

铁皮石斛黄酮苷类成分 HPLC 特征图谱优化及不同种源特征性分析

梁芷韵¹, 谢镇山¹, 黄月纯^{1,2*}, 袁媛^{3*}, 周楚娟¹, 王雅文¹, 魏刚^{4,5}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 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; 4. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 5. 韶关市铁皮石斛研究院, 广东 韶关 512005)

[摘要] 目的:优化铁皮石斛黄酮苷类成分 HPLC 特征图谱分析方法,明确不同种源的共性成分与特异性成分。方法:色谱条件采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱;流动相四氢呋喃-乙腈-甲醇(10:22:5)-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱;检测波长 340 nm;柱温 30 ℃;流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:27 批铁皮石斛共标示出 13 个黄酮类特征峰,鉴别了 6 个黄酮碳苷(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)与 1 个黄酮氧苷(芦丁)共 7 个特征峰。不同批次样品检出 7~11 个特征峰,其中新西兰牡荆苷 II 为不同来源样品相对稳定的共有峰,芦丁、佛莱心苷与异佛莱心苷特征峰差异较大。根据特征峰的相对丰度,可将样品分为 3 大类,其中第 I 类 10 批样品主要来源于广东、江西、福建、浙江(武义)等丹霞地貌(即“丹霞种”),以检出明显的芦丁强峰为特征;第 II 类 11 批样品主要来源于云南、广西等地(包括了“云南广南种”“广西铁皮兰种”),以能检出佛莱心苷与异佛莱心苷特征峰为特征;而第 III 类 6 批样品主要来源于浙江(即“浙江本地种”),以难以检出佛莱心苷与异佛莱心苷特征峰,检出不同程度的芦丁峰为特征。比较“丹霞种”与“广西铁皮兰种”的仿野生和大棚栽培铁皮石斛 HPLC 特征图谱,结果仿野生铁皮石斛中的特征峰在大棚栽培石斛中也能稳定检出,验证了铁皮石斛种源的可靠性。结论:所建立的分析方法能对铁皮石斛黄酮类特征峰达到较好的分离效果,重复性好,基本明确了不同种源铁皮石斛的共性 & 特异性黄酮苷类成分。提示新西兰牡荆苷 II 适合作为特征图谱的参照物峰;可根据芦丁相对丰度或佛莱心苷与异佛莱心苷特征峰的检出及相对丰度作为铁皮石斛“丹霞种”“云南广南与广西铁皮兰种”与“浙江本地种”的判断依据。

[关键词] 铁皮石斛; 特征图谱; 黄酮苷类成分; 丹霞种; 云南广南种; 广西铁皮兰种; 浙江本地种

[中图分类号] R284.1;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0022-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190112

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181015.1727.010.html>

[网络出版时间] 2018-10-19 10:37

HPLC Characteristic Spectrum Optimization of Flavonoid Glycosides on *Dendrobium officinale* and Characteristics Analysis of Different Provenances

LIANG Zhi-yun¹, XIE Zhen-shan¹, HUANG Yue-chun^{1,2*}, YUAN Yuan^{3*},
ZHOU Chu-juan¹, WANG Ya-wen¹, WEI Gang^{4,5}

(1. School of the First Clinical Medical, 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; 4. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 5. Shaoguan Research Institute of Dendrobium Officinale, Shaoguan 512005, China)

[收稿日期] 20180824(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] 梁芷韵,在读硕士,从事中药质量标准研究与指纹图谱分析工作,E-mail:976788804@qq.com

[通信作者] *黄月纯,主任中药师,硕士生导师,从事中药质量标准、指纹图谱及活性成分研究,E-mail:huangyuechun@163.com;

*袁媛,研究员,从事中药鉴定与分子生物学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com

[Abstract] **Objective:** To optimize the HPLC characteristic spectrum of flavonoid glycosides of *Dendrobium officinale*, and identify the common and specific components of different provenances. **Method:** Kromasil 100-5 C₁₈ column was adopted, with tetrahydrofuran-acetonitrile-methanol (10 : 22 : 5) -0.05% phosphoric acid as mobile phase (gradient elution). The detection wavelength was 340 nm, the column temperature was 30 °C, and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. **Result:** 13 flavonoid characteristic peaks were marked in 27 batches of *D. officinale*, and 7 characteristic peaks of 6 flavonoid C-glycosides (vicenin II, vicenin I, schaftoside, isoschaftoside, violanthin and isoviolanthin) and one flavonoid O-glycosides (rutin) was identified. 7-11 characteristic peaks were detected in different batches of samples. Among them, vicenin II was a relatively stable common peak in different source samples, and the characteristic peaks of rutin, schaftoside and isoschaftoside were quite different. According to the relative abundance of the characteristic peaks, the samples could be divided into three categories. Among them, the first category had 10 batches of samples, which mainly came from Danxia landforms of Guangdong, Jiangxi, Fujian and Zhejiang (Wuyi) Province (which called "Danxia landform species") and characterized by detection of obvious peak of rutin. The second category had 11 batches of samples, which mainly came from Yunnan and Guangxi Province (which included "Yunnan Guangnan species" and "Guangxi Tiepilan species") and characterized by detection of violanthin and isoviolanthin. And the third category had 6 batches of samples, which were mainly derived from Zhejiang Province (which called "native species from Zhejiang") and characterized by detection of different degrees of rutin peak, but it was difficult to detect the characteristic peaks of violanthin and isoviolanthin. HPLC characteristic chromatograms of *D. officinale* in bionics wild cultivation and greenhouse of "Danxia landform species" and "Guangxi Tiepilan species" were compared. The results showed that the characteristic peaks in *D. officinale* planted in greenhouse could be detected stably, which verified the reliability of the source in *D. officinale*. **Conclusion:** The analytical method has a better separation effect on flavonoids of *D. officinale*, with a good reproducibility. The commonness and specificities of flavonoid glycosides components of *D. officinale* from different categories have basically confirmed. This suggests that Vicenin II is suitable to be a reference peak for characteristic chromatogram. Both the relative abundance of rutin and the detection or relative abundance of violanthin and isoviolanthin peaks could be used as a reference to judge the categories of *D. officinale* in "Danxia landform species" or "Tiepilan species from Yunnan, South Guangdong and Guangxi" or "native species from Zhejiang".

[Key words] *Dendrobium officinale*; characteristic chromatogram; flavonoid glycosides; Danxia landform species; Yunnan Guangnan species; Guangxi Tiepilan species; native species from Zhejiang

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 为兰科石斛属多年生草本植物,具有益胃生津,滋阴清热的功效^[1]。铁皮石斛应用历史悠久,距今约 1 500 年前,南北朝梁代陶弘景《神农本草经集注》记载“今用石斛出始兴”,即指今天广东的韶关地区;北宋官方的《本草图经》,成书于 1061 年,进一步指出石斛“今荆湖、川、广州郡及温、台州亦有之,以广南者为佳。”这里“以广南者为佳”的“广南”即指北宋的“广南路”,北宋的“广南路”包括了广南东路(即广东),广南西路(即广西)。由此可见,在北宋时期,广东、广西、浙江等地已是铁皮石斛的道地产区^[2]。近年来课题组通过大量野外实地考察,对广东、广西、浙江、福建等地的铁皮石斛野外分布、生态环境与习性有了比较全面的了解,并发现与历代本草记载基本一致。

随着石斛应用的增多,传统道地产区的野生资源日益减少,在清代中后期,江浙人已有踏足南中国其他省份采摘石斛的记载^[2],如福建、江西、广西、云南等地。

黄酮类成分是铁皮石斛中除多糖以外的另一类主要活性化合物,在质量评价起到重要的作用。周桂芬等^[3-5]对浙江产的铁皮石斛茎与叶进行研究发现,铁皮石斛主要含以芹菜素为苷元的黄酮碳苷以及其他一些二氢黄酮类成分,对鉴别铁皮石斛的真伪具有一定的意义,但未对不同产地、不同种源铁皮石斛的黄酮类成分进行比较。吕朝耕等^[6]对同时测定了不同产地铁皮石斛中的 10 个黄酮类成分,并认为黄酮类成分可为该药材质量标准的完善提供依据。课题组前期研究发现不同产地的铁皮石斛外观

存在一定的差异^[7-8]。魏刚等^[7]对不同产地铁皮石斛茎的 HPLC 特征图谱进行研究,根据特征图谱的差异性,结合本草道地产地记载初步提出了“丹霞铁皮种”(广东、福建、江西等地丹霞地貌)、“浙江本地种”“广西铁皮兰种”的种源概念;黄月纯等^[8]进一步对不同种源铁皮石斛叶黄酮类成分进行分析研究,结果显示不同种源铁皮石斛叶相似度较低,而相同种源石斛叶黄酮类成分群基本一致,说明了铁皮石斛叶内黄酮类成分具有一定的稳定性。叶子等^[9-10]比较了铁皮石斛和齿瓣石斛黄酮类成分的差异,并认为佛莱心苷是铁皮石斛的专属性成分。

课题组在前期研究基础上,选择某些黄酮成分含量相对较高的来源于广东丹霞、云南广南的典型种源铁皮石斛叶,进行了提取分离鉴定研究,广东丹霞种分离得到了两个黄酮碳苷(新西兰牡荆苷 II,新西兰牡荆苷 I)以及 1 个黄酮氧苷(芦丁),云南广南种分离得到了新西兰牡荆苷 II,新西兰牡荆苷 I,佛莱心苷与异佛莱心苷 4 个黄酮碳苷。针对某些黄酮成分极性较为相似,难以获得较好分离度的情况^[8],本研究重点对流动相系统进行筛选,优化铁皮石斛 HPLC 特征图谱色谱条件,对不同来源的铁皮石斛以及不同种源仿野生铁皮石斛进行比较,以明确不同种源铁皮石斛的共性成分与特异性成分和确定铁皮石斛不同种源的存在,为其质量控制提供参考依据。

1 材料

HP1200 型高效液相色谱仪(DAD 检测器,美国 Agilent 公司);MS 204S 型 1/1 万电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。夏佛塔苷(批号 111912-201302,纯度 ≥ 92.5%),芦丁(批号 100080-201408,纯度 ≥ 90.2%),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,异佛莱心苷,佛莱心苷均为广州中医药大学课题组自制,经 HPLC-ESI-MSⁿ,¹³C-NMR 和 ¹H-NMR 核磁共振等技术确认,面积归一化法计算,除佛莱心苷外,纯度均 > 98%,佛莱心苷纯度为 90.2%。乙腈、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。铁皮石斛对照药材(批号 121501-201402),购自中国食品药品检定研究院;32 批铁皮石斛(编号 S1 ~ S32)经广州中医药大学魏刚研究员鉴定系兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的茎,鲜品铁皮石斛在 60 °C 条

件下减压烘干,备用,来源见表 1。

表 1 铁皮石斛样品来源

Table 1 Sources of *Dendrobium officinale*

No.	收集地	No.	收集地
S1	广东韶关仁化	S17	云南
S2	广东韶关仁化	S18	云南广南
S3	江西井冈山	S19	云南
S4	广东韶关仁化	S20	云南广南
S5	广东韶关仁化	S21	云南昆明
S6	广东韶关仁化	S22	浙江
S7	福建泰宁	S23	浙江天台
S8	浙江武义	S24	浙江天台
S9	浙江武义	S25	浙江永康
S10	浙江武义	S26	浙江义乌
S11	广西容县	S27	浙江永康
S12	广西容县	S28 ¹⁾	广东韶关仁化
S13	广西桂平	S29 ¹⁾	广东韶关仁化
S14	广西	S30 ¹⁾	广东韶关仁化
S15	云南	S31 ¹⁾	福建泰宁
S16	云南	S32 ¹⁾	广西容县

注:¹⁾表示仿野生。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相四氢呋喃-乙腈-甲醇(10:22:5)(A)-0.05% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 10% ~ 11% A; 10 ~ 25 min, 11% ~ 11.5% A; 25 ~ 32 min, 11.5% ~ 12% A; 32 ~ 42 min, 12% ~ 12.5% A; 42 ~ 52 min, 12.5% ~ 13.5% A; 52 ~ 75 min, 13.5% ~ 14% A; 75 ~ 85 min, 14% ~ 20% A);流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30 °C;检测波长 340 nm。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取新西兰牡荆苷 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,芦丁对照品适量,分别加甲醇制成每 1 mL 含有新西兰牡荆苷 II 105.8 μg,新西兰牡荆苷 I 70.9 μg,夏佛塔苷 13.8 μg,异夏佛塔苷 16.1 μg,佛莱心苷 173 μg,异佛莱心苷 163.4 μg,芦丁 372 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取石斛粉末(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,至 5 mL 量瓶中,加 80% 甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液(S15) 10 μL ,连续进样 6 次,所测的指纹图谱与所得的共有模式相似度均 >0.99 ,表明精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取供试品溶液(S15) 10 μL ,分别在 0,2,4,6,8,10,12,24 h 进样,所测的指纹图谱与所得的共有模式相似度均 >0.99 ,表明 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批样品 6 份(S15),分别制备供试品溶液,进样分析,所测的指纹图谱与所得的共有模式的相似度均 >0.99 ,表明重复性良好。

2.4 样品检测 精密吸收对照品溶液及供试品溶液各 10 μL ,依法进样分析。

2.5 特征图谱的建立与分析

2.5.1 特征峰的确定与分析 根据不同样品特征峰保留时间、紫外光谱分析,共标示了 13 个黄酮类特征峰,除峰 11 具有黄酮氧苷紫外光谱外,其他特征峰具有黄酮碳苷紫外光谱特征。采用对照品保留时间定位以及紫外光谱对照,鉴别了 6 个黄酮碳苷及 1 个黄酮氧苷 7 个特征峰,包括峰 1(新西兰牡荆苷 II),峰 2(新西兰牡荆苷 I),峰 3(夏佛塔苷),峰 4(异夏佛塔苷),峰 8(佛莱心苷),峰 9(异佛莱心苷),峰 10(芦丁)。13 个黄酮类特征峰中,峰 1(新西兰牡荆苷 II)和峰 2(新西兰牡荆苷 I)为各批次共性峰,且峰 1(新西兰牡荆苷 II)与峰 2(新西兰牡荆苷 I)丰度相对较大;峰 3(夏佛塔苷)与峰 4(异夏佛塔苷)基本在各批次样品中均能检出,但丰度均相对较小;峰 5 的丰度与峰 2(新西兰牡荆苷 I)较为相近。峰 8(佛莱心苷)与峰 9(异佛莱心苷)只有在部分样品中才能检出,丰度相对较大,并且异佛莱心苷峰的丰度均大于佛莱心苷峰的丰度。峰 10(芦丁)的丰度差异则非常大,部分样品为最强峰,而部分样品则难以检出。其他未鉴定的特征峰为部分样品所共有。新西兰牡荆苷 II 为各批样品的共有特征峰,其峰面积相对较大而且稳定,因此,以新西兰牡荆苷 II 为参照峰(S)计算各特征峰的相对峰面积,结果见表 2。

2.5.2 3 类铁皮石斛共性及特异性特征峰及不同种源特征性分析 根据相似度分析的结果,采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”(2004A 版)分别生成 3 类样品重叠图,见图 1 ~

3。第 I 类 10 批样品主要来源于广东、江西、福建等丹霞地貌,检出丰度明显较大的芦丁强峰,难以检出异佛莱心苷与佛莱心苷峰征,将其种源命名为“丹霞种”。第 II 类 11 批样品主要来源于云南、广西等地,均能检出异佛莱心苷与佛莱心苷特征峰,其中,云南产区的样品以异佛莱心苷与佛莱心苷峰的丰度明显较大为特点,将其种源命名为“云南广南种”;而广西产区的样品异佛莱心苷与佛莱心苷峰相比云南产区丰度较小些,将其种源命名为“广西铁皮兰种”。而第 III 类 6 批样品主要来源于浙江,呈现各特征峰丰度相对差异较小的特点,难以检出异佛莱心苷与佛莱心苷特征峰,但基本检出不同程度的芦丁峰为特征,将其种源命名为“浙江本地种”。提示可根据芦丁相对丰度或异佛莱心苷与佛莱心苷特征峰的检出及相对丰度作为铁皮石斛“丹霞种”“云南广南与广西铁皮兰种”与“浙江本地种”的判断依据。混合对照品、铁皮石斛对照药材与 3 种铁皮石斛典型代表重叠图见图 4。结果显示,铁皮石斛对照药材与“云南广南种”铁皮石斛基本一致,可认为铁皮石斛对照药材是采用“云南广南种”的铁皮石斛作为对照。除已鉴定的特征峰外,一些尚未明确的特征峰亦有一定的鉴别意义。如峰 5 和峰 10 均能在“丹霞种”和“浙江本地种”铁皮石斛中检出,而“广西铁皮兰种”与“云南广南种”基本未检出。峰 12 和峰 13 在“丹霞种”和“浙江本地种”的部分样品中均能检出,但“浙江本地种”的铁皮石斛均能检出丰度较大的峰 13,而“丹霞种”并不是所有样品都能检出。此外,亦有“广西铁皮兰种”铁皮石斛的峰 6 和峰 7 相对于“云南广南种”较容易检出且丰度较大。

2.5.3 2 类铁皮石斛与不同种源仿野生铁皮石斛的比较分析 利用建立的 HPLC 特征图谱方法分析仿野生与大棚栽培 2 种栽培方式下的铁皮石斛,4 批来源于广东韶关及福建泰宁的仿野生铁皮石斛与来源于广东韶关的大棚栽培铁皮石斛比较见图 5,而来源于广西容县的仿野生铁皮石斛与来源于广西容县的大棚栽培铁皮石斛比较见图 6。结果 4 批来源于广东韶关及福建泰宁的仿野生铁皮石斛检出与大棚栽培类似的 7 ~ 10 个以上黄酮特征峰,新西兰牡荆苷 II,新西兰牡荆苷 I,夏佛塔苷,异夏佛塔苷,芦丁较为稳定检出,其中新西兰牡荆苷 II 与芦丁的丰度相对较大,其他特征峰差异较大,与大棚类似。同是来源于广西容县的仿野生铁皮石斛与大棚栽培铁皮石斛检出的主要黄酮特征峰基本一致,但仿野

表 2 铁皮石斛 HPLC 特征峰分析

Table 2 Analysis of HPLC characteristic peak of *Dendrobium officinale*

峰号	成分	平均相对保留时间	相对峰面积													
			S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
1(S)	新西兰牡荆苷 II	1.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	新西兰牡荆苷 I	1.28	0.531	0.292	0.556	0.719	0.549	0.649	1.259	0.421	0.679	0.837	0.374	0.341	0.568	0.285
3	夏佛塔苷	1.34	0.214	0.162	-	0.160	0.187	0.152	0.261	0.325	0.837	0.528	0.171	0.171	0.205	0.110
4	异夏佛塔苷	1.40	0.182	0.193	-	0.157	0.183	0.220	0.263	0.373	1.032	0.608	0.176	0.386	0.243	0.142
5		1.95	0.642	0.777	0.649	0.646	0.815	1.641	1.181	1.155	3.451	3.228	0.411	0.174	0.480	0.437
6		2.14	0.068	1.394	2.295	0.381	0.219	0.050	0.943	0.742	1.151	1.116	0.277	1.634	1.142	0.494
7		2.22	0.043	2.167	3.014	0.331	0.367	0.084	1.261	0.694	0.413	1.173	0.354	2.144	1.683	0.686
8	佛莱心苷	2.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.135	0.457	0.514	1.196
9	异佛莱心苷	2.64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.984	1.220	1.318	2.144
10		3.05	0.137	0.424	0.311	0.243	0.364	0.339	0.076	0.669	2.737	2.049	-	-	-	-
11	芦丁	3.26	0.441	0.992	11.605	2.866	4.062	5.791	3.200	0.973	3.567	2.387	0.178	0.236	0.149	0.354
12		3.62	0.099	1.042	-	-	0.176	-	-	0.476	1.415	2.183	-	-	-	-
13		3.76	0.151	1.527	-	-	0.188	-	0.152	0.850	1.925	2.949	-	-	-	-

峰号	成分	平均相对保留时间	相对峰面积													
			S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	
1(S)	新西兰牡荆苷 II	1.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
2	新西兰牡荆苷 I	1.28	0.381	0.252	0.411	0.110	0.315	0.053	0.706	0.675	0.532	0.669	0.357	0.561	0.223	
3	夏佛塔苷	1.34	0.118	0.105	0.163	0.060	0.079	0.015	0.163	0.314	0.174	0.231	0.289	0.167	0.225	
4	异夏佛塔苷	1.40	0.128	0.111	0.087	0.067	0.096	0.021	0.138	0.457	0.229	0.354	0.395	0.211	0.312	
5		1.95	0.158	0.107	0.429	0.123	0.214	0.563	0.746	0.822	0.610	1.266	1.535	0.632	0.810	
6		2.14	-	-	0.170	-	-	-	-	0.786	0.450	0.467	0.500	0.335	0.319	
7		2.22	-	-	0.084	-	-	-	-	0.171	0.489	0.275	0.361	0.468	0.320	
8	佛莱心苷	2.31	1.286	1.224	0.557	1.946	1.127	1.224	1.069	-	-	-	-	-	-	
9	异佛莱心苷	2.64	2.121	2.172	1.070	3.549	2.180	2.080	1.718	-	-	-	-	-	-	
10		3.05	-	-	-	-	-	-	-	0.322	0.171	0.499	0.678	0.204	0.338	
11	芦丁	3.26	0.279	0.189	0.070	0.279	0.988	0.504	0.202	0.323	0.125	0.256	0.281	0.139	0.106	
12		3.62	-	-	-	-	-	-	-	0.896	0.202	0.157	0.341	0.201	-	
13		3.76	-	-	-	-	-	-	-	1.144	0.311	0.289	0.641	0.299	0.632	

注：“-”表示未检出。

生铁皮石斛在 8~20 min 时色谱峰较为丰富。

3 讨论

供试品溶液的制备考察了提取溶剂(甲醇, 90% 甲醇, 80% 甲醇和 70% 甲醇), 提取方式(超声, 水浴回流), 确定了 80% 甲醇为溶媒 100 °C 回流提取 4 h 的方法。针对某些黄酮成分极性较为相似分离度不佳的情况^[7], 本研究重点对流动相系统进行筛选, 确定了四氢呋喃-乙腈-甲醇(10:22:5)-0.05% 磷酸梯度洗脱的流动相系统, 大部分特征峰

峰形尖锐, 分离度好, 方法准确可靠, 重复性好。

27 批铁皮石斛共标示出 13 个黄酮类特征峰, 不同批次样品特征峰个数为 7~11, 鉴别了其中 6 个黄酮碳苷, 其中峰 1(新西兰牡荆苷 II) 不同来源样品相对稳定的共有峰。部分样品可检出一定程度的峰 3(夏佛塔苷) 与峰 4(异夏佛塔苷), 而不同来源样品间的峰 10(芦丁), 峰 8(佛莱心苷) 与峰 9(异佛莱心苷) 的差异则较大, 可作为特异性的成分的选择依据。

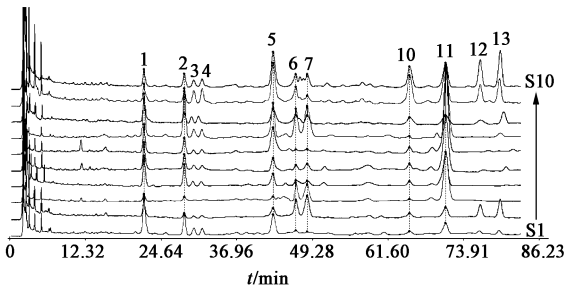


图 1 铁皮石斛第 I 类 10 批样品 HPLC 特征谱叠加
Fig. 1 HPLC characteristic chromatogram overlapping of 10 batches of *Dendrobium officinale* in class I

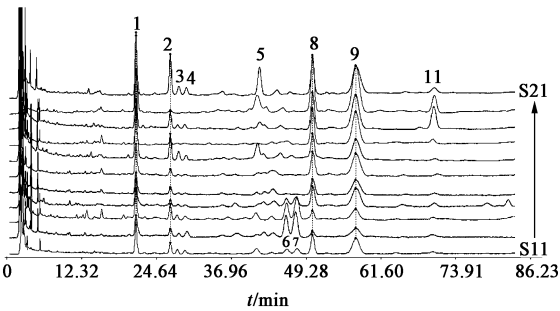


图 2 铁皮石斛第 II 类 11 批样品 HPLC 特征谱叠加
Fig. 2 HPLC characteristic chromatogram overlapping of 11 batches of *Dendrobium officinale* in class II

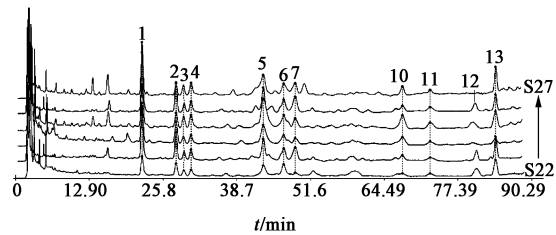


图 3 铁皮石斛第 III 类 6 批样品 HPLC 特征谱叠加
Fig. 3 HPLC characteristic chromatogram overlapping of 6 batches of *Dendrobium officinale* in class III

通过对 13 个特征峰的丰度分析,27 批铁皮石斛共分了 3 类,与前期根据特征峰的峰形、峰数与峰面积结合本草道地产地记载进行分析初步分为 3 个种源基本一致^[7-8]。相似度评价数据以及特征图谱结果表明,不同来源样品内在质量存在较大的差异,说明根据黄酮成分对铁皮石斛进行种源分类十分必要^[9-10]。第 I 类 10 批样品(“丹霞种”)主要来源于广东、江西、福建等丹霞地貌,以检出明显的芦丁强峰为特征。第 II 类 11 批样品样品主要来源于云南、广西,均能检出丰度相对较大的异佛莱心苷与佛莱心苷特征峰,而且异佛莱心苷峰的丰度均大于佛莱心苷峰的丰度,比例也大致稳定在一定范围内。但云南产区的异佛莱心苷与佛莱心苷峰的丰度更为明

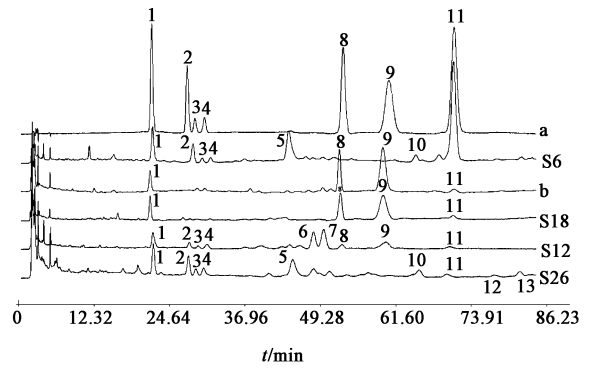


图 4 混合对照品(a),对照药材(b)与 4 种铁皮石斛代表样品 HPLC 色谱叠加
Fig. 4 HPLC chromatogram overlapping of hybrid reference substances (a), reference medicinal materials (b) and typical representative of three categories of *Dendrobium officinale*

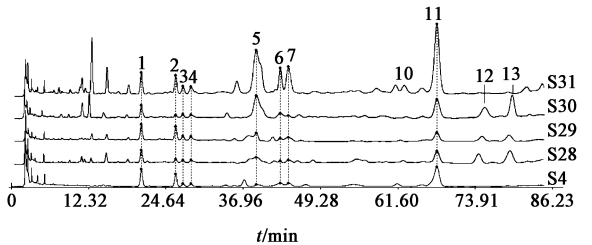


图 5 “丹霞种”仿野生与大棚栽培铁皮石斛 HPLC 特征谱叠加
Fig. 5 HPLC characteristic chromatogram overlapping of *Dendrobium officinale* in bionics wild cultivation and greenhouse of “Danxia landform species”

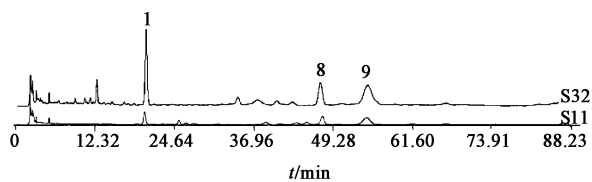


图 6 “广西铁皮兰种”仿野生与大棚栽培铁皮石斛 HPLC 特征谱叠加
Fig. 6 HPLC characteristic chromatogram overlapping of *Dendrobium officinale* in bionics wild cultivation and greenhouse of “Guangxi Tiepilan species”

显,将其进一步命名为“云南广南种”。而第 III 类 6 批样品主要来源于浙江(即“浙江本地种”),各特征峰的丰度差异相对较小,但难以检出佛莱心苷与异佛莱心苷特征峰,多份样品芦丁峰均较小。

本研究结果显示铁皮石斛确实具有种源差异性,而研究中的铁皮对照药材与“云南广南种”铁皮石斛黄酮类成分特征图谱基本一致,证明了 2015 年版《中国药典》铁皮石斛的对照药材是仅采用了某个产地的样品,没有考虑种源造成的差异性,这与课题组的前期研究结果相符^[11],提示新版《中国药

典》在选择对照药材时应充分考虑种源差异性,以免影响铁皮石斛的质量评价。

本研究在前期的研究基础上,针对铁皮石斛中丰富的黄酮类成分,优化了铁皮石斛黄酮类成分的色谱条件,基本明确了不同种源铁皮石斛的共性及特异性黄酮苷类成分,并与仿野生铁皮石斛进行比较,验证了铁皮石斛不同种源存在的可靠性。新西兰牡荆苷Ⅱ作为最主要的共性成分,适合作为特征图谱的参照物峰;可根据芦丁相对丰度或佛莱心苷与异佛莱心苷特征峰的检出与否以及相对丰度作为铁皮石斛“丹霞种”“云南广南与广西铁皮兰种”与“浙江本地种”的判断依据。针对异佛莱心苷峰的丰度均大于佛莱心苷峰的丰度不同的问题,本研究在前期研究的基础上^[6],进一步将“广西铁皮兰种”明确为“云南广南种”与“广西铁皮兰种”。

[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.

[2] 魏刚,顺庆生,杨明志,等. 石斛求真——中国药用石斛之历史、功效、真影与特征指纹图谱[M]. 成都:四川科学技术出版社,2014:27-32,53-56.

[3] 周桂芬,陈素红,吕圭源. 浙江省铁皮石斛黄酮类成分高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 中国药学杂志,2013,48(15):1261-1265.

[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):889-893.

[5] 周桂芬,吕圭源. 基于高效液相色谱-二极管阵列光谱检测-电喷雾离子化质谱联用鉴定铁皮石斛叶中8种黄酮碳苷化合物及裂解规律研究[J]. 中国药学杂志,2012,47(1):13-19.

[6] 吕朝耕,杨健,康传志,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(17):47-52.

[7] 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.

[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] 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.

[10] YE Z, DAI J R, ZHANG C G, et al. Chemical differentiation of *Dendrobium officinale* and *Dendrobium devonianum* by using HPLC fingerprints, HPLC-ESI-MS, and HPTLC analyses [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2017,doi:10.1155/2017/8647212.

[11] 周春花,李运容,胡东南,等. 基于“以广南者为佳”的广西铁皮石斛 HPLC 特征图谱研究[J]. 广东药科大学学报,2018,34(3):277-281.

[责任编辑 顾雪竹]