

霍山石斛叶黄酮提取纯化工艺优化及其成分分析

韩 硕^{1,2}, 李成网^{3,4}, 王厉梅⁶, 官 鹏^{2*}, 刘增辉^{3,4,5*}

¹安徽医科大学药学院; ²安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022; ³安徽省医学科学研究院; ⁴安徽省医学高等专科学校, 合肥 230601; ⁵安徽省祁门县蛇伤研究所, 祁门 245600; ⁶浙江康牧药业有限公司, 绍兴 312400

摘 要: 以霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang et S.J.Cheng) 叶为材料, 建立石斛叶黄酮的提取及纯化工艺, 并分析其主要黄酮类成分。本研究以乙醇浓度、料液比、提取温度和回流时间为考察因素, 以夏佛塔苷得率为评价指标, 正交试验法建立霍山石斛叶黄酮最佳提取工艺; 并从树脂选择、上样体积优化和洗脱液选择的角度, 考察夏佛塔苷回收率, 建立最佳纯化工艺; 利用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 对提取物中主要黄酮类成分进行分析。结果表明, 霍山石斛叶黄酮的最佳提取工艺为: 乙醇体积分数 70%、料液比 1 : 30、提取温度 90 °C、提取时间 30 min。此条件下, 夏佛塔苷得率为 0.348 2%。以夏佛塔苷含量为 85 µg/mL 上样液进行纯化时, 最佳纯化工艺为: 采用 AB-8 型大孔吸附树脂为纯化材料, 上样体积 7 BV, 洗脱液为 6 BV 50%乙醇, 夏佛塔苷回收率为 96.68%, 纯化后所得干粉中夏佛塔苷含量为 5.11%, 较纯化前含量提高 355%。从提取物中分析鉴定出 33 个黄酮类化合物, 其中 24 个是首次在霍山石斛中发现。以上结果表明, 该提取纯化工艺稳定可行, 可用于霍山石斛叶中黄酮类成分的提取纯化, 所得黄酮含量较高。

关键词: 霍山石斛叶; 黄酮; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; 夏佛塔苷; 提取纯化工艺

中图分类号: R284.2 文献标识码: A

Optimization of extraction and purification process of *Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang et S.J.Cheng leaf flavonoids and its component analysis

HAN Shuo^{1,2}, LI Cheng-wang^{3,4}, WANG Li-mei⁶, GONG Peng^{2*}, LIU Zeng-hui^{3,4,5*}

¹College of Pharmacy, Anhui Medical University; ²The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China; ³Anhui Academy of Medical Sciences; ⁴Anhui Medical College, Hefei 230601, China; ⁵Anhui Qimen County Snake Injury Research Institute, Qimen 245600, China; ⁶Zhejiang Kangmu Pharmaceutical Co., Ltd., Shaoxing 312400, China

Abstract: This study aims to establish a process applicable to the extraction and purification of flavonoids from the leaves of *Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang et S.J.Cheng and to analyse its main flavonoid components. In

this study, ethanol volume fraction, solid-liquid ratio, temperature and reflux time were selected as potential influencing factors in the design of an orthogonal experiment to establish an optimal extraction process by comparing the yield of shaftoside. We also investigated the influence of various purification resins, sample volumes and eluent variables on shaftoside recovery in order to develop an optimal purification process. Furthermore, UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS was employed to investigate the primary chemical components of the flavonoids present in the extract. The results demonstrated that the optimal extraction process for *D. huoshanense* leaf flavonoids was achieved with a 70% ethanol solution, a solid to liquid ratio of 1 : 30, an extraction temperature of 90 °C, and an extraction time of 30 minutes. And the yield of shaftoside was 0.348 2% under these conditions. The optimal purification procedure was as follows: AB-8 resin as the purification material, 7 BV sample (shaftoside content was 85 µg/mL), and 6 BV of 50% ethanol as the eluent. The recovery of shaftoside under these condition was 96.68%. The content of shaftoside in the dry powder obtained after purification was 5.11%, representing a significant increase of 355% in comparison to the unpurified sample. 33 flavonoids were identified in the extract, of which 24 were found for the first time in *D. huoshanense*. The results indicated that the extraction and purification process was stable and feasible, and can be used for the extraction and purification of flavonoid components in *D. huoshanense* leaves to obtain high quality flavonoids.

Keywords: *Dendrobium huoshanense* leaves; flavonoid; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; shaftoside; extraction and purification process

霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang et S.J.Cheng) 是我国传统名贵中药材, 味甘, 微寒, 具有益胃生津、滋阴清热等功效^[1]。石斛以茎入药, 而石斛叶等大量副产物作为废弃物处理, 未得到充分开发利用。已有研究表明石斛叶具有和茎中相同的化学成分, 且石斛叶黄酮含量显著高于茎, 因此, 建立石斛叶黄酮提取纯化工艺并进一步分析明确主要黄酮类化学成分, 可为开发石斛叶健康产品奠定基础, 也有助于提升石斛产业经济价值并促进其可持续发展。据《中华人民共和国药典》2020 版规定, 夏佛塔昔是霍山石斛特征图谱参照化学成分, 因此, 本研究以夏佛塔昔提取率作为指标, 采用正交试验法建立最佳提取工艺^[2]。同时, 以纯化树脂优选、上样体积及洗脱液为主要考察因素, 建立最佳纯化工艺。采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 分析明确霍山石斛叶黄酮提取物中主要黄酮类化学成分, 为霍山石斛叶资源的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

霍山石斛叶于 2023 年 11 月从安徽省霍山县安徽霍山鹏泽生物科技有限公司种植基地

采摘，经安徽中医药大学谢冬梅教授鉴定为 *Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang et S.J.Cheng 的叶。石斛鲜叶阴凉处风干 12 h 后，经 55 °C 烘箱烘干 12 h，再经粉碎机粉碎并过 30 目筛，粉末密封保存备用。

1.2 仪器与试剂

101A-3 型干燥箱（上海实验仪器厂有限公司）；AutoScience AS3120 型超声清洗仪（天津奥特赛恩斯仪器有限公司）；Ultimate 3000 高效液相色谱仪（赛默飞世尔仪器公司）；梅特勒 XP56 型百万分之一电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；AP224W 电子天平（日本岛津制作所菲律宾工厂）；DJ-04 粉碎机（山东良辰仪器设备有限公司）；HH-4 型数显恒温水浴锅（常州诺基仪器有限公司）；UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS（赛默飞世尔仪器公司）。

95%乙醇（分析纯，天津市永大化学试剂有限公司）；甲醇、乙腈（色谱纯，天津市彪仕奇科技发展有限公司）；乙酸铵（色谱纯；上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；夏佛塔苷（中国食品药品检定研究院，批号：111912-201703，纯度：95.6%）；AB-8、ADS-17、D101 大孔树脂（上海麦克林生化科技股份有限公司）；聚酰胺树脂（PA，郑州和成新材料科技有限公司）。

1.3 夏佛塔苷含量测定

1.3.1 对照品溶液制备 精密称取夏佛塔苷标准品 1.250 mg，置于 25 mL 容量瓶中，加甲醇制成 0.050mg/mL 夏佛塔苷溶液。

1.3.2 色谱条件

色谱柱：Phenomenex LC Column C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流速 0.8 mL/min，柱温 40 °C，进样量 10 μL，流动相 A 为甲醇，流动相 B 为 0.01 mol/L 乙酸铵溶液，流动相 C 为乙腈，梯度洗脱：0~10 min，4%→8%A，92%→84%B，4%→8%C；10~25 min，8%→9%A，84%→82%B，8%→9%C；25~60 min，9%→11%A，82%→78%B，9%→11%C；60~75 min，11%A，78%B，11%C；75→85 min，11%→15%A，78%→70%B，11%→15%C；85→100 min，15%→4%A，70%→92%B，15%→4%C。

1.3.3 含量测定

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，即得。

1.4 黄酮提取

1.4.1 黄酮提取

精密称取霍山石斛叶粉末 2 g 置于 150 mL 的圆底烧瓶中，加入一定体积分数的乙醇溶

液，加热回流提取后，自然冷却至室温，将提取液滤过至 100 mL 容量瓶中，用同一体积分数乙醇溶液定容至刻度线。

1.4.2 单因素试验

参考相关文献，本研究设定单因素固定水平为乙醇体积分数 70%，料液比 1:25，回流时间 1 h，提取温度 100 °C；单因素不同水平分别如下：乙醇体积分数 30%、50%、70%、90%，料液比 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35，回流时间 15、30、60、90、120 min，提取温度 60、70、80、90、100 °C。

1.4.3 正交试验

根据单因素试验结果，以乙醇体积分数 (*A*)、料液比 (*B*)、回流时间 (*C*) 和提取温度 (*D*) 为影响因素，共设三个水平，采用 $L_9(3^4)$ 正交表开展正交试验，因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	<i>A</i> : 乙醇体积分数 Ethanol volume fraction (%)	<i>B</i> : 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	<i>C</i> : 提取温度 Extraction temperature (°C)	<i>D</i> : 提取时间 Extraction time (min)
1	50	1:20	80	15
2	70	1:25	90	30
3	90	1:30	100	60

1.4.4 提取工艺验证

称取霍山石斛叶粉末 3 份，采用正交试验所得最佳提取工艺提取黄酮，测定提取液中夏佛塔苷含量，计算得率。

1.5 黄酮纯化

1.5.1 上样液的制备

采用正交试验优化的最佳提取工艺提取霍山石斛叶黄酮，制成夏佛塔苷含量为 85 $\mu\text{g/mL}$ 的提取液作为上样液。

1.5.2 纯化工艺优选

1.5.2.1 纯化树脂优选

分别选用 D101、AB-8、ADS-17、PA 树脂为纯化材料，超纯水浸泡树脂 1 h 后，湿法装柱，柱体积 10 mL (内径 1 cm) [3]。3 BV 体积提取液上样，5 BV 超纯水进行洗柱后，再用 2.5 BV 70%乙醇进行洗脱，收集洗脱液于 25 mL 容量瓶中。测定洗脱液中夏佛塔苷含量，

计算回收率。

1.5.2.2 纯化条件优化

取优选的树脂，湿法装柱，方法同上。提取液过柱，收集流出液，每 10 mL 一份，共收集 9 BV，测定每份通过液中夏佛塔苷含量，绘制泄露曲线。

1.5.2.3 洗脱液优选

基于以上试验结果，用 5 BV 40%、50%、60%、70%、80%体积分数的乙醇溶液分别进行洗脱，测定通过液中夏佛塔苷含量，计算回收率，明确最佳洗脱液的乙醇体积分数；以最佳体积分数的乙醇溶液作为洗脱液，分别以 1、2、3、4、5、6 BV 体积进行洗脱，收集洗脱液，测定洗脱液中夏佛塔苷含量，绘制洗脱曲线。

1.5.3 纯化工艺验证

按最佳纯化工艺对黄酮提取物进行分离纯化，测定洗脱液中夏佛塔苷含量，平行 3 份，计算回收率。

1.6 黄酮类化学成分分析

1.6.1 样品溶液制备

取经纯化干燥的霍山石斛叶黄酮提取物干粉 1 mg，置于 10 mL 容量瓶中，70%乙醇定容至刻度线，摇匀，0.22 μm 滤膜过滤后备用。

1.6.2 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 分析

1.6.2.1 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm ）；柱温 40 °C；流速 0.8 mL/min；进样量 0.2 μL ；流动相 A 为 5 mM 乙酸铵溶液，流动相 B 为乙腈；梯度洗脱：0~10 min，92%→84%A；10~25 min，84%→82%A；25~60 min，82%→78%A；60~75 min，78%A；75~85 min，78%→70%A；85~100 min，70%→92%A^[4]。

1.6.2.2 质谱条件

检测方式：加热电喷雾离子化源（HESI）；鞘气流量 45 arb；辅助气体流量 15 arb；吹扫气体流量 1 arb；毛细管温度 320 °C；辅助气体加热器温度 350 °C；正喷雾电压 3.1 kV；负喷雾电压 3.1 kV；MS 的分辨率 70 000；MS/MS 的分辨率 17 500；扫描方式：全扫描模式；正、负离子模式同时检测；扫描范围 m/z 100~1 500。

1.6.3 化合物定性及相对定量分析

基于质谱工作站自带数据库及化合物信息公共数据库，参考 HMDB、PubChem 和 METLIN 等已有的质谱公共数据库，并比对文献，对质谱检测的一级谱、二级谱数据进行

比对分析。同时以夏佛塔苷色谱峰响应值为参考，对主要黄酮类物质进行相对定量。

1.7 数据处理

所有数据均采用 SPSS 软件和 GraphPad Prism6.0 软件进行分析处理，结果以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，双侧单因素比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄酮提取单因素试验结果

采用不同体积分数的乙醇分别提取霍山石斛叶黄酮，结果显示随着乙醇体积分数增加至 70%，夏佛塔苷得率逐渐升高，但采用 90%乙醇时，得率显著下降（见图 1A）。料液比单因素考察结果表明，夏佛塔苷得率随料液比增加而逐渐升高，但料液比超过 1:20 (g:mL) 时，得率增加趋缓（见图 1B）。逐步提高提取温度，夏佛塔苷得率逐渐增加，其中 90 °C 时得率显著升高，但 100 °C 时，得率增加缓慢（见图 1C）。提取时间单因素试验结果表明提取 30 min，夏佛塔苷得率最高，随着时间的延长，得率逐渐下降（见图 1D）。

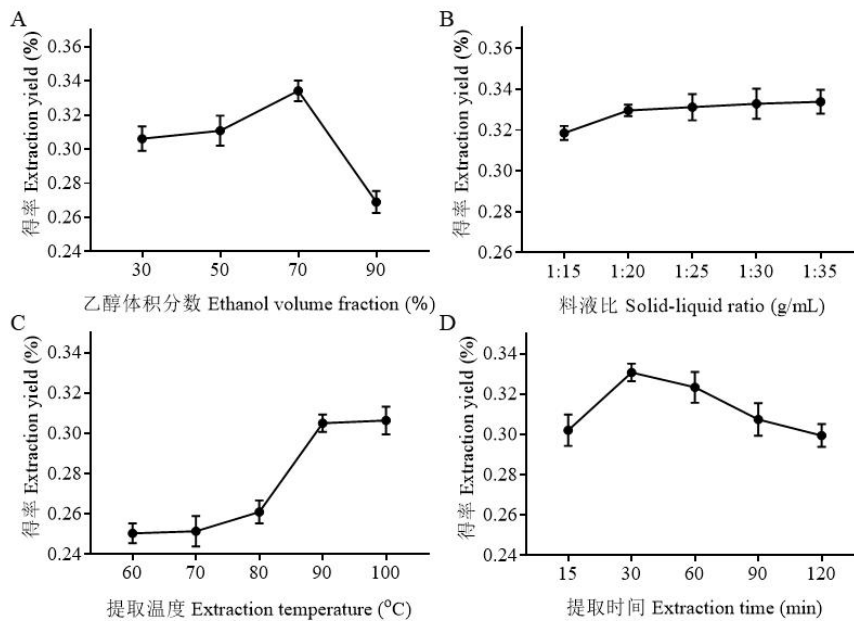


图 1 乙醇体积分数、料液比、提取温度及提取时间对夏佛塔苷提取得率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol volume fraction, solid-liquid ratio, extraction temperature and extraction time on the extraction rate of schaftoside

2.2 黄酮提取正交试验结果

正交试验（见表 2）与方差分析结果（见表 3）显示，因素 A 与因素 B 对夏佛塔苷的得率均具有显著性影响，因素 C 对夏佛塔苷的得率不具有显著性影响。各因素对于夏佛塔苷得率影响程度的顺序为：料液比 (B) > 乙醇体积分数 (A) > 提取温度 (C) > 提取时

间 (D)。因此, 最佳提取工艺为 $A_2B_3C_2D_2$, 即乙醇浓度为 70%, 料液比为 1:30 (g/mL), 提取温度为 90 °C, 提取时间为 30 min。

表 2 正交试验方案与结果

Table 2 Orthogonal experimental scheme and results

编号 No.	A: 乙醇体积分数 Ethanol volume fraction (%)	B: 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	C: 提取温度 Extraction temperature (°C)	D: 提取时间 Extraction time (min)	得率 Extraction yield (%)
1	50	1:20	80	15	0.274±0.003
2	50	1:25	90	30	0.295±0.008
3	50	1:30	100	60	0.322±0.007
4	70	1:20	90	60	0.311±0.004
5	70	1:25	100	15	0.308±0.002
6	70	1:30	80	30	0.341±0.003
7	90	1:20	100	30	0.277±0.004
8	90	1:25	80	60	0.276±0.002
9	90	1:30	90	15	0.321±0.001
I	0.297	0.288	0.297	0.301	—
II	0.320	0.293	0.309	0.304	—
III	0.291	0.328	0.303	0.303	—
R	0.029	0.041	0.013	0.003	—

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因素 Factor	离差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Degrees of freedom	F F value	P P value
A	0.001 38	2	81.881 58	0.012 07
B	0.002 91	2	172.355 26	0.005 77
C	0.000 22	2	12.842 11	0.072 24
误差 Error	0.000 02	2	—	—

2.3 黄酮提取工艺验证

精密称取霍山石斛叶粉末 3 份, 依据最佳提取工艺提取黄酮, 测定提取液中夏佛塔苷含量, 得率分别为 0.349 8%、0.350 8%和 0.344 2%, 平均得率为 0.348 2%, RSD 为 1.03%。结果表明, 该提取工艺稳定可靠, 重复性较好。

2.4 黄酮纯化工艺优化

为了优选最佳纯化材料, 我们考察了四种不同规格树脂对霍山石斛叶黄酮的纯化效果。试验结果显示, 经 D101、AB-8、ADS-17 三种树脂纯化后, 夏佛塔苷的回收率组间无显著

性差异，但均显著高于经 PA 纯化的夏佛塔苷的回收率（见图 2A）。该结果表明，PA 对夏佛塔苷的吸附能力有限，D101、AB-8、ADS-17 三种树脂均适用于霍山石斛叶黄酮的纯化，从降低成本角度，优先选用 AB-8 用于霍山石斛叶黄酮的纯化。

为了明确最佳上样体积，分析了上样液过 AB-8 树脂层析柱后流出液中夏佛塔苷含量。当上样体积为 7 BV 时，流出液中检测出微量夏佛塔苷，上样液体积超过 8BV 时，流出液中夏佛塔苷含量显著上升（见图 2B）。该结果表明，7 BV 体积的霍山石斛叶黄酮提取液即可使层析柱中 AB-8 树脂达到吸附饱和状态，因此，最佳上样体积为 7 BV。

基于以上试验结果，为了明确最佳洗脱液的浓度和体积，分别用 40%、50%、60%、70%和 80%体积分数的乙醇溶液进行洗脱，结果表明，50%体积分数乙醇洗脱液效果最佳，回收率达 91.46%（见图 2C）。分别用 1、2、3、4、5、6 BV 50%乙醇洗脱液进行洗脱，结果表明，2 BV 洗脱体积时，夏佛塔苷洗脱量最大，至 6 BV 时，洗脱液中只检出极微量夏佛塔苷，表明 6 BV 的 50%乙醇洗脱液可将纯化柱中夏佛塔苷充分洗脱出来，洗脱效果最佳（见图 2D）。

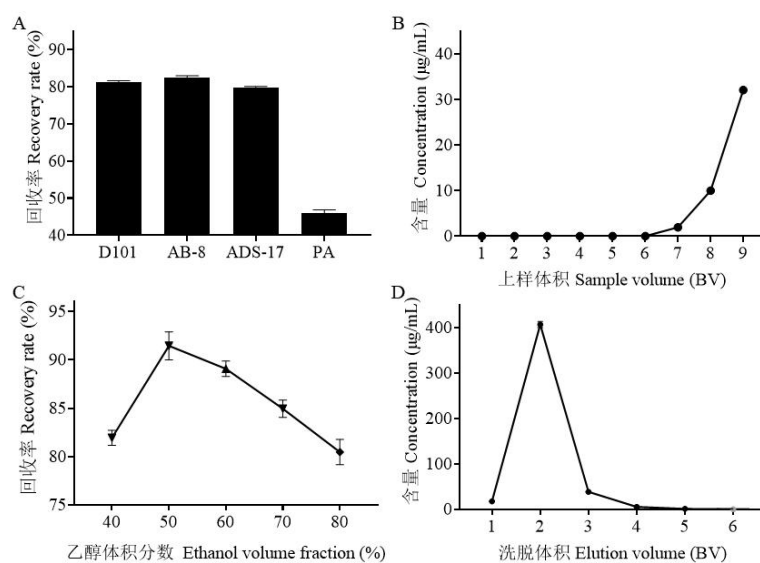


图 2 纯化树脂、上样体积、乙醇体积分数和洗脱液体积对霍山石斛叶黄酮提取物纯化的影响

Fig. 2 Effect of various purification resins, sample volume, ethanol volume fraction and eluent volume on the purification of flavonoid extracts from *D. huoshanense*

综上所述，霍山石斛叶提取液中黄酮纯化的最佳工艺为：以 AB-8 树脂纯化材料，上样液体积 7 BV，洗脱液为 6 BV 50%乙醇溶液。

2.5 黄酮纯化工艺验证

采用 AB-8 树脂填装的 10 mL (内径 1 cm) 层析柱, 以 70 mL 夏佛塔苷含量为 85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的霍山石斛叶黄酮提取液上样, 用 60 mL 50%乙醇进行洗脱, 测定洗脱液中夏佛塔苷含量, 计算回收率分别为 94.87%、98.00%和 97.17%, 回收率均值为 96.68%, RSD 为 1.68%。分别减压浓缩和冷冻干燥纯化前提取液和纯化后洗脱液, 计算夏佛塔苷含量, 结果表明, 纯化前提取液干燥粉末中夏佛塔苷含量为 1.12%, 纯化后含量为 5.11%, 含量提高 355%。

2.6 黄酮成分分析

按最佳提取及纯化工艺制备霍山石斛叶黄酮提取物, 进行质谱分析, 离子流图如图 3, 在正离子模式下, 分析鉴别出黄酮类化合物 3 个, 负离子模式下分析鉴别出黄酮类化合物 30 个, 结果见表 4。以夏佛塔苷色谱峰响应值为参照, 计算其他黄酮类物质相对含量。结果表明, 霍山石斛叶黄酮类化合物以夏佛塔苷含量最高, 其他相对含量大于 50 的有紫罗兰素、芹菜素-6-*C*- β -*D*-吡喃木糖基-8-*C*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷和山柰酚-3-*O*-芸香糖苷等, 橘红素、芹菜素、槲皮素 3-*O*-芸香糖苷、大豆黄素、柚皮素和金雀异黄素等相对含量最低。

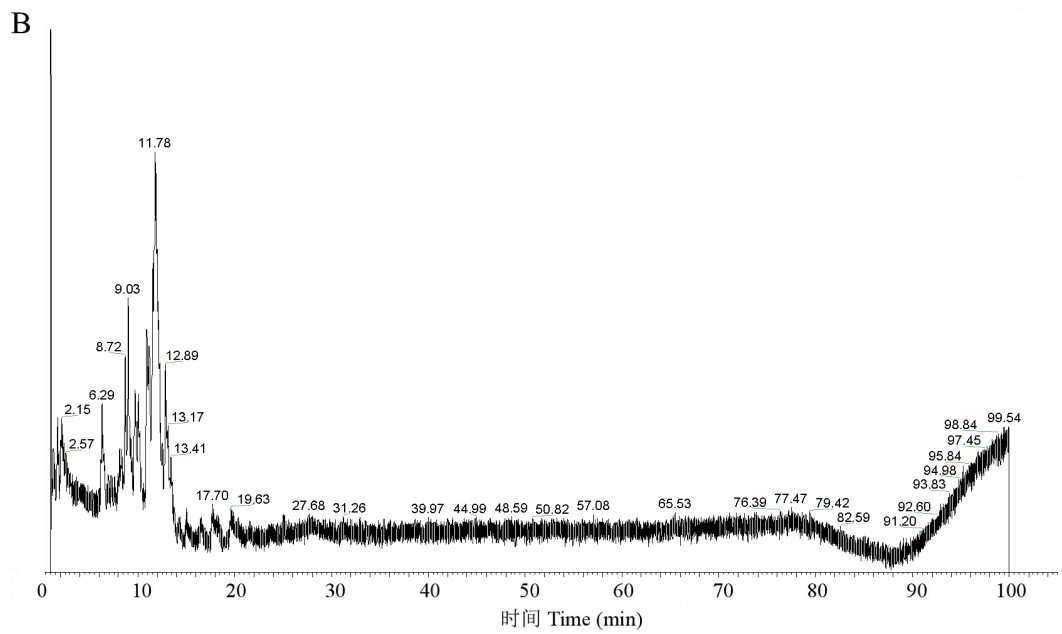
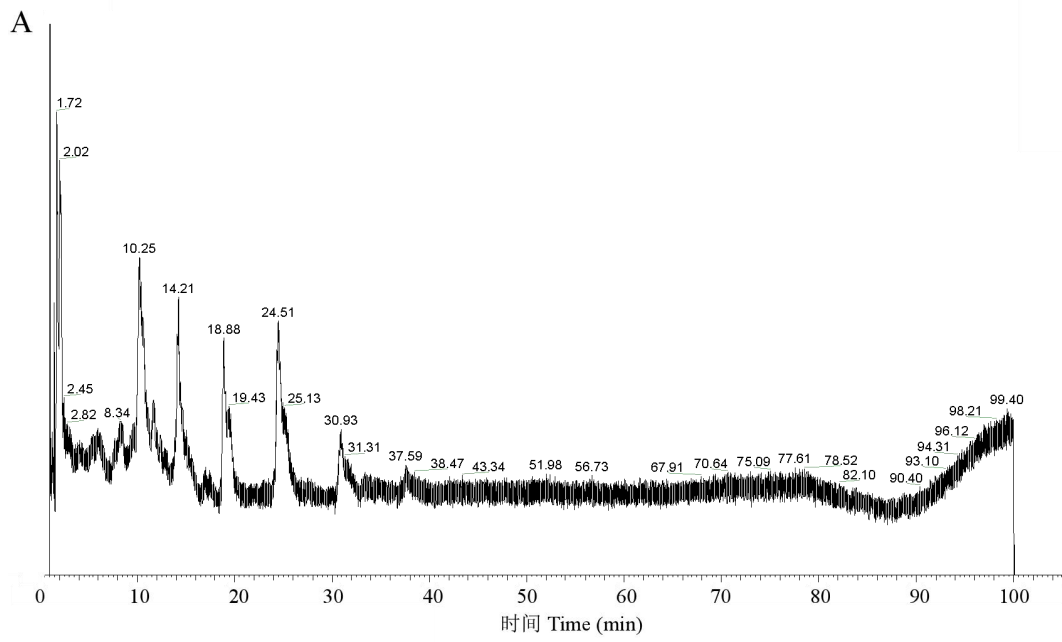


图3 正(A)、负(B)离子模式下霍山石斛叶黄酮提取物总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms of *D. huoshanensis* leaf flavonoid extracts in positive(A) and negative (B) ion

mode

表 4 霍山石斛叶黄酮提取物 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 分析

Table 4 Analysis of the components in *D. huoshanense* leaf flavonoid extracts by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

编号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	离子模 式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ion (m/z)	相对含量 Relative content
1	4.89	槲皮素-3- <i>O</i> -槐糖苷 Quercetin-3- <i>O</i> -sophoroside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	625.141 0	625.139 9	-1.8	625.139 9、463.012 2、301.980 3	0.13
2	6.25	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷 Kaempferol 3-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.151 2	593.150 9	-0.5	593.150 8、285.025 9、284.030 4、255.086 9、151.004 0	51.77
3	6.82	橘皮素 Tangeretin	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	[M+H] ⁺	373.128 2	373.127 3	-2.4	373.183 5、358.963 9、343.011 2、211.111 8、183.024 8	0.04
4	7.62	维采宁 1 Vicenin -1	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.139 9	-1.3	563.139 9、473.236 8、413.961 1、383.014 0、355.103 3、312.116 6	2.20
5	7.63	木犀草素-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -木糖苷-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷 Luteolin-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -xyloside-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	579.135 5	579.134 9	-1.1	579.134 9、429.212 2、399.268 8、369.967 6、339.247 3	5.07
6	7.7	木犀草素-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -木糖苷 Luteolin-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucoside-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -xyloside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	579.135 5	579.135 0	-0.9	579.135 0、429.213 1、399.269 3、369.387 2	5.07
7	7.97	槲皮素 3- <i>O</i> -芸香糖苷 Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	[M-H] ⁻	771.198 9	771.198 4	-0.7	771.198 4、609.958 5、463.012 1、301.010 6、178.984 2	0.02
8	8.7	异夏佛塔苷 Isoschaftoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.140 0	-1.1	563.140 0、473.202 3、443.093 3、383.066 7、353.088 1	37.51

9	8.86	芹菜素-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -木糖苷 Apigenin-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucoside-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -xyloside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.140 0	-1.1	545.187 0、473.202 4、443.622 1、413.002 8、383.014 1、 352.977 3	0.82
10	8.88	异牡荆素-2''- <i>O</i> -木糖苷 Isovitexin 2''- <i>O</i> - β - xyloside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.140 0	-1.1	563.140 0、473.202 5、413.003 1、383.133 7、312.066 6、 311.113 1	0.51
11	9.13	夏佛塔苷 Schaftoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.139 9	-1.3	563.140 0、503.213 5、473.239 6、383.013 2、353.087 5	100.00
12	9.35	芹菜素-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -木糖苷-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷 Apigenin-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -xyloside-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.140 1	-0.9	545.259 6、514.970 0、504.217 5、473.134 3、443.192 1、 353.087 2	0.53
13	9.39	新夏佛塔苷 Neoschaftoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.140 1	-0.9	473.238 7、444.145 5、413.961 2、383.983 2、353.087 4、 311.103 1	0.24
14	9.7	牡荆素葡萄糖苷 4'- <i>O</i> -Glucosylvitexin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.151 2	593.150 5	-1.2	473.095 8、311.103 8、293.087 6	37.81
15	9.76	芹菜素-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖-(1→2)- β - <i>D</i> -葡萄糖苷 Apigenin-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucoside-(1→2)- β - <i>D</i> - glucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.151 2	593.150 4	-1.3	473.237 7、413.961 3、341.973 2、293.087 6	37.81
16	9.79	维采宁 2 Vicenin-2	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.140 1	-0.9	534.133 0、503.248 8、473.105 4、456.930 7、413.002 5、 383.013 2	32.27
17	10.02	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 Astragaln	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.093 3	447.092 7	-1.3	284.990 1、255.593 0、227.200 7、151.038 5	9.25

18	10.19	牡荆素 Vitexin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	433.112 9	433.113 4	1.1	433.113 4、415.102 9、397.092	1.34
19	10.25	芹菜素-6,8-二-C-β-D-葡萄糖苷 Apigenin 6,8-di-C-β-D-glucoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	623.161 8	623.160 5	-2.0	8、367.080 7、313.070 2、283.060 2 575.140 9、533.129 6、503.176	0.08
20	11.42	芹菜素 Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.060 1	271.060 3	0.7	3、473.101 9、413.961 5、383.013 7、352.945 2	0.03
21	11.63	异槲皮苷 Isoquercetin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.088 2	463.087 8	-0.9	271.060 3、225.076 2、153.054 9、119.019 3	39.93
22	11.63	芦丁 Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.146 1	609.145 3	-1.3	463.087 8、301.031 0、300.025	1.99
23	11.78	紫罗兰素 Violanthin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	577.156 3	577.155 4	-1.5	4、271.020 6、243.966 7、227.128 3	61.13
24	11.93	芹菜素-6-C-β-D-吡喃木糖基-8-C-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 Apigenin-6-C-β-D-xylopyranosyl-8-C-α-L-arabinopyranoside	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	533.130 1	533.129 5	-1.1	463.087 8、343.212 2、301.031 0、300.025 4、271.020 6、179.070 2	54.38
25	12	槲皮素-7-O-芸香糖苷 Quercetin-7-O-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.146 1	609.145 3	-1.3	533.129 6、503.249 2、457.986	2.03
26	12.01	木犀草素-6-C-β-D-葡萄糖苷-8-C-β-D-半乳糖苷 Luteolin-6-C-β-D-glucoside-8-C-β-D-galactoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.146 1	609.145 0	-1.8	3、383.014 2、353.588 2、191.106 4	2.03

27	12.26	芹菜素-6- <i>C-α-L</i> -阿拉伯糖-8- <i>C-β-D</i> -木糖苷 Apigenin-6- <i>C-α-L</i> -arabinopyranosyl-8- <i>C-β-D</i> -xyloside	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	533.130 1	533.129 5	-1.1	473.238 1、443.192 9、383.014 2、353.589 0	24.23
28	12.82	维采宁 3 Vicenin-3	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 6	563.140 1	-0.9	563.140 1、473.108 6、443.076 7、383.546 1、353.123 8	19.38
29	13.47	芹菜素-6,8-二- <i>C-α-L</i> -吡喃苷 Apigenin-6,8-di- <i>C-α-L</i> -pyranosin	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	533.130 1	533.129 3	-1.4	516.084 2、473.238 2、443.191 3	23.07
30	20.62	异牡荆苷 Isovitexin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.098 4	431.098 0	-0.9	431.098 0、387.025 9、341.973 2、311.945 6、283.264 6	0.31
31	22.03	大豆黄素 Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	253.050 6	253.050 4	-0.9	253.050 4、224.022 4	0.02
32	32.16	柚皮素 Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.061 2	271.060 9	-1.1	271.061 2、151.038 8、119.083 3、107.158 4	0.02
33	38.29	金雀异黄素 Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 5	269.045 4	-0.5	269.212 5、254.131 3、225.023 6、151.038 7、107.168 9	0.02

注：相对含量以各化合物的响应值与夏佛塔苷响应值比值×100。

Note: Relative content was calculated as the ratio of the response value of each compound to the response value of schaftoside ×100.

3 讨论与结论

霍山石斛叶是石斛生产中的副产物,资源丰富,虽然多糖含量不及茎,但含有丰富的黄酮类物质^[5]。因石斛叶含有大量的叶绿素,会干扰紫外分光光度法对提取液中总黄酮的测定,因此本研究采用液相色谱测定提取液中夏佛塔苷含量的方式,评价霍山石斛叶黄酮提取及纯化效果。采用最佳提取工艺,提取得到的夏佛塔苷得率为 0.348 2%,显著高于杨丽娥等从多批次霍山石斛茎提取所得 0.012 2~0.086 6 mg/g 夏佛塔苷含量^[6]。该结果再次证实,霍山石斛叶中夏佛塔苷含量要显著高于茎。经 AB-8 大孔树脂纯化后,夏佛塔苷回收率为 90%,显著高于娄晓晶等研究结果^[3],表明该纯化工序纯化效率更高,更适用于石斛叶黄酮的纯化。

霍山石斛叶经提取及纯化后,采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 分析鉴别出黄酮类物质 33 个。与已有报道的石斛属相关植物的化学成分进行比对^[7-10],发现槲皮素-3-*O*-槐糖苷、5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、牡荆素葡萄糖苷、槲皮素 3-*O*-芸香糖苷、木犀草素-6-*C*- β -*D*-葡萄糖苷-8-*C*- β -*D*-半乳糖苷、维采宁 1、维采宁 2、异牡荆素-2"-*O*-木糖苷、维采宁 3、木犀草素-6-*C*- β -*D*-木糖苷-8-*C*- β -*D*-葡萄糖苷、芹菜素-6-*C*- α -*L*-阿拉伯糖-8-*C*- β -*D*-木糖苷、芹菜素-6-*C*- β -*D*-吡喃木糖基-8-*C*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、芹菜素-8-*C*- β -*D*-葡萄糖-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-葡萄糖苷、木犀草素-6-*C*- β -*D*-葡萄糖苷-8-*C*- β -*D*-木糖苷、芹菜素-8-*O*-葡萄糖甙、紫罗兰素、槲皮素-7-*O*-芸香糖苷、4',5,7-三羟基黄酮、槲皮素 3- β -*D*-葡萄糖苷、异牡荆苷、大豆黄素、4',5,7-三羟基异黄酮等 24 个化合物已被报道存在于其他石斛品种中^[11-16],但这是首次被证实存在于霍山石斛叶中。通过相对定量分析,本研究首次发现夏佛塔苷、紫罗兰素、芹菜素-6-*C*- β -*D*-吡喃木糖基-8-*C*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷和山柰酚-3-*O*-芸香糖苷是霍山石斛叶黄酮的主要成分,而周桂芬等研究表明铁皮石斛叶黄酮主要以芹菜素-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、异夏佛塔苷、夏佛塔苷、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*-木糖苷为主^[17],两者主要黄酮类成分有显著差异。该结果表明霍山石斛叶可能有区别于铁皮石斛叶的潜在健康功效及药理作用。本研究为进一步开发霍山石斛叶资源提供了基础,同时也有助于提升霍山石斛产业链的价值与效益。

参考文献

- 1 Wang HN,Fan J,Yu KZ,et al.Progress on structural analysis and bioactivity of polysaccharides of *Dendrobium huoshanense* and analysis of differences in polysaccharide composition between different species[J].Chin

- Tradit Herb Drugs(中草药),2023,54:5044-5056.
- 2 Zhao YL.Isolation and purification,structural characterization and anti-aging activity of polysaccharides from *Dendrobium officinale*[D].Beijing:Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学),2022.
 - 3 Lou XJ,Li B,Lu TT,et al.Purification of total flavones from *Dendrobium officinale* leaves by macroporous resins[J].Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学),2019,36:1338-1342.
 - 4 Guo CY,Hu JR,Li P,et al.Optimization of the extraction and purification process of flavonoids from *Athyrium sinense* Rupr. and its composition analysis[J].Chin Tradit Pat Med(中成药),2023,45:3018-3022.
 - 5 Tan LC,Li Z,Yang JY,et al.Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium*[J].Shandong Chem Ind(山东化工),2023,52:74-76.
 - 6 Yang LE,Ye JH,Zhou CJ,et al.Determination of contents of schaftoside and isoschaftoside in *Dendrobium huoshanense* by HPLC[J].J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报),2019,36:1431-1437.
 - 7 Sun FT,Xu ZL,Zhu ZY,et al.Determination of flavonoids in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and study on its bioavailability[J].J Zhejiang Agric Univ(浙江农业学报),2023,35:2710-2719.
 - 8 Zhou HJ,Zhou LX,B L,et al.Anti-cyclooxygenase,anti-glycation,and anti-skin aging effect of *Dendrobium officinale* flowers' aqueous extract and its phytochemical validation in aging[J].Front Immunol,2023,14:1095848.
 - 9 Sui MH,Feng SM,Liu GD,et al.Deep eutectic solvent on extraction of flavonoid glycosides from *Dendrobium officinale* and rapid identification with UPLC-triple-TOF/MS[J].Food Chem,2023,401:134054.
 - 10 Yang XL,Pu TZ,Li YH,et al.Content comparison and components analysis of total flavonoids in different parts of *Dendrobium huoshanense*[J].Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理),2023,34:1426-1434.
 - 11 Lu AJ,Jiang Y,Wu J,et al.Opposite trends of glycosides and alkaloids in *Dendrobium nobile* of different age based on UPLC-Q/TOF-MS combined with multivariate statistical analyses[J].Phytochem Anal,2022,33:619-634.
 - 12 Li JM,Xie HQ,Yao L,et al.Chemical components of different polar extracts of *Dendrobium officinale* water extract:an analysis based on ultra-performance liquid chromatography-linear ion trap quadrupole-orbitrap-mass spectrometry[J].J Anhui Univ Chin Med(安徽中医药大学学报),2024,43:92-99.
 - 13 Wan JQ,Gong XH,Wang FX,et al.Comparative analysis of chemical constituents by HPLC-ESI-MS(n) and antioxidant activities of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium officinale*[J].Biomed Chromatogr,2022,36:e5250.

- 14 Hu L,Zhou CJ,Huang YC,et al.HPLC coupled with electrospray ionization multistage MS/MS and TLC analysis of flavones-C-glycosides and bibenzyl of *Dendrobium hercoglossum*[J].J Sep Sci,2020,43:3885-3901.
- 15 Meng YJ,Wang YW,Zhang L,et al.Identification of bibenzyls and evaluation of imitative wild planting techniques in *Dendrobium officinale* by HPLC-ESI-MS(n)[J].J Mass Spectrom,2023,58:e4903.
- 16 Li YR,Huang GD,Li JY,et al.Evaluation of flavonoid composition differences in *Dendrobium officinale* of different growth years based on HPLC-ESI-MSⁿ and fingerprint analysis[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技):2024,45:239-249.
- 17 Zhou GF,Lv GY.Study on HPLC fingerprints of flavone C-glycosides in *Dendrobium officinale* leaves and determination of index component[J].Chin Pharm J(中国药学杂志),2012,47:889-893.

收稿日期: 2024-07-04 接受日期:

基金项目: 2021 安徽省卫生健康委科研项目 (AHWJ2021a018); 安徽省中医药学会中医药科研项目 (2024ZYXXH175); 2022 年度高等学校省级质量工程项目 (2022kcsz149); 安徽省高校自然科学基金重点项目 (2024AH050851)

*通信作者 Tel:0551-62822042; E-mail: liuzenghuilove@sina.com, 2024700007@ahmu.edu.cn