

## 铁皮石斛中 10 种黄酮类成分 UPLC-MS/MS 测定与多糖组成含量分析

吕朝耕<sup>1,2</sup>, 杨健<sup>1,2</sup>, 康传志<sup>1,2</sup>, 李振皓<sup>3</sup>, 马忠华<sup>4</sup>, 郭兰萍<sup>1\*</sup>, 王燕萍<sup>5</sup>

(1. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 中药资源中心无限极中药品质研究联合实验室, 北京 100700;

3. 浙江寿仙谷珍稀植物药研究院, 浙江 武义 321200;

4. 无限极(中国)有限公司, 广州 510623;

5. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 建立超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(UPLC-MS/MS)同时测定铁皮石斛中 10 个黄酮类成分的方法, 比较不同产地铁皮石斛黄酮类成分的含量差异, 并结合药典指标进行系统聚类综合分析。方法: 黄酮类成分测定采用 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B) 溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40 ℃, 采用电喷雾离子源, 负离子检测方式, 得到相应的提取离子流图, 以峰面积进行定量。结果: 10 种黄酮类成分具有良好的线性关系, *r* 值均 > 0.998 5, 方法精密度、重复性和稳定性的 RSD 均 < 3%, 加样回收率在 96.6% ~ 104.7%, RSD 均 < 3.5%。测定结果显示不同产地铁皮石斛中黄酮类成分在组成和含量上存在较大差异; 14 批样品多糖、甘露糖含量均符合药典标准。结论: 所建立的方法操作简便、准确、重复性好, 可用于铁皮石斛药材中黄酮类成分的定量测定, 测定结果结合《中国药典》指标可为该药材质量标准的完善提供依据。

**[关键词]** 铁皮石斛; 黄酮; 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱; 多糖

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0047-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170047

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170612.1009.022.html>

**[网络出版时间]** 2017-06-12 10:09

## Determination of 10 Flavonoids by UPLC-MS/MS and Analysis of Polysaccharide Contents and Compositions in *Dendrobii* *Officinalis Caulis* from Different Habitats

LYU Chao-geng<sup>1</sup>, YANG Jian<sup>1</sup>, KANG Chuan-zhi<sup>1</sup>, LI Zhen-hao<sup>2</sup>, MA Zhong-hua<sup>3</sup>,  
GUO Lan-ping<sup>1\*</sup>, WANG Yan-ping<sup>5</sup>

(1. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,  
State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China;

2. Joint Laboratory for the Research of Chinese Herbal Quality - China Academy of Chinese Medical Science's  
National Resource Center for Chinese Materia Medica and infinitus, Beijing 100700, China;

3. Zhejiang Shouxiangu Pharmaceutical Co. Ltd., Wuyi 321200, China;

4. Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510623, China;

5. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of  
Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[收稿日期]** 20170315(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81325023, 81473307); 财政部中央本级专项(2060302); 发改委标准化项目(ZYBZH-C-HLJ-17); 浙江特色药材质量特色研究及标准制定项目(ZH2016004); 浙江省重点研发项目(2017C02011); 优势特色领域重要国际标准研究项目(2016YFF02012802)

**[第一作者]** 吕朝耕, 在读硕士, 从事中药标准化研究, Tel: 010-64087524, E-mail: lcgfm@126.com

**[通讯作者]** \* 郭兰萍, 研究员, 从事中药资源学研究, Tel: 010-64011944, E-mail: glp01@126.com

**[Abstract]** **Objective:** To establish an ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry ( UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of ten flavonoids in *Dendrobii Officinalis Caulis* and compare the flavonoids and polysaccharide contents in samples from different habitats. **Method:** The determination was carried out by an ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> ( 2.1 mm × 100 mm , 1.8 μm ) , with 0.1% formic acid-water ( A ) and 0.1% formic acid-acetonitrile ( B ) as mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.6 mL·min<sup>-1</sup> , and the column temperature was 40 °C. MS instrument was equipped with ESI<sup>-</sup> ion source , and the extracted ion chromatograms were obtained with negative ion detection mode , quantified by using peak area. **Result:** The ten flavonoid components had good linearity ,  $r > 0.998 5$  , and the precision , repeatability , stability and accuracy of the established method were well-validated , RSD < 3% . The recovery was 96.6% -104.7% , RSD < 3.5% . The results showed that there were significant differences in the composition and content of flavonoids in *Dendrobii Officinalis Caulis* from different habitats; the contents of polysaccharide and mannose in the 14 batches of samples were consistent with the pharmacopoeia standards. **Conclusion:** The established method is proved to be rapid , accurate and sensitive for the determination of flavonoids content in *Dendrobii Officinalis Caulis*. Moreover , the quantitative results combined with *Chinese Pharmacopoeia* indexes may provide basis or the improvement of quality standards of this herbal medicine.

**[Key words]** *Dendrobii Officinalis Caulis*; flavonoids; UPLC-MS/MS; polysaccharide

铁皮石斛是我国传统名贵中药 ,为历代医家所推崇<sup>[1]</sup>。现代研究发现 ,石斛类药材中含有生物碱、黄酮、芳香类、有机酸和多糖等多种活性成分<sup>[2]</sup> ,具有免疫调节、降血糖、抗肿瘤等作用<sup>[3-4]</sup>。近年来 ,随着铁皮石斛人工栽培产业的发展 ,市场中铁皮石斛产品不断增多 ,同时也出现了产品质量参差不齐 ,以次充好的现象 ,因此铁皮石斛质量评价相关研究引起了业界、学界的重视。现标准多以多糖含量和单糖组成作为评价指标 ,难以准确鉴别药材来源和全面反映产品质量 ,寻找特异性指标成分成为当前进一步完善铁皮石斛评价标准的关键<sup>[5-6]</sup>。

研究表明 ,铁皮石斛中含有多种黄酮类成分<sup>[2]</sup> ,提示可从黄酮类成分着手进行铁皮石斛质量评价方式的探索。如黄月纯等<sup>[7]</sup>利用黄酮类成分 HPLC 指纹图谱开展了铁皮石斛不同部位比较研究 ,陈晓梅等<sup>[6]</sup>发现柚皮素结合联苕和多糖可以进行铁皮石斛品种鉴别 ,周桂芬等<sup>[8]</sup>建立了高效液相色谱测定铁皮石斛中柚皮素含量的方法等。但现有报道多为定性研究或单一成分的定量测定 ,主要在于铁皮石斛来源的真伪鉴别 ,而在质量评价相关方面的定量研究较少。

本研究旨在相关研究基础上建立一种利用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱( UPLC-QQQ-MS/MS)同时测定铁皮石斛中多种黄酮类成分含量的方法 ,可为进一步了解铁皮石斛的药效物质基础提供途径 ,并结合黄酮类成分与多糖类成分进行定量分析 ,为铁皮石斛的质量评价提供科学参考。

## 1 材料

于 2015 年 10 月至 2016 年 4 月间收集不同产地铁皮石斛样品 14 批( 表 1 )。所有样品由中国中医科学院中药资源中心郝近大研究员鉴定为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的茎。

表 1 铁皮石斛样品信息

Table 1 Information of *Dendrobii Officinalis Caulis* samples

No.	产地	No.	产地
ofc-1	广东韶关 a	ofc-8	浙江乐清 a1
ofc-2	广东韶关 b	ofc-9	浙江乐清 a2
ofc-3	广西玉林	ofc-10	浙江乐清 b
ofc-4	广西西林	ofc-11	浙江天台 a
ofc-5	浙江宁波	ofc-12	浙江天台 b
ofc-6	浙江武义 a	ofc-13	云南文山
ofc-7	浙江武义 b	ofc-14	贵州施秉

注: 表中 a、b 为来源于不同石斛产业公司的样品; a1、a2 为来源于同一石斛产业公司不同基地的样品。

ACQUITY 系列 UPLC<sup>TM</sup> I-Class 系统( 美国 Waters 公司 ,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和 Empower<sup>TM</sup> 3 色谱工作站 ) ,API6500 型四级杆-线性离子阱质谱仪( 美国 ABSciex 公司 ,配有离子喷雾接口 ) ,DHG-9145AZ 型电热干燥箱( 上海恒科仪器有限公司 ) , MM 400 型混合型球磨仪( 德国 Retsch 公司 ) ,New Classic MS-S 型 1/10 万电子天平 [梅特勒-托利多 ( 上海 ) 有限公司 ] ,SB-800 DTD 型超声波清洗器

(宁波新芝生物科技股份有限公司) 5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司)。

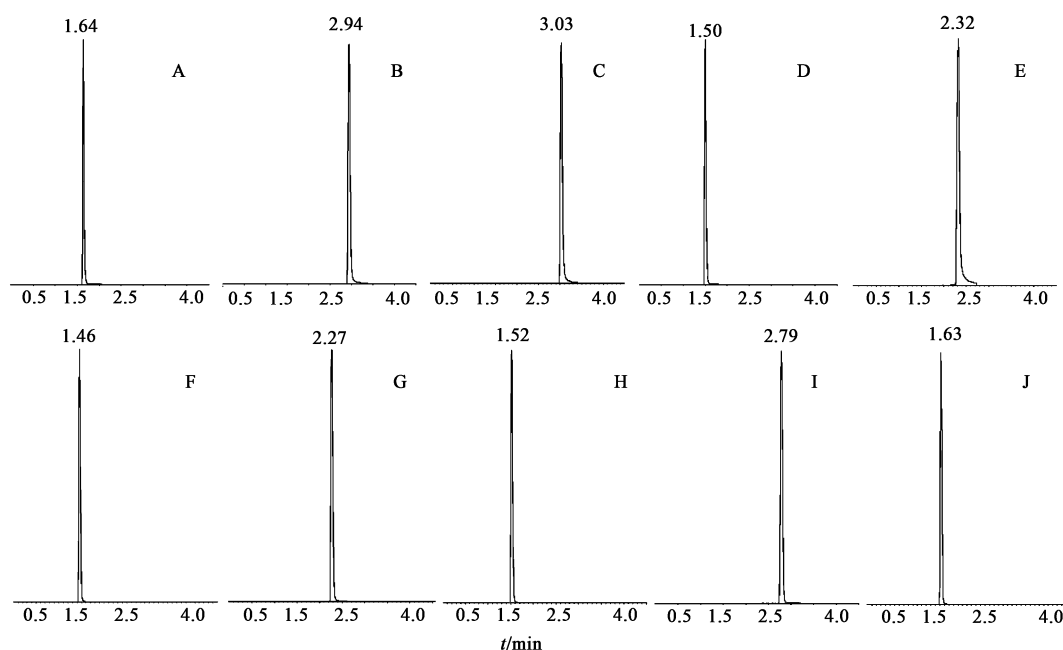
对照品柚皮苷(批号 K21F3C1, 纯度 $\geq 98\%$ ) 购自上海源叶生物科技公司; 槲皮素(批号 15011616, 纯度 $\geq 97\%$ ) , 异鼠李素(批号 15122133, 纯度 $\geq 98\%$ ) , 芹菜素(批号 15012031, 纯度 $\geq 98\%$ ) , 圣草酚(批号 15081824, 纯度 $\geq 97\%$ ) , 紫杉叶素(批号 15031341, 纯度 $\geq 98\%$ ) , 金丝桃苷(批号 15092110, 纯度 $\geq 98\%$ ) 购自上海同田生物技术股份有限公司; 金圣草黄素(批号 150701, 纯度 $\geq 98\%$ ) 购自北京索莱宝科技有限公司; 柚皮素(批号 K1502023, 纯度 $\geq 98\%$ ) 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; 芦丁(批号 MUST-12040302, 纯度 $\geq 98\%$ ) 购自成都曼斯特生物科技有限公司。甲醇和乙腈(色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 甲酸(LC-MS 分析用, 美国 Fisher Scientific 公司); 0.22  $\mu\text{m}$  PTFE 滤膜(天津津腾实验设备有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 铁皮石斛材料处理** 取新鲜铁皮石斛样品, 去除叶片, 洗净后剪成约 1 cm 小段, 低温烘干, 打粉, 过 40 目筛, 干燥器中保存。

**2.2 供试品溶液制备** 取干燥样品粉末 0.1 g, 精密称定, 置 2.0 mL 离心管中; 加入 80% 甲醇 1.5 mL, 密封, 称定质量, 超声提取(功率 250 W, 频率 40 kHz) 40 min; 放冷, 再称定质量, 以 80% 甲醇补足减失的质量; 1 万  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 续滤液为供试品溶液。

**2.3 色谱条件** Waters ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) , 流动相 0.1% 甲酸水(A) - 0.1% 甲酸乙腈(B) 梯度洗脱(0 ~ 1 min, 5% ~ 25% B; 1 ~ 3.5 min, 25% ~ 40% B; 3.5 ~ 4.5 min, 40% ~ 50% B) , 流速 0.60  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  , 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$  , 进样量 1.0  $\mu\text{L}$ 。10 种黄酮类成分提取离子流图(XIC) 见图 1。



A. 芹菜素; B. 金圣草黄素; C. 异鼠李素; D. 金丝桃苷; E. 槲皮素; F. 芦丁; G. 圣草酚; H. 异斛皮苷; I. 柚皮素; J. 紫杉叶素

图 1 石斛样品中 10 种黄酮类成分的提取离子流

Fig. 1 XIC chromatograms of 10 batches *Dendrobii Officinalis Caulis* samples

**2.4 质谱条件** 离子源 Turbo V, 电离模式  $\text{ESI}^-$  , 采集方式 MRM, 离子化温度 550  $^{\circ}\text{C}$  , 喷雾电压 -4 500 V, 喷雾气(GS1) 压力 379.1 kPa, 辅助加热气(GS2) 压力 379.2 kPa, 气帘气(CUR) 206.8 kPa, 其余优化的条件参数见表 2。

**2.5 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取各对照品适量, 加入甲醇配成单一成分对照品储备液, 摇匀。精密量取上述对照品储备液适量, 加甲醇配制

成每 1 mL 含芹菜素 0.638  $\mu\text{g}$  , 柚皮素 5.933  $\mu\text{g}$  , 圣草酚 1.018  $\mu\text{g}$  , 金圣草黄素 0.222  $\mu\text{g}$  , 槲皮素 0.233  $\mu\text{g}$  , 紫杉叶素 0.201  $\mu\text{g}$  , 异鼠李素 0.653  $\mu\text{g}$  , 金丝桃苷 0.612  $\mu\text{g}$  , 异槲皮苷 0.485  $\mu\text{g}$  , 芦丁 17.843  $\mu\text{g}$  的混合对照品溶液。放置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱, 备用。

## 2.6 方法学考察

**2.6.1 线性关系考察** 将上述制得的混合对照品

表 2 10 种黄酮类成分 LC-MS/MS 质谱优化参数

Table 2 Optimized LC-MS/MS parameters of 10 flavonoids

成分	$t_R$ /min	离子对 $m/z$	去簇电压/V	碰撞能量/eV	射出电压/V
芹菜素	2.78	268.9/148.9	-17	-33	-24
柚皮素	2.78	271.1/150.9	-166	-25	-16
圣草酚	2.26	287.1/150.8	-70	-19	-16
金圣草黄素	2.94	299.0/256.1	-140	-38	-22
槲皮素	2.31	300.8/178.8	-118	-26	-27
紫杉叶素	1.61	302.8/285.1	-44	-18	-26
异鼠李素	2.98	314.9/300.0	-166	-30	-25
金丝桃苷	1.47	463.1/300.0	-191	-38	-25
异槲皮苷	1.51	463.1/300.2	-29	-41	-33
芦丁	1.44	609.2/300.0	-145	-44	-25

溶液进一步稀释成 6 个不同质量浓度的对照品溶液 按照 2.3 2.4 项下条件测定。以进样质量浓度  $X(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$  为横坐标, 色谱峰面积  $Y$  为纵坐标得到

回归方程; 以各化合物的信噪比(  $S/N$ ) 等于 3 和 10 时所对应的浓度确定为最低检测限(  $LOD$ ) 和最低定量限(  $LOQ$ ) ,见表 3。

表 3 10 种黄酮类成分线性关系考察

Table 3 Linear regression date of 10 investigated flavonoids

成分	回归方程	$r$	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$LOD/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$LOQ/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
芹菜素	$Y = 396\ 622X + 210.87$	0.999 5	0.011 0 ~ 0.176	0.688	2.293
柚皮素	$Y = 228\ 112X + 15\ 595$	0.999 4	0.011 6 ~ 5.933	2.897	9.657
圣草酚	$Y = 1\ 000\ 000X + 12\ 458$	0.999 8	0.015 9 ~ 1.018	3.978	13.260
金圣草黄素	$Y = 674\ 983X + 1\ 218.8$	0.999 8	0.013 8 ~ 0.222	1.734	5.780
槲皮素	$Y = 2\ 000\ 000X + 2\ 560.8$	0.999 7	0.014 6 ~ 0.233	0.911	3.037
紫杉叶素	$Y = 3\ 000\ 000X + 5\ 287.9$	0.999 7	0.012 6 ~ 0.201	0.392	1.307
异鼠李素	$Y = 165\ 784X + 498.46$	0.999 6	0.010 2 ~ 0.653	2.552	8.507
金丝桃苷	$Y = 2\ 000\ 000X - 1\ 921.7$	0.999 5	0.011 9 ~ 0.612	0.299	0.997
异槲皮苷	$Y = 6\ 000\ 000X + 347.92$	0.999 4	0.015 2 ~ 0.485	0.237	0.790
芦丁	$Y = 10\ 000\ 000X - 9\ 566.2$	0.998 5	0.017 4 ~ 17.843	2.178	7.260

2.6.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液连续进样 6 次, 分别记录 10 个黄酮类成分的峰面积和保留时间, 计算其  $RSD$  分别在 1.8% ~ 2.9% 和 0% ~ 0.2% ,表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 取同一样品 6 份, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各黄酮成分含量的  $RSD$  在 2.0% ~ 2.6% ,表明方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0 2 4 6 8 12 h 测定各成分峰面积, 并计算其  $RSD$  在 1.1% ~ 2.9% ,表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.6.5 加样回收率试验 取同一批铁皮石斛样品 9 份, 分为 3 组, 分别加入适量的高、中、低浓度混合

对照品溶液, 按 2.2 项下方法分别测定加样前后各成分的含量, 计算回收率。结果显示各成分回收率为 96.43% ~ 104.75% ,  $RSD$  均 < 3.5% 。

2.7 多糖与甘露糖含量测定 多糖与甘露糖含量测定参照甘小娜等<sup>[9]</sup> 优化的方法进行。14 批不同来源的铁皮石斛样品, 每批选取 5 个单株重复, 分别按照 2.2 项下方法制备分析, 并进一步计算各样品中黄酮类成分的含量, 结果如表 4 所示。

测定结果显示, 不同样品在黄酮类成分的组成、含量方面存在较大的差异。各成分中, 柚皮素含量最高, 平均达到  $26.87 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 其次为圣草酚与异鼠李素, 平均质量分数分别为  $1.20$ 、 $0.91 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 其余成分质量分数在  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  以下。其中, 槲皮素、

表 4 铁皮石斛样品中 10 个黄酮类成分质量分数测定 (n = 5)

Table 4 Contents of 10 flavonoids in Dendrobii Officinalis Caulis (n = 5)										$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
No.	芹菜素	柚皮素	圣草酚	金圣草黄素	槲皮素	紫杉叶素	异鼠李素	金丝桃苷	异槲皮苷	芦丁
ofc-1	0.69 <sup>c</sup>	30.26 <sup>d</sup>	0.54 <sup>h</sup>	0.20 <sup>de</sup>	—	0.27	1.37 <sup>c</sup>	—	—	0.68
ofc-2	0.25 <sup>g</sup>	20.83 <sup>fg</sup>	1.01 <sup>d</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.15	0.35	1.08 <sup>d</sup>	1.39	1.20	118.16
ofc-3	0.45 <sup>e</sup>	22.09 <sup>f</sup>	0.76 <sup>ef</sup>	0.20 <sup>de</sup>	—	0.15	0.88 <sup>d</sup>	—	—	0.36
ofc-4	0.39 <sup>f</sup>	27.11 <sup>e</sup>	0.86 <sup>e</sup>	0.29 <sup>c</sup>	—	—	0.46 <sup>e</sup>	—	—	—
ofc-5	0.38 <sup>f</sup>	38.28 <sup>c</sup>	0.95 <sup>de</sup>	1.30 <sup>a</sup>	—	—	0.72 <sup>f</sup>	—	—	0.14
ofc-6	0.52 <sup>d</sup>	12.65 <sup>i</sup>	0.68 <sup>f</sup>	0.20 <sup>de</sup>	—	0.15	0.16 <sup>i</sup>	—	—	2.13
ofc-7	0.28 <sup>g</sup>	18.26 <sup>gh</sup>	0.36 <sup>i</sup>	—	—	—	0.74 <sup>f</sup>	0.26	0.17	11.69
ofc-8	0.20 <sup>i</sup>	15.24 <sup>h</sup>	0.22 <sup>j</sup>	—	—	—	0.29 <sup>h</sup>	—	—	0.44
ofc-9	0.27 <sup>h</sup>	19.68 <sup>g</sup>	0.37 <sup>i</sup>	0.20 <sup>d</sup>	—	—	0.27 <sup>h</sup>	—	—	0.82
ofc-10	0.23 <sup>hi</sup>	16.69 <sup>h</sup>	0.70 <sup>f</sup>	—	—	—	0.49 <sup>g</sup>	—	—	—
ofc-11	0.78 <sup>b</sup>	41.22 <sup>b</sup>	2.19 <sup>b</sup>	0.29 <sup>c</sup>	0.14	0.98	2.12 <sup>a</sup>	—	—	0.22
ofc-12	1.07 <sup>a</sup>	72.66 <sup>a</sup>	5.80 <sup>a</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.23	1.51	2.02 <sup>b</sup>	0.56	0.45	34.42
ofc-13	0.27 <sup>h</sup>	22.02 <sup>f</sup>	1.77 <sup>c</sup>	0.17 <sup>e</sup>	—	0.74	0.83 <sup>ef</sup>	0.65	0.56	30.45
ofc-14	0.46 <sup>e</sup>	19.18 <sup>g</sup>	0.56 <sup>g</sup>	0.20 <sup>d</sup>	—	—	1.03 <sup>d</sup>	—	—	—
均值	0.44	26.87	1.20	0.29	0.17	0.49	0.91	0.72	0.60	16.64

注 “—”表示未达到定量限;表中不同字母表示不同样品含量水平存在显著性差异  $P < 0.05$ (表 5 同)。

紫杉叶素、金丝桃苷、异槲皮苷等成分只在部分样品中检测到。芦丁在各样品间含量差异则比较大,最高在广东韶关 b 样品中达到  $118.16\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,而浙江天台 a 样品仅有  $0.22\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

部分成分含量分布表现出一定的规律性。其中就柚皮素而言,广东、广西的 4 批样品均在  $20\sim 30\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,浙江武义、乐清 5 批样品质量分数在  $10\sim 20\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,浙江天台 2 批样品质量分数则在  $40\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  以上。所有样品中,浙江天台 2 批样品就测定的黄酮类成分表现出一定的优势,2 批样品异鼠李素质量分数均在  $2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  以上,显著高于其余各样品;圣草酚质量分数分别为  $2.19, 5.80\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,显著高于其余样品;芹菜素质量分数分别为  $0.78, 1.07\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,同样高于其余样品。在测定的 10 种成分中,金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁三者含量表现出明显的正相关性。

每批样品选取 3 个单株重复,测定多糖与甘露糖含量,测定结果见表 5。结果显示,14 批样品多糖质量分数在  $25.91\%\sim 50.40\%$ ,甘露糖质量分数在  $19.28\%\sim 33.51\%$ 。

应用 SPSS 19.0 软件,以芹菜素、柚皮素、圣草酚、金圣草黄素、异鼠李素和总多糖、甘露糖含量进行系统聚类分析(采用组间联结、余弦距离)。由树形图可见(图 2),当距离在 2 左右时,得到分类情况

表 5 铁皮石斛样品中多糖与甘露糖含量测定

Table 5 Contents of polysaccharide and mannose in Dendrobii Officinalis Caulis			%
No.	多糖	甘露糖	
ofc-1	50.40 <sup>a</sup>	30.68 <sup>ab</sup>	
ofc-2	43.55 <sup>a</sup>	25.31 <sup>bc</sup>	
ofc-3	45.64 <sup>a</sup>	30.42 <sup>b</sup>	
ofc-4	46.00 <sup>a</sup>	27.88 <sup>b</sup>	
ofc-5	48.33 <sup>a</sup>	31.17 <sup>ab</sup>	
ofc-6	46.33 <sup>a</sup>	25.42 <sup>bc</sup>	
ofc-7	49.69 <sup>a</sup>	33.49 <sup>a</sup>	
ofc-8	47.35 <sup>a</sup>	27.36 <sup>b</sup>	
ofc-9	47.87 <sup>a</sup>	27.70 <sup>b</sup>	
ofc-10	43.90 <sup>a</sup>	26.63 <sup>b</sup>	
ofc-11	25.91 <sup>c</sup>	19.28 <sup>c</sup>	
ofc-12	33.37 <sup>b</sup>	20.98 <sup>c</sup>	
ofc-13	47.91 <sup>a</sup>	30.79 <sup>ab</sup>	
ofc-14	49.00 <sup>a</sup>	33.51 <sup>ab</sup>	

如下:第一类包含样品 ofc-1, ofc-2, ofc-3, ofc-4, ofc-13, 为广东、广西、云南的样品;第二类包含 ofc-6, ofc-7, ofc-8, ofc-9, ofc-10, ofc-14, 为浙江武义、浙江乐清和贵州施秉的 6 个样品;宁波样品单独聚类;浙江天台的 ofc-11, ofc-12 两批样品聚为一类。上述聚类

结果表现出一定产地聚类的现象,广东、广西、云南 3 个更偏南方产地的样品聚为一类,与贵州、浙江的样品相区别。但产地因素并不能解释全部聚类现象,如浙江省内的武义、乐清样品与宁波、天台样品间距离相比其与广东、广西等地样品间距离更远。

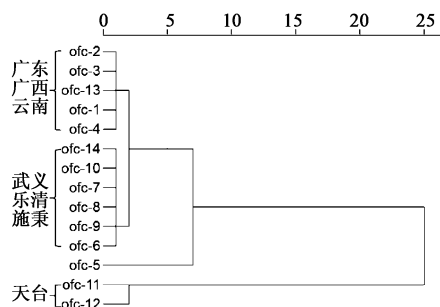


图 2 铁皮石斛样品中黄酮类成分含量聚类分析

Fig. 2 Flavonoids content clustering of *Dendrobium Officinale* Caulis

### 3 讨论

本实验前期分别对提取溶剂(乙醇,70%乙醇,50%乙醇,甲醇,80%甲醇)和提取时间(20,40,60 min)进行考察,最终选择以 80% 甲醇超声 40 min 为提取条件。根据文献[2-3]报道,除文中的 10 种成分外,本实验还检测了芹菜苷、芹菜素 7-O-β-吡喃葡萄糖苷、山奈酚、木犀草苷、槲皮苷等 5 种黄酮类成分,结果在所有样品中均未检测到上述成分。

测定结果显示铁皮石斛多种黄酮类成分中柚皮素含量普遍较高,这与已有报道相一致<sup>[6-8]</sup>,但其苷类成分柚皮苷在全部样品中均未检测到。金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁均为槲皮素的苷类化合物,其中金丝桃苷为槲皮素吡喃半乳糖苷,异槲皮苷为槲皮素的葡萄糖苷,芦丁为槲皮素的芸香糖苷,这 3 类成分含量表现出正相关性应与此有关。由于《中国药典》中多年来以多糖为质控成分,各企业也以多糖含量为指标进行铁皮石斛品种选育,培育出的品种多糖含量相比之前大幅提高<sup>[10-11]</sup>,就本研究测定的样品而言,多糖质量分数多在 40% 以上,最高达到 50.4%,远超 2015 年版《中国药典》规定的 25%,也反映出仅以多糖作为铁皮石斛质量评价指标已不能满足当前产业发展需要,有待进一步完善。

本研究选取了各样品普遍含有的 5 种黄酮类成分与多糖和甘露糖为指标进行系统聚类分析<sup>[12]</sup>。探讨聚类结果中现象出现的原因,笔者认为相对产地因素,栽培技术的选择是影响铁皮石斛质量形成更为重要的因素。床架式栽培为当前铁皮石斛人工栽培中应用最多的一种模式<sup>[13]</sup>,此技术由于采用大棚栽培,温度、湿度、光照等因素多便于控制,种苗

与栽培基质成为两个最重要的变量<sup>[14]</sup>。相对而言,同一市、县内的企业间在技术选择、管理方式等方面可能会更加相近,再加上近似的环境因素影响,产品往往会表现出更强的相近性,这也提示铁皮石斛栽培产业应更多的从种苗选育,优化培养基质,规范提高栽培技术等角度出发提升产品质量。

### 【参考文献】

- [1] 姜武,吴志刚,陶正明. 铁皮石斛的本草考证[J]. 中药材,2014,37(4):697-699.
- [2] 李燕. 铁皮石斛化学成分的研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2009.
- [3] Lam Y,Ng T B,YAO R M, et al. Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in *Dendrobium* plants[J]. Evid Based Complement Alternat Med 2015;2015:841752.
- [4] 吕圭源,颜美秋,陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(4):489-493.
- [5] 黎晶晶,李琳,徐柏颐. 一测多评法测定铁皮石斛黄酮类共有成分[J]. 浙江农业科学,2016,57(9):1497-1500.
- [6] 陈晓梅,王芳菲,王云强,等. 基于柚皮素、联苄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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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(4):276-279.
- [10] 李明焱,王瑛,郑化先,等. 铁皮石斛新品种“仙斛 2 号”的选育和特征特性研究[J]. 中国药学杂志,2013,48(19):1677-1680.
- [11] 赵贵林,张征,郑平,等. 铁皮石斛新品种“雁吹雪 3 号”多点比较试验[J]. 热带作物学报,2015,35(11):30-33.
- [12] 单正超. 基于夹角余弦的度量识别阿尔茨海默病致病基因[D]. 成都:四川师范大学,2013.
- [13] 斯金平,俞巧仙,宋仙水,等. 铁皮石斛人工栽培模式[J]. 中国中药杂志,2013,38(4):481-484.
- [14] 安彦峰,张雅琼,周路明,等. 铁皮石斛栽培基质的研究进展[J]. 中国药房,2014,25(27):2581-2583.

【责任编辑 顾雪竹】