

不同产地浙贝母总生物碱含量测定与比较

姚德中¹, 闵会², 何厚洪², 陈琳², 乔洪翔², 叶剑锋^{1*} (1.浙江康恩贝制药股份有限公司, 杭州 310052; 2.浙江康恩贝药品研究开发有限公司, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立浙贝母总生物碱含量测定方法, 比较不同产区浙贝母总生物碱含量。方法 采用酸性染料比色法测定总生物碱含量, 以贝母素甲为对照品, 采用紫外分光光度计测定。结果 浙贝母总生物碱在 0.059 2~0.295 9 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 其回收率(97.74%)、精密度(RSD=2.05%)、重复性(RSD=3.22%)结果良好。对不同产地浙贝母总生物碱含量进行测定结果表明, 磐安(0.53%)、缙云(0.52%)、象山(0.52%)产区浙贝母总生物碱含量较高, 东阳(0.44%)居中, 鄞州(0.41%)、舟山(0.38%)产区浙贝母总生物碱含量则低于其他产区。结论 不同产地浙贝母总生物碱含量存在差异, 磐安、缙云、象山产区的含量较高。

关键词: 浙贝母; 总生物碱; 酸性染料比色法; 不同产地; 紫外分光光度法

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)10-1249-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.022

Determination and Comparison of Total Alkaloids Content of Fritillariae Thunbergii Bulbus from Different Habitats

YAO Dezhong¹, MIN Hui², HE Houhong², CHEN Lin², QIAO Hongxiang², YE Jianfeng^{1*} (1.Zhejiang Conba Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China; 2.Zhejiang Conba Drug Discovery & Development Co., Ltd., Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UV method to determine the content of total alkaloids of Fritillariae Thunbergii Bulbus and compare its difference from different habitats. **METHODS** Acid dye colorimetry was applied to determine by using UV spectrophotometry with peimine as control. **RESULTS** Total alkaloids had a good linear relationship in 0.059 2~0.295 9 mg·mL⁻¹. Its accuracy (97.74%), reproducibility(RSD=2.05%), precision(RSD=3.22%) showed a good repeatability. The total alkaloids content of Fritillariae Thunbergii Bulbus from different habitats were Panan 0.53%, Jinyun 0.52%, Xiangshan 0.52%, Dongyang 0.44%, Yinzhou 0.41%, Zhoushan 0.38%. **CONCLUSION** The content of total alkaloids of Fritillariae Thunbergii Bulbus from different habitats is different, and the content is much higher in Fritillariae Thunbergii Bulbus from Panan, Jinyun and Xiangshan than other habitats.

KEY WORDS: Fritillariae Thunbergii Bulbus; total alkaloids; acid dye colorimetry; different habitats; UV spectrophotometry

浙贝母(*Fritillaria thunbergii* Miq.)为百合科贝母属多年生草本植物, 其鳞茎为大宗常用药材, 是著名的“浙八味”之一, 临床上主要用于肺热咳嗽的治疗, 是多种中成药中的常见药材, 中国药典 2010 年版收载的常用中药之一。目前, 浙贝母质量控制的报道多见于贝母素甲、乙总量的分析, 但对于其总生物碱含量的系统比较则相对较少。本实验建立了紫外分光光度法测定浙贝母中总生物碱含量的方法, 并对不同产地浙贝母总生

物碱含量进行测定与分析, 为浙贝母质量评价及未来产业发展提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

贝母素甲对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 11750-201110, 含量: 98.3%)。浙贝母分别来自磐安、缙云、鄞州、东阳、象山、舟山 6 个目前浙贝母种植主产区, 采集新鲜鳞茎洗净, 切片晒干, 浙贝母品种经浙江中药与天然药物研究

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAI04B06); 浙江省科技计划项目(2009E10009); 浙江省企业研究院项目(2010E90011)

作者简介: 姚德中, 男, 助理工程师 Tel: (0579)88139989 E-mail: Yaodz@conbagroup.com *通信作者: 叶剑锋, 男, 博士, 教授
高级工程师 Tel: (0579)85726599 E-mail: yejf@conbagroup.com

院姜迅知教授级高工鉴定为浙贝 1 号。具体信息见表 1。

表 1 浙贝母样品采集信息表

Tab. 1 Samples collected information of Fritiliariae Thunbergh Bulbus

产地	样品编号	品种	采收时间
磐安	1, 2, 3, 4, 5	浙贝 1 号	2012 年 5 月
缙云	1, 2, 3, 4	浙贝 1 号	2012 年 5 月
鄞州	1, 2, 3, 4, 5	浙贝 1 号	2012 年 5 月
东阳	1, 2, 3, 4, 5	浙贝 1 号	2012 年 5 月
象山	1, 2, 3, 4	浙贝 1 号	2012 年 6 月
舟山	1, 2, 3, 4, 5	浙贝 1 号	2012 年 6 月

1.2 仪器

BS210S 电子天平(德国赛多利斯); 精宏 HH.S11-6-S 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 取贝母素甲对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取浙贝母粉末(过四号筛)约 2 g, 精密称定, 置具塞烧瓶中, 加浓氨试液 4 mL 浸润 1 h, 精密加入氯仿-甲醇(4:1)的混合溶液 40 mL, 称定重量, 混匀, 置 80 °C 水浴中加热回流 2 h, 放冷, 再称定重量, 加氯仿-甲醇(4:1)混合溶液补足减失的重量, 精密加入 6 mL 无水乙醇, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 测定法 分别精密量取对照品溶液及供试品溶液各 1 mL, 水浴蒸干, 精密加入邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠缓冲液(取 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯二甲酸氢钾 100 mL, 用 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液约 50 mL 调节 pH 值至 5.0, 即得)5 mL, 超声溶解, 再精密加入显色剂溶液(取溴甲酚绿 0.20 g, 精密加入 2.8 mL $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液溶解, 加水稀释至 200 mL, 即得)4 mL, 密塞, 剧烈振摇后, 再精密加入三氯甲烷 15 mL, 振摇, 转移至分液漏斗中, 静置 1 h。取三氯甲烷溶液, 用干燥无水硫酸钠 0.2 g 脱水 30 min, 以相应的试剂为空白, 按紫外-可见分光光度法, 在 410 nm 处测定吸光度。参照对照品比较法, 计算供试品中被测溶液

的浓度。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0 mL, 按“2.1.3”项下方法, 自“精密加入邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠缓冲液(pH 5.0)5 mL”起进行测定, 以吸光度(Y)对浓度(X)进行线性回归, 得回归方程 $Y=2.896 2X-0.023 2$, $r=0.999 8$ 。结果表明, 贝母素甲在 $0.059 2\sim 0.295 9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内其浓度与吸收值呈良好线性关系。

2.2.2 重复性试验 精密称取浙贝母粉末 2 g, 共 6 份, 精密称定, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下方法显色和测定, 计算重复性, 结果 RSD 为 3.22%。

2.2.3 仪器精密度试验 精密称取浙贝母粉末 2 g, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 精密量取供试品溶液 1 mL, 共 6 份, 按“2.1.3”项下方法显色和测定, 计算精密度, 结果 RSD 均<3%。

2.2.4 稳定性试验 取供试品溶液在 410 nm 处延续性测定其吸光度, 显色后供试品吸收值在 120 min 内 RSD 为 0.24%, 较稳定。

2.2.5 回收率试验 取浙贝母适量, 称取 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 置具塞烧瓶中, 加浓氨试液 4 mL 浸润 1 h 后精密加入贝母素甲对照品溶液 2 mL ($2.308 7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下方法显色和测定, 计算加样回收率, 结果见表 2, 表明本法回收率符合要求。

表 2 回收率试验结果

Tab. 2 The results of recovery test

取样量/ g	含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
1.011 5	3.9449		8.449 8	97.57		
1.007 6	3.929 6		8.718 8	103.71		
1.031 8	4.024 0		8.346 5	93.61		
1.013 3	3.951 9	4.617 4	8.573 8	100.10	97.74	3.86
1.004 5	3.917 6		8.408 5	97.26		
1.051 8	4.102 0		8.449 8	94.16		

3 结果

将采集浙贝母样品按上述方法进行总生物碱含量测定, 结果见表 3。

表 3 不同产地浙贝母总生物碱含量检测结果
Tab.3 The content of total alkaloids of Fritillariae Thunbergh Bulbus from different habitats

产地	样品 编号	总生物碱 含量/%	平均 含量/%	产地	样品 编号	总生物 碱含量/%	平均 含量/%
磐安	1	0.57	0.53	鄞州	1	0.39	0.41
	2	0.58			2	0.48	
	3	0.63			3	0.46	
	4	0.35			4	0.31	
	5	0.54			5	0.40	
缙云	1	0.47	0.52	象山	1	0.43	0.52
	2	0.52			2	0.57	
	3	0.56			3	0.54	
	4	0.51			4	0.56	
东阳	1	0.38	0.44	舟山	1	0.37	0.38
	2	0.50			2	0.39	
	3	0.47			3	0.39	
	4	0.37			4	0.45	
	5	0.46			5	0.28	

4 讨论

4.1 测定方法

在实验过程中发现，所选萃取有机溶剂氯仿与水有微溶性，且可以溶解微量溴甲酚绿，对实验结果有一定干扰。显色时采用常规方法将缓冲液、显色剂、氯仿及被测物质混合后再进行反应^[1]，剧烈振摇时会有较多水相及溴甲酚绿进入到氯仿层，导致测定时对吸收有干扰，无法准确测定。因此本实验在结合前人研究的基础上进行改良，先进行显色反应，使离子对充分结合，再用氯仿将结合后的离子对络合物反萃取出来，振摇时无需剧烈振荡，可以从很大程度上减轻干扰。另通过对比实验，发现采用溴麝香草酚蓝^[2]作为酸性染料时，溴麝香草酚蓝在氯仿中的溶解性较好，极易带来干扰，故通过摸索改用溴甲酚绿作为酸性染料，很大程度上减小了酸性染料自身带来的干扰。同时，测定前亦加入少量无水硫酸钠脱去水分，可以减少水分的干扰。改进后的方法稳定可靠、干扰小，适于浙贝母总生物碱含量测定。

本实验测定浙贝母总生物碱含量与尹尚军等^[3]报道总生物碱含量测定结果相差较大，分析原因可能是提取方式不同造成。总生物碱的提取得率不同会直接影响到测定结果，本实验提取方法参照中国药典 2010 年版浙贝母项下贝母素测定提取方法，简单易行，提取效率高，损失少，因此总生物碱含量测定结果亦较高。

4.2 不同产地比较

通过对 6 个产区浙贝母样品总生物碱含量测定，结果发现，磐安、缙云、象山产区浙贝母总生物碱含量较高，平均值均>0.50%，东阳、鄞州产区浙贝母总生物碱含量稍低，但亦>0.40%，舟山产区浙贝母总生物碱含量略低于其他产区。各产地间浙贝母总生物碱含量存在差异，产地对浙贝母总生物碱含量存在影响，这与尹尚军等研究结果一致。磐安、缙云产区地势接近，皆属于丘陵山区，拥有自己独特的小气候。且磐安自古以来即为药材种植之乡，其气候土壤等适于药材种植与发展，因此浙贝母种植上亦表现出优势，生物碱含量总体水平较高。鄞州产区为浙贝母古产区，浙贝母发展历史悠久，属于浙贝母的适种区，但随着鄞州地区浙贝母连年轮作，再加上近年来种质来源混乱、退化等原因，其浙贝母总生物碱含量呈现偏低趋势。象山产区古产象贝，亦属于浙贝母，由于象山地区浙贝母种质相对保持了其固有的优良特性，加上象山产区特殊的气候与土壤条件，反而促成了其浙贝母总生物碱含量的优势。

与此同时，在考察的 6 个产区浙贝母中，各产地内不同采集点其浙贝母总生物碱含量亦存在较大差别，幅度跨越较大，如磐安产区为 0.35%~0.63%，东阳产区为 0.37%~0.50%，鄞州产区为 0.31%~0.48%。由于同一产区内总体气候差异较小，土壤类型亦差异不大，引起同产区内不同采集点浙贝母样品间总生物碱含量差异的主要因素很可能在种质及后期管理上。因此，建议在浙贝母种植时对种质进行严格把关，同时采取科学规范的种植管理方式，保证优质优育，才能保证浙贝母质量稳定均一，保障浙贝母产业稳定有序的良好发展。

REFERENCES

[1] DU M, LIU X, DING A W. Determination of total alkaloids in *Lilium brownii* var. *viridulum* by acid dye colorimetry [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*(江苏中医药), 2012, 44(1): 62-63.

[2] MA W H, SHENG Z H, RONG J H. Determination the total alkaloid in *Fritillaria thunbergii* Miq from different habitats [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2009, 27(7): 1495-1496.

[3] YIN S J, SHEN Q, WANG Z Q. The influence of different habitats and regions to the content of total alkaloids in *Fritillaria thunbergii* [J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), 2011, 39(3): 321-324.

收稿日期: 2014-04-10