

不同生长年限霍山石斛高效液相指纹图谱研究

刘 刚¹, 俞年军^{1,2*}, 韩荣春^{1,2}, 谢冬梅^{1,2}, 刘路路¹, 彭代银^{1,2}, 何祥林³, 张淇军⁴

1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012

2. 安徽省中医药科学院中药资源保护与开发研究所, 安徽 合肥 230012

3. 霍山县长冲中药材开发有限公司, 安徽 霍山 237266

4. 霍山县天下泽雨生物科技有限公司, 安徽 霍山 237266

摘要: 目的 建立霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* 的 HPLC 指纹图谱, 同时测定不同生长年限霍山石斛中丁香酸、芦丁、石斛酚、柚皮素含量, 为霍山石斛药材质量的评价提供依据。方法 采用 Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 240 nm, 柱温 30 ℃; 将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.1), 对不同年限的霍山石斛样品进行相似度分析; 峰面积导入 SPSS 软件进行聚类分析, 从树状图上判断聚类效果。结果 本方法建立的指纹图谱共有 13 个共有峰, 指认了其中 4 个共有峰, 分别为丁香酸、芦丁、石斛酚、柚皮素; 不同年限的栽培霍山石斛相似度结果小于 0.900, 不同年限的仿野生霍山石斛相似度结果大于 0.900。结论 HPLC 指纹图谱结合化学计量学方法能够评价和鉴别不同年限的霍山石斛, 为霍山石斛药材的采收、开发、评价等提供参考。

关键词: 霍山石斛; 指纹图谱; 不同年限; 种植模式; 丁香酸; 芦丁; 石斛酚; 柚皮素; HPLC

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)06-1424-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.029

HPLC fingerprint for different growth period of *Dendrobium huoshanense*

LIU Gang¹, YU Nian-jun^{1,2}, HAN Rong-chun^{1,2}, XIE Dong-mei^{1,2}, LIU Lu-lu¹, PENG Dai-yin^{1,2}, HE Xiang-lin³, ZHANG Qi-jun⁴

1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

3. Huoshan Changchong Chinese Medicine Development Co., Ltd., Huoshan 237266, China

4. Huoshan RainiGrace Biological Technology Co., Ltd., Huoshan 237266, China

Abstract: Objective To establish a HPLC fingerprint method for assessing the quality of *Dendrobium huoshanense*, in addition to determining concentrations of syringic acid, rutin, dendrophenol and naringenin in this crude drug. **Methods** Agilent C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was utilized with the mobile phase comprising methanol-0.1% phosphoric acid with the flow rate of 1 mL/min in a gradient elution manner. The detection wavelength was set at 240 nm and the column temperature was 30 ℃. The resultant chromatograms were imported to Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica (2012.1) to obtain retention time and peak area of samples. Similarity for 39 sets of samples were analyzed. The peak area data were processed by SPSS software for cluster analysis and the clustering effect was discussed. **Results** The line relationship of this way was good ($R > 0.999$), with high precision regarding instrument used ($RSD < 3.00\%$), the method showed good reproducibility ($RSD < 3.00\%$), standard recovery was between 99.26% and 100.32% (RSD of 0.35%—1.67%). Different growth period and different planting patterns of *D. huoshanense* were distinct regarding the concentration of four compounds. **Conclusion** The method is useful to evaluate and discriminate *D. huoshanense* at different growth period for the purpose of providing scientific reference on harvest, development and evaluation of *D. huoshanense*.

Key words: *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng; fingerprint; different growth period; planting pattern; syringic acid; rutin; dendrophenol; naringenin; HPLC

收稿日期: 2017-09-17

基金项目: 安徽高校科研创新平台团队项目 (皖教秘科 [2015] 49 号); 安徽道地中药材品质提升协同创新中心项目 (皖教秘科 [2013] 2 号); 安徽省教育厅项目 (皖教秘科 [2014] 44 号); 安徽省科技重大专项计划项目 (16030801104)

作者简介: 刘 刚 (1993—), 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量标准化。E-mail: 352967169@qq.com

*通信作者 俞年军 Tel: (0551)68129173 E-mail: ynj2005288@sina.com

霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng 为兰科石斛属草本植物, 俗称“米斛”。其入药始见于《镜》, 曰: 石斛近时有 1 种形短祇寸许, 细如灯芯, 色青黄、咀之味甘, 微有滑涎, 系出六安及颍州府霍山县, 是名霍山石斛^[1];《本草纲目拾遗》亦载其具有“清胃除虚热, 生津已劳损”的独特功效^[2]。霍山石斛不仅长于清胃热, 补津液, 如代之茶饮, 可清热滋阴、生津润喉, 是极其珍贵的保健品; 现代药理学研究也证明霍山石斛含有的多糖类及生物碱类成分具有提高人体免疫力、降血糖、抑制心血管疾病、抗肿瘤等作用^[3-5]。

已有的关于霍山石斛化学成分报道主要集中在多糖、生物碱、黄酮、氨基酸及微量元素类^[6-7]等多种成分, 其中丁香酸与石斛酚具有协同抗白内障、抑制醛糖还原酶的活性, 黄酮类物质芦丁和柚皮素具有抗菌、抗炎等作用^[8-11]。近年来的研究也显示霍山石斛茎中主要药效物质的积累与其生长年限具有正相关性^[12-14]。本实验在前期研究的基础上, 以具有良好生物活性的丁香酸、芦丁、石斛酚、柚皮素 4 种化学成分作为考察指标, 通过 HPLC 法建立不同年限的霍山石斛指纹图谱, 测定和比较不同年限、不同来源的霍山石斛

药材含有的 4 种成分的含量, 建立聚类分析, 为系统评价霍山石斛的质量提供科学依据。

1 仪器与材料

LC-16 型高效液相色谱仪, 配有 SPD-16 紫外可见双波长检测器、柱温箱、二元泵 (日本岛津公司); Eppendorf 5810R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); AS30600BT 系列超声波清洗仪 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); AB135-S 型十万分之一电子天平 (德国梅特勒公司); Milli-Q Gradient A10 超纯水仪 (密理博上海贸易有限公司); GZX-9140 MBE 数显鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

芦丁(111876-201503)、石斛酚(111875-201202)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 柚皮素(16032406)、丁香酸(16041910)对照品购自北京世纪奥科生物技术有限公司; 甲醇为色谱纯 (瑞典 Oceanpak 公司); 磷酸为分析纯 (天津永大化学试剂有限公司)。样品来源见表 1 (S1~S36 为大棚栽培品, S37~S39 为林下仿野生栽培品), 经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为兰科植物霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng。将新鲜霍山石斛茎按 1、2、3 年生进行分株、洗净, 置 70 °C 烘箱中烘干至恒定质量, 粉碎, 过 60 目筛。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	来源	生长年限/年	编号	来源	生长年限/年
S1	安徽六安同济生有限公司	1	S21	霍山县黑池渡镇	2
S2	霍山县天下泽雨有限公司	1	S22	霍山县黑池渡镇	2
S3	霍山县天下泽雨有限公司	1	S23	安徽六安同济生有限公司	2
S4	霍山县长冲中药有限公司	1	S24	安徽六安同济生有限公司	2
S5	霍山县长冲中药有限公司	1	S25	安徽六安同济生有限公司	3
S6	霍山县九仙尊有限公司	1	S26	霍山县天下泽雨有限公司	3
S7	霍山县九仙尊有限公司	1	S27	霍山县天下泽雨有限公司	3
S8	霍山县黑池渡镇	1	S28	霍山县长冲中药有限公司	3
S9	霍山县黑池渡镇	1	S29	霍山县长冲中药有限公司	3
S10	霍山县黑池渡镇	1	S30	霍山县九仙尊有限公司	3
S11	安徽六安同济生有限公司	1	S31	霍山县九仙尊有限公司	3
S12	安徽六安同济生有限公司	1	S32	霍山县黑池渡镇	3
S13	安徽六安同济生有限公司	2	S33	霍山县黑池渡镇	3
S14	霍山县天下泽雨有限公司	2	S34	霍山县黑池渡镇	3
S15	霍山县天下泽雨有限公司	2	S35	安徽六安同济生有限公司	3
S16	霍山县长冲中药有限公司	2	S36	安徽六安同济生有限公司	3
S17	霍山县长冲中药有限公司	2	S37	霍山县霍金石斛	1
S18	霍山县九仙尊有限公司	2	S38	霍山县霍金石斛	2
S19	霍山县九仙尊有限公司	2	S39	霍山县霍金石斛	3
S20	霍山县黑池渡镇	2			

2 方法

2.1 色谱条件

Agilent C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B); 梯度洗脱, 0~20 min, 20%~40% A; 20~30 min, 40%~50% A; 30~45 min, 50%~62% A, 45~55 min, 62%~70% A; 55~60 min, 70%~20% A; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 240 nm; 进样量 20 μL, HPLC 色谱图见图 1。

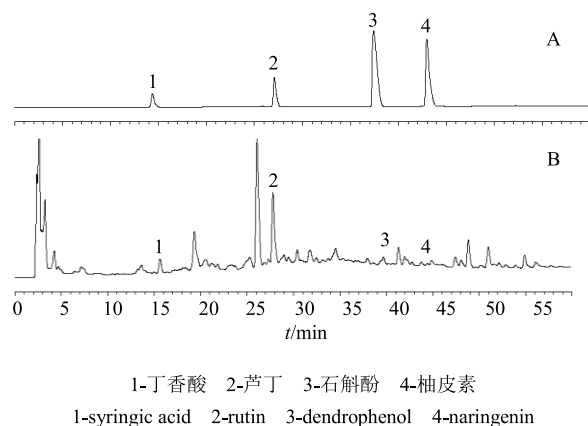


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC for reference substance (A) and samples (B)

2.2 供试品溶液制备

精密称取药材粉末 0.5 g, 置加塞玻璃瓶中, 加入甲醇 25 mL, 称定质量。室温下超声 30 min, 冷却后称定质量, 用甲醇补足减失质量, 离心, 滤过, 冷冻干燥, 用甲醇定容至 2 mL, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取丁香酸、芦丁、石斛酚、柚皮素对照品适量, 置于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得到质量浓度分别为 1.15、1.6、0.2、1.0 mg/mL 的对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取上述对照品溶液 2、5、10、20、100、200 μL, 分别置 1 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程见表 2。

2.4.2 精密度试验 取同一供试品溶液 (S1), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 RSD<1.83%, 相对峰面积 RSD<2.69%, 表明精密度良好。

表 2 4 种成分的线性关系

Table 2 Linear relationships of four constituents

化合物	线性方程	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	r
丁香酸	$Y=6 \times 10^7 X - 191\,472$	2.3~230	0.999 1
芦丁	$Y=3 \times 10^7 X - 162\,847$	3.2~320	0.999 2
石斛酚	$Y=2 \times 10^8 X - 149\,507$	0.4~40	0.999 0
柚皮素	$Y=1 \times 10^6 X - 7\,225.8$	2.0~200	0.999 8

2.4.3 重复性试验 平行称取 6 份同一样品 (S1), 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 RSD<2.18%, 相对峰面积 RSD<2.76%, 该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品 (S1) 溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项进行分析, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 RSD<2.35%, 相对峰面积 RSD<2.66%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的霍山石斛 (S12) 样品 0.5 g, 精密加入对照品溶液适量, 按“2.2”项条件下制备供试品溶液, 按“2.1”项方法进行测定。4 种化合物加样回收率为 99.86%~102.89%, RSD 为 0.43%~2.78%。

2.5 数据处理

采用国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012.1) 软件进行处理。以 S1、S13、S25 为参照图谱, 选择中位数法作为对照指纹图谱生成方法, 时间窗宽度为 0.1, 采用多点校正方法对色谱峰进行全谱峰匹配, 并计算不同年限霍山石斛与对照图谱的相似度。

采用回归方程计算不同年限霍山石斛中 4 种成分的平均含量。将样品峰面积作为变量导入 SPSS 中进行聚类分析, 通过树状图比较种类鉴别情况。

3 结果与分析

3.1 霍山石斛指纹图谱的建立及相似度分析

本实验采集霍山石斛样品 39 份, 覆盖霍山县 80% 以上的霍山石斛资源。本实验建立的指纹图谱中共指认了 13 个共有峰, 其中 4 个峰分别对应丁香酸、芦丁、石斛酚、柚皮素 4 种化学成分, 39 批霍山石斛指纹图谱见图 2。S1~S12 为 1 年生霍山石斛, S13~S24 为 2 年生霍山石斛, S27~S36 为 3 年生霍山石斛, S37、S38、S39 分别为 1、2、3 年生仿

野生霍山石斛。分别设定 S1、S13、S25 为参照图谱, 将其他样品的色谱峰与参照图谱自动匹配, 以中位数法生成 3 种年限霍山石斛对照图谱 R1、R2、R3。以 R3 为参照图谱生成对照图谱 R, 并计算 R1、R2、R3、S37、S38、S39 和 R 之间的相似度, 见表 3。

1、2、3 年生栽培品霍山石斛与对照图谱之间

的相似度均<0.900, 说明不同年限霍山石斛中的整体化学成分含量差异显著, 但是随着年限的增加相似度也逐渐递增, 说明 3 年生霍山石斛药材质量较为稳定。不同年限仿野生霍山石斛图谱与对照图谱之间的相似度均>0.900, 由于本实验林下仿野生样品很少, 仅能说明该批次林下仿野生种植的霍山石斛质量较为稳定。

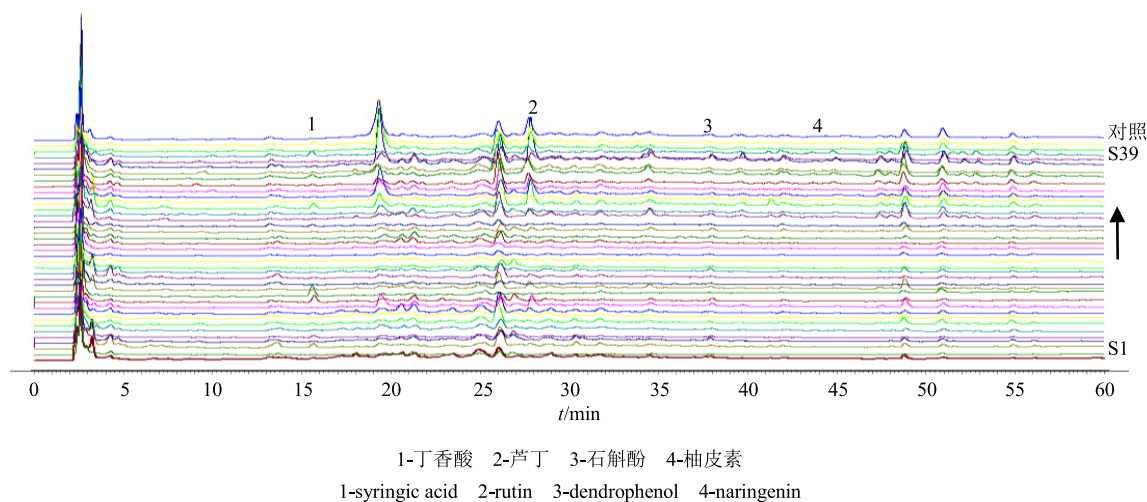


图 2 不同年限霍山石斛样品指纹图谱与对照图谱
Fig. 2 Fingerprint and control chromatograms of samples

表 3 相似度评价结果
Table 3 Similarity evaluation results

样品	R1	R2	R3	S37	S38	S39	R
R1	1.000						
R2	0.850	1.000					
R3	0.763	0.901	1.000				
S37	0.678	0.753	0.855	1.000			
S38	0.640	0.545	0.608	0.867	1.000		
S39	0.646	0.594	0.685	0.899	0.950	1.000	
R	0.793	0.809	0.874	0.971	0.906	0.937	1.000

3.2 4 种成分定量分析

由表 4 可知不同年限的大棚栽培品霍山石斛的 4 种化学成分含量差异较大。其中 3 年生的大棚栽培品霍山石斛中各类成分平均含量均高于 1 年生和 2 年生霍山石斛。1 年生和 2 年生大棚栽培品霍山石斛中的各类成分的平均含量变化较小, 表现为 2 年生霍山石斛中的丁香酸、柚皮素平均含量略微升高; 芦丁含量稍降低; 石斛酚含量保持不变。

林下仿野生栽培霍山石斛各类成分含量变化趋势与大棚栽培品的基本相同, 均是随着年限的增加, 3 年生的霍山石斛中化学成分的含量达到最高。

表 4 不同年限霍山石斛中 4 种成分平均含量

Table 4 Four kinds of chemical composition content in different growth period of *D. huoshanense*

生长年限	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	丁香酸	芦丁	石斛酚	柚皮素
大棚生 1 年	0.016 1	0.085 7	0.007 8	0.370 2
大棚生 2 年	0.017 1	0.067 9	0.007 8	0.381 2
大棚生 3 年	0.020 6	0.208 8	0.011 1	0.865 3
仿野生 1 年	0.013 2	0.056 8	0.011 1	0.803 1
仿野生 2 年	0.015 8	0.052 0	0.009 8	0.587 9
仿野生 3 年	0.017 6	0.056 7	0.011 9	0.787 0

但是 3 年生的林下仿野生栽培霍山石斛中丁香酸、柚皮素稍低于大棚栽培品；芦丁则表现林下仿野生栽培品为大棚栽培品的 1/3~1/4；石斛酚含量表现为林下仿野生栽培品稍高于大棚栽培品，这可能是由于 2 种石斛生长环境、栽培基质等不同所造成的。

3.3 不同年限霍山石斛 4 种化合物含量的聚类分析

将样品中 4 种化合物峰面积作为变量分别导入 SPSS 条件进行聚类分析，通过树状图分析种类鉴别情况。选用欧式距离平方作为样品间相似度距离，采用组间平均距离法为类间距离进行分析，结果见图 3。39 批霍山石斛药材被划分为 2 类，第 1 类为 S25~S36，均为 3 年生霍山石斛；第 2 类为

S1~S24、S37~S39，分别是 1 年生和 2 年生大棚栽培霍山石斛以及 3 种不同年限的林下仿野生霍山石斛，原因是 3 年生大棚栽培霍山石斛中各化学成分含量远高于其他样品。

4 讨论

实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液 4 种不同体系的流动相，结果表明以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相时，出峰率高，峰形最好；同时进行了全波长扫描分析，着重考察了 220、240、254、280 nm 4 个检测波长，在 240 nm 处各对照品峰形较好、对称性较高，样品出峰数最多，基线平稳、峰形较高，因此选择 240 nm 为检测波长。

本实验采用 HPLC 结合黄酮、酚酸类物质的定量分析、相似度分析和聚类分析对不同年限的霍山石斛进行研究。其中 3 年生大棚栽培霍山石斛的化学成分含量最高，与聚类分析结果相对应。传统霍山石斛入药均以 3 年生茎为药材，这与其多糖、生物碱、黄酮类、酚类等化学成分含量的积累具有密切关系。相似度分析中不同年限的林下仿野生霍山石斛的相似度均 >0.900 ，且高于大棚栽培霍山石斛，这可能是由于目前霍山石斛大棚栽培体系尚未统一，不同产地间的霍山石斛大棚栽培的种源、栽培基质、肥料等的不同而导致的。而仿野生栽培霍山石斛由于仅受到自然环境的影响而无人工因素干扰的原因使其整体质量较为均一。本实验建立了不同年限霍山石斛指纹图谱研究方法，以 4 种化学成分作为指标进行聚类分析能够准确区分 3 年生大棚栽培霍山石斛，结合相似度分析可以对仿野生栽培霍山石斛进行评价，为大棚、仿野生栽培的霍山石斛药材的采收年限、分类鉴别提供了科学参考。针对不同栽培模式、产地、采收年限霍山石斛进行全面的质量标准研究，后续实验还需要借助液质联用、核磁共振等手段进行进一步定性、定量各样品的色谱峰。

参考文献

- [1] 魏 刚, 顺庆生, 李名海, 等. 中华仙草霍山石斛 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2015.
- [2] 赵学敏. 清. 本草纲目拾遗 [M]. (第 2 版) 北京: 人民卫生出版社, 1983.
- [3] 颜美秋, 陈素红, 吕圭源. 石斛“厚肠胃”相关功效药理学研究及应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3918-3924.

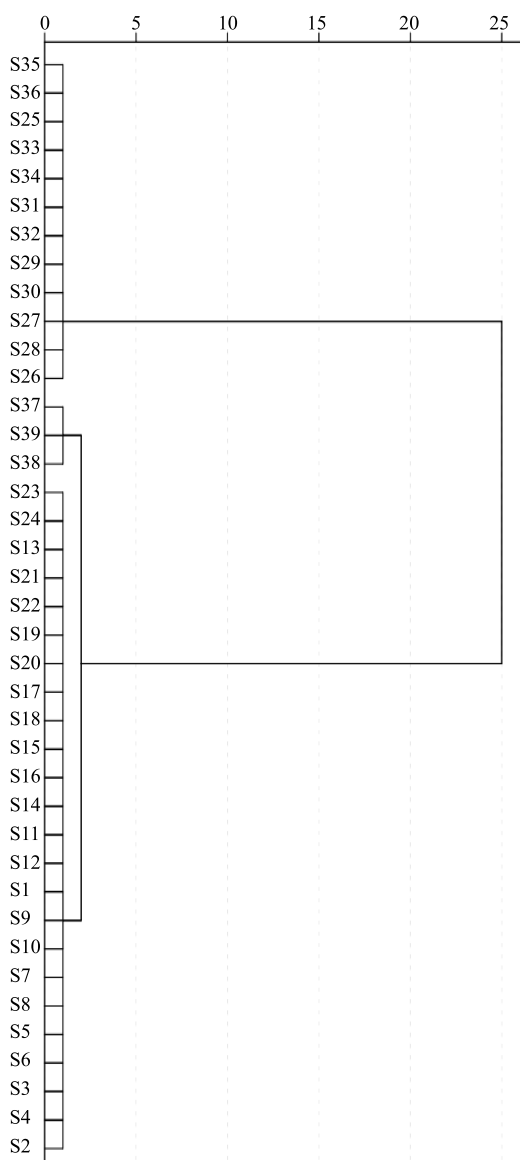


图 3 不同年限霍山石斛的系统聚类分析图

Fig. 3 System cluster analysis diagram of 39 batch D. huoshanense

- [4] 和磊, 罗婧, 王亚芸, 等. 金钗石斛脂溶性生物碱提取物诱导人结肠癌 HT-29 细胞凋亡 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 170-174.
- [5] 陈乃东, 李俊, 金晖, 等. HPLC-UV-CL 联用研究霍山石斛生物碱清除自由基活性 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(7): 276-280.
- [6] 徐德林, 储士润, 肖世基, 等. 不同产地的铁皮石斛和金钗石斛石斛多糖、石斛碱、氨基酸含量的比较 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2738-2740.
- [7] 房雪, 韩吉春, 李德芳, 等. 霍山石斛多糖通过激活 GSK-3 β 信号通路减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤 [J]. 中药材, 2017, 39(4): 926-931.
- [8] 方花, 戚辉, 高欣欣, 等. 石斛酚与丁香酸协同对醛糖还原酶的抑制作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(1): 1-4.
- [9] 刁红星, 易燕群, 戚辉, 等. 石斛酚与丁香酸联合抗白内障作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(16): 2429-2434.
- [10] 周桂芬, 陈素红, 吕圭源, 等. 高效液相色谱法测定铁皮石斛中柚皮素的含量 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 520-523.
- [11] 周佳, 周先丽, 梁成钦, 等. 铁皮石斛化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1292-1295.
- [12] 徐云燕, 王令仪, 黄彬, 等. 不同生长期金钗石斛和铁皮石斛中总生物碱及多糖的比较 [J]. 华西药学杂志, 2014, 29(3): 288-291.
- [13] 张岗, 刘阿萍, 邵庆庆, 等. 铁皮石斛蔗糖转运蛋白基因的分离和表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3688-3695.
- [14] 李蕤, 谭晓芳, 陈群, 等. 霍山石斛细胞悬浮培养及条件优化 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 358-362.