

草乌及其炮制品中 6 种生物碱类成分的含量测定

邓广海, 林华*, 龚又明
(广东省中医院药学部, 广州 510120)

[摘要] **目的:**测定不同产地草乌及草乌炮制品中 6 种生物碱的含量,综合评价其安全性和有效性。**方法:**采用 HPLC 同时测定 6 种生物碱含量,比较草乌炮制前后有效成分含量变化。**结果:**草乌生品中单酯型生物碱含量 $0.4081 \sim 1.7182 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,双酯型生物碱含量 $0.6604 \sim 8.6532 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;炮制后双酯型生物碱大大减少,而单酯型生物碱则明显增加。**结论:**不同产地草乌中 6 种生物碱的含量差异较大,常压蒸、煮法具有一定科学性,炮制后双酯型生物碱 $<0.04\%$,而单酯型生物碱常超出限量要求。

[关键词] 草乌; 单酯型生物碱; 双酯型生物碱; 炮制工艺; 含量测定

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0035-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjzxx2013070035

Content Determination of Six Kinds of Alkaloids from *Aconitum kusnezoffii* and Its Processed Products

DENG Guang-hai, LIN Hua*, GONG You-ming
(Department of Pharmacy, Guangdong Provincial Hospital
of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of six kinds of alkaloids from *Aconitum kusnezoffii* and its processed products, evaluate its safety and effectiveness of clinical application. **Method:** The contents of six kinds of alkaloids was determined simultaneously by HPLC, and compare content changes of six kinds of alkaloid before and after processing. **Result:** The content of monoester alkaloids from *A. kusnezoffii* was $0.4081 \sim 1.7182 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, and the content of diesterifiable alkaloids was $0.6604 \sim 8.6532 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; The content of diesterifiable alkaloids greatly reduced and the content of monoester alkaloids increased significantly after processing. **Conclusion:** The content of six kinds of alkaloid had significantly difference from *A. kusnezoffii* in different areas, processing technologies of steam and cooking had some scientific, the content of diesterifiable alkaloids was less than 0.04% and monoester alkaloids often beyond limited demand after processing.

[Key words] *Aconitum kusnezoffii*; diesterifiable alkaloids; monoester alkaloids; processing technology; content determination

草乌具有祛风除湿、温经止痛的功效^[1],为临床常用药,主产于辽宁、吉林、黑龙江等地,为野生

品^[2]。其生品有大毒,一般外用,主要含双酯型生物碱成分,如乌头碱、次乌头碱和新乌头碱等,它们既是有效成分,也是毒性成分,且治疗剂量与中毒剂量接近,安全范围小^[3]。为保证临床用药的安全性和有效性,需对草乌药材进行质量控制研究。目前,文献对草乌中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱等 3 种双酯型含量测定报道较多^[4-7],2010 年版《中国药典》规定其总双酯型生物碱限量为 $0.1\% \sim 0.5\%$ 。草乌经炮制后,毒性大大减低,可内服入药。草乌的

[收稿日期] 20121010(013)

[基金项目] 广东省科技厅资助项目(2009B030801300)

[第一作者] 邓广海,中医师,硕士,从事中药质量监控与质量标准研究, E-mail: handsomehai@126.com

[通讯作者] *林华,主任中医师,硕士生导师,从事中药质量鉴定和品质评价研究, Tel:020-81887233, E-mail: lh33895380@163.com

炮制方法较多,如煮制、蒸制、黑豆制、甘草制、诃子制等^[8],2010 年版《中国药典》则收录了煮制法。传统以“口尝麻舌感”作为炮制品毒性的判断指标,2010 年版《中国药典》则规定总双酯型生物碱质量分数 $\leq 0.04\%$,以保证其安全性;规定总单酯型生物碱质量分数 $0.02\% \sim 0.07\%$,以保证有效性。本实验测定不同产地草乌及草乌炮制品中 6 种生物碱的含量,比较其炮制前后有效成分的含量变化,综合评价草乌的安全性和有效性,为其质量标准的提高和炮制原理的研究提供实验依据。

1 材料

1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),BS210S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品(批号分别为 0720-9807,799-9403,110798-200404,均购自中国药品生物制品检定所),苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱对照品(批号分别为 20100823,20100703,20100712,均购自成都瑞芬思生物科技有限公司),乙腈、四氢呋喃为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。草乌药材采集于四川、吉林、新疆、陕西、河南、河北等地,经广东省中医院药学部林华主任中药师鉴定为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥母根。

2 方法与结果

2.1 炮制品的制备 参照 2010 年版《中国药典》一部制草乌项下的炮制工艺进行炮制^[1]。

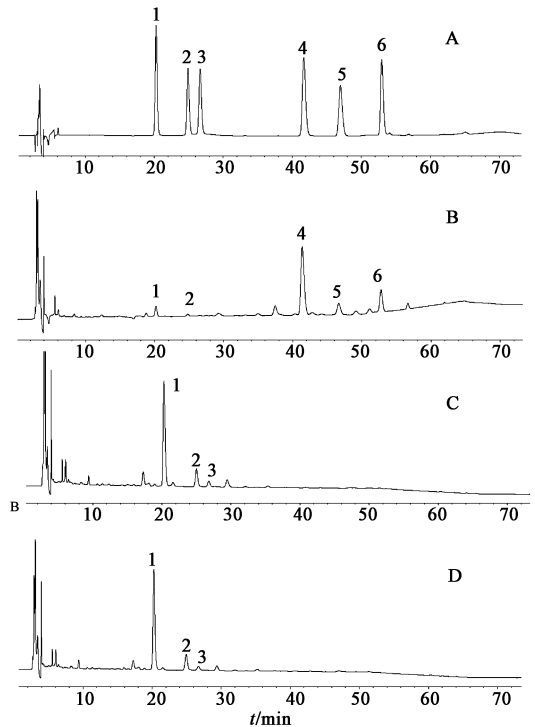
2.1.1 常温煮法 取大小均匀生草乌约 500 g,用水浸泡至内无干心,取出,加水煮 4.5 h,至切开内无白心,口尝微有麻舌感时,取出,晾至六成干,切薄片(2~4 mm),50 °C 恒温干燥,即得。

2.1.2 常温蒸法 取大小均匀生草乌约 500 g,用水浸泡至内无干心,取出,均匀放置蒸笼上,叠置厚度为 1 层,隔水蒸 6.5 h,至切开内无白心,口尝微有麻舌感时,取出,晾至六成干,切薄片(2~4 mm),50 °C 恒温干燥,即得。

2.2 6 种生物碱的含量测定^[9]

2.2.1 色谱条件 Dikma kromasil 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相[乙腈-四氢呋喃(25:15)](A)-[0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵(1 000 mL 加乙酸 0.5 mL)](B) 梯度洗脱(0~15 min, 16%~19% A; 15~45 min, 19%~22% A; 45~60 min, 22%~35% A; 65~75 min, 35% A), 检验波长 235 nm, 柱温

30 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹。见图 1。



A. 混合对照品; B. 生草乌; C. 草乌蒸制品;
D. 草乌煮制品; 1. 苯甲酰新乌头原碱;
2. 苯甲酰乌头原碱; 3. 苯甲酰次乌头原碱;
4. 新乌头碱; 5. 次乌头碱; 6. 乌头碱

图 1 草乌生品及其炮制品 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取新乌头碱 2.37 mg, 乌头碱 2.04 mg, 次乌头碱 1.61 mg, 苯甲酰新乌头原碱 4.02 mg, 苯甲酰乌头原碱 3.04 mg, 苯甲酰次乌头原碱 3.19 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加 0.05% 盐酸-甲醇溶液, 稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品 a 溶液; 精密移取该溶液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用 0.05% 盐酸-甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品 b 溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别称取草乌及其炮制品粉末(过三号筛) 1.0, 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入氨试液 3 mL 与异丙醇-乙酸乙酯(1:1) 混合溶液 50 mL, 摇匀, 称定质量, 放置 16 h, 连续超声 30 min, 冷却, 称定质量, 用混合溶液补足减失质量, 摇匀, 滤过, 精密移取续滤液 25 mL, 于 40 °C 以下减压回收溶剂至干, 残渣精密加入 0.05% 盐酸-甲醇溶液 5 mL 溶解, 摇匀, 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 标准曲线的制备 精密吸取混合对照品 a 溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 μL, 混合对照品 b 溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件进行测

定,结果见表1。

表1 草乌中6种生物碱标准曲线的建立

对照品	标准曲线	线性范围/ μg	R^2
苯甲酰新乌头原碱	$Y = 1\,494.3X + 17.895$	0.040 2 ~ 4.02	0.999 6
苯甲酰乌头原碱	$Y = 1\,443.7X + 11.828$	0.030 4 ~ 3.04	0.999 7
苯甲酰次乌头原碱	$Y = 1\,398.5X + 11.483$	0.031 0 ~ 3.19	0.999 7
新乌头碱	$Y = 1\,551.2X + 12.359$	0.023 7 ~ 4.47	0.999 9
次乌头碱	$Y = 1\,567.4X + 18.962$	0.016 1 ~ 3.22	0.999 6
乌头碱	$Y = 1\,467.3X + 6.471$	0.020 4 ~ 4.08	0.999 9

2.2.5 精密度考察 精密吸取混合对照品b溶液10 μL ,按上述色谱条件重复进样5次,测定6种生物碱的峰面积积分值,结果新乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱峰面积RSD分别为0.76%,0.72%,0.98%,1.74%,1.78%,1.76%。

2.2.6 稳定性考察 分别取草乌同一份供试品溶液,采用上述色谱条件,分别于0,4,8,16,24 h进样10 μL ,测定6种生物碱的峰面积,结果新乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的峰面积RSD分别为2.17%,1.32%,1.78%,1.35%,1.82%,1.45%。说明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批草乌药材样品5份,

按2.2.3项下方法制备供试品溶液,分别进样10 μL ,计算生物碱含量,结果新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱峰面积RSD分别为4.17%,3.78%,3.24%,2.18%,2.04%,1.87%。

2.2.8 加样回收率考察 取同一份草乌药材粉末(过三号筛)0.5 g,精密称定,加入6种生物碱对照品适量,测定其含量。结果新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的平均回收率分别为101.46%,100.11%,101.62%,97.18%,98.33%,98.12%;RSD依次为2.08%,2.47%,2.15%,2.61%,2.33%,2.78%。

2.2.9 样品测定 称取不同产地的草乌样品,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,测定草乌中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量,结果见表2。

由表2可知,生草乌主要含有双酯型生物碱,其总量在0.660 4~8.653 2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,以乌头碱最为普遍,含量最高;单酯型生物碱的含量较低,总量约0.420 2~1.718 2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3 炮制前后生物碱含量比较 按2.2项下含量测定方法分别测定草乌生品及其炮制品中6种生物碱的含量,并比较其含量变化。结果见表3。

表2 不同产地草乌中生物碱HPLC含量测定($n=3$)

产地	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	总单酯型生物碱	新乌头碱	次乌生物碱	乌头碱	总双酯型生物碱
四川	0.345	0.063	-	0.408	4.158	0.681	1.205	6.044
四川	-	0.656	-	0.656	-	-	6.507	6.507
四川	-	1.686	-	1.686	-	-	3.202	3.202
四川	0.661	0.035	0.083	0.779	1.364	1.441	0.130	2.934
内蒙古	0.650	0.042	0.078	0.770	1.353	1.422	0.124	2.899
吉林	-	1.718	-	1.718	-	-	8.653	8.653
新疆	-	0.860	-	0.860	-	-	4.170	4.170
河南	-	1.624	-	1.624	-	-	8.239	8.239
河北	-	1.633	-	1.633	-	-	5.333	5.333
陕西	0.402	-	0.019	0.420	0.330	0.279	0.051	0.660

注:“-”表示未能检测到(表3同)。

由表3可知,草乌经炮制后,双酯型生物碱含量明显减少,转化为相应的单酯型生物碱,在一定炮制时间内,其双酯型生物碱和单酯型生物碱的含量呈一定相关性,即生品中总双酯型生物碱含量越高,炮制后未水解的双酯型生物碱和生成的单酯型生物碱

的含量就越高,相反则越低。

3 讨论

目前,川乌来源于栽培,草乌来源于野生,由于草乌受资源所限,药材市场常以小个川乌作为草乌销售,影响了草乌药材的品质。因此,需对草乌药材

表 3 草乌炮制前后 6 种生物碱的含量变化 ($n=3$)

$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

产地	苯甲酰新 乌头原碱	苯甲酰 乌头原碱	苯甲酰次 乌头原碱	总单酯型 生物碱	新乌头碱	次乌生物碱	乌头碱	总双酯型 生物碱
生草乌 1	0.345 4	0.062 7	-	0.408 1	4.158 2	0.681 2	1.204 9	6.044 4
煮法	-	6.029 2	0.079 0	6.108 2	-	-	0.046 5	0.046 5
蒸法	-	6.509 8	0.098 2	6.608 1	-	-	0.046 1	0.046 1
生草乌 2	-	1.718 2	-	1.718 2	-	-	8.653 2	8.653 2
煮法	4.393 3	0.919 0	0.266 2	5.578 5	-	-	-	-
蒸法	4.178 2	0.819 9	0.193 8	5.191 9	-	-	-	-

进行质量控制,保证临床用药的安全性和有效性。本实验结果表明,不同产地草乌中 6 种生物碱的含量差异较大,其总双酯型生物碱含量 $0.660 4 \sim 8.653 2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,10 批不同产地药材中,有 7 批药材超出了 2010 年版《中国药典》的限量要求 ($1 \sim 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),其中以高于上限的药材居多。

草乌的炮制方法众多,以蒸法和煮法的炮制工艺最为简单、可控,且其“去毒”效果较好,因此本实验选择这 2 种方法进行炮制。结果表明 2 种炮制品中 6 种生物碱的含量无显著差异。草乌经炮制后,双酯型生物碱明显减低,单酯型生物碱明显增加,符合酯型生物碱的水解原理,且呈现一定相关性。制草乌中双酯型生物碱的含量 $< 0.04\%$,而单酯型生物碱含量常高于 2010 年版《中国药典》的上限要求 ($0.2\% \sim 0.7\%$),可能是草乌生品中双酯型生物碱含量较高,转化为单酯型生物碱的含量也高,而单酯型生物碱具有一定稳定性,需较高温度和长时间才能进一步水解。

草乌、川乌虽为同属植物,但两者的性状和质地却有所不同,川乌含有淀粉较多,纤维性不及草乌,这对炮制过程中酯型生物碱受热水解有一定影响。本研究前期试验发现,草乌中双酯型生物碱含量一般高于川乌,经炮制后转化为单酯型生物碱的含量也高于川乌,从而使得草乌的炮制品很难符合标准,或需要更高温度和更长时间炮制才能使得单酯型生物碱进一步水解,但该过程会使得总生物碱流失严重。

草乌具有良好的镇痛、抗炎作用,其临床需求量较大,而草乌以野生品为主,资源有限,且产地对草乌的质量品质影响较大,因此,有必要建立草乌的 GAP 基地,从源头上保证其药材的质量,同时增加人工种植的面积,满足市场的需求。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:220.
- [2] 张贵君. 中药鉴定学[M]. 北京:科学出版社,2006:94.
- [3] 张丰梅,谢黔锋,鲁静,等. 草乌药材标准修订研究[J]. 药物分析杂志,2010,30(5):940.
- [4] 吕颖,王栋,林燕,等. 蒙药材草乌及其炮制品中几种双酯型生物碱的含量比较[J]. 时珍国医国药,2010,21(5):1086.
- [5] 邬林祥,温爱平,党晓菊,等. 高效液相色谱法测定草乌药材中有效成分的含量[J]. 中国民族医学杂志,2003,9(2):36.
- [6] 图雅,张贵君,刘志强,等. HPLC 测定蒙药草乌中药效组分含量[J]. 中国现代中药,2007,9(10):14.
- [7] 赵英永,崔秀明,戴云,等. 高效液相色谱法测定草乌类药用植物活性成分含量[J]. 中国药学杂志,2007,42(11):815.
- [8] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2130.
- [9] 邓广海,林华. 川乌高压蒸制工艺的优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):21.

[责任编辑 全燕]