

3 种种源铁皮石斛叶黄酮类成分 HPLC 特征图谱比较

黄月纯¹, 谢镇山², 任晋², 叶家宏¹, 魏刚^{2*}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究不同产地种源铁皮石斛叶黄酮类成分 HPLC 特征图谱,并初步比较丹霞地貌种源(广东、福建、浙江、江西)、浙江本地种、铁皮兰种(广西、云南)特征图谱的差异。方法:采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水(梯度洗脱),检测波长 340 nm,柱温 25 °C,流速 0.8 mL·min⁻¹。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004A 版)生成共有模式。结果:3 种种源的 23 批样品共标示出 14 个共有特征峰。其中,10 批丹霞种源样品标示出 12 个共有特征峰(峰 14 为最强峰),样品相似度为 0.880 ~ 0.996;6 批浙江本地种源样品标示出 13 个共有特征峰(主要峰的相对峰面积较接近),样品相似度 0.774 ~ 0.981;7 批铁皮兰种源样品标示出 9 个共有特征峰(峰 10,峰 11 相对峰面积较大),样品相似度 0.922 ~ 0.974。丹霞种源对照图谱与浙江本地种对照图谱、铁皮兰种对照图谱的相似度分别为 0.395,0.061,铁皮兰种对照图谱与浙江本地种对照图谱相似度仅为 0.370。结论:该分析方法准确可靠,重复性好;相同种源铁皮石斛叶黄酮类成分群基本一致,显示铁皮石斛叶内在的稳定性;不同产地种源成分群组成及比例存在明显差异,亦为快速区分丹霞种源、浙江本地种、铁皮兰种区域特征提供了依据。

[关键词] 铁皮石斛叶; 种源区域; 丹霞铁皮种; 浙江本地种; 铁皮兰种; 特征图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0037-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240037

Comparison of HPLC Characteristic Spectrum of Flavonoids on Leaves of *Dendrobium officinale* from Three Provenance Sources HUANG Yue-chun¹, XIE Zhen-shan², REN Jin², YE Jia-hong², WEI Gang^{2*}
(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the HPLC characteristic spectrum of flavonoids on leaves of *Dendrobium officinale* from different provenance sources and initially compare the characteristic spectrum among Danxia landform (Guangdong, Fujian, Zhejiang and Jiangxi), Tiejilan (Guangxi, Yunnan) and native species from Zhejiang. **Method:** HPLC was used with Kromasil 100-5 C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); with methanol-water (gradient elution) as a mobile phase, detection wavelength of 340 nm, column temperature of 25 °C, and flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. A common mode was generated with Traditional Chinese medicine (TCM) chromatographic fingerprint similarity evaluation software system (2004A version) by the State Pharmacopoeia Commission. **Result:** 14 common peaks were marked in 23 batches of leaves of *D. officinale*. Among them, 12 common peaks were marked in 10 batches of samples from Danxia landform and the similarity was 0.880-0.996. 13 common peaks were marked in 6 batches of samples from Zhejiang landform and the similarity was 0.774-0.981. 9 common peaks were marked in 7 batches of samples from Tiejilan landform (relative peak area was larger for peak 10 and peak 11) and the similarity was 0.922-0.974. The similarities of Danxia landform with 6 batches from Zhejiang and 7 batches from Tiejilan were 0.395 and 0.061, respectively. The similarity of Tiejilan landform with 6 batches from Zhejiang was 0.370 only. **Conclusion:** The method is accurate and reliable, and has a better reproducibility. The main flavonoids components of the same provenance sources are basically the same, indicating internal stability of

[收稿日期] 20150315(009)

[基金项目] 广东省科技基础条件建设项目(2013B060400022)

[第一作者] 黄月纯,主任中药师,硕士生导师,从事中药质量标准研究与指纹图谱分析研究,Tel:0757-85658348, E-mail:huangyuechun@163.com

[通讯作者] *魏刚,研究员,博士生导师,从事中药新药研究与指纹图谱分析,Tel:020-39358166, E-mail:weigang021@163.com

D. officinale, but significant difference was present in components and ratio for different regions and provenance sources, providing a reference to quickly discriminate the provincial characteristics among Danxia landform, Tiejilan and native species from Zhejiang.

[Key words] leaves of *Dendrobium officinale*; population district; provenance source from Danxia landform; Tiejilan; native species from Zhejiang; characteristic spectrum; HPLC

铁皮石斛是药用石斛中的上品,功能益胃生津,滋阴清热,用于热病津伤,口干烦渴,胃阴不足,食少干呕,病后虚热不退,阴虚火旺,骨蒸劳热,目暗不明,筋骨微软^[1]。根据铁皮石斛种质资源的区域记载,主要分布在广东、广西、浙江、福建、云南、江西等地^[2]。课题组基于文献考证、野外考察和产地实地观察以及对不同产地样品进行 HPLC 特征指纹图谱研究,提出铁皮石斛“丹霞铁皮种(广东、福建、浙江、江西)”、“浙江本地种”、“铁皮兰种(广西、云南)”的种源概念,为理清当前铁皮石斛种源混乱的局面提供了一定依据^[3]。近年来研究发现铁皮石斛叶具有含量较为丰富的以芹菜素作为苷元的多种黄酮碳苷类成分^[4],现代药理实验证明黄酮碳苷类成分具有抗氧化^[5-6]、抗肿瘤^[7]、抗炎^[8]、保肝^[9]等活性,为了更好地开发铁皮石斛叶药用价值,缓解铁皮石斛的资源紧缺,有必要做进一步的研究。目前文献对铁皮石斛叶黄酮类成分的研究相对较少,周桂芬等从^[4]浙江产的铁皮石斛叶中分离鉴定出 8 个黄酮碳苷类成分,主要包括芹菜素-6-C- α -L-阿拉伯糖-8-C- β -D-木糖苷、夏佛塔苷、异夏佛塔苷等,并建立了相应的指纹图谱,但不同产地、种源铁皮石斛叶黄酮类是否有差异,是否与茎的指纹图谱具有相关性,尚不明确。本研究对不同产地铁皮石斛叶黄酮类进行 HPLC 特征指纹图谱研究,发现不同种源铁皮石斛叶黄酮类特征指纹图谱有明显差异,为快速鉴别铁皮石斛种源提供了一定的依据。

1 材料

HP 1200 系列高效液相色谱仪(二极管阵列检测器,美国 Agilent 公司)。10 批丹霞地貌种源铁皮石斛叶(编号 DX1~DX10),6 批浙江本地种源铁皮石斛叶(编号 ZJ1~ZJ6),7 批广西、云南产铁皮石斛叶(编号 TPL1~TPL7),来源见表 1。经广州中医药大学魏刚研究员鉴定系铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的叶,将鲜品在 60℃ 条件下减压干燥。夏佛塔苷(批号 110412,纯度 $\geq 99\%$),异夏佛塔苷(批号 121024,纯度 $\geq 99\%$)对照品均购自上海融禾医药科技发展有限公司;甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为纯化水。

表 1 铁皮石斛叶样品来源

Table 1 Sources of leaves of *Dendrobium officinale*

编号	来源	编号	来源	编号	来源
DX1	浙江武义	ZJ1	浙江天台	TPL1	云南红河
DX 2	广东南雄	ZJ2	浙江义乌	TPL2	云南昆明
DX 3	福建冠豸山	ZJ3	浙江永康	TPL3	广西玉林
DX 4	江西广昌	ZJ4	浙江义乌	TPL4	广西西林
DX 5	江西井冈山	ZJ5	浙江天台	TPL5	云南德宏
DX 6	福建连城	ZJ6	浙江杭州	TPL6	云南保山
DX 7	浙江武义			TPL7	广西容县
DX 8	福建武夷山				
DX 9	广东仁化				
DX 10	广东韶关				

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~6 min,25%~30% A;6~25 min,30%~45% A;25~40 min,45%~60% A),检测波长 340 nm,柱温 25℃,流速 0.8 mL·min⁻¹。

2.2 供试品溶液的制备 取铁皮石斛叶粉末 0.6 g,精密称定,加 80% 甲醇 25 mL,超声提取 50 min,取出,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加 80% 甲醇使溶解,转移至 2 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 对照品溶液的制备 取异夏佛塔苷、夏佛塔苷对照品适量,精密称定,加 80% 甲醇制成每 1 mL 中含异夏佛塔苷 789.5 μ g,夏佛塔苷 473.5 μ g 的混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液(ZJ1) 2 μ L,连续进样 6 次,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.5%,相对峰面积的 RSD 均 < 3%,说明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取供试品溶液(ZJ1) 2 μ L,分别在 0,2,4,6,12,24 h 进样,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 2%,相对峰面积的 RSD 均 < 3%,说明 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品(ZJ1)6份,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,进样分析,结果各共有峰的相对保留时间的RSD均<2%,相对峰面积的RSD均<3%,说明该方法重复性良好。

2.5 样品检测 精密吸取对照品溶液及供试品溶液各2 μL,依法进样分析。

2.6 特征图谱的建立与分析

2.6.1 共有特征峰的分析 不同种源样品的色谱见图1~3。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004A版),以均数法生成样品的共有模式,不同种源样品共有模式比较见图4。根据样品分析结果,10批丹霞种铁皮石斛叶主要有12个共有特征峰,以峰6,峰7,峰12,峰14为主,峰14为最强峰;6批浙江本地种铁皮石斛叶主要有13个共有特征峰,以多数峰的峰面积比值相对较接近为主要特征;7批铁皮兰种铁皮石斛叶主要有9个共有特征峰,以峰10,峰11为强峰为主要特征,从峰形看,3种种源有较大差异。以峰7为参照峰(S)分别计算各共有特征峰的相对保留时间与相对峰面积,结果见表2。经对照品保留时间定位及紫外光谱分析,峰3为异夏佛塔苷,峰4为夏佛塔苷。

表 2 3 种种源铁皮石斛叶 HPLC 特征图谱共有峰分析
Table 2 Results of HPLC characteristic spectrum about 3 kinds of provenance sources of leaves of *D. officinale*

峰号	丹霞铁皮种		浙江本地种		铁皮兰种	
	平均相对保留时间	相对峰面积均值	平均相对保留时间	相对峰面积均值	平均相对保留时间	相对峰面积均值
1	0.623	0.243	0.625	1.396	0.624	5.790
2	0.747	0.125	0.749	0.945	0.748	0.577
3	0.781	0.141	0.785	0.648	0.785	0.397
4	0.823	0.147	0.829	0.412	0.829	0.292
5	0.888	0.161	-	-	-	-
6	0.967	1.158	0.960	0.510	0.965	0.475
7(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	1.025	0.247	1.025	0.987	-	-
9	1.076	0.229	1.072	0.803	-	-
10	0.000	-	1.124	0.361	1.110	33.379
11	0.000	-	1.141	0.362	1.134	24.989
12	1.161	0.969	1.164	0.563	1.168	2.358
13	1.292	0.392	1.287	1.134	-	-
14	1.340	5.130	1.334	0.635	-	-

2.6.2 相似度分析 采用国家药典委员会“中药

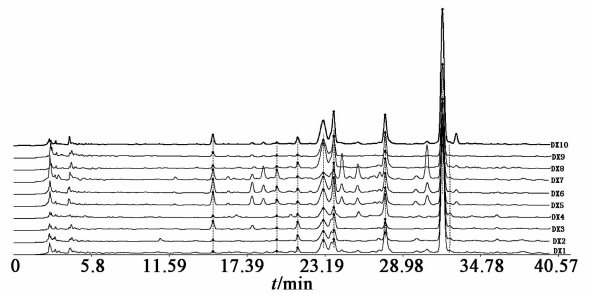


图 1 10 批丹霞种源铁皮石斛叶 HPLC
Fig.1 HPLC characteristic spectrum overlapping of 10 batches of leaves of *D. officinale* of provenance sources from Danxia landform

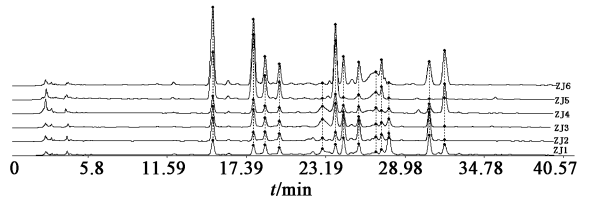


图 2 6 批浙江本地种铁皮石斛叶 HPLC
Fig.2 HPLC characteristic spectrum overlapping of 6 batches of leaves of *D. officinale* of Tiepilan

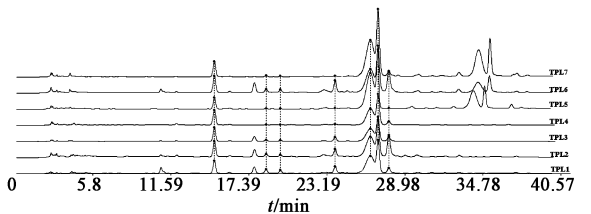


图 3 7 批铁皮兰种铁皮石斛叶 HPLC
Fig.3 HPLC characteristic spectrum overlapping of 7 batches of leaves of *D. officinale* of Tiepilan

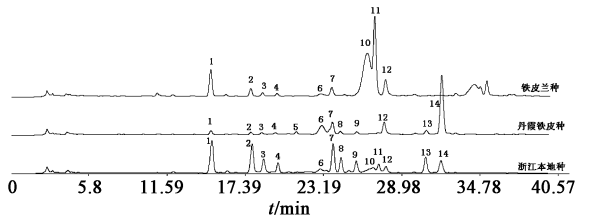


图 4 3 种种源铁皮石斛叶 HPLC 特征谱共有模式比较
Fig.4 comparison of common pattern of HPLC characteristic spectrum about 3 kinds of provenance sources of leaves of *D. officinale*

色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004A版),以均数法分析相似度。分别以不同种源共有模式为对照,分析各样品相似度,结果见表3。

3 讨论

本研究筛选优化了能同时快速对不同种源铁皮石斛叶黄酮类成分进行 HPLC 特征图谱分析的色谱

表 3 不同种源铁皮石斛 HPLC 特征图谱相似度
Table 3 Results of similarities of HPLC characteristic spectrum of leaves of *D. officinale* from different provenance sources

样品编号	丹霞铁皮种	浙江本地种	铁皮兰种
DX1	0.989	0.346	0.055
DX2	0.980	0.306	0.024
DX3	0.974	0.342	0.030
DX4	0.978	0.304	0.031
DX5	0.963	0.565	0.118
DX6	0.964	0.578	0.116
DX7	0.880	0.502	0.103
DX8	0.982	0.399	0.059
DX9	0.927	0.425	0.051
DX10	0.996	0.399	0.053
丹霞铁皮种	1.000	0.423	0.061
ZJ1	0.456	0.789	0.266
ZJ2	0.180	0.790	0.246
ZJ3	0.222	0.915	0.283
ZJ4	0.771	0.815	0.242
ZJ5	0.187	0.896	0.330
ZJ6	0.450	0.979	0.422
浙江本地种	0.395	1.000	0.370
TPL1	0.072	0.278	0.974
TPL2	0.116	0.300	0.955
TPL3	0.073	0.300	0.970
TPL4	0.042	0.205	0.971
TPL5	0.014	0.066	0.922
TPL6	0.102	0.301	0.966
TPL7	0.027	0.098	0.933
铁皮兰种	0.061	0.370	1.000

条件,大部分峰具有相对较好的分离效果。

研究发现,不同种源样品特征峰有较大差异,3 种种源的 23 批样品总共标示出 14 个共有特征峰,10 批丹霞种源样品均标示出 12 个共有特征峰,峰形相似,以峰 14 为最强峰,样品相似度相对较高(0.880~0.996)。6 批浙江本地种源样品均标示出 13 个共有特征峰,其中峰 1,峰 2,峰 3,峰 4,峰 7,峰 8,峰 9 的峰形较稳定,峰 13,峰 14 的差异较大,与文献[4]报道的浙江种基本一致,但样品相似度相对差异较大(0.774~0.981)。7 批铁皮兰种源样品标示出 9 个共有特征峰,以峰 10,峰 11 相对峰面积明显较大为主要特征,部分样品在保留时间 32~36 min 内尚有 2 个较大的特征峰,除去这 2 个特征峰,

样品相似度相对较高(0.922~0.974)。丹霞种源共有模式与浙江本地种共有模式、铁皮兰种共有模式的相似度仅为 0.395,0.061,铁皮兰种共有模式与浙江本地种共有模式相似度也仅为 0.370,提示不同产地种源成分群组成及比例存在明显差异。由于对照品来源关系,本研究只鉴别了 2 个特征峰,分别为夏佛塔苷和异夏佛塔苷,其他成分的鉴别有待进一步研究。

本研究初步探讨了不同来源铁皮石斛叶特征指纹图谱差异,为快速区分丹霞种、浙江本地种、铁皮兰种区域特征提供了一定的参考。3 种种源铁皮石斛叶指纹图谱与前期研究的茎指纹图谱^[3]有一定相关性。由于样品量较少,特征图谱有待进一步加大样本予以完善。

[参考文献]

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

[2] 包雪声,顺庆生,陈立钻,等. 中国药用石斛[M]. 上海:复旦大学出版社,2001:56.

[3] 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):467-469.

[4] 周桂芬,吕圭源. 铁皮石斛叶中黄酮碳苷类成分的高效液相指纹图谱及指标成分的含量测定[J]. 中国药学杂志,2012,47(11):889-891.

[5] Phan V K, Nguyen X C, Nguyen X N, et al. Antioxidant activity of a new C-glycosylflavone from the leaves of *Ficus microcarpa* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(2):633-637.

[6] Barreca D, Bellocco E, Leuzzi U, et al. First evidence of C-and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties [J]. *Food Chem*, 2014, 149(8):244-252.

[7] Park S H, Kim J H, Lee D H, et al. Luteolin 8-C- β -fucopyranoside inhibits invasion and suppresses TPA-induced MMP-9 and IL-8 via ERK/AP-1 and ERK/NF- κ B signaling in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Biochimie*, 2013, 95(11):2082-2090.

[8] Lee W, Ku S K, Bae J S. Vascular barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Vascul Pharmacol*, 2014, 62(1):3-14.

[9] Orhan D D, Aslan M, Aktay G, et al. Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle [J]. *Life Sci*, 2003, 72(20):2273-2283.

[责任编辑 顾雪竹]