

白花蛇舌草组织培养物多糖的提取与含量测定

李国平<sup>1,2</sup> 杨鹭生<sup>2</sup> 黄群策<sup>1\*</sup>

(1 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南郑州 450052; 2 莆田学院环境与生命科学系, 福建莆田 351100)

摘 要 采用分光光度法测定并比较白花蛇舌草野生植株及其组织培养物中的多糖含量。结果表明, 白花蛇舌草野生植株中的多糖含量为 3.517%、试管苗中的多糖含量为 3.041%、愈伤组织中的多糖含量为 4.825%。白花蛇舌草野生植株与试管苗的多糖含量相当, 愈伤组织中的多糖含量较野生植株的高。为通过细胞大量培养技术提取白花蛇舌草免疫多糖提供科学依据。

关键词 白花蛇舌草 多糖 分光光度法; 组织培养

中图分类号 R286.02 文献标识码 A 文章编号 1007-7731(2007)03-57-02

**Extraction and content determination of polysaccharide in tissue cultures of *Hedyotis diffusa***  
**Li Guoping<sup>1,2</sup> Yang Lusheng<sup>2</sup> Huang Qunce<sup>1\*</sup>** (1 Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; 2 Department of Environment and Life science, Putian University, Putian, Fujian 351100)  
**Abstract** :Object To determine and compare the content of polysaccharides in wild plants and tissue cultures of *Hedyotis diffusa*. Methods Spectrophotometry was used. Results The content of polysaccharides in wild plants from local district, plantlets regenerated on MS basic medium supplemented with BA 3mg/L and NAA 0.01mg/L and calli subcultured on MS basic medium was 3.517%, 3.041% and 4.825% respectively. Conclusion The content of polysaccharides in calli was higher than those in wild plants and plantlets. These works presented scientific principles for the production of immune polysaccharides in *Hedyotis diffusa* by means of mass cell culture technique.  
**Key words** :*Hedyotis diffusa*; polysaccharide; spectrophotometry; tissue culture

白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa*)系茜草科耳草属植物,广泛分布在热带和亚热带地区。临床应用非常广泛,是一种传统的抗肿瘤中药,可广泛应用于治疗各种肿瘤。吴厚铭等首次报道从白花蛇舌草水溶性成分中分离到具有免疫活性的多糖,并对它的结构进行了初步的探讨<sup>[1]</sup>。李瑞、赵浩如等报道从白花蛇舌草中提取出的水溶性粗多糖(H1和H2)能显著抑制小鼠移植性S-180实体瘤的生长,而且H1和H2与环磷酰胺合用,可以明显改善环磷酰胺所致的免疫器官萎缩和造血系统的损伤,多糖为主要抗肿瘤活性成分<sup>[2,3]</sup>。采用植物细胞大规模培养技术、生物转化和生物加工技术,生产高效、特异、毒副作用小的创新型新药成为今后天然药物开发的主攻方向<sup>[4,5]</sup>。我们设想利用组织、细胞培养技术,从白花蛇舌草的培养物中提取纯化活性多糖。为此,开展了该植物细胞组织培养研究<sup>[6]</sup>。本文报道其组织培养物的多糖提取及其含量测定,为通过细胞大量培养技术提取白花蛇舌草免疫多糖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 白花蛇舌草野生植株:采自校园周围,经鉴定为*Hedyotis diffusa*;试管苗:取白花蛇舌草离体叶片,接种在MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 0.01mg/L培养基中,在适宜的培养条件(培养温度25±℃,光照12·d<sup>-1</sup>,光照度1500-2000Lx)下,培养35d左右,以长约3-4cm

的丛生芽苗作为供试材料;愈伤组织:取白花蛇舌草离体叶片,接种在MS+2.4-D 2.0mg/L培养基中,在适宜的培养条件下诱导形成愈伤组织,此愈伤组织在MS基本培养基上继代培养35d,作为供试材料。

1.2 仪器与试剂 752型紫外可见分光光度计;所用试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 白花蛇舌草多糖的提取 取新鲜的白花蛇舌草野生植株200g,水煎煮3次(1.5,1.0,0.5h),抽滤,合并提取液静置12h后,取其上清液减压浓缩,浓缩液以无水乙醇调至乙醇体积浓度为80%,搅拌,静置24h(5℃),沉淀物再分别以无水乙醇、丙酮、乙醚各40ml回流洗涤,得褐色粗多糖粉末,于70℃烘干,密封备用。

1.3.2 溶液的配制 (1)葡萄糖标准液的配制。精确称取105℃干燥至恒重的葡萄糖0.2530g,以蒸馏水溶解,定容至100ml容量瓶中,质量浓度为1.265mg/ml。

(2)蒽酮溶液的配制。精确称取0.2g蒽酮,加100ml浓硫酸,混合摇匀即得(现配现用)。

(3)白花蛇舌草多糖供试液的制备。精确称取干燥至恒重的白花蛇舌草多糖50mg,加少量蒸馏水溶解,定容至100ml容量瓶中。

(4)样品溶液的制备。精密称取各供试材料0.5g,置圆底烧瓶中,以80%乙醇40ml,回流1h,趁热过滤,残渣以

基金项目:福建省自然科学基金计划资助项目(2006J0077);莆田市科技计划项目(2006N17)\*通讯作者。  
作者简介:李国平(1966-),男,副教授,博士生,主要从事离子束植物生物技术研究。 收稿日期:2006-12-18

80% 热乙醇洗涤(8ml × 3), 残渣连同滤纸置于圆底烧瓶中, 以 40ml 蒸馏水, 加热回流提取 1h, 趁热过滤, 残渣用热水洗涤(8ml × 3), 洗液并入滤液中, 冷却后, 定容至 100ml 容量瓶中。

**1.3.3 标准曲线的制备** 分别量取葡萄糖标准液 0.5ml、0.6ml、0.7ml、0.8ml、0.9ml、1.0ml 于 50ml 容量瓶, 以蒸馏水稀释至刻度, 摇匀。分别取 2ml 上述溶液于 10ml 具塞试管中, 以 2ml 蒸馏水作空白, 各自加入 4ml 蒽酮试剂, 立即摇匀, 置沸水浴中加热 8min, 迅速冷却至室温, 于 620 nm 处测定吸光度(A), 以 A 对葡萄糖浓度 C 做回归处理, 得回归方程  $C = 3.218 + 92.69 A$ ,  $r = 0.9909$ 。在 12 - 50 μg/ml 有良好的线性关系。

**1.3.4 换算因子的测定** 取白花蛇舌草多糖供试液 2ml 于 100ml 容量瓶中, 加蒸馏水定容至 100ml, 而后取出 2ml 上述溶液, 按“标准曲线的制备”项下操作测定 A 值, 从回归方程中求出多糖供试液中的葡萄糖浓度, 并按以下公式计算换算因子 f, 测得  $f = 2.526$ 。

$$f = W / (C \times D)$$

式中 W 为多糖的质量(μg); C 为多糖稀释液中的葡萄糖浓度(μg/ml); D 为稀释因素。

**1.3.5 稳定性实验** 取白花蛇舌草多糖供试液, 每隔 1 h 测定 1 次吸光度, 连续在 5 h 内考察其稳定性, 结果表明,  $RSD = 0.17\%$  ( $n = 6$ )。吸光度值在 5 h 内基本保持不变。

**1.3.6 加样回收率的测定** 精密称取白花蛇舌草野生植株 4 份, 各 0.2 g, 分别加入多糖供试液 0.5ml, 1.0ml, 1.5ml, 2.0ml。按样品溶液的制备和含量测定方法操作。计算得平均回收率为 99.24%,  $RSD = 1.97\%$  ( $n = 4$ , 已乘换算因子 f)。

**1.3.7 样品的测定** 量取样品溶液各 1ml, 置具塞试管中, 加水 1ml, 作为供试液, 按“标准曲线的制备”项下操作测定吸光度 A, 求出供试液中的葡萄糖含量, 并按以下公式计算多糖含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = C \times D \times f \times 100 / w$$

(上接 78 页)**3.2 冬耕晒田** 冷浸田一般有冬泡的习惯, 冬泡应改为冬干, 进行冬耕晒田(有的地方叫犁冬晒白), 可改良土壤的耕性和通气透水性, 增加土壤微生物活动, 加速土壤养分的分解。冬耕以后的土堡一定要晒白, 否则第二年就会耕不碎, 耕不烂, 形成许多泥核, 象“水泡饭”一样, 这对水稻生长也很不利。

来不及冬耕而燃料充足的地方, 可适当采用熏土方法。熏土时土堆不能太大, 要善于掌握火候和时间, 土堆太大就不容易熏得均匀, 火势过猛和时间过长, 会把土烧坏, 起不了改土的作用。因此, 要很好掌握火候, 暗火熏土, 不能明火烧土, 将泥土都熏成黑色, 效果最显著; 土熏好以后, 应均匀撒在田面, 使全田肥力一致。

**3.3 增施肥料** 冷浸田一般缺乏磷、钾素和硫, 施用磷肥可以增产, 磷、硫配合施用, 效果更好; 在冷浸田中施用石

灰中 C 供试液中为的葡萄糖浓度(μg/ml); D 为供试液稀释因素; f 为换算因子; W 为供试材料重量(μg)。

**2 结果与结论**

结果测得白花蛇舌草野生植株中的多糖含量为 3.517%、试管苗中的多糖含量为 3.041%、愈伤组织中的多糖含量为 4.825% ( $n = 3$ )。从测定结果看, 白花蛇舌草野生植株与试管苗的多糖含量相当, 愈伤组织中的多糖含量较野生植株和再生植株的高。愈伤组织是建立悬浮细胞培养体系的起始材料, 一般要求其具合成积累次生代谢产物能力强和生长速度快的特点。本研究获得的愈伤组织具较高的多糖含量且生长较快, 这说明可以利用细胞培养技术对白花蛇舌草进行细胞悬浮培养, 从其培养物中提取纯化高含量的活性多糖。植物细胞培养可能是生产这种免疫多糖的另一有效途径。

本文建立了白花蛇舌草多糖提取与含量测定的方法, 此法可有效分离和测定白花蛇舌草组织培养物中免疫多糖含量, 为进行细胞工程生产免疫多糖提供了准确、灵敏、可靠的分析方法。但是, 影响愈伤组织中多糖含量的因素以及培养物中多糖的结构、免疫活性尚待深入研究。

**参考文献**

[1] 吴厚铭, 黄胜余. 白花蛇舌草免疫多糖结构的研究[J]. 有机化学, 1992, 12(4): 428 - 431

[2] Li Rui, Zhao Haoru and Lin Yining. Anti - tumor effect and protective effect on chemotherapeutic damage of water soluble extracts from *Hedyotis diffusa* [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2002, 11(2): 54 - 58

[3] 赵浩如, 李瑞, 林以宁等. 白花蛇舌草不同提取工艺对抗肿瘤活性的影响[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(6): 510 - 513

[4] 王蜀秀, 温远影. 我国利用植物组织和细胞培养产生药用成分的研究概况[J]. 植物学通报, 1995, 12(1): 33 - 37

[5] 李晨东, 胡铁强, 盛长忠等. 细胞培养在获得药用植物有效成分中的研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 7 - 10

[6] 李国平, 杨鹭生. 白花蛇舌草组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 150 (责编 魏 凤)

灰和草木灰, 可中和土壤酸性, 促进有机质的分解, 使土壤 pH 值提高, 有利于亚铁的氧化, 硫化物也较不易溶解, 减轻还原物质的毒害。

冷浸田改善排水条件后, 种植绿肥, 主要是冬种红花草等绿肥。

**3.4 兴修迂回水道** 兴修迂回水道(晒水塘), 提高灌溉水的温度。

**3.5 劈山荫, 增强光照** 劈山荫(3 - 5m 为宜), 增强光照, 避免鸟、兽危害。

**3.6 掺砂入泥, 改善质地** 根据土质情况, 进行掺砂入泥, 改善土质。

经过改良的冷浸田, 过去烂泥状的耕作层, 已变成结构良好、具有红色“鳝血斑”的耕作层, “鳝血斑”是高产稳产水稻土的重要特征, 种植水稻就能高产。(责编 魏 凤)