

# 甘草愈伤组织培养及其代谢产物甘草酸的研究

杨会琴, 李 敬, 戴翠萍, 崔 娜

(河北经贸大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061)

**摘 要:**以 MS 培养基为基础, 分别以甘草根、胚轴、子叶为外植体进行培养, 考察光照、2,4-D 质量浓度、不同激素组合、pH 等理化因子对愈伤组织生长的影响, 对代谢产物甘草酸进行了 HPLC 的定量测定. 实验表明其中以根的愈伤组织中甘草酸含量最高, 为 70.2 mg/g; 黑暗条件比光照条件更有利于甘草酸合成; 以激素组合为 2,4-D 4.0 mg/L + KT 0.5 mg/L, pH 为 5.4 时甘草酸含量最高, 在此条件下悬浮培养根培养物中甘草酸质量分数为 81.6 mg/g, 比生药增多 51.08%.

**关键词:**甘草; 愈伤组织培养; 甘草酸; HPLC

**中图分类号:**Q 813

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-5854(2006)03-0346-03

甘草是我国的常用中药, 生用泻火解毒、润喉止渴, 用于咽喉肿痛、痈疽疮疡、痰热咳嗽、解药毒及食物中毒. 蜜炙后味甘性温, 具甘温益气、缓急止痛, 用于脾胃虚弱、食少、腹痛便溏、劳倦发热、肺痿咳嗽、心悸脉代、惊痫、筋脉挛急等症. 最近几年发现它具有抗 HIV 作用<sup>[1]</sup>, 成为预防和治疗艾滋病的重要药物研究对象. 甘草的主要成分为甘草酸(甘草甜素)<sup>[2]</sup>, 常以钾盐或钙盐形式存在, 易溶于水.

由于人们破坏性地对野生甘草采挖, 使野生植物几乎灭绝, 故国家对野生群丛进行保护, 大力提倡人工种植甘草. 由于甘草种子发芽率不高和人们对其次生代谢产物的需求, 从而使甘草的组织培养研究和生产具有重要作用. 本文中, 笔者考察不同理化因子对愈伤组织生长和甘草酸含量的影响.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与药品

恒温摇床 HYA(中国科学院武汉科学仪器厂), 立式培养架(自制), 超净工作台 CJJ808(沈阳医疗器械二厂), 酸度计 PHS-25(上海雷磁仪器厂), 高效液相色谱系统 LC-6A(日本岛津).

甲醇(色谱纯, 天津四友生物医学技术有限公司); 36 mg/g 乙醇(分析纯, 沈阳化学试剂厂); 芦丁(中国药品生物制品检定所产品); 胀果甘草外植体采自河北安国东方药城药园内, 胀果甘草根愈伤组织是由胀果甘草种子萌发的无菌苗根诱导、驯化得到的健康无性细胞系.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 培养方法

甘草愈伤组织的继代培养<sup>[3]</sup>: 将根、子叶和胚轴接种于 MS+2,4-D 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 培养基上诱导愈伤组织, 培养在恒温振荡器上(70 r/min, (25±1)℃), 置培养箱中暗培养或在自制培养架上 24 h 光照培养, 两者皆 20 d 继代 1 次.

#### 1.2.2 培养物及生药中甘草酸的提取及检测

甘草酸的提取<sup>[4]</sup>: 将继代培养愈伤组织、根培养物在 60℃ 烘干, 研成细粉. 称取 1 g 粉末用乙醚 5 mL 浸泡数分钟, 倾去乙醚使之挥尽, 残渣中加入 5 mL 甲醇, 于 60℃ 下水浴 2~3 h, 并蒸至甲醇剩下 1 mL 为止<sup>[3]</sup>. 另取甘草生药作为对照. 甘草酸单铵标准品质量浓度为 2 g/L.

#### 1.2.3 甘草酸的检测<sup>[5,6]</sup>

色谱条件为岛津 Shim-Pack ODS 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-醋酸铵(以冰

收稿日期: 2005-10-16; 修回日期: 2005-12-20

作者简介: 杨会琴(1965-), 女, 河北省博野县人, 河北经贸大学副教授, 主要从事天然产物的提取及应用研究.

醋酸调节 pH 为 3.5, 0.01 mol/L) ( $n(\text{乙腈}):n(\text{醋酸铵})=3:7$ ), 流速为 1.00 mL/min, 检测波长为 238 nm (甘草酸的紫外可见吸收  $\lambda_{\max}=238\text{ nm}$ ), 灵敏度为 0.04 AUFS, 柱温为室温, 进样量 10  $\mu\text{L}$ .

标准曲线制备:精密称取甘草酸单铵对照品 10 mg, 加流动相溶解并制成质量浓度为 1 g/L 的对照品溶液. 取上述对照品溶液适量, 加流动相配制成 40, 80, 120, 160, 200 mg/L 的溶液, 按上述色谱条件测定, 以峰面积(A)对溶液浓度(c)进行回归, 方程为  $A=257.551c+18\,662.3$ ,  $r=0.999\,1$ , 基本为通过原点的一条直线, 因此可用外标一点法定量测定.

精密称取提取溶液, 精密进样 10  $\mu\text{L}$ , 按回归方程计算出甘草酸的含量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同外植体愈伤组织培养物甘草酸含量的比较

将愈伤组织烘干, 提取甘草酸并测定, 结果见表 1. 比较 3 种不同来源的愈伤组织产生甘草酸的情况, 其中以根的愈伤组织中甘草酸含量最高, 胚轴来源的愈伤组织中最低, 这可能与不同器官次生代谢的能力不同有关.

### 2.2 不同外植体愈伤组织培养物光照与暗培养条件下甘草酸化合物含量比较(见表 2)

表 1 不同外植体愈伤组织培养物甘草酸含量的比较

| 愈伤组织来源 | 甘草酸/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|--------|---------------------------|
| 根      | 70.2                      |
| 子叶     | 66.0                      |
| 胚轴     | 54.0                      |

表 2 光照对胀果甘草愈伤组织生长及甘草酸形成的影响

| 愈伤组织来源 | 生长状况 |    |    |    |    |   | 甘草酸/(mg·g <sup>-1</sup> ) |      |
|--------|------|----|----|----|----|---|---------------------------|------|
|        | 黑暗   |    |    | 光照 |    |   | 黑暗                        | 光照   |
| 根      | 黄色   | 疏松 | 多  | 黄色 | 硬  | 多 | 71.6                      | 69.8 |
| 子叶     | 黄色   | 疏松 | 多  | 黄色 | 较硬 | 多 | 67.2                      | 61.4 |
| 胚轴     | 黄色   | 疏松 | 较多 | 黄色 | 较硬 | 多 | 54.0                      | 50.4 |

结果表明, 愈伤组织在光照条件下比黑暗条件下生长快, 甘草酸含量在暗条件下要比光照条件下高, 可能光照对甘草酸合成起一定的抑制作用, 因此为得到更多的甘草酸应在黑暗中培养.

### 2.3 不同质量浓度 2,4-D 对胀果甘草愈伤组织诱导的影响

将诱导出的愈伤组织分别继代到 MS 附加不同质量浓度 2,4-D 的培养基上, 1 个月后观察生长状况, 并进行甘草酸的提取及定量分析, 结果见表 3.

结果表明, 随 2,4-D 质量浓度的升高, 愈伤组织生长状况下降, 甘草酸产量却随之升高, 其中以 2,4-D 1.0 mg/L 时生长最好, 以 2,4-D 4.0 mg/L 时愈伤组织中甘草酸含量最高, 高于生药 18.9%.

### 2.4 不同激素组合对胀果甘草愈伤组织生长及甘草酸产生的影响

将诱导出的愈伤组织分别继代到 MS 附加不同激素的培养基上(2,4-D, BA, KT, NAA). 1 个月后观察生长状况, 并进行甘草酸的定量分析, 结果见表 4.

表 3 2,4-D 质量浓度对胀果甘草愈伤组织生长及甘草酸形成的影响

| 2,4-D/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 生长状况     | 甘草酸/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------|----------|---------------------------|
| 0                           | 黄色 疏松 较多 | 47.4                      |
| 1.0                         | 黄色 疏松 多  | 54.0                      |
| 2.0                         | 黄色 硬 少   | 60.6                      |
| 4.0                         | 黄色 硬 少   | 64.2                      |

表 4 不同激素组合对胀果甘草愈伤组织生长及甘草酸形成的影响

| 激素/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 生长状况     | 甘草酸/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|----------|---------------------------|
| 2,4-D 1.0                | 褐色 较硬 少  | 51.0                      |
| 2,4-D 1.0+BA 0.5         | 黄色 疏松 较多 | 54.0                      |
| 2,4-D 4.0+BA 0.5         | 黄色 硬 较少  | 65.4                      |
| 2,4-D 1.0+KT 0.5         | 黄色 疏松 较多 | 76.8                      |
| 2,4-D 4.0+KT 0.5         | 黄色 硬 较少  | 85.3                      |

结果表明, 不同的激素组合对胀果甘草愈伤组织生长及甘草酸含量有不同的影响, 其中以 2,4-D 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 的长势最好, 以 2,4-D 4.0 mg/L + KT 0.5 mg/L 的甘草酸含量最高. 加入 BA 或 KT 后甘草酸含量明显增多, 并且 KT 比 BA 更明显. 实验结果表明愈伤组织的生长状况与甘草酸含量不呈正相关, 这说明胀果甘草愈伤组织生长和甘草酸的积累对激素的要求是不同的, 利于愈伤组织生

长的条件,却不利于甘草酸的形成.因此,利用愈伤组织培养获得甘草酸,可以通过以下途径:首先用MS附加2,4-D 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 的培养基上诱导出愈伤组织,再转入MS附加2,4-D 4.0 mg/L + KT 0.5 mg/L 的培养基上继代培养合成大量甘草酸.

### 2.5 pH值对甘草培养物中甘草酸含量的影响

一般来说,最有利于培养细胞生长的pH值为5~6.实验结果(见表5)表明在pH 4.5~6.4时,细胞培养物中均可测得甘草酸,且以pH 5.4时含量最高,而且在此时甘草愈伤组织生长良好.

### 2.6 悬浮培养下胚果甘草根培养物的生长及甘草酸的合成

取胚果甘草无菌苗根顶端2.5 cm的切段,接种到MS+2,4-D 4.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + 20 g/L 蔗糖,pH 5.4的液体培养基上,每瓶接种10个切段,震荡培养1个月,甘草根切段分化出很多须根,将根培养物取出,测定甘草酸的质量分数达81.6 mg/g,比所有愈伤组织的含量都高,比生药含量高51.08%.说明根比其他器官更易产生甘草酸,离体根悬浮培养易获得较多的甘草酸,但是离体根生长比愈伤组织要慢,如何改进离体根的培养条件需进一步探索.

表5 pH值对甘草根培养物甘草酸含量的影响

| pH  | 甘草酸/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|-----|---------------------------|
| 4.5 | 65.2                      |
| 5.0 | 66.4                      |
| 5.4 | 76.8                      |
| 5.7 | 59.8                      |
| 6.0 | 58.5                      |
| 6.4 | 60.5                      |

### 参考文献:

- [1] 贾国惠,贾世山.甘草中黄酮的药理作用研究进展[J].中国药学杂志,1998,33(9):513.
- [2] 门丽.浅谈中药甘草[J].中国新医药,2004,3(2):96.
- [3] 李俊明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,1992.72.
- [4] 沙世炎.中草药有效成分分析法:上册[M].北京:人民卫生出版社,1982.8690.
- [5] 金永新,要林情,封士兰,等.乌拉尔甘草高效液相指纹图谱的研究[J].中国现代应用药学杂志,2004,21(2):93.
- [6] 张治国,韩献忠,蔡志忠,等.条叶龙胆根培养物中龙胆苦甙的产生和含量[J].植物生理学报,1993,19(1):6670.

## Studies on the Callus Tissue of *Glycyrrhiza inflata* and the Glycyrrhizic Acid Content

YANG Hui-qin, LI Jing, DAI Cui-ping, CUI Na

(College of Bioscience and Project, Hebei Economics and Trade University, Hebei Shijiazhuang 050061, China)

**Abstract:** Root, hypocotyl and cotyledon of *Glycyrrhiza inflata* were cultured on MS medium, the effects of some physico-chemical factors on the induction, culture of callus were also investigated, the content of glycyrrhizic acid in the cultures were showed. The results showed: the glycyrrhizic acid content of root cultures was 70.2 mg/g, obviously higher than that of other culture; the glycyrrhizic acid content was higher in dark than that in light; the glycyrrhizic acid content of root suspended culture was 81.6 mg/g, increase by 51.08% than the crude drug, when hormone association was 2,4-D 4.0 mg/L + KT 0.5 mg/L, pH = 5.4.

**Key words:** *Glycyrrhiza inflata*; callus culture; glycyrrhizic acid; HPLC

(责任编辑 柴 键)