

# 八种石斛中苯丙醇类和香豆素类化合物含量测定与分析

师亦洁<sup>1</sup>,周峰旭<sup>1</sup>,李 鲜<sup>1</sup>,范宇超<sup>1</sup>,刘宏程<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室,昆明 650500;

<sup>2</sup>农业部农产品质量监督检验测试中心(昆明) 云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所,昆明 650223

**摘要:**新建 HPLC 双波长同时测定松柏苷、紫丁香苷、东莨菪内酯、滨蒿内酯及香豆素含量的分析方法。采用 Shiseido CAPCELL PAK MG II C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分析柱;使用乙腈-水为流动相,梯度洗脱;流速为 0.8 mL/min;紫外检测器 260 nm, 315 nm 双波长检测。结果显示,五种成分在测定范围内有良好的线( $r^2 > 0.999$ );在三个加标浓度下方法回收率为 98.7% ~ 102.5% 之间,相对标准偏差(RSD)小于 2.5%。该方法用于 8 种石斛品种含量的测定。

**关键词:**石斛;苯丙醇类;香豆素类;HPLC

中图分类号:R284.2;R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0803-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.010

## Determination and analysis of phenylpropanol and coumarin compounds in eight kinds of *Dendrobium*

SHI Yi-jie<sup>1</sup>, ZHOU Feng-xu<sup>1</sup>, LI Xian<sup>1</sup>, FAN Yu-chao<sup>1</sup>, LIU Hong-cheng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

<sup>2</sup>Supervision and Testing Center for Farm Product Quality, Ministry of Agriculture, Institute of Quality Standard and Testing Technology, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650223, China

**Abstract:** A new method for simultaneous determination of cedarin, syringin, scutellarin, scoparone and coumarin was developed. The method was analyzed by Shiseido CAPCELL PAK MG II C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and with a gradient solvent system of water-acetonitrile. The flow was set at 0.8 mL/min. The UV detection was set with double wavelengths of 260 nm and 315 nm. The method was validated and found to be satisfactorily linear ( $r^2 > 0.999$ ). Recoveries ranged from 98.7% to 102.5% for all compounds at three different spiking levels and relative standard deviation (RSD) was with 2.5% or less. The established method was successfully used for evaluating the quality in eight kinds of *Dendrobium*.

**Key words:** *Dendrobium*; phenylpropanols; coumarins; HPLC

石斛属 (*Sect. Dendrobium*) 隶属于兰科 (*Orchidaceae*), 约有 1 000 种, 在我国发现有 74 种和 2 变种, 产秦岭以南诸省区, 尤其云南南部为多<sup>[1]</sup>。石斛作为我国传统中药<sup>[2]</sup>, 具有抗肿瘤<sup>[3]</sup>、增强免疫<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、缓解糖尿病<sup>[6]</sup>等多种药理学作用。主要是石斛多糖<sup>[7,8]</sup>、酚类化合物<sup>[9]</sup>、芳香族化合物和倍半萜类化合物<sup>[10]</sup>等功能成分。

对石斛中功能成分测定方法有很多, 如周晓梅

等<sup>[11]</sup>对 4 种不同石斛中香豆素的含量进行测定。刘妍妍等<sup>[12]</sup>对云南产的 37 个品种的石斛中的滨蒿内酯含量进行测定。也有研究表明, 曾从铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)<sup>[13]</sup> 与叠鞘石斛 (*Dendrobium aurantiacum var. denneanum*)<sup>[14]</sup> 中分离得到紫丁香苷。本实验室前期研究发现, 石斛中含有阿魏酸<sup>[15]</sup>和松柏醇<sup>[16]</sup>, 松柏醇与葡萄糖成苷后即为松柏苷。但对于石斛中松柏苷与紫丁香苷等苯丙醇类化合物的含量测定则未见报道。

本实验首次建立了一种在不同波长下同时测定石斛属中松柏苷和紫丁香苷两种苯丙醇类化合物以及东莨菪内酯、滨蒿内酯和香豆素三种香豆素类化

收稿日期:2018-12-05 接受日期:2019-04-22

基金项目:国家重点研发计划(2016YFF0201806);云南省科技惠民计划(2014DA001)

\* 通信作者 Tel:86-871-5140430; E-mail:liuorg@163.com

学物的含量分析方法。该方法以期对石斛品种的区分、质量控制以及不同石斛品种间药理活性的差异研究提供一种新的分析方法。

## 1 仪器与材料

Waters Alliance e2695 型高效液相色谱(四元梯度洗脱系统、2489 紫外检测器、Empower 3 色谱工作站,美国 Waters 公司);BT 25 S 型分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ500-E 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

松柏苷对照品及紫丁香苷对照品(北京世纪奥科生物技术有限公司,HPLC $\geq$ 98%),东莨菪内酯对照品(中国食品药品检定研究所,HPLC $\geq$ 98%),滨蒿内酯对照品(北京索莱宝科技有限公司,HPLC $\geq$ 98%),香豆素对照品(北京百灵威科技有限公司,HPLC $\geq$ 99%);乙腈、甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);实验室用水为去离子水。

五种目标成分的化学结构如下图所示:

球花石斛、鼓槌石斛、齿瓣石斛、铁皮石斛、流苏石斛、金钗石斛、叠鞘石斛、束花石斛样品均由云南热带作物研究院(国家石斛种质资源圃)李守领老师鉴定和提供。

## 2 实验方法与结果

### 2.1 色谱条件的选择

表 1 化合物最大吸收波长

Table 1 Maximum absorption wavelength of the compound

化合物 Compounds	松柏苷 Cedarin	紫丁香苷 Syringin	东莨菪内酯 Scutellarin	滨蒿内酯 Scoparone	香豆素 Coumarin
最大吸收波长 Maximum absorption wavelength (nm)	212.9 256.7	220.0 263.8	295.9 345	293.6 343.8	212.9 275.7

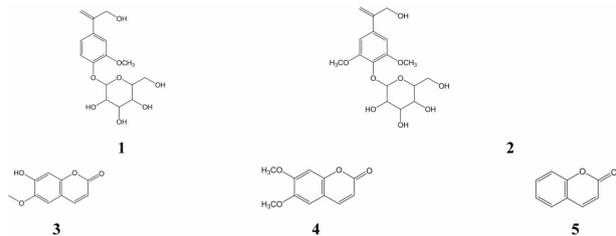


图 1 五种成分的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of five components

注:1. 松柏苷;2. 紫丁香苷;3. 东莨菪内酯;  
4. 滨蒿内酯;5. 香豆素。

Note:1. Cypressin;2. Syringin;3. Scutellarin;  
4. Scoparone;5. Coumarin.

#### 2.1.1 双波长的选择

通过全波长扫描(210 ~ 440 nm),可知各目标化合物最大吸收波长,见表 1。通过对比各波长下目标化合物响应,在 260 nm 处苯丙醇类物质有较大吸收,但此波长下的香豆素类物质响应较低,而在 325 nm 处,香豆素类物质有较大吸收。且在这两个波长下,杂质影响较小,故最终选定分析波长为 260 nm 和 315 nm。对照同等条件下单一对照品保留时间可知,如图 2,在两个波长下,各目标化合物均有较好响应。

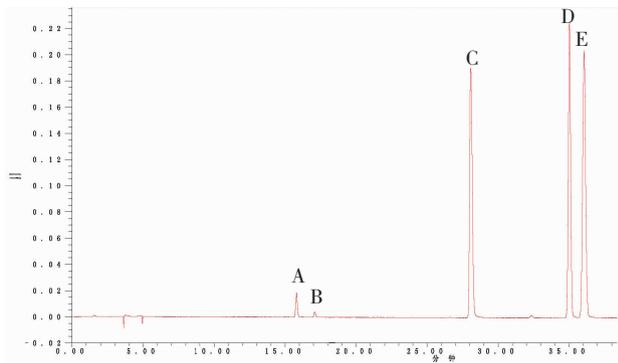
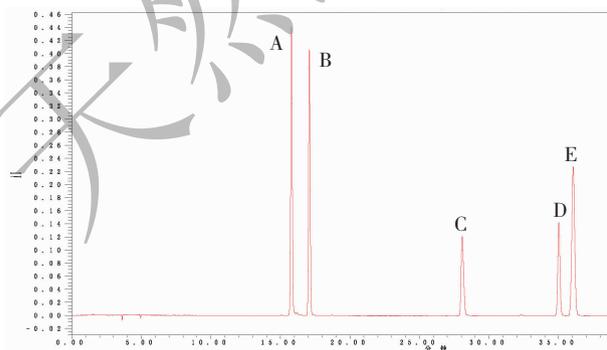


图 2 混合对照品 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC comparison of mixed controls

注:1. 图 2a 为 260nm,图 2b 为 315nm;2. 从左至右,峰依次为:A. 松柏苷、B. 紫丁香苷、C. 东莨菪内酯、D. 滨蒿内酯、E. 香豆素。

Note:1. Fig 2a is 260nm, Fig 2b is 315nm;2. From left to right, the peaks are A. cedarin, B. syringin, C. scutellarin, D. scoparone, E. coumarin.

### 2.1.2 流动相和流速的选择

在前期试验中,对比了甲醇-水以及乙腈-水体系,发现在乙腈-水体系下各峰峰形较好。对比了1.0、0.8、0.5 mL/min 等几个流速,发现在0.8 mL/min 流速下,各峰能够有较好的分离度,且分析时间适中。

### 2.1.3 色谱条件

Shiseido CAPCELL PAK MG II C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A):水(B),梯度洗脱程序如下:5% A→20% A(0~20 min),20% A→30% A(20~30 min),30% A(30~40 min),30% A→5% A(40~45 min);流速:0.8 mL/min;检测波长:260 nm,315 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。混合对照品色谱图见图2。

## 2.2 混合对照品溶液制备

精密称取各对照品5.00 mg 分别置于10 mL 容量瓶中,分别加入10 mL 5% 乙腈定容,即得浓度为

0.5 mg/mL 的单一对照品储备溶液。精密量取各单一对照品溶液各20 μL 混合,即得浓度为0.1 mg/mL 的混合对照品溶液。

## 2.3 样品溶液

### 2.3.1 提取条件的优化

因香豆素类物质不溶于冷水,易溶于热水、醇、乙醚、氯仿等,苯丙醇类物质溶于热水和乙醇,微溶于冷水,而石斛中普遍含有丰富的多糖,且多糖易溶于热水。故实验对比了纯甲醇、80% 甲醇和纯水,在相同条件和时间下的提取效果,结果显示纯甲醇提取条件下各成分均能提取得较完全。实验还对比了单纯纯甲醇提取以及用水提取一次后,弃去水提部分再以纯甲醇提取,结果显示,单纯先以水提取一次并不能较好除去相关干扰杂质,且会造成一部分目标化合物的损失,故选择以单纯纯甲醇提取。测定结果如表3 所示。

表3 提取条件选择结果(μg/g)

Table 3 Extraction condition selection results(μg/g)

化合物 Compounds	松柏苷 Cedarin	紫丁香苷 Syringin	东莨菪内酯 Scutellarin	滨蒿内酯 Scoparone	香豆素 Coumarin
纯甲醇 Pure methanol	62.46	359.92	111.06	253.27	108.55
80% 甲醇 80% methanol	53.09	307.37	77.63	184.89	77.07
纯水 Pure water	46.85	266.34	75.52	157.03	66.22
纯水提取一次后再以纯甲醇提取 Pure water extract once then extracted with pure methanol	40.56	225.25	75.83	175.23	76.62

提取时间:对比了超声提取20、30、40 min,结果表明30 min 即可达到较好的提取效果。比较了提取1、2、3 次的提取效率,结果表明,重复提取两次即可对目标成分提取得较为完全。

### 2.3.2 样品溶液制备

分别精密称取八个品种石斛干燥粉末1.0 g 置于锥形瓶中,分别加入甲醇20 mL,超声提取30 min,重复提取两次,合并提取液,于旋转蒸发仪上减压水浴蒸干后,用2 mL 甲醇溶解,过0.45 μm 水系微孔滤膜后置于进样瓶中备用。

## 2.4 检出限和线性范围考察

按照3 倍信噪比(S/N=3)来确定仪器检出限。将混合对照品溶液分别以初始比例流动相稀释1、2、5、10、20、50、100 倍,分别进样,按“2.1”项色谱条

件下进行分析,以混合对照品含量 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,色谱峰面积 $A_s$ 为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算。五种目标成分的回归方程见表2。由结果可知,在测定浓度范围内,各目标成分均有较好的线性。

## 2.5 精密度实验

取混合对照品溶液,按“2.1”项色谱条件重复进样6 次,五个目标成分峰面积的RSD 分别为0.71%、1.03%、0.61%、0.66%、0.62%。结果表明仪器精密度良好。

## 2.6 重复性实验

取同一批样品(鼓槌石斛)6 份,按“2.3”项下条件操作,按“2.1”项色谱条件分析,五个成分峰面积RSD 分别为0.47%、0.89%、0.34%、0.18%、0.71%。结果表明该方法重复性良好。

表3 五种目标成分回归方程

Table 3 Regression equations for five target components

化合物 Compounds	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	回归方程 Regression equation	$r^2$	检出限 The detection limit ( $\mu\text{g/mL}$ )
松柏苷 Cedarin	1 ~ 100	$A_s = 3.557 \times 10^4 X + 1.721 \times 10^4$	1.000	0.067
紫丁香苷 Syringin	1 ~ 100	$A_s = 3.117 \times 10^4 X + 1.359 \times 10^4$	0.999 9	0.146
东莨菪内酯 Scutellarin	1 ~ 100	$A_s = 2.434 \times 10^4 X + 1.586 \times 10^4$	0.999 9	0.108
滨蒿内酯 Scoparone	1 ~ 100	$A_s = 2.511 \times 10^4 X + 1.553 \times 10^4$	0.999 9	0.103
香豆素 Coumarin	1 ~ 100	$A_s = 2.918 \times 10^4 X + 1.961 \times 10^4$	0.999 8	0.118

## 2.7 稳定性实验

取样品溶液(鼓槌石斛),于室温下放置,分别于0、2、4、6、8、24 h,按“2.1”项下色谱条件分析,五个成分峰面积RSD分别为0.42%、1.01%、0.74%、1.20%、1.21%。结果表明样品在24 h内稳定。

## 2.8 加样回收实验

称取已知含量的样品(鼓槌石斛)9份,每份1.0 g,按低、中、高浓度(每个浓度三份,9份)加入对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件分析,结果见表3。在30~540  $\mu\text{g}$ 加标浓度范围内,平均回收率在99.80%~100.90%,RSD为0.62%~1.58%。

## 2.9 样品含量测定

取“2.3”项下八个不同品种石斛样品溶液,按

“2.1”项下色谱条件分析,结果见表4。

## 3 结论

由含量测定结果(表4)可以看出,不同品种的石斛,其所含苯丙醇类和香豆素类化合物的种类及其含量均有较大差异:七种石斛中均含有紫丁香苷,仅在球花石斛中未检测到紫丁香苷;七种石斛中均含有滨蒿内酯,仅叠鞘石斛中未检测到其存在;齿瓣石斛中五种目标物质的含量较其他几个品种的石斛均较低;而在鼓槌石斛中五种目标物质含量均高于其他几个品种。从结果可看出,相同产地的不同品种石斛中的有效成分种类及含量均存在较大差异,故可通过对其不同有效成分间含量的测定,对石斛的品种进行初步的区分。

表4 加样回收率( $n=3$ )Table 4 Sample recovery rate ( $n=3$ )

化合物 Compounds	空白值 Blank value ( $\mu\text{g/mL}$ )	加标值 Marked value ( $\mu\text{g}$ )	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
松柏苷 Cedarin	30.13	30	99.06	99.80	0.62
		60	100.06		
		90	100.30		
紫丁香苷 Syringin	180.22	180	99.15	100.40	1.08
		360	100.57		
		540	101.49		
东莨菪内酯 Scutellarin	53.32	50	98.62	100.16	1.35
		100	100.34		
		150	101.54		
滨蒿内酯 Scoparone	125.64	120	99.14	100.90	1.58
		240	100.92		
		360	102.64		
香豆素 Coumarin	53.18	50	99.19	100.07	0.98
		100	99.98		
		150	101.06		

表5 八个品种石斛含量测定结果( $\mu\text{g/g}$ )Table 5 Results of determination of six varieties of *Dendrobium*( $\mu\text{g/g}$ )

石斛品种 Dendrobium varieties	松柏苷 Cedarin	紫丁香苷 Syringin	东莨菪内酯 Scutellarin	滨蒿内酯 Scoparone	香豆素 Coumarin
球花石斛 <i>Dendrobium thyrsiflorum</i>	22.66	未检出	71.29	88.38	35.68
鼓槌石斛 <i>Dendrobium chrysotoxum</i>	62.46	359.9	111.1	253.3	108.6
齿瓣石斛 <i>Dendrobium devonianum</i>	1.471	1.565	6.016	5.926	10.67
铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	4.577	4.192	20.27	21.99	10.61
流苏石斛 <i>Dendrobium fimbriatum</i>	15.99	17.61	131.8	50.60	80.60
金钗石斛 <i>Dendrobium nobile</i>	21.93	18.80	288.5	51.12	6.25
叠鞘石斛 <i>Dendrobium aurantiacum var. denneanum</i>	2.694	3.182	8.103	未检出	5.683
束花石斛 <i>Dendrobium chrysanthum</i>	0.6159	1.949	5.403	5.335	6.348

对香豆素类化合物含量测定结果与已有文献对比:周晓梅等<sup>[11]</sup>研究结果表明其测定的4个石斛品种中仅叠鞘石斛中含有香豆素。刘妍妍等<sup>[12]</sup>研究结果显示云南产37个石斛品种中仅密花石斛和球花石斛中含有滨蒿内酯,但研究者也表示由于样品总数较大,每份样品量较少,在检测过程中部分样品只显示痕量,未能计算出具体含量,故记为“未检出”,但不能排除其他种石斛含有微量滨蒿内酯的可能性。可以看出,这些结果与本实验得到结果存在一定差异,分析原因可能是由于石斛样品的产地或采收期的不同造成了这种含量差异,后期还可对相同品种不同产地或不同采收期的石斛中香豆素类含量进行测定、比较,以期对市售常见石斛品种的质量控制提供参考。

松柏苷为松柏醇的苷类化合物。松柏苷的含量研究仅在筒鞘蛇菰(*Balanophora involucrata*)中可见,紫丁香苷含量研究主要集中于刺五加(*Acanthopanax senticosus*)等,也有报道从铁皮石斛<sup>[13]</sup>与叠鞘石斛<sup>[14]</sup>中分离得到紫丁香苷。在实验过程中,我们已选用不同流动相体系(甲醇/水,甲醇/甲酸)以及不同流动相比比例分离样品中紫丁香苷与松柏苷,其与混合对照品中保留时间一致(保留时间偏差小于5%),未发现有其他干扰物质。同时采用DAD对样品中紫丁香苷和松柏苷进行全波长扫描,其吸收波长与对照品的吸收波长一致,可确定样品中含有紫丁香苷和松柏苷。本实验首次对石斛中两种苯丙醇

类化合物进行了含量测定,结果显示大多数石斛品种中均含有这两种物质。

文献报道,紫丁香苷具有降血脂<sup>[17]</sup>、增强免疫<sup>[18]</sup>、对心肌缺血保护<sup>[19]</sup>、抗氧化<sup>[20]</sup>、抗抑郁<sup>[21]</sup>等功效。而针对松柏苷的生物活性研究仍较少,仅有部分文献报道其有抗氧化<sup>[22]</sup>作用。对比石斛属已研究发现的抗肿瘤<sup>[3]</sup>、增强免疫<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、缓解糖尿病<sup>[6]</sup>等生物活性。因此所建立的分析方法对石斛属新的生物活性研究奠定基础。

#### 参考文献

- 1 Wu CY, Li HW. Flora Republicae Popularis Sinicae(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 1999.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- 3 Zhen QP, Qiu DS, Liu XJ, et al. Study on anti-tumor active ingredients of *Dendrobium candidum* [J]. Mod Food Sci & Tech(现代食品科技), 2014, 5: 12-17.
- 4 Methacanon P, Madla S, Kirtikara K, et al. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers [J]. Carbohydr Polym, 2005, 60: 199-203.
- 5 Luo QL, Tang ZH, Zhang XF, et al. Chemical properties and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 89: 219-227.