

## 大花金挖耳细胞培养物中总黄酮含量的检测

李玉平<sup>1,2</sup>, 王永宏<sup>2</sup>, 易晓华<sup>2</sup>, 张强<sup>2</sup>, 张兴<sup>2\*</sup>

(1. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学无公害农药研究服务中心, 陕西杨凌 712100)

**摘要** [目的]研究大花金挖耳果实和细胞培养物总黄酮含量的定性和定量测定。[方法]采用试管法和紫外分光光度法对大花金挖耳果实和细胞培养物中的黄酮进行定性鉴定;用紫外分光光度法测定总黄酮含量。[结果]试管法和紫外分光光度法检测到大花金挖耳果实细胞培养物含有黄酮;紫外分光光度法测定时,在其最大吸收峰 510 nm 处测得对照品在 8.00~48.00 μg/ml 范围内线性关系良好 ( $r=0.9997$ ),平均回收率为 98.60%,RSD=1.12% (n=5)。[结论]所用方法简便、准确、稳定、灵敏、重现性好,可用于大花金挖耳果实和细胞培养物总黄酮含量的检测。

**关键词** 大花金挖耳;细胞培养物;紫外分光光度法;黄酮;含量检测

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)29-09160-02

Detection of Total Flavonoids in Cell Culture Substance of *Carpesium. macrocephalum* Franch. et Sav

LI Yu-ping et al (College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** [Objective] The paper was conducted to take qualitative and quantitative detection of the total flavonoids in fruits and cell culture substance of *Carpesium. macrocephalum* Franch. et Sav. [Methods] Qualitative detection of the flavonoids in fruits and cell culture substance of *Carpesium. macrocephalum* was carried out by test tube method and UV spectrophotometry, while the content of total flavonoids was determined by UV spectrophotometry. [Result] There were flavonoids in fruit cell culture of *Carpesium. macrocephalum* by test tube method and UV spectrophotometry. The linear relation of the control was good within the range of 8.00~48.00 μg/mL at the maximum wavelength of 510 nm by test tube method and UV spectrophotometry ( $r=0.9997$ ). The average recovery was 98.60% and RSD was 1.12% (n=5). [Conclusion] The method was simple, accurate, stable, sensitive and had good reproducibility. It could be used to detect the total flavonoids in fruit and cell culture substance of *Carpesium. macrocephalum*.

**Key words** *Carpesium. macrocephalum* Franch. et Sav.; Cell culture substance; UV spectrophotometry; Flavonoids; Content determination

大花金挖耳 (*Carpesium. macrocephalum* Franch. et Sav) 是菊科天明精属植物<sup>[1]</sup>,全草入药,凉血,散瘀,止血,用于跌打损伤,民间用于治疗吐血<sup>[2]</sup>,有较高的抗人体肝癌细胞活性和杀菌活性<sup>[3-5]</sup>。国内外已经进行了大花金挖耳原植物体的化学成分及其医药和农药活性的研究,从中分离得到了黄酮、天明精内酯酮等倍半萜内酯及其苷类等多种活性成分<sup>[6-11]</sup>。

黄酮类化合物在自然分布很广泛,具有生物抗氧化性,清除自由基作用,抗衰老,治疗心脑血管疾病,降血脂,降血压,降低血糖,治疗慢性前列腺炎,抗肿瘤等作用<sup>[12]</sup>。目前,有关大花金挖耳细胞培养及其果实和细胞培养物黄酮含量的检测少见报道<sup>[13]</sup>。为此,笔者对大花金挖耳果实和细胞培养物中总黄酮进行了定性和定量的检测,旨在为高产细胞系的筛选、大规模细胞培养生产有用的次生代谢物质,并为解决大花金挖耳资源保护和开发利用的矛盾提供新的途径,也可用于大花金挖耳的质量控制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1)大花金挖耳果实及细胞培养物材料。供试大花金挖耳果实收集于太白山海拔 1 600 m 的栎林带,经中国科学院西北植物研究所鉴定,愈伤组织由大花金挖耳幼根经诱导获得,收集培养 40 d 的褐化愈伤组织作为供试材料,愈伤组织诱导方法见文献<sup>[13]</sup>;诱导的愈伤组织以 20 d 间隔进行继代培养,在继代培养过程中筛选生长旺盛、疏松、含水量小的愈伤组织接种于 B<sub>5</sub>+NAA 3.00 mg/L+6-BA 0.20 mg/L 培养基进行细胞悬浮培养,继代培养 3 代后,收集培养 20 d 的褐化悬浮细胞作为供试材料。

(2)主要仪器。BP-190S 天平( Sartorius 公司生产),PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂生产),SW-CJ-1B 标准型净化工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司生产),WMZK-01 温度指示控制仪(上海医用仪表厂生产),ES-315 Tomy High-pressure steam sterilizer (Tomy KOGYO CO.LTD. Nerima Tokyo.Japan 生产),旋转薄膜蒸发器(上海申生科技有限公司生产),ZRD-5030 鼓风干燥箱,HZT2 双层振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司生产);UV1102 紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司生产),微型高速万能试样粉碎机(河北黄骅市齐家务科学仪器厂提供)。

(3)主要试剂。芦丁标准品(购于中国药品生物制品检验所),其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 芦丁标准品溶液和供试品溶液的制备。精密称取 105 °C 干燥至恒重的芦丁标准品 10.00 mg,加适量浓度 30% 乙醇,置水浴中微热溶解,冷却后用浓度 30% 乙醇定容,得浓度为 0.20 mg/ml 芦丁标准液 50.00 ml,备用;另将果实、愈伤组织和悬浮细胞培养物在 60 °C 烘箱内烘干至恒重,研成粉末,过 60 目筛,准确称取 10.00 g 干燥后的粉末,用丙酮振荡提取 3 次,每次 24 h;过滤,合并滤液,真空浓缩后用无水乙醇(定性鉴定)和浓度 30% 乙醇(含量测定)分别定容到 10.00 ml。测定黄酮含量时,将供试的果实和细胞培养物提取液稀释至 0.25、0.50 g/ml。

1.2.2 黄酮的定性鉴定。参考植物化学研究一般方法,利用盐酸-镁粉反应和醋酸铅沉淀反应的试管预试法,以及利用黄酮及苷类具有紫外光谱特征峰进行黄酮及苷类的化学成分的定性鉴定<sup>[14-15]</sup>。①盐酸+镁粉反应:取大花金挖耳果实、愈伤组织和悬浮细胞培养物供试液 2.00 ml,加入少量镁粉,振荡,再加入浓盐酸 7~8 滴,加热 3 min,滴加镁粉观察

作者简介 国家“十五”科技攻关项目 2002BA516A04。

作者简介 李玉平(1970-),男,宁夏中宁人,在读博士,讲师,从事药用植物的教学与研究。E-mail: daliyuping@163.com。

收稿日期 2007-05-30

结果。②醋酸铅沉淀反应:取大花金挖耳果实、愈伤组织和悬浮细胞培养物供试液 2.00 ml,滴加饱和醋酸铅溶液,观察结果。

1.2.3 最大吸收波长的确定。吸取芦丁标准品溶液和悬浮细胞供试品溶液各 2.00、0.50 ml,分别置于 2 支 25 ml 比色管中,按 1.2.4”方法显色,以等量的浓度 30%乙醇作空白,显色后,标准溶液和供试品溶液分别于 400~800 nm 扫描,确定其最大吸收波长。

1.2.4 标准曲线的绘制。分别取芦丁标准液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 ml 置于 7 个 25 ml 容量瓶中,用体积分数为 30%乙醇补充到 12.50 ml,加入 0.70 ml 质量分数为 5% NaNO<sub>2</sub> 摇匀,放置 5 min 后加入 0.70 ml 质量分数为 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>,5 min 后再加入 5.00 ml 1 mol/L NaOH 混匀,用体积分数为 30%乙醇稀释到刻度,10 min 后按 1.2.3”确定的波长绘制标准曲线,并进行相应的可能干扰测定结果准确性的条件试验。

1.2.5 精密度的试验。分别取 0.20 mg/ml 芦丁标准溶液 6.00 ml 和 0.50 g/ml 的悬浮细胞供试液 0.50 ml,按 1.2.4”的方法显色,连续测定 5 次。

1.2.6 稳定性试验结果。分别取 0.20 mg/ml 芦丁标准溶液 4 ml 和 0.50 g/ml 的愈伤组织供试液 0.50 ml,按 1.2.4”的方法显色,于室温分别放置 0、15、30、45、60 min,测定对照品及供试品溶液吸光度。

1.2.7 重现性试验。取愈伤组织样品粉末,按照 1.2.1”的方法制得浓度为 0.50 g/ml 供试品溶液 5 份,分别精密吸取 0.50 ml,按 1.2.4”的方法显色,测定溶液吸光度。

1.2.8 回收率试验。采用加样回收法,取愈伤组织样品粉末,按照 1.2.1”的方法制得浓度为 0.50 g/ml 供试品溶液 5 份,分别精密吸取 0.50 ml 加入 0.20、0.40、0.80、1.00、2.00 ml 芦丁标准液,依次显色后测得吸收度,用回归方程计算总黄酮含量。

1.2.9 待测样品黄酮含量的测定。分别取大花金挖耳果实、愈伤组织和悬浮细胞培养物的供试液各 0.50 ml 于 25 ml 容量瓶中,每个取 3 份,按 1.2.4”的方法显色,计算总黄酮的含量。

1.2.10 愈伤组织细胞的生长与黄酮积累的动态变化。将继代培养 6 代的淡黄色的愈伤组织细胞团(0.3 cm×0.3 cm×0.3 cm)转接在 MS+NAA 3.00 mg/L+6-BA 0.20 mg/L 固体继代培养基 蔗糖质量浓度 40 g/L,pH 值 5.8,光照时间 12 h/d)上,每瓶 100 ml 三角瓶,培养基 50 ml)接种 0.30 g。随培养时间的延长,考察大花金挖耳愈伤组织生长量的增加与总黄酮含量的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄酮的定性鉴定

2.1.1 显色反应。盐酸+镁粉反应试验结果表明,不加镁粉不显红色,加镁粉呈红色。醋酸铅沉淀反应试验结果表明,溶液变浑浊,有橘黄色沉淀生成。这表明样品含有黄酮或其甙类。

2.1.2 紫外光谱特征峰确定。黄酮类化合物在 200~400 nm 区域内存在 2 个主要吸收峰:峰带 I 300~400 nm 和峰带 II 240~280 nm。取大花金挖耳果实、愈伤组织和悬浮细胞培养物供试液用紫外分光光度计在 200~400 nm 区域内扫描,在

242 和 381 nm 处有特征峰,证明大花金挖耳果实、愈伤组织和悬浮细胞培养物的提取物含有黄酮类化合物。

### 2.2 测定波长与标准曲线的确定

2.2.1 测定波长的选择。扫描结果表明,对照品溶液与供试品溶液在 510 nm 处均有最大吸收,且试剂空白和不加显色剂的样品溶液在 510 nm 处均无吸收,故确定 510 nm 为检测波长。光谱扫描曲线见图 1。

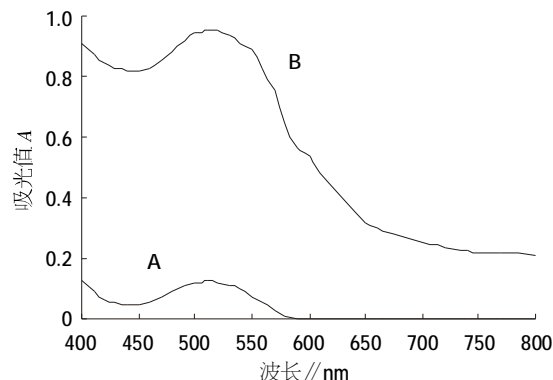


图 1 标准溶液 A) 和样品溶液 B) 的光谱扫描

2.2.2 线性关系考察。在 510 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为横坐标,以溶液质量浓度 (mg/ml) 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为:  $Y=0.0768X-0.0004$ ,  $r=0.9997$ ,芦丁在 8.00~48.00  $\mu\text{g/ml}$  线性关系良好。

2.3 精密度的试验结果 标准品溶液和供试溶液的 RSD 分别为 0.48% 和 0.33%,表明仪器精密度良好(表 1)。

表 1 精密度的试验结果 (n=5)

样品	A	RSD//%
标准品溶液	0.622	0.48
供试溶液	0.941	0.33

2.4 稳定性试验结果 对照品溶液和供试溶液的 RSD 分别为 0.75%、0.56%,这表明对照品及供试品溶液在 1 h 内稳定。

2.5 重现性试验结果 结果表明,样品中总黄酮平均含量为 7.19  $\mu\text{g/g}$ ,RSD=1.14%,这表明该方法的重现性好,结果可靠。

2.6 回收率试验结果(表 2) 由表 2 可知,样品的平均回收率为 98.60%,RSD 为 1.12%,这表明该方法测定结果准确。

表 2 回收率试验结果 (n=5)

编号	样品中总黄酮量// $\mu\text{g/g}$	加入对照品// $\mu\text{g}$	测得量// $\mu\text{g/g}$	回收率/%	平均回收率//%	RSD/%
1	7.19	40.00	46.18	97.48	98.60	1.12
2	7.19	80.00	85.57	97.98		
3	7.19	120.00	125.93	98.95		
4	7.19	160.00	164.39	98.25		
5	7.19	200.00	207.91	100.36		

2.7 样品的测定结果(表 3) 由表 3 可知,大花金挖耳果实、愈伤组织和细胞培养物总黄酮的含量分别为:11.25、7.19 和 7.38  $\mu\text{g/g}$ 。这表明大花金挖耳果实、愈伤组织和细胞培养物均含有黄酮,含量由高到低的顺序为:大花金挖耳果实>细胞培养物>愈伤组织。

表 3 样品的黄酮含量

样品	A	总黄酮含量// $\mu\text{g/g}$
果实	0.738	11.25
愈伤组织	0.941	7.19
悬浮细胞	0.966	7.38

(下转第 9233 页)

2.8 愈伤组织细胞的生长与黄酮积累的动态变化(图 2) 由图 2 可知,愈伤组织的增殖生长明显地分为 3 个时期:延迟生长期、指数生长期和静止期。在延迟期(0~5 d)内,培养物增重缓慢,这可能是由于刚接种的愈伤组织需要适应新的环境,并且细胞处于细胞分裂时期,原生质体合成过程较慢,细胞生长较慢的缘故;在指数生长期(5~40 d)内,原生质合成过程加快,水分迅速进入,细胞体积迅速加大,培养物净干重急剧增加;而到了静止期(40~60 d),细胞开始褐化,净干重稍有下降,这可能是因为在培养基中养分几乎消耗殆尽,细胞合成速率低于消耗速率。30~40 d 细胞分裂快,到第 40 天愈伤组织净干重达到最高值 1.15 g/瓶,总黄酮含量为 7.67  $\mu\text{g/g}$ ;愈伤组织总黄酮积累量在前阶段(5~20 d)呈上升趋势,接着又缓慢下行,在第 20 天总黄酮含量达到最高值 12.82  $\mu\text{g/g}$ ,此时愈伤组织净干重为 0.23 g/瓶,可见愈伤组织的细胞分裂与生长量的增加与总黄酮的产生在培养的 0~20 d 几乎呈线性对应关系。

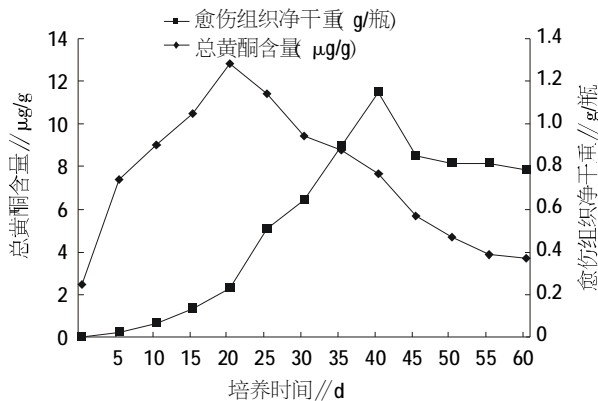


图 2 培养时间对愈伤组织生长和黄酮含量的影响

### 3 结论与讨论

该试验以芦丁为对照品,建立了比色法测定大花金挖耳果实、幼苗、愈伤组织和细胞培养物总黄酮含量的测定方法,该法具有快速、准确、重现性好的特点,能为高产细胞系的筛选、大规模细胞培养生产有用的次生代谢物质,并为解

决大花金挖耳资源保护和开发利用的矛盾提供新的途径,也可用于大花金挖耳的质量控制。

采用紫外分光光度法测得大花金挖耳愈伤组织和细胞培养物总黄酮的质量分数分别为 11.25、7.19、7.38  $\mu\text{g/g}$ ,研究发现愈伤组织细胞增长量和黄酮含量的积累并不完全同步。这说明利用细胞培养技术对大花金挖耳进行愈伤组织和细胞悬浮培养,进行工业化生产具有开发利用的前景。

### 参考文献

- [1] 中国科学院西北植物研究所.秦岭植物志(第一卷)[M].北京:科学出版社,1985:210.
- [2] 谢宗万,余友琴.中国中医研究院中药研究所[M].全国中草药名鉴上海:人民卫生出版社,1996:756.
- [3] YANG C,SHI Y P,JIA Z J.Sesquiterpene lactone,glycosides, eudesmanolides,and other constituents from *Carpesium macrocephalum* [J].*Plant Med*,2002,68(7):626-630.
- [4] 李玉平,龚宁,江志利,等.大花金挖耳杀菌活性的进一步研究[J].西北农林科技大学学报,2004,32(2):35-38.
- [5] 杨小虹,周小平.大花金挖耳提取物的血小板凝聚作用[J].人参研究,2000,12(1):20-21.
- [6] YANG X,WANG X,SHI Y P,et al.Chemical constituents of the aerial parts of *Carpesium cernuum*[J].*Journal of Lan Zhou University (Natural Sciences)*,2002,38(4):61-67.
- [7] MARUYAMA M,OMURA S.Carpesiolin from *Carpesium abrotanoides* [J].*Phytochemistry*,1977,16(4):782-783.
- [8] MARUYAMA M,KARUBE A,SATO K.Sesquiterpene lactone from *Carpesium abrotanoides* [J].*Phytochemistry*,1983,22(12):2773-2774.
- [9] KIM M R,KIM C S,HWANG K H,et al.Isolation and structures of guaianolides from *Carpesium macrocephalum*[J].*J Nat Prod*,2002,65(4):583-584.
- [10] KIM M R,SUH B R,KIM J G,et al.Sesquiterpene lactones from *Carpesium triste* var.*manshuricum* [J].*Phytochemistry*,1999,52:113-115.
- [11] CHAOY,CHENG S Y,ZHONG J J.Xanthanolides,germacranolides, and other constituents from *carpesium longifolium* [J].*J Nat Prod*,2003,66:1554-1557.
- [12] CHEN Z W,HU Y Z,WU H H,et al.Synthesis and biological evaluation of flavonoids vasorelaxant agents[J].*Bioorg Med Chem Lett*,2004(14):3949-3952.
- [13] 李玉平,龚宁,王永宏,等.大花金挖耳愈伤组织诱导与增殖[J].西北植物学报,2006,26(6):1142-1149.
- [14] 宁永成.有机化合物鉴定与有机波谱学[M].2版.北京:科学出版社,2000:364-384.
- [15] 肖崇厚.中药化学[M].上海:上海科学技术出版社,1987:191-250.