

药用植物乌头净制机制研究

吕永磊, 李珊, 李向日*, 李飞*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:研究药用植物乌头净制的机制。方法:以滴定法测定总生物碱的含量;分光光度法测定酯型生物碱的含量;高效液相色谱法测定 3 种双酯型生物碱的含量;苯酚-硫酸分光光度法测定多糖的含量。结果:母根、子根、须根总生物碱含量分别为 11.20, 11.70, 18.40 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;酯型生物碱含量分别为 4.41, 3.33, 8.24 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;3 种双酯型生物碱含量之和分别为 0.90, 1.07, 2.18 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;多糖含量分别为 60.60, 98.20, 61.80 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论:母根、子根、须根主要化学成分类别没有明显区别,但含量有差异;须根的 3 种双酯型生物碱含量之和是母根的 2 倍多,《中国药典》规定除去须根具有一定的科学性。

[关键词] 乌头;净制;生物碱;多糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0050-04

Study on Cleaning Mechanism of *Aconitum carmichaeli*

LV Yong-lei, LI Shan, LI Xiang-ri*, LI Fei*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To study the cleaning mechanism of *Aconitum carmichaeli*. **Method:** Titration method was used to determine the content of total alkaloids; UV was used to determine the content of ester-type alkaloids; HPLC was used to determine the content of three kind of diester alkaloids namely aconitine, hypaconitine, mesaconitine; sulfuric-phenol method was used to determine the content of polysaccharides. **Result:** The content of total alkaloids in parent root, daughter root, rootlet of *Aconitum carmichaeli* was 11.20, 11.70, 18.40 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively; the content of ester-type alkaloids was 4.41, 3.33, 8.24 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively; the content of three kind of diester alkaloids was 0.90, 1.07, 2.18 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively; the content of polysaccharides was 60.60, 98.20, 61.80 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively. **Conclusion:** The categories of main chemical compositions of

[收稿日期] 20101026(002)

[基金项目] 国家 973 计划中医基础理论专项(2009CB522800;2009CB522805)

[通讯作者] *李向日,研究方向:中药炮制、质量控制及活性成分, Tel:010-84738616, E-mail:lixiangri@sina.com; *李飞, Tel:010-84738616, E-mail:lf668@sina.com

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010: 732.

[2] 傅应华,王金观,徐宏祥.气相色谱法同时测定麝香解痛膏中樟脑、冰片和桂皮醛三组分的含量[J].药物分析杂志, 2007, 27(9): 1434.

[3] 郭汉文,郭兴杰,张满来.气相色谱法测定神农镇痛膏中樟脑和水杨酸甲酯的含量[J].药物分析杂志, 2007, 27(7): 1111.

[4] 管玉云,程正.气相色谱法测定妇炎灵胶囊中樟脑和冰片的含量[J].中国医院药学杂志, 2007, 27(1): 74.

[5] 武彦文,孙素琴,陶家洵.毛细管气相色谱法测定正红花油中 α -蒎烯、水杨酸甲酯、丁香酚的含量[J].药物分析杂志, 2008, 28(11): 1869.

[6] 张翠英,王青晓,李振国,等.毛细管气相色谱法测定前列腺尿栓中冰片的含量[J].中成药, 2007, 29(4): 138.

[责任编辑 蔡仲德]

parent root, daughter root and rootlet have no obvious difference, but the content of them is different. The sum of content of three kind of diester alkaloids of rootlet is more than twice that of parent root. Cleaning has scientific value.

[Key words] *Aconitum carmichaeli*; cleaning; alkaloid; polysaccharide

《中国药典》2010年版规定川乌为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根,附子为毛茛科植物乌头 *A. carmichaeli* Debx. 的子根的加工品,川乌、附子净制时都需除去须根。生物碱是川乌、附子的主要有效成分,也是毒性成分,其中双酯型生物碱是其主要毒性成分。双酯型生物碱性质不稳定,易被水解,经一级水解失去一分子醋酸生成相应低毒的单酯型生物碱,再进一步水解生成几乎无毒的胺醇型生物碱。多糖是川乌、附子的有效成分。据文献报道,川乌多糖有降血糖作用^[1],附子多糖有显著的抑瘤、抗过氧化损伤、提高免疫力的作用^[2-3]。本研究将母根、子根、须根的总生物碱、酯型生物碱、3种双酯型生物碱及多糖的含量进行比较,为乌头净制机制研究提供依据。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 TCO-250型超声波清洗器(北京医疗设备二厂);方型调节式中药切片机(中国温岭市大海药材器械厂);TU-1810紫外-可见分光光度仪(北京普析通用仪器有限公司);Agilent 1100高效液相色谱仪(四元泵、VWD检测器)。

1.2 试剂 乌头 *A. carmichaeli* 为江油太平镇 GAP基地产品,2009年7月2号采收,经北京中医药大学生药系陈玉婷教授鉴定。采集带泥乌头7 940 g,经

净制,分离不同部位,得鲜母根1 132 g、鲜子根4 345 g,共占带泥乌头68.97%。母根、子根、须根经切片,阴干,得干燥品母根241 g、子根1 601 g、须根180 g。

乌头碱(批号110720-200410)、新乌头碱(批号110798-200404)、次乌头碱(批号110799-200404)、D-葡萄糖(Glc,批号110833-200503)购自中国药品生物制品检定所;乙腈为色谱纯(美国Fisher公司);水为高纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总生物碱的含量测定^[4] 精密称定母根、子根、须根中粉各4 g,分别置具塞锥形瓶中,分别加乙醚-氯仿(3:1)50 mL与氨试液4 mL,密塞,摇匀,放置过夜,滤过,药渣加乙醚-氯仿(3:1)50 mL,超声1 h,滤过,药渣再用乙醚-氯仿(3:1)洗涤3次,每次15 mL,滤过,洗液与滤液合并,减压蒸干。残渣加乙醚-氯仿(3:1)5 mL使溶解并蒸干,再加乙醇5 mL使溶解,精密加入硫酸滴定液(0.01 mol·L⁻¹)15 mL、水15 mL与甲基红指示液3滴,用氢氧化钠滴定液(0.02 mol·L⁻¹)滴定至黄色。每1 mL硫酸滴定液(0.01 mol·L⁻¹)相当于12.9 mg的乌头碱(C₃₄H₄₇NO₁₁),结果见表1。

表1 母根、子根、须根生物碱含量测定(n=3)

样品	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱	三种双酯型生物碱总和	酯型生物碱	总生物碱
母根	0.36	0.09	0.45	0.90	4.41	11.20
子根	0.32	0.10	0.65	1.07	3.33	11.70
须根	0.45	0.11	1.62	2.18	8.24	18.40

注:3种双酯型生物碱含量总和为新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的含量之和。

2.2 酯型生物碱的含量测定^[5] 精密称定乌头碱对照品22.54 mg,置10 mL量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度。精密量取对照品溶液0.1,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL,分别置25 mL量瓶,均加无水乙醇使成2.5 mL,各精密加入碱性盐酸羟胺试液1.5 mL,摇匀,在63℃水浴中保温10 min,放冷,加高氯酸铁试液13 mL,摇匀,放置5 min,精密加入高氯酸试液8 mL,用高氯酸铁试液稀释至刻度,摇匀,放置

15 min,以第1份为空白,照分光光度法2005年版《中国药典》(附录V B)在520 nm的波长处测定吸收度,以吸收度为纵坐标,含量(mg)为横坐标,绘制标准曲线。线性回归方程 $Y = 2.0275X - 0.0057$ ($r = 0.9991$),乌头碱在0.01~0.23 mg线性关系良好。

精密称定母根、子根粗粉各2 g,须根粗粉1 g,分别置具塞锥形瓶中,分别加乙醚50 mL与氨试液

4 mL, 密塞, 摇匀, 放置过夜, 滤过, 药渣加乙醚 50 mL, 连续振摇 1 h, 滤过, 药渣再用乙醚洗涤 3 次, 每次 15 mL, 滤过, 洗液与滤液合并, 减压回收溶剂。残渣加氯仿 2 mL 使溶解, 转入分液漏斗中, 用氯仿 3 mL 分次洗涤容器, 洗液并入分液漏斗中, 用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液提取 3 次, 每次 5 mL, 酸液依次用同一氯仿 10 mL 振摇洗涤, 合并酸液, 加氨试液调节 pH 至 9, 再用氯仿提取 3 次, 每次 10 mL, 氯仿液依次用同一水 20 mL 振摇洗涤, 合并氯仿液, 减压蒸干。残渣加无水乙醇适量使溶解, 转入 5 mL 量瓶中, 用无水乙醇分次洗涤容器, 洗涤液并入量瓶中, 再加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液及无水乙醇空白溶液各 2.5 mL, 分别置 50 mL 试管中, 各精密加入碱性盐酸羟胺试液 1.5 mL, 摇匀, 在 $63 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中保温 10 min, 放冷, 加高氯酸铁试液 13 mL, 摇匀, 放置 5 min, 精密加入高氯酸试液 8 mL, 用高氯酸铁试液稀释至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以第 1 份为空白, 照分光光度法 2005 年版《中国药典》(附录 V B) 在 520 nm 的波长处测定吸收度 (表 1)。

2.3 3 种双酯型生物碱的含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称定母根、子根、须根过 80 目粉末各 1 g, 按 2010 年版《中国药典》川乌项下含量测定方法制备供试品溶液。

2.3.2 3 种双酯型生物碱检测方法 按文献法检测^[6]。

2.3.3 3 种双酯型生物碱的含量测定 分别精密量取各供试品溶液 10 μL , 按 2.3.2 项下方法测定, 色谱图见图 1, 按外标法计算各供试品溶液中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的含量 (表 1)。

2.4 多糖的含量测定

2.4.1 供试品溶液的制备 精密称定子根粗粉 0.2 g, 加入 80% 乙醇 50 mL 回流提取 3 h, 滤渣挥尽乙醇后, 60 mL 水回流提取 3 次, 每次 1 h, 过滤, 合并水提液并浓缩, 加乙醇使醇含量至 80%, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中过夜, 过滤, 得粗多糖。将粗多糖溶于水, 定容至 250 mL, 作为供试品溶液。

2.4.2 标准曲线的绘制 精密称定葡萄糖对照品 9.336 mg, 定容至 100 mL。精密量取溶液 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 25.0 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 配成系列标准溶液。精密量取 1 mL 系列标准溶液于具塞试管中, 以蒸馏水作空白,

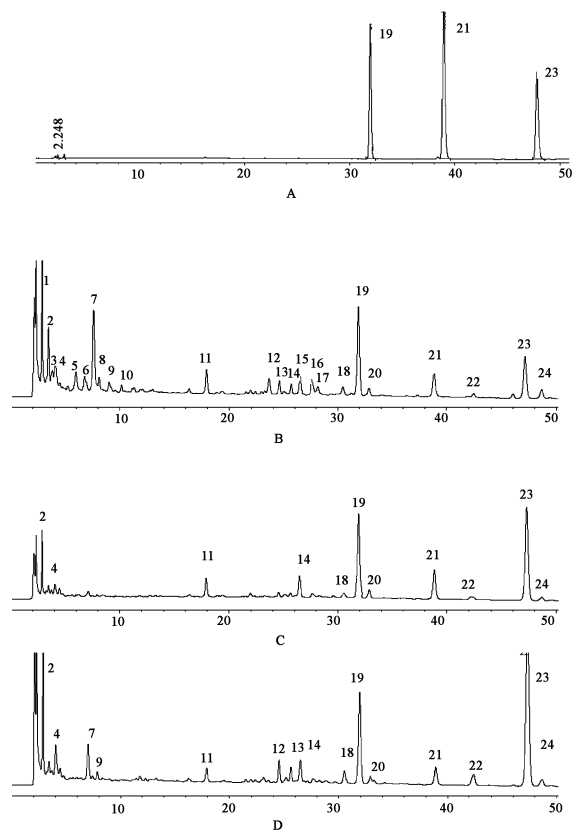


图 1 母根、子根、须根 HPLC

A. 3 种双酯型生物碱对照品; B. 母根; C. 子根; D. 须根

19. 新乌头碱; 21. 乌头碱; 23. 次乌头碱

分别加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 浓硫酸 6 mL, 摇匀, 放置 5 min, 沸水加热 15 min, 冷至室温, 于 484 nm 处测定吸收度。得回归方程 $Y = 69.386X - 0.0101$, $r = 0.9991$, 葡萄糖在 $0.2334 \sim 11.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 精密量取葡萄糖标准溶液 1 mL, 按 2.4.2 项下方法显色并测定吸收度, 平行测定 6 份, 结果 RSD 1.04%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 按 2.4.1 项下方法制备 1 份供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL, 置具塞试管中, 照 2.4.2 项下方法显色并测定吸收度, 每隔 1 h 测定 1 次, 连续 6 h, 结果 RSD 1.21%, 表明 6 h 内显色稳定。

2.4.5 重复性试验 按 2.4.1 项下方法制备 6 份供试品溶液。精密量取各供试品溶液 1 mL, 分别置于具塞试管中, 照 2.4.2 项下方法显色并测定吸收度, 结果 RSD 3.01%, 表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称定 6 份子根粗粉各 0.1 g, 按 2.4.1 项下方法制备供试品溶液, 加入

葡萄糖对照品 17 mg,照 2.4.2 项下条件显色并测定吸收度,计算回收率,结果平均加样回收率 101.02%,RSD 4.35% ($n=6$)。

2.4.7 多糖含量的测定 分别精密称定母根粗粉 0.5 g、子根粗粉 0.2 g、须根粗粉 0.5 g,按 2.4.1 项下方法制备供试品溶液和 2.4.2 项下方法显色并测定吸收度,由回归方程计算供试品溶液中葡萄糖浓度,按含量(%) = $(CD/W) \times 100\%$ 计算供试品中多糖的含量。式中: C 为供试品溶液中葡萄糖的浓度, D 为稀释倍数, W 为供试品干重质量。结果见表 2。

表 2 母根、子根、须根多糖质量分数($n=2$)

样品	多糖含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
母根	60.60	3.17
子根	98.20	2.44
须根	61.80	1.31

3 讨论

乌头总生物碱成分种类多样,包括双酯型生物碱、单酯型生物碱、胺醇型生物碱、脂碱等。这些生物碱的毒性强弱均不同,甚至相差较远,其中双酯型生物碱是剧毒成分,单酯型生物碱毒性较小,仅为双酯型生物碱的 1/200 ~ 1/500^[7],胺醇型生物碱几乎无毒。本课题组还做了母根、子根、须根的急性毒性实验,实验结果表明子根毒性是母根的 0.94,而子根 3 种双酯型生物碱的含量是母根的 1.19 倍。3 种双酯型生物碱虽然是乌头的主要毒性成分,但并不等同于样品毒性。在对乌头的成分和毒性尚未研究清楚前,仅仅以 3 种双酯型生物碱含量之和来衡量其毒性,并以此作为川乌和附子的质量控制指标是不够完善的。现阶段仍需结合总生物碱含量、酯型生物碱含量等来作为川乌、附子的质量控制指标,确保临床用药的安全有效。

川乌性味,功效与附子相近,可散在表之风邪逐在里之寒湿,但补阳之力不及附子,而祛风通痹之功较附子为胜,因此古有“附子逐寒,乌头祛风”之

说^[8]。母根、子根虽同来源于乌头,但是经分离分别加工成川乌、附子。子根总生物碱、酯型生物碱、3 种双酯型生物碱含量分别是母根的 1.04,0.75,1.19 倍,高效液相色谱图中母根主要色谱峰有 23 个,子根主要色谱峰有 11 个,母根色谱图中包含了子根的 11 个色谱峰,子根多糖含量是母根的 1.62 倍。川乌、附子功效的不同,是因母根、子根中生物碱和多糖的差别产生的,还是因炮制方法的不同导致的,有待于炮制后结合药理进一步研究。

须根总生物碱、酯型生物碱、3 种双酯型生物碱含量分别是母根的 1.64,1.88,2.41 倍,高效液相色谱图中须根主要色谱峰有 15 个,母根都含有须根的 15 个色谱峰,须根的多糖含量是母根的 1.02 倍,其毒性是母根的 1.46 倍。须根的多糖含量和母根相近,但生物碱含量和毒性都高于母根,因此《中国药典》2010 年版规定除去须根具有一定的科学性。

[参考文献]

- [1] 苏孝礼,刘成基.乌头及其炮制之中粗多糖药理作用的研究[J].中药材,1991,14(5):27.
- [2] 董兰凤,刘京生,苗智慧,等.附子多糖对 H22 和 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(9):14.
- [3] 刘古锋,吴伟康,段新芬,等.附子多糖对力竭运动小鼠心肌过氧化损伤的保护作用[J].海南医学,2008,19(7):67.
- [4] 中国药典.一部[S].2010:177.
- [5] 中国药典.一部[S].2005:27.
- [6] 刘芳,于向红,李飞,等.HPLC 测定附子及其炮制品中 3 种双酯型生物碱的含量[J].中国中药杂志,2006,31(14):1160.
- [7] 龚千锋.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2007:294.
- [8] 高学敏.中药学·第1分册[M].北京:中国中医药出版社,1985:199.

[责任编辑 蔡仲德]