

大小顺序为氮>磷≥钾,进行氮、磷、钾 3 要素配合施用能显著提高福田白菊产量、外观品质和内在品质。因此,在福田白菊的种植生产上要在合理施用氮肥的基础上增施磷、钾肥,以提高基地菊花的产量和品质。但氮、磷、钾 3 要素在福田白菊上的合理施用量与比例以及其对白菊药用品质合成代谢影响的机制还有待进一步深入研究。

References

- [1] Hu C. Research on oxidation-resisting quality of flavonoids viz. study on the effect of biological antioxidation and health protection of *Chrysanthemum morifolium* [A]. Dissertation of Doctor's Degree of Wuxi University of Light Industry (无锡轻工大学博士学位论文) [D]. Wuxi: Wuxi University of Light Industry, 1994.
- [2] Li P, Chen K L, Ye C J. Study of quality on medicinal *Chrysanthemum morifolium* of Hubei Futianhe [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2004, 27(2): 102-103.
- [3] Yang J, Jiang H Z, Xu Z H. Study on extraction techniques and variety trends of flavonoids in *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(11): 988-999.
- [4] Bao S T. *Soil and Agricultural Chemistry Analysis* (土壤与农业化学分析) [M]. 3rd ed. Beijing: Chinese Agriculture Publishing House, 2000.
- [5] Ch P (中国药典) [S]. Vol II. 2000.
- [6] Yu C, Yu S, Shen X H. Study on determination method of general flavones in health foods [J]. *Chin J Health Lab Tech* (中国卫生检验杂志), 2002, 12(4): 4-5.
- [7] Wu J S, Ying Y Q, Cao F L, et al. The effects of phosphorus application on leaves output and flavone content in leaves of *Ginkgo* [J]. *J North Forest Univ* (东北林业大学学报), 2003, 31(1): 17-18.
- [8] Wu J S, Ying Y Q, Cao F L, et al. Effects of nitrogen application on leaf output and flavone content in *Ginkgo* leaves [J]. *J Zhejiang Forest Coll* (浙江林学院学报), 2002, 19(4): 372-375.
- [9] Wu L J. *Natural Medication Chemistry* (天然药物化学) [M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003.
- [10] Xu L C, Zhang Y Q, Jiang X J, et al. Effect of fertilization on the growth of Japanese Honeysuckle (*Lonicera japonica*) and its contents of chemical composition [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(10): 620-622.

HPLC 法同时测定两面针中 5 种生物碱

施 瑶¹, 李定祥¹, 李光平², 闵知大^{1*}

(1. 中国药科大学 天然药物化学教研室, 江苏 南京 210009; 2. 上海市饲料质量监督检测中心, 上海 201106)

芸香科花椒属 (*Zanthoxylum* L.) 植物含有多类型生物碱, 主要为苯并菲啶类、喹啉类和异喹啉类生物碱。具有多种特殊而显著的生理作用, 主要有抑制血小板凝集、细胞毒活性、抑制 DNA 异构酶和选择性抑菌作用^[1]。为了更好地研究生物碱在花椒属植物中的分布, 建立一个有效的生物碱定量的方法非常必要。

两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 是花椒属中我国民间常用药, 通常以氯化两面针碱的量作为其质控指标, 如《中国药典》用薄层扫描法^[2]测定, 少量文献报道是用 HPLC 法^[3-5]测定, 然而还未见对多种类型生物碱定量分析方法的报道。本实验以两面针为例, 用 HPLC 法同时测定性质相差较大的 5 种生物碱的量。这些生物碱是苯并菲啶类生物碱: 氯化两面针碱 (nitidine chloride, I), 去-N-甲基白屈菜红碱 (N-norchelerythrine, II); 喹啉类生物碱: 茵芋碱 (skimmianine, III); 异喹啉类生物碱: 鹅掌楸碱 (liriodenine, IV) 和木兰碱 (magnoflorine, V)。

1 仪器和药品

1.1 仪器: BS—211D 型电子天平 (Sartorius); Perkin—Elmer Lambda 35 型紫外可见分光光度计; Waters 2690 高效液相色谱仪; Waters 2487 双通道紫外可见光检测器。

1.2 药品: 两面针药材购自广西, 经广西中医药研究所赖茂祥教授鉴定为两面针 *Z. nitidum* (Roxb.) DC. 的根和茎。凭证标本存放于中国药科大学天然药物化学教研室。生药样品经粉碎, 过 4 号筛, 60℃ 干燥 2.0 h, 置干燥器中放冷, 备用。对照品 I、II、III、IV、V 均由本研究小组分离自两面针的根, 理化常数和波谱数据 (UV、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR、MS) 与文献数据^[6-10]一致, 并经 HPLC 法测定质量分数 (> 98%)。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备: 分别精密称取上述 5 种对照品 (I ~ V) 2.4、5.8、5.5、3.0、5.4 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声使溶解并定容至刻度,

摇匀, 作为对照品储备液 (I ~ V 分别为 24.0、58.0、55.0、30.0、54.0 $\mu\text{g/mL}$)。

2.2 供试品溶液的制备: 分别精密称取两面针根和茎粉末 (过 4 号筛, 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2.0 h) 0.5 g 于 100 mL 容量瓶中, 加甲醇 85 mL, 50 $^{\circ}\text{C}$ 超声 30 min, 冷却, 加甲醇定容, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.3 色谱条件: 色谱柱为 Waters Nova-Pak C₁₈ (150 mm $\times$ 3.0 mm, 5 μm); 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为水 (含三乙胺 0.01% 和冰醋酸 0.000 5%, pH 7.6~7.8); 梯度洗脱: 0 min 88% B, 12 min 84% B, 16 min 58% B, 38 min 28% B, 56 min 15% B, 60 min 0% B, 62 min 0% B, 75 min 88% B; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长为 254 nm (0~40 min), 271 nm (40~75 min); 柱温 37 $^{\circ}\text{C}$ 。在上述色谱条件下对照品 I ~ V 的保留时间分别为 62、56、34、38、8 min 左右, 色谱图见图 1-A。



I - 氯化两面针碱 II - 去-N-甲基白屈菜红碱

III - 茵芋碱 IV - 鹅掌楸碱 V - 木兰碱

I - nitidine chloride II - N-norchelethrythrine III - skimmianine

IV - liriodenine V - magnoflorine

图 1 对照品(A)和样品(B)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

2.4 线性关系: 分别精密吸取上述 5 种对照品 I ~ V 储备液 2、1、1、1、5 mL 置同一量瓶中, 用甲醇定容至 10 mL 得混合对照品溶液 (其中对照品 I ~ V 分别为 4.8、5.8、5.5、3.0、27.0 $\mu\text{g/mL}$), 再将混合对照品溶液依次稀释 2、5、10、25 倍, 得不同浓度的混合对照品溶液。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 各进样 20 μL , 记录各峰面积。以生物碱峰面积(Y)的均值对质量浓度(X)回归, 计算各自的回归方程和线性范围, 结果见表 1。

2.5 精密度试验: 精密吸取同一个混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 每次 20 μL , 分别以 5 个对照品的峰面积计, 结果生物碱 I ~ V 的 RSD 分别为 1.60%、0.80%、0.70%、1.7%、0.3%。

2.6 重现性试验: 称取两面针根粉末 (过 4 号筛, 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2.0 h) 3 份, 每份 0.5 g, 分别按 2.2 项下操作得样品供试液, 按上述色谱条件进样 20 μL

表 1 5 个生物碱的线性回归方程 (n = 3)

Table 1 Linear regression equation for five alkaloids (n = 3)

生物碱	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
I	$Y = 1.12 \times 10^5 X - 1.31 \times 10^4$	0.998	0.19~24.0	0.016 8
II	$Y = 1.36 \times 10^5 X + 6.12 \times 10^4$	0.999	0.23~5.80	0.064 5
III	$Y = 3.24 \times 10^5 X + 2.28 \times 10^3$	0.999	0.22~5.50	0.000 127
IV	$Y = 2.15 \times 10^5 X - 3.47 \times 10^3$	0.999	0.12~3.00	0.061
V	$Y = 1.83 \times 10^5 X + 2.20 \times 10^3$	0.998	1.08~27.00	0.005

测定, 结果生物碱 I ~ V 质量分数的 RSD 分别为 0.08%、5.58%、0.39%、3.26%、6.49%。

2.7 稳定性试验: 混合对照品溶液, 室温保存, 每隔 10 h 进样一次, 进样 5 次, 并于 6 d 后进样一次, 每次 20 μL , 分别以 5 个对照品峰面积计, 生物碱 I ~ V 的 RSD 分别为 3.2%、2.5%、3.4%、5.4% 和 4.0% (n = 6)。

2.8 加样回收率试验: 精密称取已知量的两面针根粉末 0.5 g, 按 2.2 项下操作制备得样品供试液, 吸取 1 200 μL 样品供试液加入 200 μL 混合对照品溶液, 进样 20 μL , 计算平均加样回收率, I 为 98.3%, II 为 83.8%, III 为 95.5%, IV 为 97.3%, V 为 106.0%, RSD 值依次为 1.20%、0.50%、0.70%、3.20%、0.20% (n = 3)。

2.9 最低检测限: 精密吸取对照品储备液配制系列浓度的甲醇溶液, 基线平稳后进样 20 μL , 取信噪比为 3 的样品量为检测限, 结果见表 1。

2.10 样品测定: 按 2.2 项方法制备样品供试液, 进样 20 μL 。按外标法以峰面积计算生物碱 I ~ V 的量, 结果两面针根和茎中 5 个化合物的量分别为 I 0.149%、0.107%, II 0.069%、0.098%, III 0.011%、0.022%, IV 0.003%、0.006%, V 0.243%、0.281% (n = 3)。

3 讨论

生物碱在反相 HPLC 分析分离中, 普遍存在色谱峰展宽拖尾、保留时间漂移和分离效果下降等现象, 这主要源于生物碱中氮原子与固定相未键合的硅醇基的相互作用, 所以在选择流动相缓冲盐时, 可选择添加烷基磺酸钠等离子对试剂或有机胺改性剂。

本方法选用的色谱柱 Waters Nova-Pak C₁₈ 适宜的 pH 值范围是 2.0~8.0, 流动相若加入较高浓度三乙胺, pH 值高, 梯度洗脱中水相比比例大, 淋洗时间长, 会影响 C₁₈ 柱的稳定性, 所以应避免使用较高浓度三乙胺或二乙胺。可添加少量的冰醋酸调 pH 值, 如添加 0.000 5% 冰醋酸时 pH 约为 7.7,

这样也可延长 C_{18} 柱的使用寿命。当流动相加入一定浓度三乙胺和离子对试剂(如己烷磺酸钠)时,基线无明显变化,说明所测定的 5 个生物碱在 pH 值大于 7.0 时对离子对试剂己烷磺酸钠或辛烷磺酸钠不敏感,可以在流动相中不加或低浓度添加离子对试剂。氯化两面针碱在不同 pH 值流动相中保留时间有很大差异,比如在保证分离的情况下,稍微提高流动相酸性可使其提前出峰。通过优化选择试验,选择流动相为甲醇-水(含三乙胺 0.01% 和冰醋酸 0.000 5%, pH 7.6~7.8),梯度洗脱。

通过对样品在 190~400 nm 的三维色谱图和 5 个对照品最大吸收波长的分析,先选择 4 个不同波长进行检测,分别是 294、284、271 和 254 nm,再对 4 个波长下的色谱图进行比较,发现 271 nm 下检测氯化两面针碱和去-N-甲基白屈菜红碱吸收最大,选作检测波长,其余 3 种生物碱选择 254 nm 作为检测波长。

本实验应用反相高效液相色谱法成功建立了两面针中 5 种生物碱的测定方法。与以往文献报道的方法^[3-5]相比,本研究的特点在于可同时对两面针中多种生物碱进行定量分析,方法简单、灵敏度高。此方法可应用于两面针药材及提取物的质量控制,

并为其量效关系的研究提供依据。此法还可进一步用来测定花椒属其他植物中这 5 种生物碱的量。

References

- [1] Wang Y, Ju Y, Wang Z. Recent progress in bioactive constituents from plants of *Zanthoxylum* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(7): 666-670.
- [2] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [3] Chen J, Duan G L, Huang J M. Determination of nitidine chloride in *Zanthoxylum nitidum* by RP-HPLC [J]. *J Fudan Univ: Med Sci* (复旦学报:医学科学版), 2001, 28(5): 436-437.
- [4] Zhang S Y, Wang G F, Zou H Q. Determination of nitidine chloride in *Zanthoxylum nitidum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(7): 445-446.
- [5] Zhang S Y, Yao X F, Liu C F. Determination of nitidine in different parts of *Zanthoxylum nitidum* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24(9): 649-650.
- [6] Liao L, Li G S, Li J B. Chemical constituents of *Z. myriacanthum* and chemotaxonomy of *Zanthoxylum* [J]. *Acta Sci Nat Univ Pek* (云南植物研究), 1988, 10(4): 445-456.
- [7] Lu Y C, Jin S, Xing Q Y. The chemical constituents of *Zanthoxylum austrosinense* Huang [J]. *Acta Univ Pek: Nat Sci* (北京大学学报:自然科学版), 1988, 24(2): 245-247.
- [8] Chakravarty A K, Sarkar T, Masuda K, et al. Carbazole alkaloids from roots of *Glycosm arborea* [J]. *Phytochemistry*, 1999 (50): 1263-1266.
- [9] Wueratne E M K, Hatanaka Y, Kikuchi T, et al. A dioxaporphine and other alkaloids of two annonaceous plants of Sri Lanka [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42: 1703.
- [10] Sues T R, Stemitz F B. Alkaloids of *Mahonia repens* with a brief review of previous work in the genus *Mahonia* [J]. *J Nat Prod*, 1981, 44(6): 680-687.

HPLC 法测定丹参中丹酚酸 B

赵洪芝¹, 卢 滨², 高 钧^{2*}, 祝国光², 元英进¹

(1. 天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072; 2. 天士力集团有限公司, 天津 300402)

丹参是唇形科植物 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根, 为常用中药, 性微寒、味苦, 归心、肝经; 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功能^[1]。我国应用丹参已有近 2000 年的悠久历史, 始载于东汉《神农本草经》, 列为上品^[2]。丹参有效成分主要有水溶性的酚酸类, 包括丹参素、丹酚酸 B 等; 脂溶性的二萜醌类, 包括丹参酮 II_A 等。其中, 主要水溶性成分丹酚酸 B (salvianolic acid B) 为三分子丹参素与一分子咖啡酸缩合而成^[3], 对其的测定方法已有文献探讨^[4], 但对丹参药材中丹酚酸 B 量的集中范围进行大规模考察还未见报道。本实验对 80 个丹参样品进行测试, 并对数据进行归纳总结。

1 仪器、试剂和药材

Aglient 1100 series 高效液相色谱仪, 配置自动进样器、二级管阵列检测器、柱温箱。乙腈(色谱纯, 美国 Merck); 甲醇(色谱纯, 美国 Merck); 甲酸(分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司); 超纯水。丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号为 111562-200302)。

本实验所使用丹参药材经天津天士力集团研究院现代中药研究所魏峰博士鉴定。其中, 安徽亳州药材市场购 9 份, 标为亳州药市 1~9 号; 成都荷花池药材市场购 19 份, 标为荷花池药市 1~19 号; 安徽广德药材公司购 3 份, 标为广德药材公司 1~3 号;

* 收稿日期: 2005-03-10

作者简介: 赵洪芝(1981—), 女, 2003 级硕士研究生。E-mail: zhao-hong-zhi@126.com

* 通讯作者 高 钧 Tel: (022) 26736533 Fax: (022) 26736053 E-mail: gaojun1969@hotmail.com