

## HPLC 法测定竹叶兰根茎中竹叶兰烷

刘美凤<sup>1,2\*</sup>, 丁怡<sup>3</sup>, 杜力军<sup>3</sup>

(1. 华南理工大学化工与能源学院, 广东 广州 510640; 2. 广州奇星药业有限公司, 广东 广州 510310;

3. 清华大学 生物科学与技术系, 北京 100084)

**摘要:** 目的 利用反相高效液相相对竹叶兰干燥根茎中萜类化学成分竹叶兰烷建立了快速、高效、稳定的分析方法。方法 色谱柱 Hypersil ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 不锈钢柱, 流动相 乙腈-水 (35 : 65), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测波长: 279 nm, 进样量: 10 μL。结果 被测定峰与其他色谱峰可达到基线分离, 线性范围 0.80~2 500 μg,  $r = 1$ , 回收率及 RSD 分别为 98.20% (RSD = 0.66%), 102.17% (RSD = 0.45%), 102.23% (RSD = 1.22%) ( $n = 5$ )。结论 建立了竹叶兰烷的反相高效液相测定方法, 本法简便、准确、灵敏度高, 可用于定量测定和质量控制。

**关键词:** 反相高效液相色谱; 竹叶兰; 竹叶兰烷

**中图分类号:** R 282.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2008)03-0448-02

竹叶兰 *A. rundina gram inifolia* (D. Don) Hochr. 为兰科 (Orchidaceae) 竹叶兰属 (*A. rundina* Bl.) 植物, 别名长杆兰、草姜、山萼菜、竹兰、禾叶竹叶兰、文哈海 (傣名), 广泛分布于热带和亚热带地区, 植物资源丰富, 为西双版纳地区傣族人民常用的植物药。其药用部位主要为根茎, 用于治疗黄疸, 热淋, 脚气水肿, 疝气腹痛, 风湿痹痛, 胃痛, 尿路感染, 毒蛇咬伤, 疮痍肿毒, 跌打损伤等<sup>[1]</sup>。初步的活性筛选结果显示, 竹叶兰干燥根茎乙醇提取物具有较好抑制肿瘤细胞 (Bel-7402 和 BGC-823) 的活性, 该提取物中主要为二苯乙烯类化合物, 笔者首次对云南产竹叶兰的干燥根茎进行了系统的化学成分研究, 从其乙醇提取物中的醋酸乙酯部位分离得到 1 个新化合物竹叶兰烷 (arundinan) [2-(对-羟基苄基)-3-羟基-5-甲氧基联苄]<sup>[2]</sup>, 该化合物为萜类化合物, 也是竹叶兰中主要的化学成分。本实验建立了 HPLC 法测定竹叶兰干燥根茎中竹叶兰烷的量, 为竹叶兰中萜类成分的 HPLC 定量分析工作奠定基础。

## 1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司, 包括 515 泵, PAD996 检测器, 7725i 进样器), KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

竹叶兰根茎样品采自云南省西双版纳地区 (样品编号: 001205, 010210, 02041), 经中国科学院昆明植物研究所杨崇仁教授鉴定为 *A. gram inifolia* (D. Don) Hochr.。甲醇 乙腈 (色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 二次蒸馏水自制, 竹叶兰烷对照品

自制, HPLC 检测质量分数 98% 以上, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件:** 色谱柱为 Hypersil ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (35 : 65); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 检测波长: 279 nm。上述色谱条件下竹叶兰烷的保留时间为 7 min 左右。在该色谱条件下待测组分可达到基线分离, 见图 1。

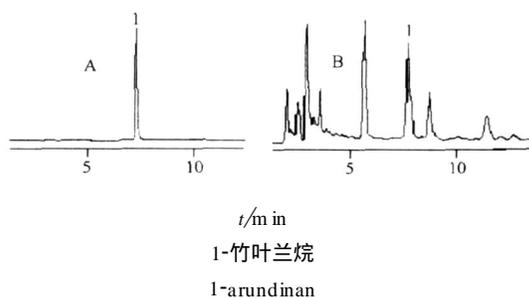


图1 竹叶兰烷对照品(A)和竹叶兰干燥根茎(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of arundinan reference substance (A) and dried tuber of *A. gram inifolia* (B)

**2.2 对照品溶液的制备:** 精密称取竹叶兰烷对照品适量, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成 1.0 mg/mL 的对照品储备溶液。

**2.3 供试品溶液的制备:** 竹叶兰干燥根茎粉末 (40~60 目) 200 mg, 精密称定, 置 20 mL 样品瓶中, 加甲醇 10 mL, 称定质量, 超声提取 20 min, 用甲醇补足

损失质量, 静置, 倾出上清液, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系考察: 精密吸取竹叶兰烷对照品储备溶液适量, 加甲醇溶液定量稀释, 分别配制成 0.08、0.40、2.00、10.00、50.00、250.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品溶液, 上述溶液按色谱条件测定峰面积, 以对照品的质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 峰面积积分为纵坐标 ( $Y$ ), 进行线性回归, 回归方程  $Y = 4\,556.4 X - 9\,517$ ,  $r = 1$ , 线性范围 0.80~2 500  $\mu\text{g}$ 。

2.5 精密度试验: 同一供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 重复进样 5 次, 测定峰面积, 竹叶兰烷峰面积的 RSD 分别为 0.51%。

2.6 重现性试验: 精密称取同一批竹叶兰干燥根茎粉末样品 5 份, 约 0.2 g, 按 2.3 项供试品溶液的制备方法制得供试品溶液, 进样 10  $\mu\text{L}$ , 测定, 测得峰面积, 计算竹叶兰烷质量分数为 0.18%, RSD 为 0.87%, 表明该方法的重现性良好。

2.7 稳定性试验: 同一供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 每隔 24 h 测定一次, 连续测定 5 次, 竹叶兰烷峰面积的 RSD 分别为 1.31%。

2.8 回收率试验: 取竹叶兰干燥根茎粉末 50、100、150 mg 各 5 份, 精密称定, 精密加入竹叶兰烷对照品溶液适量, 按 2.3 项供试品溶液的制备操作, 按 2.1 项下色谱条件分别测定竹叶兰烷, 计算得回收率分别为 98.20% (RSD = 0.66%)、102.17% (RSD = 0.45%)、102.23% (RSD = 1.22%) ( $n = 5$ ), 实验结果说明本法回收率好, 方法可行。

2.9 样品的测定: 分别称取 3 批竹叶兰干燥根茎 (批号: 001205, 010210, 02041) 粉末 0.2 g, 按 2.3 项供

试品溶液的制备方法操作, 按 2.1 项下色谱条件分别测定竹叶兰烷 ( $n = 5$ ), 测得 3 批竹叶兰干燥根茎竹叶兰烷质量分数分别为 1.72、1.65、1.81 mg/g。

### 3 讨论

3.1 色谱条件优化: 竹叶兰烷有两个共同紫外最大吸收波长, 分别为 211、279 nm, 在对竹叶兰药材进行分析发现在 211 nm 进行测定时, 由于药材中的成分较多, 显现的干扰成分也多, 结果表明, 在 279 nm 波长下进行测定具有最佳的信噪比且兼顾被测定成分受最小干扰, 因此选用了 279 nm 作为该类化合物的检测波长; 为了使竹叶兰烷与竹叶兰根茎中的其他成分有良好的分离度和相对适中的检测时间, 实验中比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水-磷酸等洗脱系统对被测定成分的分离效果, 结果乙腈-水 (35:65) 为流动相, 被测定样品的色谱峰分离度较好, 基线也较平稳。

3.2 提取方法的优化: 分别取竹叶兰干燥根茎粉末 (40~60 目) 约 100 mg, 精密称定, 分别置 20 mL 样品瓶中, 各加甲醇 10 mL, 分别按下列方法操作: 浸泡 2 h、浸泡过液、超声提取 20、30、40 min, 静置后, 倾出上清液, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 各进样 10  $\mu\text{L}$ , 按 2.1 项下色谱条件分别测定竹叶兰烷, 记录峰面积分别为 1 542 248、1 606 837、1 590 044、1 589 489、1 629 548, 几种提取方法中被测定成分的结果差别不大, 因此, 采用超声提取 20 min 作为样品制备中的提取方法, 该方法快速、简便、有效。

### 参考文献

- [1] 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [2] 刘美凤, 韩芸, 邢东明, 等. 竹叶兰中一个新的萜类化合物 [J]. 亚洲天然产物研究, 2004, 6(3): 229-232.

## 《中草药》杂志被评为第六届“百种中国杰出学术期刊”

2007 年 11 月 15 日中国科学技术信息研究所公布了第六届“百种中国杰出学术期刊”名单,《中草药》杂志又获此殊荣——第六届“百种中国杰出学术期刊”。这个名单是按照期刊评价指标体系对重要指标 (影响因子、总被引频次、他引总引比、基金论文比和即年指标) 进行打分的结果。

摘自中国科学技术信息研究所《2006 年度中国科技论文统计与分析年度报告》