

植物中鱼藤酮类化合物检测方法的改进

曾鑫年¹, COLL Josep², 张善学¹, 刘新清¹, CAMPS Francisco²

(1. 华南农业大学昆虫毒理室, 广东 广州 510642; 2. 西班牙巴塞罗那化学与环境研究所, 巴塞罗那 08034)

摘要 现有分析鱼藤酮的高效液相色谱方法是针对鱼藤酮的检测而建立的, 因此它不适合于鱼藤酮类化合物的分析检测。比较鱼藤酮类化合物的 UV 吸收光谱发现, 原方法中的检测波长(280 nm ~ 300 nm)不适于鱼藤素、毛鱼藤酮及其类似物的检测。通过试验确定适合鱼藤酮类化合物的检测波长为 240 nm。用 CHCl₃-MeOH(体积比 9:1)溶剂提取出的植物中的鱼藤酮类化合物, 经 C₁₈ 柱进行色谱分离后, 以 MeOH-H₂O(体积比 66:34)为洗脱剂对鱼藤酮类化合物进行等度洗脱。实验结果表明, 改进的方法可一次性分离检测出鱼藤酮、鱼藤素、毛鱼藤酮及其 12a-羟基-和 6a,12a-脱氢-类似物, 各峰分离良好。

关键词 高效液相色谱法; 鱼藤酮; 鱼藤素; 毛鱼藤酮

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2002)02-0144-04

Modification of the Analytical Method for Rotenoids in Plants

ZENG Xin-nian¹, COLL Josep², ZHANG Shan-xue¹, LIU Xin-qing¹, CAMPS Francisco²

(1. Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Chemical and Environmental Research of Barcelona, CSIC, Barcelona 08034, Spain)

Abstract: Rotenoids are the active ingredients of some botanical insecticides and prospective candidates as anticancer agents. The proper isolation and determination of rotenoids in plants is of great importance for their further research and development. However, the HPLC method available for this purpose was developed particularly for the detection and determination of rotenone, so it appears to be unsuitable for the analysis of other rotenoids such as deguelin, elliptone and their analogues. By checking the UV spectra, it has been found that four types of UV absorption patterns occurred among the major rotenoids isolated from the roots of *Derris elliptica* and leaves of *Tephrosia vogelii*, and that the detection wavelength at 240 nm is more adequate for the analysis of a complex of rotenoids than at 280 nm - 300 nm, which is used for rotenone detection. The extraction of rotenoids from plants is conveniently carried out by CHCl₃-MeOH(9:1, V/V) and the purification can be accomplished by filtration of the crude residue through a C₁₈ reversed-phase cartridge. Rotenoids can be isocratically eluted by MeOH-H₂O(66:34, V/V). The results showed that rotenone, deguelin, elliptone, and their 12a-hydroxy- and 6a,12a-dehydro-analogs can be easily detected by the modified method, along with a satisfactory peak separation. The rotenoid components might be characterized by their retention times and relative retention times based on rotenone, which were at a range of 3.26 min - 39.42 min and 40.4% - 489.1% respectively.

Key words: high performance liquid chromatography; rotenone; deguelin; elliptone

化学合成杀虫剂大量而广泛的使用带来了严重的害虫抗药性、再猖獗和杀虫剂残留问题。人们越来越注重环境质量, 对杀虫剂高效、低毒、低残留品质的要求也越来越高。从植物中分离提取对昆虫有活性的物质, 特别是昆虫忌避剂、拒食剂和生长发育

抑制剂的试验研究受到广泛重视^[1]。鱼藤酮是已知植物杀虫剂中非常高效的成分, 对防治果树、蔬菜、茶叶、花卉和粮食作物上的数百种害虫及蚊、蝇等卫生害虫有良好效果, 特别是近年在防治抗药性害虫上发挥了重要作用。由于人们对高效、低毒、低

收稿日期 2001-10-08

作者简介: 曾鑫年, 男, 1960年生, 博士, 副教授, 从事昆虫毒理学和农药学研究, E-mail: zengxn@scau.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20072006); 教育部留学回国人员基金资助项目; 西班牙教育部外国学者基金资助项目(SB1999-14509847)

抗药性的植物源杀虫剂的需要,以及近年发现其有抗癌活性,鱼藤酮类(rotenoids)化合物的研究再次受到国内外科学工作者的重视^[2-4]。这类化合物主要来源于豆科鱼藤属、灰毛豆属、合生果属、鸡血藤属、紫穗槐属、黄檀属、毒鱼豆属和蝶豆属等植物,迄今已发现的鱼藤酮类化合物在 75 种以上^[5,6]。现有分析鱼藤酮的高效液相色谱(HPLC)分析方法均是针对鱼藤酮而设计的,对其类似化合物的分析存在一定局限性^[7,8]。建立适合植物中鱼藤酮类化合物的 HPLC 分析方法对植物或其提取物中各组分的分离分析和含量测定有重要意义,是评价其质量、加工制备和生产应用的重要前提。

本文通过改进分析检测鱼藤酮的 HPLC 方法,使其适用于植物中鱼藤酮类化合物的分析检测。

1 实验部分

1.1 植物材料

毛鱼藤(*Derris elliptica* (Roxb.) Benth.)根和西非灰毛豆(*Tephrosia vogelii* Hook.f.)叶均从华南农业大学杀虫植物标本园收获。将样品洗净晾干后,置于鼓风干燥箱内在(60±5)℃下烘干,研磨成粉末后备用。

1.2 仪器与试剂

HPLC 分析采用美国 Applied Biosystems 公司的色谱系统,该系统由溶剂输送泵(400 型)混合进样器(491 型)和四通道二极管阵列检测器(1000S 型)组成,外加 Spark Holland SPH 99 型柱恒温器和 HP3396-II 积分仪。保护柱为 Bondapak C-18(10 μm, 24 mm×4 mm i.d. 美国 Millipore 公司),色谱柱为 LiChrospher 100RP-18 反相柱(5 μm, 12.5 cm×0.4 cm i.d. 柱效为 20 000 块理论塔板/m, 德国 Merck 公司)。Beckman TJ-6 台式离心机(美国 Beckman 公司)。Varian UNITY 300 型 NMR 仪(美国 Varian Associates, Inc.)

鱼藤酮标样从 Sigma 公司购得(批号:69F0953,纯度为 95%~98%(质量分数))。提取用的有机溶剂为分析纯,HPLC 分析用的有机溶剂为色谱纯,水为 Milli-Q 纯水。所用混合溶剂各组分的

比例或浓度均为体积比或体积分数。

1.3 样品制备

精确称取一定量的植物干粉于三角瓶中,加入 10 倍质量的 CHCl₃-MeOH(9:1)溶剂,置于超声波水浴中 2 min,然后在黑暗中静置提取 24 h,滤出提取液。重复提取一次,合并滤液。将滤液减压浓缩以除去溶剂,获得植物提取物。

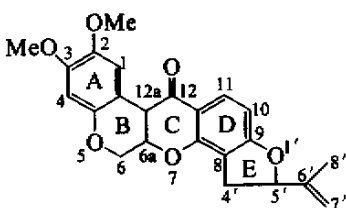
所得提取物在超声波水浴中溶于 MeOH-H₂O(1:1)中,置于高速离心机中以 2 500 r/min 的速率离心 10 min,移出上清液。重复操作 3 次,合并上清液。用 ISOLUTE C-18 反相柱(International Sorbent Technology Ltd, UK)进行净化和分离,用比例为 20:80 的 MeOH-H₂O 冲洗以有效去除大部分杂质,然后用比例为 85:15,90:10,95:5 的 MeOH-H₂O 和纯 MeOH 洗脱,分段收集各流出组分。各流出组分用薄层色谱法(TLC)进行监测(用 F₂₅₄ 硅胶 60 铝板(德国 Merck 公司),以 Hexane-EtOAc(2:1)为展开剂进行展开,以 10% H₂SO₄ 甲醇液为显色剂进行显色)。纯化后,用美国 Varian UNITY 300 型 NMR 仪以 C₅D₅N 为溶剂在 300 MHz 下测定 NMR 氢谱,所得化学位移值和偶合值与已有文献数据^[6,9]比较,确认其结构式。

1.4 色谱条件

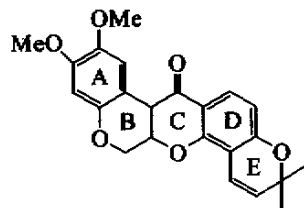
HPLC 分析以 MeOH-H₂O 为流动相,流速 1 mL/min,于室温下在 210 nm,240 nm,290 nm 和 310 nm 波长处检测,记录各峰保留时间、UV 吸收光谱和 240 nm 下检测的色谱图,并计算以鱼藤酮为参比的相对保留值。用常规外标法测定植物中主要鱼藤酮类化合物含量。

2 结果与讨论

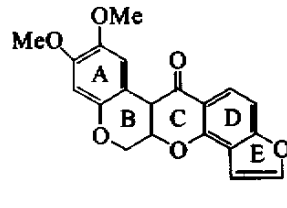
鱼藤酮及其类似物属异黄酮类化合物,其化学结构变化主要发生在 E 环和 6a,12a 位上,在该位上发生不同水平的氧化^[5]。植物中含有的鱼藤酮类化合物主要有鱼藤酮、鱼藤素、毛鱼藤酮及其 12a 羟基化合物(鱼藤醇酮、灰豆素和毛鱼藤醇酮)和 6a,12a 脱氢化合物(脱氢鱼藤酮、脱氢鱼藤素和脱氢毛鱼藤酮),其结构式如下:



鱼藤酮(rotenone)



鱼藤素(deguelin)



毛鱼藤酮(elliptone)

2.1 检测波长的确定

对毛鱼藤和西非灰毛豆的 HPLC 初步分析表明,12a 位上的羟基对 UV 吸收光谱没有大的影响,但 6a,12a 位上的脱氢引起了紫外吸收光谱的较大改变。其中含有的主要鱼藤酮类化合物的 UV 吸收光谱有 4 种类型(见图 1)。很显然,在现有方法^[7,8]中采用 280 nm ~ 300 nm 波长检测鱼藤酮类化合物是不合适的,有可能导致鱼藤素、毛鱼藤酮及其类似物无法检出。虽然该类化合物在 210 nm 均有强吸收,但发现产生了较多的杂质峰。

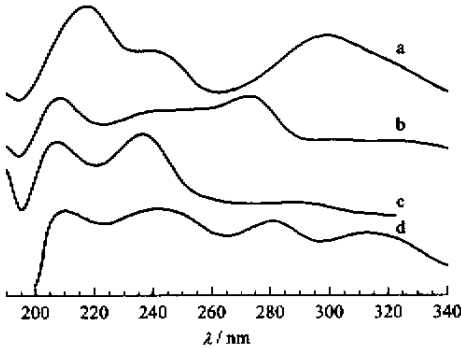


图 1 鱼藤酮类化合物的 4 种紫外吸收光谱图

Fig.1 Four types of UV spectra of rotenoids

The rotenoids are in MeOH-H₂O (66:34, V/V).

a. rotenone ; b. deguelin ; c. elliptone ; d. dehydrorotenone.

比较鱼藤酮、鱼藤素和毛鱼藤酮 3 个代表结构化合物在 240 nm 和 290 nm 波长下检测得到的色谱图(见图 2)可以看出,不同鱼藤酮类化合物在这两个波长下的吸收强度有较大差异,波长 290 nm 适合于鱼藤酮的分析,但鱼藤素和毛鱼藤酮的吸收,尤其是后者的吸收下降较大,不利于这两个化合物的检测分析。而波长 240 nm 对所有的这些鱼藤酮类化合物都能较好地检测。因此,认为 240 nm 是适合鱼藤酮类化合物的检测波长。

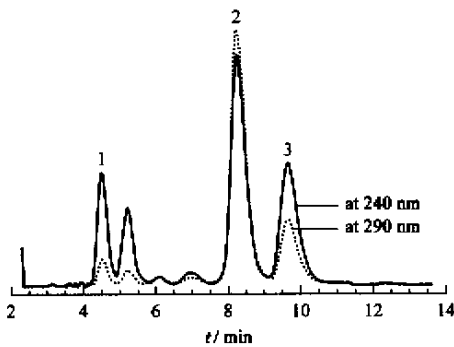


图 2 在 240 nm 和 290 nm 波长下检测的鱼藤酮类代表化合物色谱图

Fig.2 Chromatogrames of representative rotenoids at 240 nm and 290 nm

1. elliptone ; 2. rotenone ; 3. deguelin.

2.2 流动相的选择

鱼藤酮类化合物的极性差异主要是由于羟基取代引起的。采用不同比例的 MeOH-H₂O 作为反相 HPLC 分析的流动相,可以达到分离洗脱不同极性鱼藤酮类化合物的目的。从探索试验的线性梯度洗脱结果来看,MeOH-H₂O 的体积比在 50:50 ~ 90:10 为宜。为求得不同的分离效果,也可采用相同体积比范围的 CH₃CN-H₂O 为流动相。本试验采用体积比为 66:34 的 MeOH-H₂O 进行等度洗脱,获得了良好的分离效果。

2.3 植物中鱼藤酮类化合物的检测

根据上述结果设定前处理和 HPLC 分析条件,用 MeOH-H₂O (66:34) 等度洗脱,对毛鱼藤中鱼藤酮类化合物进行分析检测。结果表明,改进的方法可一次性分离检测出鱼藤酮、鱼藤素、毛鱼藤酮、鱼藤醇酮、灰豆素、毛鱼藤醇酮、脱氢鱼藤酮、脱氢鱼藤素和脱氢毛鱼藤酮,各组分离良好(见图 3)。从图 3 可以看到基本没有杂质峰出现。毛鱼藤酮后的一个峰虽还未确认是否属于鱼藤酮类化合物,但从 UV 吸收光谱看其结构应与毛鱼藤酮结构有关。另外在脱氢毛鱼藤酮前后出现的 2 个色谱峰也有待确认。在对西非灰毛豆中鱼藤酮类化合物的检测中也获得了同样的结果。

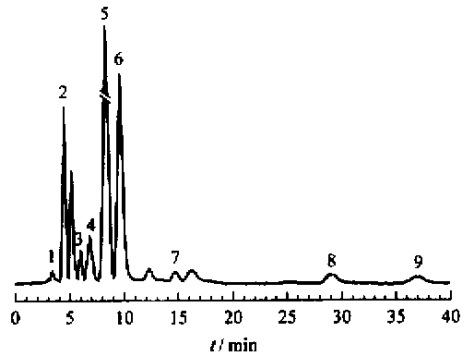


图 3 植物中鱼藤酮类化合物的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of rotenoids in plants

1. elliptone ; 2. elliptone ; 3. rotenone ; 4. tephrosin ; 5. rotenone ; 6. deguelin ; 7. dehydroelliptone ; 8. dehydrorotenone ; 9. dehydrodeguelin.

植物中各鱼藤酮类化合物在反相 HPLC 条件下的保留时间和相对保留值(以鱼藤酮为参照物)有较大差异,分别为 3.26 min ~ 39.42 min 和 40.4% ~ 489.1%(见表 1),可用于鱼藤酮类化合物的初步确定。对于更强极性的类似物应适当降低流动相中甲醇的比例,而检测弱极性的类似物时则要增加甲醇的比例或改用其他流动相。

按照常规外标法对植物中鱼藤酮类化合物的含量进行测定。结果表明,毛鱼藤中主要含鱼藤酮

(w (鱼藤酮)=1.31%,以植物干粉质量计,下同)鱼藤素(w (鱼藤素)=0.73%)和毛鱼藤酮(w (毛鱼藤酮)=0.19%);西非灰毛豆则主要含鱼藤素(w (鱼藤素)=1.32%)、灰豆素(w (灰豆素)=0.95%)和鱼藤酮(w (鱼藤酮)=0.32%)。

表 1 HPLC 法测定的植物中鱼藤酮类化合物的保留时间($n=5$)^{*}

Table 1 Retention times of rotenoids in plants by HPLC($n=5$)^{*}

Rotenoid	Retention time (mean, min)	Relative retention (%)
Elliptolone	3.26	40.4
Elliptone	4.36	54.1
Rotenolone	5.94	73.7
Tephrosin	6.75	83.7
Rotenone	8.06	100(reference)
Deguelin	9.46	117.4
Dehydroelliptone	14.44	179.2
Dehydrorotenone	28.51	353.7
Dehydrodeguelin	39.42	489.1

* Under isocratic elution with MeOH-H₂O(66:34, V/V).

3 结论

Bushway 等(1977 年)提出 HPLC 法检测鱼藤酮成分,后被美国官方分析化学者协会(AOAC)采纳^{7]}。现有 HPLC 方法用于鱼藤酮的检测可以获得很好的分离分析效果,但对于其类似物的分析则存在一定的局限性,尤其是对次要鱼藤酮类化合物的分离效果不如意^{8]},Bowman 等(1978 年)在分析时没有检测到常见的鱼藤素及其类似物^{10]}可能就是这一原因。本文采用改进的方法对含有鱼藤酮类

化合物的植物提取物进行检测,获得了满意的分离效果。

参考文献:

- [1] ZHAO Shan-huan. Journal of Northwest Agricultural University, 1993, 21(3): 73
赵善欢. 西北农业大学学报, 1993, 21(3): 73
- [2] ZHAO Shan-huan, HUANG Zhang-xin. Plant Protection, 1988, 14(1): 44
赵善欢, 黄彰欣. 植物保护, 1988, 14(1): 44
- [3] Fang N, Casida J E. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7): 3 380
- [4] XU Han-hong, HUANG Ji-guang. Journal of Southwest Agricultural University, 2001, 23(2): 140
徐汉虹, 黄继光. 西南农业大学学报, 2001, 23(2): 140
- [5] Dewick P M. In: Harborne J B, ed. The Flavonoids - Advances in Research Since 1986. London: Chapman and Hall Ltd, 1994. 125
- [6] Fang N, Casida J E. J Agric Food Chem, 1999, 47(5): 2 130
- [7] Bushway R J, Hanks A R. J Chromatogr, 1977, 134(1): 210
- [8] ZENG Xin-nian, XIE Jian-jun, HOU Xue-wen, et al. Chinese Journal of Tropical Crops, 2000, 21(4): 27
曾鑫年, 谢建军, 侯学文, 等. 热带作物学报, 2000, 21(4): 27
- [9] Carlson D G, Weisleder D, Tallent W H. Tetrahedron, 1973, 29: 2 731
- [10] Bowman M C, Holder C L, Bone L I. J Assoc Off Anal Chem, 1978, 61(6): 1 445

欢迎购买《分析化学手册第五分册气相色谱分析》

应化学工业出版社邀请,由中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心李浩春教授主编,许国旺教授、叶芬副教授、修振佳副教授、洪群发副教授及罗春荣、杨黎等同志参加撰写的《分析化学手册第五分册气相色谱分析》(第 2 版)已于 1999 年 3 月出版。全书共 200 万字,内容系统、全面、新颖、实用,既是色谱工作者必需的工具书,也是有关人士学习、提高色谱技能的必备参考书。全国各地新华书店有售。需要者也可与化学工业出版社(电话 010-64918013)或作者许国旺教授联系(电话 0411-3693403),书价 128 元,包装费、邮费 17 元,共计 145 元。