

鱼藤根抽提物中鱼藤酮的高效液相色谱分析

杨晓云, 张志祥, 黄继光, 徐汉虹

(农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学昆虫毒理研究室, 广州 510642)

摘要: 建立了鱼藤根抽提物中鱼藤酮的高效液相色谱分析方法, 试样用丙酮溶解, 鱼藤酮含量用配备有 Hypersil ODS (5 μ m, 250mm \times 4 mm) 色谱柱和紫外检测器的反相高效液相色谱法测定. 确定的最佳液相色谱检测条件为: 检测波长 290nm; 流动相, 体积比为 60:40 的乙腈/水混合液; 流速 1mL/min; 进样量 10 μ L. 此方法对鱼藤酮的测定准确度和精密度均很好, 适合于鱼藤根抽提物中鱼藤酮的含量分析.

关键词: 鱼藤; 鱼藤酮; 高效液相色谱

中图分类号: S482.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2006)02-0043-04

0 引言

鱼藤酮因其活性高、无残留、对人畜安全, 使其成为生产绿色农药的主要药性成分之一. 鱼藤根中鱼藤酮含量高, 提取简便, 是目前我国鱼藤酮原药生产的主要原料. 鱼藤根抽提物中鱼藤酮的检测是鱼藤酮原药生产过程中的一个必不可少的环节, 以往鱼藤酮的分析也大多是采用高效液相色谱分析法^[1-5], 而流动相都是采用甲醇和水的混合溶液, 但因鱼藤根中还含有与鱼藤酮结构极为类似的鱼藤素、灰叶酚等, 以醇和水的混合溶液作流动相很难把它们和鱼藤酮完全分离, 因而影响分析结果, 基于此, 本实验以乙腈和水的混合溶液作流动相对鱼藤根抽提物中鱼藤酮进行了分析研究, 结果表明, 以乙腈和水的混合溶液作流动相能够把鱼藤根中鱼藤酮和其类似物完全分离开, 从而保证了鱼藤酮分析结果的准确性, 该方法也适合于鱼藤酮原药及鱼藤酮气雾剂中鱼藤酮的含量分析.

1 仪器与试剂

配置紫外可见检测器的 HP-1100 型高效液相色谱仪;
色谱柱: ODS hypersil 5 μ m, 250 \times 4mm;
DU-600 型紫外扫描仪: 瑞士 Beckman 公司生产;
鱼藤酮标样, 97%, 购于 Sigma 公司;
乙腈(色谱纯), 蒸馏水, 其他所用试剂均为分析纯.

2 实验方法

2.1 鱼藤根抽提物的制备

称取鱼藤根干粉适量, 用滤纸包好后装入索氏提取器, 用甲醇回流提取 24h. 所得抽提液用石油醚

收稿日期: 2006-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(20377015)和广东省科技计划项目(2003B1603, 2003B21605)资助项目.

作者简介: 杨晓云(1966-), 男, 博士, 农药与化学生物学教育部重点实验室副教授.

萃取脱脂,再用二氯乙烷萃取纯化,然后减压浓缩至膏状,备用.

2.2 实验溶液的配制

标准溶液配制:准确称取97%的鱼藤酮干粉标准品,先用少量丙酮溶解,再用丙酮定容为1mg/mL鱼藤酮贮备液,于冰箱中存放.实验时,其他浓度标准溶液均用此溶液稀释而成.

样品溶液配制:准确称取适量鱼藤根抽提物、鱼藤酮原药及鱼藤酮喷剂,用丙酮溶解定容至10 mL,经0.45 mm针筒过滤头过滤后备用.

2.3 仪器检测

开启高效液相色谱仪,定好流动相、流速和检测波长,基线稳定后便可进样,每次进样量10 μ L.本实验均是在室温下进行.流动相所用的溶剂及蒸馏水均用0.45 mm的滤膜过滤后再用.

2.4 计算方法

样品含量由实验方法所得峰面积按外标法进行计算,计算公式如下:

$$c_{\text{样}} = \frac{r_{\text{样}}}{r_{\text{标}}} \times c_{\text{标}}$$

式中: $c_{\text{样}}$ —试样中鱼藤酮含量(g/mL), $r_{\text{样}}$ —试样溶液中鱼藤酮峰面积, $r_{\text{标}}$ —标样中鱼藤酮峰面积, $c_{\text{标}}$ —标样中鱼藤酮含量(g/mL).

回收率计算公式如下:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{添加标样测得量}}{\text{添加标样量}} \times 100.$$

3 结果和讨论

3.1 检测波长的确定

以乙腈溶解一定量的鱼藤酮标样,用紫外可见分光光度计进行紫外波长扫描,以确定鱼藤酮合适的检测波长,结果见图1.从图中可见有3个峰吸收点,考虑到选用波长越短溶剂和杂质干扰越大,因此本实验确定检测波长为290 nm.

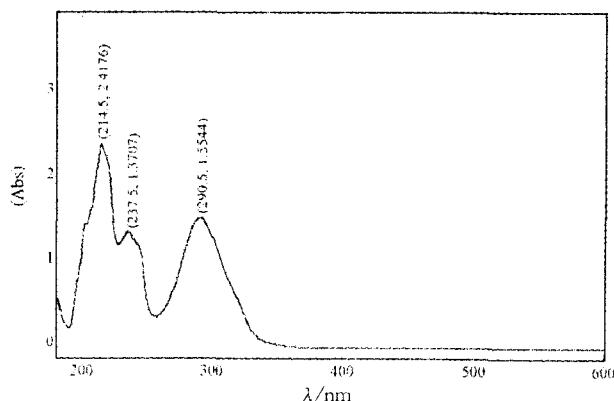


图1 乙腈作参比,乙腈作溶剂的鱼藤酮紫外扫描谱图

3.2 流动相组成对分离度的影响

实验了不同组成的(乙腈+水)、(甲醇+水)、(乙腈+甲醇+水)和(四氢呋喃+水)等不同流动相和流动相比对鱼藤根抽提物各组分分离的影响,结果表明,以(甲醇+水)和(四氢呋喃+水)作流动相时,无论配比怎样改变,鱼藤根抽提物各组分分离效果都不太好,因此不宜作为流动相;而以(乙腈+水)和(乙腈+甲醇+水)作为流动相时,通过改变配比,鱼藤根抽提物各组分能够达到很好的分离,为简便起见,本实验以(乙腈+水)作为流动相,而其最佳流动相配比为乙腈/水(60/40, v/v).图2是鱼藤酮标准及鱼藤酮样品在选定条件下的液相色谱图,从图可见鱼藤根抽提物中鱼藤酮和其它组分达到了完全分离.

检测条件:波长,290nm;流动相,体积比为60:40的乙腈/水混合液;流速,1mL/min;进样量,10 μ L. R峰:鱼藤酮.

3.3 流速对分离度的影响

以选定的检测条件,考察了不同流速对鱼藤酮原药及鱼藤酮气雾剂中鱼藤酮与其他组分分离效果的影响,结果表明,随着流速的增大,鱼藤酮的保留时间逐渐缩小,分离度降低,柱压升高.随着流速减小,保留时间延长,分离度增大,但流速太小时,保留时间过长,且色谱峰变宽.为缩短分离时间,且保持

良好的分辨率,选择流速为 1 mL/min.

3.4 进样体积对分离度的影响

进样量一定时,实验了进样体积对色谱分辨率的影响,结果表明,随着进样体积增大,色谱分辨率逐渐降低,色谱峰发生扩散,且出现峰形不对称,因此进样体积不宜过大,本实验选用进样体积为 10 μ L.

3.5 进样量对分离度的影响

在相同进样体积的条件下,考察了进样量对色谱分辨率的影响,结果表明,随着进样量的增大,色谱峰变宽,组分峰重叠加重,分辨率降低,当进样量超过一定量时,峰形不对称,且严重拖尾,这表明进样量已超过色谱柱吸附的线性范围.因此,进样量应控制在标样的线性范围以内.

3.6 鱼藤酮线性关系分析

用 1000 g/mL 鱼藤酮标准溶液,稀释为 600 g/mL, 500 g/mL, 400 g/mL, 300 g/mL, 200 g/mL, 100 g/mL, 50 g/mL 和 25 g/mL, 在选定的检测条件下,分别由低浓度向高浓度进样分析,测得结果如表 1 所示,表中所列结果均为平行进样 3 次所得结果的平均值.

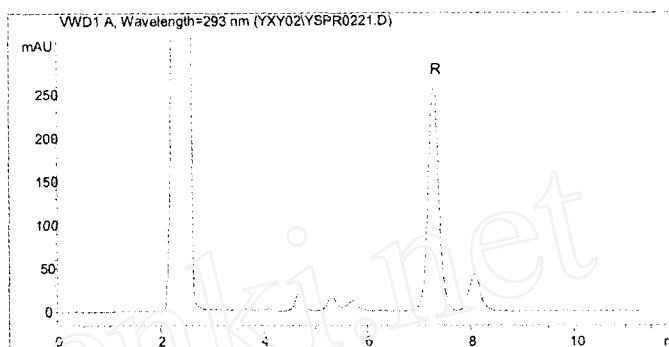
表 1 鱼藤酮标准线性关系实验结果

| 浓度 C(g/mL) | 600 | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | 50 | 25 |
|-------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|
| 峰面积 A | 15918 | 13322 | 10577 | 7966 | 5310 | 2662 | 1324 | 673 |
| 峰高 H | 1180 | 992 | 733 | 630 | 425 | 201 | 105 | 56 |

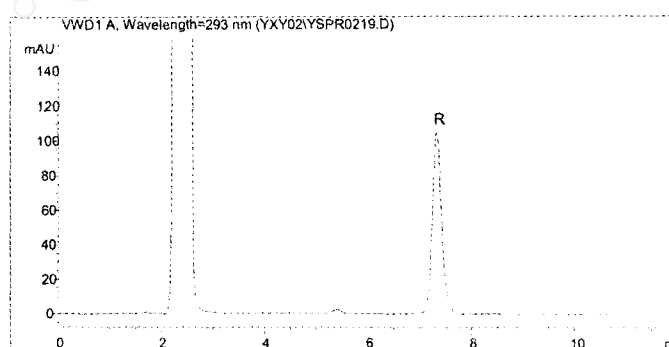
取表 1 中的点,以峰面积对应鱼藤酮浓度作线性回归,得回归方程为 $C(\text{g/mL}) = 0.03767 A - 0.0666$,线性相关系数为 0.9999,可见鱼藤酮浓度在 25 ~ 600 g/mL 范围内对应峰面积成良好线性关系;而鱼藤酮浓度对应峰高线性关系不太好,因此本法只宜用峰面积进行定量分析.图 3 为鱼藤酮浓度对应色谱峰面积线性关系图.

3.7 精密度分析

在选定的检测条件下,分别对鱼藤



(a) 鱼藤根抽提物



(b) 鱼藤酮标样

图 2 鱼藤酮标准及鱼藤酮样品的液相色谱图.

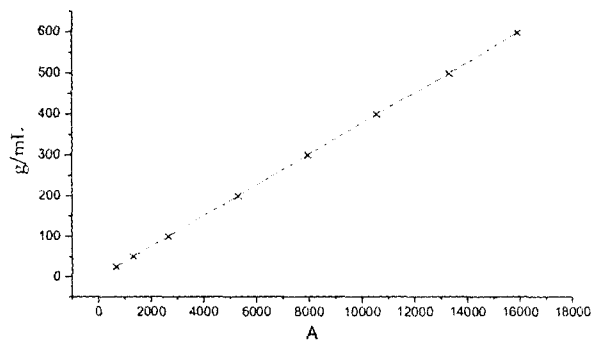


图 3 鱼藤酮浓度和色谱峰面积线性关系图

酮标样和样品平行测定6次,测得鱼藤酮标样峰面积标准偏差为1.8%;样品峰面积标准偏差为2.2%,结果令人满意。

3.8 样品回收率分析

在测定样品中加入已知量的鱼藤酮标样,按照样品处理的全部过程进行操作,测得添加50 g/mL, 100 g/mL和250 g/mL的回收率分别为97.8%,99.2%和99.7%,结果非常好。

4 结 语

以上结果表明,本方法对鱼藤酮的测定准确度和精密性均很好,适合于鱼藤根提取物中鱼藤酮的含量测定。

参考文献:

- [1] 曾鑫年, COLL JOSEP, 张善学,等. 植物中鱼藤酮类化合物检测方法的改进[J]. 色谱,2002,20(2):144-147.
- [2] DAWSON V K, ALLEN J L. Liquid chromatographic determination of rotenone in fish crayfish mussels and sediments [J]. Journal of Association Official Analytical Chemists, 1988,71(6):1094-1096.
- [3] LAFORGE F B, HALLER H L, ROTENONE XIX. The nature of the alkali soluble hydrogenation products of rotenone and its derivatives and their bearing on the structure of rotenone[J]. J Amer Chem Soc, 1932,54:810-818.
- [4] HOWARD A JONES. Determination of Rotenone in Derris and Cube[J]. Industrial and engineering chemistry, 1937,9(5):206-210.
- [5] RODNEY J BUSHWAY. High-performance liquid chromatographic analysis of rotenone and rotenonone in water by direct injection[J]. Journal of Chromatography A, 1984,303:263-266.

Determination of rotenone in Derris roots' extract by HPLC

YANG Xiao-yun, ZHANG Zhi-xiang, HUANG Ji-guang, XU Han-hong

(Key Lab. of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642)

Abstract: A HPLC method for the determination of rotenone in Derris roots' extract is described. Under mobile phase as acetonitrile/water (60/40v/v) and elute rate as 1m L/min, rotenone in Derris roots' extract is analyzed using a reversed-phase C-18 column (ODS hypersil 5 μ m, 250 \times 4mm) with UV detection at 290 nm. The good results are obtained.

Key words: derris; rotenone; HPLC