

# 草乌花总生物碱的纯化工艺研究<sup>△</sup>

林晓彤<sup>1\*</sup>, 郭娜<sup>1</sup>, 周翎<sup>2</sup>, 韩伟健<sup>1</sup>, 曹佳<sup>1</sup>, 张婷婷<sup>1</sup>, 许桐<sup>1#</sup> (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 大连海港医院, 辽宁大连 116016)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4396-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.25

**摘要** 目的: 优选草乌花总生物碱的纯化工艺。方法: 采用酸碱滴定法测定草乌花总生物碱的含量。以树脂型号、上样药质量浓度、交换速度为考察因素, 以最大吸附量、解吸率和总生物碱质量分数为指标, 优化离子树脂纯化草乌花总生物碱的工艺并进行验证。结果: 选择树脂型号为732型阳离子交换树脂、上样液质量浓度为0.32 g/L、交换速度为7倍柱体积(BV)/h为最优纯化工艺。验证试验中纯化后总生物碱质量分数平均值为86.88% (RSD=0.52%, n=3), 解吸率平均值为92.81% (RSD=0.40%, n=3); 3批样品草乌花总碱提取转移率平均值为81.76%, 纯化转移率平均值为89.47%。结论: 建立的纯化工艺稳定、可行, 且转移效率较高。  
**关键词** 草乌花; 总生物碱; 含量测定; 阳离子交换树脂; 纯化工艺

## Study on Purification Technology of Total Alkaloid from the Flos of *Aconitum kusnezoffii*

LIN Xiao-tong<sup>1</sup>, GUO Na<sup>1</sup>, ZHOU Ling<sup>2</sup>, HAN Wei-jian<sup>1</sup>, CAO Jia<sup>1</sup>, ZHANG Ting-ting<sup>1</sup>, XU Nan<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 2. Dalian Port Hospital, Liaoning Dalian 116016, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the purification technology of total alkaloid from the flos of *Aconitum kusnezoffii*. METHODS: The content of total alkaloid from the flos of *A. kusnezoffii* was determined by acid-base titration. The purification technology of total alkaloid from the flos of *A. kusnezoffii* was optimized by ion resin with resin type, mass concentration of loading liquid and exchange speed as factors, maximum adsorption quantity, desorption rate and mass fraction of total alkaloid as index, and verification test was conducted. RESULTS: The optimal purification technology was as follows as type 732 cation exchange resin, mass concentration of loading liquid 0.32 g/L, exchange speed of 7 column volume (BV)/h. In validation test, the content of total alkaloid was 86.88% (RSD=0.52%, n=3), and desorption rate was 92.81% (RSD=0.40%, n=3) averagely. The extraction transport rate of total alkaloid from 3 batches of the flos of *A. kusnezoffii* was 81.76% and purification transport rate was 89.47% in average. CONCLUSIONS: The established method is stable and feasible, and shows high transport rate.

**KEYWORDS** Flos of *Aconitum kusnezoffii*; Total alkaloids; Content determination; Cation exchange resin; Purification technology

次使用ABC数据分析方法, 将A类药品中出现频率多、临床必需的品种作为新药遴选品种提交药事会, 讨论其是否作为正式用药品种补充或者替换进入医院基本临床用药目录中, 如此一来既使入院新药的遴选有依据, 又符合临床需要<sup>[8]</sup>。

### 参考文献

- [1] 孙荣国, 贾晓蓉. 抓好我国医院临时购药管理工作[J]. 卫生软科学, 2014, 27(3): 158.
- [2] 郑利光. 北京大学口腔医院2009—2012年药品使用情况的ABC分析[J]. 中国药物应用与监测, 2014, 10(6): 335.
- [3] 刘妮, 尹桃. 国内近5年药物利用定量研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2011, 11(12): 1062.

- [4] 全国合理用药监测办公室. 抗肿瘤药及免疫调节剂的医院用药现状[J]. 中国执业药师, 2011, 8(3): 16.
- [5] 彭曦, 汪仕良. 烧伤临床营养新理念: 从营养支持到营养治疗[J]. 中华烧伤杂志, 2011, 27(5): 329.
- [6] 罗美凤, 彭梅. ABC分析法分析我院2007年药品使用情况[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(23): 2050.
- [7] 江鑫. 医院临时购药信息化管理体制的建立[J]. 海峡药学, 2012, 24(7): 240.
- [8] 朱玉洁, 葛卫红, 梁毅. 我国医疗机构新药引进管理相关文献分析[J]. 中国药房, 2012, 23(5): 464.

(收稿日期: 2015-01-19 修回日期: 2015-04-14)

(编辑: 刘萍)

## 本栏目协办

南京伊登生物医学科技有限公司

地址: 江苏省南京市玄武区龙蟠中路29号珠江路都市经济园312室  
邮编: 210018

△ 基金项目: 国家科技支撑计划课题(No.2012BAI28B01)

\* 硕士研究生。研究方向: 中草药活性及质量研究。电话: 0411-85890191。E-mail: thebestluck@sina.cn

# 通信作者: 教授。研究方向: 中草药活性、炮制及质量研究。电话: 0411-85890191。E-mail: xudanbs@163.com

草乌花为毛茛科植物北乌头(*Aconitum kusnezoffii* Reichb.)的干燥花<sup>[1]</sup>,具有祛风、除湿、散寒、止痛之功效,是蒙医临床的常用药<sup>[2]</sup>。草乌花与草乌为同一植物不同药用部位,其毒性小于其块根(草乌),不需炮制即可使用,安全性较高,开发价值更大<sup>[3]</sup>。

传统医学常用乌头属植物来治疗风湿性疾病,主要是因其生物碱具有抗炎、止痛、抗风湿、强心等活性<sup>[4-7]</sup>。虽然草乌花在蒙医临床常用于治疗风湿病,但对其化学成分和活性作用的研究较少。为探索其临床应用的科学依据,本课题组前期对草乌花药效作用进行了初步研究,发现草乌花总生物碱对大鼠佐剂关节炎有良好的抑制作用。鉴于草乌花的良好活性,笔者在建立草乌花总生物碱含量测定的基础上,优化了离子交换树脂法纯化草乌花总生物碱的工艺,为深入研究草乌花总生物碱的生物活性和综合开发利用草乌花资源提供了试验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

RP6002K 型电子天平(常州锐品精密仪器有限公司);HH-S24 型数显恒温水浴锅(菏泽市大华仪器有限公司);W2-100 型旋转蒸发器(上海申生科技有限公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

草乌花采集于内蒙古通辽罕山地区,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为草乌花(flos of *Acointi kusnezoffii*);乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110720-201111,纯度:98.8%);D151(弱酸性)、D113(弱酸性)、D001(强酸性)、001×12(强酸性)、732 型(强酸性)阳离子交换树脂(安徽三星树脂科技有限公司);丙酮、石油醚、乙醇、正己烷、乙酸乙酯、甲醇、氯仿、氨水、硫酸、盐酸、氢氧化钠均为分析纯;水为重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 草乌花总生物碱的提取

取草乌花粗粉,加 20 倍 0.3% 硫酸浸泡 24 h 后(不时搅拌)装入渗漉筒,以 4 ml/min 的流速收集渗漉液,至沉淀反应和薄层检查无生物碱反应为止。渗漉液加氨水回调至 pH 为 10,加石油醚-丙酮(1:1)萃取 3 次,回收溶剂,得草乌花总生物碱提取物。

### 2.2 草乌花总生物碱浸膏的制备

取“2.1”项草乌花总生物碱提取物,经阳离子交换树脂吸附,将吸附生物碱饱和后的树脂用氨水碱化,加乙醇提取,提取液回收溶剂,得草乌花总生物碱浸膏。

### 2.3 草乌花总生物碱的含量测定

2.3.1 供试品溶液制备 取草乌花总生物碱浸膏 1.0 g,精密称定,加乙醇 50 ml 使溶解,滤过,取续滤液,即得。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取 15.5 mg 乌头碱对照品,置于 50 ml 量瓶中,加乙醇使溶解,并定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为 0.31 mg/ml 的对照品溶液。

2.3.3 测定方法 参照文献[8-10],采用酸碱滴定法测定总生物碱含量。精密量取供试品溶液 5 ml,精密加入硫酸滴定液(0.01 mol/L)15 ml、水 15 ml 与甲基红-溴甲酚绿混合指示液 3 滴,用氢氧化钠滴定液(0.02 mol/L)滴定至绿色。每 1 ml 硫酸滴定液(0.01 mol/L)相当于 12.9 mg 的乌头碱(C<sub>34</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>11</sub>)。根据以下公式计算总生物碱的含量:总生物碱含量(%) =

$[(V_{\text{H}_2\text{SO}_4} - V_{\text{NaOH}}) \times 12.9 / 1000] / W_{\text{浸膏}} \times 100\%$ ,式中, $V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ 为硫酸滴定液的体积(ml); $V_{\text{NaOH}}$ 为滴定所用氢氧化钠滴定液的体积(ml); $W_{\text{浸膏}}$ 为总生物碱的浸膏质量(g)。

2.3.4 精密度试验 精密量取供试品溶液 5 ml,按照“2.3.3”项下方法操作,计算总生物碱含量,平行测定 6 次。结果总生物碱含量的 RSD 为 1.41% ( $n=6$ ),表明试验精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取供试品溶液每隔 1 h 测定 1 次,连续测定 10 h。结果 8 h 内总生物碱含量的 RSD=2.31% ( $n=8$ ),表明供试品溶液在 8 h 内稳定,且测定时间最好控制在 8 h 以内。

2.3.6 重复性试验 取草乌花粗粉适量,制备 6 份供试品溶液,测定总生物碱含量。结果含量的 RSD 为 1.52% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 精密量取供试品溶液 2.5 ml,共 6 份,分别加入对照品溶液 7 ml,按照“2.3.3”项下方法操作,计算加样回收率。结果平均加样回收率为 97.50% (RSD=2.72%,  $n=6$ ),表明方法准确度好。

### 2.4 上样液的制备

取草乌花总生物碱提取物 1.5 g,加 0.3% 硫酸水溶液 1 000 ml 使溶解,滤过,取续滤液作为上样液(生物碱质量浓度为 0.32 g/L)。

### 2.5 树脂的选择

分别取 D151、D113、D001、001×12、732 型阳离子树脂适量,水洗至水洗液近无色;加入 5 倍量 7% 盐酸溶液浸泡过夜,用水洗至近中性;加入 5 倍量 5% 氢氧化钠溶液浸泡 1 h 左右,并随时搅拌,用水洗至 pH 为 7;最后再加入 5 倍量 7% 盐酸溶液浸泡 2 h 左右,并随时搅拌,使树脂转为 H 型,水洗至 pH 为 7,即可装柱应用。

取“2.4”项下的上样液 2 份,平行上样于已处理好的 10 ml 树脂柱(湿法装柱,树脂柱高与柱径比为 6:1),控制交换速度为 5 倍柱体积(BV)/h,进行吸附,以 0.5 BV 为 1 流份,收集交换液,绘制泄漏曲线,确定最大吸附量。再将吸附生物碱饱和后的树脂用水洗至洗脱液 pH 为 7,取出树脂,减压抽干水分,加氨水闷润 30 min,挥去过量的氨水,加氯仿回流提取生物碱至完全,减压回收溶剂,测定总生物碱的含量,计算解吸率(%) = 从树脂上解吸出的生物碱总量/(最大吸附量×所用树脂体积)×100%。不同树脂对草乌花总生物碱的吸附能力比较结果见表 1;泄漏曲线见图 1。

表 1 不同树脂对草乌花总生物碱的吸附能力比较

Tab 1 Comparison of adsorption ability of different resin to total alkaloid from the flos of *A. kusnezoffii*

树脂型号	最大吸附量, g/L	解吸率, %	纯化后总生物碱质量分数, %
732 型	3.84	92.30	85.44
D113 型	1.60	71.84	71.60
D151 型	3.04	77.04	85.90
D001 型	3.68	89.40	83.61
001×12 型	2.56	70.37	74.13

由表 1 可见,732 型树脂对草乌花总生物碱有较好的吸附和解吸能力,适用于草乌花总生物碱的富集纯化。由图 1 可知,最大上样体积为 120 ml,即 24 BV。

### 2.6 上样药液质量浓度的选择

取“2.4”项下上样液适量,低温浓缩后加水分别制备成总生物碱质量浓度为 0.16、0.32、0.64、0.96、1.60 g/L 的酸水溶液,

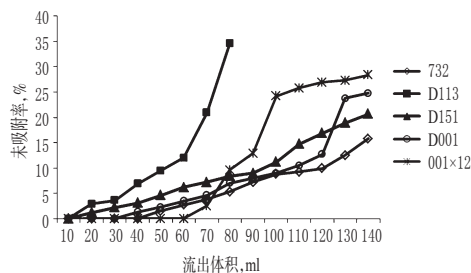


图1 不同型号树脂的泄漏曲线

Fig 1 Leakage curves of resin with different types

控制交换速度为5 BV/h,测定732型树脂对不同质量浓度草乌花酸水液的最大吸附量。结果分别为3.65、3.78、3.47、2.77、1.28 g/L,表明以0.32 g/L质量浓度溶液上样时,吸附量最大。

### 2.7 交换速度的选择

取“2.4”项下的上样液,以不同的交换速度4、7、10、13 BV/h通过10 ml树脂(湿法装柱,树脂柱高与柱径比为6:1),测定树脂最大吸附量,结果分别为3.84、3.85、2.57、1.76 g/L,确定该质量浓度下的交换速度为7 BV/h。

根据上述试验结果,确定草乌花总生物碱的纯化工艺条件为:采用732型强酸性阳离子树脂,以质量浓度为0.32 g/L的总生物碱酸水液上样,最大上样体积为24 BV,交换速度为7 BV/h。

### 2.8 工艺验证试验

取上样液3份,分别上样于100 ml离子交换柱(湿法装柱,树脂柱高与柱径比为6:1),控制交换速度为7 BV/h,达最大吸附量后,用水洗至流出液pH为7。取出树脂抽干水分,加适量氨水闷润30 min,挥去过量的氨水,加适量氯仿回流提取生物碱至完全,减压回收溶剂,得草乌花总生物碱浸膏。按照酸碱滴定法测得所富集的总生物碱的质量分数分别为87.33%、86.42%、86.90%,平均值为86.88%(RSD=0.52%,n=3);解吸率分别为92.42%、92.87%、93.15%,平均值为92.81%(RSD=0.40%,n=3),表明优化工艺稳定可行。

### 2.9 草乌花总生物碱提取纯化工艺的转移率考察

取草乌花粗粉20 g,加20倍0.3%硫酸浸泡24 h后(不时搅拌)装入渗漉筒,以4 ml/min的流速收集渗漉液,至无生物碱反应为止。渗漉液加氨水回调至pH为10,用氯仿萃取3次,合并萃取液,水浴蒸干,残渣加乙醇使溶解,并定容至10 ml,滤过,取续滤液作为测试草乌花中总生物碱的供试品溶液。

按“2.3”项下方法测定3批草乌花中总生物碱的含量,并按下式计算草乌花总生物碱浸膏的提取、纯化转移率:提取转移率=草乌花总生物碱浸膏中总生物碱含量/草乌花中总生物碱含量×100%;纯化转移率=纯化后草乌花总生物碱浸膏中总生物碱含量/纯化前草乌花浸膏中总生物碱含量×100%。结果表明,3批草乌花中总生物碱含量分别为1.13%、1.32%、1.19%,平均值为1.21%;草乌花总生物碱提取转移率分别为82.05%、81.53%、81.71%,平均值为81.76%;草乌花总生物碱纯化转移率分别为91.06%、87.40%、89.96%,平均值为89.47%。由此表明,本方法提取、纯化的工艺效率较高。

## 3 讨论

本试验的含量测定方法系参考文献[9-10]建立的,因供试品溶液成淡黄棕色,用甲基红作指示剂误差较大,故将滴定指

示剂修改为甲基红-溴甲酚绿试液。为了验证该方法是否适于草乌花总生物碱的含量测定,笔者进行了方法学研究。结果表明,该方法测定草乌花总生物碱的含量具有良好的准确度、精密度和重复性。

生物碱的检查方法是测定阳离子树脂对生物碱吸附、解吸附的关键环节。为了有效控制误差,本研究采用生物碱沉淀试剂法和薄层色谱法结合的手段,检识生物碱反应。薄层色谱法的操作如下:取酸水渗漉液1 ml,用氨水调节至pH为10,用适量乙酸乙酯萃取后,浓缩至0.2 ml点样于硅胶板,用氨水预饱和和层析缸,用正己烷-乙酸乙酯-甲醇(6.4:3.6:1)为展开剂,展开后喷以显色剂改良碘化铋钾溶液,观察有无显色斑点。生物碱沉淀试剂采用硅钨酸、碘化铋钾、碘化汞钾、碘化钾碘、苦味酸5种试液<sup>[9]</sup>。当薄层色谱和沉淀反应检查均为阴性时确定为“无生物碱反应”。

离子交换树脂法是一种工艺简单、操作安全、节省成本且分离效果较好的分离方法,适于大量生产。阳离子交换树脂法利用生物碱阳离子可被树脂所吸附、中性或阴离子成分不被吸附的原理,常用来纯化生物碱类成分。对多种树脂考察的结果显示,草乌花总生物碱在强酸性阳离子交换树脂中吸附和解吸能力相对较好,尤其是732型强酸性阳离子树脂最适于草乌花总生物碱的纯化,纯化后总生物碱质量分数达86%以上,解吸率在92%以上。这可能是由于草乌花生物碱多为叔胺型生物碱,属中强碱,在弱酸性离子交换树脂中吸附和解吸能力稍差,而在强酸性树脂中吸附和解吸较强所致。

## 参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准: 蒙药分册[S]. 1998.
- [2] 图雅, 白金亮, 周群, 等. 蒙药草乌花及其提取物化学成分的红外光谱法整体结构解析[J]. 分析化学, 2011, 39(4): 481.
- [3] 图雅, 张贵君, 王淑敏, 等. 草乌在中医和蒙医中应用概述[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2008, 10(1): 113.
- [4] 王英豪. 从化学、药理学和炮制的角度探讨附子、川乌和草乌的传统应用[J]. 光明中医, 2009, 24(9): 1 805.
- [5] 李晋, 彭成, 姬洁莹. 制川乌总碱与白芍总苷、白芍多糖配伍治疗类风湿性关节炎大鼠作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2 937.
- [6] 张成龙, 尹华, 章建华. 附子中双酯型、单酯型、非酯型生物碱对佐剂性关节炎作用的实验研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(4): 379.
- [7] 杨洁红, 张宇燕, 万海同, 等. 附子生物碱与甘草活性物质组合抗大鼠佐剂性关节炎的实验研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 439.
- [8] 舒晓燕, 侯大斌, 李凤. 不同品种附子生物碱和多糖含量的比较[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2 916.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 107, 109, 178.
- [10] 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.

(收稿日期: 2015-03-20 修回日期: 2015-08-31)

(编辑: 刘 萍)