

组培霍山石斛、野生霍山石斛及河南石斛 多糖及乙醇溶出物动态积累规律研究

陈乃东^{1,2,3*}, 陈乃富^{1,2}, 王陶陶^{1,2}, 顾 镇^{1,2}

¹皖西学院生物与制药工程学院; ²皖西中药与天然药物工程技术研究中心, 六安 237012;

³安徽医科大学药学院, 合肥 230032

摘要: 为了揭示不同种源的霍山石斛及其近缘种河南石斛多糖和醇溶性浸出物含量的动态变化规律, 为霍山石斛和河南石斛规范化种植及品种鉴定提供依据, 采用蒽酮-浓硫酸比色法和醇溶性浸出物热浸法对 1~4 年株龄的野生霍山石斛、组培霍山石斛和河南石斛的多糖和浸出物含量进行测定。结果表明, 不同株龄的组培霍山石斛、野生霍山石斛和河南石斛的多糖、浸出物含量均存在极显著差异。以多糖含量为标准, 三者均以生长 2 年采收为宜, 以醇溶物为标准, 以栽培三年采收最好。以多糖和醇溶出物总量计, 组培霍山石斛以 2 年采收为宜, 野生霍山石斛及河南石斛以 3 年株龄品质最佳。

关键词: 组培霍山石斛; 野生霍山石斛; 河南石斛; 多糖; 乙醇浸出物

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.018

Accumulation of Polysaccharides and Ethanol-soluble Extract in Tissue-cultured and Wild *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium henanense*

CHEN Nai-dong^{1,2,3*}, CHEN Nai-fu^{1,2}, WANG Tao-tao^{1,2}, GU Zhen^{1,2}

¹College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University;

²West Anhui Biotechnology Research Center of Natural Medicine and Traditional Chinese Medicine, West Anhui University, Lu'an 237012, China; ³School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: In order to reveal the accumulation of pharmaceutical constituents in different origins of *Dendrobium huoshanense* and its main counterfeit herb *Dendrobium henanense*, and to provide references for their standardized planting and cultivar identification, the contents of polysaccharides and ethanol-soluble extract in different ages of tissue-cultured and wild *D. huoshanense* as well as *D. henanense* were detected by anthrone-sulfuric acid colorimetric and hot-maceration method, respectively. The results showed that the accumulation of polysaccharides and ethanol-soluble extract in the 12 *Dendrobium* samples varied remarkably as their ages increased. It was better to harvest when they were cultivated for two years according to their polysaccharide contents. It was better to harvest when they were cultivated for three years according to their ethanol-soluble extract contents. It was more reasonable to harvest tissue-cultured *D. huoshanense* cultivated for two years while it was better to harvest wild *D. huoshanense* and *D. henanense* cultivated for 3 years according to the total contents of polysaccharides and ethanol-soluble extract.

Key words: tissue-cultured *Dendrobium huoshanense*; wild *Dendrobium huoshanense*; *Dendrobium henanense*; polysaccharide; ethanol-soluble extract

霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense* Tang et Cheng) 属兰科石斛属多年生草本植物, 主产于安徽霍山县, 具养胃生津、滋阴清热、明目等功效^[1], 是

安徽地道药材之一, 由于自然状态下萌芽率低、生长缓慢, 加上长期过度采挖, 资源濒危^[2-5]。在霍山石斛的道地产区, 采用组培快繁快速获得试管苗或人工诱导种子萌发产生实生苗大规模野外栽培的组培霍山石斛, 已逐渐替代野生资源成为药用霍山石斛的主要来源^[2-5]。多糖和乙醇溶出物是石斛类中药发挥药理作用的主要成分^[6-8], 在 2010 版《中国药典》就以多糖含量和乙醇溶出物含量作为判断铁皮

收稿日期: 2015-08-17 接受日期: 2015-10-10

基金项目: 国家自然科学基金 (81274021, 815733536); 中国博士后研究面上项目 (2014M551791); 安徽省教育厅省级高校自然科学研究重大项目 (KJ2015ZD43); 安徽省人事厅博士后研究项目; 皖西学院学生研究性学习项目 (wxyx2015184, wxyx2015176)

* 通讯作者 E-mail: 2004cnd@163.com

石斛质量标准^[9-12],因此,研究组培霍山石斛、野生霍山石斛多糖及乙醇溶出物的积累与株龄的关系,对于霍山石斛的规范化栽培和采收具有重要意义。实验同时对当前药材市场中霍山石斛的主要伪品——河南石斛(*Dendrobium henanense* J. L. Lu et L. X. Gao)的多糖及醇溶物的动态积累进行了对比研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);KQ-5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-S6 型数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);GL-200-II 型离心机(上海安亭科学仪器厂);GL-20G-

II 电子分析天平(上海安亭科学仪器厂);202A-3 型数显电热干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司)。葡萄糖对照品(SIGMA 试剂公司);其他所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.2 供试样品

供试药材野生霍山石斛、河南石斛采于安徽省霍山县,组培霍山石斛由安徽省霍山县亿康生物科技有限公司提供,品种和株龄经安徽省省级 2011 协同创新中心——霍山石斛产业化开发协同创新中心主任陈乃富教授鉴定为 1~4 年株龄组培霍山石斛(tissue-cultured *Dendrobium huoshanense*)、1~4 年株龄野生霍山石斛(wild *Dendrobium huoshanense*)、1~4 年株龄河南石斛(*Dendrobium henanense*)。采集的样品茎叶分离,茎 80 °C 烘至恒重,粉碎,过 60 目筛,干燥器储存待用。供试样品采集信息见表 1。

表 1 供试样品采集信息

Table 1 Information of the samples used in the experiments

样品名称 Sample name	采集时间 Collection date	采集地点 Collection place	样品编号 Sample No.
组培霍山石斛 1 年 One-year tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	2014. 11. 09	安徽霍山黑石渡乡	1411A01HS011S3
组培霍山石斛 2 年 Two-year tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	2014. 11. 09	安徽霍山黑石渡乡	1411A01HS012S3
组培霍山石斛 3 年 Three-year tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	2014. 11. 09	安徽霍山黑石渡乡	1411A01HS013S3
组培霍山石斛 4 年 Four-year tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	2014. 11. 09	安徽霍山黑石渡乡	1411A01HS014S3
野生霍山石斛 1 年 One-year wild <i>D. huoshanense</i>	2014. 10. 21	安徽省霍山县太平畈乡	1410B01HS011YS
野生霍山石斛 2 年 Two-year wild <i>D. huoshanense</i>	2014. 10. 22	安徽省霍山县太平畈乡	1410B01HS012YS
野生霍山石斛 3 年 Three-year wild <i>D. huoshanense</i>	2014. 10. 21	安徽省霍山县太平畈乡	1410B01HS013YS
野生霍山石斛 4 年 Four-year wild <i>D. huoshanense</i>	2014. 10. 21	安徽省霍山县太平畈乡	1410B01HS014YS
河南石斛 1 年 One-year wild <i>D. henanense</i>	2014. 11. 09	安徽省霍山县太平畈乡	1411A04HS011
河南石斛 2 年 Two-year wild <i>D. henanense</i>	2014. 11. 09	安徽省霍山县太平畈乡	1411A04HS012
河南石斛 3 年 Three-year wild <i>D. henanense</i>	2014. 11. 09	安徽省霍山县太平畈乡	1411A04HS013
河南石斛 4 年 Four-year wild <i>D. henanense</i>	2014. 11. 09	安徽省霍山县太平畈乡	1411A04HS014

2 实验方法

2.1 乙醇浸出物及总多糖提取液的制备

精密称取干燥至恒重的供试样品粉末 1.0 g 以

95% 乙醇(g: mL, 1: 25) 85 °C 回流提取 1 h, 重复三次, 过滤, 合并滤液, 得乙醇总浸出物溶液, 加 95% 乙醇定容至 75 mL, 备用。

滤渣于 90 °C 热水(g: mL, 1: 100) 浸提 2 h, 重复

提取3次,过滤,合并提取液,减压浓缩至100 mL,4℃的冰箱冷却1 h,5000 rpm离心15 min,收集上清液,得总多糖提取液,定容至100 mL,备用。实验设三次重复。

2.2 多糖的含量测定

精密吸取1.0 mL步骤2.1中制备的总多糖提取液,置于10 mL具塞刻度试管,在冰水浴中缓缓精密加入0.2%蒽酮-硫酸溶液4.0 mL,摇匀,冷却后置沸水浴中保温10 min后取出,冰水浴中冷却10 min,于621 nm下测吸光度值(A)。以葡萄糖为对照品制标准曲线:精密称取105℃干燥恒重的标准葡萄糖以蒸馏水配制0.1 mg/mL的葡萄糖标准溶液,精密量取0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL和1.0 mL葡萄糖标准溶液于具塞刻度试管中,分别加水定容至1.0 mL,摇匀,在冰水浴中缓慢滴加0.2%蒽酮-硫酸溶液4.0 mL,摇匀,冷却后管口加盖,置沸水浴中保温10.0 min后取出,冰水浴中冷却10.0 min,以葡萄糖标准溶液0.0 mL管为空白,于621

nm下测吸光度值,得回归方程 $A = 9.366C + 0.101$, $R^2 = 0.995$,A为吸光度,C为浓度。计算出各供试样品以葡萄糖计的多糖含量。

精密量取步骤2.1中制备的总多糖提取液90 mL,缓缓加入无水乙醇至乙醇的浓度为76%,4℃冰箱中保存24 h后5000 rpm离心15 min,沉淀依次用乙醇,丙酮和乙醚反复洗涤数次,溶解在适量蒸馏水,按Sevag法脱蛋白,冷冻干燥,得精制多糖,精密称取精制多糖10.0 mg,置100 mL容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,精密吸取1.0 mL,按测定标准曲线的方法测定其吸光度,按下式计算换算因子(F):

$$F = W / (C \times D)$$

其中:W:精制多糖质量(mg);C:多糖液中葡萄糖折合浓度(mg/mL);D:稀释倍数。

测得葡萄糖对各供试样品多糖的换算因子(表2)。各样品以葡萄糖计多糖含量乘以葡萄糖对供试样品多糖的换算因子,计算出供试样品中多糖含量。

表2 葡萄糖对各供试样品多糖的换算因子

Table 2 The conversion factor of glucose to polysaccharides from different ages of tissue-cultured and wild *D. huoshanense* as well as *D. henanense*

样品名称 Sample	换算因子 Conversion factor	样品名称 Sample	换算因子 Conversion factor
组培霍山石斛1年 One-year tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	2.59	野生霍山石斛3年 Three-year wild <i>D. huoshanense</i>	4.47
组培霍山石斛2年 Two-year tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	1.81	野生霍山石斛4年 Four-year wild <i>D. huoshanense</i>	4.30
组培霍山石斛3年 Three-year tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	2.55	河南石斛1年 One-year wild <i>D. henanense</i>	2.34
组培霍山石斛4年 Four-year tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	3.53	河南石斛2年 Two-year wild <i>D. henanense</i>	2.15
野生霍山石斛1年 One-year wild <i>D. huoshanense</i>	4.11	河南石斛3年 Three-year wild <i>D. henanense</i>	1.84
野生霍山石斛2年 Two-year wild <i>D. huoshanense</i>	4.08	河南石斛4年 Four-year wild <i>D. henanense</i>	2.64

2.3 醇溶性浸出物含量测定方法

精密量取制备的各供试样品乙醇浸出液25 mL,置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105℃烘箱中干燥3 h,取出,置干燥器中冷却30 min,迅速精密称重,计算供试品中乙醇浸出物含量。重复3次。

2.4 数据统计与分析

利用SPSS17.0对所测数据进行单因素方差分析。

3 结果与分析

3.1 多糖积累规律

多糖作为能量物质同时参与植物营养贮藏与代谢,多糖的累积与药用植物的生长是一个互相交替的过程,生长年限对多糖的累积有较大的影响。组培霍山石斛、野生霍山石斛、河南石斛多糖含量测定结果见表3。方差分析结果表明,不同株龄的组培霍山石斛、野生霍山石斛和河南石斛多糖含量测定

结果有统计学意义($P \leq 0.05$)。三种石斛多糖含量与生长年限密切相关,株龄2年的植株多糖含量最高,株龄4年的多糖含量最低,这与三种石斛样品的生理特性有关:株龄1年的植株,茎叶均生长旺盛,茎、叶中的叶绿体均可进行光合作用,多糖积累的速度快,二年生的植株基本只能保留少量老叶,主要依赖茎中的叶绿体进行光合作用,仍有多糖积累,但积累速度下降,3~4年植株,完全无叶,茎逐渐老化,叶绿体减少,多糖的积累不足以维持植株维持生命活动的能量需要,需消耗前期合成的多糖维系生命活动。株龄相同的组培霍山石斛、野生霍山石斛和河南石斛多糖含量存在显著差异,多糖的含量从大到小依次为:组培霍山石斛 > 野生霍山石斛 > 河南石斛,如以多糖含量作为标准,株龄2年的组培霍山石斛品质较好。

3.2 醇溶性浸出物累积规律

供试的3种石斛醇溶性浸出物含量测定结果见

表3 不同株龄的组培霍山石斛、野生霍山石斛及河南石斛多糖和乙醇浸出物的积累规律(% , Mean \pm SD)

Table 3 Accumulation of polysaccharides and ethanol-soluble extract in tissue-cultured and wild *D. huoshanense* and *D. henanense* (% , Mean \pm SD)

药材 Sample	株龄 Plant ages (year)	多糖含量 Polysaccharide content	乙醇浸出物含量 Ethanol-soluble extract content	多糖和乙醇浸出物总量 Total
组培霍山石斛 Tissue-cultured <i>D. huoshanense</i>	1	28.3 \pm 1.5	2.7 \pm 0.6	31.0 \pm 2.1
	2	31.5 \pm 2.2	7.3 \pm 0.7	38.8 \pm 2.9
	3	23.4 \pm 2.3	9.0 \pm 1.1	30.7 \pm 3.4
	4	19.1 \pm 2.5	8.0 \pm 0.9	27.0 \pm 3.5
野生霍山石斛 Wild <i>D. huoshanense</i>	1	26.2 \pm 0.8	3.1 \pm 0.8	29.3 \pm 2.5
	2	28.6 \pm 1.7	8.6 \pm 0.6	37.2 \pm 2.3
	3	24.5 \pm 0.9	14.9 \pm 1.0	39.4 \pm 1.9
	4	19.6 \pm 2.1	14.8 \pm 0.6	34.4 \pm 2.7
河南石斛 <i>D. henanense</i>	1	15.2 \pm 2.7	2.8 \pm 0.8	21.2 \pm 3.5
	2	18.4 \pm 1.4	6.9 \pm 0.3	25.3 \pm 3.0
	3	13.2 \pm 1.8	12.8 \pm 0.9	26.0 \pm 2.7
	4	9.9 \pm 1.5	12.2 \pm 1.3	22.1 \pm 2.8

4 结论与讨论

组培霍山石斛、野生霍山石斛与河南石斛多糖与醇溶性浸出物含量与生长年限密切相关。不同品种间多糖、浸出物含量存在显著差异,但动态变化规律基本一致。根据多糖与浸出物含量的动态变化,如以多糖含量为采收目标,组培霍山石斛、野生霍山

表3。方差分析结果表明,实验测定的12种石斛样品乙醇浸出物含量测定结果有统计学意义($P \leq 0.05$)。栽培1~3年,三种石斛醇溶性浸出物含量均随着生长期延长而增加,第4年出现下降,因此,从乙醇浸出物含量角度,三种石斛均以3年采收为宜。相同株龄的组培霍山石斛、野生霍山石斛及河南石斛,野生霍山石斛醇浸出物量较高,但三者之间差别不明显。

3.3 多糖和乙醇浸出物总量积累规律

三种石斛样品多糖和乙醇浸出物总量与生长年限紧密相关(表3),随着生长周期的增加多糖和乙醇浸出物总量先增加后下降,组培霍山石斛在栽培第二年,多糖与醇浸出物总量达到最大,2年后多糖和醇溶性物质总量逐年下降,而野生米斛和河南石斛多糖与醇溶性组分总量在第三年达到峰值。组培霍山石斛与野生霍山石斛多糖与醇溶性组分总量差异不显著,二者与河南石斛差别较为明显。

与河南石斛栽培2年采收为宜,如以乙醇浸出物含量为标准,三者均以生长三年的药材品质为佳,这与传统经验认为三年株龄的霍山石斛品质最佳相一致。作为霍山石斛的主要伪品——河南石斛,从多糖含量到多糖与乙醇溶出物总量,明显低于霍山石斛,因此,从多糖和以醇浸提物含量的角度考虑,河南石斛的药材品质可能低于霍山石斛。

参考文献

- 1 Lu DR (卢荣德), Tao XG (陶小平), Sun Q (孙晴), *et al.* Advances in studies on biochemical characteristics and photosynthesis process of *Dendrobium huoshanense*. *Chin Tradit Herbal Drugs* (中草药), 2010, 41:1917-1921.
 - 2 Zhang WL (张炜玲), Wang XS (王新生), Dai YF (戴亚峰), *et al.* Recent progress in the research of *Dendrobium huoshanense*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2010, 38:20661-20663.
 - 3 Chen ND (陈乃东), Gao F (高峰), Lin X (林欣), *et al.* Comparative study on alkaloids of tissue-culture seedling and wild plant of *Dendrobium huoshanense*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2014, 37:970-973.
 - 4 Chen ND (陈乃东), Li J (李俊). Comparative study on polysaccharide from tissue-cultured and wild *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium moniliforme* as well as wild *Dendrobium henanense* by PMP-HPCE fingerprint. *J Chin Med Mater* (中药材), 2015, 38(8):53-56.
 - 5 Chen ND (陈乃东), Chen H (陈瀚), Li J (李俊), *et al.* Discrimination and similarity evaluation of tissue-cultured and wild *Dendrobium* species using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Molecular Structure*, 2015, 1086:255-265.
 - 6 Chen CW (陈存武), Chen ND (陈乃东), Meng YF (孟云飞), *et al.* Quick recognition of unknown alkaloids from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo by an Alkaloid-knocking-out method and the on-line HPLC-UV-CL analysis of their antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:1000-1003.
 - 7 Wu Y (武芸), Deng JQ (邓洁群), Yang T (杨婷), *et al.* Optimization of extraction of water-soluble polysaccharides from tissue culture seedling of *Dendrobium officinale*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:1709-1714.
 - 8 He TG (何铁光), Yang LT (杨丽涛), Li YR (李杨瑞), *et al.* Physicochemical properties and antitumor activity of polysaccharide DCPPIa-1 from suspension-cultured protocorms of *Dendrobium candidum*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19:410-414.
 - 9 Sao RF (邵曰凤), Hu FQ (胡粉青), Zou C (邹澄), *et al.* Advances on studies of chemical constituents and pharmacology of plants from *Dendrobium Sw.* *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:152-157.
 - 10 Liu ZP (刘振鹏), Xu CX (徐翠霞), Liu JJ (刘京晶), *et al.* Study on accumulation of polysaccharides and alcohol-soluble extracts contents of *Dendrobium officinale* leaves. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 12:2314-2317.
 - 11 Yu QX (俞巧仙), Guo YY (郭英英), Si JP (斯金平), *et al.* Variation of polysaccharides and alcohol-soluble extracts content of *Dendrobium officinale*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 24:4769-4772.
 - 12 Xiao Q (肖强), Yang C (杨丛), Zhang Z (张峥), *et al.* Analysis of monosaccharide compositions and contents in polysaccharide of *Dendrobium officinale* from different bionic cultivation modes. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2015, 10:142-147.
 - 13 Guo YY (郭英英), Chu Y (诸燕), Si JP (斯金平), *et al.* Effects of tree species on polysaccharides content of epiphytic *Dendrobium officinale*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 21:4222-4224.
-
- (上接第 2148 页)
- 46 Geng CY (耿成燕), *et al.* Effect of olive leaf extract on repairing articular cartilage in arthritic rats. *J Clin Rehab Tissue Eng Res* (中国组织工程研究与临床康复), 2007, 11:3673-3676.
 - 47 George JA, *et al.* Evaluation of the effects of *Olea europaea* L. *subsp. africana* (Mill.) P. S. Green (Oleaceae) leaf methanol extract against castor oil-induced diarrhoea in mice. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62:368-373.
 - 48 Gong DZ (宫德正), *et al.* Repair effect of olive leaf extract on experimental cartilaginous injuries in rabbits. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2013, 27:200-204.
 - 49 Pereira AP, *et al.* Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 2007, 12:1153-1162.
 - 50 Tang ZH (唐中海). 饲料添加油橄榄叶对断奶仔兔生长及抗病力的影响. *Chinese J Veterin Med* (中国兽医杂志), 2011, 47(8):85-86.
 - 51 Bu LN (卜令娜), *et al.* Screening on the active fractions of scavenging free radical from *Olea europaea* L. leaves. *Food Ind* (食品工业), 2013, 34:131-134.
 - 52 Wang CZ (王成章), *et al.* Chemical composition and processing of olive. *Forest Sci Edu Dev* (林业科教开发), 2006, 20(2):1-4.