

苦参药材中总生物碱含量的测定

邵晶^{1,2}, 倪京满, 郭玟, 赵磊, 余晓晖 (1. 兰州大学药学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃中医学院药理学系, 甘肃兰州 730000)

摘要 [目的] 用酸性染料比色法测定不同产地苦参药材中总生物碱的含量。[方法] 苦参总生物碱的浓度50%乙醇溶液, 加一定pH值的缓冲溶液溴麝香草酚蓝指示液振摇后, 氯仿萃取, 萃取液于一定波长处测定吸光度A。[结果] 氧化苦参碱检测浓度在0.013~0.026 ng/ml范围内与吸光度线性关系良好($r=0.9971$)。用氧化苦参碱作为对照品, 在pH值7.0的条件下加入2.0 ml的溴麝香草酚蓝溶液, 在417 nm处有最大吸光度, 该条件下可准确地测定苦参药材中总生物碱的含量。试验测得不同产地苦参药材中总生物碱含量差异较大, 其中所购得的陕西、甘肃苦参药材中总生物碱含量较高, 分别为1.801、1.778 ng/kg。[结论] 该试验所采用的方法操作简便、准确, 可通过总生物碱的含量客观全面地评价苦参药材的质量。

关键词 酸性染料比色法; 溴麝香草酚; 苦参总生物碱; 氧化苦参碱; 含量测定。

中图分类号 S567.5+3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)36-15950-02

Comparison of Total Alkaloid Content in *Sophora flavescens* Ait. Medicinal Materials from Different Producing Areas

SHAO Jing et al (Department of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract [Objective] The research aimed to determine the content of total alkaloid in *Sophora flavescens* Ait. medicinal materials from different producing areas by acid dye colorimetry. [Method] Buffer solution with certain pH value and bromothymol blue indicator were added to 50% ethanol solution of total alkaloid from *S. flavescens*. After oscillation and chloroform extraction, the absorbency (A) of extract liquid was determined at certain wavelength. [Result] The detection concentration of oxynatine in the range of 0.013 - 0.026 ng/ml had a good linear relationship with its absorbency ($r = 0.9971$). With oxynatine as control substance, 2.0 ml bromothymol blue solution was added at pH value of 7.0. It had the maximum absorbency at the wavelength of 417 nm. Under these conditions, the content of total alkaloid in *S. flavescens* medicinal materials could be determined accurately. It was known from the test determination results that the content of total alkaloid in *S. flavescens* had greater difference among different producing areas. The content of total alkaloid in *S. flavescens* medicinal materials bought from Shaanxi and Gansu were higher, being 1.801 and 1.778 ng/kg respectively. [Conclusion] The used method in the test was simple and accurate. And the quality of *S. flavescens* medicinal materials could be evaluated objectively and roundly through the content of total alkaloid.

Key words Acid dye colorimetry; Bromothymol; Total alkaloid in *S. flavescens*; Oxynatine; Content determination

中药苦参是豆科植物苦参(*Sophora flavescens* Ait.)的干燥根, 具有抗炎、抗肿瘤、镇痛、抗心律失常、平喘、镇咳、杀菌等作用^[1-2], 主要含有生物碱, 其生物碱含量的多少是评价苦参药材质量好坏的重要指标之一。苦参总生物碱中主要含有氧化苦参碱和苦参碱等, 多采用HPLC法进行测定^[3-5], 但是仅通过一种或几种生物碱的含量评价药材质量不够客观, 笔者采用酸性染料比色法, 以氧化苦参碱为对照品, 对4个不同产地来源的苦参中的总生物碱进行含量测定, 旨在为更加客观全面地评价苦参药材质量提供科学依据。

1 材料与方

1.1 材料 紫外可见分光光度计(UV-2401PC, 日本岛津); 精密pH计(PHS-25, 上海雷磁仪器厂); 离心机(LD4-20, 北京医用离心机); ZK-82B真空干燥箱(上海市试验仪器所)等。

氧化苦参碱对照品(中国药品生物制品检定所); 溴麝香草酚蓝(天津天新精细化工开发中心); 盐酸、三氯甲烷、氢氧化钠(分析纯); 磷酸二氢钾(化学纯)。试验药材购自甘肃、陕西、湖南、湖北4个产地, 经甘肃中医学院副教授晋玲鉴定为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备。称取氧化苦参碱对照品1.3 ng, 加浓度50%乙醇制备成浓度为0.026 ng/ml的对照品溶液, 备用。

1.2.2 pH值7.0缓冲溶液的制备。取浓度0.1 mol/L磷酸二氢钾溶液300 ml, 浓度0.1 mol/L氢氧化钠溶液280 ml, 混匀用pH酸度计校正缓冲溶液pH值为7.0。

1.2.3 酸性染料的制备。称取溴麝香草酚蓝0.025 g溶于上

述200 ml的pH值7.0缓冲溶液中, 配成浓度 2×10^{-4} mol/L的酸性染料。

1.2.4 标准曲线的绘制。用移液管准确量取氧化苦参碱对照品溶液1、2、3、4、5、6 ml, 置于干燥的具塞三角瓶中, 各加蒸馏水至6 ml, 分取5 ml, 分别加入pH值7.0缓冲液5 ml, 再依次精密加入浓度0.025%溴麝香草酚蓝标准液2.0 ml, 氯仿10.0 ml, 振摇1 min, 转移至50 ml分液漏斗放置分层, 静置1 h, 分取氯仿层, 在417 nm波长处测定吸光度。另以同法操作(不加氧化苦参碱对照品溶液)的氯仿为空白。以浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.5 供试品溶液的制备。分别称取2批4个不同产地苦参药材50 g, 用浓度0.2%盐酸浸泡48 h后, 渗滤, 至渗滤液加生物碱沉淀试剂不产生沉淀为止, 将酸水提取液用NaOH调节至pH值12.0, 待沉淀完全后, 离心, 沉淀物置蒸发皿中, 于60.0℃下干燥至恒重, 得苦参总生物碱干燥品。

称取2批4个不同产地苦参总生物碱干燥品0.1 g于150 ml容量瓶中, 用浓度50%乙醇溶解并定容至150 ml, 配制总生物碱的稀释液, 即为供试品溶液, 备用。

1.2.6 酸性染料染色条件的考察。

(1) 缓冲溶液pH值的考察。量取供试品溶液5.0 ml共4份, 置于分液漏斗中, 分别加入pH值8.0、7.6、7.0、6.5的缓冲溶液5 ml后, 依次加入浓度0.025%溴麝香草酚蓝1.0 ml、氯仿10.0 ml, 振摇1 min, 静置1 h, 分取氯仿层。用紫外可见分光光度计于417 nm处测定吸光度。

(2) 酸性染料用量考察。量取供试品溶液5.0 ml共4份, 分别置于分液漏斗中, 加入pH值7.0的缓冲溶液5 ml后, 分别加入浓度0.025%溴麝香草酚蓝1、2、4、6 ml, 再加氯仿10.0 ml, 振摇1 min, 静置1 h, 分取氯仿层。用紫外可见分

光光度计在417 nm处测定吸光度。

1.2.7 测定波长的选择。 分别取4个不同产地的苦参药材供试品溶液,经酸性染料染色操作后,分取氯仿层。于200~800 nm进行全波长扫描。

1.2.8 不同产地苦参总生物碱含量测定。 分别取稀释液5.0 mL置分液漏斗中,依次加入pH值7.0缓冲溶液5 mL、浓度0.025%溴麝香草酚蓝标准液2.0 mL,氯仿10.0 mL,振摇1 min,静置1 h,分取氯仿层。用紫外可见分光光度计于417 nm处测定吸光度。将测得的吸光度值代入回归方程,计算苦参药材中总生物碱的含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线绘制结果 根据试验所绘制标准曲线得回归方程 $Y = 0.2 + 12.26 X$ ($r = 0.9971$)。试验结果表明,氧化苦

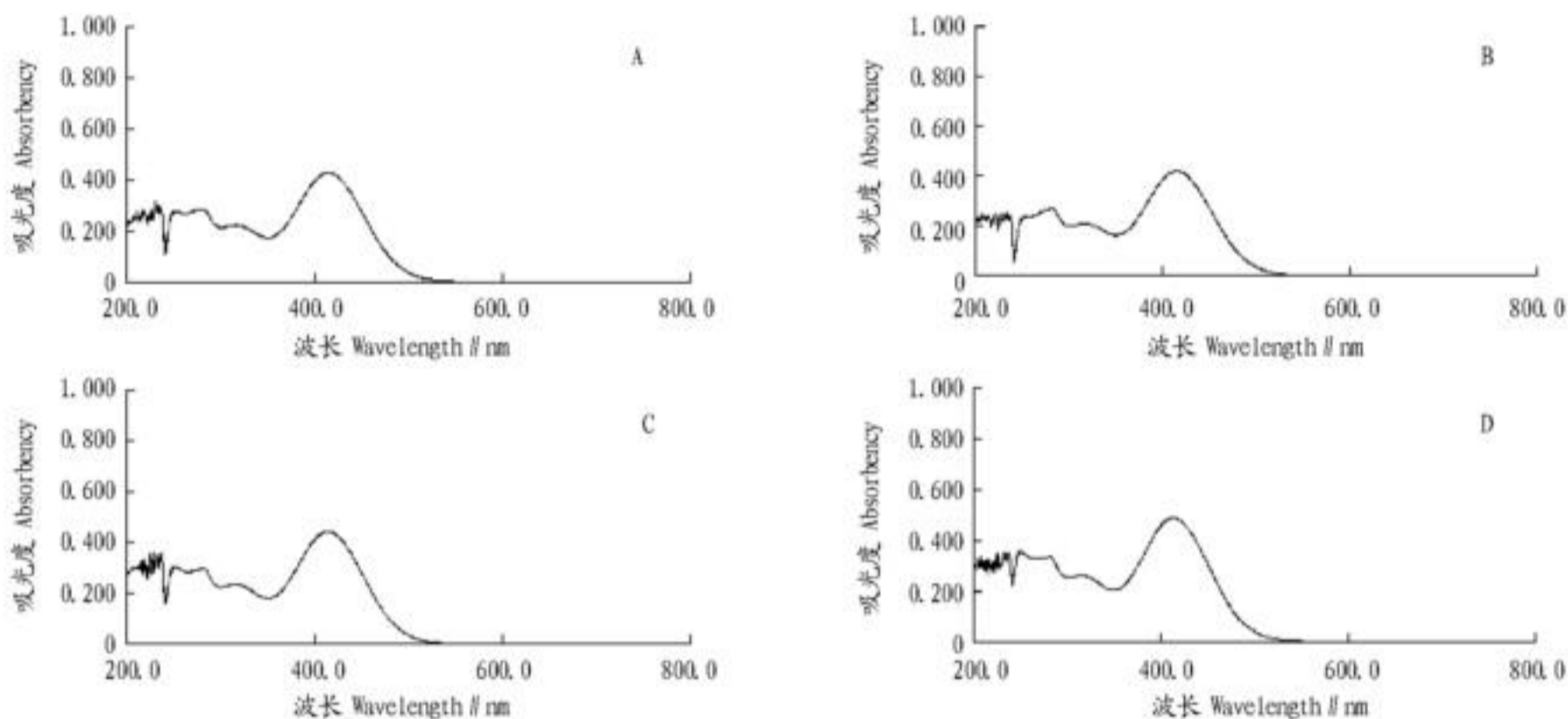
参碱浓度在0.013~0.026 ng/mL范围内与吸光度线性关系良好。

2.2 酸性染料染色条件

2.2.1 缓冲溶液pH值。 试验结果表明,当pH值为6.0、7.0、7.6、8.0时,吸光度($n = 3$)分别为0.306、0.592、0.492、0.230,表明用pH值7.0溴麝香草酚蓝溶液显色,吸光度最大。

2.2.2 酸性染料用量。 试验结果表明,当酸性染料用量为1.0、2.0、4.0、6.0 mL时,吸光度($n = 3$)分别为0.156、0.468、0.391、0.360,表明用浓度0.025%溴麝香草酚蓝溶液2.0 mL显色,吸光度最大。

2.3 测定波长 试验结果表明,溶液在417 nm处吸收最强,最终确定417 nm为检测波长(图1)。



注:A为甘肃;B为湖北;C为湖南;D为陕西。图为经酸性染料染色后结果。

Nte :A, Gansu ; B, Hubei ; C, Hunan ; D, Shaanxi .The results are after acid dyeing.

图1 不同产地苦参总生物碱提取液紫外光谱图

Fig.1 The ultraviolet spectrogram of total alkaloid extract from *Sophora flavescens* Ait. from different producing areas

2.4 不同产地苦参总生物碱含量测定结果 对4个不同产地苦参总生物碱的含量测定结果(表1)表明,不同产地来源的苦参药材总生物碱含量存在较大差异,其中试验所购得的陕西、甘肃的苦参药材中生物碱含量较高,湖北、湖南次之。

表1 样品含量测定结果

Table 1 The determination results of total alkaloid content in samples

产地	平均总生物碱含量 ng/g	百分含量 %
Producing areas	Average content of total alkaloid	Percentage content
陕西 Shaanxi	1.801	0.1801
甘肃 Gansu	1.778	0.1778
湖南 Hunan	1.562	0.1562
湖北 Hubei	1.654	0.1654

3 结论与讨论

(1) 由于苦参药材含有的生物碱属 诺里西 类,其中苦参碱和氧化苦参碱具有一定的水溶性,所以要注意所用的提取溶剂及方法,因此,该试验中使用了碱性苦味酸、改良碘化铋钾等多种生物碱沉淀试剂来判断是否提取完全。

(2) 该试验在药材总生物碱提取工艺中考察了盐酸的浓

度、浸泡时间等对提取的影响,结果发现浓度0.2%盐酸浸泡48 h效果好,可以保证生物碱提取完全。

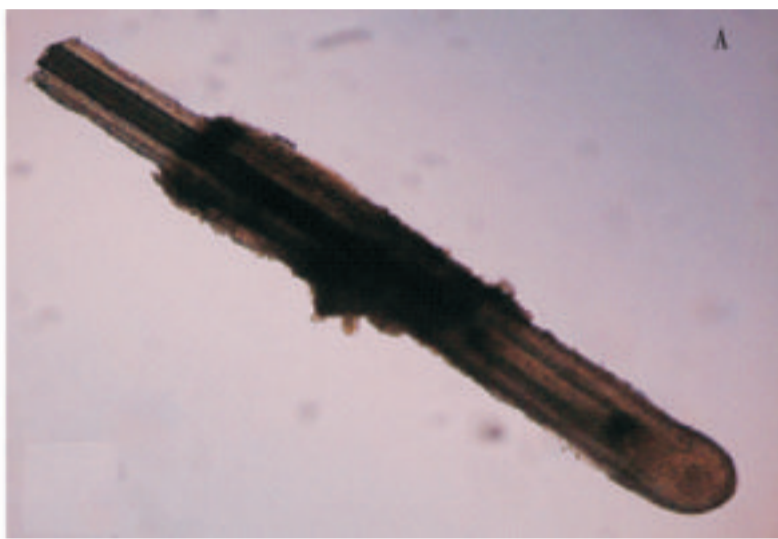
(3) 在一定pH值介质中,生物碱与氢离子生成阳离子,一些酸性染料在该条件下可解离成阴离子而与上述阳离子定量结合成有色络合物,可被有机溶剂定量提取。该试验中就应用了上述原理,用氧化苦参碱作为对照品在pH值7.0的条件下与溴麝香草酚蓝络合成可被氯仿萃取的有色离子对,在417 nm处有最大吸收。苦参药材中在该条件下能与溴麝香草酚蓝显色的生物碱均可被测出,从而可以求得总生物碱的含量,可更加全面科学地评价苦参药材的质量。但该方法对试验条件要求较高,试验条件的改变会对结果产生较大影响,这需要在今后不断地改进和提高。

(4) 缓冲溶液的pH值及溴麝香草酚蓝的用量对测定结果影响较大,该试验进行了最佳条件选择。结果表明,pH值7.0的溴麝香草酚蓝2.0 mL时,已能与生物碱完全结合,生物碱被充分萃取,吸光度最大。再增加溴麝香草酚蓝用量,反而会因空白溶液颜色加深,使吸光度下降,且酸性染料不能长期放置,需新鲜配制^[5]。(下转第15967页)

羊初级毛囊体外无血清培养进行了研究。结果发现,绒山羊毛囊在 Williams E 无血清培养基中生长良好,毛囊持续生长达15 d 以上,明显优于在无血清 DMEM 培养基中的生长情况。比较它们的成分可以发现 Williams E 含有丰富的氨基酸、维生素和微量元素,均有助于毛囊的生长。Bond 等^[2]和 Harmon 等^[3]报道胰岛素、氢化可的松、亚硒酸钠和转铁蛋白有助于毛囊的生长和形态的维持。其中,胰岛素是培养毛囊所必需的成分,缺少时毛囊生长受抑制并发生形态改变,过早地进入衰退期(其有效刺激浓度为 0.01 ~ 100.00 ng/ml)^[4]。L-谷氨酰胺是体内游离氨基酸池中含量最丰富的“条件性必需氨基酸”,为毛囊保持细胞活性提供必要的能量物质^[5]。伍津津等报道在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养

基中 37 °C 培养毛囊时,前 3 d 平均生长速度为 0.14 mm/d,仅生长 5 ~ 6 d 便开始贴壁并停止生长,可能与血清中含有多种影响毛囊生长的因子如 TGF- β 和黏附因子等有关^[6]。Imai 等认为 31 °C 适合毛囊培养^[7],而 Westgate 等认为 37 °C 培养毛囊生长速度更高^[4]。不同温度对毛囊生长的影响尚需进一步研究,但无论选择何种温度均应注意培养箱内保持一定的湿度^[8]。可见,培养基及培养条件的选择十分重要。

综上所述,要成功进行游离毛囊的培养,首先要挑选完整的生长期毛囊,其次最好选用无血清培养基,Williams E 培养基是较好的选择。游离毛囊培养体系的建立对于认识调节毛囊生长发育的分子机理具有重要意义。



注:A. 无血清 Williams E 培养基(50 ×);B. 无血清 DMEM 培养基(50 ×)。

Note: A. Serumfree Williams E media (50 ×); B. Serumfree DMEM media (50 ×) .

图2 不同培养基中培养第6天的初级毛囊

Fig 2 Primary hair follicles cultured in different media on the 6th day

参考文献

- [1] PHLOTT MP, GREEN MR, KEALEY T. Human hair growth in vitro[J]. J Cell Sci, 1990, 97: 93 - 471.
- [2] BONDI J, WYNN P C, BROWN G N, et al. Growth of wool follicles in culture [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1994, 30(2): 90 - 98.
- [3] HARMON C S, NEMNS T D. Hair fibre production by human hair follicles in whole organ culture [J]. Br J Dermatol, 1994, 130(4): 415 - 23.
- [4] WESTGATE G E, GIBSON W T, KEALEY T, et al. Prolonged maintenance of human hair follicles in vitro in a serum free medium [J]. Br J Dermatol, 1993, 129:

372 - 379.

- [5] 吴磊, 刘莉萍, 范卫新. 不同缓冲液对离体毛囊活性影响的比较研究 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 23(6): 470 - 472.
- [6] 伍津津, 刘荣卿, 叶庆佺, 等. 人头皮游离毛囊培养 [J]. 中华皮肤科学杂志, 1996, 29(4): 246 - 248.
- [7] IMAI R, MURA Y, MICHIDA K, et al. Organ culture conditions of human hair follicles [J]. J Dermatol Sci, 1992, 3: 163 - 171.
- [8] LI H, LI J Q, CAO G F, et al. Effects of different culture condition in vitro on growth of cashmere goat primary hair follicles [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 43 - 46.

(上接第15951页)

(5) 对测定波长的选择结果表明,不同产地苦参总生物碱提取经酸性染料染色后在 417 nm 波长处均有最大吸收峰,且氧化苦参碱与溴麝香草酚蓝形成的络合物在 417 nm 波长处也有最大吸收峰,故选择 417 nm 为检测波长,这一点与参考资料中一致^[3-5]。

(6) 该试验通过酸性染料染色法考察了不同产地苦参药材总生物碱的含量,能更加全面地评价药材质量,为以后的试验和科研提供了参考,为控制中药质量、保证用药合理有效提供了科学依据。

效提供了科学依据。

参考文献

- [1] 李广勋. 中药药理与临床 [M]. 天津: 科技翻译出版公司, 1992: 63 - 64.
- [2] 李金陵, 程爱民, 荆宇红, 等. 重要苦参抗肿瘤作用的试验研究 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2002, 9(2): 28 - 29.
- [3] 仵文英, 刘硕, 张抗怀, 等. 酸性染料比色法测定苦参碱脂质体中苦参碱的含量 [J]. 中国药房, 2005, 16(22): 1734 - 1735.
- [4] 朱治富, 李国元, 赵成, 等. 酸性染料比色法测定乌贝散中浙贝总生物碱的含量 [J]. 安徽医药, 2003, 7(3): 222.
- [5] 李建伟. 酸性染料比色法测定苦参药材中总生物碱的含量 [J]. 长治医学院学报, 2007, 10(21): 331 - 332.