

黔产金钗石斛生物碱组成的 HPLC 指纹图谱建立

高巍, 乙引*, 张习敏, 李军 (贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001)

摘要 [目的]建立黔产金钗石斛生物碱组成的 HPLC 指纹图谱。[方法]流动相组成(水-乙腈), 梯度洗脱条件 0~50 min(5%~80% B), 50~60 min(80% B), 流速 1.0 ml/min, 检测波长 240 nm, 测定贵州 4 个产地金钗石斛色谱图。[结果]建立了贵州 4 个产地金钗石斛生物碱组分指纹图谱, 所建立的指纹图谱可用于贵州金钗石斛产地和质量的鉴别。[结论]该方法稳定, 重现性好, 可为贵州金钗石斛质量提供控制参考。

关键词 金钗石斛; HPLC; 指纹图谱

中图分类号 O657.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)28-13610-02

HPLC Fingerprints of Alkaloids in Guizhou *Dendrobium nobile* Lindl.

GAO Wei et al (School of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001)

Abstract [Objective] The aim was to establish the fingerprints of alkaloids in Guizhou *Dendrobium nobile* Lindl. by using HPLC. [Method] With a mixture of A-water and B-acetonitrile as a mobile phase, gradient elution at 0-50 min(5%-80% B) and 50-60 min(80% B) respectively, flow rate at 1.0 ml/min, detection wavelength at 240 nm, chromatograms of *D. nobile* Lindl. from four habitats in Guizhou were determined. [Result] The fingerprints of alkaloids in *D. nobile* Lindl. from four habitats in Guizhou could be used to identify the regions and the quality of *D. nobile* Lindl. [Conclusion] The method was stability, good reproducibility, and provided a reference for the quality control of *D. nobile* Lindl.

Key words *Dendrobium nobile* Lindl.; HPLC; Fingerprint

石斛属(*Dendrobium*)是兰科(Orchidaceae)植物种类最多和分布最广的属之一。石斛作为一种名贵中药在《神农本草经》中有记载,是我国栽培历史最悠久的兰科植物之一。石斛属植物所含的化学成分种类繁多,其活性成分主要为生物碱和多糖两大类^[1-2]。石斛为贵州省珍贵药材植物,具有很高的药用价值,但由于金钗石斛来源广,产地各异,各产地之间活性成分差异较大,且市场需求量逐渐扩大,真假品种之间容易混乱,用普通的形态鉴别法对其鉴别与质量评价十分困难^[3]。中药色谱指纹图谱用于中药质量控制,比目前沿用的方法提供的信息要丰富^[4-5]。为此,笔者拟采用 HPLC 技术,从化学成分角度建立“道地性药材”——贵州省 4 个主产区的金钗石斛生物碱组成的 HPLC 指纹图谱,以期为该省药用石斛产地鉴别提供理论参考,并为加快贵州金钗石斛产业发展和金钗石斛质量控制提供科学依据。

1 材料与方

1.1 材料 主要仪器: Agilent 1100 液相色谱系统(G1315-DAD 检测器, Agilent 508 自动进样器, 32Karat 工作站, 美国惠普公司); Agilent EdipseXDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Diamondsil C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)和 Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 支 C18 色谱柱; Sartorius BP-211 电子天平(德国)。

主要试剂:乙醇(分析纯),单蒸水,甲醇和乙腈(色谱纯,江苏汉邦公司)。体系 A:甲醇-水流动相体系;体系 B:乙腈-水。

金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)茎:采自贵州赤水、罗甸、兴义、独山, 105 °C 杀青 30 min, 70 °C 烘至恒重,粉碎,过 40 目筛。

1.2 方法

1.2.1 供试品制备。首先对加热回流、索氏提取、超声提取进行比较,结果 3 种提取方法之间无论从出峰数量还是出峰

面积上都无太大的差异,但索氏提取法所得峰的总积分面积最大,即石斛生物碱组分得率最高,所以选择索氏提取法作为石斛总生物碱提取法。

取粉末 1.0 g,置于索氏提取器中,加入 75% 酸性乙醇(pH=3)200 ml, 90 °C 索氏提取 3 h,过滤。提取液在 90 °C 水浴中挥干,冷却,加入 50% 甲醇 10 ml 溶解,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为供试品溶液。

1.2.2 参照物溶液制备。精密称取石斛碱 5.00 mg,加入 50% 的乙腈,定容至 50 ml,配制成 0.1 mg/ml 的溶液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为参照物溶液。

1.2.3 方法学考察。

1.2.3.1 稳定性试验。取同一批次供试品,按“1.2.1”方法制备供试品,分别放置 0、6、12、18、36 h 后进样检测,测定峰面积。结果共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD 均小于 3%,表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

1.2.3.2 精密度试验。取同一批次的供试品,按“1.2.1”方法制备供试品,连续进样 5 次,进行检测,测定峰面积。结果共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD 均小于 3%,表明仪器精密度良好。

1.2.3.3 重现性试验。取同一批次的样品,按“1.2.1”方法制备 5 份供试溶液,分别进样检测,测定峰面积,结果共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD 均小于 3%,表明该方法测定的重现性良好。

1.2.4 金钗石斛的 HPLC 指纹图谱的建立。取 4 个产地各 10 批供试品及标准品(石斛碱),分别按“1.2.1”和“1.2.2”方法制备,精密吸取测试品溶液各 5 μl,确定的色谱条件进行色谱分离。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 流动相的考察。研究体系 A(甲醇-水的流动相体系)和体系 B(乙腈-水的流动相体系)的 HPLC 图谱,结果表明:相同条件进样后,在体系 B 下,空载不能洗脱出色谱峰,而在体系 A 下,空载,仍能多次洗脱出色谱峰,说明在体

基金项目 贵州省教育厅科研基金重点项目(黔教科[2007]018号); 国家科技攻关计划项目(20C4BA721A33)。

作者简介 高巍(1983-),男,辽宁朝阳人,硕士研究生,研究方向:药用植物。*通讯作者, E-mail: yiyin@gznu.edu.cn。

收稿日期 2009-05-31

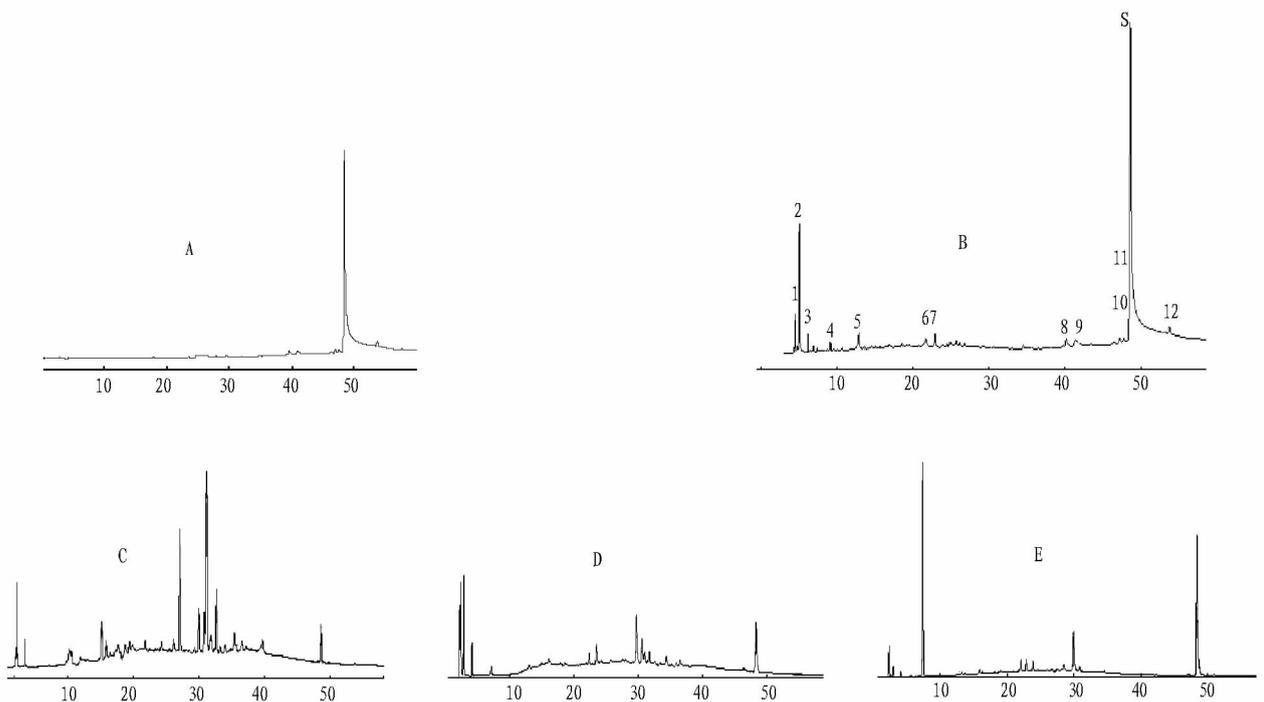
系 A 下,石斛碱会大量保留在柱内,即体系 A 洗脱能力较差,不适合作为石斛生物碱的洗脱流动相。此外,梯度洗脱时,体系 B 的响应基线相对体系 A 更为平稳,所以选择体系 B 作为石斛生物碱的流动相体系。

2.1.2 最佳波长的选择。测定结果表明,无论是石斛碱单体还是石斛总生物碱,其最大紫外吸收值都在 240 nm 处,虽然在 280 nm 处也有较高吸收值,但是峰面积较 240 nm 小。因此,该研究选用 240 nm 作为石斛碱检测波长。

2.1.3 最佳色谱柱的考察。比较 3 支色谱柱的分离洗脱效果,发现它们的分离效果都相似,但洗脱效果以 InertsilODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱较好。在相同色谱条件下,其最高峰响应值达到了 3 300 mAU,说明石斛碱组分在其上残留最少。所以选取 InertsilODS-3 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 作为检测柱。

由以上分析确定色谱条件为:色谱柱 InertsilODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相组成水-乙腈;梯度洗脱条件 0 ~ 50 min (5% ~ 80% B), 50 ~ 60 min (80% B); 检测波长 240 nm; 参比波长 360 nm; 分析时间 60 min; 进样量 5 μl; 柱温 25 °C; 流速 1.0 ml/min。

2.2 指纹图谱分析 从图 1 可以看出,各产地金钗石斛共有峰的出峰时间均在 55 min 以内。赤水产生金钗石斛指纹图谱有 12 个共有峰,其中 11 号峰(石斛碱)的峰面积最大,在 10 min 内共有峰较多(图 1B)。独山产生金钗石斛指纹图谱有 28 个共有峰,出峰时间主要集中在 10 ~ 40 min,主峰主要在第 30 min 出现,且峰面积较大(图 1C)。罗甸产生金钗石斛指纹图谱有 12 个共有峰,出峰时间主要集中在第 5、30 min(图 1D)。兴义产生金钗石斛有 10 个共有峰,石斛碱对应的峰面积比独山和罗甸产的峰面积大(图 1E)。



注:A 为对照品;B、C、D、E 均为样品,分别采自赤水、独山、罗甸、兴义。

Note A. Control substance; B, C, D, E. Samples, collected from Chishui, Dushan, Luodian, Xingyi, respectively.

图 1 对照品及样品的 HPLC 图

Fig. 1 The HPLC graph of control substance and samples

3 结论

该研究建立了贵州省赤水、独山、罗甸、兴义 4 个产地金钗石斛生物碱组分指纹图谱。HPLC 指纹图谱方法稳定,重现性好,适用于贵州金钗石斛产地及其质量的鉴别。

参考文献

[1] 吉占和. 中国石斛属植物的初步研究[J]. 植物分类学报, 1980, 18(4): 427-449.

- [2] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
- [3] 管志斌, 李再林. 珍稀名贵中药——金钗石斛[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(4): 36-37.
- [4] 曹进, 饶毅, 沈群, 等. 中药指纹图谱及其建立原则[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 200-203.
- [5] 吴田. 中医药现代化与中药指纹图谱分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(9): 645-646.