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 kusnezoffii* 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

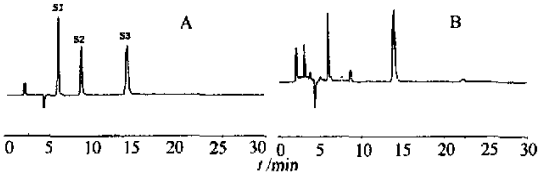
色谱柱：Kormusil C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相：乙腈-醋酸铵缓冲溶液 (pH 10.5) (60∶40)；体积流量：1.0 mL/min；检测波长：240 nm；柱温：30 ℃。

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

0.30、0.0015～0.015、0.025～0.25 mg/mL。

3.5 精密度试验：精密吸取样品(4 号)溶液各 10 μL，重复进样 5 次，记录峰面积，结果为中乌头碱、乌头碱、次乌头碱 RSD 分别为 0.6%、0.6%、1.5%。

3.6 重现性试验：取同一供试品(4 号)5 份，分别按上述方法进行供试品的制备，测定，记录峰面积，结果中乌头碱、乌头碱、次乌头碱的 RSD 分别为 1.4%、1.1%、1.7%。

3.7 稳定性试验：取草乌供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24、36 h，按前述测定方法进行测定，记录峰面积，结果中乌头碱、乌头碱、次乌头碱的 RSD 分别为 0.7%、1.4%、1.5%。

3.8 回收率试验：取已测量的草乌样品粉末 0.2 g 5 份，精密称定，每份分别加入中乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品适量，照供试样品溶液的制备项下操作，进样测定，结果中乌头碱、乌头碱、次乌头碱的回收率分别为 98.9%、97.4%、98.4%，RSD 分别为 0.9%、1.2%、1.1%。

3.9 最低检测限的确定：将混合对照品稀释到合适的质量浓度，使峰高约为噪音的 3 倍，结果中乌头碱、乌头碱、次乌头碱检测限分别为 0.301、0.314、0.298 μg/mL。

3.10 系统适应性：按照上述处理样品的方法处理 10 个不同产地的样品，在上述色谱条件下分别测定，结果均以中乌头碱峰计算理论塔板数。结果表明理论塔板数以中乌头碱峰计算不低于 4 200。

3.11 样品测定：吸取供试品溶液 10 μL 按上述条件注入液相色谱仪，测定，结果见表 1。

表 1 样品测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of samples (n=3)

编号	来源	中乌头碱/%	RSD/%	乌头碱/%	RSD/%	次乌头碱/%	RSD/%
1	河北承德	0.503	2.6	0.025	3.4	0.002	3.8
2	安徽亳州	0.066	2.8	0.011	3.6	0.074	2.5
3	安徽亳州	0.952	1.9	0.080	3.9	0.007	3.4
4	贵州	0.230	2.3	0.037	2.7	0.106	1.8
5	河南南召(采集)	0.152	3.1	0.022	2.3	0.228	1.6
6	辽宁千山(采集)	0.081	2.8	0.038	1.9	0.141	2.0
7	云南文山(采集)	0.069	2.4	0.001	2.8	0.017	3.5
8	河南确山(采集)	0.218	2.9	0.021	2.5	0.005	2.6
9	四川(采集)	0.063	3.5	0.011	3.4	0.004	2.8
10	内蒙古	0.048	3.0	0.015	2.9	0.005	2.5

4 讨论

4.1 检测波长选择：有的文献报道在 230 nm 检测[2]，有的文献报道在 235 nm 检测[3]等不同的检测波长，本实验考察了 230～260 nm 检测波长检测情况，在 230 nm 的检测波长峰面积很小，通过乌头生物碱光谱测定吸收峰为 236 nm，但是波长短，杂质及其他的成分干扰大，而在 240 nm 检测，峰面积最大，达到基线分离，基线也更稳定，确定检测波长为 240 nm。

4.2 离子强度的选择：考察了 0.01、0.03、0.05、0.07 mol/L醋酸铵配制的流动相，结果 0.01、0.03、0.07 mol/L 醋酸铵配成的流动相得到的峰形较宽，分离度小，0.05 mol/L 醋酸铵溶液得到的峰型及分离度较好。

4.3 流动相的选择：考察了甲醇-磷酸盐缓冲溶液(pH6.8)、乙腈0.2%冰醋酸缓冲液及乙腈-醋酸铵缓冲溶液(pH 10.5)(60∶40)的条件流动相，在甲醇与缓冲溶液配比条件下发现随着有机相的比例的增加 3 种乌头生物碱峰型变窄、变高，但是保留时间越来越小与其他的成分混合在一起不能分开，在75∶25的配比 3 种生物碱能够分开，但是次乌头碱的峰型变宽。分离效果不是最佳。此外，通过稳定性试验可知 3 种生物碱在甲醇中非常不稳定，所以不宜使用甲醇作为流动相及溶剂。在乙腈-缓冲液(0.2%冰醋酸，用三乙胺调 pH 9.4)配比条件下，只有在 65∶35 的配比 3 种乌头生物碱峰型较好，但是分离度小，测定样品时，有时由于受到其他成分的干扰部分样品不能分开。而在乙腈-醋酸铵缓冲溶液(pH 10.5)(60∶40)的配比的条件下，峰窄、峰型对称，且中乌头碱与乌头碱、乌头碱与次乌头碱分离度均大于 1.5，能够达到较好的分离效果。因此，与文献已报道的测定方法[4]相比，具有峰窄、峰型对称、基线稳定、杂质及其他成分干扰小、分离度大的特点。

4.4 采用高效液相色谱法测定草乌生药中乌头碱、乌头碱、次乌头碱，该方法灵敏、快速、准确，适用草乌生药中生物碱的检测，可以作为草乌类药材资源评价及质量标准的依据。

4.5 由样品的测定结果可知，不同产地的草乌药材，3 种生物碱的量差异较大。这为草乌类药材资源评价及质量标准研究提供了参考数据。

References:

[1] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol I. 2005.

[2] Wang C H, He Y, Zhang J Z, *et al*. Determination of aconitine in *Aconitum kusnezoffii* Reichb by HPLC [J]. *Pertaining*

Crime Techni (刑事技术), 2003, 1: 15-16.

[3] Huang J M, Guo J X, Sun M M, *et al*. The method for determination of *Aconitum* alkaloids in *Aconitum kusnezoffii* Reichb [J]. *Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(12): 878-880.

[4] Wu L X, Wen A P, Dang X J, *et al*. Determination of aconitine alkaloids by HPLC [J]. *J Med Pharm Chin Minorit* (中国民族医药杂志), 2003, 9(2): 36-37.

番石榴叶的质量标准研究

朱长福[1], 同利琪[1], 柯向梅[1], 王国振[2], 严玉平[1], 由会玲[1]

(1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050091; 2. 河北瑞生药业有限公司, 河北 石家庄 050085)

番石榴叶为桃金娘科植物番石榴 *Psidium guajava* L. 的干燥叶及带叶嫩茎。收载于《广西中药材标准》, 在布朗语称"麻果"。具有健胃消食、涩肠止泻、杀虫止痒、收敛止血的作用。番石榴具有很好的降低血糖作用和抗轮状病毒作用[1,2]。原药材标准仅有来源及性状鉴别标准, 相关报道显微和薄层色谱鉴别研究[3], 本实验研究薄层鉴别方法时发现采用方法比较好, 结果与其不同; 并进行槲皮素的测定方法研究, 以便有效控制药材质量。

1 仪器与试药

药材购于安国市杏林中药有限公司, 经河北省药品检定所牛小莲主任药师鉴定; KQ-250B 型超声波清洗器, 上海昆山, LC-10ATvp 高效液相色谱仪(岛津); UV-160A 型紫外-可见分光光度计(岛津); 槲皮素(批号 10081-9905, 中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯; 其余为分析纯。

2 薄层色谱鉴别

方法 1: 依照曾玉兰报道方法操作[3], 称取番石榴叶粉末约 1 g, 加 70% 乙醇 20 mL, 再加盐酸 1 mL, 回流 2 h, 离取上清液作为供试品溶液; 另取槲皮素对照品, 加甲醇制成 0.02 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。分别吸取上述两种试液各 5 μL, 分别点于同一以羧甲基纤维素为黏合剂的硅胶 H 薄层板上, 以甲苯-氯仿-丙酮-甲酸(8∶5∶7∶1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 在紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品相应的位置(Rf0.78)上, 显相同黄绿色荧光斑点, 与报道基本一致。

方法 2: 称取番石榴叶粉天约 0.3 g, 加甲醇 10 mL, 超声处理 25 min, 离取上清液, 蒸干, 加甲醇 1 mL 溶解作为供试品溶液; 另取槲皮素对照品, 加甲醇制成 0.02 mg/mL 的溶液作为对照品溶液。分别吸取上述两种试液各 5 μL, 分别点于同一以羧甲基纤维素为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-氯仿-丙酮-甲酸(8∶5∶7∶1)为展开剂, 展开 9 cm, 取出, 晾干, 喷以氯化铝试液, 在紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中有 7 个斑点, 在与对照品相应的位置(Rf0.75)上, 显相同黄绿色荧光斑点, 在 Rf 0.17 处有一黄色荧光斑点, 在 Rf 0.25 处有一蓝色荧光斑点, 在 Rf 0.42 处有一污黄色荧光斑点, 在 Rf 0.83 处有一玫红色荧光斑点, 在 Rf 0.9 处有一蓝色荧光斑点, 在 Rf 0.95 处有一亮白色荧光斑点, 显示特征斑点, 分离效果较好。见图 1。

1~3 样品 4,5 槲皮素

1—3-samples 4,5-quercetinu

图 1 番石榴叶 TLC 图(254 nm)

Fig. 1 TLC Chromatogram of *Folium Psidii* (254 nm)

3 药材中槲皮素的测定[4]

3.1 色谱条件与适应性: 色谱柱: C_{18}(5 μm, 250 mm×4.6 mm, Intersil ODS-3, 6L Sciences Inc); 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 甲醇-0.5% 磷酸溶液(58∶42)为流动相; 检测波长为 370 nm。理论板数按槲皮素峰计算, 应不低于 3 000。

3.2 溶液的制备: 精密称取槲皮素对照品, 加甲醇制成 0.103 mg/mL 的溶液, 作为母液备用; 取番石

收稿日期: 2005-09-12