

秦岭太白米中黄酮类成分的研究

邵囡囡, 杨吉安*, 刘建军, 王润丰, 司国臣, 孙红梅

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:将太白米鳞茎及组织培养诱导的愈伤组织、腋芽和不定芽的提取物进行紫外可见光光谱分析和高效液相色谱分析。结果表明,通过组织培养获得的愈伤组织、腋芽和不定芽中总黄酮的含量分别为 12.6、8.2、9.2 mg · g⁻¹,其中愈伤组织中的含量与鳞茎 12.9 mg · g⁻¹无显著差异,为愈伤组织代替太白米鳞茎入药提供了一定的依据;太白米的鳞茎及愈伤组织、腋芽、不定芽中均不含有芦丁、槲皮素和儿茶素,含有黄芩素;提取物中黄芩素的含量差别明显,愈伤组织、腋芽、不定芽中黄芩素的含量基本相同,但约为鳞茎的 1/2。

关键词:太白米;鳞茎;愈伤组织;腋芽;不定芽;黄酮;吸光度;色谱分析

中图分类号: S567.239 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7461(2011)05-0166-04

Component Analysis of Flavonoids from *Notholirion hyacinthinum* Srom Qinling Mountains

SHAO Nan-nan , YANG Ji-an* , LIU Jian-jun, WANG Rui-feng, SI Guo-chen, SUN Hong-mei

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Contents of flavonoids contained in the extracts of callus, axillary and adventitious buds of *Notholirion hyacinthinum* were measured by UV-visible spectral analysis and HPLC analysis as 12.6 mg · g⁻¹, 8.2 mg · g⁻¹, 9.2 mg · g⁻¹, respectively. No significant differences were found between the contents of flavonoids in callus (12.6) and bulbs (12.9), indicating that the callus may substitute for bulbs for officinal. Baicalein was found both in bulbs and callus, axillary and adventitious buds. Rutin, quercetin and catechin did not detected in both. Contents of baicalein in callus, axillary and adventitious buds were similar, about half of that in bulbs.

Key words: *Notholirion hyacinthinum*; bulbule; callus; bud; adventitious bud; flavone; absorbency; chromatography

太白米又名假百合 (*Notholirion bulbuliferum*), 属于百合科 (Liliaceae) 假百合属 (*Notholirion*)^[1] 植物, 主要产于我国秦岭与西南高山地区, 喜阴, 多在冷杉、松树林下或杂草中生长^[2-3]。太白米为名贵中草药, 与其他药物配伍可用于治疗胃癌、食道癌、胃溃疡和慢性乙肝等疾病。近年来由于人为破坏、自身繁殖缓慢, 已被列为太白山自然保护区珍稀保护植物^[4]。有关太白米化学成分的研究较少, 周乐^[5]等从大鳞茎中分离得到 4 个甾体生物碱苷, 初步确定太白米鳞茎中含有黄酮类化合物。黄酮类

化合物是一类多酚类物质, 具有广泛的生物活性和较高的药用价值, 是植物抗病虫草害的重要成分^[6-7]。为此对太白米药材中黄酮类成分进行系统的研究。为了检测太白米诱导物愈伤组织、腋芽、不定芽中的黄酮类有效成分与野生种的区别, 探讨太白米诱导物入药的可能性, 本试验对太白米小鳞茎及其诱导物愈伤组织、腋芽和不定芽中的黄酮类成分及含量进行了分析研究, 为充分合理利用这一濒危珍贵中药材提供理论依据。

收稿日期: 2010-04-05 修回日期: 2010-06-24

基金项目: 国家林业公益性行业专项: 秦岭林药资源保护及开发利用技术研究 (200904004)。

作者简介: 邵囡囡, 女, 在读硕士, 研究方向: 森林培育。

* 通讯作者: 杨吉安, 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事森林培育及食品检测的教学与研究。E-mail: yangjian992001@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料与设备

试验材料是 2009 年 7、8 月采于陕西省太白县咀头镇方才关村的太白米栽培基地,鳞茎于 4℃冰箱保存。小鳞茎通过 MS 培养基在一定的植物激素配置条件下诱导得到的愈伤组织、腋芽和不定芽。

化学试剂均为分析纯,芦丁标品购于中国药品生物制品检定所。试验仪器包括 KQ-500DE 型数控超声波清洗器、UV-3802 型紫外可见分光光度计、SFHB-3 循环水多用真空泵、旋转蒸发仪、电风热干燥箱和人工气候箱。

1.2 总黄酮含量测定

1.2.1 总黄酮的提取 取适量去壳的太白米鳞茎和诱导的愈伤组织、腋芽、不定芽,于 65℃干燥箱中烘 8 h,用研钵粉碎成粉末,密封保存于 4℃冰箱中。分别称取上述干粉各 0.5 g,加 40 mL 70%乙醇浸泡 16 h,50℃、80 w 超声处理 30 min,真空抽滤直至无滤液滴出。收集滤渣加 70%乙醇 40 mL,再次超声处理 30 min,抽滤,合并 2 次滤液。将滤液减压蒸发至无乙醇味,用 60%乙醇定容于 50 mL 容量瓶,4℃冰箱中保存备用。

1.2.2 标准曲线的制作及含量测定 精确称取芦丁标品 10 mg,用 60%乙醇溶液定溶于 100 mL 容量瓶中(0.1 mg·mL⁻¹),制成标准储备液。分别量取 0、1、2、3、4、5 mL 储备液于 6 个试管中,依次加入 5、4、3、2、1、0 mL60%乙醇。各试管均加入 5%亚硝酸钠 0.3 mL 后静置 5 min,再加入 10%硝酸铝 0.3 mL 后静置 5 min,最后加入 4%氢氧化钠 4 mL^[8],加蒸馏水至 10 mL,放置 15 min,510 nm 比色。依据吸光度作标准曲线和回归方程。

运用一元线性回归法得到以下吸光度(x)与芦丁浓度(y)之间回归方程: $y=0.092\ 7x-0.000\ 02$

表 2 太白米鳞茎、愈伤组织、腋芽和不定芽的总黄酮含量($\bar{x}\pm s,n=3$)

材料	吸光度			平均值	黄酮含量/ (mg·g ⁻¹)
	1	2	3		
鳞茎	0.140 0	0.140 0	0.141 0	0.140 3±0.000 3	12.986±0.000 3
愈伤	0.136 0	0.136 0	0.137 0	0.136 3±0.000 3	12.615±0.000 3
腋芽	0.088 0	0.089 0	0.089 0	0.088 7±.000 3	8.202±0.000 3
不定芽	0.099 0	0.099 0	0.100 0	0.099 3±0.000 3	9.185±0.000 3

经 SPSS19.0 分析得出每个材料组内的数据差异极不显著, $P<0.01$,材料组间的数据差异显著, $P<0.05$ 。试验表明,通过组织培养获得的愈伤、腋芽

$R^2=0.999\ 9$ 。

1.3 总黄酮成分分析

1.3.1 样品处理 分别称取鳞茎、愈伤、腋芽和不定芽的干粉 1 g,加入 80 mL70%乙醇浸泡 16 h,用上述含量测定的方法提取,将提取液于烘箱中烘成粉末备用。称取 10 mg 烘干后所得太白米提取物粉末于三角瓶中,加入 5 mL 甲醇,溶解后定容在 25 mL 容量瓶备用,取 1 μL 测定保留时间。

1.3.2 标品处理 分别称取 5 mg 的芦丁、槲皮素、儿茶素、黄岑素标品,用甲醇溶解定容在 50 mL 的容量瓶中,分别吸取 4 种标品溶液各 2 mL 混合均匀,分别取 1 μL 测定上述 4 种标品和一个混合标品的保留时间。

1.3.3 色谱条件^[9] 色谱柱,Polaris C18(2.0 m×100 mm,3 μm);流动相 A,0.1 mol·L⁻¹ HAc;流动相 B,乙腈;按表 1 的梯度洗脱,流速 0.3 mL·min⁻¹;柱温 45℃,理论塔板数按槲皮素计算不低于 3 000。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program		
时间/min	流动相 A	流动相 B
0.00—5.00	90%~70%	10%~30%
5.00—14.00	A : B=70 : 30	
14.00—14.06	70%~0%	30%~100%
14.06—18.00	A : B=0 : 100	
18.00—18.06	0%~90%	100%~10%
18.06—20.00	A : B=90 : 10	

2 结果与分析

2.1 总黄酮含量的比较

用 60%乙醇将 5 mL 提取液定容于 25 mL 容量瓶中,取定容液 5 mL 于 25 mL 容量瓶中,按照标准曲线的制作方法在 510 nm 测定其吸光度。将测定的吸光度值代入回归方程,计算出总黄酮含量(表 2)。

和不定芽中总黄酮的含量与鳞茎相差较大,以愈伤最为相近,腋芽差别最大,这可能与腋芽中含有大量的色素有关,因此通过组织培养获得的植物材料中

黄酮类有效成分的含量与野生种存在一定差别。

2.2 总黄酮成分分析

混合标品和样品在 1.3.3 所示的色谱条件下进样分析得出如下所示色谱图。

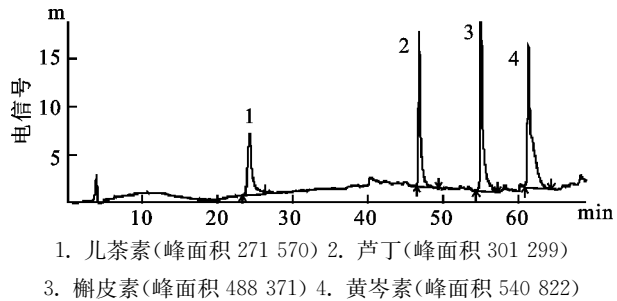


图 1 儿茶素、芦丁、槲皮素和黄芩素的混合标样色谱图与对应峰面积

Fig. 1 HPLC chromatogram of the mixture of standard samples

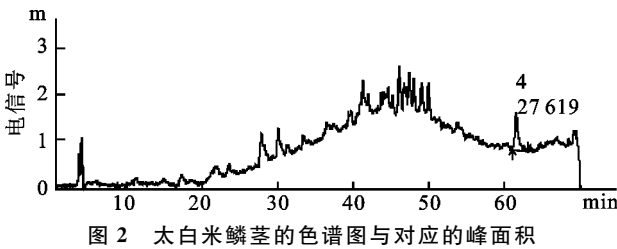


Fig. 2 HPLC chromatogram of bulb extracts

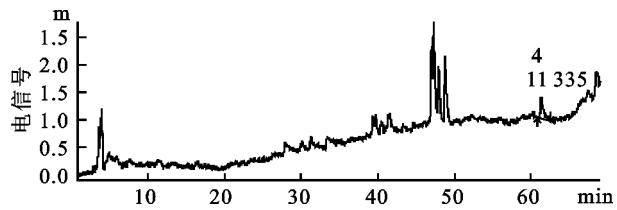


Fig. 3 HPLC chromatogram of callus extracts

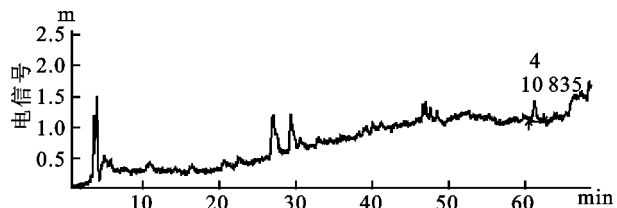


Fig. 4 HPLC chromatogram of axillary bud extracts

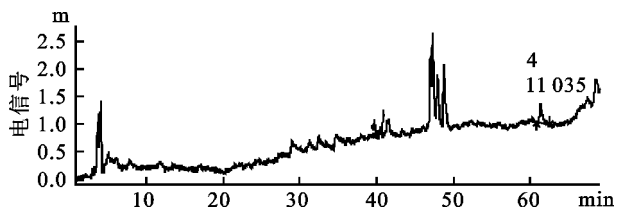


Fig. 5 HPLC chromatogram of adventitious bud extracts

4 个样品的色谱图与混合标品的色谱图相对比可以看出,太白米的鳞茎与愈伤组织、腋芽和不定芽的色谱图上没有与标品中芦丁、槲皮素和儿茶素相

对应的保留时间,只有与黄芩素相对应的保留时间,说明上述 4 个样品均不含有芦丁、槲皮素和儿茶素这 3 类黄酮类物质,含有黄芩素。

2.3 黄酮类各成分含量

2.3.1 进样精密密度试验 精密吸取同一浓度标品溶液 2 μ L,连续进样 5 次,测定峰面积。计算得芦丁、儿茶素、槲皮素和黄芩素的 RSD (相对标准偏差)^[10]分别为 1.2%、1.4%、1.1%和 0.9%,表明进样精密密度良好。

2.3.2 供试品溶液稳定性试验 取同一供试样品溶液,分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 测定,黄芩素含量的 RSD 为 1.9%($n=7$),表明供试样品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.3 样品中黄芩素含量的测定 通过色谱图上相对应的峰面积,采用归一化法计算样品中黄芩素的含量。

表 3 太白米鳞茎、愈伤组织、腋芽和不定芽中黄芩素的含量

Table 3 Contents of baicalein in different materials

材料	峰面积	黄芩素含量/(mg · g ⁻¹)
鳞茎	27 619	5.107
愈伤	11 335	2.096
腋芽	10 835	2.003
不定芽	11 035	2.040

试验表明,通过组织培养获得的愈伤、腋芽和不定芽中黄芩素的含量与鳞茎相差较大,愈伤、腋芽、不定芽中黄芩素含量基本相同。

3 结论与讨论

以芦丁为标品做标准曲线,通过测定太白米鳞茎、愈伤组织、腋芽和不定芽的吸光度计算出总黄酮的含量。太白米的诱导物愈伤组织中总黄酮的含量与鳞茎无显著差异,这与前人的研究相同。这使我们有理由相信愈伤组织代替野生太白米药材是有可能的,为进一步研究太白米组培物愈伤组织中其他活性成分奠定了基础。

太白米的组培物腋芽和不定芽中总黄酮的含量与野生鳞茎之间存在显著差异,因此生产上通过组织培养生产出愈伤组织即可,不必诱导腋芽和不定芽。

太白米的鳞茎及愈伤组织、腋芽、不定芽的色谱图与混合标品的色谱图相对照,发现只有与黄芩素相对应的保留时间,说明太白米中不含有芦丁、儿茶素和槲皮素,含有黄芩素。本试验是首次分析太白米中黄酮类成分,发现其中含有黄芩素,是否含有其他黄酮类物质还需进一步证明。

采用归一化法测定样品中黄芩素的含量,结果表明太白米鳞茎中含量最大,达 5.107 mg · g⁻¹,而

愈伤、腋芽和不定芽中的含量约为鳞茎的 1/2,但三者差别很小。

参考文献:

[1] 刘春生,马泽新. 太白米的性状与显微鉴别[J]. 中药材,1996, 19(8):394-395.

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2004:92-193.

[3] 赵银萍,李莺. 中药太白米的研究进展[J]. 西安联合大学学报, 2002,5 (14):104-106.

ZHAO Y P,LI Y. Research of Chinese medicine-tai bai lily herb [J]. Journal of Xi'an United University,2002,5 (14):104-106. (in Chinese)

[4] 胡本祥,王西芳,李秋云,等. 太白米的生物学研究之一须根、叶的组织构造[J]. 陕西中医学院学报,1997,20(4):1-2.

[5] 周乐,董旭俊,赵海双,等. 太白米中的甾体生物碱苷[J]. 西北植物学报,2005,25(6):1158-1162.

ZHOU L,DONG X J,ZHAO H S, *et al.* Glycosidal steroidal alkaloids from *Notholirion bulbuliferum*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005,25(6):1158-1162. (in Chinese)

[6] 赵银萍,高志强,董忠民. 濒危中药材太白米组织培养及总黄酮含量测定[J]. 西北植物学报,2010,30 (1):0175-0179.

ZHAO Y P,GAO Z Q,DONG Z M. Tissue culture and flavone component of endangered Chinese medicinal plant *Notholirion bulbuliferum*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,

2010,30 (1):0175-0179. (in Chinese)

[7] 魏志文,高晓雯,郑维发. 芫花根总黄酮抗肿瘤活性研究[J]. 解放军药学报,2008,24(2):116-120.

WEI Z W,GAO X W,ZHENG W F. Anti-tumor activities of flavonoids form the roots of *Daphne genkwa* [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese Peoples Liberation Army, 2008,24(2): 116-120. (in Chinese)

[8] 牛立新,李章念,李红卷,等. 超声波提取卷丹鳞茎中总黄酮研究[J]. 中药材,2007,30 (1):86.

NIU L X,LI Z N,LI H Q, *et al.* Study on ultrasonic wave ectraction of flavonoids from the bulb of *Lilium lancifolium* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007,30 (1):86. (in Chinese)

[9] 吴波,杜胜蓝,刘文杰. 高效液相色谱法——荧光检测器测定树叶中的黄酮[J]. 分析仪器,2009(4):41.

WU B,DU S L,LIU W J . Determination of flavonoids in tree leaves by HPLC with fluorescence detector [J]. Aalytical Instrumentation,2009(4):41. (in Chinese)

[10] 祝连彩,王伯初,刘火安,等. 高效液相色谱法测定银杏叶提取物中黄酮含量[J]. 重庆大学学报:自然科学版,2006,29 (1): 117.

ZHU L C,WANG B C,LIU H A, *et al.* Quantitative analysis of flavones in the *Ginkgo biloba* extract by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chongqing University: Natural Science Edition,2006,29 (1):117. (in Chinese)

(上接第 130 页)

参考文献:

[1] BEAUFILS R B. Diagnosis and recommendation integrated system (DRIS) [J]. Soil Sci. Bul. ,1973, 1: 32.

[2] 谭正喜. 诊断与施肥建议综合法 (DRIS) 用于枇杷树体营养诊断[J]. 南京农业大学学报, 1989, 12(4): 109-113.

TAN Z X. Application of diagnosis and recommendation integrated system (DRIS) in nutrient diagnosis of loquat [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1989,12 (4): 109-113. (in Chinese)

[3] FALLAHI E,RIGHTTI T L. Use of diagnosis and recommendation integrated system (DRIS) in apple [J]. Hort-science, 1984, 19(3): 116.

[4] GOH K M, MALAKOUTI M J. Preliminary nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium DRIS norms and indices for apple orchards in canterbury[J]. Soi. Sci. Plant Anal, 1992, 23(13/14): 1371-1385.

[5] 中国土壤学会. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业科技出版社,1999: 296-320.

[6] SUMMER M E. Use of the DRIS system in foliar diagnosis of

crops at field level[J]. Common. Soil. Plant Anal. , 1977, 8: 251-268.

[7] 刘红霞,张会民,郭大勇,等. 豫西地区红富士苹果叶片营养诊断[J]. 植物营养与肥料学报,2009,15(2):457-462.

LIU H X, ZHANG H M, GUO D Y, *et al.* Foliar nutrition diagnosis of red Fuji apple in western Henan Province [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science,2009 ,15 (2) : 457 - 462. (in Chinese)

[8] 刘多森,曾志远. 土壤和环境研究中的数学方法与建模[M]. 北京:中国农业出版社,1987: 51 - 55.

[9] NACHTIGALL G R, DECHEN A R. DRIS use on apple orchard nutritional evaluation in response to potassium[J]. Common. Soil Sci. Plant Anal, 2007,38(17/18):2557-2566. (in Chinese)

[10] 陈礼光,陆小靖,蔡月琴,等. 柳杉苗木综合营养诊断 I. 田间 DRIS 图解法[J]. 福建林学院学报, 2005,25(4):318-322.

CHEN L G, LU X J, CAI Y Q, *et al.* Diagnosis and recommendation integrated system of cryptomeria fortunei seedlings I. diagrammatizing method of DRIS in field[J]. Journal of Fujian College of Forestry,2005, 25 (4):318-322. (in Chinese)