

高效液相色谱法测定藜芦制剂中白藜芦醇、 藜芦托素、藜芦胺含量

杨艳琼, 杨艳芹*

(成都新朝阳作物科学股份有限公司, 成都 611630)

摘要: **目的** 采用高效液相色谱法建立一种同时测定藜芦制剂中白藜芦醇、藜芦托素、藜芦胺含量的分析方法。**方法** 采用高效液相色谱仪, InertSustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈/0.1 mol/L 乙酸铵水溶液为流动相梯度洗脱, 在波长 225 nm 下, 对制剂中白藜芦醇、藜芦托素、藜芦胺有效成分进行分离和定量分析。**结果** 白藜芦醇、藜芦托素、藜芦胺线性相关系数分别为 0.9998、0.9992 和 0.9984, 标准偏差分别为 0.00026%、0.00238%和 0.00202%, 平均回收率分别为 100.16%、102.74%和 99.55%。**结论** 建立的方法线性关系良好、精密度好、准确度高, 可用于藜芦制剂的检测。

关键词: 白藜芦醇; 藜芦托素; 藜芦胺; 高效液相色谱法

0 引言

藜芦碱属于一种天然杀虫成分, 广泛存在于藜芦属植物茎和根等部位中。该成分来源天然、残留低、对环境友好, 广泛应用于蚜虫、菜青虫、蓟马等软体害虫和部分咀嚼式口器害虫的灭杀^[1]。作为神经毒剂类杀虫剂, 藜芦碱具备触杀、胃毒及拒食多重作用。其核心机制是有效成分特异性作用于害虫神经元的钠离子通道, 通过抑制通道关闭, 导致神经持续过度兴奋与重复放电, 最终引起害虫运动失调、肌肉瘫痪而死亡^[2]。其作用机制独特, 且藜芦制剂的主要有效成分白藜芦醇、藜芦托素和藜芦胺, 3 种物质具有协同作用, 共同表现出较好的杀虫效果, 且与化学农药复配能降低害虫抗药性, 能相互提高药效^[3-4]。白藜芦醇、藜芦胺单独成分和藜芦胺与藜芦托素的混合成分^[5]都有相应的高效液相色谱方法, 但同时分析 3 种有效成分的分析方法鲜少报道, 本研究通过高效液相色谱法建立一种同时测定藜芦制剂中 3 种有效成分的定量分析方法, 以期为企业生产过程质量控制提供参考方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇(分析纯, 重庆川东化工集团有限公司); 甲醇、

乙腈(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 乙酸铵(分析纯, 成都市科隆化学品有限公司); 氨水(分析纯, 四川奥瑞特化学试剂有限公司); 白藜芦醇标准品(纯度 98.37%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); 藜芦托素标准品(纯度 98.6%, 上海源叶生物科技有限公司); 藜芦胺标准品(纯度 98.2%, 美国 CATO Research Chemicals Inc 公司)。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪(波长 225 nm, 美国安捷伦科技有限公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器(40 KHZ, 中国昆山市超声仪器有限公司); SQP 十万分之一电子天平(最小称量 1 mg, 德国赛多利斯科学仪器有限公司); InertSustain C₁₈ 色谱柱[250 mm×4.6 mm, 5 μm, 技尔(上海)贸易有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 溶液配制

中间液 A: 准确称取约 15 mg 白藜芦醇标准品(精确至 0.00002 g), 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加入适量色谱甲醇超声溶解, 放至室温后, 用色谱甲醇稀释至标线, 混匀。

中间液 B: 准确称取约 10 mg 藜芦托素标准品(精确至 0.00002 g), 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 加入适量色谱甲醇超声溶解, 放至室温后, 用色谱甲醇稀释至标线, 混匀。

中间液 C: 准确称取约 10 mg 藜芦胺标准品(精确至

0.00002 g), 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 加入适量色谱甲醇超声溶解, 放至室温后, 用色谱甲醇稀释至标线, 混匀。

精密移取 1.00 mL 中间液 A、2.50 mL 中间液 B 与 5.00 mL 中间液 C, 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 以色谱甲醇定容至刻度, 充分摇匀, 即获得同时含 3 种有效成分的混合标准工作液, 记为溶液 D, 供后续色谱分析使用^[6]。

1.3.2 样品预处理

称取约 1.0 g 试样(精确至 0.00002 g), 置于 25 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为样品测试液。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: 采用 InertSustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行分离; 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 波长 225 nm, 进样量 10 μL; 流动相: 以乙腈/0.1 mol/L 乙酸铵水溶液(氨水调 pH 至 8.5)(27:73, V:V)为初始比例, 梯度洗脱^[7]。流动相运行时间及比例见表 1, 设置后运行时间 2 min。溶液 A 为 0.1 mol/L 乙酸铵水溶液(氨水调 pH 至 8.5)。

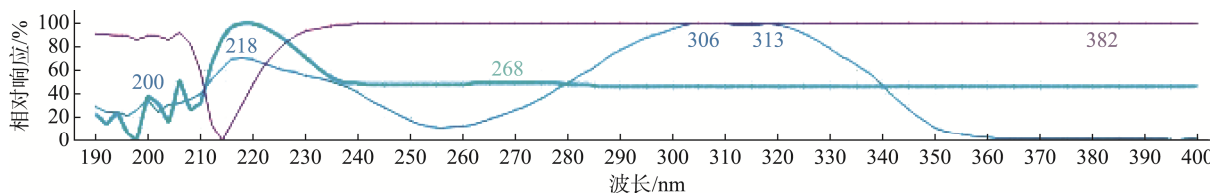
表 1 流动相运行时间及比例

时间/min	乙腈/%	溶液 A/%
0.0	27	73
21.0	27	73
21.5	37	63
40.0	37	63
40.5	85	15
46.0	85	15
46.5	27	73
49.0	27	73

以上色谱条件为典型参数示例。在实际操作中, 可能需根据具体仪器配置对条件进行适当优化, 以获得最佳分离效果。

1.3.4 检测方法

在 1.3.3 节确定的色谱条件下运行仪器, 待检测器基线平稳后, 首先连续注入混合标准工作液 D 多次, 直至相邻两针进样中各有效成分的色谱峰面积变化率低于 1.5%, 表明系统已达到稳定状态。正式测定按以下序列执行: 标准溶液→试样溶液→试样溶液→标准溶液。



注: 1. 蓝色吸收线, 白藜芦醇; 2. 蓝绿色吸收线, 藜芦托素; 3. 紫色吸收线, 藜芦胺。

图 1 白藜芦醇与藜芦托素、藜芦胺紫外吸收光谱图

1.3.5 含量计算方法

分别计算两针试样溶液与前后两针标准溶液中各目标组分色谱峰面积的平均值, 试样中白藜芦醇(藜芦托素、藜芦胺)的质量分数按照公式(1)计算:

$$\omega = \frac{A_2 \times m_1 \times p}{A_1 \times m_2 \times n} \quad (1)$$

式中: ω 为试样中白藜芦醇(藜芦托素、藜芦胺)的质量分数, %; A_2 为试样溶液中白藜芦醇(藜芦托素、藜芦胺)峰面积的平均值; A_1 为标准溶液中白藜芦醇(藜芦托素、藜芦胺)峰面积的平均值; m_1 为白藜芦醇(藜芦托素、藜芦胺)标样的质量, g; m_2 为试样的质量, g; p 为白藜芦醇(藜芦托素、藜芦胺)标准品的质量分数, %; n 为稀释倍数, 其中白藜芦醇计算时 $n=50$, 藜芦托素计算时 $n=10$, 藜芦胺计算时 $n=5$ 。

1.4 数据处理

样品进行 5 次平行测定, 采用外标法对有效成分进行定量计算, 计算公式按 1.3.5 中公式进行。采用 Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱系统, 配套 OpenLab CDS Data Analysis 2.4 色谱工作站完成数据采集、谱图处理与报告输出。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

采用高效液相色谱-二极管阵列检测器对白藜芦醇、藜芦托素、藜芦胺标准品在 190~400 nm 进行紫外扫描。结果如图 1 所示, 白藜芦醇、藜芦托素与藜芦胺 3 个有效成分在 223~226 nm 附近均表现出较强的紫外吸收。选择 3 个都具有较大吸收的 225 nm 作为检测波长, 主要基于以下考虑: 该波长位于紫外区中段, 能够兼顾不同结构类型成分的吸收特性, 尤其是对于含有苯环及其共轭体系的化合物—如白藜芦醇和藜芦胺类成分在 220~230 nm 区间通常具有较高的摩尔吸光系数和稳定的吸收响应。此外, 从图谱的整体吸收背景来看, 225 nm 处基线较为平稳, 干扰较小, 有助于提高检测的灵敏度和信噪比。此外, 全波长扫描图谱显示, 该波长下各色谱峰的形貌对称、分离良好, 无明显的共吸收或干扰现象^[8]。225 nm 不仅能够兼顾不同结构类型成分的检测灵敏度, 还能在复杂体系中保持优良的色谱行为, 因此被确定为本次分析的最佳检测波长, 为后续定量与定性研究提供了可靠依据。

2.2 流动相的选择

在白藜芦醇、藜芦托素和藜芦胺检测中, 需用同一分析方法对这 3 种成分同时进行分析。

采用流动相为乙腈/0.1mol/L 乙酸铵(pH 7.0) (27:73, V:V)时, 观察到的出峰顺序分别为(藜芦托素→白藜芦醇→藜芦胺), 藜芦托素含量低, 出峰较快, 受到制剂空白其他组分的干扰, 色谱峰分离度小于 1.5, 测定结果显著偏高且重现性差, 其可能与基质中的其他成分存在共流出现象^[9]。

采用流动相为甲醇/氨水溶液(取 0.6 mL 置于 1000 mL 水中, pH 调节为 10.3) (45:55, V:V)时, 观察到与上不同的出峰顺序(白藜芦醇→藜芦托素→藜芦胺), 这时白藜芦醇出峰较快, 也受到制剂空白杂质峰的干扰, 测定结果显著偏高且重现性差, 其可能与基质中的其他成分存在共流出现象。

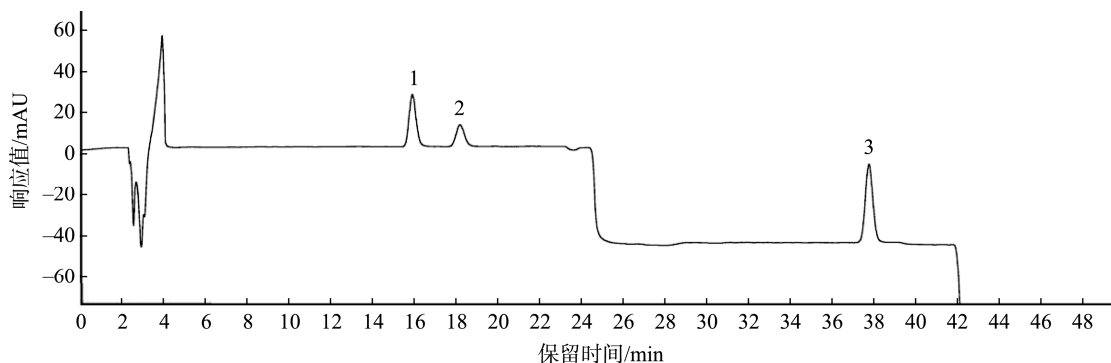
白藜芦醇和藜芦托素含酚羟基成分呈酸性, 藜芦胺含氮成分呈碱性, 在单一体系中难以同时兼顾获得良好的峰形与分离选择性。

基于上述问题, 研究将两种方法的优势进行整合的策略, 引入 pH 调控的缓冲盐系统以改善峰形并调节选择性。最终确定的优化流动相为: 乙腈/0.1 mol/L 乙酸铵水溶液(氨水调 pH 至 8.5) (27:73, V:V)。经实验证明, 该流动相

使得各组分与反相色谱固定相之间的相互作用发生显著变化, 在梯度的洗脱中, 调节了 3 种成分的相对保留时间, 使其在色谱图上的位置得以合理分布。不仅使白藜芦醇和藜芦托素与基质中的其他干扰组分得到有效分离, 还有效抑制了碱性化合物常见的峰拖尾现象, 确保了检测的特异性与准确性。典型的白藜芦醇、藜芦托素和藜芦胺高效液相色谱图见图 2、3。

2.3 线性关系验证

分别配制 5 个不同质量浓度的白藜芦醇、藜芦托素、藜芦胺混合标准溶液, 其白藜芦醇质量浓度分别为 0.00631、0.01010、0.01262、0.01515、0.01893 mg/mL, 藜芦托素质量浓度分别为 0.01597、0.03193、0.03991、0.04790、0.06386 mg/mL, 藜芦胺质量浓度分别为 0.04065、0.06505、0.08131、0.09757、0.12196 mg/mL。按标准操作条件分别测定, 以标准品质量浓度为横坐标(X , mg/mL), 峰面积为纵坐标(Y)作图, 得白藜芦醇线性方程 $Y=52559.3575X+2.9917$, 线性相关系数 $r^2=0.9998$; 得藜芦托素线性方程 $Y=8085.0283X-0.9000$, 线性相关系数 $r^2=0.9992$; 得藜芦胺线性方程 $Y=11429.4940X+32.5524$, 线性相关系数 $r^2=0.9984$ 。相关系数均满足大于 0.99 的要求。



注: 1. 白藜芦醇, 保留时间 16.0min; 2. 藜芦托素, 保留时间 18.3min; 3. 藜芦胺, 保留时间 37.9min; 图 3 同。

图 2 标样高效液相色谱图

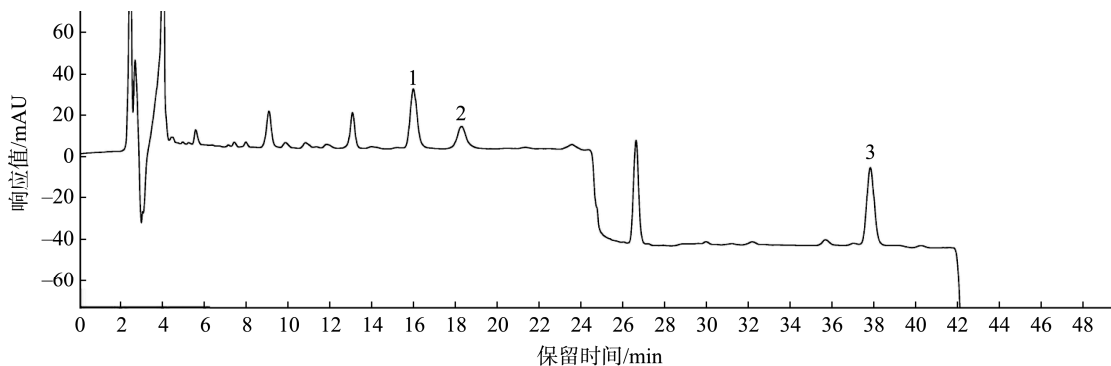


图 3 试样高效液相色谱图

2.4 精密度验证

对藜芦制剂进行 5 次平行测定, 计算白藜芦醇、藜芦托素、藜芦胺含量, 并进行标准偏差及变异系数的统计运算。同时运用修改的 Horwits 公式作为精密度是否合格的判定依据^[10], 结果如表 2 所示。可知, 本分析方法的变异系数小于 Horwits 公式计算值, 精密度合格, 能对藜芦制剂中的白藜芦醇、藜芦托素和藜芦胺的含量进行精确地分析。

2.5 准确度的验证

为评估本方法的系统误差, 本研究通过加标回收实验对方法准确度进行了验证。准确称取 5 份制剂空白各 1.0 g 左右, 在制剂空白中添加已知浓度的标品混合溶液 1.0 mL, 按照系统方法, 测定该白藜芦醇、藜芦托素、藜芦胺的回收率。如表 3 所示, 白藜芦醇平均回收率为 100.16%; 藜芦托素平均回收率为 102.74%; 藜芦胺平均回收率为 99.55%。该结果表明本方法测定白藜芦醇、藜芦托素、藜芦胺质量分数的准确度较高。

表 2 精密度实验数据

有效成分	质量分数/%						标准偏差/%	变异系数/%	Horwitz 公式 RSD/%
	1	2	3	4	5	平均值			
白藜芦醇	0.0305	0.0301	0.0306	0.0304	0.0300	0.0303	0.00026	0.86	4.54
藜芦托素	0.1001	0.1056	0.0997	0.1012	0.1026	0.1018	0.00238	2.34	3.78
藜芦胺	0.1992	0.1962	0.1997	0.2014	0.2008	0.1995	0.00202	1.01	3.42

注: 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

表 3 准确度实验数据

有效成分	序号	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%
白藜芦醇	1	0.3171	0.3145	99.18	100.16
	2	0.3171	0.3169	99.94	
	3	0.3171	0.3184	100.41	
	4	0.3171	0.3176	100.16	
	5	0.3171	0.3206	101.10	
藜芦托素	1	0.9988	1.0351	103.63	102.74
	2	0.9988	1.0247	102.59	
	3	0.9988	1.0157	101.69	
	4	0.9988	1.0258	102.70	
	5	0.9988	1.0298	103.10	
藜芦胺	1	2.0339	2.0124	98.94	99.55
	2	2.0339	2.0269	99.66	
	3	2.0339	2.0314	99.88	
	4	2.0339	2.0186	99.25	
	5	2.0339	2.0344	100.02	

3 结论

本研究建立的高效液相色谱法, 实现了白藜芦醇、藜芦托素和藜芦胺 3 种活性成分的有效分离与精准测定。该方法线性关系良好、精密度好、准确度高, 符合定量分析

要求。同时该流动相体系能有效抑制基质效应, 不受助溶剂等辅料成分的干扰, 具有专属性强、灵敏度高、重复性好的特点。与传统检测方法相比, 本研究建立的方法在分离度上有显著提升, 且仪器系统的稳定性与耐用性更适配工业化大样本检测需求。该技术不仅适用于单一成分制剂

的常规质量控制,亦可拓展应用于复杂植物提取物或复方制剂中多成分的同时定量分析。基于本研究的成果,后续可以进一步考察其他基质类型,验证方法在不同配方、不同浓度样品中的适用性,还可结合质谱技术进行定性定量的确证,提升方法的权威性。

参考文献

- [1] 于洪玉,郑婷婷,李红,等. 植物源杀虫生物碱的结构改造及作用机制研究进展[J]. 农药学报, 2025, 27(5): 781-798.
- [2] 张静怡,刘可心,赵士文,等. 枸杞木虱对 10 种田间常见杀虫剂抗性的快速检测方法[J/OL]. 中国现代中药, 1-14. [2025-12-25]. <https://doi.org/10.13313/j.issn.1673-4890.20250411002>
- [3] 张立娇,徐靖,李贵芳,等. 藜芦根茎提取物与化学农药混施防治麦蚜效果初探[J]. 中国植保导刊, 2023, 43(11): 86-88, 69.
- [4] 张顺昌,徐继根,胡丽鹏,等. 0.1%藜芦根茎提取物复配矿物油防治柑橘全爪螨的研究[J]. 浙江柑橘, 2022, 39(1): 30-33.
- [5] 邹亮,陈淑娟,王丽烂,等. 双波长高效液相色谱法同步测定苦参和藜芦提取物中五种生物碱的含量[J]. 实验室检测, 2025, 3(13): 124-126.
- [6] 曹宁,闫新焕,刘雪梅,等. 高效液相色谱法测定金银花中绿原酸及木犀草苷含量[J]. 中国果菜, 2024, 44(7): 17-21, 28.
- [7] 岳凤芹,陈思迪,陈树和,等. 山豆根及其不同炮制品毒性比较[J/OL]. 医药导报, 1-21. [2025-12-25]. <https://link.cnki.net/urlid/42.1293.R.20250722.1649.024>
- [8] 杜玉玲,王芳,文琴,等. 12%调环酸钙·S-诱抗素悬浮剂高效液相色谱分析[J]. 农药, 2024, 63(12): 894-896.
- [9] 潘晖,吴丹丹,王世双,等. 固相萃取结合液相色谱法测定蔬菜中杀虫剂及残留物的四种方法评估[J]. 中南农业科技, 2024, 45(1): 31-35.
- [10] 许艳秋,左凤,杨旒,等. 0.4%糠氨基嘌呤水剂的液相色谱分析方法研究[J]. 世界农药, 2024, 46(9): 57-60.