

甘草悬浮培养细胞与甘草草药、植株中甘草酸的检测

李楠¹, 高广瑞², 魏景芳¹, 李冬杰¹, 刘颖¹, 薛志忠¹

(1. 河北科技大学 生命科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 2. 河北省科技厅, 河北 石家庄 050021)

摘要: 采用不同的萃取剂从甘草的根、茎、叶、草药和甘草悬浮培养细胞中萃取甘草酸。结果表明, 选择含氨 0.5%、浓度为 10% 的乙醇溶液作为萃取剂, 萃取得到的甘草酸粗品含量均高于 50% 乙醇萃取的萃取含量, 检测出在优选甘草悬浮培养细胞中所含的甘草酸铵的含量高于其他材料, 其中通过细胞悬浮培养, 获得的甘草酸铵含量最高可达 160.81 mg/g。

关键词: 甘草悬浮培养细胞; 萃取剂; 甘草酸

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0197-03

Detection of Glycyrrhizic Acid in Glycyrrhizic Suspension Culture Cell and Herbal Medicine, Plant

LI Nan¹, GAO Guang-rui², WEI Jing-fang¹, LI Dong-jie¹,
LIU Ying¹, XUE Zhi-zhong¹

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. The Science and Technology Department of Hebei Province, Shijiazhuang 050021, China)

Abstract: By different extractant, glycyrrhizic acid can be extracted from glycyrrhizic roots, stems, leaves, herbal medicine and Glycyrrhizic suspension culture cells. The crude content of glycyrrhizic acid extracted by 10% ethanol containing 0.5% ammonia was higher than that extracted by 50% ethanol. The results showed the content of inammonium glycyrrhetate optimized glycyrrhizic suspension culture cells were higher than that in other materials. And also by cell suspension culture, the maximum content of glycyrrhizic acid can reach 160.81 mg/g.

Key words: Glycyrrhizic suspension culture cell; Extractant; Glycyrrhizic acid

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), 又名甜草根、粉草根, 为豆科多年生草本植物。甘草中有效成分可分为三萜类化合物和黄酮类化合物^[1]。甘草酸属于三萜类化合物, 具有消炎解毒, 调节肌体免疫力等作用。资料表明, 在甘草草药中含量可达 3.63%~10.06%。近些年来, 许多研究人员都尝试采用不同的途径、方法提高甘草酸的得率。其中, 细胞培养方法受到了较多学者的关注。

本文对从甘草的根、茎、叶、草药和优化甘草悬浮培养细胞中提取甘草酸的萃取剂进行选择, 力求提高甘草酸的得率, 同时, 探讨甘草不同组织部位中甘草酸的含量。

1 材料和方法

1.1 供试材料

新疆乌拉尔甘草(本研究室实验田所种); 甘草草药(药店售); 优选甘草悬浮培养细胞(本实验室筛选的优良细胞株系); 甘草酸标准品(宣州市貳尔塔天然有机化合物信息中心); 氨水、活性炭、乙醇等药品均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 甘草酸的萃取^[2] 依次取 3 年生甘草根、茎、叶和适量草药, 用蒸馏水清洗过后, 分别放入研钵中研磨, 加入 10 mL 萃取剂, 置于 40℃ 恒温水浴

收稿日期: 2007-02-20

基金项目: 河北省科技攻关项目(02245512D)

作者简介: 李楠(1981-), 女, 山东威海人, 硕士, 主要从事药用植物细胞组织培养研究

通讯作者: 魏景芳(1957-), 男, 河北黄骅人, 教授, 主要从事植物细胞工程研究。

30 min, 放入离心机离心 10 min (3 600 r/min), 取出上清液过滤, 活性炭脱色, 4℃冰箱保存, 备用。沉淀用滤纸吸干表面, 加入 20 mL 萃取剂, 摇匀, 将搅拌桨和超声探头插入液面下, 启动搅拌和超声波 10 min, 浸泡 24 h, 放入离心机离心 10 min (3 600 r/min), 回收上清液, 沉淀重复上述步骤一次, 合并上清液, 过滤, 活性炭脱色备用。取上清液进行甘草酸测定。

1.2.2 稀土溶液的配制^[2] 碳酸镧 (相对分子质量 457.8)、碳酸亚铈 (相对分子质量 460.2) 各取 0.4578 g 和 0.4602 g, 分别用浓盐酸定容至 100 mL, 然后各取 10 mL 用去离子水定容至 1 L, 即配成终浓度为 0.1 mmol/L 的镧溶液、0.1 mmol/L 的铈溶液。再用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 HCl 将两溶液 pH 值调至 5.8, 通过细菌过滤器 (0.22 μm 滤膜) 过滤到无菌试剂瓶中保存、备用。

1.2.3 甘草酸单铵盐标准曲线的绘制 依次量取甘草酸单铵盐的标准溶液 100, 200, 300, 400, 500, 600 μL, 加入无菌水, 使终体积达到 1 mL, 充分浑匀。以无菌水做对照, 用紫外分光光度计在 343.7 nm 的紫外光下, 以浓度 (C) 对吸光度 (A) 作图, 建立标准曲线及回归方程。其回归方程为 $Y = 0.074759X$, 相关系数 $r = 0.965580$ 。

1.2.4 甘草细胞的悬浮培养 将甘草细胞悬浮培养 3 d 后加入稀土元素, 镧浓度为 5×10^{-4} mmol/L (即 50 mL 液体培养基中加入 250 μL 镧溶液) 和铈浓度为 5×10^{-4} mmol/L (即 50 mL 液体培养基中加入 250 μL 铈溶液), 在悬浮细胞生长的指数期最高点即 18 d 时收获。

1.3 测定方法

1.3.1 甘草酸的定性鉴别^[3] 样品 植物甘草: 生长 3 年, 根、茎、叶; 甘草草药。步骤: 配制 4% H₂SO₄ 10 mL, 将嫩叶、老叶、侧根、茎研钵研碎, 取若干置于白瓷板上, 加 4% H₂SO₄, 观察颜色变化。

1.3.2 甘草酸的定量检测^[2] 吸取处理的样品液

4 mL, 加入 1 mL 氨水, 振荡混匀, 作为待测样品液。量取甘草酸单铵盐标准品 2 μL, 待测样品液 10 μL, 点于 GF₂₅₄ 硅胶板上。选择 $V(\text{正丁醇}) : V(\text{冰醋酸}) : V(\text{水}) = 4 : 2 : 4$ 作为展开剂, 于 265 nm 的紫外光下观察薄层层析结果, 做样品的定性检验。

定性检验后, 含有甘草酸单铵盐的样品用紫外分光光度计作定量检验。吸取待测样品液 1 mL, 以无菌水作对照, 测样品液的吸光度 (A)。根据标准曲线方程计算出甘草酸单铵盐的含量, 计算公式如下:

甘草酸含量 (mg/g) =

$$\frac{\text{样品吸光度} \times \text{甘草酸单铵盐标准品浓度} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{待测样品质量} \times \text{标准曲线系数} \times \text{标准品衡释倍数}}$$

由标准曲线方程可知, 标准曲线系数为 0.074759, 标准品稀释 5 倍。其中甘草酸单铵盐标准品浓度为 6.6 mg/mL, 待测样品质量为 3 g, 待测甘草悬浮培养细胞样品质量为 1.3 g, 样品稀释倍数为 20 mL。

1.3.3 萃取剂的选择 在相同的条件下, 在甘草酸萃取过程中分别使用 50% 乙醇与含氨 0.5%、浓度为 10% 的乙醇溶液作为萃取剂, 检测甘草酸含量。

2 结果与分析

2.1 甘草酸的定性鉴别

利用 4% H₂SO₄ 对甘草嫩叶、老叶、侧根、茎段及草药、悬浮培养细胞进行甘草酸的定性鉴别, 其结果见表 1。

从试验结果看, 甘草新茎、老茎中均未检测出甘草酸的存在, 而在老叶、侧根、草药均含有甘草酸。说明甘草的不同部位其甘草酸的含量存在着明显的差异, 根据显色反应, 可以初步看出, 甘草酸在老叶、侧根、草药、尤其是悬浮培养细胞中含量较高, 新茎与老茎中含量较低, 通过定性鉴别无法检测出来。

2.2 萃取剂的选择及甘草酸定量检测

在相同的萃取条件下, 分别采用 50% 乙醇和含氨 0.5%、浓度为 10% 的乙醇溶液作为萃取剂, 对样品中的甘草酸进行定量检测, 其结果见表 2。

表 1 甘草酸的定性鉴定

Tab. 1 Qualitative determination of glycyrrhizic acid

样品 Sample	嫩叶 Tender leaf	老叶 Old leaf	新茎 Tender stem	老茎 Old stem	侧根 Lateral root	草药 Herbal medicine	甘草悬浮培养细胞 Glycyrrhizic suspension culture cell
钵中加 H ₂ SO ₄ /滴	10	10	> 10	> 10	10	10	10
现象 Phenomena	浅黄	略显橙黄	无	无	略显橙黄	显橙黄(红)色	显橙黄(红)色

表 2 不同萃取剂对提取的甘草酸铵含量的影响

Tab. 2 Influence of different extractant for the content of ammonium glycyrrhetate					
样品 Sample	50% 乙醇 50% Ethanol		含氨 0.5%、浓度为 10% 的乙醇 10% Ethanol		备注 Remark
	吸光度(A) Absorbency	甘草酸铵 含量/(mg/g) Ammonium glycyrrhetate content	吸光度(A) Absorbency	甘草酸铵 含量/(mg/g) Ammonium glycyrrhetate content	
茎 Stem	0.196	23.07	0.364	42.85	鲜重
草药 Herbal medicine	0.941	110.77	1.071	126.07	干重
叶 Leaf	0.245	28.84	0.410	48.26	鲜重
根 Root	0.190	22.37	0.527	62.03	鲜重
甘草悬浮培养细胞 Glycyrrhizic suspension culture cell	0.412	111.92	0.592	160.81	鲜重

由表 2 结果可知，在相同的条件下，以含氨 0.5%、浓度为 10% 的乙醇溶液作为萃取剂，萃取得到的甘草酸粗品含量均高于常规的 50% 乙醇萃取的萃取含量，平均提高 48%，说明含氨 0.5%、浓度为 10% 的乙醇溶液是一种优良的萃取剂。从甘草不同组织部位中甘草酸的含量看，采用相同的萃取方法，甘草悬浮培养细胞中的甘草酸含量均高于植物甘草的茎、叶、根以及甘草草药。其中悬浮培养细胞，其甘草酸含量可达 160.81 mg/g (FW)，不仅大大超过甘草的植物组织，也高于甘草草药。说明通过对甘草细胞的驯化培养，可以筛选出生长快、次级代谢物含量高而稳定的优良甘草细胞株系。

3 讨论

选择含氨 0.5%、浓度为 10% 的乙醇溶液作为萃取剂，甘草酸成铵盐后水溶性增加，提取的滤液中沉淀很少，可能这是减少甘草酸损失的一个重要原因，从而提高了提取率，此结果与苑可武等^[4]所做的

研究结果一致。甘草悬浮培养细胞中所含的甘草酸铵的含量高于其他材料的原因可能是经过长期驯化培养筛选出生长快、次级代谢物含量高而稳定的优良甘草细胞株系。同时悬浮细胞培养便于操作，在对数生长指数期加入稀土元素，不影响细胞的旺盛分裂，虽然细胞的生物量略减，但其次生代谢作用增强，促进了次生代谢产物成，产生更多的甘草酸。

参考文献：

[1] 王秀兰, 常瑜, 常艳红. 甘草酸提取工艺的研究[J]. 应用科技, 2001, 28(12): 46—48

[2] 刘颖, 魏景芳, 李冬杰, 等. 稀土元素对甘草细胞生长及甘草酸合成的影响[J]. 广西植物, 2006, 26(1): 101—104

[3] 王世润, 张佩玲, 寇丽, 等. 甘草酸的提取工艺及应用[J]. 天津轻工业学院学报, 1999, 1(1): 17—20

[4] 苑可武, 白芳, 杨波, 等. 甘草酸的提取和精制法概述[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(7): 362—364