

# 铁皮石斛组织培养苗活性成分变化规律研究

姜 硕<sup>1,2</sup>, 许哲祥<sup>1,2</sup>, 吴 桐<sup>1,3\*</sup>, 郑春英<sup>1,2\*</sup>

(1. 黑龙江大学, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江哈尔滨 150500; 2. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高校微生物重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080; 3. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高校分子生物学重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080)

**摘要** [目的]研究铁皮石斛组织培养苗活性成分变化规律,探讨其与组培苗生长的相关性。[方法]分别采用比色法和 HPLC 法对不同培养时间的铁皮石斛组织培养苗中多糖和黄酮含量进行测定。[结果]随着培养时间的增长,铁皮石斛组织培养苗中活性成分也不断增长,二者呈现出正相关性。[结论]采用活性成分含量测定方法可监测铁皮石斛组织培养苗的质量。

**关键词** 铁皮石斛;组织培养苗;多糖;黄酮;变化规律

**中图分类号** R 931 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2020)23-0218-02

**doi**:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.23.056

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Study on the Variation of Active Compounds in the Tissue Culture Seedling of *Dendrobium officinale*

JIANG Shuo<sup>1,2</sup>, XU Zhe-xiang<sup>1,2</sup>, WU Tong<sup>1,3</sup> et al (1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150500; 2. Key Laboratory of Microbiology, College of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080; 3. Key Laboratory of Molecular Biology, College of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080)

**Abstract** [Objective] The variation of active compounds in the tissue culture seedling of *Dendrobium officinale* was studied in order to analyze the relation with the growth of the tissue culture seedling of *Dendrobium officinale*. [Method] Colorimetric method and HPLC method were used to determine the content of polysaccharides and flavones in tissue culture seedlings of *Dendrobium officinale* at different culture time. [Result] With the increase of the cultivation time, the active ingredients in the tissue culture seedlings of *Dendrobium officinale* also increased, and the two showed a positive correlation. [Conclusion] The quality of the tissue culture seedling of *Dendrobium officinale* can be evaluated by determination of the active compounds.

**Key words** *Dendrobium officinale*; Tissue culture seedling; Polysaccharide; Flavone; Variation

铁皮石斛, 兰科植物铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 的干燥茎<sup>[1]</sup>, 药食两用名贵中药材, 具有益胃生津、滋阴清热的功效<sup>[2]</sup>, 含有多糖、黄酮、生物碱、氨基酸等多种活性成分<sup>[3]</sup>, 具有抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、降血糖<sup>[6]</sup>等活性作用。近年来, 由于过度开采及各种环境因素的改变, 使得铁皮石斛成为濒危药用植物, 现被收录于《国家重点保护野生药材物种名录》<sup>[7]</sup>。

为了快速满足大众消费, 植物组织培养技术以其快速生产繁育能力及工厂化生产能力, 现已成为解决铁皮石斛资源短缺的最有效途径<sup>[8]</sup>。鉴于植物组织培养技术在铁皮石斛生产中的广泛应用, 笔者以多糖和黄酮含量为指标, 比较不同培养时期铁皮石斛组织培养苗中活性成分的动态积累情况, 为高质量提高铁皮石斛组织培养的生产能力奠定基础。

## 1 材料与方

**1.1 试材与试剂** 1/2MS 培养基<sup>[9]</sup>。铁皮石斛原球茎, 泉州正和堂生物科技有限公司惠赠; 葡萄糖对照品 (美国 Sigma 公司); 芦丁对照品 (中国药品生物制品检定院)。甲醇为色谱纯级别, 其他试剂均为分析纯。

**1.2 仪器与设备** FL2200 型高效液相色谱仪 (浙江福立分析仪器有限公司); 752 分光光度计 (上海广谱仪器有限公司)。

**作者简介** 姜硕 (1997—), 女, 黑龙江大庆人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物制药。\*通信作者: 吴桐, 讲师, 从事寒区植物基因与生物发酵研究; 郑春英, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物制药研究。

**收稿日期** 2020-05-07

## 1.3 铁皮石斛组织培养苗中多糖的动态变化

**1.3.1 供试品溶液的制备。**分别取不同培养时间的铁皮石斛组织培养苗, 烘干, 精密称取 0.5 g, 加水溶解 (料液比为 1:10), 以 50 ℃ 超声提取 45 min, 过滤, 重复提取 2 次, 合并滤液, 以 50 ℃ 减压浓缩至 5 mL 左右, 加入 95% 乙醇溶液使醇浓度达到 80%, 放置过夜, 弃去上清液, 3 000 r/min 离心 5 min, 将沉淀烘干。分别精密称取 0.3 g, 加水定容至 1 mL, 作为多糖供试品溶液, 备用。

**1.3.2 对照品溶液的制备。**精密称取葡萄糖对照品 2.5 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加水溶解, 定容至刻度, 摇匀, 即为对照品溶液 (0.1 mg/mL), 备用。

**1.3.3 葡萄糖对照品标准曲线的绘制。**参照文献 [10], 采用蒽酮-硫酸法, 测定其在 625 nm 处的吸光度。以对照品溶液的浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线方程为  $y = 0.5714x + 0.0118$  ( $r = 0.9991$ ), 表明葡萄糖对照品在 0.1~0.5 mg/mL 线性关系较好。

**1.3.4 铁皮石斛组织培养苗中多糖的动态变化。**参照文献 [11] 进行。

## 1.4 铁皮石斛组织培养苗中黄酮的动态变化

**1.4.1 色谱条件。**色谱柱为 Venusil XBP-C<sub>18</sub> 柱; 流动相为甲醇-水 (50:50); 流速为 1 mL/min; 检测波长为 254 nm。

**1.4.2 供试品溶液的制备。**分别取不同培养时间的铁皮石斛组织培养苗, 烘干, 精密称取 0.2 g, 加入 95% 乙醇 (料液比 1:30), 以 50 ℃ 超声提取 45 min, 过滤, 重复提取 3 次, 合并滤液, 在 50 ℃ 条件下减压浓缩至干, 残渣以 1 mL 甲醇溶解, 作

为供试品溶液,备用。

**1.4.3 对照品溶液的制备。**精密称取芦丁对照品 0.2 mg,加入适量色谱甲醇溶解,制成 0.2 mg/mL 的芦丁对照品溶液,备用。

**1.4.4 芦丁对照品线性关系考察。**取不同浓度的芦丁对照品溶液,各吸取 10  $\mu$ L 注入 HPLC 中,以芦丁浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得到线性方程为  $y = 9\,924\,681x + 22\,764$  ( $r = 0.999\,8$ ),最低检出质量浓度(以  $S/N \geq 3$  计)为 0.6  $\mu$ g/mL,表明芦丁在 0.06~0.30 mg/mL 具有良好的线性关系。

**1.4.5 铁皮石斛组织培养苗中黄酮的动态变化。**将“1.4.2”中各供试品溶液注入 HPLC,以“1.4.1”色谱条件进行分析测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 铁皮石斛组织培养苗中多糖的动态变化

**2.1.1 多糖测定方法学考察。**精密度试验、重复性试验、葡萄糖对照品在 12 h 内稳定性试验的 RSD 分别为 0.95%、1.32% 和 1.97%;平均加样回收率为 98.82%,RSD 为 3.01%。

**2.1.2 铁皮石斛组织培养苗中多糖的动态变化。**对不同培养时间的铁皮石斛组织培养苗中多糖进行测定,结果见图 1。从图 1 可以看出,在铁皮石斛组织培养苗的培养过程中,在 7~28 d 的培养阶段,多糖含量显著增长,表明铁皮石斛培养苗在此阶段处于生长旺盛期;在 28~42 d 的培养过程中,多糖含量处于缓慢增长的过程。由此说明,培养时间与多糖含量呈正相关,随着培养时间的增长,其多糖含量也呈现不断积累的过程,但达到一定的培养时间后,其多糖含量增长减慢并会随着组织培养苗的成熟而达到平稳的程度。

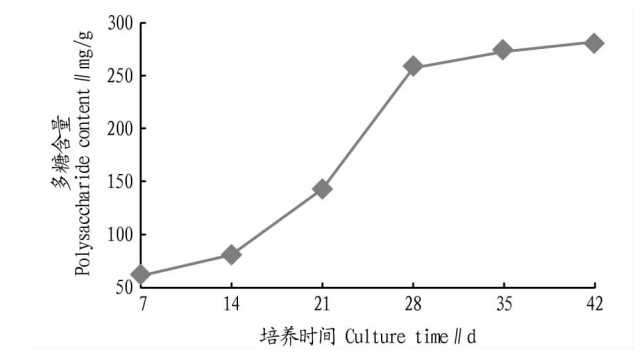


图 1 铁皮石斛组织培养苗中多糖含量变化  
Fig. 1 Changes of polysaccharide content in tissue culture seedlings of *Dendrobium officinale*

### 2.2 铁皮石斛组织培养苗中黄酮的动态变化

**2.2.1 黄酮测定方法学考察。**精密度试验、重复性试验、芦丁对照品在 24 h 内稳定性试验的 RSD 分别为 0.68%、0.82% 和 1.56%;平均加样回收率为 99.06%,RSD 为 2.47%。

**2.2.2 铁皮石斛组织培养苗中黄酮的动态变化。**对不同培养时间的铁皮石斛组织培养苗中芦丁进行测定,结果见图 2~3。从图 2~3 可以看出,在铁皮石斛组织培养苗的培养过程中,在 7~21 d 的培养阶段,芦丁含量处于增长的状态;在 21~28 d 的培养阶段,芦丁含量显著增长,表明铁皮石斛培养

苗在此阶段处于生长旺盛期;在 28~42 d 的培养过程中,芦丁含量处于平稳增长的过程。由此说明,培养时间与芦丁含量也呈正相关,随着培养时间的增长,其芦丁含量也呈现不断积累的过程,但达到一定的培养时间后,其芦丁含量增长减慢并会随着组织培养苗的成熟而达到平稳的程度。

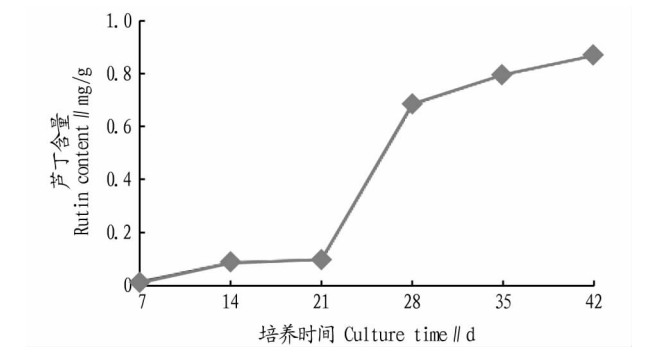
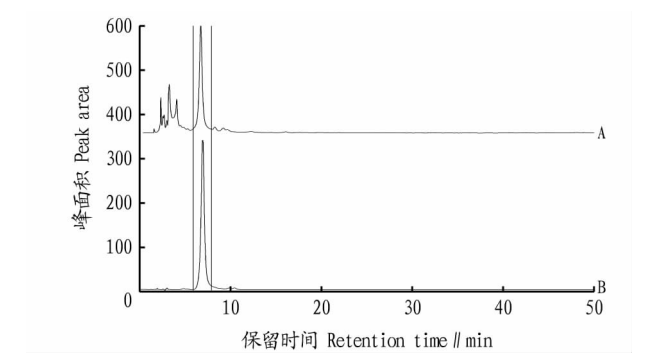


图 2 铁皮石斛组织培养苗中芦丁含量  
Fig. 2 The rutin contents in the tissue culture seedling of *Dendrobium officinale*



注:A. 铁皮石斛组织培养苗供试品;B. 芦丁对照品  
Note:A. Test substance of the tissue culture seedling of *Dendrobium officinale*;B. Rutin reference substance

图 3 铁皮石斛组织培养苗 HPLC 色谱图  
Fig. 3 HPLC chromatograms of the tissue culture seedling of *Dendrobium officinale*

## 3 结论

该研究采用多糖和黄酮含量为指标监控铁皮石斛组织培养苗的生长发育动态,并通过上述 2 种成分的动态积累过程描述铁皮石斛组织培养苗的质量,结果表明,铁皮石斛组织培养苗的品质可以替代人工栽培,该结果可为解决铁皮石斛资源紧缺提供参考。

## 参考文献

- [1] DING J T, TU H Y, ZANG Z L, et al. Precise control and prediction of the greenhouse growth environment of *Dendrobium candidum* [J]. Computers and electronics in agriculture, 2018, 151: 453–459.
- [2] WANG M Y, SHEN C, AN M F, et al. Combined treatment with *Dendrobium candidum* and black tea extract promotes osteoprotective activity in ovariectomized estrogen deficient rats and osteoclast formation [J]. Life sciences, 2018, 200: 31–41.
- [3] CUI H Y, MURTHY H N, MOH S H, et al. Protocorm culture of *Dendrobium candidum* in balloon type bubble bioreactors [J]. Biochemical engineering journal, 2014, 88: 26–29.
- [4] GUO Z B, ZHOU Y M, YANG J P, et al. *Dendrobium candidum* extract inhibits proliferation and induces apoptosis of liver cancer cells by inactivating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2019, 110: 371–379.

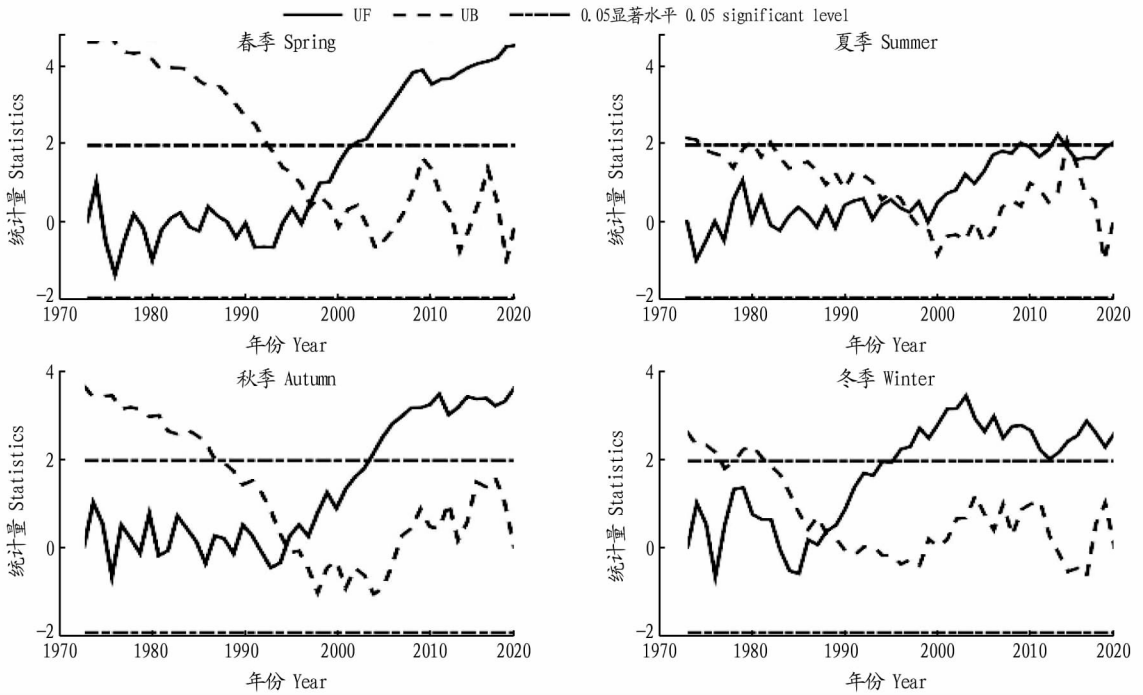


图 4 1973—2019 年黄石市四季平均气温的 M-K 检验曲线

Fig. 4 M-K test of average temperature in four seasons of Huangshi from 1973 to 2019

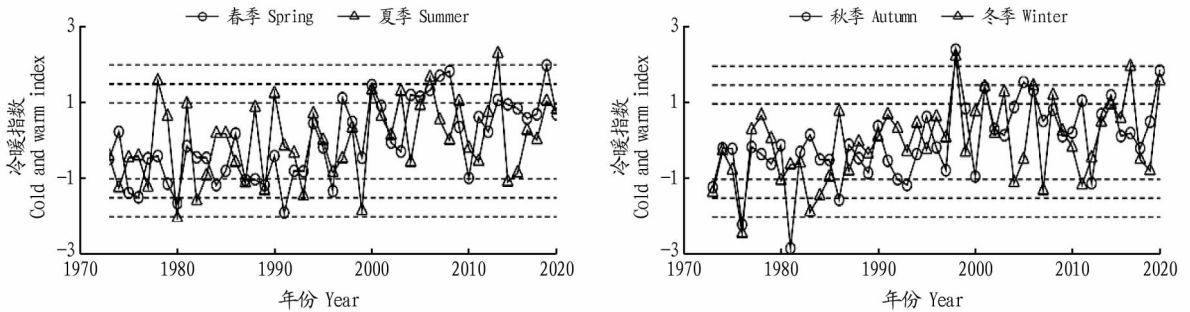


图 5 1973—2019 年黄石市四季平均气温冷暖指数变化

Fig. 5 Change of cold and warm index of average temperature in four seasons of Huangshi from 1973 to 2019

参考文献

[1] 《第二次气候变化国家评估报告》编写委员会. 第二次气候变化国家评估报告[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 38.

[2] 覃军, 王海军. 湖北省 1961 年以来气温和降水变化趋势及分布[J]. 华中农业大学学报, 1997, 16(4): 405-410.

[3] 陈正洪. 湖北省 60 年代以来平均气温变化趋势初探[J]. 长江流域资源与环境, 1998, 7(4): 341-346.

[4] 郑祚芳, 陈家华, 祁文. 湖北省近 50 年气候变化特征分析[J]. 气象科学, 2002, 22(3): 279-286.

[5] 毕旭. 湖北省气温和降水的变化特征及其与地理因子的相关性分析[D]. 武汉: 华中师范大学, 2013.

[6] 韩雪婷, 袁杰, 卫文芳, 等. 黄石市气候变化对城市发展的影响及对策分析[J]. 农业灾害研究, 2015, 5(1): 46-48.

[7] 张新宜, 周晓宇, 刘熠炎. 1954—2013 年湖北省黄石市极值气温变化特征分析[J]. 气象研究与应用, 2015, 36(2): 85-92, 95.

[8] 魏凤英. 现代气候统计诊断与预测技术[M]. 2 版. 北京: 气象出版社, 2007: 37-42, 63-66.

[9] 林培松, 李森, 李保生. 近 50 年来海南岛西部气候变化初步研究[J]. 气象, 2005, 31(2): 51-55.

[10] 李建平, 易成功, 张火平. 近 45 a 黄冈市气温和降水的变化与异常特征分析[J]. 暴雨灾害, 2008, 27(1): 59-63, 82.

[11] REFISH N M R, WANG L Q, FU C H, et al. Establishment and optimization of high efficiency embryogenic callus induction system in *Dendrobium candidum*[J]. African journal of plant science, 2016, 10(4): 77-83.

[12] 莫远琪, 郑枫, 房林, 等. 澳洲鸽子石斛组织培养快速繁殖研究[J]. 植物生理学报, 2018, 54(4): 677-685.

[13] LIN L, WANG Y, WANG F X, et al. Determination of polysaccharides content of *Gentiana farreri* from different producing areas based on anthrone-sulfuric acid method[J]. China journal of Chinese materia medica, 2014, 39(14): 2774-2776.

[14] 陈乃东, 陈乃富, 王陶陶, 等. 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[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(12): 2090-2094.

(上接第 219 页)

[5] LIANG J, WU Y F, YUAN H, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharides attenuate learning and memory disabilities via anti-oxidant and anti-inflammatory actions[J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 126: 414-426.

[6] YANG K, LU T T, ZHAN L H, et al. Physicochemical characterization of polysaccharide from the leaf of *Dendrobium officinale* and effect on LPS induced damage in GES-1 cell[J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 149: 320-330.

[7] 周玉飞, 康专苗, 彭竹晶. 珍稀濒危铁皮石斛的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(4): 1629-1635.