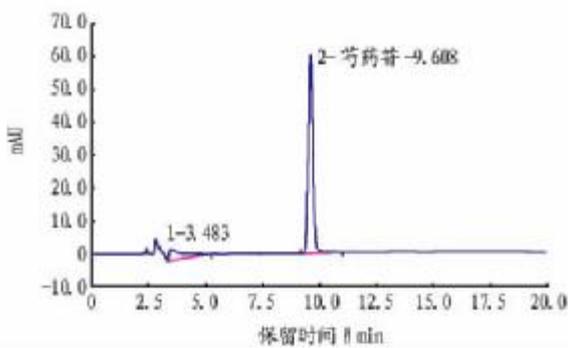


图 3 芍药苷标准品的 HPLC 分析

2.4.3 重复性试验。称取 5 份同一样品进样分析,结果表明,所有样品芍药苷含量相差不大 $RSD = 1.43\%$ 。

2.4.4 稳定性试验。取供试样品溶液分别在 1、2、4、8、12、24 h 进样 10 μl ,重复 5 次,测定峰面积的积分值,结果表明样品在 24 h 内稳定性良好, $RSD = 2.32\%$ 。

2.4.5 加样回收率试验。称取已知含量的同一批样品 9 份,精密称定,分别精密加入相同量的芍药苷标准品溶液进行 HPLC 分析,结果表明(表 4)芍药苷平均回收率为 99.77%, $RSD = 1.96\%$ 。

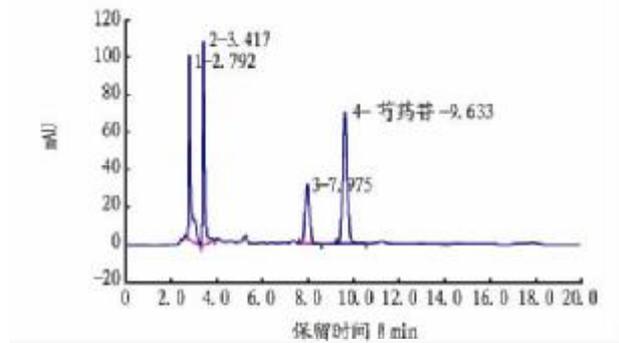


图 4 白芍愈伤组织中芍药苷的 HPLC 分析

表 4 芍药苷回收率试验

编号	取样量 g	含芍药 苷的量 mg	加入芍 药苷标准 品量//mg	测定的 量//mg	回收率 %	平均回 收率//%	RSD %
1	5.11	0.351 8	0.301 0	0.649 8	99.00	99.77	1.96
2	5.05	0.347 7	0.301 0	0.648 0	99.77		
3	5.17	0.356 0	0.301 0	0.656 7	99.90		
4	5.08	0.349 8	0.301 0	0.650 0	99.71		
5	5.20	0.358 0	0.301 0	0.659 5	100.20		
6	5.00	0.344 3	0.301 0	0.646 9	100.53		
7	4.98	0.342 9	0.301 0	0.646 0	100.69		
8	4.95	0.340 8	0.301 0	0.640 1	99.46		
9	5.01	0.344 9	0.301 0	0.642 0	98.70		

3 结论与讨论

该试验表明,在白芍愈伤的诱导过程中,不同部位外植体所用的最佳诱导培养基是不同的,叶茎、叶柄、叶片属不同的器官^[11],各自存在其最佳的诱导愈伤激素组合,白芍茎的最适诱导培养基是 1/2MS + 0.2 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA,叶的最适诱导培养基是 1/2MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L 6-BA。在白芍的继代培养中发现,不同的激素水平,可减轻材料的褐变,抑制酚类等物质产生的速度,从而延长愈伤的继代时间,该试验中得到白芍愈伤继代的最佳培养基是 1/2MS + 0.1 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA。

经过薄层层析发现白芍的愈伤组织中含有芍药苷,经高效液相色谱测定,愈伤组织中的芍药苷含量为 68.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$,低于野生白芍中的芍药苷含量,这可能是由于愈伤组织缺少特定的组织和器官,使芍药苷的表达量降低。另外,环境中的气候、土壤、生长周期对植物中药用成分的积累也有影响,而组织培养中没有这些条件的影响。但组织培养外植体的细胞生长速度要比植物正常生长速度快,且具有不受地区、季节和气候限制等优势,因此通过组织培养可克服白芍生长缓慢、生长周期长的缺点。

研究表明^[12],可通过在培养基中添加前体或代谢产物合成抑制剂及诱导子等从而增加植物细胞的次级代谢,目前也取得了一定的成绩,其中,紫草宁、小檗碱和人参皂苷等已成功实现了商业化大规模生产。白芍愈伤组织再生途径的建立和愈伤组织培养获取芍药苷的研究,使利用细胞培养及植物基因工程手段生产芍药苷成为可能,因此具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] 丁雪梅. 白芍的特性及栽培技术[J]. 新疆农业科技, 2008, 179(2): 35 -

37.

- [2] 王景霞, 张建军, 李伟, 等. 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 16(7): 183 - 184
- [3] 周晓涛, 朱明, 牟超, 等. 白芍总苷对佐剂性关节炎大鼠外周血中 TNF- α 及 sICAM-1 的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(12): 1677 - 1679.
- [4] 高凯, 潘永. 牡丹组织培养繁殖技术初探[J]. 内蒙古农业科技, 2010, 15(5): 60 - 61.
- [5] 王建国. 中国牡丹[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 10 - 240.
- [6] 曾端香, 尹维伦, 赵孝庆, 等. 牡丹繁殖技术[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(3): 90 - 95.
- [7] 高志民, 王雁, 王蓬英, 等. 牡丹、芍药繁殖与育种研究现状[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(4): 75 - 79.
- [8] 李萍, 成仿云, 张颖星. 防褐剂对牡丹组培褐化发生、组培苗生长和增殖的作用[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(2): 71 - 76.
- [9] 符真珠, 陈静, 徐盼盼, 等. 牡丹组培褐变与总酚含量及相关酶活性的关系[J]. 西北林学院学报, 2011, 22(6): 66 - 69.
- [10] 张俊琦, 罗晓芳. 牡丹组培培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 30(5): 720 - 724.
- [11] 贾小平, 孔祥生, 李海刚, 等. 不同激素配比对牡丹愈伤组织诱导及生化指标的影响[J]. 北方园艺, 2010, 22(8): 172 - 175.
- [12] 曲均革, 虞星炬, 张卫, 等. 前体饲喂、诱导子和光照联合使用对葡萄细胞培养合成花青素的影响[J]. 生物工程学报, 2006, 22(3): 299 - 305.

(上接第 4704 页)

重、干重指标 ANOVA 进行数据分析。结果表明,不同处理的株高呈 0.05 水平显著性差异;各处理分蘖数、叶片数、鲜重、干重 P 值均呈 0.01 水平显著性差异,具有统计学意义。再进行多重比较分析。由表 3 可知,在株高、分蘖数、鲜重、干重上, R + F 处理效果比其他处理好,尤其在分蘖数、鲜重和干重上超过 CK 2 倍以上,在株高方面也比 CK 增加了 8%,在叶片数上, S 处理的效果高于其他处理。

表 2 不同处理对玉米各指标的影响

处理	株高//m	穗数
CK	1.38 C	1.6 b
R	1.56 A	1.5 b
F	1.43 C	1.0 b
S	1.49 ABC	1.6 b
S + F	1.54 AB	1.8 ab
R + F	1.44 BC	2.1 a

注:同列不同大小写字母分别表示差异在 0.01、0.05 水平显著。

表 3 不同处理对水稻各指标的影响

处理	株高//m	分蘖数	叶片数	鲜重//g	干重//g
CK	0.56 B	1.68 B	3.47 C	4.53 E	1.20 E
R	0.58 AB	3.00 A	3.90 ABC	8.40 B	2.54 B
F	0.57 AB	1.70 B	3.70 BC	5.34 D	1.23 E
S	0.58 AB	2.00 B	4.44 A	6.98 C	1.66 D
S + F	0.60 AB	2.25 B	4.08 AB	8.55 B	2.19 C
R + F	0.61 A	3.54 A	3.92 ABC	10.06 A	3.51 A

注:同列不同大写字母表示差异在 0.01 水平显著。

3 讨论

为了进一步证明 R1 醇提取物对植物的促生作用,用 R1

菌丝醇提取物、复合肥、S-诱抗素对 6 个处理对大豆、玉米、水稻进行研究,其中大豆和玉米为浸种,水稻为插秧前喷根处理。利用 SPSS11.5 软件进行方差分析和多重对比水稻、大豆、玉米不同生长指标。研究表明, R1 醇提取物的处理大豆茎粗比 CK 增加了 25%,主茎节数比 CK 增加了 34%,为所有处理中效果最好的; R + F 处理根瘤数、有效荚数和鲜荚重分别比 CK 增加了 250%、113% 和 124%。除玉米株高和穗数外,其他数据均无统计学意义。R 处理玉米株高比 CK 增加了 13%, R + F 处理穗数增加了 31%。R + F 处理水稻株高、分蘖数、鲜重、干重比其他处理效果好,分别比 CK 增加了 8.9%、110.7%、122% 和 193%。由此可知, R1 菌丝提取物不论单独使用还是加肥使用都对大豆和水稻的生长指标有效果,只对玉米的株高和穗数产生效果,在大豆根瘤数和水稻的分蘖数上表现明显。这可能与 R1 菌丝醇提取物中测得的植物激素吲哚乙酸和赤霉素的作用有关^[3-4]。R + F 处理大豆和水稻的产量要好于 R 处理,表明醇提取物本身并不能提供植物生长所需的营养物质,但与肥配合使用可达到较好的增产效果。

参考文献

- [1] 刘刚, 刘启, 肖亮. S-诱抗素对玉米植株水分消耗的影响[J]. 西南农业学报, 2011, 24(3): 1125 - 1127.
- [2] 冒宇翔, 沈俊明, 陈惠, 等. 1% S-诱抗素·吲哚丁酸在水稻生产上的应用研究[J]. 现代农药, 2009(3): 55 - 56.
- [3] 阿加拉铁, 薛大伟, 李仕贵, 等. 植物激素与水稻产量的关系[J]. 中国稻米, 2006(5): 1 - 3.
- [4] 黄升谋. 玉米素和吲哚乙酸影响水稻结实率与充实度的机理分析[J]. 农业现代化研究, 2012(5): 12 - 16.