

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

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 具有清热解毒、止咳祛痰、补脾和胃、调和诸药等功效^[1],为常用大宗药材,是国家二级野生药材保护物种。由于过渡采挖,野生资源大幅减少,而人工栽培甘草因种子混杂、退化以及受生态环境、栽培技术体系不完善等因素影响,导致甘草药材的产量、质量参差不齐,制约着人工甘草大面积栽培。如何提高栽培甘草的药材质量,缓解甘草的供需矛盾是甘草研究中亟待解决的关键问题。通过药用植物优良品种选育,对栽培药用植物进行遗传改良,是提高栽培药材质量的根本有效措施^[2]。目前,甘草还未有新品种育成的报道,通过从现有野生群落或人工栽培群体中筛选药材质量优良的变异类型,培育成优良品种的方法是最为快速有效的途径^[3]。目前通过对菊花、人参、绞股蓝等药用植物优良变异类型的选择逐渐培育成优良品种已有报道^[4~6]。甘草在野生群落和人工栽培群体中,存在丰富的变异分化,不同甘草个体之间在根、茎、叶、花、荚果等器官外观形态存在显著的差异^[7]。这些不同变异类型间有效成分量是否存在差异未见报道。本实验以栽培管理措施一致的 4 年生人工栽培群体中不同变异类型的甘草为研究对象,采用 HPLC 法对不同变异类型甘草中甘草苷及甘草酸的量进行分析。揭示不同变异类型甘草与有效成分的相关性,筛选优良的变异类型,为甘草优良栽培品种的选育奠定理论依据。

1 药材、仪器与试剂

药材为 2005 年 8 月采自内蒙古杭锦旗人工甘草栽培试验基地 4 年生不同变异类型的甘草,由北京中医药大学刘春生副教授鉴定。

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,G1315B DAD 型紫外检测器,Chemstation 色谱工作站;色谱柱 Dikma C₁₈(250 mm×4.6 mm,5μm);BP211D 型电子分析天平;KQ500DE 型数控超声波清洗器。

甘草苷、甘草酸单铵盐对照品购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 111610,110731;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为高纯水。

2 方法

2.1 变异类型的划分:以文献对甘草形态特征的描述^[8]为依据,选择容易观察的茎表皮颜色、叶片平展或皱褶、茎表皮刺毛密度等 3 项指标进行变异类型的划分,设定每平方厘米的茎表皮刺毛数小于 10 根为稀刺毛,大于 10 根为密刺毛,无刺毛为茎光滑。共划分 6 个类型,类型名称见表 1。取样时分株进行编号,测定。测定部位均为主根。

表 1 甘草不同变异类型形态特征
Table 1 Characters of different variant types of *G. uralensis*

样品	变异类型名称	变异类型划分指标		
		茎表皮颜色	叶片	茎表皮刺毛
1	绿茎茎光滑类型	绿色	平展	无
2	绿茎叶片皱褶类型	绿色	皱褶	稀疏
3	普通类型	绿色	平展	稀疏
4	绿茎茎密刺毛类型	绿色	平展	密刺毛
5	紫红茎茎光滑类型	紫红色	平展	无
6	紫红茎茎光滑类型	茎基紫红色	平展	无

2.2 甘草苷的 HPLC 分析条件^[1]及标准曲线的制备:流动相为乙腈-0.5%冰醋酸(30:70);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 276 nm;柱温 25℃;进样量 10 μL。配制质量浓度分别为 0.065 66、0.328 3、0.656 6、0.984 9、1.313 2、1.641 5 mg/mL 的一系列甘草苷对照品溶液,进行 HPLC 分析,以甘草苷峰面积(Y)对甘草苷量(X)进行线性回归,回归方程 $Y=1\,602.3\,X-1.235\,5$ ($r=0.999\,9$),甘草苷进样量在 0.657~16.415 μg 峰面积与进样量呈良好的线性关系。5 号样品加样回收率在 96.94%~100.20% ($n=5$),平均加样回收率为 98.82%,RSD 为 1.28%,甘草苷的 HPLC 图见图 1。

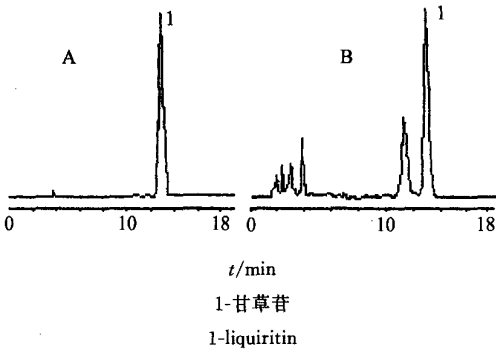


图 1 甘草苷对照品(A)及样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of liquiritin (A) and sample (B)

2.3 甘草酸的 HPLC 分析条件^[1]及标准曲线的制备:流动相为甲醇-0.2 mol/L 醋酸铵-冰醋酸(61:39:1),检测波长 250 nm;进样量 25 μL,其他条件同 2.2 项。配制质量浓度分别为 0.088 48、0.442 4、0.884 8、1.327 2、1.769 6、2.212 mg/mL 的对照品溶液,进行 HPLC 分析,以甘草酸峰面积(Y)对甘草酸量(X)进行线性回归,回归方程 $Y=787.47\,X-14.974$ ($r=0.999\,9$),甘草酸进样量在 2.21~55.30 μg,峰面积与进样量呈良好的线性关系。甘草药材 5 号样品加样回收率在 97.90%~100.01% ($n=5$),平均加样回收率为 98.35%,RSD 为 1.27%。甘草酸的 HPLC 图见图 2。

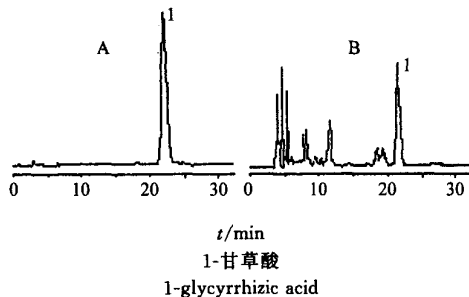


图 2 甘草酸对照品(A)及样品(B)色谱图
Fig. 2 Chromatograms of glycyrrhizic acid (A)
and sample (B)

表 2 不同变异类型甘草药材中甘草苷及甘草酸量比较(n=6)

Table 2 Comparison of contents between liquiritin and glycyrrhizic acid in different variant *G. uralensis* samples (n=6)

样品号	变异类型名称	甘草苷		甘草酸	
		质量分数/%	RSD/%	质量分数/%	RSD/%
1	绿茎茎光滑类型	2.452 5±0.100 3a	4.09	3.689 3±0.248 6a	6.74
2	绿茎叶片皱褶类型	1.834 5±0.156 0b	8.50	2.982 2±0.090 6b	3.04
3	普通类型	1.265 1±0.067 7c	5.35	2.133 3±0.207 5c	9.73
4	绿茎茎密刺毛类型	0.931 6±0.038 4d	4.12	1.545 4±0.043 6e	2.82
5	紫红茎茎光滑类型	0.745 0±0.017 6e	2.36	1.813 0±0.073 4d	4.05
6	紫红茎茎光滑类型	0.765 4±0.038 7e	5.06	1.802 0±0.109 2d	6.06
	平均值	1.332 3±0.635 1	47.67	2.327 5±0.783 8	33.68

表中同列不同字母表示显著差异(P<0.01)

Different letters in same line indicated significant difference (P<0.01)

表 3 变异类型甘草药材中甘草苷及甘草酸量方差分析表

Table 3 Variance analysis of liquiritin and glycyrrhizic acid in variant *G. uralensis* samples

类别		SS	f	MS	F	P
甘草苷	组间	14.031	5	2.806	974.980	<0.001
	组内	0.087	35	0.002		
甘草酸	组间	20.841	5	4.168	188.958	<0.001
	组内	0.662	35	0.022		

毛类型、紫红茎茎光滑类型、紫红茎茎光滑类型的甘草苷量较低,没有达到《中国药典》的标准。

3.2 甘草酸量比较:分析结果显示,不同类型药材中甘草酸量变化在 1.55%~3.69%,平均为 2.33%。其中绿茎茎光滑类型甘草苷量最高,超过《中国药典》规定量的近 1.5 倍,量最低的是绿茎茎密刺毛类型。

4 讨论

4.1 甘草苷及甘草酸是甘草中主要活性成分,其量的高低可以判断甘草药材质量的优劣。上述研究结果表明,不同变异类型甘草中二者的平均量分别达到了《中国药典》2005 年版一部中规定的 1%、2% 的最低标准。但是,方差分析的结果显示,不同变异类型甘草药材中甘草苷及甘草酸的量变化较大。绿茎茎光滑类型、绿茎叶片皱褶类型甘草中甘草苷、甘草酸的量均高于其他变异类型,从有效成分量的高低

2.4 统计处理:用 SPSS11.5 for windows 软件进行数据处理。LSD 法分析变异类型间甘草苷、甘草酸量差异。

3 结果与分析

各类型药材中甘草苷、甘草酸量见表 2,方差分析结果见表 3。

3.1 甘草苷量比较:6 个类型药材样品中甘草苷量变化较大,在 0.75%~2.45%,平均为 1.33%。量最高的是绿茎茎光滑类型为 2.45%,超过《中国药典》规定的不低于 1%标准的近 2.5 倍。而绿茎茎密刺

角度看,其可以作为优良变异类型培育优质的甘草栽培品种。

4.2 甘草不同变异类型间甘草苷、甘草酸量的高低差异达到极显著的水平,说明甘草表型变异(分化)已经引起了药材化学成分的变化,这就为甘草品种选育工作提供了丰富的材料。通过优良变异类型的遴选,培育优质高产甘草栽培品种具有一定的可行性。

4.3 培育高产优质的品种是最基本、最可靠、最经济有效的增产手段,药用植物优良品种选育工作与农业和林业相比相对滞后,而药用植物品质(产量及药用成分)的优良性、均一性、稳定性和可控性是保证中药生产和中成药疗效的首要环节。甘草年需求量巨大,供需矛盾日益突出。但是,甘草从野生到栽培没有经过系统的人工选择,在生产上还没有真正意义上的栽培品种。本实验的结果为甘草选择育种提供了参考。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol. 1. 2005.
- [2] Wei S L. Study on licorice resources and their sustainable utilization in center and western area of China [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(3): 202-206.
- [3] Chen X H, Wei S L, Wang W Q. Germplasm resources and quality of Chinese crude drugs [J]. *Res Inf Tradit Chin Med* (中药研究与信息), 2003, 5(4): 11-14.
- [4] Guo Q S, Qian D W, He X Y, et al. Comparative study on

- internal quality of four cultivars of *Chrysanthemum morifolium* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27 (12): 896-898.
- [5] Zhao S J, Liu Y Z, Zhao Y H, et al. Multi-character general evaluation of Jilin yellow fruit ginseng [J]. *Spec Wild Econimal Plant Res* (特产研究), 1998, 4: 1-6.
- [6] Xiang S R, Hu W X, Zhang R F, et al. Breeding of Elite *Gynostemma pentaphyllum* varieties [J]. *Acta Agric Jiangxi* (江西农业科学), 1998, 10(4): 38-45.
- [7] Wang W Q. Studies on ecological characters of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and effects of ecological environment on its medical material quality [A]. *Beijing Forestry University Doctoral Dissertation* (北京林业大学博士论文) [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2000.
- [8] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 42(2). Beijing: Science Press, 1998.

决明多倍体的诱导与鉴定

丁如贤¹, 郑水庆^{1*}, 邢爱婷¹, 张汉明¹, 陈万生²

(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 第二军医大学长征医院, 上海 200003)

决明子为豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *C. tora* L. 的干燥成熟种子, 为我国常用中药。性微寒, 味甘、苦、咸。归肝、肾、大肠经。具有清肝明目、润肠通便的功效。常用于治疗目赤肿痛、头痛眩晕、目暗不明、大便秘结等不适症状。现代药理研究证明决明子具有明目、降血压、降血脂、保肝、泻下等药理作用^[1]。

多倍体植物由于其遗传物质的剂量效应, 植物的营养器官变大, 有效成分增加, 抗逆性增强, 对以收获根、茎、叶的药用植物来说其巨大的优越性为广大的科研工作者所接受^[2]。这种技术已成功地应用于多种药用植物的育种, 获得了许多新的品系和种质资源。同时许多学者认为, 并且大多数的实验也证实: 人工诱导的多倍体种子发芽率低, 种子的粒重增加, 但整株乃至亩产的产量是呈下降趋势, 认为对以收获果实和种子的药用植物来说这是致命的缺点, 也是限制其应用的主要原因之一, 所以其成功的育种增产报道并不多见^[3,4]。本研究进行化学多倍体诱变育种, 以期获得多倍体决明, 提高中药材决明子的产量, 改善质量, 获得新的种质资源, 为获取以收获种子为目的的高产、优质人工多倍体药用植物提供理论方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 决明种子购自河北安国药材种植试验场, 经笔者鉴定为决明 *C. obtusifolia* L.。

1.2 多倍体诱导: 将决明种子播种于泥炭土-蛭石

(3:1) 中, 置 25℃ 左右温度下萌发, 当两片子叶完全展开后, 用滴管将秋水仙碱溶液滴于顶芽, 并罩上罩子。当溶液蒸发变少时, 继续滴加, 直至达到所需处理时间。然后用蒸馏水清洗处理部位。在室温生长 20 d, 然后移栽进大田, 生长发育直至获得种子, 完成整个生长周期, 以获得多倍体决明种子。

1.3 处理幼苗的生物学性状: 定期观察记录幼苗生长发育情况, 于花期测量叶长、叶宽、株高、植株分支, 并记录花期、果期和果实形态, 测量果实、种子大小。

1.4 染色体鉴定: 将处理后得到的诱导株种子和未处理的对照决明种子, 于 25℃ 温水浸种后, 置培养箱发芽, 约 5 d 后胚根长至 1~2 cm 时, 剪下用 0.2% 秋水仙碱溶液于 4℃ 预处理(最好 8:00~9:00) 2 h 左右。然后用卡诺固定液(无水乙醇-冰醋酸, 3:1) 固定 24 h, 经固定后的材料转入 50% 乙醇, 然后用蒸馏水清洗, 再用 1 mol/L 盐酸 60℃ 解离 10 min。解离后的材料用蒸馏水洗 3 次, 转入 45% 醋酸中软化 10 min, 碱性品红染色压片。经镜检挑选染色体分散良好的细胞, 经二甲苯浸泡, 再用光学树胶封片, 观察并摄影。

2 结果与分析

2.1 染色体鉴定结果: 观察 50 个以上可准确计数染色体的分裂中期细胞, 对照决明染色体数目为 $2n=2x=28$, 与文献报道一致^[5], 诱导株的染色体数目为 $2n=4x=56$, 见图 1。

2.2 秋水仙碱处理时间的影响: 根据诱导其他植物

收稿日期: 2006-11-12

作者简介: 丁如贤(1963—), 男, 江苏南通人, 副教授, 主要从事药用植物生物工程工作。

Tel: (021) 25074572 E-mail: rxding@smmu.edu.cn

* 通讯作者 郑水庆 Tel: (021) 25074574 E-mail: sqzheng@smmu.edu.cn