

12.52%, 酸不溶性灰分为2.712%。其须根总灰分明显高于酸不溶性灰分,说明白术须根中含有较多无机盐晶体。

3 讨论

本实验以白术主、须根为研究对象,分别进行了挥发油成分分析, TLC 定性实验, 白术内酯 II 的 HPLC 定量测定, 浸出物量测定, 灰分测定。

挥发油成分分析结果表明, 白术主根和须根挥发油的主要成分中, 除 γ -榄香烯、石竹烯的量相近之外, 其他均差别很大, 甚至不含。可见, 若以挥发油为主要药效成分, 则须根不能替代主根使用。

HPLC 定量检测结果表明, 二者均含白术内酯

II, 须根中物质的量低于主根。须根浸出物的量低于主根, 但其灰分的量却远高于主根, 可能是由于须根与土壤接触面积大, 矿物质沉积更多所致。可见, 以白术内酯 II 等物质为主要药效成分时, 适当调整处方量, 白术须根可以部分替代主根使用, 在白术资源供不应求的今天, 对合理利用白术资源, 具有现实意义。

鉴于此, 笔者建议加强对药材白术在流通领域的监管, 严格区分主根和须根, 以防乱用误用。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海科学技术出版社, 1986.
- [3] 李恒华, 廖婷婷. 浅谈白术的研究、应用及开发重点[J]. 重庆中草药研究, 2007, 2: 55-61.

附子离体苗中生物碱的测定

赵祥升, 侯大斌*, 许源, 王惠, 舒晓燕

(西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

摘要:目的 检测附子离体培养愈伤组织和离体苗的生物碱量, 建立附子乌头类总生物碱和同时测定新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的分析方法。方法 用酸性染料比色法测定乌头类总生物碱的量; 反相高效液相色谱法测定新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的量, 色谱柱为 Zorbax extend-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.1% 乙二胺, 梯度洗脱, 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 240 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。结果 愈伤组织和离体苗中总生物碱的量分别为 3.972、2.904 mg/g; 新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的量分别为: 0.678、0.448、0.887 mg/g, 0.464、0.234、0.339 mg/g。3 种生物碱得到很好分离, 线性关系良好。结论 愈伤组织中生物碱的量高于离体苗, 该方法快速简便、灵敏准确、回收率高, 可以为附子质量控制提供科学依据。

关键词: 附子; 生物碱; 高效液相色谱法

附子是我国常用的中药和四川道地药材^[1], 为毛茛科乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根。附子的主要有效成分为乌头类生物碱: 乌头碱 (aconitine)、新乌头碱 (mesaconitine) 与次乌头碱 (hypoaconitine) 等, 具有抗炎、镇痛、强心、抗心律失常、降血糖等药理作用, 回阳救逆、补火助阳、散寒除湿的功效, 近年来现代药理学研究证明, 附子提取液还具有抗癌、抗衰老和增强免疫功能等作用^[1~3]。附子离体培养克服了人工栽培中耗种量大, 容易感染病毒, 种性退化等缺点。但是在人们过去的研究中侧重于组培条件的优化和驯化种植上, 对离体培养中生物碱量的测定, 特别是 3 种主要的双酯型生物碱量的测定国内外还较少报道。本实验测定附子

离体苗中生物碱的量, 为附子的离体培养, 评价和控制附子的质量提供科学依据。

1 材料与设备

1.1 材料: 试验材料为 2007 年 12 月于江油附子 GAP 基地收获的新鲜附子, 经西南科技大学侯大斌教授鉴定为 *Aconitum carmichaeli* Debx. 附子在室内催芽, 以叶柄为外植体, 以 MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L+PVP 3.0 g/L 为愈伤组织诱导培养基, MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+PVP 3.0 g/L 为分化培养基和 MS+6-BA 1.5 mg/L+PVP 3.0 g/L 丛芽诱导培养基[蔗糖 3%, 琼脂粉 0.65%, pH 5.8, 培养温度: (23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 光周期 12 h/d, 光照强度 2 000 lx]。生长 20 d 左右的愈伤

* 收稿日期: 2008-10-28

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重大专项课题 (2007BAD89B15); 四川省农作物攻关课题 (2006 YZGG12-22)

作者简介: 赵祥升 (1982—), 男, 河南南阳人, 2006 级研究生, 研究方向为药用植物。

Tel: 13699603105 E-mail: xiangsheng437@163.com

* 通讯作者 侯大斌 Tel: (0816) 6089121 E-mail: dbhou@126.com

组织和继代培养 2 代的离体苗,用纯水清洗 2 次,装入牛皮纸袋放入烘箱,在 105 °C 下烘 30 min,再于 60~70 °C 下烘干至恒重,粉碎过 60 目筛,4 °C 冰箱保存,备用。

1.2 仪器与设备:Varian1200 LC/MS 液相色谱-质谱联用仪(带紫外检测器,美国 Varian 公司);旋转蒸发仪(Buchi 公司);BP211D 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);KQ5200 型超声波清洗器(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);中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);DGX-9143B-1 型电热恒温鼓风干燥箱(上海福玛实验设备有限公司)。

1.3 药品与试剂:乙腈、乙二胺为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯;乌头碱(110797-200404),新乌头碱(110799-200404),次乌头碱(110798-200404)对照品均购买于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 乌头类总生物碱测定

2.1.1 对照品溶液的制备:精取乌头碱对照品约 2.5 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 pH 值(3.0 ± 0.1)的 HAC-NaAc 缓冲液至刻度,作为对照品溶液,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备:取愈伤组织和离体苗附子粉各 0.10 g,精密称定,置三角瓶中,精密加入 pH 值(3.0 ± 0.1)的 HAC-NaAc 缓冲液 20 mL,浸泡过夜,用干燥滤纸滤过,用 HAC-NaAc 缓冲液定容到 20 mL,为供试品溶液。

2.1.3 标准曲线的绘制:采用酸性染料比色法^[4,5],以乌头碱的质量浓度(X)为横坐标,以吸光度(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,求得回归方程: $Y = 22.733X - 0.142$, $r = 0.9997$,乌头碱在 2~20 $\mu\text{g/mL}$ 其吸光度与乌头碱质量浓度呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验:精密取愈伤组织的粉末 0.10 g,按供试品溶液的方法制备,测定乌头类总生物碱的量,计算得 $RSD = 1.97\%$ ($n = 5$),说明该分析方法精密度良好。

2.1.5 重现性试验:精密取愈伤组织 5 份,制备供试品溶液 10 mL,测定乌头类总生物碱量。计算得 $RSD = 1.79\%$,表明该检测方法的重现性较好。

2.1.6 稳定性试验:按供试品溶液制备方法制备,取 10 mL 供试品溶液,测定吸光度,每隔 1 h 测定 1 次,连续 6 h,考察其稳定性。测得吸光度在 6 h 内无明显变化,稳定性较好($RSD = 1.85\%$)。

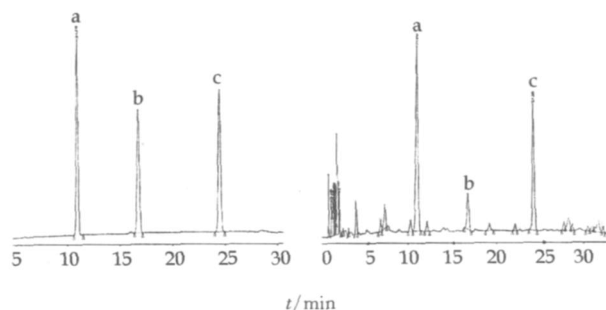
2.1.7 回收率试验:取愈伤组织的附子粉 0.1 g,每份准确加入对照品储备液使乌头碱的加入量为 0.25 mg,按照 2.1.2 的方法制备供试品溶液后测定。结果表明,乌头碱的平均加样回收率 100.6%, $RSD = 2.19\%$ ($n = 6$)。

2.1.8 样品测定:取供试品溶液 10 mL,按照方法测定吸光度,并从标准曲线上求得供试品溶液的质量浓度,再计算总生物碱的量。愈伤组织和离体苗中乌头总生物碱质量分数分别为 3.972、2.904 mg/g; RSD 分别为 1.03%、2.07% ($n = 5$)。

2.2 新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的测定

2.2.1 色谱条件:美国 Zorbax extend-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱;流动相为乙腈-0.1%乙二胺,梯度洗脱,时间程序为 0→15→30→35→60 min,乙腈体积分数相应为 35%→50%→75%→85%→35%;体积流量为 1 mL/min,柱温为 30 °C;检测波长为 240 nm。

取对照品溶液与供试品溶液,在上述色谱条件下进行,获得色谱图(图 1),表明新乌头碱、乌头碱、次乌头碱能达到基线分离,3 种生物碱的分离效果较好。



a-新乌头碱 b-乌头碱 c-次乌头碱
a-mesaconitine b-aconitine c-hypaconitine

图 1 对照品(A)和样品(B)的 HPLC 图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

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 供试品溶液的制备:取愈伤组织和离体苗附子粉 0.5 g,共 3 份,加浓氨试液 2 mL 润湿,加乙醚 2 mL,超声处理 50 min,滤过,并用乙醚洗涤 3 次,每次 10 mL,收集、合并所有滤液,浓缩,挥干溶剂。加入甲醇溶解残渣,定容到 10 mL 量瓶中,取适量用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液(避光,储存在冰箱中)。

2.2.4 线性关系的考察:准确吸取新乌头碱、乌头碱、次乌头碱储备液适量分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释到刻度,振荡均匀,作为对照品稀释液。在同一色谱条件下分别进样对照品稀释液 20.0 μL ,确定标准物质的保留时间。然后各取一定体积储备液配成不同质量浓度的混合标准溶液,分别平行测定 3 次(均进样 20.0 μL),以平均峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,回归方程分别为:新乌头碱 $Y=0.1512 X-0.0505$, $r=0.9998$;乌头碱 $Y=0.1248 X-0.0274$, $r=0.9997$;次乌头碱 $Y=0.1829 X-0.0872$, $r=0.9993$;3 种生物碱分别在 2.1~120、1.5~160、2.3~120 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验:精密吸取愈伤组织的供试品溶液 20 μL ,重复进样 5 次,进行测定。结果新乌头碱、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.04%、1.47%、1.01%。

2.2.6 稳定性试验:对愈伤组织的供试品溶液在 8 h 之内每隔 1 h 进行考察,结果新乌头碱、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.60%、1.72%、1.23% ($n=9$)。

2.2.7 重现性试验:精密称量愈伤组织的干燥粉末 0.5 g,共 5 份,按照 2.2.3 制备供试品溶液后,进行测定,结果新乌头碱、乌头碱、次乌头碱质量分数的 RSD 分别为 1.35%、2.07%、1.29%。

2.2.8 回收率试验:精密称量愈伤组织的干燥粉末 0.5 g,共 5 份,每份分别准确加入各标准储备液,使新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的加入量分别为 300、200、400 μg 。按 2.2.3 项制备供试品溶液后进行测定。结果新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的平均加样回收率分别为 99.1%、99.4%、99.2%;RSD 分别为 1.64%、1.97%、1.75%。

2.2.9 样品的测定:吸取 2.2.3 项的供试品溶液

20 μL 进样检测,用回归方程计算。结果见表 1。

表 1 样品测定结果

Table 1 Determination of samples ($n=3$)

样品	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱
愈伤组织	0.678	0.448	0.887
离体苗	0.464	0.234	0.339

3 讨论

愈伤组织中的乌头类生物碱和 3 种酯型生物碱的量均高于离体苗中。生物碱是附子的次生代谢产物,愈伤组织中的量高可能是外植体抵御外界条件的原因,这与侯大斌^[6]研究的乌头生物碱在附子生长发育中生物碱的量呈下降的趋势相似。

高效液相测 3 种酯型生物碱的供试溶液的制备时,分别以乙醚、二氯甲烷、95%乙醇为提取溶剂,回流法、超声法和《中国药典》的方法,分别以 3 种生物碱的量为标准作比较。结果表明,该实验的制备方法和《中国药典》方法的提取量相似,均高于其他制备方法,而且处理过程简单。该方法测定 3 种生物碱出峰时间早,分离效果好,而且回收率、精密度、重现性和稳定性都较好,是检测乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的优良方法;酸性染料比色法的灵敏度高,回收率高是测乌头类生物总碱的方法;两种方法可以为附子质量的评价提供科学依据。

参考文献:

- [1] 《中国药典》[S]. 一部. 2005.
- [2] 胡熙明,张文康,朱庆先,等. 中华本草(3) [M]. 上海:上海科技出版社,1999.
- [3] 胡兰凤,张英俊,刘京生,等. 附子多糖与阿霉素长循环热敏脂质体的抗肿瘤作用及其机制探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(4):458-462.
- [4] 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):662-663.
- [5] 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):878-880.
- [6] 侯大斌. 川乌 (*A. carmichaeli*) 的生物学与遗传多样性研究 [D]. 四川雅安:四川农业大学,2005.