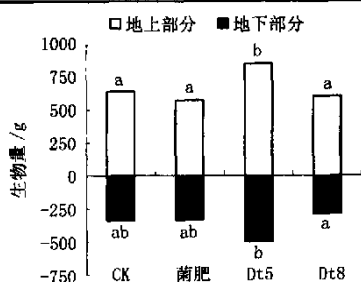


表4 小区试验中不同接种处理对组培苗茎粗的影响

Table 4 Effect of inoculations on diameter of test-tube plantlets in plot test

处 理	茎粗增加的百分数/%					
	30 d	检 验	60 d	检 验	90 d	检 验
CK	45.00	a	119.75	a	147.73	a
菌肥	75.00	b	157.93	a	222.22	b
Dt5	64.59	ab	144.89	a	218.75	b
Dt8	43.75	a	120.00	a	165.56	a

图1 小区试验中不同接种处理对组培苗生物量的影响 (不同小写字母表示部分生物量差异显著 $P < 0.05$)Fig. 1 Effect of inoculations on biomass of test-tube plantlets in plot test (different letters mean significant difference, $P < 0.05$)

中地上部分鲜质量达到 852.00 g/100 丛, 比对照增加 32.78%; 地下部分鲜质量达到 496.67 g/100 丛, 比对照增加 49.30%, 而接种 Dt8、接种细菌菌肥对生物量都没有显著影响。

从小区试验来看, 菌根真菌 Dt5 是杯鞘石斛组培苗的有益共生菌, 接种效果在整个试验阶段都明显, 能与根系形成共生关系而持续发挥作用, 增加根

际范围, 促进石斛对基质养分的吸收。细菌菌肥在施用后一段较短的时间内, 对组培苗茎的生长有促进作用, 但由于没有追施, 在根际的特殊效应不能持续, 付开聪等^[4]也有相似的看法。随着土著微生物群的恢复和发展, 菌肥的接种效应会被逐渐削弱, 因而试验进行一年后细菌菌肥对石斛生物量的作用并不显著。

3 小结

通过杯鞘石斛组培苗接种细菌菌肥和菌根真菌的盆栽和小区试验, 可以发现兰科菌根真菌 Dt5 的接种效果最好, 对入药部分茎的生长有显著促进作用, 年产量明显高于对照和其他接种处理。另外, 施用细菌菌肥的短期效果比较明显, 能在一定程度上增加石斛组培苗的株高和茎粗。

References:

- [1] Zhang Z G, Liu H, Wang L, et al. Studies on culture condition for proliferation of *Dendrobium candidum* protocorm [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(8): 431-433.
- [2] Fan L, Guo S X, Cao W O, et al. Isolation, culture, identification and biological activity of *Mycena orchidicola* sp. Nov. in *Cymbidium sinense* (Orchidaceae) [J]. *Acta Mycol Sin* (真菌学报), 1996, 15(4): 251-255.
- [3] Guo S X, Cao W Q, Cao H H. Isolation and biological activity of mycorrhizal fungi from *Dendrobium candidum* and *D. nobile* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(6): 338-340.
- [4] Fu K C, Feng D Q, Zhang S Y, et al. Studies on high production technology in scale cultivation of *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(4): 177-179.

HPLC-ELSD 法测定黄芪药材中黄芪甲苷

徐希科, 李慧梁, 柳润辉, 苏 娟, 张 川, 周 耘, 张卫东*

(第二军医大学药学院, 上海 200433)

黄芪为常用补气药, 是我国重要的传统药材。《中国药典》规定, 药用黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *nongholicus* (Bunge) Hsiao 及膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根。黄芪中含有多数化学成分, 如皂苷类、黄酮类、木脂素类、氨基酸

类、多糖类及多种微量元素等^[1]。研究表明黄芪甲苷具有降血压、镇静、镇痛及抗氧化等作用^[2~4], 是黄芪的主要活性成分, 因此黄芪甲苷常作为指标性成分应用于黄芪药材的质量监控。我国黄芪药用资源丰富, 在华北大部分省区均有大面积种植。本实验采用 HPLC-ELSD 法对全国 5 个省共 10 个产地的人

收稿日期: 2005-01-23

基金项目: 国家“863”项目 (2003AA2Z3507); 上海市科技发展基金攻关项目 (02DZ19147, 03DZ19503, 04DZ19843-3, 04DZ19856, 04DZ19857)

* 通讯作者 张卫东 Tel: (021)25070386 E-mail: wdzhangy@hotmail.com

工种植黄芪药材中的黄芪甲苷进行测定。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AT 型输液泵;法国 SEDEX 55 型蒸发光散射检测器(ELSD);美国 HP3395 型积分仪。AB-8 型大孔吸附树脂为天津南开大学化工厂生产。

乙腈为色谱纯;水为重蒸馏水;甲醇为分析纯;乙醇为化学纯;黄芪甲苷对照品(供测定用)由中国药品生物制品检定所提供,批号为 0781-200010。

根据药材不同来源,将其依次编为 1~10 号,原植物由第二军医大学生药教研室张汉明教授鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 及膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge.。供试品来源详见表 1。

表 1 供试品来源

Table 1 Source of tested sample

编号	产地	品种	采集时间
1	黑龙江佳木斯	膜荚黄芪	2000-11
2	黑龙江伊春	膜荚黄芪	2000-11
3	甘肃陇西 GAP 基地	膜荚黄芪	2000-11
4	甘肃陇西	蒙古黄芪	2000-11
5	河北保定	膜荚黄芪	2000-11
6	河北安国	膜荚黄芪	2000-11
7	内蒙满洲里	蒙古黄芪	2000-11
8	内蒙包头	蒙古黄芪	2000-11
9	山西朔州	膜荚黄芪	2000-11
10	山西大同	膜荚黄芪	2000-11

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱;流动相乙腈-水(36:64);体积流量:0.8 mL/min;进样量 20 μL,检测器漂移管温度为 35℃,载气压力为 2.0×10⁵ Pa,柱温为(25±1)℃。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取黄芪甲苷对照品约 100 mg,用甲醇配成 2 mg/mL 的溶液,作为储备液。

2.3 供试品溶液的制备:取本品粗粉约 2.0 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加甲醇 40 mL,冷浸过夜,再加甲醇适量,回流 4 h,提取液回收甲醇并浓缩至干,残渣加水 10 mL,微热使溶解,放冷。通过 AB-8 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,长 12 cm),以水 50 mL 洗脱,弃去水液,再用 40%乙醇 30 mL 洗脱,弃去 40%乙醇洗脱液,继用 70%乙醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣用甲醇定容至 2 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,续滤液为供试液。其色谱图见图 1。

2.4 线性范围考察:分别精密吸取上述对照品溶液 10.0、7.5、5.0、2.5、1.25 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,进样 20 μL,以进样量的自然对数值为横坐标(X),峰面积的自然对数值为纵

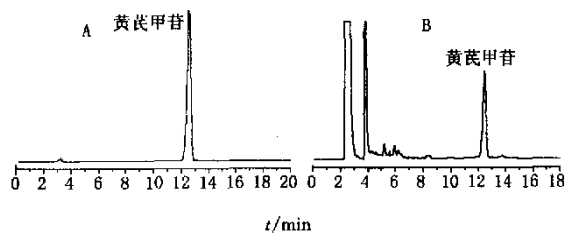


图 1 对照品(A)及样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

坐标(Y),回归方程为: $Y=1.345 X+11.284$, $r=0.9997$ ($n=5$)。黄芪甲苷在 5~40 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取供试品溶液,重复进样 6 次,结果所得黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 1.68%。

2.6 稳定性试验:取供试品溶液分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定,峰面积的 RSD 为 1.52%,表明黄芪甲苷在 24 h 内基本稳定。

2.7 重现性试验:精密称取黄芪样品共 7 份,按 2.3 项制成供试液。结果黄芪甲苷平均质量分数为 0.475%,RSD 为 1.17%。

2.8 加样回收试验:采用加样回收法,精密称取已知黄芪甲苷量的黄芪样品约 1 g,分别精密加入 1.0 mg/mL 黄芪甲苷对照品溶液(0.4、0.4、0.4、0.5、0.5、0.5、0.6、0.6、0.6 mL),按 2.3 项方法制成 2 mL 供试品溶液,按 2.9 项下方法测定、计算,求得黄芪药材中黄芪甲苷的平均回收率为 98.56%,RSD 为 1.42%($n=9$)。

2.9 测定方法:分别精密吸取对照品溶液 10、20 μL 及供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪中,将峰面积及对照品进样量均取自然对数后采用外标两点法进行计算,求出供试品的质量分数。测定了 10 批样品,结果见表 2。

表 2 不同产地黄芪药材中黄芪甲苷($n=3$)

Table 2 Determination of astragaloside IV in *Radix Astragali* from different habitats ($n=3$)

编号	产地	品种	黄芪甲苷/ (mg·g ⁻¹)	RSD/%
1	黑龙江佳木斯	膜荚黄芪	0.432	1.7
2	黑龙江伊春	膜荚黄芪	0.467	1.6
3	甘肃陇西 GAP 基地	膜荚黄芪	0.658	1.6
4	甘肃陇西	蒙古黄芪	0.623	1.6
5	河北保定	膜荚黄芪	0.325	2.1
6	河北安国	膜荚黄芪	0.484	1.8
7	内蒙满洲里	蒙古黄芪	0.451	1.6
8	内蒙包头	蒙古黄芪	0.442	1.3
9	山西朔州	膜荚黄芪	0.479	1.7
10	山西大同	膜荚黄芪	0.486	1.6

3 讨论

目前黄芪甲苷的测定主要采用薄层扫描法,如2000年版《中国药典》收载黄芪药材中黄芪甲苷的测定方法即为 TLCS 法,但其操作繁琐,重现性差。黄芪甲苷最大紫外吸收波长 $\lambda_{\max}=200.8\text{ nm}$,为末端吸收,不适用于紫外吸收检测器测定。蒸发光散射检测器(ELSD)作为 HPLC 法的一种检测器,对无紫外吸收的物质较为适用,因此,参照高效液相色谱法(《中国药典》2000 年版一部附录 VI D),经对比文献报道的黄芪甲苷测定方法,并经过反复优化,建立了黄芪甲苷的高效液相-蒸发光散射法测定方法。经过对线性范围、精密度、供试品溶液稳定性、重现

性、回收率等方法学考察,证明本方法操作简便、准确可行。

References:

- [1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine. China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [2] Luo Y M, Qin Z, Hong Z, et al. Astragaloside N protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 363: 218-223.
- [3] Zhang Y D, Wang Y L, Shen J P, et al. Anti-inflammation and decompression activity of astragaloside N [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1984, 19(5): 333-337.
- [4] Zhang Y D, Wang Y L, Shen J P, et al. Analgesia and sedation activity of astragaloside N [J]. *J Nanjing Med Univ* (南京医学院学报), 1984, 4(4): 225-227.

HPLC 法测定草木犀中香豆素

张兴福¹, 薛 艳², 张铁军², 袁 丹¹

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

草木犀为豆科(Leguminosae)草木犀属(*Melilotus* Mill.)一年或两年生草本植物,该属植物全世界约有20种,其中黄香草木犀 *M. officinalis* (L.) Desr. 主要分布于温带、亚热带、欧亚大陆及地中海地区,是家畜重要的优质牧草之一,同时民间以叶、花制成软膏,用作外伤药;或煎服用于治疗浮肿、腹痛、疟疾等症^[1]。具有止咳平喘、清热解毒、解痉止痛、化湿和中的功效^[2]。我国《部颁标准》、《藏药标准》和《上海市药材标准》有所收载。草木犀中主要有效成分为香豆素(coumarin),目前该成分的定量分析方法主要为紫外分光光度法,薄层扫描法和高效液相色谱法^[3]。以高效液相色谱法最为简便、快速、准确。因此,本试验建立了一种快速、简便、准确的 HPLC 测定方法,并对不同产地、采收时期及草木犀不同部位中的香豆素进行了测定,对控制草木犀的质量、合理的采收期和 resource 利用具有理论意义和实用价值。

1 材料与仪器

1.1 材料:草木犀分别采自江苏(苗期、成熟期)、天津(军粮城、蓟县、汉沽)、南戴河、内蒙古、青海,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为黄香草木犀 *M. officinalis* (L.) Desr. 和白花草木犀 *M. albus* Desr.。香豆素对照品由 Sigma 公司提供,质量分数

为99%。乙腈为色谱纯,购自天津市康科德科技有限公司,水为去离子水,用时均过微孔滤膜,其他试剂为分析纯。

1.2 仪器:高效液相色谱仪:DIONEX 液相系统,变色龙色谱工作站;分析柱:天河-C₁₈(250 mm×4.6 mm,10 μm)。

2 方法及测定结果

2.1 色谱条件:色谱柱为天河-C₁₈(250 mm×4.6 mm,10 μm);流动相:乙腈-水-冰醋酸(20:80:1);体积流量为1.0 mL/min;检测波长为273 nm,柱温为室温;进样量20 μL。按外标法测定。色谱图见图1。

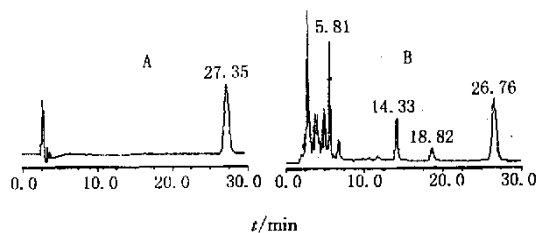


图1 香豆素对照品(A)及样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of coumarin reference substance (A) and samples (B)

2.2 对照品溶液的制备:精密称取香豆素对照品3.22 mg,于100 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为储备液,精密吸取2 mL,于10 mL量瓶中,加