

图 4 切口外缠膜对嫁接成活率的影响

Fig. 4 Effect of incision twisted with parafilm on survival rate of shoot-tip grafting

的愈伤组织可快速填满伤口,明显提高嫁接成活率。

3 讨论

柑桔属植物的病害较为严重,如黄龙病是由类细菌(类菌原体)侵染所致,以木虱作为传播媒介,是一种毁灭性的病害。现有的防治措施,主要是喷洒农药杀灭木虱及烧毁病株,从切断传染源方面来控制其蔓延,但对病害本身并没有有效的防治手段。同时农药残留超标,严重制约了高产、优质、低残留药材和水果的生产。因此,无病苗木的培育具有重要的意义。目前,柑桔属植物无病苗木的培育方法主要有热处理法、珠心胚培养、茎尖培养及茎尖微嫁接等 4 种。热处理法较为简便易行,但经处理后的苗木和接穗存活率较低,且对于病毒脱除困难^[7]。珠心胚培养会产生童期症状,且多变异^[8]。茎尖培养脱除病原体,在许多植物上获得成功并应用于生产,但柑桔属植物的离体实验表明,茎尖培养难以成活且存在生根难的问题^[5]。采用茎尖微嫁接可以克服此类困难,

自 Navarro 等^[2]首次应用于柑桔脱毒后,20 多年来得到了迅速的发展,并产生了巨大的经济效益。由于它既不会产生变异,也无童期现象,同时,又能脱除大部分病原体,因此已成为获得柑桔属植物无病原体苗木的最佳途径^[2~5]。通过茎尖微嫁接试验,笔者建立了佛手茎尖微嫁接方法,获得了较高的嫁接成活率,为培育佛手脱病原体苗奠定了基础。本实验首次报道佛手茎尖微嫁接技术,有关微嫁接苗病原体的检测及繁殖,还有待进一步研究。

References:

- [1] Xiao P G. *Modern Chinese Materia Medica I* (新编中药志 I) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [2] Navarro L, Roistache C N, Murashige T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for disease-free citrus [J]. *Am Soc Hort Sci*, 1975, 100(5): 471-479.
- [3] Mukhopadhyay S. Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting [J]. *J Hortsci*, 1997, 72(3): 493-499.
- [4] Song R L, Wu R J, Ke C. Elimination of the main citrus virus and virus-like diseases by shoot-tip grafting [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1999, 29(3): 275-279.
- [5] Dong G F, Li G G, Zhang L Y, et al. Studies on improving the successful frequency of shoot-tip grafting of Shatian Pomelo [J]. *Guihaia* (广西植物), 2001, 21(3): 273-276.
- [6] He H, Zhang G F, Pan C M, et al. New record of Huanglongbing on *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle in Guangdong [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2005, 35(2): 190-192.
- [7] Murashige T, Bitters P, Rangan T S, et al. A technique of shoot-apex grafting and its utilization toward recovering disease-free citrus clones [J]. *Hortiscience*, 1972, 7: 118-119.
- [8] Bransky R H. Citrus tristeza virus B popular in South Florida [J]. *Proc Fla State Hort Soc*, 1986, 99: 66-69.

海南胡椒药材的 HPLC 指纹图谱研究

张艳秋,洪金波

(海南省药物研究所,海南 海口 570314)

摘要:目的 建立胡椒药材的指纹图谱,为胡椒的质量控制提供新方法。方法 采用高效液相色谱法,选用 YMCC₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(65:35);体积流量为 1 mL/min;检测波长为 245 nm。结果 建立了胡椒药材的指纹图谱,并检测了不同来源 10 批胡椒药材 HPLC 指纹图谱,相似度较高,并且利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成了胡椒药材的对照指纹图谱,共有指纹峰 12 个,各色谱峰分离良好;对比分析 4 批市售胡椒粉 HPLC 指纹图谱与对照图谱的相似度。结论 所建立的胡椒药材的指纹图谱有良好的精密度、重现性、稳定性,适于胡椒的质量控制。

关键词:胡椒;HPLC;指纹图谱;相似度

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1084-04

收稿日期:2006-10-20

基金项目:海南省自然科学基金项目(20103)

作者简介:张艳秋(1962—),女,吉林人,研究员,研究方向为中药质量控制的方法学研究和新品开发。

E-mail: zyq@hifda.gov.cn

HPLC Fingerprints of *Fructus Piperis* from Hainan

ZHANG Yan-qi, HONG Jin-bo

(Hainan Institute of Materia Medica, Haikou 570314, China)

Key words: *Fructus Piperis*; HPLC; fingerprint; similarity

胡椒为胡椒科胡椒属多年生藤本植物胡椒 *Piper nigrum* Linn. 的果实,主产国是印度、印度尼西亚和马来西亚。中国于 20 世纪 50 年代引入海南试种,主产地为海南岛和广东湛江地区。未成熟时干后果皮皱缩,黑色称黑胡椒;成熟时红色,去掉中果皮则为灰白色称白胡椒。胡椒可药食两用,日常用于调味或药用均以白胡椒为佳^[1]。胡椒始载于《新修本草》,其性热,味辛,有温中散寒、下气、消痰之功效,用于胃寒呕吐、腹痛泄泻、食欲不振、癫痫痰多^[2]。现代药理研究表明,胡椒有明显的镇静作用,所含胡椒碱有对抗戊四唑惊厥及对抗电惊厥的作用,抗癫痫作用较强^[3,4];还能有效预防实验性动脉粥样硬化斑块的形成^[5]。

近年来,随着国际市场对胡椒需求的增加,海南胡椒的种植、加工比较活跃,产量也大幅度增长,但由于台风的影响,胡椒的产量并不稳定,质量也参差不齐。市售的胡椒和胡椒粉,掺假现象多见,肉眼不易识别,传统的分析方法仅能检测样品中胡椒碱的量,并不能客观、有效地评价或控制其质量,对纯度无法判断。而指纹图谱技术作为多组分复杂样品的有效的质量控制方法,可以反映出待测样品的整体性、特征性,目前已广泛被作为中草药及制剂的质量控制手段之一。本实验采用高效液相色谱法,研究并建立了胡椒药材(白胡椒)指纹图谱检测方法,对不同来源的 10 批胡椒药材进行分析对比,发现胡椒有 12 个共有指纹峰,通过分析建立了胡椒药材的对照指纹图谱。为胡椒与胡椒粉产品的质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂:美国 Waters 公司的高效液相色谱仪,紫外检测器 2487;KQ3200 超声波清洗器(上海洁净超声波设备厂);甲醇为色谱纯,江苏汉邦科技公司提供,水为自制超纯水。

1.2 对照品:胡椒碱,由中国药品生物制品检定所提供,批号:110775-200203。

1.3 样品来源:试验用胡椒药材均来源于海南本岛,从产地收集或市售购买,均经过鉴定确认为胡椒;胡椒粉不同品牌的瓶装市售产品,来源列入表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性:色谱柱为 YMC 的

表 1 样品来源
Table 1 Sample sources

样 品	购入地点	时间或批号	编号
胡椒 S1	海南琼海大陆镇	2003 年	Ha
S2	海口万福隆超市	2005 年	Hb
S3	海口市售	2005 年	Hc
S4	海南兴隆	2005 年	Hd
S5	赠送样品	2004 年	He
S6	海南琼海	2005 年	Hg
S7	海口市售	2005 年	Hh
S8	海南陵水	2005 年	Hi
S9	海南兴隆	2005 年	Hj
S10	海南文昌	2005 年	Hk
胡椒粉 1	超市(100%白胡椒)	2005-12-02	粉 1
2	超市(白胡椒)	2005-08-18	粉 2
3	超市(白胡椒、香料)	2005-05-20	粉 3
4	超市(白胡椒、香料)	2005-09-02	粉 4

C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(65:35),体积流量为 1 mL/min;柱温为室温,检测波长为 254 nm,理论塔板数以胡椒碱计不低于 4 500。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取胡椒碱适量,加甲醇制成胡椒碱约 60 μg/mL 的溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取胡椒药材经 60 ℃干燥 3 h 后粉碎,或直接称取过 100 目筛的胡椒粉 0.25 g,置 50 mL 棕色量瓶中,加甲醇约 30 mL 密塞超声提取 30 min,放凉,加甲醇至刻度,摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 测定方法:分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录 70 min 的色谱图,即得。

2.5 精密度试验:取同一份胡椒药材(样品编号 Ha)的供试品溶液重复进样 5 次,按上述色谱条件测定,比较不同色谱中各峰的保留时间和峰面积相对胡椒碱峰的比值,结果所标定的各色谱峰相对保留时间和峰面积比值基本一致,其 RSD 分别为 0.22%~1.1%和 0%~3.6%;与对照模式的色谱图比较,各色谱相似度均大于 0.999。

2.6 稳定性试验:取同一份胡椒药材(样品编号 Ha)的供试品溶液每间隔一定时间进样,比较不同色谱中各峰的保留时间和峰面积相对胡椒碱峰的比值,最后一次与第一次进样间隔时间为 5 d。结果所

标定的各色谱峰的相对保留时间和峰面积比值基本一致,其 RSD 分别为 0.22%~1.1%和 0%~3.6%;与对照模式的色谱图比较,相似度均大于 0.999,说明供试品溶液比较稳定。

2.7 重现性试验:取同一批胡椒药材(样品编号 Hi)均匀的粉末样品 5 份,分别精密称定,按供试品的制备方法制备供试品溶液,并分别按照上述色谱条件连续进样测定,以考察指纹图谱的重现性。数据处理结果表明,5 份样品所标定的各色谱峰的相对保留时间基本一致,RSD 为 0.16%~1.9%,与对照模式的色谱图比较,相似度均大于 0.999,说明方法的重现性良好。

2.8 胡椒药材的 HPLC 指纹图谱中特征峰的标定:根据 10 批不同来源的胡椒药材的 HPLC 指纹图谱检测结果,利用“中药色谱指纹图相似度评价软件”生成胡椒药材共有模式的对照 HPLC 指纹图谱(见图 1),其中共有特征峰有 12 个,量最高的 3 号峰为胡椒碱的指纹峰。

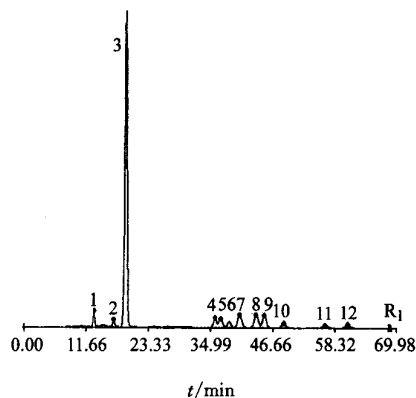


图 1 胡椒药材的对照指纹图谱

Fig. 1 Reference fingerprint of *Fructus Piperis*

2.9 不同来源的胡椒药材的指纹图谱相似度评价:采用“中药色谱指纹图谱相似度软件 2004A 版”评价系统,对 10 批不同来源的胡椒药材的 HPLC 指纹图谱检测结果进行数据处理,生成胡椒药材共有模式的对照 HPLC 指纹图谱(图 2 中 R_1),并通过“中药色谱指纹图谱相似度软件 2004B 版”评价系统,分析对比了 10 个样品的 HPLC 指纹图谱(图 2 中 S_{1-10})与胡椒药材共有模式的对照 HPLC 指纹图谱(R_1)的相似度,结果分别为:0.999、1.000、1.000、0.999、1.000、1.000、1.000、0.999、1.000,相似度极高,说明胡椒药材在岛内不同产区化学成分变化不大。

2.10 市售胡椒粉的指纹图谱与胡椒对照模式的指纹图比较:随机购买市售 4 种品牌的胡椒粉各 1 瓶,

分别进行 HPLC 指纹图谱分析,通过与胡椒药材共有模式的对照 HPLC 指纹图比较其相似度,结果表明,胡椒粉 1、2、3、4 号相似度分别为 0.980、0.771、0.727、0.640(见图 3)。不难看出 1 号相似度较高,说明 1 号为纯胡椒粉,其余则掺有其他物质。经与产品配料表核对发现,1、3、4 号胡椒粉标示配料与测试结果相符;2 号标示配料与测试结果不符。

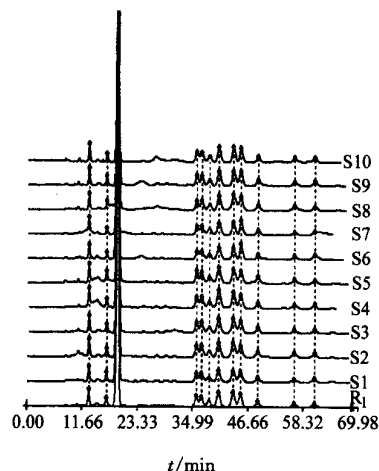


图 2 10 批不同来源的胡椒药材的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC Fingerprints of ten batches of *Fructus Piperis* from different sources

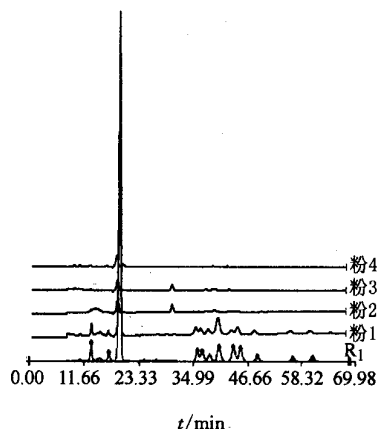


图 3 4 批市售胡椒粉的指纹图谱与对照指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of four batches of *Fructus Piperis* powder sold in market and their reference fingerprints

3 讨论

3.1 检测方法:由于胡椒中所含的主要活性成分为酰胺生物碱类,在 200~400 nm 可以有紫外吸收,因此,色谱指纹图谱建立选用紫外检测器。

3.2 对照品的选择:胡椒中胡椒碱量最高,且为活性成分,因此选择胡椒碱作为对照品。

3.3 流动相的选择:参考文献方法^[6],采用甲醇-水系统试验。以尽量多地检测到胡椒的成分峰为目的,

因其成分类型不复杂,经过试验选择甲醇-水(65:35)分析时间 70 min,即可达到较好的分离效果,多个样本分析结果表明,该分离系统产生的 HPLC 图谱能够标示出胡椒的 HPLC 指纹特征,故被选用。

3.4 检测波长的选择:试验过程中通过改变波长考察指纹图谱的出峰效果,结果表明 254 nm 测定的信息量多,特征最为明显,图谱中的各指纹峰信号强,分离效果较好。因此,选用该波长作为检测波长。

3.5 提取溶剂的选择:胡椒中主要含胡椒碱类生物碱成分,经过甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等溶剂提取试验,甲醇提取部分成分相对多,量高,故选择甲醇提取。

3.6 提取方法选择:采用超声提取与回流提取两种方法进行对比试验,结果表明相同提取时间,前者提取胡椒碱的峰面积高,而且一步完成操作减少转移过程的损失,又节约能源,故选择超声提取。并对比了样品的粉碎粒度,超声提取时间,最终选择用过 100 目筛的胡椒细粉,在棕色量瓶中直接加入溶剂超声提取 30 min,滤过后取续滤液直接测试。

通过以上 10 批胡椒的 HPLC 指纹相似度结果可以看出,海南岛内不同来源的胡椒指纹图谱相似度较高,均大于 0.99,说明药材组成一致性较好,质

量较稳定;但个别成分与胡椒碱的量比例有些不同,使用者可根据需要选择所需成分量的高低。此外,还对比分析了市售新鲜胡椒、经加热干燥的胡椒、黑胡椒的指纹图谱,与胡椒药材共有模式的对照 HPLC 指纹图谱比较其相似度均大于 0.99,无明显区别,只是黑胡椒各成分的量低于白胡椒;此外,陈年胡椒(Ha)指纹图谱中各成分与胡椒碱峰面积相对比值略低于存放时间短的各批,提示胡椒存放不宜过久。

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicia, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Toums 20. Beijing: Science Press, 1982.
- [2] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol I. 2005.
- [3] Guin G Z, Li J, Zhang Z Y, et al. Influence of piperine on CNS [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(4): 269-170.
- [4] Cui G Z, Pei Y Q. Analysis on Anti-experimental epilepsy action of piperine and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, 18(5): 675-680.
- [5] Bai Y Z. Preventive effects of piperine of experimental atherosclerosis in hypercholesterolemia rabbits [J]. *J Med Pharm Chin Minor* (中国民族医药杂志), 2002, 8(3): 35-36.
- [6] Rao G X, Yuan Z G, Wang J P, et al. Determination of piperine in medicinal plant of Piperaceae [J]. *Yunnan Coll Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 1995, 18(4): 7-8.

不同变异类型甘草中甘草苷及甘草酸量比较研究

杨全^{1,2}, 王文全^{1*}, 魏胜利¹, 解军波¹, 陈千良¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 对人工栽培群体不同变异类型甘草中甘草苷及甘草酸的量进行分析, 筛选优良的变异类型, 为甘草优良品种选育提供理论依据。方法 采用 HPLC 法, 以甘草苷、甘草酸量为检测指标, 对变异类型甘草药材样品进行比较分析。结果 甘草苷、甘草酸量在各变异类型甘草药材中的量存在较大差异。绿茎茎光滑类型、绿茎叶片皱褶类型甘草中甘草苷及甘草酸量较高。结论 甘草表型的变异已经引起了化学成分的变化, 可以通过筛选优良的变异类型, 培育高产、优质的甘草栽培品种。

关键词: 变异类型甘草; 甘草苷; 甘草酸

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)07-1087-04

Comparison contents between liquiritin and glycyrrhizic acid in different variant *Glycyrrhiza uralensis*

YANG Quan^{1,2}, WANG Wen-quan¹, WEI Sheng-li¹, XIE Jun-bo¹, CHEN Qian-liang¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Key words: variant of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; liquiritin; glycyrrhizic acid

收稿日期: 2006-11-06

基金项目: 国家自然科学基金(30400588); 北京市自然科学基金(6042021)

作者简介: 杨全(1972—), 男, 讲师, 在读博士研究生, 主要从事中药资源开发及利用方面的研究工作。

E-mail: yangquan7208@vip.163.com

* 通讯作者 王文全 Tel: (010)84738623 E-mail: wwq57@126.com