

草烏

(ACONITI KUSNEZOFFII RADIX)

草烏 MI	2
一、藥材採購及鑑定.....	2
二、藥材性狀描述 (圖 1).....	2
三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2).....	2
四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3).....	3
草烏 HPLC	8
一、材料.....	8
二、儀器及層析管柱.....	8
三、實驗藥品及試劑來源.....	8
四、方法.....	8
五、結果.....	12
草烏 TLC	36
一、方法.....	36
二、萃法選擇及濃度測試.....	38
三、溶媒系統選擇.....	39
四、觀察方式選擇.....	41
五、十批草烏藥材樣品檢測.....	42

草烏 MI

一、藥材採購及鑑定

收集 10 批來自全臺北、中、南、東各地不同通路之中藥販賣業或中藥製造業的藥材樣品，確認所收集之藥材為草烏的乾燥塊根。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：草烏

生藥名：ACONITI KUSNEZOFFII RADIX

英文名：Kusnezoff Monkshood Root

基原：本品為毛茛科 Ranunculaceae 植物北烏頭 *Aconitum kusnezoffii* Rchb. 之乾燥塊根。

採收加工：秋季莖葉枯萎後採挖，除去根頭及鬚根，洗淨，曬乾。

藥材性狀：本品呈不規則長圓錐形，稍彎曲，長約 2~7 cm，直徑約 1~3 cm。頂端常有殘莖或莖痕，表面灰褐色或暗棕褐色，外皮皺縮而不平，具點狀鬚根痕，有時可見瘤狀突起的子根。氣微，味辛辣而麻舌。

飲片性狀：本品呈不規則或近三角形的片，質堅硬，切面灰白色或暗灰色，有裂隙，可見多角形形成層環紋，髓部較大或呈中空狀。氣微，味辛辣而麻舌。

生長分佈：多年生草本，植株高 70~150 cm，喜涼爽濕潤環境，忌積水，以肥沃疏鬆砂質壤為宜，主產於黑龍江、吉林、遼寧、河北、山西等地。花期 7~8 月，果期 8~9 月。

三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)

1. 後生皮層由 1 至數列黃棕色細胞組成。
2. 皮層為數層切向延長薄壁細胞，偶可見石細胞，呈單個散在或 2~5 個成群，類長方形、類橢圓形，腔大。
3. 內皮層為扁平長方形細胞一列。
4. 韌皮部寬廣，常有不規則裂隙，篩管群散在。
5. 近形成層的篩管群外側可見韌皮纖維。
6. 形成層環略呈微波狀彎曲或呈星角狀環。
7. 木質部導管數個或數十個成群，放射狀排列。
8. 髓部較大，細胞呈類圓形，薄壁細胞內充滿澱粉粒。

四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3)

1. 本品粉末灰棕色。
2. 含大量澱粉粒，澱粉粒單粒，類圓形，臍點裂縫狀或點狀，層紋可見，直徑 5~29 μm ，偏光顯微鏡下呈黑十字狀；複粒由 2~6 分粒組成。
3. 石細胞呈類長方形、類橢圓形，長 60~220 μm ，寬 60~100 μm ，壁厚薄不一，壁厚者層紋明顯，有的含棕色物。偏光顯微鏡下呈亮黃白色。
4. 後生皮層細胞棕色，表面觀類方形或類多角形，壁不均勻增厚。
5. 導管以孔紋及網紋導管為主，亦可見螺紋導管，直徑 5~50 μm 。



圖 1A 草烏藥材圖



圖 1B 草烏飲片藥材圖 (製草烏)

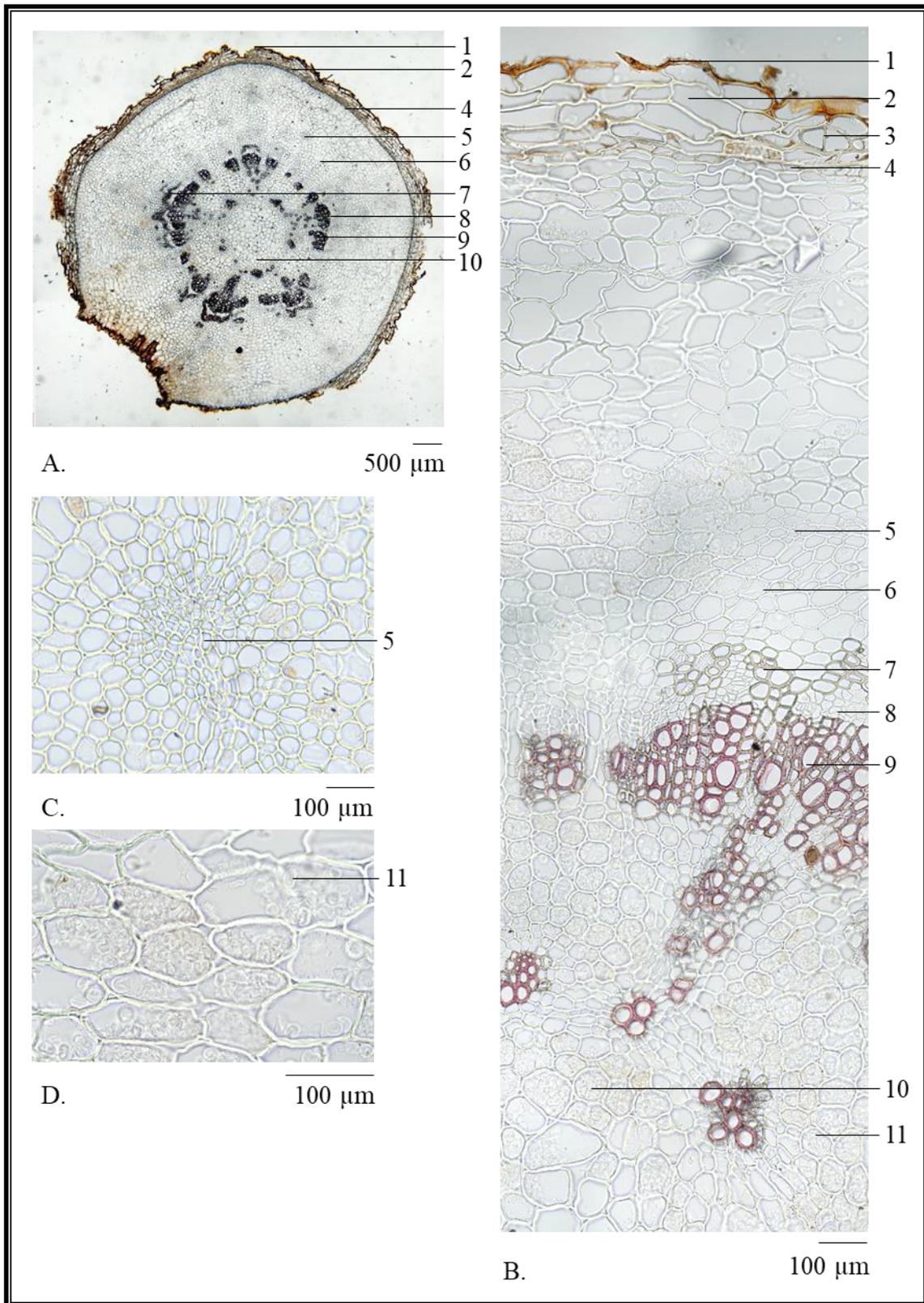


圖 2 草烏塊根橫切面顯微特徵圖

A.橫切面 B.橫切面放大圖 C.篩管群 D.薄壁細胞富含澱粉粒

1.後生皮層 2.皮層 3.石細胞 4.內皮層 5.篩管群 6.韌皮部 7.韌皮纖維

8.形成層 9.木質部 10.髓 11.澱粉粒

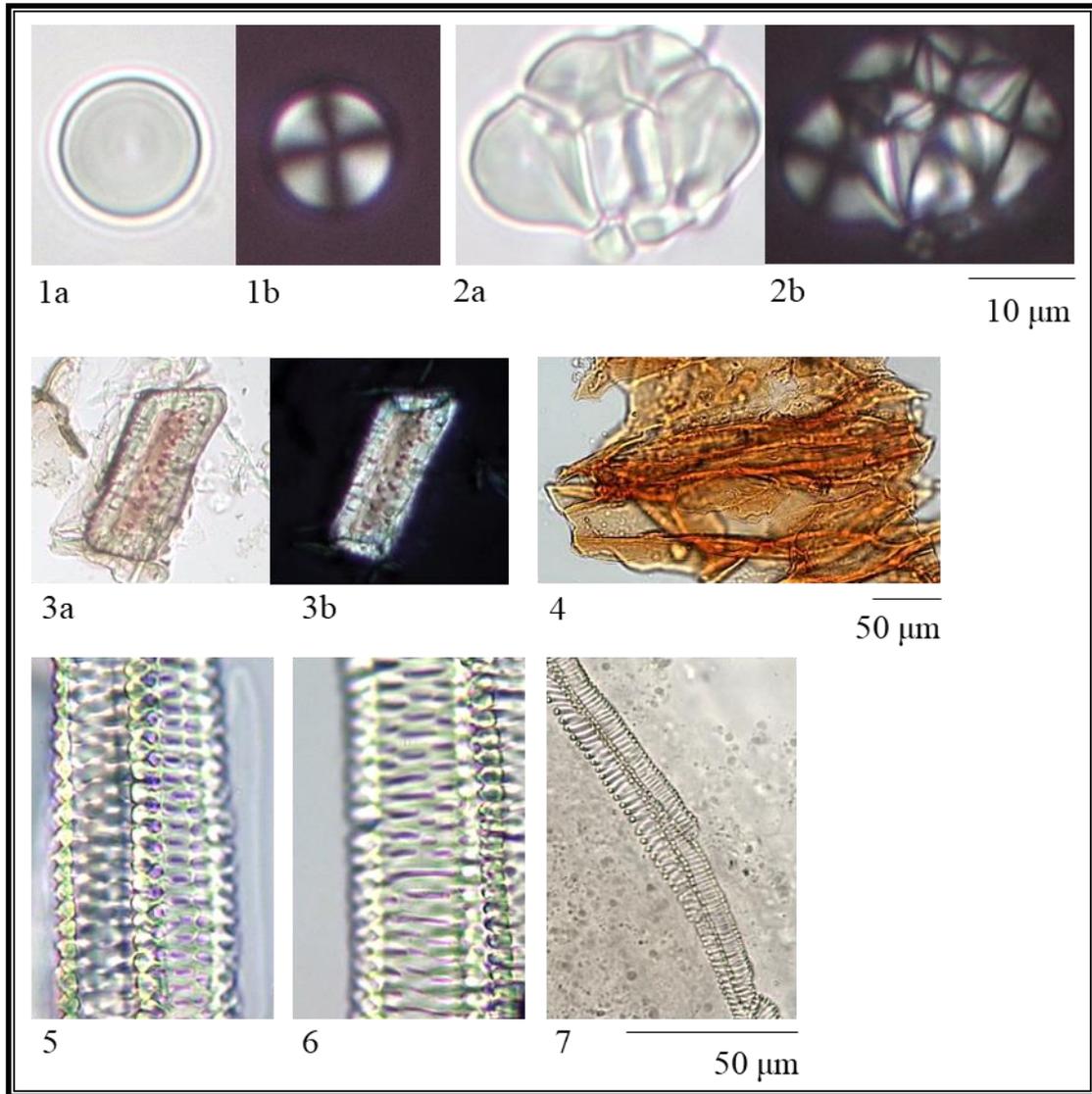


圖 3 草烏塊根粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 澱粉粒(單粒) 2. 澱粉粒(複粒) 3. 石細胞 4. 後生皮層細胞 5. 有緣紋孔導管

6. 網紋導管 7. 螺旋導管

參考文獻

1. 衛生福利部臺灣中藥典第四版編輯工作小組(2021)。臺灣中藥典第四版。台北市：衛生福利部。278 頁。
2. 戴新民(1978)。中藥栽培法。啟業書局。223 頁。
3. 中華人民共和國香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部(2015)。香港中藥材標準第七冊。香港：香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部。11~23 頁。
4. 肖培根等(2001)。新編中藥志第一卷。北京：化學工業出版社。645~649 頁。
5. 陳士林、林余霖(主編)(2013)。中藥飲片標準圖鑑。福州：海峽出版發行集團·福建科學技術出版社。424~425 頁。
6. 國家藥典委員會(2020)。中華人民共和國藥典 2020 年版一部。北京：中國醫藥科技出版社。247 頁。
7. 趙中振、陳虎彪(主編)(2016)。中藥顯微鑑定圖典。福建科學技術出版社。146~147 頁。
8. 范崔生(主編)(1995)。中藥採收鑑別應用全書。江西科學技術出版社。37~38 頁。
9. 樓之岑、秦波(主編)(1995)。常用中藥材品種整理和質量研究第二冊。北京大學醫學出版社。142~189 頁。

草烏 HPLC

一、材料

購自於臺灣各地中藥店草烏藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Waters 2695 Separation Module，包含 Waters 2998、Photodiode Array Detector；層析管柱 Agilent ZORBAX Extend C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)。

(二) UPLC 儀器及層析管柱

Agilent 1290 series，包含 Degasser (G1330B)、Quat Pump (G4220A)、DAD (G4212A)、Autosampler (G4226A)、Column Oven (G1316C.)；層析管柱 Agilent poroshell 120 EC-C18 Column (100 × 3.0 mm, 2.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

乙腈(99.9%)購自於友和貿易股份有限公司；乙酸購自於 Merck；氨試液(25%)購自於 Merck。

(二) 標準品

標準品新烏頭鹼(Mesaconitine)、烏頭鹼(Aconitine)與次烏頭鹼(Hypaconitine)購自於普思生物科技股份有限公司，純度皆 98%以上。

四、方法

(一) 萃取條件

取本品粉末(過第 20 號篩網)準確稱取 2.0 g，置 50 mL 離心管中，準確加入 25%氨試液 3 mL 和異丙醇：乙酸乙酯(1：1)混合溶液 45 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 10 分鐘(約 4000 × g)，以 No.1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加異丙醇：乙酸乙酯(1：1)混合溶液至刻度，在 40 °C 以下減壓濃縮至乾，加 0.01% 鹽酸甲醇溶液溶解，移入 5 mL 容量瓶中，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，取濾液即得。

(二) 萃取次數

由於萃取條件步驟複雜，只做 1 次草烏藥材萃取，步驟同萃取條件。

(三) 對照標準品溶液

1. 準確稱取標準品新烏頭鹼 10 mg，加 10 mL 的 0.01% 鹽酸甲醇溶液製成每 1 mL 含新烏頭鹼 1000 μg 的標準品儲備溶液，並以 0.01% 鹽酸甲醇溶液稀釋至 50 μg/mL 製成對照標準品溶液。

2. 準確稱取標準品烏頭鹼 7.2 mg，加 10 mL 的 0.01% 鹽酸甲醇溶液製成每 1 mL 含烏頭鹼 720 μg 的標準品儲備溶液，並以 0.01% 鹽酸甲醇溶液稀釋至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 製成對照標準品溶液。
3. 準確稱取標準品次烏頭鹼 6.0 mg，加 10 mL 的 0.01% 鹽酸甲醇溶液製成每 1 mL 含次烏頭鹼 600 μg 的標準品儲備溶液，並以 0.01% 鹽酸甲醇溶液稀釋至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 製成對照標準品溶液。

(四) 檢品溶液

取本品粉末(過第 20 號篩網)準確稱取 2.0 g，置 50 mL 離心管中，準確加入 25% 氨試液 3 mL 和異丙醇：乙酸乙酯(1：1)混合溶液 45 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 10 分鐘(約 4000 \times g)，以 No.1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加異丙醇：乙酸乙酯(1：1)混合溶液至刻度，在 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下減壓濃縮至乾，加 0.01% 鹽酸甲醇溶液溶解，移入 5 mL 容量瓶中，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，取濾液即得。

(五) 測定法

分別準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 μL ，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼的含量，即得。

(六) 檢量線

1. 準確吸取新烏頭鹼標準品儲備液適量(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以 0.01% 鹽酸甲醇溶液稀釋成含新烏頭鹼分別為 250、100、50、25、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y = ax + b$ 與相關係數 R^2 。
2. 準確吸取烏頭鹼標準品儲備液適量(720 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以 0.01% 鹽酸甲醇溶液稀釋成含烏頭鹼分別為 360、180、100、50、25、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y = ax + b$ 與相關係數 R^2 。
3. 準確吸取次烏頭鹼標準品儲備液適量(600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以 0.01% 鹽酸甲醇溶液稀釋成含次烏頭鹼分別為 300、150、100、50、25、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y = ax + b$ 與相關係數 R^2 。

(七) 精密度試驗

1. 以新烏頭鹼濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以新烏頭鹼的波峰面積為指標，求出相對標準差。
2. 以烏頭鹼濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以烏頭鹼的波峰面積為指標，求出相對標準差。
3. 以次烏頭鹼濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以次烏頭鹼的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性：取同一批市售草烏藥材粉末，依草烏藥材檢品溶液製備方法平行製備 5 份草烏藥材檢品溶液，進樣測定，以新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售草烏藥材粉末，依草烏藥材檢品溶液製備方法製備草烏藥材檢品溶液，分別在 0、2、4、8、24 小時進樣測定，以新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼的含量為指標，求出相對標準差。

(九) 偵測極限與定量極限試驗

1. 偵測極限(Limit of Detection, LOD)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 3:1$ 時之濃度，作為偵測極限估計值。
2. 定量極限(Limit of Quantification, LOQ)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(十) 添加回收率試驗

1. 取已知新烏頭鹼含量的草烏藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 1.0 g，分別加入新烏頭鹼 0.2 mg，並按檢品溶液製備方法操作測定。
2. 取已知烏頭鹼含量的草烏粉末 5 份，每份準確稱取約 1.0 g，分別加入加入 1 mL 的烏頭鹼溶液(60 $\mu\text{g/mL}$)，並按檢品溶液製備方法操作測定。
3. 取已知次烏頭鹼含量的草烏藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 1.0 g，分別加入次烏頭鹼 0.1 mg，並按檢品溶液製備方法操作測定。

(十一) HPLC 分析條件

1. 層析管：Agilent ZORBAX Extend C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 235 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	0.2% 乙酸(含 25% 氨試液)(v/v, %)
0	24	76
5	31	69
20	45	55
40	78	22
50	100	0

*取 2 mL 乙酸配成 1000 mL 乙酸水溶液再加入 10 mL 氨試液(25%) (pH 值約 10.02)。

(十二) 臺灣市售草烏藥材含量測定

取 10 批市售草烏藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼的百分比含量。

(十三) 草烏檢品之 UPLC 分析條件

1. 層析管：Agilent Poroshell 120 EC-C18 Column (100 x 3.0 mm, 2.7 μm)
2. 檢測波長：UV 235 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

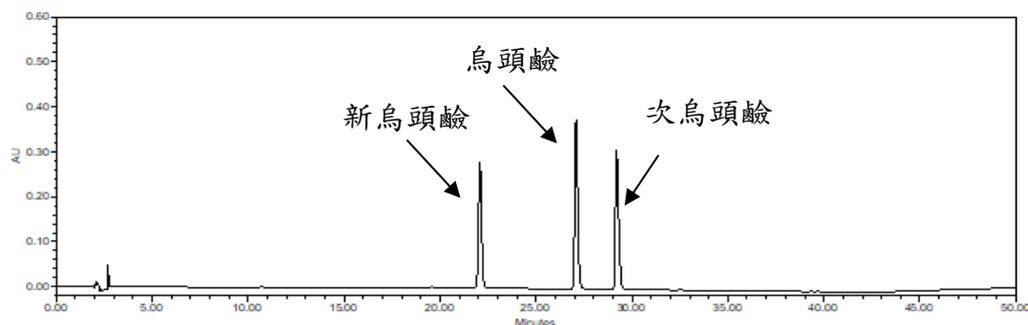
時間(min)	乙腈(%)	0.2% 乙酸(含 25% 氨試液)(v/v, %)
0	24	76
1	31	69
6	45	55
12	78	22
15	100	0

*取 2 mL 乙酸配成 1000 mL 乙酸水溶液再加入 10 mL 氨試液(25%) (pH 值約 10.02)。

五、結果

(一) 標準品新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼之 HPLC 層析

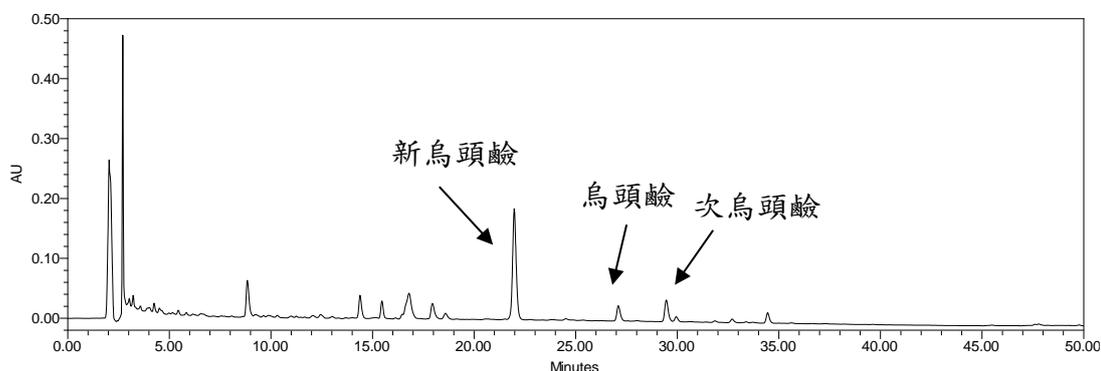
於滯留時間 22.1、27.1 與 29.2 分鐘處分別顯示新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼標準品波峰(圖一)。



圖一、新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售草烏檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 21.9、27.0 與 29.4 分鐘處分別顯示草烏藥材檢品中新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼波峰(圖二)。新烏頭鹼分離率(R)為 1.65，拖尾因子(T)為 1.05；烏頭鹼分離率(R)為 1.73，拖尾因子(T)為 1.19；次烏頭鹼分離率(R)為 7.67，拖尾因子(T)為 1.04。



圖二、市售草烏檢品之 HPLC 層析圖

表一、新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼之分離率與拖尾因子

	新烏頭鹼	烏頭鹼	次烏頭鹼
分離率	1.65	1.73	7.67
拖尾因子	1.05	1.19	1.04

(三) 萃取條件

結果顯示以 25% 氨試液 3 mL 和 異丙醇：乙酸乙酯(1：1) 混合溶液為溶媒時所測得之新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼的波峰面積為佳。

表二、萃取條件

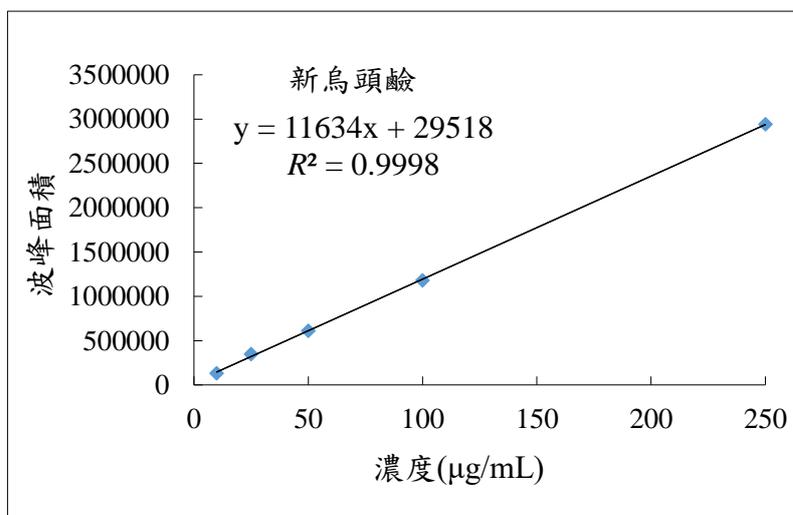
溶媒	新烏頭鹼 波峰面積	烏頭鹼 波峰面積	次烏頭鹼 波峰面積
25% 氨試液 3 mL 和 異丙醇： 乙酸乙酯(1：1) 混合溶液	579891	127631	400257

(四) 萃取次數

由於萃取條件步驟複雜，只做 1 次草烏藥材萃取，結果同表二。

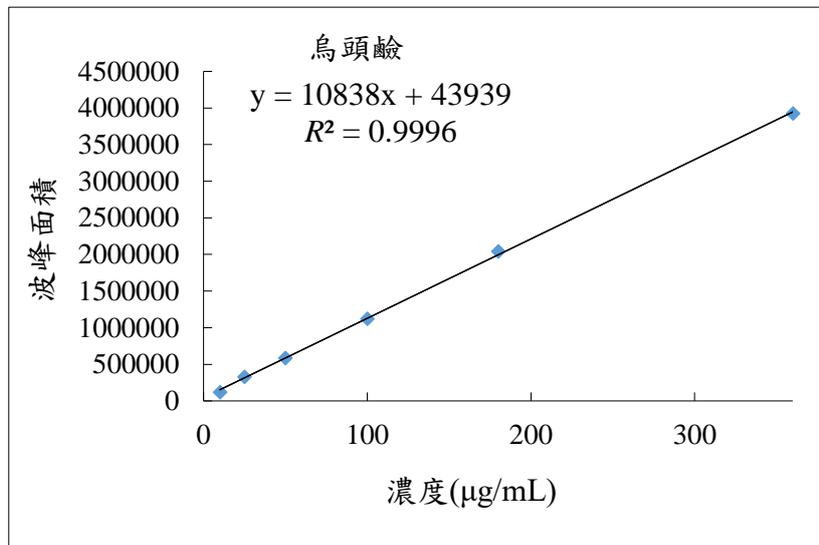
(五) 標準品新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼檢量線

1. 經不同濃度新烏頭鹼(x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 11634x + 29518$ ， $R^2 = 0.9998$ ，顯示濃度在 10–250 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



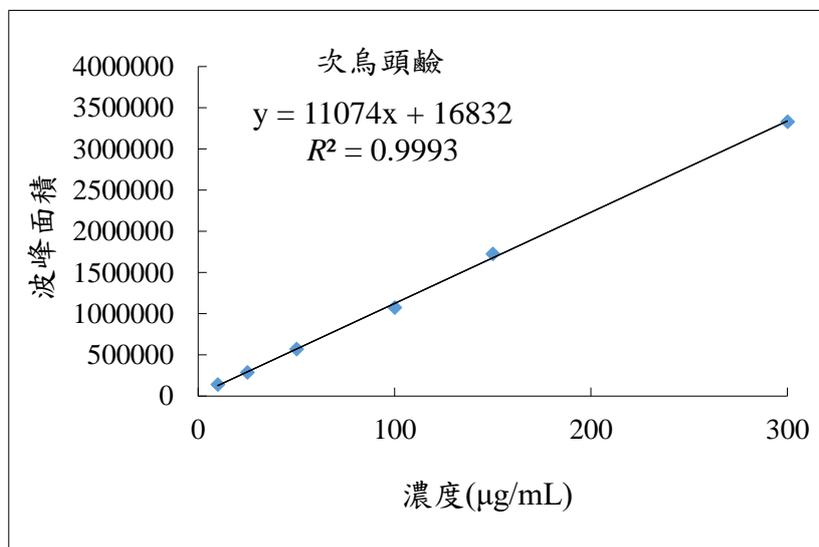
圖三、新烏頭鹼之檢量線圖

2. 經不同濃度烏頭鹼(x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 10838x + 43939$ ， $R^2 = 0.9996$ ，顯示濃度在 10–360 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖四)。



圖四、烏頭鹼之檢量線圖

3. 經不同濃度次烏頭鹼(x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 11074x + 16832$ ， $R^2 = 0.9993$ ，顯示濃度在 10–300 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖五)。



圖五、次烏頭鹼之檢量線圖

表三、新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼之檢量線方程式

對照標準品	濃度(μg/mL)	線性回歸方程式	R ²
新烏頭鹼	10-250	y = 11634x + 29518	0.9998
烏頭鹼	10-360	y = 10838x + 43939	0.9996
次烏頭鹼	10-300	y = 11074x + 16832	0.9993

(六) 精密度試驗

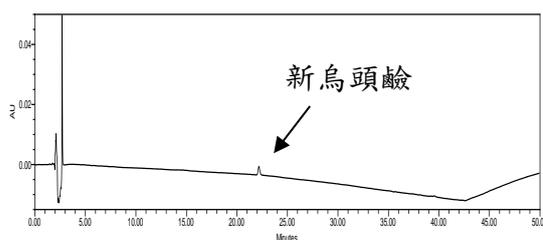
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼精密度之相對標準差分別為 0.24%、0.87%與 0.16%，均在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

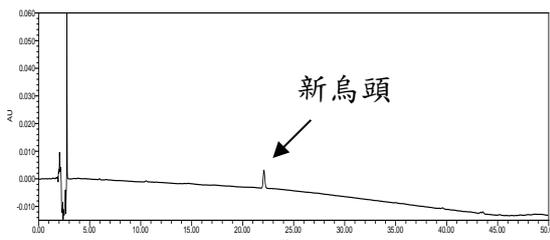
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼重複性之相對標準差分別為 2.22%、1.81%與 1.92%，均在系統適用性要求內。新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼在 24 小時內穩定，穩定性相對標準差分別為 1.44%、1.49%與 1.35%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

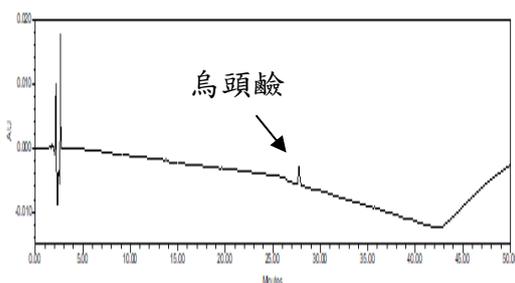
新烏頭鹼偵測極限為 0.2 μg/mL (圖六)，定量極限為 1.0 μg/mL (圖七)。烏頭鹼偵測極限為 0.2 μg/mL (圖八)，定量極限為 0.5 μg/mL (圖九)次烏頭鹼偵測極限為 0.5 μg/mL (圖十)，定量極限為 2.0 μg/mL (圖十一)。



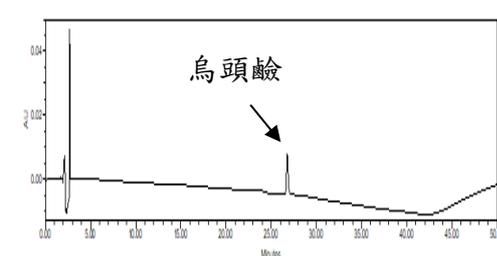
圖六、新烏頭鹼之偵測極限層析圖



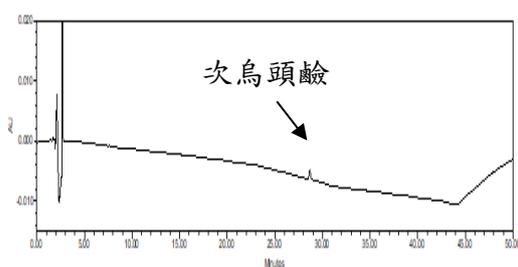
圖七、新烏頭鹼之定量極限層析圖



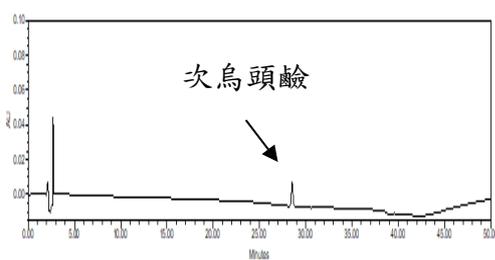
圖八、烏頭鹼之偵測極限層析圖



圖九、烏頭鹼之定量極限層析圖



圖十、次烏頭鹼之偵測極限層析圖



圖十一、次烏頭鹼之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	新烏頭鹼		烏頭鹼	
	濃度	R.S.D. (%)	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	50 µg/mL	0.24	50 µg/mL	0.87
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.6)	2.22	檢品溶液(No.6)	1.81
穩定性 (n=5)	檢品溶液(No.6)	1.44	檢品溶液(No.6)	1.49
偵測極限 (n=1)	0.2 µg/mL	-	0.2 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	1.0 µg/mL	-	0.5 µg/mL	-
檢測項目	次烏頭鹼			
	濃度	R.S.D. (%)		
精密度 (n=5)	50 µg/mL	0.16		
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.6)	1.92		
穩定性 (n=5)	檢品溶液(No.6)	1.35		
偵測極限 (n=1)	0.5 µg/mL	-		
定量極限 (n=1)	2.0 µg/mL	-		

(九) 添加回收率試驗

新烏頭鹼平均添加回收率為 92.1%，相對標準偏差為 2.48% (表五)。烏頭鹼平均添加回收率為 92.8%，相對標準偏差為 3.11% (表六)。次烏頭鹼平均添加回收率為 92.3%，相對標準偏差為 2.06% (表七)。

表五、新烏頭鹼添加回收率

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	R.S.D. (%)
1	1.01	0.1604	0.2	0.3458	92.68	92.07	2.48
2	1.01	0.1604	0.2	0.3480	93.82		
3	1.01	0.1604	0.2	0.3427	91.14		
4	1.01	0.1604	0.2	0.3375	88.57		
5	1.01	0.1604	0.2	0.3487	94.13		

表六、烏頭鹼添加回收率試驗

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	R.S.D. (%)
1	1.01	0.0765	0.06	0.1302	89.45	92.83	3.11
2	1.01	0.0765	0.06	0.1331	94.25		
3	1.01	0.0765	0.06	0.1326	93.46		
4	1.01	0.0765	0.06	0.1308	90.44		
5	1.01	0.0765	0.06	0.1344	96.53		

表七、次烏頭鹼添加回收率

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	R.S.D. (%)
1	1.01	0.0834	0.1	0.1758	92.41	92.27	2.06
2	1.01	0.0834	0.1	0.1751	91.66		
3	1.01	0.0834	0.1	0.1728	89.39		
4	1.01	0.0834	0.1	0.1770	93.61		
5	1.01	0.0834	0.1	0.1777	94.28		

(十) 臺灣市售草烏含量測定

10 批草烏藥材之含量測定結果(乾燥品)如表八所示，新烏頭鹼的含量為 0.011–0.057%，烏頭鹼的含量為 0.002–0.016%，次烏頭鹼的含量為 0.004–0.069%，新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼的總含量為 0.017–0.142%。建議草烏藥材指標成分新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼的總含量在 0.1–0.5%之間。理論板數按新烏頭鹼波峰計算應不低於 5000 (實際值為 77907)，烏頭鹼波峰計算應不低於 5000 (實際值為 110513)，次烏頭鹼波峰計算應不低於 5000 (實際值為 147771)。

表八、臺灣市售草烏檢品之新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼的含量

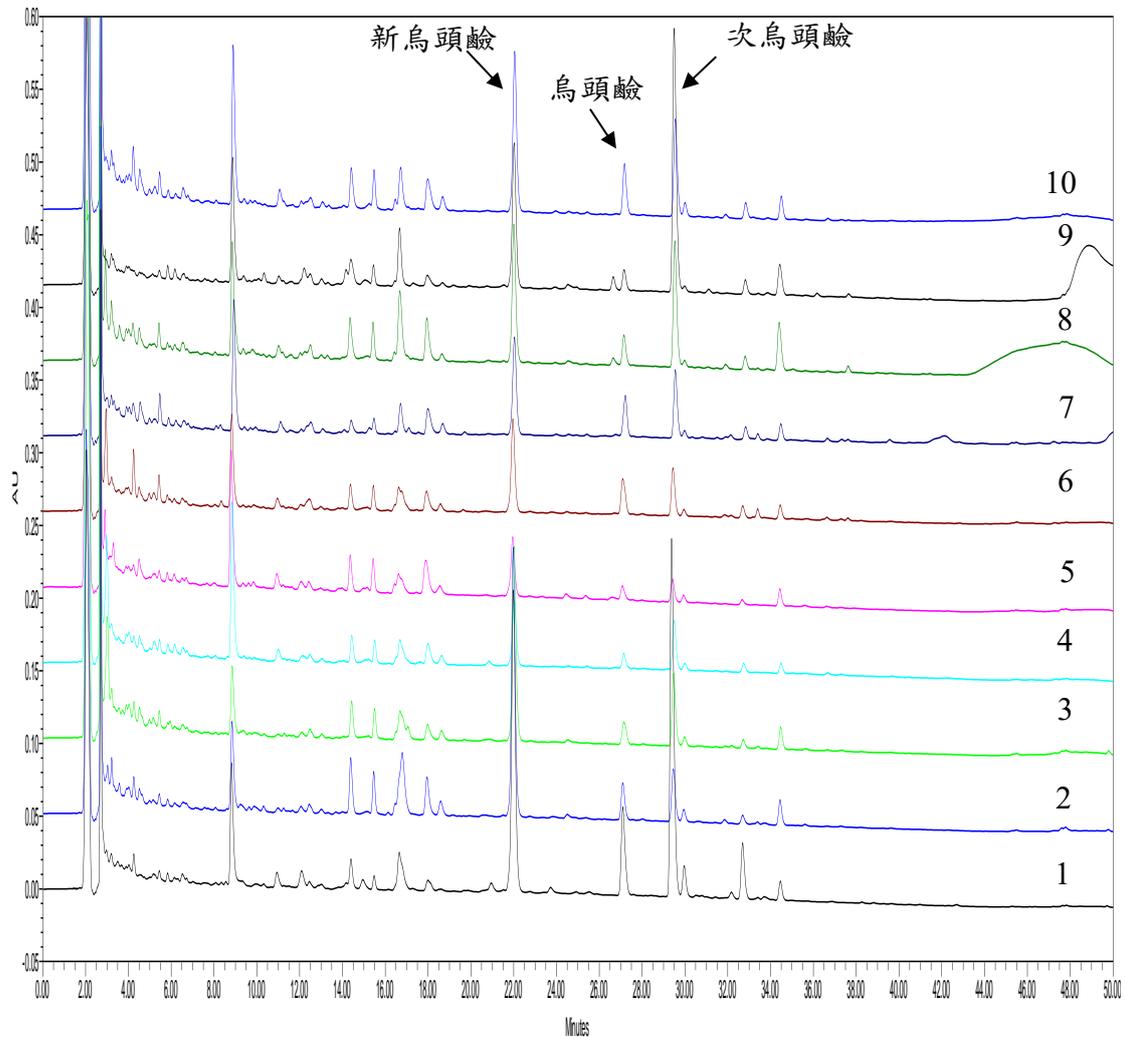
藥材編號 (No.)	新烏頭鹼 含量(%)	烏頭鹼 含量(%)	次烏頭鹼 含量(%)	新烏頭鹼+烏頭鹼+ 次烏頭鹼總含量(%)
1 (ND)	0.057	0.016	0.069	0.142
2 (NDA)	0.049	0.006	0.009	0.064
3 (NDB)	0.035	0.004	0.013	0.052
4 (NF-1)	0.012	0.002	0.009	0.023
5 (NJ)	0.011	0.002	0.004	0.017
6 (CA-1)	0.017	0.007	0.008	0.032
7 (CA-2)	0.017	0.007	0.012	0.036
8 (SGB)	0.024	0.005	0.022	0.052
9 (SUA)	0.026	0.003	0.049	0.078
10 (SUC)	0.029	0.008	0.017	0.054
平均值±S.D.	0.028±0.015	0.006±0.004	0.021±0.021	0.055±0.036

(十一) 草烏藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售草烏檢品溶液各 10 μL 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX Extend C18 Column (250 \times 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 235 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

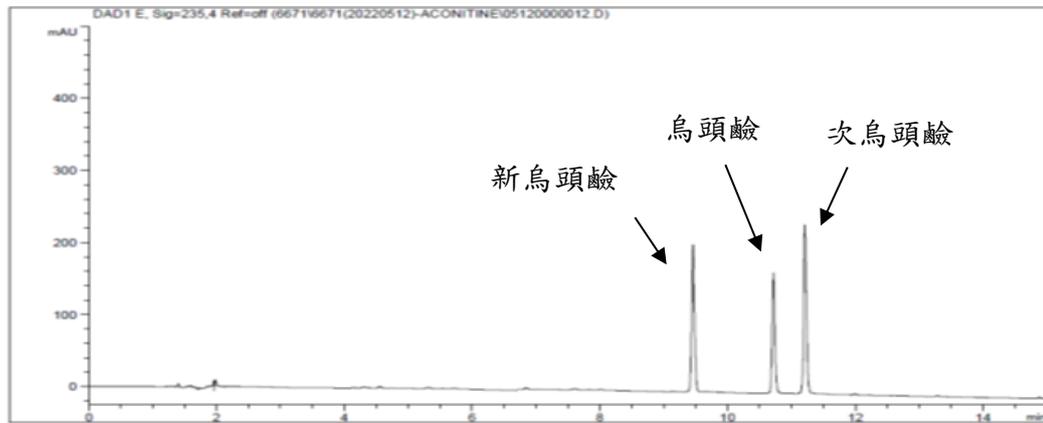
時間(min)	乙腈(%)	0.2% 乙酸(含 25% 氨試液)(v/v, %)
0	24	76
5	31	69
20	45	55
40	78	22
50	100	0



圖十二、10 批草烏藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品草烏、烏頭鹼與次烏頭鹼之 UPLC 層析

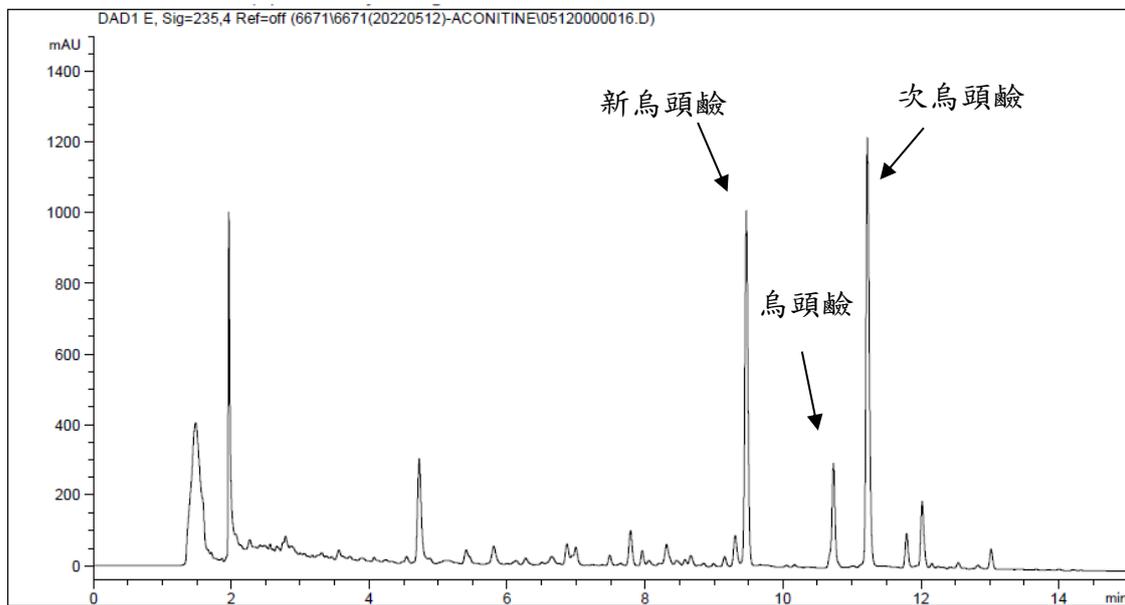
於滯留時間 9.46、10.7 與 11.2 分鐘處顯示新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼標準品波峰(圖十三)。



圖十三、新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售草烏檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 9.47、10.7 與 11.2 分鐘處分別顯示草烏檢品中新烏頭鹼、烏頭鹼與次烏頭鹼波峰(圖十四)。

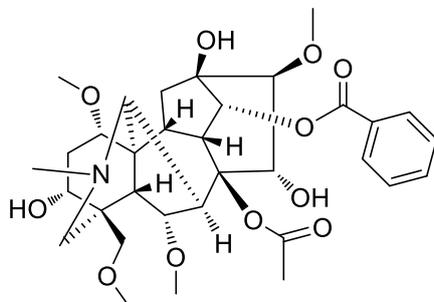


圖十四、市售草烏檢品之 UPLC 層析圖

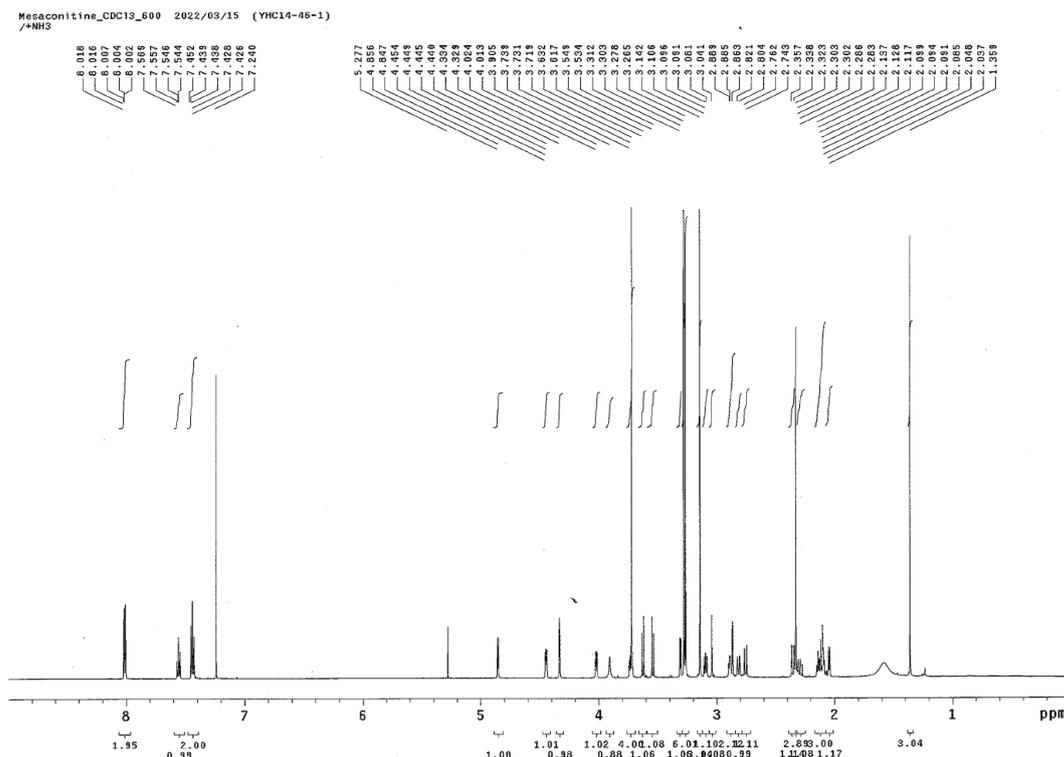
(十四) 新烏頭鹼的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{33}H_{45}NO_{11}$ ；分子量：631.7；熔點：208–210 °C；白色粉末。

(十五) 新烏頭鹼的結構



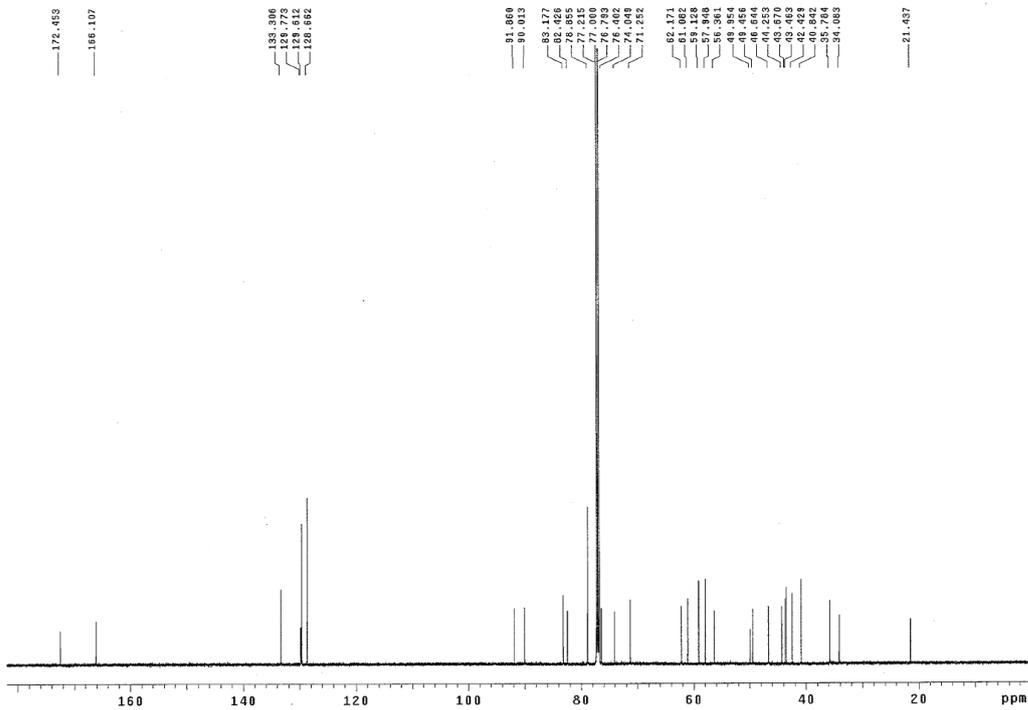
(十六) 新烏頭鹼的 ¹H NMR 圖譜



圖十五、新烏頭鹼的 ¹H NMR 圖譜(CDCl₃)

(十七) 新烏頭鹼的 ^{13}C NMR 圖譜

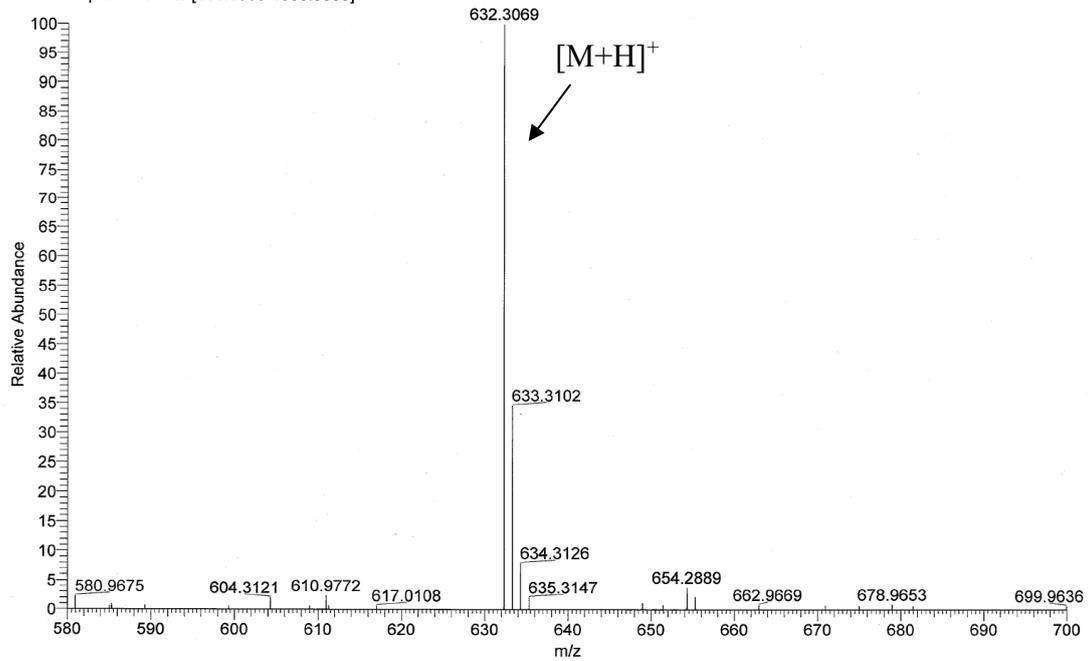
Mesaconitine_CDCl3_600 2022/02/15 (YHC14-46-1)



圖十六、新烏頭鹼的 ^{13}C NMR 圖譜(CDCl_3)

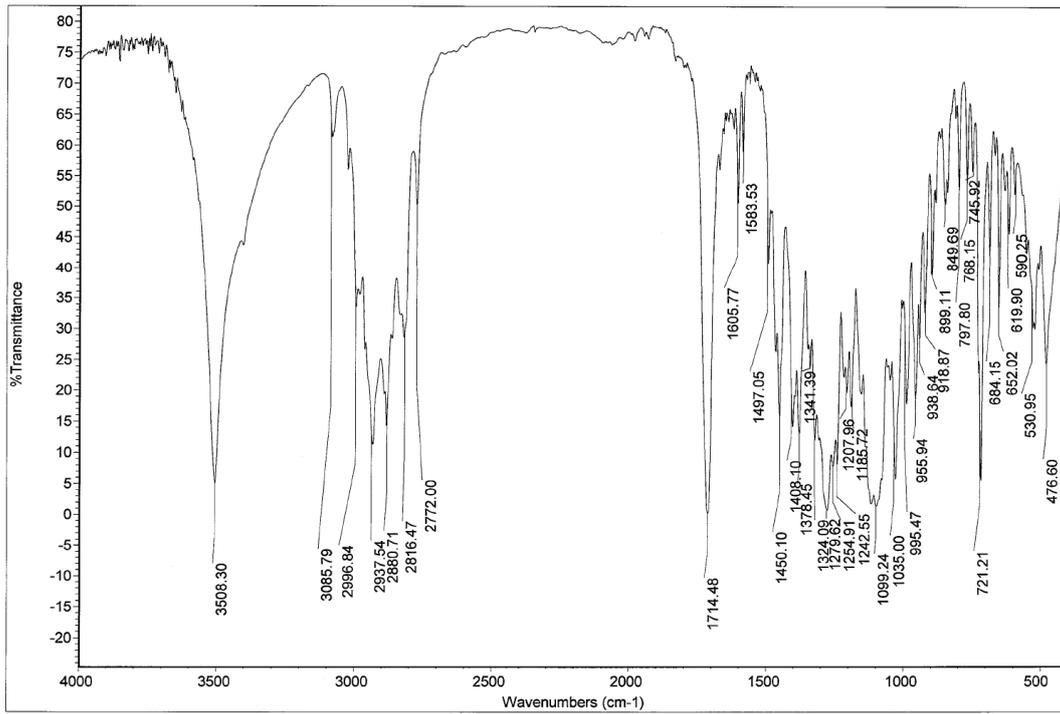
(十八) 新烏頭鹼的 ESI-MS 圖譜

YHC14-46-5 #221 RT: 2.14 AV: 1 NL: 1.10E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0000]



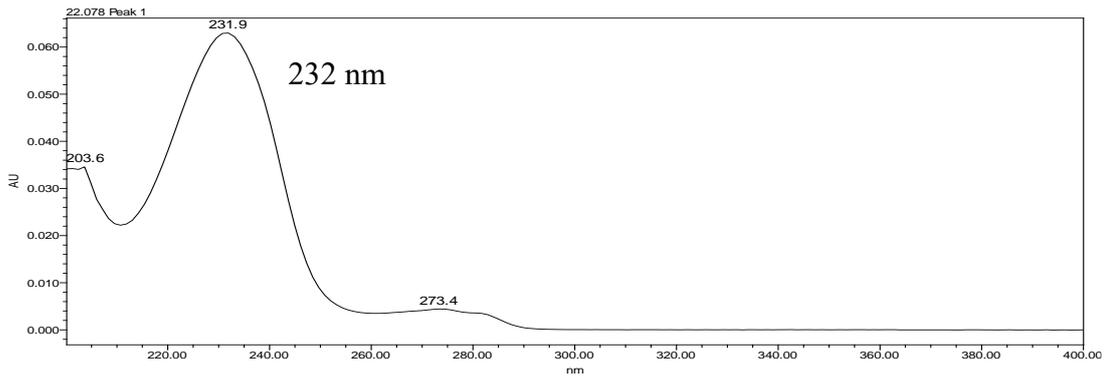
圖十七、新烏頭鹼的 ESI-MS 圖譜

(十九) 新烏頭鹼的 FTIR 圖譜



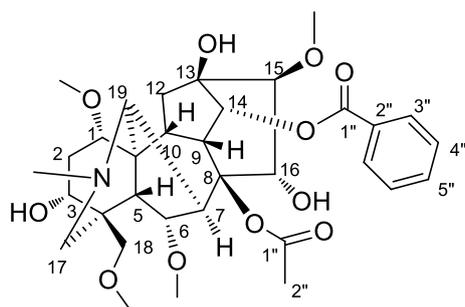
圖十八、新烏頭鹼的 FTIR 圖譜

(二十) 新烏頭鹼的 UV 圖譜



圖十九、新烏頭鹼的 UV 圖譜

(二十一) 新烏頭鹼的氫、碳化學位移



新烏頭鹼

表九、新烏頭鹼氫、碳化學位移(CDCl₃)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	3.09 (dd, 9.0, 6.6)	82.4
2	2.10–2.15 (m), 2.27–2.30 (m)	34.1
3	3.74 (d, 4.8)	71.3
4	-	43.5
5	2.04 (d, 6.6)	46.6
6	4.02 (d, 6.6)	83.2
7	2.86 (s)	43.7
8	-	91.9
9	2.88–2.90 (m)	44.3
10	2.09–2.11 (m)	40.8
11	-	50.0
12	2.09–2.12 (m), 2.80–2.84 (m)	35.9
13	-	74.0
14	4.85 (d, 6.6)	78.9
15	3.31 (d, 5.4)	90.0
16	4.45 (dd, 5.4, 3.0)	78.9
17	2.35 (d, 11.4), 2.76 (d, 11.4)	49.5
18	3.54 (d, 9.0), 3.62 (d, 9.0)	76.4
19	3.04 (s)	62.2
1'	-	172.5
2'	1.36 (s)	21.4
1''	-	166.1
2''	-	129.8
3'', 7''	8.01 (dd, 8.4, 1.2)	129.6
4'', 6''	7.44 (t, 8.4)	128.7
5''	7.54–7.57 (m)	133.3

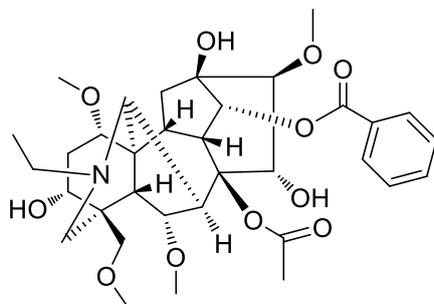
N-CH ₃	2.32 (s)	42.4
1-OCH ₃	3.27 (s)	56.4
6-OCH ₃	3.14 (s)	57.9
15-OCH ₃	3.72 (s)	61.1
16-OH	4.33 (d, 3.0)	-
18-OCH ₃	3.28 (s)	59.1

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

(二十二) 烏頭鹼的分子式、分子量與熔點

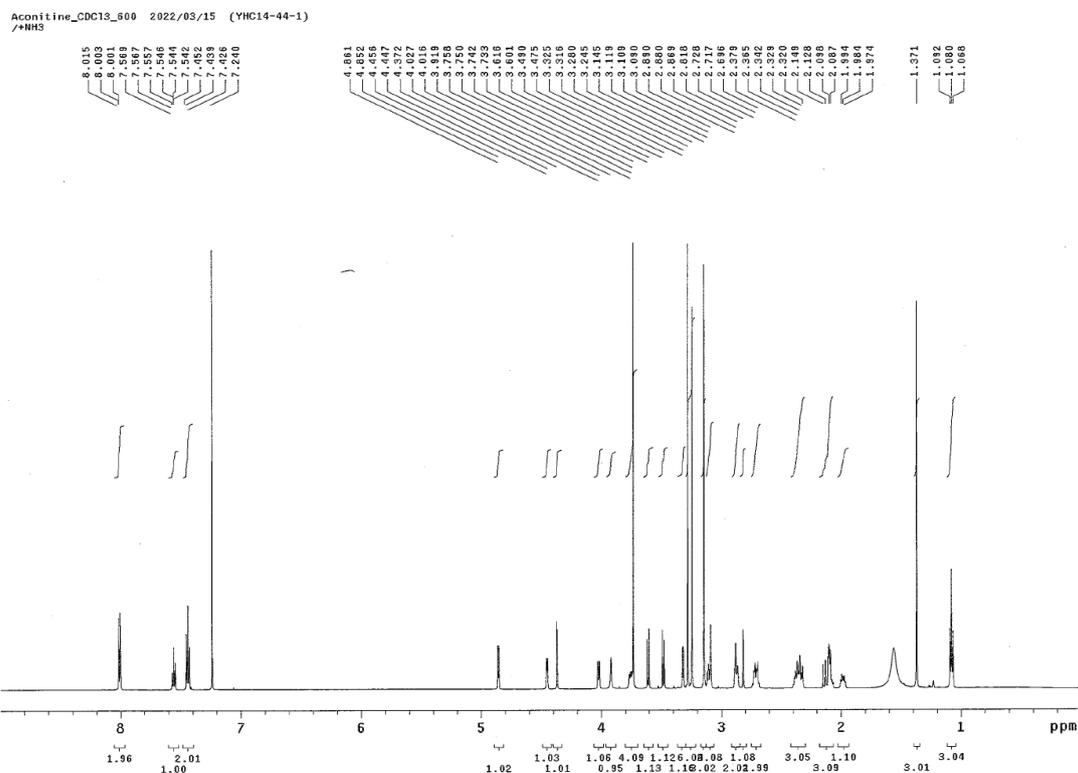
分子式：C₃₄H₄₇NO₁₁；分子量：645.7；熔點：204–206 °C；白色粉末。

(二十三) 烏頭鹼的結構



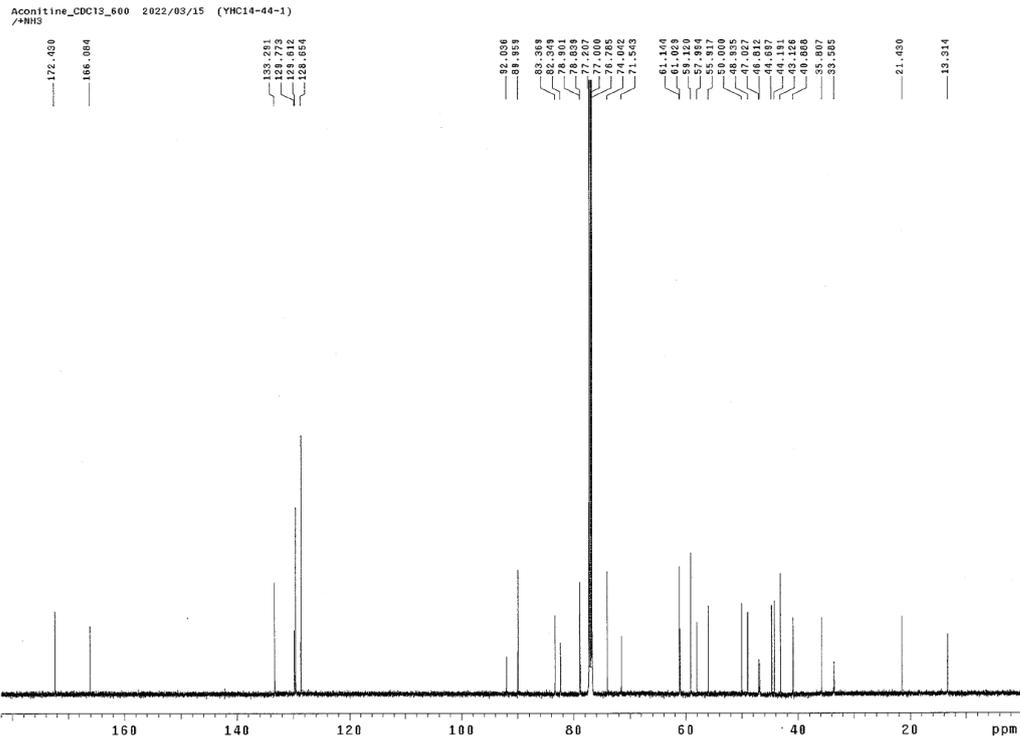
烏頭鹼

(二十四) 烏頭鹼的 ¹H NMR 圖譜



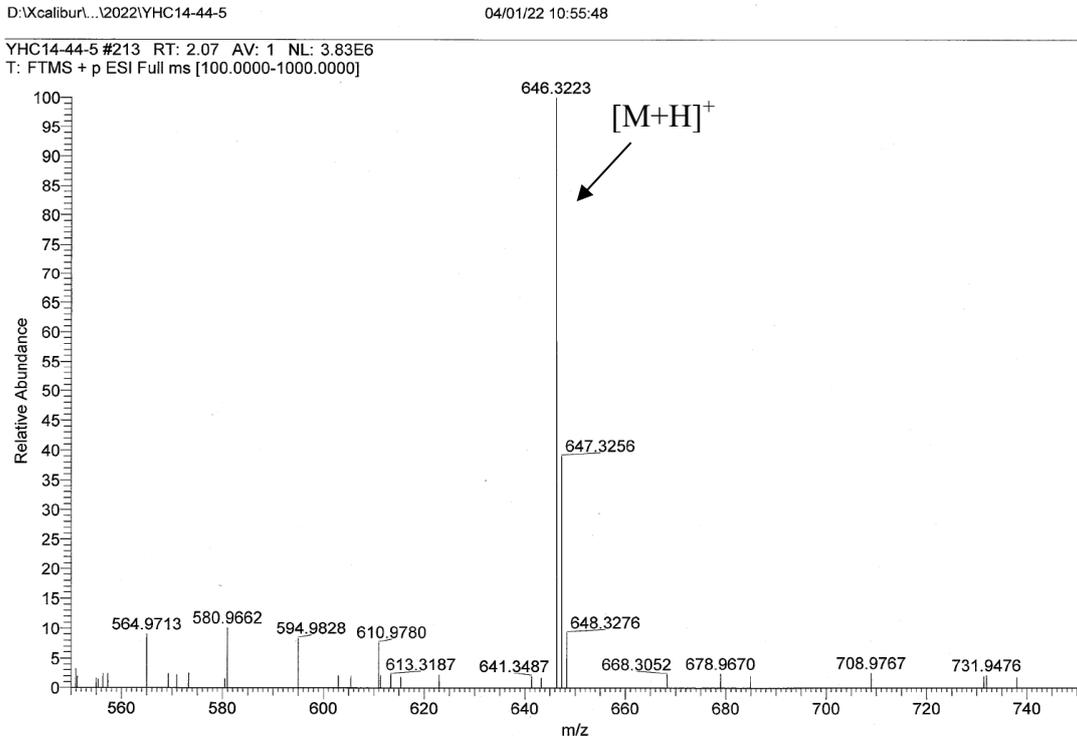
圖二十、烏頭鹼的 ¹H NMR 圖譜(CDCl₃)

(二十五) 烏頭鹼的 ^{13}C NMR 圖譜



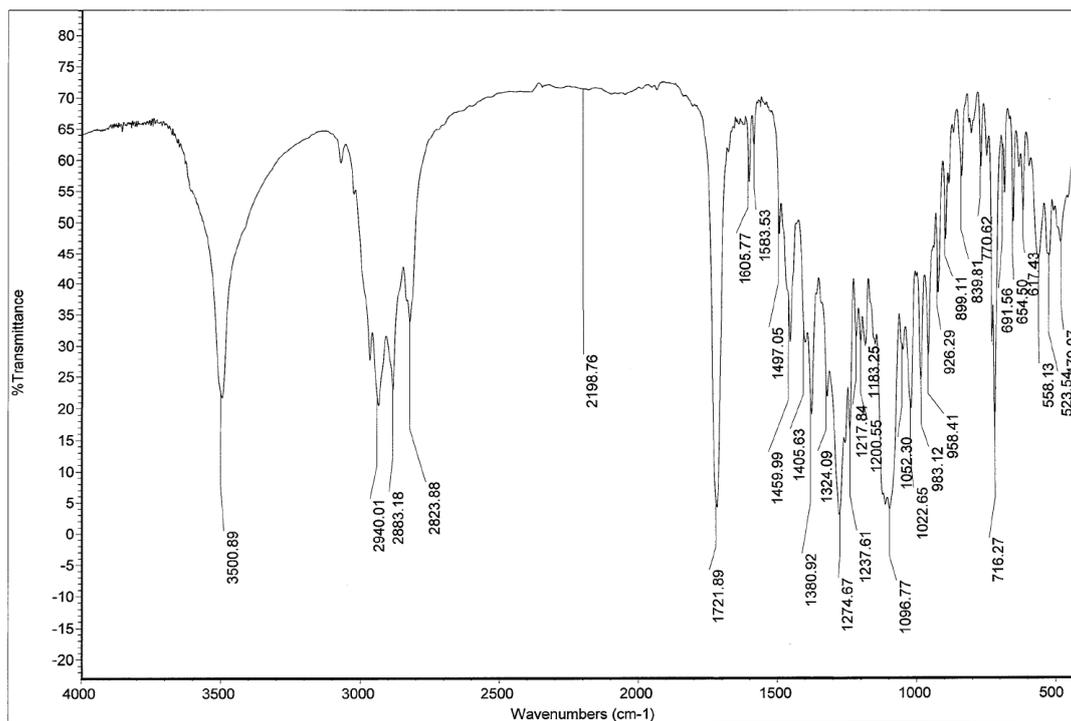
圖二十一、烏頭鹼的 ^{13}C NMR 圖譜(CDCl_3)

(二十六) 烏頭鹼的 ESI-MS 圖譜



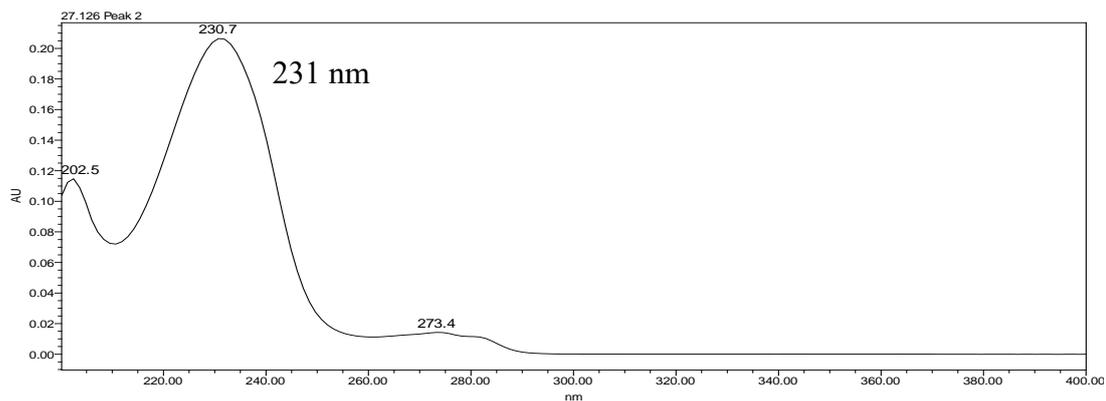
圖二十二、烏頭鹼的 ESI-MS 圖譜

(二十七) 烏頭鹼的 FTIR 圖譜



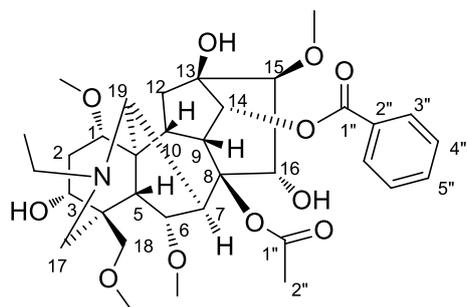
圖二十三、烏頭鹼的 FTIR 圖譜

(二十八) 烏頭鹼的 UV 圖譜



圖二十四、烏頭鹼的 UV 圖譜

(二十九) 烏頭鹼的氫、碳化學位移



烏頭鹼

表十、烏頭鹼的氫、碳化學位移(CDCl₃)^a

position	δ_{H} (600 MHz)	δ_{C} (150 MHz)
1	3.11 (dd, 7.8, 6.0)	82.3
2	1.97–2.00 (m), 2.35–2.40 (m)	33.6
3	3.75 (dd, 9.6, 4.8)	71.5
4	-	43.1
5	2.07–2.10 (m)	46.8
6	4.02 (d, 6.6)	83.4
7	2.82 (s)	44.7
8	-	92.0
9	2.86–2.89 (m)	44.2
10	2.09–2.11 (m)	40.9
11	-	50.0
12	2.08–2.15 (m), 2.68–2.74 (m)	35.8
13	-	74.0
14	4.86 (d, 5.4)	78.8*
15	3.32 (d, 5.4)	90.0
16	4.45 (dd, 5.4, 2.4)	78.9*
17	2.32–2.37 (m), 2.86–2.89 (m)	47.0
18	3.48 (d, 9.0), 3.61 (d, 9.0)	76.8
19	3.09 (s)	61.0
1'	-	172.4
2'	1.37 (s)	21.4
1''	-	166.1
2''	-	129.8
3'', 7''	8.01 (dd, 7.8, 1.2)	129.6
4'', 6''	7.44 (t, 8.4)	128.7
5''	7.54–7.57 (m)	133.3

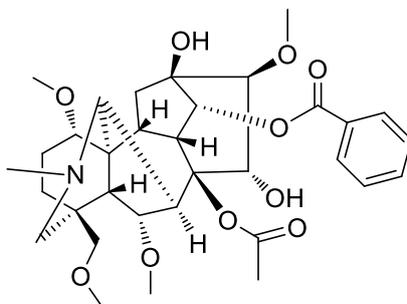
N- <u>CH</u> ₂ CH ₃	2.35–2.40 (m), 2.68–2.74 (m)	48.9
N-CH ₂ <u>CH</u> ₃	1.08 (s)	13.3
1-OCH ₃	3.25 (s)	55.9
6-OCH ₃	3.15 (s)	58.0
15-OCH ₃	3.73 (s)	61.1
16-OH	4.37 (d, 2.4)	-
18-OCH ₃	3.28 (s)	59.1

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

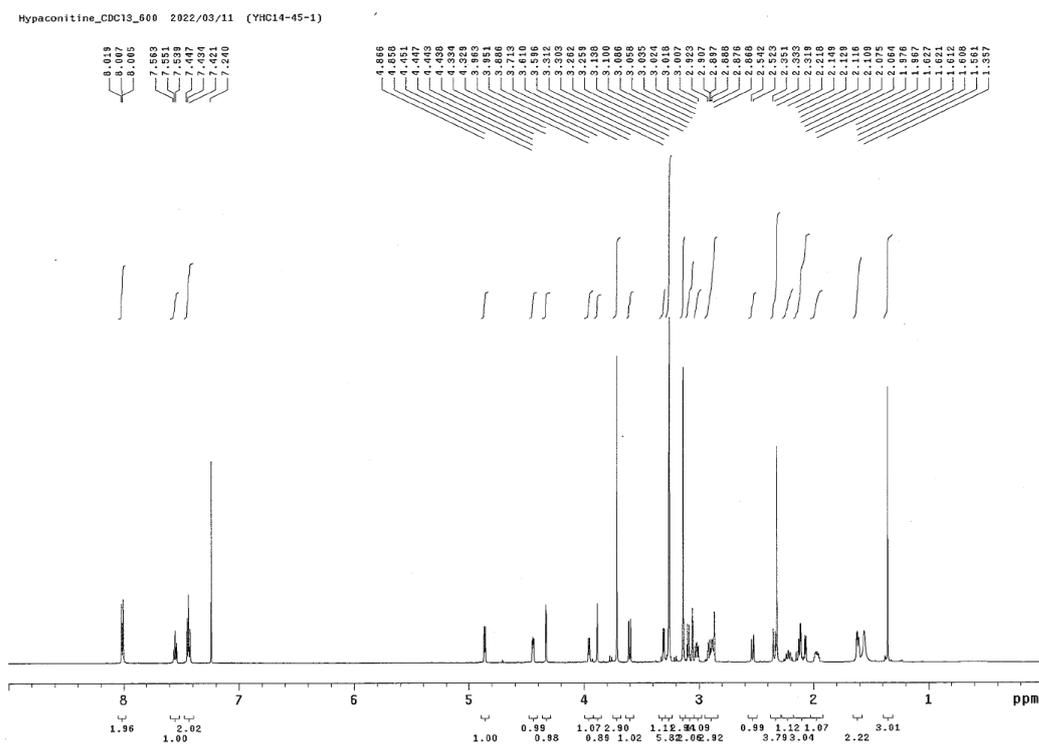
(三十) 次烏頭鹼的分子式、分子量與熔點

分子式：C₃₃H₄₅NO₁₀；分子量：615.7；熔點：198–200 °C；白色粉末。

(三十一) 次烏頭鹼的結構

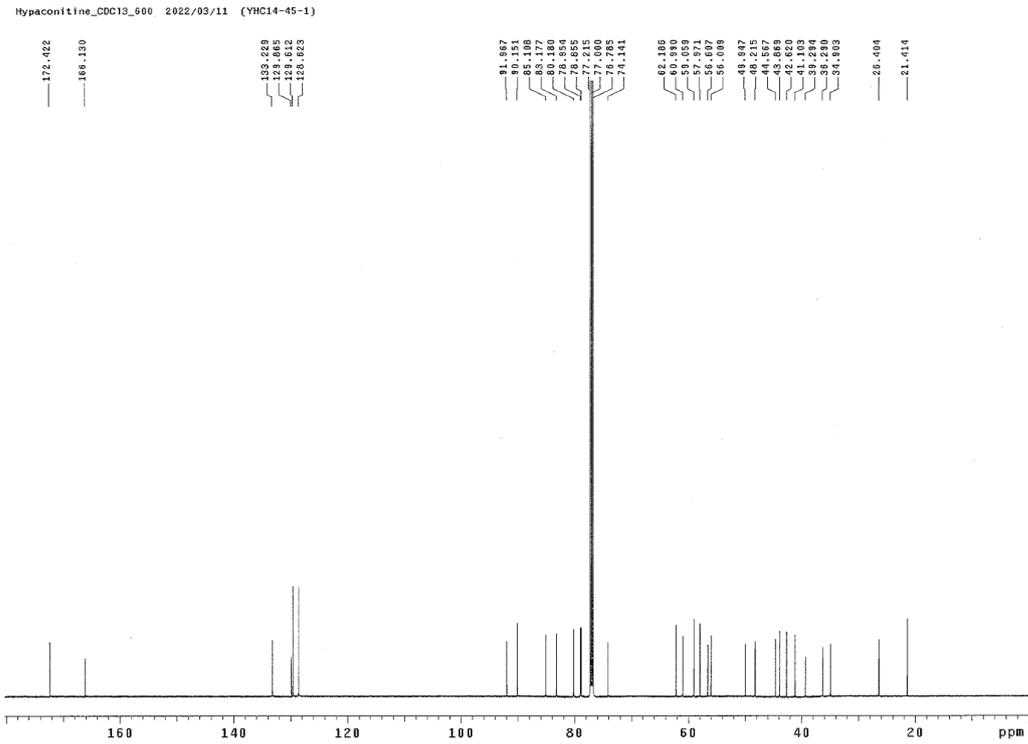


(三十二) 次烏頭鹼的 ¹H NMR 圖譜



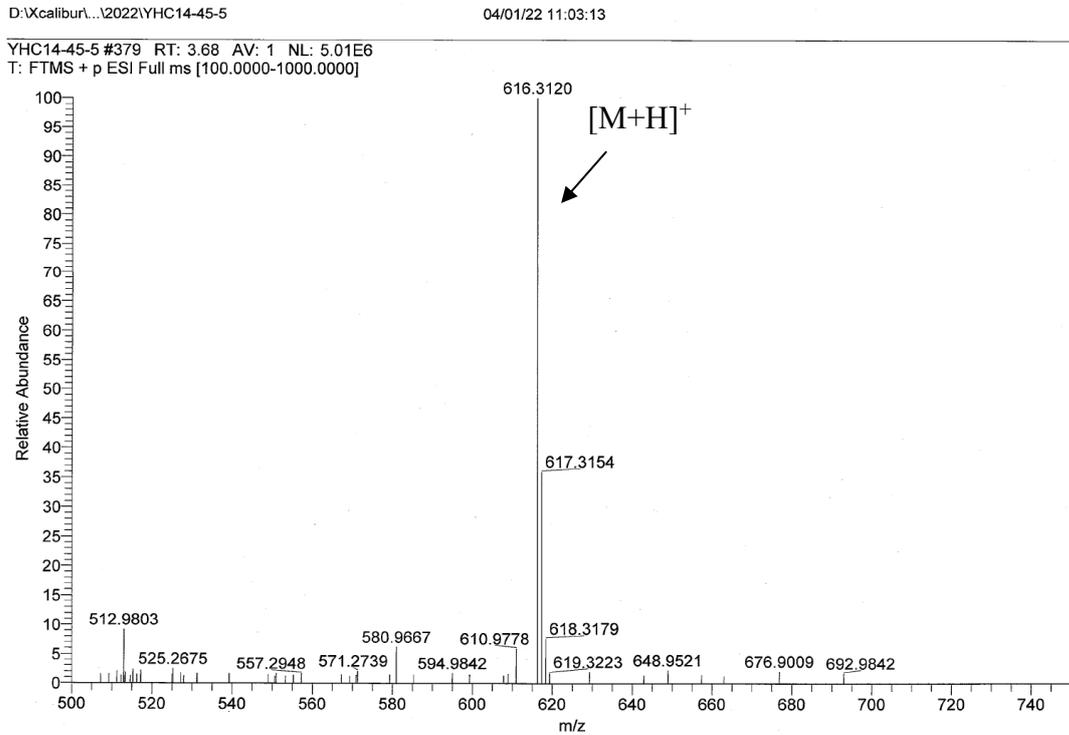
圖二十五、次烏頭鹼的 ¹H NMR 圖譜(CDCl₃)

(三十三) 次烏頭鹼的 ^{13}C NMR 圖譜



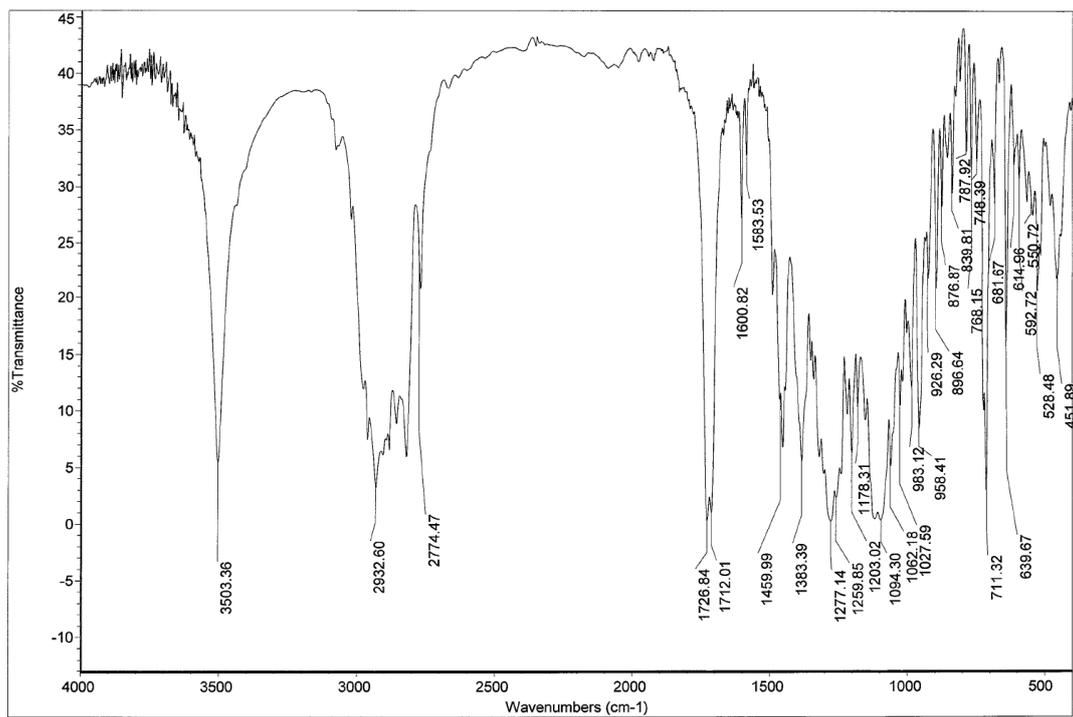
圖二十六、次烏頭鹼的 ^{13}C NMR 圖譜(CDCl_3)

(三十四) 次烏頭鹼的 ESI-MS 圖譜



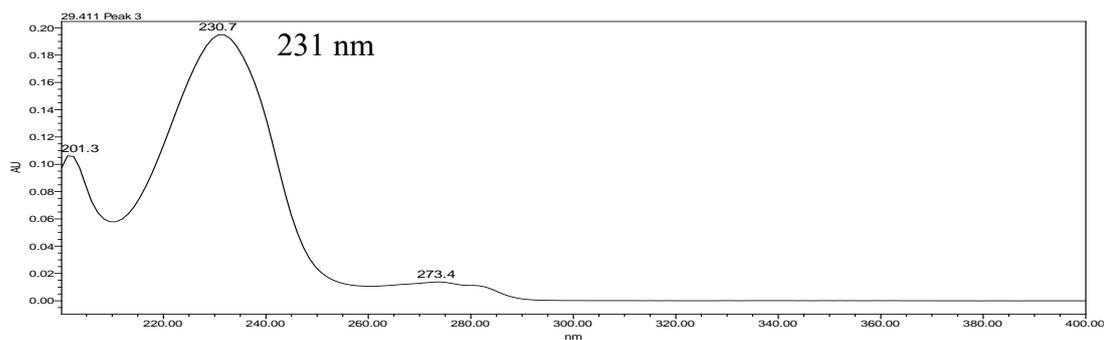
圖二十七、次烏頭鹼的 ESI-MS 圖譜

(三十五) 次烏頭鹼的 FTIR 圖譜



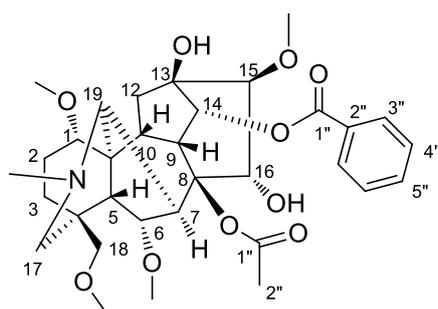
圖二十八、次烏頭鹼的 FTIR 圖譜

(三十六) 次烏頭鹼的 UV 圖譜



圖二十九、次烏頭鹼的 UV 圖譜

(三十七) 次烏頭鹼的氫、碳化學位移



次烏頭鹼

表十一、次烏頭鹼的氫、碳化學位移(CDCl₃)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	3.02 (dd, 10.2, 6.6)	85.1
2	1.95–1.99 (m), 2.19–2.26 (m)	26.4
3	1.61–1.63 (m)	34.3
4	-	39.3
5	2.07 (d, 6.6)	48.2
6	3.96 (d, 6.6)	83.2
7	2.87 (s)	43.9
8	-	92.0
9	2.89–2.92 (m)	44.6
10	2.10–2.15 (m)	41.1
11	-	49.9
12	2.10–2.15 (m), 2.89–2.92 (m)	36.3
13	-	74.1
14	4.86 (d, 4.8)	79.0
15	3.31 (d, 5.4)	90.2
16	4.45 (dd, 5.4, 3.0)	78.9
17	2.34 (d, 11.4), 2.53 (d, 11.4)	56.0
18	3.09 (d, 7.4), 3.60 (d, 7.4)	80.2
19	3.06 (s)	62.2
1'	-	172.4
2'	1.36 (s)	21.4
1''	-	166.1
2''	-	129.9
3''', 7'''	8.01–8.02 (m)	129.6
4''', 6'''	7.43 (t, 7.8)	128.6
5'''	7.54–7.56 (m)	133.2

N-CH ₃	2.32 (s)	42.6
1-OCH ₃	3.26 (s)	56.6
6-OCH ₃	3.14 (s)	58.0
15-OCH ₃	3.71 (s)	61.0
16-OH	4.33 (d, 3.0)	-
18-OCH ₃	3.26 (s)	59.1

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

草烏 TLC

生藥名：ACONITI KUSNEZOFFII RADIX

英文名：Kusnezoff Monkshood Root

基 原：本品為毛茛科 Ranunculaceae 植物北烏頭 *Aconitum kusnezoffii* Rchb.之乾燥根。

一、方法

(一) 檢品溶液 【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》

—取本品粉末 2.0 g，加氨試液 2 mL 潤濕後，加乙醚 20 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加二氯甲烷 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】修飾《中華人民共和國藥典 2020》

—取本品粉末 2.0 g，加氨試液 2 mL 潤濕後，加乙醚 20 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加異丙醇：二氯甲烷(1：1)混合溶液 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 3】《香港中藥材標準第七冊》

—取本品粉末 2.0 g，加 9.1%(w/v)氨溶液 2 mL，和乙醚 20 mL，加蓋，置冰浴中超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加異丙醇：乙酸乙酯(1：1)混合溶液 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 4】(自行開發) ✓

—取本品粉末 2.0 g，加氨試液 2 mL 潤濕後，加異丙醇：乙酸乙酯(1:1)混合溶液 20 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 取烏頭鹼(Aconitine)、次烏頭鹼(Hypaconitine)、新烏頭鹼(Mesaconitine)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 各含 1.0 mg 的溶液，作為對照標準品溶液。

(三) 薄 層 板 HPTLC silica gel 60 F₂₅₄，10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm

(四) 展 開 劑 【展開劑 1】《臺灣中藥典第四版 2021》，《中華人民共和國藥典 2020》

—正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6.4：3.6：1) 氨蒸氣飽和 20 分鐘。

【展開劑 2】《香港中藥材標準第七冊》

—正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6.4：6.8：1) 氨蒸氣飽和 10 分鐘。

【展開劑3】 修飾《臺灣中藥典第四版 2021》✓

—正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6：4：1) 氮蒸氣飽和 20 分鐘。

- (五) 展 開 槽 10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm
- (六) 展 開 展 開槽預先平衡 15 分鐘，上行展開，展開距離 8 cm。
- (七) 顯色&檢視 以碘化鉍鉀試液(Dragendorff Reagent)和亞硝酸鈉-乙醇試液(NaNO_2 -EtOH TS)噴霧後，晾乾，置於可見光下檢視。

二、萃法選擇及濃度測試

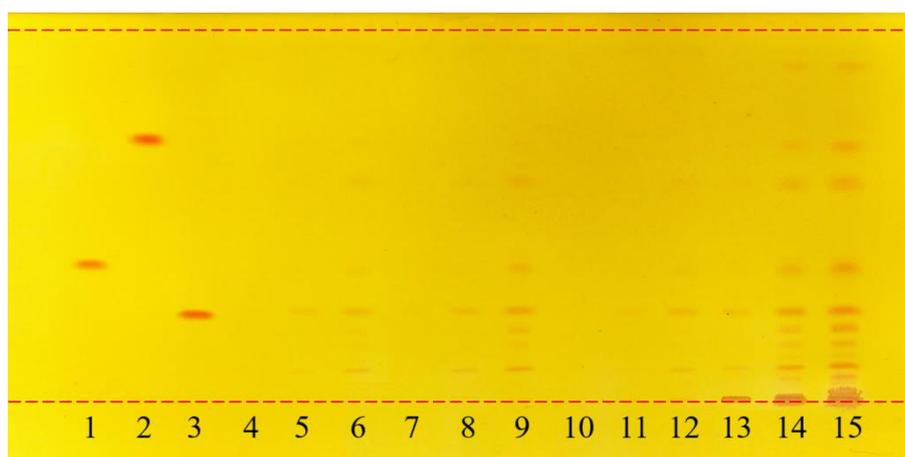
實驗日期：111/05/03

相對溼度(RH)：68%

溫度(RT)：22.3 °C

【展開劑3】修飾《臺灣中藥典第四版 2021》——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6：4：1) 氨蒸氣飽和 20 分鐘。

——HPTLC 碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯色後可見光檢出



編號	名稱	點注量
1	烏頭鹼(1.0 mg/mL)	5 μ L
2	次烏頭鹼(1.0 mg/mL)	5 μ L
3	新烏頭鹼(1.0 mg/mL)	5 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 10 【萃取方法 1】	2, 5, 8 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 10 【萃取方法 2】	2, 5, 8 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 10 【萃取方法 3】	2, 5, 8 μ L
13, 14, 15	檢品溶液 10 【萃取方法 4】	2, 5, 8 μ L

建議萃法：四種萃取法中，皆可分離檢出烏頭鹼，次烏頭鹼，新烏頭鹼，因不使用二氯甲烷且濃度適中，故採用【萃取方法 4】。

建議點注量：烏頭鹼 5 μ L，次烏頭鹼 5 μ L，新烏頭鹼 5 μ L，檢品溶液【萃取方法 4】8 μ L。

三、溶媒系統選擇

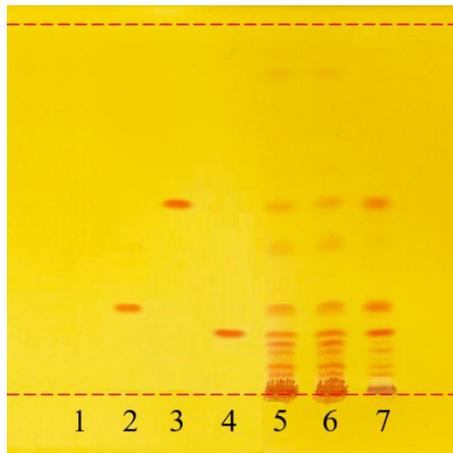
實驗日期：111/05/03

相對溼度(RH)：68%

溫度(RT)：22.3 °C

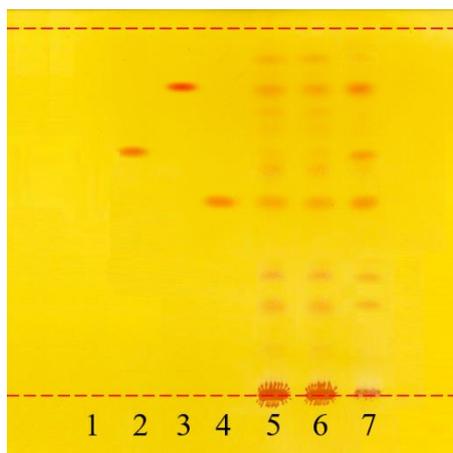
【展開劑 1】《臺灣中藥典第四版 2021》、《中華人民共和國藥典 2020》——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6.4：3.6：1) 氬蒸氣飽和 20 分鐘。

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯色後可見光檢出(烏頭鹼 R_f 值為 0.21、次烏頭鹼 R_f 值為 0.50、新烏頭鹼 R_f 值為 0.14)



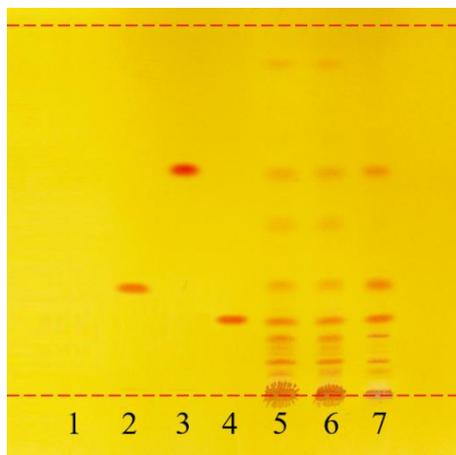
【展開劑 2】《香港中藥材標準第七冊》——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6.4：6.8：1) 9.1%氬蒸氣飽和 10 分鐘。

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯色後可見光檢出(烏頭鹼 R_f 值為 0.7、次烏頭鹼 R_f 值為 0.85、新烏頭鹼 R_f 值為 0.54)



【展開劑 3】修飾《臺灣中藥典第四版 2021》——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6：4：1) 氨蒸氣飽和 20 分鐘。

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯色後可見光檢出(烏頭鹼 R_f 值為 0.30、次烏頭鹼 R_f 值為 0.62、新烏頭鹼 R_f 值為 0.20) ✓



- | | |
|---------|-------------|
| 1：Blank | 4：新烏頭鹼 |
| 2：烏頭鹼 | 5，6：檢品溶液 10 |
| 3：次烏頭鹼 | 7：Spike |

建議溶媒系統：以【萃取方法 4】方式，三種展開劑皆可分離烏頭鹼，次烏頭鹼，新烏頭鹼，其中【展開劑 3】 R_f 值適中，故採用【展開劑 3】。

四、觀察方式選擇

實驗日期：111/05/03

相對溼度(RH)：68%

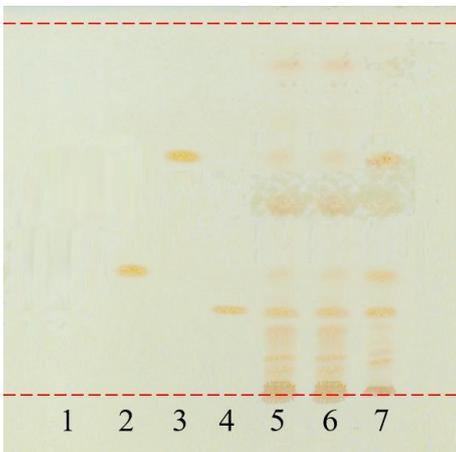
溫度(RT)：22.3 °C

【展開劑 3】修飾《臺灣中藥典第四版 2021》——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6：4：1) 氬蒸氣飽和 20 分鐘。

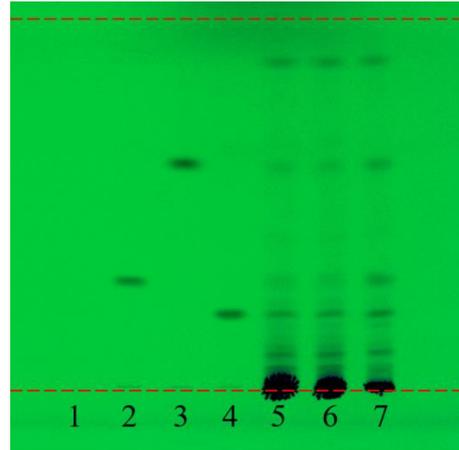
【萃取方法 4】(自行開發)—HPTLC 可見光檢出



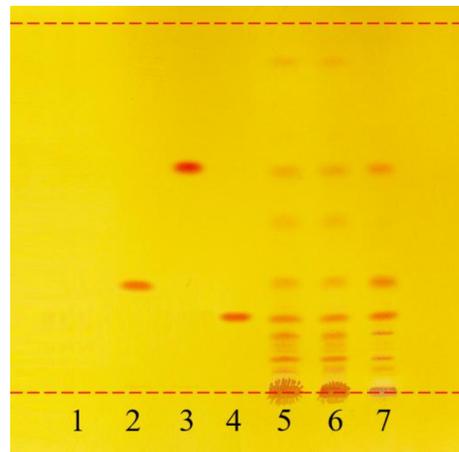
【萃取方法 4】(自行開發)—HPTLC 改良式碘化鉍鉀噴霧劑(改良式卓根道夫噴霧劑) 顯色後可見光檢出



【萃取方法 4】(自行開發)—HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



【萃取方法 4】(自行開發)—HPTLC 碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯色後可見光檢出 ✓



1：Blank

2：烏頭鹼

3：次烏頭鹼

4：新烏頭鹼

5，6：檢品溶液 10

7：Spike

建議觀察方式：以碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯色後可見光檢出，顯示有較明顯分離之條帶。

五、十批草烏藥材樣品檢測

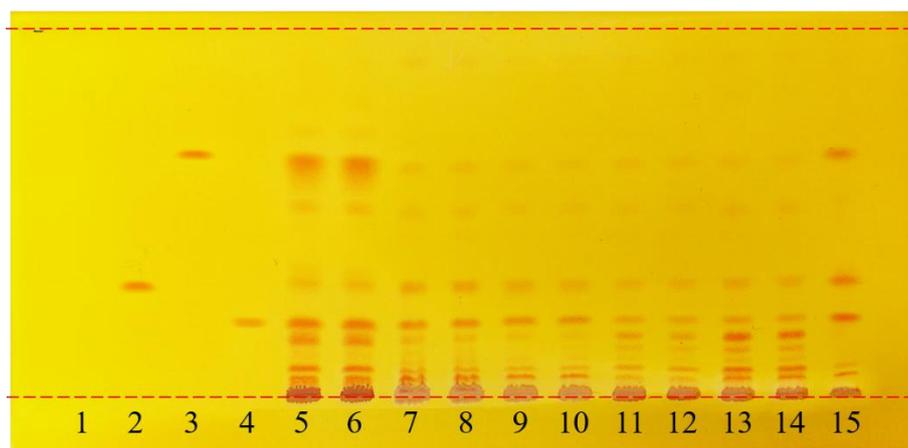
實驗日期：111/05/03

相對溼度(RH)：68%

溫度(RT)：22.3 °C

【展開劑 3】修飾《臺灣中藥典第四版 2021》——正己烷：乙酸乙酯：甲醇
(6：4：1) 氮蒸氣飽和 20 分鐘。

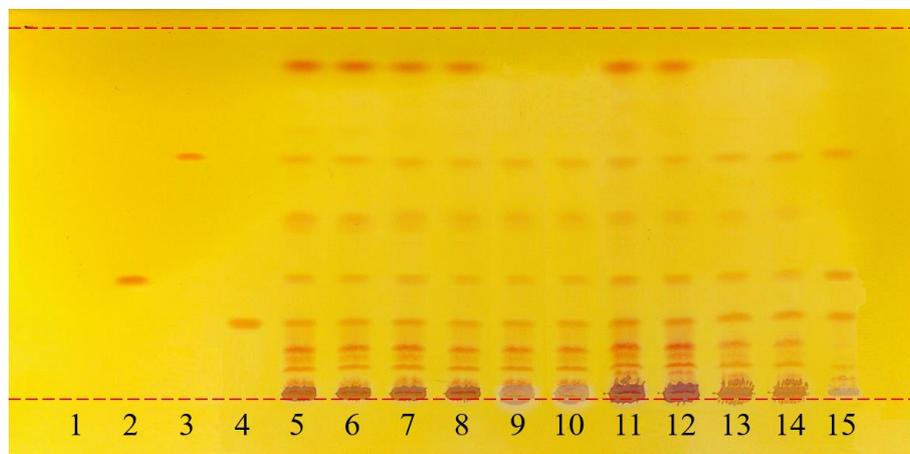
【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯
色後可見光檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 2 (NDA)
2	烏頭鹼(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 3 (NDB)
3	次烏頭鹼(1.0 mg/mL)	11, 12	檢品溶液 4 (NF1)
4	新烏頭鹼(1.0 mg/mL)	13, 14	檢品溶液 5 (NJ)
5, 6	檢品溶液 1 (ND)	15	Spike (檢品溶液 10)

【展開劑 3】修飾《臺灣中藥典第四版 2021》——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6：4：1) 氨蒸氣飽和 20 分鐘。

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯色後可見光檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 7 (CA2)
2	烏頭鹼(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 8 (SGB)
3	次烏頭鹼(1.0 mg/mL)	11, 12	檢品溶液 9 (SUA)
4	新烏頭鹼(1.0 mg/mL)	13, 14	檢品溶液 10 (SUC)
5, 6	檢品溶液 6 (CA1)	15	Spike (檢品溶液 10)

結論與建議：以【萃取方法 4】及【展開劑 3】方式，顯示分離與檢出烏頭鹼、次烏頭鹼及新烏頭鹼的效果較佳，以碘化鉍鉀試液和亞硝酸鈉-乙醇試液顯色後，於可見光下檢視較佳。