

3 讨论

DNA提取过程中多酚类物质的去除大多采取两类手段,一类是加酚类的结合剂,如PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、PVPP(聚乙烯聚吡咯烷酮)、PEG(聚乙二醇);另一类是加抗氧化剂,如Vit G亚硫酸钠、二硫苏糖醇、巯基乙醇、半胱氨酸等,防止酚类氧化为醌类。本实验证明将两类方法组合起来可以有效去除多酚类杂质,其中PVP和Vit C组合效果最佳。

作者对G处理去除多酚的有效性和通用性进行了考察,试验提取了厚朴 *Magnolia officinalis* 药材(含有较多简单酚类)、牛膝 *Achyranthes bidentata* 药材(含有三萜皂苷、甾酮及多糖)和干叶(含鞣质)及木通科猫儿屎 *Decaisnea insignis* 干叶(含有大量鞣质),并用随机引物和特异引物(扩增ITS序列)进行扩增,效果均很好,故而该方法可推荐为去除酚类杂质的有效通用方法,而且,用PVP-40T预洗的过程中也可去除多糖类杂质^[5],所以也适用于含糖的材料,但该方法对DNA提取量的影响及更广泛的样本适用性还在考察中。

本实验发现的CTAB法加G处理可推荐为通用提取方法,但使用该方法时应注意:①PVP和Vit C都以固体形式加入最好,不能事先配成储存液,否则会与空气中的氧作用而失去效果。②丹参DNA提取时PVP和Vit C使用量分别为0.1g/g和1g/g(干材料),如果效果不好,二者可加倍量使用。③PVP与样本共研后,要用预冷清洗液,并冰置一段时间,也是防止氧化的手段。④加Vit C后溶液的pH值会下降至4~5,这样的条件下,CTAB提取效果不佳,必须将提取缓冲液的pH值调至近中性6~6.5。

参考文献:

- [1] 郭宝林,李家实,阎玉凝. 中药材DNA分子标记研究的技术问题I. 植物药基因组DNA的提取[J]. 中草药, 2000, 31(12): 951.
- [2] 顾红雅,瞿礼嘉,明小天,等. 植物基因和分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995.
- [3] 邹喻苹,汪小全,雷一丁,等. 几种濒危植物及其近缘类群总DNA的提取和鉴定[J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528-532.
- [4] Tan S-L, Dossett M, Katze M G. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots[J]. Bio Tech, 1998, 25(5): 796-801.
- [5] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

薄层扫描法测定烟叶中茄呢醇的含量

李烈¹,马振元²,钱秋霞,丛晓东^{2*}

(1. 中国药科大学,江苏南京 210038; 2. 山东省天然药物工程技术中心,山东烟台 210405)

茄呢醇(solanescol, 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35-九甲基-2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34-三十六烷九烯-1醇)是茄科植物烟草 *Nicotiana tabacum* L. 中含有的萜类有效成分,具有抗菌、消炎和止血作用,也是合成辅酶Q₁₀和Vit K₂的主要中间体,具有很好的应用价值。关于茄呢醇含量测定方法的文献报道较少,国外报道中主要用气相色谱法测烟叶中茄呢醇的含量^[1,2]。茄呢醇沸点大于300℃,需高温色谱柱,条件较为苛刻,不易推广。国内报道用HPLC示差折光检测仪来测定其含量^[3],示差折光检测仪检测灵敏度较低,对流动相温度变化非常敏感,可控性也差。本实验首次使用薄层扫描法对烟叶中茄呢醇含量进行测定。

1 仪器与试剂

CD-60型薄层扫描仪(德国DESAGA公司),定量毛细管(1μL, 2μL, CAMAG公司),烟草(采集自不同产地),茄呢醇对照品(Sigma公司,纯度>99%),高效薄层板(100mm×200mm,青岛海洋化工厂分厂),所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制: 取茄呢醇对照品28mg,精密称定,置于50mL容量瓶中,用正己烷定容,配成浓度为0.56mg/mL的对照品溶液。

2.2 供品溶液的配制: 取5g烟叶(30~40目,烘干至恒重,山东临沂),精密称定,置于50mL三角烧瓶中,精密加入40mL正己烷,超声30min,取上清液,过滤,弃去初滤液,取续滤液,作为供品溶液备用。

* 收稿日期: 2001-09-25

作者简介: 李烈(1976-)女,重庆人,中国药科大学生药学专业99届硕士研究生,研究方向为天然药物分析。

Tel 13851470035 E-mail junenow76@sina.com

2.3 薄层色谱条件: 薄层板: 硅胶 G 高效薄层板 (100 mm × 200 mm); 展开方式: 上行展开, 展距 10 cm; 湿度控制: 于层析缸中放置一装有 54% 浓硫酸的敞口烧杯; 展开剂: 正己烷-乙酸乙酯-乙酸 (4: 1: 0.5); 预饱和时间: 30 min; 显色剂: 香草醛-浓硫酸溶液, 喷湿润, 100 °C 烘 5 min 至斑点显色清晰, 茄呢醇斑点为紫色, Rf 值约为 0.55

2.4 薄层扫描条件: 双波长锯齿扫描, 光束狭缝 0.4 mm × 0.4 mm, 线性参数 $S_s = 3$, 灵敏度中等, 测定波长 $\lambda_s = 540$ nm, 参比波长 $\lambda_r = 700$ nm

2.5 标准曲线及线性范围: 精密吸取对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 μ L, 分别点于同一硅胶板上, 依法展开, 显色, 按拟定的扫描条件测定各斑点的峰面积值, 以峰面积积分值 (Y) 对点样量 (X) 进行线性回归, 回归方程为: $Y = 1221.243X + 81.41768$, $r = 0.9956$ 结果表明在 0.28~2.24 μ g 范围内, 点样量与峰面积积分值呈良好的线性关系。因标准曲线不通过原点, 所以用外标两点法计算所测样品的含量

2.6 精密度实验: 同板精密度试验: 精密吸取对照品溶液 2 μ L 点于硅胶 G 板上, 共点 6 个点, 展开, 显色, 扫描测定, $RSD = 2.3\%$ ($n = 6$) 仪器精密度试验: 对薄层板上同一斑点连续扫描 6 次, 结果 $RSD = 1.6\%$ ($n = 6$) 异板精密度试验: 精密吸取同一对照品溶液 2 μ L 点于 6 块不同的硅胶 G 板上, 依次扫描测定, 结果 $RSD = 2.1\%$ ($n = 6$)

2.7 稳定性实验: 精密吸取对照品溶液 3 μ L, 点于薄层板上, 展开, 显色后每 15 min 扫描一次, 结果 $RSD = 4.4\%$ ($n = 5$), 表明对照品在 1 h 内稳定。精密吸取样品溶液 3 μ L, 点于薄层板上展开, 显色后每 15 min 扫描一次, 结果 $RSD = 4.2\%$ ($n = 5$), 表明样品在 1 h 内稳定

2.8 重复性实验: 按 2.2 项下制备供试品溶液, 共 5 份, 精密吸取 3 μ L 与对照品溶液 1, 4 μ L 交叉点于薄层板上, 展开, 扫描测定, 结果平均含量为 0.36%, $RSD = 3.2\%$ ($n = 5$)

2.9 最低检测限: 取对照品溶液, 依次稀释成一系列浓度由高到低的溶液, 在上述色谱条件下点样 3

μ L, 取峰面积为噪音 3 倍时的浓度为最低检测浓度, 由此得检测下限: 0.10 μ g

2.10 加样回收试验: 取已测得茄呢醇含量的烟叶样品 (山东临沂) 共 5 份, 精密称定, 置于 50 mL 锥形瓶中, 分别精密加入对照品溶液 5 mL, 按供试品溶液制备方法制备。精密吸取 3 μ L 与对照品溶液 1, 4 μ L 交叉点于薄层板上, 展开, 显色, 测定, 计算加样回收率, 平均回收率为 95.6%, $RSD = 2.3\%$ ($n = 5$)

2.11 样品含量测定: 取不同产地样品按供试品溶液制备方法操作, 制备所需溶液。精密吸取样品溶液 3 μ L 与对照品溶液 1, 4 μ L 交叉点于同一薄层板上, 展开, 显色, 扫描, 测得 5 批样品中茄呢醇的含量, 见表 1

表 1 样品测定结果 ($n = 3$)

烟叶产地	茄呢醇含量 (%)	RSD (%)
山东临沂	0.360	1.6
云南大理	0.278	1.3
四川温江	0.286	2.1
贵州贵阳	0.370	0.9
湖南郴州	0.359	1.4
甘肃天水	0.205	1.2

3 讨论

3.1 经高效薄层色谱展开体系的反复摸索, 采用正己烷-乙酸乙酯系统时能使烟叶中茄呢醇斑点与上下其它斑点分开, 但是茄呢醇斑点有一点拖尾, 加入少量乙酸后能明显改善拖尾, 使斑点圆整

3.2 本实验采用硅胶 G 高效薄层双波长扫描法对烟叶中茄呢醇含量进行测定, 方法快速, 简便, 有较好的稳定性和重现性, 板间误差小, 回收率较好, 为烟叶中茄呢醇的质量分析和控制提供了方便、可靠的依据和方法

参考文献:

[1] Chamberlain W J, Severson R F. Determination of solanesol in tobacco by capillary gas chromatography [J]. J Chromatogr, 1990, 513: 55.
 [2] Severson R F, Ellington J J, Schlotzhauer P F, et al. Gas chromatographic method for the determination of free and total solanesol in tobacco [J]. J Chromatogr A, 1997, 139: 269.
 [3] 赵瑾, 王超杰, 孙心齐. 高效液相色谱法测定烟叶中茄呢醇的含量 [J]. 色谱, 1997, 15(6): 544.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和新闻出版署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确,必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”的广告。

医药专业媒体是指具有国家新闻出版管理部门批准的具有国内统一刊号 (CN 号), 由医药卫生科研教育机构、学术团体等主管部门主办的, 以医药卫生专业技术人员、管理人员为主要对象的医药卫生类报刊 (不含面向大众的科普刊物)

《中草药》杂志欢迎制药企业来函来电刊登广告!