



铁皮石斛不同部位黄酮碳苷类成分及清除 DPPH 自由基能力比较研究

周桂芬, 吕圭源*

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

[摘要] 目的:对铁皮石斛根、茎、叶和花中黄酮碳苷类成分及抗氧化作用进行比较,为扩大铁皮石斛的药用部位提供实验依据。方法:采用 TLC 和 HPLC 及与对照品对照,对铁皮石斛不同部位黄酮类成分种类和含量进行分析;以清除 DPPH 自由基能力对抗氧化活性进行比较。结果:铁皮石斛茎、叶和花中含有种类相同的黄酮二糖碳苷类成分,并采用对照品指认了共有的 8 个色谱峰;但各黄酮碳苷的含量有显著差异,叶和花中黄酮碳苷的含量明显高于茎,叶和花 HPLC 色谱图相似度较高;根中黄酮类成分较少。茎中含有柚皮素,而根、叶和花均不含该成分。铁皮石斛茎和叶对 DPPH 自由基均有一定的清除作用,叶对 DPPH 自由基清除能力优于茎。结论:以黄酮碳苷含量及抗氧化活性为指标,铁皮石斛叶和花代替茎入药有一定可能性。该研究为铁皮石斛的综合开发利用提供了前期基础。

[关键词] 铁皮石斛;黄酮碳苷;不同部位;DPPH

铁皮石斛为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 的干燥茎,有益胃生津,滋阴清热等功效^[1]。铁皮石斛因其特殊的生存环境和卓越的滋补功效而名列“中华九大仙草”之首,浙江省是全国率先发展铁皮石斛产业的省份,是铁皮石斛类保健食品的生产基地和消费大省。近 2 年,对铁皮石斛茎化学成分的研究已取得较大进展^[2],至今对铁皮石斛其他部位的研究还未见报道,但采集的药材中非药用部位占有很大比例。为充分利用铁皮石斛资源,扩大入药部位和开发铁皮石斛其他部位药用价值,课题组前期研究表明铁皮石斛叶和花中含有大量的黄酮碳苷类成分,并首次采用 HPLC-DAD-ESI-MSⁿ 技术鉴定了 8 种黄酮二糖碳苷类化合物^[3],黄酮具有清除自由基,抗氧化,降血糖,对心血管系统具有保护作用等药理活性^[4]。由于黄酮类化合物具有很强的抑制活性氧、减少自由基产生和清除自由基作用^[5-7],它是自然界中抗氧化作用最

强的一类天然化合物,说明研究开发含有黄酮类化合物的药物具有广阔的前景。为了系统地反映铁皮石斛不同部位黄酮类成分及抗氧化活性区别,本研究在前期工作基础上,对浙江省铁皮石斛骨干企业铁皮石斛不同部位黄酮类成分及清除 DPPH 自由基活性进行了比较,结果表明,如以黄酮含量及抗氧化活性为指标,铁皮石斛叶和花代替茎入药有一定可能性。本研究为铁皮石斛综合利用和进一步研究提供了实验依据。

1 材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有二极管阵列检测器(DAD)、四元泵、柱温箱、自动进样器和在线脱气机;CAMAG Linomat 5 半自动点样仪和 CAMAG 薄层色谱数码成像系统(瑞士卡玛);Lambda 45 紫外-可见分光光度计(美国珀金埃尔默公司)。

芹菜素-6,8-二-C-β-D-吡喃葡萄糖苷、芹菜素-6-C-β-D-木糖-8-C-β-D-吡喃葡萄糖苷、异夏佛托苷、夏佛托苷、芹菜素-6-C-β-D-吡喃葡萄糖-8-C-β-D-木糖苷、芹菜素-6-C-β-D-木糖-8-C-α-L-阿拉伯糖苷、芹菜素-6,8-二-C-α-L-吡喃阿拉伯糖苷、芹菜素-6-C-α-L-阿拉伯糖-8-C-β-D-木糖苷对照品由沈阳药科大学提供;柚皮素(批号 101206,上海融禾医药科技有限公司);DPPH(批号 257621, Sigma 公司);甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司);甲酸(光谱级,美国 Tedia 公

[稿件编号] 20111102016

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BA104B06);浙江省科技厅项目(2009F70034);浙江省高等学校优秀青年教师项目[浙教办高科(2010)175号];浙江省重大科技专项重点项目(2006C13014)

[通信作者] *吕圭源,教授,博士生导师,研究方向为中药药理及新产品开发,Tel/Fax:(0571)86613601,E-mail:lv_gy@263.net

[作者简介] 周桂芬,博士,研究方向为天然药物活性成分及质量控制



司);聚酰胺薄膜(20 cm × 10 cm,浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);其余试剂均为分析纯。

铁皮石斛全株由浙江金华寿仙谷药业有限公司提供,经浙江中医药大学资源鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为 *D. officinale*。

2 方法

2.1 对照品溶液制备

精密称取 8 种黄酮二糖苷对照品和柚皮素对照品适量,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,备用。

2.2 供试品溶液制备

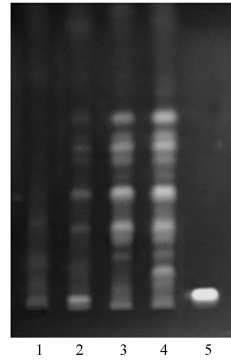
取铁皮石斛根、茎、叶和花粉末各约 0.5 g,精密称定,置 100 mL 圆底烧瓶中,加 50 mL 蒸馏水,加热回流提取 1 h,放冷至室温,离心,上清液减压回收至 20 mL,水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇溶液,减压回收至干,残渣加 70% 甲醇溶解并定容至 10 mL。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.3 薄层色谱法对铁皮石斛不同部位黄酮类成分分析

参照 2010 年版《中国药典》铁皮石斛项下薄层色谱法试验^[1],吸取供试品溶液(根和茎 5 μL,叶和花 2 μL)和柚皮素对照品溶液 5 μL,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以乙醇-丁酮-乙酰丙酮-水(15:15:5:85)为展开剂,展开,取出,烘干,喷以 1% 三氯化铝乙醇试液,在 105 °C 烘约 3 min,置紫外光灯(365 nm)下检视,结果见图 1。在该色谱条件下,各黄酮类成分分离度较好。茎的供试品色谱中,在与柚皮素对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,而根、叶和花中不含该成分。茎、叶和花含的黄酮类成分种类较相似,但茎中相应斑点颜色较浅,含量较低。花和叶中黄酮类成分种类和含量均较相似,从图可看出花比叶多了一个深黄色的斑点,并且该成分的 Rf 相对其他黄酮的 Rf 小,说明含酚羟基较多。

2.4 高效液相色谱法对铁皮石斛不同部位黄酮类成分分析

2.4.1 色谱条件 Welch Materials XB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);柱温 30 °C;流动相 0.4% 甲酸(A)-甲醇(B),梯度洗脱,0 ~ 5 min(B 25% ~ 25%),5 ~ 10 min(B 25% ~ 30%),10 ~ 25 min(B 30% ~ 40%),25 ~ 45 min(B 40% ~ 55%),45 ~ 50 min(B 55% ~ 60%);检测波长 335 nm;流速



1. 根;2. 茎;3. 叶;4. 花;5. 柚皮素。

图 1 铁皮石斛根、茎、叶、花样品和柚皮素对照品 TLC 图

Fig. 1 TLC of root, stem, leaf, flower and naringenin

1.0 mL · min⁻¹;进样量叶和花 3 μL,根和茎 5 μL。

2.4.2 方法学考察 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统对精密度,重复性和稳定性进行考察,色谱图进行自动匹配,相似度均在 0.99 以上。

精密度试验:取铁皮石斛叶同一供试品溶液,在 2.4.1 项下的色谱条件下,重复进样测定 6 次,结果被测定的 9 个成分峰面积平均值的 RSD 分别为 0.37%, 0.15%, 0.28%, 0.18%, 0.99%, 0.47%, 1.5%, 0.45%, 0.21%, 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取铁皮石斛叶同一供试品溶液,在 2.4.1 项下的色谱条件下,在 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 分别进样测定,以峰面积为指标计算 9 个成分的 RSD 分别为 0.48%, 0.38%, 0.40%, 0.39%, 1.1%, 0.41%, 0.14%, 0.45%, 1.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批铁皮石斛叶药材 6 份,按 2.2 项下制备供试品溶液,在 2.4.1 项下的色谱条件下测定,测得 9 个成分单位质量峰面积平均值的 RSD 分别为 0.33%, 0.28%, 0.39%, 0.44%, 1.1%, 0.56%, 1.6%, 0.32%, 0.22%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 铁皮石斛不同部位黄酮类成分比较 分别吸取 9 种混合对照品溶液和铁皮石斛根、茎、叶、花供试品溶液,在上述色谱条件下测定,9 种被测成分分离度较好,见图 2。供试品中被测定化合物色谱图与对照品色谱图比较,供试品中被测定化合物的保留时间分别与对照品的保留时间一致,从 DAD 获得的被测定成分和对照品紫外光谱



图比较,供试品色谱中,与对照品色谱保留时间相同的色谱峰紫外光谱图一致,确定了茎、叶和花中8个共有峰为芹菜素-6,8-二-C-β-D-吡喃葡萄糖苷(1号峰)、芹菜素-6-C-β-D-木糖-8-C-β-D-吡喃葡萄糖苷(2号峰)、异夏佛托苷(3号峰)、夏佛托苷(4号峰)、芹菜素-6-C-β-D-吡喃葡萄糖-8-C-β-D-木糖苷(5号峰)、芹菜素-6-C-β-D-木糖-8-C-α-L-阿拉伯糖苷(6号峰)、芹菜素-6,8-二-C-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(7号峰)、芹菜素-6-C-α-L-阿拉伯糖-8-C-β-D-木糖苷(9号峰),均为芹菜素为苷元的黄酮二糖碳苷类化合物;茎中含有柚皮素(10号峰),而根、叶和花没有该成分;根中含的黄酮类成分较少。该结果与TLC相同。

峰,在线UV光谱也呈现与8个黄酮二糖碳苷相同的特征UV吸收,表明黄酮母核可能相同。茎中虽含有9个黄酮类成分,但比叶和花中含量低;茎中含有二氢黄酮类化合物——柚皮素色谱峰,而根、叶和花没有该化合物,茎与花,茎与叶的相似度比花和叶的相似度低。根中的黄酮类成分较少,只有4号峰与茎、叶和花相同,与茎、叶和花的相似度均很低。

表1 铁皮石斛根、茎、叶和花相似度测定

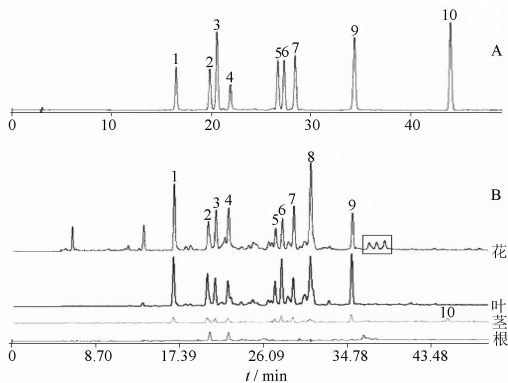
Table 1 Similarity evaluation results of root, stem, leaf and flower

部位	相似度			
	花	叶	茎	根
花	1.00	0.93	0.70	0.33
叶	0.93	1.00	0.83	0.31
茎	0.70	0.83	1.00	0.41
根	0.33	0.31	0.41	1.00

2.4.5 铁皮石斛不同部位黄酮类成分相对含量比较 铁皮石斛茎、叶和花中共有的黄酮二糖碳苷类化合物,中国食品药品检定研究院没有这些对照品,故本实验还没能进行多指标含量测定或一测多评研究。指认的8种黄酮碳苷类化合物均为芹菜素为苷元的黄酮二糖碳苷类化合物,单糖均连接在芹菜素的C-6位和C-8位,紫外吸收光谱相同(带I 335 nm,带II 271 nm),紫外响应值基本相近,可以根据单位质量峰面积,比较铁皮石斛不同部位8种黄酮二糖碳苷的相对含量。将铁皮石斛不同部位黄酮类成分HPLC图谱各色谱峰的峰面积相对药材称样量之比,即单位质量药材峰面积进行统计,结果见表2。叶和花中的8种黄酮二糖碳苷的含量均比茎高,基本都在10倍以上;叶和花中相对含量最高的是8号峰,该色谱峰的峰面积叶是茎的33.9倍,花是茎的51.4倍;该化合物没有对照品指认,在线UV光谱也呈现与8种黄酮二糖碳苷相同的特征UV吸收,表明黄酮母核可能相同,具体结构有待进一步通过液质联用等技术来确定。根中只有4号峰,而且相对含量较低。叶和花中黄酮碳苷类成分含量较丰富,如果以黄酮碳苷含量为指标,铁皮石斛叶和花代替茎入药有一定可能性。

2.5 清除DPPH自由基活性比较

2.5.1 DPPH自由基溶液配制 精密称取一定量DPPH自由基,用70%乙醇溶解,配制浓度为



1. 芹菜素-6,8-二-C-β-D-吡喃葡萄糖苷;2. 芹菜素-6-C-β-D-木糖-8-C-β-D-吡喃葡萄糖苷;3. 异夏佛托苷;4. 夏佛托苷;5. 芹菜素-6-C-β-D-吡喃葡萄糖-8-C-β-D-木糖苷;6. 芹菜素-6-C-β-D-木糖-8-C-α-L-阿拉伯糖苷;7. 芹菜素-6,8-二-C-α-L-吡喃阿拉伯糖苷;9. 芹菜素-6-C-α-L-阿拉伯糖-8-C-β-D-木糖苷;10. 柚皮素。

图2 9种混合对照品(A)和铁皮石斛不同部位样品(B) HPLC图

Fig. 2 HPLC chromatograms of 9 mixed reference substances (A) and different parts from *Dendrobium officinale* (B)

2.4.4 相似度评价 将铁皮石斛根、茎、叶和花供试品溶液的HPLC图谱信号数据导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件(2004A版),设定茎为参照图谱,选取“时间窗宽度”为0.2 min,选定根、茎、叶和花均有的4号峰进行校正,自动匹配,匹配后的样品谱图见图2。然后进行各样品间的相似度评价,结果见表1。从表1和图2可知叶和花的相似度(0.93)较高,有9个共有色谱峰,采用对照品指认了其中8个色谱峰,均为芹菜素为苷元的黄酮二糖碳苷类成分;花在9号峰后又多了一些色谱



表 2 铁皮石斛根、茎、叶和花黄酮类成分色谱峰单位质量峰面积 ($n=3$)

Table 2 Peak area of flavonoids in root, stem, leaf and flower ($n=3$)

部位	色谱峰								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
茎	160.7	190.1	113.9	131.9	94.1	165.7	136.2	103.6	200.4
叶	2 313.1	1 833.6	1 325.7	1 203.5	1 214.1	2 260.7	1 408.9	3 516.0	2 392.5
花	2 843.8	1 644.1	1 850.8	2 097.8	1 065.3	1 485.7	2 074.5	5 326.7	1 654.2
根	0	0	0	246.3	0	0	0	0	0
叶/茎	14.39	9.65	11.64	9.12	12.90	13.64	10.34	33.94	11.94
花/茎	17.70	8.65	16.25	15.90	11.32	8.97	15.23	51.42	8.25

61.3 mg · L⁻¹ 的自由基溶液。

2.5.2 铁皮石斛茎和叶样品溶液制备 参照 2.2 项下供试品溶液制备方法。

2.5.3 DPPH 自由基清除率的测定 测定方法见参考文献[6], 稍作修改。分别精密吸取铁皮石斛茎和叶溶液, 配制成 5 个不同浓度, 分别精密吸取样品溶液 1 mL 和 DPPH 自由基乙醇溶液 2 mL, 混匀, 在室温下反应 40 min (已对样品反应时间进行了考察), 在 517 nm 下测定吸光度。按公式 $I = [1 - (A_s - A_{c2})/A_{c1}] \times 100\%$ (式中 A_s 为样品吸光度, A_{c1} 为 DPPH 乙醇溶液吸光度值, A_{c2} 为样品溶液空白对照吸光度), 计算各样品对 DPPH 自由基清除率 (I)。以清除率为纵坐标, 样品溶液质量浓度为横坐标, 绘制清除率曲线, 在一定质量浓度范围内, DPPH 的清除率 (Y) 与各部位的质量浓度 (X) 呈近似线性关系, 线性方程见表 3。

表 3 铁皮石斛茎和叶中黄酮碳苷类成分清除 DPPH 自由基活性

Table 3 DPPH free radical scavenging activity of flavone C-glycosides in stem and leaf

部位	线性方程	r	IC ₅₀ /g · L ⁻¹
茎	$Y = 19.362X + 41.541$	0.995	4.37
叶	$Y = 14.797X + 32.165$	0.998	1.21

根据线性方程计算 IC₅₀, 即清除率为 50% 时样品的浓度, 铁皮石斛茎 IC₅₀ 为 4.37 g · L⁻¹ (以原药材计), 铁皮石斛叶 IC₅₀ 为 1.21 g · L⁻¹ (以原药材计), IC₅₀ 越小, 抗氧化剂清除自由基能力越强。铁皮石斛茎和叶均有一定的清除 DPPH 自由基的能力, 叶清除 DPPH 自由基能力优于茎。前面研究已表明, 茎与叶中黄酮碳苷种类相同, 但叶中的每种黄

酮二糖碳苷的含量均比茎高近 10 倍以上, 清除 DPPH 自由基活性与黄酮碳苷含量呈一定量效关系, 黄酮碳苷含量越高, 抗氧化活性越强。如以黄酮碳苷类成分抗氧化活性为指标, 铁皮石斛叶和花代替茎入药有一定可能性。

3 讨论

铁皮石斛茎、叶和花中的黄酮主要以苷形式存在, 极性较大, 溶于水。本研究供试品溶液制备, 采用水回流提取, 叶绿素等极性小的杂质不被提出, 再用水饱和的正丁醇萃取把黄酮苷类化合物萃取出来 (实验中使用乙酸乙酯不能把黄酮碳苷萃取出来), 与多糖等水溶性杂质分离, 铁皮石斛水提取与临床应用相一致, 结果更具有实际意义。

铁皮石斛茎、叶和花含有种类相同的黄酮碳苷类成分, 通过与对照品对照指认了 8 个黄酮碳苷的结构, 中国食品药品检定研究院没有铁皮石斛中的 8 种黄酮二糖碳苷类化合物对照品, 铁皮石斛叶和花中的黄酮碳苷种类较丰富, 含量相对较高, 是制备黄酮碳苷类成分的好资源, 为进一步采取“一测多评”对铁皮石斛中各种黄酮二糖碳苷的含量测定提供基础。茎中的黄酮碳苷含量较低, 但茎中含有铁皮石斛其他部位不含有的特征性成分柚皮素, 为了更好的控制铁皮石斛茎的质量, 应进一步对茎中柚皮素的含量进行研究。

本文对铁皮石斛茎和叶黄酮类成分清除 DPPH 自由基活性进行了比较, 铁皮石斛花产量较低, 季节性较强, 故本文没有对花清除 DPPH 自由基活性进行研究。铁皮石斛叶和花中黄酮二糖碳苷的种类和含量相近, 推测清除 DPPH 自由基活性可能相似。

叶中黄酮类成分清除 DPPH 自由基的活性比茎强, 与叶中的黄酮含量较高有一定相关性, 叶中黄酮



碳苷均为芹菜素为苷元的黄酮二糖碳苷类化合物,单糖均连接在 C-6 和 C-8,但单糖种类不同,各成分与清除 DPPH 自由基的关联性及其构效关系有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:265.
[2] 李燕. 铁皮石斛化学成分的研究[D]. 北京:北京协和医学院中国医学科学院, 2009.
[3] 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]. 中国药理学杂志,2012,47(1):13.
[4] 龚金炎,吴晓琴,张英. 碳苷黄酮及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2010,22:525.
[5] 吴春,陈林林. 菟丝子黄酮体外清除自由基活性的研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(5):553.
[6] 付影超,严铭铭,黄耀玲,等. 节节草总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2010,25(10):1589.
[7] 袁亚男,陈承瑜,杨滨,等. 31 种黄酮、酚酸类化合物和 10 种中药清除 DPPH 能力考察[J]. 中国中药杂志,2009,34(13):1695.

Comparative studies on scavenging DPPH free radicals activity of flavone C-glycosides from different parts of *Dendrobium officinale*

ZHOU Guifen, LV Guiyuan*

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To study the scavenging DPPH free radicals activity of flavone C-glycosides from different parts of *Dendrobium officinale*. **Method:** The types and contents of flavonoids from different parts of *D. officinale* were analyzed by TLC and HPLC. The antioxidant effect was tested by scavenging DPPH free radicals activity. **Result:** The stems, leaves and flowers contained the same type of flavone C-A glycosides and 8 common peaks were identified. The content of flavone C-A glycosides was significantly different. The content of flavone C-glycosides in leaves and flowers was higher than that in stems. The flavonoid in roots was less. Stems contained naringenin, which was not identified in root, leave and flower. Both stems and leaves had antioxidant capacity of eliminating DPPH free radicals, of which scavenging DPPH free radicals activity of leaves was better than stems. **Conclusion:** Considering the content of flavonoid and antioxidant activity leave and flower of *D. officinale* may substitute stems. The study provides a preliminary basis for the development and utilization of leave and flower of *D. officinale*.

[Key words] *Dendrobium officinale*; flavone C-glycosides; different parts; DPPH

doi:10.4268/cjcm20121106

[责任编辑 吕冬梅]