

3 讨论

3.1 激素对苦皮藤组织培养的影响: 在苦皮藤愈伤组织的诱导、分化过程中, 生长素有一定作用, 以 2, 4-D 为好, 细胞分裂素效果不明显。细胞分裂素 6-BA 对苦皮藤愈伤组织的继代培养有良好作用。较高浓度的 6-BA 与一定浓度的 NAA 配合有利于苦皮藤愈伤组织的分化, 但与 2, 4-D 配合效果较差。究其原因与激素的性质有关。巴尔茨^[7]发现在石刁柏的愈伤组织中, 当用 6-BA 与 NAA 结合使用时, 可以诱导出芽, 而 6-BA 与 2, 4-D 结合使用时则不能发生, 本实验结果与巴尔茨的结论基本一致。

3.2 外植体的部位对苦皮藤组织培养的影响: 在苦皮藤组织培养过程中发现, 正确的选择外植体的部位非常重要。本试验以其子叶和胚轴为外植体获得了成功, 而从野外采回的叶片外植体诱导效果较差, 究其原因可能是子叶和胚轴的分生细胞较多、分化程度较低而成熟叶片细胞分化程度高, 所以在苦皮藤组织培养中应选择细胞分化程度较低的部位。

3.3 影响苦皮藤生根的因素: 一般认为生长素与细胞分裂素高比例有利于根的发生, 本试验在此比例的培养基上没有观察到根的发生, 而发现只有添加了多效唑的培养基上才有根的生成, 并且苗生长健壮、叶片翠绿, 移栽成活率高。多效唑在苦皮藤的组培苗生根方面具有明显的促进作用, 并且矮化植株使植株生长健壮, 还可增加叶片的叶绿素含量。这与文献报道的植物生长延缓剂多效唑对试管苗不定根

的形成及培育壮苗、室外移栽有良好的作用^[8]的结果一致。另外, 在实验中发现, 低盐对苦皮藤根的生长发育有利。在加入多效唑和 IBA 的 MS 培养基中, 无论是光培养还是暗培养均没有根的产生。而使用 1/2MS 培养基后, 均有根的产生。暗培养是苦皮藤生根的重要因素, 经暗培养后生根率提高了 80%, 其原因可能与某些生根基因受光调控有关。

References:

- [1] Ke Z G, Nan L S. The research and advances on the plant-based insect antifeedant *Celastrus angulatus* [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 1993, 11(3): 265-271.
- [2] Nan L S, Lu L X. Advances in plant pesticide angled bitter-sweed [J]. *Pesticides* (农药), 1995, 34(7): 29-31.
- [3] Wang J Z, Sun S L, Su H T. The research utilization present situation and forecast of plant source insecticide [J]. *J Beijing Agr Coll* (北京农学院学报), 2002, 15(2): 72-73.
- [4] Cao H Q, Yue Y D, Hua R M. Research and advances of the plant-based pesticides agents [J]. *J Anhui Agr Univ- Nat Sci* (安徽农业大学学报·自然科学版), 2000, 77(1): 40-44.
- [5] Liu H X, Wu W J, Ji Z Q, *et al.* Studies on the selective toxicity and selective mechanism of poisonous ingredient celanyulin V of *Celastrus angulatus* against the insect pests [J]. *Acta Agr Boreali-occidentalis Sin* (西北农业学报), 1998, 7(2): 41-44.
- [6] Wu W J, Liu H X, Ji Z Q, *et al.* Research and development on the botanical insecticide of 0.2% celangulines emulsifiable concentrate [J]. *Pesticides* (农药), 2001, 40(3): 17.
- [7] Barz W, Reinhard E, Zenk M H. *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application* (植物组织培养技术及其在生物技术的应用) [M]. Beijing: Science Press, 1983.
- [8] Cao Z Y, Lui G M. *The Practical Technology Course of the Plant Organization Culture* (实用植物组织培养技术教程) [M]. Lanzhou: Gansu Science and Technology Press, 1995.

HPLC 法测定杜仲仁中桃叶珊瑚苷的含量

杨小梅, 尚平平, 刘建斌, 孙文基*

(陕西省生物医药重点实验室 西北大学, 陕西 西安 710068)

杜仲仁为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 成熟种子的种仁, 含有脂肪油、蛋白质、糖类及桃叶珊瑚苷等多种化学成分。目前的利用价值仅限于从杜仲仁提取油脂。关于杜仲仁的研究, 未见报道, 笔者从中提取分离出桃叶珊瑚苷, 并用 HPLC 法进行含量测定, 测得杜仲仁中的桃叶珊瑚苷有较高的含量。

1 仪器与试剂

Beckman Coulter 高效液相色谱仪, System Gold 125 Solvent Module, System Gold 168 Detector; 桃叶珊瑚苷对照品: 自制, TLC 检查为单一斑点。HPLC 检测为单一峰, 归一化法计算纯度为 99% 以上, 其甲醇溶液的紫外扫描图谱中 $\lambda_{\max} = 206.4 \text{ nm}$, 红外扫描图谱数据与西安交通大学药学

* 收稿日期: 2002-10-12

作者简介: 杨小梅(1962-), 女, 陕西省武功县人, 学士学位, 副主任药师。Tel: (0917) 3573739

* 通讯作者 Tel: (029) 8303569

院王军宪教授赠 aucubin 对照品对照一致。杜仲仁为陕西略阳产杜仲种子临用前剥去外壳的种仁; 其余试剂均为分析纯。

2 色谱条件

预柱: USE UL TRASPHERE ODS dp (4.6 mm × 4.5 cm × 5 m); 色谱柱: USA UL TRASPHERS ODS dp (4.6 mm × 25 cm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(3 : 97); 检测波长: 206nm; 柱温(室温): 25 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL。分离结果见图 1-A, B。

3 方法与结果

3.1 线性关系考察: 精密称取桃叶珊瑚苷对照品 8.71 mg 置 50 mL 容量瓶中, 用 30% 甲醇溶液定容, 精密吸取 0.2, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用 30% 甲醇溶液定容。将配制不同浓度的对照品溶液进样, 以峰面积为纵坐标, 对照品溶液浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为: $Y = 2.793 \times 10^3 X + 3.758 \times 10^3$, $r = 0.999 4$, 桃叶珊瑚苷的浓度与峰面积具有良好的线性关系, 线性范围为 3.48~87.10 μg/mL。

3.2 精密度试验: 精密吸取浓度为 69.68 μg/mL

的对照品溶液 20 μL, 重复进样 5 次, 记录峰面积, 计算 RSD 为 1.1% ($n = 5$)。

3.3 稳定性试验: 取该对照品溶液在 0, 4, 8, 20, 26, 48 h, 分别进样 20 μL, 记录峰面积, 计算 RSD 为 1.5% ($n = 6$), 表明桃叶珊瑚苷 30% 甲醇溶液在 48 h 内是稳定的。

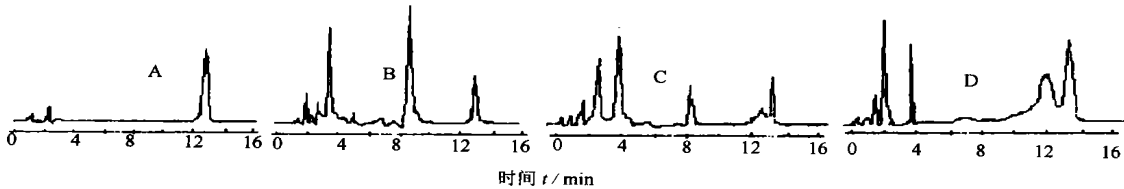
3.4 重复性试验: 取同一供试样品 5 份, 精密称定, 按样品测定项下的方法进行含量测定, 结果平均含量为 2.98%, RSD 为 2.7% ($n = 5$)。

3.5 回收率试验: 精密称取已测定含量的同一供试样品 5 份, 再精密加入桃叶珊瑚苷对照品 1.00 mg, 按样品测定项下的方法操作, 平均回收率为 94.8%, RSD= 1.9% ($n = 5$)。

3.6 提取条件的选择

3.6.1 提取溶剂的选择: 桃叶珊瑚苷易溶于水、甲醇, 故选用 30%, 50% 甲醇溶液及甲醇为溶剂进行提取, 结果甲醇的浓度越高, 与桃叶珊瑚苷成分色谱峰相邻的杂质峰含量越高, 而且两个峰不能很好分离。30% 甲醇提取, 色谱中无此杂质峰, 见图 1。故选用 30% 甲醇溶液为溶剂。

3.6.2 实验中用乙醚去油脂, 再用冷浸法提取, 结



A-桃叶珊瑚苷对照品 B-30% 甲醇提取样品 C-50% 甲醇提取样品 D-甲醇提取样品
A-aucubin B-sample extracted by 30% MeOH C-sample extracted by 50% MeOH D-sample extracted by MeOH
图 1 对照品(A)及样品(B, C, D)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of chemical reference substance (A) and samples (B, C, D)

果桃叶珊瑚苷成分损失很大, 回收率只有 73% 左右。

3.6.3 超声处理与冷浸法比较: 超声处理的样品杂质成分增大很多, 即影响滤过, 又使色谱峰分离不好, 用冷浸法比较理想。

3.6.4 用 30% 甲醇溶液提取过程中, 室温放置, 溶液的颜色发生变化, 室温越高变化越快, 15 °C 放置 6 h 颜色加深, 25 °C 放置 1 h 后颜色即发生变化。提取时将样品置冰箱中放置过夜, 样品溶液颜色不变, 再放置, 也无变化。故以 30% 甲醇溶液冷浸提取, 样品溶液稳定。

3.7 样品测定: 杜仲仁研细, 精密称取细粉 0.1 g, 置 50 mL 容量瓶中, 加 30% 甲醇溶液 40 mL, 振摇 5 min, 置冰箱中过夜。取出, 放至室温, 再振摇 10 min 加 30% 甲醇溶液至刻度, 摇匀, 过滤, 弃去初滤液,

取续滤液用滤膜滤过后进样检测。结果见表 1。

表 1 样品测定

Table 1 Samples determination		
样品	桃叶珊瑚苷的含量/ %	RSD/ %
1	2.98	2.7($n = 5$)
2	0.87	2.1($n = 3$)

另外用同样的方法测定杜仲植物不同部位桃叶珊瑚苷的含量情况, 结果见表 2(干皮: 宝鸡市药检所中药标本, 皮厚 0.3 cm, 胶丝致密; 干皮(鲜): 四月初采于陕西陇县, 皮厚 0.5 cm, 胶丝较疏; 枝皮: 市售品, 皮厚 0.1 cm, 胶丝致密; 嫩叶: 四月初采于陕西陇县。)

4 讨论

4.1 用 30% 甲醇提取时, 室温放置发生颜色变化,

表 2 植物杜仲中各部位桃叶珊瑚苷的含量(按干燥品计算)

Table 2 Content of aucubin in different parts of <i>E. ulmoides</i> (for dried samples)			
部位	含量/ %	部位	含量/ %
干皮	0.43	嫩叶	0.53
干皮(鲜)	0.27	种仁	2.98
枝皮	0.38	种子外壳	未检出

置冰箱中冷藏却稳定,推测杜仲仁中可能有酶存在,在室温下发生了水解及聚合反应。

4.2 杜仲仁中含有大量的脂肪油,影响桃叶珊瑚苷

成分的浸出。因此,杜仲仁的粒度会影响含量测定,测定时最好研成细粉。

4.3 样品溶液的稳定性:在样品提取过程中已经发现它的不稳定性,所以将滤液保存于冰箱中,在测定前取出放至室温,用滤膜滤过进样,1 h 内基本稳定。

4.4 从样品测定结果发现,杜仲仁中桃叶珊瑚苷的含量差异很大,这是否与其干燥的条件、采收时间等因素有关;另外,能否用桃叶珊瑚苷的含量大小来衡量杜仲仁的质量,有待于进一步研究探讨。

HPLC 法测定五味子茎藤中木脂素的含量

于俊林¹,秦¹,胡彦武¹,赵宏宇²,宿艳霞²,高巍^{2*}

(1. 通化师范学院 药学系,吉林 通化 134002; 2. 吉林修正药业集团股份有限公司,吉林 通化 134001)

五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 主产于东北的东部山区,其成熟果实称北五味子,是著名的长白山道地药材,具有益气生津、补肾养心、收敛固涩的作用。五味子的主要有效成分为木脂素类成分,以五味子甲素、五味子乙素为代表,有明显的促进肝糖元生成、降低肝炎患者血清谷丙转氨酶水平、保护肝细胞的作用,是预防和治疗肝炎的要药。近来还发现五味子中的木脂素成分有抗癌、抗艾滋病和 PAF 拮抗等多种生物活性^[1]。

北五味子作为常用的中药主要来源于野生资源,由于森林面积的减少,加之人们对五味子果实的掠夺性采收,致使北五味子的产量逐年减少,为了扩大药源,我们参考《中华人民共和国药典》的方法^[2]对五味子茎藤中的木脂素成分进行了定性检识和含量测定。

1 实验材料

五味子果实:2001 年 9 月采自吉林省通化市左安,阴干备用。五味子茎藤:2002 年 4 月采自吉林省通化市左安,按生长节区分并分离 1~6 年生长以上枝条,选 6 年生以上的茎藤分离韧皮部和木质部,阴干,粉碎过 3 号筛粉末,备用。以上材料均经通化师范学院药学系于俊林研究员鉴定。

2 仪器与药品

日本岛津 CLASS-VP;五味子甲素、五味子乙素购于中国药品生物制品检定所;色谱用甲醇,天津

四友化学试剂厂,色谱纯;硅胶 GF254,青岛海洋化工厂;其他试剂为分析纯。

3 方法与结果

3.1 对照品液和供试品液的制备:精密称定五味子甲素、乙素对照品各 5 mg,分别用甲醇定容至 20 mL,作五味子甲素和乙素的对照品溶液。精密称定各实验材料约 0.5 g,分别置于 20 mL 容量瓶中,加甲醇 18 mL,超声处理 20 min,取出,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,作供试品溶液。

3.2 薄层色谱:用定量毛细管分别吸取 2 种对照品溶液和 8 种供液品溶液各 5 μ L,分别点于同一块自制的硅胶 GF254-CMC-Na 薄层板上,以石油醚(30 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,在紫外灯(254 nm)下检视,TLC 图谱如图 1 所示。

3.3 HPLC 定量分析

3.3.1 色谱条件:YWG-C₁₈柱;SPD-10A VP 紫外检测器,检测波长 254 nm;流动相为甲醇-水(13:7);流速 1.8 mL/min;室温。

3.3.2 线性关系考察:分别准确吸取五味子甲素和乙素对照品溶液各 2,6,10,14,18 μ L,进样,分别以五味子甲素和乙素的量为横坐标,以峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为:五味子甲素 $Y = -24\,232 + 1\,351\,033X$, $r = 0.999\,4$;五味子乙素 $Y = -28\,965 + 1\,025\,618X$, $r = 0.999\,6$;五味子

* 收稿日期:2003-03-04
作者简介:于俊林(1962-),男,吉林省长春市人,1982 年毕业于吉林农业大学中药材学院,现任通化师范学院药学系研究员,主要从事药用植物学及资源开发利用的教学与研究工作。Tel: (0435) 3976161 E-mail: yujunlin1962@163.com