

5 种不同石斛的多糖与氨基酸及甘露糖的含量比较

鲁芹飞¹, 黄松^{1,2*}, 林培¹, 吕书剑¹, 谢剑锋¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] **目的:**比较不同种石斛部分化学成分的差别。**方法:**采用苯酚-硫酸法测定样品中多糖含量, 茚三酮显色法测定样品中氨基酸的含量, 内标法测定样品中甘露糖的含量, 通过定量测定, 比较 5 种石斛中总多糖、氨基酸和甘露糖的含量差异。**结果:**5 种不同种类的石斛中多糖、氨基酸、甘露糖的含量存在较大的差异。多糖含量, 细茎石斛、金钗石斛、马鞭石斛相近, 其中铁皮石斛明显高于其余 4 种石斛, 鼓槌石斛明显低于其余的 4 种石斛; 氨基酸含量, 马鞭石斛高于其他 4 种石斛; 甘露糖含量, 铁皮石斛明显高于其余 4 种石斛。**结论:**5 种不同石斛的总多糖、氨基酸和甘露糖的含量存在较大的差异, 但就所含的相同化学成分总体而言铁皮石斛的质量好于其他 4 种石斛。

[关键词] 石斛; 多糖; 氨基酸; 甘露糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0059-04

[doi] 10.11653/syfy2014020059

Determination of Polysaccharide, Amino Acid and Mannose Content in Five Kinds of Dendrobii Caulis

LU Qin-fei¹, HUANG Song^{1,2*}, LIN Pei¹, LV Shu-jian¹, XIE Jian-feng¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the chemical compositions in the five kinds of Dendrobii Caulis. **Method:** Polysaccharide, mannose and amino acid in the five kinds of Dendrobii Caulis were determined and compared. **Result:** The polysaccharide contents, the amino acid contents and the mannose contents are remarkably different in the five kinds of Dendrobii Caulis. The content of polysaccharide in the Dendrobii Caulis officinnle is highest in the five kinds of Dendrobii Caulis; the content of amino acid in the Dendrobii Caulis finbristun is higher than other four kinds of Dendrobii Caulis; the mannose contents of Dendrobii Caulis officinnle is much more higher than other kinds. **Conclusion:** The quantity and contents of polysaccharide, amino acid and the mannose are remarkably different in the five kinds of Dendrobii Caulis. However, Dendrobii Caulis officinnle has a higher quality than other four kinds of Dendrobii Caulis in terms of the same chemical compositions.

[Key words] Dendrobii Caulis; polysaccharide; amino acid; mannose

中药石斛为兰科植物石斛属 *Dendrobium* 多种药用植物的总称, 始载于《神农本草经》, 具有养胃生津、滋阴清热、明目的功能, 用于阴伤津亏, 口干烦

渴, 食少干呕, 病后虚热, 目暗不明等症^[1]。现代药理研究证明石斛具有抗衰老、抗肿瘤、降低血糖的作用, 在治疗胃肠道疾病和治疗白内障方面也有很好疗效^[2-8]。石斛属植物中化学成分类型不尽相

[收稿日期] 20130712(002)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2008A030101009); 广东省教育部产学研结合项目(2010B090400474); 广东省科技计划项目(2011A030100011)

[第一作者] 鲁芹飞, 在读硕士研究生, 从事中药新药研究开发研究, Tel:020-39359731, E-mail:jiayouluqinfei@163.com

[通讯作者] *黄松, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药研究开发研究, Tel:020-32503212, E-mail:hsl318@yahoo.com.cn

同,含量也存在差异^[9-15]。本文对铁皮石斛、金钗石斛、细茎石斛、鼓槌石斛和马鞭石斛的多糖、氨基酸、甘露糖的含量进行了测定和比较,旨在从化学成分含量方面比较不同品种石斛的差异,使得各种石斛得到更好的综合应用。

1 材料

1.1 药材 5 种石斛均由广州中医药大学新药研究开发中心黄松老师提供,经广州中医药大学新药研究开发中心陈建南研究员鉴定为兰科石斛属植物。

1.2 仪器 UV mini 紫外分光光度计(日本岛津), Sartorius BP110S 型电子天平(德国), Sartorius CP225D 型电子天平(德国), Aquapro 艾科浦 u 系列纯水机, HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司); SHIMADZU 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), SPD-20A 型紫外-可见光检测器, Diamonsil 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

1.3 试剂 天冬氨酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 624-200104), 无水葡萄糖(中国药品生物制品检定所提供,批号 0833-9501), 甘露糖(中国药品生物制品检定所提供,批号 140651-200602), 盐酸氨基葡萄糖(中国药品生物制品检定所提供,批号 140649-201103); 苯酚、硫酸、乙醇、茛三酮、氯化亚锡、无水乙酸钠、PMP(1-苯基-甲基-5 吡唑啉酮), 乙腈为色谱纯, 甲醇, 三氯甲烷, 乙酸铵等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总多糖的含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 铁皮石斛的多糖供试品溶液参照 2010 年版《中国药典》铁皮石斛项下多糖含测方法。其余 4 种石斛的多糖供试品溶液的制备方法如下:取样品粉末(过 3 号筛)约 0.3 g,精密称定,置 250 mL 圆底烧瓶中,加水 200 mL 加热回流 2 h,抽滤,滤液转移至 250 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。从 250 mL 量瓶中精密移取溶液 10 mL,置 100 mL 离心管中,精密加入无水乙醇 50 mL,摇匀,冷藏 1 h,取出,离心 20 min,弃去上清液,沉淀加 80% 乙醇洗涤两次,每次 40 mL,离心,弃上清液,沉淀加热水溶解,转移至 25 mL 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀。

2.1.2 多糖含量测定及标准曲线的绘制 精密称定 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水适量使溶解,稀释至刻度,摇匀。精密移取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.4 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中,各加水至

2.0 mL,精密加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,加硫酸 5.0 mL,摇匀,置沸水浴中加热 20 min,取出,置冰浴中冷却 5 min,以相应试剂为空白,在 488 nm 的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.060 X - 0.074 (r = 0.999 2)$,在 2.48 ~ 17.36 mg · L⁻¹ 线性良好。另取 2.1.1 项下制备的供试品溶液 1.0 mL,自“加水至 2.0 mL 开始”,依法测定其吸光度,计算多糖的含量(以葡萄糖计),结果见表 1。

表 1 5 种石斛的多糖和氨基酸含量 %

| 药材 | 多糖 | 氨基酸 |
|------|-------|------|
| 细茎石斛 | 14.01 | 0.89 |
| 金钗石斛 | 13.96 | 0.62 |
| 鼓槌石斛 | 6.84 | 0.80 |
| 马鞭石斛 | 15.53 | 1.21 |
| 铁皮石斛 | 29.75 | 0.70 |

2.1.3 精密密度、重复性、稳定性考察 依法测定试验方法的精密密度、重复性、稳定性,其 RSD 依次为 1.37%, 1.52%, 0.45%, 180 min 内稳定性良好。

2.1.4 回收率 精密称取已知多糖含量的石斛鲜品样品的 6 份,加入相同量葡萄糖对照品,按 2.1.1 项下的方法制备供试品溶液,依法测定,结果回收率为 97.6%, RSD 2.43%。

2.2 氨基酸的含量测定

2.2.1 2% 茛三酮溶液的配制 称取水合茛三酮 2.0 g,加水 50 mL、氯化亚锡 0.080 g 搅拌溶解,于暗处静置过夜,过滤后,加水定容至 100 mL。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品粉末(过 3 号筛)约 1.0 g,精密称定,置 250 mL 圆底烧瓶中,加 70% 乙醇 40 mL 加热回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,转移至 100 mL 量瓶中,定容,摇匀。

2.2.3 氨基酸含量测定及标准曲线的绘制 精密称取天冬氨酸对照品 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。精密吸取对照品标准溶液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mL,于 25 mL 量瓶中,加水补足至 4.0 mL,再精密加入 pH 6.5 的 CH₃COONa 缓冲盐溶液 1.0 mL,2% 的茛三酮溶液 1.5 mL,摇匀,置沸水浴中加热 30 min,取出,放冷 15 min,加水定容。以相应溶剂为空白,在波长为 568 nm 处测定吸光度,以吸光度作纵坐标,以天冬氨酸溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.111 9 X - 0.128 0 (r = 0.999 7)$ 。在 2.022 ~ 12.132 mg · L⁻¹ 线性良好。另取 2.2.2 项下制备的

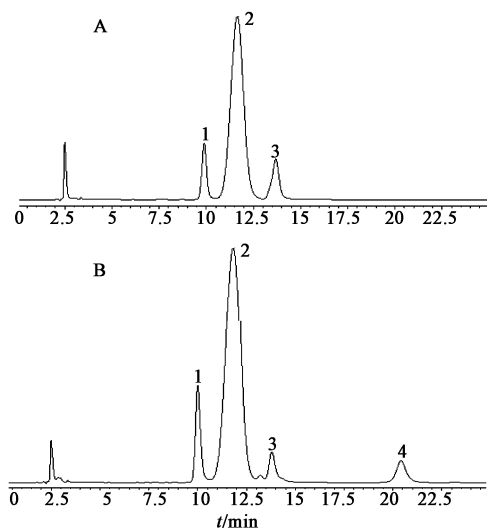
供试品溶液 2.0 mL,自“加水至 4.0 mL 开始”,依法测定其吸光度,计算氨基酸的含量,结果见表 1。

2.2.4 精密度、重复性、稳定性考察 依法测定试验方法的精密度、重复性、稳定性,其 RSD 依次为 0.98%,1.12%,1.64%,45 min 内稳定性良好。

2.2.5 回收率 取已知含量的石斛药材 1.0 g,精密称定,平行 6 份,按 2.2.2 项下的方法制备供试品溶液,并且按 2.2.3 项下的方法显色,依法测定吸光度,在显色反应过程中按照供试品中总游离氨基酸的量与加入对照品的量 1:1,精密加入适量的天冬氨酸对照品溶液,结果平均回收率为 99.87%,RSD 1.72%。

2.3 甘露糖的含量测定

2.3.1 色谱条件 SHIMADZU 高效液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-20A 紫外-可见光检测器,Diamonsil 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),以乙腈-0.02 mol·L⁻¹的乙酸铵溶液(20:80)为流动相,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 250 nm。见图 1。



A. 对照品;B. 样品;1. Man;2. PMP;3. 内标物;4. Glu

图 1 铁皮石斛对照品及样品的 HPLC

2.3.2 线性范围的考察 分别精密称取 1,4,7,10,20,30 mg 甘露糖对照品置 100 mL 量瓶中,再精密加入内标溶液 1 mL,加水适量使溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取以上系列对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪中,记录色谱图,测定甘露糖峰面积和盐酸氨基葡萄糖的峰面积。以甘露糖的进样浓度为横坐标,以甘露糖的峰面积为纵坐标进行回归,得到方程 $Y = 196\ 059X + 28\ 165$ ($r = 0.999\ 8$),说明甘露糖在 0.009 3 ~ 0.310 8 g·L⁻¹,进样量与峰面积呈良好线性关系。

2.3.3 校正因子测定 取盐酸氨基葡萄糖适量,精

密称定,加水制成每 1 mL 含 12 mg 的溶液,作为内标溶液。另取甘露糖对照品约 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,精密加入内标溶液 1 mL,加水适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,吸取 400 μL,加 0.5 mol·L⁻¹的 PMP(1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮)甲醇溶液与 0.3 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液各 400 μL,混匀,70 °C 水浴反应 100 min。再加 0.3 mol·L⁻¹的盐酸溶液 500 μL,混匀,用三氯甲烷洗涤 3 次,每次 2 mL,弃去三氯甲烷液,水层离心后,取上清液 10 μL,注入液相色谱仪,测定,计算校正因子。校正因子为 1.01,RSD 1.41%。

2.3.4 供试品溶液的制备 取样品粉末约 0.12 g,精密称定,置索氏提取器中,加 80% 乙醇适量,加热提取 4 h,弃去乙醇液,药渣挥干乙醇,滤纸筒拆开置于烧杯中,加水 100 mL,再精密加入内标溶液 2 mL,煎煮 1 h 并时时搅拌,放冷,加水补至 100 mL,混匀,离心,吸取上清液 1 mL,置安瓿瓶或顶空瓶中,加 3.0 mol·L⁻¹的盐酸溶液 0.5 mL,封口,混匀,110 °C 水解 1 h,放冷,用 3.0 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液调节 pH 至中性,吸取 400 μL,照校正因子测定方法,自“加 0.5 mol·L⁻¹的 PMP 甲醇溶液”起,依法操作,取上清液 10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.3.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液,依法重复进样 6 次,测定甘露糖的含量,结果 RSD 0.52% ($n = 6$)。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,间隔 2 h 测定 1 次,共测 7 次,结果 RSD 1.03% ($n = 6$),结果表明甘露糖的衍生物在 12 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 精密称取同一份样品 6 份,按 2.3.4 项下方法制备供试品溶液,依法测定甘露糖的含量,结果 RSD 2.31% ($n = 6$)。

2.3.8 加样回收试验 分别精密称取 6 份已知含量的细茎石斛粉末约 0.06 g,分别加入 0.310 8 g·L⁻¹的甘露糖对照品溶液 10 mL,按供试品溶液的制备方法制备,依法测定甘露糖的含量,结果见表 2。

2.3.9 样品的测定 取各石斛样品,按 2.3.4 项下方法制备供试品溶液,按照 2.3.1 项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算甘露糖的含量。结果见表 3。

从表 1 和表 3 可以看出上述 5 种不同种类石斛的多糖、氨基酸、甘露糖的含量存在较大的差异。多糖含量,细茎石斛、金钗石斛、马鞭石斛相近,铁皮石斛明显高于其余 4 种石斛,鼓槌石斛明显低于其余的 4 种石斛;氨基酸含量,马鞭石斛高于其他 4 种石

表 2 细茎石斛中甘露糖回收率测定 (n=6)

| 取样量 /g | 样品中的量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|-----------|--------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 0.061 8 | 0.284 3 | 0.599 8 | 101.52 | 101.22 | 2.75 |
| 0.062 3 | 0.286 6 | 0.612 7 | 104.93 | | |
| 0.060 9 | 0.280 1 | 0.584 7 | 97.99 | | |
| 0.061 7 | 0.283 8 | 0.602 2 | 102.44 | | |
| 0.059 7 | 0.274 6 | 0.578 8 | 97.87 | | |
| 0.062 7 | 0.288 4 | 0.607 3 | 102.60 | | |

注:加入量均为 0.310 8 mg。

表 3 5 种石斛的甘露糖含量

| 样品 | 取样量 /g | 甘露糖 峰面积 | 内标 峰面积 | 甘露糖 含量/% | 平均 含量/% |
|------|-----------|------------|-----------|-------------|------------|
| 鼓槌石斛 | 0.123 4 | 5 471 | 277 633 | 0.25 | 0.24 |
| | 0.117 8 | 5 675 | 30 8731 | 0.24 | |
| | 0.121 1 | 5 975 | 312 977 | 0.24 | |
| 金钗石斛 | 0.116 3 | 2 381 | 199 280 | 0.15 | 0.15 |
| | 0.124 5 | 2 596 | 238 178 | 0.14 | |
| | 0.123 3 | 2 463 | 216 488 | 0.15 | |
| 细茎石斛 | 0.118 9 | 10 058 | 279 838 | 0.46 | 0.46 |
| | 0.119 8 | 11 509 | 318 765 | 0.46 | |
| | 0.124 1 | 10 686 | 292 918 | 0.47 | |
| 马鞭石斛 | 0.126 2 | 5 631 | 260 958 | 0.28 | 0.28 |
| | 0.117 3 | 5 293 | 229 294 | 0.30 | |
| | 0.120 3 | 5 895 | 263 192 | 0.29 | |
| 铁皮石斛 | 0.122 2 | 751 337 | 1 021 819 | 14.64 | 14.23 |
| | 0.118 4 | 793 559 | 1 102 146 | 14.34 | |
| | 0.122 7 | 782 876 | 1 127 775 | 13.83 | |

斛;甘露糖含量,铁皮石斛明显高于其余 4 种石斛。

3 讨论

5 种不同石斛的总多糖、氨基酸和甘露糖的含量存差异,部分的差异比较明显,但就所含的相同化学成分总体而言铁皮石斛的质量好于其他 4 种石斛。但是本实验仅单纯的从化学成分方面比较了不同,在养胃生津、滋阴清热等药效方面的差异与本实验所测的成分有无直接关系,关联的程度等等问题还需要进一步实验探索验证。

在测定多糖的含量时,通过查阅文献资料发现细茎石斛、金钗石斛、马鞭石斛、鼓槌石斛的多糖含量低于铁皮石斛,所以在制备 5 种石斛的多糖供试品溶液时有所区别。

在制备氨基酸的供试品溶液时,提取溶媒考察了 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸,蒸馏水和不同浓度的乙醇,提取方法考察了回流提取和超声提取,综合比较分析,最后确定 40 倍量的 70% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 1 h 的提取方法。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大药典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:586.

[2] 吴昊姝,徐建华,陈立钻,等. 铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(2):69.

[3] 金红峰,周云连,陈云龙,等. 石斛对大鼠胸主动脉搏的舒张作用[J]. 中国中药杂志,2003,28(11):1067.

[4] 吕圭源,颜美秋,陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(4):489.

[5] 郁美娟,孟庆华,黄德音,等. 石斛属植物有效成分及药理作用研究[J]. 中成药,2003,25(11):918.

[6] 邵曰凤,胡长青,邹澄,等. 石斛属植物化学成分和药理活性研究现状[J]. 天然产物研究与开发,2012(24):152.

[7] 徐琼,陈素红,吕圭源. 3 种不同石斛的化学成分及相关药理学研究进展[J]. 亚太传统医药,2010,6(4):115.

[8] 鲍丽娟. 四种石斛抗肿瘤活性的研究[D]. 合肥工业大学,2007.

[9] 范俊安,王继生,张艳,等. 铁皮石斛组培品与野生品的形态组织学和多糖含量比较研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(21):1648.

[10] 王换,张建霞,吴坤林,等. 不同石斛的生物学特性及主要成分比较研究[J]. 广东农业科学,2012,12(6):44.

[11] 陈晓梅,肖盛元,郭顺星. 铁皮石斛与金钗石斛化学成分的比较[J]. 中国医学科学院学报,2006,28(4):524.

[12] 朱丽娜. 金钗、铁皮、马鞭、鼓槌、迭鞘五种不同基源石斛的药效学评价研究[D]. 成都:成都中医药大学,2012.

[13] 龚庆芳,周浩,王新桂,等. 7 种石斛多糖质量分数的测定及单糖组成分析[J]. 食品科技,2013,38(3):172.

[14] 华允芬,陈云龙,张铭. 三种药用石斛多糖成分的比较研究[J]. 浙江大学学报:工学版,2004,38(2):249.

[15] 诸燕,斯金平,郭宝林,等. 人工栽培铁皮石斛多糖含量变异规律[J]. 中国中药杂志,2010,35(4):427.

[责任编辑 顾雪竹]