

RP-HPLC 法测定大叶香茶菜中冬凌草甲素含量

王永学, 王中全, 陈正跃, 邱培勇, 张积霞*

(1. 新乡医学院药物研究室, 河南新乡 453003; 2. 河南省新乡市公安局, 河南新乡 453003)

摘要 [目的] 应用 RP-HPLC 法测定大叶香茶菜中冬凌草甲素的含量。[方法] RP-HPLC 法色谱条件: 色谱柱为 Varian Microsorb-MV 100-5 C18 柱, 流动相为甲醇-水(1:1), 流速 1.0 ml/min, 检测波长 = 238 nm, 柱温 30℃。[结果] 冬凌草甲素加样回收率为 98.6%, RSD 为 2.04% (n=5); 大叶香茶菜叶中冬凌草甲素的含量为 4.79 g/kg。[结论] 该法简便可靠, 适用于大叶香茶菜中冬凌草甲素含量测定。

关键词 大叶香茶菜; 冬凌草甲素; RP-HPLC 法

中图分类号 O657.7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)22-09349-01

Quantitative Determination of Oridorin in *Isodon macrophyllus* by RP-HPLC

WANG Yong-xue et al (Pharmaceutical Laboratory, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract [Objective] The research aimed to determine the content of oridorin in *Isodon macrophyllus* by RP-HPLC method. [Method] The chromatographic conditions of RP-HPLC method were that the chromatographic column was analytical C18 column, the mobile phase was methanol-water(1:1), the flowrate was 1.0 ml/min, the column temperature was 30℃, the detection wavelength was 238 nm. [Result] The average recovery was 98.6% with RSD 2.04% (n=5). The content of oridorin in *Isodon macrophyllus* was 4.79 g/kg. [Conclusion] This method was proved to be simple and reliable. It could be used for the oridorin content determination in *Isodon macrophyllus*.

Key words *Isodon macrophyllus*; Oridorin; HPLC

冬凌草甲素(Oridorin)为一种具有明显生物活性的贝壳杉烷类二萜成分。据报道,其具有抗细胞增殖、突变,抑制癌细胞DNA、RNA和蛋白质的合成,诱导细胞的凋亡,轻微抑制体液免疫,阻断 β -受体的作用。张典瑞等研究表明,冬凌草甲素具有较强的抗肿瘤活性,对多种移植性肿瘤有效,临床上主要用于肝癌、食管癌、胰腺癌等的治疗^[1-2]。笔者在大叶香茶菜(*Isodon macrophyllus*)化学成分研究中发现其茎叶中含有大量的冬凌草甲素,且资料调查显示尚无人对大叶香茶菜茎叶中冬凌草甲素的含量进行详细的研究^[1-5]。为此,笔者采用HPLC法对大叶香茶菜茎叶中冬凌草甲素进行了含量测定。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 大叶香茶菜 *Isodon macrophyllus* (Mgo) H.Haha], 2003年9月初采自河南省桐柏县,标本由中国科学院昆明植物研究所林中文教授鉴定。

试剂:冬凌草甲素(新乡医学院药物研究室自制,含量98%);甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯。

仪器:Varian Prostar 210型高效液相色谱仪;Varian prostar 6.2工作站;325紫外检测器。

1.2 方 法

1.2.1 色谱条件。色谱柱为Varian Microsorb-MV 100-5 C18柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(1:1);流速为1.0 ml/min;检测波长为λ=238 nm;柱温为30℃;进样量为20 μl。

1.2.2 对照品溶液的制备。精密称取冬凌草甲素5.0 ng,置于10 ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得到对照品溶液,备用。

1.2.3 供试品溶液的制备。称取大叶香茶菜100 g,70%丙酮-水浸泡3次,浸提液合并浓缩,滤除色素沉淀,用乙酸乙酯萃取,蒸去溶剂得浸膏3.2 g。取浸膏11.3 ng,用50 ml甲醇溶解,得供试品溶液。

1.2.4 线性关系考察。精密吸取对照品溶液适量,加入甲醇稀释制成0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 ng/ml的冬凌草甲素溶液,使用HPLC仪测定峰面积。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标得回归方程。

1.2.5 精密度试验。取质量浓度为0.04 ng/ml的供试品溶液,在选定的色谱条件下依法测定,重复进样6次,测定冬凌草甲素的峰面积。

1.2.6 稳定性试验。取供试品溶液,在10 h内间隔2 h进针测定峰面积。

1.2.7 回收率试验。精密称取大叶香茶菜乙酸乙酯萃取物13.2 ng及冬凌草甲素对照品2.6 ng,混合,用甲醇溶解,定容至100 ml,摇匀,测定冬凌草甲素的峰面积。

1.2.8 样品含量测定。取供试品溶液进样,测定冬凌草甲素的峰面积。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察结果 所得线性回归方程为: $Y = 2.6426 \times 10^8 X + 5.4432 \times 10^5$, $r = 0.9979$, 线性范围为0.01 ~ 0.08 ng/ml。

2.2 精密度试验结果 计算得RSD为1.85%,说明试验结果可靠。

2.3 稳定性试验结果 计算得RSD为1.99%,说明仪器在10 h内稳定。

2.4 回收率试验结果 计算得平均回收率为98.6%, RSD为2.04% (n=5),说明仪器良好。

2.5 样品含量测定结果 计算大叶香茶菜叶中冬凌草甲素的含量为4.79 g/kg, RSD为1.89% (n=5)。结果见图1。

3 结论与讨论

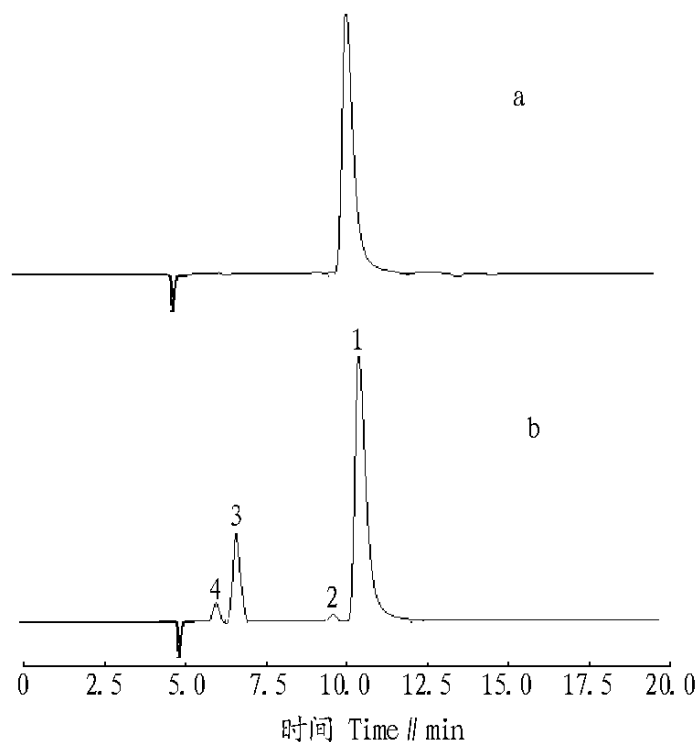
20世纪60年代末发展起来的HPLC,是目前在分离和分析物质方面应用最广泛的手段之一,具有灵敏度高,适用性广,不破坏样品等特点,在中药现代化中起着重要的作用,是公认的控制天然药物质量的有效手段。由该研究测定结果可以看出,冬凌草甲素为桐柏产大叶香茶菜茎叶中所占比重较大的化学成分之一,由前人对冬凌草甲素所进行的抗肿瘤

基金项目 河南省科技厅科技攻关项目(0624420029)。

作者简介 王永学(1978-),男,河北无极人,硕士,讲师,从事天然药物化学教学和研究工作。* 通讯作者。

收稿日期 2008-05-27

104.60%，说明该法精密度良好。



注:a 为标准品;b 为样品。1 为富马酸,2 为 L-乳酸,3 为葡萄糖,4 为 α -酮戊二酸。

Note:a. Standard substance; b. Sample. 1. Fumaric acid; 2. L-lactic acid; 3. Glucose; 4. α -ketoglutaric acid.

图1 富马酸色谱

Fig.1 Chromatogram of fumaric acid

2.4 样品中富马酸的含量 用此方法对发酵时间分别为 12、48、72 h 的米根霉摇瓶富马酸发酵液进行测定,测得富马酸的质量浓度分别为 5.712、36.420、56.449 g/L, RSD 分别为 1.040%、0.667% 和 0.430%。

3 小结

采用排斥高效液相色谱法,快速准确测定了米根霉发酵

(上接第9349页)

活性测定的结果可以推测出冬凌草甲素是大叶香茶菜中主要药效成分之一,因此可以把冬凌草甲素作为大叶香茶菜质量监控指标。

该试验改进了以前建立的 HPLC 测定冬凌草甲素含量的条件,通过优化、比较,流动相确定为甲醇-水(1:1),与其

表1 富马酸回收率及精密度试验结果

Table 1 The results of the recovery and precision test of fumaric acid

编号 Code	加入量 g/L Adding amount	实测值与本底值之差 g/L Difference between the measured value and background value	回收率 % Recovery	RSD %
1	0.500	0.511 0	102.20	0.290
2	1.000	1.046 0	104.60	0.667
3	1.500	1.529 4	101.95	0.277
4	2.000	1.968 6	98.43	0.573

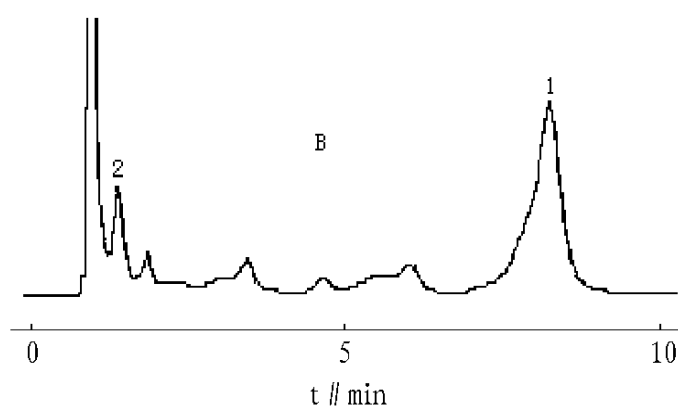
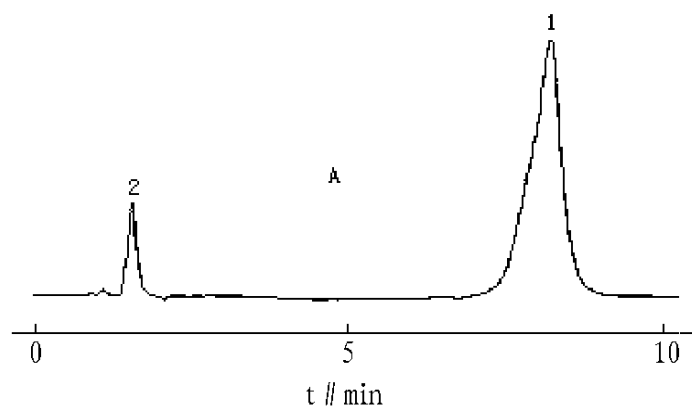
液中富马酸的含量。该方法具有分离效果好、定性和定量分析准确、时间短等优点,对于及时检测米根霉发酵过程中富马酸含量的变化具有重要意义。

参考文献

- [1] KAMMB, KAMMM. Principles of biorefineries[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 137.
- [2] 付永前, 王桂兰, 徐晴, 等. 应用 KMnO_4 滴定法快速检测米根霉发酵液中富马酸含量[J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2007, 29(6): 91-94.
- [3] 盛自华. 富马酸检测方法[J]. 发酵科技通讯, 2001, 30(2): 33-34.
- [4] CAO NJ, DUJ X, GONG C S, et al. Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary liquid contactor and an adsorption column[J]. Applied And Environmental Microbiology, 1996, 62(8): 2926-2931.
- [5] ZHOU Y, DUJ, TSAO G T. Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2002, 25: 179-181.
- [6] CHINNI F, SHINABELLI U, RIPCINI C, et al. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion exclusion liquid chromatography[J]. J Food Composition and Analysis, 2005, 18: 121-130.
- [7] ZHOU Y, DUJ, TSAO G T. Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2002, 25: 179-181.

他方法相比可使冬凌草甲素同大叶香茶菜茎叶乙酸乙酯提取物中其他化合物得到更好的分离,更利于冬凌草甲素的含量监测。

精密度试验及加样回收试验表明,该法简便易行,试验结果准确可靠,因此为检验、评价大叶香茶菜质量提供了重要依据。



注:1 为冬凌草甲素;2 为溶剂。

Note: 1, Oidorin; 2, Solvent.

图1 冬凌草甲素对照品(A)和大叶香茶菜(B) HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of oidorin standard (A) and *Rhabdosa macrophylla* (B)

参考文献

- [1] 刘晨江, 赵志鸿. 冬凌草的研究进展[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(10): 577-581.
- [2] 张典瑞, 任天池. 冬凌草甲素的药学研究进展[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(11): 817-820.

- [3] 袁珂, 吴崇珍, 张晓明, 等. 高效液相色谱法同时测定冬凌草中冬凌草甲、乙素的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2004, 21(3): 213-215.
- [4] 张积霞, 陈正跃, 王永学, 等. 大叶香茶菜化学成分研究[J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(1): 16-18.
- [5] ZHANG J X, CHEN Z Y, WANG Y X, et al. Two new ent-kaurane diterpenoids from *Sodon macrophyllum*[J]. Journal of Chemical Research, 2006, 7: 420-421.