

陕产铁棒锤不同生长期不同器官中 3 种酯型生物碱的含量测定

杨长花 杨文娟 王西芳 崔立坤

【摘要】 目的 对陕产铁棒锤不同生长期不同器官中乌头碱、次乌头碱及中乌头碱进行含量测定,探讨化学成分的动态变化,为资源开发及合理使用提供参考。**方法** 色谱柱:Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:A:乙腈-四氢呋喃(25:15),B:0.1 mol/L 醋酸铵溶液(每 1000 mL 加冰乙酸 0.5 mL);流速:1.0 mL/min;梯度洗脱;检测波长为 235 nm;温度 25℃。**结果** 铁棒锤不同生长期、不同器官中酯型生物碱含量均较高,不同器官中酯型生物碱的含量差异较大;块根在果期酯型生物碱的含量最高,茎在花前期酯型生物碱的含量最高,叶在花后期酯型生物碱的含量最高;乌头碱在植物体内的含量呈现先升后降的变化趋势,花前期乌头碱的含量最高;次乌头碱在植物体内的含量呈现 S 变化趋势,苗期和花期的含量最高;中乌头碱在植物体内的含量呈现先升后降的变化趋势,花前期中乌头碱含量最高。**结论** 铁棒锤不同生长期、不同器官酯型生物碱的含量远大于川乌的限量标准,且资源优质,具有较高的药用价值,本研究为陕产铁棒锤合理使用、资源开发及质量评价提供理论依据。

【关键词】 铁棒锤; 不同器官; 不同生长期; 动态变化

【中图分类号】 R254.23 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.01.004

Determination of three diester diterpenoid alkaloids in different organs at different growing period of *A. pendulum* Busch YANG Changhua, YANG Wenjuan, WANG Xifang, et al. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China
Corresponding author: YANG Changhua, E-mail: 466811179@qq.com

【Abstract】 Objective To study the dynamic changes of chemical compositions in different organs of *A. pendulum* Busch from Shaanxi at different growing periods, and to provide a theoretical basis for the rational use and resource development, the method of HPLC was applied to analyze the contents of aconitine, hypaconitine and mesaconitine in different organs. **Methods** The assay was performed on Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column at the temperature of 25℃ by gradient elution, mobile phase was made up of A and B at a flow of 1.0 mL/min, and the A mobile phase consisted of acetonitrile and tetrahydrofuran(25:15), and the B mobile phase consisted of 0.1 mol/L ammonium acetate solution (1000 mL solution mixed 0.5 mL glacial acetic acid), the eluent was monitored by UV detector at 235 nm.

Results The content of three diester diterpenoid alkaloids were found to be much different and higher in different organs of *A. pendulum* Busch at different growing period; content of diester diterpenoid alkaloid were the highest in root during fruit stage; the highest content of diester diterpenoid alkaloid in stem were at flower stage; the highest content of diester diterpenoid alkaloid in leaf were at flower stage; The content of aconitine increased at first and then decreased at different growing period in plant and had the highest at prophase of flower stage; the content of hypaconitine showed changes in curve in plants and was the highest at seedling and flowering stage; the content of mesaconitine increased at first and then decreased at different

基金项目: 陕西省教育厅项目(2013JK0841)

作者单位: 712046 咸阳, 陕西国际商贸学院中药研究院(杨长花), 国际学院(崔立坤); 陕西科技大学生命科学院(杨文娟); 陕西中医药大学药学院(王西芳)

作者简介: 杨长花(1978-), 女, 硕士, 讲师。研究方向: 药用植物资源开发利用。E-mail: 466811179@qq.com

growing period in phant and the highest was at prophase of flower stage. **Conclusion** The medicinal value of *A. pendulum* Busch was higher in different organs at different growing period, the content of three diester diterpenoid alkaloids are much larger than that of aconiti Radix, this study provided a theoretical basis for the rational use, resource exploiting and quality evaluating of *A. pendulum* Busch produced in Shaanxi.

【Key words】 *A. pendulum* Busch; Different organs; Growing periods; Dynamic change

铁棒锤来源于毛茛科乌头属植物铁棒锤 *A. pendulum* Busch 和伏毛铁棒锤 *A. flavum* Hand-Mazz, 药用部位为块根及幼苗^[1]。铁棒锤块根能祛风止痛、散瘀止血、消肿拔毒,用于治疗风湿关节痛、腰腿痛、跌打损伤;外用治淋巴结核(未破)、痈疮肿毒^[2];幼苗具有解毒、消肿止痛的功效,用于治疗跌打损伤、刀伤、痈肿、疮疖^[1]。主要产地:陕西南部、西藏、云南西北部、四川西部、青海、甘肃南部及河南西部^[3]。乌头类生物碱是铁棒锤的有效成分,毒性成分主要为二萜双酯型生物碱^[4-5],品种分为乌头碱、次乌头碱和新乌头碱等^[6]。陕产铁棒锤主要分布于秦岭地区,当地农民一直以采挖野生资源入药,资源日趋枯竭,资源优化是解决这一问题的有效途径。国内对铁棒锤研究主要集中在块根的化学成分上^[7-9],而对地上部分(茎、叶、花、果实)的双酯型生物碱研究较少。本研究采用高效液相色谱法测定铁棒锤不同生长期、不同药用部位的乌头碱、次乌头碱及中乌头碱含量,旨在认识生物碱积累与植物生长发育之间的积累变化动态,为合理使用、资源开发、质量控制、安全用药、人工栽培提供科学依据。

1 材料

1.1 实验仪器

高效液相色谱仪(品牌:Waters,型号:E2695, 2489 紫外检测器);TE124S 分析天平(万分之一, Sartorius 公司);CP225D 电子分析天平(十万分之一, Sartorius 公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司);KH5200DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限责任公司);FW-100D 高速万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限责任公司);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 实验药品

乌头碱对照品、次乌头碱对照品、新乌头碱对照品(中国药品生物制品检定研究所,批号:110446-201507、10096-201504、10478-201412)、乙腈、四氢呋喃、甲醇、乙酸铵、冰乙酸、异丙醇、三氯甲烷、乙

酸乙酯、氨水,其中乙腈和四氢呋喃为色谱纯,其余为分析纯,水为纯化水。铁棒锤于 2014 年 6 月(苗期)、7 月(花前期)、8 月(花期)、9 月(果期)采自秦岭太白山上板寺地区,经陕西中医药大学雷国莲教授鉴定为铁棒锤(*A. pendulum* Busch),分离各药用部位,洗净,干燥,粉碎,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:A:乙腈-四氢呋喃(25:15),B:0.1 mol/L 醋酸铵溶液(每 1000 mL 加冰乙酸 0.5 mL),按表 1 梯度洗脱;检测波长为 235 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:25℃;进样量:10 μL;理论板数按新乌头碱峰计算应不低于 2000。

表 1 梯度洗脱时间表

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~48	15~→26	85~→74
48~49	26~→35	74~→65
49~58	35	65
58~65	35~→15	65~→85

2.2 对照品溶液的制备

精密称取乌头碱对照品、次乌头碱对照品、新乌头碱对照品,加异丙醇-三氯甲烷(1:1)的混合溶液溶解,制成每 1 mL 分别含乌头碱 66.6 μg、次乌头碱 170.6 μg 和新乌头碱 170.6 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取铁棒锤粉末(过三号筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氨试液 3 mL 润湿,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液 50 mL,称定重量,超声处理(功率 300W,频率 90 KHZ;水温在 25℃)以下 30 分钟,放冷,再称定重量,用异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液补足减失的重量,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 使溶解,滤过,取续滤液,即得。

表 2 铁棒锤不同生长期不同器官中 3 种双酯型生物碱的含量

生长期	药用部位	取样量(g)	乌头碱(g/g)	中乌头碱(g/g)	次乌头碱(g/g)	合计(g/g)
苗期	全草	3.0109	0.10%	0.0049%	0.29%	0.3949%
花前期	块根	2.0006	0.28%	0.0444%	0.14%	0.4644%
	茎	2.0001	1.53%	0.0188%	0.06%	1.6088%
	叶	2.0005	0.32%	0.0172%	0.14%	0.4772%
	花	2.0005	0.32%	0.0172%	0.14%	0.4772%
花期	块根	3.0078	0.18%	0.0029%	0.29%	0.4729%
	茎	1.8821	0.11%	0.0019%	0.09%	0.2019%
	叶	3.0410	0.22%	0.0087%	0.30%	0.5287%
	花	3.0143	0.36%	0.0004%	0.08%	0.4404%
果期	块根	2.0009	0.12%	0.0355%	0.13%	0.6055%
	茎	2.0005	0.04%	0.0005%	0.12%	0.1605%
	叶	2.0007	0.05%	0.0090%	0.05%	0.1090%
	果实	2.0001	0.13%	0.0034%	0.07%	0.2034%

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μL 进样,测定峰面积,以对照品进样量(Y)为横坐标、峰面积(X)为纵坐标做标准曲线。得回归方程为:乌头碱: $Y = 1 \times 10^9 X - 231422$, $r = 0.9990$;次乌头碱: $Y = 1 \times 10^9 X + 33376$, $r = 0.9982$;新乌头碱: $Y = 6 \times 10^8 X + 17739$, $r = 0.9981$,证明乌头碱在 0.13 ~ 1.33 μg、次乌头碱在 0.34 ~ 3.41 μg、中乌头碱在 0.34 ~ 3.41 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取 2.2 配制的对照品溶液,进样 10 μL,平行测定 6 次,记录峰面积,乌头碱、次乌头碱、中乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.11%、1.78%、1.87%,该数据符合规定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批次铁棒锤药材粉末 5 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样 10 μL,记录峰面积,乌头碱、次乌头碱、新乌头碱含量的 RSD 分别为 3.57%、2.02%、3.83%,该数据符合规定。

2.7 稳定性试验

精密称取铁棒锤粉末 1 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8 小时进样 10 μL,记录峰面积,乌头碱、次乌头碱、中乌头碱峰面积的 RSD 分别为 2.17%、2.17%、3.22%,该数据符合规定。

2.8 回收率试验

精密称取 6 份已知含量的铁棒锤药材粉末,分别精密加入混合对照品溶液,按 2.3 项下方法制备

供试品溶液,进样 10 μL,记录峰面积,乌头碱平均回收率为 97.04%,RSD = 1.29%;次乌头碱平均回收率为 96.99%,RSD = 1.17%;新乌头碱平均回收率为 96.27%,RSD = 1.52%,该数据符合规定。

2.9 含量测定

取不同生长期不同药用部位的铁棒锤粉末,按照 2.3 项下制备供试品溶液,进样 10 μL,记录峰面积,代入线性方程,计算样品含量。不同生长期不同药用部位铁棒锤中乌头碱、次乌头碱及中乌头碱的含量见表 2、图 1。

3 讨论

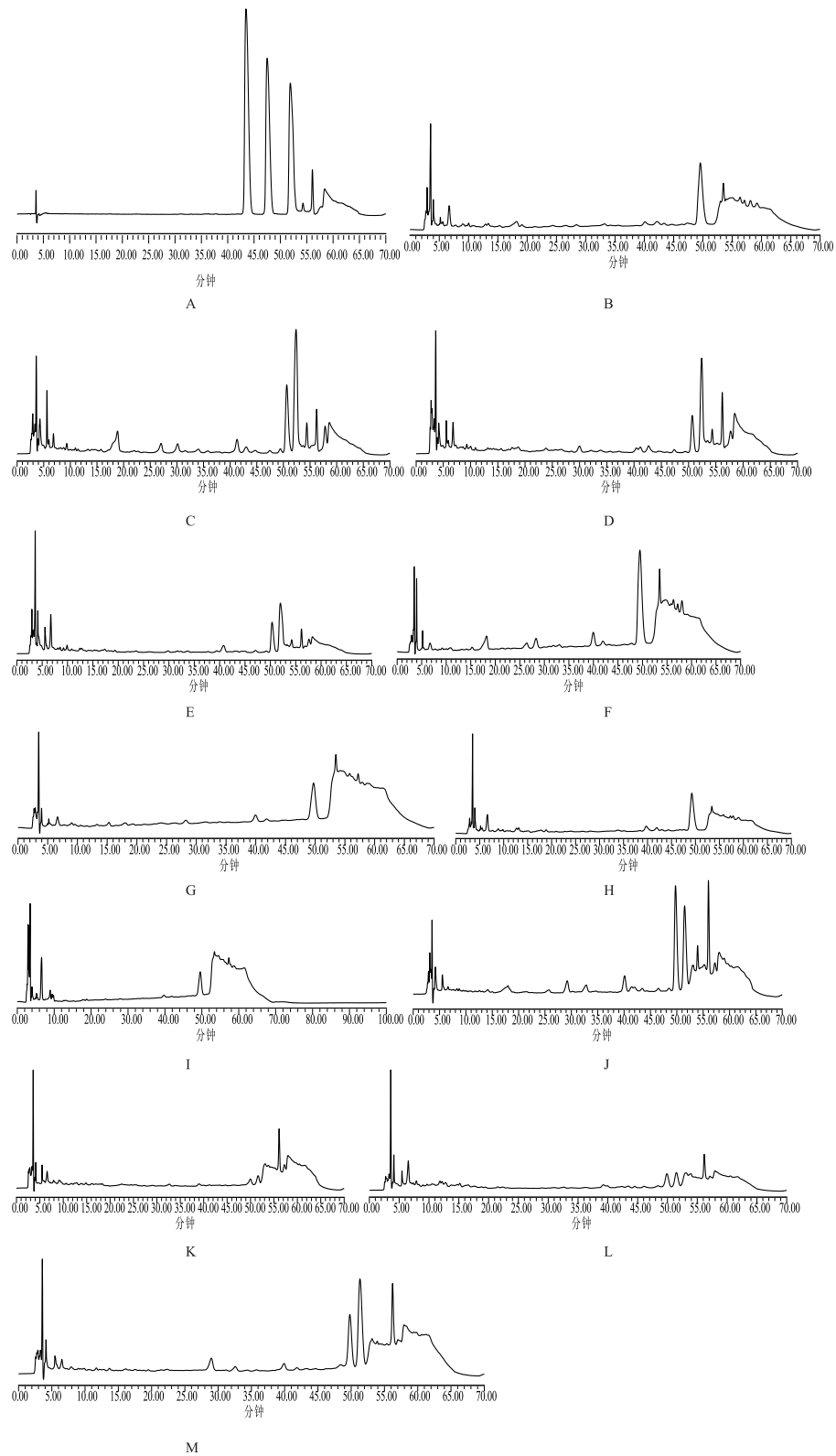
3.1 建立铁棒锤 3 种酯型生物碱测定方法

本文采用 2015 版药典中川乌的双酯型生物碱测定方法测定铁棒锤器官中乌头碱、次乌头碱及中乌头碱的含量,本法操作简单,测定结果准确,具有一定的重复性,可用于测定铁棒锤中 3 种双酯型生物碱的含量,并可为药材及相关制剂质量标准的修订和完善提供依据。

3.2 铁棒锤不同器官内酯型生物碱的动态变化

对块根来说,花前期 3 种双酯型生物碱的总量是 0.4644%、花期是 0.4729%、果期是 0.6055%,即花前期<花期<果期,总体表现为块根中的双酯型生物碱呈上升趋势,在果期达到最高点,民间常采集果期块根入药看来是合理的。对茎来说,花前期 3 种生物碱的总量是 1.6088%、花期是 0.2019%、果期是 0.1605%,即花前期>花期>果期,总体表现为下降的趋势,花前期茎中的含量是所有器官中含量最高的。对叶来说,花前期 3 种生物碱的总量是 0.4772%、花期是 0.5287%、果期是 0.109%,即花

期>花前期>果期,叶中 3 种酯型生物碱在花期达到 高峰,果期明显下降。



注:A 铁棒锤混合对照品;B 铁棒锤幼苗;C 铁棒锤花前期块根;D 铁棒锤花前期茎;E 铁棒锤花前期叶;F 铁棒锤花期块根;
G 铁棒锤花期茎;H 铁棒锤花期叶;I 铁棒锤花期花;J 铁棒锤果期块根;K 铁棒锤果期茎;L 铁棒锤果期叶;M 铁棒锤果期果实

图 1 不同生长期不同器官色谱图

3.3 铁棒锤不同生长期植物体内酯型生物碱的动态变化

在苗期 3 种双酯型生物碱的总量是 0.3949%、花前期是 2.5504%、花期是 1.2035%、果期是 0.875%，即苗期<花前期>花期>果期，呈现一个先上升再下降的趋势，花前期 3 种双酯型生物碱的总量最高，到花期和果期急剧下降，从总量上来说，花前期、花期、果期的含量远远高于苗期。

3.4 铁棒锤在不同生长期器官内 3 种酯型生物碱的动态变化

对乌头碱来说，苗期幼苗乌头碱的含量是 0.10%、块根中乌头碱的含量花前期是 0.28%、花期是 0.18%、果期是 0.12%，即花前期>花期>果期，呈现先升后降的趋势，花前期最高，果期含量降到最低，但仍然高于苗期；茎中乌头碱花前期是 1.53%、花期是 0.11%、果期是 0.04%，即花前期>花期>果期，呈现先升后降的趋势，花前期茎中乌头碱的含量最高；叶中乌头碱含量花前期是 0.32%、花期是 0.22%、果期是 0.05%，即花前期>花期>果期，叶中乌头碱的含量呈现先升后降的变化趋势，花前期叶中乌头碱含量最高。乌头碱在植物体内的含量呈现先升后降的变化趋势，花前期叶中乌头碱的含量最高。

对次乌头碱来说，苗期幼苗次乌头碱的含量是 0.29%，块根次乌头碱含量花前期是 0.14%、花期是 0.29%、果期是 0.13%，即花期>花前期>果期，呈现 S 型变化，苗期和花期含量最高，花前期和果期含量相当；茎中次乌头碱含量花前期是 0.06%、花期是 0.09%、果期是 0.12%，即果期>花期>花前期，茎中次乌头碱呈现 S 型变化，苗期次乌头碱含量远远高于其他；叶中次乌头碱含量花前期是 0.14%、花期是 0.3%、果期是 0.05%，即花期>花前期>果期，呈现 S 型变化的趋势，苗期和花期叶中次乌头碱的含量最高。次乌头碱在植物体内中的含量均呈现 S 变化趋势，苗期和花期的含量最高。

对中乌头碱来说，苗期幼苗含量是 0.0049%，块根中中乌头碱含量花前期是 0.0444%、花期是 0.0029%、果期是 0.0355%，即花前期>果期>花期，呈现 S 型变化，花前期块根中中乌头碱含量最高；茎中中乌头碱含量花前期是 0.0188%、花期是 0.0019%、果期是 0.0005%，即花前期>花期>果期，呈现先升后降的趋势，花前期茎中中乌头碱含量最高；叶中中乌头碱花前期是 0.0172%、花期是 0.0087%、果期是 0.009%，即花前期>花期>果期，

呈现先升后逐渐平稳的趋势，花前期叶中中乌头碱的含量最高。中乌头碱在植物体内的含量均呈现先升后降的变化趋势，花前期中乌头碱含量最高。

3.5 不同器官的药用价值评价

2015 版中国药典川乌含乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的总量在 0.050%~0.17%^[11]。从表 2 可以看出，3 种酯型生物碱的总量，苗期幼苗是 0.3949%，花前期块根是 0.4644%、茎是 1.6088%、叶是 0.4772%，茎>叶>块根>幼苗，可以看出在花前期和幼苗一样，各器官都具有药用价值；花期 3 种酯型生物碱的总量，块根是 0.4729%、茎是 0.2019%、叶是 0.5287%、花是 0.4404%，叶>块根>花>茎，可以看出花期各器官都具有药用价值；果期 3 种酯型生物碱的总量块根是 0.6055%、茎是 0.1605%、叶是 0.109%、果实是 0.2034%，块根>果实>茎>叶；与川乌相比，可以看出各器官都具有药用价值，花前期、花期不同器官中 3 种酯碱的总量均大于川乌的最高限量。果期块根、果实中 3 种酯碱的总量均大于川乌的最高限量，果期茎、叶中 3 种乌头酯碱的总量在川乌限量的上限。综上所述，铁棒锤不同生长期、不同器官都具有较高的药用价值，通过本研究，可以为资源开发及合理使用提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第 7 卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 138-142.
- [2] 谢宗万. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1015.
- [3] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 301-312.
- [4] 朱敏, 肖培根. 常用藏药榜嘎的研究[J]. 中药材, 1989, 12(10): 17-19.
- [5] 孙文基, 沙振方, 王艾兴, 等. 铁棒锤化学成分的研究[J]. 药学报, 1989, 24(1): 71-74.
- [6] 王慕邹, 李百龙, 高凤英. 乌头中主要生物碱的高效液相色谱测定[J]. 药学报, 1983, 18(9): 689-690.
- [7] 王毓杰, 曾陈娟, 姚喆, 等. 民族药铁棒锤不同药用部位中生物碱含量测定[J]. 中成药, 2010, 32(8): 216-220.
- [8] 王恩军, 韩多红, 陈垣, 等. 不同生长期铁棒锤根生物总碱含量的比较[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(9): 2261-2262.
- [9] 马学琴, 康小兰, 付雪艳. 不同来源铁棒锤中乌头碱的含量比较[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(11): 19-21.
- [10] 谷军, 王燕萍, 马潇. HPLC 法同时测定藏药铁棒锤中 3 种双酯生物碱的含量[J]. 中国药事, 2014, 28(6): 618-621.
- [11] 国家药典委员会. 中国药典 2015 年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 39-40.

(收稿日期: 2016-04-16)

(本文编辑: 韩虹娟)