

3.1.3 酶解时间对茯苓原生质体产量的影响:试验结果见表 3, Z_{10-2} 菌株采用 3% 酶液酶解 2.0 h 后, 其原生质体产量最高, 而 Z_{10-3} 菌株采用 3% 酶液酶解 2.5 h, 其原生质体产率最高。实验表明原生质体产率与酶解时间有一定关系, 但并不成正相关, 有些菌类如果延长酶解时间, 原生质体产率会显著降低, 这可能是因为脱壁太彻底或杂酶对原生质体长时间的损伤降低了原生质体的活性和再生。

表 3 酶解时间对原生质体产率的影响

菌株	原生质体产量/($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	1.5 h	2.0 h	2.5 h	3.0 h
Z_{10-2}	1.81	5.25	2.81	1.56
Z_{10-3}	3.56	3.68	6.50	5.37

3.1.4 不同稳渗剂对茯苓原生质体产量的影响:脱去了细胞壁的原生质体是很脆弱的, 需要特定的等渗溶液来悬浮原生质体, 原生质体在分离、再生及融合过程中都离不开渗透压稳定剂的保护。稳渗剂的种类和浓度对原生质体的分离有着较大影响, 本实验选用不同浓度的 KCl、蔗糖、甘露醇稳渗剂对茯苓进行酶解对比试验, 结果见表 4。对于 Z_{10-2} , 0.5 mol/L 甘露醇作稳渗剂时所得原生质体数量最多, 且原生质体大小均匀, 其次为蔗糖, KCl 最差; Z_{10-3} 以 0.6 mol/L 甘露醇作稳渗剂所得原生质体最多, 蔗糖次之, KCl 最次。因此, 最适合的渗透压稳定剂条件需要根据不同供试菌株来确定。

3.2 原生质体再生

3.2.1 不同种类的稳渗剂对茯苓原生质体产量的影响:由表 5 可以看出甘露醇作稳渗剂对茯苓原生质体的再生效果最佳。其次为蔗糖, 而无机盐 NaCl、KCl 效果较差。且 Z_{10-2} 在 NaCl 为稳渗剂的条件下几乎不能再生。

3.2.2 不同浓度的稳渗剂对茯苓原生质体产量的

影响:由表 6 可以看出, 同一种稳渗剂不同的浓度其原生质体再生率也不同, 0.6 mol/L 甘露醇作为稳渗剂时其原生质体再生率最高。

表 4 不同稳渗剂对原生质体产率的影响

Table 4 Effect of various stabilizers on protoplast yield

稳渗剂	浓度/ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	原生质体产量/($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	
		Z_{10-2}	Z_{10-3}
KCl	0.40	1.50	0.50
	0.50	0.56	0.75
	0.60	0.75	0.25
蔗糖	0.40	0.50	0.50
	0.50	1.25	1.00
	0.60	1.50	0.25
甘露醇	0.40	0.50	0.50
	0.50	2.00	1.75
	0.60	1.50	2.50

表 5 不同种类的稳渗剂对原生质体再生的影响

Table 5 Effect of various kinds of stabilizers on protoplast regeneration

菌株	原生质体再生率			
	0.5 mol/L 蔗糖	0.5 mol/L 甘露醇	0.5 mol/L KCl	0.5 mol/L NaCl
Z_{10-2}	0.75×10^{-2}	1.00×10^{-2}	2.50×10^{-3}	—
Z_{10-3}	1.30×10^{-2}	1.66×10^{-2}	6.70×10^{-3}	2.50×10^{-3}

表 6 不同浓度的稳渗剂对原生质体再生的影响

Table 6 Effect of various concentrations of stabilizers on protoplast regeneration

菌株	原生质体再生率		
	0.4 mol/L 蔗糖	0.6 mol/L 甘露醇	0.8 mol/L 甘露醇
Z_{10-2}	2.5×10^{-3}	7.5×10^{-3}	5.0×10^{-3}
Z_{10-3}	1.0×10^{-2}	1.3×10^{-2}	6.7×10^{-3}

References:

[1] Chang S T, Miles P E. *Edible Mushrooms and Their Cultivation* Boca Raton [M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.
[2] Chang S T. *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms* [M]. Yverdon; Gorden and Brenc Science Publishers, 1992.
[3] Yang X M. *Investigation Technique of Edible Mushrooms* (食用菌研究法) [M]. Beijing: China Agriculture Publishing House, 1998.

RP-HPLC 法测定厚朴中厚朴碱

刘明哲, 邹玉红, 陈晓辉, 毕开顺*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *M. officinalis* Rehd.

et Wils. subsp. *biloba* (Rehd. et Wils.) Cheng et Law 的干燥干皮、根皮和枝皮。厚朴中主要有效成

收稿日期: 2005-07-30
作者简介: 刘明哲 (1980—), 男, 满族, 河北保定人, 在读硕士, 主要从事中药质量标准的研究。
Tel: (024) 23986296 E-mail: liumz80@yahoo.com.cn
* 通讯作者 毕开顺

分为酚类和生物碱。为了全面、有效地控制中药材质量,本实验建立了厚朴药材中厚朴碱的 RP-HPLC 测定法。

1 仪器与试药

仪器:日本岛津 LC—10A 高效液相色谱仪、日本岛津 SPD—10A 紫外检测器、日本岛津 CKChromTM 色谱工作站。

试剂:甲醇(色谱纯),三乙胺、磷酸(分析纯),厚朴碱对照品(自制,质量分数 99%)。药材购自全国各地药店,经沈阳药科大学孙启时教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Lichrospher C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 江苏汉邦)色谱柱;流动相:甲醇-水-三乙胺(50:50:0.2, 磷酸调 pH 至 3.5);体积流量 0.8 mL/min;检测波长 282 nm;柱温为室温;进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备:称取厚朴碱对照品适量,精密称定,置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成厚朴碱质量浓度为 250 μg/mL 的溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取厚朴粉末 1.0 g,精密称定,置三角瓶中,加 20 mL 盐酸溶液(pH 2),超声提取 20 min。提取液转移至 50 mL 量瓶中,蒸馏水洗涤残渣 3 次,每次 5 mL,合并洗涤液,用蒸馏水定容至 50 mL,摇匀。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.4 标准曲线的绘制:分别精密量取对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液进样 10 μL。在上述色谱条件下进行分析,记录色谱图。以对照品峰面积为纵坐标(Y),以质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 4.18 \times 10^6 X + 1.82 \times 10^4$ ($r = 0.9992$)。结果表明,厚朴碱在 12.5~200.0 μg/mL 线性关系良好。

2.5 精密度试验:吸取同一浓度对照品溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次,测得厚朴碱峰面积,计算 RSD 为 0.8%。

2.6 重现性试验:称取同一样品(No. 6) 6 份,每份 1.0 g,精密称定,按 2.3 项下操作,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,测得厚朴碱的质量分数,计算 RSD 为 2.6%。

2.7 稳定性试验:取一份样品溶液(No. 6) 分别在 1、2、4、8、16、24 h 测定。结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好,厚朴碱峰面积 RSD 为 1.5%。

2.8 回收率试验:称取已知量的厚朴样品(No. 6)

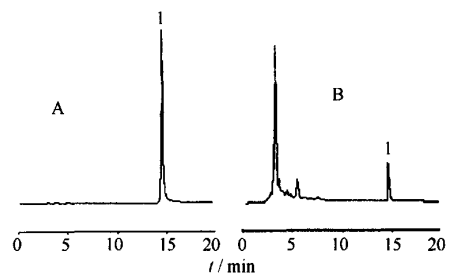
9 份,每份 0.5 g,精密称定,分别精密加入一定量的对照品,按 2.3 项下操作,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,平均回收率 98.5%,RSD 为 1.3%。

2.9 样品的测定:取厚朴样品,按 2.3 项下操作,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,按外标一点法计算厚朴碱的量。测定结果见表 1,代表性色谱图见图 1。

表 1 厚朴中厚朴碱的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Magnocuraine in *M. officinalis* ($n=3$)

样品编号	产地	厚朴碱/%	样品编号	产地	厚朴碱/%
1	重庆	0.05	10	甘肃	0.07
2	云南	0.15	11	哈尔滨	0.20
3	沈阳	0.04	12	上海	0.02
4	天津	0.07	13	深圳	0.04
5	山西	0.08	14	营口	0.03
6	山东	0.10	15	秦皇岛	0.25
7	保定	0.08	16	唐山	0.05
8	湖南	0.05	17	大连	0.02
9	河南	0.04			



1-厚朴碱
1-magnocuraine

图 1 厚朴碱(A)和样品(B) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of magnocuraine (A) and sample (B)

3 讨论

3.1 厚朴碱为生物碱,色谱峰拖尾严重,本研究采用的流动相为甲醇-水-三乙胺(50:50:0.2, 磷酸调节 pH 3.5),在其中加入的三乙胺可使厚朴碱峰形改善。

3.2 考察药材提取工艺时,以厚朴碱的量为指标,考察了水、盐酸酸水与盐酸酸性乙醇的提取效率。结果表明酸水提取液中厚朴碱量最高且杂质少,所以选取盐酸酸水为提取溶剂。

3.3 通过对不同产地厚朴中厚朴碱量的测定,发现各地差异很大,在本研究所测定的 17 批厚朴中,秦皇岛产厚朴中厚朴碱量最高,为 0.25%,其余产地厚朴中的量为 0.20%~0.02%,这些差异可能由药材的产地、生产环境、采收期及贮藏方法等不同原因引起的。