

## 曲茎石斛及其近缘种的鉴别与质量评价

孙廷<sup>1</sup>, 杨玉珍<sup>1</sup>, 胡述晓<sup>2</sup>, 路遥<sup>3</sup>, 张村<sup>4</sup>, 胡如善<sup>1\*</sup>

(1. 南阳农业职业学院, 河南 南阳 473000; 2. 南阳市园林绿化管理局, 河南 南阳 473002;  
3. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:对曲茎石斛及其近缘种的药材进行鉴别,并分析其多糖成分、D-甘露糖含量的差异,为石斛药材的准确鉴定及其质量控制提供理论依据。方法:采用DNA条形码和红外光谱技术对9份石斛药材(S1~S9)进行鉴定,并分别采用紫外分光光度法(UV)和高效液相色谱法(HPLC)对石斛多糖和D-甘露糖的含量进行测定,UV检测条件为488 nm;HPLC检测条件为流动相20 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵溶液-乙腈(81.5:18.5),检测波长250 nm。结果:DNA条形码结果显示,样品S1~S3鉴定为金钗石斛;样品S4~S5鉴定为铁皮石斛;样品S6鉴定为霍山石斛;样品S7~S9鉴定为曲茎石斛。一维红外光谱显示,仅3份金钗石斛在波数1 570~1 467 cm<sup>-1</sup>处有稳定的特征峰,呈现“W”形,而在842~740 cm<sup>-1</sup>处无吸收峰;其余石斛则在842~740 cm<sup>-1</sup>处有稳定吸收峰。一阶导数光谱上在785 cm<sup>-1</sup>处,霍山石斛呈现“V”形,而其余石斛呈现“W”形;在1 110 cm<sup>-1</sup>处曲茎石斛具有稳定的特征峰。二阶导数光谱中在1 125 cm<sup>-1</sup>处,铁皮石斛呈现“M”形,其余石斛近似“W”形。含量测定结果显示,样品S1~S9的多糖质量分数依次为9.35%、9.12%、32.78%、49.38%、48.97%、32.48%、32.95%、39.41%和25.32%,D-甘露糖质量分数依次为1.39%、0.47%、13.57%、3.04%、33.85%、23.57%、16.64%、17.47%和19.49%。其中曲茎石斛具有着较高的多糖和D-甘露糖含量。结论:DNA条形码和一阶、二阶导数红外光谱均可实现曲茎石斛及其近缘种的鉴别,且红外光谱鉴别方法价格低、操作简便;同时,曲茎石斛具有较高含量的多糖和D-甘露糖,可为快速鉴别曲茎石斛及其近缘种药材提供科学依据,并为曲茎石斛的质量控制和资源利用提供参考。

**[关键词]** 曲茎石斛; 铁皮石斛; DNA条形码; 多糖; 红外光谱; 质量控制; 高效液相色谱法(HPLC)

**[中图分类号]** R22;R931;R28;O433 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)20-0128-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220652

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220619.2206.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-06-20 16:03

### Identification and Quality Evaluation of *Dendrobium flexicaule* and Its Related Species

SUN Ting<sup>1</sup>, YANG Yuzhen<sup>1</sup>, HU Shuxiao<sup>2</sup>, LU Yao<sup>3</sup>, ZHANG Cun<sup>4</sup>, HU Rushan<sup>1\*</sup>

(1. Nanyang Vocational College of Agriculture, Nanyang 473000, China;

2. Nanyang Landscaping Administration, Nanyang 473002, China;

3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify *Dendrobium flexicaule* and its related species, and analyze the differences in polysaccharide composition and D-mannose content, so as to provide theoretical basis for the accurate identification and quality control of *Dendrobium* medicinal materials. **Method:** Nine samples of *Dendrobium* (S1-S9) were identified by DNA barcoding and infrared spectroscopy, and the contents of polysaccharides and D-mannose were determined by ultraviolet spectrophotometry (UV) and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. UV detection condition was 488 nm, HPLC detection conditions were the mobile phase of 20 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate solution-acetonitrile (81.5:18.5) and the detection

**[收稿日期]** 2022-03-25

**[第一作者]** 孙廷, 硕士, 教授, 从事植物组织培养、园艺技术研究, E-mail: 563294838@qq.com

**[通信作者]** \* 胡如善, 正高级讲师, 从事植物组织培养、植物保护研究, E-mail: hurushan1958@sina.com

wavelength at 250 nm. **Result:** DNA barcoding results showed that samples S1-S3 were *D. nobile*, samples S4-S5 were *D. officinale*, sample S6 was *D. huoshanense*, and S7-S9 were *D. flexicaule*. One-dimensional infrared spectroscopy showed that only *D. nobile* had stable characteristics at the wavenumber of 1 570-1 467  $\text{cm}^{-1}$ , showing a "W" shape, while no absorption peak was found at the wavenumber of 842-740  $\text{cm}^{-1}$ , but the other *Dendrobium* samples had stable absorption peaks at the wavenumber of 842-740  $\text{cm}^{-1}$ . In the first derivative spectrum, at the wavenumber of 785  $\text{cm}^{-1}$ , *D. huoshanense* presented a "V" shape, while the rest of *Dendrobium* presented a "W" shape. At the wavenumber of 1 110  $\text{cm}^{-1}$ , *D. flexicaule* had a stable characteristic peak. In the second derivative spectrum, at the wavenumber of 1 125  $\text{cm}^{-1}$ , *D. officinale* presented an "M" shape, and the rest of *Dendrobium* was approximately "W" shape. The results of determination showed that the contents of polysaccharides in samples S1-S9 were 9.35%, 9.12%, 32.78%, 49.38%, 48.97%, 32.48%, 32.95%, 39.41% and 25.32%, and their contents of *D*-mannose were 1.39%, 0.47%, 13.57%, 3.04%, 33.85%, 23.57%, 16.64%, 17.47% and 19.49%, respectively. Among them, *D. flexicaule* had high polysaccharide and *D*-mannose contents. **Conclusion:** Both DNA barcoding and infrared spectroscopy can be used to identify *D. flexicaule* and its related species, and infrared spectroscopy is cost-effective and easy to operate. At the same time, *D. flexicaule* has high contents of polysaccharides and *D*-mannose, which can provide a scientific basis for rapid identification of *D. flexicaule* and its relatives, and provides a reference for its quality control, and resource development and utilization.

**[Keywords]** *Dendrobium flexicaule*; *Dendrobium officinale*; DNA barcoding; polysaccharides; infrared spectroscopy; quality control; high performance liquid chromatography (HPLC)

石斛是我国传统名贵药材,具有滋阴清热、益胃生津、润肺止咳等功效<sup>[1]</sup>。其种类繁多,仅我国分布的就达80多种,且多数作为药用<sup>[2-4]</sup>。曲茎石斛主要分布于河南、湖北、四川等地,属多年生草本植物。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)规定的石斛及铁皮石斛种类并未收录曲茎石斛<sup>[1]</sup>,但据文献调研,在河南等地亦有将曲茎石斛作为民间药材使用,具有一定的市场潜力。然而,目前曲茎石斛的真伪成为影响其使用的关键问题之一。曲茎石斛植株形态与栽培的铁皮石斛相似,药材形态又相近于霍山石斛、细茎石斛<sup>[5]</sup>,容易混淆。此外,市场上石斛药材被加工成各种形状,仅依靠性状已不能准确鉴定,亟需对曲茎石斛及其近缘种建立一种快速便捷的鉴别方法,以保证其使用的安全性和有效性。

近年来,以“味甘”“味苦”的性味差异对石斛来源问题进行评估引起了众多学者的注意<sup>[6]</sup>。其中,石斛多糖、甘露糖是评价石斛“味甘”的重要成分。不同品种石斛的多糖含量相差较大。如徐雅因等<sup>[7]</sup>比较了6种石斛活性成分的差异,结果发现不同石斛品种多糖含量存在差异。陈丹等<sup>[8]</sup>对铁皮石斛、流苏石斛及紫皮石斛多糖含量进行测定,结果表明不同品种的多糖含量存在较大差异。此外,多糖也是石斛重要的营养成分。目前,曲茎石斛主要用于

观赏和食用,其是否能作为药材使用仍需要深入研究。因此,对曲茎石斛多糖含量、甘露糖进行对比分析,有利于开发其药用价值。

目前,石斛的鉴别仍采用性状、显微等传统鉴别方法,可能会存在主观性误差。近年来,DNA分子鉴定技术因不受物种个体形态、发育等的影响,具有用样量少、准确性和多态性高等优点,已被广泛应用于药材的鉴定研究。红外光谱分析技术凭借其分析速度快、成本低、光谱测量方便、样品前处理简单等优点,同时结合相似度评价、聚类分析等化学计量学方法,在中药材真伪鉴别、药材质量评价等方面也得到了广泛应用<sup>[9-12]</sup>。然而,目前少有关于曲茎石斛的红外光谱鉴别及其成分研究,同时红外光谱结合相似度评价、聚类分析能明确曲茎石斛及其近缘种亲缘关系的远近。基于此,本研究拟采用DNA条形码和红外光谱对曲茎石斛及其近缘种进行评价,运用苯酚-硫酸法对比分析多糖含量,利用高效液相色谱法(HPLC)测定*D*-甘露糖含量,以期快速鉴别石斛属药材提供科学依据,并为曲茎石斛质量控制和资源开发提供参考。

## 1 材料

Veriti 96-Well Thermal Cycler型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),BG-gdsAUTO 520型凝胶成像分析系统(北京

百晶生物技术有限公司), Powerpa Basic164-5050 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱、DK-600S 型三用恒温水箱、UV-2800 型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司), JY-SPDT 型水平电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司), LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), Vertex 70 型傅里叶变换红外光谱仪[布鲁克(北京)科技有限公司]。

9 批石斛样品(编号 S1~S9)来源于安国药材市场, 广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒、2×Taq Plus PCR MasterMix(含染料)(北京博迈德基因技术有限公司, 批号分别为 DL116-01、MT206-02), 无水葡萄糖、D-甘露糖对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为 S11022、SD8420, 纯度分别为 99%、≥98%), 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)和盐酸氨基葡萄糖(HAG)(北京兰博利德商贸有限公司, 批号分别为 M70800、G4875), 水为娃哈哈纯净水, 乙腈、乙酸铵为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 2 方法

**2.1 DNA 提取与 PCR 扩增** 取适量石斛样品用 75% 乙醇擦拭, 加入液氮, 充分研磨, 用广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取。使用自行设计的引物 *trnH-psbA* 叶绿体片段进行扩增。扩增反应体系组成为正、反引物各 1 μL, DNA 模板(适宜浓度) 2 μL, 2×Taq Plus PCR MasterMix 聚合酶 15 μL, 双蒸水 11 μL, 总体积 30 μL。 *trnH-psbA* 叶绿体正向引物序列 5'-GCTCCATCTATAAATGGATAATAC-3', 反向引物 5'-CATTTAGCGGAAGAATTG-3'。设定的反应程序为 94 °C 预变性 1.5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 5 min, 共 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min, PCR 产物胶回收。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

**2.2 红外光谱鉴定** 分别取样品 S1~S9 粉末(过六号筛)进行红外光谱扫描, 光谱测量范围设定 4 000~400 cm<sup>-1</sup>, 光谱分辨率 4 cm<sup>-1</sup>, 扫描数 32 次, 每次扫描时扣除水和二氧化碳(CO<sub>2</sub>)的背景干扰。重复检测 3 次。

## 2.3 多糖的含量测定

**2.3.1 样品处理** 样品 S1~S9 在 40 °C 烘箱中烘干至恒重, 粉碎后过三号筛备用。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取无水葡萄糖对照品适量, 精密称定, 加水制成 90 mg·L<sup>-1</sup> 溶液。精密量

取该对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 各加水补至 1.0 mL, 精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL(临用配制), 摇匀, 精密加入 98% 硫酸 5 mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 20 min, 取出, 置冰浴中冷却 5 min, 分别加水定容至 10 mL, 以相应试剂为空白, 在 488 nm 处测定吸光度 *A*, 以 *A* 为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取样品粉末约 0.02 g, 精密称定, 加水 20 mL, 加热回流 2 h, 放冷, 转移至 25 mL 量瓶中, 用少量水依次洗涤容器, 洗液并入同一量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀, 分液漏斗滤过, 精密量取续滤液 2 mL, 置于 15 mL 离心管中, 精密加入无水乙醇 10 mL, 摇匀, 冷藏 1 h, 取出, 于转速 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min(离心半径 13.5 cm, 下同), 弃去上清液(必要时滤过), 沉淀使用 80% 乙醇洗涤 2 次, 每次 8 mL, 离心(8 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min, 25 °C, 下同), 弃去上清液, 沉淀加热水使溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 放冷, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得<sup>[1]</sup>。

## 2.4 D-甘露糖的含量测定

**2.4.1 色谱条件** 采用 WondaSil C<sub>18</sub>-WR 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 20 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵溶液-乙腈(81.5:18.5), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 250 nm, 进样量 5 μL。

**2.4.2 校正因子测定** 精密称取 HAG 0.302 4 g, 置 25 mL 量瓶中, 加水定容成每 1 mL 含 12.096 mg 的溶液, 作为内标溶液。精密称取 D-甘露糖对照品 10.39 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 加水适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 400 μL, 加入 0.5 mol·L<sup>-1</sup> PMP 甲醇溶液 400 μL 与 0.3 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 400 μL, 混匀, 70 °C 水浴反应 100 min; 加入 0.3 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 500 μL, 混匀, 使用三氯甲烷洗涤 3 次, 每次 2 mL, 弃去三氯甲烷液, 水层离心, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取上清液 5 μL, 待测。

**2.4.3 供试品溶液的制备** 取石斛粉末(过三号筛)约 0.12 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加 80% 乙醇适量, 加热回流提取 4 h, 弃去乙醇提取液, 药渣挥干乙醇, 滤纸筒拆开置于烧杯中, 加水 100 mL, 精密加入内标溶液 2 mL, 煎煮 1 h 并时时搅拌, 放冷, 加水补至约 100 mL, 混匀, 离心处理, 精密吸取上清液 1 mL, 置顶空瓶中, 加 3.0 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 0.5 mL 封口, 混匀, 110 °C 水解 1 h, 放冷, 用 3.0 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调节 pH 至中性, 精密吸取 400 μL, 自“加入 0.5 mol·L<sup>-1</sup> PMP 甲醇溶液”起按 2.4.2 项下方法操

作,取上清液 5  $\mu\text{L}$  待测。

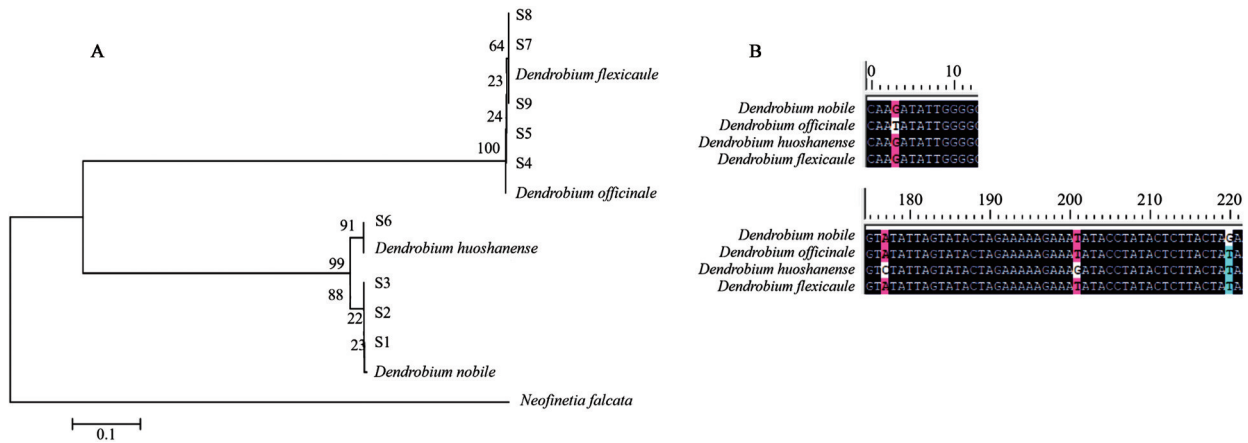
**2.4.4 方法学考察** 取 *D*-甘露糖对照品溶液连续进样 6 次,记录 *D*-甘露糖的峰面积,计算其相对标准偏差(RSD),以考察仪器的精密度。分别配制质量浓度为 9.824、19.648、29.472、39.296、49.12  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 *D*-甘露糖对照品溶液(含 12.096  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  内标溶液),以 *D*-甘露糖质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。取同一份石斛样品(样品 S8)6 份,精密称定,按 2.4.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.1 项下条件测定,记录 *D*-甘露糖峰面积并计算其 RSD,以考察该方法的重复性。取同一供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按 2.4.1 项下条件测定,记录 *D*-甘露糖峰面积并计算其 RSD,以考察供试品溶液的稳定性。取已知 *D*-甘露糖含量的石斛样品 0.06 g,按 1:1 比例加入 *D*-甘露糖对照品,按 2.4.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.1 项下条件测定,计算加样回收率及其 RSD。

**2.5 数据处理** 红外光谱图采用傅里叶变换红外光谱仪自带的 OPUS 7.8 软件进行数据采集和图谱

预处理,剔除异常样本。应用 OriginPro 2021 软件进行原图、一阶和二阶导数光谱的绘制,运用 SPSS 20.0 软件进行相似度分析和聚类分析。含量测定结果以  $\bar{x}\pm s$  表示,采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, $P<0.05$  表示差异具有统计学差异。

### 3 结果

**3.1 DNA 分子的鉴定** 经过分析,所得序列长度约 500 bp,采用 MEGA6.0 进行聚类分析,应用邻接法(NJ)构建系统进化树,见图 1。结果发现样品 S1~S3 与金钗石斛聚为一支,确定为金钗石斛 *Dendrobium nobile*;样品 S4、S5 与铁皮石斛聚为一支,确定为铁皮石斛 *D. officinale*;样品 S6 与霍山石斛聚为一支,确定为霍山石斛 *D. huoshanense*;样品 S7~S9 为曲茎石斛 *D. flexicaule*。此外,利用软件 DNAMAN6.0 分析后发现金钗石斛在 220 bp 处为鸟嘌呤(G),霍山石斛在 178、201 bp 处分别为胞嘧啶(C)和 G,铁皮石斛在 4 bp 处为胸腺嘧啶(T),说明该方法可以将曲茎石斛及其近缘种进行很好的区分,见图 1。



注:A.NJ树;B.DNAMAN分析

图1 曲茎石斛及其近缘种的DNA条形码分析

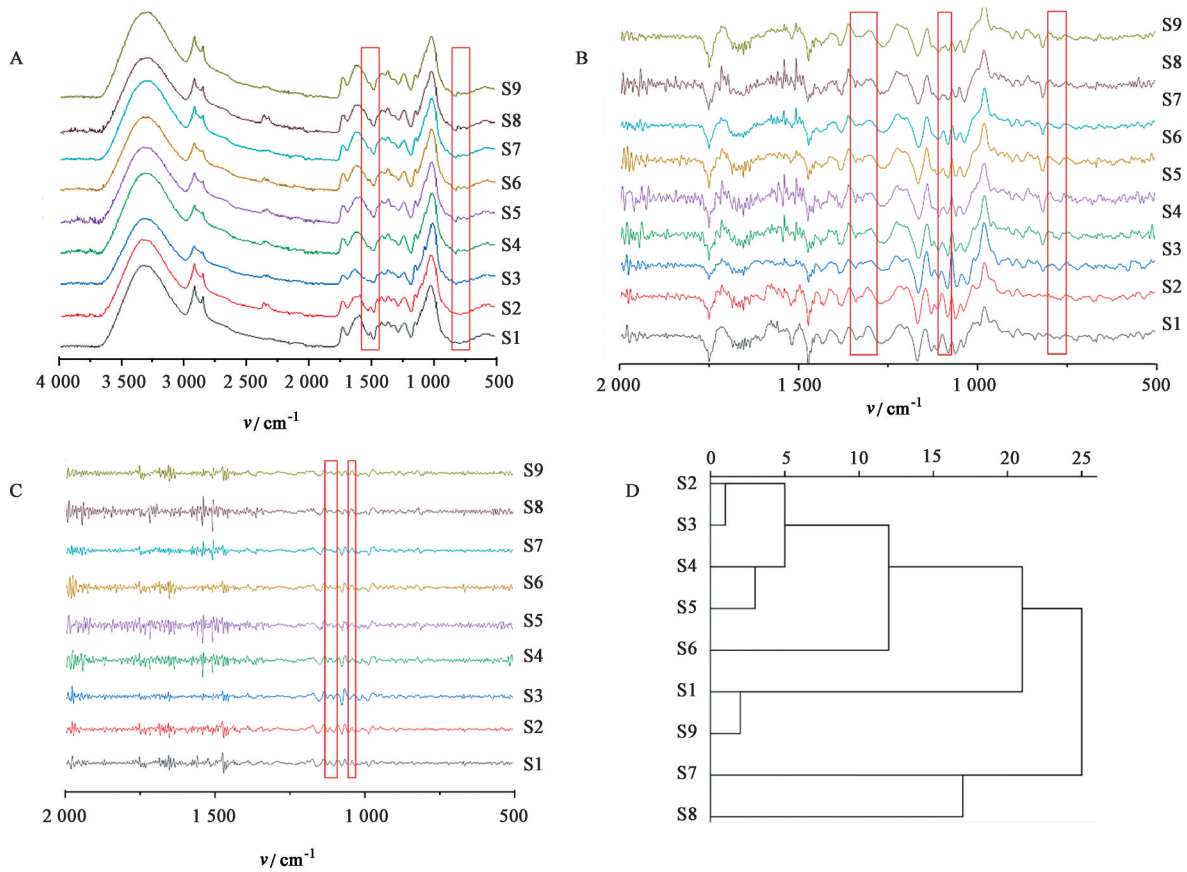
Fig. 1 DNA barcoding analysis of *Dendrobium flexicaule* and its related species

**3.2 红外光谱分析** 由图 2(A)可知,9 批石斛的一维红外光谱峰形非常类似,共有吸收峰较多,但仍存在差异。仅 3 批金钗石斛在 1 570~1 467  $\text{cm}^{-1}$  处有稳定的特征峰,呈“W”形,而在 842~740  $\text{cm}^{-1}$  处无吸收峰,其余品种石斛则在 842~740  $\text{cm}^{-1}$  处有稳定的吸收峰。据报道,波数 950~700  $\text{cm}^{-1}$  为多糖类不同异构体的区域<sup>[13]</sup>,提示金钗石斛多糖种类与其余品种存在差异。但 9 批石斛样品的一维红外光谱图相似度分析显示,各样品之间的相似度在 98.0%~99.9%,难以区别,数据见表 1。由图 2(A)可知,9 批样品的吸收峰差异多集中在 1 800~500  $\text{cm}^{-1}$ ,为了准

确比较曲茎石斛与铁皮石斛、霍山石斛的红外光谱差异,将一维红外光谱经过数据变换为的一阶导数红外光谱和二阶导数红外光谱,以 1 800~500  $\text{cm}^{-1}$  的一阶和二阶导数光谱进行比较分析。一阶导数光谱分析发现,在 785  $\text{cm}^{-1}$  处,霍山石斛呈现“V”形,而其余石斛呈现“W”形。在 1 110  $\text{cm}^{-1}$  处曲茎石斛具有稳定的特征峰。在 1 364~1 278  $\text{cm}^{-1}$ ,铁皮石斛和霍山石斛的吸收峰形态区别于其他峰,见图 2(B)。二阶导数光谱分析结果发现,铁皮石斛在 1 125  $\text{cm}^{-1}$  处呈“M”形,其余石斛近似“W”形,见图 2(C)。平均联结组间聚类分析显示,曲茎石斛与金钗石斛、

霍山石斛聚为一大类,见图2(D),表明曲茎石斛可能与这2种亲缘关系较相近。综上分析,一维红外

光谱结合一阶、二阶导数红外光谱能成功鉴别曲茎石斛与其近缘种。



注:A.一维红外光谱;B.一阶导数红外光谱;C.二阶导数红外光谱;D.聚类分析树状

图2 9批石斛样品的红外光谱分析

Fig. 2 Infrared spectrum analysis of 9 batches of *Dendrobium* samples

表1 9批石斛样品一维红外光谱的相似度分析

Table 1 Similarity analysis of one-dimensional infrared spectra of 9 batches of *Dendrobium* samples

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
S1	1.000								
S2	0.995	1.000							
S3	0.980	0.993	1.000						
S4	0.987	0.993	0.994	1.000					
S5	0.995	0.995	0.989	0.996	1.000				
S6	0.995	0.996	0.992	0.996	0.999	1.000			
S7	0.996	0.995	0.988	0.995	0.998	0.998	1.000		
S8	0.995	0.993	0.986	0.993	0.999	0.998	0.998	1.000	
S9	0.997	0.991	0.980	0.992	0.997	0.996	0.998	0.997	1.000

3.3 多糖含量测定 拟合得回归方程 $Y=0.0045X-0.0011$  ( $r=0.9993$ ),表明葡萄糖的质量浓度在 $0.0018\sim 0.009\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与A呈良好线性关系。样品S1~S9中多糖质量分数分别为9.35%、9.12%、

32.78%、49.38%、48.97%、32.48%、32.95%、39.41%和25.32%,说明曲茎石斛样品的多糖含量较高。

### 3.4 D-甘露糖的含量测定

3.4.1 方法学考察 在精密度试验中,D-甘露糖峰面积的RSD 0.5%,表明仪器精密度良好。D-甘露糖线性回归方程为 $Y=43345X-12860$  ( $R^2=0.9998$ ),线性范围 $9.824\sim 49.12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在重复性试验中,计算D-甘露糖的平均质量分数18.0%,其RSD 1.7%,表明该方法重复性良好。在稳定性试验中,D-甘露糖峰面积的RSD 0.3%,表明供试品溶液在24 h内稳定。在加样回收试验中,D-甘露糖平均加样回收率99.60%,RSD 1.1%,表明该方法回收率符合要求。

3.4.2 样品测定 样品S1~S9中D-甘露糖质量分数分别为1.39%、0.47%、13.57%、3.04%、33.85%、23.57%、16.64%、17.47%、19.49%,说明样品S5(铁皮枫斗)的D-甘露糖质量分数最高,但曲茎石斛中D-甘露糖的含量也较高。

#### 4 讨论

药用石斛的性状具有诸多相似之处,导致市场流通品种较为混乱,因此对其进行准确鉴别有利于正本清源。目前,关于曲茎石斛的研究还不够深入。本研究先对收集到的曲茎石斛药材进行了形态特征比较,发现曲茎石斛呈圆柱形,长3~12 cm,直径0.2~0.4 cm,节间长0.6~1 cm,表面黄绿色,有纵皱纹,表面残留须根较多,嚼之有黏性。说明曲茎石斛的药材性状与霍山石斛十分相似,传统鉴定难以区分。据报道,曲茎石斛鲜品易于区分,而干品因为叶片脱落的原因形态特征较难鉴定<sup>[5]</sup>。本课题组前期选择了通用的内部转录间隔区(ITS)和 *trnH-psbA* 进行预试验,结果发现通用条形码存在一些局限性<sup>[14]</sup>。例如,因为收集到的药材储藏时间较长<sup>[15]</sup>而导致的ITS扩增成功率不高,峰图杂乱。因此,本研究以自行设计石斛属通用叶绿体序为引物,能准确对曲茎石斛及其近缘种进行鉴别且鉴别效率高。红外光谱图解析时发现,9份石斛样品的红外吸收共有峰有3 311、2 918、2 853、1 727、1 241、1 021  $\text{cm}^{-1}$ 等,3 311  $\text{cm}^{-1}$ 附近吸收峰为O-H的伸缩振动,2 918  $\text{cm}^{-1}$ 为亚甲基C-H反对称伸缩振动,2 853  $\text{cm}^{-1}$ 处为亚甲基C-H对称伸缩振动,1 727  $\text{cm}^{-1}$ 处为羰基C=O的伸缩振动,1 021  $\text{cm}^{-1}$ 附近多为多糖类物质的C-O伸缩振动。这与文献[16-18]报道一致,也反映了石斛的主要成分为多糖类物质<sup>[19]</sup>。在二阶导数红外光谱中,铁皮枫斗在1 056~1 032  $\text{cm}^{-1}$ 呈现倒“M”形,与铁皮石斛出现的倒“V”形不同,说明铁皮石斛不同加工方式得以鉴别,但红外光谱是否能作为有效鉴别药材加工方式的一种快速方法后续还应加大样本量继续研究。此外,9份石斛样品的一维红外光谱相似度均在98.0%~99.9%,难以区分。而一阶红外光谱相似度均<90%,更适合鉴别曲茎石斛及其近缘种。因此,根据本文研究结果推测,选择一阶导数红外光谱对曲茎石斛及其近缘种的鉴别更为合理。综上分析,本研究通过比较上述2种方法,DNA分子鉴定需要提取、扩增、测序一系列流程,相比于红外光谱鉴定成本较高。在实际鉴定工作中,要综合考虑选择合适的方法对石斛进行鉴定。

曲茎石斛具有较好的食用价值,其花、叶可被制成茶使用。石斛多糖不仅是重要的有效物质,还能作为石斛重要的营养成分,其含量的高低会在一定程度上影响石斛的使用。因此,本研究主要选择对9份样品的石斛多糖和甘露糖含量进行分析,结

果可知样品S4与S5的多糖含量较高,霍山石斛多糖含量也较高,难以与铁皮石斛区别,这与之前报道结果相似<sup>[20]</sup>。而3批金钗石斛也呈现出了不同的多糖含量,原因可能与生长年限<sup>[21]</sup>、环境<sup>[22-25]</sup>、干燥方式<sup>[26]</sup>、种质<sup>[27]</sup>等诸多因素不同相关,后续将加大样本量继续研究。*D*-甘露糖含量结果显示,铁皮枫斗含量最高,而曲茎石斛中该成分含量也较高。然而,铁皮石斛样品S4中*D*-甘露糖含量却低于铁皮枫斗样品S5,这可能是不同环境<sup>[22]</sup>、不同栽培方式等造成的。曲茎石斛含有较多的多糖也间接说明其作为“味甜”石斛应用的科学性。据《本草纲目拾遗》记载,曲茎石斛的性状符合“细、小、色黄,长度较短,多为几寸,且质实有肉,嚼之富膏脂者为上品”<sup>[28]</sup>,这也为其药用、食用价值的挖掘提供了支撑。因此,笔者建议后期可加大对曲茎石斛的药用价值研究,以在一定程度上缓解药用石斛资源紧缺的压力。此外,鉴于本研究所选取样本量较少,后期将加大样本量对曲茎石斛进行研究,并探索开发选育优良品种石斛。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:94-97,295-296.
- [2] 张爽. 伏牛山区环境条件对曲茎石斛生长繁殖的影响[J]. 现代园艺,2016(21):13-14.
- [3] 明兴加,赵纪峰,米本中,等. 基于形态学的金钗、金钗石斛名实续考[J]. 中国中药杂志,2018,43(11):2396-2401.
- [4] 明兴加,李博然,赵纪峰,等. 金钗、金钗石斛的名实考证[J]. 中国中药杂志,2016,41(10):1956-1964.
- [5] 丁小余,徐璐珊,徐红,等. 曲茎石斛及其近缘种鉴别的形态和DNA分子证据[J]. 药学学报,2001,36(11):868-873.
- [6] 徐利国,钟国跃. 石斛的名义和原植物[J]. 时珍国医国药,2004,15(4):241-242.
- [7] 徐雅因,钟淳菲,陈燕兰,等. 不同石斛品种的品质差异[J]. 食品工业,2020,41(9):280-284.
- [8] 陈丹,吴梅青,张广宁,等. 铁皮石斛、流苏石斛及紫皮石斛中总多糖含量测定研究[J]. 中国民族民间医药,2019,28(22):50-54.
- [9] 雷林. 基于颜色量化与近红外光谱技术对谷芽、苍术质量快速评价的方法学研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2021.
- [10] 楚刚辉,谭雪梨. 基于近红外光谱与CARS-PLS-LDA的不同产地雪菊的定性鉴定[J]. 时珍国医国药,

- 2020,31(9):2148-2152.
- [11] 丁海泉,高洪智,刘振尧. 近红外光谱分析技术在中药材鉴定和质量控制中的研究进展[J]. 现代农业装备,2020,41(3):11-16.
- [12] 陈乃东. 霍山石斛、铁皮石斛与河南石斛花茶多级红外光谱快速鉴定研究[J]. 光谱学与光谱分析,2020,40(8):2598-2604.
- [13] 刘文杰. 铁皮石斛的红外光谱定性定量研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [14] 徐素素,高静,陈军文,等. 药用石斛及其混伪品的DNA条形码分子鉴定[J]. 云南农业大学学报:自然科学版,2021,36(5):862-871.
- [15] 王晓云,张莲,曹岚,等. 江西省锐尖山香圆亲缘关系与群体结构的ISSR分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(15):150-155.
- [16] 徐元江,刘江,彭诗原,等. 西藏六种野生石斛的红外光谱鉴别研究[J]. 高原农业,2019,3(6):664-669.
- [17] 张悦,陈莹,郭怡博,等. 基于化学计量学的金钗石斛不同加工品和干燥品的红外光谱分析[J]. 中南药学,2021,19(3):431-438.
- [18] 刘瑞婷. 基于近红外光谱技术的石斛属植物快速鉴别研究与应用[D]. 杭州:浙江农林大学,2015.
- [19] 曾贞,孙恒,陈骏飞,等. FTIR结合化学计量学快速预测铁皮石斛中总多糖含量[J]. 江西农业学报,2018,30(1):117-121.
- [20] 王雅文,梁芷韵,谢镇山,等. 铁皮石斛与霍山石斛中甘露糖、葡萄糖及柚皮素的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):35-42.
- [21] 吴经耀,冯瑛. 不同采收期铁皮石斛主要成分含量测定及比较[J]. 中国民族民间医药,2019,28(10):39-42.
- [22] 余文霞. 不同居群铁皮石斛表型性状、SSR指纹图谱及多糖含量研究[D]. 广州:广州中医药大学,2019.
- [23] 唐丽,王朝勇,龙华,等. 环境因子对铁皮石斛生长发育及药效成分含量的影响[J]. 中药材,2019,42(2):251-255.
- [24] 田少凯,侯嘉铭,高智强,等. 光果甘草ARPI基因的克隆和生物信息学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(4):185-190.
- [25] 侯嘉铭,田少凯,杨林,等. 光果甘草GgUGE基因的克隆和序列分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(6):163-167.
- [26] 韩妹葶,王婉馨,袁国强,等. 干燥方式对铁皮石斛品质的影响[J]. 食品科学,2019,40(3):142-148.
- [27] 左珺花. 铁皮石斛种质资源主要成分差异分析及遗传多样性研究[D]. 南昌:江西师范大学,2020.
- [28] 焦连魁,曾燕,王继永,等. 石斛药材基原的本草学研究概况[J]. 中国现代中药,2019,21(4):542-551.

[责任编辑 刘昶]