

HPLC-CAD法测定3种药用石斛中3种糖类成分的含量[△]

郑晓倩^{1*}, 金传山^{1#}, 张亚中², 刘军玲², 俞年军¹, 欧金梅¹(1.安徽中医药大学药学院,合肥 230012;2.安徽省食品药品检验研究院,合肥 230051)

中图分类号 R282.71;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)10-1185-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.10.06

摘要 目的:建立测定3种药用石斛中3种单/双糖成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱-电喷雾式检测器法。色谱柱为Shodex Asahipak NH₂P-50 4E,流动相为乙腈-水(75:25, V/V),流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为10 μL,数据采集频率为5 Hz,过滤常数为5 s,雾化器温度为35 ℃,气源为氮气,压力为4.012×10⁵ Pa。结果:果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖检测质量浓度的线性范围分别为0.156 2~1.873 8 mg/mL($r=0.999\ 5$)、0.012 7~0.152 4 mg/mL($r=0.999\ 7$)、0.277 6~3.331 2 mg/mL($r=0.999\ 8$);定量限分别为0.002 61、0.004 24、0.005 12 mg/mL,检测限分别为0.000 78、0.001 27、0.001 54 mg/mL;精密性、稳定性、重复性、耐用性试验的RSD均小于3%,加样回收率分别95.98%~98.15%(RSD=0.83%, $n=6$)、95.64%~98.62%(RSD=1.10%, $n=6$)、97.53%~98.94%(RSD=0.53%, $n=6$);含量分别为0.28%~1.12%、0.02%~0.13%、0.76%~2.67%;总含量为1.38%~3.10%。3种石斛中糖类成分含量高低依次为蔗糖>果糖>D-无水葡萄糖,其中蔗糖含量及总含量高低依次均为霍山石斛>铜皮石斛>铁皮石斛,D-无水葡萄糖含量高低依次为霍山石斛>铁皮石斛>铜皮石斛,果糖含量高低依次为铜皮石斛>铁皮石斛>霍山石斛。结论:所建方法灵敏度高、重复性好、操作简单,可用于测定3种药用石斛中3种糖类成分的含量;3种药用石斛中糖类成分的含量存在差异。

关键词 高效液相色谱-电喷雾式检测器法;霍山石斛;铁皮石斛;铜皮石斛;单糖成分;双糖成分;含量测定

Content Determination of 3 Saccharides in 3 Kinds of Medicinal *Dendrobii Caulis* by HPLC-CAD

ZHENG Xiaoqian¹, JIN Chuanshan¹, ZHANG Yazhong², LIU Junling², YU Nianjun¹, OU Jinmei¹(1. College of Pharmacy, Anhui University of TCM, Hefei 230012, China; 2. Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the content determination method of 3 mono/disaccharides in 3 kinds of medicinal *Dendrobii Caulis*. METHODS: HPLC-CAD method was established. The determination was performed on Shodex Asahipak NH₂P-50 4E column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (75:25, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃, and sample size was 10 μL. CAD detection condition included that data acquisition frequency was 5 Hz, filter constant was 5 s, atomization temperature was 35 ℃, gas source was nitrogen with pressure of 4.012×10⁵ Pa. RESULTS: The linear range of fructose, D-anhydrous glucose and sucrose were 0.156 2-1.873 8 mg/mL($r=0.999\ 5$), 0.012 7-0.152 4 mg/mL($r=0.999\ 7$), 0.277 6-3.331 2 mg/mL($r=0.999\ 8$), respectively. The limits of quantification were 0.002 61, 0.004 24 and 0.005 12 mg/mL, and the limits of detection were 0.000 78, 0.001 27 and 0.001 54 mg/mL, respectively. RSDs of precision, stability, reproducibility and durability tests were all lower than 3%. The recoveries were 95.98%-98.15% (RSD=0.83%, $n=6$), 95.64%-98.62% (RSD=1.10%, $n=6$) and 97.53%-98.94% (RSD=0.53%, $n=6$). The contents of them were 0.28%-1.12%, 0.02%-0.13%, 0.76%-2.67%, respectively. The total content was 1.38%~3.10%. The order of saccharide content in 3 kinds of *Dendrobii Caulis* was sucrose>fructose>D-anhydrous glucose; the order of sucrose content and total content were *Dendrobium huoshanense*>*D. moniliforme*>*D. officinale*; the order of D-anhydrous glucose content was *D. huoshanense*>*D. officinale*>*D. moniliforme*; the order of fructose content was *D. moniliforme*>*D. officinale*>*D. huoshanense*. CONCLUSIONS: Established method is sensitive, reproducible and simple in operation, and can be used for content determination of 3 saccharides in 3 kinds of medicinal *Dendrobii Caulis*. There are differences in the contents of saccharides among 3 kinds of *Dendrobii Caulis*.

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U19A2009);中央财政林业科技推广示范资金项目(No.林科函[2019]357号);中央财政林业改革发展资金项目(No.皖财资环[2019]722号);安徽省财政厅“特支计划”资金项目(No.皖财行[2019]669号)

* 硕士研究生。研究方向:中药质量标准。E-mail:185078352@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药炮制学教学与科研。E-mail:jcs4@sohu.com

KEYWORDS HPLC-CAD; *Dendrobium huoshanense*; *Dendrobium officinale*; *Dendrobium moniliforme*; Monosaccharides; Disaccharides; Content determination

石斛属(*Dendrobium*)是兰科大属植物之一^[1],分布极其广泛。《中国植物志》中记载的石斛药用品种有近51种^[2],其中安徽霍山境内及其邻近山区主产的霍山石斛

(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)、铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)和细茎石斛(又名铜皮石斛)[*Dendrobium moniliforme*(L.)Sw.]等3种药用石斛的临床价值极高^[3]。有研究表明,药用石斛主要含有糖类^[4]、生物碱类^[5]、菲类^[6]等成分,且糖类成分是该药材发挥抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、调节血糖、增强免疫等^[7-9]功效的重要活性成分,且该类成分的药理活性与其单糖组成密切相关^[1,10-11]。由此可见,测定药用石斛中糖类成分的含量具有重要意义。目前,关于药用石斛糖类成分中多糖的含量测定已有较多研究报道,但对于其单糖、双糖的含量测定研究相对较少。单糖和双糖是多糖组成的基础,其中果糖具有养胃、护肝、润肠、滑肠通便、平衡肠道菌群的活性,有预防便秘、肠炎、肠道癌的功^[12];葡萄糖具有营养、解毒、强心、利尿的作用,是机体所需能量的主要来源,除对肝脏具有保护和解毒作用外,还可加强记忆、刺激钙质吸收和促进细胞间的沟通^[13];蔗糖可以增加机体三磷酸腺苷的合成,有利于维持氨基酸的活力与蛋白质的合成,具有解毒保肝、抑制细菌繁殖、止血、消炎、增强钙铁吸收等作用^[14];且果糖、葡萄糖和蔗糖混合物具有补血的活性^[15]。因此,测定药材中单糖和双糖的含量显得十分重要。

有学者采用高效液相色谱(HPLC)-蒸发光散射法^[16]和高效阴离子交换色谱-脉冲安培法^[17]测定了药用石斛中单糖和双糖的含量,但蒸发光散射检测的耐用性和稳定性欠佳^[17],脉冲安培检测的成本较高、稳定性差且对色谱条件要求较为严格^[18]。近年来,电喷雾式检测器(CAD)作为一种新型的通用检测器,可在一定程度上弥补上述检测器的不足,现已被广泛应用于药物分析领域,尤其是脂质、糖类、生物碱类、甾体皂苷类等弱紫外吸收和无紫外吸收化合物的定量分析^[19-21];此外,CAD还具有无需衍生化处理就可直接分离以测定单糖、双糖的优点^[22]。基于此,本研究采用HPLC-CAD法测定霍山石斛、铁皮石斛、铜皮石斛等3种药用石斛中单糖(果糖、葡萄糖)和双糖(蔗糖)的含量,以探讨不同来源药用石斛的差异,旨在为霍山石斛、铁皮石斛、铜皮石斛的鉴别提供依据,亦为药用石斛的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate-3000型HPLC仪,包括Corona Ultra型电雾式检测器、Chromleon 7.1色谱工作站(美国Dionex公司);Elma S120H型超声波清洗机(德国Elma公司);Simplicity-185型超纯水仪(美国Millipore公司);YF-103型摇摆式6两装高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司);HH型数显恒温水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司);ML204型万分之一分析天平、XP26型百万分之一分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药材

24批药用石斛药材(编号:S1~S24)均购自九仙尊霍山石斛股份有限公司,经安徽中医药大学药学院刘守金教授鉴定,S1~S8为霍山石斛(*D. huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)、S9~S16为铁皮石斛(*D. officinale* Kimura et Migo)、S17~S24为铜皮石斛[*D. moniliforme*(L.)Sw.]的茎。石斛样品信息来源见表1。

表1 石斛样品信息来源

Tab 1 Information source of *Dendrobium* Caulis samples

编号	品种	采收地	采集时间
S1	霍山石斛	安徽省六安市经济开发区新北二路88号石斛产业园二期	2014年12月26日
S2	霍山石斛	安徽省霍山县太平畈乡王家店村太平畈保种基地(林下)	2015年1月4日
S3	霍山石斛	安徽省霍山县太平畈乡王家店村太平畈保种基地二期	2014年12月26日
S4	霍山石斛	安徽省霍山县太平畈乡王家店村太平畈保种基地二期	2015年3月24日
S5	霍山石斛	安徽省霍山县黑石渡镇朱家畈村黑石渡中药材生产质量管理规范示范基地	2015年7月9日
S6	霍山石斛	安徽省霍山县黑石渡镇朱家畈村黑石渡中药材生产质量管理规范示范基地	2015年8月17日
S7	霍山石斛	安徽省六安市经济开发区新北二路88号石斛产业园	2015年9月20日
S8	霍山石斛	安徽省霍山县黑石渡镇朱家畈村黑石渡中药材生产质量管理规范示范基地	2015年3月18日
S9	铁皮石斛	安徽省金寨县梅山镇徐冲村良田组石斛种植基地	2015年4月12日
S10	铁皮石斛	安徽省金寨县梅山镇徐冲村良田组石斛种植基地	2015年9月21日
S11	铁皮石斛	安徽省金寨县青山镇汤店村同济生中药材生产质量管理规范示范基地	2015年1月27日
S12	铁皮石斛	安徽省金寨县青山镇汤店村同济生中药材生产质量管理规范示范基地	2015年11月28日
S13	铁皮石斛	安徽省金寨县青山镇汤店村同济生中药材生产质量管理规范示范基地	2015年12月22日
S14	铁皮石斛	安徽省金寨县青山镇汤店村同济生中药材生产质量管理规范示范基地	2015年4月6日
S15	铁皮石斛	安徽省霍山县太平畈乡王家店村太平畈保种基地二期	2015年2月6日
S16	铁皮石斛	安徽省霍山县太平畈乡王家店村太平畈保种基地二期	2015年3月4日
S17	铜皮石斛	安徽省金寨县青山镇汤店村同济生中药材生产质量管理规范示范基地	2014年3月15日
S18	铜皮石斛	安徽省金寨县青山镇汤店村同济生中药材生产质量管理规范示范基地	2014年4月12日
S19	铜皮石斛	安徽省金寨县青山镇汤店村同济生中药材生产质量管理规范示范基地	2014年7月18日
S20	铜皮石斛	安徽省金寨县梅山镇徐冲村良田组石斛种植基地	2014年12月13日
S21	铜皮石斛	安徽省金寨县梅山镇徐冲村良田组石斛种植基地	2015年10月22日
S22	铜皮石斛	安徽省霍山县太平畈乡王家店村太平畈保种基地二期	2015年9月8日
S23	铜皮石斛	安徽省霍山县太平畈乡王家店村太平畈保种基地二期	2015年10月25日
S24	铜皮石斛	安徽省霍山县太平畈乡王家店村太平畈保种基地二期	2015年11月27日

1.3 试剂

果糖对照品(批号:100231-201305,纯度:99.7%)、D-无水葡萄糖对照品(批号:110833-201506,纯度:99.9%)、蔗糖对照品(批号:111507-201303,纯度:99.8%)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈为色谱纯,乙醇、甲醇等其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shodex Asahipak NH₂P-50 4E(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-水(75:25, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:10 μL;检测器:CAD;数据

采集频率:5 Hz;过滤常数:5 s;雾化器温度:35 ℃;气源:氮气;压力: 4.012×10^5 Pa。

2.2 溶液的制备

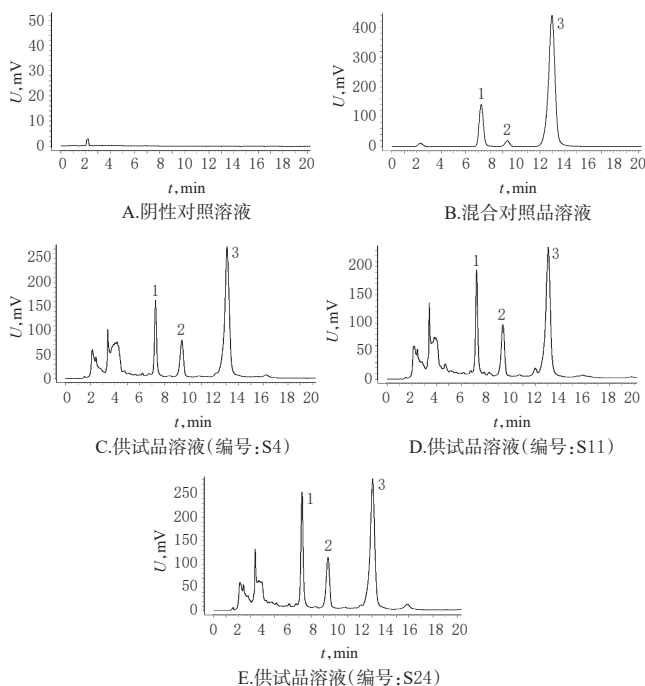
2.2.1 混合对照品溶液 精密称取果糖对照品 390.375 mg、D-无水葡萄糖对照品 31.750 mg、蔗糖对照品 694.050 mg,分别置于 5 mL 量瓶中,加 80%乙醇溶解并定容,摇匀,制得各单一对照品贮备液。取上述各单一对照品贮备液 1 mL,置于 25 mL 量瓶中,加 80%乙醇稀释至刻度,混匀,制成果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖质量浓度分别为 3.123、0.254、5.552 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药用石斛药材样品粉碎,过三号筛,取粉末,约 1.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加 80%乙醇 30 mL,超声(功率:500 W,频率:30 kHz)处理 60 min,滤过,减压回收溶剂,残渣加适量 80%乙醇溶解,并用 80%乙醇定容至 10 mL 量瓶中,经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 以 80%乙醇为阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液(以 S4、S11、S24 为例)、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖的分离度均大于 1.5,理论板数均不低于 6 000,阴性对照对测定无干扰,详见图 1。



注:1.果糖;2. D-无水葡萄糖;3.蔗糖

Note: 1. fructose; 2. D-anhydrous glucose; 3. sucrose

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 80%乙醇稀

释至刻度,制成系列浓度工作溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分的质量浓度(x , mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果,果糖的回归方程为 $y=44.6657x-0.4748$ ($r=0.9995$)、D-无水葡萄糖的回归方程为 $y=45.1718x+0.1330$ ($r=0.9997$)、蔗糖的回归方程为 $y=46.5553x+0.3501$ ($r=0.9998$),上述 3 种成分检测质量浓度的线性范围分别为 0.1562~1.8738、0.0127~0.1524、0.2776~3.3312 mg/mL。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液,用 80%乙醇逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比 10:1、3:1 计算定量限、检测限。结果,果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖的定量限分别为 0.00261、0.00424、0.00512 mg/mL,检测限分别为 0.00078、0.00127、0.00154 mg/mL。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1.0 mL,置于 5 mL 量瓶中,加 80%乙醇稀释至刻度,混匀,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.2%、1.0% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S4)适量,分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.4%、1.3% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取药用石斛药材样品(编号:S4)粉末约 1.0 g,共 6 份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中 3 种成分的含量。结果,果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖含量的 RSD 分别为 2.0%、1.4%、1.9% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(编号:S4)粉末约 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别精密加入一定量的混合对照品溶液(含果糖 3.0016 mg/mL、D-无水葡萄糖 1.303 mg/mL、蔗糖 25.8094 mg/mL)0.5 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 2。

2.10 耐用性试验

取药用石斛药材样品(编号:S4)粉末适量,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件分别以不同色谱柱[Shodex Asahipak NH₂P-50 4E(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)、Agilent Zorbax NH₂(250

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
果糖	502.1	1.423 1	1.500 8	2.871 2	96.49	96.88	0.83
	502.3	1.428 6	1.500 8	2.869 1	95.98		
	499.7	1.421 7	1.500 8	2.870 9	96.56		
	509.4	1.408 1	1.500 8	2.881 2	98.15		
	500.1	1.410 3	1.500 8	2.874 6	97.57		
D-无水葡萄糖	502.5	1.417 2	1.500 8	2.866 3	96.56	97.55	1.10
	502.1	0.651 7	0.651 5	1.285 4	97.27		
	502.3	0.641 6	0.651 5	1.284 1	98.62		
	499.7	0.640 3	0.651 5	1.277 5	97.81		
	509.4	0.653 1	0.651 5	1.276 2	95.64		
蔗糖	500.1	0.642 5	0.651 5	1.280 8	97.97	98.40	0.53
	502.5	0.641 2	0.651 5	1.279 6	97.99		
	502.1	12.752 3	12.904 7	25.463 6	98.50		
	502.3	12.756 6	12.904 7	25.422 6	98.15		
	499.7	12.688 1	12.904 7	25.455 9	98.94		
	509.4	12.931 5	12.904 7	25.517 5	97.53		
	500.1	12.700 3	12.904 7	25.463 8	98.91		
	502.5	12.759 5	12.904 7	25.453 6	98.37		

mm×4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Luna® NH₂(250 mm×4.6 mm, 3 μm)、不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同柱温(25、30、35 ℃)进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中3种成分的含量,结果见表3。

表3 耐用性试验结果(%)

Tab 3 Results of durability tests(%)

项目	分项	果糖		D-无水葡萄糖		蔗糖	
		含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
色谱柱	Shodex Asahipak NH ₂ P-50 4E	0.281 2	1.29	0.129 4	1.72	2.535 5	1.15
	Agilent Zorbax NH ₂	0.282 5		0.125 1		2.581 6	
	Phenomenex Luna® NH ₂	0.288 1		0.128 0		2.527 4	
流速	0.8 mL/min	0.289 1	1.38	0.127 3	1.74	2.574 0	1.16
	1.0 mL/min	0.284 5		0.129 6		2.535 1	
	1.2 mL/min	0.281 3		0.131 8		2.516 3	
柱温	25 ℃	0.283 4	0.64	0.130 6	1.66	2.518 3	1.10
	30 ℃	0.284 2		0.129 5		2.535 8	
	35 ℃	0.286 9		0.133 7		2.572 9	

2.11 样品含量测定

取24批药用石斛药材样品粉末适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中3种成分的含量,结果见表4、图2。

由图2、表4可知,3种药用石斛中糖类成分的含量高低依次为蔗糖>果糖>D-无水葡萄糖,其中蔗糖含量及总含量高低依次均为霍山石斛>铜皮石斛>铁皮石斛,D-无水葡萄糖含量高低依次为霍山石斛>铁皮石斛>铜皮石斛,果糖含量高低依次为铜皮石斛>铁皮石斛>霍山石斛,提示3种石斛中糖类成分的含量存在差异。

3 讨论

在前期预试验中,本课题组分别比较了以5种比例乙腈-水(83:17、80:20、78:22、75:25、70:30, V/V)的分

表4 3种药用石斛中3种糖类成分的含量测定结果(n=3, %)

Tab 4 Results of content determination of 3 saccharides in 3 kinds of medicinal Dendrobii Caulis(n=3, %)

编号	果糖	D-无水葡萄糖	蔗糖	总含量
S1	0.30	0.13	2.67	3.10
S2	0.29	0.13	2.58	3.00
S3	0.30	0.12	2.59	3.01
S4	0.28	0.13	2.54	2.95
S5	0.29	0.12	2.57	2.98
S6	0.30	0.13	2.65	3.08
S7	0.28	0.13	2.52	2.93
S8	0.30	0.13	2.64	3.07
S9	0.53	0.08	0.80	1.41
S10	0.52	0.08	0.82	1.42
S11	0.53	0.08	0.77	1.38
S12	0.52	0.07	0.83	1.42
S13	0.53	0.07	0.78	1.38
S14	0.55	0.08	0.76	1.39
S15	0.52	0.08	0.84	1.44
S16	0.52	0.07	0.79	1.38
S17	1.09	0.03	1.79	2.91
S18	1.12	0.02	1.78	2.92
S19	1.10	0.03	1.72	2.85
S20	1.10	0.03	1.69	2.82
S21	1.11	0.03	1.69	2.83
S22	1.11	0.03	1.77	2.91
S23	1.06	0.02	1.76	2.84
S24	1.10	0.03	1.70	2.83

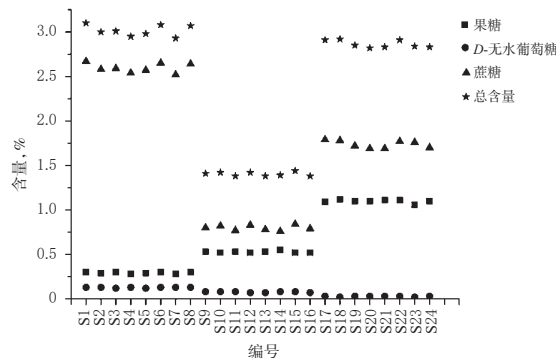


图2 3种药用石斛中3种糖类成分含量测定结果的直观图

Fig 2 Visual diagram of content determination results of 3 saccharides in 3 kinds of medicinal Dendrobii Caulis

离效果。结果发现,以乙腈-水(75:25, V/V)为流动相时所得的色谱峰分离度适宜,峰宽较小、峰高较高,且在20 min内即可达到良好的分离效果,故选择流动相为乙腈-水(75:25, V/V)。同时,本课题组在“耐用性试验”项下又考察了不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)的分离效果。结果发现,流速的变化对试验结果影响较小;但当流速为1.0 mL/min时,各色谱峰的分离度良好、峰宽较小,故选择流速为1.0 mL/min。此外,本课题组在“耐用

性试验”项下还考察了不同柱温(25、30、35、40℃)对色谱峰分离效果的影响。结果发现,柱温的变化对色谱峰保留时间、峰宽和分离度无明显影响,考虑到试验操作的简便性,最终选择与试验环境温度较为接近的30℃为柱温。

本研究结果显示,3种药用石斛中均含有果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖,但3种糖类成分的含量存在差异。3种药用石斛中单、双糖类成分总含量以霍山石斛最高,其次为铜皮石斛,铁皮石斛最低;蔗糖、D-无水葡萄糖的含量以霍山石斛最高,果糖的含量以铜皮石斛最高。其原因可能与药材的地域多样性有关,即不同产地及栽培环境均可导致药用石斛药材中糖类成分含量存在差异^[23]。而本研究中,由于3种药用石斛的栽培环境不同,可能对植物体内糖类成分的积累和代谢造成不同程度的影响;加之不同品种间的遗传因素,可能也会影响糖类成分代谢的关键酶活性,从而改变糖类成分的积累或降解过程,导致糖类成分含量存在明显差异^[24]。此外,由于3种药用石斛采集时的生长年限不同,造成了糖类成分在植物体内积累程度不同,从而导致糖类成分含量有所差异^[25]。糖类成分的含量能反映石斛药材的信息,通过分析霍山石斛、铁皮石斛、铜皮石斛中3种糖类成分含量存在的差异,可进一步区分3种药用石斛。

综上所述,本研究所建HPLC-CAD法灵敏度高、重复性好、操作简单,可用于测定3种药用石斛中3种糖类成分的含量;3种石斛中糖类成分的含量存在差异。

参考文献

[1] 陈懿瑶,罗阳,闫燊,等. HPAEC-PAD法测定石斛属植物单糖组分与主成分聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(15):106-111.

[2] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志:第19册[M].北京:北京科学出版社,1999:111.

[3] 刘明珍,陈乃富,李耀亭,等. 霍山产3种药用石斛及其杂交优势种的ISSR-PCR分子标记鉴别[J]. 种子, 2009,28(2):43-45.

[4] 陈云龙,张铭,华允芬,等. 细茎石斛不同部位有效成分及分布规律研究[J]. 中国中药杂志, 2001,26(10):709-710.

[5] BI ZM, LI Y, WANG ZT, et al. A new bibenzyl derivative from dendrobium moniliforme[J]. *Chin Chem Lett*, 2002, 13(6):535-536.

[6] LIN TH, CHANG SJ, CHEN CC, et al. Two phenanthraquinones from dendrobium moniliforme[J]. *J Nat Prod*, 2001,64(8):1084-1086.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 吕圭源,颜美秋,陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013,38(4):28-32.

[10] 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.

[11] 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):180-183.

[12] 刘宗利,李克文,王京博,等. 低聚果糖的理化特性、生理功效及其应用[J]. 中国食品添加剂, 2016,211(10):211-215.

[13] 宋玉民,周清涛,帅斌,等. 功能糖研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2013,21(11):29-31.

[14] 李伟. 功能性低聚糖的酶法合成及其生理功能评价[D]. 南京:南京农业大学,2010.

[15] 梁乾德. 用化学组学方法研究四物汤的补血成分[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院,2003.

[16] 张淋洁,王如伟,何厚洪,等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定铁皮石斛中单糖和双糖[J]. 医药导报, 2013,32(4):517-520.

[17] 孙亚灵,赵恂,张玫,等. 蔗糖及其有关物质含量的HPLC-CAD分析研究[J]. 药物分析杂志, 2019,39(4):32-38.

[18] 孙亚飞,赵恂,张玫,等. HPLC-CAD法测定乳糖含量及有关物质[J]. 药物分析杂志, 2018,38(5):168-175.

[19] 刘路,高旋,杨永健. HPLC-电雾式检测器的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2012,43(3):227-231.

[20] 李心怡,蒋运斌,马逾英. 电喷雾检测器在药物HPLC分析中的优势及应用进展[J]. 中国药房, 2017,28(15):2152-2155.

[21] 刘立洋,刘肖. 1种新型的通用型检测器:电喷雾检测器[J]. 现代科学仪器, 2011(5):144-148.

[22] 张雪,李铮,张英涛,等. HPLC-CAD法同时测定白及中单糖、双糖的含量[J]. 国际药学研究杂志, 2018,45(2):154-157.

[23] 邓辉,韩邦兴,陈乃东,等. 安徽霍山产3种石斛多糖组成的比较研究[J]. 中药材, 2017,40(6):65-69.

[24] 孟雨冉. 铁皮石斛多糖积累与蔗糖代谢的影响因素研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2018.

[25] 秦子芳,谭晓妍,宁慧娟,等. 不同生长年限铁皮石斛多糖含量与特性分析[J]. 食品科学, 2018,39(6):189-193.

(收稿日期:2019-12-10 修回日期:2020-03-31)

(编辑:陈宏)