

HPAEC-PAD 法测定石斛属植物单糖组分与主成分聚类分析

陈懿瑶¹, 罗阳¹, 闫燊¹, 钟伟萍¹, 牟兰¹, 田孟良^{2*}

(1. 四川农业大学农学院, 成都 611130; 2. 四川农业大学新农村发展研究院, 四川雅安 625014)

[摘要] 目的:建立一种高效阴离子交换色谱-脉冲安培(HPAEC-PAD)检测方法,直接用于检测石斛属植物单糖组分,并对其进行主成分聚类分析。方法:通过单因素试验筛选石斛多糖水解条件,使用 DIONEX-ICS-5000⁺型离子色谱进行检测,梯度洗脱;并通过主成分聚类分析 20 种石斛属植物。结果:建立的 HPAEC-PAD 法能在 15 min 之内实现 7 种单糖(甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、果糖、乳糖)的分离,精密度、稳定性、重复性 RSD < 5.0%,各成分平均加样回收率为 141.95%,平均 RSD 3.4%;对单糖组分分析结果表明,单糖组分差异显著,最高相差 961 倍,最低相差 38.5 倍;20 种石斛均检测出甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和木糖,球花石斛、滇金石斛、尖刀唇石斛 3 种未检测出果糖和乳糖;长距石斛、长苏石斛未检测出果糖;景洪石斛、小黄花石斛、玫瑰石斛未检测出乳糖;通过主成分聚类分析,能将铁皮石斛、鼓槌石斛、金钗石斛、线叶石斛、姬竹叶石斛、小黄花石斛、玫瑰石斛、长苏石斛、长距石斛、尖刀唇石斛、蜻蜓石斛、滇金石斛、景洪石斛聚为一类,此类单糖组分含量较低,其他石斛种含量相对较高。结论:建立的 HPAEC-PAD 法灵敏度高、重复性好,样品处理简单,分析快速准确,仪器使用便利,可用于石斛单糖或其他植物、微生物单糖组分测定,为石斛多糖成分质控提供参考,通过组分分析也为高多糖种质选择、选育提供重点关注材料。

[关键词] 高效阴离子交换色谱-脉冲安培(HPAEC-PAD)法;石斛单糖组分;主成分聚类;石斛属

[中图分类号] R282.2;R241;R286;R931.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0106-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181046

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180312.1456.003.html>

[网络出版时间] 2018-03-12 17:07

Monosaccharide Composition and Principal Component Clustering Analysis of *Dendrobium* by HPAEC-PAD

CHEN Yi-yao¹, LUO Yang¹, YAN Shen¹, ZHONG Wei-ping¹, MOU Lan¹, TIAN Meng-liang^{2*}

(1. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Institute for New Rural Development, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for determination of monosaccharide compositions of *Dendrobium* by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), and conduct principal component clustering analysis. **Method:** The hydrolysis conditions of polysaccharide were screened by single factor experiment, and then DIONEX-ICS-5000⁺ ion chromatography was used for detection and gradient elution. Finally, 20 species of dendrobium were analyzed by principal component clustering analysis. **Result:** The 7 kinds of monosaccharide (mannose, rhamnose, arabinose, glucose, xylose, fructose, and lactose) could be separated within 15 min with HPAEC-PAD method, and the precision, stability, repeatability and accuracy of the established method were well-validated, RSD < 5.0%. The recovery rate of each component was 141.95% with RSD of 3.4%. The results of monosaccharide components analysis showed that the difference of monosaccharide components was significant; the maximum difference was 961 times, and the minimum difference

[收稿日期] 20171128(020)

[基金项目] 四川省农业科技成果转化资金项目(15NZ0033);四川农业大学本科生科研兴趣培养项目

[第一作者] 陈懿瑶,从事中草药栽培与鉴定方向,E-mail:840390175@qq.com

[通信作者] *田孟良,博士,教授,从事中药材新品种选育和规范化栽培研究,E-mail:652430882@qq.com

was 38.5 times. All of 20 species of dendrobium contained mannose, rhamnose, arabinose, glucose and xylose, but fructose and lactose were not detected in *D. thysiflorum*, *Flickingeria albopurpurea* and *D. heterocarpum*; fructose was not detected in *D. longicornu* and *D. brymerianum*; and lactose was not detected in *D. exile*, *D. jenkinsii* and *D. crepidatum*. By the method of principal component clustering analysis, *D. officinale*, *D. chrysotoxum*, *D. nobile*, *D. aurantiacum*, *D. jenkinsii*, *D. crepidatum*, *D. brymerianum*, *D. longicornu*, *D. heterocarpum*, *D. pulchellum*, *F. albopurpurea*, and *D. exile* were clustered into one class, as the content of the monosaccharide components was low in these species, and relatively high in the other dendrobium species.

Conclusion: The established HPAEC-PAD method has high sensitivity, good reproducibility, easy processing of samples, accurate analysis and convenient use of instrument, so it can be used for component determination in *Dendrobium* monosaccharide or other plant monosaccharide, providing reference for the quality control of polysaccharides in dendrobiums. Through the component analysis, it also provides key points in the selection and breeding of high-polysaccharide germplasm.

[**Key words**] HPAEC-PAD; *Dendrobiums monosaccharide*; principal component analysis; *Dendrobium*

石斛属 (*Dendrobium*) 是兰科植物最大属之一, 分布广泛, 我国记载报道^[1] 有 81 种 2 变种, 其中药用近 51 种。作为传统中药材, 2015 年版《中国药典》^[2] 也将铁皮石斛、金钗石斛、鼓槌石斛、流苏石斛及其同属植物的新鲜或干燥茎入药, 也是重要的保健“食品”。现代药理研究表明其中的石斛多糖、石斛碱、芪类及其衍生物等天然物质是其发挥功效的主要成分, 尤其是多糖, 不仅是光合作用直接产物, 也是石斛发挥其增强免疫、调节血糖、抗氧化、延缓衰老等功效的重要成分^[3-4]; 因此开展石斛多糖中单糖组分的研究就尤为重要。

目前对多糖成分的测定存在许多方法, 包括传统的滴定法、光谱法以及现代的色谱、质谱等方法, 但是各方法均存在一定限制因素, 而高效阴离子交换色谱-脉冲积分安培检测 (HPAEC-PAD) 法不仅提高了传统方法检测的准确度, 也减少了液相、气相色谱法对样品处理衍生化步骤, 达到了操作简便、灵敏度高、分离效果好的分析效果^[5-6]。并且也还未见报道有利用该法建立石斛属植物单糖组分的研究, 2015 年版《中国药典》中对于石斛多糖和甘露糖的检测手段也较为传统和滞后, 样品处理也相对复杂, 因此有必要建立石斛单糖组分的分析检测方法, 为石斛多糖的质控提供参考。

对石斛单糖组分研究显示石斛中含有葡萄糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、果糖、半乳糖醛酸、鼠李糖等, 不同的石斛种中单糖组分存在差异, 不同的种植年限之间也存在差异^[7-10], 因此有必要对更大的种质群体之间单糖组分差异进行进一步的研究, 以期对石斛高多糖种质选择、选育提供依据。

1 材料

DIONEX-ICS-5000⁺ 型离子色谱 (Thermo Fisher Scientific 公司), 配备检测器, Au 工作电极, Ph-Ag/AgCl 复合参比电极, Chromeleon 7 色谱工作站, AS-AP 自动进样器, CarboPacTM PA100 BioLCTM Guard (4 mm × 50 mm), CarboPacTM PA100 Analytical (4 mm × 250 mm); UPH-III-10T 型超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司); KQ-400KDE 型大功率数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); LX-0 型万能高速粉碎机 (红光工贸有限公司); 0.45 μm 津腾有机滤头及一次性注射器 (成都力天世纪生物科技有限公司); Allegra X-30R Centrifuge 型离心机 [贝克曼库尔特商贸 (中国) 有限公司]; CP224S 电子天平 (德国赛多利斯公司); DHG-91012A 型电热恒温鼓风干燥器 (上海三发科学仪器有限公司)。

无水乙醇为优级纯; 甘露糖 (Man), 鼠李糖 (Rha), 阿拉伯糖 (Ara), 葡萄糖 (Glu), 木糖 (Xyl), 果糖 (Fru), 乳糖 (Lac) 单糖对照品 (均为 HPLC 级, 批号分别为 MFCD00064122, MFCD00011591, MFCD00135867, MFCD00063774, MFCD00064360, MFCD00148910, MFCD00150747) 购于上海源叶生物科技有限公司; 50% NaOH 溶液购于 Sigma-Aldrich 公司; 用水为电阻率 ≥ 18.19 MΩ·cm 的超纯水; 硫酸、硝酸、磷酸、盐酸、冰乙酸、双氧水三氟乙酸 (TFA) 均为分析纯 (西陇化工有限公司)。

材料为从云南、四川等地收集的 20 种石斛属植物, 经四川农业大学田孟良教授鉴定有滇金石斛 (*Flickingeria albopurpurea*), 鼓槌石斛 (*D. chrysotoxum*), 姬竹叶石斛 (*D. salaccense*), 玫瑰石斛 (*D. crepidatum*), 喇叭唇石斛 (*D. lituiflorum*), 黄

喉石斛 (*D. signatum*), 长距石斛 (*D. longicornu*), 长苏石斛 (*D. brymerianum*), 蜻蜓石斛 (*D. pulchellum*), 麝香石斛 (*D. parishii*), 细茎石斛 (*D. moniliforme*), 紫婉石斛 (*D. transparens*), 球花石斛 (*D. thyrsiflorum*), 景洪石斛 (*D. exile*), 小黄花石斛 (*D. jenkinsii*), 苏瓣石斛 (*D. harveyanum*), 铁皮石斛 (*D. officinale*), 线叶石斛 (*D. aurantiacum*), 尖刀唇石斛 (*D. heterocarpum*), 金钗石斛 (*D. nobile*)。

2 方法与结果

2.1 高效阴离子交换色谱-脉冲安培法 (HPAEC-PAD)

2.1.1 淋洗液配制 淋洗液 A 为超纯水; 精密量取 50% NaOH 溶液 26.2 mL, 加入超纯水至 1 L, 配制成浓度为 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淋洗液 B。

2.1.2 色谱条件 柱温 (检测池温度) $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样体积 $25 \text{ } \mu\text{L}$, 金盘工作电极, 脉冲安培检测, IntAMP 模式, AgCl 参比电极, pH 12.48, Gold Carbo Quad 模式波形, 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 淋洗梯度程序

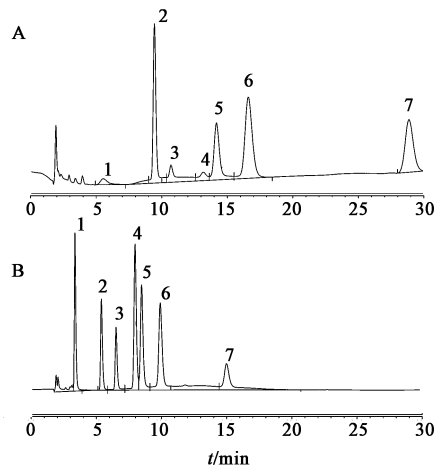
Table 1 Gradient condition

时间 /min	流速 / $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	A /%	B /%	时间 /min	流速 / $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	A /%	B /%
0	0.800	90	10	14	0.600	80	20
3	0.800	90	10	18	0.600	85	15
5	0.800	85	15	20	0.800	85	15
7	0.400	85	15	24	0.800	90	10
9	0.300	80	20	30	-	-	-
12	0.400	80	20				

2.1.3 色谱柱选择 按照 2.1.2 项下色谱条件进行对比试验, 发现 CarboPac™ PA100 Analytical ($4 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$) 比 CarboPac™ PA10 Analytical ($4 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$) 具有更高效的分离效果见图 1, 因此选择 PA100 色谱柱, CarboPac™ PA100 BioLC™ 保护柱 ($4 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$) 作为实验使用色谱柱。

2.2 对照品配制

2.2.1 对照品溶液配制 分别精密称取甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、果糖、乳糖对照品配制成质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备母液; 再精密吸取配置成各单糖浓度均为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合使用液; 过 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 孔径滤膜, 在 2.1 项条件下进行进样分析, 记录色谱图, 7 种单糖混合对照品分离色谱图见图 2, 结果表明在 15 min 以内能有效分离甘露糖,



1. 甘露糖; 2. 鼠李糖; 3. 阿拉伯糖; 4. 葡萄糖; 5. 木糖; 6. 果糖; 7. 乳糖 (图 2 同)

图 1 石斛对照品色谱柱 PA10 (A) 与 PA100 (B) 分离效果

Fig. 1 Chromatogram of 7 carbohydrates on different columns

鼠李糖, 阿拉伯糖, 葡萄糖, 木糖, 果糖, 乳糖, 分离度、理论板数均达到分析要求。

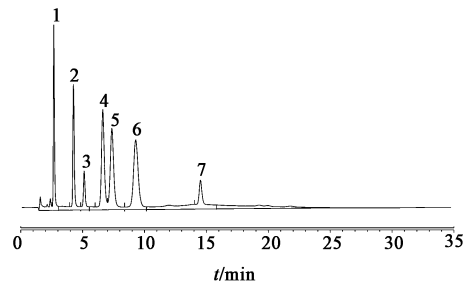


图 2 混合对照品 HPAEC 离子色谱

Fig. 2 Ion chromatogram of standard mixed solution of 7 monosaccharides

2.2.2 标准曲线制备 精密吸取单糖对照溶液, 配制成梯度质量浓度溶液, 按 2.1 项下进行进样分析, 以质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归分析, 计算各单糖回归方程和相关系数, 结果见表 2。

表 2 7 种单糖回归方程、线性范围

Table 2 Linear regression date of 7 carbohydrates

单糖	回归方程	R^2	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
Man	$Y = 6.6023X + 0.2596$	0.9992	0.05 ~ 6.00
Rha	$Y = 5.3954X + 0.1804$	0.9997	0.01 ~ 4.00
Ara	$Y = 13.687X + 0.2028$	0.9992	0.01 ~ 2.00
Glu	$Y = 17.700X - 0.6117$	0.9997	0.01 ~ 20.00
Xyl	$Y = 1.3236X + 0.2257$	0.9993	0.01 ~ 10.00
Fru	$Y = 20.164X + 0.5793$	0.9999	0.01 ~ 2.00
Lac	$Y = 2.3191X + 2.4737$	0.9990	0.01 ~ 4.00

2.3 样品处理

2.3.1 多糖提取 通过预备试验发现石斛多糖制备方法采用超声辅助提取能提高提取效率,因此在本试验采用超声辅助“水提醇沉法”进行石斛多糖的提取制备。取1年生石斛新鲜茎洗净,于105℃烘箱中杀青30 min,50℃烘干至恒重,样品机械粉碎后过40目筛。取过筛粉末约0.3 g,精密称定,加入超纯水30 mL,活性炭0.06 g,于400 W,50℃超声提取1 h,静置过夜取上清液8 mL,加入无水乙醇32 mL,冷藏2 h后4℃离心(3 000 r·min⁻¹)30 min,沉淀加20 mL热水溶解得多糖提取液。

2.3.2 多糖水解液制备 通过单因素试验结果发现,TFA水解效果优于盐酸、磷酸、硝酸、冰乙酸、硫酸、双氧水等水解试剂(浓度均为6 mol·L⁻¹),其他水解条件为温度100℃,时间12 h,样品体积-水解剂体积(1:1)3个因素均优于其他对照处理。

2.3.3 样品制备 精密吸取20个石斛样品多糖提取溶液1 mL,精密加入TFA 1 mL,密闭,置于100℃环境水解12 h,挥干溶剂,加入5 mL热水溶解,过0.45 μm滤膜,装入进样瓶,按2.1项下上样检测。

2.4 方法学验证

2.4.1 精密度试验 取7种单糖混合使用液连续进样6次,间隔6 h,重复3次,测试条件按2.1项下执行,记录色谱图峰面积,计算精密度RSD在0.9%~3.4%,<5.0%,结果表明,DIONEX-ICS-5000⁺型离子色谱分析精密度良好。

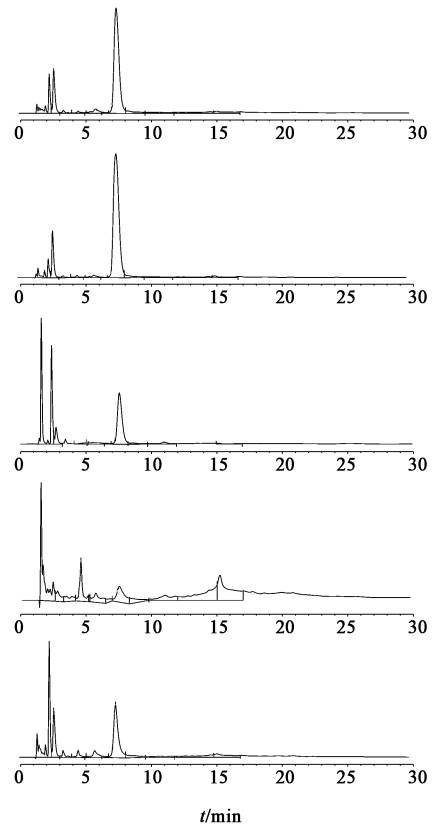
2.4.2 稳定性试验 取石斛样品,按2.3项下制备样品液,测试条件按2.1项下执行,测试后6,12,24,36,48,72 h再次进样,记录色谱图峰面积,计算RSD在1.2%~3.4%,<5.0%,结果表明该方法处理样品在检测条件72 h内稳定。

2.4.3 稳定性试验 取石斛样品,按2.3项下制备样品液,测试条件按2.1项下执行,重复6次,记录色谱图峰面积,计算RSD在1.2%~4.4%,<5.0%,结果表明该方法重复性良好。

2.4.4 加样回收试验 取已测得单糖组分含量样品,精密称量,按50%,100%,150%水平添加各单糖对照品进行加样回收试验,按2.3.3项下进行水解处理,按2.1项下执行测试,记录色谱图峰面积,计算各单糖成分加样回收率以及计算RSD,平均加样回收率为141.95%,RSD 3.4%,因此该方法具有一定的可靠性。

2.5 样品单糖组分测定 将20种石斛样品制备液按2.1项方法上样检测,记录色谱图(部分石斛测

试色谱图见图3),重复3次试验,取均值计算,结果见表3。各个单糖组分存在显著差异,以最高含量对比来看,木糖和甘露糖含量最高,鼠李糖、乳糖次之,阿拉伯糖、葡萄糖偏低,果糖含量最少。以最高含量和最低含量差异来看,最大差异是木糖,最高含量(紫萼石斛)与最低含量(滇金石斛)相差961倍;最小差异为乳糖,最高含量(喇叭唇石斛)和最低含量(线叶石斛)相差38.5倍;7种单糖总含量最高(紫萼石斛)和最低(景洪石斛)相差43.76倍。在种属差异上,20个种的石斛均检测出甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和木糖;球花石斛、滇金石斛、尖刀唇石斛3种均未检测出果糖和乳糖;长距石斛、长苏石斛未检测出果糖;景洪石斛、小黄花石斛、玫瑰石斛未检测出乳糖。



A. 蜻蜓石斛; B. 紫萼石斛; C. 铁皮石斛; D. 金钗石斛; E. 鼓槌石斛

图3 部分石斛样品单糖组分离子色谱

Fig.3 Part of sample monosaccharide IC

2.6 主成分聚类

2.6.1 主成分分析 根据20种石斛单糖组分结果,发现7种单糖组分含量之间差异显著,将数据导入SPSS 20.0进行主成分分析,得到主成分总变量和主成分载荷矩阵(表4,5),计算得到前2个主成分(PC1和PC2)累积方差贡献值(94.89%),对解释

表 3 20 种石斛样品单糖组分含量测定

Table 3 Measurement results of monosaccharide composition of 20 *Dendrobium* sample

样品	甘露糖	鼠李糖	阿拉伯糖	葡萄糖	木糖	果糖	乳糖	总和
滇金石斛	0.026	0.012	0.005	0.001	0.059	0	0	0.103
鼓槌石斛	0.153	0.034	0.025	0.014	0.243	0.008	0.077	0.554
姬竹叶石斛	0.039	0.026	0.022	0.006	0.161	0.007	0.043	0.304
玫瑰石斛	0.071	0.021	0.006	0.003	0.108	0.003	0	0.212
喇叭唇石斛	0.674	0.052	0.059	0.178	0.847	0.039	0.308	2.157
黄喉石斛	0.087	0.112	0.054	0.004	0.229	0.009	0.026	0.521
长距石斛	0.030	0.016	0.007	0.003	0.109	0	0.021	0.186
长苏石斛	0.056	0.019	0.007	0.004	0.082	0	0.052	0.220
蜻蜓石斛	0.296	0.032	0.042	0.063	0.440	0.017	0.142	1.032
麝香石斛	0.209	0.082	0.063	0.032	0.379	0.017	0.107	0.889
细茎石斛	0.459	0.048	0.055	0.138	0.726	0.03	0.266	1.722
紫婉石斛	0.641	0.072	0.057	0.192	0.961	0.036	0.273	2.232
球花石斛	0.027	0.013	0.006	0.002	0.021	0	0	0.069
景洪石斛	0.022	0.009	0.006	0.002	0.011	0.001	0	0.051
小黄花石斛	0.060	0.004	0.001	0.002	0.001	0.030	0	0.098
苏瓣石斛	0.316	0.347	0.125	0.087	0.602	0.031	0.120	1.628
铁皮石斛	0.153	0.030	0.030	0.034	0.263	0.016	0.013	0.539
线叶石斛	0.059	0.052	0.037	0.010	0.218	0.008	0.008	0.392
尖刀唇石斛	0.029	0.020	0.008	0.003	0.085	0	0	0.145
金钗石斛	0.005	0.031	0.006	0.001	0.080	0.003	0.076	0.202

表 4 主成分总变量

Table 4 Total variance explained of principal component analysis

项目	标准偏差	方差贡献值/%	累积贡献值/%
PC1	2.326	77.32	77.32
PC2	1.108	17.15	94.89
PC3	0.478	3.26	98.15
PC4	0.240	0.82	98.97
PC5	0.235	0.79	99.76
PC6	0.107	0.16	99.92
PC7	0.076	0.08	100

表 5 成分载荷矩阵

Table 5 Rotated component matrix of principal component analysis

单糖	Ara	Glu	Xyl	Fru	Lac	Man	Rha
PC1	-0.349	-0.410	-0.422	-0.387	-0.396	-0.414	-0.231
PC2	-0.502	0.230			0.273	0.220	-0.750
PC3	0.112	0.104	0.238	-0.901	0.314		
PC4	0.552	-0.552		0.120	0.452	-0.196	-0.407
PC5	-0.415		-0.375		0.682	-0.199	-0.407
PC6		-0.289	-0.481	-0.102		0.818	
PC7	0.404	0.615	-0.620			-0.172	-0.204

变量贡献最大,可作为最佳主成分数目;第一主成分 PC1 综合了 7 种单糖信息,且 7 种单糖均有贡献,表明这 7 种单糖均能代表这 20 种石斛种质材料的单糖组分差异来源的组成;第二主成分 PC2 综合了阿拉伯糖、葡萄糖、乳糖、甘露糖、鼠李糖 5 种单糖信息。

2.6.2 聚类分析 通过计算 20 种石斛属植物的主成分得分,得到其主成分得分平面图(图 4),根据结果,可将铁皮石斛、鼓槌石斛、金钗石斛、线叶石斛、

姬竹叶石斛、小黄花石斛、玫瑰石斛、长苏石斛、长距石斛、尖刀唇石斛、蜻蜓石斛、滇金石斛、景洪石斛聚为一类,此类石斛单糖组分含量较低;喇叭唇石斛、紫婉石斛、苏瓣石斛、细茎石斛单糖组分含量相对较高。

3 讨论

本研究建立的 HPLC-PAD 法(高效阴离子色谱-脉冲检测)对 7 种单糖(甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、果糖、乳糖)成分能实现快速

(15 min 以内), 高效(无衍生化及其他处理), 痕量(检测限在 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的分离鉴定。在对淋洗液的使用中, 单一使用 NaOH 和超纯水溶液就能达到良好的效果, 在分离测试中发现 NaOH 溶液浓度越高, 仪器灵敏度越高, 但分辨率降低; 增加淋洗液流速能加快出峰速度, 但是分辨率会有所降低; 一定范围提高温度也会使仪器灵敏度提高, 分辨率降低; 因此在针对不同单糖成分的时候, 需要对这三者之间找到一个平衡点, 协调灵敏度与分辨率, 以达到最优的分离效果。

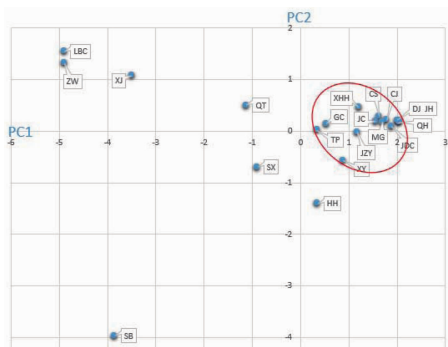


图 4 石斛单糖组分主成分得分

Fig. 4 Main component score of dendrobium monosaccharide component

在对石斛多糖水解液的制备过程中, 本研究采用了单因素试验, 对比各种水解剂的水解效果、水解温度、水解时间, 发现样品体积-TFA 体积 1:1, 100 °C 水解 12 h 能达到一个最优的水解效果。但并未进行水解条件各因素之间的相关性研究与分析, 因此采用正交试验或者响应面设计探究最优的水解方案也是后续研究需要努力的方向。在利用建立的 HPLC-PAD 法检测石斛单糖组分中, 20 种石斛单糖组分差异较大, 再通过与 2015 年版《中国药典》检测的石斛甘露糖含量标准对比中发现此 20 种石斛均未达到标准, 一是由于本次取样为石斛新生一年新鲜茎叶, 含量还未达到入药标准; 二是检测方法存在差异, 药典规定使用的是液相色谱衍生化处理检测, 这样增加了处理过程带来的人为试验误差, 而本次试验建立的检测方法更为简便、高效, 能够有效地降低人为误差, 更能真实反应石斛甘露糖含量本身的差异, 也为提升石斛多糖质控检测、检验手段提供参考。

石斛中的药效成分多样, 通过其多样的生物活性化学物质建立指纹图谱更能全面表征种质之间差异, 因此本研究预试验阶段也对 2015 年版《中国药典》规定检测成分石斛碱、毛兰素以及其他化学成分香豆素、柚皮素、丁香酸、香草醛、没食子酸进行 HPLC 含量的测定, 但是大部分种质均未检测到, 作为指纹图谱或者种质聚类并不能很好的说明种质之间差异来源。因此通过对其单糖组分成分进行分析, 对造成这 20 种石斛中单糖组分差异的主要因素来源包含了这 7 种单糖, 通过聚类可大致将铁皮石斛、鼓槌石斛、金钗石斛、线叶石斛、姬竹叶石斛、小黄花石斛、玫瑰石斛、长苏石斛、长距石斛、尖刀唇石斛、蜻蜓石斛、滇金石斛、景洪石斛聚为一类, 此类单糖组分含量较低; 对于喇叭唇石斛、紫萼石斛、细茎石斛和苏瓣石斛, 其单糖组分含量较高, 在研究石斛高多糖品种选择、选育方面都是值得关注的重点种属材料。

[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:北京科学出版社, 1999:111.
[2] 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, 2015: 92-93.
[3] 孙恒, 胡强, 金航, 等. 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.
[4] 蒋玉兰, 罗建平. 药用石斛多糖药理活性及化学结构研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 2986-2988.
[5] 刘婷. 多糖类物质的离子色谱检测技术研究[D]. 重庆:西南大学, 2009.
[6] 柴银, 王虹, 刘雅萌, 等. 离子色谱测定多糖的单糖组成的方法学研究及其应用[J]. 药物生物技术, 2016, 23(4): 332-336.
[7] 龚庆芳, 周浩, 王新桂, 等. 7 种石斛多糖质量分数的测定及单糖组成分析[J]. 食品科技, 2013, 38(3): 172-175.
[8] 黄民权, 阮金月. 6 种石斛属植物水溶性多糖的单糖组分分析[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(2): 74, 115.
[9] 颜美秋, 陈素红, 周桂芬, 等. 不同种植年限铁皮石斛多糖、甘露糖含量的测定及其他化学成分比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(4): 878-881.
[10] 朱波, 荣松, 吴令上, 等. 铁皮石斛优良亲本杂交 F₁ 代苗期选择[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 25-29.

[责任编辑 全燕]