

# 丹霞种、云南广南种铁皮石斛中主要黄酮苷的分离鉴定

张小凤<sup>1</sup>, 周春花<sup>1</sup>, 张龙开<sup>1</sup>, 蒋梅<sup>1</sup>, 谢镇山<sup>2</sup>, 袁媛<sup>3\*</sup>, 黄月纯<sup>2</sup>, 罗颖懿<sup>1</sup>, 魏刚<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006;

2. 广州中医药大学 第一附属医院, 广州 510405; 3. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**对 2 个道地种源(丹霞种、云南广南种)铁皮石斛中的黄酮苷成分进行提取分离、纯化及结构鉴定,为确认铁皮石斛的共性黄酮苷成分提供实验依据。**方法:**①采用 70% 乙醇提取两个产地铁皮石斛叶的总黄酮成分,依次采用有机溶剂石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取粗提物,运用大孔吸附树脂 AB-8, LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)以及 ODS 柱色谱对水饱和正丁醇萃取部位进行分离纯化,通过化合物的理化性质结合 HPLC, ESI-MS<sup>n</sup>, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 等现代波谱学方法鉴定黄酮苷结构。②利用 HPLC 分析比较不同道地种源(丹霞种、云南广南种、广西铁皮兰种、浙江本地种)铁皮石斛的黄酮苷共有成分。**结果:**从 2 个产地铁皮石斛叶中共分离得到了 5 个黄酮苷化合物,经鉴定为芦丁,新西兰牡荆苷 II, 新西兰牡荆苷 I, 佛莱心苷, 异佛莱心苷。4 个不同道地种源(丹霞种、云南广南种、广西铁皮兰种、浙江本地种)铁皮石斛茎中均能检出新西兰牡荆苷 II, 新西兰牡荆苷 I 特征峰,其中新西兰牡荆苷 II 丰度相对较大,而佛莱心苷、异佛莱心苷在云南广南种、广西铁皮兰种中出峰明显,芦丁则在丹霞种中尤为突出。**结论:**新西兰牡荆苷 II 为铁皮石斛不同道地种源(丹霞种、云南广南种、广西铁皮兰种、浙江本地种)的共性黄酮苷成分,可作为铁皮石斛特征图谱的参照物。

**[关键词]** 铁皮石斛; 黄酮苷; 芦丁; 新西兰牡荆苷 II; 新西兰牡荆苷 I; 佛莱心苷; 异佛莱心苷

**[中图分类号]** R284.1; R282.6; R289; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0029-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20182417

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180927.1141.023.html>

**[网络出版时间]** 2018-09-28 10:18

## Isolation and Identification of Main Flavonoid Glycosides of *Dendrobium officinale* from Danxia Species and Yunnan Guangnan Species

ZHANG Xiao-feng<sup>1</sup>, ZHOU Chun-hua<sup>1</sup>, ZHANG Long-kai<sup>1</sup>, JIANG Mei<sup>1</sup>, XIE Zhen-shan<sup>2</sup>,  
YUAN Yuan<sup>3\*</sup>, HUANG Yue-chun<sup>2</sup>, LUO Ying-yi<sup>1</sup>, WEI Gang<sup>1\*</sup>

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

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

3. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese  
Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To extract, isolate, purify and identify the structures of the flavonoid glycoside in *Dendrobium officinale* from two different origin places (Danxia species and Yunnan Guangnan species), and provide experimental reference for confirming the common flavonoid glycoside components in *D. officinale*. **Method:** ①70% ethanol was applied to extract the total flavonoids in leaves of *D. officinale* from two different species. Organic solvents petroleum ether, acetic ether and water saturated *n*-butyl alcohol were used in turn to

**[收稿日期]** 20180622(008)

**[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]** 张小凤,在读硕士,从事中药创新药物与指纹图谱研究, Tel:020-39358519, E-mail:15521076223@163.com

**[通信作者]** \*袁媛,研究员,从事中药鉴定与分子药理学研究, Tel:010-64087649, E-mail: y\_yuan0732@163.com;

\*魏刚,研究员,博士生导师,从事中药创新药物与指纹图谱分析,石斛类药材规范化研究, Tel:020-39358519, E-mail: weigang021@163.com

extract the crude extraction. Then AB-8 Macroporous resin, Sephadex LH-20 and ODS chromatographic column were applied to isolate and purify the water saturated *n*-butyl alcohol extraction fraction. The structures of flavonoid glycoside were identified by studying physicochemical property, applying modern spectroscopy method like HPLC, ESI-MS<sup>n</sup>, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, etc. ②HPLC characteristic spectrum technique was used to analyse and compare the common flavonoid glycoside components in *Dendrobium officinale* from different origin places (Danxia species, Yunnan Guangnan species, Guangxi Tiepilan species and Zhejiang native species). **Result:** Five flavonoid glycoside compounds were isolated from the crude extractions of the leaves of *D. officinale* from two different species, and they were identified as rutin, vicenin II, vicenin I, violanthin and isoviolanthin. The characteristic spectrum of vicenin II and vicenin I were detected in stems of *D. officinale* from four different origin places (Danxia species, Yunnan Guangnan species, Guangxi Tiepilan species and Zhejiang native species), and vicenin II had a better separation degree in the characteristic spectrum. However, the characteristic spectrum of violanthin and isoviolanthin were more obvious in Yunnan Guangnan species and Guangxi Tiepilan species, while rutin was obvious in the Danxia species. **Conclusion:** Vicenin II is the common flavonoid glycosides component in *D. officinale* from different origin places (Danxia species, Yunnan Guangnan species, Guangxi Tiepilan species and Zhejiang native species), and can be used as the internal reference material for the characteristic spectrum of *D. officinale*.

[ **Key words** ] *Dendrobium officinale*; flavonoid glycoside; rutin; vicenin II; vicenin I; violanthin; isoviolanthin

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 为中国传统名贵中药,味甘、微寒,常用于热病津伤,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,筋骨痿软<sup>[1]</sup>。研究表明,铁皮石斛中含有多糖、黄酮类物质、联苜类和菲酚类成分、氨基酸和微量元素等成分<sup>[2]</sup>。其中,黄酮类成分具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖等药理作用<sup>[3]</sup>,而关于铁皮石斛黄酮类成分研究的报道较少,侧重于铁皮石斛中黄酮类成分的含量测定及活性评价,还有部分研究详细报道了黄酮类成分的化学结构,如管惠娟<sup>[4]</sup>从铁皮石斛茎水提物的乙酸乙酯和正丁醇萃取部位分离得到 19 个化合物,其中 9 个为黄酮类化合物;李燕等<sup>[5]</sup>从铁皮石斛脂溶性部位分离得到 17 个化合物,其中有 2 个二氢黄酮类化合物。但仅仅从这些报道的已知化合物中,还不足以发现它们与不同种源铁皮石斛之间有何关联。

近年来,HPLC 指纹图谱技术已经广泛应用于中药化学成分的质量分析,而铁皮石斛种源众多,质量不一,如安徽、广东、广西、浙江、福建、云南等地均有分布,为铁皮石斛的质量评价增加了难度,但同属不同产地中药的化学成分具有一定的相似性,可通过 HPLC 指纹图谱技术全面评价其质量体系,因此现在急需找到不同种源铁皮石斛的一种或几种共性成分。课题组前期基于本草考证、野外实地考察及对不同产地样品进行 HPLC 特征指纹图谱研究,提

出铁皮石斛道地种源有“丹霞铁皮种”“浙江本地种”“铁皮兰种”等<sup>[6]</sup>。叶子等<sup>[7]</sup>从铁皮石斛中分离得到专属性黄酮类成分佛莱心苷,但本课题组近年对不同道地种源铁皮石斛黄酮类成分开展了系统研究,发现佛莱心苷在广西“铁皮兰种”和“云南广南种”中含量较高,在“丹霞铁皮种”和“浙江本地种”中含量较低或难以检出<sup>[8]</sup>。故本研究选择两种代表性种源(丹霞种、云南广南种)的黄酮苷类成分进行提取分离、纯化和结构鉴定,得到 5 个黄酮苷成分,并且在前期特征图谱分析的基础上<sup>[6,9]</sup>,进一步分析比较 4 个不同道地种源(丹霞种、云南广南种、广西铁皮兰种、浙江本地种)铁皮石斛中黄酮苷成分的共性与个性,最后确认新西兰牡荆苷 II 为共性特征成分,可为铁皮石斛的特征图谱分析提供重要的实验依据。

## 1 材料

TSQ Quantum Ultra 型三重四级杆液相色谱-质谱联用仪(美国赛默飞公司);AVANCE III HD 500 型超导脉冲傅里叶变换核磁共振谱仪(德国 Bruker 公司);HP1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,包括 DAD 检测器);MS 204 型 1/1 万电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

用于提取分离的新鲜丹霞种铁皮石斛叶(购自广东仁化县鑫宇生态开发有限公司,批号 20140501),新鲜云南广南种铁皮石斛叶(购自于云

南省保山市龙陵县金石石斛种植园,批号 20140409),经广州中医药大学新药开发研究中心魏刚研究员鉴定为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的叶;用于特征图谱分析的 4 批铁皮石斛茎,包括丹霞种,来源于广东仁化鑫宇生态开发有限公司;云南广南种,来源于云南省保山市龙陵县金石石斛种植园;广西铁皮兰种,来源于广西桂平仙宝园铁皮石斛有限责任公司;浙江本地种,来源于浙江天皇药业有限公司,经广州中医药大学新药开发研究中心魏刚研究员鉴定为兰科植物铁皮石斛 *D. officinale* 的新鲜茎,鲜品均在 60 ℃ 条件下减压烘干,备用。

用于特征图谱分析用的芦丁(批号 100080-201408,纯度 ≥ 90.2%),夏佛塔苷(批号 111912-201302,纯度 ≥ 92.5%),均购自中国食品药品检定研究院;异夏佛塔苷(批号 121024,纯度 ≥ 99%),购自上海融禾医药科技发展有限公司;新西兰牡荆苷 II,新西兰牡荆苷 I,佛莱心苷,异佛莱心苷为本研究提取分离获得的单体,经峰面积归一化法计算,纯度均供含量测定用。

AB-8 型大孔吸附树脂(广州市皖业化工有限公司);ODS-A 填料(50 μm,天津波鸿树脂科技有限公司);LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20, Pharmacia 公司)。乙腈(色谱纯,德国 Merk 公司);甲醇(色谱纯,德国 Merk 公司);四氢呋喃(色谱纯,美国 MREDA 公司);水为屈臣氏蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 丹霞种铁皮石斛叶黄酮苷的提取分离** 将干燥的丹霞种铁皮石斛叶粉碎,过 1 号筛,称取药材粉末 2.0 kg,用 70% 的乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,用旋转蒸发器减压浓缩,得含水浸膏 1 183.0 g。加适量水溶解,用等体积的石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇溶液依次进行萃取,得到水饱和正丁醇萃取部位总浸膏 152.1 g。

取正丁醇层干膏 142.1 g 进行大孔树脂分离纯化,用水和 15%、30%、50%、95% 乙醇依次进行洗脱,将 30% 乙醇洗脱液合并,减压浓缩至一定体积。用 50% 甲醇溶解浓缩液,上样至 Sephadex LH-20 色谱柱,50% 甲醇等度洗脱,并用 HPLC 进行检测,合并相同流分,浓缩较纯部分,并用 30% 甲醇反复重结晶,分离得到化合物芦丁。

将上述经 Sephadex LH-20 色谱柱纯化的其他

谱分离纯化,以 20%、30%、40%、50% 甲醇依次洗脱,进行 HPLC 检测,合并相同部位,30% 甲醇洗脱部位经浓缩后反复重结晶得到化合物新西兰牡荆苷 II,新西兰牡荆苷 I。

**2.2 云南广南种铁皮石斛叶黄酮苷的提取分离** 将干燥的云南广南种铁皮石斛叶粉碎,过 1 号筛,称取药材粗粉 4.8 kg,用 70% 的乙醇回流提取 3 次,每次 2 h。滤过,合并滤液,减压浓缩得浓缩液 3 L(经换算浸膏量为 1 644.0 g),加水稀释成混悬状。用等体积的石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇溶液依次萃取,得到水饱和正丁醇萃取部位总浸膏为 258.5 g。

取正丁醇层浸膏 244.7 g 进行大孔树脂分离纯化,依次用水和 10%、20%、30%、50% 乙醇进行洗脱,将 30% 乙醇洗脱部位合并,减压浓缩至一定体积,过 Sephadex LH-20 再次进行分离纯化。用 50% 甲醇等度洗脱,并用 HPLC 进行检测,合并相同部位,将较纯部分进行浓缩后,用 30% 甲醇进行反复重结晶,得到化合物芦丁。

将过完 Sephadex LH-20 色谱的其他相同部位浓缩,10% 乙腈溶解,进行 ODS 色谱的进一步分离纯化。依次以 10%、15%、20% 乙腈洗脱,洗脱液进行 HPLC 检测,合并相同流分,15% 乙腈洗脱部分经浓缩后进行反复重结晶,得到化合物新西兰牡荆苷 II 和 新西兰牡荆苷 I。

将过完 ODS 色谱后的 20% 乙腈洗脱部分浓缩至一定浓度,进行制备液相分离,PRC-ODS 制备柱(4.6 mm × 250 mm, 7 μm),45% 甲醇等度洗脱,流速 20 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 340 nm。将目标流分合并,浓缩,得到化合物佛莱心苷和异佛莱心苷。

**2.3 结构鉴定** 芦丁 黄色粉末,与盐酸-镁粉反应呈紫红色,推测该化合物为黄酮类化合物;与氨性氯化锶反应出现绿色沉淀,说明有邻二酚羟基;与 Molish 试剂反应呈阳性,则化合物中接有糖,综合推测化合物可能为黄酮苷类化合物。UV(MeOH) λ<sub>max</sub> 为 255,355 nm,进一步推证该化合物为黄酮苷类。ESI-MS *m/z* 609 [M - H]<sup>-</sup>,则相对分子质量为 610,分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>。其二级碎片离子为 *m/z* 301 [(M - H) - C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>]<sup>-</sup>,且为基峰,是上级离子失去 C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> 的碎片离子,表明化合物的 C-3 位同时连接有两个取代糖。<sup>1</sup>H-NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz), δ: 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.39 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-8), 7.61 (1H, d, H-3'), 6.86 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 7.62 (1H, dd, *J* = 2.1 Hz, H-6'), 5.10

(1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-1'') 此为葡萄糖端基上氢的信号, 4.51 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz, H-1''') 此为鼠李糖端基上氢的信号, 1.11 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-6''') 此为鼠李糖 CH<sub>3</sub> 上氢的信号。<sup>13</sup>C-NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz) 化学位移归属见表 1。综合波谱数据与文献 [10] 对照, 该化合物鉴定为芦丁。

表 1 芦丁, 新西兰牡荆苷 II, 新西兰牡荆苷 I, 佛莱心苷, 异佛莱心苷的<sup>13</sup>C-NMR 化学位移 (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz)

Table 1 <sup>13</sup>C-NMR chemical shift (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz) of rutin, vicanin II, vicanin I, violanthin and isoviolanthin

碳位	芦丁	新西兰牡荆苷 II	新西兰牡荆苷 I	佛莱心苷	异佛莱心苷
2	158.51	163.63	165.28	166.54	166.61
3	135.63	103.86	102.56	105.42	104.91
4	179.42	184.15	182.89	184.05	184.04
5	162.99	157.41	161.35	154.80	157.10
6	99.94	107.95	106.28	109.50	107.65
7	166.02	162.75	159.13	162.89	163.97
8	94.86	105.03	104.44	104.71	105.40
9	159.33	156.43	156.01	161.72	158.79
10	105.63	103.70	103.75	103.89	103.34
1'	123.55	123.28	121.95	122.91	123.26
2'	117.69	130.06	128.77	129.45	130.06
3'	145.84	117.00	115.61	116.97	117.07
4'	149.81	161.67	160.52	157.10	162.77
5'	116.05	117.00	115.61	117.08	116.95
6'	123.13	129.68	128.41	129.29	129.64
1''	104.72	70.95	72.43	73.86	75.64
2''	73.94	72.35	71.74	72.05	73.34
3''	78.19	79.73	78.88	80.28	80.02
4''	69.71	71.11	70.85	75.20	73.64
5''	77.22	82.82	81.54	82.61	82.83
6''	68.55	61.77	61.70	63.15	63.09
1'''	102.42	75.27	74.56	77.41	77.44
2'''	72.24	71.66	70.44	75.59	75.24
3'''	72.10	79.11	78.20	74.88	73.27
4'''	75.73	70.95	70.09	72.90	72.89
5'''	71.40	82.55	69.56	72.36	71.78
6'''	17.88	61.77	-	18.43	18.43

新西兰牡荆苷 II 黄色粉末, 与盐酸-镁粉试剂充分反应呈紫红色, 提示该化合物为黄酮类化合物。与 Molish 试剂反应呈阳性, 推断为黄酮苷类化合

物。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  为 271, 336 nm, 进一步推证该化合物为黄酮苷类。ESI-MS  $m/z$  593 [M - H]<sup>-</sup>, 说明其相对分子质量为 594, 分子式 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>。其二级碎片离子有  $m/z$  503 [(M - H) - C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 473 [(M - H) - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 383 [(M - H) - C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 353 [(M - H) - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 其中 473 [(M - H) - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup> 是基峰, 为上级离子失去 C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> 的碎片离子, 表明该化合物的 C-6 位和 C-8 位取代糖均为六碳糖。<sup>1</sup>H-NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz),  $\delta$ : 6.58 (1H, s, H-3), 7.94 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-2', H-6'), 6.89 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-3', H-5'), 4.92 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz, H-1'') 此为葡萄糖端基上氢的信号, 5.11 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz, H-1''') 此为葡萄糖端基上氢的信号。<sup>13</sup>C-NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz) 化学位移归属见表 1。综合数据信息与文献 [11-12] 对照, 该化合物鉴定为新西兰牡荆苷 II。

新西兰牡荆苷 I 黄色粉末, 与镁粉-盐酸反应呈紫红色, 推测为黄酮类化合物; 与 Molish 试剂反应出现紫色环, 推断可能是黄酮苷类化合物。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  为 271, 336 nm, 推证该化合物为黄酮苷类。ESI-MS  $m/z$  563 [M - H]<sup>-</sup>, 相对分子质量为 564, 分子式 C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>。其二级碎片离子有  $m/z$  503 [(M - H) - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 473 [(M - H) - C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 443 [(M - H) - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 383 [(M - H) - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 353 [(M - H) - C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 其中  $m/z$  473 [(M - H) - C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup> 是基峰, 为上级离子失去 C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> 得到的碎片离子, 提示化合物的 C-6 位和 C-8 位存在五碳糖和六碳糖取代。<sup>1</sup>H-NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz),  $\delta$ : 6.56 (1H, s, H-3), 7.95 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-2', H-6'), 6.91 (2H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-3', H-5'), 4.98 (1H, d,  $J = 9.9$  Hz, H-1'') 此为葡萄糖端基上氢的信号, 5.12 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz, H-1''') 此为葡萄糖端基上氢的信号。<sup>13</sup>C-NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz) 化学位移归属见表 1。综合波谱数据与文献 [13] 对照, 该化合物鉴定为新西兰牡荆苷 I。

佛莱心苷 淡黄色粉末, 与镁粉-盐酸充分反应呈紫红色, 推测该化合物为黄酮类化合物。与 Molish 试剂反应出现紫色环, 推断是黄酮苷类化合物。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  为 271, 336 nm, 进一步推证该化合物为黄酮苷类。ESI-MS  $m/z$  577 [M - H]<sup>-</sup>, 推出相对分子质量应该为 578, 分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>。其二级碎片离子有  $m/z$  503 [(M - H) -

$C_3H_6O_2$ ] $^-$ , 487 [(M - H) -  $C_3H_6O_3$ ] $^-$ , 473 [(M - H) -  $C_4H_8O_3$ ] $^-$ , 457 [(M - H) -  $C_4H_8O_4$ ] $^-$ , 413 [(M - H) -  $C_3H_6O_2$  -  $C_3H_6O_3$ ] $^-$ , 383 [(M - H) -  $C_3H_6O_2$  -  $C_4H_8O_4$ ] $^-$  和 383 [(M - H) -  $C_3H_6O_3$  -  $C_4H_8O_3$ ] $^-$ , 353 [(M - H) -  $C_4H_8O_3$  -  $C_4H_8O_4$ ] $^-$ , 其中  $m/z$  457 [(M - H) -  $C_4H_8O_4$ ] $^-$  是基峰, 为上级离子失去  $C_4H_8O_4$  得到的碎片离子, 提示化合物的 C-6 位和 C-8 位存在六碳糖和甲基五碳糖取代。 $^1H-NMR$  (MeOD- $d_4$ , 500 MHz),  $\delta$ : 6.88 (1H, s, H-3), 7.92 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2', H-6'), 6.92 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', H-5'), 5.02 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-1'') 此为葡萄糖端基上氢的信号, 4.95 (1H, s, H-1''') 此为鼠李糖端基上氢的信号, 1.39 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-6''') 此为鼠李糖  $CH_3$  上氢的信号。 $^{13}C-NMR$  (MeOD- $d_4$ , 125 MHz) 化学位移归属见表 1。综合波谱数据与文献[14]对照, 该化合物鉴定为佛莱心苷。

**异佛莱心苷** 淡黄色粉末, 与镁粉和盐酸反应呈紫红色, 推测该化合物为黄酮类化合物。与 Molish 试剂反应出现紫色环, 推断为黄酮苷类化合物。UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  为 271, 336 nm, 推证该化合物为黄酮苷类。ESI-MS  $m/z$  577 [M - H] $^-$ , 推出相对分子质量应该为 578, 分子式为  $C_{27}H_{30}O_{14}$ 。其二级碎片离子有  $m/z$  503 [(M - H) -  $C_3H_6O_2$ ] $^-$ , 487 [(M - H) -  $C_3H_6O_3$ ] $^-$ , 473 [(M - H) -  $C_4H_8O_3$ ] $^-$ , 457 [(M - H) -  $C_4H_8O_4$ ] $^-$ , 413 [(M - H) -  $C_3H_6O_2$  -  $C_3H_6O_3$ ] $^-$ , 383 [(M - H) -  $C_3H_6O_2$  -  $C_4H_8O_4$ ] $^-$  和 383 [(M - H) -  $C_3H_6O_3$  -  $C_4H_8O_3$ ] $^-$ , 353 [(M - H) -  $C_4H_8O_3$  -  $C_4H_8O_4$ ] $^-$ , 其中  $m/z$  457 [(M - H) -  $C_4H_8O_4$ ] $^-$  是基峰, 即为上级离子失去  $C_4H_8O_4$  的碎片离子, 但与佛莱心苷相比,  $m/z$  503 [(M - H) -  $C_3H_6O_2$ ] $^-$  和  $m/z$  473 [(M - H) -  $C_4H_8O_3$ ] $^-$  的丰度明显较大, 说明化合物的 C-6 位, C-8 位分别有甲基五碳糖和六碳糖取代。 $^1H-NMR$  (MeOD- $d_4$ , 500 MHz),  $\delta$ : 6.54 (1H, s, H-3), 7.92 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-2', H-6'), 6.89 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', H-5'), 5.02 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-1'') 此为葡萄糖端基上氢的信号, 4.98 (1H, s, H-1''') 此为鼠李糖端基上氢的信号, 1.39 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-6''') 此为鼠李糖  $CH_3$  上氢的信号。 $^{13}C-NMR$  (MeOD- $d_4$ , 125 MHz) 化学位移归属见表 1。综合波谱数据与文献[15]对照, 该化合物鉴定为异佛莱心苷。

经过比较分析丹霞种、云南广南种铁皮石斛叶经 Sephadex LH-20, ODS 色谱分离得到的前 3 个化合物的 $^1H-NMR$ ,  $^{13}C-NMR$  核磁共振数据信息, 发现两个产地的数据基本一致, 可以确认丹霞种、云南广南种铁皮石斛中含有相同的组分芦丁, 新西兰牡荆苷 II, 新西兰牡荆苷 I, 文中已经对丹霞种铁皮石斛叶中的这 3 个成分进行了详细的结构鉴定, 故不再对云南广南种铁皮石斛中这 3 个化合物的结构鉴定进行累述。

## 2.4 4 个不同种源铁皮石斛茎黄酮苷成分的 HPLC 共性与特异性成分分析

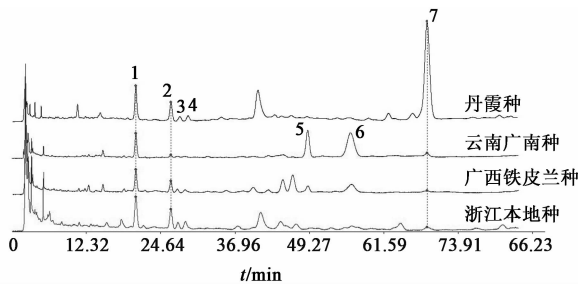
**2.4.1 色谱条件** 按课题组拟定的特征图谱分析方法。采用 Kromasil 100-5  $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相四氢呋喃-乙腈-甲醇 (10:22:5) (A)-0.05% 磷酸 (B), 梯度洗脱; 流速 1.0 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ ; 柱温 30  $^{\circ}C$ ; 检测波长 340 nm。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 取芦丁、夏佛塔苷和异夏佛塔苷对照品, 以及本研究提取分离获得的单体新西兰牡荆苷 II, 新西兰牡荆苷 I, 佛莱心苷与异佛莱心苷适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每 1 mL 含新西兰牡荆苷 II 92.5  $\mu$ g, 新西兰牡荆苷 I 84.3  $\mu$ g, 夏佛塔苷 71.4  $\mu$ g, 异夏佛塔苷 65.3  $\mu$ g, 佛莱心苷约 70.2  $\mu$ g, 异佛莱心苷 119.5  $\mu$ g 和芦丁 165.0  $\mu$ g 的对照品溶液。

**2.4.3 供试品溶液的制备**<sup>[6]</sup> 取 4 个种源的铁皮石斛粉末 (过 60 目筛) 约 2.5 g, 精密称定, 精密加入 80% 甲醇 125 mL, 加热回流 4 h, 取出, 放冷至室温, 滤过, 用 80% 甲醇适量洗涤滤渣, 合并滤液, 挥干溶剂, 残渣加 80% 甲醇使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

**2.4.4 特征成分分析** 按拟定方法进样分析, 鉴别了 7 个特征峰, 其中峰 1 ~ 峰 7 分别为新西兰牡荆苷 II, 新西兰牡荆苷 I, 夏佛塔苷, 异夏佛塔苷, 佛莱心苷, 异佛莱心苷, 芦丁, 结果见图 1。研究表明, 4 个不同道地种源 (丹霞种、云南广南种、广西铁皮兰种、浙江本地种) 铁皮石斛中均能检出新西兰牡荆苷 II, 新西兰牡荆苷 I 以及丰度差异很大的芦丁特征峰, 其中新西兰牡荆苷 II 丰度相对较大, 提示新西兰牡荆苷 II 可作为铁皮石斛特征图谱参照物的选择; 除云南广南种的夏佛塔苷、异夏佛塔苷特征峰丰度很小外, 其他三个种源均检出夏佛塔苷、异夏佛塔苷特征峰; 佛莱心苷与异佛莱心苷是云南广南种与广西铁皮兰种特异性特征峰, 而且云南广南种的丰度更大; 丹霞种的特点是芦丁峰特别显著, 而其他产

地样品该特征峰明显较小。



1. 新西兰牡荆苷 II; 2. 新西兰牡荆苷 I; 3. 夏佛塔苷; 4. 异夏佛塔苷; 5. 佛莱心苷; 6. 异佛莱心苷; 7. 芦丁

图1 4个不同种源铁皮石斛茎的HPLC色谱重叠

Fig. 1 HPLC characteristic spectrum overlapping of stems of *Dendrobium officinale* from four different origin places

### 3 讨论

铁皮石斛作为一种珍稀名贵中药材,正日益受到人们的关注,野生石斛更是濒危灭绝。但随着铁皮石斛栽培行业的发展,铁皮石斛药材不断丰富市场的同时,也面临种源不清、产品质量参差不齐,甚至以假充真的挑战。铁皮石斛现有质量主要以多糖含量及单糖组成进行评价<sup>[1]</sup>,特异性不强,因此不断完善铁皮石斛的质量评价标准至关重要。经文献报道,发现铁皮石斛中含有多种以芹菜素为苷元的黄酮碳类成分<sup>[16]</sup>,可考虑以此作为铁皮石斛质量评价标准的参考。

课题组前期对大量的铁皮石斛道地种源开展了特征图谱分析<sup>[6,8]</sup>,发现既有共性,也有个性;并比较了铁皮石斛茎和叶的黄酮苷成分<sup>[9]</sup>,发现可以利用铁皮石斛叶开展共性黄酮苷的分离,因此本研究在此基础上建立了铁皮石斛黄酮苷成分的制备方法,先后从丹霞种、云南广南种2个代表性种源中共分离得到了5种黄酮苷类成分,分别为芦丁,新西兰牡荆苷II,新西兰牡荆苷I,佛莱心苷和异佛莱心苷;在分离得到以上单体后,进一步选择前期有分析基础的不同道地种源(丹霞种、浙江本地种、广西铁皮兰种、云南广南种)进行比较,通过HPLC图谱分析上述4个不同道地种源的黄酮苷类成分,得出新西兰牡荆苷II,I可作为铁皮石斛的共性成分及其质量评价的特征性成分,其中尤其新西兰牡荆苷II含量较高、分离度较好,可作为特征图谱的内标物,为进一步完善铁皮石斛的质量评价指标提供了参考依据。同时本研究也存在改进的地方,对铁皮石斛中含量较低的其他未分离的黄酮类化合物可进一步开展提取分离鉴定的研究,并对其药理活性开展评价。

### [参考文献]

[1] 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,2015:282-283.

[2] 高正华,杨兵勋,陈立钻. 铁皮石斛的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2008,25(8):692-695.

[3] 孙恒,胡强,金航,等. 铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(11):225-234.

[4] 管惠娟. 铁皮石斛的化学成分及指纹图谱研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009.

[5] 李燕,王春兰,王芳菲,等. 铁皮石斛中的酚酸类及二氢黄酮类成分[J]. 中国药学杂志,2010,45(13):975-979.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 黄月纯,杨丽娥,刘宏源,等. 鲜铁皮石斛茎、叶高效液相色谱特征图谱比较[J]. 广州中医药大学学报,2012,29(5):561-565.

[10] 韩宝来,李元元,张玲玲,等. 芦丁的光谱分析[J]. 化学与黏合,2017,39(1):72-76.

[11] Velozo L S M, Ferreira M J P, Santos M I S, et al. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda* [J]. Fitoterapia,2008,80(2):119-122.

[12] 唐海明,陈建南,徐香琴,等. 狭基线纹香茶菜水溶性成分及其抗肿瘤活性研究[J]. 中草药,2014,45(22):3219-3223.

[13] ZHANG Y, LUO J, HAN C et al. Bioassay-guided preparative separation of angiotensin-converting enzyme inhibitory C-flavone glycosides from *Desmodium styracifolium* by recycling complexation high-speed counter-current chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal,2015,102:276-281.

[14] 刘晖晖,于永明,张涛,等. 半边铁角蕨化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2017,52(2):100-104.

[15] Flamini G. Flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Viola etrusca* [J]. Chem Biodivers,2007,4(2):139-144.

[16] 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):889-893.

[责任编辑 顾雪竹]