

· 资源与鉴定 ·

基于连作障碍条件下穿山龙无机元素吸收规律及总皂苷含量分析

姚佳, 尹海波*, 赵容, 贾晓晴, 邵飞
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:探讨不同连作条件对于穿山龙的无机元素吸收及总皂苷含量的影响。方法:采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)对不同连作条件下的穿山龙药材与根际土壤中 17 种无机元素的含量进行测定,射频功率 1.3 kW,等离子体流量 15 L·min⁻¹,载气流量 1.16 L·min⁻¹,采样深度 8.6 mm,雾室温度 2 ℃,分析时间 3 s,测量数 3 次,排风量 5.0~7.5 m³·min⁻¹(4.7~8.1 m·s⁻¹);循环水的要求为流速 5 L·min⁻¹,温度 15~20 ℃,压力 230~350 kPa。利用紫外分光光度法测定穿山龙中总皂苷含量,检测波长 457 nm,通过 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行相关性分析。结果:穿山龙在正茬 2~4 年时,药材与土壤的无机元素呈显著相关;从连作一茬 1 年开始无明显相关性,药材中总皂苷含量亦呈下降趋势。结论:穿山龙随着连作年限的增加,其总皂苷的含量随之下落,说明连作障碍对药材中总皂苷的含量积累造成了影响,但与无机元素的变化无明显相关,说明无机元素只是造成连作现象的因素之一。

[关键词] 穿山龙; 土壤; 无机元素; 总皂苷; 相关性分析

[中图分类号] R282.2;R931.2;S344.4;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0061-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240061

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151028.1040.006.html>

[网络出版时间] 2015-10-28 10:40

Absorption Law of Inorganic Elements and Contents of Total Saponins in Dioscoreae Nipponicae Rhizoma Based on Continuous Cropping Obstacles Conditions YAO Jia, YIN Hai-bo*, ZHAO Rong, JIA Xiao-qing, SHAO Fei (School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of different continuous cropping conditions on inorganic elements absorption and content change of total saponins in Dioscoreae Nipponicae Rhizoma. **Method:** Seventeen kinds of inorganic elements in Dioscoreae Nipponicae Rhizoma and rhizosphere soil by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Determination of total saponins in Dioscoreae Nipponicae Rhizoma was ultraviolet spectrophotometry. Data were analyzed by SPSS 17.0 software. **Result:** Contents of inorganic elements in herbs of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma which was in rotation 2, 3, 4 years significantly correlated with soil. Continuous cropping stubble 1 years began to no significant correlation, and the content of total saponins showed downward trends. **Conclusion:** The content of total saponins in Dioscoreae Nipponicae Rhizoma is declining with increasing of continuous cropping time. These results show that continuous cropping affects the content of total saponins, but its content change has no obvious correlation with inorganic elements, which indicates that change of inorganic elements is just a factor for continuous cropping.

[Key words] Dioscoreae Nipponicae Rhizoma; soil; inorganic element; total saponins; correlation analysis

[收稿日期] 20150517(008)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(201402004);辽宁中医药大学杏林学者青蓝工程杰出青年基金项目(500213)

[第一作者] 姚佳,在读硕士,从事种质资源鉴定及中药的品质评价研究,Tel:13842610506,E-mail:yogi_apotoxin4869@126.com

[通讯作者] *尹海波,教授,硕士生导师,从事种质资源鉴定及中药的品质评价研究,Tel:15998530628,E-mail:yhb0528@sina.com

穿山龙收载于 2010 年版《中国药典》一部^[1-2], 有效成分为甾体皂苷类。其皂苷和皂苷元有抗肿瘤作用^[3-4], 并已被作为甾体激素药物和抗冠心病皂苷类药物的重要工业原料^[5]。除有机成分外, 无机元素也体现药用植物本身的生理特点, 对药材的生长和次级代谢产物的形成等机制产生影响^[6-7]。

由于市场的需求及盲目采挖, 穿山龙的野生资源匮乏, 目前主要由人工栽培获得。研究发现在该药材种植实践中由于采收年限的不同, 会造成药材质量不均、产量降低、品质变劣、生长状况变差、病虫害发生加剧等连作现象。本实验通过对不同连作条件下穿山龙药材与土壤中无机元素、药材中总皂苷的含量测定, 分析无机元素与连作障碍的相关性, 探讨连作障碍对于穿山龙总皂苷的影响, 为该药材的质量控制及规范化种植提供示范。

1 材料

7500a 型电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS, 美国 Agilent 公司), Milli-Q 型超纯水处理系统 (美国 Millipore 公司), CP225D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司), WD-9405B 型水平摇床 (北京市六一仪器厂)。

全定量分析多元素混合标准溶液 [Part#5183-4688, 含镁 (Mg), 钒 (V), 铬 (Cr), 锰 (Mn), 铁 (Fe), 钴 (Co), 镍 (Ni), 铜 (Cu), 锌 (Zn), 砷 (As), 镉 (Cd)], 内标 [Part#5183-4680, 含钙 (Ca), 钾 (K), 硒 (Se), 汞 (Hg), 铅 (Pb)] 和调谐液 [Part#5184-3566, 含 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 锂 (Li), 钪 (Sc), 锗 (Ge), 铋 (Bi), 铟 (In), 铊 (Tl)] 均购自安捷伦科技 (中国) 有限公司。薯蓣皂苷对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 纯度 > 98%, 批号 CF0227QA14), 硝酸、高氯酸和 HF 为优级纯, 水为超纯水 (电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega$) 或重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

穿山龙药材 2013 年 5 月收集于吉林省通化市头道镇, 分别采集于正茬 2, 3, 4 年; 连作一茬 1, 3 年; 连作二茬 4 年的种植区域, 经辽宁中医药大学尹海波教授鉴定为薯蓣科植物穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica*, 凭证标本保存于本院药用植物教研室。将 6 个不同连作条件下的穿山龙药材粉碎, 制成过 80 目筛的细粉。穿龙薯蓣根际土壤于 2013 年 5 月随药材采集, 采集地中采用 Z 字形 5 点取样法, 将 5 个点的 2~20 cm 土层的土壤混匀, 四分法取部分土样装于自封袋中, 干燥后过 80 目筛备用。

2 方法与结果

2.1 无机元素测定

2.1.1 药材消解 精密称定药材 0.3 g, 置于 250

mL 具塞锥形瓶 (5% 硝酸浸泡 24 h) 中, 加入混酸液 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (4:1) 30 mL, 小心摇动, 使混酸液面浸没样品, 置于摇床震荡 2 h, 至消化液透明澄清, 混酸剩至 2 mL 时为止, 冷却后用水稀释消化液并洗涤, 过滤至 50 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 备用。平行操作制备空白溶液。

2.1.2 土壤消解 称取样品 0.5 g 于 250 mL 具塞锥形烧瓶中, 加入混酸液 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HF}$ (4:1:1) 30 mL 浸泡过夜, 在电热板上小火慢慢加热消解至溶液约剩下 1~2 mL, 土壤样品变为灰白 (若样品还未变灰白, 则再加少量混合酸继续加热, 直到样品变为灰白), 放冷, 过滤至 25 mL 量瓶中, 用水反复多次冲洗锥形瓶和漏斗滤纸, 加水稀释至刻度, 摇匀静置后待测。平行操作制备空白溶液。

2.1.3 标准溶液的制备 分别精密吸取混合标准溶液 0, 100, 200, 300, 500 μL 至 100 mL 量瓶中, 用水定容, 得系列标准溶液。精密吸取内标溶液 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 用水定容, 得内标液。

2.1.4 仪器参数 射频功率 1.3 kW, 等离子体流量 $15 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 载气流量 $1.16 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 采样深度 8.6 mm, 雾室温度 $2 \text{ }^\circ\text{C}$, 分析时间 3 s, 测量数 3 次, 排风量 $5.0 \sim 7.5 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ($4.7 \sim 8.1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$); 循环水的要求为流速 $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 $15 \sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$, 压力 230~350 kPa。

2.1.5 线性关系考察 按 2.1.4 项下条件对 5 个质量浓度的标准溶液进行测定, 并扣除空白溶液测定结果, 结果表明各元素标准溶液相关系数 r 在 0.979 7~1.000 0。各元素线性关系见表 1。

2.1.6 样品含量测定 在半定量预试验基础上, 筛选出 17 种无机元素进行全定量分析, 结果见表 2。

2.1.7 相关性分析 利用 SPSS 17.0 统计软件对穿山龙药材及土壤中的无机元素进行相关性分析, 结果见表 3。

2.2 穿山龙总皂苷的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取薯蓣皂苷对照品 5.25 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称定穿山龙药材粉末 0.5 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加 30 倍量 75% 乙醇超声提取 2 次, 每次 30 min, 合并 2 次滤液, 浓缩后定容于 25 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

2.2.3 线性关系考察 分别精密移取 $1.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 薯蓣皂苷对照品溶液 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 mL 置于具塞试管内, 挥干溶剂, 各加入 5% 香草

表 1 各元素的回归方程及相关系数

Table 1 Regression equations and correlation coefficients of elements

元素	回归方程	<i>r</i>
Mg	$Y = 7.417X - 152.4$	0.999 9
K	$Y = 0.929X + 953.8$	0.999 8
Ca	$Y = 1.790 \times 10^{-3}X + 0.293$	0.999 3
V	$Y = 1.284X - 4.490 \times 10^{-2}$	0.999 7
Cr	$Y = 0.127X + 0.589$	0.999 7
Mn	$Y = 1.400X + 0.660$	1.000 0
Fe(56)	$Y = 1.131X + 200.2$	0.999 9
Fe(57)	$Y = 2.765X + 3.480$	0.999 8
Co	$Y = 6.487X - 1.352$	0.999 9
Ni	$Y = 1.456X + 3.769$	1.000 0
Cu	$Y = 3.510X + 1.162$	1.000 0
Zn	$Y = 8.915X + 0.704$	0.997 7
As	$Y = 0.914X - 0.648$	0.999 4
Se	$Y = 1.032 \times 10^{-2}X + 1.946 \times 10^{-2}$	0.999 8
Cd	$Y = 1.208 \times 10^{-1}X - 7.717 \times 10^{-2}$	0.999 5
Hg	$Y = 2.346X + 2.254$	0.979 7
Pb	$Y = 0.756X + 0.689$	0.999 2

表 2 不同种植条件下穿山龙和土壤中无机元素的含量测定 ($n = 3$)

Table 2 Content of each inorganic element in Dioscoreae Nipponicae Rhizoma and soil under different planting conditions ($n = 3$) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

无机元素	正茬 2 年		正茬 3 年		正茬 4 年		连作一茬 1 年		连作一茬 3 年		连作二茬 4 年	
	药材 1	土壤 1	药材 2	土壤 2	药材 3	土壤 3	药材 4	土壤 4	药材 5	土壤 5	药材 6	土壤 6
Mg	319.00	1.96	326.00	36.58	379.00	0.43	515.00	1.46	198	0.21	181	0.24
K	8 280.00	4 007.00	11 500.00	2 870.60	9 050.00	3 547.00	12 100.00	3 036.00	9 200.00	2 987.00	8 320.00	1 226.00
Ca	9 800.00	689.00	5 440.00	735.90	8 620.00	987.00	4 700.00	216.10	3 620.00	347.00	3 470.00	286.90
V	16.18	12.08	15.21	12.48	11.37	11.80	-	12.62	13.49	10.29	0.75	10.53
Cr	-	8.21	26.20	7.66	-	7.92	-	6.44	19.97	9.51	-	5.09
Mn	143.63	85.53	47.03	96.67	102.00	175.00	175.83	112.80	131.25	189.90	26.38	166.80
Fe(56)	7 370.00	6 010.00	2 210.00	6 310.00	4 370.00	6 690.00	591.00	6 030.00	2 360.00	8 070.00	877.00	5 720.00
Fe(57)	73.50	57.16	23.63	57.63	44.78	61.70	7.14	56.80	24.05	77.25	10.17	53.44
Co	2.35	4.46	4.36	4.21	1.17	4.66	0.79	3.64	1.71	1.10	0.55	2.71
Ni	8.29	15.16	9.47	13.39	7.54	13.10	3.84	7.28	6.46	0.21	5.12	6.46
Cu	9.34	4.31	36.48	0.20	10.65	0.79	12.55	0.11	13.99	0.11	11.99	2.40
Zn	41.98	8.90	40.73	7.90	29.58	4.39	69.60	8.53	35.05	2.96	33.63	1.02
As	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Se	0.13	15.34	0.02	24.84	0.05	23.30	0.06	30.53	0.28	48.03	0.10	28.24
Cd	-	-	-	-	-	-	-	0.83	-	-	-	-
Hg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pb	-	23.75	-	28.98	-	24.10	-	63.33	-	63.89	-	6.24

醛冰乙酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 混匀, 密塞, 置 60 ℃ 恒温水浴锅中显色 20 min, 取出后立即以冰水冷却 5 min, 加入冰乙酸 5.0 mL, 摇匀, 静置 10 min。以空白试剂为参比, 于 457 nm 处测定吸光度 *A*。以 *A* 为纵坐标, 质量浓度 (*C*) 为横坐标, 得回归方程 $A = 0.459 7C - 0.208$ ($r = 0.999 8$), 线性范围 175 ~ 262.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 精密度试验 精密吸取薯蓣皂苷对照品溶液 1 mL, 共 5 份, 按线性关系考察项下方法显色后测定, RSD 1.1%。

2.2.5 重复性试验 精密称取混合均匀的同一样品药材粉末, 按 2.2.2 项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 每份吸取 1 mL, 按 2.2.3 项下方法测定 *A*, 计算 RSD 1.3%, 表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一样品溶液按 2.2.3 项下方法显色, 在 1 h 内每隔 10 min 测定 1 次, 计算 *A* 的 RSD 1.2%。表明供试品溶液在 1 h 内基本稳定。

2.2.7 加样回收率试验 精密量取已知薯蓣皂苷含量的样品 9 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 每组按低、中、高质量浓度分别加入薯蓣皂苷对照品 ($n = 3$), 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下

表 3 不同种植条件下穿山龙药材与土壤中无机元素的相关参数

Table 3 Correlation analysis of inorganic elements in Dioscoreae Nipponicae Rhizoma and soil under different planting conditions

土壤	药材 1	药材 2	药材 3	药材 4	药材 5	药材 6
1	0.746 ²⁾	0.622 ²⁾	0.662 ²⁾	0.527 ¹⁾	0.683 ²⁾	0.569 ¹⁾
2	0.709 ²⁾	0.501 ¹⁾	0.590 ¹⁾	0.389	0.563 ¹⁾	0.437
3	0.743 ²⁾	0.558 ¹⁾	0.636 ²⁾	0.451	0.618 ²⁾	0.497 ¹⁾
4	0.672 ²⁾	0.503 ¹⁾	0.562 ¹⁾	0.401	0.571 ¹⁾	0.445
5	0.640 ²⁾	0.414	0.506 ¹⁾	0.301	0.482	0.350
6	0.585 ¹⁾	0.293	0.426	0.170	0.360	0.222

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

方法测定 A, 计算回收率, 结果见表 4。

表 4 薯蓣皂苷含量测定的加样回收率

Table 4 Recovery test of dioscin

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.246	21.02	18	38.89	99.28		
0.253	21.62	18	39.51	99.39		
0.251	21.45	18	38.98	97.39		
0.243	20.76	20	40.07	96.55		
0.252	21.53	20	41.65	100.60	99.10	1.3
0.250	21.36	20	41.40	100.20		
0.249	21.27	22	42.89	98.27		
0.248	21.19	22	43.19	100.00		
0.251	21.45	22	43.50	100.23		

2.2.8 样品测定 取供试液 1.0 mL 置于具塞试管中, 挥干溶剂, 按 2.2.3 项下方法测定 A, 结果正茬 2 年, 正茬 3 年, 正茬 4 年, 连作一茬 1 年, 连作一茬 3 年, 连作二茬 4 年样品中总皂苷质量分数分别为 73.75, 91.79, 95.28, 85.44, 79.10, 76.51 mg·g⁻¹。

3 讨论

ICP-MS 是当今多元素测定领域中最先进和准确的分析测试手段^[8], 测定总皂苷时采用超声提取法反应时间短、提取效率高; 采用紫外分光光度法测定总皂苷简单方便, 准确度和精密度均能满足分析要求。由表 2 可知, 穿山龙药材中各无机元素平均质量分数由高到低排序前 5 位为 K > Ca > Fe (56) > Mg > Mn, 质量分数依次为 9.74 × 10³, 5.94 × 10³, 2.96 × 10³, 319.67, 104.35 μg·g⁻¹。另外, K, Ca, Mg 等大多数元素的含量均在连作发生时开始呈现下降趋势, 说明穿山龙的种植忌连作, 正茬 3~4 年时采收最为合理, 为该药材的合理种植及品质评价提供参考。

通过药材与土壤的相关性分析可知, 在正茬 2, 3, 4 年时穿山龙药材与土壤的无机元素呈显著相关, 从连作一茬 1 年既开始无明显相关性, 推断穿山

龙从连作一茬 1 年开始出现了连作现象, 这也与实地调查和生产实践中的情况相符。正茬时随着年份的增长, 穿山龙总皂苷的含量逐渐增加, 但在连作一茬 1 年以后其总皂苷含量既呈明显下降趋势, 说明连作可能会影响药材质量。

综上所述, 连作不利于穿山龙的种植栽培, 这与实践种植生产的情况亦相符。通过分析发现, 穿山龙总皂苷的变化与无机元素的变化相关性并不强, 说明无机元素只是造成连作现象的因素之一。提示种植栽培穿山龙忌连作, 应在正茬 3~4 年时对穿山龙进行采收, 保证穿山龙中皂苷类成分和钾、钙、镁等元素含量最高, 这对高质量药材的种植具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 肖培根. 新编中药志. 1 卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 745-748.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 250-251.
- [3] 陈信义, 高志捷, 王玉芝, 等. 薯蓣皂苷抗移植性小鼠乳腺癌作用的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(5): 23-24.
- [4] 王丽娟, 王岩, 陈声武, 等. 薯蓣皂苷元体内、外的抗肿瘤作用[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(10): 777-779.
- [5] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 1414.
- [6] 简在友, 王文全, 游佩进. 三七连作土壤元素含量分析[J]. 中国现代中药, 2009, 11(4): 10-11.
- [7] 尹海波, 张囡, 康廷国. 穿龙薯蓣药材和土壤无机元素的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 137-141.
- [8] 陈军辉, 谢明勇, 傅博强, 等. 西洋参中无机元素的主成分分析和聚类分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(7): 1326-1329.

[责任编辑 刘德文]