

• 方药研究 •

6 个不同产地铁皮石斛功效成分的分析研究 *

全晶晶¹, 虞泓^{1△}, 曾文波^{1,2}, 曹东怡¹, 杨俊媛³

(1. 云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室, 云南 昆明 650091;
2. 文山学院, 云南 文山 663000; 3. 云南云百草生物技术有限公司, 云南 昆明 650201)

摘要: 目的 对比 6 个产地铁皮石斛功效成分的差异, 以期铁皮石斛进一步开发利用以及石斛行业的质量规范提供试验数据支撑。**方法** 通过高效液相色谱法和紫外分光光度法分别测定不同产地 3 年生铁皮石斛的干燥茎中多糖、D-甘露醇、总黄酮、总皂苷、总生物碱、核苷类成分及甾族化合物等多种化学成分, 并对 6 个产地进行 Q-聚类分析。**结果** 浙江省乐清市双峰乡所产石斛的多种功效成分相对较高, 聚类结果显示昆明市官渡区所产石斛与文山广南县最为接近, 德宏州盈江县石斛与其他产地相距最远。**结论** 铁皮石斛功效成分众多, 开发潜力极大, 但各地区材料功效成分差异明显, 而这些差异与地理位置关联不大, 推测种质资源与人工繁育体系影响更大, 说明急需统一的质量标准约束。

关键词: 铁皮石斛; 功效成分; 质量标准规范

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)05-0081-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.05.018

兰科植物铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 多产于云南、广西、浙江等地。2015 版《中国药典》^[1]记载铁皮石斛具有益胃生津, 滋阴清热等功效。研究还发现, 铁皮石斛在抗肿瘤和抗突变、降低血糖、抗氧化及增强机体免疫力等方面药用价值极高^[2]。现阶段对其功效成分的研究多集中于石斛多糖、甘露醇及石斛碱等, 其他化合物的研究多集中于其分离鉴定, 缺乏系统的营养成分含量研究。另外, 不同产地铁皮石斛的功效成分差异较大但缺乏具体的试验数据, 限制了不同地区铁皮石斛的综合开发。

本文以 6 个不同地区的铁皮石斛为材料, 系统开展石斛多糖、D-甘露醇等 15 种功效成分的检测, 并进行 Q-聚类分析, 探讨石斛功效成分多样性及其在不同地区之间的差异, 以期不同地区铁皮石斛的差异化开发提供数据支撑, 同时为完善铁皮石斛产业的质量规范提供基础数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收集 6 批不同地理来源的铁皮石斛材料, 皆为 3 年生铁皮石斛的干燥茎, 详情见表 1。所有材料均经云南大学虞泓教授鉴定。

表 1 铁皮石斛产地信息汇总

样品编号	产地	经纬度
1	云南省德宏州盈江县	N: 24°42' E: 97°55'
2	云南省普洱市景谷县	N: 23°29' E: 100°42'
3	云南省昆明市官渡区	N: 25°01' E: 102°44'
4	云南省文山广南县	N: 24°02' E: 105°03'
5	云南省西双版纳州勐海县	N: 21°57' E: 100°27'
6	浙江省乐清市双峰乡	N: 28°25' E: 121°07'

高效液相色谱仪: 戴安 ULTIMATE 3000 (LPG-3400A 四元梯度泵, WPS-3000SL 自动进样器, PDA-3000 二极管阵列检测器, TCC-3000 柱温箱, 戴安原装 ACCLAIM C18 色谱柱, 5μm, 4.6×250mm, “变色龙”控制分析色谱工作站软件)。紫外分光光度计: T6 新世纪, 北京普析通用仪器有限公司。

多糖、甘露醇等标准品均购自中国药品生物制品

* 基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (31760011); 云南省科技计划民营经济发展专项资金项目 (2014XA051)

收稿日期: 2017-08-26

作者简介: 全晶晶 (1993-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中草药资源开发与利用。

△通信作者: 虞泓, E-mail: herbfish@163.com

鉴定所;甲醇为国产色谱纯;其余试剂均为进口分析纯,实验用水为超纯水。

1.2 测定方法

1.2.1 多糖

取 0.250 0g 左右的样品经 90℃水浴提取后,浓缩至 2mL 后加入 10mL 无水乙醇,静置后离心,重复三次,取沉淀用水溶解后加入苯酚及硫酸溶液显色,利用分光光度计于 490nm 处测定分光光度值^[1]。

1.2.2 D-甘露醇

取 0.250 0g 左右的样品经 90℃水浴提取后,取 1mL 样品液依次加入高碘酸钾-盐酸溶液,0.1% L-鼠李糖溶液各 1mL,新鲜配制的 NaSh 试剂 4mL,于 53℃水浴加热 15min 后在 412nm 波长处测定分光光度值^[3]。

1.2.3 总黄酮

称取 0.500 0g 左右的样品,用 70%乙醇冷浸 72h,离心后取上清液 2mL,依次加入 1mL 5%NaNO₂ 溶液,1mL 10%Al(NO₃)₃ 溶液,10mL 4%NaOH 溶液,然后用 60%乙醇定容至 50mL,摇匀,放置 15min,在 508nm 处测定分光光度值^[3]。

1.2.4 总皂苷

用 70%乙醇溶液浸泡 0.100 0g 左右的样品,超声 90min 后放置 12h,取 1mL 过层析柱(大孔树脂:中性氧化铝=3:1),用 70%乙醇冲洗后烘干,加入香草醛-冰乙酸溶液 1mL,60℃水浴 15min 后加入 5mL 冰乙

酸,在 560nm 处测定吸光值^[3]。

1.2.5 总生物碱

取样品 0.500 0g 左右,用 20mL 氯仿浸泡 24h,加入醋酸盐缓冲溶液 5mL,0.04%溴甲酚绿溶液 2mL,混匀后静置 30min,离心 10min,取上清液 5mL,加入 0.01mol·L⁻¹ NaOH-无水乙醇溶液 1mL,混匀后在 620nm 处测定分光光度值^[4]。

1.2.6 核苷类成分

称取 0.100 0g 左右的样品,以 20%的甲醇为提取液,超声提取 30min,重复三次后过滤定容,利用高效液相色谱仪,选取流动相为甲醇:水=10:90,于 260 nm 作为检测波长,流速为 1.0mL/min,柱温为 30℃^[5]。

1.2.7 甾族化合物

称取 0.100 0g 样品,加入适量异丙醇后超声 1h,取上清液定容至 50mL 制成样品液,选取流动相为甲醇:乙腈:异丙醇=9:90:1,于 205nm 处检测,流速为 2.0mL/min^[6]。

1.3 数据处理方法

使用 SPSS22.0 软件,利用铁皮石斛中检测到的 12 种成分对 6 个不同地理来源的铁皮石斛进行地区间聚类分析。

2 结果与分析

2.1 6 个不同产地铁皮石斛功效成分的含量

试验检测了不同产地铁皮石斛总多糖、D-甘露醇、总黄酮等 15 种功效成分的含量,结果见表 2。

表 2 不同产地铁皮石斛功效成分含量表(μg·g⁻¹)

地区编号	1	2	3	4	5	6
总多糖	395577.97	252697.08	297077.32	309845	422200.57	428150.27
D-甘露醇	1329.18	2098.27	2720.32	2621.52	1435.93	2008.72
总黄酮	1074.37	1362.49	1361.13	1326.07	1073.49	1615.62
总皂苷	11261.61	10741.01	11026.27	10465.51	11230.83	11050.64
总生物碱	166.88	60.12	91.48	126.85	68.18	160.49
尿苷	34.301	85.312	103.426	112.804	97.541	112.97
鸟苷	30.855	91.554	99.874	108.975	99.085	117.037
胸苷	9.971	18.618	21.732	25.196	17.999	23.092
腺苷	70.879	141.702	171.883	176.623	153.697	180.955
2'-脱氧腺苷	13.992	31.404	38.513	41.252	28.296	19.035
尿嘧啶	—	—	—	—	—	—
肌苷	—	—	—	—	—	—
腺嘌呤	—	—	—	—	—	—
豆甾醇	29.934	86.399	55.455	54.206	58.272	49.894
β-谷甾醇	201.101	287.823	306.625	300.116	287.039	344.683

注:—,低于检测限。

研究发现,在所检的 6 个地区的石斛材料中,总多糖含量差异显著,其中最高为浙江省乐清市双峰乡,其含量达到 $428\ 150.27\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,最低为云南省普洱市景谷县,仅有 $252\ 697.08\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。而总生物碱含量普遍偏低,在 $60.12\sim 166.88\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间。不同地区铁皮石斛的 D-甘露醇及总皂苷含量差异并不明显,总黄酮含量仍以浙江省乐清市双峰乡含量为最高,云南省勐海县与盈江县的铁皮石斛总黄酮含量较低。另外,结果显示各个地区之间核苷类成分含量差异较大,云南省德宏州盈江县所产的铁皮石斛中尿苷含量仅为浙江省乐清市双峰乡的 30%,而其鸟苷含量也仅为乐清市所产材料的 26.4%。所检测到的尿苷、鸟苷、腺苷均以浙江乐清市双峰乡的铁皮石斛最高,其次为云南省文山州广南县产的铁皮石斛。胸苷和 2'-脱氧腺苷含量则以广南县所产铁皮石斛为最高。而 6 个地区的材料均未检测到肌苷,尿嘧啶和腺嘌呤。这 6 个地区的铁皮石斛茎中豆甾醇的含量在 $86.399\sim 29.934\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间,以云南省普洱市景谷县所产铁皮石斛含量最高,云南省德宏州盈江县含量最低,其余地区的材料豆甾醇含量都在 $49.894\sim 58.272\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间。 β -谷甾醇含量最高的为浙江产的铁皮石斛,可达 $344.683\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,其次为云南昆明市所产,含量达 $306.625\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,最低为云南省盈江县所产,为 $201.101\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.2 不同产地铁皮石斛化学成分 Q-聚类分析

为揭示铁皮石斛的化学成分在各个地区间的分布情况,对 6 个地区的铁皮石斛进行 Q-聚类分析,结果见图 2。这 6 个产地的铁皮石斛明显分为两大支,云南省德宏州盈江县的铁皮石斛单独为一支,其余的 5 个地区聚成一个大亚支,云南省昆明市官渡

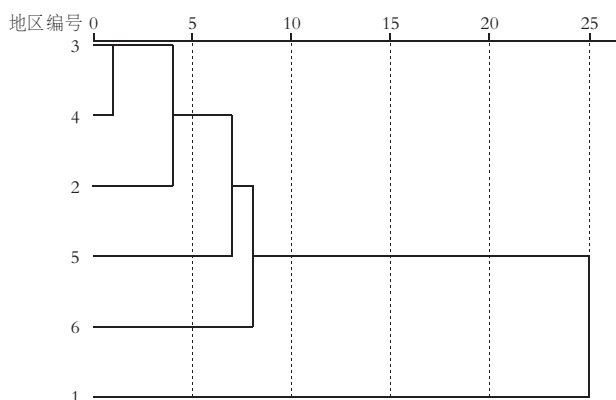


图 1 不同产地铁皮石斛功效成分聚类图

区与文山广南县所产的铁皮石斛在较小距离聚为一支,浙江省乐清市双峰乡所产石斛被单独分出形成一个亚支。

3 讨论

多糖类成分具有抑制肿瘤细胞生长、调节机体免疫等多种效用^[7],是铁皮石斛质量检测的重要指标之一。2015 版《中国药典》^[11]规定,铁皮石斛中的多糖含量不得低于 25.0%,经检测 6 批不同地理来源的铁皮石斛中多糖含量在 25.3%~42.8%之间,均符合国家标准。豆甾醇和 β -谷甾醇在石斛属植物中分布广泛^[18-21],两者都具有抑制肿瘤,降低心血管疾病发生机率的作用^[10-11]。核苷类成分则是细胞维持生命的重要物质,可以提高机体免疫力,镇静神经中枢^[12]。本实验首次在铁皮石斛干燥茎中系统检测了豆甾醇, β -谷甾醇以及核苷类成分,明确了其分布含量及不同地理来源间的差异。铁皮石斛中总黄酮与生物碱含量较少,不作为其主要指标进行检测^[12,13],但是总黄酮作为一类天然的植物抗氧化剂,具有降低血糖、血脂等生理活性^[13],生物碱在抑制肿瘤生长,防治胃肠道相关病症等多个方面的作用明显^[14],这对于铁皮石斛的药用开发仍有较高的参考价值。

另外,2'-脱氧腺苷,D-甘露醇及总皂苷是此次试验新检测的活性成分,其中,2'-脱氧腺苷是多种抗毒,抗艾滋药物的中间体^[15],D-甘露醇和总皂苷分别在抑制肿瘤、抗菌、抗炎等方面效果显著^[16-17],这为铁皮石斛药用价值的提升,开发领域的拓展提供了重要的数据基础。

不同地区生长的铁皮石斛部分化学成分差异明显,质量参差不齐。综合比较可以发现,浙江省乐清市双峰乡的铁皮石斛与其他产区的材料相比,优势较为明显,其多糖、黄酮、尿苷、腺苷及 β -谷甾醇等多种功效成分的含量都比其他材料要高,而云南省德宏州盈江县所产石斛的核苷类成分和甾族化合物成分含量明显偏低。此外,6 个地区铁皮石斛的聚类结果显示,云南省昆明市官渡区与文山广南县所产的铁皮石斛在化学成分上最为相似,云南省德宏州盈江县的铁皮石斛与其它 5 个地区差别最大,说明铁皮石斛功效成分的含量并非与地理环境完全相关。推测不同企业铁皮石斛人工繁殖体系的完善程度,种质资源的质量水平,都会在一定程度上影响铁皮石斛的功效。

本研究局限于不同地区的 3 年生铁皮石斛茎中化学成分的比较,未涉及铁皮石斛不同时间段化学成分动态变化以及人工培育与自然条件下其成分差异。这些仍有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2015 年版). 四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:282.
- [2] 陈晓梅,王春兰,杨峻山,等. 铁皮石斛化学成分及其分析的研究进展 [J]. 中国药学杂志,2013,48(19):1634-1640.
- [3] 杨俊媛. 蛹虫草、粉棒束孢和蝙蝠蛾拟青霉培养过程中化学成分的比较研究[D]. 云南大学,2015.
- [4] 徐作英,严伟,廖晓康,等. 栽培金钗石斛形态鉴别和总生物碱含量研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版),2010,33(3):361-365.
- [5] Zeng WB, Yu H, Ge F, et al. Distribution of nucleosides in populations of *Cordyceps cicadae* [J]. *Molecules*, 2014, 19(5):6123-6141.
- [6] 李英霞,谷颜杰,马承严. HPLC 同时测定大豆甾醇提取物中 β -谷甾醇和豆甾醇的含量 [J]. 中成药,2008,30(5):751-752.
- [7] 陈超琴,蒋丽华,赵黎明,等. 石斛多糖的研究进展[J]. 食品工业科技,2012(2):441-445.
- [8] 郭孟璧,田茂军,张举成,等. 流苏石斛挥发油化学成分的研究 [C]//中国化学会第四届有机化学学术会议论文集(上册),2005:25.
- [9] 周晓梅. 选鞘石斛有效部位的化学成分与药材质量标准研究[D]. 成都中医药大学,2008.
- [10] 周志远,卢群,刘洋,等. 豆甾醇的研究及开发进展 [J]. 中国当代医药,2015,22(24):15-17.
- [11] 肖志彬,贾韩学,刘小雷. β -谷甾醇药理活性的研究现状 [J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(8):66-68.
- [12] 张元杰,钱正明,陈肖家,等. HPLC 法同时测定补益中药中尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(1):33-36.
- [13] 吴佳雯,鲍佳路,吕耀平,等. 乐清市铁皮石斛总黄酮含量的测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(18):10856.
- [14] 诸燕,张爱莲,何伯伟,等. 铁皮石斛总生物碱含量变异规律[J]. 中国中药杂志,2010,35(18):2388-2391.
- [15] 路有昌,张换平. 2'-脱氧腺苷的合成[J]. 应用化工,2006,35(7):564-565.
- [16] 詹天荣,宋金明. 甘露醇的药用研究进展[J]. 中国海洋药物,2003,22(3):57-61.
- [17] 李晓宇,郝海平,王广基,等. 三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究[J]. 中国天然药物,2008,6(5):377-381.

(编辑:徐建平)

Study on Functional Components of *Dendrobium officinale* from Different Culturing Areas

TONG Jingjing¹, YU Hong¹, ZENG Wenbo^{1,2}, CAO Dongyi¹, YANG Junyuan³

(1. Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herbal Biotic Resources, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Wenshan University, Wenshan 663099, China;

3. Yunnan Herbal Biotech Co., LTD, Kunming 650201, China)

ABSTRACT: **Objective** By comparing the functional components of *Dendrobium officinale* from six areas to provide a theoretical basis for the further development of *Dendrobium officinale* and establishing a quality standard of industry. **Methods** Polysaccharide, D-mannitol, flavonoids, total saponins, total alkaloids, nucleosides and steroids in dry stems of *Dendrobium officinale* from different areas were detected by HPLC and UV experiments, and Q-cluster analysis was performed on 6 producing areas. **Results** *Dendrobium officinale* from Leqing of Zhejiang province has the relatively higher quality, the cluster diagram shows that the materials from Guandu district of Kunming and Guangnan county of Wenshan Prefecture has the nearest distance, and Yingjiang county of Dehong Prefecture is the farthest away from other producing areas. **Conclusion** *Dendrobium officinale* has many functional components and its potential is great, but the materials' differences are obvious, and these are not related to the geographical location. It is speculated that germplasm resources and artificial breeding system have great influence, which indicates the need for uniform quality standard.

KEY WORDS: *Dendrobium officinale*; functional component; quality standard