

基于毛兰素含量为指标的石斛属植物品质鉴别分析

黄清俊¹, 万正辉², 黄金文³, 吴范宏³

¹上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海

²上海弘路建设发展有限公司, 上海

³上海应用技术大学化学与环境工程学院, 上海

Email: huangqingjun@163.com

收稿日期: 2021年6月6日; 录用日期: 2021年7月22日; 发布日期: 2021年7月29日

摘要

目的: 《中国药典》2015年版中将毛兰素含量定为鼓槌石斛品质的判断指标, 论文采用高效液相色谱法测量39种石斛属中具有抗癌作用的毛兰素的含量。方法: 采用Shim-pack GIS C18色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm), 以乙腈 - 三氟乙酸水溶液(pH = 3.25)为流动相, 流速1.5 ml/min (水相0.9 ml/min, 有机相0.6 ml/min), 检测波长232 nm, 柱温25°C, 进样量20 μl。结论: 39种石斛仅在鼓槌石斛中检测到毛兰素, 含量为0.047%; 本检测方法准确, 快速, 重复性好, 适合石斛属植物毛兰素的含量鉴别分析。

关键词

石斛, 高效液相色谱法, 毛兰素, 抗癌作用, 品质鉴别分析

Quality Identification Analysis of *Dendrobium* Based on the Content of Erianin

Qingjun Huang¹, Zhenghui Wan², Jinwen Huang³, Fanhong Wu³

¹Ecological Technique and Engineering College, Shanghai Institute of Technology, Shanghai

²Shanghai Honglu Construction Development Company, Shanghai

³School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai

Email: huangqingjun@163.com

Received: Jun. 6th, 2021; accepted: Jul. 22nd, 2021; published: Jul. 29th, 2021

Abstract

Objective: In the 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia, the content of erianin was specified as a judgment indicator of the quality of *Dendrobium chrysotoxum*. This paper determinates the content of erianin which has anticancer effect in 39 species of *Dendrobium* by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods:** The samples were separated on Shim-pack GIS C18 column (4.6 * 250 mm; 5 μ m) using a mobile phase consisting of trifluoroacetic acid-acetonitrile (pH = 3.25) at a flow rate of 1.5 mL/min (aqueous phase: 0.9 ml/min, organic phase: 0.6 ml/min) and detected at 232 nm, and the column temperature was kept at 25°C. The injection volume was 20 μ L. **Conclusion:** Among the 17 species of *Dendrobium* determined, erianin was detected only in *Dendrobium chrysotoxum* and the content was 0.047%. This method is accurate, rapid and suitable for the identification and analysis of the content of erianin in *Dendrobium*.

Keywords

Dendrobium, High Performance Liquid Chromatography, Erianin, Anti-Cancer Activity, Quality Identification Analysis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

石斛属(*Dendrobium*)植物为兰科最大属之一,石斛为石斛属植物统称,在中国约有 74 种及 2 个变种,主要产于秦岭以南诸省,其中尤以云南为多[1]。石斛为多年生附生草本植物,多生于岩石或密林树干上。近年来野生石斛资源遭到过度挖掘,使得野生石斛处于濒危状态。

石斛作为我国传统的药用及观赏植物,有着悠久的历史。在不同时期,药用石斛的品种范围有所变化。石斛始载于《神农本草经》,因其具有多重药用功效而被历代医学家推崇[2]。《中华人民共和国药典》2015 年版中收录了金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl),鼓槌石斛(*Dendrobium chrysotoxum* Lindl),流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook)的栽培品及其同属植物近似种的新鲜或干燥茎[3]。因此,从广义上的《中国药典》以及长期的认知上看,常见的石斛均被认为是药用植物[4]。近 20 年来,国内外学者大量研究表明石斛属植物,含有多糖、生物碱、菲类、联苕类、香豆素、氨基酸等多种具有药理活性的化学成分,具有提高免疫力、抗肿瘤、抗氧化、调节血糖、抗炎等作用。

毛兰素{C₁₈H₂₂O₅,2-甲氧基-5-[2-(3,4,5-三甲氧基-苯基)-乙基]-苯酚}为分离自鼓槌石斛中的一种低分子量天然产物[5],其相对分子量为 318.36,属于联苕类化合物。《中国药典》2015 年版中将毛兰素含量定为鼓槌石斛品质的判断指标,含量不能低于 0.03% [3]。邓同兴等[6]研究发现毛兰素可在体外诱导人肺癌 A549 细胞凋亡。苏鹏等[7]研究表明毛兰素能诱导人肝癌 Huh7 细胞凋亡并使其细胞周期阻滞于 G2/M 期,从而起到抑制其增殖作用。Sun 等[8]研究发现毛兰素对人乳腺癌 T47D 细胞增殖有明显的抑制作用,能激活免疫逃逸信号通路来诱导 T47D 细胞凋亡、抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)表达,并导致细胞周期停滞,且毛兰素不影响正常乳腺上皮 MCF10A 细胞的增殖。毛兰素通过多机制、多层次起到抑制肿瘤的效果,在临床治疗方向有很大的应用前景[9]。本研究试图建立高效液相色谱法对 39 种石斛

中毛兰素含量进行检测,揭示毛兰素在这 39 种石斛中的分布情况,为石斛属植物的品质鉴定,繁育栽培、育种选种以及石斛属植物的开发及可持续利用提供化学成分依据。

2. 材料、试剂与仪器

39 种健康无病害的石斛鲜茎段,产地为云南或四川;毛兰素标准品 HPLC 纯度 $\geq 98\%$;水,乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯;LC-20A HPLC 仪(SPD-20A 紫外检测器,双泵)。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack GIS C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-三氟乙酸水溶液(pH = 3.25),流速 1.5 ml/min (水相 0.9 ml/min, 有机相 0.6 ml/min),检测波长 232 nm,进样量 20 μl ,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。在上述条件下毛兰素保留时间约为 21 min,如图 1 所示。

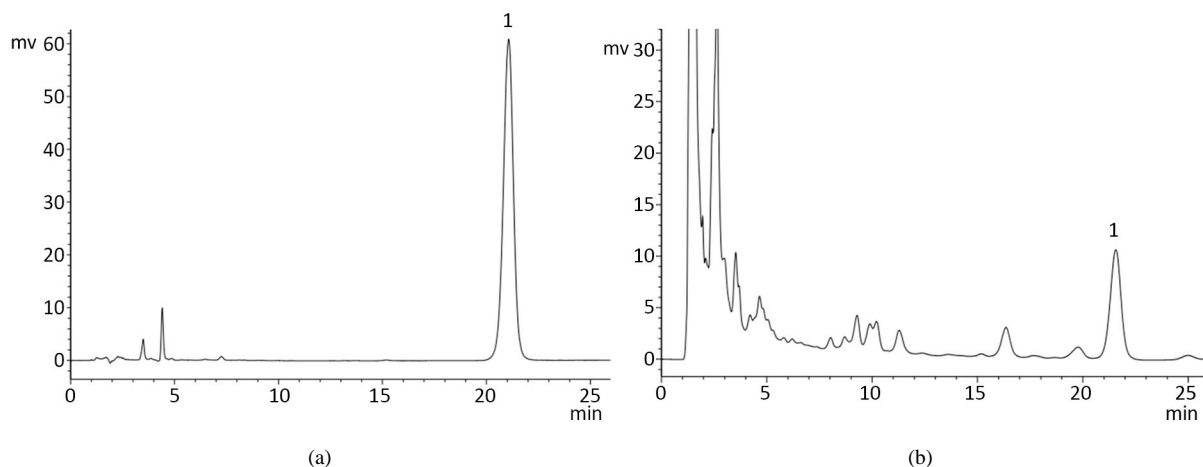


Figure 1. HPLC chromatograms of standard (a) and *D. chrysotoxum* (b); 1-erianin

图 1. 毛兰素标准品(a)、鼓槌石斛(b)的 HPLC 图; 1.毛兰素峰

3.2. 标准品溶液制备

精密称取毛兰素标准品 10.13 mg,加入 10 ml 无水乙醇,配制成浓度为 1.013 mg/ml 的标准品溶液。

3.3. 供试品溶液制备

取所收集的 39 种石斛健康无病害的石斛鲜茎段,去除叶片及叶鞘,将茎洗净并剪成小段,放于 70 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥箱中干燥后粉碎,过 40 目筛,取 250 mg 粉末,加入 10 ml 无水乙醇,超声处理 45 min (功率 250 W 频率 45 kHz),冷却后用无水乙醇补足失重,作为供试品溶液。

3.4. 方法学考察

3.4.1. 线性关系考察

将 2.2 项下标准品溶液梯度稀释,将得到的梯度浓度标准品溶液,在 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,如表 1 所示,以进样毛兰素浓度 X (mg/ml)为横坐标,色谱峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明毛兰素浓度在 0.00395703~0.126625 mg/ml 范围内呈良好的线性关系。回归方程为 $Y = 33462744.98X - 5801.6243$, $R^2 = 0.99975$ ($n = 6$)。

Table 1. Linear relationship**表 1.** 线性关系

编号 Code	浓度(mg/ml) Concentration (mg/ml)	峰面积 Peak area
1	0.126625	4,249,641
2	0.0633125	2,072,585
3	0.03165625	1,045,174
4	0.01582812	556,331
5	0.00791406	258,342
6	0.00395703	125,144

3.4.2. 精密度试验

将 2.2 项下毛兰素标准品溶液稀释三倍, 在 2.1 项色谱条件下连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算得 RSD 为 0.41% (n = 6), 如表 2 所示。

Table 2. Results of precision tests**表 2.** 精密度测定结果

进样次数 Inject number	峰面积 Peak area	平均峰面积 Mean peak area	RSD
1	4,256,371		
2	4,238,588		
3	4,205,401	4,237,560	0.41%
4	4,239,034		
5	4,236,325		
6	4,249,641		

3.4.3. 重复性试验

精密称取六份鼓槌石斛样品, 每份 250 mg, 按 2.3 项下制成供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, RSD = 2.6% (n = 6), 表明本法重复性良好(见表 3)。

Table 3. Results of reproducibility tests**表 3.** 重复性试验结果

进样次数 Inject number	峰面积 Peak area	平均峰面积 Mean peak area	RSD
1	388,540		
2	407,867		
3	385,349	389,980	2.6%
4	394,069		
5	384,180		
6	379,874		

3.4.4. 稳定性试验

取一份样品按 2.3 项下制成供试品溶液, 将 20 μ l 样品溶液在 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 分别注入液相色谱仪, 记录峰面积, RSD = 2.3% (n = 6), 样品在 10 h 内稳定性良好(见表 4)。

Table 4. Results of stability tests

表 4. 稳定性试验结果

进样次数 Inject number	峰面积 Peak area	平均峰面积 Mean peak area	RSD
1	387,885		
2	392,769		
3	388,277	382,368	2.3%
4	380,056		
5	374,349		
6	370,874		

3.4.5. 加标回收率试验

分别精密吸取已知含量的供试品溶液六份, 每份 1 ml, 分别精密加入毛兰素标准品溶液 1 ml, 加甲醇稀释至 4 ml, 注入液相色谱仪, 计算回收率, 平均回收率为 99.96%, RSD = 1.6% (n = 6), 结果表明本法具有较好的回收率(见表 5)。

Table 5. Results of recovery tests

表 5. 加样回收率试验结果

样品含量(mg) Content of sample (mg)	加入量(mg) Content of standard (mg)	测得量(mg) Measured value (mg)	回收率(%) Recovery (%)	平均回收率(%) Average recovery (%)	RSD
0.01169	0.01583	0.02734	98.86		
0.01169	0.01583	0.02749	99.81		
0.01169	0.01583	0.02717	97.80	99.96	1.6%
0.01169	0.01583	0.02777	101.58		
0.01169	0.01583	0.02746	99.62		
0.01169	0.01583	0.02785	102.08		

3.4.6. 样品测定

将 2.4.3 项中的平均峰面积代入回归方程, 计算得本试验所用的鼓槌石斛中毛兰素(以干燥品计)含量为 0.047%。所检测的 39 种石斛毛兰素检出率如表 6 所示。

Table 6. The percentage of erianin from 39 species of *Dendrobium*

表 6. 39 种石斛中毛兰素含量测定

种 Variety	产地 Origin	含量(%) Content (%)
金钗石斛 <i>Dendrobium nobile</i>	云南、四川	未检出
霍山石斛 <i>D. huoshanense</i>	四川	未检出
玫瑰石斛 <i>D. crepidatum</i>	四川	未检出

Continued

球花石斛 <i>D. thyrsiflorum</i>	云南	未检出
黑毛石斛 <i>D. williamsonii</i>	四川	未检出
肿节石斛 <i>D. pendulum</i>	四川	未检出
报春石斛 <i>D. polyanthum</i>	四川	未检出
棒节石斛 <i>D. findlayanum</i>	四川	未检出
春石斛 <i>D. hybrid</i>	四川	未检出
束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>	四川	未检出
铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	四川	未检出
流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>	四川	未检出
天宫石斛 <i>D. aphyllum</i>	四川	未检出
鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i>	云南	0.047
红牙刷石斛 <i>D. secundum</i>	四川	未检出
晶帽石斛 <i>D. crystallinum</i>	四川	未检出
短棒石斛 <i>D. capillipes</i>	四川	未检出
叠鞘石斛 <i>D. denneanum</i>	四川	未检出
尖刀唇石斛 <i>D. heterocarpum</i>	四川	未检出
杓唇石斛 <i>D. moschatum</i>	四川	未检出
剑叶石斛 <i>D. acinaciforme</i>	四川	未检出
黄贝壳石斛 <i>D. primulinu</i>	云南	未检出
长苏石斛 <i>D. brymerianum</i>	四川	未检出
矩唇石斛 <i>D. linawianum</i>	四川	未检出
滇金石斛 <i>Flickingeriaalbopurpurea</i>	云南	未检出
反瓣石斛 <i>D. ellipsophyllum</i>	云南	未检出
紫婉石斛 <i>D. transparens</i>	四川	未检出
细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	云南	未检出
细叶石斛 <i>D. hancockii</i>	四川	未检出
蜻蜓石斛 <i>D. pulchellum</i>	四川	未检出
秋石斛 <i>D. phalaenopsis</i>	四川	未检出
重唇石斛 <i>D. hercoglossum</i>	四川	未检出
翅梗石斛 <i>D. trigonopus</i>	四川	未检出
龙石斛 <i>D. draconis</i>	四川	未检出
杯鞘石斛 <i>D. gratiosissimum</i>	四川	未检出
血喉石斛 <i>D. ochraceum</i>	四川	未检出
紫瓣石斛 <i>D. parishii</i>	四川	未检出
大苞鞘石斛 <i>D. wardianum</i>	四川	未检出
红牙刷石斛 <i>D. secundum</i>	四川	未检出

4. 讨论

本实验中流动相采用乙腈-磷酸溶液和乙腈-三氟乙酸水溶液,将毛兰素标准品注入液相色谱后,前者毛兰素峰出现较大前沿峰,且峰宽较大,稳定性差;后者只有将三氟乙酸水溶液 pH 调至 3.25 时所得毛兰素峰峰形最好,理论塔板数达 8600 以上,且分离度高,故选择后者作为流动相。超声时间分别采用了 15 min、45 min 和 60 min,结果显示超声 15 min 毛兰素提取率明显低于 45 min,超声 60 min 和超声 45 min 提取率差别不大,为保证药材的提取率以及经济性和简易性,故选择超声 45 min。另外,本研究中溶剂选择无水乙醇,而《中国药典》2015 版中测量毛兰素的方法使用的溶剂为甲醇,由于毛兰素在甲醇及无水乙醇中的溶解度没有差别,考虑到本次试验所测石斛品种较多,所以选择更加经济的无水乙醇作为溶剂。

本研究所测 39 种石斛中,仅在鼓槌石斛中检测到含量为 0.047% 的毛兰素,其毛兰素含量高于《中国药典》2015 年版中 0.03% 品质判断指标;其余 38 种石斛均未检出。部分结果与同类研究存在差异。夏克中等[10]在云南产的鼓槌石斛中检出毛兰素含量高于 0.16%;本次试验中在金钗石斛和铁皮石斛中均未检测到毛兰素,但有研究报道在铁皮石斛和金钗石斛中发现毛兰素[11][12]。造成这些差异的原因可能有多种情况。陈晓梅等[13]报道了石斛中联苯类成分受到栽培方式、生长环境等的影响;龚庆芳等[14][15]研究表明铁皮石斛和鼓槌石斛中毛兰素含量受产地和光照强度的影响;杨虹等[16]测量了不同采收时期的鼓槌石斛中毛兰素的含量,发现采收时期不同的鼓槌石斛中毛兰素含量差异巨大。显然,石斛中毛兰素的含量受到多方面因素的影响,是由其基因(不同种及品种)和环境(生长条件、生长期及生长年限等)相互作用的结果。所以,在鉴别或培养优质石斛时,首先需要注意种间差异;其次,即使筛选出优良的石斛,也需要比较不同品种在不同环境以及不同生长年限下的品质差异,只有这样才能真正全面而客观地评价石斛品质。

基金项目

上海应用技术大学协同创新基金(XTCX2018-3)。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 67.
- [2] 孙恒, 胡强, 金航, 王元忠. 铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 225-234.
- [3] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 92-282.
- [4] 张雪琴, 赵庭梅, 刘静, 赵若茜, 郑世刚, 淳泽, 等. 石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(13): 3174-3182.
- [5] 马国祥, 徐国钧, 徐洛珊, 王侑先. 鼓槌石斛及其化学成分的抗肿瘤活性作用[J]. 中国药科大学学报, 1994(3): 188-189.
- [6] 邓同兴, 王敏丽, 温文静, 袁磊. 毛兰素通过 ROS/p38 MAPK 通路诱导人肺癌 A549 细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(8): 1457-1462.
- [7] 苏鹏, 王晶, 安君霞, 朱启晟, 卢晓霞, 唐亚雄. 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, 17(5): 662-665.
- [8] Sun, J., Fu, X., Wang, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Hao, T., et al. (2016) Erianin Inhibits the Proliferation of T47D Cells by Inhibiting Cell Cycles, Inducing Apoptosis and Suppressing Migration. *American Journal of Translational Research*, **8**, 3077-3086.
- [9] 李震, 曹奕鸥, 肖立俊, 刘绍群, 陈义, 苏畅. 毛兰素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2442-2444.

-
- [10] 夏克中, 王增, 陈立钻. 鼓槌石斛中抗癌成分毛兰素的含量测定研究[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(1): 63-66.
- [11] 吕英俊, 陈群. 铁皮石斛化学成分研究及其对 HepG2 细胞胆固醇代谢影响[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(1): 225-227.
- [12] 许莉, 王江瑞, 郭力, 张廷模. 金钗石斛化学成分的研究[J]. 中成药, 2018, 40(5): 1110-1112.
- [13] 陈晓梅, 王芳菲, 王云强, 李学兰, 王爱荣, 王春兰, 等. 基于柚皮素、联苜和多糖分析的珍贵药用植物铁皮石斛鉴别分析[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(12): 1002-1009.
- [14] 龚庆芳, 周浩, 王新桂, 何金祥, 付传明, 郭伦发. 不同产地铁皮石斛的品质比较研究[J]. 北方园艺, 2013(8): 162-165.
- [15] 龚庆芳, 黄宁珍, 何金祥, 周浩. 不同光照强度对鼓槌石斛生长特性和化学成分的影响[J]. 北方园艺, 2015(23): 155-159.
- [16] 杨虹, 毕志明, 项素云, 王峥涛, 徐珞珊. 不同采收期鼓槌石斛中酚类化合物的测定[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1885-1886.