

霍山石斛与美花石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱比较

黄月纯¹, 叶家宏², 戴亚峰³, 任 晋², 顺庆生⁴, 魏 刚² (1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 3. 九仙尊霍山石斛股份有限公司, 安徽 六安 237003; 4. 上海健康职业技术学院, 上海 200237)

摘要: **目的** 研究比较霍山石斛与美花石斛多糖柱前衍生高效液相色谱(HPLC)特征图谱的差异。**方法** 以盐酸水解石斛多糖, 水解产物加入 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)进行衍生化, 采用 HPLC 法分析单糖的衍生物。色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 的乙酸铵溶液(冰乙酸调 pH=6.7), 梯度洗脱; 检测波长为 250 nm; 柱温为 30 ℃; 流速为 1 mL·min⁻¹。采用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)生成对照图谱。**结果** 10 批霍山石斛多糖柱前衍生特征图谱标示出 6 个特征峰, 主要由 D-甘露糖(71.8%)与 D-葡萄糖(27.2%)组成, D-甘露糖与 D-葡萄糖峰面积比值为 2.05~3.71, 此外含微量的 D-半乳糖醛酸、D-半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖。10 批美花石斛多糖柱前衍生特征图谱亦标示出 6 个特征峰, 主要为 D-甘露糖(42.9%)与 D-葡萄糖(54.0%)组成, D-甘露糖与 D-葡萄糖峰面积比值为 0.67~0.98, 此外含微量的 D-半乳糖醛酸、D-半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖。与对照图谱比较, 10 批霍山石斛、美花石斛的相似度分别为 0.994~1.000, 0.934~1.000, 霍山石斛与美花石斛共有模式之间的相似度为 0.871。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好; 两种石斛多糖构成差异较大, 不宜混用。**关键词:** 霍山石斛; 美花石斛; 多糖; 柱前衍生化; 特征图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)06-0725-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.019

Comparative Study on Pre-column Derivation HPLC Characteristic Spectrum of Polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium loddigesii*

HUANG Yuechun¹, YE Jiahong², DAI Yafeng³, REN Jin², SHUN Qingsheng⁴, WEI Gang² (1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 3. Jiuxianzun *Dendrobium huoshanense* Biotechnology Co., Ltd., Liu'an 237003 Anhui, China; 4. Shanghai Vocational-Technical Institute of Health Sciences, Shanghai 200237, China)

Abstract: **Objective** To compare the differences of pre-column derivation HPLC characteristic spectrum of the polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium loddigesii*. **Methods** *Dendrobium* polysaccharide samples were hydrolyzed with hydrochloric acid and derivated by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). HPLC was performed on Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution (pH=6.7) (gradient elution) was employed as a mobile phase, the detection was carried out at 250 nm with flow rate being of 1 mL·min⁻¹ at column temperature 30 ℃. The common mode was generated by the State Pharmacopoeia Commission specific chromatogram similarity evaluation system software (2004A version). **Results** Six common peaks were separated from 10 batches of *Dendrobium huoshanense*, mainly composed of D-mannose (71.8%) and D-glucose (27.2%). The ratio of peak area of D-mannose to that of D-glucose was 2.05~3.71. The common peaks

收稿日期: 2014-06-15

作者简介: 黄月纯, 女, 主任中药师, 硕士生导师, 研究方向: 中药质量标准研究与指纹图谱分析。Email: huangyuechun@163.com。通讯作者: 魏刚, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药新药研究与指纹图谱分析。Email: weigang021@163.com。

基金项目: 广东省产业技术研究与开发专项资金(2013B060400022)。

also contained traces of galacturonic acid, D-galactose, D-xylose and D-arabia sugar. Six common peaks were separated from 10 batches of *Dendrobium loddigesii*, mainly composed of D-mannose (42.9 %) and D-glucose (54.0 %). The ratio of peak area of D-mannose to that of D-glucose was 0.67~0.98. The common peaks also contained traces of D-galacturonic acid, D-galactose, D-xylose and D-arabia sugar. The similarities of 10 batches of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium loddigesii* were 0.994~1.000, 0.934~1.000 respectively, and the similarity of the mutual modes between *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium loddigesii* was 0.871. **Conclusion** The components of the two kinds of *Dendrobium* polysaccharide are quite different and can not be confused. The established method is accurate and reproducible, which will provide reference for the quality control of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium loddigesii*.

Keywords: *Dendrobium huoshanense*; *Dendrobium loddigesii*; Polysaccharide; Pre-column derivatives; Characteristic spectrum; HPLC

霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang et S. J.Cheng 为兰科石斛属多年生草本植物, 是我国本草中记载的有确切名称、产地来源、植物形态等描述的石斛属植物之一^[1]。药用石斛种类虽多, 但霍山石斛局限分布于安徽省霍山县及邻近地区, 以其味甘、黏质厚的上乘品质成为石斛中的极品, 备受历代医家推崇^[2], 但目前尚未列入《中国药典》。由于霍山石斛独特的生长环境要求, 以及历代的采挖和近代生态环境的改变, 其野生资源日趋稀少, 濒临灭绝^[3], 导致市场上充斥各种假冒伪劣“霍石斛”、“霍斗”、“金霍斛”, 因此研究一种鉴别真伪的技术非常必要。美花石斛 *Dendrobium loddigesii* Rolfe 又名环钗石斛, 曾收载于 2000 年版《中国药典》, 主要分布于两广地区, 其茎纤细而下垂, 自然生成或盆栽时茎常呈半圆形弯曲匍状。因其生物形态与霍山石斛相似, 市场上常加工冒充成霍山石斛^[1,4], 目前尚未见能有效鉴别两者的研究报道。多糖是霍山石斛中主要的活性成分之一, 研究发现霍山石斛多糖具有抗氧化^[5]、抗肿瘤^[6]、抗白内障^[5]、降血糖^[7]、免疫调节^[8]等多种药理作用。因此, 本课题在确保霍山石斛来源正品的基础上, 对两种石斛多糖的鉴别进行了研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 HP1200 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; MS204S 型电子天平, 新西兰 Mettler Toledo 公司; HWS24 型电热恒温水浴锅, 上海一恒科技有限公司; DHG-9245A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科技有限公司; TDZ4-WS 离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司; TYXH-1 漩涡混合器, 上海乔跃电子有限公司。

1.2 试剂 D- 葡萄糖(批号: 110833-201205, 含量 $\geq 99\%$)、D- 甘露糖(批号: 140651-200602, 含量 $\geq 99\%$)、D- 半乳糖(批号: 100226-201105, 含量 $\geq 99\%$), 中国药品生物制品检定院; D- 葡萄糖醛酸(批号: 121009, 含量 $\geq 99\%$), D- 半乳糖醛酸(批号: 121106, 含量 $\geq 99\%$)、D- 木糖(批号: 121026, 含量 $\geq 99\%$), D- 阿拉伯糖(批号: 121103, 含量 $\geq 99\%$), 上海融禾医药科技有限公司; 1- 苯基-3- 甲基-5- 吡啶酮(PMP)(批号: A1216009), 阿拉丁试剂上海有限公司; 乙腈, 色谱纯, 德国 Merk 公司; 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯。

10 批霍山石斛(编号 HS-1 至 HS-10)由九仙尊霍山石斛股份有限公司提供, 经上海健康职业技术学院 顺庆生 教授鉴定系霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng 的新鲜茎; 10 批美花石斛(编号 MH-1 至 MH-10)购自岭南花卉市场或网上店铺, 经广州中医药大学第一附属医院黄月纯主任中药师鉴定, 为美花石斛 *D. loddigesii* Rolfe 的新鲜茎。新鲜石斛均在 60 ℃烘箱中减压干燥, 备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.02 mol·L⁻¹ 的乙酸铵溶液(冰乙酸调 pH=6.7)(B), 梯度洗脱: 0~28 min, A 为 16.9 %; 28~38 min, A 为 16.9 %→19.4 %; 38~55 min, A 为 19.4 %; 检测波长为 250 nm; 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃; 进样量为 5 μL。

2.2 对照品溶液制备 分别取 D- 甘露糖、D- 葡萄

糖、D-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-半乳糖、D-木糖对照品适量，精密称定，加水制成单糖混合对照品溶液(D-阿拉伯糖、D-木糖浓度分别为 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，其他单糖浓度均为 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。精密吸取单糖混合对照品溶液 $400 \mu\text{L}$ 置 5 mL 的安瓶中，精密加入 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 $400 \mu\text{L}$ ，混匀，精密加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP $400 \mu\text{L}$ ，在 $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 100 min 。取出，放冷，精密加入 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 $450 \mu\text{L}$ ，涡旋混匀，转移至 5 mL 离心管中，涡旋混匀。加入三氯甲烷 2 mL ，涡旋混匀，离心($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min ，弃去三氯甲烷层，如此至少重复 3 次，至三氯甲烷层无颜色，水层即得对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备方法筛选

2.3.1 多糖溶液制备 取霍山石斛粉末(过 4 号筛)约 0.3 g ，精密称定，加入 80% 乙醇 50 mL ，超声处理 50 min ，取出，滤过，滤渣与滤器用 80% 乙醇洗涤 3 次，每次 10 mL ，将滤渣连同滤纸置烧瓶中，加水 200 mL ，回流提取 1 h ，取出，趁热抽滤，残渣及烧瓶用热水洗涤 4 次，每次 10 mL ，合并滤液与洗液，浓缩至约 10 mL ，放冷，离心($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 20 min ，上清液转移至 10 mL 量瓶中，加水至刻度，摇匀，转移至具塞三角瓶中，精密加入无水乙醇 40 mL (慢加快搅)，置 $5 \sim 10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 12 h ，离心($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min ，弃去上清液，沉淀加 80% 乙醇洗涤 2 次，每次 10 mL ，离心($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min ，再加无水乙醇洗涤 2 次，每次 10 mL ，离心($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min ，弃去上清液，沉淀加热水溶解，转移至 5 mL 量瓶中，放冷，加水至刻度，摇匀，即得粗多糖溶液。

2.3.2 多糖溶液盐酸水解方法 精密吸取 2.3.1 项下样品粗多糖溶液 1 mL ，置 5 mL 的安瓿中，精密加入 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 $500 \mu\text{L}$ ，封口后置 $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下水解，取出，放冷，加入 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液调 pH 值至 7.0。

2.3.3 PMP 衍生化方法 精密吸取 2.3.2 项下的粗多糖水解溶液 $400 \mu\text{L}$ ，置 5 mL 的安瓶中，精密加入 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 $400 \mu\text{L}$ ，混匀，精密加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP $400 \mu\text{L}$ ，在 $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下衍生反应^[1]。取出，放冷，精密加入 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 $500 \mu\text{L}$ ，移至 5 mL 离心管中，涡旋混匀。加入三氯甲烷 2 mL ，涡旋混匀，离心($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min ，弃去三氯甲烷层，如此至少重复 3 次，至三氯甲烷层

无颜色，水层即得供试品溶液。

2.3.4 多糖溶液的盐酸水解时间的筛选 按 2.3.2 项下方法试验，水解时间分别考察 30, 45, 60, 75, 90 min，所得粗多糖水解溶液按 2.3.3 项下方法试验，衍生时间为 100 min 。精密吸取所得供试品溶液各 $5 \mu\text{L}$ ，按 2.1 项下色谱条件进样分析。以供试品溶液所得 HPLC 图谱主要共有特征峰的峰面积和作为衡量指标，不同水解时间试验结果见图 1。由图 1 可见随着多糖趋于完全水解，当水解时间超过 45 min，曲线呈下降趋势，确定 45 min 为最佳水解时间。

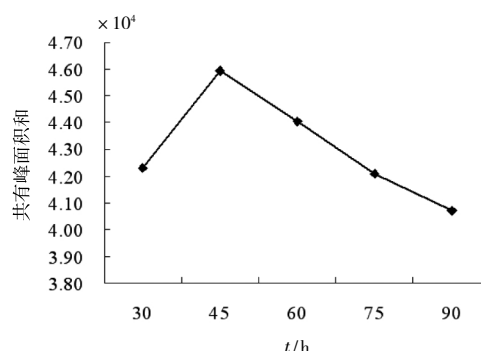


图 1 不同水解时间对霍山石斛多糖 PMP-HPLC 特征图谱共有峰面积和的变化趋势图

Figure 1 Change trend of different hydrolysis time to a total of common peak areas of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide pre-column derivatization HPLC characteristic spectrum

2.3.5 PMP 衍生时间筛选 按 2.3.2 项下方法试验，取水解时间为 60 min 所得的粗多糖水解溶液按 2.3.3 项下方法试验，衍生时间分别考察 60, 80, 100, 120, 140 min，精密吸取所得供试品溶液各 $5 \mu\text{L}$ ，按 2.1 项下色谱条件进样分析。以供试品溶液所得 HPLC 图谱主要共有特征峰的峰面积和作为衡量指标，结果见图 2。由图 2 可见随着衍生时间的延长，主要共有特征峰的峰面积和随之升高，衍生时间为 100 min 多糖趋于反应完全，当衍生时间超过 100 min ，曲线开始下降，确定 100 min 为最佳水解时间。

2.3.6 供试品溶液制备方法 精密吸取 2.3.1 项下霍山石斛样品粗多糖溶液 1 mL ，置 5 mL 的安瓿中，精密加入 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 $500 \mu\text{L}$ ，封口后置 $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下水解 45 min ，取出，放冷，加入 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液调 pH 值至 7.0，即得粗多糖水解溶液。精密吸取粗多糖水解溶液 $400 \mu\text{L}$ ，置 5 mL 的安瓶中，精密加入 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 $400 \mu\text{L}$ ，混匀，精密加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP $400 \mu\text{L}$ ，在 $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下衍生反应 100 min 。取出，放冷，精密加入

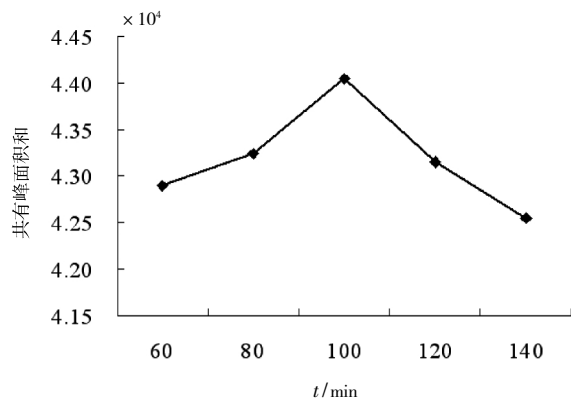


图 2 不同衍生时间对霍山石斛多糖 PMP-HPLC 特征图谱共有峰面积和的变化趋势图
Figure 2 Change trend of different derivation time to a total of common peak areas of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide pre-column derivation HPLC characteristic spectrum

0.3 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液 500 μL, 移至 5 mL 离心管中, 涡旋混匀。加入三氯甲烷 2 mL, 涡旋混匀, 离心 (3500 r·min⁻¹) 10 min, 弃去三氯甲烷层, 如此至少重复 3 次, 至三氯甲烷层无颜色, 水层即得霍山石斛供试品溶液。按霍山石斛供试品溶液制备方法对美花石斛进行同样筛选, 结果表明可采用霍山石斛相同方法制备。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取霍山石斛供试品溶液 5 μL, 连续进样 6 次, 结果所测的指纹图谱与所得的共有模式的相似度均大于 0.99, 表明精密度良好, 符合指纹图谱研究要求。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取霍山石斛供试品溶液 5 μL, 分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样, 结果所测的指纹图谱与所得的共有模式的相似度均大于 0.99, 表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好, 符合指纹图谱研究要求。

2.4.3 重复性试验 取同一批霍山石斛样品, 依法制备 6 份供试品溶液并进样分析, 结果所测的指纹图谱

表 1 霍山石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱分析

Table 1 Pre-column derivation HPLC characteristic spectrum of polysaccharide of *Dendrobium huoshanense*

峰号	相对保留时间	相对峰面积										成分	
	$(\bar{x} \pm s)$	HS-1	HS-2	HS-3	HS-4	HS-5	HS-6	HS-7	HS-8	HS-9	HS-10		$\bar{x} \pm s$
1	0.440 ± 0.0015	3.615	3.705	2.168	2.690	2.448	2.049	2.437	2.579	2.218	3.326	2.724 ± 0.6074	D- 甘露糖
2	0.872 ± 0.0039	0.0061	0.0040	0.0036	0.0092	0.0041	0.0021	0.0017	0.0038	0.0032	0.0089	0.0047 ± 0.0026	D- 半乳糖醛酸
3(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	D- 葡萄糖
4	1.088 ± 0.0073	0.030	0.021	0.013	0.018	0.012	0.0069	0.010	0.014	0.011	0.030	0.017 ± 0.0080	D- 半乳糖
5	1.127 ± 0.0070	0.011	0.0068	0.0062	0.0069	0.0067	0.0042	0.0049	0.0074	0.0060	0.011	0.0071 ± 0.0023	D- 木糖
6	1.146 ± 0.0084	0.018	0.012	0.0087	0.011	0.0095	0.0050	0.0053	0.0079	0.0063	0.018	0.010 ± 0.0047	D- 阿拉伯糖

与所得的共有模式的相似度均大于 0.99, 表明重复性良好, 符合指纹图谱研究要求。

2.5 特征图谱建立与分析

2.5.1 混合单糖对照品分析 精密吸取 2.2 项下混合单糖对照品溶液 5 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样分析得到色谱图, 见图 3。

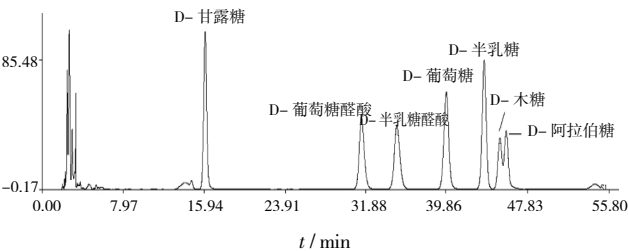


图 3 7 种单糖对照品柱前衍生 HPLC 图谱
Figure 3 Pre-column derivation HPLC spectrum of 7 kinds of monosaccharide reference substances

2.5.2 共有峰的确定及参照峰的选择 按 2.3.6 项下方法制备 10 批霍山石斛样品及 10 批美花石斛样品的供试品溶液, 按 2.1 项的色谱条件进样分析, 结果霍山石斛和美花石斛均标示出 6 个共有峰。经对照品保留时间定位及色谱峰紫外光谱分析, 鉴别了 6 个共有峰 (D- 甘露糖、D- 半乳糖醛酸、D- 葡萄糖、D- 半乳糖、D- 木糖、D- 阿拉伯糖), 选择峰 3 (D- 葡萄糖) 为参照峰 (S), 分别计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积, 结果见表 1 及表 2。

2.5.3 相似度分析 采用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), 以均值法生成特征图谱共有模式, 10 批霍山石斛及 10 批美花石斛样品重叠图及共有模式图谱见图 4 ~ 图 7。分别以霍山石斛共有模式、美花石斛共有模式为对照分析各批次样品相似度, 结果见表 3。

3 讨论

本试验对霍山石斛、美花石斛多糖进行盐酸酸水

表 2 美花石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱分析

Table 2 Pre-column derivation HPLC characteristic spectrum of polysaccharide of *Dendrobium loddigesii*

峰号	相对保留时间 /min ($\bar{x} \pm s$)	相对峰面积										$\bar{x} \pm s$	成分
		MH-1	MH-2	MH-3	MH-4	MH-5	MH-6	MH-7	MH-8	MH-9	MH-10		
1	0.435 ± 0.0048	0.718	0.709	0.819	0.753	0.679	0.982	0.673	0.952	0.926	0.816	0.803 ± 0.1158	D- 甘露糖
2	0.828 ± 0.0071	0.0077	0.0011	0.0029	0.0024	0.0072	0.0018	0.0015	0.014	0.066	0.0031	0.011 ± 0.0199	D- 半乳糖醛酸
3(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	D- 葡萄糖
4	1.097 ± 0.0033	0.0093	0.0094	0.019	0.017	0.042	0.011	0.011	0.015	0.058	0.019	0.021 ± 0.0161	D- 半乳糖
5	1.137 ± 0.0044	0.0053	0.0073	0.010	0.0055	0.031	0.0047	0.0046	0.0088	0.033	0.010	0.012 ± 0.0108	D- 木糖
6	1.155 ± 0.0044	0.0054	0.0090	0.011	0.0080	0.032	0.0068	0.0058	0.0098	0.043	0.011	0.014 ± 0.0128	D- 阿拉伯糖

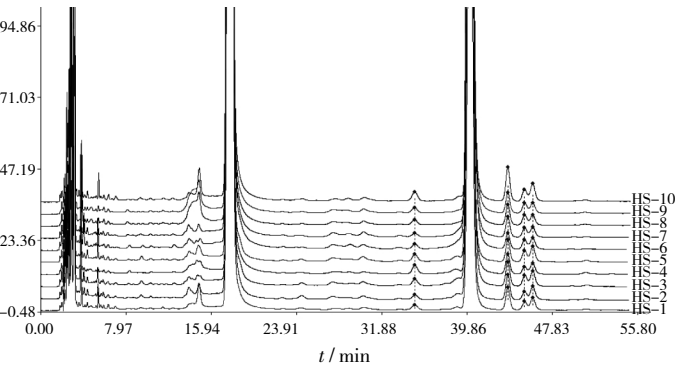


图 4 10 批霍山石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱重叠图

Figure 4 Pre-column derivation HPLC characteristic spectrum overlapping of 10 batches of polysaccharide of *Dendrobium huoshanense*

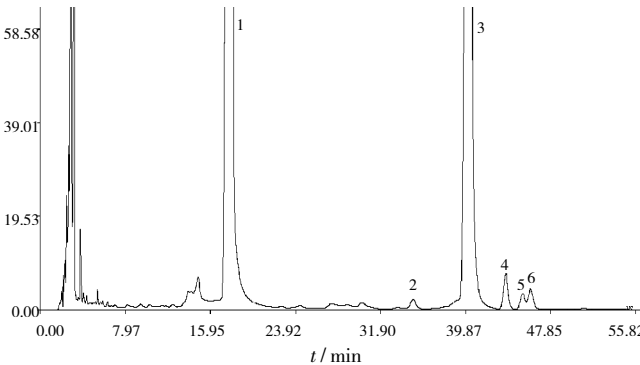


图 5 霍山石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱共有模式

Figure 5 Common pattern of polysaccharide pre-column derivation HPLC characteristic spectrum of *Dendrobium huoshanense*

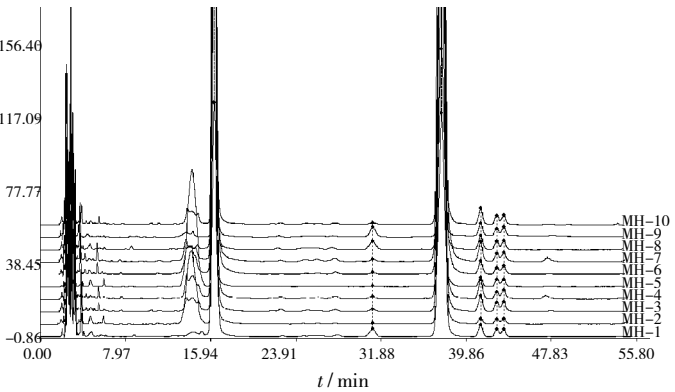


图 6 10 批美花石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱重叠图

Figure 6 Pre-column derivation HPLC characteristic spectrum overlapping of 10 batches of polysaccharide of *Dendrobium loddigesii*

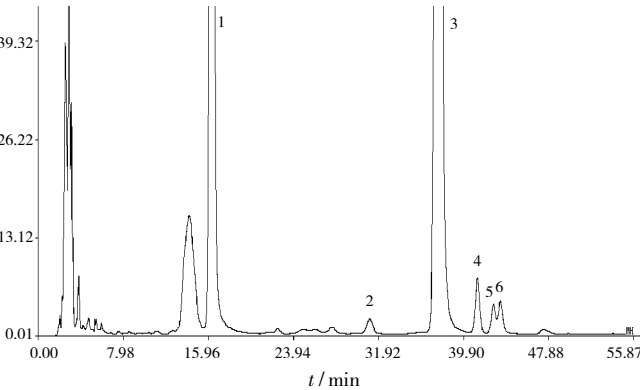


图 7 美花石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱共有模式

Figure 7 Common pattern of polysaccharide pre-column derivation HPLC characteristic spectrum of polysaccharide of *Dendrobium loddigesii*

解时间、PMP 衍生时间范围进行考察，以共有特征峰的峰面积和作为评价指标，确定了较优的水解和衍生条件：水解时间 45 min 和衍生时间 100 min。

研究分析 10 批霍山石斛及 10 批美花石斛样品，分别建立了其多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱，均标示及鉴定出 6 个特征峰(D- 甘露糖、D- 半乳糖醛酸、D- 葡萄糖、D- 半乳糖、D- 木糖、D- 阿拉伯糖)；以均值法生成的共有模式为对照，10 批霍山石斛、

美花石斛的相似度分别为 0.994 ~ 1.000，0.934 ~ 1.000，同种石斛相似度均较高。以美花石斛共有模式为对照，10 批霍山石斛的相似度为 0.811~0.907，以霍山石斛共有模式为对照，美花石斛的相似度为 0.825~0.914，霍山石斛与美花石斛共有模式之间的相似度为 0.871，表明这两种石斛多糖特征图谱之间具有相对较大的差异。

比较了 10 批霍山石斛与 10 批美花石斛多糖中甘

表 3 霍山石斛与美花石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱相似度

Table 3 Pre-column derivation HPLC characteristic spectrum of polysaccharide of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium loddigesii*

霍山石斛编号	霍山石斛相似度		美花石斛编号	美花石斛相似度	
	霍山石斛模	美花石斛模		美花石斛模	霍山石斛模
	式为对照	式为对照		式为对照	式为对照
HS-1	0.994	0.815	MH-1	0.998	0.840
HS-2	0.994	0.811	MH-2	0.999	0.837
HS-3	0.998	0.898	MH-3	0.998	0.873
HS-4	1.000	0.862	MH-4	1.000	0.852
HS-5	1.000	0.877	MH-5	0.996	0.825
HS-6	0.997	0.907	MH-6	0.996	0.914
HS-7	1.000	0.878	MH-7	0.996	0.824
HS-8	0.999	0.894	MH-8	0.997	0.907
HS-9	0.999	0.894	MH-9	0.934	0.901
HS-10	0.997	0.828	MH-10	1.000	0.872
霍山石斛模式	1.000	0.871	美花石斛模式	1.000	0.871

露糖与葡萄糖峰面积的比值，结果霍山石斛甘露糖与葡萄糖峰面积比值均大于 2.0(2.05 ~ 3.71)，而美花石斛甘露糖与葡萄糖峰面积比值均小于 1.0(0.67 ~ 0.98)，与霍山石斛比较差异明显，因此采用多糖特征图谱相似度分析以及甘露糖与葡萄糖的峰面积比值来鉴别霍山石斛与美花石斛，具有一定意义。

参考文献：

[1] 包雪声，顺庆生，王新生，等. 霍山石斛[M]. 上海：上海交通大学出版社，2012：1-3，39-41.

[2] 包雪声，顺庆生，陈立钻. 中国药用石斛[M]. 上海：复旦大学出版社，2001：75.

[3] 刘守金，武祖发，梁益敏，等. 霍山石斛的资源及生物学特性[J]. 中药材，2001，24(10)：709-710.

[4] 冯耀南，刘明，刘俭，等. 中药材商品规格质量鉴别[M]. 广州：暨南大学出版社，1995：193-196.

[5] 李秀芳，邓媛元，潘利华，等. 霍山石斛多糖对糖尿病性白内障大鼠眼球晶状体组织抗氧化作用的研究[J]. 中成药，2012，34(3)：418-421.

[6] 黄森. 霍山石斛多糖提取分离以及抗肿瘤活性的研究[D]. 合肥：合肥工业大学，2007.

[7] 李秀芳. 霍山石斛和四种药典石斛多糖降血糖活性比较研究[D]. 合肥：合肥工业大学，2012.

[8] 陈程，吴胡琦，查学强，等. 霍山石斛组织快繁中不同发育阶段多糖理化性质和免疫活性的比较研究[J]. 中药材，2012，35(8)：1195-1199.

[9] 冯宝军. 霍山石斛多糖的分离纯化及结构鉴定[D]. 合肥：合肥工业大学，2010.

[10] 刘明珍，陈乃富，刘秀珍，等. 道地药材霍山石斛及其相似种的分子鉴定[J]. 生物学杂志，2009，26(5)：34-36.

[11] 周桂芬，庞敏霞，陈素红，等. 铁皮石斛茎、叶多糖含量及多糖部位柱前衍生化高效液相色谱指纹图谱比较研究[J]. 中国中药杂志，2014，39(5)：795-802.

(编辑：邓响潮)

UPLC 法同时测定止痒洗剂中盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素的含量

周芙琼^{1,2}，夏崇才¹，隆红艳^{2,3}，高运军¹（1. 南京市中医院中医药研究所，江苏 南京 210001；2. 南京市中医院中心实验室，江苏 南京 210001）

摘要：目的 采用超高效液相色谱(UPLC)方法，同时测定止痒洗剂中盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素的含量。方法 采用 Aglient ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1×50 mm, 1.8 μm)，流动相为甲醇-0.1 %磷酸水溶液，进行梯度洗脱，流速为 0.4 mL·min⁻¹，检测波长为 240 nm，柱温为 30 ℃。结果 盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素分别在 0.0346 ~ 0.4152 μg, 0.3190 ~ 3.8280 μg, 0.0250 ~ 0.3000 μg 范围内呈良好的线性关系；平均回收率分别为 96.44 %，95.62 %和 96.48 %。结论 该方法简便、准确、重复性好，可为制定止痒洗剂质量标准及产品质量控制提供依据。

关键词：止痒洗剂；盐酸小檗碱；芍药苷；大黄素；超高效液相色谱法
中图分类号：R284.1 文献标志码：A 文章编号：1003-9783(2014)06-0730-04

收稿日期：2014-07-31
作者简介：周芙琼，女，中药师，研究方向：中药制剂及质量标准研究。Email: qiong860612@163.com。通讯作者：隆红艳，副主任中医师，研究方向：小儿神经及精神系统疾病、脾胃系统疾病的临床及实验研究。Email: hongyan3128@163.com。
基金项目：南京市医学科技发展项目(ZKX13048)。