

UPLC-MS/MS 测定铁皮石斛中 9 个有机酸成分含量

吕朝耕¹ 杨 健¹ 康传志¹ 杨婉珍^{1,2} 周 利^{1,3} 李振皓⁴ 郭兰萍^{1*}

(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. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 3. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 4. 浙江寿仙谷医药股份有限公司, 浙江 武义 321200)

摘要 目的: 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定铁皮石斛中 9 个有机酸类成分的含量。方法: 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 以 0.1% 甲酸溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱; 流速 0.6 mL/min; 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: 9 个有机酸类成分具有良好的线性关系, r 值均大于 0.998, 方法精密度、重复性和稳定性的 RSD 值均小于 3%, 加样回收率在 95.61% ~ 102.66%, RSD 值均小于 3.5%。不同产地铁皮石斛中有机酸类成分在组成和含量上存在较大差异。结论: 该研究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有机酸类成分的定量测定, 测定结果可为该药材质量标准的完善提供依据。

关键词 有机酸; 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱; 铁皮石斛; 质量评价

中图分类号: R283.6/R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2017)06-1360-04

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2017.06.027

Determination of Nine Organic Acids in *Dendrobium officinale* by UPLC-MS/MSLV Chao-geng¹, YANG Jian¹, KANG Chuan-zhi¹, YANG Wan-zhen^{1,2}, ZHOU Li^{1,3}, LI Zhen-hao⁴, GUO Lan-ping¹

(1. National Resource Center for Chinese Materia Medica, State Key Laboratory Breeding Base of *Dao-di* Herbs, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 4. Zhejiang Shouxiangu Pharmaceutical Co., Ltd., Wuyi 321200, China)

Abstract Objective: To establish an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of nine organic acids in *Dendrobium officinale*. Methods: The determination was carried out by an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with a gradient elution system using 0.1% formic acid(A)-acetonitrile(with 0.1% formic acid)(B) as mobile phase, the flow rate was 0.6 mL/min, the column temperature was 40 ℃. MS instrument was equipped with ESI-Ion source, gaining the extracted ion chromatograms. Results: The nine components had good linearity ($r > 0.998$), and the precision, repeatability, stability and accuracy of the established method were well-validated and proved to be satisfactory, with the RSD < 3%. The recoveries were 95.61% ~ 102.66%, with the RSD < 3.5%. There were great differences in composition and content of organic acids in *Dendrobium officinale* from different habitats. Conclusion: The established method is proved to be rapid, accurate and sensitive for the determination of organic acids in *Dendrobium officinale*. Moreover, the quantitative results may be useful for the improvement of quality control of this herbal medicine.

Key words Organic acids; UPLC-MS/MS; *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; Quality control

铁皮石斛为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 的干燥茎, 具有益胃生津、滋阴清热的功效, 主要用于治疗热病津伤、口干烦渴、胃阴不足等^[1]。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, 具有免疫调节、降血糖、抗肿瘤等作用^[2,4]。

近年来, 以铁皮石斛为原料的药品、保健品不断增多, 但也出现了以次充好、以假乱真等现象。铁皮石斛的质量控制水平亟需提高, 以保障药材和产品的质量。但目前 2015 年版中国药典中以多糖和甘

露糖作为铁皮石斛的质量评价指标^[1], 缺乏特异性, 因此寻找可以反映铁皮石斛质量的特异性成分成为其质量评价水平提升的关键。

已有文献^[2,5]报道铁皮石斛中含丁香酸、苯甲酸等多种有机酸类成分, 提示可以从有机酸的角度进行铁皮石斛质量评价的探讨。本研究建立 UPLC-MS/MS 同时测定铁皮石斛中 9 个有机酸类成分含量的方法, 旨在为铁皮石斛的质量评价提供科学参考。

1 仪器与材料

收稿日期: 2016-10-30

基金项目: 国家自然科学基金(81130070, 81072989); 国家科技支撑计划项目(2012BAI29B02, 2012BAI28B002)

作者简介: 吕朝耕(1992-), 男, 在读硕士研究生, 专业方向: 中药资源与中药标准化研究; E-mail: lcgfm@126.com。

* 通讯作者: 郭兰萍, Tel: 010-64011944, E-mail: glp01@126.com。

1.1 仪器 ACQUITY UPLCTM 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、Empower™ 3 色谱工作站); API6500 四级杆-线性离子阱质谱仪(美国 ABSCIEX 公司,配有离子喷雾接口); SB-800 DTD 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); New Classic MS-S 电子天平(梅特勒-托利多(上海)有限公司); Eppendorf 5810R 离心机(德国 Eppendorf 公司); 球磨仪(Retsch 公司, MM 400 混合型球磨仪); 电热干燥箱(上海恒科仪器有限公司, DHG-9145AZ)。

1.2 材料 丁香酸(批号: S23F7K9842)、香草酸(批号: S27M7115319)、对羟基苯甲酸(批号: MKBK3576V)、对羟基肉桂酸(批号: H05A6Q1)、苯

甲酸(批号: TS0911CA14)对照品购自上海源叶生物科技公司; 没食子酸(批号: 15033122)、原儿茶酸(批号: 15050521)对照品购自上海同田生物科技股份有限公司; 肉桂酸(批号: PS0094-0100)、水杨酸(批号: PS1136-0025)对照品购自成都普思生物科技有限公司; 乙醇(色谱纯,西陇化工股份有限公司); 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 μm PTFE 滤膜(天津津腾实验设备有限公司)。

14 批不同产地铁皮石斛样品来源见表 1。经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* Kimura et Mi-go 的茎。

表 1 14 批不同产地铁皮石斛样品来源信息

样品编号	产地	采样时间	样品编号	产地	采样时间
ofc-1	广东韶关 1	2016. 04	ofc-8	浙江乐清 1	2016. 03
ofc-2	广东韶关 2	2016. 04	ofc-9	浙江乐清 2	2016. 03
ofc-3	广西玉林	2016. 03	ofc-10	浙江乐清 3	2016. 03
ofc-4	广西西林	2016. 03	ofc-11	浙江天台 1	2016. 03
ofc-5	浙江宁波	2016. 04	ofc-12	浙江天台 2	2016. 03
ofc-6	浙江武义 1	2015. 10	ofc-13	云南文山	2016. 04
ofc-7	浙江武义 2	2015. 10	ofc-14	贵州施秉	2015. 11

注: 韶关、武义、天台 1、2 为来源于不同石斛产业公司的样品; 乐清 1、2、3 为来源于同一石斛产业公司不同基地的样品

2 方法

2.1 铁皮石斛样品处理 新鲜铁皮石斛样品,洗净后剪成约 1 cm 小段,低温烘干,打粉,过 3 号筛,干燥器中保存。

2.2 有机酸类成分含量分析

2.2.1 供试品溶液的制备: 取上述干燥样品粉末 0.1 g,精密称定,置 2.0 mL eppendorf 管中; 加入 1.5 mL 70% 乙醇,密封,称定重量,超声(250 W,40 kHz)提取 40 min; 放冷,再称定重量,70% 乙醇补足减失的重量。以 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.2.2 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。精密量取适量上述对照品储备液适量,加甲醇配制成每 1 mL 含 0.94 μg 没食子酸、1.52 μg 丁香酸、2.32 μg 香草酸、4.09 μg 对羟基苯甲酸、1.28 μg 对羟基肉桂酸、3.92 μg 苯甲酸、0.81 μg 肉桂酸、0.64 μg 水杨酸、7.25 μg 原儿茶酸的混合对照品溶液,置于 4℃ 冰箱保存。

2.2.3 色谱条件: 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm,1.8 μm); 流动相:

0.1% 甲酸溶液(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: 0.6 mL/min; 柱温: 40℃; 进样量: 1.0 μL。

2.2.4 质谱条件: 离子源: Turbo V,电离模式: ESI⁻,采集方式: MRM,离子化温度: 550℃。优化的条件参数见表 2。

2.2.5 线性关系考察: 将“2.2.2”项下混合对照品溶液进一步稀释成 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件测定峰面积。以进样浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标得到回归方程,线性关系考察结果见表 3。

2.2.6 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 9 个有机酸类成分的峰面积和保留时间,计算其 RSD 分别在 2.19%~2.86% 和 0~0.32%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验: 取同一样品 6 份,按照“2.2.1”项方法制备供试品溶液,进样测定,计算各有机酸成分含量的 RSD 值在 1.03%~2.62%,表明方法重复性良好。

表 2

9 个有机酸类成分优化的质谱条件参数

化合物	Rt/min	MRM 参数			
		MRM 离子对 <i>m/z</i>	去簇电压 (DP/V)	碰撞能量 (CE/eV)	射出电压 (CXP/V)
丁香酸(Syringic acid)	1.33	196.9/166.6	-64	-25	-9
香草酸(Vanillic acid)	1.30	166.9/122.8	-38	-16	-16
对羟基苯甲酸(<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid)	1.18	136.9/92.8	-89	-17	-14
对羟基肉桂酸(<i>p</i> -Hydroxy-cinnamic acid)	1.49	162.9/118.8	-101	-21	-14
苯甲酸(Benzoic acid)	1.93	120.9/77.0	-40	-17	-12
肉桂酸(Cinnamic acid)	2.66	146.9/103.0	-48	-14	-13
原儿茶酸(Protocatechuic acid)	0.98	153.0/108.9	-55	-21	-12
没食子酸(Gallic acid)	0.72	168.9/78.8	-77	-29	-9
水杨酸(Salicylic acid)	1.96	137.0/92.9	-48	-21	-11
喷雾电压/V			-4500		
GS1/Psi			55		
GS2/Psi			55		
CUR/Psi			30		

表 3 线性关系考察结果

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)
没食子酸	$Y = 80040X + 522.99$	0.9999	0.015 ~ 0.937
丁香酸	$Y = 30007X - 233.89$	0.9983	0.048 ~ 1.520
香草酸	$Y = 32293X - 1502.2$	0.9994	0.073 ~ 2.320
对羟基苯甲酸	$Y = 1000000X + 198399$	0.9987	0.128 ~ 4.093
对羟基肉桂酸	$Y = 2000000X + 35496$	0.9984	0.040 ~ 1.276
苯甲酸	$Y = 28101X + 1062$	0.9997	0.031 ~ 3.920
肉桂酸	$Y = 46627X + 314.97$	0.9995	0.013 ~ 0.808
水杨酸	$Y = 396622X + 210.87$	0.9995	0.010 ~ 0.638
原儿茶酸	$Y = 1000000X + 84418$	0.9994	0.14 ~ 7.250

2.2.8 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 测定各成分峰面积, 并计算其

表 4 14 批铁皮石斛样品中 9 个有机酸类成分含量测定结果($\mu\text{g/g}$ $n=5$)

样品编号	水杨酸	肉桂酸	没食子酸	丁香酸	香草酸	对羟基苯甲酸	对羟基肉桂酸	苯甲酸	原儿茶酸
ofc-1	0.51 \pm 0.05	6.20 \pm 0.35	—	4.43 \pm 0.11	4.26 \pm 0.42	11.59 \pm 1.47	3.47 \pm 0.16	26.88 \pm 0.70	2.18 \pm 0.16
ofc-2	0.49 \pm 0.03	4.43 \pm 0.23	0.23 \pm 0.02	5.43 \pm 0.14	7.00 \pm 0.37	5.05 \pm 0.43	3.06 \pm 0.21	3.81 \pm 0.28	5.54 \pm 0.36
ofc-3	0.59 \pm 0.05	6.31 \pm 0.58	—	5.34 \pm 0.30	6.29 \pm 0.67	9.64 \pm 0.67	2.60 \pm 0.07	15.86 \pm 1.08	1.65 \pm 0.08
ofc-4	0.45 \pm 0.04	4.68 \pm 0.08	2.51 \pm 0.03	8.61 \pm 0.76	18.32 \pm 0.44	28.63 \pm 1.29	3.96 \pm 0.33	7.44 \pm 0.71	25.69 \pm 2.42
ofc-5	0.33 \pm 0.02	5.15 \pm 0.06	1.70 \pm 0.05	6.25 \pm 0.41	16.93 \pm 1.49	26.13 \pm 2.55	4.10 \pm 0.11	5.94 \pm 0.62	10.47 \pm 1.24
ofc-6	0.43 \pm 0.03	9.09 \pm 1.18	0.20 \pm 0.02	3.65 \pm 0.19	4.72 \pm 0.51	21.41 \pm 2.15	1.67 \pm 0.07	46.10 \pm 2.94	3.56 \pm 0.10
ofc-7	1.00 \pm 0.07	12.96 \pm 0.50	—	3.82 \pm 0.17	7.08 \pm 0.76	8.49 \pm 1.02	2.35 \pm 0.19	32.00 \pm 2.20	2.13 \pm 0.14
ofc-8	—	2.64 \pm 0.15	—	3.13 \pm 0.10	7.33 \pm 0.78	6.55 \pm 0.56	3.13 \pm 0.19	6.25 \pm 0.71	1.51 \pm 0.07
ofc-9	0.29 \pm 0.02	4.00 \pm 0.33	—	4.32 \pm 0.21	9.76 \pm 0.38	7.49 \pm 0.58	4.06 \pm 0.17	12.31 \pm 0.66	2.07 \pm 0.08
ofc-10	0.16 \pm 0.01	5.67 \pm 0.12	—	5.25 \pm 0.56	10.28 \pm 0.33	7.81 \pm 0.81	3.02 \pm 0.20	19.72 \pm 3.15	2.14 \pm 0.10
ofc-11	0.43 \pm 0.04	5.49 \pm 0.41	—	5.95 \pm 0.25	9.8 \pm 0.63	20.12 \pm 0.87	6.74 \pm 0.52	21.01 \pm 1.43	1.99 \pm 0.11
ofc-12	0.24 \pm 0.02	2.31 \pm 0.29	—	8.68 \pm 0.58	12.31 \pm 0.68	17.82 \pm 1.04	6.45 \pm 0.39	3.51 \pm 0.19	2.28 \pm 0.13
ofc-13	0.57 \pm 0.05	1.97 \pm 0.19	—	4.94 \pm 0.21	11.79 \pm 0.23	5.83 \pm 0.16	6.34 \pm 0.26	5.44 \pm 0.41	3.44 \pm 0.20
ofc-14	1.28 \pm 0.13	—	—	7.59 \pm 0.42	8.69 \pm 0.28	17.44 \pm 0.77	2.06 \pm 0.04	14.74 \pm 0.52	2.36 \pm 0.16
均值	0.52 \pm 0.32	5.45 \pm 2.95	1.16 \pm 1.14	5.53 \pm 1.75	9.61 \pm 4.16	13.96 \pm 7.93	3.77 \pm 1.66	15.79 \pm 12.46	4.79 \pm 6.46

注 “—”表示未达到定量限

RSD 值在 0.81% ~ 2.42% ,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率试验: 取同一批铁皮石斛样品 9 份, 分为 3 组 ($n=3$), 分别加入适量的高、中、低浓度混合对照品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件分别测定各成分的含量, 计算各成分平均加样回收率为 95.61% ~ 102.66%, RSD 值均小于 3.5%。

3 结果与分析

取 14 批不同来源的铁皮石斛样品, 每批选取 5 个单株, 分别按照“2.2”项下方法制样分析, 并进一步计算各样品中 9 个有机酸类成分的含量, 结果见表 4。

9个有机酸类成分中,以对羟基苯甲酸和苯甲酸含量最高,平均含量分别达到13.96 $\mu\text{g/g}$ 和15.79 $\mu\text{g/g}$ 。其次为香草酸、丁香酸、肉桂酸、原儿茶酸和对羟基肉桂酸。水杨酸成分含量较低,为0.52 $\mu\text{g/g}$;没食子酸则在大多样品中未检测到。

不同批次的铁皮石斛样品,在有机酸的组成、含量方面存在较大的差异。其中,浙江武义1样品(ofc-6)中苯甲酸含量最高,达到46.10 $\mu\text{g/g}$,最低为浙江天台2样品(ofc-12)的3.51 $\mu\text{g/g}$,相差达10倍以上。肉桂酸则以浙江武义2样品(ofc-7)含量最高,达到12.96 $\mu\text{g/g}$,云南文山样品(ofc-13)含量较低,为1.97 $\mu\text{g/g}$,贵州施秉样品(ofc-14)中则没有检测到该类成分。没食子酸仅在广西西林(ofc-4)、浙江宁波(ofc-5)、广东韶关2(ofc-2)、浙江武义1(ofc-6)等4批样品中可以检测到,其含量分别为2.51、1.70、0.23和0.20 $\mu\text{g/g}$,差异较大。

4 讨论

本研究建立了铁皮石斛中9个有机酸类成分的UPLC-MS/MS测定分析方法,可为后期铁皮石斛质量评价研究提供支持。本研究前期根据文献^[2]报道考察了纯乙醇、70%乙醇、甲醇、80%甲醇等提取溶剂及不同超声提取时间对提取效果的影响,结果表明以70%乙醇提取效果最佳,超声40 min已能较完全的提取。此外,本研究还考察了咖啡酸和阿魏酸在铁皮石斛样品中的含量分布,结果在所有样品中均未检测到这两种成分。

样品测定结果显示,9个有机酸类成分在铁皮石斛中有着较广泛的分布,且不同样品间含量差异显著。不同产地铁皮石斛的有机酸并未与产地形成明显的相关关系,广东、广西、浙江等省内的相同产地不同批次样品亦未表现出明显的聚类关系。但部分有机酸类成分分布依然存在一定特异性,如浙江

武义的两批样品苯甲酸含量显著高于其他样品,均在30 $\mu\text{g/g}$ 以上;而丁香酸含量则在4 $\mu\text{g/g}$ 以下,低于大部分产地样品。

探讨上述现象出现的原因,由于目前铁皮石斛生产多采用组培苗在特定的栽培基质中进行床架式种植的模式^[6,7],在小范围区域内,可能由于在种子种苗、栽培技术方面更有共同性,以及更为接近的环境因素的影响,致其表现出接近的质量特性^[8]。因此相对于产地因素,种子种苗和栽培技术对于栽培铁皮石斛质量可能有着更为重要的影响,提示人工栽培铁皮石斛产业可能需要更多的从种苗选育及规范提高栽培技术出发提升产品质量。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社 2015: 282-283.
- [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] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发 2001, 13(1): 70-75.
- [4] Lam Y, Ng TB, Yao RM *et al.* Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in *Dendrobium* plants [J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 2015: 1-25.
- [5] Xu J, Han QB, Li SL *et al.* Chemistry, bioactivity and quality control of *Dendrobium*, a commonly used tonic herb in traditional Chinese medicine [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2013, 12(2): 341-367.
- [6] 邢福桑, 冯锦东, 刘凌峰, 等. 铁皮石斛栽培技术的研究概况[J]. 时珍国医国药 2002, 13(9): 559-560.
- [7] 黄作喜, 林忠全, 陶广松, 等. 影响铁皮石斛组培苗驯化的关键因素探析[J]. 中药材 2011, 34(12): 1829-1833.
- [8] 唐丽, 李菁, 龙华, 等. 生态因子对铁皮石斛生长发育影响的研究进展[J]. 中药材 2014, 37(1): 153-156.