

# 铁皮石斛中甘露糖的提取与检测方法优化

叶少文\*

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要: 目的** 对中华人民共和国药典一部(2015版)中铁皮石斛中甘露糖的含量测定方法进行讨论, 简化已有方法的实验操作步骤。**方法** 使用超声提取法代替索氏提取法去除铁皮石斛样品中的游离单糖, 使用微波法代替煎煮法提取样品中的甘露糖, 去除衍生反应和内标法定量步骤。样品提取液经微孔滤膜过滤后, 采用药典中的高效液相色谱法分析, 外标法定量分析甘露糖的含量。**结果** 甘露糖在0.054~0.648 mg/mL的浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数  $r > 0.999$ 。甘露糖在3个不同添加水平下的平均回收率分别为97.66%、98.10%和98.68%。**结论** 本方法大大缩短了样品的前处理时间, 操作简便、准确度和精密度良好, 可以用于铁皮石斛中甘露糖的含量测定。

**关键词:** 铁皮石斛; 甘露糖; 微波提取; 高效液相色谱法

## Optimization of the extraction and detection method of mannose in *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo

YE Shao-Wen\*

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To discuss the detection method of mannose in *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo in *harmacopoeia of People's Republic of China Part I (2005 Edition)* and simplify the operation steps of existing method. **Methods** The free monosaccharide in *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo samples was removed by ultrasonic extraction method instead of soxhlet extraction, and the mannose in samples was extracted by microwave method instead of dew decoction method. There was no derivative reaction and internal standard method in this method. The sample extract was filtered by microporous filtering film, then analyzed by the high performance liquid chromatography (HPLC) described in *harmacopoeia*, and the content of mannose was determined by external standard method. **Results** There was a good linear relationship between the mannose content which ranged from 0.054~0.648 mg/mL and peak area with the correlation coefficient ( $r$ ) greater than 0.999. The average recoveries of mannose at 3 different adding levels were 97.66%, 98.10% and 98.68%, respectively. **Conclusion** This method is simple, accurate, precise, and greatly shorten the processing time, which can be used to the content determination of mannose in *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo.

**KEY WORDS:** *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo; mannose; microwave extraction; high performance liquid chromatography

\*通讯作者: 叶少文, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 442884571@qq.com

\*Corresponding author: YE Shao-Wen, Licensed Pharmacist, By-Health Co., Ltd, Zhuhai 519040, China. E-mail: 442884571@qq.com

## 1 引言

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), 别名黑节草, 为兰科石斛属多年生草本植物。成书于一千多年前的道家医学经典《道藏》将铁皮石斛列为“中华九大仙草”之首, 其因独特的药用价值和保健功效成为历代养生滋补佳品, 素有“千金草”和“软黄金”之称<sup>[1]</sup>。铁皮石斛药用历史悠久, 其药用成分丰富均衡, 含有丰富的多糖和生物碱等功效成分<sup>[2]</sup>, 具有抗肿瘤、抗衰老及增强机体免疫力等作用<sup>[3]</sup>。本研究对中华人民共和国药典一部(2015版)<sup>[4]</sup>中铁皮石斛中甘露糖的含量测定方法进行讨论, 对甘露糖的提取及测定方法进行优化, 用超声提取法代替索氏提取法去除样品中的游离单糖, 用微波提取法代替煎煮法提取样品中的甘露糖<sup>[5]</sup>, 不需生化步骤和内标法分析, 以期建立一种操作更为简便的铁皮石斛中甘露糖含量的测定方法<sup>[6]</sup>。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂和仪器

甘露糖标准品(纯度为100%, 中国药品生物制品检定所); 一级用水; 浓硫酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 氢氧化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 铁皮石斛(汤臣倍健股份有限公司)。

Waters e2695 高效液相色谱仪(配备折射光示差检测器, 美国 Waters 公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 液相色谱条件

色谱柱: 菲罗门 Rezex RCM-Monosaccharide  $\text{Ca}^{2+}$  色谱柱(300mm×7.8 mm)或同等性能的  $\text{Ca}^{2+}$  型糖柱<sup>[7]</sup>; 柱温: 65 °C; 折射光示差检测器温度: 65 °C; 流动相为水, 流速: 0.4 mL/min; 进样量: 40  $\mu\text{L}$ ; 运行时间: 40 min<sup>[8]</sup>。

#### 2.2.2 标准曲线的绘制

标准溶液的配制: 称取甘露糖标准品 50 mg, 加纯化水超声溶解后用纯化水定容至 10 mL, 配制浓度为 5.0 mg/mL 的标准储备液, 于 4 °C 避光保存。分别取上述标准储备液 0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.2 mL 至 10 mL 容量瓶中, 稀释成浓度为 0.5、0.10、0.20、0.40 和 0.60 mg/mL 的标准品供试液。

将甘露糖标准品供试液经 0.45  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜过滤, 进行高效液相色谱分析, 记录色谱图, 以标准品浓度( $X$ )为横坐标, 相应的标准品峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归方程<sup>[8]</sup>。

#### 2.2.3 样品供试液的配制

精密称取样品研磨粉末(过三号筛)适量(约 0.1 g, 相当于 0.15 mg/mL 标准品浓度的量)于 250 mL 锥形瓶中, 加

入 80%乙醇溶液 150 mL, 超声 20 min; 弃去乙醇溶液, 挥干药渣中的乙醇溶液; 向药渣中加入 30 mL 纯化水, 微波(400 W)提取 5 min; 取出冷却至室温后转入 50 mL 离心管, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 mL 至 25 mL 比色管中, 加入 1.5 mL 12%硫酸溶液, 塞好盖子, 在电热鼓风箱中 110 °C 加热水解 60 min; 取出冷却至室温, 用 10%氢氧化钠溶液调节 pH 至中性(pH 试纸测定), 用纯化水定容至 25 mL, 摇匀, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 得样品供试液<sup>[9]</sup>。

样品同时采用中华人民共和国药典一部(2015 版)中的方法进行测定。

#### 2.2.4 精密度实验

精密称取 6 份样品, 按“2.2.3”中的方法制备样品供试液, 测定样品中甘露糖的含量, 计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)<sup>[10]</sup>。

#### 2.2.5 加标回收实验

精密称取 9 份样品研磨粉末(过三号筛)适量(约相当于 0.10 mg/mL 标准品浓度的量)于 50 mL 锥形瓶中, 将样品分成 3 组, 每组 3 份样品, 每组样品中分别加入甘露糖标准品 6.0、7.5 和 9 mg (半定量加标, 大约相当于 40%、50% 和 60% 的添加水平), 每份样品定量加入 30 mL 纯化水, 微波(400 W)提取 5 min; 取出冷却至室温后转入 50 mL 离心管, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 mL 至 25 mL 比色管中, 加入 1.5 mL 12%硫酸溶液, 塞好盖子, 在电热鼓风箱中 110 °C 加热水解 60 min; 取出冷却至室温, 用 10%氢氧化钠溶液调节 pH 至中性(pH 试纸测定), 用纯化水定容至 25 mL, 摇匀, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 得加标样品溶液, 进行高效液相色谱测定<sup>[11]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 甘露糖的标准曲线

甘露糖的标准曲线如图 1 所示, 其标准曲线方程为  $Y=852119X-6114.9$ ,  $r=0.9999$ , 表明甘露糖标准品在 0.054~0.648 mg/mL 的浓度范围内具有良好的线性关系<sup>[12]</sup>。

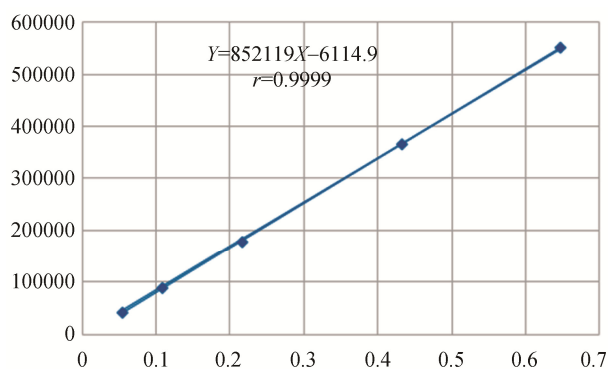


图1 甘露糖的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of mannose

### 3.2 检出限和定量限

方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantification, LOQ)由信噪比( $S/N$ )计算。LOD 定义为  $S/N=3$  时对应的样品浓度, LOQ 定义为  $S/N=10$  时对应的样品浓度<sup>[13]</sup>。

#### 3.2.1 检出限

将甘露糖浓度为  $0.15 \mu\text{g/mL}$  的对照溶液进样分析, 通过工作软件计算得  $S/N=3$ 。按实际样品的处理过程计算, 甘露糖测定的方法检出限为:  $0.15 \mu\text{g/mL} \times 150 \text{ mL} / 1000 / 100 \text{ mg} \times 100\% = 0.0225\%$

#### 3.2.2 定量限

根据上述 LOD 和 LOQ 的定义,  $\text{LOQ} = \text{LOD} / 3 \times 10$ , 按照实际样品的处理过程计算, 甘露糖测定的方法定量限为:  $0.0225\% / 3 \times 10 = 0.075\%$ 。

### 3.3 精密度实验

6 份样品的甘露糖含量检测结果分别为 22.13%、22.36%、22.24%、22.40%、22.31%及 22.25%,  $\text{RSD} < 1.3\%$ , 表明该方法精密度良好<sup>[14]</sup>。

### 3.4 加标回收实验

甘露糖在 3 个不同添加水平下的回收率结果见表 1, 从表 1 中可以看出, 3 个添加水平下样品中甘露糖的平均回收率分别为 97.66%、98.10%及 98.68%,  $\text{RSD}$  分别为 0.5%、0.5%及 1.2% 表明该方法准确度良好<sup>[15]</sup>。

### 3.5 样品测定

#### 3.5.1 实际样品测定

样品及甘露糖标准品的色谱图分别如图 2 和图 3 所示, 铁皮石斛粉中甘露糖的分离效果良好, 不会受杂质峰的影响。将样品色谱图与甘露糖标准品色谱图进行比对, 以目标峰的保留时间定性。

将采用本研究中的方法测得的铁皮石斛样品中的甘露

糖含量与采用中国药典一部(2015 版)中方法的测定结果进行比较, 由表 2 可知, 2 种方法 2 种方法的准确度相当。

表 1 加标回收率实验结果  
Table 1 The results of recoveries

理论加标量 (mg)	样品中标准品的含量(mg)	回收率(%)	平均回收率 (%)	RSD(%)
6.00	5.90	98.006		
5.98	5.82	97.324	97.66	0.5
5.94	5.83	98.148		
7.53	7.36	97.742		
7.48	7.36	98.395	98.10	0.5
7.61	7.53	98.160		
9.13	8.95	98.028		
9.08	8.91	98.127	98.68	1.2
9.11	9.10	99.890		

## 4 讨论与结论

甘露糖是中华人民共和国药典一部(2015 版)中铁皮石斛检测的功效指标之一, 药典中的方法以水浴提取铁皮石斛粉中的多糖后, 用盐酸将多糖酸解成单糖, 用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮-甲醇溶液衍生, 以十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱测定, 内标法定量。方法中的样品前处理操作相对复杂且耗时较长, 本研究对药典中的方法进行了优化, 得到了一个相对简便且准确的甘露糖检测方法, 即: 用微波提取代替水浴提取, 使用糖柱直接测定甘露糖的含量,

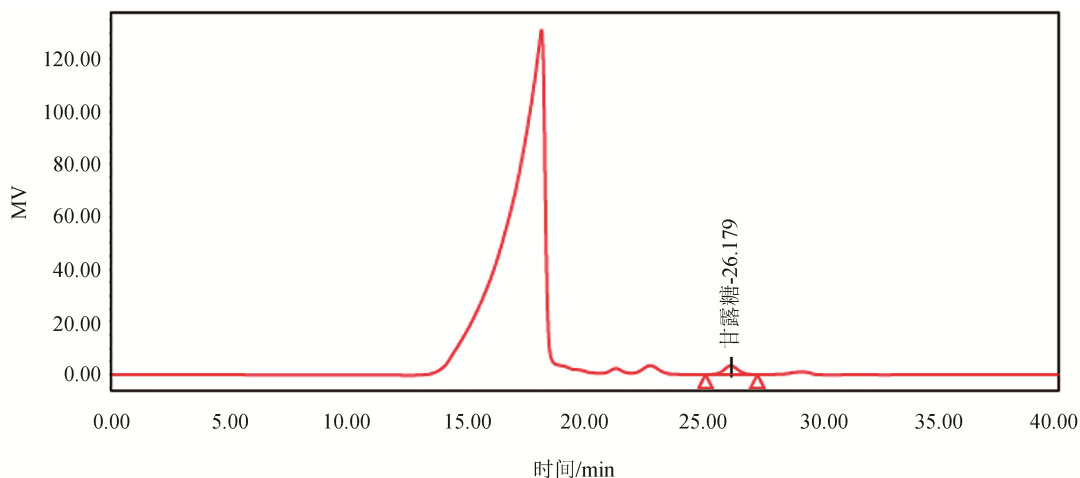


图 2 样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of sample

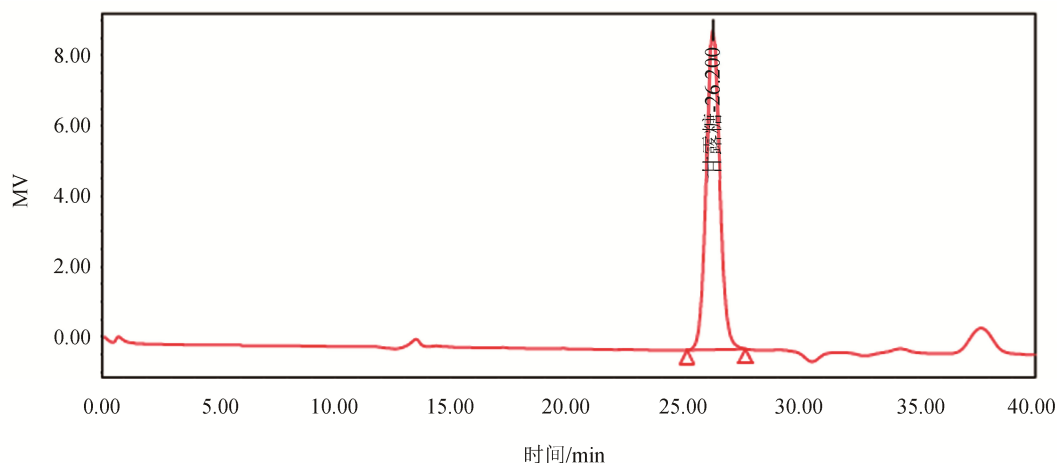


图3 甘露糖标准品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of mannose standard

表2 甘露糖含量测定结果比较

Table 2 The comparison of mannose contents

序号	本方法测得的含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)	中国药典一部(2015版)方法测得的含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
				21.58		
1	22.13			22.06	22.28	0.5
2	22.36			22.13		
3	22.24			21.51		
4	22.40	22.28	0.5	22.06		
5	22.31			22.02		
6	22.25					

免去了衍生步骤,且用外标法定量。2种方法的测定结果表明,本研究中的方法的准确度和精密度良好,符合检测要求。药典方法的样品前处理操作时间为320 min,本研究方法的样品前处理时间为80 min,显著缩短了前处理时间,提高了样品前处理步骤的操作效率。

#### 参考文献

- 钱桂敏,章华泼. 金钗石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 21(4): 112-113.  
Qian GM, Zhang HP. Research progress of the chemical components and pharmacological activity of Gold hair pin caulis dendrobii [J]. Chin Med Mod Dist Educ China, 2011, 21(4): 112-113.
- 王伟英,邹晖,陈永快,等. 铁皮石斛的综合利用与展望[J]. 中国园艺文摘, 2011, 14(1): 25-26.  
Wang WY, Zou H, Chen YK, et al. Comprehensive utilization and prospect of *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo [J]. Chin Hortic Abstr, 2011, 14(1): 25-26.
- 高秀娟,王春生. 鲜品铁皮石斛的应用介绍[J]. 北京中医药, 2013, 10(7): 104-106.  
Gao XJ, Wang CS. Application of fresh *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2013, 10(7): 104-106.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部(2015版) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.  
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China Part I (2015 Edition) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- 杨虹,王顺春,王峥涛,等. 铁皮石斛多糖的研究[J]. 中国药理学杂志, 2004, 15(4): 58-60.  
Yang H, Wang SC, Wang ZT, et al. The research of mannose in *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo [J]. Chin Pharm J, 2004, 15(4): 58-60.
- 陈晓梅,郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 02(1): 13-15.  
Chen XM, Guo SX. Research progress of chemical composition and pharmacological activity of plants belong to *Dendrobium* Sw. [J]. Nat Prod Res Dev, 2001, 02(1): 13-15.
- 王静,王晴,向文胜. 色谱法在糖类化合物分析中的应用[J]. 分析化学, 2013, 41(1): 1-5.

- 2001, 11(2): 43-45.
- Wang J, Wang Q, Xiang WS. Application of chromatography in the analysis of carbohydrate compounds [J]. Chin J Anal Chem, 2001, 11(2): 43-45.
- [8] 黄民权, 黄步汉, 蔡体育, 等. 铁皮石斛多糖的提取、分离和分析[J]. 中草药, 1994, 05(3): 72-75.
- Huang MQ, Huang BH, Cai TY, et al. Extraction, separation and analysis of mannose in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1994, 05(3): 72-75.
- [9] 尚喜雨. 水提法-酶法提取铁皮石斛多糖的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 22(18): 47-49.
- Shang XY. Comparative study on the extraction of polysaccharide from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo using water extraction method and enzyme method [J]. Anhui Agric Sci, 2010, 22(18): 47-49.
- [10] 刘焕兰, 尚子义, 曲卫玲. 铁皮石斛保健产品的研究开发价值 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 10(18): 52-53
- Liu HL, Shang ZY, Qu WL. Tin caulis dendrobii health products research and development value [J]. Journal of China national folk medicine. 2010 (18), 10 52-53
- [11] 吕佳妮, 陈素红, 徐娟华. 铁皮石斛根中石斛多糖的响应面法提取优化研究 [J]. 浙江中医杂志, 2014, 05(06): 11-13
- Lv JN, Chen SH, Xu JH. Caulis dendrobii polysaccharide of Tin caulis dendrobii root's extraction of the response surface method optimization study [J]. Journal of zhejiang of traditional Chinese medicine, 2014, 05 (06): 11-13
- [12] 汪群红, 何贤君, 鲍珍贝等. 不同来源铁皮石斛中多糖、氨基酸和生物碱含量比较 [J]. 中药材, 2014, 11(05): 42-44
- Wang QH, He XJ, Bao ZB Etc. Different sources of iron polysaccharides, amino acids and alkaloid content in caulis dendrobii comparison [J]. Journal of traditional Chinese medicine. 2014, 11 (05): 42-44
- [13] 聂少平, 蔡海兰. 铁皮石斛活性成分及其功能研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 02(23): 75-77
- Nie SP, Cai HL. Tin caulis dendrobii active ingredient and its research progress function [J]. Journal of food science. 2012, 02 (23): 75-77
- [14] 顾慧芬, 忻晓君, 周文婷等. 铁皮石斛试管苗快速生长与栽培研究及多糖含量测定 [J]. 中成药, 1999, 06(12): 18-20
- Gu HF, Xin XJ, Zhou WT Etc. Tin caulis dendrobii tube seedlings growth and cultivation research and polysaccharide content determination [J]. Proprietary of Chinese medicine. 1999, 06(12): 18-20
- [15] 何铁光, 杨丽涛, 李扬瑞等. 铁皮石斛原球茎多糖提取最佳工艺研究 [J]. 西北农业学报, 2006, 12(05): 21-23
- He TG, Yang LT, Li YR Etc. Tin caulis dendrobii protocorm polysaccharide extract optimum technological research [J]. Journal of northwest agriculture. 2006, 12 (05): 18-20

(责任编辑: 刘 丹)

## 作者简介



叶少文, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。  
E-mail: 442884571@qq.com