

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810051161.8

[51] Int. Cl.  
*A61K 36/714 (2006.01)*  
*C07D 221/22 (2006.01)*  
*A61K 125/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年2月4日

[11] 公开号 CN 101357167A

[22] 申请日 2008.9.12

[21] 申请号 200810051161.8

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 皮子凤 孙莉佳 宋凤瑞 刘志强

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公  
司

代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

## [54] 发明名称

一种增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法。通过调节提取物溶液的酸碱度和高压水解的方法，使提取物中的双酯型生物碱尽可能的转化为单酯型生物碱。反应产物主要是以水解反应产物为主，双酯型生物碱发生水解反应，生成毒性较小的单酯型生物碱。由于是对提取物溶液的水解，不用考虑生药材的闷润时间等多种因素的影响。而且溶液分布均匀，反应更稳定可靠。减少副产物，缩短生产周期，提高单酯型生物碱产率 0.17 - 13 倍。

1、一种增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法，其步骤和条件如下：将乌头类植物的干燥粉末浸于体积分数为 50-95% 的乙醇溶液中，乌头类植物的干燥粉末质量(g):50-95% 的乙醇溶液的体积(ml)比为 1: 1-3；超声提取 1.5-4 小时后滤出乙醇提取液；按上述方法再处理两次；合并三次滤出的乙醇提取液，40℃-60℃下减压蒸出溶剂，得到提取物；该提取物用蒸馏水稀释成以乌头类植物的干燥粉末质量（g）和蒸馏水的体积（ml）比为 3-6g/ml 的溶液，加氨水调 pH 值到 6.0-10.0，置高压反应釜中于 100℃-120℃加热，加热时间 40-80min，得到一种增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

## 一种增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法

## 技术领域

本发明属于中药技术领域，具体涉及增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法。

## 背景技术

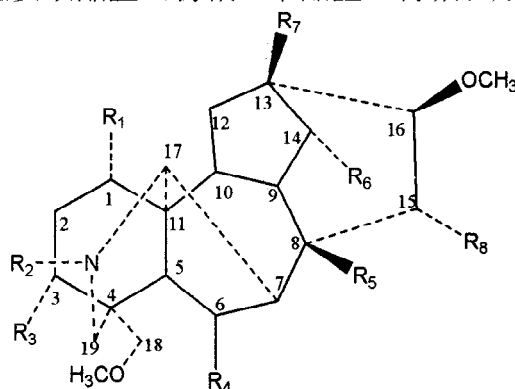
毛茛科 (Ranunculaceae) 乌头属 (Aconitum) 植物在我国品种很多，约 160 多种，主产于西南各省，约有 44 种已作为药用，其中附子 (*Radix Aconiti Lateralis*)、川乌 (*Radix Aconiti*) 和草乌 (*Radix Aconiti Kusnezoffii*) 是最常用的中药。附子为毛茛科植物乌头 (*Aconitum carmichaeli* Debx) 的子根，川乌为毛茛科植物乌头的干燥母根，草乌为毛茛科植物北乌头 (*Aconitum kusnezoffii* Reichb) 的干燥块根。

乌头属植物中主要含有三类生物碱：双酯型生物碱、单酯型生物碱和脂类生物碱 (表1)。现代药理研究证明，双酯型生物碱为附子及乌头属植物中的剧毒成分，乌头碱、中乌头碱、次乌头碱的小鼠 LD<sub>50</sub> 分别为 1.8 mg/kg、1.9 mg/kg 和 5.8 mg/kg (Ohno Y. *J. Tox. 2Toxin Rev.*, 1998, 17 (1): 1-11)。中毒症状以神经系统和循环系统为主，其次是消化系统症状，尸检可见脑部及全身各器官均有不同程度的出血"此类生物碱的毒性概括为箭毒样作用即阻断神经)肌肉接头传导;乌头碱样作用表现为心率紊乱、血压下降、体温降低、呼吸抑制、肌肉麻痹和中枢神经功能紊乱等"乌头碱可直接毒害心肌细胞,故其心脏中毒的致命性最为严重 (宋东江.乌头碱类化合物毒理学研究概况[J].中国药理通报,1989,5(5):272)。虽然单酯型生物碱含量低，但是毒性低，使用安全，炮制品和配伍水煎液中含量较高，但是提取物中仍有一定双酯型生物碱残余。在加热水解过程中双酯型生物碱如乌头碱首先水解失去 C-8 位乙酰基而成为毒性较小且仍具有一定药理作用的苯甲酰乌头原碱类 (benzoylaconitines) 毒性约为乌头碱的 1/200，已基本达到去毒目的。若进一步水解则失去 C-14 位苯甲酰酯基而成为毒性更小，药理作用也较弱的乌头原碱类 (aconines)，其毒性仅为原生物碱的 1/2000~1/4000。水解后的产物仍然有效。本专利的目的，即通过调节提取溶液的酸碱度和高压水解的方法，使提取物中的双酯型生物碱尽可能的转变为单酯型生物碱。

## 发明内容

本发明是通过调节提取物溶液的酸碱度和高压水解的方法，使提取物中的双酯型生物碱尽可能的转化为单酯型生物碱。

表1 乌头属植物中主要双酯型生物碱、单酯型生物碱和脂类生物碱



生物碱		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	质荷比 (m/z)	口服半 数致死 量 (mg/Kg)
双酯	次乌头碱	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OAc	OBz	OH	OH	616	5.8
型生	中乌头碱	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OAc	OBz	OH	OH	632	1.9
物碱	乌头碱	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OAc	OBz	OH	OH	646	1.8
单酯	14-苯甲酰次 乌头胺	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OBz	OH	OH	574	800
	14-苯甲酰中 乌头胺	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OBz	OH	OH	590	800
	14-苯甲酰乌 头胺	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OBz	OH	OH	604	1500
脂型 生物 碱	8-亚油酰-14- 苯甲酰次乌 头胺	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OLipo	OBz	OH	OH	836	100-200
	8-亚油酰-14- 苯甲酰中乌 头胺	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OLipo	OBz	OH	OH	852	10-40
	8-亚油酰-14- 苯甲酰乌头 胺	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OLipo	OBz	OH	OH	866	>400

一种增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法，其步骤和条件如下：

将乌头类植物的干燥粉末浸于体积分数为 50-95% 的乙醇溶液中，乌头类植物的干燥粉末质量 (g):50-95% 的乙醇溶液的体积(ml) 比为 1: 1-3；超声提取 1.5-4 小时后滤出乙醇提取液；按上述方法再处理两次；合并三次滤出的乙醇提取液，40℃-60℃ 下减压蒸出溶剂，得到提取物；该提取物用蒸馏水稀释成以乌头类植物的干燥粉末质量 (g) 和蒸馏水的体积 (ml) 比为 3-6g/ml 的溶液，加氨水调 pH 值到 6.0-10.0，置高压反应釜中于 100℃-120℃ 加热，加热时间 40-80min，得到一种增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

有益效果：一种增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法，反应产物主要是以水解反应产物为主，双酯型生物碱发生水解反应，生成毒性较小的单酯型生物碱。由于是对提取物溶液的水解，不用考虑生药材的闷润时间等多种因素的影响。而且溶液分布均匀，反应更稳定可靠。减少副产物，缩短生产周期，提高单酯型生物碱产率 0.17-13 倍。

## 检测方法

### (1) 质谱半定量法

金属加热毛细管温度 180℃;喷雾电压 4.5 kV;管透镜补偿电压 10 V;碰撞能量为 20% ~ 42%;氮气为壳气;金属加热毛细管电压 10 V;注射泵流速 3  $\mu$ L/min。取上述样品溶液 20 $\mu$ L, 加入 100 $\mu$ L 高乌甲素(内标物), 用甲醇稀释 25 倍后, 进电喷雾质谱仪分析。

### (2) 检测图见附图1和附图2

## 附图说明

附图1为生川乌未经过增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法得到的电喷雾质谱图(图中616.88、632.68、646.61为双酯型生物碱)。由图可以看出未水解的生川乌提取液样品中主要以双酯型生物碱为主, 单酯型生物碱的含量很低(相对含量为22.66%)。

附图2为生川乌经过增加乌头属植物提取物中单酯型生物碱含量的方法得到的电喷雾质谱图(图中590.63、574.62、604.58为单酯型生物碱; 836.63、852.51为脂型生物碱)。由图可以看出水解后的生川乌提取液样品中主要是单酯型生物碱(相对含量为317.90%), 双酯型生物碱已水解成单酯型生物碱。

## 具体实施方式

**实施例1** 将生川乌的干燥粉末5g浸于体积比为50%的乙醇5ml溶液中超声提取1.5小时后滤出乙醇提取液, 按上述方法再处理两次, 合并三次滤出的乙醇提取液, 40℃下减压蒸出溶剂, 得到生川乌提取物, 提取物用蒸馏水稀释成生川乌干燥粉末与蒸馏水的比是3g/ml的溶液, 加氨水调PH值到6.0, 至高压反应釜中于100℃加热, 加热时间40min, 得到一种增加生川乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生川乌的提取液冷却至室温, 取 20 $\mu$ L 样品溶液, 加入 100 $\mu$ L 高乌甲素作为内标物, 混匀后, 进 LCQ 质谱半定量检测, 双酯型生物碱全部水解, 单酯型生物碱水解前的相对含量为 22.66%, 水解后的相对含量为 317.90%。

**实施例2** 将生川乌的干燥粉末 5g 浸于体积比为 95% 的乙醇 15ml 溶液中超声提取 4 小时后滤出乙醇提取液, 按上述方法再处理两次, 合并三次滤出的乙醇提取液, 60℃下减压蒸出溶剂, 得到生川乌提取物, 提取物用蒸馏水稀释成生川乌干燥粉末与蒸馏水的比是 6g/ml 的溶液, 加氨水调 PH 值到 10.0, 至高压反应釜中于 120℃加热, 加热时间 80min, 得到一种增加生川乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生川乌的提取液冷却至室温, 取 20 $\mu$ L 样品溶液, 加入 100 $\mu$ L 高乌甲素作为内标物, 混匀后, 进 LCQ 质谱半定量检测, 双酯型生物碱全部水解, 单酯型生物碱水解前的相对含量为 22.66%, 水解后的相对含量为 305.76%。

**实施例3** 将生川乌的干燥粉末5g浸于体积比为75%的乙醇10ml溶液中超声提取3小时后滤出乙醇提取液, 按上述方法再处理两次, 合并三次滤出的乙醇提取液, 50℃下减压蒸出溶剂, 得到生川乌提取物, 提取物用蒸馏水稀释成生川乌干燥粉末与蒸馏水的比是5g/ml的溶

液，加氨水调PH值到7.0，至高压反应釜中于110℃加热，加热时间70min，得到一种增加生川乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生川乌的提取液冷却至室温，取20μL样品溶液，加入100μL高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为22.66%，水解后的相对含量为276.98%。

实施例4 生附子的干燥粉末5g，处理方法同实施例1，得到一种增加生附子的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生附子的提取液冷却至室温，取20μL样品溶液，加入100μL高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为21.09%，水解后的相对含量为172.71%。

#### 实施例5

生附子的干燥粉末5g，处理方法同实施例2得到一种增加生附子的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生附子的提取液冷却至室温，取20μL样品溶液，加入100μL高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为21.09%，水解后的相对含量为165.72%。

实施例6 生附子的干燥粉末5g处理方法同实施例3，得到一种增加生附子的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生附子的提取液冷却至室温，取20μL样品溶液，加入100μL高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为21.09%，水解后的相对含量为152.36%。

实施例7 制草乌的干燥粉末5g处理方法同实施例1，得到一种增加制草乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该制草乌的提取液冷却至室温，取20μL样品溶液，加入100μL高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为57.71%，水解后的相对含量为67.37%。

实施例8 制草乌的干燥粉末5g，处理方法同实施例2，得到一种增加制草乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该制草乌的提取液冷却至室温，取20μL样品溶液，加入100μL高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为57.71%，水解后的相对含量为65.39%。

实施例9 制草乌的干燥粉末5g，处理方法同实施例3，得到一种增加制草乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该制草乌的提取液冷却至室温，取20 $\mu$ L样品溶液，加入100 $\mu$ L高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为57.71%，水解后的相对含量为59.28%。

实施例10 生草乌的干燥粉末5g，处理方法同实施例1，得到一种增加生草乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生草乌的提取液冷却至室温，取20 $\mu$ L样品溶液，加入100 $\mu$ L高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，脂肪型生物碱水解前的相对含量为191.82%，脂肪型生物碱水解后的相对含量为299.36%，单酯型生物碱水解前的相对含量为31.77%，单酯型生物碱水解后的相对含量为45.81%。

实施例11 生草乌的干燥粉末5g，处理方法同实施例2，得到一种增加生草乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生草乌的提取液冷却至室温，取20 $\mu$ L样品溶液，加入100 $\mu$ L高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，脂肪型生物碱水解前的相对含量为191.82%，脂肪型生物碱水解后的相对含量为305.46%，单酯型生物碱水解前的相对含量为31.77%，单酯型生物碱水解后的相对含量为40.37%。

实施例12 生草乌的干燥粉末5g，处理方法同实施例3，得到一种增加生草乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该生草乌的提取液冷却至室温，取20 $\mu$ L样品溶液，加入100 $\mu$ L高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，脂肪型生物碱水解前的相对含量为191.82%，脂肪型生物碱水解后的相对含量为287.56%，单酯型生物碱水解前的相对含量为31.77%，单酯型生物碱水解后的相对含量为37.88%。

实施例13 黑顺片的干燥粉末5g，处理方法同实施例1，得到一种增加黑顺片的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该黑顺片的提取液冷却至室温，取100 $\mu$ L样品溶液，加入20 $\mu$ L高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为47.24%，水解后的相对含量为71.52%。

实施例14 黑顺片的干燥粉末5g处理方法同实施例2，得到一种增加黑顺片的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该黑顺片的提取液冷却至室温，取100 $\mu$ L样品溶液，加入20 $\mu$ L高乌甲素作为内标物，混匀后，进LCQ质谱半定量检测，双酯型生物碱全部水解，单酯型生物碱水解前的相对含量为47.24%，水解后的相对含量为68.48%。

实施例15 黑顺片的干燥粉末5g处理方法同实施例3, 得到一种增加黑顺片的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该黑顺片的提取液冷却至室温, 取100 $\mu$ L样品溶液, 加入20 $\mu$ L高乌甲素作为内标物, 混匀后, 进LCQ质谱半定量检测, 双酯型生物碱全部水解, 单酯型生物碱水解前的相对含量为47.24%, 水解后的相对含量为75.36%。

实施例16 制川乌的干燥粉末5g处理方法同实施例1, 得到一种增加制川乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该制川乌的提取液冷却至室温, 取20 $\mu$ L样品溶液, 加入100 $\mu$ L高乌甲素作为内标物, 混匀后, 进LCQ质谱半定量检测, 双酯型生物碱全部水解, 单酯型生物碱水解前的相对含量为69.17%, 水解后的相对含量为170.30%。

实施例17 制川乌的干燥粉末5g处理方法同实施例2, 得到一种增加制川乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该制川乌的提取液冷却至室温, 取20 $\mu$ L样品溶液, 加入100 $\mu$ L高乌甲素作为内标物, 混匀后, 进LCQ质谱半定量检测, 双酯型生物碱全部水解, 单酯型生物碱水解前的相对含量为69.17%, 水解后的相对含量为169.25%。

实施例18 制川乌的干燥粉末5g处理方法同实施例3, 得到一种增加制川乌的提取物中单酯型生物碱含量的提取液。

把该制川乌的提取液冷却至室温, 取20 $\mu$ L样品溶液, 加入100 $\mu$ L高乌甲素作为内标物, 混匀后, 进LCQ质谱半定量检测, 双酯型生物碱全部水解, 单酯型生物碱水解前的相对含量为69.17%, 水解后的相对含量为165.19%。



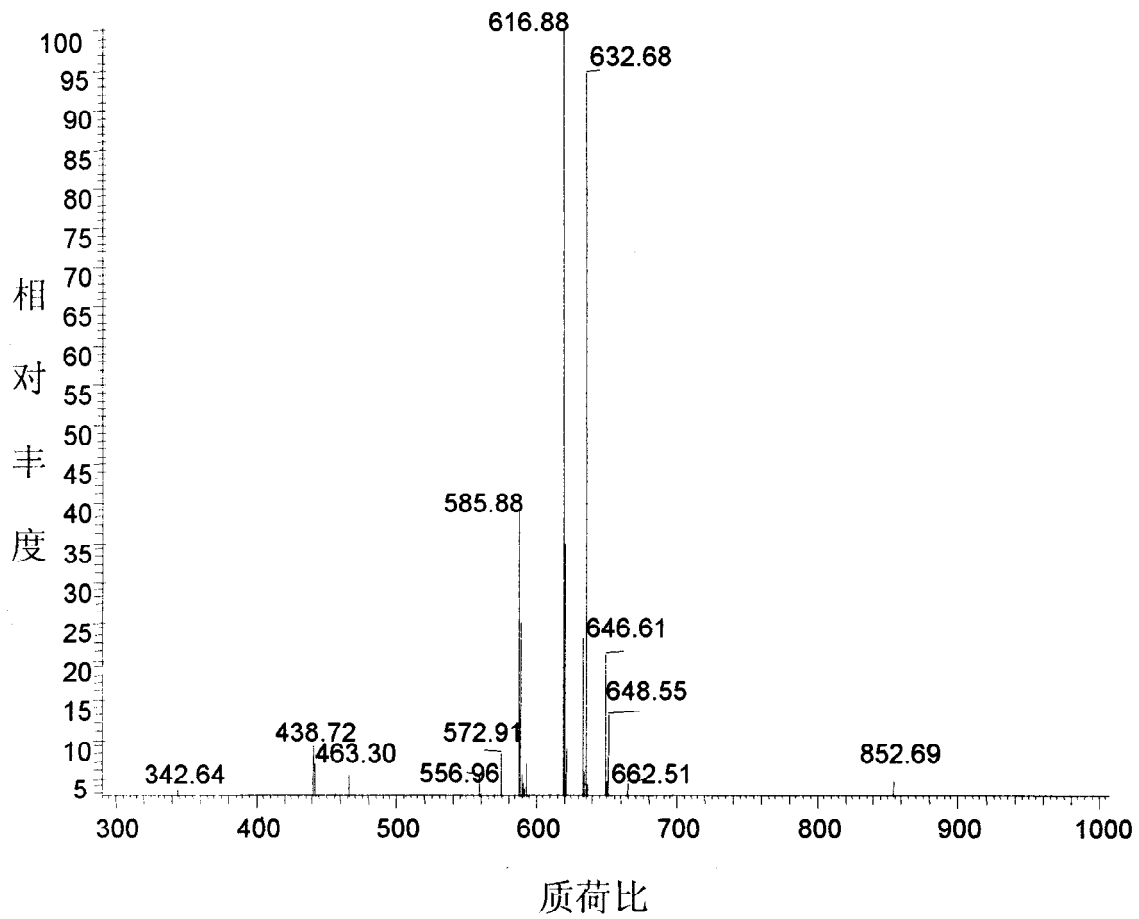


图1

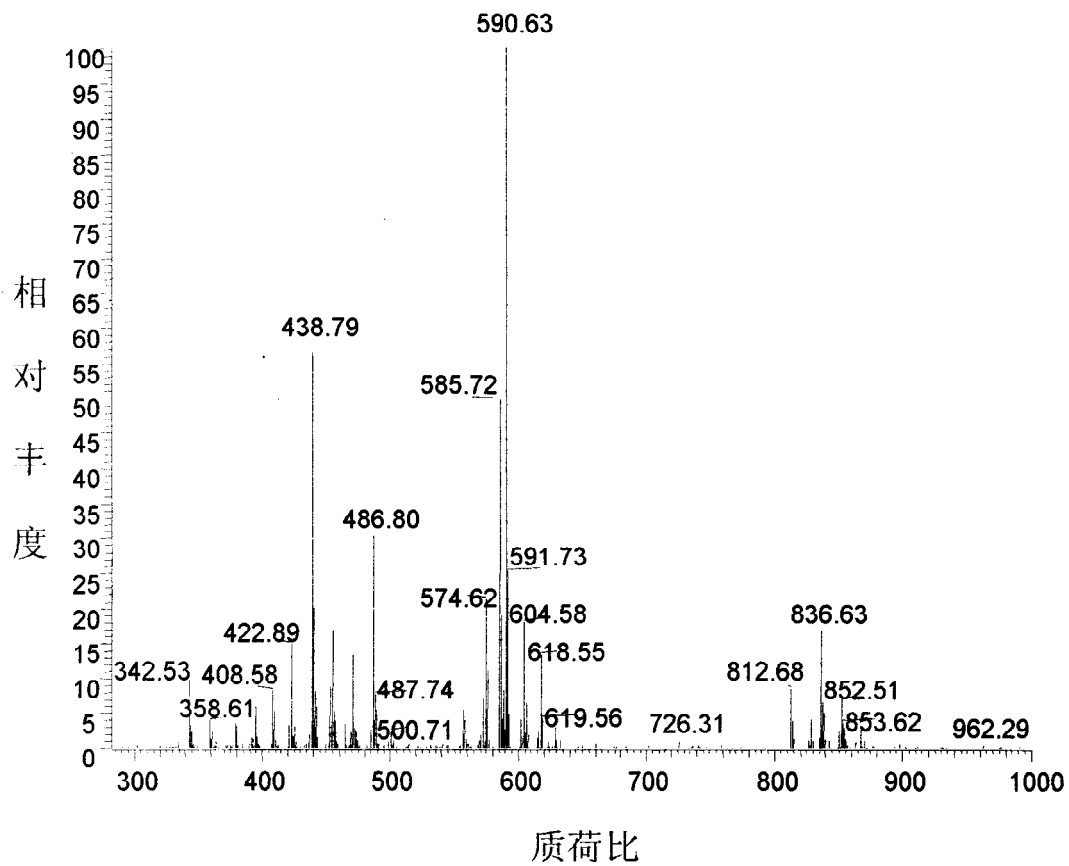


图 2