

# 长白山野生膜荚黄芪不定根总黄酮积累规律研究(I)

秦嘉泽, 全雪丽, 田海丽, 吴松权

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘 要:**以膜荚黄芪不定根为试材,测定了其不同生长时期不定根的生物量、总黄酮含量和体外抗氧化活性。结果表明:不定根生物量呈“S”型曲线变化,总黄酮的积累有2个波峰,抗氧化活性有1个波峰;生长至40 d时,生物量、总黄酮含量和自由基清除率最高,分别为0.513 g、2.048 mg/g和92.29%,均显著高于其它时期;因此,确定40 d为收获总黄酮的最佳时期。

**关键词:**野生黄芪;不定根;总黄酮;抗氧化活性

**中图分类号:**R 284.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2014)16-0158-03

黄芪为豆科黄芪属多年生草本植物。其味甘、性微温,有益胃固表、利水消肿、脱毒生肌、补中益气之功效<sup>[1]</sup>。我国药典(2010版)规定,正品黄芪为黄芪属植物膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge)和蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao)的干燥根<sup>[2]</sup>。黄芪的有效成分主要为黄芪皂苷、多糖、黄酮类<sup>[3]</sup>。其化学成分决定了药理

作用,以往多数学者集中于皂苷和多糖的研究,近年来黄酮类的研究也受到关注。黄芪总黄酮无毒无害,对人类的肿瘤、衰老、心血管等疾病的治疗和预防具有重要作用<sup>[4]</sup>,其抗氧化作用明显优于黄芪皂苷,是一种天然的抗氧化剂<sup>[5]</sup>。

除了药用外,黄芪还广泛应用于食品、保健、化妆品等工业生产中,市场需求量日渐增多<sup>[6]</sup>。目前,随着野生资源锐减,只能依靠人工栽培来满足人类需求。不过由于多种原因导致栽培黄芪总黄酮明显低于野生黄芪<sup>[7]</sup>。不定根培养是植物组织培养技术之一,属于分化水平较高的植物器官培养,可以人为地调控其生长发育和环境条件,生长周期短,可排除病虫害的侵袭,有利于重要次生代谢产物的标准化、工业化生产<sup>[8]</sup>。Wu等<sup>[9]</sup>

**第一作者简介:**秦嘉泽(1991-),女,吉林四平人,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail:qinjiaze123@sina.com.

**通讯作者:**吴松权(1972-),男,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事植物种质等研究工作。E-mail:arswsq@ybu.edu.cn.

**基金项目:**吉林省科技厅资助项目(201115228)

**收稿日期:**2014-04-25

## Analysis of Content of Baicalin and Activity of Phenylalanine Ammonia Lyase from Cell Suspension Cultures of *Scutellaria baicalensis*

ZHANG Dong-xiang, ZHAO Jing, LIU Li-jie, JIAO Zhan-zhan, ZHANG Ling-ang, BI Yu  
(College of Life Science and Agro-forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

**Abstract:** Using cell suspension cultures of *Scutellaria baicalensis* as materials, the change of baicalin contents and activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from cell suspension cultures of *Scutellaria baicalensis* were analyzed in this paper. The effects of plant hormone proportions on biomass accumulation of the cell suspension cultures were studied by uniform design. The results showed that the growth curves of the cell suspension cultures exhibited 'S' curve, and biomass accumulation of the cell suspension cultures matched with change of baicalin contents. There was correlation between PAL activities and change of baicalin contents. The most suitable hormone ratio to biomass accumulation of the suspension cultures was MS medium added with 6-BA 0.75 mg/L, NAA 0.5 mg/L, KT 1.5 mg/L by uniform design method.

**Key words:** *Scutellaria baicalensis*; suspension culture; baicalin; PAL; uniform design

研究表明,膜荚黄芪不定根与栽培的膜荚黄芪总黄酮含量无显著差异,可代替栽培黄芪生产总黄酮。

该研究以长白山野生膜荚黄芪为试材诱导和培养不定根,测定不定根生长过程中生物量、总黄酮含量和抗氧化活性,以便确定总黄酮含量最高时期,为探明膜荚黄芪不定根总黄酮积累规律和提高总黄酮含量奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试野生膜荚黄芪种子采自吉林省长白山。芦丁对照品购于上海融禾医药科技发展有限公司;二苯代苦味酰基自由基(DPPH)购于 Sigma 公司;其它生化试剂均为分析纯购于国内各公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 长白山野生黄芪不定根的培养 参照 Wu 等<sup>[9]</sup>方法,诱导培养基:MS+IBA 3.0 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L。增殖培养基:B5+IBA 2.0 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L、pH 5.8。培养条件为(25±2)℃,相对湿度为 70%,暗培养。仔细观察增殖培养过程,待不定根生长至 20 d 时进行第 1 次采样,之后每隔 5 d 采样 1 次,共 6 次。每个处理 3 个培养皿,50℃烘干至恒重,称其干重为生物量,重复 2 次。

1.2.2 标准曲线的绘制 精密称取芦丁对照品 1 mg,用 30%乙醇溶液溶解后定容于 10 mL 的容量瓶中,摇匀制成标准溶液。分别准确抽取上述芦丁标准液 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,分别加入 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10%硝酸铝溶液 0.3 mL 放置 6 min,加入 1 mol/L 的氢氧化钠溶液 4 mL,分别用 30%的乙醇溶液定容至 10 mL,放置 15 min,在 510 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标绘制标准曲线, $Y=11.8929X+0.0776$ , $R^2=0.9982$ 。

1.2.3 样品溶液的制备 取 0.1 g 不定根用液氮充分研磨后,加入 1 mL 无水乙醇,100 r/min 振荡萃取 24 h。10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液加入无水乙醇定容至 1 mL 容量瓶中备用。精密吸取 0.6 mL 的样品提取液,加入 0.3 mL 无水乙醇,得到终浓度为 0.067 g/mL 的抗氧化活性测试液,剩余 0.4 mL 用于总黄酮的测定。

### 1.3 项目测定

1.3.1 总黄酮的测定 用 0.4 mL 样品溶液,参照 1.2.2 方法,依法测定吸光度,按照标准曲线方程,计算各样品溶液中总黄酮含量。

1.3.2 抗氧化活性的测定 参照 Kilani 等<sup>[10]</sup>准确抽取 0.2 mL 抗氧化活性测试液,加入 DPPH(0.2 mmol/L)溶

液 0.4 mL,在室温下暗反应 30 min 后于波长 517 nm 处测定吸光度。DPPH 自由基清除率: $S(\%)=[1-(A_i-A_j)/A_o]\times 100\%$ ;式中: $A_o$ 为 DPPH 溶液加上无水乙醇的吸光值; $A_j$ 为样品液加上无水乙醇的吸光值; $A_i$ 为样品液加上 DPPH 溶液的吸光值。

### 1.4 数据分析

采用 SPSS 19.0 进行显著性检验和多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同生长时期不定根生物量

继代培养 15 d 内不定根生长缓慢,累积的生物量不足以进行总黄酮和抗氧化活性的测定。生长至 20、25、30、35、40、45 d 时的生物量如表 1 所示,20、25、30 d 时快速成倍生长,35 d 时不再生长、进入停滞期,与 40、45 d 相比无显著性差异。该研究中黄芪不定根生长规律与梁玉勇等<sup>[11]</sup>研究结果一致,不定根生物量呈“S”型曲线变化,而且在快速生长时期不定根呈白色,40 d 以后不定根的部分组织开始逐渐褐化。

表 1 不同生长时期不定根的生物量

Table 1 Biomass of adventitious roots at different growth stages

编号 Number	生长期 Growth stage/d	生物量 Biomass/g
1	20	0.138 b
2	25	0.237 b
3	30	0.475 a
4	35	0.497 a
5	40	0.513 a
6	45	0.529 a

注:不同小写字母表示处理间差异达到显著水平。

Note: The different letters within the same column mean significant difference.

### 2.2 不同生长时期不定根总黄酮含量和抗氧化活性分析

由图 1 可知,不同生长时期对总黄酮的积累有重要影响。总黄酮含量在不定根快速生长和停滞期都呈现出先上升后下降的趋势,2 次波峰分别出现在 25 d 和 40 d,且停滞期 40 d 的含量(2.048 mg/g)显著高于

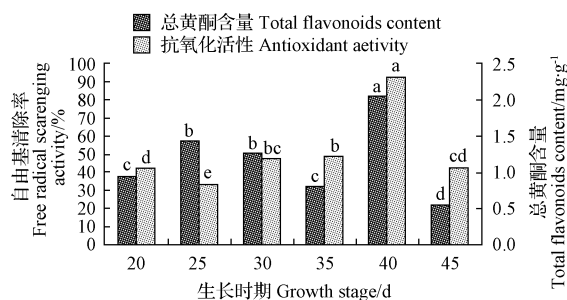


图 1 不同生长时期不定根的总黄酮含量与抗氧化活性

Fig. 1 Total flavonoids contents and antioxidant activity of adventitious roots at different growth stages

快速生长期(1.428 mg/g)。说明总黄酮的积累与不定根的生长发育紧密相关,具有时空表达差异性。生长至45 d时,总黄酮含量由最高值急剧下降至最低值,可能是由于此时不定根已部分褐化,组织的结构和生长受到了破坏,使新陈代谢活动减慢甚至终止,最终导致原有的黄酮类化合物遭到降解或破坏。

总黄酮的最主要的活性为抗氧化活性,为此以自由基清除率为代表调查了不定根生长过程中的抗氧化活性。由图1可知,自由基清除率总体呈先上升后下降趋势,与总黄酮含量成正相关,40 d时其清除自由基能力最高。但是在25 d时清除自由基能力最差,且与总黄酮含量不相关。这种现象在黄芩、野菊花、葛根等药用植物生长过程中也存在<sup>[12]</sup>。分析其原因可能是由于不同生长时期野生黄芪不定根中黄酮种类、结构、成分、含量<sup>[13-15]</sup>以及清除自由基的能力不同,也可能是该试验所制备的样品提取液中存在除黄酮类化合物以外的其它多酚类抗氧化物质<sup>[16]</sup>,也不能完全排除样品提取液的量少所引起的干扰。总之,培养40 d时不定根中总黄酮含量最高且抗氧化活性最强。

### 3 结论

该研究结果表明,不定根生物量呈“S”型曲线变化,总黄酮的积累有2个波峰,抗氧化活性有1个波峰。生长至40 d时,生物量、总黄酮含量和自由基清除率最高,分别为0.513 g、2.048 mg/g和92.29%,均显著高于其它时期。因此,长白山野生膜荚黄芪不定根生长过程中总黄酮的积累受到发育水平的调控,收获总黄酮的最佳时期为生长40 d的不定根。

#### 参考文献

[1] 谢建伟,黄兰芳,贺云彪,等.黄芪中黄酮类化合物色谱指纹图谱的光谱相关色谱分析[J].光谱实验室,2010,27(2):553-556.

- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版[M].1部.北京:中国医药科技出版社,2010.
- [3] 韩燕.中药黄芪的研究概况[J].河南中医学院学报,2003,18(6):86.
- [4] 杨映雪,陈建业,王亚平.黄芪总黄酮的抗氧化作用[J].川北医学院学报,2007,22(6):606-608.
- [5] 汪德清,沈文梅,田亚平,等.黄芪的三种提取成分对氧自由基作用的影响[J].中国药理学通报,1994,10(2):129-132.
- [6] 郑德勇,安鑫南.竹叶提取物清除DPPH自由基的测定方法[J].福建农林大学学报(自然科学版),2005,34(1):59-62.
- [7] 张庆芝,吴晓俊,刘涤,等.影响黄芪有效成分含量的因子的研究[J].中草药,2002,33(4):314-315.
- [8] Murthy H N, Hahn E J, Paek K Y. Adventitious roots and secondary metabolism[J]. Chin J Biotech, 2008, 24(5): 711-716.
- [9] Wu S Q, Lian M L, Gao R, et al. Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus* [J]. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2011, 47(6): 719-724.
- [10] Kilani S, Ammar R B, Bouhlel I, et al. Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers [J]. Environ. Toxicol. Phar, 2005, 20: 478-484.
- [11] 梁玉勇,尹双双,左北梅,等.太子参不定根组织培养的研究[J].中国中药杂志,2012,37(24):3803-3807.
- [12] 杨利军,田迪英.11种中草药抗氧化活性与黄酮含量相关性研究[J].食品工业科技,2008,29(1):119-123.
- [13] 马晓丰,田晓明,陈英杰,等.蒙古黄芪中黄酮类成分的研究[J].中草药,2005,36(9):1293-1296.
- [14] 王海敏,虞海霞,董蕊,等.苕子蜜总酚酸和总黄酮含量测定及抗氧化活性的研究[J].食品科学,2010,31(1):54-57.
- [15] 黄池宝,罗宗铭,宾丽英,等.黄酮类化合物抗氧化性与其结构关系的研究[J].广东工业大学学报,2000,17(2):71-74.
- [16] 张颖丽,刘男,刘爽,等.不同生长年限栽植膜荚黄芪中黄酮类成分的比较研究[J].延边大学医学学报,2011,34(1):34-37.
- [17] Kahkonen M P, Hopia A I, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 4076-4082.

## Study on the Accumulation Pattern of Total Flavonoids for Adventitious Roots of Wild *Astragalus membranaceus* in Changbai Mountain

QIN Jia-ze, QUAN Xue-li, TIAN Hai-li, WU Song-quan  
(Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

**Abstract:** Taking the adventitious roots of wild *Astragalus membranaceus* in Changbai Mountain as materials, the biomass of adventitious roots, total flavonoids content and antioxidant activity in vitro at the different stages of growth were measured in this study. The results showed that the growth curve of adventitious roots was “S” type, there were two peak stages for the accumulation of total flavonoids but only one peak for the antioxidant activity. Biomass, total flavonoids content and free radical scavenging rate activity were all the highest when roots grew to 40 days, the values were 0.513 g, 2.048 mg/g and 92.29%, respectively. Therefore, 40 days were the best harvesting stage for total flavonoids.

**Key words:** wild *Astragalus membranaceus*; adventitious roots; total flavonoids; antioxidant activity