

雷公藤次碱的高效液相色谱分析方法

陈列忠¹, 陈建明¹, 吕仲贤¹, 申屠旭萍²,

郑许松¹, 徐红星¹, 张珏锋¹, 俞晓平¹

(¹浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州310021; ²中国计量学院生命科学院, 杭州310018)

摘要 雷公藤的根皮提取物中一般含有多个具杀虫活性的生物碱,其中以雷公藤次碱的活性最高。采用高效液相色谱法,乙腈+0.02mol/L磷酸二氢钾水溶液(50+50)作为流动相,流速为1ml/min,C18反相色谱柱,紫外检测波长为195nm,用外标法对提取物中的雷公藤次碱进行了定性定量分析,方法的变异系数为0.24%,线性相关系数为0.9995,平均回收率为99.8%。

关键词 雷公藤次碱 高效液相色谱

中图分类号:TQ450.7 文献标识码:A 文章编号:1006-0413(2005)04-172-02

Analysis of Wilforine by HPLC

CHEN Lie-Zhong¹, CHEN Jian-Ming¹, LU Zhong-Xian¹, SHENTU Xu-Ping², ZHENG Xu-Song¹,

XU Hong-Xing¹, ZHANG Jue-Feng¹, YU Xiao-Ping¹

(¹Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Extracts of root epidermis of *Tripterygium wilfordii* commonly contain several alkaloids with insecticidal activity. Among these, wilforine has the highest activity. An HPLC method was described using a 50:50 mixture of acetonitrile and 0.02 M KH_2PO_4 as the mobile phase with a flow rate of 1 ml/min, a C18 reverse phase column, and UV detection at 195 nm. An external standard was used to qualitatively and quantitatively determine wilforine in the extract. Coefficient of variation, linear correlation coefficient, and average recovery were 0.24%, 0.9995, and 99.8%, respectively.

Key words: wilforine, HPLC

有关研究发现,雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)主要杀虫活性成分为雷公藤生物碱,该类生物碱对多种害虫有较强的拒食和毒杀作用,对小菜蛾、菜青虫及二化螟等鳞翅目害虫尤为明显,其中以雷公藤次碱的活性最为突出。目前对雷公藤次碱的分析方法还没有报道,本文采用高效液相色谱法建立了雷公藤次碱合理的分析方法,为该植物源农药的实验室研究及产业化生产中的质量控制提供了检测手段。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

仪器:岛津LC-2010HT高效液相色谱仪;检测器:SPD-Avp;数据处理:Class-vp工作站;色谱柱:分析柱VP-ODS 4.6mm × 150mm。

试剂:乙腈(分析纯);水(二次重蒸馏水);磷酸二氢钾(分析纯);雷公藤次碱标样(已知含量95.0%)。

1.2 色谱条件

流动相:乙腈+0.02mol/L磷酸二氢钾水溶液=50+50(v/v)溶液;流速:1.0ml/min;检测波长:195nm;柱温:25;进样量:10μl。

1.3 操作过程

1.3.1 流动相配制

配制0.02mol/L磷酸二氢钾水溶液后取500ml,用量筒量取乙腈500ml,于容器中混匀,用G5玻璃砂芯漏斗过滤,并经超声波浴槽脱气20min密封保存。

1.3.2 标准溶液配制

准确称取标准样0.01g(精确至0.0002g)置于100ml容量瓶中,用乙醇和丙酮(1:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,作为定量用的标样溶液(放在4°C的冰箱内保存)。

1.3.3 试样溶液配制

收稿日期:2004-07-30 修返日期:2004-10-19

基金项目:浙江省科技厅重大项目(021102533);浙江省青年人才专项基金(RC7018)。

作者简介:陈列忠(1975-),男,学士,现工作于浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所,从事植物源农药研究。电话:0571-86404077, E-mail:zwsc1z@hotmail.com

通讯作者:俞晓平 E-mail:luzx@public.hz.zj.cn

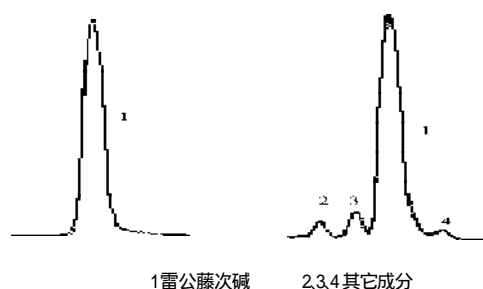


图1 雷公藤次碱的高效液相色谱图

准确称取雷公藤提取总生物碱样品 0.02g (精确至 0.0002g) 置于 100ml 容量瓶中,用乙醇和丙酮 (1:1) 稀释至刻度,摇匀,待测。

1.3.4 测定

在上述色谱条件下,待仪器稳定后,先注入数针标准品溶液,直到相邻两针相对峰面积响应值平行后,按标准品溶液、样品溶液、样品溶液、标准品溶液的进样顺序进行测定。色谱图见图 1。

1.3.5 计算

根据标准品和样品溶液中雷公藤次碱的峰面积,按下面公式,采用外标法计算雷公藤次碱的含量,计算公式如下: $X(\%) = \frac{A_{\text{样}} \times M_{\text{标}} \times P}{A_{\text{标}} \times M_{\text{样}}} \times 100$

式中: $A_{\text{样}}$ 为样品中雷公藤次碱的峰面积平均值
 $A_{\text{标}}$ 为标准品中雷公藤次碱的峰面积平均值
 $M_{\text{标}}$ 为标准品的质量
 $M_{\text{样}}$ 为样品的质量
 P 为标准品纯度

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的研究

雷公藤根皮提取物中含有多个生物碱,该类生物碱都为内酯类化合物,在结构上和性质上较为相似,采用一般的分析手段很难把其中的几种生物碱分开。经过大量试验,我们根据这些生物碱具有的碱性强弱不同,在流动相中加入了适宜浓度磷酸二氢钾,在 C18 反相柱上进行分离^[1],取得较好的效果。

2.2 线性关系试验

在同一色谱条件下,配制了 6 个不同浓度的标准品溶液,进行分析测定。试验结果表明,在给定的分析条件下,次碱浓度在 0.1~1mg/ml 范围内,有较好的线性关系,相关系数为 0.9995。

2.3 方法精确度

在上述条件下,测定同一样品连续进针 10 次,得到数据求出其标准偏差为 ± 2.2234 ,变异系数为 0.24%。

2.4 方法准确度

在样品中加入一定量的标准品进行回收率测定,测得回收率范围为 99.75%~100.04%。

3 结论

本方法中利用不同生物碱的碱性有所不同这个特点,通过在流动相加入磷酸二氢钾后,取得了良好的分离效果,方法简便、快速、线性关系和精确度较好,可以适合实验室及中试生产时雷公藤提取工艺中质量控制。

参考文献

- [1] 赵剑,朱蔚华,吴蕴祺,等. 反相高效液相色谱法测定长春花组织培养物中吲哚生物碱含量[J]. 药学学报, 1999, 15(7): 312-314

责任编辑:夏彩云

(上接第 166 页)

表 3 目标化合物的植调和杀菌活性(相对抑制率 %)

测试对象	浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1	2	3	4	5	6
小麦赤霉	50	0	0	0	0	0	40.0
番茄早疫	50	0	0	0	0	0	42.9
花生褐斑	50	44.4	0	0	0	0	52.8
苹果轮纹	50	30.8	0	0	30.8	12.3	38.5
芦笋茎枯	50	20.6	0	0	0	0	14.7
黄瓜子叶扩张	10	-3.3	0.7	2.3	1.1	-1.0	-0.7

2.3 目标化合物的生物活性

对上述 6 种化合物进行了植物生长调节和杀菌活性测试,见表 3。总的来说,此类衍生物虽然溶解性能较 NAE 有所改善,但其植调和杀菌活性并不理

想,尤其是当苯环上有氯取代时(化合物 3 和 4 无活性)。相对而言,当苯环上为两个甲基取代时(化合物 6),活性较好。

参考文献

- [1] 杨静玉,吴春福. 内源性生物活性物质脂肪酸研究进展[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1): 1-4
- [2] Chapman K D. Occurrence, metabolism, and prospective functions of N-acyl ethanolamines in plants [J]. Progress in Lipid Research, 2004, 43: 302-327
- [3] 李在国,汪清民,黄君珉编. 有机中间体制备[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 202

责任编辑:陈启辉