

鼓槌石斛中抗癌成分毛兰素的含量测定研究

夏克中,王增,陈立钻(浙江天皇药业有限公司,杭州 310012)

摘要:目的 建立测定鼓槌石斛药材中毛兰素含量的高效液相色谱法。方法 采用 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-乙腈-水(30:30:40);流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 232 nm;柱温为 25 ℃。结果 毛兰素在 0.093 5 ~ 5.984 μg内呈良好的线性关系($r=1.000 0$);平均回收率为 100.4%, RSD = 1.14% ($n=9$)。结论 此法准确、

作者简介:夏克中,男,助理工程师

Tel: (0571) 88858168 - 218

E-mail: dhxl020@sohu.com

重复性好,可作为鼓槌石斛药材的质控方法。

关键词:鼓槌石斛;毛兰素;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R931.6;R979.1

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2008)01-0063-04

Study on the Determination of Antitumor Component Erianin in *Dendrobium chrysotoxum*

XIA Ke-zhong, WANG Zeng, CHEN Li-zuan (Zhejiang Tianhuang Medicinal Plant Pharmaceutical Co., Ltd, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for the determination of erianin in *Dendrobium chrysotoxum* Lindl.

METHODS The column was a Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); The mobile phase was methanol-acetonitrile-water (30:30:40), at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹; The detection wavelength was 232 nm; The column temperature was maintained at 25 °C. **RESULTS** The linear range of erianin was between 0.093 5 ~ 5.984 μg (r=1.000 0), and the average recovery was 100.4%, with RSD=1.14% (n=9). **CONCLUSION** The method is accurate with good reproducibility and can be utilized for the quality control of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl.

KEY WORDS: *Dendrobium chrysotoxum* Lindl; erianin; HPLC; content determination

鼓槌石斛 *Dendrobium chrysotoxum* Lindl, 商品称为大黄科^[1], 小瓜黄科^[2]作为石斛入药。马国祥等^[3]从鼓槌石斛中分离得到 5 个化合物, 而其中毛兰素 (erianin) 含量最高为 0.215%, 同时马国祥等^[4]又发现对小鼠肝癌以毛兰素的作用最强, 其抑瘤率为 62.25%。王源园等^[5]对鼓槌石斛指纹图谱进行了研究, 但对鼓槌石斛中的抗癌有效成分毛兰素的含量测定未见报道。笔者利用 HPLC 测定了鼓槌石斛中毛兰素的含量并进行了方法学研究。研究表明, 本方法准确、重复性好, 可作为鼓槌石斛药材的质控方法。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 系列 HPLC (G1322A 在线真空脱气机, G1311A 四元梯度泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315B DAD 检测器), USB-702B 超声波清洗器; 甲醇 (色谱纯, 分析纯), 乙腈 (色谱纯), 水 (亚沸重蒸), 毛兰素对照品自制 (纯度: 98.81%)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液

取毛兰素对照品适量, 加甲醇制成浓度为每 1 mL 含 0.075 mg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2 供试品溶液

取鼓槌石斛药材粉末 (过 3 号筛) 约 2 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入分析纯甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定重量, 超声处理 (功率: 300 W, 频率 50 kHz) 15 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用分析纯甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液即得。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-水 (30:30:40); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 232 nm; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μL。在上述条件下, 毛兰素色谱峰与相邻峰的分度大于 1.5, 理论塔板数以毛兰素色谱峰计不低于 3 000。见图 1。

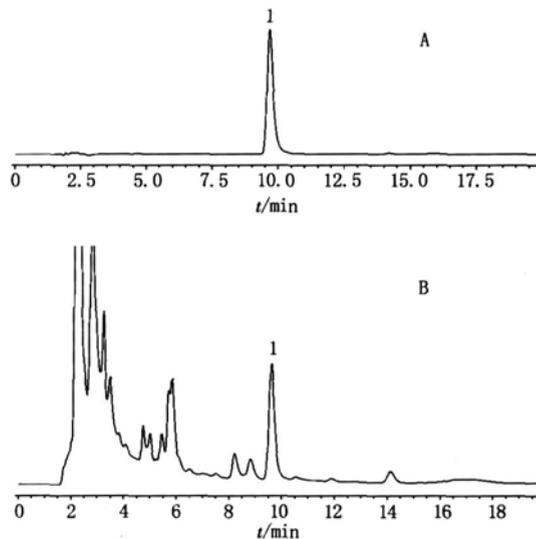


图 1 HPLC 色谱图

A - 对照品; B - 鼓槌石斛样品 (批号 0703); 1 - 毛兰素

Fig 1 HPLC chromatogram s

A - reference substance; B - *Dendrobium chrysotoxum* Lindl sample (0703); 1 - erianin

2.4 测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 按外标法计算。

2.5 线性关系的考察

精密称定毛兰素对照品 15.14 mg, 加甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀, 精密吸取 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀; 同法依次稀释 5 次。分别取以上 7 份溶液各 10 μL 注入液相色谱仪中, 测定, 记录峰面积值, 以峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 X (μg · μL⁻¹) 为横坐标, 进行线性回归, 结果表明毛兰素在 0.093 5 ~ 5.984 μg 内呈良好的线性关系, 回归方程为 Y = 25 890 X - 19, r = 1.000 0。定量限为

0.004 675 μg .

2.6 仪器精密度试验

精密吸取对照品溶液,重复进样 6 次,每次 10 μL ,以毛兰素峰面积计,RSD为 0.15%。见表 1。

表 1 精密度测定结果

Tab 1 Results of precision tests

进样次数	峰面积	平均峰面积	RSD/%
1	1 864.8		
2	1 869.5		
3	1 871.1		
4	1 871.8	1 870.2	0.15
5	1 872.0		
6	1 872.1		

2.7 重复性试验

精密称取 6 份样品,按“2.2”项下方法制成供试品溶液,进样测定,进样量为 10 μL 。结果毛兰素平均含量为表 3 日内、日间稳定性测定结果

Tab 3 Results of intra-day and inter-day stability tests

稳定性	峰面积					平均	RSD/%
	1	2	3	4	5		
日内	1 533.2	1 537.1	1 542.5	1 540.5	1 546.8	1 540.0	0.34
日间	1 533.2	1 516.9	1 529.5	1 520.3	1 530.4	1 526.1	0.46

2.9 加样回收率试验

取同一批已测含量(1.616%)的样品 9 份,每份 1 g,精密称定,3 份为一组,分别精密加入另配制的毛兰素对照品溶液(浓度为 0.627 25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2, 2.5, 3 mL,按“2.2”项下方法制成低、中、高 3 个浓度的溶液,按上述色谱条件测定,计算回收率。平均回收率为 100.4% ($n=9$),RSD 为 1.14%。见表 4。

表 4 加样回收率试验测定结果

Tab 4 Results of recovery tests

样品	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	1.549 8	1.254 5	2.787 0	98.6		
2	1.553 0	1.254 5	2.797 2	99.2		
3	1.559 8	1.254 5	2.807 0	99.4		
4	1.565 6	1.568 1	3.160 1	101.7		
5	1.561 7	1.568 1	3.144 6	100.9	100.4	1.14
6	1.548 1	1.568 1	3.115 4	99.9		
7	1.591 4	1.881 7	3.508 2	101.9		
8	1.550 7	1.881 7	3.452 1	101.0		
9	1.560 3	1.881 7	3.453 5	100.6		

2.10 样品测定

按照供试品溶液的制备方法和测定方法,对多批的鼓槌石斛药材样品进行了测定,结果见表 5。

1.616%,RSD为 0.47% ($n=6$)。见表 2。

表 2 重复性试验的测定结果

Tab 2 Results of reproducibility tests

样品	称样量 /g	药材含量 (以干燥品计 %)	平均含量	RSD/%
1	2.015 0	1.619		
2	2.004 6	1.605		
3	2.013 1	1.620		
4	1.990 8	1.608	1.616	0.47
5	1.988 3	1.625		
6	2.009 8	1.616		

2.8 稳定性试验

取同一份供试品,分别在 0, 1, 2, 3, 4 h 测定日内稳定性,并连续 5 d 测定日间稳定性,其日内平均峰面积为 1 540.0, RSD 为 0.34%;日间平均峰面积为 1 526.1, RSD 为 0.46%。见表 3。

表 5 样品测定结果 ($n=2$)

Tab 5 Results of sample determination ($n=2$)

样品批次	产地	含量(以干燥品计 %)
0701 批	云南景洪	1.65
0702 批	云南景洪	1.68
0703 批	云南景洪	1.62
0705 批	云南景洪	1.64

3 讨论

3.1 测定波长的选择

毛兰素对照品的甲醇溶液,经 DAD 检测器从 200 ~ 600 nm 紫外吸收扫描,其最大吸收波长为 207 nm 和 279 nm。207 nm 处靠近末端吸收,279 nm 处吸收值偏小。故选择 220 nm 和 279 nm 之间, ± 2 nm 间响应值差异相对较小的 232 nm 为检测波长,并用对照品外标法测定。

3.2 流动相的选择

采用了乙腈-水(50:50)、甲醇-乙腈-水(30:30:40)作为流动相进行洗脱,二者色谱峰都有较好的分离度,但是在前者中,毛兰素峰的理论塔板数不高,且毛兰素峰的拖尾因子偏大,而在后者中毛兰素峰的峰形较好,有较高的理论塔板数,所以选择后者作为流动相。

3.3 超声时间的选择

各取鼓槌石斛药材粉末(过 3 号筛)约 2 g,精密称定,各置 100 mL 锥形瓶中,精密加入分析纯甲醇 50 mL,密塞,摇匀,称定重量,超声处理(功率:300 W,频率:50 kHz),分别于

5, 10, 15, 20, 30 min各取两份,放冷,再称定重量,用分析纯甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液注入色谱仪,记录峰面积。结果在 5 min时,含量相对较低,10, 15, 20, 30无较大区别,为保证药材中毛兰素尽可能的提取出来,同时也考虑经济性,所以选择 15 min为样品的超声处理时间。

REFERENCES

- [1] LI M F, XU G J, XU L S, *et al.* Investigation and identification for Commercial Dendrobium (II) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1991, 22(4): 173-180.
- [2] MA G X, XU G J, XU L S, *et al.* Investigation and identification for Commercial Dendrobium (III) [J]. Chin Tradit Herb Drugs

(中草药), 1995, 26(7): 370-372.

- [3] MA G X, XU G J, XU L S, *et al.* Study on the chemical constituents of Dendrobium chrysotoxum Lindl [J]. Acta Pharm sinica (药学学报), 1994, 29(10): 763-766.
- [4] MA G X, XU G J, XU L S, *et al.* Inhibitory effects of Dendrobium chrysotoxum and its constituents on the mouse HePA and ESC [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 1994, 25(3): 188-189.
- [5] WANG Y Y, ZHANG Z J, LI X X, *et al.* Studies on the HPLC/UV/MS fingerprint of Dendrobium chrysotoxum Lindl [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2006, 26(5): 568-571.

收稿日期: 2006-07-27