

不同激素配比对明党参叶片愈伤组织诱导的影响及其总香豆素的含量测定^Δ

步 达*,姚 晓,刘晓艺,李 祥,陈建伟[#](南京中医药大学药学院,南京 210046)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1806-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.28

摘要 目的:考察不同激素配比对明党参叶片愈伤组织诱导的影响;建立测定明党参叶片愈伤组织中总香豆素含量的方法。方法:采用L₉(3⁴)正交试验设计不同激素对明党参叶片愈伤组织的诱导体系;以出愈率和生长状况为指标,考察不同激素配比对愈伤组织诱导的影响。以珊瑚菜内酯为指标性成分,检测波长为268 nm,采用紫外-可见分光光度法测定愈伤组织中总香豆素的含量。结果:以MS培养基+2,4-二氯苯氧乙酸0.5 mg/L+6-糠氨基嘌呤0.2 mg/L+1-萘乙酸1.5 mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0.5 mg/L的激素组合对明党参叶片愈伤组织的诱导效果较好,培养14 d左右的出愈率即达到100%,且生长状况也较好。珊瑚菜内酯的质量浓度在4.06~11.60 μg/L范围内与吸光度呈良好的线性关系($r=0.9948$);平均加样回收率为103.15%,RSD=2.04%($n=6$)。结论:该方法操作简便、快捷,结果准确,可用于明党参叶片愈伤组织中总香豆素的含量测定,也可为明党参愈伤组织诱导的激素配比选择提供依据。

关键词 明党参;愈伤组织;珊瑚菜内酯;紫外-可见分光光度法;含量测定;激素诱导

Determination of Total Coumarins in Leaf Callus Induction of *Changium smyrnioides* by UV Spectrophotometry

BU Da, YAO Xiao, LIU Xiao-yi, LI Xiang, CHEN Jian-wei (College of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of different proportions of hormone on leaf callus induction of *Changium smyrnioides*, and to establish a method for the determination of the total coumarins in leaf callus induction of *C. smyrnioides*. METHODS: The system of different hormones inducing leaf callus of *C. smyrnioides* was designed with L₉(3⁴) orthogonal test; with callus induction rate and growth as index, the effects of different proportions of hormone on leaf callus induction. With phellopterin as index component, the content of coumarins in callus was detected by UV spectrophotometry at 268 nm. RESULTS: MS culture medium+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L+NAA 1.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L showed sound induction effect on leaf callus of *C. smyrnioides*; callus induction rate reached 100% about 14 days later, and leaf callus of *C. smyrnioides* had grown well. The linear range of phellopterin was 4.06-11.60 μg/L ($r=0.9948$) with an average recovery of 103.15% (RSD=2.04%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate for the content determination of the total coumarins in leaf callus of *C. smyrnioides*. It also can provide reference for the selection of hormone proportion for leaf callus induction of *C. smyrnioides*.

KEY WORDS *Changium smyrnioides*; Callus; Phellopterin; UV spectrophotometry; Content determination; Hormone induction

明党参(*Changium smyrnioides* Wolff)为伞形科多年生草本植物,根入药,又名土人参、百丈光、粉沙参等,为名贵中药材之一。它具有润肺化痰、和胃、解毒的功效,主治咳嗽痰喘、呕吐反胃、头晕、白带多、疔毒疮疡^[1]。珊瑚菜内酯是明党参中新发现的有药理活性的香豆素类成分之一,体外试验表明,它能抑制K⁺和谷氨酸诱导的PC12细胞Ca²⁺内流增加以及咖啡因和环匹阿尼酸(CPA)诱导的PC12细胞Ca²⁺的释放^[2],抑制前列腺素E₂的产生^[3],调节肿瘤坏死因子α刺激人体经内皮细胞黏附分子的表达^[4],抑制中枢神经系统苯二氮受体^[5],促进脂肪细胞脂解作用^[6],明显抑制7种肿瘤细胞的生长^[7]。笔者参照文献^[8],以珊瑚菜内酯为指标成分,采用紫外-可见分光光度

法测定明党参叶片愈伤组织中总香豆素的含量,以期优化明党参愈伤组织的诱导体系,为改良明党参的种质资源提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

752紫外-可见分光光度计、FA-1004电子分析天平(上海天平仪器厂);LIBRORAEL-40SM电子分析天平、UV-2401紫外扫描仪(日本Shimadzu公司);KQ-500DE医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,频率:40 kHz,功率:500 W)。

1.2 试剂

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid,简称2,4-D)、6-糠氨基嘌呤(Kinetin,简称KT)、1-萘乙酸(1-Naphthaleneacetic acid,简称NAA)、6-苄氨基腺嘌呤(6-Benzylaminopurine,简称6-BA)均购自上海朝瑞生物科技有限公司,均为生化级试剂;珊瑚菜内酯对照品为南京中医药大学中药化学实验室从明党参果实中分离得到,经紫外光谱、红外光谱、质谱、核磁共振光谱(氢谱、碳谱)鉴定确定为珊瑚菜内酯,熔点为103~104℃,归一化法测得纯度为99.7%;甲醇为分析纯,水为蒸馏水。

^Δ 基金项目:教育部高等学校博士点基金项目(No.200803150009);江苏高校优势学科建设工程资助项目(No.ysxk-2010);江苏省科技计划资助项目(No.BK2003107)

* 硕士研究生。研究方向:中药资源保护与利用。电话:025-85811073。E-mail: xmrs2008@163.com

[#] 通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:中药品质评价与中药生物技术。电话:025-85811695。E-mail: chenjw695@126.com

1.3 愈伤组织

待测的愈伤组织采用 $L_9(3^4)$ 正交设计方法,以9种不同激素配比对明党参的叶片进行诱导后所得。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计

明党参叶片愈伤组织的诱导试验采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法,以2,4-D、KT、NAA、6-BA质量浓度为考察因素,根据 $L_9(3^4)$ 表设计9组不同的诱导体系^[9-10]。正交试验设计见表1。

表1 正交试验设计

Tab 1 orthogonal design experiments

水平	因素			
	2,4-D,mg/L	KT,mg/L	NAA,mg/L	6-BA,mg/L
1	0.2	0.1	0.5	0.5
2	0.5	0.2	1.0	1.5
3	1.0	1.0	1.5	2.0

2.2 愈伤组织诱导及其结果

表2 不同激素配比对愈伤组织诱导的影响

Tab 2 Effects of different hormone proportion on callus induction

培养基编号	2,4-D,mg/L	KT,mg/L	NAA,mg/L	6-BA,mg/L	出愈时间,d	出愈率1,%	出愈率2,%	出愈率3,%	出愈率4,%	\bar{x} ,%	生长状况
1	0.2	0.1	0.5	0.5	15	-	66.67	66.67	100.00	77.78	+++
2	0.2	0.2	1.0	1.5	15	83.33	83.33	100.00	-	88.89	++
3	0.2	1.0	1.5	2.0	15	83.33	66.67	83.33	83.33	79.17	++
4	0.5	0.1	1.0	2.0	15	66.67	66.67	66.67	-	66.67	+++
5	0.5	0.2	1.5	0.5	15	-	100.00	100.00	100.00	100.00	+++
6	0.5	1.0	0.5	1.5	15	-	83.33	83.33	100.00	88.89	++
7	1.0	0.1	1.5	1.5	15	100.00	100.00	100.00	83.33	95.83	++
8	1.0	0.2	1.5	2.0	15	-	83.33	83.33	100.00	88.89	++
9	1.0	1.0	1.0	0.5	15	83.33	100.00	83.33	83.33	87.50	++

注:“+”表示生长状况为颜色黄白,长势弱,少量,紧密;“++”表示生长状况为颜色黄白,长势较强,中等量,较疏松;“+++”表示生长状况为颜色黄绿,长势旺盛,多量,疏松;“-”为污染组

note: “+” means white and yellow color, weak growing potential, small amount, close together; “++” means white and yellow color, medium growing potential, medium amount, relative loose; “+++” means greenish-yellow color, vigorous growth, large amount, loose; “-” means pollution group

50 ml 烧瓶中,加甲醇50 ml,加热回流1 h,滤过,滤液用甲醇定容至50 ml,精密吸取1 ml,再用甲醇定容至50 ml,即得供试品溶液^[11]。

2.3.3 检测波长的选择 取对照品溶液、供试品溶液各适量,于200~400 nm 波长范围内扫描。结果发现,对照品溶液与供试品溶液均在268 nm 波长处有最大吸收,峰形变化平缓,且空白试剂无干扰,便于定量测定,故选择检测波长为268 nm^[12]。紫外吸收光谱图见图1。

2.3.4 标准曲线的制备 精密吸取0.058 0 mg/ml的对照品溶液0.7、1.0、1.2、1.5、1.8、2.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,用甲醇定容,于268 nm 波长下测定吸光度。以质量浓度(c)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 54.239c + 0.0116$ ($r = 0.9948, n = 6$)。结果表明,珊瑚菜内酯的质量浓度在4.06~11.60 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.3.5 精密度的试验 精密称取上述明党参叶片的愈伤组织约0.25 g,置于50 ml 圆底烧瓶中,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,于268 nm 波长下测定吸光度,重复测定6次。结果, $RSD = 0.17\%$ ($n = 6$),表明本方法精密度的良好。

2.3.6 稳定性试验 精密称取上述明党参叶片的愈伤组织约0.25 g,置于50 ml 圆底烧瓶中,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,在268 nm 波长下分别于0、10、20、30、50、70、100 min 测

选取生长健壮明党参幼嫩叶片作为外植体。将其分割成块状(大约0.3 cm^2),按正交试验设计接种在不同激素配比的培养基上诱导愈伤组织。每瓶接种5~7块外植体,每项试验平行做4组,共计接种36瓶。

15 d后,部分外植体开始膨大,切口处先后长出黄白色愈伤组织。30 d后,外植体愈伤化效果较好,产生的愈伤组织多为淡黄白色,质地较疏松。以MS培养基+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L+NAA 1.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L的激素组合对明党参叶片愈伤组织的诱导效果较好,培养14 d左右的出愈率(出愈率=形成愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$)即达到100%,且生长状况也较好。不同激素配比对愈伤组织诱导的影响见表2。

2.3 总香豆素含量的测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取珊瑚菜内酯对照品适量,加甲醇制成每1 ml含0.058 0 mg的溶液,即得对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取样品约1.25 g,精密称定,置于

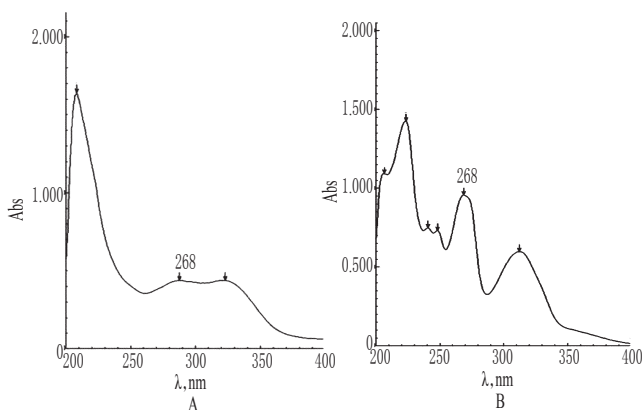


图1 紫外吸收光谱图

A. 明党参叶片愈伤组织; B. 珊瑚菜内酯对照品

Fig 1 UV absorption spectrum

A. callus induction of *C. smyrnioides* leaf; B. phellopterin control 定吸光度。结果, $RSD = 2.50\%$ ($n = 7$),表明供试品溶液在100 min 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 精密称取上述明党参叶片的愈伤组织约0.1 g,共6份,置于25 ml 圆底烧瓶中,分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,于268 nm 波长下测定吸光度并计算含量。

结果,每1 g样品中平均含珊瑚菜内酯1.394 mg,RSD=1.96% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 称取上述已知含量的明党参叶片愈伤组织9份,每份0.05 g,精密称定,每3份为一组,共3组,分别加入对照品溶液(0.095 mg/ml)7.5、15、22.5 ml,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,于268 nm波长下测定吸光度,计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery test(n=9)

样品编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	1.422 9	0.712 5	2.145 3	101.39		
2	1.425 7	0.712 5	2.173 8	104.99		
3	1.450 4	0.712 5	2.195 8	101.81		
4	1.417 3	1.425 0	2.856 8	101.02		
5	1.403 2	1.425 0	2.906 9	105.52	103.15	2.04
6	1.402 3	1.425 0	2.893 1	104.62		
7	1.420 1	2.137 5	3.684 6	105.94		
8	1.417 3	2.137 5	3.571 3	100.77		
9	1.468 8	2.137 5	3.655 7	102.31		

2.3.9 样品含量测定 取9组明党参叶片的愈伤组织各适量,分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按拟定的含量测定方法进行测定,计算各组样品中总香豆素的质量分数,结果见表4。

表4 明党参叶片愈伤组织中总香豆素含量测定结果

Tab 4 Results of content determination of total coumarins in leaf callus induction of *C. smyrnioides*

样品编号	培养基及激素的种类和质量浓度[mg/L(下标)]	愈伤组织质量,g	总香豆素质量分数,%
1	MS+2,4-D _{0.2} +KT _{0.1} +NAA _{0.5} +6-BA _{0.5}	0.125 5	10.438
2	MS+2,4-D _{0.2} +KT _{0.1} +NAA _{1.0} +6-BA _{1.5}	0.124 7	12.871
3	MS+2,4-D _{0.2} +KT _{0.1} +NAA _{1.5} +6-BA _{2.0}	0.124 5	13.574
4	MS+2,4-D _{0.5} +KT _{0.1} +NAA _{1.0} +6-BA _{2.0}	0.124 4	16.881
5	MS+2,4-D _{0.5} +KT _{0.2} +NAA _{1.5} +6-BA _{0.5}	0.125 1	15.088
6	MS+2,4-D _{0.5} +KT _{1.0} +NAA _{0.5} +6-BA _{1.5}	0.124 6	16.372
7	MS+2,4-D _{1.0} +KT _{0.1} +NAA _{1.5} +6-BA _{1.5}	0.125 3	20.551
8	MS+2,4-D _{1.0} +KT _{0.1} +NAA _{1.5} +6-BA _{2.0}	0.124 9	9.748
9	MS+2,4-D _{1.0} +KT _{1.0} +NAA _{1.0} +6-BA _{0.5}	0.124 9	11.229

3 讨论

3.1 明党参叶片愈伤组织含量测定方法的初步建立

目前,关于明党参愈伤组织含量测定的方法尚未见报道。本试验以珊瑚菜内酯作为指标成分,初步建立起以紫外-可见分光光度法测定明党参叶片愈伤组织中总香豆素含量的方法,可为明党参愈伤组织诱导的激素配比选择提供依据。测定结果表明,本方法简便、快速、准确、灵敏度高。

3.2 明党参叶片愈伤组织诱导的不同激素配比优选

本试验采用正交设计,对明党参的叶片进行了9组不同激素配比的组织培养。在9种培养基激素组合中,第5组的平均出愈率为100%,且长势较好,但其总香豆素的质量分数相对偏低,为15.088%;而出愈率次之的第7组,其平均出愈率和总香豆素的质量分数分别为95.83%和20.551%。综合考虑,9种激素组合中,第7组(MS+2,4-D_{1.0}+KT_{0.1}+NAA_{1.5}+6-BA_{1.5})为明党参叶片愈伤组织诱导最为适合的激素配比。

3.3 明党参叶片愈伤组织最佳采收期的选择

为明确明党参叶片愈伤组织最适合的采收时间,笔者在培养过程中,每5天随机取8瓶样品称质量,取鲜质量的平均值,分别绘制9组愈伤组织鲜质量与时间的生长曲线(见图2~

图4)。

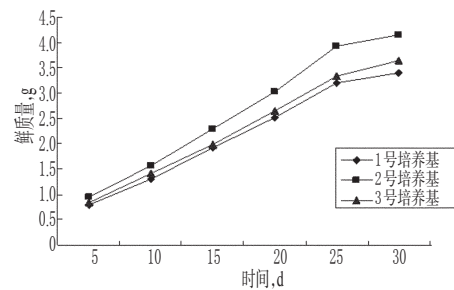


图2 1~3号培养基明党参叶片愈伤组织的生长曲线

Fig 2 Growth curves of leaf callus of *C. smyrnioides* culture medium 1-3

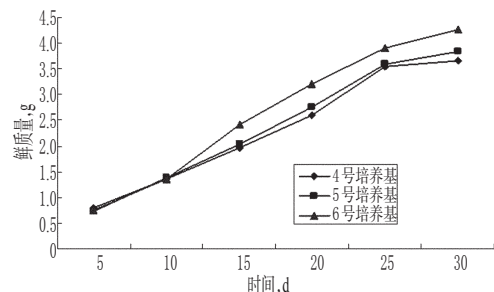


图3 4~6号培养基明党参叶片愈伤组织的生长曲线

Fig 3 Growth curves of leaf callus of *C. smyrnioides* culture medium 4-6

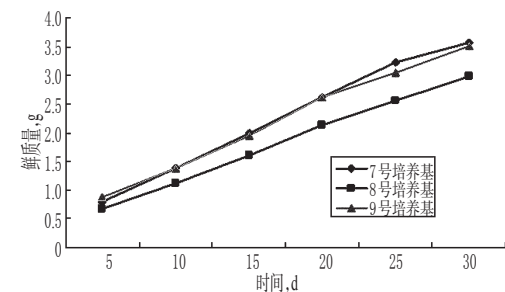


图4 7~9号明党参叶片愈伤组织的生长曲线

Fig 4 Growth curves of leaf callus of *C. smyrnioides* culture medium 7-9

从图2~图4中可以看出,明党参叶片愈伤组织的生长呈“S”形曲线,且随着培养天数的增加,愈伤组织的生物量也逐渐增加,30 d后增幅趋于平稳,因此以25~30 d采收做继代较为合适。

参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 2 824.
- [2] Li HT, He L, Qiu JB. Effects of the Chinese herb component phellopterin on the increase in cytosolic free calcium in PC12 cells[J]. *Drug Dev Res*, 2007, 68(2): 79.
- [3] Nizamutdinova IT, Jeong JJ, Xu GH, et al. Hesperidin, hesperidin methyl chalone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecules in tumor necrosis factor- α -stimulated human umbilical vein endothelial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(5): 670.
- [4] Bergendorff O, Dekemendjian K, Nielsen M. Furanocou-

心血管类中成药代谢性药物相互作用的研究进展[△]

刘丽雅^{1,2*}, 韩永龙², 杨全军², 郭澄^{2#}(1.上海中医药大学, 上海 201203; 2.上海交通大学附属第六人民医院药剂科, 上海 200233)

中图分类号 R283;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1809-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.29

摘要 目的:为心血管类中成药临床合理应用提供参考。方法:检索近年来相关文献,对常用的心血管类中成药对细胞色素P₄₅₀(CYP₄₅₀)的影响及其可能引发的代谢性药物相互作用进行分析、归纳和总结。结果与结论:多种常用的心血管类中成药对CYP₄₅₀有抑制或诱导作用,联合用药时可能发生代谢性药物相互作用,因此对其研究具有重要的临床意义。

关键词 心血管系统;中成药;代谢;药物相互作用;细胞色素P₄₅₀

心血管类中成药临床应用广泛,已占到心血管系统药物销售总金额的1/3以上^[1]。这类药物临床上常与多种其他药物联合使用,由此引发的药物相互作用值得关注。药物对细胞色素P₄₅₀(Cytochrome P₄₅₀, CYP₄₅₀)的抑制或诱导作用,可引起临床的代谢性药物相互作用,导致药物产生不可预测的副作用或疗效失败。CYP₄₅₀是由许多同工酶组成的超家族,90%的药物通过CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4和CYP3A5这6个亚型代谢^[2]。CYP₄₅₀的底物可在其相对应的酶诱导剂作用下产生增加生物转化率、降低药物浓度及疗效的现象,在相应的酶抑制剂作用下产生增加药物浓度、延长药理作用时间、增加药物不良反应的现象^[3]。本文从研究方法、种属、体内外作用和给药时间等方面分析了心血管类中成药对总CYP₄₅₀和CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C9、CYP2C11、CYP2C19、CYP2D1、CYP2D4、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A、CYP3A1、CYP3A2、CYP3A4影响的文献,期望了解心血管类中成药代谢性药物相互作用,指导临床合理用药。结果,常用的研究方法有肝微粒体法、探针法、HPLC法等;多种常用心血管类中成药对CYP₄₅₀可产生抑制或诱导作用以及多重作用。常用心血管类中成药对CYP₄₅₀及其亚型的调控作用见表1(表中CYP1表示CYP₄₅₀的第1个亚型,1A2表示第1个亚型下的

A2亚型);常用心血管类中成药对CYP₄₅₀及其亚型调控作用的研究方向见表2。

1 心血管类中成药对CYP₄₅₀的作用

1.1 心血管类中成药对CYP₄₅₀的诱导作用

麝香保心丸由麝香、人参提取物、牛黄、肉桂、苏合香、蟾酥、冰片组成,有芳香温通、益气强心之功效,用于冠心病的治疗等。Jiang B等^[6]在不同种属体系中利用反转录-聚合酶链式扩增(RT-PCR)法、Western blot法及探针法进行研究,发现在人的HepG2细胞内在麝香保心丸作用下不仅提高了CYP3A4的mRNA水平及蛋白表达,而且使酶活性也提高了,其含有的蟾毒灵、华蟾蜍毒素及蟾力苏是CYP3A4的诱导剂。在大鼠体内麝香保心丸提高了CYP3A1、CYP3A2的mRNA表达水平及CYP3A的酶活性。

金纳多注射液的主要成分为银杏叶提取物,常用于治疗脑部及其周边等血液循环障碍。王常松^[9]通过CO还原差示光谱法测定出在大鼠体内随着剂量的增加,金纳多注射液对CYP1A具有选择性诱导作用。

1.2 心血管类中成药对CYP₄₅₀的抑制作用

刺五加注射液为刺五加茎叶提取物,有扩张血管和改善血液循环等作用,主要用于治疗脑血栓与冠心病等。曾超等^[10]



marins with affinity to brain benzodiazepine receptors in vitro[J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(6):1 121.

[5] Dekermendjian K, Ai J, Nielsen M, et al. Characterisation of the furanocoumarin phellopterin as a rat brain benzodiazepine receptor partial agonist in vitro[J]. *Neurosci Lett*, 1996, 219(3): 151.

[6] Kimura Y, Ohminami H, Arichi H, et al. Effects of various coumarins from roots of *Angelica dahurica* on actions of adrenaline, ACTH and insulin in fat cells[J]. *Planta*

Med, 1982, 45(7):183.

[7] 王萌,陈建伟,李祥.明党参根皮中5种呋喃香豆素类成分的体外活性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(6):203.

[8] 顾源远,陈建伟.紫外分光光度法测定明党参中总香豆素类成分的含量[J]. *现代中药研究与实践*, 2010, 24(2):58.

[9] 张家菁,于元杰.伞形科药用植物组织培养的研究进展[J]. *特产研究*, 2011(1):63.

[10] 刘叶蔓,赵碧清,曾婷.凹叶厚朴愈伤组织的诱导及其有效成分含量的比较[J]. *中国药房*, 2008, 19(18):1 393.

[11] 段志富.明党参活性成分及其累积分布与定量分析研究[D].南京:南京中医药大学, 2008.

[12] 陈化,陈竹,梁斌.紫外-可见分光光度法测定环草石斛中石斛多糖的含量[J]. *中国药房*, 2011, 22(39):3 690.

△基金项目:上海市医院协会科研基金资助(No.201002029)
*药师。研究方向:中药学及药动学。电话:021-24058789。
E-mail:liuliya6h@126.com
#通信作者:教授,主任药师,博士研究生导师。研究方向:中药学与临床药理学。电话:021-24058098。E-mail:gboss@sina.com

(收稿日期:2012-08-23 修回日期:2012-11-26)