

壮药矮陀陀中总生物碱含量测定条件优选及不同产地药材含量比较^Δ

马雯芳*, 唐玉荣, 颜萍花, 曾祥燕, 蔡毅[#](广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0476-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.14

摘要 目的: 优选壮药矮陀陀中总生物碱的含量测定条件, 并对不同产地药材进行含量比较。方法: 采用正交试验法, 以总生物碱含量为评价指标, 以溶剂用量、超声时间、超声提取次数、缓冲液 pH 为考察因素, 优选壮药矮陀陀中总生物碱含量测定的条件。采用优选的含量测定条件, 测定 18 个产地不同采收季节药材的总生物碱含量。结果: 优选的含量测定条件为溶剂用量(三氯甲烷) 20 ml, 超声处理 3 次, 每次超声 15 min, 缓冲液 pH 为 4.5。18 个产地药材总生物碱含量在 0.6~11.98 mg/g 之间, 含量差异较大。其中以隆林县、田林县在 10 月份采收的药材总生物碱含量最低。结论: 优选的含量测定条件可用于测定壮药矮陀陀中总生物碱的含量及该药材的质量控制。该药材生物碱含量与产地、采收季节等有关。

关键词 矮陀陀; 总生物碱; 含量测定; 正交试验

Optimization of the Content Determination Conditions of Total Alkaloids from Zhuang Medicine *Munronia delavayi* and Comparison of the Contents in *M. delavayi* from Different Producing Areas

MA Wenfang, TANG Yurong, YAN Pinghua, ZENG Xiangyan, CAI Yi (College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the content determination conditions of total alkaloids from Zhuang medicine *Munronia delavayi*, and to determine the content of total alkaloids in *M. delavayi* from different producing areas. METHODS: With the content of total alkaloids as index, using solvent amount, ultrasonic time, ultrasonic extraction times and pH value of buffer as factors, the content determination conditions of total alkaloids from Zhuang medicine *M. delavayi* were optimized by orthogonal test. Optimized content determination conditions were adopted to determine the content of total alkaloids in *M. delavayi* from 18 producing areas in different harvest time. RESULTS: The optimum content determination conditions were as follows as the amount of solvent (CHCl₃) 20 ml, ultrasonic processing for 3 times, lasting for 15 min each time, pH value of buffer 4.5. The contents of total alkaloids in *M. delavayi* from 18 producing areas were between 0.6-11.98 mg/g, showing great difference. *M. delavayi* from Longlin county and Tianlin county harvested in Oct. had the lowest content of total alkaloids. CONCLUSIONS: Optimized content determination condition can be used for the content determination of total alkaloids in Zhuang medicine *M. delavayi* and quality control of it. The content determination of total alkaloids in *M. delavayi* is related to producing area and harvest time.

KEYWORDS *Munronia delavayi*; Total alkaloids; Content determination; Orthogonal test

矮陀陀为楝科植物地黄连属云南地黄连 *Munronia delavayi* Franch. 的干燥全株, 又称小地黄连、小独根、千年矮、思茅地黄连等。其味甘、微苦, 性凉, 具有清热解毒、活血止痛的功效, 可用于治疗跌打瘀痛、风湿关节痛、咽喉炎、痈肿疔疮^[1]。在民间有着“爬不得坡, 离不开矮陀陀^[2]”“千药万药, 不如矮陀陀”“半死不活, 快服矮陀陀”等说法。该药为极具民族特色的一种植物药^[3-4], 在民间使用广泛并具有较好的临床疗效, 但目前为止对矮陀陀的药理、化学成分等方面的研究较少, 只有对其鉴别研究的相关报道^[5]。笔者前期试验发现矮陀陀含有生

物碱物质, 而生物碱具有抗炎、镇痛等活性^[6-9]。在本试验中, 笔者采用正交试验法优选矮陀陀中总生物碱含量测定条件, 并用于不同产地矮陀陀药材的含量测定, 以期完善该药材质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

8453 型紫外可见分光光度计(美国安捷伦科技公司); BT224S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); PB-10 型精密酸度计(德国赛多利斯集团); LSY 型电热恒温水浴锅(北京市医疗设备厂)。

1.2 药品与试剂

矮陀陀均采自广西, 经广西中医药大学蔡毅教授鉴定为楝科植物地黄连属云南地黄连 *Munronia delavayi* Franch. 的干燥全株; 丁溴东莨菪碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 00130-201103, 纯度: 99.7%); 三氯甲烷、邻苯二甲酸氢钾、溴甲酚绿均为分析纯, 水为纯净水。

2 方法与结果

^Δ 基金项目: 广西壮药质量标准(第三卷)质量评价与标准研究项目(No. GXZC2014-G3-1577-YLZB-B-3); 广西自然科学基金创新研究团队项目(No. 2011GXNSFF018006); 广西“2011 协同创新中心”——壮瑶药协同创新中心(No. 桂教教研[2013]20 号); 广西壮瑶药重点实验室(No. 桂科基字[2014]32 号); 广西重点学科(壮药学)(No. 桂教科研[2013]16 号); “八桂学者”工程专项经费项目

* 讲师, 博士。研究方向: 中药品种、品质。电话: 0771-3137585。E-mail: alswen@163.com

[#] 通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 中药、民族药的质量标准。电话: 0771-3137585。E-mail: caiyi118@163.com

2.1 供试品含量测定条件的优选

2.1.1 缓冲溶液的制备 称取邻苯二甲酸氢钾及氢氧化钠固体,分别加蒸馏水溶解并定容,均制备成0.2 mol/L的溶液;用氢氧化钠溶液调节邻苯二甲酸氢钾溶液的pH,制得邻苯二甲酸氢钾缓冲液(pH=4.5)。

2.1.2 酸性染料的制备 取约40.0 mg溴甲酚绿粉末,置于100 ml量瓶中,加入邻苯二甲酸氢钾缓冲液(pH=4.5)至刻度,振摇使溶解,摇匀,即得0.04%溴甲酚绿溶液。

2.1.3 波长的选择 精密吸取丁溴东莨菪碱对照品溶液1 ml,挥干溶剂,残渣用邻苯二甲酸氢钾缓冲液(pH=4.5)5.0 ml溶解并移入分液漏斗中,再精密加入0.04%溴甲酚绿溶液2.0 ml,摇匀,最后加入三氯甲烷10 ml,振荡2 min,静置15 min后,分出下层,用三氯甲烷定容至10 ml,加入适量无水硫酸钠脱水;同上操作制备不含丁溴东莨菪碱的阴性对照品溶液作为空白。分别用紫外分光光度计在400~800 nm波长范围内进行扫描,结果测得对照品溶液的最大吸收波长为416 nm,空白对照不干扰测定。且供试品溶液测定结果与对照品所测基本一致,也在416 nm附近有最大吸收。最终确定检测波长为416 nm。丁溴东莨菪碱对照品与供试品光谱图见图1。

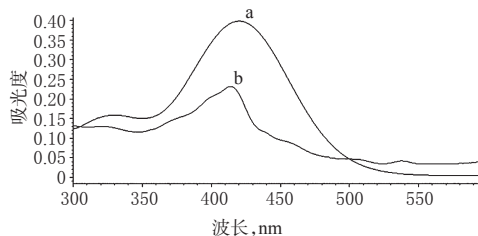


图1 紫外扫描光谱图

a. 丁溴东莨菪碱对照品; b. 矮陀陀供试品

Fig 1 UV scanning spectrum

a. scopolamine butylbromide control; b. test sample of *M. delavayi*

2.1.4 正交试验方法考察供试品溶液制备条件 (1)正交试验设计。根据单因素试验及结果,以三氯甲烷为提取溶剂,采用超声提取方法提取药材,以溶剂用量(A)、超声时间(B)、超声提取次数(C)、缓冲液pH(D)为因素,以总生物碱含量为指标进行正交试验。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(溶剂用量),ml	B(超声时间),min	C(超声提取次数),次	D(缓冲液pH)
1	20	15	1	4.0
2	25	30	2	4.5
3	30	45	3	5.0

(2)正交试验安排与结果分析。取矮陀陀药材(编号:ATT-1)干燥粗粉9份,每份1 g,精密称定,置于100 ml具塞锥形瓶中,按正交试验设计表进行试验,平行3次,制备样品,测定含量,结果见表2。试验结果经SPSS 19.0软件进行方差分析,结果见表3。

由表2直观分析可知,各因素作用主次顺序为C(提取次数)>B(提取时间)>D(缓冲液pH)>A(溶剂用量);A(溶剂用量)因素中以 K_1 最大,B(提取时间)因素中以 K_1 最大,C(提取次数)因素中以 K_3 最大,D(缓冲液pH)因素中以 K_2 最大,得出最优提取工艺为 $A_1B_1C_3D_2$ 。由表3方差分析可知,各因素对总生物碱提取均具显著影响,与直观分析结果一致。故确定

优选的含量测定条件为:溶剂用量(三氯甲烷)20 ml,超声提取(功率:250 W,频率:40 kHz)3次,每次超声15 min,缓冲液pH为4.5。

表2 正交试验设计及结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	总生物碱含量,mg/g			平均含量,mg/g
					1	2	3	
1	1	1	1	1	4.210	4.323	4.400	4.311
2	1	2	2	2	6.939	6.684	6.602	6.742
3	1	3	3	3	6.257	6.156	6.472	6.295
4	2	1	2	3	6.787	7.065	6.727	6.860
5	2	2	3	1	5.494	5.759	5.445	5.566
6	2	3	1	2	3.637	3.660	3.810	3.702
7	3	1	3	2	7.754	7.782	7.388	7.641
8	3	2	1	3	3.960	3.759	3.841	3.853
9	3	3	2	1	5.077	5.161	5.021	5.086
K_1	17.406	19.170	12.051	14.963				
K_2	15.918	16.202	18.350	18.085				
K_3	16.791	14.977	19.305	17.008				
R	1.488	4.193	7.254	3.122				

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

变异来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F	P
A	0.008	2	0.004	17.151	<0.01
B	0.074	2	0.037	166.115	<0.01
C	0.352	2	0.176	793.340	<0.01
D	0.050	2	0.025	113.468	<0.01
E(误差)	0.004	2	0.000		

2.1.5 供试品溶液的制备 称取粉碎后的矮陀陀粉末(过20目筛)1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入20 ml三氯甲烷,称定质量,超声提取(功率:250 W,频率:40 kHz)3次,每次15 min,放冷,再称定质量,用三氯甲烷补足减失的质量,摇匀,滤过,合并续滤液,即得。

2.2 方法学考察与结果

2.2.1 线性关系考察 精密称定丁溴东莨菪碱对照品适量,加三氯甲烷制成每1 ml含0.377 2 mg的对照品贮备溶液。分别精密吸取丁溴东莨菪碱对照品贮备溶液0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10 ml,置于10 ml量瓶中,加三氯甲烷稀释至刻度,制备成丁溴东莨菪碱系列对照品溶液。按“2.1.3”项下方法操作,在416 nm波长处测定,以吸光度(y)为纵坐标、丁溴东莨菪碱质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=0.002 7x+0.033 7(r=0.999 4)$ 。结果表明丁溴东莨菪碱检测质量浓度线性范围为0.018 86~0.377 2 mg/ml。

2.2.2 精密度试验 精密吸取丁溴东莨菪碱对照品溶液1.0 ml,按“2.1.3”项下方法操作测定,平行测定6次。结果吸光度的RSD=0.75%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 取矮陀陀(编号:ATT-1)供试品溶液,每隔30 min测1次吸光度。结果在5 h内吸光度的RSD=2.00%(n=10),表明供试品溶液在5 h内稳定性较好。

2.2.4 重复性试验 精密称取矮陀陀药材干燥粗粉(编号:ATT-1)1 g,共6份,按照“2.1.5”项下确定的提取条件制备供试品溶液,在“2.1.3”项下方法操作测定,结果含量的RSD=1.13%(n=6),表明方法重复性良好。

2.2.5 加样回收率试验 精密称定已知丁溴东莨菪碱含量(4.570 0 mg/g)的矮陀陀药材干燥粗粉(编号:ATT-1)0.5 g,共

6份,分别精密加入丁溴东莨菪碱对照品溶液(2.411 4 mg/ml) 1 ml,按“2.1.5”项下确定的提取工艺制备供试品溶液,按“2.1.3”项下方法操作测定,计算得平均加样回收率为101.50%, RSD=1.94%(n=6)。

2.3 不同药材含量测定结果

分别精密称取不同批次的矮陀陀干燥粗粉约1 g,精密称定,按“2.1.5”项下确定的提取工艺制备样品,每产地样品平行3份,按“2.1.3”项下方法操作测定。各产地矮陀陀含量测定结果见表4。

表4 各产地矮陀陀含量测定结果(n=3)

Tab 4 Content determination results of *M. delavayi* from different producing areas (n=3)

编号	产地	采集时间	采收季节	含量,mg/g	RSD, %
ATT-1	靖西县三合街	2015.05.02	春季	4.57	0.51
ATT-2	靖西县	2013.06.15	春季	3.86	1.88
ATT-3	隆林县	2014.04.27	春季	3.39	1.93
ATT-4	德保县	2014.05.31	春季	5.17	2.00
ATT-5	靖西县同德乡	2014.05.31	春季	2.37	1.52
ATT-6	靖西县武平乡	2014.05.31	春季	2.07	1.89
ATT-7	靖西县新甲乡	2014.06.01	夏季	2.99	0.62
ATT-8	靖西县河阳村	2014.06.01	夏季	6.75	1.95
ATT-9	靖西县城郊区	2014.06.01	夏季	7.34	0.95
ATT-10	靖西县禄峒乡	2014.06.01	夏季	4.49	1.42
ATT-11	靖西县地洲乡	2014.06.01	夏季	6.62	1.75
ATT-12	隆林县	2014.07.04	夏季	2.72	1.66
ATT-13	隆林县	2014.10.11	秋季	0.69	1.78
ATT-14	田林县	2014.10.16	秋季	0.60	1.41
ATT-15	田林县	2015.01.10	冬季	3.80	1.72
ATT-16	隆林县	2015.01	冬季	2.08	0.87
ATT-17	隆林县	2015.05.26	春季	3.83	1.71
ATT-18	田林县	2015.05.31	春季	11.98	0.35

3 讨论

在测定生物碱含量的几种方法中,高效液相色谱法对一种或几种单体生物碱含量测定灵敏度高、准确性好,但对总生物碱含量测定结果不理想;酸碱滴定法测定总生物碱的含量结果误差较大;酸性染料比色法测定较准确,且操作简单,近年来应用广泛,故本试验采用酸性染料比色法测定总生物碱含量^[10-12]。

在前期试验中对不同提取溶剂进行了考察,其中三氯甲烷提取所得总生物碱含量最高(3.850 0 mg/g),乙醇次之(2.950 1 mg/g),三氯甲烷(加氨水适量)与三氯甲烷-甲醇(5:1,加氨水适量)所得更少。在前期试验中还考察了冷浸(24 h)、回流(40 min)、超声(40 min)3种提取方法的提取效果,结果冷浸法所得总生物碱最高(4.211 5 mg/g),超声法(3.807 8 mg/g)与回流法(3.656 4 mg/g)相差不大,但从试验操作的便利性与可行性方面考虑,最终选用超声处理法。本文对测定矮陀陀总生物碱含量的检测波长、缓冲液pH、提取溶剂、超声提

取时间等试验条件进行了优化筛选,确定最优提取工艺为:溶剂用量(三氯甲烷)20 ml,超声处理3次,每次超声15 min,缓冲液pH为4.5。

本文对不同采收时间、不同采收地点的18批次矮陀陀药材总生物碱含量进行了测定,结果各批次药材总生物碱含量在0.6~11.98 mg/g之间,含量差异较大。其中以隆林县、田林县在10月份采收的药材总生物碱含量最低,可能与该地区秋季干旱少雨有关;同一产地药材在不同季节,其所含总生物碱量存在差异,可能受季节变化影响;同时,不同产地药材在同一季节,其所含总生物碱量亦有差异,可能与其所生长的地理环境有关。总之,该药材生物碱含量受产地、采收季节等因素影响明显,对其总生物碱含量与临床疗效的相关性进一步研究,则对其质量控制更具现实意义。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:第5册:第十三卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:42.
- [2] 郭红.天然奇特的苗药[N].中国中医药报,2001-07-19(001).
- [3] 杨春燕,龙春林,石亚娜,等.广西靖西县端午药市的民族植物学研究[J].中央民族大学学报:自然科学版,2009,18(2):21.
- [4] 贾敏如,李星炜.中国民族药志要[M].北京:中国医药科技出版社,2005:413.
- [5] 蔡毅,黎春园,余娇,等.矮陀陀的显微结构研究[J].时珍国医国药,2012,23(4):974.
- [6] 柏云娇,于淼,赵思伟,等.生物碱的药理作用及机制研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2013,29(1):8.
- [7] 李海丽,潘国庆,酉志亮,等.藏药赛北紫堇总生物碱镇痛药效学研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(4):544.
- [8] 褚克丹,陈立典,倪峰,等.雷公藤总生物碱的药效实验研究[J].中药药理与临床,2011,27(1):33.
- [9] 李文兰,于莹莹,赵培,等.乌头总生物碱贴片抗炎镇痛药效学研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(2):339.
- [10] 范圣洁,李文龙,崔文霞,等.酸性染料比色法测定飞龙掌血提取物中总生物碱的含量[J].上海中医药大学学报,2012,26(1):85.
- [11] 钟燕珠,麦润萍,郭顺群.酸性染料比色法测定牛大力中总生物碱的含量[J].中药新药与临床药理,2011,22(6):685.
- [12] 刘喜纲,刘翠哲,常金花.应用酸性染料比色法测定总生物碱的含量[J].中国药房,2007,18(11):875.

(收稿日期:2015-07-20 修回日期:2015-11-15)

(编辑:余庆华)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅