

基于生物碱含量-化痰生物效价-止咳祛痰作用综合评价 6 个基原川贝母的质量一致性

谭 鹏¹, 谢俊杰¹, 杨沛勋¹, 张 磊^{1*}, 耿 昭², 张定堃^{3*}

1. 四川省中医药科学院 国家中医药管理局 中药质量生物评价重点实验室, 四川 成都 610041

2. 四川省药品检验研究院 国家药品监督管理局 中成药质量评价重点实验室, 四川 成都 611731

3. 成都中医药大学 现代中药产业学院, 四川 成都 611137

摘要:目的 从 6 个代表性生物碱含量、体外化痰生物效价和体内止咳祛痰作用等 3 个方面综合量化评价 6 个基原川贝母的质量一致性。方法 基于高效液相色谱-蒸发光散射检测器新建立了一种川贝母中 6 种生物碱(西贝母碱苷、西贝母碱、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙、梭砂贝母碱)的同时定量分析方法;选择铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 和金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 作为人工痰液的培养菌,制备含菌人工痰液,与川贝母混合后在 0、30、60、90、120 min 测定黏度值,以期从体外化痰生物活性的角度评价川贝母的质量差异;基于氨水引咳、气管酚红排泌 2 种小鼠动物模型,分别比较川贝母样品(1.802 g·kg⁻¹)的止咳和祛痰作用,以期从体内整体药效作用的角度评价川贝母的质量差异。结果 定量分析结果显示,6 个生物碱类化学成分在 23 批次川贝母样品中的含量较低,部分样品中西贝母碱苷、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙、梭砂贝母碱的含量低于检测限。以不同基原川贝母样品中 6 个生物碱总量平均值比较,高低顺序如下:瓦布贝母(0.190 4%)>太白贝母(0.048 9%)>梭砂贝母(0.024 0%)>川贝母(0.020 6%)>甘肃贝母(0.008 7%)>暗紫贝母(0.007 5%),表明以化学评价 6 个基原川贝母的质量一致性时,存在较大差异。以不同基原川贝母样品的平均化痰生物效价比较,效价高低顺序如下:瓦布贝母(1 560 U·g⁻¹)>甘肃贝母(1 135 U·g⁻¹)>太白贝母(953 U·g⁻¹)>暗紫贝母(838 U·g⁻¹)>川贝母(805 U·g⁻¹)>梭砂贝母(670 U·g⁻¹),表明以体外化痰生物效价评价 6 个基原川贝母的质量一致性时,存在较大差异。止咳作用实验结果显示,以不同基原川贝母样品止咳作用平均值比较,止咳作用强弱顺序如下:梭砂贝母(13 次)>暗紫贝母(16 次)>甘肃贝母(18 次)>川贝母(21 次)>太白贝母(40 次)>瓦布贝母(51 次),表明以体内止咳作用强度评价 6 个基原川贝母的质量时,其质量一致性较差。以不同基原川贝母样品祛痰作用平均值比较,祛痰作用强弱顺序如下:梭砂贝母>瓦布贝母≈甘肃贝母≈太白贝母≈川贝母≈暗紫贝母,表明以体内祛痰作用强度评价 6 个基原川贝母的质量时,其质量一致性相对较好。结论 6 个基原的川贝母样品存在较大的质量差异,亟需进一步加强质量评价研究。

关键词: 川贝母; 质量一致性; 生物碱; 化痰生物效价; 止咳祛痰; 综合评价

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)07-2364-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.07.010

Comprehensive analysis of quality consistency of *Fritillaria cirrhosa* based on alkaloid content, biological potency and phlegm relieving effects

TAN Peng¹, XIE Junjie¹, YANG Peixun¹, ZHANG Lei¹, GENG Zhao², ZHANG Dingkun³

1. Key Laboratory of Biological Evaluation of TCM Quality of the State Administration of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

2. NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine (Traditional Chinese Patent Medicine), Sichuan Provincial Institute for Drug Control, Chengdu 611731, China

3. College of Modern Traditional Chinese Medicine Industry, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

收稿日期: 2026-01-21

基金项目: 四川省科技厅科技计划项目(2023YFH0104); 四川省科技厅基本科研项目(2025JDKY0027); 四川省药品检验研究院国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室开放课题(中成药-2023-KFKT-004)

作者简介: 谭 鹏, 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药质量标准 and 品质评价研究。E-mail: 410578772@qq.com

*通信作者: 张 磊, 男, 研究员, 主要从事中药新药研发研究。E-mail: 937696094@qq.com

张定堃, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药制剂新技术与质量评价研究。E-mail: zhangdingkun@cdutcm.edu.cn

Abstract: Objective To comprehensively evaluate the quality consistency of six different types of *Fritillaria cirrhosa* from three aspects: the content of six representative alkaloids, *in vitro* biological potency, and *in vivo* cough and phlegm relieving effects. **Methods** A new simultaneous quantitative analysis method for six alkaloids (siberian lily alkaloid glycoside, siberian lily alkaloid, fritillaria acid, fritillaria acid A, fritillaria acid B, and siberian lily alkaloid) in *F. cirrhosa* has been established based on high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detector. *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were selected as the culture bacteria for artificial sputum preparation. After mixing the artificial sputum containing bacteria with *F. cirrhosa*, viscosity values were measured at 0, 30, 60, 90, and 120 min, aiming to evaluate the quality differences of *F. cirrhosa* from the perspective of *in vitro* expectorant biological activity. Based on two mouse animal models, namely ammonia-induced cough and tracheal phenol red excretion, the cough relieving and expectorant effects of *F. thunbergii* samples ($1.802 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) were compared, aiming to evaluate the quality differences of *F. cirrhosa* from the perspective of overall pharmacological effects *in vivo*. **Results** The quantitative analysis results showed that the content of six alkaloids in 23 batches of samples was relatively low, and the content of target compounds in some samples was below the detection limit. Comparing the average total amounts of six alkaloids in different samples, the order from high to low is as follows: *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsiavar. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen (0.1904%) > *F. taipaiensis* P. Y. Li (0.0489%) > *F. delavayi* Franch. (0.0240%) > *F. cirrhosa* D. Don (0.0206%) > *F. przewalskii* Maxim. (0.0087%) > *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia (0.0075%), indicating that there are significant differences in evaluating the quality consistency of six different types of *F. cirrhosae* bulbus using chemical models. Comparing the average expectorant biological potency of the samples, the order from high to low is as follows: *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsiavar. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen ($1560 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) > *F. przewalskii* Maxim. ($1135 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) > *F. taipaiensis* P. Y. Li ($953 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) > *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia ($838 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) > *F. cirrhosa* D. Don ($805 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) > *F. delavayi* Franch. ($670 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), indicating that there are significant differences in the quality consistency of six different types of *F. cirrhosae* bulbus evaluated by *in vitro* expectorant biological potency. The results of the cough suppression experiment showed that compared with the average cough suppression effect of different samples, the order from strong to weak is as follows: *F. delavayi* Franch. (13 times) > *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia (16 times) > *F. przewalskii* Maxim. (18 times) > *F. cirrhosa* D. Don (21 times) > *F. taipaiensis* P. Y. Li (40 times) > *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsiavar. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen (51 times), indicating that when evaluating the quality of six different types of *F. cirrhosae* bulbus based on the strength of cough suppression effect *in vivo*, the quality consistency is relatively poor. Comparing the average expectorant effects of different samples, the order from strong to weak is as follows: *F. delavayi* Franch. > *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsiavar. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen $\approx$ *F. przewalskii* Maxim. $\approx$ *F. taipaiensis* P. Y. Li $\approx$ *F. cirrhosa* D. Don $\approx$ *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia, indicating that when evaluating the quality of six different types of *Fritillaria cirrhosa* based on the strength of their expectorant effects *in vivo*, their quality consistency is relatively good. **Conclusion** There are significant quality differences among the six types of *Fritillaria cirrhosa* samples, and further research on quality evaluation is urgently needed.

Key words: *Fritillaria cirrhosa*; quality consistency; alkaloid; biological potency of reducing sputum viscosity; cough and phlegm dispelling; comprehensive evaluation

川贝母为百合科植物川贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don、暗紫贝母 *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia、甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim.、梭砂贝母 *F. delavayi* Franch.、太白贝母 *F. taipaiensis* P. Y. Li 或瓦布贝母 *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsiavar. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen 的干燥鳞茎, 具有化痰止咳、散结消痈等功效, 临床常用于治疗肺热燥咳、干咳少痰等^[1]。川贝母是著名的川产名贵道地药材之一, 也是可用于保健食品的中药, 在新药和大健康产品研发方面具有重要价值, 但由于质量评控方法和药理作用机制等基础研究非常薄弱, 川贝母产业发展较慢^[2]。

川贝母是典型的多基原、多产地、多生长年限、多规格等级、野生与栽培共用的中药材, 其质量评价与控制难度大。目前, 有关川贝母 6 个基原之间的质量一致性评价研究几乎是一片空白, 严重影响临床用药的疗效稳定性。川贝母的质量评控主要是依据《中国药典》标准, 包括基原、薄层色谱、聚合酶链式反应、含量测定等, 由于标准低, 在质量评控环节实际上该标准难以区分不同来源的川贝母质量差异, 且质控结果对临床应用几无指导价值。在中药材市场流通中, 川贝母常以规格等级定价, 涉及到传统经验感官评价, 但是感官评价也存在主观性强, 难以客观量化等缺陷。虽然已有少量

文献报道^[3-4]采用高效液相色谱法测定川贝母中西贝母碱、贝母辛等几个化学成分的含量,但在测定方法的色谱分离度、指标性成分检测数量等方面仍然需要提升。鉴于目前同时定量测定川贝母中多个生物碱类成分的分析方法比较少,本研究尝试建立一种基于高效液相色谱法-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)同时定量测定川贝母中 6 个指标成分的分析方法,以期从多组分化学表征的角度比较不同川贝母的质量差异;同时考虑到化痰是川贝母的重要临床功效,本研究尝试建立一种基于化痰生物效价测定的川贝母质量评价方法,从生物评价角度阐释不同来源川贝母的质量差异,为 6 个基原川贝母的质量一致性评价提供一种新的分析方法,助力川贝母的质量标准提升。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

西贝母碱(批号 22091609,质量分数 99.03%)、贝母素甲(批号 22042708,质量分数 99.68%)、贝母素乙(批号 21082402,质量分数 99.54%)、贝母辛(批号 20071403,质量分数 99.44%)、西贝母碱昔(批号 20082801,质量分数 99.16%)、梭砂贝母碱(批号 22042711,质量分数 99.93%)均购于成都普菲德生物科技有限公司;甲酸铵(批号 Q/12KM 3735-2018,质量分数 99.86%)购于天津市科密欧化学试剂有限公司;三氯甲烷(批号 2021022601,质量分数 99.00%)购于成都市科隆化学品有限公司;鱼精 DNA(批号 SLCJ4536)、猪胃Ⅱ型黏蛋白(批号 SLCK1866)均购于 Sigma-aldrich 公司;二乙基三胺五乙酸(批号 H2106660)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;分析纯 L-苏氨酸、L-色氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-缬氨酸、L-蛋氨酸、L-异亮氨酸、L-(+)-赖氨酸、L-(一)-酪氨酸、L-脯氨酸、L-组氨酸、L-丙氨酸、甘氨酸、L-谷氨酸、L-(+)-精氨酸、L-丝氨酸、L-(一)-胱氨酸、L-天冬氨酸均购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;氯化铵(批号 20220526)购于成都长聊化工试剂有限公司;羧甲基纤维素钠(批号 030612)购于成都科龙化工试剂厂;蜜炼川贝枇杷膏(MLCBPP,批号 L00408101)购于京都念慈菴。铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 由四川抗菌素工业研究所提供。川贝母样品信息见表 1,经四川省中医药科学院谭鹏副研究员鉴定为川贝母样品。

表 1 23 批次川贝母样品详细信息

Table 1 Information on 23 batches of *F. cirrhosa* samples

样品 编号	基原	产地	生长 年限
S1	<i>F. taipaiensis</i>	广元	1
S2		广元	2
S3		广元	3
S4		广元	4
S5		广元	5
S6		广元	6
S7		重庆	5
S8		重庆	5
S9	<i>F. unibracteata</i>	阿坝州	3
S10		阿坝州	5
S11		阿坝州	5
S12		阿坝州	5
S13		阿坝州	4
S14		阿坝州	4
S15		阿坝州	4
S16		阿坝州	5
S17	<i>F. delavayi</i>	阿坝州	5
S18		阿坝州	5
S19		阿坝州	5
S20		阿坝州	5
S21		阿坝州	5
S22		云南	4
S23		云南	4

1.2 主要仪器

LC-2040C 高效液相色谱仪,配备有 ELSD-LT III 蒸发光散射检测器(日本岛津公司);XPE 26 百万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);10~100 μL 移液枪(德国 Eppendorf 公司);SK250H 超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司);arium mini 超纯水系统(德国 sartorius 公司);NDJ-99AT 数字式黏度计(宁波华丰电子仪器厂);DHP060 恒温培养箱(上海双旭电子有限公司);pHS-3C 酸度计(上海雷磁公司);DK-S28 电热恒温水浴锅(青岛明博公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 KM 小鼠,体质量 18~22 g,购自北京华阜康生物科技有限公司,合格证编号 110322251101074478,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2024-0003,动物使用许可证号 SYXK(川)2023-0100。动物实验伦理要求已获四川省中医药科学院伦理委员会批准(批准号 DWSYLL-

2024-203)。动物饲养于四川省中医药科学院动物实验中心 SPF 级动物房内, 室温 (22±2) °C、相对湿度 50%~60% 的环境, 12 h 光照/12 h 黑暗交替, 自由进食饮水。

2 方法与结果

2.1 生物碱含量分析

2.1.1 色谱条件 采用 Kromasil 100-5- C_{18} 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 以 0.1 mol·L⁻¹ 甲酸铵 (A)-乙腈 (B) 为流动相, 体积流量为 1 mL·min⁻¹, 梯度洗脱程序为 0~12 min, 80% A; 12~22 min, 80%→65% A; 22~30 min, 65% A; 30~31 min, 65%→20% A; 31~40 min, 20% A; 40.00~40.10 min, 20%→80% A; 40.10~48.00 min, 80% A。柱温度 30 °C, 漂移管温度为 50 °C, 氮气体积流量为 3 L·min⁻¹, 气体压强为 373 kPa, Gain 值为 Wide, 进样量为 10 μ L。

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取 6 种化合物对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解定容, 摇匀, 标记为混合对照品溶液。西贝母碱苷、西贝母碱、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙、梭砂贝母碱的质量浓度分别为 352.94、183.01、503.67、322.58、117.01、299.39 μ g·mL⁻¹。

2.1.3 供试品溶液制备 取川贝母粉末 (过三号筛) 3 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入浓氨试液 6 mL 浸润 1 h, 加入三氯甲烷-甲醇 (4:1) 的混合溶液 50 mL, 称定质量, 混匀, 置 80 °C 水浴中回流 2 h, 放冷, 再称定质量; 用三氯甲烷-甲醇 (4:1) 的混合溶液补足减失的质量, 用滤纸滤过, 用三氯甲烷-甲醇 (4:1) 的混合溶液洗涤锥形瓶和滤纸, 合并滤液后精确吸取 40 mL 置于蒸发皿中蒸干。残渣用甲醇溶解并转移至 2 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 即得。

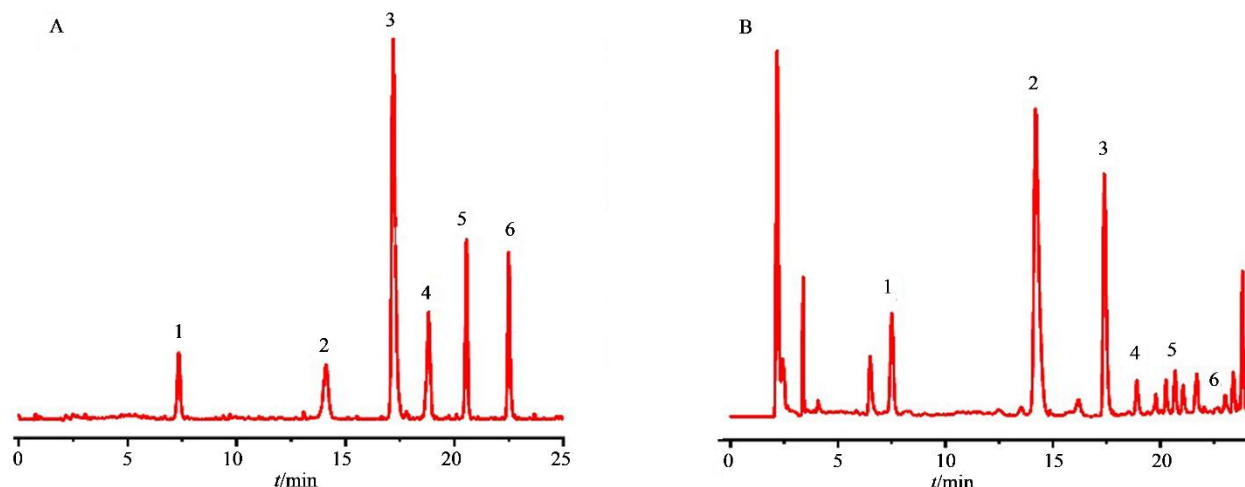
2.1.4 方法学考察 将混合对照品溶液梯度稀释至适宜倍数, 按“2.1.1”项色谱条件进样分析, 测定峰面积, 利用 SHIMADZU LabSolutions 工作站进行线性回归。将混合对照品溶液不断稀释, 直至信噪比为 3, 以此作为检测限 (LOD), 以信噪比为 10 时作为定量限 (LOQ)。准确取样品 S16 粉末 3 g, 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、16、24 h 按“2.1.1”项色谱条件进样, 记录 6 个化学成分的保留时间和峰面积, 计算 RSD 值。取稀释 4 倍的混合对照品溶液, 按“2.1.1”项色谱

条件连续进样 6 次, 记录保留时间和峰面积, 计算 RSD 值。准确称定 S16 样品 6 份, 每份 3 g, 按“2.1.3”项方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样, 记录保留时间和峰面积, 计算 6 个化学成分含量和 RSD 值。准确称取 6 份已知含量的样品 S7, 每份约 1.5 g, 精密加入 6 个化学成分对照品溶液, 加入量与样品 S7 中 6 个化学成分的含量相近 (西贝母碱苷 0.15 mg、西贝母碱 0.02 mg、贝母辛 0.75 mg、贝母素甲 0.15 mg、贝母素乙 0.15 mg、梭砂贝母碱 0.20 mg), 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样分析, 测定含量, 计算回收率。

典型的 HPLC-ELSD 色谱图见图 1。线性关系考察结果显示, 6 个待测化学成分在一定的质量浓度范围内呈现良好的线性关系, 结果见表 2。精密度考察结果显示, 西贝母碱苷、西贝母碱、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙、梭砂贝母碱的保留时间的 RSD 分别为 1.39%、1.42%、1.54%、1.63%、1.03%、1.68%, 峰面积的 RSD 分别为 1.36%、1.49%、1.74%、1.67%、1.03%、1.53%, 表明仪器精密度良好。重复性考察结果显示, 西贝母碱苷、西贝母碱、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙、梭砂贝母碱的保留时间的 RSD 分别为 1.06%、1.36%、1.56%、1.59%、1.63%、1.45%, 峰面积的 RSD 分别为 1.91%、2.06%、1.86%、2.26%、1.76%、2.13%, 表明本方法重复性良好。稳定性考察结果显示, 西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙、贝母辛、西贝母碱苷、梭砂贝母碱的保留时间 RSD 分别为 1.66%、1.81%、1.76%、1.34%、1.36%、1.43%, 峰面积 RSD 分别为 1.74%、1.91%、1.56%、2.34%、1.96%、2.33%, 表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性较好。加样回收考察结果显示, 西贝母碱苷、西贝母碱、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙、梭砂贝母碱的平均加样回收率分别为 97.89%、99.42%、100.55%、101.75%、101.57%、100.44%, RSD 分别为 1.85%、2.24%、1.55%、1.62%、2.02%、2.17%, 表明该方法准确度良好。

2.1.5 供试品测定 称取 23 批川贝母样品各 3 g, 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 分别按照“2.1.1”项色谱条件进样测定, 采用标准曲线法计算结果。

定量分析结果显示, 6 种生物碱类化学成分在 23 批次川贝母样品中的含量较低, 均处于万分之几的水平, 部分样品中西贝母碱苷、西贝母碱、贝母



A-混合对照品溶液；B-供试品溶液；1-西贝母碱苷；2-西贝母碱；3-贝母辛；4-贝母素甲；5-贝母素乙；6-梭砂贝母碱。
A-mixed control solution; B-test solution; 1-siameimine-3β-D-glucoside; 2-siameimine; 3-peimine; 4-peimine; 5-peiminine; 6-hupehenine.

图 1 混合对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 的高效液相色谱-蒸发光散射检测器光谱图

Fig. 1 Typical HPLC-ELSD chromatogram of mixed reference solution (A) and sample solution (B)

表 2 6 个待测目标成分的线性关系测定结果

Table 2 Analysis results of linear relationships of six compounds

化学成分	线性方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
西贝母碱苷	$Y=X^{1.198\ 06}\times e^{8.981\ 43}$	35.29~352.94	0.999 7	3.53	17.65
西贝母碱	$Y=X^{1.492\ 10}\times e^{8.876\ 84}$	18.30~183.01	0.999 5	1.83	9.15
贝母辛	$Y=X^{1.579\ 61}\times e^{8.622\ 88}$	50.37~503.67	0.999 5	5.04	25.18
贝母素甲	$Y=X^{0.891\ 942}\times e^{11.004\ 5}$	32.26~322.58	0.999 8	3.23	16.13
贝母素乙	$Y=X^{1.430\ 28}\times e^{10.059\ 3}$	11.70~117.01	0.999 8	1.17	5.85
梭砂贝母碱	$Y=X^{1.019\ 10}\times e^{10.617\ 0}$	29.94~299.39	0.999 6	2.99	14.97

素甲、贝母素乙、梭砂贝母碱的含量低于检测限。从单一生物碱的含量来看，贝母辛在所有样品中被检出，但是其在不同样品中的含量差异较大，例如 S7 样品是 S10 样品的 17 倍(0.042 7% vs 0.002 5%)；西贝母碱含量差异较大，例如瓦布贝母样品 S16 的含量是太白贝母样品 S8 的含量近 65 倍(0.005 21% vs 0.000 8%)。从 6 种生物碱的总量来看，暗紫贝母样品普遍含量较低，瓦布贝母与其余 5 个基原的川贝母差异明显，这可能暗示瓦布贝母与其余 5 个基原川贝母的质量存在较大差异。此外，川贝母生物碱的含量与其生长年限存在一定关联，但从本研究中太白贝母 1~6 年生的样品所含 6 种生物碱总量随着生长年限的累积规律来看，累积规律并不明显，但这与本研究的实验样本量偏少有关系，有待大样本量的川贝母进一步验证。以不同基原川贝母样品中 6 种生物碱总量平均值对比，高低顺序如下：瓦布贝母(0.190 4%)>太白贝母(0.048 9%)>梭

砂贝母(0.024 0%)>川贝母(0.020 6%)>甘肃贝母(0.008 7%)>暗紫贝母(0.007 5%)，23 批川贝母样品 6 个指标性化学成分含量测定结果见表 3、图 2。

2.1.6 化学计量学分析 将 23 批川贝母供试品色谱图以.cdf 文件格式导出，将文件导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件中，以样品 S15 的色谱图作为参照图谱，以贝母辛为 Mark 峰进行峰校正，同时进行全峰匹配，以平均数法生成对照图谱，计算相似度。采用 origin 2021 软件进行聚类热图分析，采用 SIMCA-P11.5 软件进行主成分分析。

23 批次川贝母样品的 HPLC-ELSD 特征图谱分析结果显示，暗紫贝母(S9、S10、S11、S12)、瓦布贝母(S15、S16)、梭砂贝母(S17、S18)、川贝母(S22)等 9 个样品的色图谱与对照图谱的相似度小于 0.8，其余样品的色图谱与对照图谱的相似

表 3 23 批次川贝母样品中 6 种生物碱类化学成分定量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

编号	西贝母碱苷/%	西贝母碱/%	贝母辛/%	贝母素甲/%	贝母素乙/%	梭砂贝母碱/%
S1	0.010 3±0.000 4	/	0.028 2±0.000 7	0.006 4±0.000 3	0.001 6±0.000 2	0.001 1±0.000 3
S2	0.019 0±0.000 4	/	0.032 0±0.000 6	0.015 4±0.000 4	0.001 1±0.000 1	0.001 3±0.000 2
S3	0.013 5±0.000 3	0.005 2±0.000 1	0.013 8±0.000 5	0.002 3±0.000 5	0.002 3±0.000 1	0.009 4±0.000 3
S4	0.006 4±0.000 3	0.001 5±0.000 3	0.021 2±0.000 4	0.001 9±0.000 4	0.000 2±0.000 1	0.000 3±0.000 1
S5	0.003 7±0.000 3	0.003 8±0.000 2	0.016 6±0.000 6	0.002 4±0.000 3	0.001 4±0.000 1	0.000 3±0.000 0
S6	0.007 0±0.000 3	0.002 6±0.000 2	0.018 6±0.000 3	0.004 0±0.000 3	0.000 6±0.000 1	0.000 3±0.000 0
S7	0.009 5±0.000 2	0.001 3±0.000 2	0.042 7±0.000 8	0.014 4±0.000 3	0.000 4±0.000 1	0.000 7±0.000 1
S8	0.008 2±0.000 4	0.000 8±0.000 1	0.039 4±0.000 9	0.017 1±0.000 6	0.000 4±0.000 1	0.000 6±0.000 1
S9	/	/	0.004 5±0.000 4	0.000 1±0.000 0	0.000 8±0.000 1	0.006 3±0.000 2
S10	0.002 4±0.000 3	/	0.002 5±0.000 3	0.000 1±0.000 0	0.000 5±0.000 1	0.001 9±0.000 1
S11	0.001 4±0.000 3	/	0.002 6±0.000 4	0.000 1±0.000 1	0.000 5±0.000 0	0.002 4±0.000 2
S12	0.001 4±0.000 4	/	0.002 5±0.000 5	/	/	/
S13	0.067 2±0.002 1	0.034 8±0.000 9	0.027 9±0.000 8	0.040 4±0.001 6	0.005 7±0.000 2	0.007 1±0.000 2
S14	0.065 8±0.002 4	0.038 0±0.000 9	0.028 8±0.000 9	0.036 0±0.000 6	0.005 9±0.000 3	0.006 7±0.000 4
S15	0.128 1±0.002 9	0.038 6±0.001 1	0.021 1±0.000 9	0.044 8±0.000 9	0.004 9±0.000 4	0.002 1±0.000 2
S16	0.055 3±0.001 4	0.052 1±0.001 7	0.028 1±0.001 1	0.014 6±0.000 8	0.004 5±0.000 4	0.002 9±0.000 3
S17	0.002 3±0.000 3	/	0.012 9±0.000 6	0.000 9±0.000 1	0.000 5±0.000 1	0.005 7±0.000 2
S18	0.002 5±0.000 4	/	0.016 2±0.000 8	0.001 2±0.000 2	0.000 7±0.000 1	0.005 0±0.000 3
S19	0.002 9±0.000 5	/	0.011 5±0.000 9	0.001 1±0.000 2	0.000 6±0.000 2	0.007 9±0.000 2
S20	0.003 0±0.000 3	0.003 8±0.000 5	0.003 7±0.000 2	0.000 3±0.000 0	/	/
S21	0.001 8±0.000 3	/	0.004 5±0.000 2	0.000 3±0.000 0	/	/
S22	0.003 6±0.000 3	0.005 8±0.000 2	0.004 9±0.000 3	0.000 2±0.000 0	0.000 4±0.000 1	0.000 6±0.000 1
S23	0.003 6±0.000 4	0.008 5±0.000 4	0.013 6±0.000 7	/	/	/

/-该化合物的含量未达到检测限。
/-content of compound has not reached detection limit.

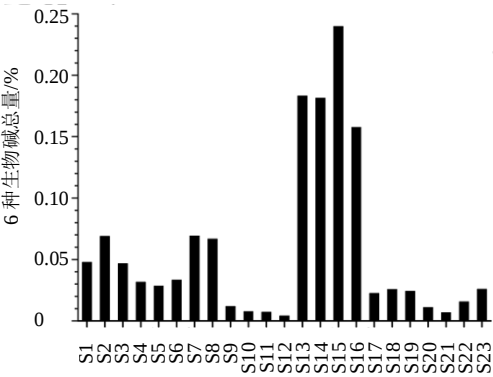


图 2 川贝母样品中 6 种生物碱化合物的总量
Fig. 2 Total amount of six alkaloid compounds in sample

度在 0.825~0.918, 显示这些样品之间的整体化学相似度偏低, 结合这些样品的整体化学轮廓相似度和上述 6 种代表性生物碱成分的含量高低, 表明这些样品之间存在较大的质量差异, 见图 3 和表 4。

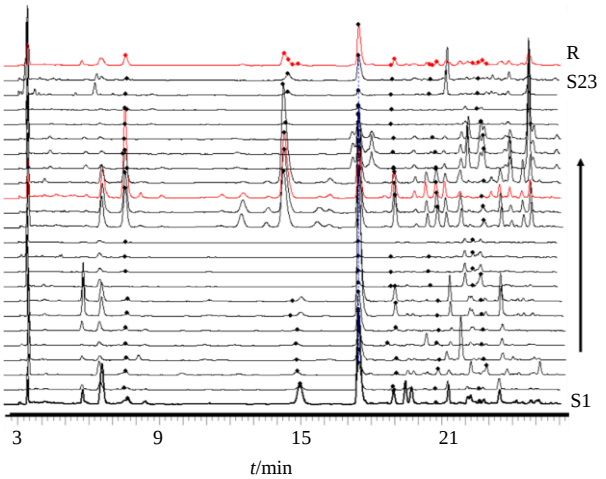


图 3 23 批次川贝母样品的特征图谱
Fig. 3 Fingerprints of 23 batches of *F. cirrhosa* samples

热图分析结果显示(图 4), 以 6 种指标性生物碱类成分含量高低进行聚类, 瓦布贝母(S13~S16)

表 4 23 批次川贝母样品 HPLC-ELSD 色谱指纹图谱相似度分析结果

Table 4 HPLC-ELSD fingerprint similarity analysis results of 23 batches of *F. cirrhosa* samples

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.866	S13	0.918
S2	0.866	S14	0.907
S3	0.865	S15	0.733
S4	0.887	S16	0.789
S5	0.876	S17	0.672
S6	0.893	S18	0.769
S7	0.884	S19	0.866
S8	0.885	S20	0.839
S9	0.385	S21	0.888
S10	0.700	S22	0.606
S11	0.631	S23	0.825
S12	0.770		

和太白贝母 (S1~S8) 样品分别具有较好的聚集性, 暗紫贝母 (S9~S12)、梭砂贝母 (S17~S19)、甘肃贝母 (S20~S21) 和川贝母 (S22~S23) 等与前 2 者聚集不明显, 表明瓦布贝母、太白贝母和其余 4 个基原的川贝母存在一定的差异性。

主成分分析结果显示 (图 5), 23 批次川贝母样品大致能够以其基原归属分为 6 个大类: 暗紫贝母、川贝母、甘肃贝母和梭砂贝母等 4 个基原的贝母样品聚集明显, 太白贝母样品与前述 4 个基原贝母有一定聚集性, 但已有一定的区分趋势。尤其值得注意的是, 瓦布贝母样品与其余 5 个基原川贝母样品呈现明显的离散, 表明其与其他基原川贝母存在较大的质量差异。总体而言, 主成分分析结果与热图聚类分析结果的趋势一致。

2.2 化痰生物效价分析

2.2.1 人工痰液的制备 参照 Kirchner 等^[5-7]方法并进行优化。4 g 鱼精 DNA 和猪胃 II 型黏蛋白 5 g 分别加入盛有 250 mL 超纯水的烧杯中, 搅拌至溶解, 备用。称取 18 种氨基酸各 0.25 g 于烧杯, 加入超纯水 100 mL 和 0.5 mol·L⁻¹ 的 KOH 溶液 25 mL, 搅拌至溶解, 备用。将二乙三胺五乙酸 (DTPA) 5.9 mg、NaCl 5 g、KCl 2.2 g 溶于超纯水 100 mL 中, 搅拌至溶解, 备用。将鱼精 DNA 混悬液, 猪胃 II 型黏蛋白混悬液, 18 种氨基酸的混悬液, DTPA、NaCl 和 KCl 的混悬液转移至 1 L 的烧杯中, 加入

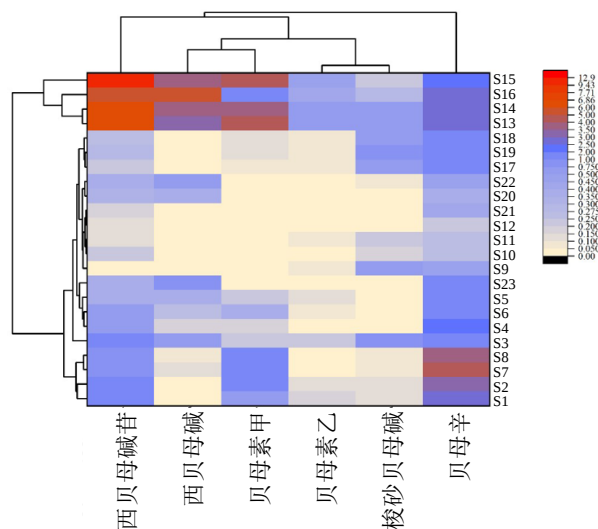


图 4 23 批次川贝母样品中 6 种生物碱类化学成分含量的热图聚类分析结果

Fig. 4 Cluster heat map analysis results of 23 batches of *F. cirrhosa* samples

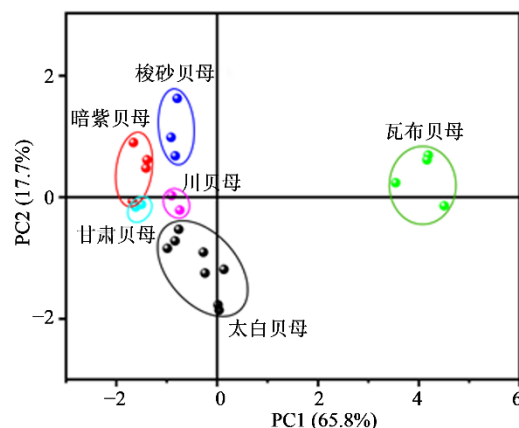


图 5 23 批次川贝母样品的主成分分析结果

Fig. 5 Principal component analysis of 23 batches of *F. cirrhosa* samples

蛋黄乳剂 5 mL, 搅拌溶解, 加水至 850 mL。向 1 L 烧杯中逐滴加入 Tris-HCl 溶液, 调节混悬液 pH 值至 6.9, 然后加超纯水定容至 1 L, 密封后将人工痰液培养基在紫外灯 (30 W) 照射下处理 2 h 除菌, 4 °C 冰箱保存, 备用。铜绿假单胞菌是囊性肺纤维化患者肺部的主要细菌病原体^[8], 它通过对先天免疫反应和抗生素治疗有抵抗力的生物膜内高密度生长而导致肺功能下降^[9]。金黄色葡萄球菌等革兰阳性菌在肺部感染痰液中普遍存在^[10-11]。因此在本实验中选择铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 和金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 作为人工痰液的培养菌。配制好的 LB 培养基和营养琼脂于 121 °C 高温高压灭

菌 20 min, 备用。分别将 *P. aeruginosa* 和 *S. aureus* 挑取单一菌落于 LB 液体培养基 125 mL 中, 37 °C 恒温培养 24 h。将活化后的菌液用灭菌 LB 液体培养基调节细菌浓度为 0.5 麦氏单位浊度 (菌密度约 $1 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$), 于冰箱 4 °C 保存, 备用^[12]。将上述配制的人工痰液培养基和培养的 2 种菌悬液分别按照 100 : 1.5 的体积比混合, 在恒温震荡培养箱中以 37 °C、180 r·min⁻¹ 培养 12 h, 即得含菌人工痰液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取川贝母粉末 (过三号筛) 3 g, 精密称定, 置于 1 000 mL 烧杯中, 准确加入 200 mL 超纯水, 置于有石棉垫的电炉上煎煮至沸腾, 保持 5 min, 调整至微沸状态, 保持 30 min 后滤过, 用 10 mL 超纯水冲洗烧杯和滤布, 合并滤液, 浓缩至 10 mL, 备用。

2.2.3 参比溶液的制备 乙酰半胱氨酸是临床常用化痰药物, 主要用作黏液溶解剂, 具有较强的黏痰溶解作用, 其分子中所含的巯基能使痰液中糖蛋白多肽链中的二硫键断裂, 降低痰液的黏滞性, 使痰液化而易咳出, 还能使脓性痰液中的 DNA 纤维断裂, 溶解白色黏痰和脓性痰^[13]。本实验选用乙酰半胱氨酸作为参比溶液。准确称取乙酰半胱氨酸颗粒 0.6 g 溶解于蒸馏水 10 mL 中, 超声处理后制成质量浓度为 $0.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的参比溶液, 备用。

2.2.4 方法学考察 取配制好的人工痰液 6 份, 每份 30 mL, 于 30、60、120 min 测定人工痰液的黏度, 重复测定 3 次, 黏度测定结果取平均值, 计算 RSD 值, 以此考察人工痰液的稳定性。6 份人工痰液在没有药物干预以及在恒温 37 °C 保存的条件下, 在 120 min 后的黏度下降平均值为 $0.11 \text{ mPa} \cdot \text{s}$, RSD 为 1.07%, 表明人工痰液的稳定性良好。

采用 0.9% 氯化钠溶液检验黏度计的重现性和准确性。记录 30 mL 0.9% 氯化钠溶液在实验前和实验后的黏度变化, 重复测定 3 次, 结果取平均值。实验前后共 6 次在 37 °C 时测定 0.9% 氯化钠溶液的黏度均为 $1.4 \text{ mPa} \cdot \text{s}$, 表明黏度计的稳定性良好。

将参比溶液 10 mL 和配制好的人工痰液 20 mL 充分混合均匀, 间隔 0、30、60、90、120 min 后测定人工痰液的黏度, 每个时间点测定 3 次, 结果取平均值。6 d 内平行重复 6 次, 计算参比溶液在 120 min 内使人工痰液黏度的下降值及 RSD 值, 以此考察方法的重复性。6 份乙酰半胱氨酸溶液 ($0.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

使人工痰液黏度的下降值的 RSD 值为 2.55%, 表明乙酰半胱氨酸溶液对人工痰液黏度的降解稀释能力稳定, 具有较好的重复性。

取人工痰液 6 份, 每份 20 mL, 准确加入 10 mL 参比溶液, 1 d 之内连续测定 6 份参比溶液与人工痰液混合后 0、30、60、90、120 min 后黏度的变化, 重复测定 3 次, 结果取平均值, 计算 6 份参比溶液使人工痰液黏度的下降值及 RSD 值, 以此考察精密度。6 份乙酰半胱氨酸溶液 ($0.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在 120 min 后对人工痰液黏度改变值的 RSD 值为 2.39%, 表明方法的精密度良好。

2.2.5 化痰生物效价的计算 本实验定义测试样品 (川贝母供试品溶液、参比溶液) 与人工痰液混合反应后, 混合物的黏度下降 $1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 表示该测试样品的化痰生物效价为 $1\,000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。待测样品的化痰能力采用人工痰液黏度的下降值表示, 并计算待测样品的化痰生物效价。

$$\text{黏度下降值} = N_0 - N_t - 0.11$$

N_0 为人工痰液 20 mL 和 10 mL 待测样品混合均匀后的黏度初始值; N_t 为人工痰液和 10 mL 川贝母供试品溶液混合均匀作用 t 时的黏度值 ($t=30、60、90、120 \text{ min}$); $0.11 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 为人工痰液在静置 120 min 后黏度下降值

$$\text{生物效价} = (N_0 - N_t - 0.11) \times 1\,000$$

2.2.6 参比溶液、供试品测定 分别将参比溶液、供试品溶液 10 mL 和人工痰液 20 mL 混合均匀, 在 0、30、60、90、120 min 测定黏度值, 重复测定 3 次, 结果取平均值。

在 120 min 内测定结果显示随着测试时间的增加, 人工痰液的黏度逐渐下降, 乙酰半胱氨酸参比溶液在 30、60、90、120 min 时的化痰效价分别是 420、520、630、680 U, 结果见图 6。

对 18 批次川贝母样品在 30、60、90、120 min 时的化痰效价进行测定, 结果见表 5。结果显示, 随着分析时间的增加, 样品的生物效价均有所增加。以 120 min 时测得的化痰生物效价比较 6 个基原川贝母的质量差异为例, 6 个基原样品中化痰效价最高的分别是 $2\,280 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (瓦布贝母 S15), 最低为 $470 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (梭砂贝母 S17), 两者差异达 4.9 倍。以同一基原暗紫贝母为例, 生物效价最高的是 $1\,260 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (S11), 最低为 $480 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (S9), 两者差异达 2.6 倍。以不同基原川贝母样品的平均化痰生物效价对比, 效价高低顺序如下: 瓦布贝母

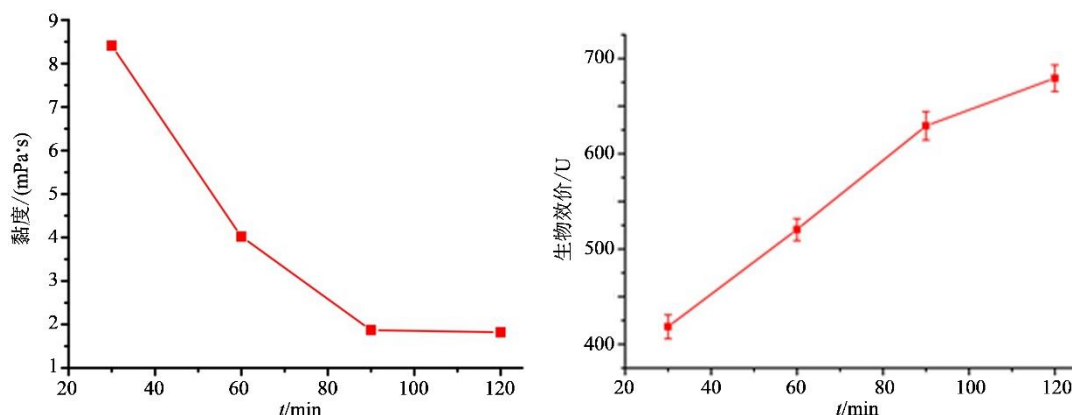


图 6 参比溶液在 120 min 内化痰效果测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Analysis results of phlegm reduction of reference solution within 120 min ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 5 川贝母样品在 120 min 内化痰生物效价测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Analysis results of phlegm reduction biological potency of *F. cirrhosa* samples within 120 min ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品编号	生物效价/(U·g ⁻¹)			
	30 min	60 min	90 min	120 min
S6	360±20	680±15	730±15	780±10
S7	670±25	930±20	1 090±15	1 190±10
S8	470±25	780±20	840±10	890±10
S9	150±10	310±15	410±15	480±5
S10	320±15	470±15	580±20	630±10
S11	690±20	1 050±15	1 160±15	1 260±15
S12	730±10	840±15	940±20	990±20
S13	670±20	930±15	1 140±15	1 250±10
S14	730±25	1 090±10	1 190±15	1 250±15
S15	1 650±35	2 020±20	2 230±30	2 280±25
S16	990±25	1 140±15	1 300±20	1 460±15
S17	260±15	370±15	420±15	470±10
S18	420±20	680±15	730±15	780±10
S19	420±20	580±20	680±15	760±10
S20	730±20	1 040±20	1 410±25	1 570±25
S21	530±20	730±15	990±15	1 100±10
S22	520±15	680±15	780±15	830±10
S23	470±20	670±15	730±15	780±10

(1 560 U·g⁻¹) > 甘肃贝母 (1 135 U·g⁻¹) > 太白贝母 (953 U·g⁻¹) > 暗紫贝母 (838 U·g⁻¹) > 川贝母 (805 U·g⁻¹) > 梭砂贝母 (670 U·g⁻¹), 表明以体外化痰生物效价评价 6 个基原川贝母的质量一致性时, 存在较大差异, 见图 7。

2.3 止咳和祛痰作用分析

2.3.1 小鼠氨水引咳实验 雄性小鼠 40 只, 随机分为模型组、MLCBPP (阳性药, 19.82 g·kg⁻¹) 组和川贝母组 (S22)、暗紫贝母组 (S9)、甘肃贝母组

(S20)、梭砂贝母组 (S18)、太白贝母组 (S4)、瓦布贝母组 (S14) (1.802 g·kg⁻¹, 《中国药典》推荐用量, 贝母破碎研钵至极细粉末后, 用 0.5%CMC-Na 溶剂混悬), 每组 5 只, 模型组 ig 0.5%CMC-Na 溶液, 体积为 10 mL·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 ig 7 d; 其余 7 组每天 ig 相应的药液 1 次, 体积为 10 mL·kg⁻¹, 连续给药 7 d。末次给药后 1 h, 将小鼠置于 500 mL 烧杯中, 烧杯内置一卫生纸球, 在卫生纸上滴加 250 μL 浓氨水, 立即扣紧烧杯, 观察并记录小鼠

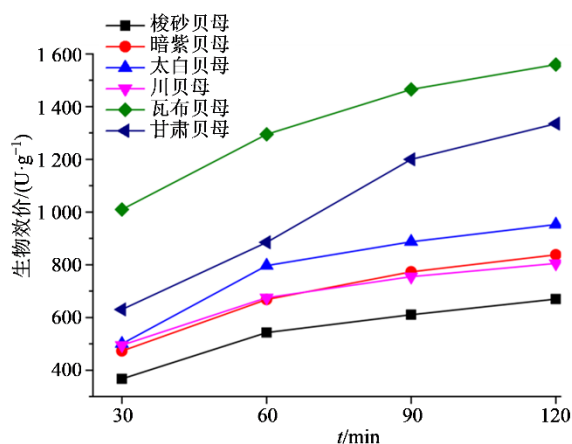


图 7 同一基原川贝母样品在不同测试时间的平均生物效价

Fig. 7 Average biological potency of samples of same category at different testing times

3 min 内咳嗽次数。咳嗽表现以腹肌收缩、伴随张大嘴呼吸等状况计。

2.3.2 小鼠气管酚红排泌实验 雄性小鼠 40 只，随机分为模型组、氯化铵 ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和川贝母组 (S22)、暗紫贝母组 (S9)、甘肃贝母组 (S20)、梭砂贝母组 (S18)、太白贝母组 (S4)、瓦布贝母组 (S14) ($1.802 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)，模型组 ig 0.5% CMC-Na 溶液，体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，每天 1 次，连续 ig 7 d。其余 7 组每天 ig 相应的药液 1 次，体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，连续给药 7 d。末次给药后 30 min，ip 2.5% 酚红碳酸氢钠溶液，于给药 1 h 后处死小鼠，摘取小鼠气管置于 0.9% 氯化钠溶液，涡旋 3 min，超声 30 min 后 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，吸取 0.9% 氯化钠溶液加入等体积 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液中，于紫外分光光度计 546 nm 处比色，并记录吸光度 (A) 值。

2.3.3 统计分析 采用统计软件 Graphpad prism

8.0.2 进行统计分析，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较用 t 检验，多组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

2.3.4 实验结果 如图 8 所示，氨水引咳小鼠咳嗽次数实验结果显示，与模型组相比，MLCBPP 组的小鼠咳嗽次数显著降低 ($P < 0.05$)，抑制率为 61.34%；梭砂贝母组和暗紫贝母组的小鼠咳嗽次数显著降低 ($P < 0.05$)，抑制率分别为 65.97% 和 57.73%；川贝母组和甘肃贝母组的小鼠咳嗽次数有降低的趋势，太白贝母组和瓦布贝母组的小鼠咳嗽次数无明显降低。以不同基原川贝母样品止咳作用平均值对比，止咳作用强弱顺序如下：梭砂贝母 (13 次) > 暗紫贝母 (16 次) > 甘肃贝母 (18 次) > 川贝母 (21 次) > 太白贝母 (40 次) > 瓦布贝母 (51 次)，表明以体内止咳作用强度评价 6 个基原川贝母的质量时，其质量一致性较差。

小鼠气管酚红排泌实验结果显示，与模型组相比，氯化铵组的小鼠气管酚红排泌量显著增加 ($P < 0.05$)，不同川贝母组的小鼠气管酚红排泌量均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，表明不同基原川贝母均有一定祛痰作用。以不同基原川贝母样品祛痰作用平均值对比，祛痰作用强弱顺序如下：梭砂贝母 > 瓦布贝母 $\approx$ 甘肃贝母 $\approx$ 太白贝母 $\approx$ 川贝母 $\approx$ 暗紫贝母，表明以体内祛痰作用强度评价 6 个基原川贝母的质量时，其质量一致性相对较好。

3 讨论

鉴于目前针对川贝母中生物碱类成分定量分析方法较少，本研究新建立了一种基于 HPLC-ELSD 同时测定川贝母中 6 个化学成分定量分析方法。在实验中，以 6 个待测成分的色谱峰分离度

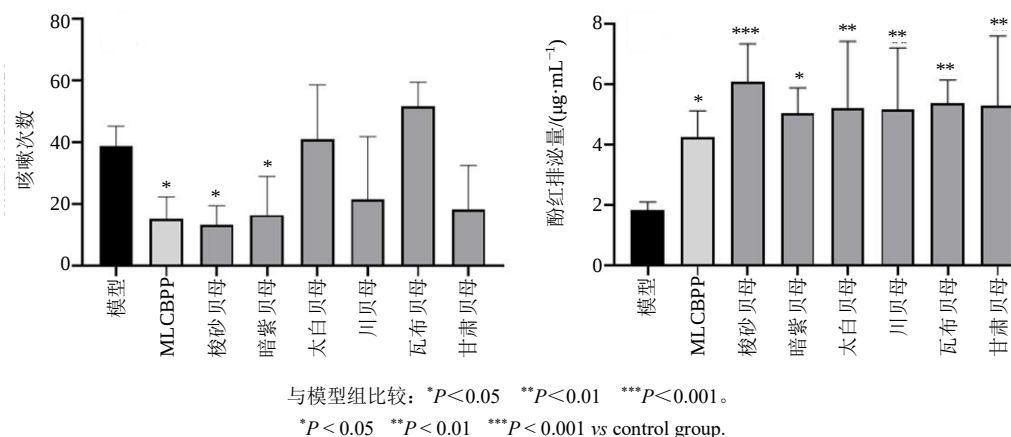


图 8 6 个基原川贝母止咳和祛痰作用测定结果

Fig. 8 Determination results of cough relieving and expectorant effects of six base strains of *F. cirrhosa*

大于 1.5 为目标, 对不同流动相组合和梯度条件进行优化, 最终优选为: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱程序为 0~12 min, 80% A; 12~22 min, 80%→65% A; 22~30 min, 65% A; 30~31 min, 65%→20% A; 31~40 min, 20% A; 40~40.10 min, 20%→80% A; 40.10~48 min, 80% A。在此梯度洗脱条件下, 川贝母中 6 个生物碱类化学成分能达到有效色谱分离。与现有文献报道的分析方法相比, 新建立的分析方法具有分析时间短、分离度高和检测灵敏度高优势, 为川贝母的质量评价提供了一种实用的分析方法。

以 HPLC 测定少数几个指标性成分含量为主的质量评价 (化学评价) 方法可及性强、测定准确度高, 能在一定程度上反映不同样品之间的化学差异性。但是现有的 HPLC 定量分析方法只是在一个检测波长下测定少数几个化学成分的含量, 不能反映不同检测波长下不同类型成分的整体化学差异。同时, 由于不同类型化学成分之间存在协同或抵抗作用, 化学评价方法所测得的指标性成分含量高低并不能表征样品的整体药理作用强弱差异。生物评价能够在一定程度上直观量化反映中药的整体药理活性强弱, 与其临床功效关联性强, 能够弥补化学评价的缺陷, 是更加符合中药特色的质量评价方法。四川民间自古评价川贝母的质量优劣方式为: “将萼贝碾成粉末, 挑少许于痰中, 即化为水”, 受此启发, 本实验建立了基于化痰效价测定的川贝母质量生物评价方法。在实验中, 考察了菌种的培养时间对人工痰液黏度和组织状态的影响。在培养箱恒定温度和转速的情况下, 分别在人工痰液培养 6、12、18、24、36、48、72 h 时检测菌种在人工痰液培养基中的生长状态以及对人工痰液的均一性影响。最终优选菌种培养 12 h 后的人工痰液作为测定化痰效价的载体。尤其值得关注的是, 川贝母所含 6 个生物碱类化学成分总量与其相应的体外化痰生物效价、体内止咳和祛痰作用强度的相关性并不明显, 这提示采用单一评价方法并不能完全反映样品的质量, 应尽可能采用多维评价模式评价川贝母的整体质量。总体而言, 不同来源的川贝母质量差异明显, 且化学差异性和生物效应差异性的趋势并不完全一致, 提示应当进一步加强川贝母的质量一致性研究。

本研究存在一定的局限性: 受限于样本数量, 研究结论仍然需要验证。课题组将采集更多样本量

(不同基原、不同生长年限、不同产地) 的川贝母样品对化学分析和化痰生物效价分析所得实验结果进行重复实验; 同时对新建立的化痰生物效价分析方法进一步优化, 以便于能够推广应用; 止咳祛痰药效作用涉及的动物模型仍然需要改进以更符合临床病症。

本研究采用多组分化学表征 (化学评价)、体外化痰效价测定 (生物评价) 和体内药效作用强弱等 3 种评价手段分别对《中国药典》2020 年版收载的 6 个基原的川贝母栽培品的质量一致性进行了评价, 为提升川贝母质量评价提供一些数据参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 38-39.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 谢俊杰, 谭鹏, 郝露, 等. 基于广义中药学探讨川贝母产业发展现状、策略与方法 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2150-2163.
Xie J J, Tan P, Hao L, et al. Development status, strategies and methods of *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus industrial chain based on generalized science of Chinese materia Medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(7): 2150-2163.
- [3] 王业, 冯雪, 高旦, 等. 川贝母不同规格鳞茎的生理指标和生物碱含量比较分析 [J]. 世界中医药, 2022, 17(13): 1833-1839.
Wang Y, Feng X, Gao D, et al. Comparative analysis of physiological indexes and alkaloid content of *Fritillaria cirrhosa* D.Don of different bulb sizes [J]. World Chin Med, 2022, 17(13): 1833-1839.
- [4] 李小平, 陈渝珂, 朱明. 不同产地的贝母中主要生物碱的含量比较及其毒性评价 [J]. 中国饲料, 2022(17): 95-99.
Li X P, Chen Y K, Zhu M. Content comparison and cytotoxicity evaluation of three alkaloids in *Fritillaria thunbergii* from different habitats [J]. China Feed, 2022(17): 95-99.
- [5] Kirchner S, Fothergill J L, Wright E A, et al. Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung [J]. JoVE, 2012(64): 3857.
- [6] Fung C, Naughton S, Turnbull L, et al. Gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* in a mucin-containing synthetic growth medium mimicking cystic fibrosis lung sputum [J].

- J Med Microbiol, 2010, 59(9): 1089-1100.
- [7] Neve R L, Carrillo B D, Phelan V V. Impact of artificial sputum medium formulation on *Pseudomonas aeruginosa* secondary metabolite production [J]. J Bacteriol, 2021, 203(21): e00250-e00221.
- [8] Blanchard A C, Waters V J. Microbiology of cystic fibrosis airway disease [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2019, 40(6): 727-736.
- [9] Diaz Iglesias Y, Van Bambeke F. Activity of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* model of biofilms in the context of cystic fibrosis: Influence of the culture medium [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(4): e02204-e02219.
- [10] Wang M, Zhang L L, Fei Y F. Distribution characteristics of pathogenic bacteria and drug-resistant bacteria in sputum samples from respiratory department of a tertiary hospital [J]. Contemp Med For, 2019, 17(21): 167-169.
- [11] 史新格. 83 例痰液标本菌种鉴定分型及药敏结果对老年重症脑卒中伴肺部感染患者抗菌药物合理使用的影
响 [J]. 抗感染药学, 2020, 17(11): 1632-1635.
- Shi X G. Effect of bacteria identification and drug sensitivity of 83 sputum samples on rational use of antibiotics in elderly patients with severe stroke complicated with pulmonary infection [J]. Anti Infect Pharm, 2020, 17(11): 1632-1635.
- [12] Buhailiqiemu A Fang D D, Jiang L X, et al. Study on liquid fungus of *auricularia auricula ssuitable* for southern Xinjiang and optimization of its culture conditions [J]. Nort Horticul, 2022, (24): 107-114.
- [13] 叶细妹. 乙酰半胱氨酸联合氨溴索治疗老年慢性阻塞性肺疾病急性发作期的临床效果 [J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(22): 61-63.
- Ye X M. Clinical effect of acetylcysteine combined with ambroxol in the treatment of acute attack of chronic obstructive pulmonary disease in the elderly [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2022, 15(22): 61-63.

[责任编辑 兰新新]