

# 高效液相色谱法测定蓝耳草中 $\beta$ -蜕皮激素含量 Determination of $\beta$ -Ecdysone in *Cyanotis vaga* (Lour.) Roem. et Schult by HPLC

徐 慧  
XU Hui

(广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)  
(Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

**摘要:**以甲醇为溶剂,用索式提取法提取蓝耳草 [*Cyanotis vaga* (Lour.) Roem. et Schult] 中 $\beta$ -蜕皮激素,用高效液相色谱法(HPLC)测定其含量。结果, $\beta$ -蜕皮激素在 0.4~8.0 $\mu$ g 范围内线性关系良好, $r^2=0.9992$ ,平均回收率为 99.31%,RSD 值均小于 3%。

**关键词:**高效液相色谱法  $\beta$ -蜕皮激素 蓝耳草 提取工艺

**中图分类号:** O657.72, R282.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2010)03-0239-03

**Abstract:** Using methanol as the solvent extraction rate, the  $\beta$ -Ecdysone in *Cyanotis vaga* (Lour.) Roem. et Schult is extracted by the soxhlet extraction method. The content of  $\beta$ -Ecdysone is determined by HPLC. A linear curve of  $\beta$ -Ecdysone was obtained in the range of 0.4~8.0 $\mu$ g with  $r^2$  equalling to 0.9992. The average recovery was 99.31% with RSD being less than 3%.

**Key words:** HPLC,  $\beta$ -Ecdysone, *Cyanotis vaga* (Lour.) Roem. et Schult, extraction process

蓝耳草 [*Cyanotis vaga* (Lour.) Roem. et Schult], 鸭趾草科植物, 多年生披散草本, 主要分布在广东、广西、云南等地。蓝耳草成分复杂, 活性成分较多,  $\beta$ -蜕皮激素为其活性成分之一。其主要作用是促进核酸和蛋白质的合成, 影响糖代谢和脂类代谢, 免疫调节机体。高剂量的蜕皮激素能扰乱昆虫体内的正常代谢过程, 可用于防治害虫; 另外蜕皮激素能提高蟹虾的产量, 已广泛用于养殖业。蜕皮激素又名蜕皮甾酮, 化学名 cholest-7-n-6-one, 2, 3, 14, 20, 22, 25-hex-ahydroxy-(2 $\beta$ , 3 $\beta$ , 22R)<sup>[1]</sup>。自然界存在着大量含蜕皮激素的植物, 尚待人们对其进行开发利用。关于含蜕皮激素的报道不断涌现, 陈莉莉等<sup>[2]</sup>从漏芦中提取蜕皮甾酮, 朱向东等<sup>[3]</sup>从露水草中提取纯化 $\beta$ -蜕皮激素, 谭梅等<sup>[4]</sup>研究露水草提取物质量标准。本文用高效液相色谱法(HPLC)测定蓝耳草中 $\beta$ -蜕皮激素的含量。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂和样品

电子天平, 索式提取器, 粉碎机, 旋转蒸发器, 数显恒温水浴锅, 超声波清洗器, 高效液相色谱系统 (Waters ALLIANCE 2695) 配二极管阵列检测器 (Waters 2996)。

$\beta$ -蜕皮激素标准品 (Sigma 公司出品); 甲醇 (分析纯, 色谱纯), 无水乙醇 (分析纯), 超纯水; 蓝耳草样品。

### 1.2 提取方案

#### 1.2.1 不同溶剂提取

将蓝耳草药材于 60 $^{\circ}$ C 干燥 4h, 粉碎后过 40 目筛。称取蓝耳草粉末 2 份, 每份 1g, 加入甲醇、乙醇溶剂各 100ml, 超声提取 40min, 提取液待用。

#### 1.2.2 不同提取方法提取

称取干燥后的蓝耳草粉末 1g, 加入 100ml 甲醇, 分别采用超声提取 (40min)、振荡提取 (40min) 和索式提取器加热回流至回流液无色, 3 种方法各自所得提取液待用。

### 1.2.3 不同提取时间提取

称取5份干燥后的蓝耳草粉末,每份1g,加入100ml甲醇,用索式提取器回流30min、1h、2h、4h、8h、10h,提取液待用。

将上述方案中所得提取液进行抽滤后经旋转蒸发仪减压浓缩至干,残渣用甲醇溶解并定容至10ml。经0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤上机测定。

### 1.3 标准溶液配制

精密称取0.0200g  $\beta$ -蜕皮激素标准品,加入甲醇制成每1ml含 $\beta$ -蜕皮激素0.80mg的标准储备液。使用时用甲醇稀释成不同浓度的标准工作液。

### 1.4 色谱条件

GRACE ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(250mm  $\times$  4.6mm i.d.);柱温:26 $^{\circ}$ C;流动相:甲醇:水=40:60(V/V, %);流速:1.0ml/min;检测波长:248nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取方案的确定

以甲醇和乙醇为溶剂提取得到 $\beta$ -蜕皮激素的含量分别为0.031%,0.035%,用甲醇提取量比用乙醇的高。用振荡提取法、超声提取法、索式提取法提取得到 $\beta$ -蜕皮激素的含量分别为0.029%,0.034%,0.041%,索式提取法提取 $\beta$ -蜕皮激素最完全。在提取时间分别为0.5h、1h、2h、3h、4h、8h、10h时,用索式提取法提取得到 $\beta$ -蜕皮激素的含量分别为0.021%,0.025%,0.035%,0.041%,0.041%,0.041%,样品回流提取到4h后含量基本稳定, $\beta$ -蜕皮激素提取比较完全。因此,最佳提取方案是以甲醇为溶剂,用索式提取法提取4h。

### 2.2 检测波长的选择

在200~400nm波长范围用紫外吸收光谱检测其最大吸收波长,吸收曲线如图1和图2所示。结果表明,两种流出物的紫外吸收光谱具有良好的一致性,蜕皮激素对照品在248nm处有最大吸收波长。

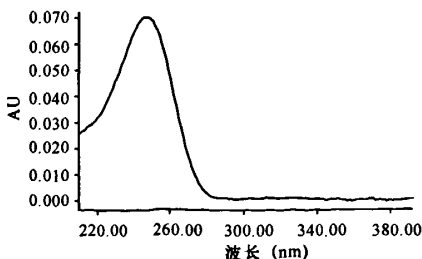


图1 标准品吸收曲线

### 2.3 流动相的选择

用不同比例的甲醇-水作为流动相进行分离,发

现随着流动相中甲醇用量的不断减少,从70至30(V/V, %)变化, $\beta$ -蜕皮激素的保留时间不断增加,相应的容量因子由0.46增加到7.4。实验选择的流动相为甲醇:水=40:60(V/V, %),此时 $\beta$ -蜕皮激素的保留时间为13.78,峰形良好(如图3)。

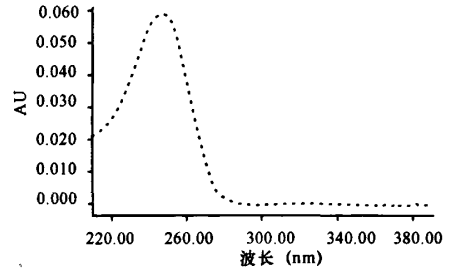


图2 样品吸收曲线

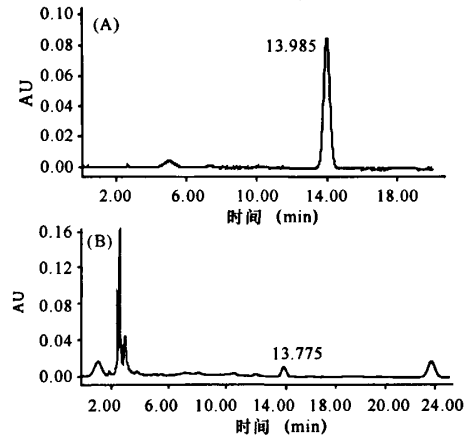


图3  $\beta$ -蜕皮激素标准品(A)与样品(B)的HPLC色谱

### 2.4 线性关系

精密吸取配制的 $\beta$ -蜕皮激素标准储备液0.5ml、1.0ml、2.0ml、5.0ml、10.0ml至10ml容量瓶中,甲醇稀释定容至刻度。得浓度分别为0.04mg/ml、0.08mg/ml、0.16mg/ml、0.40mg/ml、0.80mg/ml的系列标准工作液,在高效液相色谱系统上依次进样10 $\mu$ l,以 $\beta$ -蜕皮激素峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,计算出线性方程为 $y = 1002.7x + 250.22$ , $r^2 = 0.9992$ 。结果表明, $\beta$ -蜕皮激素在0.4~8.0 $\mu$ g范围内与其峰面积积分值呈现出良好线性关系。

### 2.5 精密度

平行称取100405号样品共5份,经60 $^{\circ}$ C干燥后碎成细粉,过40目筛,平行称样后按2.1中最佳方案提取、抽滤、减压蒸馏,浓缩至干,甲醇定容10ml,0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤,按1.4中色谱条件,各进样10 $\mu$ l,分别测量峰面积积分值,计算得出蓝耳

草中β-蜕皮激素的含量分别为0.0369%, 0.0401%, 0.0395%, 0.0410%, 0.0395%, RSD为1.61%。

### 2.6 加标回收率

取已知含量的样品粉末,加入适量β-蜕皮激素标准溶液,按索氏提取法进行操作,再按1.4中色谱条件测定β-蜕皮激素含量并计算得到平均回收率为99.31%。

### 2.7 重现性

精密吸取0.80mg/ml标准溶液10μl,按1.4中色谱条件,重复进样5次,计算得出RSD=2.0%。

### 2.8 样品测定

将100401、100402、100403、100404、100405、100406、100407、100408这8个不同批次的蓝耳草粉末按精密度试验方法,结合标准曲线分别计算蓝耳草中β-蜕皮激素的含量,结果(表1)比较理想。

表1 样品的测定结果

样品批号	含量(%)	样品批号	含量(%)
100401	0.039	100405	0.036
100402	0.040	100406	0.041
100403	0.040	100407	0.038
100404	0.039	100408	0.041

(上接第238页)

酯提取率较乙醇高,甲醇与乙酸乙酯提取率相当。与甲醇相比,乙酸乙酯低毒、沸点低易回收,提取液色素含量低,色谱杂质峰少,故本实验采用乙酸乙酯为提取试剂。通过对提取方式(加热回流、超声、振摇)、提取时间、提取温度、料液比、提取次数分别做单因素实验,确定出实验方案为:每次用乙酸乙酯50ml在40℃恒温下振摇提取30min,分别提取3次。特别的是白藜芦醇对光不稳定,其反式异构体见光后发生异构化而形成顺式,因此所有操作应严格避光。

### 3.3 色谱条件的选择

本次试验通过对色谱条件的多次筛选,确定选用SymmetryshiledTMRP18(4.6mm×250mm,5μm)作为色谱柱,选用乙腈-0.2%醋酸溶液(25:75)作为流动相。优于其他的溶液系统磷酸盐-乙腈,乙腈-水等,达到更好的分离效果,而且能够明显改善色谱峰脱尾现象。

#### 参考文献:

[1] 余慧琳.白藜芦醇的生理功能及其应用前景[J].生物

## 3 结束语

本文采用振荡提取法和超声提取法提取β-蜕皮激素。该方法操作简单,提取时间短,但激素提取不是很完全。由于蓝耳草成分较复杂,我们选用中等浓度有机相(如40%甲醇水溶液)作流动相得到了较好的分离效果,以甲醇为溶剂,索式提取法提取蓝耳草中β-蜕皮激素,用高效液相色谱法测定其含量,所得线性关系、回收率、精密度、重现性都比较满意,对样品含量的测定,也取得了较好的结果。该结果为蓝耳草的进一步开发利用提供了依据。

#### 参考文献:

- [1] 肖崇厚.中药化学[M].上海:上海科学技术出版社,1997.
- [2] 陈莉莉,吴红权,李颖,等.漏芦中蜕皮甾酮提取方法研究[J].中药材,2002,25(3):195-196.
- [3] 朱向东,安银岭.从露水草中提取纯化β-蜕皮激素工艺研究[J].西南林学院学报,2003,23(2):23-25.
- [4] 谭梅,李良,杨建鸣,等.露水草提取物质量标准的研究[J].中国兽药杂志,2009,43(8):23-80.

(责任编辑:尹 闯)

学通报,2005,40(11):12-13.

- [2] 薛洁.山葡萄酒中白藜芦醇含量的测定[J].酿酒科技,2004(5):103-104.
- [3] 王劲松.葡萄与葡萄酒中白藜芦醇的含量及其影响因素[J].宁夏农林科技,2003(6):81-83.
- [4] 王劲松.葡萄和葡萄酒中白藜芦醇的测定方法[J].宁夏农林科技,2003(5):37-38.
- [5] 孟宪军,杜彬.野生山葡萄皮籽中白藜芦醇的含量测定[J].食品科学,2006(2):96-99.
- [6] 高年法,姜丽,张健,等.HPLC法测定葡萄酒中白藜芦醇的基础性研究[J].酿酒,2005,32(1):75-76.
- [7] 向阳,张彤,张焯,等.高效液相色谱法测定葡萄皮和葡萄籽中白藜芦醇的含量[J].卫生研究,2003,32(5):490-492.
- [8] 王永亮.白藜芦醇的检测作为及技术监督的优选进出口葡萄酒卫生质量指标的可行性和意义[J].微量元素与健康研究,2002,19(1):41-57.
- [9] 张影陆,于贞,赵光葵.葡萄与葡萄酒中的白藜芦醇[J].中外葡萄与葡萄酒,2002(2):53-54.
- [10] 李华,张予林,袁春龙,等.葡萄与葡萄酒中白藜芦醇分析方法的研现状[J].中国食品学报,2005,5(1):104-107.

(责任编辑:邓大玉)