

## 反相高效液相色谱法测定毛鱼藤中鱼藤酮的含量

胡道德, 顾磊, 刘皋林 (上海交通大学附属第一人民医院, 上海 200080)

**摘要** 目的:建立以反相高效液相色谱法测定毛鱼藤中鱼藤酮含量的方法。方法:以 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 ×150 mm)色谱柱为固定相;乙腈:0.1%磷酸溶液 (48:52, v/v, pH 2.6)为流动相;流速 1.0 mL/min;柱温 40.0 °C;检测波长 299 nm。结果:鱼藤酮在浓度为 30~50 mg/L 范围内,其峰面积与浓度线性关系良好,线性方程为  $A = 20.7311C - 0.3616$  ( $r = 0.9998$ ),平均加样回收率为 100.74%,RSD 为 0.86%。结论:本方法操作简便、快速,结果准确,可用于毛鱼藤中鱼藤酮的含量测定。

**关键词** 毛鱼藤;鱼藤酮;反相高效液相色谱法

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2007)03-0159-03

## Determination of rotenone in *Derris elliptica* by reversed-phase high performance liquid chromatography

HU Dao-de, GU Lei, LIU Gao-lin (Department of Pharmacy, Affiliated First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish a reversed-phase high performance liquid chromatography method for rotenone in *Derris elliptica*. **Methods:** The determination was performed on ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 ×150 mm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphate acid solution (48:52, v/v, pH 2.6) with flow rate at 1.0 mL/min and determination wavelength at 299 nm under 40.0 °C. **Results:** Under the conditions described, the calibration curve of rotenone was linear over the concentration range of 30 to 50 mg/L. The regression equation was  $A = 20.7311C - 0.3616$ ,  $r = 0.9998$  ( $n = 5, P < 0.01$ ). The average recovery for rotenone was 100.74%. The mean relative standard deviation (RSD) was 0.86%. **Conclusion:** The method is simple and accurate, and suitable for the determination of rotenone in *Derris elliptica*.

**KEY WORDS** *Derris elliptica*; rotenone; reversed-phase high performance liquid chromatography

毛鱼藤 (*Derris elliptica*) 为豆科鱼藤属植物,广泛生长在东南亚各国<sup>[1]</sup>。毛鱼藤根、茎中鱼藤酮 (rotenone) 含量高,是目前我国鱼藤酮原药生产的主要原料。鱼藤酮是一种抑制神经组织和肌肉组织的选择性植物源杀虫剂,具有活性高、杀虫谱广的特点,在无公害农产品的害虫防治方面,具有较好的应用前景。近年文献报道<sup>[2,3]</sup>,大鼠长时间接触鱼藤酮会对大鼠黑质多巴胺神经元有选择性损伤作用,可出现特征的 Lewy 小体,而对胆碱能神经元无影响,从而使大鼠产生类似于人类帕金森病 (Parkinson disease) 的症状,利用鱼藤酮的这一药理毒理作用可以建立大鼠帕金森病动物模型。我们在建造大鼠帕金森病动物模型之前,参考了有关文献<sup>[4,5]</sup>,结合本实验室的具体条件,建立了测定毛鱼藤中鱼藤酮含量的反相高效液相色谱法,该方法操作简便、快速,

结果准确,为鱼藤酮定量测定提供又一分析手段。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Agilent 1100 型高效液相色谱仪,包括四元梯度泵、二极管阵列检测器 (DAD 190 ~ 950 nm)、自动进样器、柱温箱、在线脱气机、数据处理系统为美国 Agilent 公司化学工作站 (Chem station), ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 ×150 mm) 色谱柱,微孔滤膜 (0.45 μm), HP-01 真空过滤装置, Mettler Toledo 电子天平 (AL104)。

**1.2 试剂** 对照品鱼藤酮 (Sigma-Aldrich, 含量 98.0%), 乙腈 (美国天地公司, 批号: 412021, 色谱纯); 三氯甲烷、丙酮、乙醇等均为分析纯; 三蒸水 (自制)。

### 2 方法与结果

**2.1 毛鱼藤根、茎提取物的制备** 称取毛鱼藤根、茎干粉适量,装入索氏提取器中,用三氯甲烷浸渍过

夜(12 h),然后回流提取 1 h,所得提取液先粗滤,后精滤(0.45  $\mu\text{m}$ ),减压浓缩即得样品。

**2.2 标准溶液配制** 精密称取干燥至恒重的鱼藤酮对照品适量,加丙酮-乙醇(1:2)溶解并稀释至刻度,配成 500 mg/L 储备液,置 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。临用时将鱼藤酮储备液以乙醇按适当比例稀释,配制成浓度分别为 30、35、40、45、50 mg/L 的鱼藤酮标准溶液。

**2.3 供试品溶液配制** 精密吸取样品 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加乙醇至刻度,摇均,再精密吸取上述溶液 1.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加乙醇至刻度,摇均,即得。

**2.4 检测波长的选择** 精密配制浓度 40 mg/L 的鱼藤酮标准溶液,按色谱条件进样,结果显示鱼藤酮标准溶液在 299 nm 波长处有最大的面积响应值,因此,本实验选定检测波长为 299 nm。

**2.5 色谱条件** 色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150 mm);流动相:乙腈:0.1%磷酸溶液(48:52, v/v, pH 2.6);色谱参数:流速 1.0 mL/min;柱温 40.0  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长 299 nm;进样量:10  $\mu\text{L}$ ;记录鱼藤酮峰面积为响应参数,外标法定量。鱼藤酮的典型色谱图谱见图 1 和图 2。由图可知,在建立的色谱条件下,毛鱼藤根、茎提取物中鱼藤酮和其它组分达到了完全分离,鱼藤酮的保留时间为 13.0 min。

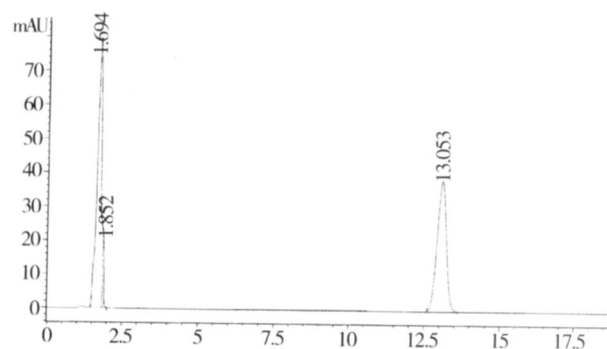


图 1 鱼藤酮对照品的色谱图

**2.6 标准曲线的制备** 分别进样 30、35、40、45、50 mg/L 的鱼藤酮标准溶液,进行测定,以峰面积  $A$  对浓度  $C$  进行线性回归,得线性方程为  $A = 20.7311C - 0.3616$  ( $r = 0.9998$ )。表明鱼藤酮在浓度为 30~50 mg/L 范围内,其峰面积与浓度线性关系良好。

**2.7 溶液稳定性试验** 取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,分别于 0、2、4、6、8 h 进样,共进样 5 次,观察鱼藤酮峰面积变化,结果表明,该溶液在 8 h 内稳定,峰面积测量值的  $RSD$  为 0.27%。

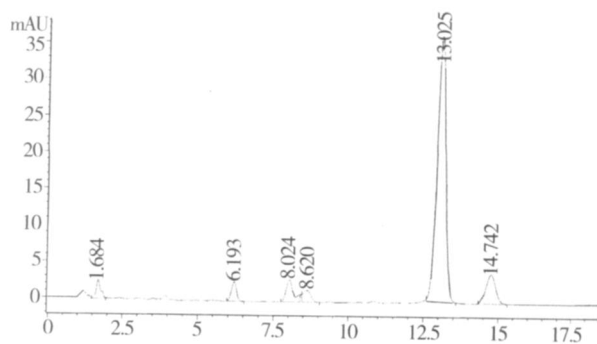


图 2 供试品的色谱图

**2.8 进样精密度试验** 取标准曲线下溶液 10  $\mu\text{L}$ ,进样 5 次,计算鱼藤酮进样精密度,结果鱼藤酮峰面积测量值的  $RSD$  为 0.11%。

**2.9 中间精密度试验** 取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,分别在第 1 天、第 2 天、第 3 天由不同的分析人员在不同的仪器上分别进样 5 次,结果鱼藤酮的  $RSD$  为 0.13%。

**2.10 方法回收率** 精密吸取已知含量的样品,共 9 份,分别精密加入一定量的鱼藤酮对照品贮备液适量,使成高、中、低浓度,分别进样 3 次测定,代入回归方程,外标法定量,计算得平均加样回收率为 100.74%, $RSD$  为 0.86%。如表 1。

表 1 鱼藤酮方法回收率 ( $n = 3$ )

序号	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	$RSD$ (%)
1	24.46	5.78	30.3021	100.21		
2	24.46	5.78	30.3911	100.50		
3	24.46	5.78	30.0637	99.42		
4	24.46	12.12	36.4608	99.67		
5	24.46	12.12	36.9429	100.99	100.74	0.86
6	24.46	12.12	36.9667	101.06		
7	24.46	20.24	45.2274	101.18		
8	24.46	20.24	45.4344	101.64		
9	24.46	20.24	45.5875	101.99		

**2.11 专属性** 在建立的色谱条件下,峰形良好,其他物质对鱼藤酮测定无干扰。用强酸(1 mol/L HCl 溶液)、强碱(1 mol/L NaOH 溶液)、强氧化剂(1 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液)对供试品进行破坏,色谱图见图 3、图 4、图 5。表明降解产物不影响测定。

**2.12 检测限及定量限** 以信噪比为 3:1 时 ( $S/N = 3:1$ ) 相应注入仪器的量确定检测限,以信噪比为 10:1 时 ( $S/N = 3:1$ ) 相应注入仪器的量确定定量限。结果,本方法检测限及定量限分别为 0.72 ng 和 2.17 ng。

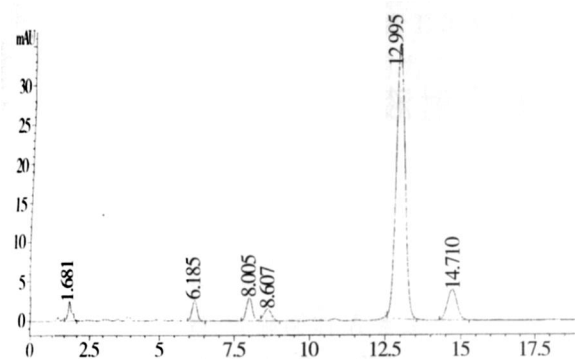


图 3 强酸 (1 mol/L HCl 溶液)破坏后供试品的色谱图

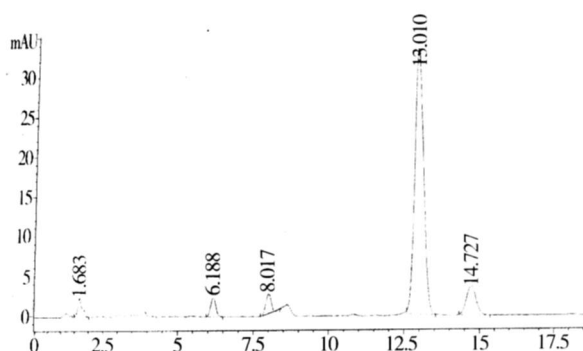


图 4 强酸 (1 mol/L NaOH 溶液)破坏后供试品的色谱图

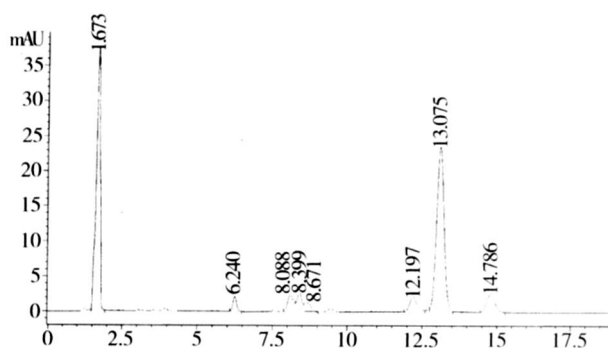


图 5 强氧化剂 (1 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液)破坏后供试品的色谱图

2.13 样品测定 精密吸取样品溶液 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加乙醇至刻度,摇均,另精密吸取上述溶液 1.0 mL,置 25 mL 量瓶中,摇均,10  $\mu$ L 注入液相色谱仪,记录色谱图,外标法以峰面积代入回归方程,计算鱼藤酮的含量。测定了 3 批毛鱼藤提取物样品中鱼藤酮含量分别是 46.65、45.24、45.00 g/L,如表 2。

表 2 3 批样品中鱼藤酮含量测定结果 (n=3)

样品编号	含量 (g/L)	RSD (%)
1	46.65	0.28
2	45.24	0.25
3	45.00	0.53

### 3 讨论

毛鱼藤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 12 羟基化合物 (鱼藤醇酮、灰豆素和毛鱼藤醇酮)和 6,12 脱氢化合物 (脱氢鱼藤酮、脱氢鱼藤素和脱氢毛鱼藤酮),它们属异黄酮类化合物。鱼藤酮类化合物 UV 吸收光谱有四种类型,鱼藤酮、鱼藤素、毛鱼藤酮和它们的脱氢氧化物分别在 299、273、241 nm 和 281 nm 处有吸收峰<sup>[6]</sup>。在本实验条件下比较不同检测波长处的鱼藤酮色谱图,可以看出鱼藤酮在 299 nm 波长处有最大的面积响应值,因此,本实验选定检测波长为 299 nm,同文献报道一致<sup>[6]</sup>。

在综合分析了鱼藤酮的物理和化学性质的基础上,对使用不同的溶剂作为流动相进行了反复的对比研究,发现采用 C<sub>18</sub> 色谱柱,甲醇/水为流动相组成的反相系统,鱼藤酮峰型的对称性不佳且有拖尾。只有采用 C<sub>18</sub> 色谱柱和乙腈:0.1% 磷酸溶液 (48:52, v/v, pH 2.6) 为流动相组成的反相系统,峰型对称,分离效果满意。

鱼藤酮在酸、碱中较稳定,但在强氧化剂 (1 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液)作用下不稳定,有新物质生成,在本实验条件下新物质色谱峰的保留时间为 12.197 min (图 5),同鱼藤酮的分离度大于 1.5,分离效果良好,该新物质结构确定,尚需进一步研究。鱼藤酮见光易分解,标样保存时注意密封、避光,进样时应在暗室条件下进行。

总之,本方法具有较高的精密度和准确性,并且操作简便、快速,是进行毛鱼藤中鱼藤酮有效成分检测的理想分析方法。

### 参考文献:

- [1] Sae-Yun A, Ovatlampom C, Itharat A, et al. Extraction of rotenone from *Derris elliptica* and *Derris malaccensis* by pressurized liquid extraction compared with maceration [J]. J Chromatogr A, 2006; 1125 (2): 172.
- [2] Huang J, Liu H, Gu W, et al. A delivery strategy for rotenone microspheres in an animal model of Parkinson's disease [J]. Biomaterials, 2006; 27 (6): 937.
- [3] Phinney AL, Andringa G, Bol JG, et al. Enhanced sensitivity of dopaminergic neurons to rotenone-induced toxicity with aging [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2006; 12 (4): 228.
- [4] Holm A, Molander P, Lundanes E, et al. Determination of rotenone in river water utilizing packed capillary column switching liquid chromatography with UV and time-of-flight mass spectrometric detection [J]. J Chromatogr A, 2003; 983 (1-2): 43.
- [5] Jimenez JJ, Bemal JL, DeIMJ, et al. Determination of rotenone residues in raw honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2000; 871 (1-2): 67.
- [6] 曾鑫年, Coll Josep, 张善学, 等. 植物中鱼藤酮类化合物检测方法改进 [J]. 色谱, 2002; 20 (2): 144.