

表 1 金雀根中 carasinol B 的测定 ($n=3$)
Table 1 Determination of carasinol B in *Radix*

Caraganae Sinicae ($n=3$)

药材产地	采集时间	Carasinol B/(mg · g ⁻¹)	RSD/%
湖北黄梅	12 月	0.42	1.34
湖北黄梅	7 月	0.72	0.28
云南昆明	12 月	0.31	1.45

3 讨论

本实验将 carasinol B 制备成对照品,并建立了金雀根中 carasinol B 的测定方法(图 1)。本实验建立的分析方法快速、简便,具有良好的精密性、稳定性和重现性。

Carasinol B 体外细胞试验证明具有刺激成骨细胞增殖的活性,它属于二苯乙烯类化合物,是金雀根的活性成分之一,主要存在于金雀根的醋酸乙酯可溶部位,性质稳定,可以作为金雀根的质量控制样品。

本实验同时分析了不同产地不同采集时间的金雀根中 carasinol B 的量。得到的结论是采集于相同时间都是 12 月份的,湖北黄梅的量高于云南昆明

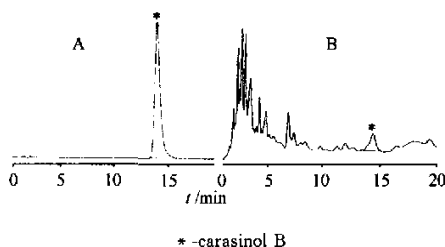


图 1 Carasinol B 对照品(A)及金雀根(B)的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC Chromatograms of carasinol B (A) and *Radix Caraganae Sinicae* (B)

的,而采集于相同地点都是湖北黄梅的 7 月份量高于 12 月份的。有效成分量的不同可能是由于土壤、气候、水份、温度等的不同造成的。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1975.
- [2] Ma D Y, Lou H F, Hu C Q. Three stilbenes from the roots of *Caragana sinica* [J]. *Chin J Chem*, 2004, 22, 207-221.
- [3] Luo H F, Zhang L P, Hu C Q. Five novel oligostilbenes from the roots of *Caragana sinica* [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57, 4849.

HPLC 法测定羌活中阿魏酸、羌活醇、苯乙基阿魏酸酯和异欧前胡素

古丽娜·沙比尔^{1,2}, 郭洪祝¹, 郭慧¹, 马晓驰¹, 王炜¹, 果德安^{1*}

(1. 北京大学药学院, 北京 100083; 2. 新疆中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002)

羌活为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. I. Chang、宽叶羌活 *N. forbesii* Boiss. 或川羌活 *N. franchetii* Boiss. 的根及根茎,有散表寒、祛风湿、利关节等功效,用于治疗感冒风寒、头痛无汗,风寒湿痹、项强筋急、骨节酸痛、风水浮肿、痲痘疮毒等^[1]。本属植物的主要活性成分为香豆素类化合物。羌活为《中国药典》2005 年版一部收载品种,但对羌活药材未作定量测定要求,其质量仅通过测定挥发油的量来控制,规定总挥发油不得少于 0.028 mL/g^[2]。为了有效地控制羌活药材的质量,本实验选择羌活药用部分中量较高的 4 种有效成分(阿魏酸、羌活醇、苯乙基阿魏酸酯、异欧前胡素)作为定量指标,建立羌活的 RP-HPLC 测定法,为中药羌活内在质量的评价提供科学依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:Agilent 1100 型高效液相色谱仪(德国 Agilent Technologies)。配二级管阵列检测器和 ChemStation 色谱工作站,四元溶剂系统、在线脱气机、自动进样器、柱温箱。Sartorius 电子天平(德国 Sartorius 公司)。HPLC 级乙腈(加拿大 LTD 公司);色谱纯甲醇(北京市华准化学试剂科技开发部);冰醋酸为分析纯(北京化学试剂公司);双蒸水(Millipore simplicity 纯水制备系统)。

羌活对照药材购自中国药品生物制品检定所(批号:120935-200405)。四川羌活药材从四川阿坝州采集,其他 23 批羌活药材均购自当地药店或医院,由本室果德安教授鉴定。对照品羌活醇(notopteryol)、苯乙基阿魏酸酯(phenethyl ferulate)和异欧前胡素(isoimperatorin)3 种成分均为笔者分离所得,并经 4 大光谱(UV、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR)

收稿日期:2005-11-10

作者简介:古丽娜·沙比尔(1963—),女(维吾尔族),新疆伊犁人,副研究员。2002—2005 年在北京大学药学院特培,访问学者,研究方向:中药质量控制及天然药物化学研究。 Tel: (0991)2637505 E-mail: gulnar_sabir@163.com

* 通讯作者 果德安 Tel: (010)82801516 Fax: (010)82802700 E-mail: gda@bjmu.edu.cn

分析,与文献化学光谱数据查对确定结构^[3~6];阿魏酸(ferulic acid)购自中国药品生物制品检定所(批号 0773—9607);HPLC 检测 4 个对照品质量分数为 98%以上。

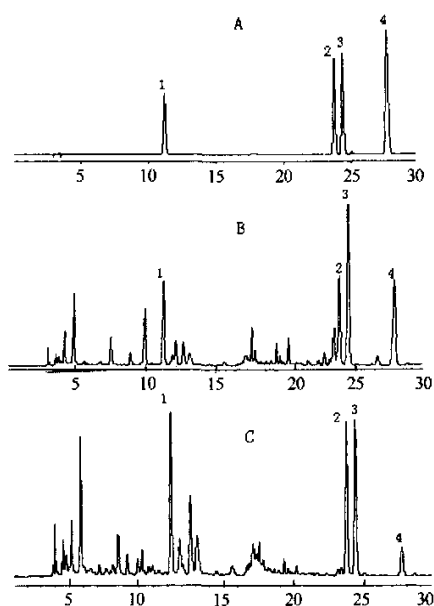
2 方法与结果

2.1 液相色谱条件:色谱柱:Alltima HP C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),预保护柱:Phenomenex, Security Guard;流动相乙腈(A)和 0.3%醋酸水(B);梯度洗脱程序:0~8 min A 由 15%~20%,8~12 min A 20%,12~14 min A 由 20%~55%,14~25 min A 55%,25~26 min A 55%~65%;26~30 min A 65%。柱温 30 ℃,体积流量 1 mL/min,检测波长 330 nm,进样量为 5 μL。在此色谱条件下 4 种待测化合物的混合对照储备液(A)、羌活对照药材(B)和四川羌活药材(C)的色谱分离结果见图 1。可见,羌活中 4 种化合物得到了基线分离。

2.2 对照品溶液制备:分别精密称取对照品阿魏酸、羌活醇、异欧前胡素各 5 mg,苯乙基阿魏酸酯 2 mg,分别置于 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制对照品储备液。分别精密吸取适量对照品储备液混合并用甲醇定容至 5 mL 量瓶中,制成混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液制备:羌活药材粉碎(60 目筛),精密称取 0.1 g,加甲醇 5 mL,称质量,回流 1 h,放冷至室温,补质量,取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 标准曲线和线性范围:精密依次吸取混合对照品储备液 7 个不同质量浓度进行 HPLC 分析,在上



1-阿魏酸 2-羌活醇 3-苯乙基阿魏酸酯 4-异欧前胡素
1-ferulic acid 2-notopterol 3-phenethyl ferulate
4-isomeratorin

图 1 混合对照品(A)、对照药材(B)和四川产羌活药材(C)HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), reference medicinal materials (B), and *Rhizoma et Radix Notopterygii* in Sichuan (C)

述色谱条件下检测峰面积,同一质量浓度连续测定 3 次,4 种成分均以质量浓度为横坐标(X),平均峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,相关系数与线性范围见表 1。

表 1 4 个化合物的线性回归方程

Table 1 Linear equation of four compounds

化合物	回归方程	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	r	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
阿魏酸	$Y=95.271X+22.943$	0.80~28.00	0.999 9	0.05	0.18
羌活醇	$Y=7.4213X+6.7345$	6.40~192.00	1.000 0	0.11	0.33
苯乙基阿魏酸酯	$Y=24.857X+9.605$	3.20~96.00	0.999 9	0.90	0.31
异欧前胡素	$Y=14.808X+12.369$	6.80~204.00	1.000 0	0.14	0.37

2.5 精密度试验:分别在 1 d 内和连续 3 d 精密吸取上述混合标准储备液 5 μL 在所确定的 HPLC 条件下重复进样 6 次测定。记录各成分色谱峰面积,计算其质量分数。结果阿魏酸、羌活醇、苯乙基阿魏酸酯和异欧前胡素质量分数的日内 RSD 分别为 0.56%、0.53%、0.53%、0.56%,日间 RSD 分别为 1.55%、0.88%、2.75%、0.99%。

2.6 重现性试验:分别称取四川羌活药材粉末(60 目)5 份,按供试品操作方法平行制备,进样 5 μL,连续测 2 次,分别计算所含阿魏酸、羌活醇、苯乙基阿

魏酸酯和异欧前胡素的质量分数,RSD 分别为 1.02%、1.30%、1.11%、1.10%。

2.7 稳定性试验:精密吸取混合对照品储备液 5 μL,分别在 0、2、4、6、12、24、36 h 进样分析,分别计算所含阿魏酸、羌活醇、苯乙基阿魏酸酯和异欧前胡素质量分数,RSD 分别为 0.42%、0.70%、1.21%、0.41%,表明 36 h 内 4 个对照品稳定性良好。

2.8 回收率试验:精密称取羌活药材粉末 0.05 g (60 目,四川产),分别精密加入已知量高、中、低 3 种质量浓度的对照储备液,每个质量浓度取 3 份,按

2.3 项供试品方法制备。进样 5 μ L, 每份样品测定 3 次, 计算回收率, 结果阿魏酸平均回收率 100.52%, RSD 为 0.38% ($n=3$), 羌活醇平均回收率 101.60%, RSD 为 1.09% ($n=3$), 苯乙基阿魏酸酯平均回收率 97.75%, RSD 为 0.83% ($n=3$), 异欧前胡素平均回收率 100.12%, RSD 为 1.93% ($n=3$)。

2.9 样品测定: 精密称取不同来源的 25 份羌活粉末各 0.1 g (60 目), 精密加 5 mL 甲醇, 按上述供试品溶液制备, 以 5 μ L 进样, 测定色谱峰面积, 根据标准曲线计算其质量分数结果见表 2。

表 2 羌活药材中 4 个化合物的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of four compounds in *Rhizoma et Radix Notopterygii* ($n=3$)

序号	样品来源	质量分数/(mg · g ⁻¹)				总量
		阿魏酸	羌活醇	苯乙基阿魏酸酯	异欧前胡素	
1	中国药品生物制品检定所	0.62	9.20	2.00	5.75	17.57
2	四川阿坝州	0.46	5.76	0.73	0.70	7.64
3	北京海淀药店	0.21	4.83	0.65	4.40	10.09
4	北京同仁堂药店	0.26	0.72	0.67	0.54	2.19
5	北京天衡药店	0.20	1.34	0.56	0.30	2.40
6	北京京隆堂药店	0.23	0.41	0.38	0.42	1.44
7	北京长春堂药店	0.24	0.24	0.19	1.46	2.13
8	北京南庆仁堂药店	0.28	0.24	0.45	1.18	2.15
9	云南大理药店	0.49	7.88	1.28	1.61	11.26
10	云南昆明药店	0.20	2.38	0.42	0.40	3.40
11	云南西双版纳药店	0.23	4.40	1.03	2.04	7.70
12	上海医院	0.28	6.14	1.80	3.14	11.36
13	新疆乌鲁木齐医院	0.26	2.49	1.02	1.86	5.63
14	辽宁沈阳药店	0.27	5.90	0.78	0.82	7.77
15	辽宁抚顺药店	0.28	7.95	0.15	2.98	11.36
16	山东烟台药店	0.16	1.35	0.22	3.73	5.46
17	安徽药店	0.21	2.38	0.83	0.38	3.80
18	江西南昌药店	0.36	0.33	0.66	1.30	2.65
19	吉林市药店	0.05	0.21	0.12	0.16	0.54
20	安徽亳州药店	0.13	0.53	0.17	0.32	1.15
21	陕西榆林药店	0.03	-	-	8.09	8.12
22	宁夏药店	0.21	0.31	0.49	1.07	2.08
23	甘肃药店	0.06	0.54	0.12	0.25	0.97
24	河北石家庄药店	0.19	5.59	0.74	2.09	8.61
25	广东深圳医院	0.49	3.58	1.48	1.27	6.82

3 讨论

3.1 色谱条件优化: 为了尽可能在短时间内获得好的分离效果, 对色谱条件进行了优化。首先考察了不同反相色谱柱 Phenomenex Luna C₁₈, Alltima HP C₁₈ 和 Zorbax 等因素。同时考察了不同组成的流动相 (甲醇-水、异腈-水、甲醇-酸水、异腈-酸水) 系统。酸

主要比较了冰醋酸和磷酸, 冰醋酸可以改善峰型和分离度, 而磷酸分离效果不好。又比较了不同浓度冰醋酸-水溶液, 因酸度越高对色谱柱的损害也相应增加, 通过比较综合考虑, 最终确定采用乙腈-0.3% 冰醋酸水溶液为流动相系统进行梯度洗脱。考察了不同的柱温 (25、30、35、40 $^{\circ}$ C)、不同体积流量 (0.8、0.9、1 mL/min)。波长采用 HPLC-DAD 检测, 被测 4 个化合物的最大吸收波长均在 330 nm 附近。故检测波长设在 330 nm。通过上述试验条件的考察, 对羌活提取物测得的色谱图分离效果进行比较, 最终优化色谱条件确定色谱柱为 Alltima HP C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、柱温 30 $^{\circ}$ C、体积流量 1 mL/min 和检测波长 330 nm。在优化的 HPLC 条件下, 能够在 30 min 之内测定羌活中的 4 个主要成分。此方法简单、快速、准确, 可以用于羌活药材的质量控制。

3.2 提取方法的优化: 为能使被测化合物提取效果最佳, 考察了不同提取溶剂 (甲醇、乙醇以及不同比例的甲醇-水和乙醇-水); 不同提取方法 (回流、超声) 和不同提取时间 (30、45、60、90、120、150 min) 等因素对提取效率的影响, 最终确定甲醇回流 1 h 方法提取效率高。

3.3 指标性成分的选择: 中药所含的化学成分极其复杂, 而且在治疗疾病方面中药多个活性成分是起协同作用, 一个成分很难代表一味中药的功效。因此, 选用尽可能多的成分来评价药材质量和确保药材的临床效果。这 4 个化合物是羌活中质量分数高的化学成分, 对其进行定量分析是有必要的。

3.4 样品分析: 本实验建立的分析方法用于定量分析 25 批不同来源的羌活药材中 4 个化合物的量, 结果见表 3。从测定结果来看, 在大多数羌活药材中 4 个成分均含有, 21 号药材中没有检测出羌活醇、苯乙基阿魏酸酯; 阿魏酸量也极低, 但是其所含异欧前胡素是在所有药材中量最高的。25 批不同来源羌活药材中 4 个成分的量存在显著的差异。说明市场上流通的羌活药材品质差别较大。由此可以看出各地药材的内在质量有很大不同, 这可能是由于植物基源不同, 或是生长环境、采集时间、加工方法、贮存条件等外部因素造成的。因此对中药材有效成分的内在质量进行定量控制是很有必要的。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1986.
- [2] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [3] Gu Z M, Zhang D X, Yang X W, et al. Isolation of two new coumarin glycosides from *Notopterygium forbesii* and evalua-

tion of a Chinese crude drug, Qianghuo, the underground part of *N. incisum* and *N. forbesii*, by high performance liquid chromatography [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(9): 2498-2502.

- [4] Kozawa M, Fokumoto M, Matsuyama Y, et al. Chemical studies on the constituents of the Chinese crude drug "Qiang Huo" [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(8): 2712-2717.

- [5] Zschocke S, Lehner M, Bauer R. 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitory active constituents from Qianghuo (*Notopterygium incisum*) [J]. *Planta Med*, 1997, 63(3): 203-206.

- [6] Yang X W, Yan Z K, Gu Z M, et al. Chemical constituents of *Notopterygium ncisum* Ting [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(10): 507-511.

RP-HPLC 法测定草乌中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱

赵英永^{1,2}, 崔秀明^{1*}, 张文斌¹, 苗 华³, 戴 云²

(1. 文山三七研究院天然药物研究所, 云南 文山 663000; 2. 云南民族大学化学与生物技术学院,

云南 昆明 650031; 3. 南阳师范学院, 河南 南阳 473061)

草乌属毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezofii* Reichb. 的干燥块根, 具有祛风除湿、温经止痛的功能, 用于风寒湿痹、心腹冷痛、麻醉止痛等^[1]。主要含有中乌头碱、乌头碱、次乌头碱等二萜类生物碱, 它们既是其有效成分, 也是其毒性成分。本实验采用 HPLC 方法测定 3 种生物碱, 方法简便、快速, 结果准确。

1 仪器、药品与试剂

Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪, 包括 LC-10ATvp 溶剂输送泵, SCL-10Av 系统控制器, SPD-10Avp 紫外-可见检测器, CTO-10Avp 柱温箱, DGU-12A 在线真空脱气机, Class-up 工作站; 中船七院二六所超声波清洗机, KL-009 袖珍数显笔式酸度计。

中乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品质量分数分别为 98.5%、99.3%、99.2%, 由中国科学院昆明植物研究所提供; 乙腈为色谱纯, 三重蒸馏水(自制), 其他试剂为分析纯; 草乌药材来源见表 1, 经中国科学院昆明植物研究所标本馆李锡文研究员鉴定。

2 色谱条件

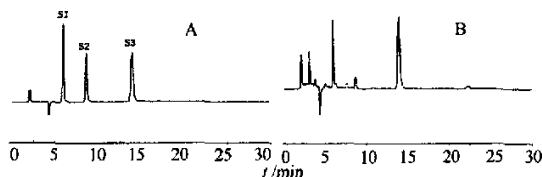
色谱柱: Kormusil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-醋酸铵缓冲溶液 (pH 10.5) (60:40); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 240 nm; 柱温: 30 ℃。

3 方法与结果

3.1 对照品溶液的制备: 精密称取对照品用乙腈配制成中乌头碱 0.14 mg/mL、乌头碱 0.068 mg/mL、次乌头碱 0.124 mg/mL 的混合对照品溶液, 冷藏备用。

3.2 供试品溶液的制备: 精密称取草乌(块根)粉末 0.4 g, 置于磨口的三角瓶中, 加入 10% 氨溶液 0.4 mL, 搅拌均匀, 加入 10 mL 乙醚, 超声 30 min 后补加 5 mL 乙醚, 加入适量的氧化铝, 放置过夜, 滤过, 分别用 5 mL 的乙醚洗涤 3 次滤渣, 合并醚液, 挥干, 用乙腈洗涤残渣定容为 5 mL, 冷藏备用。

3.3 分离效果考察: 取上述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: 中乌头碱、乌头碱、次乌头碱能达到基线分离, 分离度 ≥ 1.5, 可见 3 种生物碱间的分离效果较好, 且无其他成分干扰。



S1-中乌头碱 S2-乌头碱 S3-次乌头碱
S1-mesaconitine S2-aconitine S3-hypaconitine

图 1 对照品(A)和草乌样品(B)
HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and *Radix Aconiti Kusnezoffii* (B)

3.4 线性关系的考察: 精密吸取对照品溶液分别采用 2、5、10、15、20 μL 的进样量, 按上述色谱条件测定峰面积; 以峰面积积分值为纵坐标, 对照品的进样质量为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程分别为: 中乌头碱 $Y = 529\,275 X + 56\,975$, $r = 0.999\,1$; 乌头碱 $Y = 859\,404 X + 43\,376$, $r = 0.999\,2$; 次乌头碱 $Y = 688\,851 X + 69\,298$, $r = 0.999\,0$ 。线性范围分别为: 0.03~

收稿日期: 2005-10-14

作者简介: 赵英永(1975—), 男, 河南开封人, 硕士研究生, 主要从事有机化学和天然药物化学的研究工作。

Tel: (0876)8881535 E-mail: zhaoyybr@sina.com

* 通讯作者 崔秀明 Tel: (0876)8881537 E-mail: sanqi37@vip.sina.com