

# 藏药镰形棘豆中总生物碱的含量测定<sup>△</sup>

杨光明\*, 邱蓉丽, 顾青, 蔡宝昌\*(南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室/国家中医药管理局中药炮制标准重点实验室, 南京 210023)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1383-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.14

**摘要** 目的:建立无紫外吸收的藏药镰形棘豆总生物碱的定量分析方法。方法:采用酸性染料比色法,以野决明碱为对照品,溴麝香草酚蓝为酸性染料,药材先用酸水提取,碱化后经有机溶剂振摇提取,检测波长为413 nm。结果:野决明碱进样量在20.06~100.30 μg范围内与吸光度呈良好线性关系( $r=0.9995$ );平均加样回收率为100.7%,RSD=1.41%( $n=6$ )。结论:该方法简便、准确、可靠,可用作镰形棘豆中总生物碱的定量分析方法,为其质量评价提供科学依据。

**关键词** 镰形棘豆;总生物碱;野决明碱;酸性染料比色法;含量测定

## Content Determination of Total Alkaloids in Tibetan Medicine *Oxytropis falcata*

YANG Guang-ming, QIU Rong-li, GU Qing, CAI Bao-chang (Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of TCM, Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicine Processing, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quantitative method for analysis of total alkaloids of Tibetan medicine *Oxytropis falcata*. METHODS: Samples were extracted with acid water and then shook with organic solvent after alkalization, and the content of total alkaloids in samples was assayed by acidic dye colorimetry using thermopsine as control and bromothymol blue as the acidic dye. The detection wavelength was 413 nm. RESULTS: The linear ranges of thermopsine were 20.06-100.30 μg ( $r=0.9995$ ) with an average recovery of 100.7% (RSD=1.41%,  $n=6$ ). CONCLUSION: The method is simple, accurate and reliable, and it can be used for quantitative analysis of total alkaloids in *O. falcata* and provides scientific basis for quality evaluation of it.

**KEY WORDS** *Oxytropis falcata*; Total alkaloids; Thermopsine; Acidic dye colorimetry; Content determination

藏药镰形棘豆为豆科棘豆属(*Oxytropis* D. C.)植物镰形棘豆 *Oxytropis falcata* Bunge 的干燥全草,藏药名为“表达夏”<sup>[1]</sup>。该植物药用部位为全草,味辛,性寒,有小毒,入肺、脾二经,具有清热解毒、生肌愈疮、抗炎镇痛、涩脉止血等功效,在藏医临床上广泛使用,享有“草药之王”的美誉<sup>[2-3]</sup>。镰形棘豆主要含有黄酮、生物碱、皂苷等成分,药理研究表明其具有镇痛、抗炎、抗氧化<sup>[4-5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6-7]</sup>等活性,因此很多藏成药方中都含有它。生物碱类成分是棘豆属植物抗肿瘤的主要活性成分<sup>[8-10]</sup>,而目前国内、外学者对镰形棘豆生物碱类成分的研究较少。笔者前期对镰形棘豆的研究表明,其生物碱类成分具有明显的抗肿瘤活性<sup>[11]</sup>,因而其总生物碱的定量分析对控制该药材及其制剂质量显得尤为重要。

由于所含生物碱无紫外吸收,检测所受限制较大,到目前为止尚未见关于镰形棘豆生物碱定量分析的相关报道。对于没有紫外吸收的生物碱,常用的含量测定方法为两相滴定法、酸性染料比色法、红外光谱法、薄层扫描法、气相色谱法等<sup>[12-13]</sup>。其中,酸性染料比色法的原理是根据在一定pH介质中,生物碱类与氢离子生成阳离子,一些酸性染料在此条件下

可解离成阴离子而与上述阳离子定量结合成有色络合物,从而可被有机溶剂定量提取<sup>[14]</sup>。酸性染料比色法消除了两相滴定法因终点观察困难所带来的误差,且分光光度计为常用仪器,较之红外光谱仪和气相色谱仪更易获得,近年来常用于测定总生物碱的含量<sup>[15-16]</sup>。本试验采用酸性染料比色法建立了镰形棘豆总生物碱的定量分析方法,并对11批次不同产地的镰形棘豆进行了分析,旨在为镰形棘豆药材的质量评价提供科学的依据与参考,也为今后进行镰形棘豆生物碱的深入研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV-2401PC 紫外分光光度计(日本岛津公司);AG285 电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);pHS-3C 酸度计(上海康仪仪器有限公司);E-201-C pH复合电极(上海雷磁仪器厂);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);KQ-500E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

### 1.2 试剂

野决明碱对照品(芜湖贰尔塔医药科技有限公司,批号:20100325,纯度>95%);磷酸氢二钠、柠檬酸、溴麝香草酚蓝、甲醇、三氯甲烷等试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

11批镰形棘豆药材样品分别来源于青海、甘肃、西藏,经

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30902012)

\*副研究员,博士。研究方向:中药炮制及中药质量标准。电话:025-86798281。E-mail: ygmm0901@hotmail.com

#通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:中药炮制及中药质量标准。电话:025-86798281。E-mail: bccai@126.com

南京中医药大学刘训红教授鉴定为豆科棘豆属植物镰形棘豆 *O. falcata* Bunge 的干燥全草。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备

精密称取野决明碱对照品 10.03 mg, 加甲醇溶解并定容至 5 ml 量瓶中, 作为对照品贮备液 (2.006 mg/ml), 用时稀释 20 倍, 得到 100.3  $\mu\text{g/ml}$  的对照品溶液。

### 2.2 供试品溶液的制备

精密称取镰形棘豆药材粉末 (过四号筛) 2.0 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 2.5% 的乙酸 20 ml, 称质量, 超声提取 1 h (频率: 40 kHz, 功率: 70 W), 放冷, 再称质量, 用 2.5% 的乙酸补足失质量, 滤过, 滤液用 1 mol/L 的 NaOH 碱化至 pH 10, 石油醚振摇提取 3 次, 每次 20 ml, 碱水液继续用三氯甲烷振摇提取 3 次, 每次 20 ml, 取三氯甲烷层浓缩, 以甲醇定容至 5 ml 量瓶中, 作为供试品溶液。

### 2.3 酸性染料质量分数的选择

在分液漏斗中加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 5.4) 5.0 ml, 再分别加入质量分数为 0.025%、0.05%、0.1% 的溴麝香草酚蓝溶液各 2.0 ml, 摇匀, 以三氯甲烷 8 ml 振摇提取, 静置 2 h, 提取液作为空白溶液, 分别进行紫外全波长扫描。结果, 质量分数为 0.05% 的溴麝香草酚蓝溶液空白干扰小, 且和样品显色后吸光度较大, 故选其作为酸性染料。

### 2.4 检测波长的选择

分别取野决明碱对照品溶液 (100.3  $\mu\text{g/ml}$ ) 50  $\mu\text{l}$  和供试品溶液 150  $\mu\text{l}$ , 挥干甲醇, 精密加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 5.4) 5.0 ml, 再分别加入 0.05% 的溴麝香草酚蓝溶液 2.0 ml, 转移至分液漏斗中, 摇匀, 以三氯甲烷 8 ml 振摇提取, 静置 2 h, 在 300~500 nm 波长范围内进行扫描, 随用三氯甲烷作空白。结果表明, 供试品溶液和对照品溶液均在 413 nm 波长处有最大吸收, 因此选择 413 nm 作为检测波长。供试品和对照品溶液的吸收图谱见图 1。

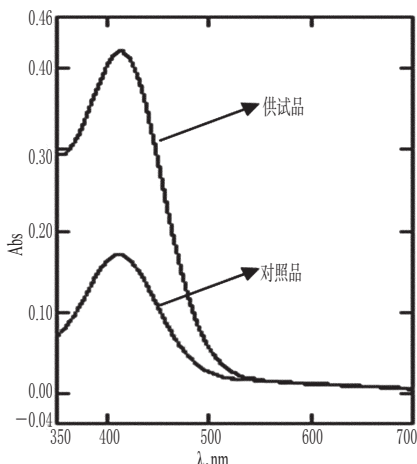


图 1 供试品和对照品溶液的吸收图谱

Fig 1 Absorption spectrum of test samples and control solution

### 2.5 最佳测试条件的选择

影响酸性染料比色法测定的因素包括缓冲液 pH 值、缓冲溶液用量、酸性染料用量、三氯甲烷用量等。选用  $L_9(3^4)$  表进

行正交试验, 以吸光度为考察指标, 对正交试验结果作直观分析和方差分析, 以判断各因素对酸性染料显色效果的影响, 确定其优化参数。正交试验结果和方差分析结果分别见表 1、表 2。

表 1 正交试验结果

Tab 1 Results of orthogonal tests

序号	因素				吸光度
	缓冲液 pH 值(A)	缓冲液用量(B), ml	酸性染料用量(C), ml	三氯甲烷用量(D), ml	
1	1(4.0)	1(4)	1(0.5)	1(8)	0.451
2	1(4.0)	2(5)	2(1)	2(10)	0.436
3	1(4.0)	3(6)	3(2)	3(12)	0.478
4	2(5.4)	1(4)	2(1)	3(12)	0.539
5	2(5.4)	2(5)	3(2)	1(8)	0.852
6	2(5.4)	3(6)	1(0.5)	2(10)	0.465
7	3(7.6)	1(4)	3(2)	2(10)	0.569
8	3(7.6)	2(5)	1(0.5)	3(12)	0.314
9	3(7.6)	3(6)	2(1)	1(8)	0.573
均值 1	0.455	0.520	0.410	0.625	
均值 2	0.619	0.534	0.516	0.490	
均值 3	0.485	0.505	0.633	0.444	
R	0.164	0.029	0.223	0.181	

表 2 方差分析结果

Tab 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.045	2	0.022 5	45.000	<0.05
B	0.001	2	0.000 5	1.000	
C	0.075	2	0.037 5	75.000	<0.05
D	0.053	2	0.026 5	53.000	<0.05

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

note:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

由表 1 中的极差 R 值判断, 各因素对吸光度的影响程度依次为  $C > D > A > B$ 。表 2 结果表明, A、C、D 3 个因素对吸光度的影响有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。最佳组合为  $A_2B_3C_3D_1$ , 即 pH 5.4 的提取液 5 ml, 加入溴麝香草酚蓝染料 2 ml, 以三氯甲烷 8 ml 振摇提取。本试验还对上述最佳组合进行了验证, 结果表明其准确、可行,  $RSD = 1.21\%$ 。

### 2.6 标准曲线的制备

分别精密吸取野决明碱对照品溶液 0.2、0.4、0.5、0.7、0.8、1.0 ml, 挥干甲醇, 用少量三氯甲烷溶解, 置分液漏斗中, 按“2.5”项下最佳测试条件操作, 取三氯甲烷层于 413 nm 波长处测定吸光度。以对照品进样量 (x) 为横坐标, 吸光度 (y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程为  $y = 0.008 6x + 0.092 5$  ( $r = 0.999 5, n = 6$ )。结果表明, 野决明碱的进样量在 20.06~100.30  $\mu\text{g}$  范围内与吸光度呈良好的线性关系。

### 2.7 精密度的试验

精密吸取对照品溶液和供试品溶液各适量, 分别按“2.5”项下最佳测试条件操作, 取三氯甲烷层于 413 nm 波长处测定吸光度, 连续 6 次。结果, 对照品和供试品的 RSD 分别为 0.14% 和 0.87% ( $n$  均为 6), 表明仪器和方法精密度均良好。

### 2.8 稳定性试验

取供试品溶液适量, 室温下分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 测定吸光度。结果,  $RSD = 1.2\%$  ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液在 3.0 h 内基本稳定。

### 2.9 重复性试验

平行称取同一批样品6份,每份2.0 g,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取1 ml,挥干甲醇,按“2.5”项下最佳测试条件操作,取三氯甲烷层于413 nm波长处测定吸光度,计算每份样品中总生物碱的含量。结果,每1 g样品平均含总生物碱0.100 7 mg, RSD=1.18% (n=6),表明方法重复性良好。

### 2.10 加样回收率试验

精密称取6份已知含量(0.100 7 mg/g)的样品各1.0 g,精密加入1.0 ml野决明碱对照品溶液,混匀,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.5”项下最佳测试条件测定吸光度。根据野决明碱的标准曲线计算样品中总生物碱的含量,再计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=6)  
Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	$\bar{x}$ , %	RSD, %
1.005 4	0.101 2	0.100 3	0.202 0	100.5		
1.002 8	0.101 0	0.100 3	0.202 8	101.5		
1.000 5	0.100 8	0.100 3	0.200 7	99.7	100.7	1.41
0.998 7	0.100 6	0.100 3	0.199 8	98.9		
1.001 8	0.100 9	0.100 3	0.201 9	100.7		
1.003 1	0.101 0	0.100 3	0.204 3	103.0		

### 2.11 样品含量测定

精密称取11批镰形棘豆药材粉末各2.0 g,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.5”项下最佳测试条件测定吸光度,根据野决明碱的标准曲线计算样品中总生物碱的含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=5)

Tab 4 Results of content determination of samples(n=5)

批号	采收地点	采收时间	吸光度	总生物碱含量/mg/g
1	青海共和县	2009-07	0.439	0.100 7
2	青海共和县	2010-07	0.296	0.059 2
3	青海1	2008-08	0.578	0.141 1
4	青海2	2008-08	0.371	0.081 0
5	青海海北州	2008-07	0.485	0.114 1
6	青海门源县	2008-08	0.597	0.146 7
7	青海海南州	2008-07	0.390	0.086 5
8	青海互助县甘滩乡	2008-07	0.401	0.089 7
9	青海海晏县青海湖乡	2008-08	0.453	0.104 8
10	甘肃	2008-08	0.333	0.069 9
11	西藏	2008-07-16	0.287	0.056 5

## 3 讨论

镰形棘豆生物碱类成分主要包括三类:一类是以野决明碱、臭豆碱为代表的喹诺里西啶类生物碱;一类是以苦马豆素为主的吲哚里西啶类生物碱;此外还含有较多的酰胺类生物碱<sup>[17]</sup>。三类生物碱类成分极性差别较大,除了野决明碱等极性较小的喹诺里西啶类生物碱外,还有极性较大的吲哚里西啶类生物碱。在提取镰形棘豆总生物碱时如选用三氯甲烷、乙醚等低极性溶剂,除了有易燃、毒性大等弊端之外,还存在提取不完全的问题,因此本试验选用2.5%的乙酸为提取溶剂。

本试验采用酸性染料比色法,选取野决明碱为对照品,在pH 5.4下与溴麝香草酚蓝定量显色,镰形棘豆中的生物碱在此条件下凡能与溴麝香草酚蓝显色的成分均可被检测出,从而求得相对总生物碱的含量。该法灵敏度高、结果稳定、操作简便,易于推广应用。

对不同产地不同批次的镰形棘豆总生物碱含量测定后发现,青海不同地域不同批号的镰形棘豆药材每1 g约含总生物碱0.1 mg,是甘肃和西藏药材总生物碱含量的近2倍,其中尤以青海门源县的镰形棘豆总生物碱含量为高。批号1和批号2两批样品均来自青海共和县,含量却相差近2倍,可能与采收时间、贮藏条件等因素有关。生物碱含量与采收时间、贮藏条件等因素的关系有待进一步研究。

综上,本试验结果可为镰形棘豆质量标准的制定提供一定的依据,也可为后续的药理实验提供一定的理论基础。

## 参考文献

- [1] 姜华,詹文强,刘霞.藏药镰形棘豆的生药学鉴定[J].中国中药杂志,2007,32(24):2 664.
- [2] 朱云相.中国豆科植物分类系统概览:英文[J].植物研究,2004,24(1):20.
- [3] 姜华,胡君茹,刘霞.镰形棘豆的研究进展[J].中草药,2006,37(2):314.
- [4] 王栋,杨欢,童丽,等.藏药镰形棘豆的镇痛抗炎活性[J].药学与临床研究,2008,16(2):90.
- [5] Yang GM, Wang D, Tang W, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Oxytropis falcata* Bunge fractions and its possible anti-inflammatory mechanism[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2010, 8(4):285.
- [6] 杨光明,张芳芳,王栋,等.镰形棘豆对SMMC-7721肝癌细胞增殖及MMP-2表达的影响[J].中国中药杂志,2011,36(9):1 227.
- [7] 张芳芳,杨光明,王栋,等.镰形棘豆提取物抗肿瘤活性的体外实验研究[J].药学与临床研究,2010,18(2):135.
- [8] Long L, Li QW. The effect of alkaloid from *Oxytropis ochrocephala* on growth inhibition and expression of pncn and p53 in mice bearing H22 hepatocellular carcinoma [J]. Yakugaku Zasshi, 2005, 125(8):665.
- [9] 吴达,龙玲,张彦明.甘肃棘豆抗肿瘤活性成分的筛选[J].中国兽医科学,2007,37(5):440.
- [10] 刘铭,王明娟,刘伟,等.甘肃棘豆体内生物碱部位活性的研究[J].中国现代医药杂志,2008,10(12):8.
- [11] 陈醒,杨光明,何媛媛,等.镰形棘豆总生物碱对S180荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J].中华中医药杂志,2011,26(11):2 540.
- [12] 王楠楠,唐玉梅,韩小年,等.生物碱类物质含量测定方法研究进展[J].西北药学杂志,2006,21(6):287.
- [13] 李萍,曾令杰,李松林.无紫外吸收的贝母总生物碱定量分析方法研究[J].中国药学杂志,2002,37(8):614.
- [14] 周毅玲.酸性染料比色法测定延胡索总生物碱的量[J].中草药,2008,39(8):1 257.
- [15] 余江平,刘震东,王曙.分光光度法测定栽培川贝母中总生物碱的含量[J].中国药房,2010,21(15):1 383.
- [16] 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.
- [17] 陈醒,杨光明,蔡宝昌.棘豆属植物生物碱类成分结构特征和生理活性研究进展[J].南京中医药大学学报,2011,27(1):95.

(收稿日期:2012-05-06 修回日期:2012-07-19)