

## 第三章 試驗部分

### 第一節 材料與方法

#### 一、延胡索之組織培養

##### (一)材料

本研究試驗材料，係 1995 年 11 月由瀋陽藥科大學劉仲銘教授，提供延胡索之基原植物 (*Corydalis yanhusuo* W.T. WANG) 之塊莖 (tuber) 為培植體 (圖 5-7)。

##### (二)方法

#### 1.培養基之製備

##### (1)固體培養基

以 MS (Murashige & Skoog, 1962)<sup>(103)</sup> 無機及有機鹽類為基本配方 (附錄一)，添加 3 % sucrose 及凝膠 (0.9 % Difco agar 或 0.2 % Gelrite)，配合 NAA、2,4-D、BA、TDZ、kinetin、zeatin、2ip 及 GA<sub>3</sub> 等各類植物生長調節劑，或配合 casein hydrolysate (CH)、椰子汁 (CM)、蛋白 (peptone) 及酪胺酸 (tyrosine) 等各種有機添加物。培養基於加入凝膠物質前，先用 0.5 N NaOH<sub>(aq)</sub> 或 HCl<sub>(aq)</sub>，將 pH 值調至 5.7 ± 0.1，以 121 及 15 lb/in<sup>2</sup> (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) 之條件，高溫高壓滅菌 15 分鐘後，擺成

斜面放冷凝固備用。

## (2)液體培養基

液體培養基之配製步驟同固體培養基，僅不添加凝膠物質，並將 pH 值調為  $5.2 \pm 0.1$ 。

## 2. 培植體之消毒

取延胡索塊莖為培植體，先以清水沖洗乾淨擦乾後，去除表皮，再以含 70 % 酒精之棉花擦拭塊莖表面，並浸泡於 70 % 酒精消毒 1 分鐘後，以 0.5 % 次氯酸鈉溶液（每 100 ml 含 Tween 20 兩滴），置於超音波震盪器進行表面消毒 10 分鐘，移至無菌操作台經無菌水洗滌四次後，置於無菌濾紙上吸乾表面水分，削去表面後，切成厚約 1-2 mm，邊長約 5 mm 等三角形的培植體。

## 3. 培養環境

接種後之材料置於  $25 \pm 0.5$  之恆溫，於黑暗或照光（固體培養：光量  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ，光波長 350-800 nm；液體培養：光量  $10 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ）下培養，液體培養則將材料置於平面迴轉式振盪器上，以 100 rpm 之速度振盪培養。

## 4. 接種方式

以試管為培養容器，內含 10 ml 培養基，於無菌操作臺操作，每支試管接種兩個塊莖切片或體胚；癒合組織之生長和繼代培養試驗，取 200 mg 的癒合組織為單位，每支試管接種二單位的癒合組織；液體培養則以 125ml 三角錐瓶內含 20 ml 培養基培養；若以 250 ml 三角錐瓶為培養容器，

內含 100 ml 培養基，每瓶接種 1-6 株。接種後置於黑暗或光照（每日照光 14 小時）下，相對濕度為 75 % 的培養室或平面迴轉式震盪器。

#### 5.癒合組織之誘導

將表面消毒過之塊莖對半橫切，再縱切成厚度 1-2 mm 之片狀，接種於 MS 基本培養基，3 % sucrose, 0.9% Difco agar，添加 0.5、1、2 及 4 mg/L BA，配合 0.5、1、2 mg/L 2,4-D 或 0.5、1、2 mg/L NAA 等處理，黑暗下培養，經 30 天後調查癒合組織形成率及平均鮮重。

#### 6.懸浮細胞之建立

將生長良好且均質之癒合組織約 5 g 切碎後，置於含 20 ml 液體培養基之 125 ml 三角錐瓶內，於  $10 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  光照環境下，在平面迴轉式振盪器上，以 100 rpm 之速度振盪培養，每二週更換培養基乙次，以建立懸浮細胞之母瓶（圖 8）。懸浮細胞生長狀況調查方法係測量於含 20 ml 培養基之 125 ml 有臂三角錐瓶（De-long flask）中細胞沉降體積（packed cell volume, PCV）（圖 9）。

#### 7.體胚之誘導

(1)生長良好之癒合組織，接種於不同種類的植物生長調節劑，如 BA、kinetin、zeatin、2ip 及 NAA 各 0.5 mg/L 之 MS 固體培養基，於光照下培養，經 30 天後調查其誘導的體胚個數。

(2)由癒合組織誘得之體胚苗，接種於 0.5、1、2、4、8、12、

16 mg/L ABA 處理之 MS 固體培養基，於光照下培養，經 60 天後調查所誘導的體胚個數。

## 8.體胚的發育及塊莖之形成

### (1)體胚之發育

將添加 2.0 mg/L ABA 處理得到之體胚，置於不添加與分別添加 0.1 mg/L GA<sub>3</sub>、1 mg/L kinetin、1 mg/L zeatin-riboside 之 MS 液體培養基，於光照下培養，經 15 天後調查其體胚苗生長的優劣。

### (2)不同濃度的基本鹽類及蔗糖對塊莖形成之影響

以 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> 液體培養基培養 15 天後，將生長良好之體胚苗，接種於分別含有 3、6 及 9 % sucrose 配合 1/4 X、1/2 X、1 X 及 2 X MS 等 12 種不同處理之固體培養基，於光照下培養，經 30 天後調查植株塊莖的形成率。

### (3)不同添加物對塊莖成分含量之影響

以 0.1mg/L GA<sub>3</sub> 液體培養基培養 15 天後的植株，培養於 1/2 X MS, 6% sucrose, 0.9 % Difco agar, 分別添加 ABA (0.5, 1, 2, 5 mg/L)、ancymidol (0.5, 1, 2 mg/L)、GA<sub>3</sub> (0.5, 1, 2, 5 mg/L)、paclobutrazol (0.5, 1, 2, 5, 10 mg/L)、PEG-4000 (15, 20, 50, 100 mg/L) 及對照組等 21 處理，光照培養一個月後，調查塊莖的生長情形。再將生長良好且已形成塊莖之植株，分別繼代於含 1/2 X MS, 3% sucrose, 0.2 % Gelrite, 添加 0.1 mg/l GA<sub>3</sub> or 0.5 mg/l paclobutrazol 等處理培養基之三角錐瓶，每二個月繼代一次，培養六個月後

調查塊莖的生長情形，將培養所得之塊莖以 HPLC 偵測其 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量。

## 9. 植株之生長及健化

將具有約 0.5 cm 塊莖之植株，分別接種於 sucrose (3 % , 6 % ) 及 0.2 % Gelrite ，配合 1/2 X 及全量 MS ，培養於 250ml 三角錐瓶，光照下培養，每個月調查植株的生長情形。最後將具有葉片及根系的組培苗取出，用清水沖洗培養基後，以稀釋 1000 倍的億力浸泡 1 分鐘，隨即移植於滅菌過的栽培介質（蛭石：泥炭土 = 1:1 ）中，將植盆置於網室 [ 25/16 （日/夜），12 小時光照 ] 條件下，每天澆水二次以保持濕度，30 天後調查移植存活率。

## 10. 統計分析方法

### (1) 固體培養之統計分析方法

各處理間之比較，係以最小顯著差異測驗法 LSD (least significant difference test) 判定其差異性。塊莖的形成率以百分之九十五的信賴區間檢定其顯著性。

### (2) 懸浮細胞生長情形之偵測方法

自母瓶中取出固定量之懸浮細胞（連同培養基共約 5 ml），繼代培養於含有 20 ml 培養基之有臂三角瓶中（總體積約 25 ml），由培養當天開始，每隔 4 天測量懸浮細胞佔總培養基體積之刻度。測量之前需先使懸浮細胞靜止沉降於側管底部約 20 分鐘，再測量細胞之沉降體積 (packed cell volume, PCV)，並畫出其生長曲線圖以比較各

處理間之差異。圖上各個沉降體積之數值係重覆五次之平均值，並計算其標準偏差。

## 二、延胡索 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量測定

### (一)材料

- 1.市售延胡索乾燥藥材：1999 年 3 月購自臺中市健行路聯合中西藥局。
- 2.利用組織培養所得之延胡索癒合組織，經冷凍乾燥後，稱重備用。
- 3.細胞懸浮培養所得之延胡索檢品：係將細胞懸浮培養後所得之培養物，過濾，除去培養液，經冷凍乾燥後，稱重備用。
- 4.組織培養法所得之延胡索塊莖，經冷凍乾燥後，稱重備用。
- 5.成分標準品：
  - (1) corydaline(延胡索甲素)：購自建吾公司 (代理 法國 EXTRASYNTHESE )
  - (2) tetrahydropalmatine (延胡索乙素)：靜宜大學賴及黃由植物延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W.T. WANG) 之乾燥塊莖抽取純化而得 (抽取流程如附錄二)，其純度經鑑定超過 98%。

### (二)儀器

- 1.薄層層析 (TLC) 板：Silica gel 60 F254。
- 2.高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography)。

- (1)幫浦：Waters™ 600 controller。
- (2)自動注入器：Waters™ 717plus。
- (3)檢測器：Waters™ 996 photodiode array variable wave length detector。
- (4)分析軟體：Millennium 2010 chromatography manager (software and hardware)。
- (5)層析柱 (column)：RP-18, Inertsil ODS-3 (5 μm , 4.6 × 250 mm) (GL Sciences Inc., Shinjuku, Tokyo, Japan)。前端加保護管柱 (Guard-Pak™ pre- column)。

### 3.真空冷凍乾燥機 (U. S. A)

- (1)Tray drying Chamber FTS SYSTEM INC
- (2)STONE DIDGE N.Y 12484
- (3)DURA-TOP™
- (4)BULK DRAY DRYER
- (5)DURA-DRY™
- (6)CONDENSER MODULE

## (三)方法

### 1.標準品儲存溶液之製備

取 corydaline 及 tetrahydropalmatine 各 5 mg , 分別溶於 5 ml 甲醇 (CH<sub>3</sub>OH) 中, 以 0.45 μm 濾膜 (millipore) 過濾, 為含量 1 mg/mL 儲存溶液。

## 2. 檢品之製備

分別將冷凍乾燥之檢品（癒合組織、懸浮細胞、塊莖和市場品）取出研碎，以適量 methanol 為溶媒，浸漬過夜，經超音波震盪 10 分鐘，過濾並收集濾液，殘渣再加溶媒重複以上步驟萃取三次。將濾液合併，以真空減壓濃縮器濃縮，並用 methanol 將其成分溶出且定容至 5 ml，再以 0.45  $\mu\text{m}$  之濾膜過濾供 HPLC 檢測，以偵測其 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量。

## 3. 薄層層析法

在 TLC 板上分別點上 20  $\mu\text{l}$  的標準品、市售品延胡索及檢品溶液，以展開劑（n-butanol : glacial acetic acid : water = 4 : 1 : 5）在展開槽中展開 6 公分，於 UV light 366 nm 下，觀察斑點（圖 10）。

## 4. 高效液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography)

### (1) 分析條件

在室溫下以甲醇：水(含 0.4 % 硝酸，以三乙胺 triethylamine 調 pH 至 6.0) = 70 : 30 為流動相 (mobile phase)，流速 0.8 ml/min，檢測波長為 280 nm<sup>(184)</sup>。

### (2) 標準曲線之繪製

取 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之標準品，分別精確配製標準溶液之濃度為 5、10、20、40、60、80、125、250、500 及 750 mg/L，製得 10 個濃度之標準品溶液，各取 10  $\mu\text{l}$ ，供 HPLC 分析測定。每個濃度處理重

複注射三次進行分析，將 3 次總和加以平均，再以成分濃度為橫座標，峰面積為縱座標，迴歸檢量線(圖 11,12)，求得直線方程式如下

$$\begin{aligned} \text{corydaline} \quad Y &= 13287X - 24701 \\ R^2 &= 0.9987 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{tetrahydropalmatine} \quad Y &= 14080X - 56204 \\ R^2 &= 0.9986 \end{aligned}$$

### (3) 檢品的測定

將各種延胡索檢品，依照上述檢品製備方法及層析條件，注射 10  $\mu\text{l}$  於 HPLC 進行分析，重複次數為 3 次，採用標準法計算的 corydaline 及 tetrahydropalmatine 濃度(圖 13)。

### 三、延胡索體胚內部組織及外部形態之觀察

#### (一)石臘切片觀察體胚之發育

取不同大小之體胚，以 FAA (50 % ethanol : glacial acetic acid: formalin = 90:5:5) 固定 48 小時，經 TBA (t-butanol) 脫水後以石臘置換包埋。石臘置於手搖轉動式切片機 (Leitz, Germany) 切成 10  $\mu\text{m}$  厚度之連續蠟帶切片，再將切片以 Haupt's Adhesive 粘著於玻片上，置於恆溫 50 的加熱板中 24 小時，經 Delafieds hematoxylin method 染色，以加拿大膠 [ Canada balsam (Fluka, Buchs) ] 製成永久片。使用光學顯微鏡 [ Nikon UFX-II microscope (Japan) ] 觀察並照相。

#### (二)掃描式電子顯微鏡觀察體胚苗之外部形態

將培養五個星期之體胚苗，以鑷子小心取出置於掃描檯上，以液態氮急速冷卻固定後，再置入掃描式電子顯微鏡 [JEOL-JSM-6330F (Japan) ] 觀察並照相。