

附子水溶性生物碱提取纯化工艺研究

罗春梅^{1,2}, 黄志芳², 汤依娜², 刘云华², 刘玉红², 陈燕², 夏燕莉², 李东晓², 易进海^{1,2*}

1. 西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000

2. 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 研究附子水溶性生物碱的提取纯化工艺。方法 采用 UPLC-MS/MS 技术, 以 14 种生物碱(多根乌头碱、宋果灵、附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、新乌头原碱、乌头原碱、次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱)的总量为考察指标, 采用单因素实验和正交试验方法筛选最佳提取工艺; 以 8 种水溶性生物碱(乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱、附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、宋果灵、多根乌头碱)的量为考察指标, 对 5 种大孔树脂吸附和解吸性能进行考察, 优选最佳纯化工艺。结果 最佳提取纯化工艺为蒸附片加 10 倍量 pH 值 3.5 的酸水, 煎煮 3 次(维持 pH 值约 3.5), 每次 2 h, 合并水煎液, 用 20% NaOH 溶液调 pH 值 10.0, 加热回流水解 2 h 后, 放冷, 调 pH 值 11.0, 上大孔树脂 HPD 300, 上样量为生药 2.5 g/mL 树脂, 6 BV 水洗除杂, 4 BV 80% 乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液, 减压浓缩干燥, 即得附子水溶性生物碱提取物。该提取物收率为 1.69%, 其中新乌头原碱、乌头原碱、次乌头原碱、附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、多根乌头碱、宋果灵的总量高达约 15%。结论 优选得到的提取纯化工艺稳定可行, 为附子水溶性生物碱的研究应用提供参考。

关键词: 附子; 水溶性生物碱; 大孔树脂; UPLC-MS/MS; 新乌头原碱; 多根乌头碱; 乌头原碱; 宋果灵; 附子灵; 次乌头原碱; 尼奥灵; 塔拉萨敏; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 氢溴酸高乌甲素

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)12-2415-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.009

Study on process of extraction and purification of water-soluble alkaloids from *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*

LUO Chun-mei^{1,2}, HUANG Zhi-fang², TANG Yi-na², LIU Yun-hua², LIU Yu-hong², CHEN Yan², XIA Yan-li², Li Dong-xiao², YI Jin-hai^{1,2}

1. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

2. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** To research the process of extraction and purification of water-soluble alkaloids of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (ALRP). **Methods** Orthogonal design $L_9(3^4)$ and single factor experiments were employed to optimize the extraction conditions using UPLC-MS/MS. The total extraction yield of 14 alkaloids (karacoline, songorine, fuziline, neoline, talatisamine, mesaconine, aconine, hyaconine, benzoylmesaconine, benzoylaconine, benzoylhyaconine, mesaconitine, aconitine, and hyaconitine) was used as an index. The absorption-desorption characteristics of five macroporous resins were evaluated to optimize purification conditions using contents of eight water-soluble alkaloids (aconine, mesaconine, hyaconine, fuziline, neoline, talatisamine, songorine, and karacoline) as indexes. **Results** The optimized extraction and purification conditions were as follows: steamed tablets were decocted thrice with 10-fold pH 3.5 acidic water for 2 h each time (maintaining pH 3.5). The alkalinity of water decoction was adjusted to pH 10.0 with 20% NaOH and then heated for 2 h. The supernatant was adjusted to pH 11.0 by 20% NaOH and then was subjected to macroporous resin HPD300 whose relative adsorption amount was 2.5 g dried medicinal herb/mL resin, and then the resin was eluted with 6 BV of water and 4 BV of 80% ethanol respectively. The 80% ethanol fraction was evaporated under vacuum to give the water-soluble alkaloids extract. The extract yield was 1.69%. The total contents of mesaconine, aconine, hyaconine, fuziline, neoline, talatisamine, karacoline and songorine were above 15%. **Conclusion** The optimized extraction and purification process is stable and

收稿日期: 2017-01-13

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-ZY-45); 四川省基本科研业务专项(A-2017N-26)

作者简介: 罗春梅(1991—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药化学成分与质量标准。Tel: (028)85210843 E-mail: 451406785@qq.com

*通信作者 易进海(1963—), 研究员, 研究方向为中药化学成分与质量评价。Tel: (028)85210843 E-mail: yijinhai63@163.com

feasible, and this present study provides the reference for the research and application of water-soluble alkaloids in ALRP.

Key words: *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; water-soluble alkaloids; macroporous resin; UPLC-MS/MS; mesaconine; karacoline; aconine; songorine; fuziline; hyaconine; neoline; talatisamine; benzoylmesaconine; benzoylaconine; benzoylhyaconine; aconitine; mesaconitine; hyaconitine; lannaconitine

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 子根的加工品, 性味辛、甘、大热, 有毒, 具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等功效^[1]。附子主要的活性成分为生物碱^[2], 具有强心、抗炎、镇痛等药理作用^[3-5], 其中主要毒性成分是双酯型生物碱(乌头碱、新乌头碱、次乌头碱)。附子在煎煮或炮制过程中, 双酯型生物碱水解转化为单酯型生物碱(苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱)和原碱(乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱), 毒性显著降低^[6-8]。附子炮制品主要有传统工艺的胆制附片——黑顺片、白附片、淡附片等^[9], 以及现代工艺的无胆附片——蒸附片和炒附片。研究表明, 胆制附片经过水浸泡、煮、漂洗等处理, 总生物碱损失达 80% 以上, 而无胆附片直接蒸制或炒制避免了生物碱有效成分的流失, 总生物碱量与生附子相当, 其中蒸附片中原碱量显著高于炒附片^[10-12]。

文献曾报道附子强心有效成分为 *dl*-去甲乌药碱^[13]、氯化棍掌碱^[14]、去甲猪毛菜碱^[15]、尿嘧啶^[16]和附子苷^[17], 但上述成分量甚微。近年来, 进一步研究表明附子水溶性生物碱为强心活性成分^[18-19], 其中北乌宁^[20]、新乌头原碱^[20]、多根乌头碱^[20]、乌头原碱^[20]、异塔拉定^[20]、次乌宁^[20]和 3-去氧乌头原碱^[20]、附子灵^[21]、尼奥灵^[21]、塔拉萨敏^[22]等具有强心作用。此外, 附子水溶性生物碱还具有抗心律失常和降压作用^[23]。基于蒸附片中总生物碱和原碱量较高, 故本实验以蒸附片为原料, 提取总生物碱, 再水解使酯型生物碱转化为原碱, 经大孔树脂分离纯化得到附子水溶性生物碱提取物, 为后续深入研究应用水溶性生物碱的强心和抗心律失常作用提供物质基础。

1 材料与仪器

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪, Agilent 6460 型三重四极杆质谱仪, MassHunter Qualitative Analysis B.03.00 定性、定量分析软件, 美国 Agilent 公司; ST16R 型台式冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; MS205DU 型分析天平, ME204/02 型分析天平, 瑞士梅特勒-托利多(上海)有限公司; Milli-Q Integral 3 型超纯水机, 美国 Millipore 公司;

Cyberscan pH/Ion 510 型台式酸度计, 美国 Eutech 仪器公司。

蒸附片购于四川江油中坝附子科技发展有限公司, 由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根加工品。大孔吸附树脂 HPD100、HPD300、HPD600、AB-8、D101, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 内标物氢溴酸高乌甲素(批号 100289-200902)及对照品苯甲酰新乌头原碱(批号 111795-200901)、苯甲酰次乌头原碱(批号 111796-201002)、苯甲酰乌头原碱(批号 111794-200901)、乌头碱(批号 110720-200410)、新乌头碱(批号 110799-200505)、次乌头碱(批号 110798-201106), 质量分数均 ≥ 98%, 中国食品药品检定研究院; 对照品乌头原碱(批号 MUST-16060306)、新乌头原碱(批号 MUST-16030604)、次乌头原碱(批号 MUST-16033015)、附子灵(批号 MUST-16032804)、尼奥灵(批号 MUST-16052503)、塔拉萨敏(批号 MUST-16031801)、多根乌头碱(批号 MUST-16031213)、宋果灵(批号 MUST-16032515), 质量分数均 ≥ 98%, 成都曼思特生物科技有限公司; 乙腈、甲醇, 色谱纯, 美国 Fisher 公司; 甲酸, 色谱纯, 成都市科龙化工试剂厂; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 生物碱定量测定方法^[10]

2.1.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 柱温 35 °C; 流动相为 2 mmol/L 醋酸铵溶液(含 0.1% 甲酸, A)-乙腈(含 0.1% 甲酸, B), 梯度洗脱: 0~1.5 min, 15%~20% B; 1.5~5.0 min, 20%~70% B; 5.0~5.1 min, 70%~100% B; 5.1~8.0 min, 100% B; 体积流量 0.4 mL/min; 进样体积 1 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式检测, 毛细管电压 4 kV, 干燥气温度 350 °C, 干燥气体积流量 11 L/min, 雾化气压力 310.275 kPa (45 psi), 扫描方式为多反应监测模式(MRM)。14 种生物碱的化学结构见图 1、表 1。14 种生物碱及内标(IS)监测离子对及质谱分析参数见表 2。上述条件下所测定各成分定量离子 MRM 图见图 2,

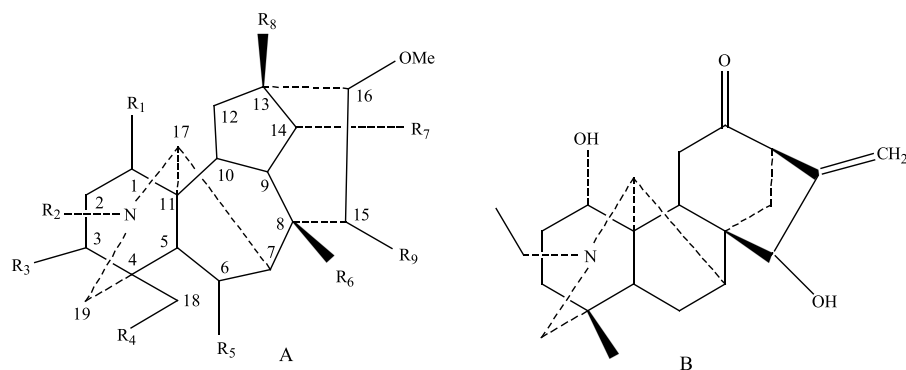


图 1 C_{19} 型二萜类生物碱骨架 (A) 和宋果灵 (B) 结构

Fig 1 C_{19} -diterpenoid alkaloids' skeleton (A) and structure of songorine (B)

表 1 13 种 C_{19} 型二萜生物碱的结构

Table 1 Structures of 13 C_{19} -diterpenoid alkaloids

编号	名称	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
1	乌头碱	OCH ₃	C ₂ H ₅	OH	OCH ₃	OCH ₃	OAc	OBz	OH	OH
2	新乌头碱	OCH ₃	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OAc	OBz	OH	OH
3	次乌头碱	OCH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OAc	OBz	OH	OH
4	苯甲酰乌头原碱	OCH ₃	C ₂ H ₅	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OBz	OH	OH
5	苯甲酰新乌头原碱	OCH ₃	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OBz	OH	OH
6	苯甲酰次乌头原碱	OCH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OBz	OH	OH
7	乌头原碱	OCH ₃	C ₂ H ₅	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH	OH
8	新乌头原碱	OCH ₃	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH	OH
9	次乌头原碱	OCH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH	OH
10	附子灵	OH	C ₂ H ₅	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H	OH
11	尼奥灵	OH	C ₂ H ₅	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H	H
12	塔拉萨敏	OCH ₃	C ₂ H ₅	H	OCH ₃	H	OH	OH	H	H
13	多根乌头碱	OH	C ₂ H ₅	H	H	H	OH	OH	H	H

表 2 14 种生物碱及内标检测离子对及质谱分析参数

Table 2 Detected ion pairs and parameters of mass spectrum for 14 alkaloids and IS

成分	保留时间/min	相对分子质量	监测离子对 (m/z)	碎裂电压/V	碰撞电压/eV
乌头碱	3.75	645.74	646.2/586.1	210	41
新乌头碱	3.46	631.71	632.3/572.3	150	35
次乌头碱	3.77	615.71	616.3/556.0	170	34
苯甲酰乌头原碱	2.96	603.70	604.3/104.7	120	45
苯甲酰新乌头原碱	2.73	589.67	590.3/540.0	120	46
氢溴酸高乌甲素 (IS)	2.82	683.64	585.2/535.1	135	40
苯甲酰次乌头原碱	3.10	573.29	574.3/542.0	110	43
乌头原碱	0.61	499.60	500.3/450.2	200	32
新乌头原碱	0.49	485.57	486.2/436.2	90	40
次乌头原碱	0.77	469.57	470.2/438.0	140	39
附子灵	0.79	453.58	454.2/436.3	135	34
尼奥灵	0.92	437.58	438.3/420.3	170	30
塔拉萨敏	1.20	421.58	422.3/390.1	170	26
多根乌头碱	0.59	377.52	378.2/360.2	150	34
宋果灵	0.66	357.48	358.3/340.2	135	30



图2 混合对照品 (A) 和水煎液样品 (B) 中 14 种生物碱及内标定量离子 MRM 色谱图

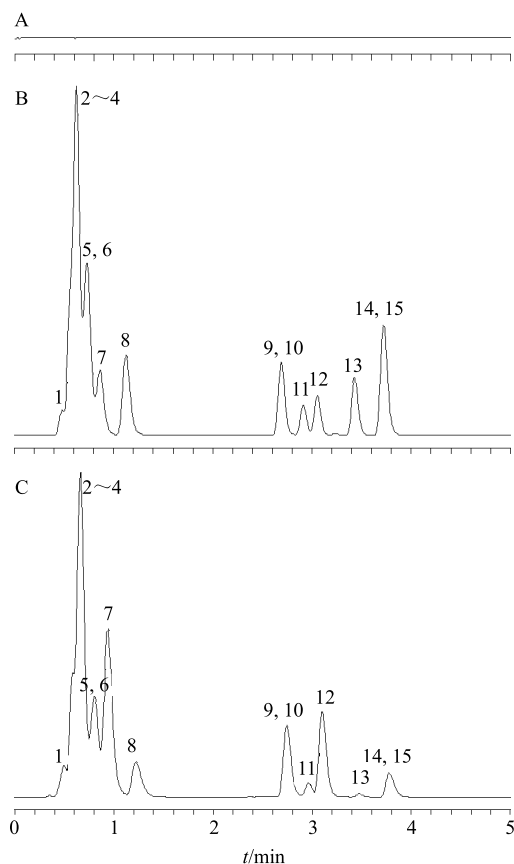
Fig. 2 MRM chromatograms of mix-standards (A) and decocting sample (B) for 14 alkaloids and IS

空白溶剂、混合对照品、样品的总离子流色谱图 (TIC) 见图 3。

2.1.3 混合对照品储备液及内标溶液的制备 取对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶液分别制成含乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、多根乌头碱、宋果灵各 0.5 mg/mL, 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱各 0.25 mg/mL 的对照品储备液。再取上述对照品储备液各 1 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶液定容, 即得混合对照品储备液。精密称取氢溴酸高乌甲素对照品适量, 用甲醇制成 5 μ g/mL 的内标溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备 取蒸附片水煎液 3 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 精密量取上清液 0.4 mL, 加入内标溶液 1 mL, 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.1.5 线性关系考察 取上述混合对照品储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 混匀, 得混合对照品溶液, 分别精密量取混合对照品溶液适量置 10 mL 量瓶中, 各加入内标溶液 1 mL, 甲醇定容至刻度, 制得一系列不同质量浓度的混合对照



1-新乌头原碱 2-多根乌头碱 3-乌头原碱 4-宋果灵 5-次乌头原碱 6-附子灵 7-尼奥灵 8-塔拉萨敏 9-氢溴酸高乌甲素 10-苯甲酰新乌头原碱 11-苯甲酰乌头原碱 12-苯甲酰次乌头原碱 13-新乌头碱 14-乌头碱 15-次乌头碱

1-mesaconine 2-karacoline 3-aconine 4-songorine 5-hypaconine 6-fuziline 7-neoline 8-talatisamine 9-lannaconitine 10-benzoylmeaconine 11-benzoylaconine 12-benzoylhypaconine 13-mesaconitine 14-aconitine 15-hypaconitine

图3 空白 (A)、混合对照品 (B)、蒸附片水煎液 (C) TIC 图
Fig. 3 TIC of blank sample (A), mixed standard (B), and steated tablets (C)

品溶液。分别按“2.1.1”项下条件进样测定, 以对照品进样质量浓度为横坐标 (X), 对照品峰面积与内标峰面积之比为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。以信噪比 (S/N) 为 3:1 和 S/N 为 10:1 确定检测限和定量限, 结果见表 3。

2.2 附子总生物碱提取研究

2.2.1 提取溶剂的考察 文献报道^[24-25]和预试验表明, 酸水有利于附子生物碱的提取, 故本实验采用酸水提取附子总生物碱, 并考察了不同 pH 值的酸水对提取效果的影响。称取 100 g 蒸附片, 分别用 10 倍量 pH 2.0、3.5、5.5 的酸水煎煮 2 次, 每次 2 h, 煎煮过程中维持相应的 pH 值。合并 2 次水煎液,

按照“2.1”项下方法测定水煎液中 14 种代表性生物碱的量,结果见表 4。pH 值对附子生物碱的提取效果有显著影响, pH 值 2、3.5 酸水提取的生物碱总量显著高于 pH 值 5.5, 但 pH 值 3.5、2.0 提取效

果相当, 考虑提取器材对酸水的耐受程度及环境污染等因素, 故选用 pH 值 3.5 的酸水作为附子总生物碱的提取溶剂。

2.2.2 正交试验 以 14 种代表性生物碱的总量为

表 3 14 种生物碱的检出限、定量限及线性方程

Table 3 Linear equations, LODs, and LOQs of 14 alkaloids

成分	线性方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r ²	检测限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
乌头碱	$Y=0.009\ 5\ X-0.030\ 4$	0.550~1 110	0.999 7	0.06	0.21
新乌头碱	$Y=0.011\ 9\ X-0.046\ 7$	0.556~1 112	0.999 4	0.06	0.18
次乌头碱	$Y=0.014\ 6\ X-0.046\ 7$	0.519~1 138	0.999 5	0.04	0.13
苯甲酰乌头原碱	$Y=0.002\ 8\ X-0.009\ 9$	1.020~2 040	0.999 7	0.05	0.15
苯甲酰新乌头原碱	$Y=0.001\ 5\ X-0.003\ 7$	1.190~2 380	0.999 7	0.10	0.35
苯甲酰次乌头原碱	$Y=0.003\ 6\ X-0.016\ 1$	1.026~2 052	0.999 4	0.02	0.06
乌头原碱	$Y=0.003\ 0\ X-0.007\ 8$	1.030~2 060	0.999 9	0.02	0.07
新乌头原碱	$Y=0.002\ 1\ X+0.003\ 8$	1.012~2 024	0.999 6	0.17	0.56
次乌头原碱	$Y=0.008\ 8\ X-0.019\ 3$	1.080~2 160	0.999 8	0.05	0.18
附子灵	$Y=0.006\ 4\ X+0.035\ 7$	1.074~2 148	0.999 6	0.16	0.56
尼奥灵	$Y=0.006\ 1\ X+0.048\ 4$	1.017~2 034	0.998 3	0.10	0.33
塔拉萨敏	$Y=0.010\ 2\ X-0.040\ 5$	1.014~2 028	0.999 7	0.15	0.50
多根乌头碱	$Y=0.010\ 7\ X+0.052\ 3$	1.006~2 012	0.999 5	0.12	0.40
宋果灵	$Y=0.027\ 7\ X+0.314\ 8$	1.058~2 116	0.998 7	0.05	0.15

表 4 不同 pH 值酸水对生物碱提取的影响

Table 4 Extraction results of different pH of acidic water

提取溶剂		指标成分/(μg·g ⁻¹)						
pH 值	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	乌头原碱	新乌头原碱
2.0	2.57	5.02	26.09	127.31	668.54	593.63	5.93	50.25
3.5	1.41	2.31	22.74	103.56	630.46	581.30	8.92	66.50
5.5	0.00	2.03	5.72	76.91	490.34	489.73	9.81	85.01
提取溶剂		指标成分/(μg·g ⁻¹)						
pH 值	次乌头原碱	附子灵	尼奥灵	塔拉萨敏	多根乌头碱	宋果灵	14 种生物碱总量	
2.0	10.31	342.78	684.03	90.16	248.24	235.53	3 090.39	
3.5	20.39	320.01	677.90	85.49	255.76	223.37	3 000.12	
5.5	23.41	265.10	555.68	74.07	194.01	180.52	2 452.34	

评价指标, 选取酸水用量 (A)、煎煮次数 (B) 和煎煮时间 (C) 3 个考察因素, 按 L₉(3)⁴ 正交试验表设计方案进行试验。称取 9 份 100 g 蒸附片, 加 pH 值 3.5 酸水煎煮, 煎煮过程中维持提取液 pH 值, 照“2.1”项下方法测定各份水煎液中 14 种生物碱的量, 实验设计及结果见表 5, 方差分析结果见表 6。

由直观分析结果可知, 各因素影响大小顺序为 B>C>A, 即影响附子生物碱总量的主要因素是煎煮次数, 其次是煎煮时间和酸水的用量。由方差分

析结果可知, B、C 因素具有极显著性差异 ($P<0.01$), A 因素无显著性差异。因此, 最佳提取方案为 A₃B₃C₃。

2.2.3 验证实验 由表 5 可知, A 因素和 C 因素的 2 水平、3 水平差异不大, 故可选择 2 水平, 即选择次佳提取方案 A₂B₃C₂。

以 14 种生物碱的总量为考察指标, 称取蒸附片 100 g, 对最佳方案 A₃B₃C₃ 与次佳方案 A₂B₃C₂ 进行实验, 重复 3 次, 结果见表 7。由表 7 可见, 拟定

表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 5 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A/倍	B/次	C/h	D(空白)	生物碱总量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	8 (1)	1 (1)	1 (1)	(1)	1 620.18
2	8 (1)	2 (2)	2 (2)	(2)	2 716.28
3	8 (1)	3 (3)	3 (3)	(3)	3 488.08
4	10 (2)	1 (1)	2 (2)	(3)	2 024.69
5	10 (2)	2 (2)	3 (3)	(1)	2 999.23
6	10 (2)	3 (3)	1 (1)	(2)	2 831.72
7	12 (3)	1 (1)	3 (3)	(2)	2 351.33
8	12 (3)	2 (2)	1 (1)	(3)	2 513.59
9	12 (3)	3 (3)	2 (2)	(1)	3 376.69
K_1	7 824.54	5 996.20	6 965.49	7 996.10	
K_2	7 855.64	8 229.10	8 117.66	7 899.33	
K_3	8 241.61	9 696.49	8 838.64	8 026.36	
R	417.07	3 700.29	1 873.15	127.03	

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

变异来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	35 987.492 9	2	12.260 7	
B	2 314 580.211 8	2	788.562 0	$P<0.01$
C	595 110.976 9	2	202.750 3	$P<0.01$
D(误差)	2935.191 3	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

方案 $A_2B_3C_2$ 生物碱总量与最佳方案差异不大,略有降低,但可以节约酸水用量、缩短提取时间,降低生产成本等,因此提取方案确定为 $A_2B_3C_2$,即 10 倍量的酸水煎煮 3 次,每次 2 h。

2.3 酯型生物碱的水解研究

文献报道^[26]附子酯型生物碱在碱性条件下水解失去 C-8 位苯甲酰基及 C-14 位乙酰基转化为酯型原碱(乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱),故本

表 7 提取工艺验证试验结果

Table 7 Results of verification experiment of extraction process

方案	批号	生物碱总量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	平均值/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
$A_2B_3C_2$	1	3 305.97	3 310.44
	2	3 354.99	
	3	3 270.35	
$A_3B_3C_3$	1	3 493.29	3 507.33
	2	3 552.10	
	3	3 476.59	

实验以 3 种酯型原碱新乌头原碱、次乌头原碱、乌头原碱和 5 种非酯型原碱附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、宋果灵、多根乌头碱的总量为评价指标,考察水解 pH 值、水解时间对 8 种原碱量的影响。

2.3.1 pH 值对生物碱水解的影响 平行取 4 份水煎液 250 mL,用 20% NaOH 溶液调 pH 值分别为 8.0、10.0、12.0、13.0,加热回流 2 h,冷却,照“2.1”项下方法检测 8 种原碱及 6 种酯型生物碱的总量,结果见表 8。表明水解 pH 值由 8.0 升至 10.0,6 种酯型生物碱总量显著降低,分别为水解前的 10.02% 和 0.68%;3 种酯型原碱乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱的量显著增加,提示水解 pH 值为 10.0 时,酯型生物碱已经完全水解,当 pH 值由 10.0 升至 13.0,3 种酯型原碱和总原碱的量差异不大。此外,不同 pH 值水解(8.0~13.0)对附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、多根乌头碱、宋果灵 5 种非酯型原碱量无明显影响,表明上述 5 种非酯型原碱不能由酯型生物碱转化得到。综上分析,选择最佳水解 pH 值为 10.0。

2.3.2 水解时间对生物碱水解的影响 取水煎液 250 mL,用 20% NaOH 溶液调 pH 值 10.0,分别加热回流 1、2、4 h,照“2.1”项下方法检测 8 种原碱及 6 种酯型生物碱的量,结果见表 9。可知 3 种

表 8 不同 pH 值对生物碱水解的影响

Table 8 Results of hydrolysis of alkaloids at different pH values

不同 pH 值条件	指标成分/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)									
	新乌头原碱	乌头原碱	次乌头原碱	附子灵	尼奥灵	塔拉萨敏	多根乌头碱	宋果灵	原碱总量	酯型生物碱总量
水煎液	75.89	16.26	24.71	342.04	675.82	115.80	260.32	266.12	1 776.96	1 630.38
8.0	484.29	92.58	228.82	343.85	670.14	114.83	263.18	260.49	2 458.18	163.31
10.0	607.46	115.34	276.95	350.61	693.12	116.00	270.48	260.13	2 690.09	11.18
12.0	615.73	117.03	263.64	357.92	708.25	121.16	272.50	271.50	2 727.73	3.38
13.0	625.92	127.20	266.96	359.37	709.14	121.43	275.71	266.69	2 752.42	3.89

表 9 不同加热时间对生物碱水解的影响

Table 9 Results of hydrolysis of alkaloids at different heating time

加热时 间/h	指标成分/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	新乌头原碱	乌头原碱
0	1.55	1.97	11.43	69.06	496.85	217.82	61.51	258.50
1	1.42	1.22	0.88	0.00	1.71	0.00	109.67	590.26
2	0.00	0.00	0.79	0.00	1.31	0.00	106.25	607.14
4	0.00	0.00	0.41	0.00	0.61	0.00	115.34	604.13

加热时 间/h	指标成分/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
	次乌头原碱	附子灵	尼奥灵	塔拉萨敏	多根乌头碱	宋果灵	酯型生物碱总量	原碱总量
0	139.41	335.32	679.20	116.00	261.12	256.13	798.68	2 107.19
1	267.04	337.63	672.35	128.35	269.36	250.46	5.23	2 625.12
2	276.26	350.91	693.08	133.94	284.93	255.66	2.10	2 708.17
4	268.95	343.61	687.23	137.00	286.92	260.13	1.02	2 703.31

酯型原碱变化趋势为加热 1 h 之内新乌头原碱、乌头原碱、次乌头原碱量显著增加, 2 h 之后其量趋于稳定; 水解时间对非酯型原碱附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、多根乌头碱、宋果灵的量无明显影响, 再次表明 5 种非酯型原碱不能由酯型生物碱水解生成; 总原碱和酯型生物碱变化趋势为酯型生物碱总量加热 1 h 之内急剧下降, 其量几乎趋近零, 表明酯型生物碱加热 1 h 基本水解完全, 而总原碱在加热 1 h 之内其量迅速增加, 2 h 后基本稳定。因此, 选择水解时间为 2 h。

2.4 水溶性生物碱的纯化

2.4.1 大孔树脂型号的考察 根据附子生物碱的结构特点和不同大孔吸附树脂的吸附特性, 取预处理好的 HPD600、HPD300、HPD100、D101 及 AB-8 型大孔吸附树脂各 20 mL 湿法装柱, 取“2.3”项下水解液作为上样液, 以 10 BV/h 上柱进行动态吸附, 收集流出液, 第 1 份收集 280 mL (1 号), 此后每份收集 70 mL, 分别测定上样液、各流出液中 8 种原碱的量。实验表明新乌头原碱最先泄漏, 故规定流出液中新乌头原碱量/上柱液中新乌头原碱量 $\geq 20\%$ ($C/C_0 \geq 20\%$) 示为泄漏点, 以此判断标准确定树脂的吸附容量, 结果见图 4。可知 HPD 300 树脂的吸附容量最大, 故选 HPD 300 做下一步考察。

2.4.2 上样液 pH 值的考察 取预处理好的 HPD 300 大孔树脂 3 份, 每份各 20 mL, 湿法装柱。取蒸附片水解液 3 份, 每份 1 800 mL, 分别用 20% NaOH 调 pH 值 9.0、10.0、11.0, 以 10 BV/h 上样, 收集流出液, 分别测定上样液、流出液中 8 种原碱

的量, 计算不同 pH 值上样时新乌头原碱的泄漏量和吸附量, 结果见表 10。由表 10 可知, 随着上样液 pH 值的升高, HPD300 对新乌头原碱的吸附容量呈上升趋势, 当上样液 pH 值为 11.0 时, 20 mL HPD 300 对新乌头原碱的吸附容量高达 31.92 mg, 故上样液的最佳 pH 值为 11.0。

2.4.3 上样液量的考察 取预处理好的 HPD300 大孔树脂 20 mL, 湿法装柱。取适量蒸附片水解液,

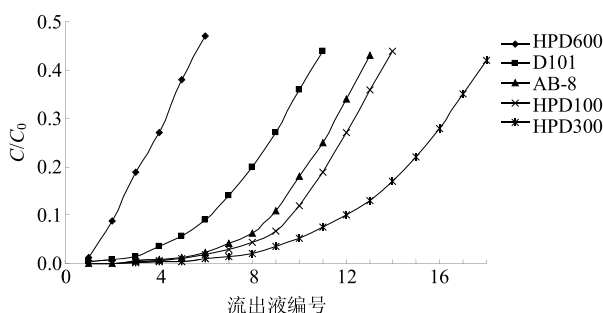


图 4 不同大孔吸附树脂动态吸附容量

Fig. 4 Dynamic adsorption capacity of water-soluble alkaloids from *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* by different macroporous resins

表 10 不同上样液 pH 值对吸附性能的影响

Table 10 Influence of different sample pH values on adsorption properties

pH 值	上样液中新乌头 原碱总量/mg	新乌头原碱 泄漏量/mg	新乌头原碱 吸附量/mg
9.0	41.34	18.05	23.29
10.0	39.12	10.81	28.31
11.0	39.05	7.13	31.92

用 20% NaOH 调 pH 值 11.0, 以 10 BV/h 上样, 收集流出液, 第 1 份收集 560 mL (1 号), 此后每份收集 70 mL, 分别测定各流出液中 8 种原碱的量, 以流出液中新乌头原碱量/上柱液中新乌头原碱量 $\geq 20\%$ ($C/C_0 \geq 20\%$), 示为泄漏点, 结果见图 5。可知, 第 13 号流出液达到泄漏点, 故最大上样量为 1 400 mL (药液质量浓度为 35.8 mg 生药/mL), 即上样量为生药 2.5 g/mL 树脂。

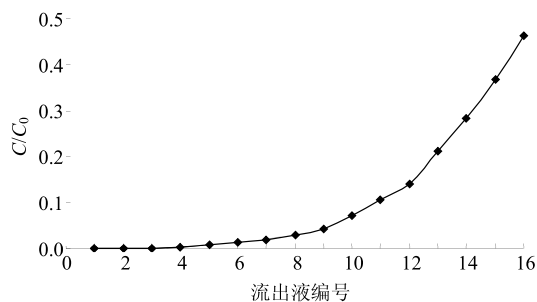
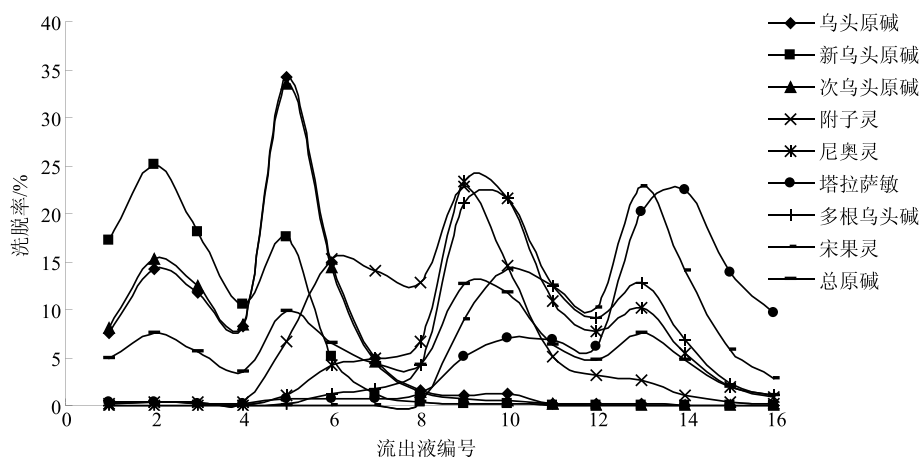


图 5 泄漏曲线

Fig. 5 Dynamic leakage curves



1~4-20%乙醇洗脱液 5~8-40%乙醇洗脱液 9~12-60%乙醇洗脱液 13~16-80%乙醇洗脱液
1—4-20% ethanol eluent 5—8-40% ethanol eluent 9—12-60% ethanol eluent 13—16-80% ethanol eluent

图 6 不同体积分数乙醇梯度洗脱曲线

Fig. 6 Eluting curves of gradient elution

拉萨敏、多根乌头碱、宋果灵主要集中在 60%~80% 乙醇洗脱部分。综合考虑为了将上述 8 种原碱全部洗脱富集, 故确定 80%乙醇为洗脱剂。

2.4.6 洗脱溶剂用量的确定 取预处理好的 HPD 300 20 mL, 湿法装柱。取适量蒸附片水解液, 调 pH 11.0 按上述筛选的饱和吸附容量上样, 先用 6 BV (120 mL) 水洗除杂, 再用 80%乙醇以 2 BV/h 进行解吸, 每 1 BV 收集 1 份洗脱液, 按照“2.1”项下方法测定每份流出液中 8 种原碱的量, 计算各

2.4.4 水洗体积的确定 取预处理好的 HPD300 20 mL, 湿法装柱。取适量蒸附片水解液, 调 pH 值 11.0, 按上述筛选的饱和吸附容量上样, 用 300 mL 水洗脱, 每 1 BV 收集 1 份, 分别测定各份水洗流出液中 8 种原碱的量, 计算新乌头原碱及总原碱的损失率。结果表明各份流出液中 8 种原碱的量均很低, 无损失, 在洗至 6 BV 时流出液颜色已近无色, 故选择水洗体积为 6 BV。

2.4.5 洗脱溶剂的考察 取预处理好的 HPD300 20 mL, 湿法装柱。取适量蒸附片水解液, 调 pH 值 11.0, 按上述筛选的饱和吸附容量上样, 先用 6 BV (120 mL) 水洗除杂, 再用 4 BV (80 mL) 20%、40%、60%、80%乙醇以 2 BV/h 依次进行洗脱, 每 1 BV 洗脱液收集 1 份, 按照“2.1”项下方法检测各份洗脱液中 8 种原碱的量, 计算各原碱以及总原碱的洗脱率, 结果见图 6。新乌头原碱、乌头原碱、次乌头原碱主要集中在 20%~40%乙醇洗脱部分, 附子灵主要集中在 40%~60%乙醇洗脱部分, 尼奥灵、塔

原碱及总原碱的洗脱率, 结果见图 7。洗脱至 4 BV 时, 塔拉萨敏的累计洗脱率为 80.5%, 而其他各原碱及总原碱的累计洗脱率达到 98%以上, 由于塔拉萨敏的量很少, 在总原碱中所占比例约为 5%, 故为了节约溶剂用量和提高生产效率, 选择 80%乙醇洗脱 4 BV。

2.5 附子水溶性生物碱提取纯化工工艺验证实验

取 3 份蒸附片各 500 g, 加 10 倍量的 pH 3.5 酸水煎煮 3 次, 每次 2 h, 煎煮过程中维持 pH 值 3.5,

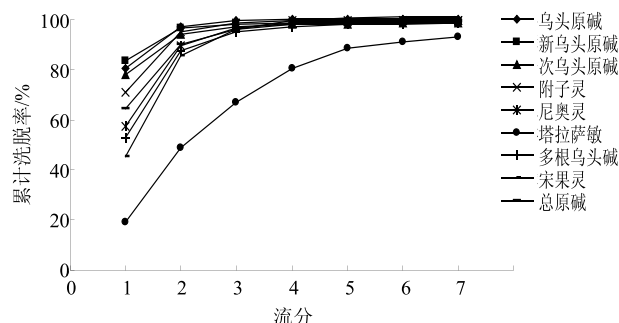


图 7 洗脱剂用量的考察

Fig. 7 Investigation of eluting solvent volumes

表 11 3 批验证实验各指标参数结果

Table 11 Each process parameter results of three batches of verification

批号	提取物 收率/%	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
		新乌头原碱	乌头原碱	次乌头原碱	附子灵	尼奥灵	塔拉萨敏	多根乌头碱	宋果灵	8 种原碱总量
20161208	1.63	30.41	6.31	15.42	20.74	41.47	7.33	16.44	15.00	153.12
20161211	1.75	29.92	5.65	14.37	18.75	38.39	6.36	14.91	13.63	141.98
20161220	1.68	31.31	6.16	15.02	21.15	41.06	6.72	16.02	14.68	152.12
平均值	1.69	30.55	6.04	14.94	20.21	40.31	6.80	15.79	14.44	149.08

3 讨论

附子生物碱的常规定量测定方法有酸性染料比色法、酸碱滴定法、HPLC、LC-MS 等方法，由于水煎液、树脂流出液和水洗液等样品中生物碱量很低，故采用高灵敏度的 UPLC-MS/MS 法测定附子生物碱中 14 种代表性成分的量，该测定方法简单、快速、准确，能够有效监控提取纯化工艺的各个环节。附子水溶性生物碱为强心活性的主要成分，故本实验选择测定乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱、附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、多根乌头碱、宋果灵 8 种主要代表性原碱的量来表征附子水溶性生物碱整体化学成分面貌，比单一指标成分更具有代表性。

8 种水溶性生物碱（原碱）均含有多个羟基，极性和亲水性相对较大，故易与非极性树脂和极性树脂发生氢键吸附，通过对极性、中等极性、非极性 3 种不同类型的 5 种树脂筛选，结果表明 HPD300 非极性大孔树脂对其吸附解吸能力最佳。因 8 种水溶性生物碱所含羟基的数量和位置亦有不同，故在大孔树脂上的吸附、洗脱行为也表现出明显的差异，3 种酯型原碱的极性相对较大，其中新乌头原碱的极性最强，故其树脂吸附能力最弱，最先漏吸，也最易洗脱，20%~40%乙醇即可洗脱完全；而 5 种非酯型原碱的极性相对较小，其中塔拉萨敏极性最

合并 3 次水煎液，冷却，用 20% NaOH 溶液调 pH 10.0 加热水解 2 h，冷却，离心，取上清液用 20% NaOH 溶液调 pH 11.0 上 200 mL HPD 300 大孔树脂，6 BV 水洗除杂后，80%乙醇 4 BV 洗脱，收集乙醇洗脱液，减压回收乙醇，浓缩、干燥，即得附子水溶性生物碱提取物（批号依次为 20161208、20161211、20161220）。计算各批样品收率，测定提取物中各原碱量，结果见表 11。验证实验结果表明，3 次重复性试验的各批指标值接近，说明该工艺稳定、质量可控。

弱，最难洗脱，4 BV 80%的乙醇洗脱率仅约为 80%。

8 种水溶性生物碱呈弱碱性，游离状态更有利于树脂吸附，故考察上样液吸附最佳 pH 值，实验结果也表明，pH 值越高越有利于吸附。此外，本实验发现蒸附片水煎液水解后酯型原碱的增量明显小于水解前酯型生物碱的折算量，表明酯型生物碱并非完全转化为对应的酯型原碱，水解过程中可能生成其他产物，其水解规律及其产物有待于进一步研究。蒸附片中 14 种生物碱的总量约为 0.33%，其水煎液经碱水解，大孔树脂富集纯化得到水溶性生物碱提取物，8 种原碱的总量约为 15%，生物碱量显著提高，该研究为附子水溶性生物碱的制备提供有益的参考方法，为进一步研究应用附子水溶性生物碱奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 黄志芳, 杨昌林, 张意涵, 等. UPLC-MS/MS 法测定市售附子中的 13 种生物碱 [J]. 华西药学杂志, 2016, 31(5): 505-508.
- [3] 贾雪岩, 林 华, 沈玉巧, 等. 附子新型炮制品中乌头类生物碱测定及其强心作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 224-229.
- [4] 孙 萌, 卢志强, 庄朋伟, 等. 附子、白及反药组合对乙酸诱导大鼠胃溃疡的影响及其机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(9): 1319-1324.

- [5] 陈荣昌, 孙桂波, 张强, 等. 附子及其复方中药的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 883-888.
- [6] Zhou G, Tang L, Zhou X, *et al.* A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 160: 173-193.
- [7] 林彦君, 游宇, 季宁平, 等. HPLC-Q-TOF/MS 指纹技术对比分析附子配伍炙甘草前后化学组分变化 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1556-1560.
- [8] 曲帅, 阚鸿, 何忠梅, 等. 乌头类中药炮制配伍减毒增效研究进展 [J]. 农业与技术, 2016, 35(23): 14-18.
- [9] 温瑞卿. 基于生物毒价检测和化学成分分析的毒性中药附子质量评控研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [10] 杨昌林, 黄志芳, 张意涵, 等. 蒸制和烘制对附子生物碱成分含量的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4798-4803.
- [11] 沈玉巧. 附子现代炮制品的急性毒性及药效学评价研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [12] 张意涵. 附子煎煮、炮制化学成分变化规律研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [13] Kosuge T, Yokota M. Studies on cardiac principle of aconite root [J]. *Chem Pharm Bull*, 1976, 24(1): 176-178.
- [14] Konno C, Shirasaka M, Hikino H. Cardioactive principle of *Aconitum carmichaelii* roots [J]. *Planta Med*, 1979, 35(2): 150-155.
- [15] 陈迪华, 梁晓天. 中药附子成分研究——I. 去甲猪毛菜碱 (salsolinol) 的分离及其结构测定 [J]. 药学学报, 1982, 10(17): 792-794.
- [16] 韩公羽, 梁华清, 廖耀中, 等. 四川江油附子新的强心成分 [J]. 第二军医大学学报, 1991, 12(1): 10-13.
- [17] 徐瞰海, 赵洪峰, 徐雅娟, 等. 四川江油生附子强心成分的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 9-11.
- [18] 贺抒, 谢晓芳, 张雪, 等. 附子水溶性生物碱对心衰细胞模型的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 127-130.
- [19] 贺抒, 戴鸥, 刘建林, 等. 附子水溶性生物碱治疗急性心力衰竭的研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 89-92.
- [20] 王璐, 丁家昱, 刘秀秀, 等. 附子中胺醇型二萜生物碱的鉴定及其强心活性研究 [J]. 药科学报, 2014, 49(12): 1699-1704.
- [21] Xiong L, Peng C, Xie X F, *et al.* Alkaloids isolated from the lateral root of *Aconitum carmichaelii* [J]. *Molecules*, 2012, 17(8): 9939-9946.
- [22] Chen X, Cao Y, Zhang H, *et al.* Comparative normal/failing rat myocardium cell membrane chromatographic analysis system for screening specific components that counteract doxorubicin-induced heart failure from *Aconitum carmichaeli* [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(10): 4748-4757.
- [23] 张梅, 张艺, 陈海红, 等. 附子抗心律失常有效组分研究 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(3): 193-194.
- [24] 吴平. 附子生物碱提取分离与水解规律研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
- [25] 李书华, 陈封政, 黄晓辉, 等. 附子中生物碱正交提取工艺和吸附树脂的筛选研究 [J]. 中成药, 2010, 32(8): 1419-1421.
- [26] 周远鹏. 从双酯型生物碱的水解来看附子的解毒 (二) [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 154-157.