

# 浙贝母总生物碱提取工艺优化研究\*

□徐晓婷 田 婧 林宏英 龚卫红 吴 清\*\*

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

**摘 要** :目的 :优化浙贝母中总生物碱提取工艺。方法 :以总生物碱含量为指标 ,采用酸性染料比色法测定浙贝母总生物碱含量 ,以乙醇用量、乙醇浓度、回流时间为主要影响因素开展正交试验 ,以回流次数单因素考察优化提取工艺。结果 :最佳提取工艺为 70%乙醇 ,6 倍量溶媒 ,提取 2 次 ,每次 2 h。结论 :所优选出的提取工艺方法合理可行 ,稳定可靠。

**关键词** :浙贝母 总生物碱 酸性染料比色法 正交试验 提取工艺

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.06.025

浙贝母(*Fritillaria thunbergii* Miq.)为百合科植物浙贝母的地下鳞茎,主产于浙江、安徽、江苏、湖南等地。性味苦寒,归心肺经。具有清热润肺、化痰止咳及散结之功效,常用于治疗风热犯肺、痰火咳嗽、肺痛、乳痛、瘰疬、疮毒<sup>[1]</sup>。贝母生物碱是其主要药理活性组分<sup>[2]</sup>,本文采用酸性染料比色法测定浙贝母总生物碱含量,以正交试验考察可能影响提取生物碱的因素,如乙醇用量、乙醇浓度、回流时间,优选出浙贝母中生物碱的提取条件,为进一步制备现代制剂提供参考。

## 一、仪器与试药

### 1. 仪 器

BS110S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),SP-752(PC)-紫外可见分光光度计(上

海光谱),8Y11-KP2C 型电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司),SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂),RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),PHS-25 型酸度计(上海伟业仪器厂)。

### 2. 试 药

浙贝母饮片(购自安国以岭中药饮片有限公司,产地为浙江),贝母素乙对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110751-200709),二氯甲烷、三氯甲烷、氨水、溴麝香草酚蓝、磷酸二氢钠和氢氧化钠均为分析纯。

## 二、实验方法

### 1. 总生物碱含量测定<sup>[3]</sup>

#### (1) 显色剂配制。

称取溴麝香草酚蓝 0.0200 g,溶于 pH7.6 缓冲溶液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 配

收稿日期:2011-12-09

修回日期:2012-03-06

\* 国家自然科学基金项目(81073059):基于 Nrf2/ARE 通路的当归超临界提取物癌症化学预防作用有效组分的确认及机理研究,负责人:吴清;国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2012CB724001):基于释药动力学的多组分缓控释给药体系的评价方法研究,负责人:王智民;国家高技术研究发展计划("863 计划")项目(2009AA043201):中药生产现代化质量控制技术,子课题负责人:吴清;北京中医药大学创新团队(2011\_CXTD\_13):中药复方制药研究创新团队,负责人:杜守颖。

\*\* 通讯作者:吴清,教授,博士,主要研究方向:中药新剂型与制剂关键技术,Tel:010-84738616,E-mail:rqwu@vip.sina.com。

制)90 mL 中,即得。

#### (2)对照品溶液配制。

取贝母素乙对照品 3.24 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加 95%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为  $0.13 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。

#### (3)供试品溶液制备。

取浙贝母粉末(过四号筛)约 2.0 g,精密称定,置烧瓶中,加浓氨试液 4 mL 浸润 1 h,精密加入三氯甲烷-甲醇(4:1)的混合溶液 40 mL,称定重量,混匀,置  $80^\circ\text{C}$  水浴中加热回流 2 h,放冷,再称定重量,以上述混合溶液补足减失的重量,滤过。精密量取续滤液 20 mL,至蒸发皿中蒸干,残渣加 95%乙醇使溶解并转移至 25 mL 量瓶中,加 95%乙醇至刻度,摇匀,即得。

#### (4)最大吸收波长的测定。

精密吸取阴性样品溶液、贝母素乙对照品溶液、样品溶液各 0.5 mL 于具塞试管中,蒸干,分别加入 pH7.6 溴麝香草酚蓝溶液各 4 mL,再加二氯甲烷 6 mL,涡旋振摇 2 min,静置 2 h,分取二氯甲烷层于 330~480 nm 范围内扫描测定吸光度。阴性、贝母素乙对照品和样品溶液用 pH7.6 溴麝香草酚蓝溶液显色后的吸收光谱见图 1。由图 1 可知,生物碱在酸性染料中最大吸收波长为 410 nm,由此可以确定总生物碱测定的吸收波长为 410 nm。

#### (5)显色稳定性考察。

精密吸取浙贝母样品溶液 0.5 mL,按上述方

法操作,在 0、20、40、60、80、100、120 min 测定吸光度。由表 1 可知,二氯甲烷萃取液放置 120 min 基本稳定。

#### (6)线性关系考察。

精密吸取  $0.13 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  贝母素乙对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,按上述方法测定吸光度,以贝母素乙对照品溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,并进行线性回归,得到回归方程  $A=0.039C+0.037$  ( $r^2=0.997$ )。结果表明,浙贝母总生物碱在  $2.17\sim 21.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内与吸光度呈良好的线性关系。

#### (7)精密度考察。

精密吸取样品溶液 5 份,每份 0.5 mL,蒸干,测定吸光度,计算含量(见表 2)。结果表明,该方法精密度良好。

#### (8)重复性考察。

按“供试品溶液制备”项下方法制备样品溶液,

表 1 显色稳定性考察结果

显色时间(min)	吸光度(A)	RSD(%)
0	0.398	
20	0.404	
40	0.409	1.35
60	0.407	
80	0.410	
120	0.414	

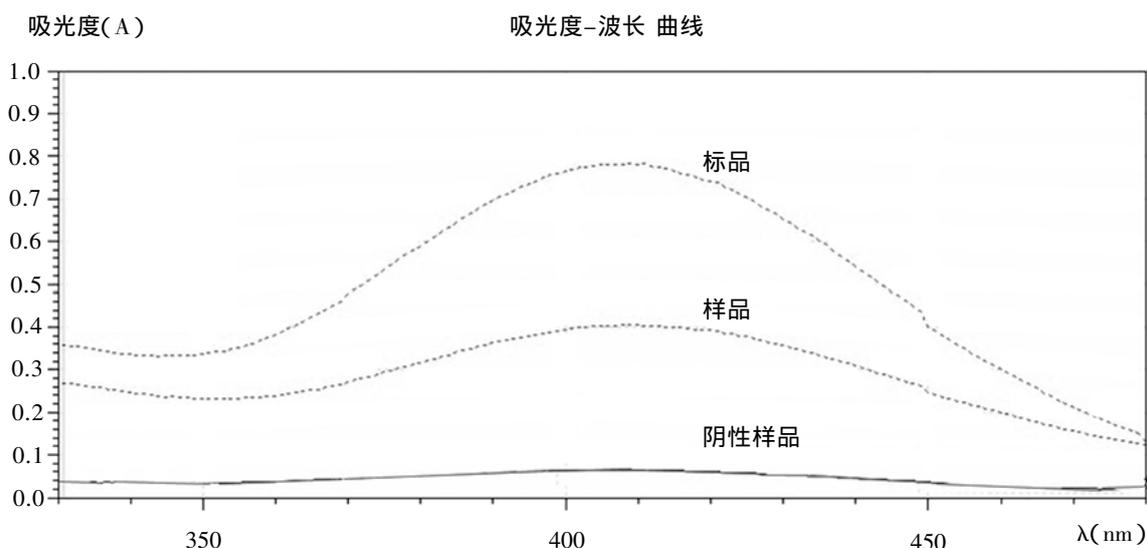


图 1 阴性样品、贝母素乙对照品和样品显色后紫外吸收光谱

平行操作 5 份,各精密吸取 0.5 mL,蒸干,测定吸光度,并按回归方程计算含量(见表 3)。结果表明,该方法重现性良好。

#### (9)回收率试验。

精密称定已知含量的样品 5 份,分别加入贝母乙素标准品适量,按“供试品溶液制备”项下方法制备各供试品溶液,测定吸光度,按回归方程计算含量(见表 4)。平均回收率为 102.6%,RSD=1.11%。

### 2. 提取工艺优化

#### (1)正交试验优化提取工艺<sup>[4-6]</sup>。

在以往浙贝母总生物碱提取分离研究的基础上,本文选取乙醇浓度、乙醇用量、回流时间为考察因素,选用  $L_9(3^4)$  正交表安排实验,因素水平的安排见表 5。取浙贝母饮片 30.0 g,按正交试验设计因素水平表进行实验,加入乙醇回流提取,合并提取液,滤过,定容至 500 mL,采用酸性染料比色法测定浙贝母总生物碱含量,结果见表 6、表 7。

方差分析结果表明,以生物碱含量为考察指标时,影响因素大小顺序:A>C>B,其中因素 A 和因素 C 有显著性差异,B 因素没有显著性差异,根据

表 2 精密度考察结果(%)

编号	含量	平均含量	RSD
1	0.27		
2	0.28		
3	0.27	0.28	2.71
4	0.28		
5	0.28		

表 3 重复性考察结果(%)

样品	含量	平均含量	RSD
1	0.32		
2	0.31		
3	0.32	0.31	2.61
4	0.32		
5	0.30		

表 4 回收率试验结果

编号	实际加入 贝母素乙量( $\mu\text{g}$ )	测得加入 贝母素乙量( $\mu\text{g}$ )	回收率(%)
1	33.8	34.22	101.2
2	33.8	34.88	103.2
3	33.8	35.28	104.4
4	33.8	34.61	102.4
5	33.8	34.41	101.8

SPSS.V 16.0 统计分析结果,得出浙贝母总生物碱提取的最佳工艺为  $A_2B_1C_3$ ,即 70%乙醇,6 倍量溶媒,提取 2 h。

#### (2)验证试验。

取浙贝母饮片 30.0 g,按正交优选工艺  $A_2B_1C_3$ ,即 70%乙醇,6 倍量溶媒,提取 2 h 进行正交验证实验,计算浙贝母总生物碱含量,结果见表 8。验证结果与正交试验结果相近,说明该工艺稳定可行。

#### (3)单因素考察提取次数。

鉴于在正交试验中未考虑提取次数的影响,按上述条件,以总生物碱含量为指标,考察提取次数对工艺的影响,结果见表 9。

综上所述,以总碱含量为指标,采用正交试验

表 5 因素水平表

水平	乙醇浓度/%	乙醇体积/倍	提取时间/h	空白
	A	B	C	D
1	60	6	1	
2	70	8	1.5	
3	80	10	2	

表 6 正交实验设计及结果

序号	A	B	C	D(空白)	含量(%)
1	1	1	1	1	0.18
2	1	2	2	2	0.22
3	1	3	3	3	0.25
4	2	1	2	3	0.29
5	2	2	3	1	0.33
6	2	3	1	2	0.28
7	3	1	3	2	0.26
8	3	2	1	3	0.23
9	3	3	2	1	0.24
K1	0.66	0.73	0.69	0.76	
K2	0.90	0.78	0.76	0.76	
K3	0.73	0.78	0.84	0.77	
R	0.24	0.04	0.16	0.01	

表 7 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均差	F	P
乙醇浓度(A)	0.011	2	0.005	16.000	<0.05
乙醇体积(B)	0.000	2	0.000	7.000	>0.05
提取时间(C)	0.004	2	0.002	57.000	<0.05
误差	$6.667 \times 10^{-5}$	2	$3.333 \times 10^{-5}$		

表8 验证试验结果

样品号	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
1	0.34		
2	0.35	0.35	0.40
3	0.35		

表9 提取次数考察结果( $n=2$ )

提取次数	含量(%)	RSD(%)
1	0.22	2.78
2	0.35	0.40
3	0.36	0.58

设计和单因素考察对浙贝母醇提工艺参数进行优选,确定的最佳工艺为70%乙醇,6倍量溶媒,提取2次,2h/次。

### 三、讨论

酸性染料比色法的原理是在适当pH介质中,生物碱与氢离子结合的阳离子( $BH^+$ )与溴麝香草酚蓝解离的阴离子( $In^-$ )定量结合成有色离子对被有机溶剂提取后,形成有色溶液,可供比色测定。李萍等<sup>[7]</sup>比较研究了贝母总生物碱的3种定量分析方法发现,非水滴定法所测得的结果高于酸性染料比色法和两相滴定法。但据文献报道<sup>[8]</sup>用滴定法对总生物碱含量测定时存在样品消耗较大,终点变化不明显,不易辨认的问题,故本实验采用酸性染料比色法测定浙贝母的总生物碱的含量。该

法操作方便,简洁,回收率高,结果可靠,可用于浙贝母的质量控制。

由于生物碱含量测定受温度影响较大,在实验过程中,因尽量在稳定的温度条件下进行,以避免温度变化带来的实验误差。同时供试品溶液的处理中溶剂易挥发,会造成一定的系统误差,因此操作过程要注意供试品溶液处理的平行性,减少误差。

通过本实验优化的提取工艺所得到的浙贝母生物碱含量高于丁春霞等<sup>[4]</sup>用摇床振荡法得到的浙贝母生物碱含量,且工艺稳定,可作为浙贝母生物碱提取的一种较好选择。

### 参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:化学工业出版社, 2010:274.
- 2 张明发, 沈雅琴. 浙贝母药理研究进展. 上海医药, 2007, 28(10):459~461.
- 3 刘斌, 石任兵, 周素蓉. 苦参汤有效部位总生物碱含量测定方法研究. 北京中医药大学学报, 2004, 27(2):76~79.
- 4 丁春霞, 屠善军, 应敏. 浙贝母中生物碱提取方法以及条件的优化. 现代中药研究与实践, 2004, 18(2):28~30.
- 5 冉婧, 龙江, 田淑琴, 等. 正交试验法优选复方贝母醇提工艺条件的研究. 科技信息, 2007, 33:31~32.
- 6 徐仿周, 陈昶, 阮汉利, 等. 湖北贝母有效部位提取工艺的研究. 时珍国医国药, 2009, 20(5):1033~1034.
- 7 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. 中国药学杂志, 2002, 37(8):614~617.
- 8 夏德豪, 程显隆, 肖新月, 等. 平贝母中总生物碱含量测定方法学研究. 中国药事, 2007, 21(9):756~758.

### Extraction Technology of Total Alkaloids in *Bulbus Fritillariae Thunbergii*

Xu Xiaoting, Tian Jing, Lin Hongying, Gong Weihong, Wu Qing

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**Abstract:** This study was aimed to optimize the extraction technology of total alkaloids in *Bulbus Fritillariae Thunbergii*. Acid dye colorimetry was adopted to determine the total alkaloid, with the content of total alkaloids as index. The extraction technology was optimized by orthogonal and the single factor tests. The results showed that the optimal extract processing was 6 times volume 70% ethanol, 2 h and extracting 2 times. It was concluded that the optimal extract processing was reasonable, stable and reliable.

**Keywords:** *Bulbus Fritillariae Thunbergii*, total alkaloids, acid dye colorimetry method, orthogonal design, extraction technology

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)