

# 滤液法和沉淀法测定宁夏枸杞果实醇提物中季铵型生物碱的含量

马 茜, 饶 建 华

(宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

**摘 要:**以宁夏枸杞为试材,基于季铵型生物碱与雷氏盐的反应原理,采用分光光度法测定宁夏枸杞果实醇提物中季铵型生物碱含量,建立了宁夏枸杞果实醇提物中季铵型生物碱的含量测定方法。结果表明:滤液法与沉淀法的平均回收率分别为 97.57%与 98.06%,RSD 分别为 1.02%与 1.10%( $n=6$ )。由此看出,滤液法与沉淀法用于季铵型生物碱的含量测定,所得结果基本一致,滤液法操作相对简便。

**关键词:**宁夏枸杞;季铵型生物碱;雷氏盐;分光光度法;滤液法;沉淀法

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0142-04

我国枸杞属植物种质资源现有 7 个品种和 2 个变种<sup>[1]</sup>,主要分布于宁夏、河北、内蒙古、新疆、青海等省(自治区),其中以宁夏地区得天独厚的地理环境所种植的枸杞最为“道地”,素有“世界的枸杞在中国,中国的枸杞在宁夏,宁夏的枸杞在中宁”之说<sup>[2]</sup>。宁夏枸杞属茄科(Solanaceae)茄亚科(Solanoidea)枸杞族枸杞属(*Lycium*),落叶灌木植物<sup>[3]</sup>。《中华人民共和国药典》(2010 年版)唯一收录了宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的干燥成熟果实为中药枸杞子(*Lycii Fructus*)的药典品种<sup>[4]</sup>。随着对宁夏枸杞药理活性的深入研究表明,宁夏枸杞具有抗肿瘤、抗氧化、抗疲劳、抗辐射、抗衰老、降血脂、降血糖、降血压、保肝、补肾、明目、健脑、养颜、排毒、调节免疫力和保护生殖系统等功能,现已被广泛用于医药、食疗、养生、保健等领域<sup>[5-6]</sup>。

国内外学者对宁夏枸杞的化学成分及功能因子进行了大量的研究,主要集中在枸杞多糖、枸杞黄酮等方面,但对于其它成分,如生物碱的研究报道相对较少<sup>[7-8]</sup>。生物碱是多数天然药物的有效成分,季铵型生物碱是宁夏枸杞果实中主要生物碱之一,有一定表面活性作用和药用功能<sup>[9-10]</sup>。因此,现以季铵型生物碱为活性指标成分,基于季铵型生物碱与雷氏盐的反应原理,采用分光光度法测定宁夏枸杞果实醇提物中季铵型生物碱的含

量,同时比较滤液法和沉淀法对季铵型生物碱含量测定的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

宁夏枸杞果实由宁夏玉西枸杞科技开发有限公司提供。

T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);PB303-E 电子天平(METTLER-TOLEDO 仪器公司);R201D-11 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

甲醇、乙醚、氯仿、盐酸和丙酮等试剂均为分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品溶液的制备 宁夏枸杞研磨成粉末状过 40 目筛,精密称取 10 g,置 100 mL 三角烧瓶中,加入 80 mL 甲醇,超声提取 3 次,每次 1 h,静置过滤,并洗涤滤渣 3 次,收集合并滤液,减压浓缩得浸膏约 7 g;6 倍去离子水复溶,乙醚萃取,减压浓缩合并得水相,再用 0.1 mol/L 的盐酸定容水相至 50 mL,备用。

1.2.2 溶液的配制 对照品溶液的配制:精密称取甜菜碱对照品,加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解,制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液。2.5%雷氏盐溶液的配制:称取利英纳克盐 2.5 g,加水 100 mL,加热搅拌使溶解,过滤,备用(当天配制)。

1.2.3 测定波长的选择 沉淀法:取对照品溶液与供试品溶液各 5 mL,置于 25 mL 离心管中,加 0.1 mol/L 盐酸

**第一作者简介:**马茜(1988-),女,宁夏贺兰人,硕士,助理实验师,研究方向为生物学化学与分子生物学。E-mail:maqian226@126.com.

**基金项目:**国家科技支撑计划子课题资助项目(2009BAI72B03)。

**收稿日期:**2015-05-27

溶液调 pH 1.0, 冷却至 0~4℃, 加入 2.5% 雷氏盐溶液 6 mL, 摇匀, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度, 摇匀, 置 4℃ 条件下静置 3 h, 8 000 r/min, 4℃ 离心 30 min, 干燥滤纸滤过, 收集沉淀, 先用乙醚洗至洗涤液无色, 再用 70% 丙酮溶液溶解沉淀, 定容至 25 mL, 以 70% 丙酮溶液为空白, 分别测定其 70% 丙酮溶液在波长 400~600 nm 的吸收光谱。滤液法: 取对照品溶液、供试品溶液与空白试液(0.1 mol/L 盐酸溶液)各 5 mL, 以下操作同沉淀法项目, 至“干燥滤纸滤过”, 依法操作, 取续滤液, 定容至 50 mL, 以 0.1 mol/L 盐酸为空白, 分别测定续滤液在波长 400~600 nm 范围内的吸收光谱。

1.2.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取标品溶液 2、3、4、5、6、7、8、9 mL, 同 1.2.3 项操作, 以 70% 丙酮水溶液与 0.1 mol/L 盐酸为空白, 参照分光光度法, 在 520 nm 波长处测定吸光度。用标品的吸光度减去空白试剂的吸光度(沉淀法)或用对照品试剂的吸光度减去标品的吸光度(滤液法), 以吸光度差值 Y 对甜菜碱量 X(mg) 进行线性拟合, 绘制标准曲线。

1.2.5 方法学考察 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 每隔 0.5 h, 测定吸光度, 计算其 RSD, 考察样品的稳定性。重现性试验: 取同批提取物 6 份, 按 1.2.1 项制备样品溶液, 依 1.2.3 项方法分别测定吸光度, 并计算样品中水溶性生物碱含量以及 RSD, 考察该方法的重现性。回收率测定: 分别精密称取已知生物碱含量的同一批宁夏枸杞样品 6 份, 各约 10 g, 按 1.2.1 项下样品溶液制备方法制备样品溶液, 取 5 mL 样品溶液和 1 mL 甜菜碱对照品溶液共 6 mL, 按 1.2.3 项方法分别测定水溶性生物碱含量(n=6), 并计算其加样回收率和 RSD。

## 2 结果与分析

### 2.1 测定波长的选择

2.1.1 沉淀法 由图 1 可知, 在 300~600 nm 区间, 甜菜碱对照品溶液和样品溶液均在 520 nm 处有最大吸收, 故雷氏盐沉淀比色法测定宁夏枸杞水溶性生物碱的选择波长为 520 nm。

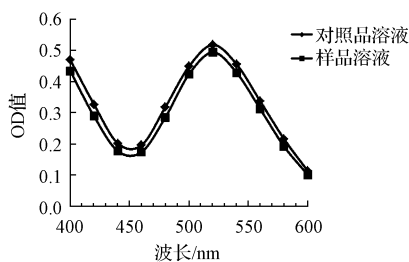


图 1 沉淀溶液的吸光光谱

2.1.2 滤液法 由图 2 可知, 在 300~600 nm 区间, 甜菜碱对照品溶液、样品溶液和空白试液均在 520 nm 处有最大吸收值, 且空白试液吸收值大于对照品溶液与样

品溶液, 故以空白试液的吸光度分别减去对照品与样品的吸光度, 可计算出水溶性生物碱的含量。

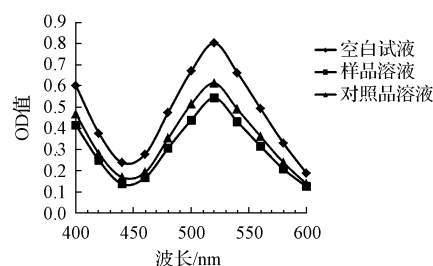


图 2 滤过溶液的吸光光谱

### 2.2 线性范围

按 1.2.4 绘制标准曲线并进行线性回归, 分别得回归方程: 沉淀法  $y=0.0011x-0.009238$  ( $R^2=0.9990$ ), 滤液法  $y=0.0006x+0.009107$  ( $R^2=0.9985$ ), 表明甜菜碱对照品在 160~720  $\mu\text{g/mL}$  的范围内浓度与吸光度呈良好的线性关系。

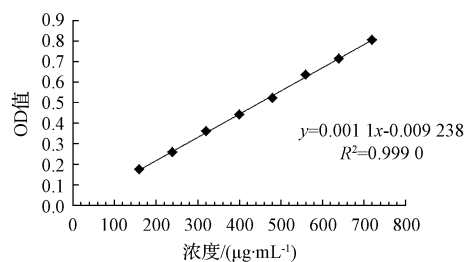


图 3 甜菜碱标准曲线图-沉淀法

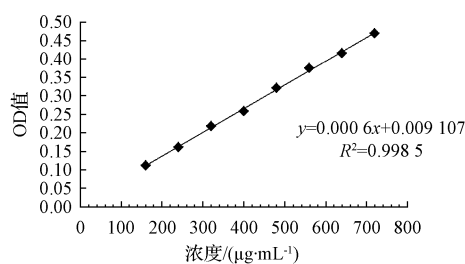


图 4 甜菜碱标准曲线图-滤液法

### 2.3 稳定性试验

样品溶液显色后 3 h 内, 每隔 0.5 h 测定其吸光度, 计算滤液法和沉淀法 RSD 分别为 0.39%、0.34%, 表明样品显色后 3 h 内基本稳定, 结果见表 1。

表 1 稳定性试验结果(n=3)

时间/h	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	RSD/%
滤液法	0.543	0.544	0.544	0.546	0.547	0.547	0.549	0.39
沉淀法	0.494	0.496	0.496	0.497	0.498	0.498	0.499	0.34

### 2.4 重现性试验

分别精密称取同一批宁夏枸杞样品 6 份, 进行重复性试验, 结果滤液法测得水溶性生物碱平均浓度约为

2.218 mg/mL, RSD 为 0.94%, 沉淀法测得水溶性生物碱平均浓度约为 2.305 mg/mL, RSD 为 1.22%, 结果如表 2。

表 2 滤液法和沉淀法测定水溶性生物碱的重复性试验结果

称样量 /g	滤液法			沉淀法		
	吸光度	浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	RSD/%	吸光度	浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	RSD/%
10.000	0.538	2.315		0.498	2.305	
10.000	0.542	2.248		0.507	2.346	
10.000	0.543	2.232	0.94	0.498	2.305	1.22
10.000	0.551	2.098		0.490	2.269	
10.000	0.540	2.282		0.501	2.319	
10.000	0.549	2.132		0.494	2.287	

## 2.5 加样回收率试验

分别精密称取已知含量的同一批宁夏枸杞样品 6 份, 进行加样回收率试验, 结果滤液法测得水溶性生物碱平均回收率为 97.57%, RSD 为 1.02%; 沉淀法测得水溶性生物碱平均回收率为 98.06%, RSD 为 1.10%; 表明该方法的测定结果在线性范围内是可靠的, 试验结果见表 3。

表 3 滤液法和沉淀法测定水溶性生物碱的加样回收率试验结果

加入量 /mg	滤液法			沉淀法		
	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
5	11.575	16.427	99.11	11.527	15.931	96.39
5	11.242	15.881	97.78	11.732	16.371	97.84
5	11.158	15.713	97.25	11.346	16.092	98.47
5	10.492	15.191	98.06	11.596	16.164	97.40
5	11.408	15.912	96.98	11.436	16.259	98.90
5	10.658	15.065	96.21	11.527	16.417	99.33

## 2.6 滤液法与沉淀法的比较

取同一供试品分别按滤液法与沉淀法测定水溶性生物碱含量, 结果见表 4。比较 2 种方法, 沉淀法测定值略大于滤液法测定值, 这可能是因为沉淀用乙醚洗涤不够完全所致。

表 4 滤液法和沉淀法的比较

编号	滤液法			沉淀法		
	实测量 /mg	平均含量 /%	RSD /%	实测量 /mg	平均含量 /%	RSD /%
1	114.08			115.27		
2	111.58	1.13	1.13	115.96	1.15	0.70
3	112.42			114.36		

## 3 讨论

雷氏盐比色法原理是根据雷氏盐与季铵型生物碱

反应生成不溶于水的生物碱雷氏铵盐沉淀, 该沉淀在 520 nm 处有最大吸收, 从而进行测定。在测定含量时, 首先, 应用活性炭对供试品进行脱色预处理, 否则样液中留有大量色素, 供试品溶液色泽太深, 从而掩盖水溶性生物碱在 520 nm 处的吸光度, 大大影响水溶性生物碱含量测定的真实性。其次, 要保证试验在酸性条件和冰浴或冰箱冷藏中进行, 这样既可促使该反应进行, 也可减少沉淀的溶解, 增加水溶性生物碱含量测定的准确性。

该试验首先采用乙醚萃取, 既提取得到了脂溶性生物碱, 又对水溶性生物碱的含量测定进行了脱色预处理, 一举两得。沉淀法是直接测定生物碱与雷氏盐反应所得沉淀的吸光度, 比较直观; 但在测定沉淀的吸光度之前, 需用乙醚将沉淀洗涤完全, 后再用 70% 的丙酮溶解定容, 过程较复杂、误差大、所耗试剂较多、成本高。滤液法则是测定反应后去除沉淀的滤液吸光度, 再由空白试液的吸光度减去供试品的吸光度, 而间接得到生物碱沉淀的吸光度。在测定滤液的吸光度之前, 只需将得到的滤液用 0.1 mol/L 盐酸定容即可, 操作相对简单快速、误差小、所耗试剂较少、成本低, 而且经方法学考察 2 种方法所得结果基本一致, 并无显著差异。

## 参考文献

- [1] 董静洲, 杨俊军, 王瑛. 我国枸杞属物种资源及国内外研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2020-2027.
- [2] 何红君. 宁夏枸杞主要经济性状与有效成分的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [3] HAWKES J G, LESTER R N, NEE M, et al. Solanaceae I[M]. London: Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London, 1991.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 232-234.
- [5] 谢月英. 枸杞子的药用价值及资源开发[J]. 特种经济动植物, 2003, 8(7): 25-29.
- [6] 白寿宁. 宁夏枸杞研究[M]. 银川: 宁夏出版社, 1999: 11-13.
- [7] 徐鹏. 枸杞水溶性成分的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [8] YAO X, PENG Y, XU L J, et al. Phytochemical and biological studies of lycium medicinal plants[J]. Chemistry and Biodiversity, 2011, 8(6): 976-1010.
- [9] 黄红娜, 张丹参, 郑晓霞, 等. 甜菜碱药理作用的研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(21): 3788-3789.
- [10] YANCE P H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses[J]. J Exp Bio, 2005, 208(15): 2819-2830.

## Determination of Ammonium Alkaloids in Methanol Extract of *Lycium barbarum* L. by Filtrate and Precipitation Methods

MA Qian, RAO Jianhua

(College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

# 六种蜜环菌固体培养基配方的筛选

刘太林, 李 黎, 周正涛, 黎 祥

(天津天狮学院 生物与食品工程学院, 天津 301700)

**摘 要:**引种了6个蜜环菌菌种分别接种于8个不同配方的固体培养基中进行筛选试验。从萌发时间、满皿时间、生长势、菌索干重等方面进行评价。结果表明:菌种 AM7 在培养基配方 8 (马铃薯 20 g, 木屑 20 g, 麦麸 20 g, 胡萝卜 20 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 5 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4$  1 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg, 水 1 000 mL) 上萌发时间最短, 生长速度快, 生长生物量最大, 与其它菌种和配方组合差异达显著或极显著水平, 是最佳组合; 菌种 AM6 和宁强 A9 菌种在配方 8 培养基上生长生物量较高, 与其它组合差异显著, 也是较好的菌种。该研究筛选出的优良品种和配方组合可以用于生产。

**关键词:**蜜环菌; 菌种; 固体培养基; 筛选

**中图分类号:**S 646.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0145-04

蜜环菌(*Armillaria mellea*)属担子菌亚门, 层菌纲, 伞菌目, 白蘑科, 蜜环菌属(*Armillaria* (Fr.) Staude) 的一种药食两用真菌<sup>[1]</sup>, 又名蜜环蕈、青闪蕈等。其子实体虽小但味道鲜美, 富含多种营养素, 菌丝、菌索在暗处会发出荧光<sup>[2]</sup>且均可入药。蜜环菌与天麻和猪苓等名贵中药材存在着特殊的共生关系<sup>[3]</sup>, 蜜环菌类似线绳的黑色菌索侵入天麻块茎或猪苓等菌核后被消化利用, 为天麻或猪苓提供营养, 供其生长所需<sup>[4-5]</sup>。

在自然界中, 蜜环菌主要从富含枯枝落叶的土壤基质中获取碳源、氮源、无机盐及维生素等营养物质。在人工栽培培养基上不同的菌株表现出的生长特性差异较明显<sup>[6-7]</sup>, 蜜环菌种类繁多, 分布广泛<sup>[8]</sup>, 在中国用于天麻、猪苓栽培伴生的蜜环菌种类报到较多<sup>[9-10]</sup>。蜜环菌

菌种的质量决定着二者的产量及品质。筛选优良的蜜环菌株和培养基配方是生产高品质天麻的基础<sup>[11-12]</sup>。该研究结合前人的研究基础, 搜集国内几种主要蜜环菌栽培菌种, 采用不同的培养配方, 以期筛选出优质菌种, 获得最佳培养配方。促进蜜环菌的扩大生产, 进而为天麻和猪苓等经济作物的人工栽培提供优质的菌株, 提高产量和产品品质。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试6种蜜环菌菌株如表1所示。设有8个不同蜜环菌培养基配方, 如表2所示。仪器为高压灭菌锅, 超净工作台, 电热恒温培养箱, 组织捣碎匀浆机, 电磁炉等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 固体培养基制备 将各个配方的马铃薯、胡萝卜、麦麸、木屑、玉米粉按照比例称好, 加入500 mL左右的去离子水, 倒入组织搅拌匀浆机中匀浆15 min, 然后转

**第一作者简介:**刘太林(1983-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事药用植物栽培育种与生物技术等研究工作。E-mail: huajizi83@126.com.

**基金项目:**天津天狮学院校内资助项目(K13005)。

**收稿日期:**2015-05-25

**Abstract:** *Lycium barbarum* L. was used as raw material, and spectrophotometry was used to determine content of ammonium alkaloids in methanol extract of *Lycium barbarum* L., based on the reaction of ammonium alkaloids with Remecke salt. The aim was to establish a method for quantitative determination of ammonium alkaloids in methanol extract of *Lycium barbarum* L. The results showed that the average recovery rate of filtrate and precipitation methods was 97.57% and 98.06%, and relative standard deviation was 1.02% and 1.10% (n=6), respectively. Conclusion, the results were consistent for determination of ammonium alkaloids by the two methods, and filtrate method was comparatively simple.

**Keywords:** *Lycium barbarum* L.; ammonium alkaloids; Reinecke's salt; spectrophotometry; filtrate method; precipitation method