

高效液相色谱法评价中药石斛的质量

徐蓓^{1,2}, 杨莉^{1,3*}, 王峥涛^{1,2,3}¹上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室, 上海 201210²中国药科大学生药学研究室, 南京 210009; ³上海中药标准化研究中心, 上海 201210)

摘要 以联苳类成分枸唇石斛素和石斛酚为指标成分, 建立了采用 HPLC 进行石斛含量测定的方法。采用反相 C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-0.01% 三氟乙酸为流动相进行梯度洗脱。结果表明目标化合物的质量浓度分别在 2.29~1144.00 μg/mL 之间和 1.79~1196.00 μg/mL 之间呈线性, R^2 均大于 0.9997; 平均加样回收率分别为 102.7% 和 99.1%。通过对 18 种不同来源石斛及 18 批商品石斛的含量测定, 表明所建方法灵敏、准确、可靠, 可作为中药石斛的质量控制方法。

关键词 石斛属; 石斛; 联苳类; 枸唇石斛素; 石斛酚; 高效液相色谱法; 质量控制

中图分类号 R927 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2010)05-0467-04

Quality evaluation of *Dendrobii Caulis* by HPLCXU Bei^{1,2}, YANG Li^{1,3*}, WANG Zheng-tao^{1,2,3}

¹The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210; ²Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201210, China

Abstract Bibenzyls are biologically active compounds widely found in *Dendrobii Caulis*. A HPLC method was developed for the determination of two specific bibenzyls, moscatilin and gigantol. Chromatographic separation was performed on a reverse-phase C₁₈ column employing a binary linear gradient elution with acetonitrile and 0.01% trifluoroacetic acid. The linear ranges of moscatilin and gigantol were from 2.29 μg/mL to 1144.00 μg/mL and 1.79 μg/mL to 1196.00 μg/mL respectively with good correlation coefficients greater than 0.9997. The average recoveries measured at three levels were 102.7% and 99.1%, respectively. The validated method was applied for 18 different species of *Dendrobium* plants and 18 batches of *Dendrobii Caulis* which proved to be sensitive, reliable and applicable for the quality control.

Key words *Dendrobium*; *Dendrobii Caulis* bibenzyls; moscatilin; gigantol; HPLC; quality control

This study was supported by the Quality Standards Foundation for Chinese Pharmacopoeia (2010 Vol. I) of Chinese Pharmacopoeia Commission (No. YS-174)

石斛是传统中药材, 具有益胃生津、滋阴清热等功能, 用于阴伤津亏, 口干烦躁, 食少干呕, 病后虚热, 目暗不明。2010年版《中华人民共和国药典》中记载为兰科植物金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl、鼓槌石斛 *Dendrobium chrysotoxum* Lindl、或流苏石斛 *Dendrobium fimbriatum* Hook var. *oculatum* Hook 的栽培品及其同属植物近似种的栽培品的新鲜或干燥茎^[1]。金钗石斛和鼓槌石斛茎形态

特异分别呈扁圆柱形和呈粗纺锤形, 易于区分; 而以流苏石斛为代表的其他黄草类石斛茎呈长圆柱形, 其近似种品种主要有叠鞘石斛 *D. aurantiacum* Rehb. f. var. *denneanum*、束花石斛 *D. chrysanthum*、报春石斛 *D. primulinum*、玫瑰石斛 *D. crepidatum*、兜唇石斛 *D. aphyllum*、细叶石斛 *D. hancocki*、密花石斛 *D. densiflorum* 等。由于金钗石斛和鼓槌石斛目前已明确其专属性成分, 分别为石斛碱和毛兰素,

* 收稿日期 2010-04-09 * 通讯作者 Tel: 021-51322506 E-mail: cpuy@126.com

基金项目 国家药典委员会《中华人民共和国药典》2010版(一部)标准研究课题(No. YS-174)

2010版《中华人民共和国药典》分别针对其专属性成分制定了相应的鉴别及含量测定方法;而流苏石斛等其他石斛,由于种类较多,目前仅有以石斛酚为指标的薄层鉴别检查,尚无含量测定方法。此外,石斛药材商品规格十分复杂,其植物来源种类甚多,主要有细黄草、粗黄草、大黄草和扁黄草等^[2]。因此,迫切需要建立简便、灵敏和可靠的定量分析方法,以保证临床用药的安全。

根据文献报道,联苳类成分在石斛属植物中广泛分布,Yang等^[3]对常用药用石斛属植物中 11 种酚类成分进行分析(包括 5 种联苳类,3 种茛酮类,3 种菲类),结果表明除少数品种外,大部分品种均能检测到杓唇石斛素或石斛酚,两者含量总和约为 0.1%。同时,现代药理作用表明此类化合物具有抗血小板凝集、抗感染、抗氧化和抗肿瘤等作用^[4-6]。因此,本文选取代表性的石斛属植物流苏石斛、金钗石斛、鼓槌石斛及其近似品种以及商品石斛药材和饮片,以共有性成分杓唇石斛素和石斛酚作为指标化合物,对石斛的质量评价进行研究,为合理评价石斛药材提供科学依据。

1 材料

1.1 样品与试剂

18 种收集自不同地区的石斛属植物,其中包含一种国外栽培品索尼亚石斛(*D. Sonia*);收集 18 批次不同产地的商品石斛(编号: P01~P18),其中有 9 批样品(编号: P01~P09)来源为索尼亚石斛(*D. Sonia*),另外 9 批商品药材均为各种药用石斛植物的混合样品。所有样品均由作者杨莉副研究员鉴定,保存于上海中医药大学中药研究所。样品均采用低温干燥(60℃),打粉后过 4 号筛备用。其中叠鞘石斛为提取方法和方法学考察用样品。

对照品杓唇石斛素(moscaticin, $C_{17}H_{20}O_5$)和石斛酚(gigantol, $C_{16}H_{18}O_4$)均为本实验室自制品,经 HPLC-PAD 检测其纯度均 $\geq 98\%$ 。

乙腈、三氟乙酸均为色谱纯(美国 Tedia 公司),其余试剂为市售分析纯,超纯水为 MilliQ(美国 Millipore 公司)处理水。

1.2 仪器

高效液相色谱仪:美国 Waters 公司 Waters alliance(e2695 分离模块, e2998 光电二极管阵列检测); AE200 电子分析天平(瑞士梅特勒托利多公司)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定条件

XTerraTM RP₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);以乙腈为流动相 A, 0.01% 三氟乙酸为流动相 B, 0~12 min 30% A, 12~30 min 30% A → 48% A 进行梯度洗脱;检测波长为 230 nm;流速: 1.0 mL/min;柱温: 25℃;进样量: 20 μL。标准品溶液和样品溶液的色谱图见图 1。

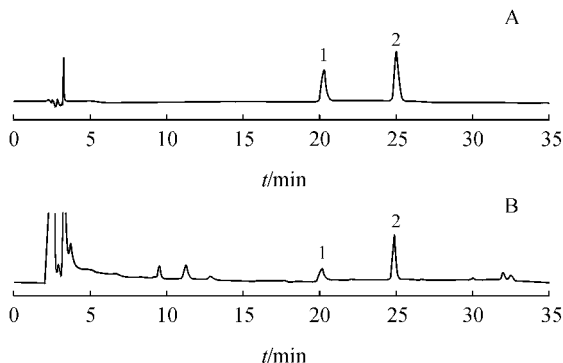


Figure 1 HPLC chromatograms of mixture standard solution (A) and sample solution (B) of *D. aurantiacum* var. *dennanum*
1 Moscatilin 2 Gigantol

2.2 方法学考察

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取杓唇石斛素和石斛酚对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,分别配制成质量浓度为 1.144 μg/mL 和 2.990 μg/mL 的标准品贮备液。对混合对照溶液进行 72 h 的稳定性考察,两者峰面积的 RSD 小于 1.0%,表明该两种化合物 3 d 内在甲醇溶液中稳定。

2.2.2 供试品溶液的制备 取供试药材粉末约 1.0 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称重,常温放置 15 min,超声提取 45 min,取出,称重,加甲醇补足减失的重量,摇匀取上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.2.3 定量限、检测限和标准曲线 精密称取杓唇石斛素和石斛酚对照品适量,加甲醇配制成混合对照溶液,逐渐稀释后作为标准曲线的分析浓度。以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得到 2 个化合物的线性回归方程及线性范围。分别以信噪比(S/N)为 3/1 和 10/1 确定杓唇石斛素和石斛酚的检测限和定量限,结果见表 1。

2.2.4 精密度、重复性和稳定性 准确吸取供试液 20 μL,一天内连续进样 5 次,仪器精密度 RSD

小于 0.9%。另取同一样品 6 份, 要求测定, 分别计算药材中石斛酚和杓唇石斛素的含量及其相对标准差作为提取方法的重复性考察 RSD 小于 3.0%。取其中一份供试品作为样品稳定性考察, 分别在 0 1, 2 4 8 12 36 72 h 进行测定, 峰面积 RSD 均低于 2.6%。

Table 1 Calibration data of moscatilin and giganol

Analyte	Regressive equation	R ²	Linear range/(μg/mL)	LOD/(μg/mL)	LOQ/(μg/mL)
Moscatilin	y= 50 737x - 102 690	0.999 8	2.29 - 1 144.00	0.69	2.29
Giganol	y= 42 801x - 94 039	0.999 7	1.79 - 1 196.00	0.60	1.79

LOD: Limit of detection LOQ: Limit of quantitation

Table 2 Recovery of two target compounds($\bar{x} \pm s$, n= 6)

Analyte	Added/μg	Recovery/%	RSD/%
Moscatilin	209.04	101.6±1.7	1.2
	418.08	103.4±0.8	
	627.12	103.0±0.5	
Giganol	209.40	96.0±0.7	2.4
	418.80	100.6±0.4	
	628.20	100.8±0.4	

2.3 样品含量测定

对收集到得 18 种石斛药材和 18 批次的商品石斛进行含量测定, 结果分别见表 3、4

Table 3 Contents of moscatilin and giganol from 18 species of *Dendrobium* plants(%)

Origin	Location	Moscatilin/%	Giganol/%
<i>D. nobile</i>	Sichuan Yunnan	- /nq	tr~ 0.004
<i>D. chrysotocum</i>	Yunnan(Sinao); Jiangsu(Nanjing)	tr~ 0.007	tr~ 0.008
<i>D. finlayianum</i>	Yunnan(Sinao); Jiangsu(Nanjing)	0.007	0.011
<i>D. pendulum</i>	Yunnan(Sinao), Sichuan	0.011	0.005
<i>D. waldianum</i>	Yunnan(Sinao)	0.008	0.002
<i>D. gratiosissimum</i>	Yunnan(Sinao, Menglian)	0.011	0.006
<i>D. capillipes</i>	Yunnan(Kunming)	0.032	0.391
<i>D. aurantiacum</i>	Yunnan(Sinao, Menglian, Wenshan)	0.058	0.091
<i>D. chrysanthum</i>	Yunnan(Menglian); Jiangsu(Nanjing); Zhejiang(Leqing)	0.047	0.032
<i>D. crepidatum</i>	Yunnan(Menglian)	0.018	0.022
<i>D. densiflorum</i>	Yunnan(Sinao)	0.168	0.021
<i>D. aphyllum</i>	Yunnan(Sinao, Menglian)	0.057	0.077
<i>D. primulinum</i>	Yunnan(Sinao, Menglian)	0.109	0.080
<i>D. hancockii</i>	Jiangsu(Nanjing)	0.244	0.216
<i>D. thyrsiflorum</i>	Yunnan(Sinao); Jiangsu(Nanjing)	0.114	0.174
<i>D. loddigesii</i>	Guangxi	0.121	0.020
<i>D. candidum</i>	Yunnan	-	-
<i>D. Sonia</i>	Jiangsu(Nanjing); Hainan, Thailand	-	0.245

-: Not detected; nq: Not quantified owing to the suspicious purity of the peak; tr: Under LOQ, but concentrated in five times

2.2.5 加样回收率 精密称定叠鞘石斛约 0.5 g 分别按照预实验石斛中杓唇石斛素和石斛酚的各自平均值, 以低 (50%)、中 (100%)、高 (150%) 3 个水平分别加入的两种化合物, 每个水平平行做 3 份, 按要求测定, 两种化合物的加样回收率分别为 102.7% 和 99.1%, 结果见表 2。

Table 4 Contents of moscatilin and giganol from 18 commercial herbs of *Dendrobii* Caulis

Voucher ^a	Location (Year, month)	Moscatilin/%	Giganol/%
P01	Yunnan (2008, 01)	-	0.091
P02	Yunnan (2008, 11)	-	0.127
P03	Yunnan (2009, 04)	-	0.144
P04	Guangxi (2009)	-	0.030
P05	Guangxi (2009)	-	0.081
P06	Guangxi (2009)	-	0.087
P07	Sichuan (2008, 11)	-	0.105
P08	Sichuan (2007)	-	0.037
P09	Nanjing, Jiangsu (2008, 11)	-	0.164
P10	Yunnan (2009, 02)	0.029	0.04
P11	Yunnan (2008, 03)	0.043	0.011
P12	Yunnan (2003, 07)	0.030	0.075
P13	Yunnan (2003, 02)	0.053	0.048
P14	Zhejiang (2009)	0.011	0.041
P15	Zhejiang (2003, 02)	0.010	0.009
P16	Sichuan (2008, 03)	0.191	0.254
P17	Lijiang, Yunnan (2008, 11)	0.060	0.012
P18	Guizhou (2008, 11)	0.075	0.106

^a P01-P09 comes from *D. Sonia*; -: Not detected

3 讨论

3.1 含量测定结果

从杓唇石斛素和石斛酚的含量测定结果 (表 3) 可见, 在药典收载的不同石斛属植物中, 金钗石斛和鼓槌石斛中两者含量均低于 0.008%, 铁皮石斛中未检出这两种成分; 外来栽培品——索尼亚石斛中所含石斛酚含量较高, 平均含量约为 0.2%, 但其几乎不含杓唇石斛素。除此之外, 流苏石斛等其他近似种药材均可检出这两种化合物, 含量范围分别为 0.007% ~ 0.244% 和 0.002% ~ 0.391%, 其中杓唇石斛素的平均含量 0.072%, 石斛酚平均含量 0.082%, 两者之和大于 0.15%。因此, 本研究结果充分表明, 除金钗石斛、鼓槌石斛及铁皮石

斛外(2010版《中华人民共和国药典》均分别制订其含量测定方法),以杓唇石斛素和石斛酚这两种成分的含量之和为指标可用于评价流苏石斛等及其近似品种的质量。

进一步对商品石斛的分析结果表明(表4),商品石斛中有9批次(P10~P18)平均含0.056%的杓唇石斛素和0.066%的石斛酚,其余9批次饮片(P01~P09)中,石斛酚的平均含量约为0.1%、不含或含少量的杓唇石斛素,另外对6批石斛伪品分析表明,均不含上述两种成分。本次实验收集的石斛药材及饮片分别来自云南、广西、四川、浙江等6个省中多个产地的18批样品,具有一定的代表性。从植物鉴定及含量分析结果均表明,近年来石斛流通市场中主流商品石斛的植物来源应为栽培品索尼娅石斛。进一步对9批经鉴定植物来源为索尼娅石斛的商品药材与收集自泰国栽培种的索尼娅石斛原植物进行HPLC指纹图谱的比较分析,结果也充分证实P01~P09来源于索尼娅石斛,表现为均含有石斛酚外,另含有其他6种共有成分,通过紫外吸收光谱推断,应分别为联苳、茛酮及菲类等石斛属的特征性化合物。鉴于索尼娅石斛为外来进口的石斛栽培品种,目前尚无有关质量控制的研究,因此有必要对该外来进口品种进行深入的质量控制研究,以保证临床用药的安全和合理。

3.2 色谱条件优化和提取方法考察

联苳类化合物在230 nm和280 nm处有最大吸收,结合分析商品石斛的色谱情况,在230 nm可以将石斛酚和杓唇石斛素进行有效分离。

运用单因素法对提取方法进行考察,比较不同溶剂、方法、溶剂体积、时间、次数等影响因素,最后确定提取方法(见“2.2.2”项)。此外,依次考察不同厂家C₁₈色谱柱、流速和柱温,结果发现各厂家C₁₈柱的测量结果RSD均小于3.1%;流速和柱温对杓唇石斛素的影响较大,RSD大于4.3%,而对石斛

酚的影响较小,RSD小于2.5%。因此,建议流速控制在1 mL/min,柱温控制在(25±2)℃。

4 结 论

本项研究所建立的分析方法准确度以平均加样回收率计在96.0%~103.4%之间,且精密度、重复性、稳定性等考察中,其RSD均小于3.0%,表明方法准确、可靠和可行。进一步通过对18种不同来源药用石斛和18批商品石斛的含量测定,结果表明,所建立的方法能满足流苏石斛及其近似品种等石斛的质量评价研究,补充了中国药典中对于流苏石斛等其他石斛的质量控制;同时本研究也表明,近年来主流商品石斛的来源大多为栽培品索尼娅石斛。本研究采用HPLC法对石斛中活性指标成分杓唇石斛素和石斛酚进行含量测定研究,为中药石斛的质量评价提供了科学依据。

致谢:上海食品药品检验所吴赵云副主任药师提供部分石斛样品。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 9版. 北京:中国医药科技出版社,2010:85.
- [2] 张 婷(Zhang T). 中药石斛的分子鉴定及质量评价研究[D]. 南京:中国药科大学,2005.
- [3] Yang L, Wang ZT, Xu LS. Simultaneous determination of phenols (bibenzyl phenanthrene and fluorenone) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection[J]. *J Chromatogr A*, 2006, **1104**(1/2): 230–237.
- [4] Fan CQ, Wang YP, Qin GW, et al. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum* [J]. *Photochemistry*, 2001, **57**(8): 1255–1258.
- [5] Gong YQ, Fan Y, Yang Z, et al. In vivo and in vitro evaluation of erianin, a novel antiangiogenic agent[J]. *Eur J Cancer*, 2004, **40**(10): 1554–1565.
- [6] Wang TS, Lu YM, Ma GX, et al. In vitro inhibition activities from *Dendrobium chrysotoxum* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 1997, **9**(2): 1–3.