

栽培与野生藏药铁棒锤中活性成分 乌头碱的 HPLC 分析

林丽, 高素芳, 晋玲*, 杨扶德, 魏学明, 侯嘉
(甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 对 3 个不同产地栽培与野生铁棒锤中乌头碱活性成分进行分析, 对其做出客观评价。方法: 采用高效液相色谱法 (HPLC), 使用 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2% 二乙胺水溶液 (35: 65); 柱温 30℃; 流速 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长 240 nm。结果: 乌头碱在 0.39~1.95 μg 与峰面积有良好的线性关系, 平均回收率为 98.35%, RSD 1.5% (n=6); 甘肃产铁棒锤药材中乌头碱的质量分数为 0.324 4%; 宁夏产铁棒锤药材中乌头碱为 0.214 4%; 青海产铁棒锤药材中乌头碱为 0.139 7%。结论: 3 个不同产地铁棒锤中乌头碱含量差异较大, 甘肃栽培铁棒锤中乌头碱含量最高, 宁夏野生铁棒锤次之, 青海野生铁棒锤含量较低。

[关键词] HPLC; 不同产地; 栽培、野生藏药铁棒锤; 乌头碱

铁棒锤为毛茛科乌头属植物铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch 和伏毛铁棒锤 *A. flavum* Hand - M. azz 的块根, 《中华人民共和国卫生部药品标准 (藏药)》^[1] 第 1 册以“铁棒锤”一名收录, 为甘、青、宁、藏等地应用较广的一种民间草药, 具有活血祛瘀, 祛风湿, 止痛, 治疗跌打损伤, 风湿性关节炎, 毒蛇咬伤等作用^[2]。近代药理学研究表明该药制成注射液有很强的镇痛、局麻、抑制呼吸、抗炎、解热、致心率失常等作用。根据文献记载, 铁棒锤的化学成分为: 雪乌碱 (penduline)、乌头碱 (aconitine)、3-乙酰乌头碱 (3-aconitine)、次乌头碱 (hypoconitine) 等^[3], 乌头碱类生物碱既是其毒性成分, 又是其药用成分。

甘肃野生铁棒锤主要分布在武威、甘南及平凉等地, 由于连年采挖, 环境植被破坏严重, 使野生资源枯竭, 资源无法可持续利用。目前尚未有人对占据药材市场主流品种甘肃栽培铁棒锤进行研究。本实验以不同产地野生与栽培铁棒锤为研究对象, 运用 HPLC 法对铁棒锤中活性成分乌头碱进行分析研究, 为客观评价不同产地栽培与野生铁棒锤质量提供参考, 同时

也为更好的有效利用甘肃铁棒锤资源提供依据。

1 材料

1.1 药材来源 甘肃栽培铁棒锤采集于甘肃省永登县; 宁夏野生铁棒锤购于固原医药公司; 青海野生铁棒锤购于青海三江宝药业有限公司, 经甘肃中医学院药学系晋玲副教授鉴定, 均为毛茛科乌头属植物铁棒锤 *A. pendulum* 的干燥块根, 标本保存在甘肃中医学院生药标本室。

1.2 试剂 乌头碱对照品 (纯度大于 98%, 批号 110720-200410) 购自中国生物制品检验所; 甲醇 (天津市凯信化学工业有限公司)、乙腈 (产品批准号 Q/12NK-4021-2003, 天津市光复精细化工研究所) 均为色谱纯; 其他均为分析纯。

1.3 仪器 高效液相 Agilent 1200 (安捷伦公司), 检测器 G131513 二极管阵列检测器 (美国); BS 224 S 型电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)

2 方法及结果

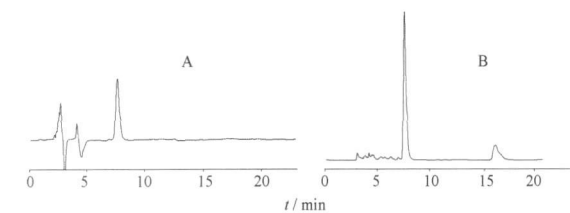
2.1 色谱条件^[4] 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱, (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2% 二乙胺水溶液 (35: 65); 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 240 nm; 柱温为 30℃; 进样量为 5 μL; 理论塔板数不低于 4 000, 乌头碱与相邻峰分离度均 > 1.5 分离良好。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备^[5] 精密称取乌头碱对照品 2.6 mg 置于 10 mL 量瓶中溶解, 定容, 精密吸取 5 mL, 移至 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 其乌头

[稿件编号] 20101115008

[基金项目] 甘肃教育厅科研项目 (0906B-07); 甘肃中医学院中青年科研基金项目 (09ZQ-17)

[通信作者] * 晋玲, 副教授, 研究方向为药用植物及中药资源与保护研究, Tel/Fax (0931) 8765495, E-mail jxyj@163.com



A. 乌头碱对照品;B. 样品。

图 1 高效液相色谱图

碱质量浓度为 $0.13\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 供试品溶液制备 取不同产地铁棒锤块根粉末,过 60 目筛,各取 5 g 精密称定,置 150 mL 具塞锥形瓶中,加 35 mL 乙醚-氯仿 (3:1) 混合溶剂及 3 mL 氨试液,摇匀,浸泡过夜,过滤,收集滤液,残渣加相应溶剂滤提取,浸泡 12 h 过滤,合并滤液,残渣再提取 1 次,洗涤 3 次,合并 6 次滤液,回收溶剂,低温水浴挥干 (低于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$),残渣加 5 mL 甲醇溶解,转移至 50 mL 量瓶中定容至刻度,摇匀,临用前用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取上述对照品溶液 3.6.9.12.15 μL ,按上述色谱条件测定。以进样量 ($X,\mu\text{g}$) 为横坐标,峰面积积分值 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=913.94X+22.165(r=0.9992)$ 。结果表明,乌头碱进样量在 $0.39\sim 1.95\text{ }\mu\text{g}$ 与峰面积积分值呈良好的线性。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2 项下对照品溶液 5 μL ,按 2.1 项下色谱条件连续进样 5 次,计算。结果乌头碱峰面积的比值 RSD 为 0.31%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一批 (甘肃) 样品约 5 g 精密称定,照 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别与制备后的 0.4.6.10.14 h 按 2.1 项下色谱条件各进样 5 μL 测定。结果,乌头碱平均峰面积为 1600.38 RSD 2.0%,表明供试品溶液 14 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验 取同一批 (甘肃) 样品约 5 g 共 6 份,精密称定,照 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,测定。结果 6 份样品中乌头碱平均为 0.339%,RSD 2.9%,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的同一批样品 (甘肃) 共 6 份,精密称定,分别加入乌头碱对照品,照 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件

进样分析,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验 ($n=6$)

样品量 /g	乌头碱量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.501	1.624	1.300	2.894	97.69	98.35	1.5
0.500	1.623	1.300	2.920	99.76		
0.501	1.624	1.300	2.931	100.54		
0.501	1.625	1.300	2.896	97.77		
0.500	1.622	1.300	2.891	97.77		
0.500	1.623	1.300	2.880	96.69		

2.9 样品含量测定 取每个不同产地的同一批次药材各 3 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别进样测定。从实验结果来看,乌头碱含量由高到低依次为:甘肃栽培 0.324 4%,宁夏野生 0.214 4%,青海野生 0.139 7%,RSD 小于 3%。

3 结论与讨论

由于生长地域的迁移,驯化成栽培品后,生长条件的改善、疏松的土质和肥料等多方面因素的影响,有利于铁棒锤根向地下生长和养分的吸收利用,使得其化学成分发生变化,导致甘肃栽培铁棒锤乌头碱含量相对较高。甘肃省永登县地处兰州西北部,野生铁棒锤资源丰富,又有铁棒锤野生家养驯化的栽培历史,药材性状好,活性成分乌头碱含量高,质优价廉,为今后资源的开发与利用奠定了很好的基础。

产地不同造成代表药材质量的活性成分乌头碱的含量有所差异,影响了药材质量。据笔者观察,野生种主要生长在海拔 2400 m 以上的高山草甸、砾石或荆棘丛中,为典型的旱生环境气候,其生长环境恶劣,土壤条件贫瘠,这可能是导致乌头碱含量相对较低的主要原因。铁棒锤所含生物碱类成分复杂,应从各项指标综合研究,有关有效成分与疗效关系有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 胡君茹,姜华.藏药铁棒锤的化学成分及药理作用研究进展[J].甘肃中医,2006,19(11):18.

[2] 陕西省卫生厅.陕西中草药[M].北京:科学出版社,1971:505

[3] 张帆,王兴明,彭树林,等.伏毛铁棒锤根部二萜生物碱的研究[J].中国药杂志,2006,41(24):1852

[4] 付雪艳,董琳,张义伟,等. HPLC 法测定铁棒锤中乌头碱的含量[J].科技评价,2007,8:456

[5] 丘振文,罗丹冬,王沛坚. HPLC 法测定舒痹宁颗粒中次乌头碱、新乌头碱的含量[J].中药新药与临床药理,2008,19(4):304.

[责任编辑 吕冬梅]