

做 PCR 产物的限制性片断长度多态性分析(PCR-RFLP),应注意以下 2 点:1)选适宜的引物:为了便于酶切位点的分析,最好选择扩增条带少、信号强、分子量大、稳定性好的引物。2)选合适的限制性内切酶:首先,应从内切酶的不同类型缓冲液(pH 值和 K、Na、Mg、Cl 离子强度不同)中,挑选与 PCR 反应所用缓冲液相匹配的缓冲液及其适合这种缓冲液的酶。其次,应选择识别序列较短的酶做工具,以便获得较多的切点,例如,按概率计算识别 4 碱基的限制性内切酶在 256 bp 的 DNA 片段有 1 个切点,1 kb 的 DNA 片段概率上有 3 个~4 个切点。

- 1 Palmer J D, *et al.* Theor Appl Genet, 1983; 65: 181
- 3 Williams J G, *et al.* Nucl Acids Res, 1990; 18: 6531
- 3 Welsh J, *et al.* Nucl Acids Res, 1990; 18: 7213
- 4 Pieter Vos, *et al.* Nucl Acids Res, 1995; 23: 4407
- 5 Gustavo Caetano-Anolles, *et al.* Bio Technology, 1991; 9 (6): 553
- 6 汪小全,等. 银杉的遗传多样性及系统位置的研究——兼论松科的系统分子学: [博士学位论文]. 北京: 中国科学院植物研究所, 1997: 29
- 7 Shaw PC, *et al.* Planta Med, 1995; 61: 466
- 8 Ozeki Y, *et al.* Natural Med, 1996; 50: 24
- 9 马小军,等. 中草药, 1998; (3): 191
- 10 Paul W. Skroch, *et al.* The Rapid Cyclist, 1985; 1(1): 9

(1997-12-08 收稿)

PCR-RFLP Method on Ginseng (*Panax ginseng*)

¹Ma Xiaojun, ²Wang Xiaoquan and ¹Xiao Peigen (¹Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract In order to identify homogeneity of RAPD (random amplified polymorphic DNA) products and to make full use of RAPD markers for the study of ginseng germplasm, it was tried for the first time, to digest PCR products produced by capillary PCR and their restriction sites determined effectively. Results showed that PCR-RFLP was a simple and useful method for screening distinctive molecular markers on *Panax ginseng* C. A. Mey, which provided a new tool for the study of germplasm of medicinal plants.

Key words *Panax ginseng* C. A. Mey germplasm PCR-RFLP

柿叶鉴别的实验研究

广西中医学院(南宁 530001) 甄汉深* 张三平** 唐维宏***

摘要 为更好地利用柿叶这一资源和评价其质量提供科学依据,采用性状、显微、化学、可见紫外分光光度法、薄层色谱法对柿叶进行鉴别研究。结果表明:这些方法可用于柿叶的质量控制。

关键词 柿叶 鉴别 显微 理化

柿叶为柿科植物柿 *Diospyros kaki* L. f. 的干燥叶。中医传统认为其味苦、酸、涩,性凉,具有清肺止咳,凉血止血,活血化瘀,降血压之功效,主要用于咳嗽,肺气肿,各种内出

血,高血压等症^[1]。柿叶的生药学鉴定,未见有显微、理化方面的报道,我们就此进行研究,报道如下。

1 仪器与材料

* Address: Zhen Hanshen, Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning

** 广西柳州市人民医院(545001)

*** 广西北海市中医院(536000)

UV-160A 分光光度计(日本岛津);紫外分析仪(日本岛津)。柿叶采自广西全州县郊区,经本院周子静教授鉴定为柿科植物柿 *Diospyros kaki* L. f. 的干燥叶。硅胶 G, 青岛海洋化工厂产品。齐墩果酸对照品: 由中国药品生物制品检定所提供。实验所用试剂均为分析纯。

2 实验内容

2.1 药材性状: 叶片多皱缩或破碎。完整叶片展平后呈卵状椭圆形、宽卵形或近圆形, 长 10 cm~15 cm, 宽 6 cm~10 cm, 先端渐尖或钝, 基部楔形至圆形, 全缘; 上表面灰绿色或黄棕色, 较光滑; 下表面颜色稍浅, 中脉及侧脉上面凹下或平坦, 下面凸起, 侧脉每边 5 条~7 条, 向上斜生, 将近叶缘网结, 脉上有微毛; 叶柄长 8 mm~20 mm, 质脆。气微, 味微苦涩。

2.2 显微特征

2.2.1 叶横切面: 上表皮细胞长方形; 下表皮细胞较少, 非腺毛、腺毛较多, 气孔可见。栅栏组织 1 列细胞。主脉维管束外韧型, 弯月状, 木质部导管常 4 个~7 个排列成行, 韧皮部较小; 主脉上下表皮内侧有若干列厚角细胞。主脉及叶肉中散有粘液细胞及草酸钙方晶(图 1)。

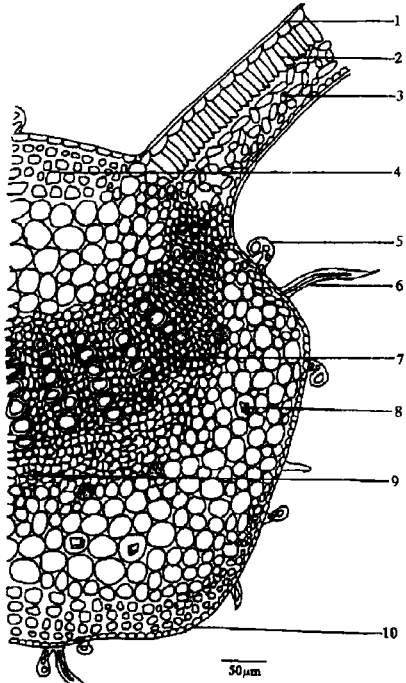
2.2.2 叶粉末: 上表皮细胞多角形, 垂周壁较平直, 气孔少见; 下表皮细胞较小, 垂周壁多稍弯曲, 气孔较密集。非腺毛、腺毛较多。表皮细胞内常存在棕黄色块状物, 有时脱离出来。草酸钙方晶较多。导管多为网纹、螺纹(图 2)。

2.3 理化鉴别

2.3.1 化学定性鉴别: 取本品粉末约 0.5 g, 置试管中, 加水 10 mL 振摇约 10 min, 静置, 过滤, 取滤液 5 mL, 加入硝酸银试液数滴, 出现混浊, 放置后有大量沉淀产生(检验维生素 C)。

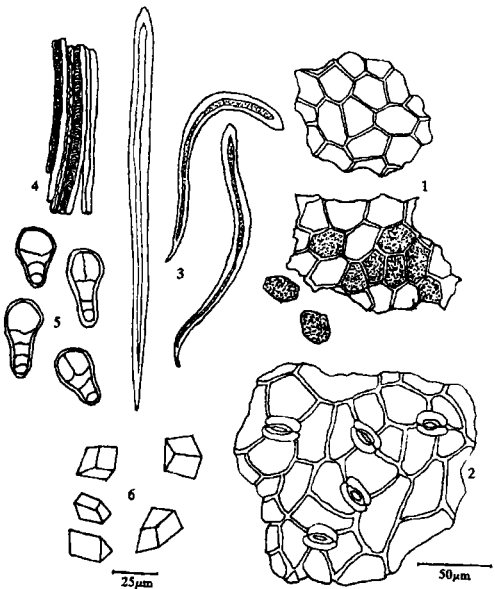
取本品粉末约 0.5 g, 加 60% 乙醇 10 mL, 水浴加热 10 min, 过滤, 取滤液 5 mL, 加入少量镁粉与盐酸 0.5 mL, 加热片剂, 滤液

由黄绿色变为红色(检验黄酮类成分)。



1-上表皮 2-栅栏组织 3-海绵组织 4-厚角组织
5-腺毛 6-非腺毛 7-木质部 8-草酸钙方晶 9-韧皮部 10-下表皮

图 1 柿叶主脉横切面组织图

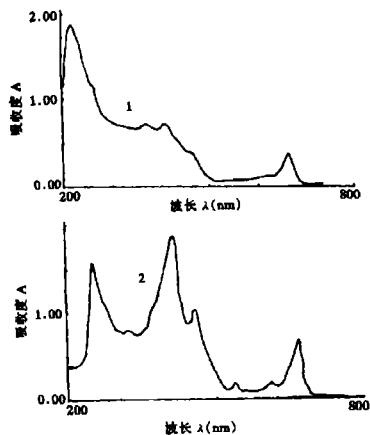


1-上表皮细胞, 示有的细胞内含棕黄色物
2-下表皮细胞 3-非腺毛 4-导管 5-腺毛
6-草酸钙方晶

图 2 柿叶粉末显微特征图

2.3.2 UV-Vis 鉴别: 取本品粉末适量, 分

别用 95% 乙醇、氯仿浸泡过夜, 过滤, 取滤液在 200 nm~800 nm 波长范围内进行光谱扫描。结果醇液在 218、370、412、664 nm 波长处有吸收峰; 氯仿液在 248、415、458、668 nm 波长处有吸收峰(图 3)。



1-95% 乙醇提取液 2-氯仿提取液

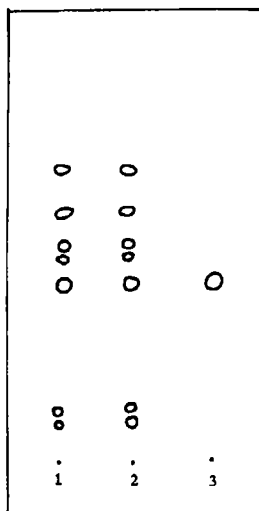
图 3 柿叶光谱图

2.3.3 TLC 鉴别: 样品供试液制备: 取本品粉末适量(约 5 g), 过 80 目筛, 以 95% 乙醇 50 mL 回流提取 3 h, 过滤, 滤液加盐酸 5 mL, 水浴回流水解 1 h, 滤过, 滤液用石油醚萃取 3 次(每次用 5 mL), 合并萃取液, 挥干石油醚, 残渣用无水乙醇 5 mL 溶解。

对照液制备: 取对照品齐墩果酸加氯仿制成 0.5 mg/mL 的对照液。

操作方法: 分别取上述样品液、对照液适量, 点于同一块硅胶 G-0.7% CMC-Na(1:3) 薄层板上, 以苯-乙酸乙酯(3:1) 为展开剂, 展开, 展距 12 cm, 晾干后喷以 10% 硫酸乙醇液, 于 90 °C 烘 10 min, 在可见光下观察, 两者在相同位置上为红色斑点; 在紫外光下(254 nm 或 365 nm 均可), 两者在相同位

置上为黄色荧光斑点(图 4)。



1、2-柿叶供试液 3-齐墩果酸对照液

图 4 柿叶 TLC 图谱

3 讨论

3.1 柿叶横切面组织及粉末特征较明显, 特别是草酸钙方晶、腺毛、非腺毛及表皮细胞形状, 内含物均可作为其鉴别特征。

3.2 据现代研究表明, 柿叶含有有机酸类化合物, 如齐墩果酸等, 还含有 Vit C、黄酮苷等成分^[1]。实验以 VitC、黄酮苷为指标对其进行化学反应鉴别, 以齐墩果酸为对照品对其进行 TLC 鉴别, 这些方法均灵敏, 重现性好。

3.3 在 UV-Vis 鉴别中, 可供鉴别的特征峰较多, 特别是氯仿提取液其在可见光区和紫外光区特征峰更明显。

我们认为上述研究, 可为今后制定柿叶质量标准提供科学依据。

参考文献

- 1 广西卫生厅. 广西中药材标准. 南宁: 广西科学技术出版社, 1992: 243 (1997-08-25 收稿 1998-05-04 修回)

《湖北中医杂志》1999 年征订启事

《湖北中医杂志》(月刊)是综合性中医药科技期刊, 由湖北中医学院主办, 国内外公开发刊。设有专家论坛、老中医经验、临床研究、报道、学术探讨、方药研究、针灸按摩、新药观察、验方新编、改革与管理、综述等栏目。本刊从 1999 年起由双月刊改为月刊, 每月 10 日出版。每册定价 2.50 元, 全年定价 30 元。统一刊号: CN42-1189/R。国内代号: 38-52, 国外代号: BM753。欢迎新老订户订阅。如读者在当地邮局订阅不便, 本社可代办邮购。地址: 武汉市武昌区云架桥 110 号湖北中医学院内 邮编: 430061 电话: (027)88910096