

乌头各组织部位生物碱类成分动态差异性研究

欧水平^{1,2}, 郑琴², 王森², 岳鹏飞², 陈振华³, 杨明^{1,2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
3. 江西科技师范大学, 南昌 330013)

[摘要] **目的:**比较不同采收期乌头不同组织中乌头总碱和双酯型生物碱(新乌头碱、乌头碱和次乌头碱)的含量,为毒性及药效学研究提供依据。**方法:**用酸性染料比色法测定乌头不同组织中总生物碱的含量;反相高效液相色谱法测定新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的含量,流动相为乙腈-40 mmol·L⁻¹乙酸铵水,梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm,柱温 30 ℃。**结果:**6月4日之前采收的乌头的不同组织部位总生物碱含量明显小于6月18日和7月3日,乌头最佳采收期可确定为6月底至7月初。乌头地上部分乌头类总生物碱的含量小于地下部分,不同采收期乌头各组织部位中乌头类总生物碱和双酯型生物碱含量顺序大体为:须根>子根>母根>叶片≈茎秆。**结论:**该研究初步了解了乌头各组织部位生物碱类成分的动态变化规律,确认了乌头的最佳采收期及各组织部位生物碱类成分的含量差异。

[关键词] 乌头属;总生物碱;新乌头碱;次乌头碱;乌头碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0083-05

Study on Dynamic Differences of Alkaloid in Various Tissues of *Aconitum*

OU Shui-ping^{1,2}, ZHENG Qin², WANG Sen², YUE Peng-fei², CHEN Zhen-hua³, YANG Ming^{1,2*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;
3. Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the total alkaloids and three kinds of diester diterpenoid alkaloids in different parts of monkshood medicinal material. **Method:** We used acid dye colorimetry method to evaluate the alkaloids and RP-HPLC to evaluate three kinds of diester diterpenoid alkaloids. The compounds was analyzed by gradient elution program performed with acetonitrile and 40 mmol·L⁻¹ ammonium acetate as a mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection was done at 240 nm and column temperature was 30 ℃. **Result:** The total alkaloid content of different tissues which be harvested before June 4, was significantly less than on June 18 and July 3. The best harvest period of aconitine can be defined as the end of June and early July. The alkaloid content of ground parts of *Aconitum* is less than the underground. The contents of alkaloid and three kinds of diester diterpenoid alkaloids in different tissues of *Aconitum carmichaeli* were in the sequence of: fibrous tubers > monkshood-tubers > mother tubers > leaves > stem. **Conclusion:** The study was a preliminary understanding of the dynamic variation of the various tissues of the *Aconitum* Alkaloids and From the point of view on the content of alkaloids, the best harvest period of aconitine and content of alkaloids in various tissues can be defined.

[Key words] *Aconitum*; total alkaloids; mesaconitine; hypaconitine; aconitine

[收稿日期] 20111125(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060347);成都中医药大学药学院科技发展基金项目(2010-10)

[第一作者] 欧水平,博士,Tel:0791-87118614,E-mail:oushuiping1208@126.com

[通讯作者] *杨明,教授,博士生导师,Tel:028-61800127,E-mail:574825214@qq.com

毛茛科乌头属植物乌头是我国常用中药和四川道地药材川乌和附子的原植物。其中川乌为母根,附子为子根的加工品。根据人们长期的用药习惯,子根(附子)和母根(川乌)是乌头的主要收获和药用的部位,而占全植物生物量 44% 左右的茎叶和须根通常都被遗弃不用。为扩大药用部位,本研究对其生物碱类成分进行研究,比较不同发育期乌头全植株不同部位(母根、子根、须根、茎、叶)总生物碱及双酯型生物碱(乌头碱、新乌头碱、次乌头碱)的动态差异性,探寻茎叶、须根作为乌头新药部位资源的可行性,并为乌头药用植物资源综合利用及新产品的开发研究提供科学依据。

1 材料

Agilent 1200 液相色谱仪(美国 Agilent 公司),旋转蒸发仪(Buchi 公司),电子分析天平(Sartorius 公司),优普超纯水制造系统(上海优普实业有限公司),超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),T6 普析通用新世纪紫外分光光度计(北京普析公司),中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),电热恒温鼓风干燥箱(上海福玛实验设备有限公司)。

乌头经成都中医药大学杨明教授鉴定为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx., 于 2011 年 3 月 18 日—2011 年 7 月 3 日(每 15 d 采收 1 次)在江油河西月爱村直接采收鲜乌头,净制,分离得到母根、子根、须根、茎、叶,洗净,晒干,粉碎,备用。

乌头碱(批号 110797-200404),新乌头碱(批号 110799-200404),次乌头碱(批号 110798-200404)对照品购于中国药品生物制品检定所;乙腈,乙二胺为色谱纯,水为超纯水,其余试剂如醋酸钠,冰醋酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同采收期乌头各组织部位的总生物碱含量测定^[1]

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取乌头各组织部位粉末 0.30 g,置于锥形瓶中,加入 pH 3.0 的 HAC-NaAC 20 mL 缓冲液浸泡过夜,过滤,滤渣用缓冲液洗 2 次,收集滤液定容于 25 mL 量瓶中,备用。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定乌头碱对照品 4 mg,置 25 mL 量瓶中,加 pH (3.0 ± 0.1) HAC-NaAC 缓冲液至刻度,作为对照液,备用。

2.1.3 最大吸收峰的确定 供试品液及对照品液与溴甲酚绿形成的离子对的氯仿溶液,在紫外分光光度计上从 340 ~ 520 nm 扫描,其最大吸收峰位在 415 nm。

2.1.4 标准曲线的建立 精密吸取乌头碱对照品液 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 mL 分别置不同的分液漏斗中,加 pH 3.0 的 HAC-NaAC 缓冲液至 8 mL,取 pH 3.0 的 HAC-NaAC 缓冲液 8 mL 置另一分液漏斗中。在以上 8 个分液漏斗中均加入 10 mL pH 5.4 的溴甲酚绿染料溶液,充分振摇,静置 10 min,用氯仿液提取 3 次(10, 5, 5 mL),氯仿层过滤于 25 mL 量瓶中,并用氯仿液稀释至刻度,加无水硫酸钠 0.5 g 脱水后,以未加对照品溶液的氯仿层做空白,在 415 nm 处测定吸光度。以乌头碱的质量浓度 (mg·L⁻¹) 为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y = 0.0270X + 0.0086$ ($r = 0.9951$),乌头碱质量浓度在 0.68 ~ 27.20 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.5 精密度考察 精密量取乌头碱对照品溶液 1.0 mL,按 2.1.4 项下方法测定吸光度,平行测定 6 份,RSD 1.1%,表明方法精密度良好。

2.1.6 重复性考察 取同一样品,按 2.1.1 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1.4 项下方法测定吸光度,结果 RSD 2.8%,表明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性考察 精密量取供试品溶液 8 mL,按 2.1.4 项下方法测定吸光度,每隔 1 h 测定 1 次,连续 6 h,测定吸光度 RSD 1.2%,表明供试品经酸性染料比色法处理所得氯仿溶液在 6 h 内显色稳定。

2.1.8 加样回收率考察 取已知含量的叶子粉末,共 6 份,每份准确加入标准储备液 4 mL,使乌头碱含量约为 0.7 mg,按照 2.1.1 的方法制备供试溶液后,按 2.1.4 项下方法测定吸光度,计算回收率,结果见表 1。乌头碱的平均加样回收率 99.38%,RSD 3.4% ($n = 6$)。

表 1 加样回收率试验测定 ($n = 6$)

No.	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
1	0.803	0.341	1.135	99.21
2	0.803	0.682	1.470	98.99
3	0.803	0.850	1.679	101.57
4	1.954	0.682	2.756	104.55
5	1.954	1.364	3.214	96.87
6	1.954	2.046	3.803	95.08

2.1.9 不同采收期乌头各组织部位总生物碱的含量比较 精密称取不同采收期乌头各组织部位粉末 0.300 g,按照 2.1.1 项下方法制备,按 2.1.4 项下方法测定吸光度,采用标准曲线法计算总生物碱含量。

不同采收期乌头各组织部位总生物碱含量结果见表2。

表2 不同采收期乌头各组织中总生物碱的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

采收时间/月-日	部位	总生物碱含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
3-18	地上	6.59 ± 0.09
	地下	11.89 ± 0.10
4-03	地上	4.43 ± 0.02
	地下	11.99 ± 0.29
4-18	地上	4.60 ± 0.08
	地下	11.99 ± 0.29
5-03	茎	5.45 ± 0.06
	叶	5.44 ± 0.09
	母根	10.72 ± 0.58
	子根	10.10 ± 0.33
5-18	须根	11.06 ± 0.29
	茎	6.44 ± 0.10
	叶	6.08 ± 0.10
	母根	8.49 ± 0.12
6-04	子根	11.43 ± 0.13
	须根	11.58 ± 0.23
	茎	5.58 ± 0.08
	叶	6.32 ± 0.10
6-18	母根	8.29 ± 0.13
	子根	10.51 ± 0.20
	须根	10.59 ± 0.29
	茎	8.66 ± 0.32
7-03	叶	7.64 ± 0.23
	母根	9.86 ± 0.28
	子根	14.20 ± 0.49
	须根	16.37 ± 0.68
7-03	茎	7.93 ± 1.39
	叶	8.27 ± 1.24
	母根	11.51 ± 1.67
	子根	15.00 ± 2.01
	须根	17.92 ± 0.42

注:3月18日—4月18日全植株各部位不明显,不能分离,故比较的是地上与地下的含量差异。从5月3日起全植株各部位才能明显分离(表4同)。

2.2 不同采收期乌头各组织部位的双酯型生物碱含量测定^[3-4]

2.2.1 供试品溶液的制备 参考《中国药典》2010年版附子项下的含量测定方法,取不同部位粉末(过三号筛)约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氨试液3 mL,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液50 mL,称定质量,超声处理(功率300 W,频率

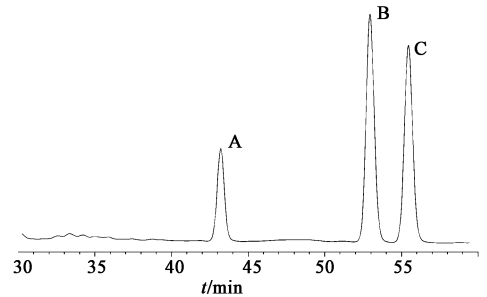
40 kHz;水温在25 ℃以下)30 min,放冷,再称定质量,用异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液25 mL,40 ℃以下减压回收溶剂至干,残渣精密加入异丙醇-三氯甲烷(1:1)混合溶液3 mL溶解,滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取新乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品适量,分别置10 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,得各单一成分对照溶液,作为储备液,其他不同质量浓度的对照品溶液由储备液稀释得到。

2.2.3 色谱条件 AGT Venusil XBP C₁₈(L)色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相A 40 mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液(氨水调pH 9),流动相B 乙腈,流速1 mL·min⁻¹,柱温30 ℃,进样量20 μL,检测波长240 nm,流动相梯度洗脱程序见表3,图1~6。

表3 流动相梯度洗脱

t/min	B/%
0	10
10	15
30	40
55	54



A. 新乌头碱; B. 乌头碱; C. 次乌头碱(图2~6同)

图1 混合对照品液相色谱

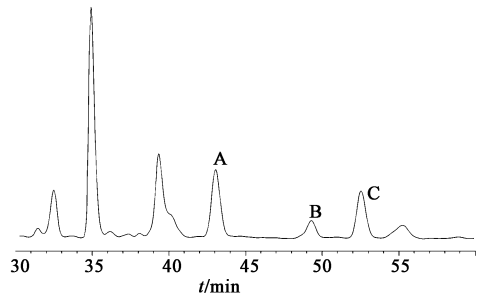


图2 叶子部位液相色谱

2.2.4 标准曲线的制备 分别精密量取乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品储备液5.0 mL制成混合对照品母液,摇匀,精密吸取混合对照品母液5 mL至

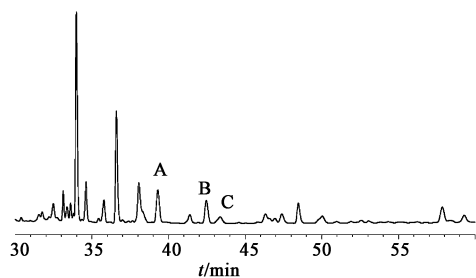


图 3 茎部位液相色谱

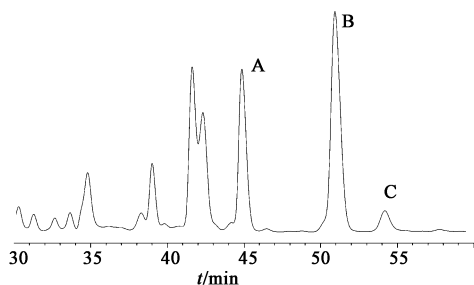


图 4 子根(附子)部位液相色谱

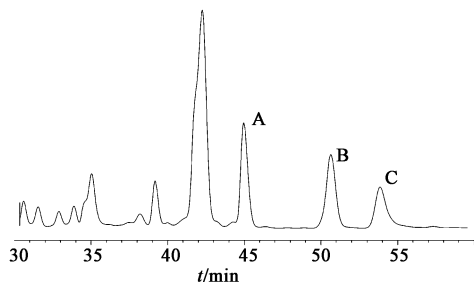


图 5 母根(川乌)部位液相色谱

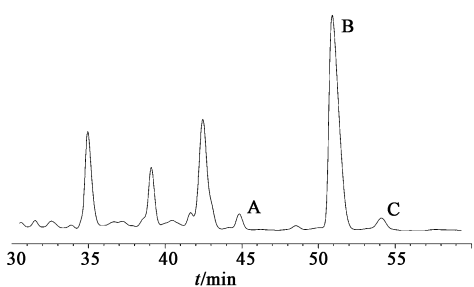


图 6 须根部位液相色谱

10 mL 量瓶中,加酸性甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 2 倍稀释液,同理制得 4,8,16,32,64 倍稀释液,分别吸取 20 μL 进样,以各溶液质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标(X),相应峰面积为纵坐标(Y),得到各对照品线性方程与线性范围分别为 $Y_{\text{乌头碱}} = 14.686X - 7.5563$ ($136.0 \sim 2.12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $r = 0.9999$); $Y_{\text{新乌头碱}} = 15.313X - 10.064$ ($138.40 \sim 2.16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $r = 0.9999$); $Y_{\text{次乌头碱}} = 15.203X + 2.3034$ ($136.0 \sim 2.12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $r = 0.9997$),表明其线性关系良好。

2.2.5 精密性及重复性考察 取混合对照品溶液,进样量 20 μL ($n = 6$),测得各物质峰面积 RSD 分别

为乌头碱 0.9%,新乌头碱 0.9%,次乌头碱 1.1%,结果表明方法精密度良好。取同一样品,按 2.2.1 项下方法制备 6 份供试品溶液,测得乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的 RSD 分别为 1.6%,1.5%,1.7%,表明方法重复性良好。

2.2.6 稳定性考察 取供试品溶液,每 2 h 进样 1 次,进样 6 次,测得各物质峰面积 RSD 分别为乌头碱 1.2%,新乌头碱 1.4%,次乌头碱 1.3%,结果表明供试品溶液在常温 12 h 内稳定。

2.2.7 加样回收率考察 取已知含量的母根粉末适量,精密称定,共 6 份,每份准确加入混合对照品溶液 1 mL,按照 2.2.1 的方法制备供试溶液后,按 2.2.4 项下方法测定。乌头碱、新乌头碱、次乌头碱平均加样回收率分别为 98.8%,96.7%,95.6%;RSD 分别为 1.9%,3.1%,3.8%。

2.2.8 不同采收期乌头各组织部位双酯型生物碱的含量比较 精密称取不同采收期乌头各组织部位粉末 2 g,按照 2.2.1 项下方法制备,按 2.2.4 项下方法测定。不同采收期乌头各组织部位总生物碱含量结果见表 4。

3 结论与讨论

从表 2,4 不同采收时间乌头各组织中乌头类总生物碱和双酯型生物碱的含量比较可以看出,总体上,乌头地上部分乌头类总生物碱的含量小于地下部分,地上部分(茎叶)含量约为地下(子根、母根、须根)的 1/2;5 月 3 日,5 月 18 日和 6 月 4 日及 6 月 18 日和 7 月 3 日采收的乌头中的乌头类总生物碱在相应各组织部位中含量差异不明显,但 6 月 4 日之前采收的乌头的不同组织部位总生物碱含量明显小于 6 月 18 日和 7 月 3 日,6 月 18 日采收的各部位的双酯型生物碱含量较其他采收期的低。初步了解了乌头生物碱类成分含量的动态变化,从量上来看,乌头最佳采收期可确定为 6 月 18 日至 7 月 3 日,这与民间习惯的 6 月底至 7 月初采收相符。

从乌头各组织部位总碱与单酯、双酯型生物碱的比较可以看出,每个采收期乌头各组织部位中乌头类总生物碱含量顺序为须根 > 子根 > 母根 > 叶片 \approx 茎秆,7 月 3 日各部位的含量依次为 17.9,15.0,11.5,8.27,7.93 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。须根、子根中总生物碱含量高,双酯型生物碱含量也高,其毒性大;茎、叶中总碱含量较低,双酯型生物碱含量也较低,毒性相对较小。乌头生药中的毒性成分主要为双酯型二萜类生物碱,即乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等,经炮制后可使双酯型转换为单酯型或无酯型生物碱,使

表4 不同采收期乌头不同组织部位3种双酯型生物碱含量($\bar{x} \pm s, n=3$) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

采收时间/月-日	部位	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱	总计
3-18	地上	112.44 ± 4.61	620.73 ± 34.50	218.12 ± 9.44	951.29
	地下	59.87 ± 4.99	696.91 ± 13.24	247.81 ± 22.28	1 004.59
4-03	地上	125.63 ± 7.09	531.03 ± 28.10	128.28 ± 3.57	784.94
	地下	269.14 ± 30.55	563.13 ± 68.91	126.70 ± 10.04	958.98
4-18	地上	83.54 ± 0.42	51.70 ± 2.03	78.84 ± 0.07	214.08
	地下	347.03 ± 94.95	964.43 ± 191.40	253.80 ± 48.24	1 564.54
5-03	茎	63.02 ± 6.22	209.41 ± 22.06	53.52 ± 4.39	325.96
	叶	48.89 ± 0.20	114.62 ± 122.86	70.77 ± 4.71	309.69
	母根	201.42 ± 17.84	1 056.85 ± 33.12	255.59 ± 14.85	1 513.87
	子根	640.03 ± 18.41	903.90 ± 125.19	110.87 ± 90.00	1 654.81
	须根	702.48 ± 21.78	380.49 ± 240.40	110.48 ± 7.40	1 309.54
5-18	茎	145.30 ± 1.40	339.49 ± 31.82	93.39 ± 6.81	578.19
	叶	158.85 ± 13.02	213.93 ± 15.73	104.02 ± 9.40	476.80
	母根	207.96 ± 5.87	711.85 ± 6.38	211.05 ± 8.67	1 130.86
	子根	434.75 ± 12.83	222.59 ± 28.94	68.29 ± 3.89	725.63
	须根	1 122.64 ± 8.26	513.97 ± 10.61	101.08 ± 7.81	1 737.69
6-04	茎	26.34 ± 2.18	124.71 ± 9.48	71.06 ± 3.57	222.11
	叶	20.14 ± 0.22	99.46 ± 4.60	133.36 ± 0.44	252.95
	母根	101.71 ± 71.06	356.64 ± 14.60	109.70 ± 27.70	568.05
	子根	75.92 ± 10.15	457.01 ± 10.56	673.76 ± 106.53	1 206.69
	须根	30.12 ± 2.37	273.39 ± 46.87	746.86 ± 53.30	1 050.38
6-18	茎	18.39 ± 1.47	77.48 ± 2.65	52.48 ± 4.85	148.35
	叶	32.18 ± 1.63	175.08 ± 8.01	289.66 ± 10.37	496.92
	母根	131.02 ± 12.35	325.75 ± 15.83	85.19 ± 16.39	541.97
	子根	32.60 ± 8.88	136.70 ± 36.74	238.70 ± 13.81	408.00
	须根	24.54 ± 1.08	191.67 ± 7.60	655.69 ± 18.45	871.9
7-03	茎	30.44 ± 1.11	74.46 ± 1.54	67.86 ± 1.09	172.76
	叶	36.90 ± 1.15	128.04 ± 2.65	181.80 ± 3.88	346.74
	母根	62.37 ± 3.99	312.47 ± 6.55	131.49 ± 4.96	506.33
	子根	123.98 ± 4.68	478.46 ± 5.47	738.82 ± 6.23	1 341.26
	须根	90.04 ± 8.06	660.91 ± 17.05	1 241.72 ± 69.06	1 992.66

毒性降低,但疗效也有所下降。故地上部分茎叶由于双酯型生物碱含量较低,毒性虽然较子根、母根、须根小,但疗效可能也不如地下的根部分,有待于进一步的药效和毒性试验验证。

[参考文献]

[1] 李云霞,孙照,郭艳玲.酸性染料比色法测定川乌、草乌中总乌头生物碱的含量[J].中成药,2000,22

(9):662.

[2] 黄建明,郭济贤,孙明明,等.草乌中生物碱含量测定方法的研究[J].中药材,2002,25(12):878.

[3] 中国药典.一部[S].2010:177.

[4] 张启云,朱战杰,余日跃,等.RP-HPLC法测定白附片中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(12):1.

[责任编辑 邹晓翠]