

瑞毒霉在白花曼陀罗中消解动态研究

中国医学科学院 药用植物研究所(北京 100094) 张曙明* 陈建民 宋洪涛 刘慧灵
中国协和医科大学

摘要 用 Rp-HPLC 对病毒霉在白花曼陀罗花和叶中的消解动态进行了研究。其色谱柱为 ODS-C₁₈ 柱, 流动相为 MeOH-H₂O(6:4, V/V), 检测波长为 264nm; 瑞毒霉的最小检出量为 2.56×10^{-9} g。样品用硅胶小柱纯化。对白花曼陀罗花和叶的瑞毒霉添加回收率为 73.56%~75.56%, RSD 为 0.48%~3.27%。瑞毒霉在白花曼陀罗叶和花中的消解方程和半衰期分别为 $C = 64.4131e^{-0.2119t}$, $C = 194.31663e^{-0.4743t}$ 和 3.27d, 1.46d。

关键词 瑞毒霉 白花曼陀罗 消解动态 Rp-HPLC

白花曼陀罗 *Datura metel* L. 又名风茄儿、大颠茄、野蓖麻、猪波罗等。在中药配伍中以花入药, 名为洋金花, 其叶为工业提取东莨菪碱的原料。

在栽培过程中霜霉病为其主要病害之一, 瑞毒霉作为一种较新型的內吸收性杀菌剂, 具有保护植物和治疗病害的作用, 在本植物中使用频繁。瑞毒霉在我国的应用较晚, 且尚未见到其残留量分析的正式报道, 而国外对其在农作物中已有一些报道, 其主要分析手段为 GC 和 HPLC^[1~8]。鉴于上述情况, 我们建立了白花曼陀罗叶和花中瑞毒霉残留量分析的 Rp-HPLC 法, 同时测定了瑞毒霉在上述材料中的消解动态和半衰期, 为合理、有效而安全地使用该药, 为防止其污染, 提高药材质量提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂: Varian 2020 HPLC 系统, GJ-601 进样阀(大连化物所), 瑞毒霉标准品(纯度 > 99%, 沈阳化工研究院), 25% 瑞毒霉可湿性粉剂(南通化工厂), 100~200 目柱层析用硅胶(青岛海洋化工厂), Elma 310 超声清洗器, ZFQ-85A 真空旋转蒸发器, 20 × 0.8cm 玻璃柱。其它溶剂均为分析纯。

1.2 白花曼陀罗材料的处理与采集: 在本所植物园设试验面积 24m², 3 个重复处理小

区, 一个空白对照区, 每小区 3m², 每处理间设有保护行。用 25% 瑞毒霉可湿性粉剂按 200g/666m² 的用量兑水 60kg 均匀地喷雾于白花曼陀罗叶和花表面(以叶面有液滴滴下为止), 然后按 1/12、1、3、7、10 及 15d 分别随机采取叶片和花, 供消解动态研究之用(样品存放于低温冰箱中)。检测前从冰箱中取出, 迅速在低温处风干后称量提取。

2 分析方法

2.1 色谱条件: 250 × 4.0mm (i. d) C₁₈-ODS 柱(10μm), 室温, 进样: 10μl, 流速: 1.0ml/min, 检测波长: 264nm, 流动相: MeOH-H₂O(6:4, V/V), 灵敏度: 0.08AUFS, 瑞毒霉的保留时间 9.72 ± 0.16 min, 最小检出量为 2.56×10^{-9} g, 理论塔板数 n 为 2700。

2.2 样品前处理: 准确称取叶和花的干燥粉末 2g 于 50ml 具塞三角瓶中, 加入 40ml 丙酮浸泡过夜, 超声提取 1h, 抽滤, 残渣加入 30ml 丙酮超声 0.5h, 抽滤。残渣及滤纸用丙酮洗涤 2~3 次, 合并全部滤液, 于旋转蒸发器上(水浴温度为 45~50℃)浓缩近干, 转移至小烧杯中, 挥至近干时, 加入适量硅胶拌样, 干燥, 上样至预先装好小硅胶柱中(8g 硅胶), 用石油醚-乙酸乙酯(2:1, V/V)湿法装柱, 且用它作为洗脱液, 洗脱, 弃前流出液, 收集黄色-淡黄色部分(约 80ml), 经旋转蒸发

* Address: Zhang Shuming, Institute of Medicinal Plant, China Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing

器(水浴温度 45~50℃)浓缩近干,甲醇溶解、转移并定容于容量瓶中,待测。

2.3 标准曲线的绘制:准确称取瑞毒霉标准品 3.2mg 于 10ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度线,配成贮备液,准确移取 40、60、80、100 和 500 μ l 贮备液分别于 1.0ml 容量瓶中,甲醇定容。在上述色谱条件下测定,得到其回归方程为: $Y=1.1864 \times 10^{-6} X + 0.0162$, $r=0.9999$ 。式中 Y 为瑞毒霉含量(μ g), X 为峰面积。

2.4 样品中瑞毒霉含量测定:按上述色谱条件,采用外标法测定各待测样品中瑞毒霉含量,并用标准液作随行对照。根据 HPLC 测得数据计算出瑞毒霉在叶和花中的消解动态和半衰期。样品中瑞毒霉含量的计算公式为:

瑞毒霉含量(mg/kg)=

$$\frac{\text{样品峰面积} \times \text{标准品含量}(\mu\text{g})}{\text{标准品峰面积} \times \text{样品重量}(\text{g})} \times \text{定容体积}$$

消解方程为: $C=Ae^{-Bt}$, C 为不同天数(t)样品中瑞毒霉含量,根据 HPLC 数据,经回归计算得出 A、B 值。半衰期 $t_{1/2}=0.6933/B$ 。

2.5 样品精密测定:取同一批白花曼陀罗叶(第一天),花(第三天),按上述方法提取,净化并测定,每批样品重复 5 次。测得白花曼陀罗叶和花的精密 RSD 分别为 1.88% 和 1.78%。

2.6 回收率测定:分别准确称取未经农药处理过的白花曼陀罗叶和花各 2g,置于具塞三角瓶中,分别加入一定体积的标准品溶液,混匀凉干。按上述方法提取,净化并测定瑞毒霉含量。每处理重复 3 次,计算其回收率。

3 结果与讨论

3.1 瑞毒霉在白花曼陀罗叶和花中的消解动态和半衰期见表 1,回收率测定结果见表 2。从表 1 可以发现,瑞毒霉在白花曼陀罗花中的消解较叶中快,这可能跟这二部位的化学成分不同有关(花中以东莨菪碱为主,莨菪碱次之,而叶中则正好相反^[9])。沈一行等^[10]曾报道了敌克松对白花曼陀罗和毛曼陀罗中

表 1 瑞毒霉在白花曼陀罗叶和花中的消解动态(mg/kg, n=3)($\bar{x} \pm s$)

| 取样间隔期(d) | 叶 | 花 |
|---------------|-------------------------|--------------------------|
| 1/12 | | 174.9 \pm 9.36 |
| 1 | 64.5 \pm 1.10 | 136.4 \pm 4.59 |
| 3 | 34.4 \pm 0.97 | 41.2 \pm 0.83 |
| 7 | 11.1 \pm 1.07 | 8.2 \pm 0.71 |
| 10 | 7.1 \pm 0.24 | 1.6 \pm 0.01 |
| 15 | 3.2 \pm 0.35 | |
| 消解方程 | $C=64.4131e^{-0.2119t}$ | $C=194.3163e^{-0.4743t}$ |
| 相关系数 r | -0.9871 | -0.9980 |
| 半衰期 $t_{1/2}$ | 3.27 | 1.46 |

--:未检出

表 2 回收率测定结果(n=3)($\bar{x} \pm s$)

| 样品名称 | 添加标准品(μ g) | 检出量(μ g) | 回收率(%) | RSD(%) |
|------|-----------------|-----------------|------------------|--------|
| 花 | 5.70 | 4.20 \pm 0.02 | 73.67 \pm 0.35 | 0.48 |
| | 9.12 | 6.75 \pm 0.09 | 73.99 \pm 1.01 | 1.37 |
| 叶 | 5.70 | 4.31 \pm 0.12 | 75.56 \pm 2.11 | 2.79 |
| | 9.12 | 6.71 \pm 0.22 | 73.56 \pm 2.40 | 3.27 |

二种主要生物碱(东莨菪碱和莨菪碱)的含量有明显的影晌,由于瑞毒霉的结构跟这一种生物碱有相似之处,故它们之间存在着相互影响。从表 2 得知,其回收率均不是很高,反映了采用硅胶净化样品时有损失,同时瑞毒霉标准品在这两种材料中的添加水平为 2.85~4.56 μ g/g,实际添加量很低,样品吸附及转移过程也造成一定损失。

3.2 由于白花曼陀罗叶和花中成分复杂,且莨菪碱和东莨菪碱含量较高,其物理性质跟瑞毒霉有相似之处,故对瑞毒霉的分离干扰较大。我们曾用了多种吸附剂进行了净化试验,结果不满意。最后采用硅胶 TLC 展开,发现瑞毒霉与黄色部分有重叠,且与前后色带有很好的分离度。空白样品经 TLC 展开,刮下相同部位的硅胶,经溶剂洗脱,用 HPLC 测定,对瑞毒霉无干扰,又经柱层析进一步验证,说明此方法可行,故最后采用了上述硅胶柱净化的条件。

3.3 检测波长的选择:经过瑞毒霉标准品的 UV 吸收情况(在 264nm 和 272nm 处有吸收),选择其最大吸收峰 264nm 作为 HPLC

的检测波长。曾有文献报道,选用 220nm^[7]和 275nm^[8]作为检测波长,但本实验中曾作了用此波长为检测波长,但均没有 264nm 处好。

3.4 根据以上实验结果,并参照 WHO 和 FAO 在 1985 年推荐的瑞毒霉在农作物上的最大残留量标准(MRL)在 0.1~0.5 $\mu\text{g/g}$,结合南洋金花在中药制剂与配伍中的应用情况,建议在白花曼陀罗上最后一次使用瑞毒霉(使用量为 1kg/ha)到收获的安全间隔期为 15d。

参考文献

- 1 Speck M, et al. J Chromatogra, 1980, 200: 313
- 2 Francesco T, et al. J Agric Food Chem, 1981, 29: 1296
- 3 Caverly D J, et al. Analyst, 1981, 106: 389
- 4 Getzin L W, et al. J Assoc Off Anal Chem, 1989, 72: 361
- 5 Vuik J, et al. J Agric Food Chem, 1989, 37: 88
- 6 El-Yasery I I, et al. Arab J Plant Prot, 1991, 9: 23
- 7 Lopez L F, et al. J Agric Food Chem, 1989, 37: 684
- 8 Khazanchi R, et al. Int J Trop Agric, 1989, 7: 129
- 9 CA, 60: 7870c
- 10 沈一行,等. 中药材, 1993, 16(3): 7

(1995-12-21 收稿)

Studies on the Dispelled Dynamics of Metalaxyl in Hindu Datura (*Datura metel*)

Zhang Shuming, Chen Jiangmin, Song Hongtao, et al

Dispelled dynamics of metalaxyl in both leaves and flowers of *Datura metel* L. were studied by Rp-HPLC. ODS-C₁₈ was used as the column with MeOH-H₂O(6:4) as the mobile phase at a detection wavelength of 264nm. The limit of detection of metalaxyl was $2.56 \times 10^{-9}\text{g}$, while the samples were purified through a small silica gel column. The added recovery rates of metalaxyl in these samples were 73.56%~75.56%. RSD was 0.48%~3.27%. The dispelled equation and the half-life time of metalaxyl in leaves and flowers were $C = 64.4131e^{-0.2119t}$, 3.27 days and $C = 194.3163e^{-0.4743t}$, 1.46 days respectively.

根痛平片中葛根素的含量测定

北京医科大学实验药厂(10083) 张世勤* 李树琦 胡长风 柳林

摘要 应用 HPLC 法测定根痛平片中葛根素的含量,作为控制该制剂质量的方法。

关键词 HPLC 根痛平片 葛根 葛根素

根痛平片是治疗颈椎病较为有效的药物,由牛膝、葛根、伸筋草、红花、乳香、没药等多味中药组成。其功能是祛风止痛,养血活血,可以治疗由于颈椎病引起的颈部痛、肩臂痛、坐骨神经痛,以及各种原因引起的神经根痛病。组方中的葛根在治疗颈项强痛方面起着很重要的作用,其主要成分为葛根素,因此测定葛根中的葛根素含量,对控制根痛平片

的质量是有着十分积极的意义的。

1 仪器与试剂

美国 SP 公司 P4000 型高效液相色谱仪, FOCUS 紫外检测器, SP386E 色谱工作站, 甲醇为优级纯, 双蒸水由北京医科大学提供, EDTA 及磷酸氢二钠均为分析纯, 葛根素为中国药品生物制品检定所提供, 根痛平片为北京医科大学实验药厂生产。

* Address: Zhang Shiqin, Experimental Factory, Beijing Medical University, Beijing