

## 摘 要

目前竹叶提取物 (EBL<sub>971</sub>) 的主要质控指标是以硝酸铝~亚硝酸钠比色法测定的总黄酮糖苷含量 (以芦丁为标准)。为了建立与国际接轨的高标准质控体系, 必须运用高效液相色谱 (HPLC) 技术对 EBL<sub>971</sub> 中主要的黄酮碳苷进行定量, 首先面临的是标准品的分离、纯化和结构鉴定。本研究采用高速逆流色谱 (HSCCC) 对 EBL<sub>971</sub> 中的黄酮进行组分分离, 接着用制备型高效液相色谱 (PHPLC) 纯化黄酮单体, 然后用液相色谱~质谱联用 (LC~MS) 技术对单体进行结构鉴定。同时采用溶出伏安法对 EBL<sub>971</sub> 中的微量元素进行检测。研究结果分述如下:

1、经过对 6 组两相溶剂系统的分析测试, 选择以石油醚: 正丁醇: 水 (1: 4: 5) 作为 HSCCC 的溶剂系统, 其分层时间为 25s, 上下相体积比为 0.96。两种主要竹叶碳苷黄酮在该溶剂系统上、下相中的分配系数分别为 3.80 和 4.44。

2、以此溶剂系统的上相为固定相、下相为流动相, 当 HSCCC 仪转速为 800rpm, 流动相流速为 2.25ml/min, EBL<sub>971</sub> 进样量为 103 mg 时, 3 小时内就可有效地将试样中的黄酮类化合物分成六个馏分, 其中最主要的馏分—5 号峰经 HPLC 检测, 发现含两种主要的竹叶碳苷黄酮。

3、利用制备型反相高效液相色谱, 对 5 号峰进一步分离纯化。色谱条件为: Beckman Ultrasphere TM ODS 柱 (10mm i.d. ×250mm, 5 $\mu$ m), 柱温: 30 °C, 流速: 1.0 ml/min, 进样量: 100  $\mu$ L, UV 检测波长: 330nm, PDA 扫描波长范围: 190~600nm, 制备得到两个单体。其紫外光谱图都具有黄酮类化合物所特有的吸收带 I (300~400nm) 和带 II (240~285nm), 且两吸收峰的相对强度也符合黄酮类化合物特征。

4、利用 LC~MS 联用技术对所得的两个黄酮单体进行结构鉴定, 测得其分子量均为 448, 带 I 的紫外吸收相同, 带 II 有显著差异。经与美国 Indofinechemical 公司的 HPLC 级标准品对照, 证实分别是荭草苷 (8-C-葡萄糖-木犀草素) 和异荭草苷 (6-C-葡萄糖-木犀草素)。

5、经多次探索发现, 运用 1.5 次微分的溶出伏安法, 在 0.01mol/L 醋酸钠~0.045mol/L 酒石酸氢钾介质 (pH=5.78) 中, 镉、铅、锌和铜离子都能产生灵敏的氧化波, 四种离子在 10<sup>-8</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L 之间均具有良好的线性关系。将此法应

用于 EBL<sub>971</sub> 中微量元素的分析测定, 得干基含量为: 铅 =  $(1.69 \pm 0.057) \mu\text{g/g}$ , 锌 =  $(6.09 \pm 0.567) \mu\text{g/g}$ ; 变异系数分别为 3.38% 和 9.31%; 回收率分别为 84.7%~108%, 锌 85.2%~105%; 而 Ebl<sub>971</sub> 中的镉和铜离子几乎测不出。

研究表明, 将 HSCCC 和 PHPLC 有机组合, 可以从 EBL<sub>971</sub> 中快速、高效地分离纯化黄酮单体, 且能达到百毫克级的水平, 为竹叶黄酮标准品的制备开拓了一条有效途径, 并为竹叶提取物高标准质控体系的建立奠定了基础。同时, 本研究得出的溶出伏安法测定竹叶提取物中的微量元素, 具有样品处理简单、灵敏度高、快速简便、干扰小、设备投资省等优点, 适宜在生产实际中推广使用。 )

关键词: 竹叶提取物; 碳苷黄酮; 微量元素; 高速逆流色谱 (HSCCC)  
制备型高效液相色谱 (PHPLC) 液相色谱~质谱联用 (LC~MS)  
溶出伏安法;

# Application Studies of Chromatography and Voltammetry on Effective Component Analysis of Bamboo-Leaf-Extract

## Abstract

At present, the major quality control index of the Extract of bamboo leaves (EBL) is the total flavone glycoside content (TF) determined by  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \sim \text{NaNO}_3$  spectrophotometry taking rutin as a standard. In order to set up a high-standard quality assurance system, which can be accepted by international society, the quantitative analysis method of TF using by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) should be inducted as early as possible. It is firstly faced with the separation, purification, preparation and structural identification of main flavonoids in EBL. In this studies, using high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) to pre-purify flavonoids in EBL<sub>971</sub>, preparative high performance liquid chromatography (PHPLC) to prepare monomers, and HPLC-MS to identify structure, we gained two pure chemicals of C-glycosyl flavonoids of bamboo. At the same time, the measurement of trace elements in EBL<sub>971</sub> was also conducted using by 1.5th Differential Stripping Voltammetry. Results were reported as follows, respectively.

1) Through investigating the distribution coefficient, delamination time, and volume ratio between two phases of six solvent systems, one mix-solvents that consists of petroleum, n-butanol and water (1:4:5, v/v) was selected for HSCCC. Its delamination time is 25s, volume ratio between upper and nether phases was 0.96. And the distribution coefficients of two main C-glycosyl flavones of bamboo in the mix-solvents were 3.80 and 4.44, respectively.

2) Taking the upper of the mix-solvents as stationary phase and the nether as mobile

phase, six eluted fractions, which include a part stayed in stationary phase, were obtained by HSCCC in 3 hours. The separating conditions were 800rpm rotate speed, 2.25ml/min flow rate, and 103 mg injection amount of Ebl<sub>971</sub> sample. Two main C-glycosyl flavones were detected by HPLC in the fifth fraction, *i.e.* the biggest peak.

3) The fifth fraction was purified by PHPLC under following condition: column temperature 30 °C, flow rate 1.0 ml/min, injection volume 100μL, UV detection wavelength 330nm, and PDA detection wavelength 190~600nm. Two flavonoid monomers were prepared and both have the character UV absorbance. Their band I and band II were located in the ranges of 300~400nm and 240~285nm, and absorbance intension also accords with the characteristic of flavonoids.

4) The chemical configuration of two monomers was identified by HPLC-MS technology. Results showed that they all have the same molecular weight of 448, with same band I and different band II absorbance. Comparing with the standard samples bought from of America Indofinechemical Company, and testing by standard addition method of HPLC, two monomers were approved as orientin (8-C-glucosyl-luteotin) and isoorientin (6-C-glucosyl-luteolin), individually.

5) Determination of trace elements of Cd、Pb、Zn、Cu by the 1.5th differential anode stripping voltammetry were conducted too. In the solvent medium of 0.01mol/L Potassium hydrogen tartrate and 0.045mol/L NaAc with pH5.78, all of four irons can produce very sensitive oxidation waves. The peak height is related linearly with iron concentration in the range of  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  mol/L. This method has been successfully used to inspect the content of Cd、Pb、Zn and Cu of EBL<sub>971</sub>, and results showed Pb at  $(1.69 \pm 0.06)\mu\text{g/g}$  and Zn at  $(6.09 \pm 0.57)\mu\text{g/g}$  in dry base. Method's variation coefficients were 3.38% and 9.31%, and the recovery rates were 84.7-108% and 85.2-105%, respectively. However, Cd and Cu in Ebl<sub>971</sub> could not be determined here, due to their contents over the inspecting limit of this

method.

These studies revealed that the flavone glycosides in EBL could be separated and purified above 0.1g scales by HSCCC plus HPLC fast and effectively. It explored an effective route to prepare bamboo-leaf-flavonoid standards and settled down a foundation for setting up a high-standard quality assurance system of EBL. Meanwhile, the method application of the anode stripping voltammetry in continuous determination of trace amounts in EBL<sub>971</sub> was simple, sensitive, fast and disturbless and costless, so very suitable for manufacturer's application.

**Key words:** Extract of bamboo leaves (EBL); C-glycosyl flavone; trace element; High speed countercurrent chromatography(HSCCC); Preparative high performance liquid chromatography(PHPLC); HPLC-MS; Anode stripping voltammetry

## 致 谢

本论文是在二位导师——张英教授和吴晓琴副教授的悉心指导下完成的。导师严谨的科学态度、对事业的执着追求、高尚的人格魅力、和循循善诱的工作作风，时刻感染和鼓舞着学生，使我受益匪浅，这一切对我的一生都将产生重要的影响。在即将毕业之际，谨向导师致以崇高的敬意和衷心的感谢！

在本论文的设计、试验和论文撰写过程中，高速逆流色谱部分得到了杭州商学院的杜琪珍高级研究员、夏明硕士的大力协助；高效液相色谱实验部分还得到了浙江省疾病控制和防疫站的任一平高级工程师、钱晓成工程师的竭诚帮助；溶出伏安法的条件摸索得到了施清照教授、李秀玲副教授的悉心指点，谨在此向他们表示衷心的感谢！

汤兴俊博士和硕士同学沈海清、王启军、潘向荣、王乐普、俞卓裕、姚晓宝等为本论文的研究工作提供了热情的帮助。特别值得一提的是，我的师妹、师弟们——郭重营、胡晓结、陆柏益等，在本文的试验部分做了大量的工作，在此一并表示诚挚的谢意！

我还要感谢农业工程与食品科学学院和食品系的领导和其他老师在我求学期间给予的关心和帮助。

最后，要特别感谢在我多年求学生活中，一直关心我、支持我的家人，是他（她）们给了我一直直前的勇气和克服困难的决心。

谨将此文献给我所热爱的人们！

徐维姪

2002年5月于浙大华家池



## 前 言

黄酮类化合物 (Flavonoids, 简称类黄酮) 广泛分布于植物界, 是许多中草药和食物的有效成分, 为当今国内外的医药保健品行业 and 功能性食品领域所瞩目。类黄酮类具有  $C_6-C_3-C_6$  的基本结构, 主要包括黄酮、黄酮醇、双氢黄酮 (醇)、异黄酮、黄烷酮、查尔酮等十几个大类<sup>[1]</sup>。近 20 年来, 类黄酮日益引起人们的重视, 迄今自然界中发现的已达数千种, 大多具有显著的生理和药理活性, 对一些常见病、多发病、慢性病有良好的防治作用。随着对类黄酮研究的不断深入, 分析、测试和制备手段也得到了迅速发展<sup>[2]</sup>。

### 0.1 高速逆流色法 (HSCCC) 在天然产物研究中的应用

逆流色谱 (Countercurrent Chromatography, CCC) 是近 40 年发展起来的一种新型的色谱技术, 但在发展过程中遇到了许多挫折<sup>[3]</sup>。直至上世纪 80's 初期, 高速逆流色谱 (High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) 的出现, 才使得 CCC 技术取得了突破性的进展。HSCCC 利用流体在聚四氟乙烯螺旋管内的方向性与高速行星式运动结合, 产生一种独特的流体动力学现象, 使互不相溶的两相溶液在螺旋管中充分混合, 顺序传递, 导致样品中各个组分由于分配系数的差别而有效地分离。目前, HSCCC 在天然产物的研究中已有广泛的应用。

#### 0.1.1 HSCCC 在类黄酮中的应用

有文献报道, 用氯仿-甲醇-水(4:3:2)体系、从芫花总黄酮中一次进样 100mg, 分离得到了 3'-羟基芫花素、洋芹素和木犀草素<sup>[4]</sup>。用氯仿-甲醇-水(6:3:2)体系、以 1800rpm 的转速在 15min 内从大黄根茎提取物中分离出大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚和大黄素<sup>[5]</sup>。以氯仿-甲醇-水(33:40:27)体系和 700rpm 的转速, 在 70min 内从黄酮混合物中分离出橙皮素、4-羟基-黄酮和槲皮素, 并有效地利用了梯度洗脱技术<sup>[6]</sup>。Vanhaelen 等将 HSCCC 与 HPLC 相结合, 从 500mg 的银杏叶萃取物中一次分离出了 7 个黄酮糖苷, 其方法是: 以水为固定相, 开始以乙酸乙酯为流动相, 然后在流动相中逐渐添加异丁醇, 到分离结束时乙酸乙酯与异丁醇之比为 6:4<sup>[7]</sup>。Oka 等以氯仿-甲醇-水(4:3:2)体系、在 3500rpm 下、8min 内从 see buckthorn 的果实萃取物中分离得到了 5

个主成分, 其分离速度完全可与 HPLC 相比较<sup>[8]</sup>。还有报道从大黄羟基蒽醌总苷元中分离了大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚等<sup>[9]</sup>。用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(9:1:5:5)在 1800rpm 的转速下、70min 内从掌叶大黄的根茎提取物中分离出大黄素甲醚、芦荟大黄酸、大黄酸、大黄酚和大黄素<sup>[10]</sup>。将 *Epilobium parviflorum* (柳叶菜属) 的甲醇萃取物进样 2g 分离得到了槲皮苷、杨梅苷、异杨梅苷和没食子酸, 两相溶剂系统为氯仿-甲醇-水(7:13:8)<sup>[11]</sup>。1992 年 Chen 利用氯仿-甲醇-水(4:3:2)的两相系统对 5 个类黄酮进行了分离、并作了定量分析<sup>[12]</sup>; 1994 年 Kapadia 利用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:4:2.5:2.5)从 *Garcinia Kola*(藤黄属)种子中分离出了多个双黄酮<sup>[13]</sup>。

### 0.1.2 HSCCC 在生物碱中的应用

生物碱是植物中一类重要的化学组分, 分布非常广泛, 至少有 50 多科 120 属以上的植物中证明有生物碱存在, 已知的种类在 2000 种以上。到目前为止, 用 HSCCC 研究天然产物化学成分的也以生物碱的报道为多。

正丁醇-丙酮-水(8:1:10)体系曾用于从委内瑞拉的箭毒中分离马枯素和 Panarine, 样品进样达 700mg<sup>[14]</sup>。正丁醇-氯化钠(0.1mol/L) (1:1) 体系用于从 *Strychnos usambarensis* (马钱科) 的树干和树皮中分离 10-羟基-Nb-甲基-柯楠醇<sup>[15]</sup>。用四氯化碳-甲醇-水 (20:20:2) 从 *Anisocycla cymosa* 的根中分离得到了一个季铵盐生物碱和 5 个叔苄基异奎宁生物碱<sup>[16]</sup>。用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:7:5:5)在 70min 内以 1800rpm 的转速从粉防己干根的提取物中分离了粉防己碱、去甲粉防己碱和轮环藤酚碱<sup>[17]</sup>。从唐古特山莨菪粗提物中, 用氯仿-磷酸盐(0.07mol/L、pH 6.4)(1:1)系统分离出了 4 个生物碱<sup>[18]</sup>。从小蔓长春花植物的叶子中用正己烷-乙醇-水(6:5:5)体系分离了长春胺和长春辛<sup>[19]</sup>。将 HSCCC 与 MS 联用分析长春胺和长春辛碱<sup>[20]</sup>; 分别用正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(6:3:2:5)和正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)从红豆杉的粗提物中分离纯化了紫杉醇、Cephalomannine、巴卡亭<sup>[21]</sup>; 以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(50:70:80:65)从紫杉醇的混合物中分离得到了纯的紫杉醇和 Cephalomannine<sup>[22]</sup>。

### 0.1.3 HSCCC 在木脂素中的应用

木脂素一般存在于植物的木质部和树脂中, 所以称为木脂素类。Lee 等以正己烷-甲醇-水(6:5:5)、以 1500rpm 的转速在 80min 内从江花五味子果实核



的乙醇萃取物中分离了 2 个结构十分相似的木脂素的成分—schisanhend 和它的乙酸化物<sup>[23]</sup>，以氯仿-甲醇-水的溶剂系统从西伯利亚人参的根中分离得到了纯的 eleutheroside<sup>[24]</sup>。Nitao 等<sup>[25]</sup>于 1991 年主张用正己烷-乙腈-乙酸乙酯-水(8 : 7 : 5 : 1)的两相系统从 *Magnolia virginian* 中进行 neelignans 的最初纯化，它比传统的柱色谱更快、更有效、更经济。

#### 0.1.4 HSCCC 在香豆素类中的应用

香豆素及其衍生物广泛分布于植物界。曾用氯仿-甲醇-水 (13 : 23 : 16) 的两相系统，一次进样 440mg 来自于 *Lomatium dissectum* 的样品，得到了 3 个香豆素的糖苷和 1 个黄酮糖苷<sup>[26]</sup>；用氯仿-甲醇-水(13 : 7 : 8)的两相体系分离并分析了香豆素混合物中的甲醚散形酮、7-甲氧基-香豆素、7-羟基-6-甲氧基-香豆素和 7-羟基-香豆素<sup>[27]</sup>；俞维乐等<sup>[28]</sup>1995 年从 *Artemisia dalailamae karaschen* 中以氯仿-甲醇-水(2 : 1 : 1)分离出了纯的 7-羟基-6-甲氧基-香豆素以及 isofraxdin 和 taxaxeryl-acetate，达到了很好的分离效果。

综上所述，HSCCC 在天然产物中的分离制备是很成功的。进样量可从毫克级到克级，进样体积可从几毫升到几十毫升。不但适用于非极性化合物，而且适用于极性化合物的分离。它可用于天然产物粗提物的去杂，也可用于精制，甚至直接从粗提物一步纯化到达纯品。

## 0.2 高效液相色谱法 (HPLC)

高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 是 20 世纪 60's 末、70's 初发展起来的一种分离分析技术，它是在经典液相色谱基础上，引入气相色谱的理论，在硬件上采用了高压泵、高效固定相和高灵敏度检测器等，因而具备速度快、效率高、灵敏度高、操作自动化的特点，尤其适合于挥发性低、热稳定性差、分子量大及离子型化合物的分析<sup>[29]</sup>。根据 HPLC 在植物化学研究中的样品处理量和工作目的，可分为分析型和制备型两类。

### 0.2.1 分析型高效液相色谱

分析型 HPLC 以分离和定性为目的，所使用的色谱柱内径一般为 2.1~5mm，柱长 10~30cm，最大进样量小于 1mg，进样体积为 5 $\mu$ l 左右，流动相流速为 0.8~1.2 ml/min。分析型 HPLC 已广泛用于天然产物的分析，成为中草药有效成分、食品化学成分和保健功能因子含量测定、纯度鉴定以及质量监控的

常用手段<sup>[2]</sup>。

### 0.2.1.1 分析型 HPLC 在类黄酮中的应用

类黄酮的 HPLC 分析通常用反相 C<sub>18</sub> 色谱柱。由于黄酮分子中存在酚羟基，流动相中加入少量的酸可改善峰形。陈晓岚等<sup>[30]</sup>使用 ODS C<sub>18</sub> 柱(4.6×250mm, 5μm)，流动相为甲醇：0.1%的磷酸二氢钠水溶液=65:35，检测波长 360nm，测定银杏黄酮浸膏中槲皮素和总黄酮的含量。周欣等<sup>[31]</sup>用甲醇溶解，加盐酸水浴回流水解银杏叶提取物，用 TWG C<sub>18</sub>(4.6×150mm)柱，流动相为甲醇：水：磷酸(50:49.8:0.2)，检测波长 360nm，分离银杏叶提取物中类黄酮，并测定其中槲皮素的含量。邬建敏等<sup>[32]</sup>用甲醇浸提，用 WYG C<sub>18</sub> 色谱柱，以甲醇：水：磷酸(60:40:0.5)为流动相，以 254nm 为检测波长，测定了 10 种竹子的叶、枝中的黄酮化合物总量芦丁含量，测得竹叶中黄酮总量在 5.9~13.1mg/g，竹枝在 1.3~4.3mg/g。张廷之等<sup>[33]</sup>用 ZORBAX C<sub>18</sub> 柱(4.6×250mm)，流动相为甲醇-水-冰乙酸(40:60:2)，检测波长 280nm，以芦丁为参照物，辅以二极管阵列检测技术，测定了毛竹叶中总黄酮的含量。

王萍等<sup>[34]</sup>用 YWG C<sub>18</sub> 柱(4.6×100mm, 10μm)，流动相为甲醇：水：(0.2mol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)：(0.5 mol/L K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)=80:120:1:8 的溶剂系统，检测波长 280nm，采用梯度淋洗法，使水飞蓟素中的 7 种主要成分得到完全分离。胡敏等<sup>[35]</sup>用 RP-HPLC 等梯度洗脱的方式成功地分辨出银杏叶 17 个黄酮糖苷，并定量分析了 7 个主要糖苷(含 4 个独特结构和活性的桂皮酰黄酮糖苷)的相对含量。

陈发奎等<sup>[36]</sup>用三维 HPLC 法测定了牛黄解毒片中黄芩苷的含量，在 Intertsil ODS 柱上，以含醋酸的乙腈~水系统线性梯度洗脱，绘制三维谱图，由峰形、峰位确定图谱中指标成分的吸收峰，按标准曲线、由峰面积计算含量。Pietta 等<sup>[37]</sup>在 Nucleosil 100 C<sub>18</sub> 柱上，以 0.5%H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-MeOH-THF 梯度洗脱，50min 分离了 15 个银杏黄酮化合物，6 个化合物由标准品对照确认，其他由 UV 或可见分光光度计及二极管阵列检测器(PDA)确定。

### 0.2.1.2 分析型 HPLC 在其它天然产物的应用

有关 HPLC 分析其它天然产物的文献报道非常多，如刘巍等<sup>[38]</sup>对苔素内酯及其有关甾族化合物进行衍生后，分别用紫外、荧光、电化学检测器进行检测的 HPLC 分析法。吕光华<sup>[39]</sup>等用 HPLC 法测定了十大功劳属植物中的 7 种生物碱成分。原源等<sup>[40]</sup>用 HPLC 法测定酸模属植物根中活性成分—酸模素的含量。

李蔚等<sup>[41]</sup>用 HPLC 对以白芍为主要原料的保健食品中芍药苷的含量测定。杨枫等<sup>[42]</sup>用 HPLC 法测定西洋参蜂王浆口服液中的人参皂苷与癸烯酸等。

### 0.2.2 制备型高效液相色谱

制备型高效液相色谱 (Preparative High Performance Liquid Chromatography, PHPLC) 是在传统分析型 HPLC 的基础上发展起来、以分离获取大量的单组分为目的的一种高效分离纯化技术。根据制备量的大小又可以分为两种类型：一种是将分析型 HPLC 按比例放大, 操作参数与分析型大致相同的半制备型 HPLC, 其所用色谱柱内径为 8~10mm, 柱长 20~50cm, 进样体积 0.2~2ml, 流动相流速为 3~5 ml/min, 一次制备量在毫克数量级; 另一种是专用制备型 HPLC, 其色谱系统及操作参数与分析型 HPLC 有较大的差别, 所用色谱柱内径在 10mm 以上, 流动相流速在 5~50ml/min 左右, 一次制备量可高达 1000mg<sup>[43]</sup>。由于技术上的原因, 长期以来 PHPLC 的进展比较缓慢, 随着理论研究的深入, 新颖的填料、新的填充方法以及在仪器和流程上的进展, 近年来 PHPLC 获得迅速发展, 从直径 10mm 的实验室半制备到直径 500mm 的工业制备柱及其相应的设备相继商品化, 解决了多方面的分离纯化问题<sup>[44]</sup>。作为一种制备手段, 它具有分离条件温和, 分离检测过程中一般没有样品损坏, 易于原物回收, 且装置简单有效等优点。

天然产物研究中面临的一个主要方面就是从天然植物中分离纯化鉴定化合物, PHPLC 在天然产物研究领域广泛应用的原因<sup>[44]</sup>: (1) 化合物结构鉴定仪器的发展, 使结构鉴定所需的样品量越来越少, 一般只需几到几十毫克就可解决, 由 PHPLC 得到毫克级的样品是非常容易的。(2) 天然产物化学经过多年的研究, 各种药用动植物中含量较高的成分大多已被分离和研究, 而含量较少的成分由于分离方法的限制不易获得, 而 PHPLC 方法则非常适合于分离纯化含量较低的成分。(3) PHPLC 在分离纯化水溶性成分时有较大优势。

#### 0.2.2.1 PHPLC 在类黄酮中的应用

HPLC 在不同植物黄酮分析中的应用已相当成熟, 而用其来制备类黄酮虽有一定的研究, 但仍不成熟。戴军、王洪新等<sup>[45]</sup>应用 Spherisorb-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> 色谱柱 (8×300mm, 10μm), 流动相为甲醇/水 (14/86, V/V), 检测波长 540nm, 成功地分离和制备了芦苇叶中的类黄酮, 并进行了定性和定量分析; Huch Christiaw 等<sup>[46]</sup>用 PHPLC 从樱草花中分离了单-、双-、三-、五-4 种甲氧基黄酮, 制备量

分别达到了 8、9、8、12mg; 邹耀洪等<sup>[47]</sup>用 Lichrosorb RP-18 色谱柱(8.0×300mm,10 $\mu$ m),流动相为 CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:HCOOH (75:25:0.8, V/V/V), 检测波长 330nm, 从杨梅叶中分离和制备了 4 种黄酮醇苷和 1 种黄酮醇; 用 Spherisorb-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> 色谱柱(8×300mm, 10 $\mu$ m), 流动相为甲醇:水(14:86)进行制备, 定时收集检测器出口组分, 并用 PDA 检验收集液纯度, 从甘薯叶黄酮中分离纯化制备了 4 种黄酮单体<sup>[48]</sup>; 同时用流动相为甲醇:水(15:85, V/V),检测波长 340nm, 光谱采集: 190~600nm, 从箬竹叶中分离制备了 8 种黄酮类化合物<sup>[49]</sup>。

#### 0.2.2.2 PHPLC 在其它天然产物制备研究中的应用

徐光国<sup>[50]</sup>运用国产 YZS-3 型液相制备色谱仪分离制备了抗癌药葫芦素 B 标准品, 茯苓三萜酸成分和金银花中的主要成分绿原酸; 陈若芸等<sup>[51]</sup>用 PHPLC 制备了灵芝中的三萜类化合物; 张仁斌等<sup>[52]</sup>用 PHPLC 对青蒿素异构体进行了分离制备; 贺贤国等<sup>[53]</sup>用 PHPLC 制备了芫花甲酯; 陈波等<sup>[54]</sup>用 PHPLC 制备分离纯化菊苣酸标准对照品; 于志强等<sup>[55]</sup>利用正相高效液相半制备色谱制备了新地质卟啉化合物; 雷历等<sup>[56]</sup>利用反相制备高效液相色谱结合溶剂萃取、大孔吸附树脂柱色谱和葡聚糖凝胶 LH-20 柱色谱方法, 从管花肉苁蓉的乙醇提取物中纯化制备了苯乙醇苷类化合物——松果菊苷的标准品, 纯度可达 98% 以上。

近几年来, PHPLC 技术在制备高纯度生物活性物质的方面有了长足的发展, 有关报道不断出现。如 hatch 等<sup>[57]</sup>对牛血清蛋白、铁蛋白等进行了制备分离, 制备量达数百毫克; Cildenast Thomas 等<sup>[58]</sup>用 PHPLC 和半制备 HPLC 从人角质层脂肪中分离出神经酰胺单体; 王学彤等<sup>[59]</sup>用反相高效液相色谱法分离制备了鱼油中的 EPA 和 DHA; 周海欧等<sup>[60]</sup>用美国 Beckman 344-M HPLC 进行了鹿茸中多肽的分离制备。

### 0.3 极谱和伏安法

极谱法是上世纪二十年代 J.海洛夫斯基 (Heyrovsky)<sup>[61]</sup>所创立的一种电化学分析方法, 基于可还原或可氧化物质在滴汞电极上进行电解的过程中, 由于浓差极化而形成电流—电压极化曲线, 根据此曲线进行定性、定量。后来, 柯尔蜀夫(kolthoff)等<sup>[62]</sup>把凡是使用微电极以电流—电压曲线为基础来研究溶液组成的电化学分析方法统称为“伏安法”。



随着当今世界科学技术的迅猛发展, 对分析化学的灵敏度和分辨率提出了更高的要求, 各种仪器分析技术都得到了长足的发展, 电化学方法也是如此。近年来迅速发展、并广为应用的极谱和伏安法新技术有: 溶出伏安法、催化极谱法、交流极谱法、脉冲极谱法、半微分半积分极谱法、放射极谱法等等<sup>[63]</sup>。

### 0.3.1 极谱和伏安法在微量元素分析测定中的应用

极谱和伏安法在微量元素分析测定中应用较多。1989年, 李启隆等<sup>[64]</sup>利用铅~二甲酚橙络合物的极谱行为对食糖中的铅进行测定, 发现在铅浓度  $2.0 \times 10^{-8} \sim 6.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  范围内, 电流与浓度成线性关系。万渝平<sup>[65]</sup>用示波极谱法测定 6 个不同茶叶样品中的铅含量, 并与国标方法—双硫脲比色法进行对比实验, 结果表明该法准确可靠、与国标法相比无显著差异。谢媚等<sup>[66]</sup>在 HCl-酒石酸-KI-抗坏血酸体系中, 用催化示波极谱法测定了皮蛋中微量铅。在此体系中, Pb(II) 于 -0.54 V 处产生一个非常灵敏的吸附催化波。铅含量在  $0.025 \sim 3 \mu\text{g/ml}$  范围内波高与浓度呈良好的线性关系, 相关系数( $r$ )为 0.9976, 检测限为  $0.025 \mu\text{g/ml}$ 。费俊杰等<sup>[67]</sup>建立了用槲皮素修饰碳糊电极测定痕量铅的新方法: 在  $0.10 \text{ mol/L}$  的甲酸缓冲液(pH 4.3)中, 于 -0.10V (vs.SCE) 搅拌富集, 再在 -0.70 V 静止还原 40s 后, 阳极化扫描, 于 -0.42V 左右获得一灵敏的铅阳极溶出峰; 最佳条件下, 富集不同时间, 其二次导数峰电流与  $\text{Pb}^{2+}$  在  $1.0 \times 10^{-8} \sim 8.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  和  $2.0 \times 10^{-9} \sim 6.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$  两个浓度范围内呈线性关系, 检出限为  $8.0 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 。徐泽民等<sup>[68]</sup>采用示差脉冲阳极溶出伏安法测定了中药川附子中的痕量铅。

戴树桂等<sup>[69]</sup>1995年首次描述用金盘电极同步镀金阳极溶出伏安法测定溶液中的 As(III), 通过正交试验优化实验参数, 检出限达  $0.36 \mu\text{g/L}$ , 实际水样加标回收率为 91.9~105.3%, 并应用于河口间隙水和深井水样中 As(III)和总砷含量。范华均等<sup>[70]</sup>在稀盐酸底液中, As(III)与吡咯烷二硫代甲酸铵(APDC)形成的络合物在悬汞电极上有良好的吸附溶出行为, 于 -0.53V(vs. SCE) 处有一灵敏的二次导数溶出峰, 在  $1.3 \times 10^{-8} \sim 2.6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  浓度范围内, 峰高与 As(III)浓度有良好的线性关系, 检出限为  $1.3 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ , 用本法测定两种标准品以及茶叶中的砷, 准确度和精密度都非常高。

1996年有人用催化极谱法测定茶叶中痕量的硒<sup>[71]</sup>, 用单扫示波极谱法测

定茶叶中的铜<sup>[72]</sup>, 结果令人满意。石金辉等<sup>[73]</sup>用极谱络合吸附催化波测定蔬菜中微量锗的结果与石墨炉原子吸收光谱法的测定结果相一致。陈庆绸等<sup>[74]</sup>应用单扫描极谱法测定海蛎中痕量的镉。孙长清等<sup>[75]</sup>利用锗(IV)-邻苯二酚络合物在汞电极上的吸附性, 并结合过氧化氢催化的吸附溶出伏安法, 测定了人参中的锗。

极谱和伏安法还可对食品中的重金属离子铅、镉实现连续测定<sup>[76]</sup>。周连君等<sup>[77]</sup>用吸附溶出伏安法同时测定水中痕量铅和镉。1999年王继明<sup>[78]</sup>用单扫描极谱法同时测定饮料中铅、铜含量。张庭廷等<sup>[79]</sup>用微分脉冲阳极溶出伏安法连续测定葛花中微量锌、铜。陈文章等<sup>[80]</sup>利用阳极溶出伏安法连续测定溴化钾中镉、铅、锌和铜。

### 0.3.2 极谱和伏安法在天然产物和食品分析测定中的应用

槲皮素及其苷类是植物界分布最广的类黄酮。槲皮素的分析测定方法通常有分光光度法、荧光法和色谱法等。分光光度法准确度不高, 荧光法和色谱法测定手续较繁琐。槲皮素的电化学方法研究, 主要为直流极谱法<sup>[81]</sup>, 灵敏度不高, 测定限为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L。1984年 Fahrat 等<sup>[82]</sup>报道了有关槲皮素的阳极伏安法, 由于使用固态石墨电极为工作电极, 重现性较差。汪乃兴等(1990)<sup>[83]</sup>利用槲皮素分子中的酚羟基与  $\gamma$ -吡喃酮环易与金属离子形成络合物的特点, 使槲皮素与钴离子形成络合物还原波, 因此可以用滴汞电极为工作电极, 重现性良好, 而且采用了微分脉冲极谱技术, 解决了毛细管噪声和补偿电路, 抵消了残余电流, 从而使灵敏度大大提高, 使槲皮素电极反应为不可逆性质, 检出限达  $9.6 \times 10^{-6}$  mol/L。

在电化学法中, 类黄酮含量的测定和分析用得最多的还是极谱法, 如熊晓燕等<sup>[84]</sup>用极谱法测定红景天的含量, 张秀琴等<sup>[85]</sup>用脉冲极谱法测定黄芩中黄酮苷及其苷元的含量等等。从最近几年的文献看, 极谱法不但可用来测定黄酮的含量而且用于研究类黄酮的极谱行为和电极反应机理, 如郇洪等在单扫描示波极谱仪上直接测定了原儿茶醛<sup>[86]</sup>、黄芩苷<sup>[87]</sup>和大黄素<sup>[88]</sup>的含量, 而且利用邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生活性氧自由基体系中, 黄芩苷和大黄素对邻苯三酚自氧化产物的还原峰受到抑制, 研究了黄芩苷和大黄素清除活性氧自由基的作用, 并利用自由基阻聚剂研究了原儿茶醛的电化学行为和电极反应机理。



1998年,邹洪等<sup>[89]</sup>建立了土木香内酯的单扫示波极谱法测定,由于该方法简便、灵敏、快速,可用于中药穿心莲内酯的质量控制和药理研究。汪振辉等<sup>[90]</sup>建立胡椒碱的伏安法测定,他们首次用磷酸三丁酯(TBP)化学修饰玻碳电极测定天然胡椒中的胡椒碱的含量。化学修饰电极由于具有特殊的功能团,用于分析测试,与滴汞电极单扫描极谱法相比,该方法的灵敏度和选择性都得到了显著改善而且避免了汞的污染。由于紫杉醇在天然植物中的含量很低,所以需要灵敏度很高的检测方法。测定紫杉醇的方法一般采用高压液相色谱法,于永等<sup>[91]</sup>采用线性扫描示波极谱法对紫杉醇的含量进行了测定。

极谱和伏安法还应用于测定食品中糖精含量、肉制品中亚硝酸盐的含量和食品、饮料和药物包装中的氧含量的测定,进行品质管理。氧的定量分析较气相色谱法容易达到ppb级甚至ppt级的检测下限,而且准确度高<sup>[92]</sup>。

综上所述,极谱和伏安法是一种较先进的、投资省、适合基层生产、科研单位优先采用的分析方法。利用极谱和伏安分析法可对金属离子、天然产物、食品添加剂、氧含量等进行快速、准确、简便的分析检测。它的发展日臻完善,但在食品分析测定中上述的许多技术尚未被充分利用,还有待于继续探索和应用。

#### 0.4 立题的依据和意义

竹叶在我国具有悠久的食用和药用历史,早在《本草求真》和《本经逢原》中就有记载,1998年又被卫生部批准列入了“药食两用的天然物名单”。竹叶中含有丰富的类黄酮,张英等<sup>[93]</sup>已对竹叶黄酮及其抗自由基、抗氧化、抗衰老的生物学功效进行了深入细致的研究,表明其可能在很多领域弥补银杏黄酮资源的不足;并借鉴了国内外在植物黄酮提取方面的各种专利技术,结合竹叶中黄酮类化合物存在的特点,创造了经济、适用、独特的提取工艺,并获得了国家发明专利<sup>[94]</sup>。该发明专利得到的竹叶提取物(EBL)称为标准竹叶提取物,记为Ebl<sub>971</sub>,大量的生物活性试验、药理研究实验均是以此为基础展开的。

由于目前企业对EBL中总黄酮含量的测定,采用以芦丁为标准的硝酸铝~亚硝酸钠比色法,而实际EBL中芦丁含量非常低,而且从竹叶黄酮的组成和结构来看,相当部分竹叶黄酮体母核上无3和/或5-OH, B环上也无邻二

羟基时，无法与  $Al^{3+}$  络合，不能显色，因而这一部分黄酮的含量得不到反映。由此可见，用这一方法测定 EBL 的总黄酮含量存在很大的局限性，导致测定值低于实际含量。同时，比色法并不能地反映提取物中各个黄酮单体的含量水平及其相互间的比例。

当前加入中国 WTO 的大环境和中药现代化、国际化的大趋势客观上要求提升 EBL 的质量保证体系，迫切需要建立以 HPLC 为质控手段的总黄酮定量方法，使之与国际市场接轨。而且，在目前竹叶黄酮新药的研发和食品抗氧化剂报批的过程中，包含了 III 阶段毒理试验，要求做药物代谢试验，必须监测血样和尿液中的竹叶黄酮浓度，首先面临 HPLC 级标准品的问题。由于目前国内无竹叶黄酮标准品，进口则价格昂贵，所以自行分离、制备的意义十分重大。除经济意义外，还蕴含了十分重要的学术价值和技术内核。另外，EBL 所含的微量元素也是质量控制体系中的关键一环，寻找一种快速、简便、准确的测定方法以应用于生产实践也是一项十分有意义的工作。

## 第一节 高速逆流色谱分离竹叶黄酮组分

高速逆流色谱法（HSCCC）是一种不用固态支撑体或载体的液~液分配色谱，它是以两相互不混溶的溶剂系统在支撑管内高速行星运动的方式下进行组分的分离纯化。HSCCC 用于天然产物分离有如下优势<sup>[95]</sup>：(1)避免分离样品与固体载体表面产生化学反应、导致变性和不可逆吸附等情况的发生，因而消除了由固定相载体引起的样品结合或失活以及污染；(2)每次分离工作结束后，管道中残留溶剂均可冲出，不会对后续分离产生任何影响，同样的原因，分离样品具有高的回收率；(3)有广泛的液~液分配系统可供选择；(4)较为方便和快速，仪器价格也比较低廉；(5)相对于干柱分离，有较高的分离度和较大的制备量。(6)对所分离样品的分子量不受限制。所以，目前 HSCCC 已在标准品制备、天然产物研究及新药开发等领域得到越来越广泛的应用。

HSCCC 应用中，最关键和最难解决的问题是溶剂系统的选择。不同的溶剂系统，具有不同的上、下相之比，并且粘度、极性、密度等性质的差异，均会对相同的成分产生不同的溶解、分配能力，形成分配系数的差异，对分离效果产生影响。溶剂系统的选择一般需根据实验积累经验，而没有充分的理论依据。分配系数（K）为溶质在固定相里的浓度（ $C_s$ ）同溶质在移动相里的浓度（ $C_m$ ）之比，即为： $K=C_s/C_m$ 。<sup>[99]</sup>

通常来说，选择用于 HSCCC 的溶剂系统时，应注意以下几个方面：①不造成样品的分解或变性；②足够高的样品溶解度；③样品在溶剂系统中有合适的分配系数值；④溶剂系统的分层时间小于 30s，且固定相能实现足够高的保留，上下两相的体积大致相等，以免浪费溶剂。一般来说，前两点可以较简便地进行判断，后两点对 HSCCC 就显得特别重要，需要经过测试来判断<sup>[99]</sup>。

本文通过对 HSCCC 溶剂系统的比较选择、分离条件的优化，将 HSCCC 应用于 Ebl<sub>971</sub> 中黄酮的组分分离，为单体制备创造条件。

### 1.1 材料与方法

#### 1.1.1 实验材料

竹叶黄酮提取物 (Ebl<sub>971</sub>)：由安吉圣氏生物制品有限公司提供，总黄酮糖苷 $\geq 30\%$ 、总内酯 $\geq 15\%$ ，HPLC 图谱如图 1.1 所示。

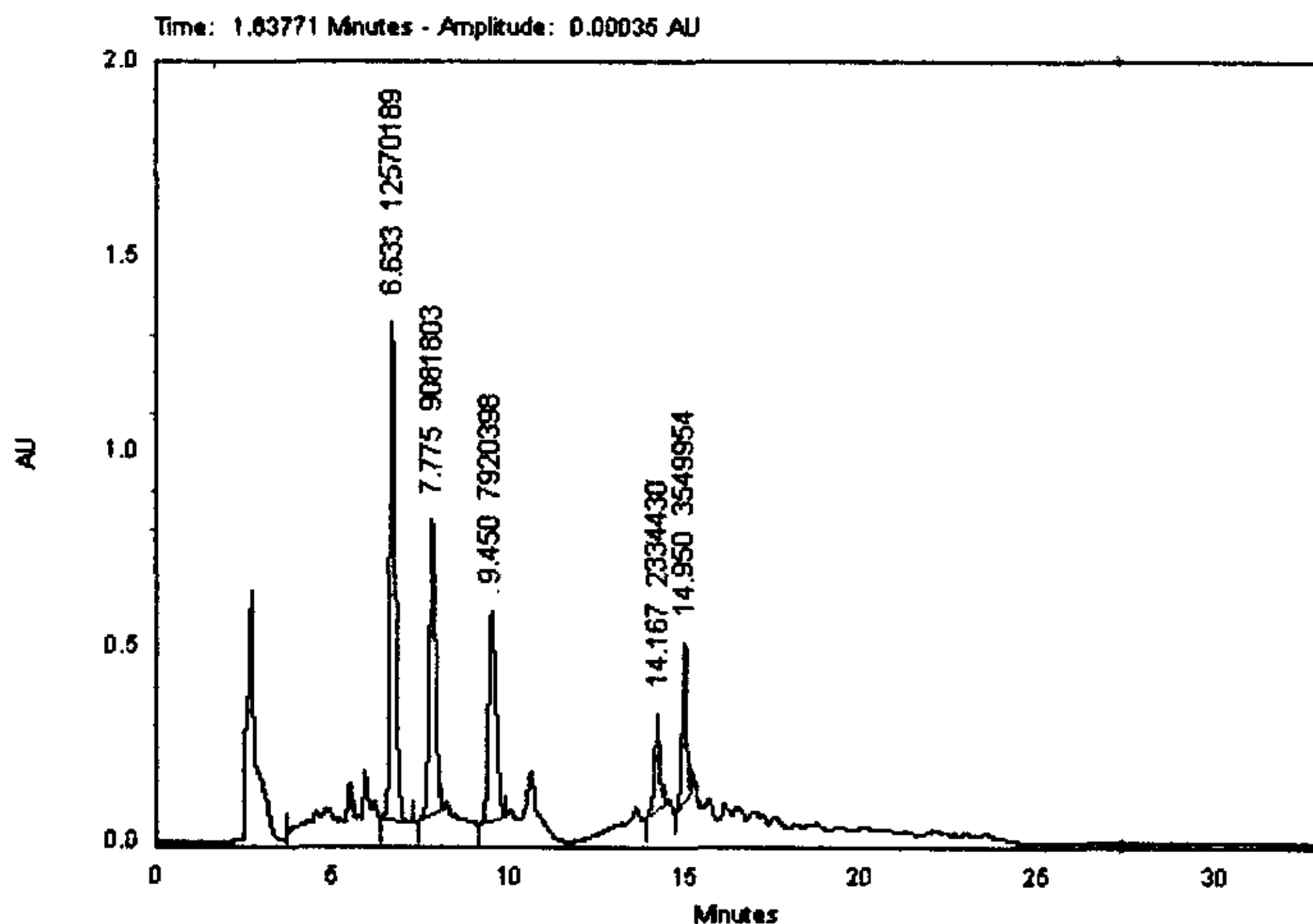


图 1.1 竹叶提取物 (Ebl<sub>971</sub>) 的 HPLC 谱图

### 1.1.2 仪器设备

高速逆流色谱仪：GS-10A3 型，北京市新技术应用研究所出品；

紫外检测器：8823A—UV，北京市新技术应用研究所出品；

便携式记录仪：YOKCLGAWA3057 型，北京市新技术应用研究所出品；

微机单缸泵：S-1007，北京益圣通技术开发有限责任公司出品；

数控计滴自动部分收集器：SBS-100，上海青浦沪西分析仪器厂出品；

超声波清洗器：KQ-250B 型，昆山市超声仪器有限公司出品；

快速混匀器：XK96-B 型，江苏姜堰新康仪器厂出品；

电子天平（万分之一）：FA1004 型，上海精密科学仪器公司天平仪器厂出品；

旋转蒸发器：R201 型，上海申科机械研究所出品；

电热恒温水浴锅：DKS-12 型，上海经济区沈荡中新电器厂出品；

循环水式真空泵：SHZ-D 型，河南巩义市英峪豫华仪器厂出品；

高效液相色谱仪：Agilent 1000 series，安捷伦科技上海分析仪器有限公司。

溶剂包括氯仿、甲醇、正丁醇、醋酸、石油醚、乙腈、磷酸等，除乙腈为 HPLC 纯外，其余均为分析纯。

### 1.1.3 实验方法

#### 1.1.3.1 HSCCC 分离溶剂系统的选择

根据各种溶剂的极性、粘性、比重、对样品的溶解性等因素，设计六组溶剂系统(如表 1.1 所示)，用 50ml 的分液漏斗，将上述溶剂系统各配制 20 ml，上、下相各取 2ml，然后再将对应的两相等体积混合于 10ml 试管中，分别加入约 0.1g 的 Ebl<sub>971</sub>，充分振荡，使样品在两相中完全溶解，静置分层，记录分层时间和上、下相体积，用 HPLC 法测定上、下相中所含的主要竹叶黄酮体的浓度，即可求得它们在该溶剂系统中的分配系数  $K^{[96]}$ 。

#### 1.1.3.2 HSCCC 操作程序

将选定的溶剂系统——石油醚：正丁醇：水(1：4：5)(总体积为 1500ml)配好，在分液漏斗中混匀，静置分层，临用前将其分开。取 10ml 下相(流动相)溶解 250mg Ebl<sub>971</sub> 试样，用于 HSCCC 的进样。

在室温下，以上相作固定相，下相作流动相，流速 2.0ml/min，从首端向尾端洗脱，主机正转，转速为 800rpm，固定相保留值为 43.5%，检测器波长 330nm 记录仪灵敏度范围 1A，量程 200mV，纸速 6cm/h。待色谱图的基线稳定后，调整检测器零点，通过进样器进样。当流动相开始流出色谱柱时，即可调节自动部分收集器按每管 8ml 收集。

每次进样 3.0ml，根据 330nm 波长下的紫外吸收峰定时收集馏分，合并多次重复试验的相同馏分，浓缩后，用 HPLC 鉴定。

实验结束时，用氮气将固定相由首端向尾端推出，并依次用 50ml 乙醇、60ml 水冲洗。

#### 1.1.3.3 HPLC 分析方法

色谱柱：Phenomenex C18 反相柱(4.6 mm i.d×250mm, 5 $\mu$ m)，柱温：30℃，流速：1.0 ml/min，进样量：20 $\mu$ l，洗脱溶剂：A 液是乙腈/0.1%磷酸(10：90, V/V)，B 液是乙腈/0.1%磷酸(25：75, V/V)，采用梯度洗脱，洗脱程序见表 1.1。检测波长：330 nm。



表 1.1 HPLC 梯度洗脱程序

Time (min)	0 ~ 30	30 ~ 35	35 ~ 40
A 液 (%)	0	100	0
B 液 (%)	100	0	100

## 1.2 结果与分析

### 1.2.1 HSCCC 分离的溶剂系统

样品成分在溶剂系统中的分配系数和管柱中固定相的保留值均会影响分离效果。一般情况下, 调整固定相达到管柱总体积 50%以上, 将分配系数调整在 0.5 到 2 之间能得到最满意的分离效果。分离样品时, 可以任意选择上相或下相作为流动相, 但在两种情况下, 溶剂固定相的保留值、流速控制及分离效果均大不相同。以下相作为流动相时, 流速较容易控制。本实验均以下相为流动相。

本文参照 1991 年 Fumie OKA, Hisao OKA 和 Yoichiro Ito 等人于设计的一套溶剂系统<sup>[97]</sup>, 结合竹叶黄酮糖苷的极性大小, 调正溶剂组成及体积比, 使样品得到理想的 K 值。经过大量实验, 得到一种较为满意的溶剂系统。

从表 1.2 和表 1.3 可见, 六种溶剂系统中的两相体积比都接近 1。1<sup>#</sup> 溶剂系统 (氯仿: 甲醇: 水= 4: 3: 2) 虽然分层稳定时间小于 30 秒, 但由于氯仿的非极性很强, 竹叶黄酮糖苷基本不溶于氯仿层; 2<sup>#</sup> 和 4<sup>#</sup> 溶剂系统分配系数过大, 分离效果不会很理想; 3<sup>#</sup> 溶剂系统分层时间太长; 虽然 5<sup>#</sup> 和 6<sup>#</sup> 溶剂系统都可能将样品分离, 但 6<sup>#</sup> 的上、下两相均有较强的亲水性, 在实际应用中固定相损失较大, 不利于样品的分离, 加之 5<sup>#</sup> 的分层时间较合适, 因此选择 5<sup>#</sup> 溶剂系统 (石油醚: 正丁醇: 水=1:4:5) 用于 Ebl<sub>971</sub> 中黄酮体的分离。



表 1.2 六种溶剂系统中的溶剂配比、分层时间及两相体积比

No.	溶剂系统	体积配比	分层时间(s)	上相/下相 (体积比)
1 <sup>#</sup>	氯仿: 甲醇: 水	4: 3: 2	8	1.05
2 <sup>#</sup>	正丁醇: 醋酸: 水	4: 1: 5	32	1.17
3 <sup>#</sup>	石油醚: 正丁醇: 甲醇: 水	1: 4: 1: 5	118	0.93
4 <sup>#</sup>	石油醚: 正丁醇: 醋酸: 水	2: 4: 1: 5	45	1.14
5 <sup>#</sup>	石油醚: 正丁醇: 水	1: 4: 5	25	0.96
6 <sup>#</sup>	石油醚: 正丁醇: 醋酸: 水	1: 4: 1: 5	57	1.04

表 1.3 四种主要竹叶黄酮体\*在六种溶剂系统中的分配系数值 (K 值\*\*)

No.	溶剂系统	A 峰	B 峰	C 峰	D 峰
1 <sup>#</sup>	氯仿: 甲醇: 水	—	—	—	—
2 <sup>#</sup>	正丁醇: 醋酸: 水	30	20	11	3
3 <sup>#</sup>	石油醚: 正丁醇: 甲醇: 水	11.6	4.3	1.3	2.7
4 <sup>#</sup>	石油醚: 正丁醇: 醋酸: 水	16	17.1	10.38	4.67
5 <sup>#</sup>	石油醚: 正丁醇: 水	3.8	4.44	3.2	2.8
6 <sup>#</sup>	石油醚: 正丁醇: 醋酸: 水	5.3	9.4	5.02	3.2

\* 四种主要竹叶黄酮体分别用 A 峰、B 峰、C 峰和 D 峰表示, 对应于图 1.1 的 Ebl<sub>971</sub> 中保留时间为 6.63、7.78、9.45 和 14.95 min 的组分。

\*\*  $K=C_s/C_m$ , 溶质在固定相里的浓度/ 溶质在移动相里的浓度

### 1.2.2 操作参数的优化

样品性质、色谱仪转向、流动相流速、进样量等因素, 均会影响逆流色谱仪运转过程中固定相的保留值, 也必然影响逆流色谱仪中样品成分的动态分配特性, 因而影响组分的分离效果。针对具体样品来说, 样品性质已固定, 可供选择的条件是色谱仪转向、流动相流速、进样量、仪器转速等, 需逐一进行考察。

#### 1.2.2.1 色谱仪的转向

对确定的溶剂系统, 样品由首端向尾端洗脱, HSCCC 转向分别采用正转和反转两种条件作考察: 以主机正转作为溶剂系统的上机操作条件时, 发现

在转速恒定的条件下,以下相作流动相,上相作固定相时其保留值可达 43.5%;主机反转时,固定相体积保留值只有 27.1%。同时发现增大转速或减少流速,都可以降低或消除固定相的带出现象。但流速过低时,分离时间延长,分离效率降低;且长期高速旋转,产生的热量将影响分离的稳定性。所以我们选择正转。

#### 1.2.2.2 进样量对分离效率的影响

当 HSCCC 仪主机正转,转速为 800rpm,流速为 2.0 ml/min,进样量分别为 84、103、120mg 时, Ebl<sub>971</sub> 各组分的保留时间和峰形均相应地发生变化。当进样量增大到 120mg, Ebl<sub>971</sub> 中 1、2、3 号吸收峰的间距缩短,峰形部分重叠,4 号峰消失,相比 103mg 进样量时的谱图、5 号峰提前流出,详见如图 1.2。为了获得有效的分离,我们选择最大进样量不超过 103mg。

结果表明,用单台 HSCCC 分离,一次可以实现 103mg 的 Ebl<sub>971</sub> 样品的较好分离,但还不能达到克量级分离的目的,要达到这一目标,只有加大柱容量。目前国内只有柱容量为 230ml 的 HSCCC 仪,若采用双机联用的方法进行分离,就能达到克量级的分离<sup>[98]</sup>,但由于试验条件限制,我们未能进行克量级分离的应用研究。

#### 1.2.2.3 流动相流速对分离效率的影响

当 HSCCC 仪转速为 800rpm,进样量为 103mg,流速分别为 1.0、1.5、2、2.25、2.5ml/min 时 Ebl<sub>971</sub> 各组分的保留时间也相应地发生变化。当流速为 1.5ml/min 时,1、2、3 号峰部分重叠,4 号峰消失,所有的峰相对于流速为 2.25ml/min 时,出峰时间往后推迟了 30min;随着流速大于 2.25 ml/min, Ebl<sub>971</sub> 各吸收峰的间距缩短,峰形变差,4 号峰消失。为了获得最佳的分离效率,我们选择流速为 2.25 ml/min,如图 1.3 所示。

#### 1.2.2.4 仪器转速对分离效率的影响

当进样量为 103mg,流速为 2.25 ml/min, HSCCC 仪器转速分别为 700、800、900 rpm 时, Ebl<sub>971</sub> 各组分的保留时间均相应地发生变化。当转速为 700 和 900 r/m 时,情况相似:1、2、3 号峰未能很好地分离;4 号峰消失,经 HPLC 鉴定留于固定相中;5 号峰出峰提前了 20 分钟左右。故适宜的分离转速应为 800 rpm。

当 HSCCC 主机正转,转速为 800rpm,进样量为 103mg,流动相流速分别为 1.5、2、2.25 ml/min 时, Ebl<sub>971</sub> 各组分的出峰情况详见图 1.3 中 a、b、c 部分所示。

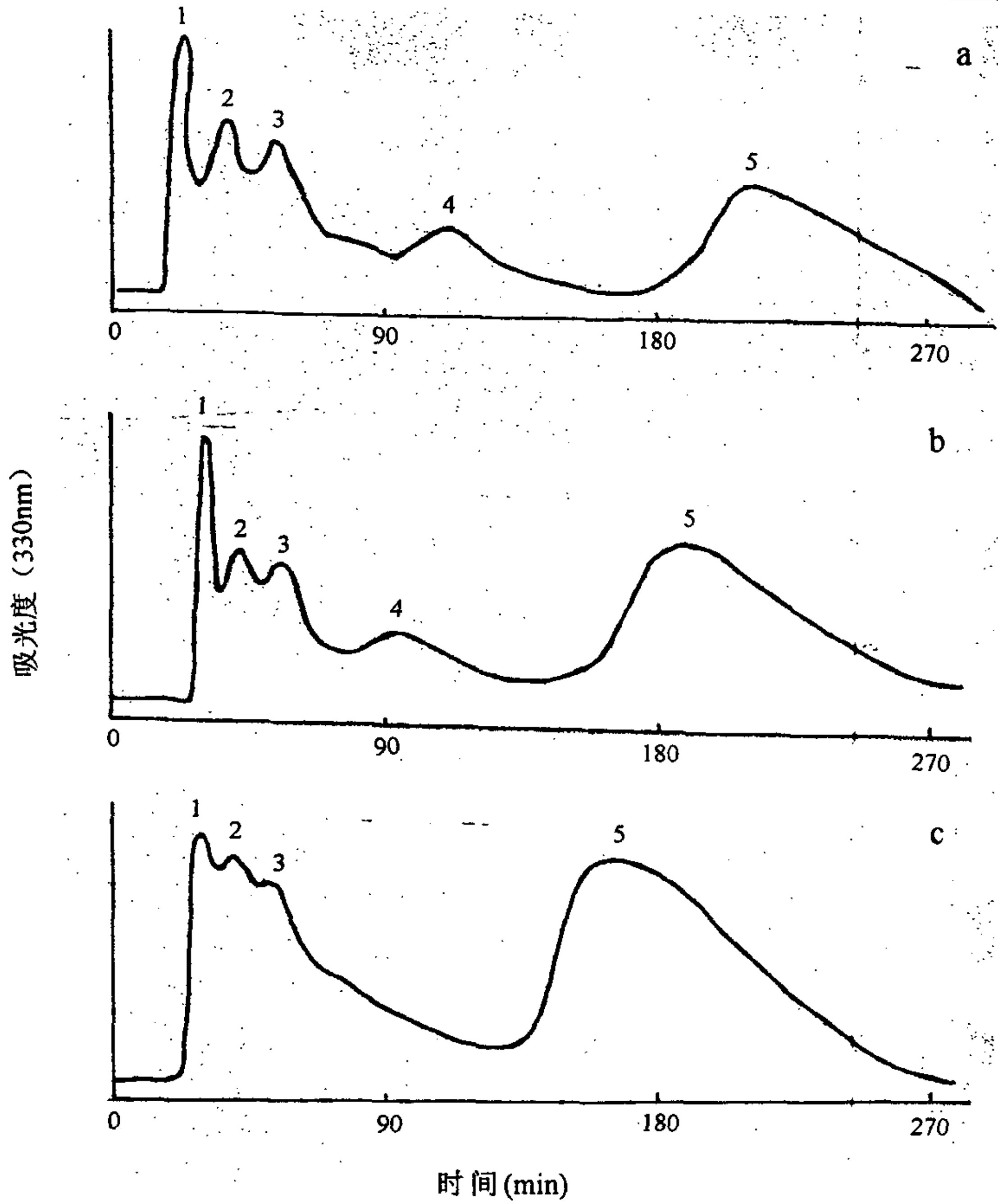


图 1.2 Ebl<sub>971</sub> 进样量对 HSCCC 分离效率的影响  
 (a) Ebl<sub>971</sub> 进样量为 84mg; (b) Ebl<sub>971</sub> 进样量为 103mg; (c) Ebl<sub>971</sub> 进样量为 120mg  
 (主机正转, 转速为 800rpm, 流速为 2.0 ml/min)

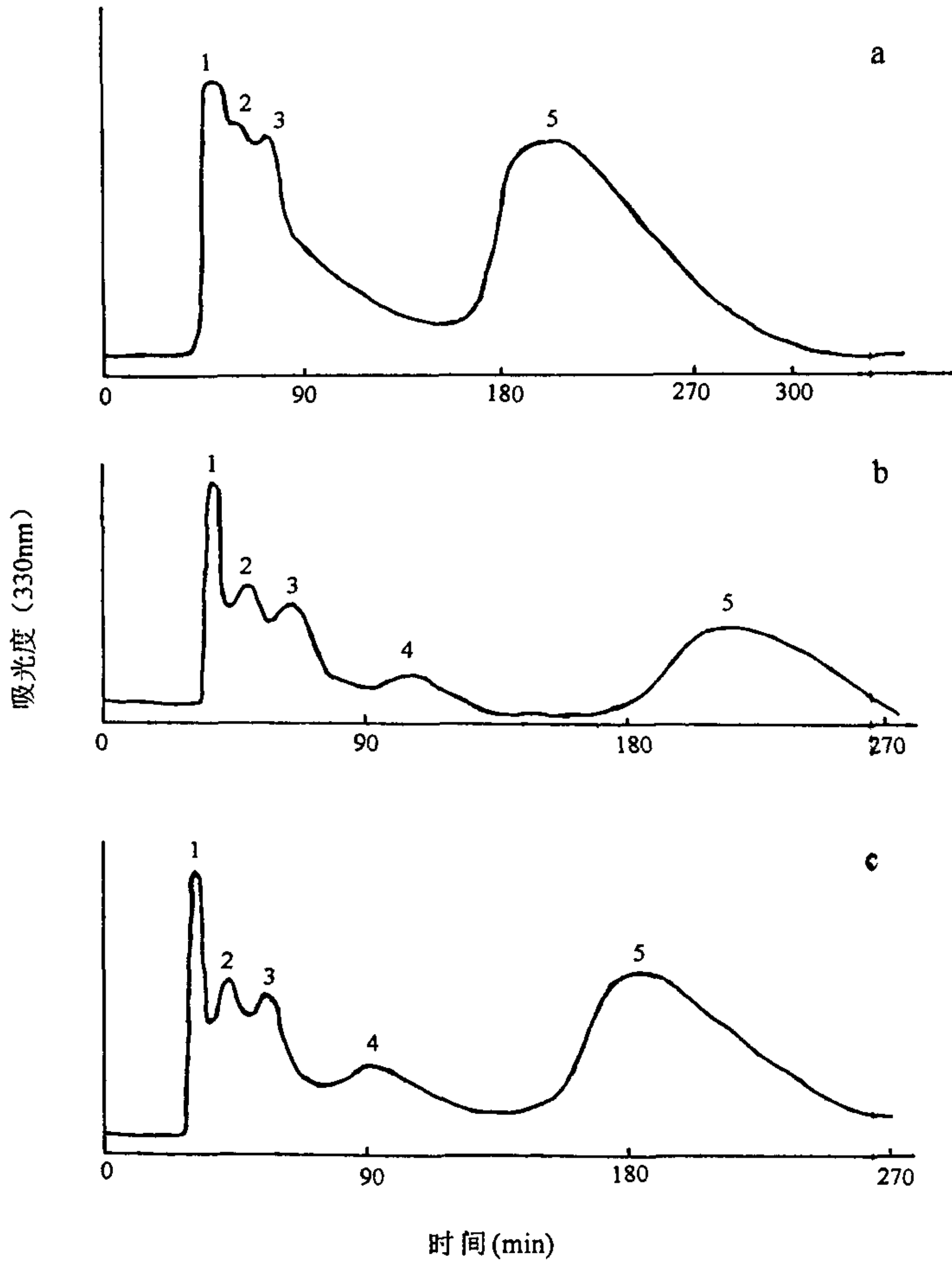


图 1.3 流动相流速对 HSCCC 分离效率的影响  
 (a) 流速为 1.5 ml/min; (b) 流速为 2 ml/min; (c) 流速为 2.25 ml/min  
 (主机正转, 转速为 800rpm, Ebl<sub>971</sub> 进样量为 103mg)

### 1.2.3 分离结果分析

用单台 HSCCC 仪分离 103mg 的 Ebl<sub>971</sub>，当离心分离至 270min 时，停止泵入流动相，并使仪器停止运行，用氮气以 4.0ml/min 的流量，将分离柱中的固定相溶剂推出。

从流动相中分别收集得到 5 个分离组分（图 1.2-b 中 1~5 号峰），显示组分分离效果较为理想：

1 号峰：棕黄色溶液，HPLC 分析表明，主要成分为 330nm 波长下无吸收的色素及少量的酚酸类物质，几乎不含竹叶黄酮体。

2 号峰：淡黄色溶液，HPLC 分析显示，在保留时间 6.64min 时有一个浓度很低的吸收峰，同时其它杂峰也较多。

3 号峰：淡黄色溶液，HPLC 分析显示，在保留时间 5.70min 时有一个浓度很低的吸收峰，同时其它杂峰也较多。

4 号峰：淡黄色溶液，HPLC 分析表明，保留时间为 12.51min 时有一个吸收峰，纯度较高，见图 1.4。

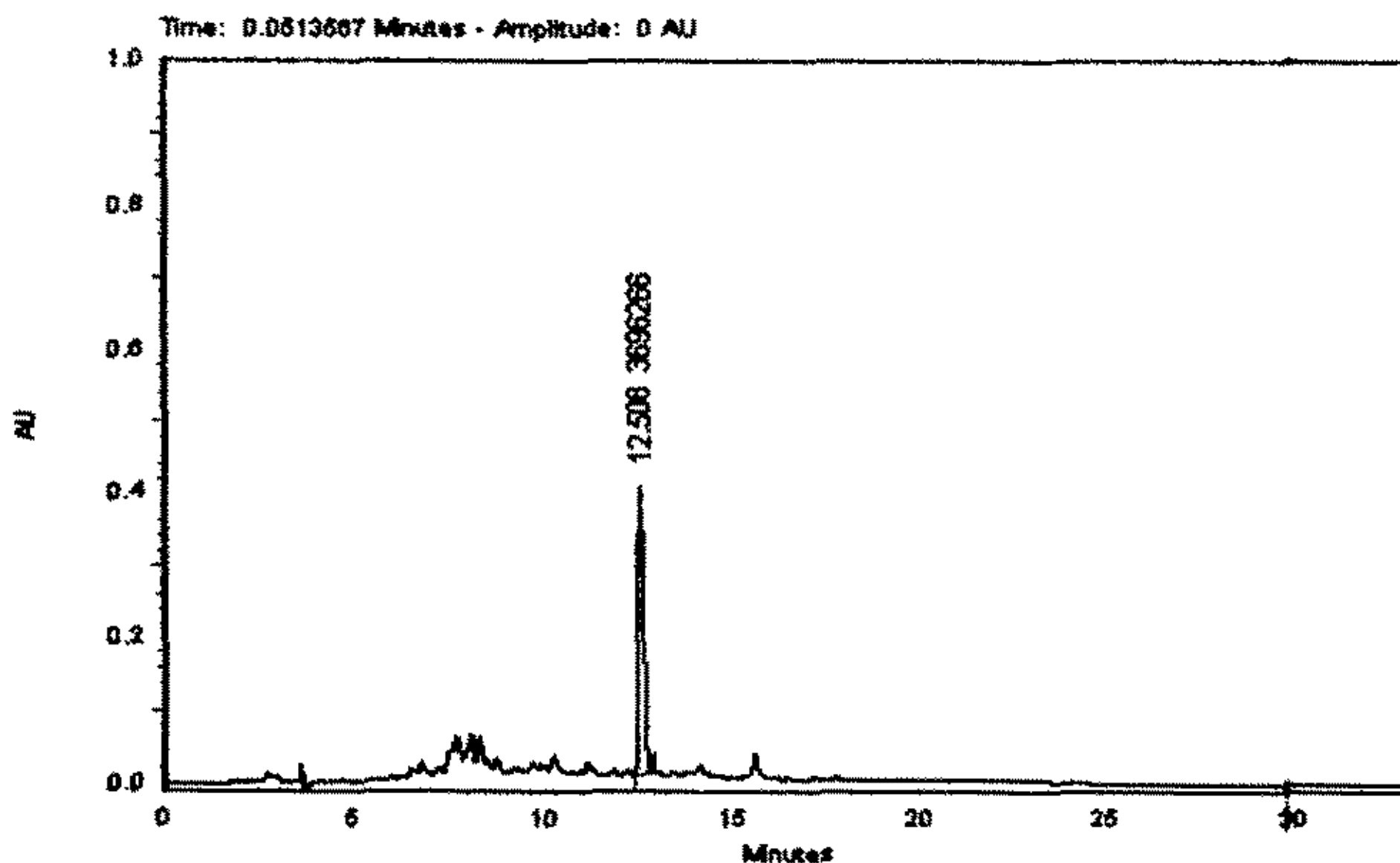


图 1.4 HSCCC 分离组分中 4 号峰的 HPLC 谱图

（反相 C<sub>18</sub> 柱，梯度洗脱，检测波长 330 nm）

5 号峰：淡黄色溶液，经 HPLC 分析表明，该组分含保留时间分别为 6.51

和 7.54min 两个强吸收峰，与 Ebl<sub>971</sub> 原样的 HPLC 图谱对照，发现此二峰即为原样中的两个主峰（图 1.5），两个峰合计占总面积达 94%，推测应为荭草苷和异荭草苷。

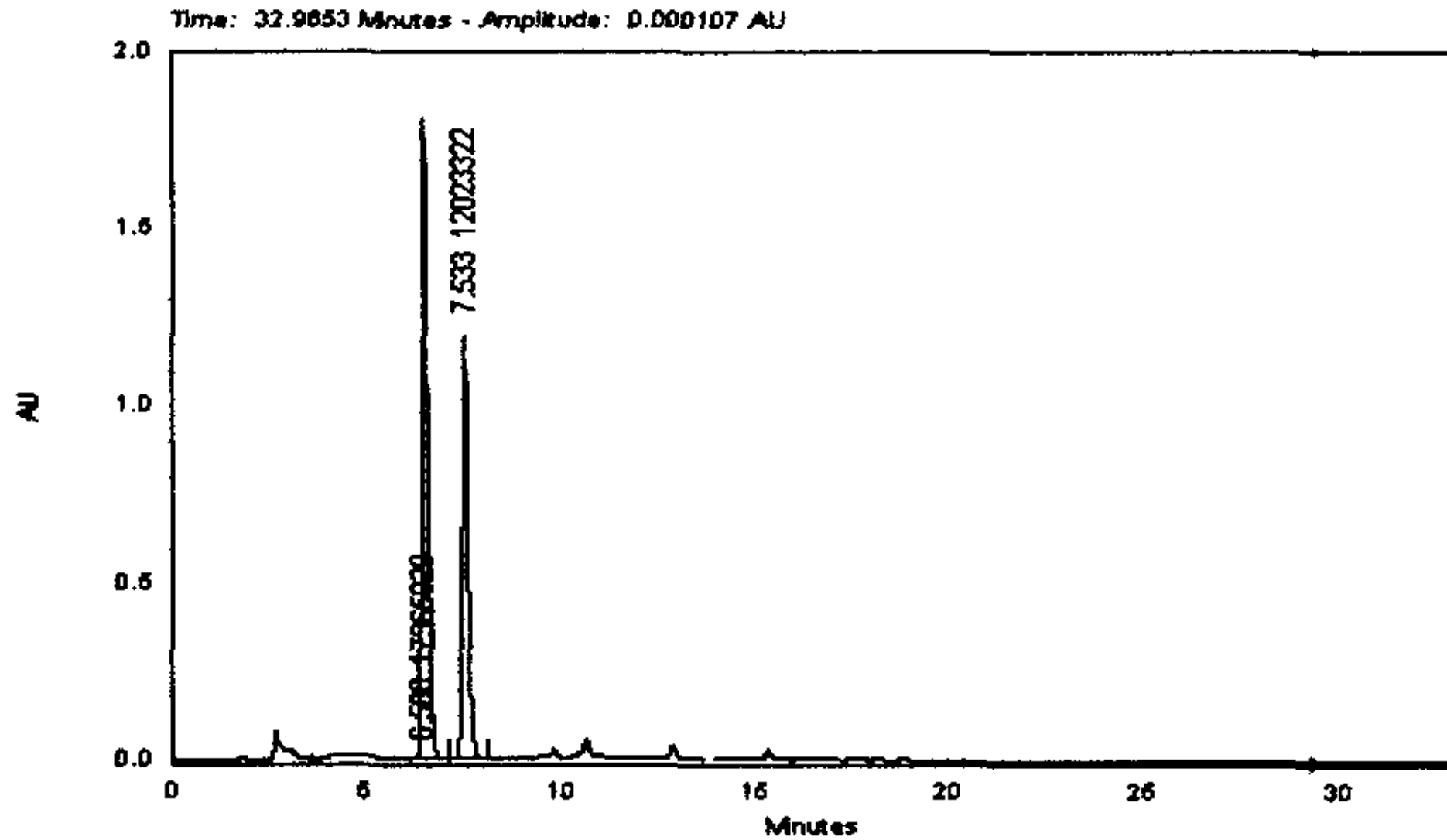


图 1.5 HSCCC 分离组分中 5 号峰的 HPLC 谱图  
(反相 C<sub>18</sub> 柱，梯度洗脱，检测波长 330 nm)

固定相中仍保留有一定的 Ebl<sub>971</sub> 组分（称为 6 号峰）：淡黄色溶液，HPLC 分析显示，图谱中所含成分及出峰时间基本等同于图 1.1 Ebl<sub>971</sub> 的 HPLC 谱图，只是保留时间为 6.51 和 7.54min 两个强吸收峰的浓度下降了很多。

另外，在 HSCCC 分离实验中发现，流出曲线的个别峰出现“毛刺”（详见图 1.2 和 1.3），可能与固定相被带出有关，也可能是紫外检测及记录仪与主机不甚匹配，使色谱图的峰形不够满意，这些尚待探索与改进。

### 1.3 小结

结果表明，采用石油醚：正丁醇：水（1：4：5）三元溶剂系统，当逆流色谱仪转速为 800rpm，流速为 2.0 ml/min，Ebl<sub>971</sub> 进样量为 103mg 时，3h 内就可有效地将竹叶提取物(Ebl<sub>971</sub>)中的黄酮物质分成六个组分，特别是 5 号峰，经 HPLC 检验其中含两种主要的竹叶碳苷黄酮体，达到理想的预分离效果。



## 第二节 制备高效液相色谱分离纯化竹叶碳苷黄酮单体

上个世纪 80's 以来, HPLC 技术在天然产物的分析检测中得到了飞速发展, 其中反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 在黄酮等酚性化合物的研究中扮演着重要角色, 但以定性和定量方面的应用居多, 制备型 HPLC (PHPLC) 的由于技术上的原因, 进展相对较慢, 还未形成系统的理论, 一些参数大多根据具体实验来选择。

本文在 HSCCC 预分离的基础上, 运用 PHPLC 手段对 5 号峰中所含的 2 种主要的竹叶黄酮碳苷进行分离和纯化, 并用紫外二极管阵列检测 (PDA) 和液相色谱~质谱联用 (HPLC~MS) 技术对制备产物进行定性。

### 2.1 材料与amp;方法

#### 2.1.1 分离原料

将 1.2.3 中的 Ebl<sub>971</sub> 目标馏分——5 号峰用旋转蒸发仪在 50℃ 下减压浓缩、直至干燥, 残渣用甲醇溶解后备用。

#### 2.1.2 仪器与试剂

高效液相色谱系统: Beckman System Gold series, 144M Solvent Delivery 泵, 各种规格进样器, 406 数模转化器, 168 紫外二极管阵列检测器, Sc-100 型部分收集器, System Gold 工作站系统, 均为美国 Beckman 公司产品。

液~质联用系统: Micromass Quattro II LC-MS 系统, a Waters Alliance 2690 HPLC 系统 and Waters 996 PDA 检测器, MassLynx 3.3 版本的软件均为 Waters 公司产品

旋转蒸发仪: R201 型, 上海申科机械研究所出品。

干热式样品浓缩器: 59751 Reacti-Therm, 迪马公司出品。

掌上离心机: LX-100 型, 江苏海门麒麟医用仪器厂出品

甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯, 水为超纯水, 其它试剂皆为分析纯。

碳苷黄酮标准品: 荭草苷(orientin)和异荭草苷(isoorientin)购自美国的 Indofinechemical 公司, HPLC 级标准品 (经过四谱确认)。

#### 2.1.3 实验方法

### 2.1.3.1 HPLC 分析条件

色谱柱: Phenomenex C<sub>18</sub> 柱 (4.6mm i.d.×250mm, 5μm), 柱温: 30℃, 流速: 1.0 ml/min, 进样量: 20μl, 洗脱溶剂: A 液: 0.1%甲酸水溶液 (V/V), B 液: 乙腈, 梯度洗脱 (程序如表 2.1 所示)。检测波长: 330nm, 光谱采集范围 190~600nm。

表 2.1 高效液相色谱分析的梯度洗脱程序

Time (min)	0	20	25	27	32
A 液	85%	70%	70%	85%	85%
B 液	15%	30%	30%	15%	15%

### 2.1.3.2 HPLC 制备条件

色谱条件: Bechman Ultrasphere<sup>TM</sup> ODS 半制备柱 (10mm i.d.×250mm, 5μm), 柱温: 30℃, 流速: 1.0 ml/min, 进样量: 100μl, 洗脱溶剂: A 液: 0.1%甲酸水溶液 (V/V), B 液: 乙腈, 梯度洗脱 (程序如表 2.2 所示)。检测波长: 330 nm, 光谱采集范围 190~600nm。

表 2.2 高效液相色谱制备的梯度洗脱程序

Time (min)	0	15	25	27	32
A 液	80%	60%	60%	80%	80%
B 液	20%	40%	40%	20%	20%

### 2.1.4 馏分收集与制备

根据保留时间和信号响应值大小的变化, 定时收集检测器出口的 2 个相应馏分。收集液在 60℃下, 用氮气吹干至粉末状。用 100μl 甲醇分别溶解得到, 用移液枪注入 1.5ml 离心管中, 再加入 900μl 乙醚, 充分混合后离心分离, 弃去上层清液, 重复操作 3 次, 留下的沉淀就是所需的黄酮单体的结晶, 用 HPLC 检验纯度。

### 2.1.5 HPLC~MS 鉴定条件

HPLC 条件: HP ODS hypersil 色谱柱 (4mm i.d. ×125mm, 5μm), 柱温: 40℃, 流速: 0.15 ml/min, 进样量: 0.15μl, 洗脱溶剂: A 液: 水溶液,

B 液：甲醇，C 液：甲酸，洗脱梯度（如表 2.2 所示），检测波长：350 nm，光谱采集范围：200~400nm。质谱条件：扫描时间范围：0~15min，分子量范围 250~700，质子轰击法。

表 2.3 HPLC-MS 流动相梯度程序

Time (min)	0	5	15	17	25
A 液	73%	53%	38%	73%	73%
B 液	25%	45%	60%	25%	25%
C 液	2%	2%	2%	2%	2%

## 2.2 结果与分析

### 2.2.1 色谱体系的选择

Ebl<sub>971</sub> 中含多种碳苷黄酮，结构相似，极性相近，要获得高纯度的单体化合物非常困难。在分析型 HPLC 的实验过程中选择了多种流动相条件，起先选择通用、经济且毒性较小的甲醇~水体系作流动相，但峰形重叠、分离效果差。改用乙腈~水系统后，分离的图形明显改善，分离度增大，但仍未达到基线分离。后在该系统中添加一定浓度的磷酸，分离效果明显，目标峰达到基线分离。

PHPLC 条件是在 HPLC 分析的基础上，调整了洗脱程序（见表 2.1 和 2.2 所示），得到峰形较为理想的图谱。制备初期所得的图谱（图 2.1）在主要组分出峰前有一个大包，由于在分析柱上从未出现此种情形，我们推测是由于半制备柱的质量超载。为了确定其属质量超载还是含有其它杂质，采用逐步减少进样量（从 200 $\mu$ l、100 $\mu$ l、50 $\mu$ l 到 20 $\mu$ l）的方法，发现此包慢慢减小直至消失，初步确认为柱超载。为了进一步确证，我们收集了该馏分，再过分析柱，出现与原来样品一致的图谱（图 1.2），证实此包确实是由于样品量超过半制备柱的吸附饱和容量，不经吸附而直接洗脱下来的缘故。随着进样量的加大，峰形的重叠现象加剧。最终确定进样量为 100 $\mu$ l（约含 5 号峰物质 100 $\mu$ g）。

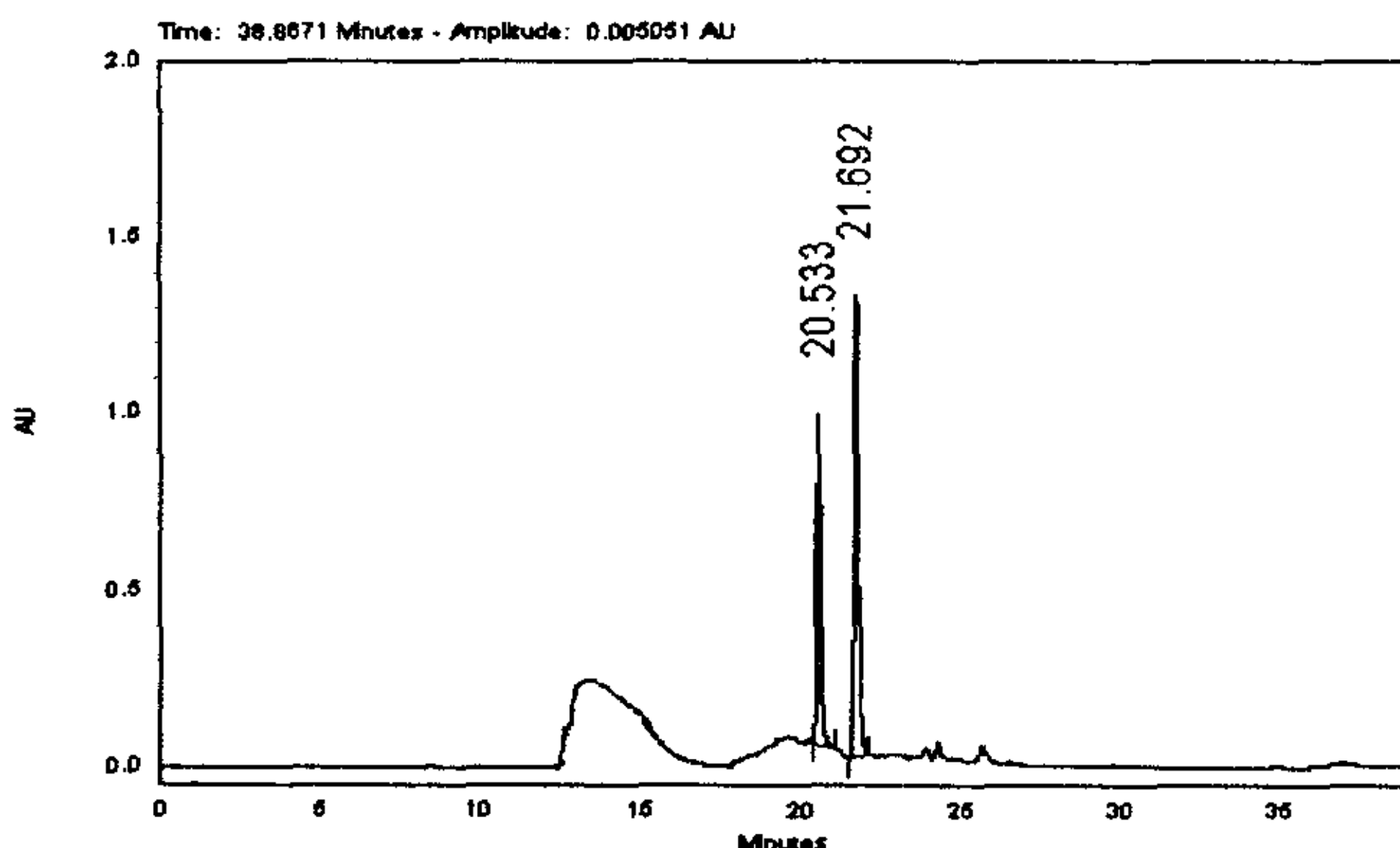


图 2.1 HSCCC 分离物——5 号峰的 PHPLC 图  
(示半制备柱的过载现象)

### 2.2.2 流动相中酸的选择

流动相中加入少量的酸可以改善酚类物质的分离度和防止峰的拖尾，并可缩短出峰时间，通常使用磷酸。但加酸对柱的稳定性和寿命有一定影响，同时由于流动相中所含的磷酸在后续的浓缩过程中难以挥发，会影响目标产物的制备。

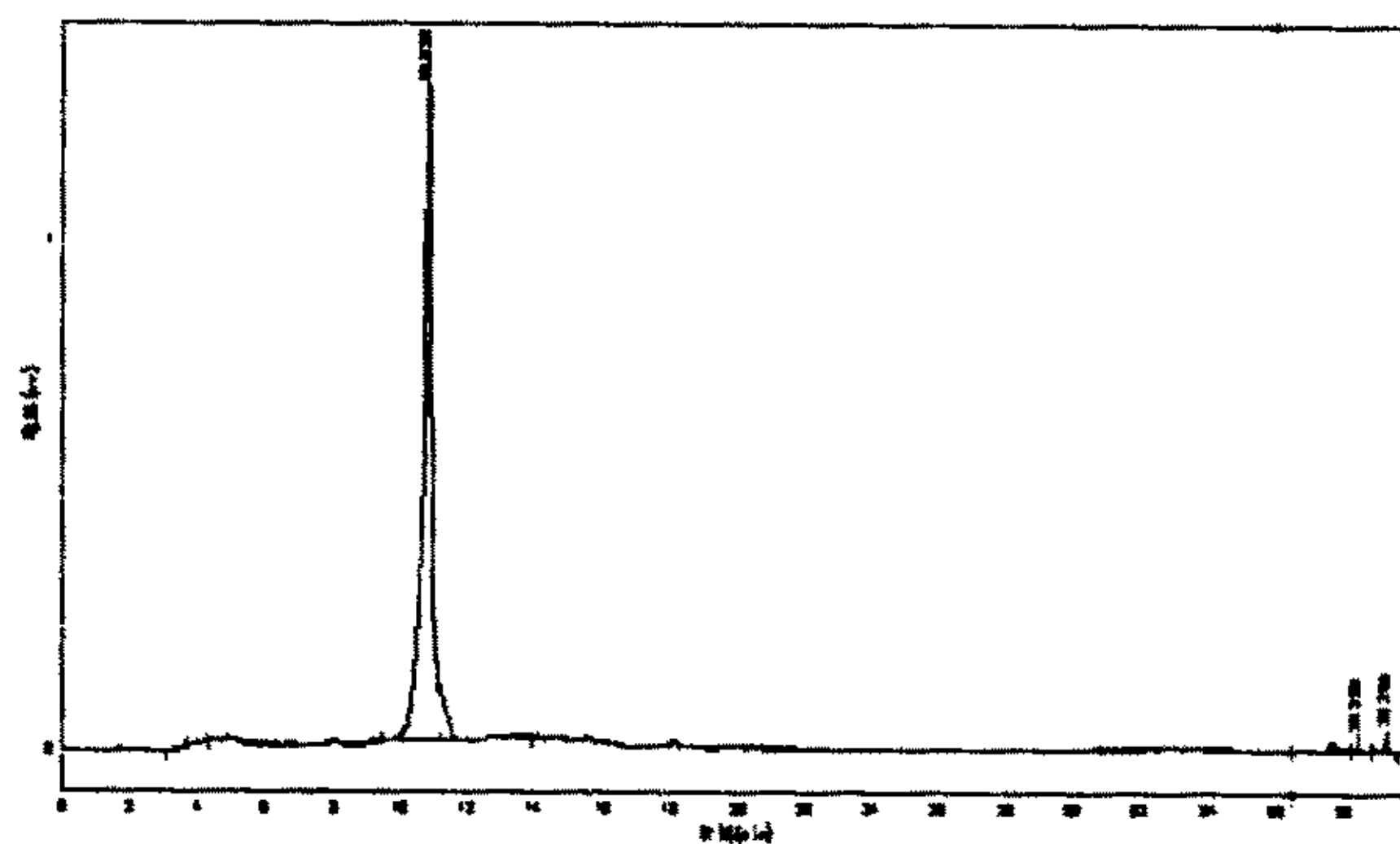
为了选择合适的酸代替磷酸作为分离扫尾剂，分别比较了甲酸和乙酸，结果表明两者在保持分离度和峰形上的作用均与磷酸相同。虽然两者均为挥发性有机酸，但考虑到乙酸的沸点较高（118 °C），在浓缩过程中其浓度会逐渐升高，容易引起样品的酸水解，而甲酸沸点与水相近（100.6 °C），易与水一起蒸出，所以在本实验中选用甲酸。又经反复试验，将流动相中甲酸的浓度从 0.5% 降到了 0.1%，对峰形和分离度几乎没有影响。对制备产物进行 HPLC 分析的结果也证明，使用甲酸后，后续的制备过程中未发生目标产物的水解现象。

### 2.2.3 目标产物的纯度检验及结构确认

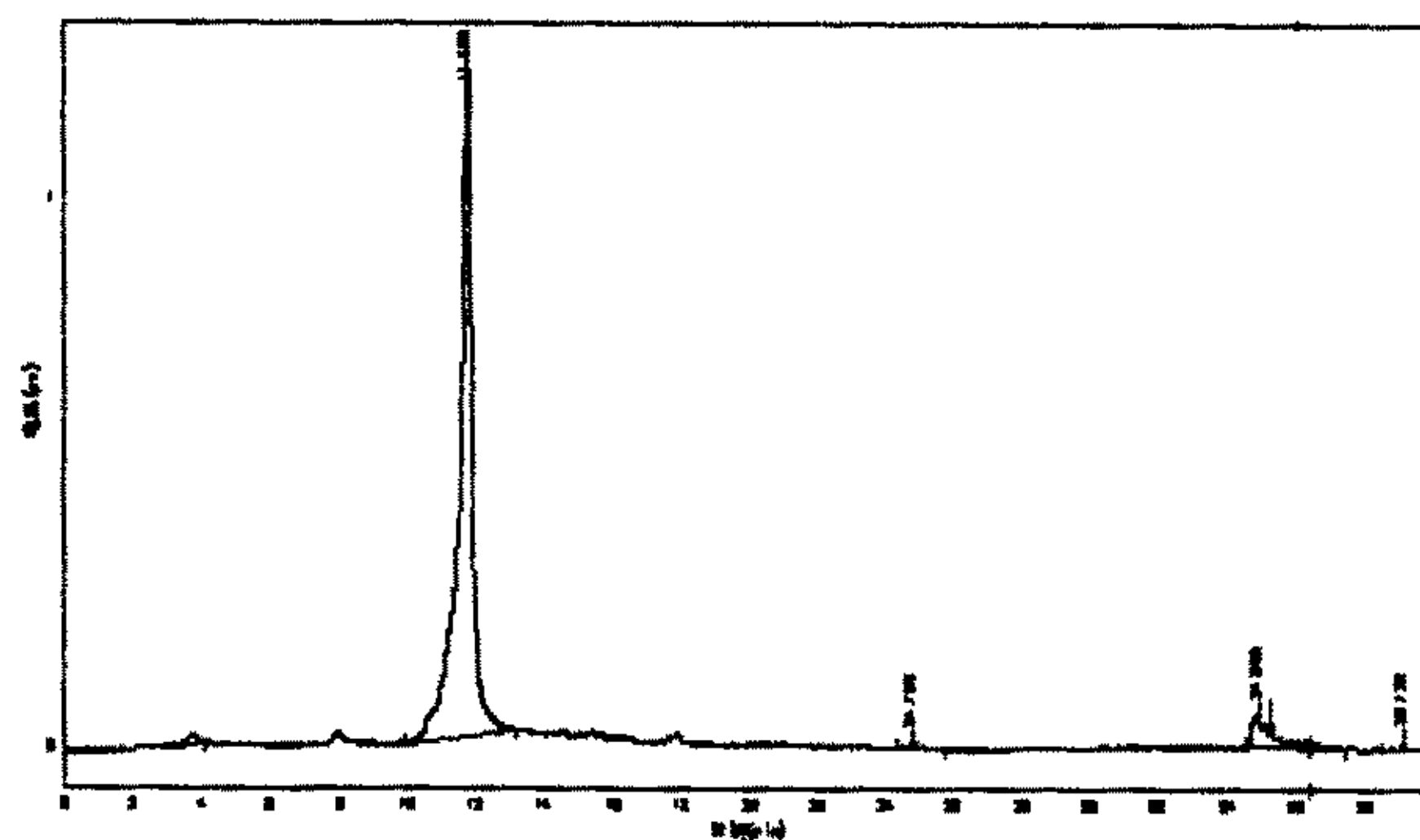
紫外光谱（UV）是鉴定黄酮类化合物结构的一种最有效的方法<sup>[99]</sup>。黄酮和黄酮醇在甲醇中的紫外吸收光谱，在 240~400nm 区域有两个主要的吸收峰，带 I 与 B 环肉桂酸系统有关，通常在 300~380nm；带 II 与 A 环苯甲酰系统有

关，一般在 240~280nm<sup>[100]</sup>。

HPLC 制备的 2 种重结晶产物均为金黄色无定形粉末，将其用甲醇溶解后，以 PDA 在 190~600nm 作光谱采集，从 UV 光谱图看，分离得到的两个产物都具有黄酮类化合物所特有的吸收带 I、II，且两吸收峰的相对强度也具备黄酮类化合物特征。经分析型 HPLC 检测，其纯度分别大于 98%、95%。见图 2.2。



(1)



(2)

图 2.2 目标产物 1 和 2 的 HPLC 谱图

#### 2.2.4 HPLC~MS 鉴定结构

将 2 种制备产物分别与 2 种 Indofinechemical 公司的标准品同时作 HPLC~MS 测试, 其 M+1 都是为 449, 表明分子量均为 448。目标产物 1 与荭草苷 (Orientin) 的出峰时间和 PDA 波谱一致, 经标准样品加入试验法测定, 出峰完全重叠, 确认目标产物 1 是荭草苷 (木犀草素-8-C 葡萄糖苷), 结构如图 2.3 所示; 目标产物 2 与异荭草苷 (Isoorientin or homoorientin) 的出峰时间和 PDA 波谱一致, 经标准样品加入试验法测试, 出峰完全重叠, 确认目标产物 2 是异荭草苷 (木犀草素-6-C 葡萄糖苷), 结构如图 2.4 所示。

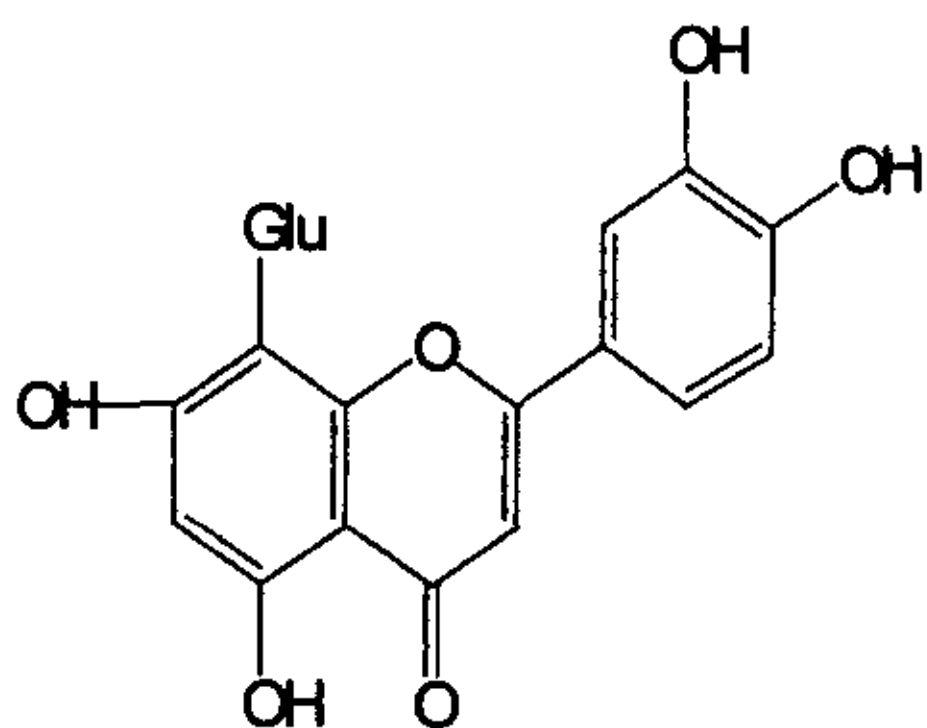


图 2.3 荭草苷 (Orientin)

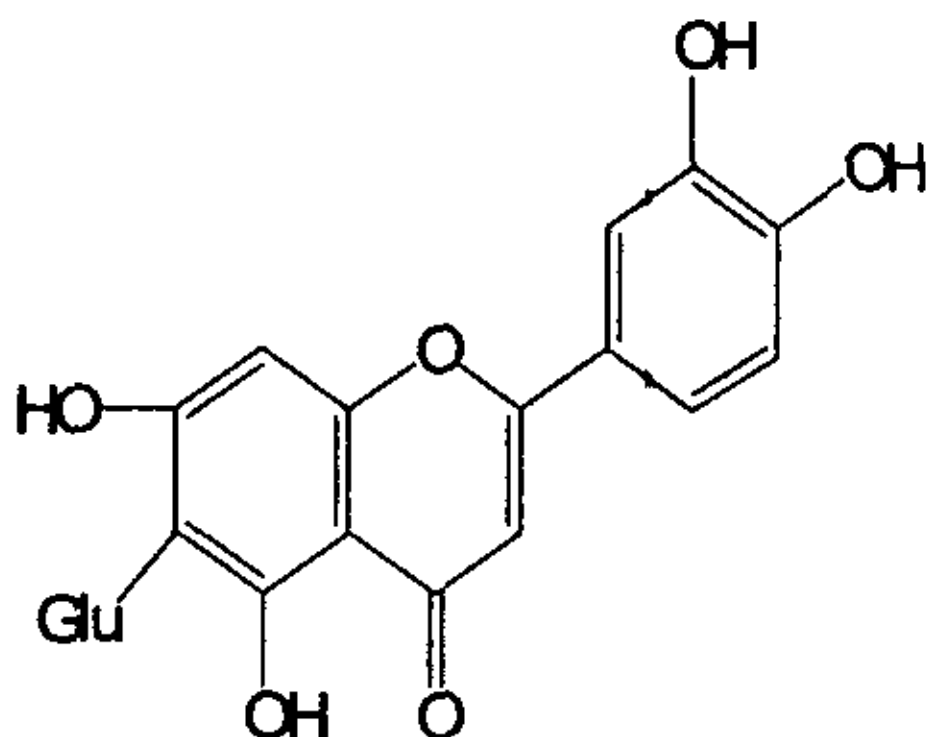


图 2.4 异荭草苷 (Isoorientin)

HPLC~MS 分析测试的荭草苷和异荭草苷的 HPLC 图、总离子流图 (TIC) 和 PDA 紫外扫描图谱分别如图 2.5 和图 2.6 所示。

#### 2.3 小结

运用 HPLC 制备技术, 色谱条件为: Bechman Ultrasphere™ ODS 柱 (10mm i.d. × 250mm, 5μm), 柱温 30 °C, 进样量 100μl, 乙腈~水~甲酸梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, UV 检测波长 330 nm, 二极管阵列扫描范围 190~600nm, 对 HSCCC 预分离得到的 5 号峰进行分离、纯化和制备, 得到了两个黄酮单体。并运用 HPLC~MS 联用技术对单体进行结构鉴定, 通过与标准品同步的对照测试和标准加入法试验, 结合文献报道的数据, 确认此 2 种竹叶碳苷黄酮单体分别是荭草苷和异荭草苷。



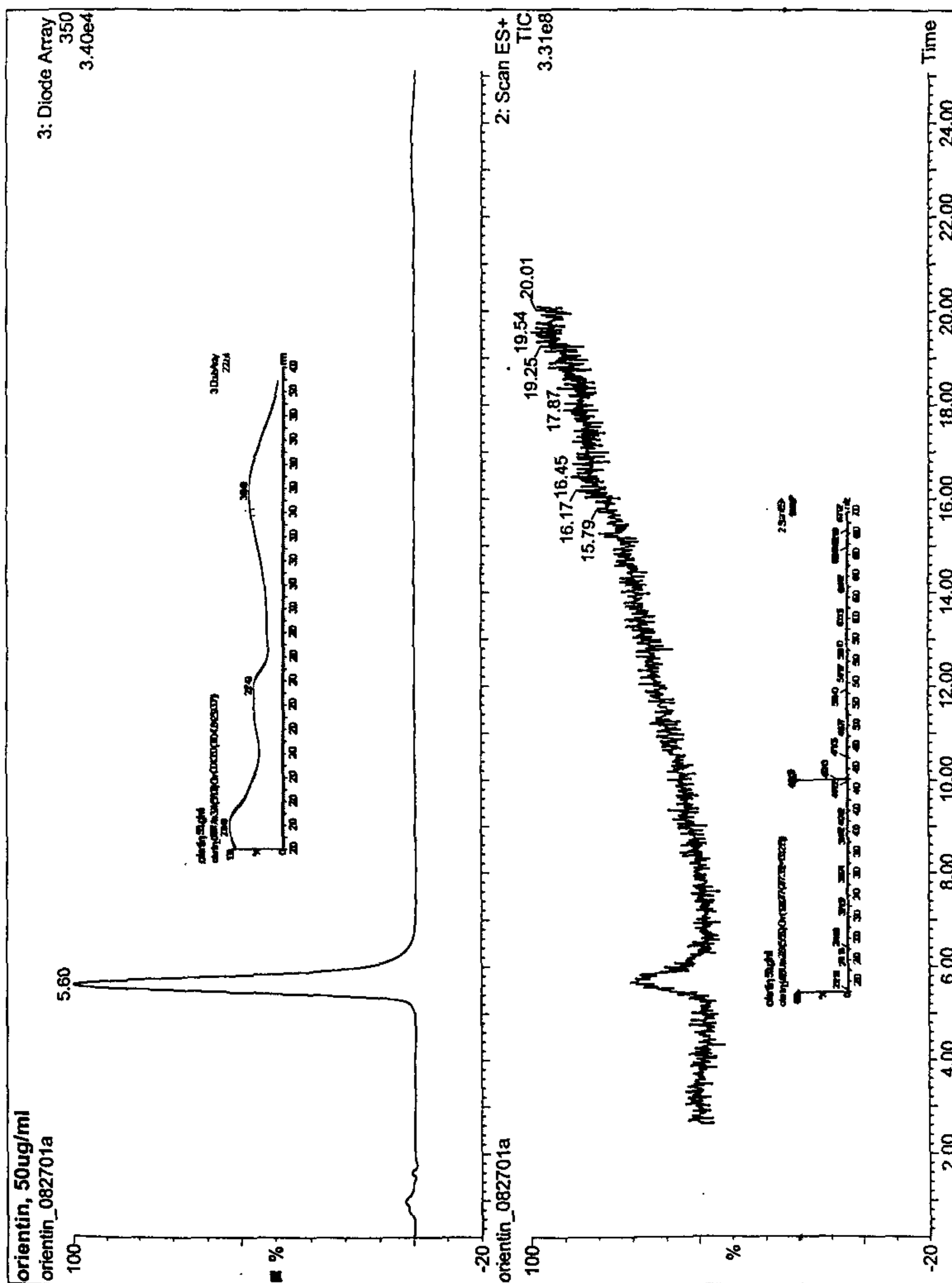


图 2.5 荪草苷的 HPLC-MS 谱图

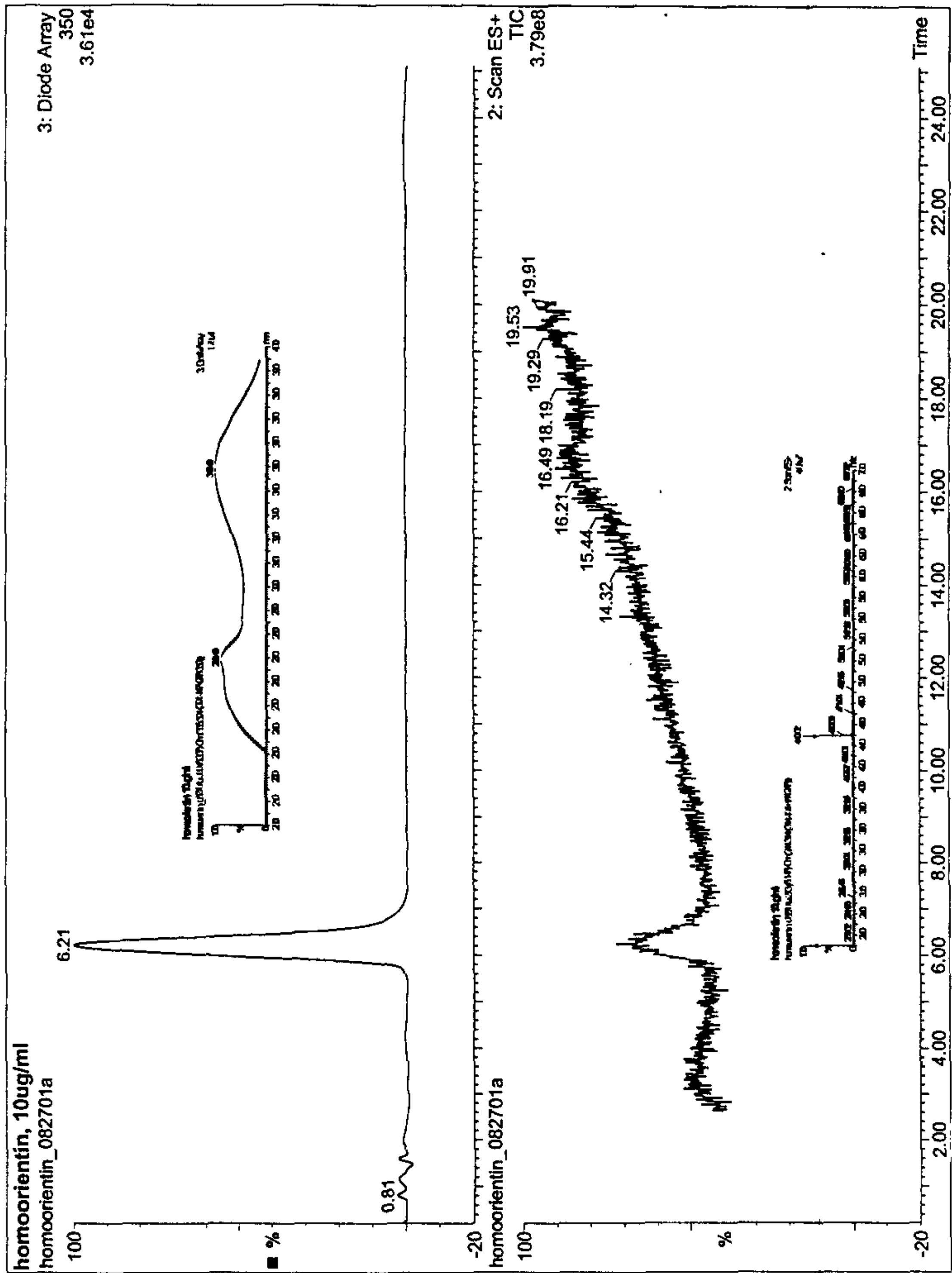


图 2.6 异荭草苷的 HPLC-MS 谱图

### 第三节 溶出伏安法检测竹叶提取物中的微量元素

对单个金属离子的测定，通常有分光光度法、原子吸收法、极谱和伏安法等。溶出伏安法在最近的十余年中，由于其特殊的高灵敏性，在各种痕量元素的分析领域很快地发展起来，能够测定的金属元素已达四十余种<sup>[61]</sup>。溶出伏安法早期的研究，较多的是对原子能、半导体工业中使用的超纯材料内痕量杂质元素的测定。现在则更多的是研究它在环境保护、医学卫生、临床化学、生物学以及食品分析等领域中的应用。这一价廉、简便而高灵敏度的分析技术，越来越受到广大分析工作者的欢迎。

铅、镉等微量元素历来是危及人类安全和健康和有害成分，其毒理作用正不断为人们所认识，在食品和天然产物中含量超标的现象时有发生，监控的重要性日益显现。锌、铜等虽是人体必需的微量元素，但超过一定量也会对人体有害，所以对于它们的测定也显得非常必要。在食物、饮用水等直接与人体密切相关的物质中此类元素的测定已有较多的报道<sup>[61-80]</sup>，利用各种极谱法连续测定两种或两种以上金属离子，利用阳极溶出伏安法连续测定镉、镉、锌和铜也都有报道<sup>[80]</sup>，但用 1.5 次微分阳极溶出伏安法连续测定这四种元素还未见有公开报道。本文探索运用溶出伏安法测定竹叶提取物中的铅、镉、锌、铜，以期工业化生产中的质量控制找到一种高效、快速、准确的测定方法。

#### 3.1 材料与方方法

##### 3.1.1 实验原料

Ebl<sub>971</sub>: 由安吉圣氏生物制品有限公司提供。

##### 3.1.2 仪器设备

多功能极谱仪: AD-3 型, 江苏金坛仪器制造厂出品。

三电极系统: 镀汞玻碳电极(工作电极, 3.2mm)、铂电极(辅助电极)、饱和甘汞电极(参比电极), 江苏金坛仪器制造厂出品。

记录仪: U-135 型, 日本岛津株式会社出品。

##### 3.1.3 溶液的配制<sup>[101]</sup>

###### 3.1.3.1 镉标准溶液配制

称取 0.5620g 基准金属镉于 250ml 烧杯中，加入 30ml 1:1 盐酸，加热溶解，冷却，移入 250ml 容量瓶中，用水定容。配成  $2.00 \times 10^{-2}$  mol/L 的镉储备液。

#### 3.1.3.2 锌标准溶液配制

称取 0.3269g 基准金属锌于 250ml 烧杯中，加入 40ml 1:1 盐酸溶解，待溶解完全后，加热煮沸几分钟，冷却，移入 250ml 容量瓶中，用水定容。配成  $2.00 \times 10^{-2}$  mol/L 的锌储备液。

#### 3.1.3.3 铅标准溶液配制

称取 1.0360g 基准金属铅于 250ml 烧杯中，加入 40ml 1:2 硝酸溶解，待溶解完全后，加热除去二氧化碳，冷却，移入 250ml 容量瓶中，用水定容。配成  $2.00 \times 10^{-2}$  mol/L 的铅储备液。

#### 3.1.3.4 铜标准溶液配制

称取 0.3177g 基准金属铜于 250ml 烧杯中，加入 20ml 1:1 硝酸，小火加热蒸至近干，然后加入 10ml 浓硫酸，小心蒸至冒三氧化硫白烟，冷却，加水使全部盐类溶解移入 250ml 容量瓶中，用水定容。配成  $2.00 \times 10^{-2}$  mol/L 的铜储备液。

#### 3.1.3.5 0.01 mol/L 酒石酸氢钾溶液的配制

称取 0.4704g 酒石酸氢钾溶解后，用水定容于 250ml 容量瓶中。

#### 3.1.3.6 0.045 mol/L 醋酸钠溶液的配制

称取 0.9234g 醋酸钠溶解后，用水在 250 ml 容量瓶中定容。

#### 3.1.4 实验方法

于电解池中加入 10ml 0.01mol/L 的酒石酸氢钾~0.045mol/L 醋酸钠底液 (pH=5.78)，100 $\mu$ l  $2.0 \times 10^{-2}$ mol/L 的 HgNO<sub>3</sub> 溶液，适量锌镉铅铜标准溶液，加水至总体积为 50 ml，通 N<sub>2</sub> 除氧 10min，在灵敏度 20 $\mu$ A，-1.2V 电位处富集 120s，静止 60s，以 100mV/s 向正方向扫描到 0V，记录下 1.5 次微分伏安图，清洗 60s。锌、镉、铅、铜的溶出峰电位分别为 -1.08V，-0.62V，-0.50V，-0.07V。文中的所有电位值相对于饱和甘汞电极。

#### 3.1.4.4 Ebl<sub>971</sub> 样品的消化方法<sup>[102]</sup>

称取 2g Ebl<sub>971</sub> 试样于 250ml 凯氏烧瓶中，加入 3 粒玻璃珠，加 25ml 混合酸（硝酸：高氯酸 = 4:1）放置过夜后，在电炉上消解，若变棕黑色，再加 10ml 混合酸，直至冒白烟，消化液呈无色透明，放冷，用滴管将样品消化液洗入 50ml 容量瓶中，用水少量多次洗涤，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用，同时作试剂空白和三个平行加标试样 A1、A2、A3。

#### 3.1.4.5 Ebl<sub>971</sub> 样品的测定方法

考虑到样品成分较复杂及实验设备条件所限，采用目前极谱法中应用最普遍的标准加入法，采用此法消除了溶出伏安法公式所表示的各种实验参数。取消化好的样品溶液  $V_1$ ，设浓度为  $C_1$  按实验方法操作，作图，测量峰高  $h_1$ ，然后在此溶液中加入  $V_2$  的标准溶液，其浓度  $C_2$ ，测得其溶出峰高为  $h_2$ 。（由于试剂空白的峰高几乎为零，所以可忽略不计）

计算：
$$h_1 = KC_1$$

$$h_2 = K \frac{C_1 V_1 + C_2 V_2}{V_1 + V_2}$$

二式相除消去  $K$  值后，浓度计算公式为：

$$C_1 = \frac{h_1 C_2 V_1}{(h_2 - h_1) V_1 + h_2 V_2}$$

其中,  $V_1$ —样品溶液体积 (ml);  $V_2$ —标准溶液体积(ml);

$C_1$ —样品的离子浓度(mol/L);  $C_2$ —标准的离子浓度(mol/L);

$h_1$ —样品的峰高(mm);  $h_2$ —样品加标准的峰高(mm)

## 3.2 结果与讨论

### 3.2.1 测定体系的选择

#### 3.2.1.1 底液的选择

参照有关文献，我们用溶出伏安法试验了四种体系，分别考察了锌、镉、铅和铜各离子在邻苯二甲酸氢钾~盐酸 (pH=2.20)、醋酸~醋酸钠(pH=4.20)、醋酸钠~酒石酸氢钾(pH=5.78)和氨水~氯化铵(pH=8.00)底液中的电化学行为，结果表明：四种金属离子在醋酸钠~酒石酸氢钾底液中峰形好、对称性好、灵敏度高。在充分考查其线性范围后，根据 Ebl<sub>971</sub> 中各金属离子的含量范围，我们选择了选择醋酸钠~酒石酸氢钾作为底液。

#### 3.2.1.2 pH 值的选择

溶液 pH 值与峰高的关系由图 3.2 可见：溶液的 pH 值对峰高有一定的影响。当镉、铅、铜各离子浓度均为  $2.00 \times 10^{-7}$  mol/L，锌离子浓度为  $2.00 \times 10^{-6}$  mol/L 时，pH 在 5.4~5.8 范围内，峰电流稳定，pH 值对峰高的影响较小；当 pH < 5.4 时，随着 pH 降低，峰高增加；而当 pH > 5.8 时，随着 pH 升高，峰高普遍降低，唯有锌的峰高增加。因而选 pH=5.78 的 0.01 mol/L 醋酸钠~0.045 mol/L 酒石酸氢钾作为介质溶液。



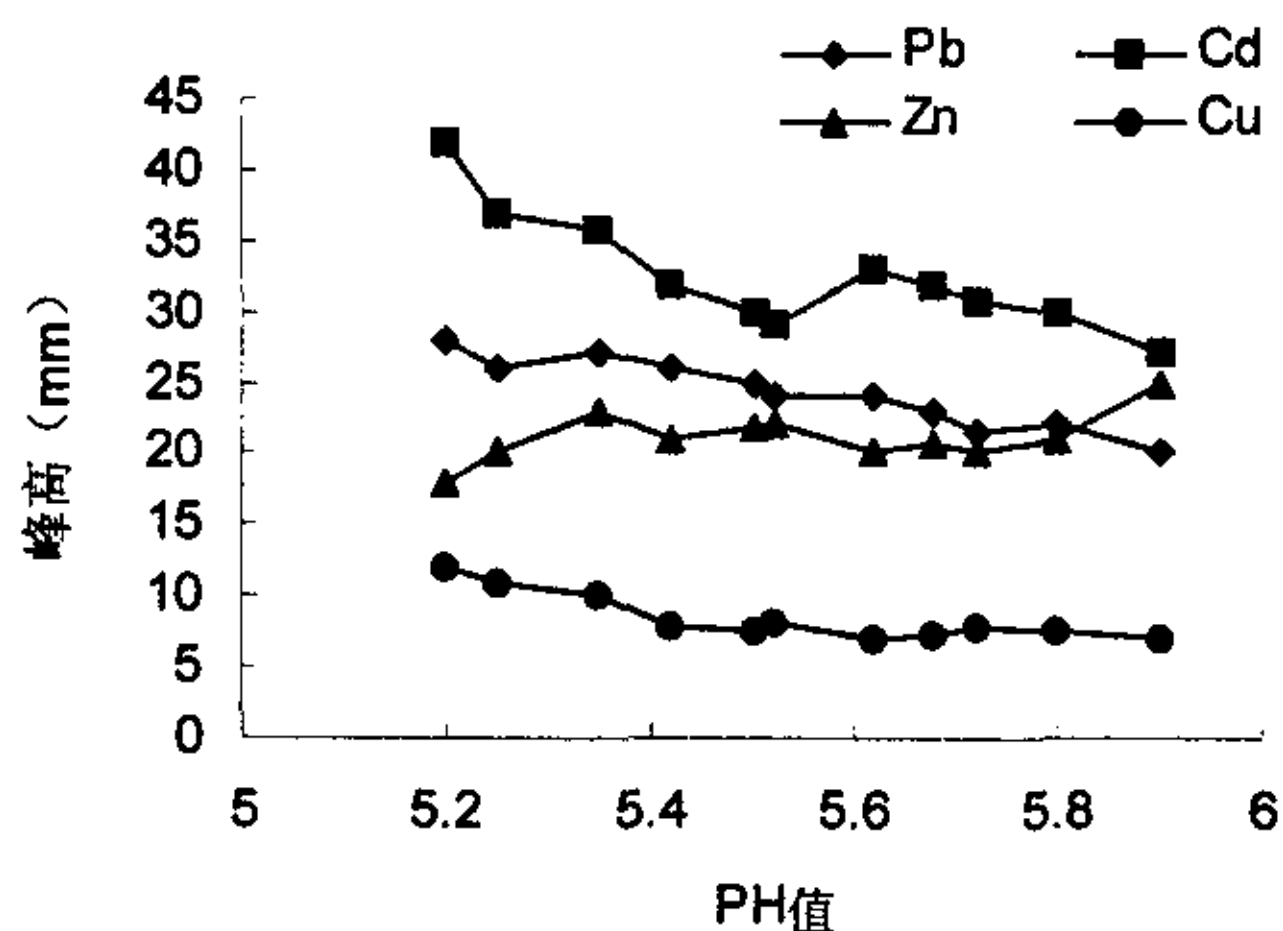


图 3.2 介质 pH 值与元素峰高的关系

(醋酸钠~酒石酸氢钾作为介质溶液, 镉、铅、铜各离子浓度均为  $2.00 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ , 锌离子浓度为  $2.00 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ )

### 3.2.1.3 镀汞膜的方法确定

我们采用的电极是玻碳电极。根据多次镀汞膜的经验总结, 最佳的方法是: 底液中加入  $100 \mu\text{l}$   $2.00 \times 10^{-2} \text{mol/L}$  的  $\text{HgNO}_3$ , 选择在灵敏度  $20 \mu\text{A}$ ,  $-1.2\text{V}$  电位, 富集  $120\text{s}$ , 然后静置  $60\text{s}$ , 以  $100\text{mV/s}$  向正方向扫描到  $0\text{V}$ , 清洗  $60\text{s}$ , 用相同的方法镀汞数次, 效果较好。

### 3.2.1.4 起始电位的选择

当起始电位小于  $-1.2\text{V}$ , 由于电位过负, 溶液中氢离子被还原, 氢气吸附在工作电极和辅助电极上, 这将大大影响测定的准确性。根据汞膜富集电位的情况, 另外由于锌、铜互化物的影响, 测定锌时  $E_a = -1.2\text{V}$ , 测定其它离子时选择  $E_a = -1.0\text{V}$ , 以消除互化物对铜测定的影响。

### 3.2.1.5 富集时间与峰高的关系

富集时间与峰高的关系由图 3.3 可见, 在  $0.01\text{mol/L}$  醋酸钠~ $0.045\text{mol/L}$  酒石酸氢钾 ( $\text{pH}=5.78$ ) 的底液中, 镉、铅、铜各离子浓度均为  $1.00 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ , 锌为  $1.00 \times 10^{-6} \text{mol/L}$  浓度下, 随着富集时间的延长, 同一离子富集时间越长, 峰越高, 但各个离子受的影响也是不同的, 实验选择富集时间  $t = 120\text{s}$ 。

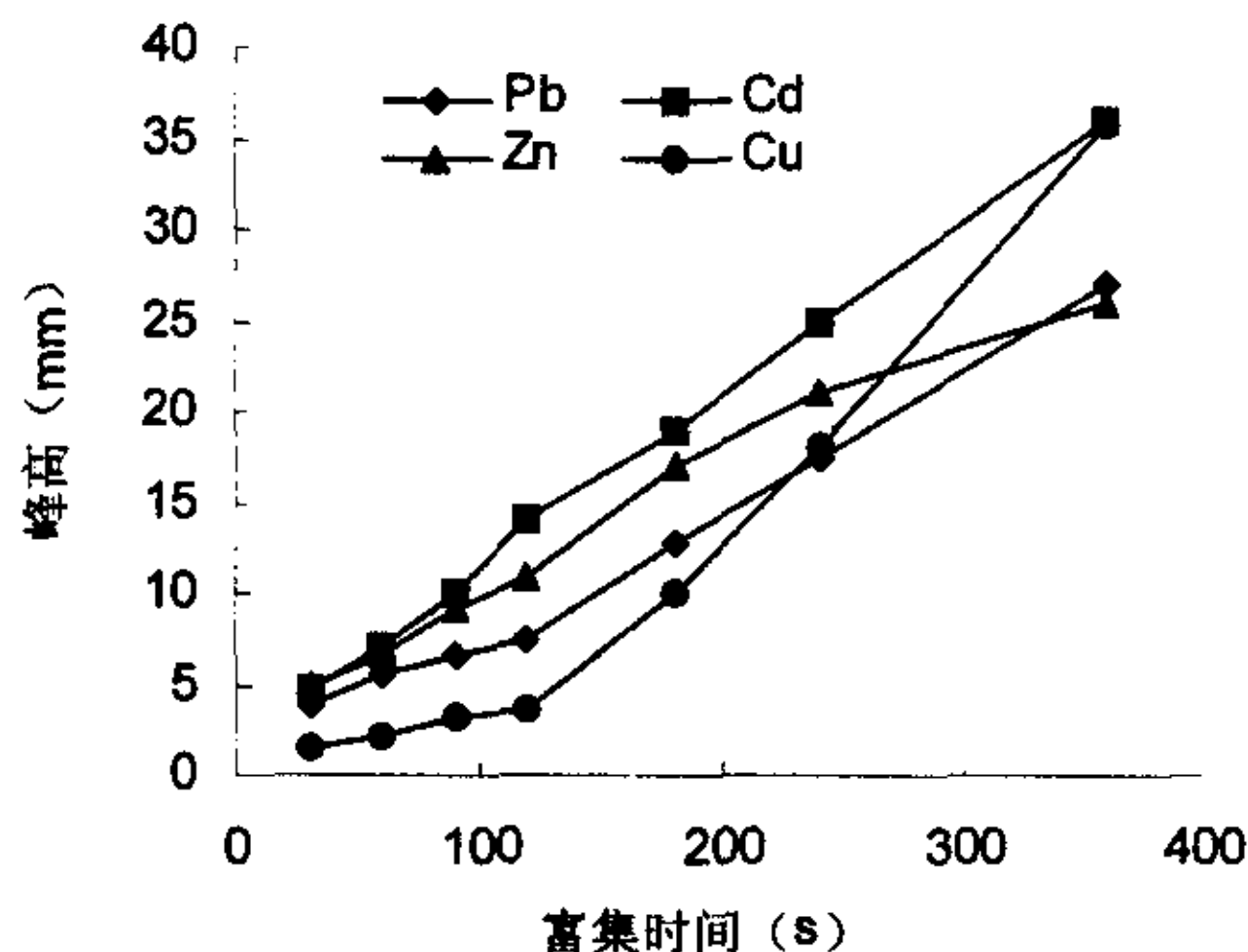


图 3.3 富集时间与峰高的关系

(醋酸钠~酒石酸氢钾作为介质溶液, 镉、铅、铜各离子浓度均为  $1.00 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ,

锌离子浓度为  $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ )

#### 3.2.1.6 共存离子的影响

1000 倍的  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  对被测定的这 4 种金属离子不干扰,  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^+$  和  $\text{Sn}^{2+}$  对  $\text{Zn}^{2+}$  的测定有干扰。虽然铜与锌在电极表面会生成互化物而影响测定, 但由于 Ebl<sub>971</sub> 样品中几乎不含铜, 不会形成互化物。

#### 3.2.2 各离子测定的线性范围和检测限

在  $0.01 \text{ mol/L}$  醋酸钠~ $0.045 \text{ mol/L}$  酒石酸氢钾 ( $\text{pH}=5.78$ ) 条件下测定各离子线性范围, 富集时间 120s, 静置 60s, 以  $100 \text{ mV/s}$  向正方向扫描到  $0 \text{ V}$ , 记录下 1.5 次微分伏安图。

##### 3.2.2.1 锌离子标准曲线的制作

按试验方法操作, 绘制峰高与锌浓度的关系曲线, 见图 3.4。结果表明, 锌离子于醋酸钠~酒石酸氢钾 ( $\text{pH}=5.78$ ) 底液中, 于  $-1.08 \text{ V}$  处有一 1.5 次微分峰, 浓度在  $4.00 \times 10^{-7} \sim 3.20 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  范围内呈良好的线性关系。回归方程:  $y=0.9745x-0.5156$ , 相关系数  $r^2=0.9977$ , 检测限为  $1.42 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。本标准曲线重复 6 次, 求出平均峰高及标准误差, 计算锌标准曲线平均变异系数为 2.08%, 如表 3.1 所示。

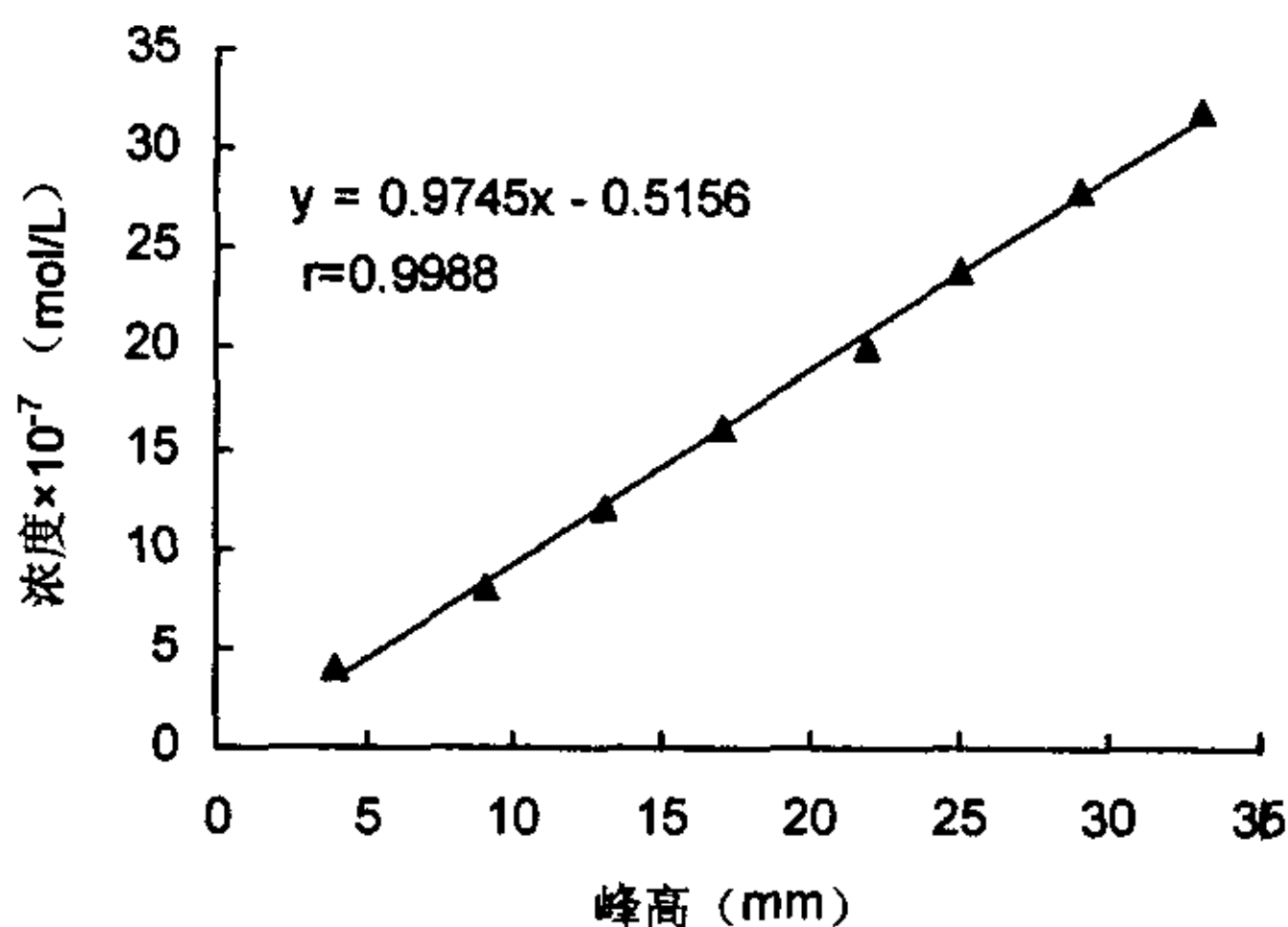


图 3.4 锌离子标准曲线

表 3.1 阳极溶出伏安法作锌离子标准曲线重复六次的峰高变化

标液浓度 ( $\times 10^{-7}$ mol/L)	峰高重复测定六次						均值 $\pm$ 标准误差 ( $\bar{x} \pm SD$ )	变异系数 CV(%)
	1	2	3	4	5	6		
4.0	3.9	4.0	4.1	3.8	4.0	4.2	4.0 $\pm$ 0.14	3.54
8.0	8.7	8.8	9.2	9.1	9.5	9.3	9.1 $\pm$ 0.30	3.33
12.0	13.4	13.2	13.2	13.5	13.0	13.2	13.2 $\pm$ 0.18	1.33
16.0	16.6	16.5	16.5	17.1	16.8	17.3	16.8 $\pm$ 0.44	2.59
24.0	24.3	25.0	25.1	25.6	24.7	24.8	24.9 $\pm$ 0.46	1.84
28.0	29.0	29.4	28.6	28.9	29.2	28.8	29.0 $\pm$ 0.29	0.99
32.0	33.1	33.0	33.5	32.9	33.4	33.7	33.3 $\pm$ 0.31	0.94

### 3.2.2.2 镉离子标准曲线的制作

按试验方法操作，绘制峰高与镉浓度的关系图（图 3.5）。结果表明，镉离子于醋酸钠~酒石酸氢钾（pH=5.78）底液中，于-0.62V 处有一 1.5 次微分峰，浓度在  $3.56 \times 10^{-8}$ — $2.14 \times 10^{-7}$  mol/L 范围内呈良好的线性关系。回归方程： $y=0.606x-1.4509$ ，相关系数  $r^2=0.999$ ， $n \geq 6$ ，检测限为  $1.27 \times 10^{-8}$  mol/L。本

标准曲线重复 6 次，求出各平均峰高及标准差，计算镉标准曲线平均变异系数（标准偏差 ÷ 峰高 × 100%）为 2.52%，如表 3.2 所示。

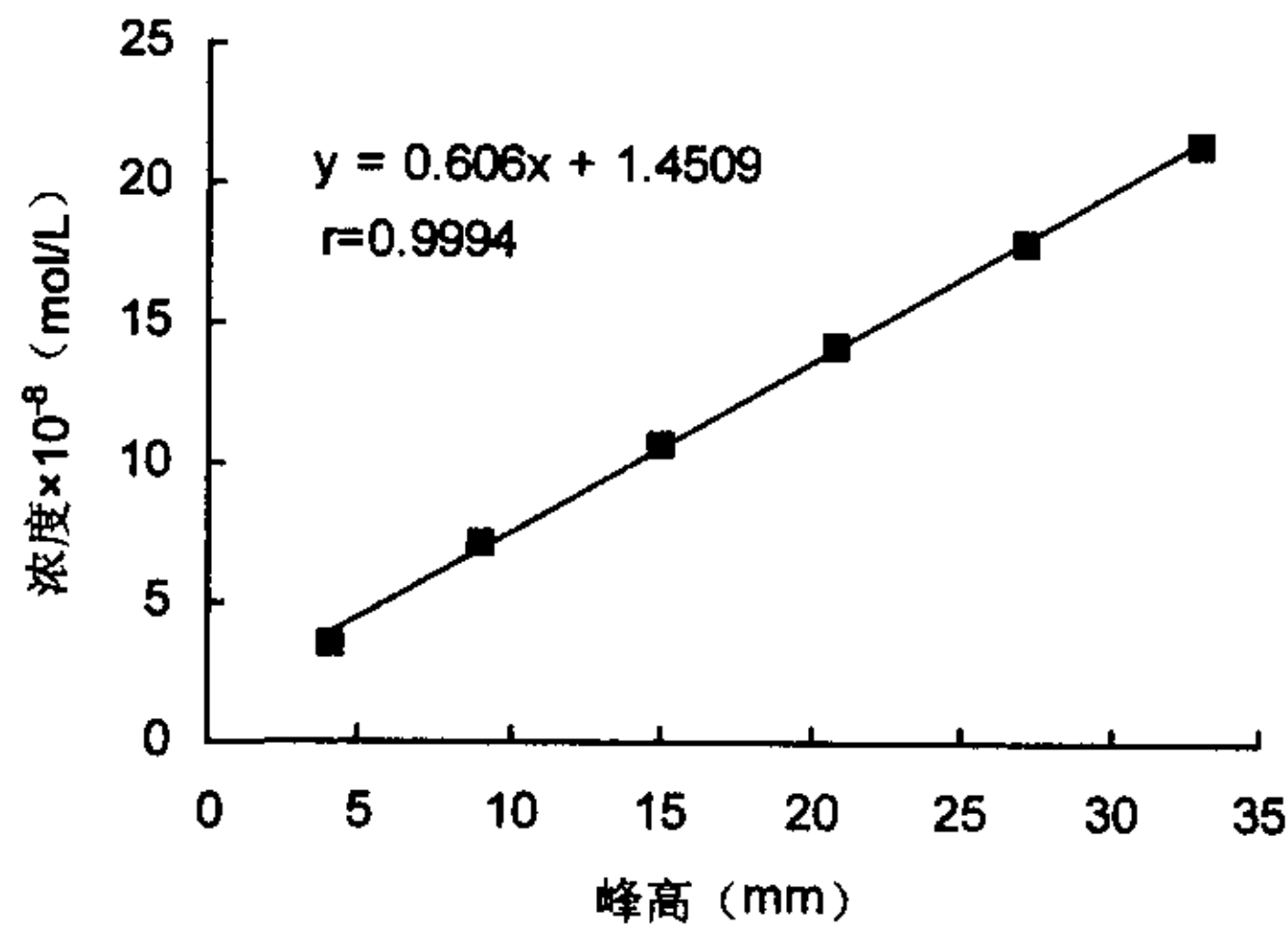


图 3.5 镉离子标准曲线

表 3.2 阳极溶出伏安法作镉离子标准曲线重复六次的峰高变化

标液浓度 ( $\times 10^{-8}$ mol/L)	峰高重复测定六次						均值 ± 标准误差 ( $\bar{x} \pm SD$ )	变异系数 CV(%)
	1	2	3	4	5	6		
3.7	4.1	4.0	3.9	3.8	4.4	4.3	4.1 ± 0.23	5.67
7.1	8.9	8.7	9.0	9.2	9.3	9.5	9.1 ± 0.29	3.18
10.7	14.9	15.2	14.5	14.8	15.1	15.0	14.9 ± 0.25	1.66
14.2	20.8	20.5	20.0	19.6	20.6	21.0	20.4 ± 0.52	2.56
17.8	27.2	26.8	27.2	27.4	27.1	27.5	27.2 ± 0.24	0.90
21.4	32.4	33.0	33.5	33.4	33.0	33.0	33.1 ± 0.39	1.18

### 3.2.2.3 铅离子标准曲线的制作

按试验方法操作，绘制峰高与铅浓度的关系曲线，见图 3.6。结果表明，铅离子于醋酸钠~酒石酸氢钾（pH=5.78）底液中，于-0.50V 处有一 1.5 次微分峰，浓度在  $8.00 \times 10^{-8} \sim 6.40 \times 10^{-7}$  mol/L 范围内呈良好的线性关系。回归方程： $y=0.7098x-4.7699$ ，相关系数  $r^2=0.9971$ ，检测限为  $1.50 \times 10^{-8}$  mol/L。本标准

曲线重复 6 次，求出各平均峰高及标准差，计算铅标准曲线平均变异系数（标准偏差 ÷ 峰高 × 100%）为 3.11%，如表 3.4 所示。

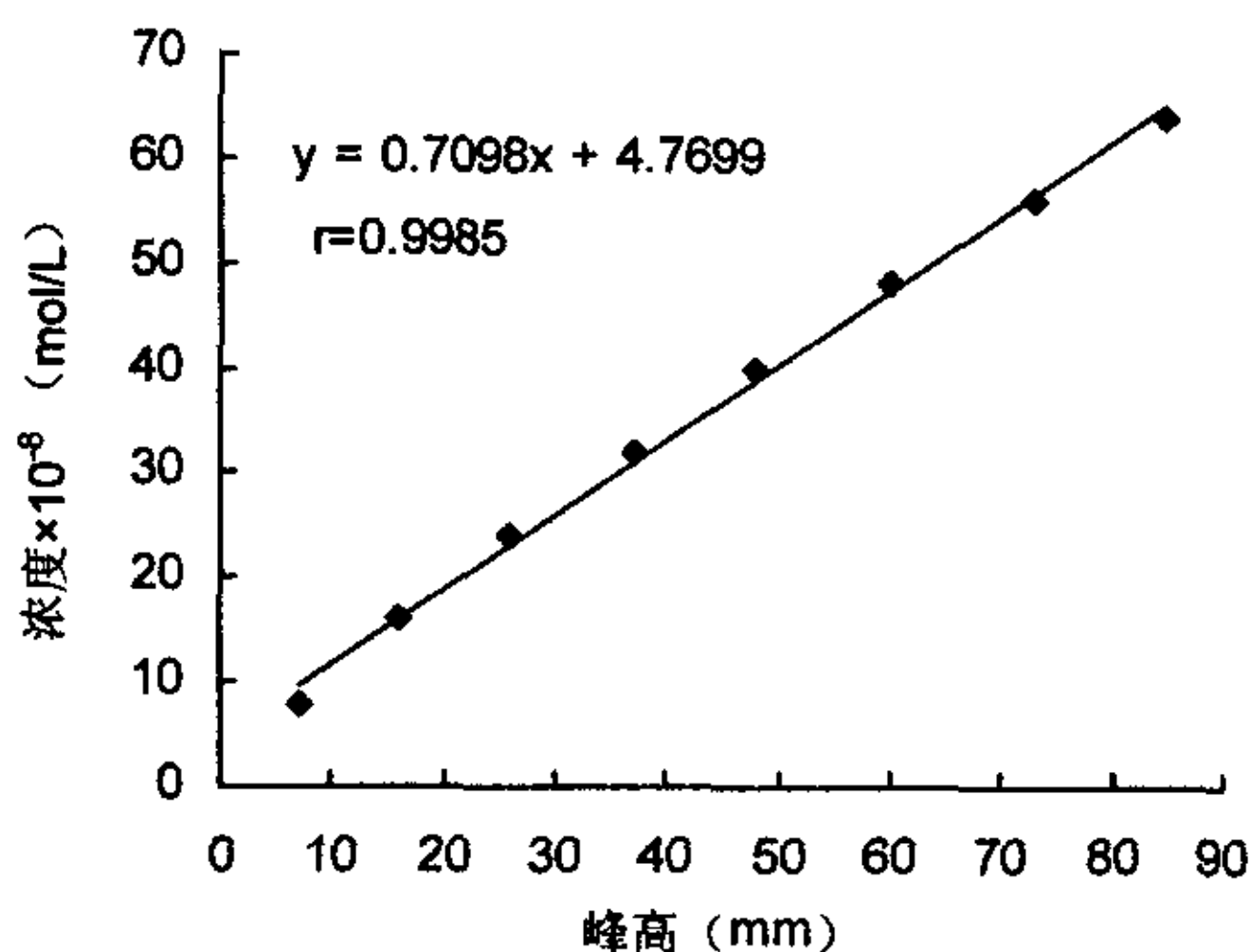


图 3.6 铅离子标准曲线

表 3.3 阳极溶出伏安法作铅离子标准曲线重复六次测试的峰高变化

标液浓度 (×10 <sup>-8</sup> mol/L)	峰高重复测定六次						均值±标准误差 ( $\bar{x} \pm SD$ )	变异系数 CV(%)
	1	2	3	4	5	6		
8.0	7.1	7.5	8.2	8.2	7.7	7.6	7.7±0.43	5.52
16.0	16.2	15.8	15.5	16.1	14.9	15.7	15.7±0.47	2.99
24.0	26.6	27.1	27.3	26.5	25.3	25.6	26.4±0.80	3.03
32.0	37.5	37.8	35.1	36.6	33.4	37.0	36.2±1.68	4.64
40.0	48.3	47.0	48.5	46.7	43.2	47.4	46.8±1.92	4.09
48.0	60.2	62.1	60.5	60.7	60.0	61.7	60.9±0.84	1.39
56.0	73.4	72.5	73.0	74.4	71.1	72.0	72.7±1.14	1.57
64.0	85.5	88.9	86.4	85.5	85.0	87.3	86.4±1.46	1.68

### 3.2.2.4 铜离子标准曲线的制作

按试验方法操作，绘制峰高与铜浓度的关系曲线，见图 3.7。结果表明，



铜离子于醋酸钠~酒石酸氢钾 (pH=5.78) 底液中, 于-0.07V 处有一 1.5 次微分峰, 浓度在  $6.30 \times 10^{-8} \sim 3.78 \times 10^{-7} \text{mol/L}$  范围内呈良好的线性关系。回归方程:  $y=2.4316x-0.8186$ , 相关系数  $r^2=0.9953$ , 检测限为  $3.27 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。本标准曲线重复 6 次, 求出各平均峰高及标准误差, 计算铜标准曲线平均变异系数为 3.70%, 如表 3.4 所示。

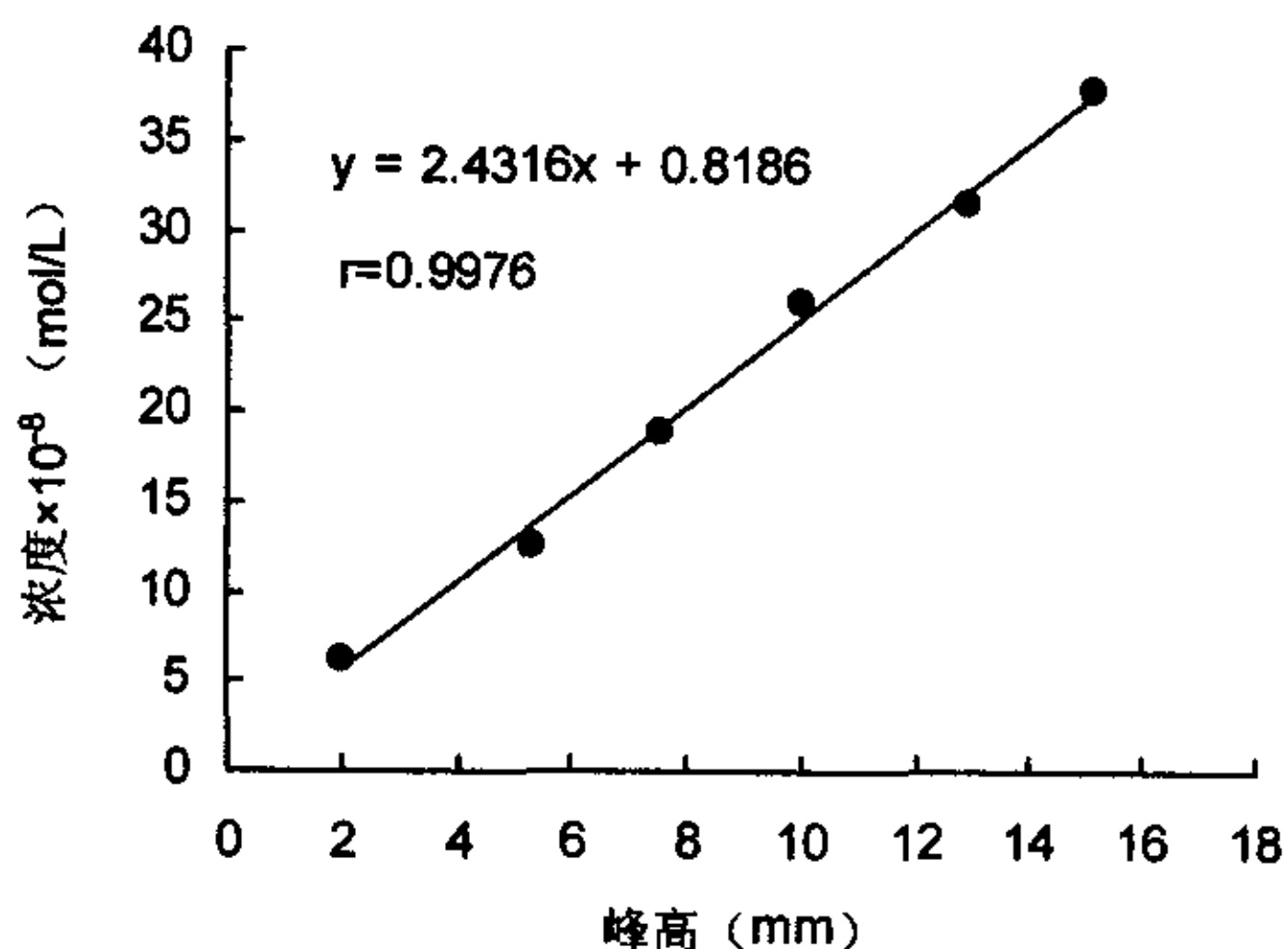


图 3.7 铜离子标准曲线

表 3.4 阳极溶出伏安法作铜离子标准曲线重复六次的峰高变化

标液浓度 ( $\times 10^{-8} \text{mol/L}$ )	峰高重复测定六次(n=6)						均值±标准误差 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	变异系数 CV(%)
	1	2	3	4	5	6		
6.3	2.2	2.0	2.1	1.9	2.2	2.4	$2.1 \pm 0.18$	8.21
12.6	4.9	5.0	5.3	5.5	5.2	5.7	$5.3 \pm 0.30$	5.72
18.9	7.5	7.2	7.2	7.7	7.6	7.5	$7.5 \pm 0.21$	2.78
25.2	10.0	10.3	10.1	9.7	9.8	9.9	$9.9 \pm 0.22$	2.17
31.5	12.9	12.5	12.7	13.1	13.2	13.0	$12.9 \pm 0.26$	2.02
37.8	15.1	15.4	15.0	15.3	15.0	14.9	$15.1 \pm 0.91$	1.28

### 3.2.3 样品的测定

同一 Ebl<sub>971</sub> 试样经 6 次重复实验, 测得结果如下:

镉和铜离子几乎测不出。

铅: 取消化好的样品溶液 3ml, 加  $2.00 \times 10^{-3}$  mol/L 铅标液 1 $\mu$ l, 测定试样干基铅含量为  $(1.69 \pm 0.06)$   $\mu$ g/g, 变异系数为 3.38%, 如表 3.5 所示。锌: 取消化好样品溶液 6ml, 加  $2.00 \times 10^{-3}$  mol/L 锌标液 10  $\mu$ l, 每克干物质含锌  $(6.09 \pm 0.567)$   $\mu$ g, 变异系数为 9.31%, 如表 3.6 所示。

表 3.5 Ebl<sub>971</sub> 中铅含量重复测定结果 (n=6)

n	1	2	3	4	5	6
$h_1(\text{mm})$	5.2	5.0	4.9	4.8	5.1	5.1
$h_2(\text{mm})$	15.3	15.2	15.2	15.0	15.1	15.4
$C_1$	3.43	3.27	3.17	3.14	3.30	3.30
X	1.78	1.69	1.64	1.62	1.71	1.71
$\bar{X} \pm \text{SD}$	$1.69 \pm 5.71 \times 10^{-2}$					
CV(%)	3.38					

表 3.6 Ebl<sub>971</sub> 中锌含量重复测定结果 (n=6)

n	1	2	3	4	5	6
$h_1(\text{mm})$	4.5	4.4	4.2	4.9	4.8	4.6
$h_2(\text{mm})$	8.7	8.3	8.5	8.8	8.9	8.6
$C_1$	3.56	3.75	3.25	4.17	3.89	3.82
X	5.82	6.12	5.31	6.82	6.36	6.24
$\bar{X} \pm \text{SD}$	$6.09 \times 10^{-6} \pm 5.67 \times 10^{-1}$					
CV(%)	9.31					

注:  $h_1$  —— Ebl<sub>971</sub> 样品中该离子的峰高 (mm)

$h_2$  —— 加入标准溶液后此离子峰高 (mm)

$C_1$  —— 反应池中铅或锌浓度 ( $\times 10^{-6}$  mol/L)

X —— Ebl<sub>971</sub> 样品中铅或锌浓度 ( $\times 10^{-6}$  mol/L)

$\bar{X} \pm \text{SD}$  —— Ebl<sub>971</sub> 样品中铅或锌浓度的均值  $\pm$  标准误差

CV (%) —— 变异系数

## 3.2.4 重现性和回收试验

由于 Ebl<sub>971</sub> 中的镉、铜离子的含量在本方法的检测限以下, 几乎测不出, 所以本文只对试样中含量较高的铅和锌做了三组平行试验 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>。在消化前分别往样品溶液中加入不同量的铅和锌标准溶液, 结果方法重现性良好, 测得元素的回收率为: 铅 84.7%~108%, 锌 85.2%~105%。

表 3.7 铅的回收率试验

	A1		A2		A3	
$h_1(\text{mm})$	8.1	7.9	11.3	11.4	15.3	15.7
$h_2(\text{mm})$	21.2	20.8	26.0	25.7	31.5	32.1
$C_1 \times 10^{-7}$	4.12	4.23	5.12	5.31	6.30	6.38
$X \times 10^{-6}$	2.14	2.11	2.65	2.75	3.26	3.31
实测值 ( $\times 10^{-6} \text{ mol/L}$ )	0.45	0.42	0.96	1.06	1.57	1.62
真实值 ( $\times 10^{-6} \text{ mol/L}$ )	0.50		1.00		1.50	
回收率 (%)	90.0	84.0	96.0	106.0	104.7	108.0

表 3.8 锌的回收率试验

	A1		A2		A3	
$h_1(\text{mm})$	6.20	6.10	11.3	11.2	8.7	8.9
$h_2(\text{mm})$	10.0	9.90	15.3	15.1	12.9	13.0
$C_1 \times 10^{-6}$	5.41	5.35	9.36	9.36	6.87	7.20
$X \times 10^{-6}$	8.85	8.75	15.3	15.5	11.2	11.8
实测值 ( $\times 10^{-6} \text{ mol/L}$ )	2.76	2.66	5.11	5.71	9.21	9.41
真实值 ( $\times 10^{-6} \text{ mol/L}$ )	3.00		6.00		9.00	
回收率 (%)	92.0	88.7	85.2	95.2	102.3	104.6

注:  $h_1$  —— Ebl<sub>971</sub> 加标样品中该离子的峰高 (mm)

$h_2$  —— 加入标准溶液后此离子峰高 (mm)

$C_1$  —— 反应池中铅或锌浓度 (mol/L)

$X$  —— 加标 Ebl<sub>971</sub> 样品中铅或锌浓度 (mol/L)

### 3.3 小结

对锌、镉、铅、铜在醋酸钠和~酒石酸氢钾底液中的 1.5 次微分伏安法进行了研究, 在 pH 值为 5.78 的醋酸钠~酒石酸氢钾介质中, 锌、镉、铅、铜各离子在 AD-3 型伏安仪上于-1.2—0.0V 处, 均产生灵敏的氧化波, 1.5 次微分伏安图灵敏度高、峰形好、便于测量, 结果较好, 四种离子在  $10^{-8} \sim 10^{-6}$  mol/L 的浓度范围内具有良好的线性关系。应用于 Ebl<sub>971</sub> 的测定, 由于镉、铜离子的含量极低, 用此法几乎测不出; 铅含量为  $(1.69 \pm 0.06) \mu\text{g/g}$ , 变异系数为 3.38%; 锌含量为  $(6.09 \pm 0.57) \mu\text{g/g}$ , 变异系数为 9.31%。并测得铅、锌两种元素的回收率分别为 84.7%~108%和 85.2%~105%, 方法重现性良好。

## 参 考 文 献

- 1 肖崇厚, 陆蕴如, 凌罗庆. 中药化学. 上海科学技术出版社, 1983, pp: 191
- 2 李广, 王清刚, 王义明等. 黄酮类化合物的定量色谱分析. 食品科学, 2001, 22(2) : 57-60
- 3 孙雪飞, 安登魁. 逆流色谱法的进展. 国外医学药学分册, 1990, 18(1): 40-44
- 4 T Y Zhang, et al. Separation of flavenoids and alkaloids in medicinal herbs by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr*, 1988, 435: 159
- 5 T Y Zhang, et al. Rapid separation of flavenoids by analytical high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr*, 1988, 435: 199
- 6 I Slacanin, et al. Modification to a high -speed counter-current chromatography for improved separation capability. *J Chromatogr*, 1989, 482: 243
- 7 M Vanhaelen, et al. Counter-current chromatography for isolation of flavonol glycosides from *Gingko biloba* leaves. *J Chromatogr*, 1988, 11: 2969
- 8 H Oka, et al. Multilayer coil planet centrifuge for analytical high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr*, 1989, 479: 53
- 9 蔡定国, 张天佑, 顾明娟等. 应用高速逆流色谱分离大黄羟基蒽醌甙元. 中国医药工业杂志, 1990, 21(3): 213
- 10 T Y Zhang, et al. Separation of hydroxyanthraquinone derivatives extracted from rheum with analytical by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr*, 1988, 442: 455
- 11 I Slacanin, et al. Isolation and determination of flavonol glycosides from *Epilobium* species. *J Chromatogr*, 1991, 557: 391
- 12 G C Chen. High performance counter -current chromatography for quantitative analysis of five flavonoids. *J Liq Chromatogr*, 1992, 15(15-16): 2857
- 13 G J Kapadia, et al. High-speed countercurrent chromatography separation of biflavanoids from *Garcinia kola* seeds. *J Chromatogr*, 1994, 63: 142
- 14 J Quetin -Leclercq, et al. Isolation and purification of panarine, an alkaloid from a Venezuelan curare. *Phytochemistry*, 1988, 27: 4002
- 15 J Quetin -Leclercq, et al. 10-Hydroxy-Nb-methyl-corynanthoel, a new quaternary alkaloid from the stem bark of *Strychnos usambarensis*, *Phytochemistry*, 1988, 27: 1923
- 16 B Kanyinda, et al. Benzylisoquinoline alkaloids from *Anisocycla cymosa*



- roots. *Planta Medica*, 1989,55: 394
- 17 T Y Zhang, et al. Separation of alkaloids extracted from *Stephania tetrandra* by analytical high-speed-counter-current-chromatography. *J Liq Chromatogr*, 1988,11(8): 1661
  - 18 T Y Zhang, et al. Separation of flavenoids and alkaloids in medicinal herbs by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr*, 1988, 35: 159
  - 19 J Y Zhou, et al. The application of high-speed counter-current chromatography to the semipreparative separation of vincine. *Phytochemical Analysis*, 1990, 11: 74
  - 20 Y W Lee, et al. Application of counter-current chromatography/ thermospray mass spectrometry for the analysis of natural products. *J Liq Chromatogr*, 1988, 11: 153
  - 21 佟晓杰, 方唯硕, 周金云等. 东北红豆杉枝叶化学成分研究. *药学学报*, 1994, 29(1): 55
  - 22 R Vanhaelen-Fastre, et al. High-speed counter-current chromatography separation of taxol and related diterpenoids from *Taxus baccata*. *J Liq Chromatogr*, 1992,15: 697
  - 23 Y W Lee, et al. Application of analytical high-speed counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products. *J Chromatogr*, 1989, 477: 434
  - 24 A Marston, et al. Some new developments in centrifugal partition chromatography and applications the separation of natural products. *J Liq Chromatogr*, 1990,13: 3615
  - 25 J K Nitao, et al. Bioactive neolignans from the leaves of *Magnolia virginiana*. *Phytochemistry*, 1991,30: 2193
  - 26 B C Vanwagenen, et al. Native Amercian food and medicinal plants, a water-soluble constituents of *Lomatium dissectum*. *J Nat Prod*, 1988, 51: 136
  - 27 E Schaufelberger. Analytical high-speed-counter-current chromatography: a new tool for natural products chemistry. *Planta Med*, 1989, 55: 584
  - 28 F Yang, et al. Semi-preparative separation of tarxeryl-acetate and coumarins from *Artemisia dalailamae kraschen* by high-speed countercurrent chromatography. *J Liq Chromatogr*, 1995,18(2): 395
  - 29 北京大学化学系. 仪器分析教程. 北京大学出版社, 1996, pp: 340
  - 30 陈晓岚, 屈凌波等. HPLC 定量测定银杏黄酮浸膏中槲皮素和黄酮总量. *河南科学*, 1998, 16(2): 178-180.
  - 31 周欣, 钟世江. 高效液相色谱法测定银杏叶提取物中槲皮素的含量. *中国中药杂志*. 1997, 22(10): 616-618
  - 32 邬建敏, 贾之慎. 竹类黄酮化合物总量及芦丁含量的测定. *浙江农业大*

- 学学报, 1998, 24(40): 339-343.
- 33 张廷之, 侯镜德, 徐秀珠. 反相高效液相色谱法测定毛竹叶中总黄酮. *理化检验—化学分册*, 37(3): 117-118
  - 34 王萍, 丛润滋. 水飞蓟素中活性黄酮的测定. *色谱*, 1998, 16(6): 510-512.
  - 35 胡敏, 李晓丽, 张声华等. 不同提纯法精制银杏叶提取物中黄酮糖苷含量分析. *食品科学*, 1998, 19(12): 42-45
  - 36 陈发奎, 郭先珍, 孟宪舒. 牛黄解毒片的三维高效液相色谱法鉴定和指标成分的定量. *药学学报*, 1993, 28(1): 57
  - 37 P G Pietta, P L Mauri, A Bruno et al. Identification of flavonoids from *Ginkgo biloba* L, *Anthem is nobilis* L. and *Equisetum arvense* L. by high-performance liquid chromatography with diode-array UV detection. *J Chromatogr*, 1991: 553-223
  - 38 刘巍, 黄海涛, 刘国清等. 芸苔素内酯及其有关甾族化合物的 HPLC 分析法. *云南化工*, 2000, 27(6): 19-21
  - 39 吕光华, 王立为, 陈建民等. 高效液相色谱法测定十大功劳属植物中的 7 种生物碱成分. *药物分析杂志*, 1999, 19(4): 271-274
  - 40 原源, 陈万生, 张汉明等. HPLC 法测定酸模属植物根中酸模素的含量. *中药材*, 2000, 23(10): 621-622
  - 41 李蔚, 李素云, 陈金东. 高效液相色谱法测定保健食品中芍药式. *中国卫生检验杂志*, 2001, 11(2): 176-177
  - 42 杨枫, 余晓, 张蔚青等. HPLC 法测定西洋参蜂王浆口服液中的参皂苷与癸烯酸. *中国中药杂志*, 1999, 24(10): 605-607
  - 43 李平. 高效液相色谱在生物医药研究中的应用. *色谱*, 1990, 8(5): 308-312
  - 44 耿丽华, 鲍晓梅, 吴献礼. 制备高效液相及其在天然药物研究中的应用. *基层中药杂志*, 1999, 13(3): 44-46
  - 45 戴军, 王洪新, 华春雷. HPLC 分析芦苇叶中天然抗氧化成分黄酮类化合物. *无锡轻工业学院学报*, 1994, 13(1): 34-37
  - 46 Huch.christiaw et al. *J Chromatogr*, 2000, 18: 453-462
  - 47 邹耀洪, 李桂荣. 杨梅叶黄酮类化合物研究. *常熟高专学报*, 1998, 7(1): 36-39
  - 48 邹耀洪. 国产甘薯叶黄酮类成分研究. *分析测试学报*, 1996, 15(1): 71-74
  - 49 邹耀洪. 箬竹叶中黄酮类化合物的高效液相色谱分析. *分析化学*, 1996, 24(2): 216-219
  - 50 徐光国. YZS-3 型液相制备色谱仪的研制. *色谱*, 1986(2): 98
  - 51 陈若芸, 于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展. *药学学报*, 1990, 25(12): 940-953
  - 52 张仁斌, 徐松林, 李英. 反相高速液相色谱分离青蒿素及其衍生物. *药学学报*, 1981, 16(6): 460

- 53 贺贤国, 蒋福祥, 周倩如. 高速液相层析在植物化学研究中的应用. *植物学报*, 1978, 20(1): 76
- 54 陈波, 潘振球, 范元成等. 高效液相色谱法制备菊苣酸标准对照品的研究. *实用预防医学*. 2001, 8(1): 15-17
- 55 于志强, 彭平安, 傅家谟等. 利用正相高效液相色谱制备新地质卟啉化合物. *分析实验室*, 2000, 19(6): 74-76
- 56 雷历, 宋志宏, 屠鹏飞等. 反相高效液相色谱法制备松果菊苷的标准品. *色谱*, 2001, 19(3): 200-203
- 57 R G hatch. *J Chromatogr*, 1990, 28: 210
- 58 cildenast.Thomas et al. *Biochimicaet Biophysica Acta*, 1997, 5(17): 69-74
- 59 王学彤, 张书圣, 白吉洪等. 反相高效液相色谱法分离制备鱼油中的 EPA 和 DHA. *分析实验室*, 1999, 18(1): 42-45
- 60 周海欧. 张志强, 尤耕野. 高效液相色谱用于鹿茸中多肽的分离制备. *色谱*, 1993, 11(2): 119.
- 61 邓家祺, 林义祥编著. 溶出伏安法在环境、医学、食品上的应用. 人民卫生出版社 1986, pp: 1-6
- 62 朱明华. 仪器分析 (第二版). 高等教育出版社, 1997, pp: 176-196
- 63 彭图治, 杨丽菊. 生命科学中的电分析化学. 杭州大学出版社, 1997, pp: 308
- 64 李启隆, 马晓红. 铅—二甲酚橙络合吸附波及食糖中铅的测定. *环境化学*, 1989, 8(4): 57-32
- 65 万渝平. 示波极谱法测定茶叶中铅的含量. *计量与测试技术*, 1999, (1): 25-26
- 66 谢媚, 兰斌明. 变蛋中微量铅的催化示波极谱法测定. *西安工程学院学报*, 2000, 22(2): 96-98
- 67 费俊杰, 黎拒难, 易芬云. 槲皮素化学修饰碳糊电极吸附溶出伏安法测定痕量铅. *分析化学*, 2001, 29(8): 916-918
- 68 徐泽民, 顾永林, 徐慧. 示差脉冲阳极溶出伏安法测定中药川附子痕量铅. *四川环境*, 2000, 19(3): 38-39
- 69 戴树桂, 陈甫华, 陈伟琪. 金盘电极同步镀金阳极溶出伏安法测定天然水中痕量砷. *中国环境监测*, 1995, 11(3): 11-13
- 70 范华均, 施文赵, 蔡乾涛等. 吸附溶出伏安法测定痕量砷的研究. *分析化学*, 1993, 21(1): 59-62
- 71 陈安民, 罗黎明, 彭汝芳. 茶叶中痕量硒的催化极谱法测定. *理化检验-化学分册*, 1996, 32(2): 114-116
- 72 吴莹. 单扫示波极谱法测定茶叶中铜. *理化检验: 化学分册*, 1996, 32(3): 116-163
- 73 石金辉. 极谱络合吸附催化波测定蔬菜中微量锗. *分析化学*, 1996, 24(11):

- 1316-1319
- 74 陈庆绸,吕禹泽. 单扫描极谱法测定海扇中镉. *福建水产*, 1998, (1): 19-22
- 75 孙长清, 苏星光, 高茜等. 吸附溶出催化伏安法测定人参中的锗. *分析测试通报*, 1991, 10(6): 47-49
- 76 邓天龙. 微量铅、镉极谱法连续测定. *分析化学*, 1998,26(11): 1403
- 77 周连君, 朱庆存, 尤进茂等. 吸附溶出伏安法同时测定水中痕量铅和镉. *分析化学*, 1995, 23(2), 243
- 78 王继明. 单扫描极谱法同时测定饮料中铅、铜含量. *中华预防医学杂志*, 1999,33(1): 47-48
- 79 张庭廷, 周宏标, 李蜀萍. 微分脉冲阳极溶出伏安法连续测定葛花中微量锌、铜. *安徽师范大学学报(自然科学版)*, 2000, 23(2): 158-159
- 80 陈文章, 陈金海. 用半微分阳极溶出伏安法连续测定溴化钾中镉、铅、锌和铜. *分析化学*, 1991, 19(9): 125
- 81 D W Engelkemir et al. *J Am Chem Soc* 1947: 69-155
- 82 Fahrat et al. *Talannta* 1984,31(8): 615
- 83 汪乃兴, 俞棠棣. 柴胡等六种中草药中槲皮素的微分脉冲极谱法测定. *中草药*,1990, 21 (12): 13-14
- 84 熊晓燕, 向仕学, 汤晓勤. 保健酒中功效成分红景天甙的极谱分析. *中国公共卫生*, 1998,14(12): 749
- 85 张秀琴. 黄芩中黄酮甙元的脉冲极谱测定法. *中草药*, 1985,16(5): 24-25
- 86 邹洪, 袁倬斌. 原儿茶醛的电化学研究. *分析测试学报*, 1998, 17 (1): 47-49
- 87 邹洪, 袁倬斌. 青藤碱和黄芩甙的极谱特性. *分析化学*, 1997, 25(5): 551-554
- 88 邹洪, 袁倬斌. 大黄素的极谱行为及应用研究. *药学学报*, 1997 ,32(4): 310 -313
- 89 袁倬斌, 邹洪. 土木香内酯的电化学研究. *分析测试学报* 1998,17(2): 47-49
- 90 汪振辉, 张钱丽, 周漱萍. 胡椒碱在磷酸三丁酯修饰电极上的电化学反应研究. *分析实验室*, 1999, 18(3): 31-34
- 91 于泳, 毛燕宁, 李启隆. 线性扫描示波极谱法测定抗癌药紫杉醇. *分析化学*, 1999.27(5): 562-565
- 92 张军合, 宋照军. 极谱法在含氧分析中的应用及前景. *食品研究与开发*, 1998, 19(3): 57-59
- 93 张英. 竹叶保健功能因子的研究. *无锡轻工学院博士学位论文*, 1995
- 94 张英. 从竹叶中提取黄酮类化合物浸膏或粉剂的生产方法. *发明专利*, ZL98104564.2
- 95 柴逸峰, 李修禄, 王明龙. 逆流色谱及其在药学中的应用. *西北药学杂志*, 1992, 7(3): 35-39

- 96 张天佑. 逆流色谱技术. 北京科学技术出版社, 1991, pp: 275
- 97 Fumie OKA, et al. *J Chromatogr* 1991,538:99
- 98 杜琪珍, 程启坤, 李名君等. 单台与双台串联高速逆流色谱分离能力的比较. *色谱*, 1994, 12(2): 130-131
- 99 中科院上海药物所植物化学研究室. 黄酮体化合物鉴定手册[M]. 科学出版社(北京), 1981, p: 372-373
- 100 哈本 JB 等. 黄酮类化合物. 科学出版社, 1983
- 101 杭州大学化学系分析化学教研室. 分析化学手册(第二分册). 化学工业出版社(北京), 1986, pp: 7-10
- 102 中国预防医学科学院标准处. 食品卫生标准汇编. 中国标准出版社, 1987, pp: 372-383