

铁皮石斛与霍山石斛中甘露糖、葡萄糖及柚皮素的含量比较

王雅文¹, 梁芷韵¹, 谢镇山¹, 叶家宏¹, 欧斯建², 周楚娟¹, 袁媛^{3*}, 黄月纯^{1,4*}, 魏刚²

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510006;

2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 3. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700;

4. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] 目的:优化铁皮石斛中甘露糖与葡萄糖的柱前衍生 HPLC 含量测定方法以及柚皮素 HPLC 含量测定方法,比较铁皮石斛与霍山石斛中这 3 种成分的含量差异。方法:在 2015 年版《中国药典》铁皮石斛甘露糖柱前衍生 HPLC 含量测定项下色谱条件基础上,选择乙腈-0.02 mol·L⁻¹乙酸铵溶液为流动相系统梯度洗脱,同时测定甘露糖与葡萄糖的含量,并分析甘露糖与葡萄糖的峰面积比值;采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);检测波长 250 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30 ℃。柚皮素 HPLC 含量测定采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈-甲醇-0.4% 磷酸溶液,梯度洗脱;检测波长 290 nm;流速 0.8 mL·min⁻¹;柱温 40 ℃。结果:甘露糖与葡萄糖在 0.15~3.0,0.075~2.25 μg 线性关系良好($r=0.999\ 9$),平均加样回收率分别为 99.01% (RSD 2.1%),101.69% (RSD 2.0%),重复性、耐用性等其他方法学研究符合要求。43 批不同产区铁皮石斛中甘露糖、葡萄糖以及两者的含量之和分别在 12.75%~36.40%,2.93%~18.39%,19.23%~54.58%,除极少数样品外,基本符合 2015 年版《中国药典》甘露糖含量限度要求,甘露糖与葡萄糖含量之和也接近总多糖含量限度要求;含量与产区相关性不显著。12 批霍山石斛的总糖则分别在 14.33%~29.47%,6.64%~15.20%,25.73%~44.37%,其含量以及峰面积比值基本落在铁皮石斛范围期间,多批次的平均含量也基本与铁皮石斛一致(约 33%左右)。柚皮素在 0.020 8~0.832 0 μg 线性关系良好($r=0.999\ 9$),平均加样回收率为 101.96% (RSD 1.8%)。11 批铁皮石斛与 7 批霍山石斛的柚皮素含量分别为 0.053 2~0.122 4 mg·g⁻¹(均值为 0.081 0 mg·g⁻¹),0.040 3~0.090 0 mg·g⁻¹(均值为 0.068 3 mg·g⁻¹),铁皮石斛含量稍高于霍山石斛,但含量均亦未达到 0.02% 的质量标准下限的常规要求。结论:铁皮石斛中甘露糖与葡萄糖 HPLC 含量测定方法重复性较好,用两者含量之和替代具有较大误差的总多糖含量作为测定指标具有可行性;单糖含量测定可应用于霍山石斛的定量质控指标;但依据 2 种石斛的总多糖含量、水解后的单糖含量与峰面积比值以及柚皮素含量,无法区分铁皮石斛与霍山石斛,需结合其他专属性方法方能对两种石斛进行区别。

[关键词] 铁皮石斛; 霍山石斛; 甘露糖; 葡萄糖; 柚皮素; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1;R289;R22;R927.2;R931.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0035-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182418

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180927.1137.013.html>

[网络出版时间] 2018-09-28 11:04

Content Comparison of Mannose, Glucose and Narinhenin in *Dendrobium officinale* and *Dendrobium huoshanense*

WANG Ya-wen¹, LIANG Zhi-yun¹, XIE Zhen-shan¹, YE Jia-hong¹, OU Si-jian²,
ZHOU Chu-juan¹, YUAN Yuan^{3*}, HUANG Yue-chun^{1,4*}, WEI Gang²

(1. The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

3. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,

[收稿日期] 20180622(009)

[基金项目] 中央本级重大增减支项目(2060302);广州中医药大学高水平大学基金项目(2050205)

[第一作者] 王雅文,在读硕士,从事中药质量标准与指纹图谱分析研究,E-mail:499459029@qq.com

[通信作者] *黄月纯,主任中药师,硕士生导师,从事中药质量标准研究、指纹图谱及活性成分研究工作,E-mail:huangyuechun@163.com;

*袁媛,研究员,从事中药鉴定与分子生药学研究工作,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com

Beijing 100700, China;

4. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the pre-column derivation high performance liquid chromatography (HPLC) content determination method of *D*-mannose and *D*-glucose as well as the content determination method of narinhenin in *Dendrobium officinale* and *D. huoshanense*, and compare the contents of *D*-mannose, *D*-glucose and narinhenin between *D. officinale* and *D. huoshanense*. **Method:** A pre-column derivation HPLC method modified by *Chinese Pharmacopoeia* (Ch. P) 2015 was used to simultaneously determine the contents of *D*-mannose and *D*-glucose, with acetonitrile-0.02 mol · L⁻¹ ammonium acetate solution as mobile phase for gradient elution. Kromasil 100-5 C₁₈ was performed with the wavelength set at 250 nm, and the flow rate was 1 mL · min⁻¹; column temperature was 30 °C. HPLC content determination of narinhenin was performed on Kromasil 100-5 C₁₈ with the acetonitrile-methanol-0.4% phosphoric acid solution as mobile phase for gradient elution, and the wavelength was set at 290 nm; the flow rate was 0.8 mL · min⁻¹, and column temperature was 40 °C. **Result:** *D*-mannose and *D*-glucose showed a good linear relationship within the range of 0.15-3.0 μg and 0.075-2.25 μg ($r = 0.9999$); and their average recoveries were 99.01% (RSD 2.1%) and 101.69% (RSD 2.0%) respectively. In addition, the other methodological researches such as repeatability and durability all met the requirements. The contents of *D*-mannose (C_m), *D*-glucose (C_g) and sum of them ($C_m + C_g$) were 12.75%-36.40%, 2.93%-18.39% and 19.23%-54.58% in 43 batch of *D. officinale*. Almost all of the results except very few samples reached the *D*-mannose standard in Ch. P 2015, and the total content of *D*-mannose and *D*-glucose was also up to the total polysaccharide standard in Ch. P. The correlation between content and origin was not significant. The contents of *D*-mannose (C_m), *D*-glucose (C_g) and sum of them ($C_m + C_g$) were 14.33%-29.47%, 6.64%-15.20%, and 25.73%-44.37% in 12 batch of *D. huoshanense*. These contents and ratio of peak areas of *D*-mannose to *D*-glucose (A_m/A_g) were within the scope of *D. officinale*'s; in addition, their average contents were basically the same with those in *D. officinale* (about 33%). Next, naringenin showed a good linear relationship within the range of 0.020 8-0.832 0 μg ($r = 0.9999$), and its average recovery was 101.96% (RSD 1.8%). The content of naringenin was 0.053 2-0.122 4 mg · g⁻¹ (average value of 0.081 0 mg · g⁻¹) in 11 batch of *D. officinale*, slightly higher than 0.040 3-0.090 0 mg · g⁻¹ (average value of 0.068 3 mg · g⁻¹) in 7 batch of *D. huoshanense*. All of these results of narinhenin did not reach the content lower limit in Ch. P. **Conclusion:** The method used to determinate the content of *D*-mannose and *D*-glucose is reproducible, and their sum content is possible to substitute the total polysaccharide determination (with higher errors) in *D. officinale*; monosaccharide content determination can be used for quantitative quality control of *D. huoshanense*. However, it could not distinguish *D. officinale* and *D. huoshanense* by determining the contents of polysaccharide, *D*-glucose, *D*-mannose and narinhenin, and shall be combined with other specificity methods for further identification.

[Key words] *Dendrobium officinale*; *D. huoshanense*; *D*-glucose; *D*-mannose; naringenin; determination; HPLC

石斛始载于《神农本草经》，称其“主伤中，除痹，下气，补五脏虚劳羸瘦，强阴，久服厚肠胃，轻身延年。生山谷。”《名医别录》首载石斛“出六安水傍石上”，提示最早药用的石斛应是霍山石斛；陶弘景《本草经集注》记载“今用石斛出始兴”，提示铁皮石斛的应用历史也在 1 500 年以上^[1]。近年来石斛的保健功能日趋受到重视，铁皮石斛因其多糖含量高，人工栽培得到较大的发展，在全国多个省区（浙江、

云南、广西、广东、福建、江西等）形成了大规模的人工种植区域，2010 年版《中国药典》也将其单列。霍山石斛虽然应用历史最早，但因其资源局限分布于安徽省霍山县及邻近地区，加上霍山石斛独特的生长环境要求，以及历代的大量采挖，其野生资源日趋稀少，并未纳入《中国药典》。目前霍山石斛在安徽省霍山县及邻近地区有了一定的种植规模^[2]，对其质量开展系统研究势在必行。

现代化学成分及药理研究表明,铁皮、霍山石斛多糖类成分是石斛中含量最高的一种活性成分,具有抗肿瘤、免疫调节等药理作用^[3]。按照石斛药材传统的质量要求,“味甘,中实,嚼之粘齿,无渣者为优”的样品一般多糖含量较高。铁皮石斛因其多糖含量的优势以及与其他石斛质量的差异性,2010 和 2015 年版《中国药典》中含量指标包括比色法(苯酚-硫酸法)测定的总多糖含量限度以及酸水解柱前衍生高效液相色谱法(HPLC)测定的甘露糖含量限度,此外还在甘露糖含量方法条件基础上规定了甘露糖及葡萄糖的峰面积比值范围的检查项目^[4,5]。课题组前期对霍山石斛水提醇沉法获得的粗多糖进行酸水解柱前衍生 HPLC 特征图谱分析发现,霍山石斛单糖主要由甘露糖与葡萄糖组成,其他单糖组成非常少,与铁皮石斛类似^[6]。本文拟进一步从甘露糖与葡萄糖含量以及峰面积比值分析的角度对这两种石斛进行比较,看其异同以及药典铁皮石斛项下多糖与甘露糖含量方法是否适合霍山石斛含量测定。

课题组前期实验表明,苯酚-硫酸法测定铁皮石斛总多糖含量测定误差较大,主要影响因素除了显色误差外,还有供试品溶液制备方法造成的部分误差^[7]。而甘露糖 HPLC 含量测定方法则重复性较好,测定误差较小,在相同的供试品溶液及色谱方法条件下,葡萄糖的峰面积也相对较大,能达到含量测定的要求。但课题组前期还发现,在采用乙腈-0.02 mol·L⁻¹乙酸铵溶液等度洗脱的方法,葡萄糖色谱峰有时受色谱柱等色谱条件影响时容易与衍生试剂峰重叠。如采用梯度洗脱系统,葡萄糖色谱峰则能达到较好的分离度,符合含量测定要求。甘露糖与葡萄糖的含量之和接近比色法测定的总多糖含量,符合铁皮石斛多糖主要由甘露糖与葡萄糖组成的规律。因此,本研究在 2015 年版《中国药典》铁皮石斛甘露糖含量测定方法的基础上,优化流动相比例系统,在同一条件下同时测定甘露糖与葡萄糖的含量,通过测定多个产区 40 多批次铁皮石斛及 10 多批霍山石斛样品中甘露糖与葡萄糖的含量,分析两者含量之和是否基本能达到 2015 年版《中国药典》铁皮石斛总多糖的含量限度,探讨其代替总多糖含量的可行性。

除多糖作为定量指标外,国内研究者对石斛属药材中的黄酮苷元柚皮素含量也进行了一些研究。有文献^[8]报道 24 种石斛属植物 62 份样品中,有 20 种植物的 56 份样品能够检测到柚皮素,检出率

90.3%;部分来源铁皮石斛中柚皮素质量分数可达到 0.1 mg·g⁻¹ 以上甚至更高^[9-11];亦有报道霍山石斛中柚皮素含量比铁皮石斛的含量高^[12]。柚皮素是否可以作为铁皮石斛或霍山石斛的定量指标,两者的差异是否明显,尚待明确。因此,本研究根据文献柚皮素含量测定供试品溶液制备采用酸性溶媒^[9-10]或碱性溶媒^[11]可能造成差异的情况,优化供试品溶液制备方法以及色谱条件,探讨柚皮素作为铁皮石斛或霍山石斛的定量指标的可行性以及他们的含量差异。

本研究对多糖含量明显较高、最贵重的 2 种传统石斛进行柚皮素与多糖衍生水解后单糖(甘露糖、葡萄糖)含量测定的方法优化研究,探讨铁皮石斛与霍山石斛这两类成分的内在质量差异性,为其质量控制及鉴定提供依据。

1 材料

HP1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, DAD 检测器);LC-20AT(DAD)型高效液相色谱仪(日本岛津);MS-204S 型 1/1 万电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);HWS24 型电热恒温水浴锅, DHG-9245A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);TDZ4-WS 型离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)。1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)(阿拉丁试剂上海有限公司,批号 A1216009);乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);屈臣氏蒸馏水;其余试剂均为分析纯。对照品 D-葡萄糖(批号 110833-201205,纯度 ≥ 99%),D-甘露糖(批号 140651-200602,纯度 ≥ 99%),D-盐酸氨基葡萄糖(批号 140649-201606,纯度 ≥ 99%),均购自中国食品药品检定研究院;对照品柚皮素(批号 MUST-12041107,纯度 ≥ 98%),购自成都曼思特生物科技有限公司;铁皮石斛(编号 TP1 ~ TP44),霍山石斛(编号 HS1 ~ HS16),经广州中医药大学魏刚研究员鉴定系兰科铁皮石斛 *Dendrobium officinale*;霍山石斛 *D. huoshanense* 的茎,样品 HS1 ~ HS16 均来自安徽霍山;鲜品在 60 °C 条件下减压干燥,备用,来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 甘露糖与葡萄糖含量测定研究

2.1.1 对照品溶液的制备 取盐酸氨基葡萄糖适量,精密称定,加水制成每 1 mL 含 12 mg 的溶液,作为内标溶液。分别取甘露糖、葡萄糖对照品各约 8 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,精密加入内标溶液 1 mL,加适量水使溶解并稀释至刻度,摇匀。分

表 1 铁皮石斛样品来源

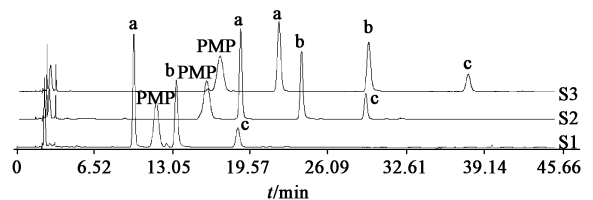
Table 1 Sources of *Dendrobium officinale*

编号	产地	编号	产地	编号	产地
TP1	广东韶关 1	TP19	浙江森山	TP37	广西玉林
TP2	广东韶关 2	TP20	浙江天台 1	TP38	广西玉林
TP3	江西井冈山	TP21	浙江 4	TP39	浙江牧歌
TP4	浙江武义 1	TP22	广东韶关	TP40	浙江森山
TP5	云南德宏	TP23	广东南雄	TP41	浙江
TP6	广西容县 1	TP24	广东韶关	TP42	浙江
TP7	广西桂平	TP25	广东河源	TP43	浙江
TP8	云南昆明 1	TP26	江西广昌	TP44	广东韶关
TP9	云南昆明 2	TP27	江西井冈山	TP45	浙江天台
TP10	浙江 3	TP28	江西会昌	TP46	浙江永康
TP11	浙江温州	TP29	福建冠豸山	TP47	云南昆明
TP12	广西容县 2	TP30	福建	TP48	浙江武义
TP13	云南	TP31	福建武夷山	TP49	云南
TP14	广东韶关 3	TP32	湖南铁掌峰	TP50	福建冠豸山
TP15	浙江永康 1	TP33	云南	TP51	福建
TP16	浙江 1	TP34	云南	TP52	江西井冈山
TP17	浙江武义 4	TP35	云南	TP53	江西会昌
TP18	广东韶关 5	TP36	云南	TP54	江西会昌

别吸取 400 μL , 加 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PMP 甲醇溶液与 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液各 400 μL , 混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 100 min。再加 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 500 μL , 混匀, 用三氯甲烷洗涤 3 次, 每次 2 mL, 弃去三氯甲烷液, 水层即得混合对照品溶液。按相同方法取甘露糖、葡萄糖对照品各约 10, 12 mg 得到 3 种不同浓度的混合对照品溶液。另外不加入甘露糖、葡萄糖、内标溶液, 同法制备一份空白对照液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取药材粉末(过三号筛)约 0.12 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加 80% 乙醇适量, 加热回流提取 4 h, 弃去乙醇液, 药渣挥干乙醇, 滤纸筒拆开置于烧杯中, 加水 100 mL, 再精密加入内标溶液 2 mL, 煎煮 1 h 并时时搅拌, 放冷, 加水补至约 100 mL, 混匀, 离心, 备用。吸取上述样品上清液 1 mL, 置安瓿瓶或顶空瓶中, 加 3.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 0.5 mL, 封口, 混匀, 110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 60 min, 放冷, 用 3.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液调节 pH 至中性, 备用。吸取 400 μL , 加 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PMP 甲醇溶液与 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液各 400 μL , 混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 100 min。再加 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 500 μL , 混匀, 用三氯甲烷洗涤 3 次, 每次 2 mL, 弃去三氯甲烷液, 水层离心后, 取上清液, 即得。

2.1.3 色谱条件筛选 在 2015 年版《中国药典》铁皮石斛项下甘露糖含量测定项下色谱条件基础上进行流动相乙腈(A)-0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(B)比例的筛选。采用常规流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长为 250 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。图 1 为 Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)条件下, 不同流动相比比例的图谱, S1 为 2015 年版《中国药典》项下等度洗脱方法, A 为 20%; S2 为梯度洗脱(0 ~ 5 min, 16% A; 5 ~ 17 min, 16% ~ 19% A; 17 ~ 30 min, 19% ~ 22% A, 30 ~ 35 min, 22% ~ 16% A); S3 亦为梯度洗脱(0 ~ 45 min, 15% ~ 20% A)。结果提示采用 2015 年版《中国药典》项下流动相比比例, PMP 峰在甘露糖与内标物峰之间, 但系统因其他因素影响时, 有时 PMP 峰容易与目标峰的分度达不到 1.5 的要求。而采用梯度洗脱, 虽延长了目标峰保留时间, 但 PMP 峰在前面出峰, 不会对目标峰造成影响, 因此采用 S2 的流动相系统。进一步采用另外一种 Agilent ZORBAX Eclipse XDB C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)验证了方法的可行性, 结果见图 2。



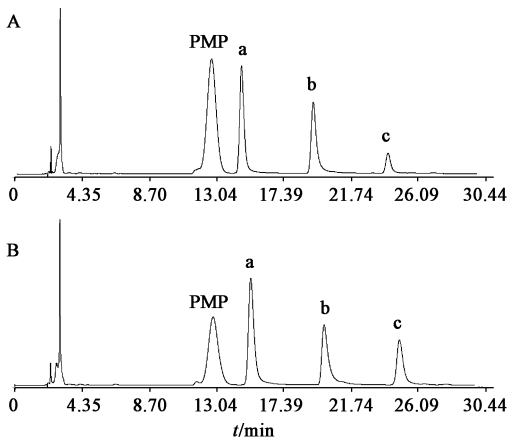
a. 甘露糖; b. 内标物; c. 葡萄糖

图 1 不同流动相比比例的铁皮石斛 HPLC (Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱)

Fig. 1 HPLC of different mobile phase in *Dendrobium officinale* (Kromasil 100-5 C_{18} column)

2.1.4 校正因子的计算 分别取 2.1.1 项下 3 种浓度的甘露糖、葡萄糖混合对照品溶液各 10 μL , 按拟定的色谱条件, 分别测定甘露糖、葡萄糖、内标物的峰面积, 结果甘露糖、葡萄糖的平均校正因子分别为 0.983, 1.019, RSD 分别为 2.9%, 2.9%。

2.1.5 线性关系考察 分别取甘露糖、葡萄糖对照品各 30 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 制成甘露糖、葡萄糖对照品储备液(3.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。分别利用对照品储备液制成甘露糖、葡萄糖系列对照品溶液。精密吸取各浓度甘露糖、葡萄糖对照品溶液各 1 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 精密加入盐酸氨基葡萄糖内标溶液(12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.1 mL, 加水稀释刻度, 即得系列混合对照溶液。精密吸取上述混合对照品溶液按照对照品溶液制备



A. 铁皮石斛 (TP14); B. 霍山石斛 (HS1); a. 甘露糖峰; b. 内标物峰; c. 葡萄糖峰

图 2 铁皮石斛与霍山石斛 HPLC (XDB C₁₈ 色谱柱)

Fig. 2 HPLC of *Dendrobium officinale* and *D. huoshanense* (XDB C₁₈ column)

方法依法操作,取上清液 10 μL,注入液相色谱仪。分别以甘露糖峰面积 (A_m) 或葡萄糖峰面积 (A_g) 与盐酸氨基葡萄糖内标峰面积 (A_s) 比值为纵坐标,甘露糖或葡萄糖对照品进样量 (μg) 为横坐标 X ,结果甘露糖的回归方程为 $A_m/A_s = 1.008 3X - 0.020 2$ ($r=0.999 9$),在 0.075 ~ 2.99 μg 线性关系良好;葡萄糖的回归方程为 $A_g/A_s = 0.951 2X - 0.003 1$ ($r=0.999 9$),葡萄糖在 0.076 ~ 3.02 μg 线性关系良好。

2.1.6 精密度性试验 精密吸取同一批铁皮石斛供试品溶液 (TP1) 10 μL,连续进样 6 次,记录峰面积,结果 6 次检测结果甘露糖平均峰面积为 2 458.9, RSD 0.2%,葡萄糖平均峰面积为 881.8, RSD 0.2%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一批铁皮石斛供试品溶液 (TP1) 10 μL,按 2.1 项下,于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 分别进样,记录峰面积,结果甘露糖平均峰面积为 2 454.6, RSD 0.2%,葡萄糖平均峰面积为 881.2, RSD 0.3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 精密吸取同一批铁皮石斛供试品溶液 (TP1) 10 μL,平行 6 份,依法进样分析,记录峰面积,结果甘露糖平均质量分数为 24.44%, RSD 1.1%,葡萄糖平均质量分数为 8.24%, RSD 2.8%,表明方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 称取 6 份已知含量的铁皮石斛样品 (TP1),每份约 0.06 g,精密称定,分别加入一定量的对照品,按供试品溶液方法制备,

依法进样测定,记录峰面积,计算回收率,结果见表 2。

表 2 铁皮石斛中甘露糖、葡萄糖含量测定加样回收率试验 ($n=6$)
Table 2 Recovery test of mannose and glucose in *Dendrobium officinale* ($n=6$)

成分	称样量 /mg	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
甘露糖	60.80	14.86	15.16	30.52	103.32	101.69	2.0
	60.13	14.70	15.16	30.15	101.96		
	61.13	14.94	15.16	30.12	100.15		
	59.15	14.46	15.16	30.11	103.25		
	60.05	14.68	15.16	30.27	102.89		
	61.68	15.07	15.16	30.02	98.58		
葡萄糖	60.80	5.01	6.15	11.30	102.28	99.01	2.1
	60.13	4.95	6.15	11.00	98.29		
	61.13	5.04	6.15	11.14	99.25		
	59.15	4.87	6.15	11.01	99.74		
	60.05	4.95	6.15	11.00	98.41		
	61.68	5.08	6.15	10.99	96.09		

2.1.10 样品含量测定及峰面积比值分析 精密吸取铁皮石斛、霍山石斛供试品溶液各 10 μL 依法进样测定,记录甘露糖色谱峰、葡萄糖色谱峰和内标峰面积,以内标法计算各样品中甘露糖含量 (C_H),葡萄糖含量 (C_G),并计算两者含量之和 ($C_H + C_G$),同时分析甘露糖与葡萄糖峰面积比值 (A_H/A_G),结果见表 3。

2.2 柚皮素含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 取柚皮素对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含柚皮素 41.6 μg 的对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液制备 取石斛粉末 (过四号筛) 1.0 g,精密称定,置 500 mL 的圆底烧瓶中,加入 80% 甲醇 100 mL,置水浴中加热回流 4 h,取出,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加 80% 甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 色谱条件 采用 Kromalil 100-5 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A)-甲醇 (B)-0.4% 磷酸溶液 (C),梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 10% ~ 15% A, 10% ~ 15% B; 10 ~ 30 min, 15% ~ 23% A, 15% ~ 23% B; 30 ~ 35 min, 23% ~ 24% A, 23% ~ 24% B; 35 ~ 45 min, 24% ~ 25% A, 24% ~ 25% B); 流速 0.8 mL · min⁻¹; 柱温 40 °C; 检测波长

表 3 铁皮石斛与霍山石斛中甘露糖、葡萄糖含量及峰面积比值

Table 3 Determination and ratio of peak area results of mannose and glucose in *Dendrobium officinale* and *Dendrobium huoshanense*

编号	$C_{\text{甘}}/\%$	$C_{\text{葡}}/\%$	$C_{\text{甘}} + C_{\text{葡}}/\%$	$A_{\text{甘}}/A_{\text{葡}}$	编号	$C_{\text{甘}}/\%$	$C_{\text{葡}}/\%$	$C_{\text{甘}} + C_{\text{葡}}/\%$	$A_{\text{甘}}/A_{\text{葡}}$
TP1	24.44	8.24	32.68	3.07	TP29	16.54	3.01	19.55	5.42
TP2	22.32	8.92	31.24	2.59	TP30	21.10	9.31	30.41	2.20
TP3	19.05	9.09	28.14	2.17	TP31	17.79	6.14	23.93	2.85
TP4	27.93	8.59	36.52	3.37	TP32	22.04	6.70	28.74	3.24
TP5	17.43	4.24	21.67	4.26	TP33	32.65	9.29	41.94	3.45
TP6	26.68	14.01	40.69	1.97	TP34	26.96	6.44	33.40	4.12
TP7	18.72	9.02	27.74	2.15	TP35	26.01	4.54	30.55	5.63
TP8	31.41	9.54	40.95	3.41	TP36	23.75	6.62	30.37	3.52
TP9	24.15	17.01	41.16	1.47	TP37	19.70	2.93	22.63	6.62
TP10	21.57	6.94	28.51	3.22	TP38	34.89	7.41	42.30	4.63
TP11	26.71	10.70	37.41	2.59	TP39	29.76	14.20	43.96	2.06
TP12	34.98	12.90	47.88	2.81	TP40	26.05	4.38	30.43	5.79
TP13	36.19	18.39	54.58	2.04	TP41	27.12	7.64	34.76	3.49
TP14	25.31	7.86	33.17	3.34	TP42	20.64	5.60	26.24	3.58
TP15	17.69	7.03	24.72	2.61	TP43	25.55	14.02	39.57	1.77
TP16	32.60	6.65	39.25	5.09	HS1	21.59	6.64	28.23	3.69
TP17	15.97	3.26	19.23	5.08	HS2	23.01	10.51	33.52	2.47
TP18	36.40	3.38	39.78	3.38	HS3	23.38	11.64	35.02	2.28
TP19	20.82	9.22	30.04	2.34	HS4	16.08	9.65	25.73	1.90
TP20	20.20	7.24	27.44	2.89	HS5	23.79	12.15	35.94	2.24
TP21	12.75	9.47	22.22	1.40	HS6	23.38	14.05	37.44	1.88
TP22	28.00	9.57	37.57	2.85	HS7	24.40	12.34	36.74	2.25
TP23	18.02	9.78	27.80	1.79	HS8	23.76	11.90	35.66	2.32
TP24	22.42	6.60	29.02	3.34	HS9	29.47	14.90	44.37	2.29
TP25	24.94	6.87	31.81	3.57	HS10	20.31	7.10	27.41	3.23
TP26	22.29	8.40	30.69	2.61	HS11	23.82	11.58	35.40	2.06
TP27	28.84	7.23	36.07	3.92	HS13	14.33	15.20	29.53	0.94
TP28	29.21	7.75	36.96	3.70					

设定 290 nm。结果分离度良好,见图 3。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取上述柚皮素对照品溶液(1 mL 含柚皮素 41.6 μg)0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL, 按拟定色谱条件进样分析, 测定峰面积。以进样量为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得柚皮素的回归方程 $Y = 4\ 254.2X + 2.923\ 4$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 0.020 8 ~ 0.832 μg。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一铁皮石斛供试品溶液(TP44)20 μL, 重复进样 6 次, 结果柚皮素平均峰面积为 1 579.63, RSD 1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一铁皮石斛供试品溶液(TP44)20 μL, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 结果柚皮素平均峰面积为 1 560.38, RSD 1.4%, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

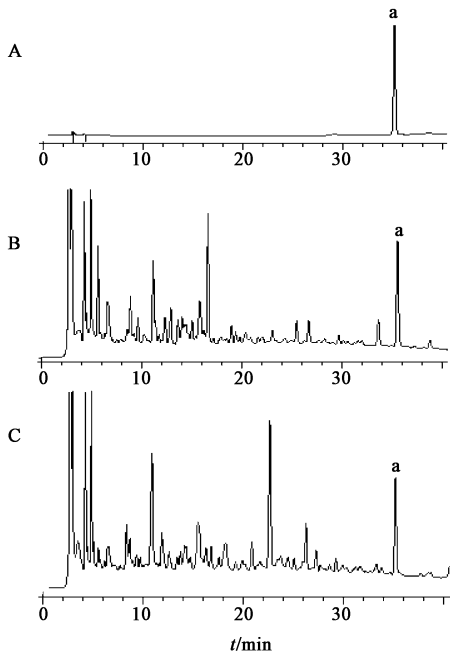
2.2.7 重复性试验 取同一铁皮石斛供试品溶液(TP44)6 份, 分别制备供试品溶液, 进样分析, 按外标法计算含量, 结果柚皮素的平均质量分数为 0.113 6 mg·g⁻¹, RSD 2.9%, 表明方法重复性良好。

2.2.8 准确度试验 取已含量铁皮石斛样品(TP44)0.5 g, 精密称定, 分别一定量加入约与药材等量的对照品溶液, 平行制备 6 份, 测定, 计算加样回收率, 结果见表 4。

2.2.9 样品的测定 精密吸取铁皮石斛、霍山石斛供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算含量, 结果见表 5。

3 讨论

3.1 甘露糖与葡萄糖含量测定分析 曾采用 2015 年版《中国药典》铁皮石斛项下苯酚-硫酸法测定多糖含量, 但实验过程发现影响因素很多, 主要原因有



A. 对照品; B. 铁皮石斛; C. 霍山石斛; a. 柚皮素峰

图 3 铁皮石斛与霍山石斛中柚皮素 HPLC

Fig. 3 HPLC of narinhenin content in *Dendrobium officinale* and *Dendrobium huoshanense*

表 4 铁皮石斛中柚皮素含量测定加样回收率试验

Table 4 Recovery test of narinhenin in *Dendrobium officinale*

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.478 0	0.054 30	0.116 3	99.35	101.96	1.8
0.513 3	0.058 31	0.123 2	104.06		
0.499 7	0.056 77	0.120 7	102.42		
0.495 4	0.056 28	0.119 2	100.88		
0.480 2	0.054 55	0.117 8	101.33		
0.511 3	0.058 08	0.122 8	103.71		

注: 加入量均为 0.062 4 mg。

供试品溶液制备过程离心程度不够, 有时多糖部分沉淀成絮状悬浮于液面, 在除去上清液过程中易造成损失; 还有从加显色剂到测定吸光度的放置时间的差异也是造成误差的重要原因。在提高了离心转速以减少损失以及严格控制吸光度测定过程误差后, 测定结果的 RSD 也常 > 5.0%。

2015 年版《中国药典》铁皮石斛甘露糖含量测定项下采用乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液等度洗脱的方法, 研究发现, 葡萄糖色谱峰有时受不同型号色谱柱、柱效、供试品溶液衍生试剂去除程度的影响, 容易与衍生试剂峰重叠, 有时也有拖尾现象。而改为梯度洗脱系统, 葡萄糖色谱峰则能达到较好的分离度, 相同的供试品溶液及色谱方法条件下, 葡萄糖的峰面积也相对较大, 能达到含量测定的要求。

表 5 铁皮石斛与霍山石斛中柚皮素质量分数

Table 5 Determination results of narinhenin in *Dendrobium officinale* and *D. huoshanense*

样品编号	柚皮素/mg·g ⁻¹	样品编号	柚皮素/mg·g ⁻¹
HS1	0.040 3	TP46	0.122 4
HS11	0.090 0	TP47	0.070 1
HS12	0.060 0	TP48	0.065 2
HS13	0.062 8	TP49	0.053 2
HS14	0.084 3	TP50	0.079 3
HS15	0.055 8	TP51	0.098 7
HS16	0.084 8	TP52	0.065 2
TP44	0.111 7	TP53	0.091 8
TP45	0.055 5	TP54	0.077 8

方法学研究表明重复性较好, 通过不同型号色谱柱 (Kromasil 100-5 C₁₈, Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈), 流速, 柱温的比较, 也证明方法的耐用性较好。

经几批次苯酚-硫酸法测定的总多糖含量与酸水解柱前衍生法 HPLC 法测定单糖含量之和进行比较, 结果甘露糖与葡萄糖含量之和接近总多糖含量, 符合铁皮石斛的多糖主要由甘露糖与葡萄糖组成的规律。经过 40 多批样品的测定, 除极少数样品外, 甘露糖质量分数在 12.75% ~ 36.40% (均值为 24.59%), 葡萄糖质量分数在 2.93% ~ 18.39% (均值为 8.28%) 基本符合 2015 年版《中国药典》甘露糖含量限度要求, 甘露糖与葡萄糖质量分数之和在 19.23% ~ 54.58% (均值为 32.88%) 以及峰面积比值在 1.40% ~ 6.62% 也接近总多糖含量限度要求, 而含量与产区的相关性不显著。而 12 批霍山石斛的甘露糖质量分数在 14.33% ~ 29.47% (均值为 22.28%), 葡萄糖质量分数在 6.64% ~ 15.20% (均值为 11.47%), 质量分数之和在 25.73% ~ 44.3% (均值为 33.75%) 以及峰面积比值在 0.94% ~ 3.69% 基本也落在铁皮石斛范围期间, 平均含量也基本与铁皮石斛一致, 约 33%, 说明霍山石斛与铁皮石斛在多糖质量上的相似性。采用优化后的甘露糖与葡萄糖 HPLC 含量测定方法, 以两者的含量之和替代误差大的总多糖含量测定指标, 作为铁皮石斛与霍山石斛的定量质控指标均具有可行性。但依据 2 种石斛的总多糖含量、水解后的单糖含量或峰面积比值, 则无法区分铁皮石斛与霍山石斛。

3.2 柚皮素含量测定分析 柚皮素是石斛属药材含量较高的黄酮苷元, 含量测定检测波长有 290,

280, 310, 270, 226 nm 等^[9-13], 经试验在 290 nm 有最大吸收, 因此选择 290 nm 为检测波长。试验曾采用甲醇-0.2% 磷酸作为流动相系统^[9], 柚皮素附近有杂质峰干扰, 导致峰面积偏大, 含量偏高。通过筛选改为乙腈-甲醇-0.4% 磷酸梯度系统的三元系统能较好地排除杂质峰干扰。

供试品溶液的制备比较了甲醇-20% 盐酸(4:1)的混合溶液^[9], 甲醇^[13], 80% 甲醇等不同溶媒不同回流时间的提取效果, 结果显示采用甲醇-20% 盐酸(4:1)混合水溶液回流 1, 2, 3 h 的含量不稳定, 回流时间与含量未呈现正相关的规律。而采用甲醇, 80% 甲醇为溶媒, 回流时间与含量呈现正相关, 回流 4 h 的提取效果明显优于 2 h, 说明柚皮素提取率与提取时间有直接关系, 回流 4 h 可提取完全, 80% 甲醇与甲醇提取效果基本一致, 因此, 确定 80% 甲醇为溶媒回流时间 4 h 的方法。

本研究测得的铁皮石斛的柚皮素质量分数为 0.053 2 ~ 0.122 4 mg·g⁻¹, 霍山石斛含量也落在铁皮石斛含量范围内, 两者无显著性差异。含量范围与文献报道的结果有一定差异, 而不同文献测定的结果差异也较大, 提示石斛中柚皮素含量除了与测定方法的差异有关外, 主要与样品来源差异有关。除了测定了多批次铁皮石斛与霍山石斛含量外, 本研究也对 2015 年版《中国药典》收录的石斛及一些主要的常用石斛中的柚皮素含量也进行比较, 结果显示铁皮石斛柚皮素含量除比安徽产的细茎石斛含量稍低外, 基本高于齿瓣石斛、金钗石斛、流苏石斛 3 种石斛中的含量, 而鼓槌石斛则未检出柚皮素。由于柚皮素在多种多糖含量较高的贵重石斛中缺乏专属性, 而且其含量与多糖含量之间的相关性不明显, 总体含量亦未达到 0.02% 的含量限度要求, 尚未能达到作为质量标准定量指标的常规标准要求, 但可作为质量控制的参考。

3.3 铁皮石斛与霍山石斛专属性分析 通过上述研究结果提示, 多糖含量、水解后的单糖含量与柚皮素含量均缺乏专属性, 铁皮石斛含量与产区的相关性不显著, 无法区分铁皮石斛种源, 也未能与霍山石斛进行区别, 需结合其他专属性方法方能更好地对两种石斛进行区别。本课题组发现铁皮石斛黄酮类成分具有种源差异性^[14-15], 霍山石斛黄酮苷类成分也较为丰富^[16-17], 2 种石斛具有相似的黄酮苷类成分, 能否从黄酮类成分角度达到有效鉴别两种石斛的目的, 有待于后续研究。

[参考文献]

[1] 魏刚, 顺庆生, 杨明志. 石斛求真——中国药用石斛之历史、功效、真影与特征指纹图谱[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2014: 3-19.

[2] 魏刚, 顺庆生, 李名海, 等. 中华仙草——霍山石斛[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2015: 203.

[3] 罗宇琴, 肖苏萍, 赵润怀, 等. 霍山石斛与铁皮石斛对比研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(8): 1067-1070, 1080.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 265-266.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 282.

[6] 黄月纯, 叶家宏, 戴亚峰, 等. 霍山石斛与美花石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱比较[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(6): 725-730.

[7] 甘小娜, 徐英, 徐红, 等. 铁皮石斛中多糖和甘露糖含量测定方法的改进及与齿瓣石斛的比较研究[J]. 中国药品标准, 2014, 15(4): 276-279.

[8] 陈晓梅, 王芳菲, 王云强, 等. 基于柚皮素、联苕和多糖分析的珍贵药用植物铁皮石斛鉴别分析[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(12): 1002-1009.

[9] 周桂芬, 陈素红, 吕圭源, 等. 高效液相色谱法测定铁皮石斛中柚皮素的含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 520-523.

[10] 周天策. 高效液相色谱法测定铁皮石斛中柚皮素的含量[J]. 黑龙江科技信息, 2016(22): 129.

[11] 王少平, 孙乙铭, 姜艳, 等. 基于指纹图谱及柚皮素含量对铁皮石斛及伪品的鉴定[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(12): 2199-2205.

[12] 孟海涛. 安徽霍山产三种石斛 HPLC 化学指纹研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2015.

[13] 叶子, 卢叶, 薛亚甫, 等. 铁皮石斛专属性成分的分离制备及质量标准研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2481-2486.

[14] 魏刚, 顺庆生, 黄月纯, 等. 3 种铁皮石斛种源 HPLC 特征图谱比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(4): 467-471.

[15] 黄月纯, 谢镇山, 任晋, 等. 3 种种源铁皮石斛叶黄酮类成分 HPLC 特征图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 37-40.

[16] 魏刚, 顺庆生, 戴亚峰, 等. 霍山石斛 HPLC 特征图谱研究[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2642-2644.

[17] WU C F, GUI S H, HUANG Y C, et al. Characteristic fingerprint analysis of *Dendrobium huoshanense* by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. Anal Meth, 2016, 8(18): 3802-3808.

[责任编辑 顾雪竹]