

# 不同产地铁皮石斛的品质比较研究

龚庆芳, 周 浩, 王新桂, 何金祥, 付传明, 郭伦发

(广西壮族自治区 中国科学院 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

**摘 要:**为了筛选铁皮石斛优良种质,在广西、安徽、云南、浙江收集不同产地的铁皮石斛,参照 2010 年版《中国药典》提供的方法,采用苯酚-硫酸法测定多糖含量,柱前衍生化 HPLC 法测定甘露糖含量,并使用高效液相法测定毛兰素的含量。结果表明:在 0.018~0.090 mg 范围内,葡萄糖与吸光值线性关系良好,相关系数  $r=0.9987$ ,不同产地铁皮石斛多糖含量为 25.15%~36.53%;柱前衍生化 HPLC 法测定 D-甘露糖含量专属性强、精确、重现性好,不同产地铁皮石斛甘露糖含量为 18.00%~32.35%;不同产地铁皮石斛毛兰素的含量为 0~0.0043%。不同产地的铁皮石斛多糖、甘露糖和毛兰素含量差异显著,其中采自云南、浙江的种质在多糖和甘露糖方面有优良的遗传基础,而广西种质的毛兰素含量相对较高。

**关键词:**铁皮石斛;甘露糖;多糖;毛兰素;含量

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0162-04

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimkuraet Migo) 属兰科石斛属多年生草本植物,是我国传统的名贵中药,拥有“仙草”之美誉。中医记载其具有健脾养胃、滋阴养肾、润肺生津等功效,现代药理研究证明其具有抗肿瘤、抗衰老、高血压等功效。其中铁皮石斛多糖和甘露糖是重要的活性成分,具有增强免疫力与刺激造血作用、抗氧化等功效。传统标准以“质重,嚼之粘牙,口甜,无渣者为优”,2010 年版《中国药典》,制定以多糖和甘露糖为质量标准进行品质控制<sup>[1]</sup>。毛兰素是石斛属抗肿瘤主要活性成分,具有显著诱导结肠癌细胞、肝癌、胃癌细胞和白血病细胞凋亡等作用<sup>[2-5]</sup>,故该试验采用此作为评价铁皮石斛品质的指标之一。

由于铁皮石斛对生长环境要求十分严格,造成野生资源稀缺。另一方面,市场对其需求大幅增加,人们无节制的采摘,野生资源破坏严重,铁皮石斛已成为濒危珍稀药材<sup>[6]</sup>。近年来,铁皮石斛人工种植在中国云南、广西、安徽、湖南、浙江等主产区迅速发展,现已成为林下经济发展的重要经济作物,对缓解野生铁皮石斛的市

场稀缺和大幅提高农民的收入有重要的作用。目前已有多种栽培种在全国各区域推广种植,但由于气候环境对铁皮石斛的有效成分累积产生一定的影响,不同种质对区域气候相应机制有差异,多糖、甘露糖和毛兰素的含量可能也会存在差异。目前只见对浙江产区的不同种质的铁皮石斛的多糖比较分析的报道<sup>[7-8]</sup>,而针对各产地的不同种质的铁皮石斛的多糖、甘露糖和毛兰素的含量鲜见报道。现对采集于浙江、贵州、云南、广西、安徽等地铁皮石斛的物种资源进行多糖、甘露糖和毛兰素的含量测定,以期为了筛选优良的铁皮石斛品系,为杂交育种提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料采自广西、安徽、云南、贵州等省,株龄为 3 a,由广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所刘演研究员鉴定,在广西植物研究所试验基地引种栽培 1 a 后实施试验研究,每个品系取 3 份样本。

**试剂与仪器:**D-甘露糖(D-Man)和 D-葡萄糖标准品为生化试剂;毛兰素对照品购自北京方程生物科技有限公司;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、盐酸氨基葡萄糖(HAG)、盐酸、氢氧化钠、三氯甲烷、乙酸铵、苯酚、硫酸、乙醇均为分析纯;乙腈、甲醇为色谱纯;水为娃哈哈纯净水。Agilent 高效色谱仪(美国 Agilent 公司),ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)(美国 Agilent 公司),水浴锅(江苏金坛中大仪器厂),烘箱(上海一恒仪器公司),LG-500A 型高速中药粉碎机(瑞安市百信药机器械厂),TDZ4A-WS 低速离心机(湘仪公司),

**第一作者简介:**龚庆芳(1980-),女,博士,助理研究员,研究方向为植物引种栽培及质量评价。E-mail:qingfang\_gong@126.com.

**责任作者:**何金祥(1968-),男,本科,研究员,研究方向为植物引种栽培及生物防治。E-mail:hejinxiang@gxib.cn.

**基金项目:**广西壮族自治区科技攻关资助项目(桂科攻 10100012-5);广西林业厅科研资助项目(桂林科字[2011]第 07 号;桂林科字[2012]第 21 号);桂林市科技攻关资助项目(20110107-1);广西植物研究所基本业务费资助项目(桂植业 12008)。

**收稿日期:**2012-12-10

Finnpipette 移液器(Thermo 公司), T6 紫外分光光度计(北京谱析通用仪器有限公司)。

## 1.2 试验方法

供试品溶液制备:参照文献[9],略加改动。供试样品 50℃烘箱烘干,粉碎后取供试样品粉末 0.3 g(过 40 目筛),放入滤纸筒内,置索氏提取器中,加入 80%乙醇,加热回流 6 h,取出滤纸筒,挥干乙醇,滤纸筒拆开置于烧杯中,加入 100 mL 双蒸水,沸水水浴 2 h,放冷,定容到 100 mL,过滤,用于多糖、甘露糖含量测定。

## 1.3 项目测定

多糖含量测定参照文献[1]的方法;甘露糖含量测定:校正因子测定参照文献[1],供试样品衍生化制备:取上述滤液 0.990 mL,加入 12 mg/mL 盐酸氨基葡萄糖 0.01 mL,置顶空瓶管中,加入 3.0 mol/L 的盐酸溶液 0.5 mL,封口,混匀,110℃水解 1 h 后放冷,用 0.5 mL 3.0 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 值为中性。吸取 400  $\mu$ L,参照校正因子测定方法。色谱条件:ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:0.02 mol/L 乙酸铵缓冲液-乙腈(80:20)。柱温 25℃,流速 1.0 mL/min,检测波长为 250 nm,进样量 10  $\mu$ L。

毛兰素含量测定:精密称取样品粉末(过 3 号筛) 1.0 g,加甲醇 25 mL,密塞,摇匀,超声处理 2 h。冷却后补足失重,用滤纸过滤后再用 45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,用于 HPLC 测定。色谱条件:ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:甲醇-乙腈-水(30:30:40)。柱温 25℃,流速 1.0 mL/min,检测波长为 232 nm,进样量 10  $\mu$ L。建立标准曲线:精密称取毛兰素 5.0 mg,用少量甲醇溶解,置 5.0 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,即为 1 mg/mL 的标准溶液。精密量取 0.01、0.02、0.04、0.08、0.1 mL,分别定容到 1.0 mL,用 45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,各取 10  $\mu$ L 进样,测定峰面积。

多糖含量 =  $(C \times V_{\text{总}} \times D) / (W \times V_{\text{测}} \times 10^6) \times 100\%$ , 毛兰素含量 =  $(C \times V_{\text{总}}) / (W \times V_{\text{测}} \times 10^3) \times 100\%$ , 校正因子( $f$ ) =  $(A_s/C_s) / (A_r/C_r)$ , 甘露糖含量 =  $f \times (A_c) / (A_s/C_s) \times V_{\text{总}} / (W \times V_{\text{测}} \times 10^3) \times 100\%$ , 式中,  $C$ : 在标准曲线上查出的糖含量;  $V_{\text{总}}$ : 提取液总体积;  $V_{\text{测}}$ : 测定时取用的体积;  $D$ : 稀释倍数;  $W$ : 样品重量(g);  $10^6$ : 样品重量单位由 g 换算成  $\mu$ g 的倍数;  $A_s$ : 内标峰面积;  $C_s$ : 内标浓度;  $A_r$ : 甘露糖标准品峰面积;  $C_r$ : 甘露糖标准品浓度;  $A_c$ : 供试样品峰面积。  $10^3$ : 样品重量单位由 g 换算成 mg 的倍数。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖含量的测定

2.1.1 葡萄糖的浓度与吸光度的线性关系考察 以吸光度值为纵坐标(Y),以质量为横坐标(X),绘制标准曲

线见图 1,得回归方程  $y = 9.9619x + 0.065$ ,  $r = 0.9987$ ,表明在 0.018~0.090 mg 线性关系良好。

2.1.2 重复性试验 取同一供试样品 5 份,按 1.2 制备供试品溶液,测定多糖含量,根据标准曲线计算多糖含量,其 RSD 为 2.39%,表明该方法重复性好。

2.1.3 精密度试验 取同一供试品多糖-苯酚硫酸制备液 5 份,在紫外-可见分光光度计 488 nm 的波长处测定吸光度,根据标准曲线计算多糖含量,其 RSD 为 0.12%,表明该仪器的精密度良好,适合试验要求。

2.1.4 稳定性试验 同一供试品多糖-苯酚硫酸制备液在室温放置 0、2、4、6 h 后,分别测定吸光度,根据标准曲线计算多糖含量,其 RSD 为 3.15%,表明该样品在 6 h 内显示稳定。

2.1.5 不同产地铁皮石斛多糖含量测定结果 从不同产地铁皮石斛的多糖含量测定结果显示(表 1),不同种质的铁皮石斛的多糖含量均达到 25% 以上,但存在显著差异,其中采自云南的 XI 号种源的多糖最高,其次为浙江的 II 种源,且来自浙江的 4 个种源的多糖含量都得到 30% 以上,采自贵州 IX 号的种源的含量最低。

### 2.2 甘露糖含量的测定

2.2.1 专属性试验 对含内标的甘露糖标准品、不含内标的甘露糖标准品及供试样品衍生化制备液分别进行 HPLC 测定(图 2~4)。

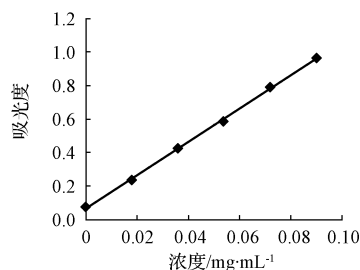


图 1 葡萄糖的标准曲线

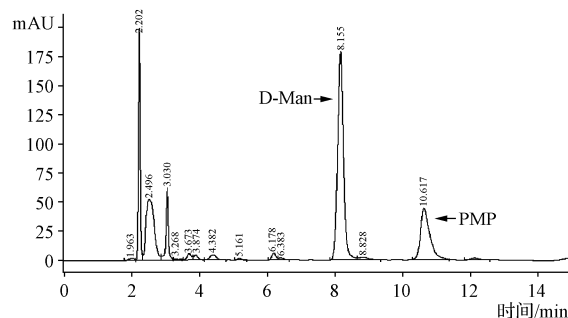


图 2 对照品(不加内标)HPLC 图

2.2.2 重复性试验 取同一供试样品,参照 1.3 方法分别制备 5 份样品,按色谱条件进行测定,根据 D-Man 的峰面积的测定结果,计算得 RSD 为 2.53%,表明该方法的重复性好。

2.2.3 精密度试验 取同一份供试样品衍生化产物,按

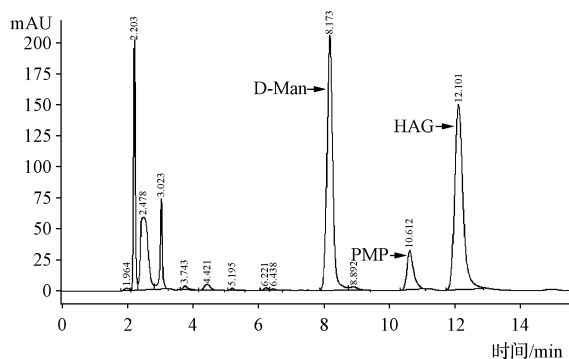


图3 对照品(加内标)HPLC图

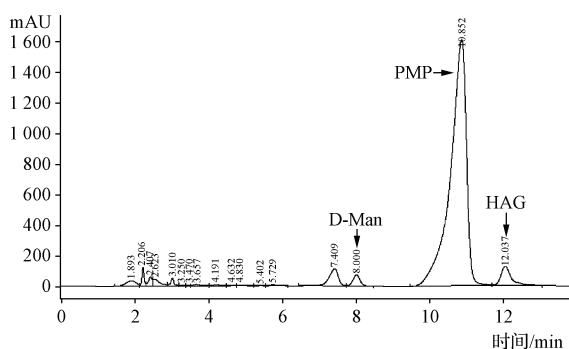


图4 供试样品 HPLC 图

1.3 色谱条件进行测定,重复5次,根据 D-Man 的峰面积的测定结果,计算得出其 RSD 为 0.62%,表明该仪器精密性良好,适于测试样品甘露糖含量。

2.2.4 不同产地铁皮石斛甘露糖含量比较分析 从不同产地铁皮石斛的甘露糖含量测定结果看出(表1),不同产地铁皮石斛甘露糖含量存在差异,其中采自云南的 XI 号种源的甘露糖含量最高,其次为来自安徽霍山的 X 种源较高,采自贵州 IX 号的种源的含量最低。来自浙江的 4 个种质,甘露糖的含量相当。

表1 铁皮石斛多糖、甘露糖、

毛兰素含量测定结果( $\bar{x}$ , n=3)

铁皮石斛种质资源样品号	原产地	采集时间/年-月	多糖含量/%	甘露糖含量/%	毛兰素含量/ $\mu\text{g}$
I	浙江武义	2012-03	30.37	25.51	—
II	浙江乐清	2012-03	36.41	26.32	—
III	浙江临安	2012-03	32.89	26.11	—
IV	浙江雁荡	2012-03	35.24	27.09	—
V	广西恭城	2012-03	27.33	20.93	0.0036
VI	广西临桂	2012-04	26.44	19.68	0.0025
VII	广西桂林	2012-04	29.87	21.07	0.0043
VIII	湖南南山	2012-04	25.99	18.09	0.0029
IX	贵州罗甸	2012-03	25.15	18.00	—
X	安徽霍山	2012-04	33.11	27.14	—
XI	云南广南	2012-03	36.53	32.35	—

### 2.3 毛兰素含量测定结果

2.3.1 色谱条件考察结果 从图 5、6 可知,毛兰素在该

试验采用的色谱条件下,标准品有较好的基线分离,测试样品中各峰之间也有较好的分离效果。

2.3.2 标准曲线的建立 以毛兰素对照品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,计算得回归方程为  $Y=33.634X+94.394$ ,  $r=0.999$ 。表明毛兰素在线性范围为 0.1~1.0  $\mu\text{g}$  内,浓度与峰面积之间呈良好的线性关系。

2.3.3 不同产地铁皮石斛中毛兰素含量比较分析 从表 1 毛兰素测定结果可知,铁皮石斛中毛兰素含量较低,其中广西桂林的含量较高,浙江等地的种质在广西引种植后,毛兰素的含量未检出。

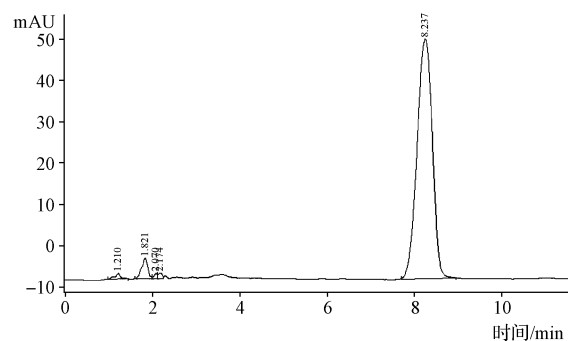


图5 毛兰素对照品的 HPLC 图

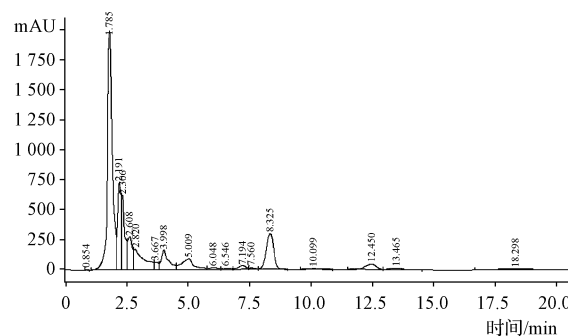


图6 样品的 HPLC 图

## 3 讨论

现代药理研究表明,铁皮石斛多糖具有抗氧化<sup>[10]</sup>、提高免疫力<sup>[11]</sup>、对由自体免疫性疾病引起的干燥综合征有显著疗效<sup>[12]</sup>等功效。D-甘露糖是一种具有重要功能的六碳单糖,通过研究表明其具有对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用和通过甘露糖受体抑制脂多糖诱导的小鼠巨噬炎症细胞等作用<sup>[13]</sup>。2010 年,国家制定了以铁皮石斛多糖和甘露糖为铁皮石斛质量控制标准,但铁皮石斛具有多种药效功能,有待进一步深入研究铁皮石斛的化学成分和药理作用,以更全面的规范铁皮石斛的质量控制。

在我国,铁皮石斛主要分布在安徽西南部、浙江东部、福建西部、广西西北部、湖南、云南东南部等地,主要生长在岩石峭壁上。该试验中,供试野生资源样品采集于云南、浙江、安徽等地,针对广西桂林的气候选育优良品系的,所以试验材料均经过在广西植物研究所试验基地引种栽培 1 a 后进行的,以消除生境对含量的影响,有利于选

育适合广西桂林气候的优良种质。研究表明,测试的 11 个样品的多糖含量 25.15%~36.53%,甘露糖的含量在 18.00%~32.35%。由此说明,这些品种的品质都能符合国家制定的铁皮石斛多糖含量在 25% 以上,甘露糖在 13%~38% 的标准<sup>[1]</sup>。不同产地的铁皮石斛的多糖和甘露糖含量存在较大的差异,其中采自云南的 XI 号种源、浙江的 II 号、IV 种源,在多糖和甘露糖方面都有优良的品性,具有优良的遗传基础。该试验测定的毛兰素含量在 0~0.0043  $\mu\text{g}$  之间,比马国祥等<sup>[14]</sup>测定云南西双版纳的铁皮石斛的毛兰素含量 0.013  $\mu\text{g}$  低。在某些种质中未检测出毛兰素,这可能是不同的种质对区域气候经过长时间的驯化已产生了相应的响应机制,这些种质在广西的气候、土质等条件下未能启动毛兰素控制基因的表达。该研究表明,毛兰素作为次生代谢产物,环境因素会影响毛兰素控制基因的表达。次生代谢产物是植物长期进化中适应环境的产物,含量受环境等因素的影响较大。目前对毛兰素的产量与环境因子和遗传因素等之间的关系的研究较少,石斛属为多年生附生草本,生境独特,对小环境要求十分严格,影响毛兰素在石斛中累积的主导因素等问题是值得进一步深入研究的方向,可为人工种植铁皮石斛的品质保证提供科学的指导依据。

该研究表明,甘露糖的含量与多糖含量之间不存在规律性,种质资源 II 的多糖含量较高,但其甘露糖含量并不是较高的,这可能由于该试验所用的检测甘露糖含量方法包括多糖所含的甘露糖和游离的甘露糖。而多糖具有结构多样性,其各组分含量受种质因素产生一定的影响,甘露糖在多糖的比例相应的有一定的变化;另一方面,游离甘露糖的累积也受种质的影响。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会,中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:265-266.
- [2] 苏鹏,王晶,安君霞,等. 毛兰素对人肝癌 Huh7 细胞的抑制作用[J]. 应用与环境生物学报,2011(5):662-665.
- [3] 崔旭琴,苏鹏,朱启晟,等. 毛兰素诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡的分子机制[J]. 应用与环境生物学报,2011(4):512-516.
- [4] 洪卫,马胜利,杜灵彬,等. 毛兰素对胃癌细胞 SGC-7901 端粒酶活性的影响[J]. 浙江实用医学,2009(3):181-182.
- [5] 李运曼,王海燕,刘国卿. 毛兰素诱导人白血病 HL-60 细胞的凋亡(英文)[J]. Acta Pharmacologica Sinica,2001(11):60-64.
- [6] 李娟,李顺祥,黄丹,等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报,2011(18):74-79.
- [7] 苑鹤,白燕冰,斯金平,等. 柱前衍生 HPLC 分析铁皮石斛多糖中单糖组成的变异规律[J]. 中国中药杂志,2011(18):2465-2470.
- [8] 周桂芬,吕圭源. 柱前衍生化 HPLC 分析不同来源、不同生长年限铁皮石斛多糖的组成和含量[J]. 中国药理学杂志,2011(8):626-629.
- [9] 杨兵勋,沈春香,王增,等. HPLC 法测定铁皮石斛饮料中 D-甘露糖的含量[J]. 食品科学,2011(8):275-277.
- [10] 鲍素华,查学强,郝杰,等. 不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2009(21):123-127.
- [11] 张红玉,戴关海,马翠,等. 铁皮石斛多糖对 S<sub>1</sub>(180)肉瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 浙江中医杂志,2009(5):380-381.
- [12] Lin X, Shaw P C, Sze Stephen C W, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharides ameliorate the abnormality of aquaporin 5, pro-inflammatory cytokines and inhibit apoptosis in the experimental Sjogren's syndrome mice [J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(12): 2025-2032.
- [13] Xu X L, Xie Q M, Shen Y H, et al. Mannose prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. Inflammation Research, 2008, 57(3): 104-110.
- [14] 马国祥,徐国钧,徐璐珊,等. 反相高效液相色谱法测定 18 种石斛类生药中 chrysotoxene, erianin 及 chrysotoxine 的含量[J]. 中国药科大学学报, 1994(2): 103-105.

## Comparative Study on Quality of *Dendrobium officinale* from Different Habits

GONG Qing-fang, ZHOU Hao, WANG Xin-gui, HE Jin-xiang, FU Chuan-ming, GUO Lun-fa

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi 541006)

**Abstract:** To screen the elite germplasm of *Dendrobium officinale*, the content of polysaccharides, D-mannose and erianin from different habits were studied in this paper. According to the methods from the Pharmacopeia of the People's Republic of China, the content of polysaccharides was determined by phenol-vitriol colorimetric, and using Pre-column derivatization-HPLC measured D-mannose content, and the content of erianin determined by HPLC. The results showed that a good correlation ( $r = 0.9987$ ) between glucose level and absorbance values at range from 0.018 to 0.090 mg. The content of polysaccharides of *Dendrobium officinale* ranged from 25.15% to 36.53%. Pre-column derivatization-HPLC method for the determination of D-mannose content was specific, accurate, reproducible. The D-mannose content of *Dendrobium officinale* ranged from 18.00% to 32.25%. The contents of erianin ranged from 0 to 0.0043%. There were significantly difference in the content of polysaccharides, D-mannose and erianin of *Dendrobium officinale* from different habits.

**Key words:** *Dendrobium officinale*; D-mannose; polysaccharides; erianin; content