

情况下可保持数年不落。

笋芽的直径生长缓慢而平稳,即使高生长停止后,直径生长也未迅速增粗。在引种地栽培过程中,茎粗细比较均匀,茎的中间部分“鼓槌”状不明显,并且无翼状叶鞘包被或不明显。而野生条件下的当年生茎株“鼓槌”状明显,银白色翼状叶鞘包被茎株可达1~2年,到第三年时才慢慢脱落,因此新老茎株容易区分。

3 讨论

鼓槌石斛主要分布于云南南部至西南部,印度东北部、缅甸、越南、老挝和泰国也有分布。常生于海拔500~1700 m的疏林中树上或山腰至山脊的岩石上。

西双版纳地区,其野生资源在海拔1100~1400 m这一垂直带比较常见。本实验栽培观察的分株苗采自海拔1300 m处,年平均气温18.9℃,年平均降水量1496 mm,相对湿度80%,年平均日照时数2440.1 h,气候凉爽湿润。实验地海拔高584 m,平均气温22.2℃,最高月均温26.1℃,最低月均温16.0℃,年降水量1080.3 mm,平均相对湿度

80%,年日照时数2205.6 h(1975—1995年资料)。鼓槌石斛从高海拔1300 m的地区引种到低海拔584 m地区,亦能开花结果,并生长良好。随着天然林保护工程的实施,人们对生物多样性保护的意识逐渐增强,鼓槌石斛的人工栽培是保护野生资源免遭厄运的重要途径之一。鼓槌石斛的栽培基质为碎砖块的试种成功,一方面可利用西双版纳有着丰富的森林资源进行林下种植,不与农民争田地,充分节约和利用土地资源。另一方面,可便于管理,解决因树高而采收困难的问题。从而避免掠夺性采收发生,这对其野生资源保护有着重要意义。

References:

- [1] Chen X Q, Ji Z H, Luo X B. *Color Illustrated Handbook of Chinese Feral Orchid Plants* (中国野生兰科植物彩色图鉴) [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [2] Zeng S J, Hu S H. *Orchid Genus Dendrobium* (石斛兰) [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2004.
- [3] Wang T S, Lu Y M, Ma G X, et al. *In vitro* experiment of the chemical component in *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. inhibiting the growth of K562 tumor cell strain [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1997, 9(2): 1-3.

不同产地知母中皂苷类成分的测定

原 源^{1,3}, 陈万生^{2,3*}, 孙连娜^{1,3}, 郑水庆^{1,3}, 姜子洋¹, 张汉明¹

(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 第二军医大学附属长征医院 药学部, 上海 200003;

3. 第二军医大学 现代中药研究中心, 上海 200433)

知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的根茎, 始载于《神农本草经》, 列为中品。具有滋阴降火、润燥、滑肠的功效, 常用于外感热病、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘等症的治疗。知母的化学成分主要为甾体皂苷、双苯吡酮类、木脂素类、多糖类等, 活性成分主要是甾体皂苷^[1]。血小板聚集和血栓形成是缺血性心脏病损伤的重要原因, 现代药理研究证明, 知母皂苷 E₁、B-Ⅱ、B、AⅢ均能抑制血小板聚集, AⅢ的抑制活性最强^[2~4]。此外, 知母皂苷可明显改善大鼠脑缺血再灌注损伤引起的行为症状、缩小脑梗死体积、降低脑缺血大鼠脑水肿^[5], 还是很强的 Na⁺, K⁺-ATP 酶

的抑制剂, 并具较强抗病毒(流感 A-3 型)作用^[1]。现代生药学研究资料表明, 药用植物种内的变异是影响生药品质的重要因素, 在种的进化过程中, 不同产地知母因生长环境等多种因素的长期作用, 形态特征已发生分化^[6]。为探讨种内的变异是否会造成其化学成分的改变, 影响生药品质, 本实验选择知母中分得的4种甾体皂苷, 建立高效液相色谱-蒸发光散射法^[7], 考察测定不同产地知母中该类成分的变化。

1 仪器与试药

美国 Waters 510 型泵; 法国 SEDEX75 型蒸发光散射检测器(ELSD); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为双蒸水; SrA3dy 色谱数据工作站; 知母皂苷 E₁、知

收稿日期: 2005-12-20

基金项目: 上海市科委重大科技专项(03DZ19514)

作者简介: 原 源(1974—), 女, 山东省荣成市人, 博士, 主要从事中药质量控制方面的工作。 E-mail: yuanyuan74@mail.china.com

* 通讯作者 陈万生 E-mail: chenws@vnet.citiz.net

母皂苷 B-Ⅱ、知母皂苷 B、知母皂苷 AⅢ 对照品(自提,质量分数为 99%以上);知母生药采集于全国 10 个地区,生药来源见表 1。各批生药均经第二军医大学长征医院药学部陈万生副教授鉴定为百合科植物知母 *A. asphodeloides* Bunge 的干燥根茎。

表 1 知母样品

Table 1 Samples of *A. asphodeloides*

样品号	采收地	采收时间	测定时间
1	安徽亳州	2004-08	2004-09
2	河北易县	2004-08	2004-09
3	山东平度	2004-08	2004-09
4	山西沁县	2004-08	2004-09
5	内蒙古什克腾旗	2004-08	2004-09
6	河南济源	2003-08	2004-09
7	甘肃西峰	2003-08	2004-09
8	黑龙江哈尔滨	2003-08	2004-09
9	山西稷山	2003-08	2004-09
10	内蒙古兰浩特	2004-08	2004-09

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:依利特 Hypersil ODS C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:25℃;流动相:采用乙腈-蒸馏水梯度洗脱:0~10 min 乙腈 0%~30%,10~20 min 乙腈 30%~60%,20~30 min 乙腈 60%~100%;体积流量:0.8 mL/min;ELSD 检测器漂移管温度:40℃;载气流速:340 kPa。理论塔板数按知母皂苷 B-Ⅱ 计算应不低于 4 000。

2.2 对照品溶液制备:分别精密称取知母皂苷 E₁、知母皂苷 B-Ⅱ、知母皂苷 B、知母皂苷 AⅢ 对照品 12.02、10.00、12.80、10.20 mg,以水溶解,定容 10 mL 量瓶中,摇匀,配制成 1.202、1.000、1.280、1.020 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备:不同产地知母生药样品 60℃烘干,粉碎,过 10 目筛,分别精密称取 10 g,以 5 倍量 30%乙醇浸 24 h,渗漉,收集 24 倍量渗漉液,浓缩,定容至 100 mL,取 1 mL,稀释并定容于 25 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,滤液为供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备:精密吸取知母皂苷 E₁ 对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,进样 20 μL。以峰面积的常用对数为纵坐标,质量浓度的常用对数为横坐标,线性回归,回归方程见表 2。

精密吸取知母皂苷 B-Ⅱ 对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.5 mL 置 5 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,进样 20 μL。以峰面积的常用对数为纵坐标,质量浓度的常用对数为横坐标,线性回归,回归方程见表 2。

精密吸取知母皂苷 B 对照品溶液 0.1、0.3、0.6、0.8、1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,进样 20 μL。以峰面积的常用对数为纵坐标,质量浓度的常用对数为横坐标,线性回归,回归方程见表 2。

精密吸取知母皂苷 AⅢ 对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,进样 20 μL。以峰面积的常用对数为纵坐标,质量浓度的常用对数为横坐标,线性回归,回归方程见表 2。

表 2 知母皂苷的线性方程、相关系数与线性范围

Table 2 Linear equation, correlative coefficient, and linear range of saponins of *A. asphodeloides*

对照品名称	线性方程	r	线性范围/ng
知母皂苷 E ₁	$Y=1.168\ 9X+3.969\ 0$	0.999 2	120.20~1 202.00
知母皂苷 B-Ⅱ	$Y=1.499\ 8X+3.109\ 3$	0.999 7	400.00~1 000.00
知母皂苷 B	$Y=1.288\ 9X+3.700\ 6$	0.999 0	256.00~2 560.00
知母皂苷 AⅢ	$Y=1.002\ 6X+3.583\ 1$	0.997 5	102.00~2 040.00

2.5 稳定性试验:取知母皂苷 E₁、知母皂苷 B-Ⅱ、知母皂苷 B、知母皂苷 AⅢ 对照品混合溶液,于配制后的 0、4、8、12、24、48 h 测定,其峰面积积分值的 RSD 分别为 1.76%、1.32%、1.51%、1.48%。结果表明在 48 h 内稳定。

2.6 精密度试验:取同一份知母供试品溶液连续重复进样 3 次,测定峰面积积分值,计算知母皂苷 E₁、知母皂苷 B-Ⅱ、知母皂苷 B、知母皂苷 AⅢ 日内精密度的 RSD 分别为 1.38%、1.15%、1.73%、1.89%。另取同一份知母供试品溶液每日进样 1 次,连续重复 3 日,测定峰面积积分值,计算知母皂苷 E₁、知母皂苷 B-Ⅱ、知母皂苷 B、知母皂苷 AⅢ 日间精密度的 RSD 分别为 1.64%、2.15%、1.79%、2.32%。

2.7 重现性试验:取同一批样品精密称取 5 份,制备供试品溶液,测定峰面积得 RSD 值,分别为知母皂苷 E₁:0.76%;知母皂苷 B-Ⅱ:0.54%;知母皂苷 B:0.35%;知母皂苷 AⅢ:0.78%。

2.8 加样回收率试验:精密称取已测定量的知母样品约 1 g,定量加入知母皂苷 E₁、知母皂苷 B-Ⅱ、知母皂苷 B、知母皂苷 AⅢ 对照品,按供试品制备及测定方法操作,平均回收率及 RSD 为(n=3):知母皂苷 E₁:101.36%,1.83%;知母皂苷 B-Ⅱ:99.62%,1.92%;知母皂苷 B:102.71%,2.04%;知母皂苷 AⅢ:99.30%,2.36%。

2.9 样品测定:分别吸取对照品及各供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积,用外标法计算,色谱图见图 1,结果见表 3。

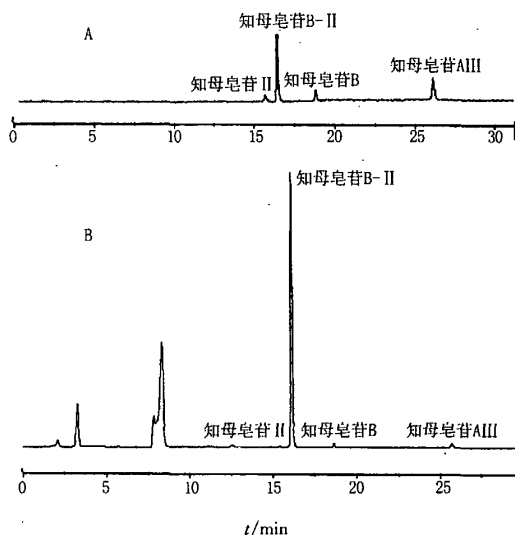


图 1 对照品(A)和供试品(B)HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatogram of references substances (A) and sample (B)

表 3 不同产地知母中皂苷测定结果((n=3)

Table 3 Determination of saponins of *A. asphodeloides* from various habitats ((n=3)

样品	知母皂 苷 E ₁ / %	知母皂苷 B-Ⅱ / %	知母皂苷 B / %	知母皂苷 AⅢ / %	4 种皂苷 和 / %
1	1.978 7	5.724 3	0.792 5	0.657 6	9.153 1
2	1.986 5	6.301 7	未检测到	0.382 4	8.670 6
3	1.135 7	5.389 1	未检测到	0.139 5	6.664 3
4	0.772 3	8.088 4	未检测到	0.305 5	9.166 2
5	1.005 7	4.832 8	未检测到	0.218 0	6.056 5
6	1.282 1	3.726 7	0.713 9	0.198 8	5.921 5
7	2.118 3	3.974 8	1.238 0	0.231 9	7.563 0
8	1.141 1	2.823 0	0.628 8	0.145 6	4.738 5
9	1.218 7	1.557 7	未检测到	未检测到	2.776 4
10	0.527 3	0.602 1	未检测到	0.528 3	1.657 7

3 讨论

知母中所含的皂苷类成分为甾体皂苷类,不含发色基团,没有紫外吸收,不适用紫外检测器。而 ELSD 是一种质量型通用检测器,其响应值与被测物质的官能团和光学性质无关,通用于各种物质。检测结果表明,其灵敏度与稳定性均能满足要求,ELSD 对于无紫外吸收或紫外吸收差的样品的检测,显示出了极大的优越性。

不同产地知母中的皂苷类成分量的差异较大。其中山西沁县、河北易县、安徽亳州所产知母中皂苷类成分量最高,可达 8.6% 以上,而其他产地较低,最低仅为 1.6%。

历代本草指出知母主要分布区域为河北、陕西、山西等黄河以北省区,道地药材产于山西沁县等地;而现代研究表明知母分布于华北、西北、东北地区,以河北易县所产为道地药材^[8]。古今说法虽然有出入,但其认为的道地药材的说法都在本实验中得到验证。笔者前期的研究表明^[6],气候、土壤等环境条件不同对知母的生长有着很大的影响,其形态特征已发生分化产生种内变异,本研究结果提示,知母的种内变异可能是其生药品质差异的重要因素之一。

知母皂苷 B 为知母皂苷 B-Ⅱ 变构产物,长时间存放,可致知母皂苷 B-Ⅱ 转化为知母皂苷 B。测定结果表明,2003 年采集的知母样品大多可测到知母皂苷 B,而在多数新采集的样品中未见;知母皂苷 B-Ⅱ 量高的,长时间存放后知母皂苷 B 量也较高。提示药材中知母皂苷 B 的量可能与知母皂苷 B-Ⅱ 的量高低及贮存时间有关联,采收后中药的贮存条件及时间也是非常重要的一个环节,会直接影响药材的品质。

References:

- [1] Yang L R. Research progress in chemical ingredient and pharmacological function of *Anemarrhena asphodeloides* [J]. *Foreign Med Sci; Tradit Chin Med Sect* (国外医学:中医中药分册), 2002, 24(4): 207-210.
- [2] Zhang J Y, Meng Z Y, Zhang M Y, et al. Effect of six steroidal saponins isolated from *anemarrhenae rhizoma* on platelet aggregation and hemolysis in human blood [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, 289(1-2): 79-88.
- [3] Knama N, Zhang J Y, Meng Z Y, et al. Effect of timosaponin E1 and E2 on superoxide generation induced by various stimuli in human neutrophils and on platelet aggregation in human blood [J]. *Clin Chim Acta*, 2000, 295(1-2): 129-140.
- [4] Zhao Y, Ma B P, Wang S Q, et al. Advances in the cardiovascular pharmacology studies of saponins [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2003, 38(1): 3-7.
- [5] Chen W S, Qiu Y, Yin X P, et al. The use of TTS to make the drug of preventing and curing stroke [P]. CN1451384, 2003-10-29.
- [6] Chen W S, Qiao C Z. The morphological variation in species of *Anemarrhena asphodeloides* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2000, 23(6): 311-314.
- [7] Shen L, Zhu H P, Song Q, et al. Determination of sarsasapogenin in crude *Anemarrhena asphodeloides* and its preparation by RP-HPLC-ELSD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(10): 889-891.
- [8] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1977.