

分光光度法测悬浮培养飞廉细胞中总黄酮含量

叶小颖 徐茂军 (浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江杭州 310035)

摘要 [目的] 建立悬浮培养飞廉细胞中总黄酮的含量测定方法。[方法] 采用分光光度法测定悬浮培养飞廉细胞中总黄酮含量。[结果] 芦丁线性范围为0~0.6 ng($r=0.9997$), 平均回收率为100.4%, RSD=1.5%($n=5$)。[结论] 该方法简便、准确, 重复性良好, 可作为测定飞廉细胞总黄酮含量的方法。

关键词 飞廉细胞; 黄酮类化合物; 分光光度法

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10945-02

Study on the Determination of Total Flavonoids Content in the Suspended Cells of *Carduus crispus* L. by Spectrophotometry

YE Xiao-ying et al (College of Food Science and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310035)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the determination methods of total flavonoids content in the suspended cells of *Carduus crispus* L. [Method] The content of total flavonoids in the suspended cells of *C. crispus* was determined by spectrophotometry. [Results] The linear range of rutin was 0-0.6 ng ($r=0.9997$), the average recovery was 100.4% and RSD was 1.5% ($n=5$). [Conclusion] This method was simple and accurate and it had good reproducibility. It could be taken as the determination method of total flavonoids content in *C. crispus*.

Key words Cells in *Carduus crispus* L.; Flavonoid; Spectrophotometry

飞廉 (*Carduus crispus* L.) 又称飞轻、红花草、飞帘等, 是菊科飞廉属二年生草本, 以全草或根入药, 广泛分布于我国各地, 生长于田边、路旁及荒野等处。《神农本草经》上记载其性“味苦, 平”, 以及《西藏常用中草药》记载其具祛风、清热、利湿、凉血散瘀之功效, 主治风热感冒、头风眩晕、风热痹痛、皮肤刺痒、尿路感染、乳糜尿、尿血、带下、跌打瘀肿、疮疡肿毒、烫火伤等^[1-2]。关于飞廉的相关分析鲜有报道, 对于悬浮培养的飞廉细胞总黄酮的测定更是未有报道, 为此, 笔者采用硝酸铝显色, 建立了悬浮培养飞廉细胞中总黄酮含量的光谱分析方法, 现介绍如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 仪器岛津 UV-2550 紫外可见分光光度计; KQ200DB 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 3K30 冷冻离心机(Sigma)。试剂芦丁(Sigma); 无水乙醇、甲醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。MS 液体优化培养基: 每升 MS 液体培养基含 4.3 g MS 盐、 1×10^{-5} mol 萘乙酸、 2×10^{-6} mol 6-(苄胺基) 嘌呤和 30 g 蔗糖。用浓度 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 5.8, 121 °C 湿热灭菌 20 min。

1.2 方 法

1.2.1 飞廉悬浮细胞的培养。飞廉悬浮细胞(浙江工商大学食品与生物工程学院细胞培养实验室提供), 在 25 °C, 100 r/min 的恒温摇床振荡培养, 每 10 d 进行传代接种, 接种量为 50 ml 培养液接种细胞 3 g(湿重)。

1.2.2 芦丁标准溶液的制备。准确称取芦丁标准品 10 ng, 置于 10 ml 容量瓶中, 加浓度 30% 的乙醇溶解(水浴微热)并定容至刻度, 摇匀, 从中准确吸取 2.5 ml, 用浓度 30% 的乙醇定容至 25 ml 容量瓶中, 得到浓度为 0.1 ng/ml 的芦丁标准溶液。

1.2.3 样品溶液的制备。取飞廉悬浮细胞, 抽滤后 60 °C 真空干燥至恒重, 精密称取 0.5 g 飞廉细胞, 至 10 ml 离心管中, 加入 8 ml 甲醇; 超声 1 h, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液; 再加入 8 ml 甲醇, 重复超声提取、离心, 合并上清液, 浓缩

至干; 加甲醇溶解定容至 10 ml 容量瓶, 得样品总黄酮提取液。

1.2.4 显色稳定性试验。准确吸取芦丁标准溶液和样品总黄酮提取液各 3 ml 分别于 0、15、30、45、60 min 测其吸光度。

1.2.5 精密度试验。准确吸取芦丁标准溶液和样品总黄酮提取液各 3 ml, 重复测定 6 次, 研究试验精密度。

1.2.6 重复性试验。取不同生长时间的飞廉悬浮细胞, 制备样品总黄酮提取液, 准确吸取各时间样品总黄酮提取液 3 ml 各 5 份, 测定吸光度, 计算 RSD 值。

1.2.7 加样回收率试验。取已知总黄酮含量的样品提取液 3 ml, 加入芦丁标准品适量, 分别测定吸光度, 分析加样回收率。

1.2.8 标准曲线的绘制和样品含量的测定。分别吸取芦丁标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml 置 25 ml 的容量瓶中, 用浓度 30% 乙醇补充至 12.5 ml, 加入浓度 5% 亚硝酸钠溶液 0.7 ml, 混匀, 放置 5 min, 加入浓度 10% 硝酸铝溶液 0.7 ml, 混匀, 放置 6 min, 加入浓度 1 mol/L 氢氧化钠溶液 5 ml, 混匀, 用浓度 30% 乙醇定容至刻度, 静置 10 min, 以试剂为空白, 于波长 510 nm 处测定吸收度值。取样品总黄酮提取液各 3 ml, 依法测定吸光度^[3-5]。

1.2.9 样品中总黄酮含量计算方法。样品黄酮含量计算公式:

$$X = C \times V_m \times V_1 / V_2$$

式中, X 为黄酮含量 (ng/g), 以芦丁计; C 为根据吸光度得到的样品总黄酮浓度 (ng/ml); m 为处理样品的质量 (g); V 为测吸光度时所稀释的容量瓶体积, 该处为 25 ml; V_1 为样品处理液的总体积 (ml), 该处为 10 ml; V_2 为测定时吸取样品处理液的体积 (ml)。

2 结果与分析

2.1 标准曲线及其回归方程的建立 以吸光度为横坐标, 芦丁标准溶液浓度为纵坐标进行线性回归, 结果表明, 芦丁在 0~0.6 ng 范围内线性良好, 回归方程为 $Y = 0.0905X + 0.00003$ ($r = 0.9997$) (图 1)。

2.2 显色稳定性试验结果 试验结果表明, 芦丁标准品和样品液在 1 h 内稳定性良好, RSD 分别为 0.72% 和 1.46%。

作者简介 叶小颖 (1983-), 女, 浙江金华人, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物合成。

收稿日期 2008-06-18

2.3 精密度试验结果 试验结果表明,精密度试验芦丁标准品溶液和样品总黄酮提取液吸光度值基本不变,RSD 分别为0.25%和0.33%,表明仪器精密度良好。

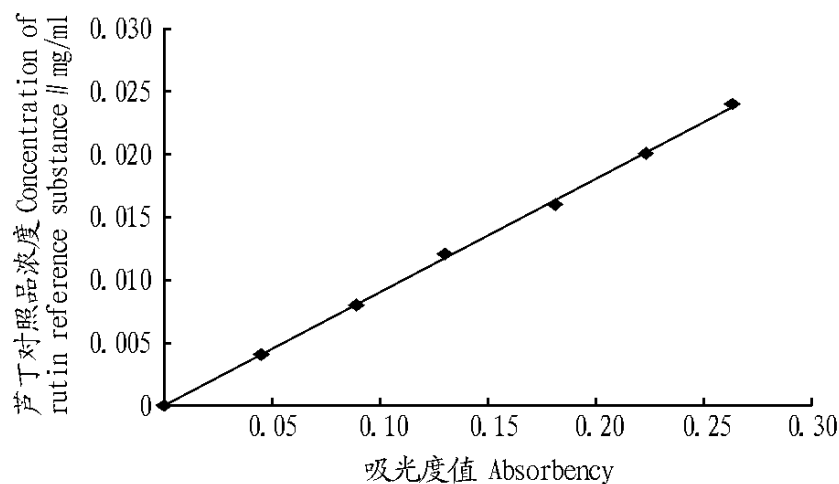


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 The standard curve of rutin

2.4 重复性试验结果 重复性试验结果表明,该方法重复性良好(表1)。

表1 重复性试验结果

Table 1 The repetitive experiment results

时间 Time	吸光度 Absorbency					平均值 Mean	SD %	RSD %
	1	2	3	4	5			
0	0.273	0.271	0.270	0.270	0.271	0.271	0.12	0.44
4	0.185	0.187	0.184	0.185	0.183	0.185	0.15	0.81
8	0.218	0.218	0.217	0.218	0.217	0.218	0.05	0.23
12	0.346	0.346	0.348	0.350	0.350	0.348	0.20	0.57
16	0.356	0.358	0.359	0.359	0.362	0.359	0.22	0.61

2.5 加样回收率试验结果 试验结果见表2,计算得加样平均回收率为100.4%,RSD 为1.5%。

2.6 测定结果 取不同培养时间的飞廉悬浮细胞,依试验方法测定,计算得飞廉细胞的总黄酮含量见图2。在培养14d左右,其总黄酮含量达最高。

3 结论

试验以芦丁为标准品,利用硝酸铝显色法对悬浮培养飞

(上接第10935页)

从表3中数据的直观分析可知,各因素对甘草酸提取的影响大小为A>B>D>C,即提取时间>提取剂用量>提取剂配比>提取温度。通过方差分析表明,A、B具有显著性差异,C、D对结果无显著的影响。选用收率作为考察指标优化甘草酸的提取工艺,最佳工艺条件为A₂B₂C₃D₃,即提取时间为7h,提取剂用量为8倍,提取温度为85℃,提取溶剂的配比为含氨0.5%的60%乙醇溶液。

2.3 验证试验 由于该组合未在正交表中列出,故以该组合进一步做平行试验,试验数据见表4。试验表明,该工艺条件有较高的重现性与可靠性。

表4 验证试验

Table 4 The verification test

试验号 Test code	A	B	C	D	收率 Yield %
1	2	2	3	3	10.80
2	2	2	3	3	10.82
3	2	2	3	3	10.85

表2 加样回收率试验结果

Table 2 The results of recovery rate test of added sample

样品 Samples	样品量 Sample quantity ng	标准品量 Quantity of stand- ard substance ng	测定值 Determined value ng	回收率 Recovery rate %
1	0.085 3	0.1	0.184	98.70
2	0.085 3	0.2	0.286	100.35
3	0.085 3	0.3	0.392	102.23
4	0.085 3	0.4	0.482	99.18
5	0.085 3	0.5	0.593	101.54

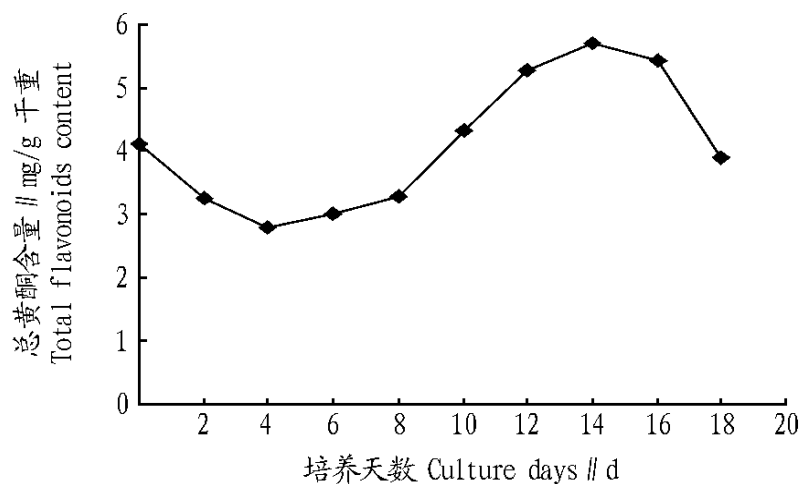


图2 飞廉悬浮细胞中总黄酮含量的变化曲线

Fig.2 The change curve of total flavonoids content in the suspended cells of *Carduus crispus* L.

廉细胞总黄酮含量进行测定,稳定性及重现性良好,加样回收率高,达到了准确测定飞廉悬浮细胞中总黄酮含量的要求。

参考文献

- [1] 张庆英,王学英,营海平,等.飞廉化学成分研究[J].中国中药杂志,2001,26(12):837-840.
- [2] 张庆英.生藤和飞廉化学成分及生物活性研究[D].北京:北京医科大学,2000.
- [3] 苏东林,单杨,李高阳.紫外分光光度法测定柑桔皮中总黄酮的含量[J].食品研究与开发,2007,28(8):124-128.
- [4] 张岩,曹国杰,张燕,等.黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(1):154-158.
- [5] 李玉平,王永宏,易晓华,等.大花金挖耳细胞培养物中总黄酮含量的检测[J].安徽农业科学,2007,35(29):9160-9161.

3 结论

以含氨0.5%的60%乙醇溶剂作为提取剂,提取温度为85℃,提取时间为7h,提取剂用量为甘草重量8倍,在此工艺条件下,甘草酸的提取率最高,达10.85%。

参考文献

- [1] 殷斌烈,阎秀菊,王升.以阳离子交换树脂降低甘草浸膏灰分的研究[J].中草药,1984,15(1):11.
- [2] 高章圈,张建新,徐铎,等.甘草酸抗炎、抗病毒及免疫调节作用研究进展[J].解放军药学报,1999,15(5):27-28.
- [3] JEONG H G, YOU H J, PARKS J, et al. Hepatoprotective effects of 18beta glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression[J]. Pharmacol Res, 2002, 46(3):221-227.
- [4] ZHANG Y H, KATO M, ISHIBE K, et al. Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes[J]. Cell Immunol, 1995, 162(1):97-104.
- [5] TANAHASHI T, MUNE T, MORITA H, et al. Glycyrrhizic acid suppresses type 2 11beta hydroxysteroid dehydrogenase expression in vivo[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 80(4/5):441-447.
- [6] 贾道全,张正,罗成福,等.甘草甜素逆转肝纤维化及早期肝硬化的作用探讨[J].中华消化杂志,2001,21(12):754-756.
- [7] 蔡瑜,沈锡中,王吉耀.甘草酸对大鼠肝纤维化过程中肝组织基因表达的影响[J].中华医学杂志,2003,83(13):1122-1125.