

## · 方药研究 ·

## 不同生长环境下茯苓总三萜和水溶性总多糖含量比较

张越<sup>1,2,3</sup>, 程玥<sup>1,2,3</sup>, 刘洁<sup>1,2,3</sup>, 尹孝莉<sup>1,2,3</sup>, 王妍妍<sup>1,2,3</sup>, 陈卫东<sup>1,2,3</sup>, 张善堂<sup>1,4</sup>

(1. 安徽中医药大学, 安徽合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院, 安徽合肥 230012;

3. 安徽中医药大学药物代谢研究所, 安徽合肥 230012; 4. 安徽省立医院, 安徽合肥 230001)

**[摘要]**目的 比较大别山区金寨县野生、椴木栽培和仿野生栽培3种不同生长环境下茯苓化学成分的差异。**方法** 利用紫外分光光度法分别测定3种生长环境下的茯苓总三萜和水溶性总多糖的含量。**结果** 不同生长环境下茯苓水溶性总多糖含量比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 野生和仿野生栽培茯苓的水溶性总多糖含量显著高于椴木栽培( $P < 0.05$ )。野生和仿野生栽培茯苓中总三萜含量均高于椴木栽培, 但3种生长环境下茯苓总三萜含量比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 与椴木栽培茯苓比较, 仿野生栽培茯苓质量更接近野生茯苓。**[关键词]** 茯苓; 茯苓水溶性总多糖; 茯苓总三萜; 种植模式**[中图分类号]** R284.1 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2019.04.022

中药茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核, 多寄生于松科植物赤松或马尾松等树根上<sup>[1]</sup>, 具有利水渗湿、健脾、宁心等功效。茯苓主要分布在我国云南、贵州、湖北、湖南、安徽等地<sup>[2]</sup>, 尤以安徽产量最大, 为“十大皖药”之一, 习称“安苓”。茯苓在药品、食品、保健品中均有广泛应用。

目前, 野生茯苓资源稀少, 市场上茯苓主要为栽培茯苓。茯苓栽培主要有两种形式, 即仿野生(树兜)栽培和椴木栽培<sup>[3-4]</sup>。仿野生栽培主要是利用野生松树林下松树根进行茯苓的仿野生抚育栽培, 而椴木栽培则利用松树砍伐后主要枝干去皮留茎, 进行椴木下窑栽培。然而, 关于茯苓不同生长环境的比较研究尚未有报道。

**基金项目:** 国家中医药管理局中药标准化项目(2017HZ5); 国家重点研发计划项目(2017YFC1701600, 2017YFC1701601, 2017YFC1701602, 2017YFC1701603, 2017YFC1701605); 安徽省教育厅高校科研创新平台团队项目(皖教社科[2015]49号)

**作者简介:** 张越(1994-), 男, 硕士研究生

**通信作者:** 陈卫东(1965-), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, [anzhongdong@126.com](mailto:anzhongdong@126.com)

茯苓的活性成分主要为多糖和茯苓三萜类化合物, 药理实验表明茯苓多糖具有增强免疫、抗肿瘤、利尿渗湿、抗炎、延缓衰老等作用<sup>[5]</sup>。茯苓三萜类化合物具有抗肿瘤、降血脂、消炎等作用<sup>[6-7]</sup>。因此, 本研究选用安徽省金寨地区野生、椴木栽培、仿野生(树兜)栽培茯苓为研究对象, 采用课题组前期建立的方法, 利用苯酚-硫酸法和香草醛-高氯酸显色反应法分别测定茯苓水溶性总多糖含量和茯苓总三萜含量<sup>[8-9]</sup>, 探索不同生长环境下茯苓有效成分差异, 为茯苓质量标准的建立以及高品质茯苓中药材的种植提供借鉴。

## 1 材料

1.1 样品 椴木栽培、仿野生(树兜)栽培茯苓药材均采于安徽省金寨县双河镇双河村同一栽培地, 野生茯苓采于安徽省金寨县桃岭乡桐岗村、龙潭村、东冲村、秦湾村, 经安徽中医药大学俞年军教授鉴定, 符合《中华人民共和国药典》2015年版一部各项规定, 为茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 的干燥菌核。椴木栽培以及仿野生(树兜)栽培所用的菌种均由野生茯苓菌核接种扩繁所得。本实验所用的样品均由安徽金寨县金山寨食(药)用菌种植专业合作社统一加工。

potential target molecules and active component-target protein interaction network, and different proportions and roles for various tumors, components, and pathways were found. **Conclusion** The method based on network pharmacology provide ideas and methods for analyzing the interaction network of *Brucea javanica* with various components, targets, pathways, and tumors and elaborating on its antitumor mechanism of action, which lays a theoretical foundation for clinical application in future.

**[Key words]** Network pharmacology; *Brucea javanica*; Anti-tumor

1.2 仪器 AB135-S型十万分之一电子分析天平;德国梅特勒-托利多公司;YL-060S数控超声波清洗器;济南巴克超声波科技有限公司;UV757CRT紫外可见分光光度计;上海精科公司;SHZ-D(Ⅲ)型循环水真空泵;邦西仪器科技有限公司。

1.3 试剂 齐墩果酸(批号20160228,质量分数 $\geq 98\%$ );上海源叶生物科技有限公司;葡萄糖(分析纯,批号20170915);无锡市亚泰联合化工有限公司;苯酚、浓硫酸:国药集团化学试剂有限公司;香草醛:天津市光复精细化工研究所;高氯酸(优级纯)、冰醋酸:上海润捷化学试剂有限公司;甲醇:上海星可高纯溶剂有限公司;其余试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 葡萄糖对照品溶液的配制 精密称取干燥至恒质量的葡萄糖对照品10.00 mg,置于100 mL容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,即得浓度为100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖对照品溶液,放置于4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

2.1.2 齐墩果酸对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品5.00 mg于50 mL容量瓶中,甲醇溶解,得浓度为100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的齐墩果酸对照品溶液,放置于4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

2.1.3 6%苯酚试剂的配制 称取苯酚6.00 g,溶解于100 mL纯水中,至棕色瓶中保存备用,得浓度为6%的苯酚试液。

2.1.4 茯苓水溶性总多糖供试品溶液的制备 称取茯苓样品粉末1.00 g于具塞锥形瓶中,加入50 mL纯水,超声30 min后过滤,取续滤液10 mL于容量瓶中,加纯水定容至50 mL,即得供试品溶液,现配现用。

2.1.5 茯苓总三萜供试品溶液的制备 精密称定茯苓粉末1.00 g,置于50 mL锥形瓶中,加入乙酸乙酯30 mL,摇匀,超声30 min,放冷后过滤,收取滤液蒸发浓缩,再用5 mL甲醇复溶,现配现用。

### 2.2 苯酚-浓硫酸法测定茯苓水溶性总多糖含量

2.2.1 标准曲线的建立 分别精密吸取葡萄糖对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL于10 mL试管中,加纯水至1 mL,再加入1 mL 6%苯酚溶液,加入4 mL浓硫酸,沸水浴25 min后冷水浴10 min,在487 nm处测定其吸光度(A),以浓度(c)对其做线性回归方程,求得回归方程为 $A=8.7176c+0.112$ (线性范围:0.01~0.1 mg/mL; $r=0.9995$ )。

#### 2.2.2 方法学考察

(1)精密度试验 取葡萄糖对照品溶液1.0 mL

于10 mL试管,按照“2.2.1”项下显色方法,于487 nm波长下重复测定吸光度5次,代入标准曲线,计算葡萄糖含量,RSD值为0.28%,表明精密度良好。

(2)重复性试验 按照“2.1.4”项下方法平行制备成6份供试品溶液,精密吸取供试品1.0 mL溶液至10 mL试管中,按照“2.2.1”项下显色方法,于487 nm波长下分别测定吸光度。代入标准曲线,计算茯苓水溶性总多糖含量,RSD值为0.72%,表明该方法重复性良好。

(3)稳定性试验 按照“2.1.4”项下方法制备供试品溶液,精密移取供试品溶液1.0 mL至10 mL试管中,按照“2.2.1”项下显色方法,于0、10、20、40、60 min内于487 nm波长下分别测定吸光度。代入标准曲线,计算茯苓水溶性总多糖含量,RSD值为0.31%,表明样品1 h内稳定性良好。

(4)加样回收率试验 称取6份已知总多糖含量的茯苓样品0.5 g至锥形瓶中,加入葡萄糖对照品9 mg,按照“2.1.4”项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品1.0 mL溶液至10 mL试管中,按照“2.2.1”项下显色方法,于487 nm波长下分别测定吸光度。计算得平均加样回收率为99.73%,RSD值为1.19%。

2.2.3 茯苓样品中水溶性总多糖含量测定 取待测3种生长环境下茯苓样品,按“2.1.4”项下方法制备茯苓供试品溶液。按照“2.2.1”项下显色反应操作后,于487 nm波长下测定吸光度,计算茯苓样品中水溶性总多糖含量。

### 2.3 香草醛-高氯酸显色反应测定茯苓总三萜含量

2.3.1 标准曲线的建立 分别精密吸取对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL于10 mL具塞磨口试管中,水浴挥干溶剂,冷却后精密加入0.2 mL 5%香草醛冰醋酸溶液和1 mL高氯酸,密塞,于60  $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中加热15 min,取出,冷却至室温,加冰醋酸5 mL,摇匀后置于室温,甲醇作为空白对照,在545.5 nm处测定吸光度值,以吸光度值(A)为纵坐标,以对照品浓度(c)为横坐标,得到线性回归方程 $A=8.0142c-0.0349$ (线性范围:0.01~0.1 mg/mL, $r=0.9995$ ),线性关系良好。

#### 2.3.2 方法学考察

(1)精密度试验 精密移取齐墩果酸对照品溶液1.0 mL至10 mL试管中,按“2.2.1”项下方法显色后,连续测定吸光度5次,代入标准曲线,计算齐墩果酸含量,RSD值为1.26%,表明精密度良好。

(2)重复性试验 按照“2.1.5”项下方法,平行制备6份供试品溶液,精密移取供试品溶液0.2 mL

至 10 mL 试管中,按“2.2.1”项下方法显色后,分别测定吸光度。代入标准曲线,计算茯苓总三萜含量,RSD 值为 0.89%,表明该方法重复性符合要求。

(3)稳定性试验 按照“2.1.5”项下方法,制备供试品溶液,精密移取供试品溶液 0.2 mL 至 10 mL 试管中,按“2.2.1”项下方法显色后,于 0、10、20、40、60 min 测定吸光度。代入标准曲线,计算茯苓总三萜含量,RSD 值为 1.63%,表明样品在 1 h 内稳定。

(4)加样回收率试验 称取 6 份已知总三萜含量的茯苓样品 0.5 g 至锥形瓶中,加入 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  齐墩果酸对照品溶液 8 mL,按照“2.1.5”项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 0.2 mL 至 10 mL 试管中,按“2.2.1”项下显色方法,于 545.5 nm 波长下分别测定吸光度。计算得平均加样回收率为 100.39%,RSD 值为 1.18%。

2.3.3 茯苓样品中总三萜含量测定 取茯苓样品,按“2.1.5”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 0.2 mL,按照“2.2.1”项下方法显色,于 545.5 nm 处测定其吸光度,将得到的吸光度值代入上述标准曲线中,计算供试品中总三萜的含量。

2.4 统计学方法 连续型变量以“均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )”表示,采用 SPSS 23.0 进行统计学分析,组间差异采用单因素方差分析。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

不同生长环境下茯苓水溶性总多糖含量比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),野生和仿野生栽培茯苓的水溶性总多糖含量显著高于椴木栽培( $P<0.05$ )。野生和仿野生栽培茯苓中总三萜含量均高于椴木栽培,但 3 种生长环境下茯苓总三萜含量比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 不同生长环境下茯苓水溶性总

多糖含量和总三萜含量( $\bar{x}\pm s$ )

茯苓生长环境	<i>n</i>	水溶性总多糖/%	总三萜/%
野生	6	1.95 $\pm$ 0.35*	0.18 $\pm$ 0.04
仿野生栽培	6	1.94 $\pm$ 0.08*	0.17 $\pm$ 0.01
椴木栽培	6	1.65 $\pm$ 0.25	0.16 $\pm$ 0.02

注:与椴木栽培组比较,\* $P<0.05$

### 4 讨论

本实验结果显示野生、仿野生茯苓中总三萜含量和水溶性总多糖含量高于椴木栽培,这可能与其适宜的生长环境有关。野生茯苓与仿野生茯苓有效

成分差异并不大,可能与相似的生长环境和仿野生茯苓菌种由野生茯苓母核扩繁而来的菌种有关。但是,数据显示野生茯苓质量不均一,这可能与成熟期难以确定有关,在后续的实验将继续考察不同生长时间、不同采收季节对茯苓有效成分含量的影响。

野生茯苓品质较好,但存在数量极其有限、采收难度大、成熟期难以确定等突出问题。采用仿野生栽培方式营造野生茯苓的生长环境,提供野生茯苓母核扩繁而来的菌种,加上人工管理,使栽培出的茯苓质量高且均一。该方法因地制宜,综合利用松树兜有利于节省松木资源,在一定程度上减少了松材线虫的食物来源,并可节省人力资源,符合当今绿色发展理念。

本研究采用苯酚-硫酸法和香草醛-高氯酸法研究不同生长环境下茯苓有效成分含量的差异,为高品质茯苓中药材的种植提供借鉴。今后将结合药效学进一步评价不同生长环境下茯苓质量的差异,为保护优质茯苓资源及其科学合理应用提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:240-241.
- [2] 马芳,张方,汤进,等. 不同产地茯苓皮药材红外光谱的识别[J]. 光谱学与光谱分析,2014,34(2):376-380.
- [3] 廖盛祥. 松树兜栽培茯苓技术[J]. 食用菌,2016,38(5):38.
- [4] 刘本洪,郑林用. 茯苓的特性及断木栽培技术[J]. 种植技术,2002,4(4):15-16.
- [5] 游昕,熊大国,郭志斌,等. 茯苓多种化学成分及药理作用的研究进展[J]. 安徽农业科学,2015,43(2):106-109.
- [6] 刘惠知,吴胜莲,张德元,等. 茯苓药物成分提取分离及其药用价值研究进展[J]. 中国食用菌,2015,34(6):1-6.
- [7] 毛跟年,张诗韵,付超,等. 茯苓皮总三萜的降血脂活性研究[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版),2015,33(3):130-134.
- [8] 王妍妍. 茯苓对大鼠细胞色素 P450 酶活性及 mRNA 表达的影响[D]. 合肥:安徽中医药大学,2017.
- [9] 方毅,许凤清,吴德玲,等. 响应面法优化茯苓总三萜超声波提取工艺[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(11):57-59.

(收稿日期:2018-06-13;编辑:张倩)

## Content of Total Triterpenes and Water-soluble Polysaccharides in *Poria cocos* in Different Growth Environments: A Comparative Analysis

ZHANG Yue<sup>1,2,3</sup>, CHENG Yue<sup>1,2,3</sup>, LIU Jie<sup>1,2,3</sup>, YIN Xiao-li<sup>1,2,3</sup>, WANG Yan-yan<sup>1,2,3</sup>, CHEN Wei-dong<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Shan-tang<sup>1,4</sup>

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 3. Institute of Drug Metabolism, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 4. Anhui Provincial Hospital, Anhui Hefei 230001, China)

**[Abstract] Objective** To compare the chemical components of wild *Poria cocos*, *Poria cocos* grown by basswood cultivation, and wild-simulated cultivated *Poria cocos* in Jinzhai County in the Dabie Mountain, China. **Methods** Ultraviolet spectrophotometry was used to measure the content of total triterpenes and water-soluble polysaccharides in *Poria cocos* under three growth conditions. **Results** There was a significant difference in the content of water-soluble polysaccharides between *Poria cocos* grown under different conditions ( $P < 0.05$ ), and wild *Poria cocos* and wild-simulated cultivated *Poria cocos* had significantly higher content of water-soluble polysaccharides than *Poria cocos* grown by basswood cultivation ( $P < 0.05$ ). Wild *Poria cocos* and wild-simulated cultivated *Poria cocos* had higher content of total triterpenoids than *Poria cocos* grown by basswood cultivation, but there was no significant difference in the content of total triterpenoids between *Poria cocos* grown under the three conditions ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Compared with *Poria cocos* grown by basswood cultivation, wild-simulated cultivated *Poria cocos* has similar quality to wild *Poria cocos*.

**[Key words]** *Poria cocos*; Water-soluble polysaccharides of *Poria cocos*; Total triterpenes of *Poria cocos*; Planting pattern

## 征文通知

为庆祝安徽中医药大学 60 周年华诞,充分展示我校科研成果,拟将本刊 2019 年第 6 期(正常期次,非增刊,封一印有“庆祝安徽中医药大学建校 60 周年”)作为校庆专刊,需要征集一些高水平稿件,现将征文相关事项通知如下:

- 1 征文内容 理论研究、临床研究、临床经验、针灸经络研究、实验研究、方药研究以及其他与中医药相关的专题研究。
- 2 征文对象 本校从事科研、临床和教学工作的专业技术人员,以及具有较高学术造诣的校友。欢迎承担各级科研项目人员及具有高级职称或博士学位者积极投稿。
- 3 投稿要求 论文应论点正确、论据充分、论证严谨,具有创新性,对科研、临床工作具有指导意义。对于临床研究或实验研究类论文,作者应提供单位介绍信,主要说明有无一稿多投,稿件内容是否真实,是否涉密,署名有无争议。编辑部将采用中国知网学术不端文献检测系统对所有来稿进行检测,稿件的文字复制比应低于 20%。论文字数以 5 000 字左右为宜,附 200~400 字的中文摘要及与之相对应的英文摘要。请按照 GB/T 7714—2015《信息与文献 文后参考文献著录规则》著录参考文献,采用顺序编码制,文末附参考文献表。基金资助的论文,请在文末正确标注基金项目名称及编号,并附项目任务书(合同书)首页复印件。请附第一作者简介,包括姓名、出生年、性别、最高学位、职称、电子信箱、联系电话。若通信作者非第一作者,请另外注明通信作者的姓名、出生年、性别、最高学位、职称、电子信箱。对于病理照片,请提供高像素的 jpg 格式或 tif 格式图片,并注明染色方式、放大倍数及其他注解信息;对于线条图,应从原程序导出图元格式(后缀为 emf 或 wmf)的图片。所有图片均应清晰,达到出版要求。请采用三线表,将标目和标值放在单元格中。若稿件中涉及统计学处理,请务必注明统计学方法,不要笼统地写成“用 SPSS 软件处理”等。
- 4 投稿和录用 请在本刊网站([xuebao.ahtcm.edu.cn](http://xuebao.ahtcm.edu.cn))注册投稿,并在稿件显著位置(如文题上方)注明“60 周年校庆征文”。征文截止日期为 2019 年 8 月 31 日。编辑部将对所有来稿进行同行评议,择优录用。