

12 种不同产地铁皮石斛指纹图谱研究 及重金属元素含量测定

杨 岚¹, 王红娟¹, 师 帅², 向增旭^{1*}

(1 南京农业大学 中药材研究所, 南京 210095; 2 江苏宜兴爱琴海太湖生态农业专业合作社, 江苏宜兴 214200)

摘 要:以 12 种不同产地铁皮石斛新鲜茎段为材料, 以 Ultimate XB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温 30 ℃。通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会)进行相似度分析, 并建立 12 个不同产地铁皮石斛指纹图谱。经微波消解处理材料后, 采用 ICP-AES 原子吸收光谱法测定不同产地铁皮石斛新鲜茎段中重金属铜、镉、铅、汞的含量, 分析不同产地铁皮石斛质量, 为建立铁皮石斛质量标准提供理论依据。结果表明: (1) 不同产地铁皮石斛指纹图谱共有 23 个特征峰, 相似度为 0.918~0.987, 其中产自安徽大别山、云南文山的铁皮石斛相似度分别为 0.918、0.935, 相比其他产地具有一定的差异性。 (2) 通过聚类分析将 12 种不同产地铁皮石斛分为 4 类: 安徽霍山、江苏南京、云南石屏、云南玉溪、云南思茅为一类, 云南文山、浙江仙居为一类, 云南红河、广西天峨、安徽大别山、福建宁化为一类, 浙江天台单独为一类。 (3) 产自云南玉溪的铁皮石斛茎段中铜含量超标 26.25%, 产自福建宁化和江苏南京的镉含量分别超标 27.33% 和 122.30%, 其它产地铜、镉、铅、汞含量在国家现行安全值以内。

关键词:铁皮石斛; 不同产地; 指纹图谱; 微波消解; 重金属含量

中图分类号: Q949.95; Q946.91

文献标志码: A

Fingerprints and Heavy Metal Contents of *Dendrobium officinale* Produced from 12 Areas

YANG Lan¹, WANG Hongjuan¹, SHI Shuai², XIANG Zengxu^{1*}

(1 College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Jiangsu Yixing Aegean Taihu Ecological Agricultural Professional Cooperatives, Yixing, Jiangsu 214200, China)

Abstract: With different origins of *Dendrobium officinale* fresh stem produced from 12 different areas segments as material, we performed gradient elution, with Ultimate XB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as mobile phase gradient elution, velocity of 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength of 270 nm, column temperature 30 ℃. Through Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system (national pharmacopoeia committee) similarity analysis and establish the 12 different areas fingerprint, at the same time by microwave digestion processing materials, using ICP-AES atomic absorption spectrometry determination of different origin of cadmium, copper, lead and mercury contents, so as to compare the different origin of quality, to provide theoretical basis for establishing quality standard. The results show: (1) A total of 23 different producing area features was established. The similarity of different origin of *D. officinale* was 0.918—0.987, which shows differences, but there was no difference in the chemical composition and chemical contents; (2) Through clustering analysis, *D. officinale* of

收稿日期: 2014-03-22; 修改稿收到日期: 2014-08-25

基金项目: 江苏省科技支撑计划(SEB201130258); 无锡市农业科技支撑项目(CLE01N1113); 中央高校基本科研业务费(y0201200357)

作者简介: 杨 岚(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物生物技术育种研究。E-mail: 2011104184@njau.edu.cn

* 通信作者: 向增旭, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物生物技术育种研究。E-mail: zxxiang@njau.edu.cn

12 different regions can be divided into four categories; Anhui Huoshan, Jiangsu Nanjing, Yunnan Shiping, Yunnan Yuxi, Yunnan Simao, as a category, Yunnan Wenshan, Zhejiang Xianju as a category, Yunnan Honghe, Guangxi Tian'e, Dabie Mountain in Anhui and Fujian Ninghua as a class, Zhejiang Tiantai for a class; (3) Including the copper contents from Yuxi of Yunnan, cadmium contents from Fujian Ninghua, Jiangsu Nanjing, exceed 26.25%, 27.33% and 122.30%, respectively. Other origin of copper, cadmium, lead, mercury levels in countries. Our aim is to provide theoretical basis for *D. officinale* medicinal materials quality control.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; different producing areas; fingerprints; microwave digestion; heavy metals content

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为传统名贵珍稀中药材,以新鲜或干燥的茎入药,具有滋阴清热、润肺明目、抗癌防老等功效^[1],作为一种天然滋补药物,现代药理研究发现,铁皮石斛在治疗慢性萎缩性胃炎、高血压、糖尿病等方面具有显著功效^[2],市场需求量不断上升,然而自然环境下其自身繁殖率低,随着生存环境的破坏及人类毁灭性采挖,野生资源已濒临灭绝^[3]。目前铁皮石斛的人工种植栽培主要集中在云南、浙江、安徽、江苏等地^[4],然而 2010 版《中国药典》对铁皮石斛的质量评价,仅停留在外观性状及有效成分鉴别方面^[5],难以实现对铁皮石斛质量的全面控制。颜美秋等^[6]、殷放宙等^[7]、何铁光等^[8]在铁皮石斛质量检测方面做了重要研究,同时还建立了云南、广西铁皮石斛高效液相指纹图谱,进一步体现了指纹图谱在药材质量控制上的优势。此外,由于栽培基质、气候环境等因素,致使铁皮石斛重金属污染现象日益严重。同时,铁皮石斛植株内的重金属也间接地影响了人体新陈代谢和正常的生理功能,更有甚者会引发多种疾病^[9]。因此,国际上对中药材重金属的安全性也越来越重视。本试验利用 HPLC 高效液相梯度洗脱法和 ICP-AES 原子吸收光谱法,分别建立了 12 个不同产地铁皮石斛液相色谱指纹图谱和重金属含量测定方法,为铁皮石斛药材质量控制提供理论依据。

目前,随着铁皮石斛人工引种及育种技术的日益成熟,野生资源匮乏问题逐步得到解决,但关于铁皮石斛的质量控制仍相对薄弱,市场上以次充好的现象时有发生^[10]。目前真伪鉴别多集中在薄层分析等理化鉴别上^[11],该方法虽简便,但因样品来源、产地、采收期等因素,对其质量也有很大影响,故难以把握。在其品质优劣评价上主要以指标性成分(多糖、甘露糖、醇浸出物)的含量高低为主^[12],仍不能真实反映铁皮石斛的药用价值。铁皮石斛特征指纹图谱的建立是一种综合的、可量化的鉴定手段,可以较全面地评价铁皮石斛品质的真实性、优良性和

稳定性^[13],因此,加大对铁皮石斛特征指纹图谱的研究,不仅是铁皮石斛质量控制的研究方向,也是推进中药现代化的标志之一。

1 材料和方法

1.1 试验材料

12 种不同产地铁皮石斛均为野生品,经南京农业大学园艺学院向增旭副教授鉴定为兰科石斛属铁皮石斛(表 1)。

1.2 指纹图谱的建立

1.2.1 色谱条件 采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),参考颜美秋方法并优化为:色谱柱 Ultimate XB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温 30 ℃;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 270 nm;以乙腈-0.1%磷酸缓冲液为流动相,进行线性梯度洗脱。洗脱条件:0~5 min,保持 A 为 5%;5~10 min, A 为 5%~10%;10~15 min, A 为 10%~50%;15~20 min, A 为 10%~50%;进样体积 20 μL。

1.2.2 供试品溶液的制备 将 12 种不同产地铁皮石斛新鲜茎段于 120 ℃杀青 30 min 后,置于 60 ℃烘干,粉碎,过 80 目筛。准确称取各样品粉末 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加乙腈 50 mL,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)2.5 h,冷却室温后,离心后取上清液减压浓缩至干,将残渣加水 20 mL 溶解,用乙醚萃取 3 次,每次 20 mL,合并乙醚层,蒸干后,残渣用 90%乙腈溶解,并定容至 1.5 mL。0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试样品滤液。

1.2.3 特征图谱方法学考察 将 12 种不同产地铁皮石斛的指纹图谱导入中药指纹图谱相似度评价系统‘2004A 版’软件处理,谱峰自动匹配,生成 12 种不同产地铁皮石斛粗提物的共有指纹图谱峰。同法检测 12 份样品,通过指纹图谱相似度计算软件得 12 种不同产地铁皮石斛粗提物 HPLC 指纹谱模式图。将 12 种不同产地的共有峰定为参照峰(保留时间约为 40.58 min)。相对保留值(TR)计算公式^[14]:

表 1 不同产地铁皮石斛材料基本信息
Table 1 Origin of different *D. officinale*

编号 Code	产地来源 Country of origin	主要形态特征 Main morphological characteristics	生长特性 Growth characteristics
S1	安徽大别山 Dabie Mountain, Anhui	茎紫色,节间绿色,上下茎粗相近 Stems purple, internodes green, thick stems close up and down	不易倒伏,第二年基部叶子变黄,部分叶落下,抗性强 Not easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, strong resistance
S2	安徽霍山 Huoshan, Anhui	茎深绿色,节间绿色,上下茎粗相近 Variegated dark green, stem internodes green, thick stems close up and down	易倒伏,第二年基部叶子变黄,部分叶落下,抗性强 Easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, resistance is strong
S3	云南红河 Honghe, Yunnan	茎浅绿色,节间黑色,上下茎粗相近,基部细小 Stems green, internode black, up and down the stem diameter, tiny at base	不易倒伏,第二年叶子变黄,叶全部落下,抗性弱 Not easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, all leaves falling, resistance is weak
S4	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	茎绿色,节间绿色,上下茎粗相近,基部细小,茎秆粗短 Stems green, internodes green, stem thickness, base small, stem thick short	不易倒伏,第二年基部叶子变黄,部分叶落下,抗性强 Not easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, resistance is strong
S5	云南思茅 Simao, Yunnan	茎绿色,节间绿色,上下茎粗相近,基部细小,茎秆细长 Stems green, internodes green, stem thickness, base small, slender stem	易倒伏,第二年叶子变黄,叶全部落下,抗性弱 Easy lodging, leaves turn yellow in the second year, all leaves falling, resistance is weak
S6	云南文山 Wenshan, Yunnan	茎淡绿色,节间绿色,上下茎粗相近,基部细小 Stems pale green, internodes green, up and down the stem diameter, tiny at base	易倒伏,第二年基部叶子变黄,部分叶落下,抗性强 Easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, strong resistance
S7	云南石屏 Shiping, Yunnan	茎红色,节间绿色,上下茎粗相近,基部细小 Stems red, stem internodes green, up and down the stem diameter, tiny at base	易倒伏,第二年基部叶子变黄,部分叶落下,抗性强 Easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, strong resistance
S8	福建宁化 Ninghua, Fujian	茎淡紫色,节间绿色,上下茎粗相近,基部细小,茎秆细长 Stems pale purple, internodes green, up and down the stem diameter, base small, slender stem	易倒伏,第二年基部叶子全部变黄,部分叶落下,抗性弱 Easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, resistance is weak
S9	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	茎绿色,节间绿色,上下茎粗相近,茎间宽大 Stems green, internodes green, up and down the stem diameter, stem bounty	易倒伏,第二年基部叶子变黄,部分叶落下,抗性强 Easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, strong resistance
S10	浙江天台 Tiantai, Zhejiang	茎淡红色,节间黑色,上下茎粗相近,基部细小 Stems red-dish, internode black, up and down the stem diameter, tiny at base	易倒伏,第二年基部叶子变黄,部分叶落下,抗性弱 Easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, resistance is weak
S11	浙江仙居 Xianju, Zhejiang	茎黑色,节间黑色,上下茎粗相近 Stems black, internode, black thick stems close up and down	不易倒伏,第二年基部叶子变黄,部分叶落下,抗性强 Not easy lodging, leaves turn yellow in the second year from the base, some leaves falling, resistance is strong
S12	广西天峨 Tian'e, Guangxi	茎黑色,节间黑色,鞘叶包茎,上下茎粗相近,基部细小,茎秆粗壮,节间细长 Stems black, stem internode sheath leaf phimosis, up and down the stem diameter, base small, stem stout, internodes long and thin	易倒伏,第二年叶子变黄,部分叶落下,抗性弱 Easy lodging, leaves turn yellow in the second year, some leaves falling, resistance is weak

$TR = T / T_s$

式中, T 为待测峰的绝对保留时间, T_s 为共有峰的绝对保留时间。

相对面积(AR)计算公式: $AR = A / A_s$

式中, A 待测峰面积, A_s 共有峰面积。求得不同产地时间相对保留值及相对面积。

(1) 精密度 精密吸取供试品溶液 20 μL , 连续进样 6 次, 各共有峰相对保留时间与相对峰面积 RSD 值均小于 3%, 表明精密度良好。

(2) 重复性 取同一来源铁皮石斛样品, 按 1.2.2 项下平行制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 3%, 符合特征图谱研究的技术要求。

1.3 重金属元素含量测定

分别精密称取 60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干的 12 种不同产地的干燥铁皮石斛粉末 0.1 g, 放入消解罐中, 加入 10 mL 浓硝酸放置过夜, 待反应停止后, 加 2 mL 双氧

表 2 微波消解程序

Table 2 The produre of microwave digestion

步骤 Step	压力 Power/kPa	时间 Time/min	温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$
1	1 600	5	120
2	1 600	5	160
3	1 600	10	190

水, 密闭, 按照设定好的微波消解程序(表 2)完成后, 冷却室温后取出, 将消解液转入 50 mL 量瓶中, 用水洗涤 3 次, 定容至刻度, 即为供试样品溶液。

采用 X-2 电感耦合等离子体质谱仪(美国热电)测定重金属元素含量, 并通过参考廖婉等^[15]的方法, 设定本试验射频功率为 1.25 kW, 进样速度 1.5 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 载气流速 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 等离子体流量 15 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 冷却气流速 13 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 蠕动泵转速 30 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 雾室温度 3 $^{\circ}\text{C}$, 每点停留时间 0.6 ms, 点数/质量为 3, 重复 3 次, 每次测量时间为 0.13 s。

2 结果与分析

2.1 指纹图谱的建立和分析

将供试溶液进行检测后得到的指纹图谱导入“中药指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版”软件后得出图 1。由图 1 分析供试样品共获得 30 个匹配指纹图谱峰,其中有 23 个峰为 12 种不同产地铁皮石斛的共有色谱峰(图 2)。12 种不同产地供试样品共有峰总面积占总峰面积的比例分别为 90.15%、92.45%、90.79%、93.09%、92.98%、95.23%、92.30%、92.13%、92.52%、96.65%、94.02%、91.02%,均符合指纹图谱研究的规定:即非共有峰不得大于总峰面积的 10%^[16]。根据图 2 中图谱分析结果显示:11 号峰分离度较好,且峰面积较大、较稳定,因此以 11

号峰作为参照峰(共有峰 1~6 为杂质峰,为避免影响试验精确不能作为参考峰),分别计算各特征共有峰的相对保留时间与相对峰面积,结果见表 3。

2.1.1 指纹图谱相似度分析 将表 3 中的相对峰面积以均值法进行全谱相似度分析评价,结果见表 4。由表 4 可以看出不同产地铁皮石斛药材的 HPLC 指纹图谱相似度在 0.918~0.987 之间,其中安徽大别山(S1)、云南文山(S6)与共有模式图谱间的相似度最低为 0.918、0.935,其余产地均在 0.944 以上,说明产自安徽大别山、云南文山的铁皮石斛具有一定的差异性。

2.1.2 不同产地铁皮石斛聚类分析 将 12 种不同产地铁皮石斛指纹图谱的共有峰峰面积(表 5)通过 SPSS 16.0 统计软件进行聚类分析,结果(图 3)显

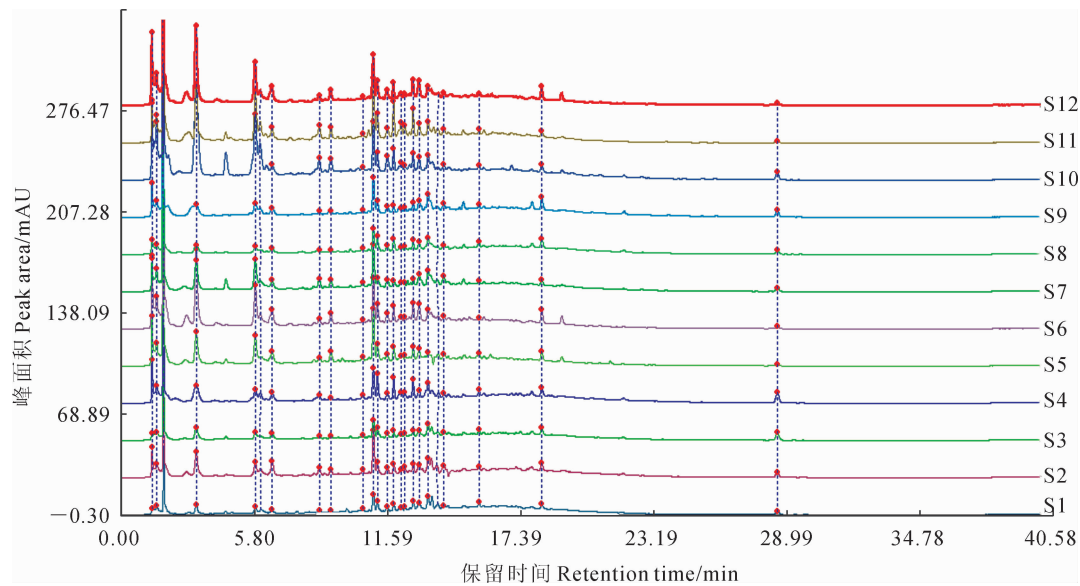


图 1 不同产地铁皮石斛 HPLC 特征图谱重叠图

Fig. 1 HPLC characteristic spectrum overlapping of *D. officinale* produced from different areas

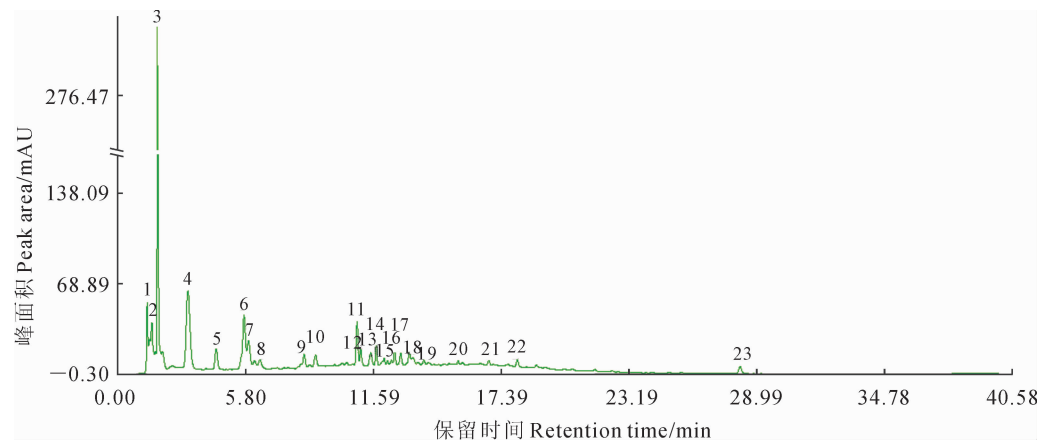


图 2 铁皮石斛 HPLC 特征图谱共有模式

Fig. 2 Common pattern of HPLC characteristic spectrum of *D. officinale*

表 3 不同产地铁皮石斛指纹图谱分析
Table 3 Results of HPLC characteristic spectrum of *D. officinale*

峰号 Peak	相对保留时间 Relative retention time	相对峰面积 Relative peak area											
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.095	0.079	0.748	0.198	0.238	0.348	0.432	0.806	0.675	0.356	0.568	0.745	0.976
2	0.172	0.213	0.503	0.298	0.654	0.832	0.345	0.712	0.660	0.634	0.436	0.389	0.459
3	0.196	0.334	0.619	0.373	0.886	0.959	0.786	0.846	0.559	0.813	0.604	0.465	0.422
4	0.845	0.736	0.629	0.854	0.730	0.621	0.867	0.754	0.629	0.662	0.545	0.767	0.765
5	0.296	0.149	0.335	0.168	1.330	0.619	0.933	0.682	0.174	0.320	0.256	0.567	0.543
6	0.521	0.503	0.567	0.538	0.826	0.598	0.534	0.703	0.426	0.712	0.459	0.545	0.440
7	0.362	0.676	0.324	0.433	0.459	0.789	0.309	0.862	0.345	0.298	0.245	0.309	0.233
8	0.448	0.850	0.623	0.442	0.543	0.552	0.339	0.925	0.536	0.510	0.592	0.234	0.454
9	0.489	0.024	0.032	0.024	0.545	0.873	0.036	0.721	0.372	0.620	0.839	0.546	0.654
10	0.525	0.784	0.322	0.795	1.098	0.710	0.908	0.460	0.604	0.528	0.802	0.235	0.439
11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	0.620	0.163	0.249	0.168	0.603	0.370	0.368	0.163	0.332	0.207	0.609	0.233	0.343
13	0.648	0.365	0.388	0.320	0.503	0.209	0.687	0.187	0.185	0.172	0.558	0.345	0.256
14	0.724	0.285	0.177	0.271	0.222	0.142	0.364	0.144	0.153	0.159	0.240	0.453	0.412
15	0.789	0.350	0.538	0.360	0.876	0.376	0.310	0.273	0.306	0.217	0.639	0.564	0.356
16	0.828	0.076	0.062	0.216	0.348	0.496	0.223	0.228	0.367	0.305	0.626	0.323	0.465
17	0.876	0.574	0.469	0.602	0.389	0.567	0.256	0.323	0.613	0.897	0.398	0.476	0.532
18	0.890	0.235	0.987	0.322	0.176	0.098	0.342	0.234	0.833	0.567	0.456	0.343	0.320
19	0.532	0.078	0.453	0.654	0.690	0.328	0.443	0.217	0.323	0.996	0.770	0.433	0.253
20	0.956	0.098	0.576	0.655	0.765	0.455	0.349	0.324	0.564	0.925	0.103	0.123	0.225
21	1.060	0.182	0.415	0.413	0.713	0.434	0.800	0.478	0.463	0.526	0.550	0.213	0.121
22	1.128	0.161	0.478	0.235	0.465	0.333	0.109	0.165	0.343	0.025	0.309	0.332	0.098
23	1.156	0.270	0.363	0.223	0.434	0.211	0.216	0.100	0.261	0.154	0.245	0.234	0.154

注:S1~S12 表示铁皮石斛产地编号;下同。
Note:S1-S12 represent the codes of origin of different *Dendrobium officinale*. The same as below.

表 4 不同产地铁皮石斛指纹图谱相似度
Table 4 Similarity in fingerprints of *D. officinale* produced from different areas

产地	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
相似度 Similarity	0.918	0.950	0.955	0.975	0.987	0.935	0.982	0.959	0.984	0.944	0.951	0.939

示,12 种不同产地铁皮石斛茎段中含有的化学成分种类一致,但含量差异较大,其中产自浙江天台(S10)的铁皮石斛指纹图谱共有峰总面积最高达 34 851,云南文山(S6)次之达 23 110,而安徽大别山(S1)最低为 7 398. 2;聚类分析结果(图 3)将 12 种不同产地铁皮石斛分为四大类,其中安徽霍山、江苏南京、云南石屏、云南玉溪、云南思茅为一类,云南文山、浙江仙居一类,云南红河、广西天峨、安徽大别山、福建宁化为一类,浙江天台为一类。

2.2 重金属含量

通过微波消解对 12 种不同产地铁皮石斛 5 种重金属含量进行测定,每份样品平行测定 3 次,并依现行《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》限量指标^[17]:重金属总量应≤20.0 mg/kg,铜≤20.0 mg/kg,铅≤5.0 mg/kg,镉≤0.3 mg/kg,汞≤0.2 mg/kg 进行评价。结果见表 6,产自云南玉溪(S4)的铁皮

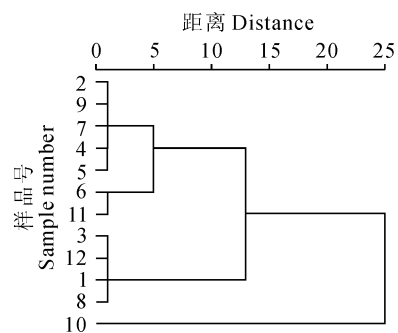


图 3 不同产地铁皮石斛聚类分析图
Fig. 3 Clustering analysis of *D. officinale* produced from different areas

石斛铜含量超标 26.25%,福建宁化(S8)和江苏南京(S9)的铁皮石斛镉含量分别超标 27.33%、122.30%,其它产地铜、铅、汞、镉等 4 种重金属含量差异不大,且均不高于上述标准,为进一步评价铁皮石斛药用质量安全提供科学依据。

表 5 不同产地铁皮石斛指纹图谱共有峰面积
Table 5 Common peak areas of fingerprints of *D. officinale* from different areas

共有峰编号 Common peak number	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	70.298	689.13	182.48	1 021.6	1 186.9	2 165.1	741.64	620.98	1 004.9	1 879.4	920.11	200.89
2	180.71	441.03	261.58	1 221.8	729.07	1 067.9	623.59	577.80	556.03	1 616.6	876.62	345.78
3	156.50	2 905.7	1 755.6	4 167.3	4 504.6	5 236.3	3 970.9	2 622.0	3 816.9	1 051.8	4 695.3	678.90
4	444.02	1 395.4	822.89	1 710.8	2 021.9	4 599.9	1 801.7	744.28	1 830.3	710.10	3 253.9	89.768
5	347.93	785.69	397.04	773.13	1 448.9	2 184.8	1 596.6	408.06	751.34	4 070.2	2 340.9	134.98
6	287.73	930.73	307.79	472.39	641.32	1 255.7	402.01	243.63	407.62	787.07	571.84	320.89
7	95.990	769.06	576.43	484.93	151.54	178.03	122.56	230.40	147.34	152.90	142.05	298.65
8	219.13	160.75	113.72	140.16	142.43	87.497	238.65	138.48	131.73	1974.5	258.06	330.23
9	56.356	73.444	56.647	1 282.4	2 054.4	85.507	1 697.1	875.32	1 460.1	720.13	2 352.2	1 232.0
10	70.455	1 731.5	714.01	943.73	637.38	1 721.2	413.38	541.89	474.25	804.20	897.70	187.89
11	398.93	483.09	386.92	283.18	295.59	709.99	356.92	238.83	324.56	709.66	493.60	456.23
12	190.50	290.83	195.65	701.45	431.90	428.24	189.59	374.99	241.41	420.92	1164.4	784.09
13	275.54	293.18	241.92	379.94	158.26	518.99	141.63	138.96	130.56	181.02	754.82	178.93
14	215.25	133.70	204.78	167.63	106.66	274.63	108.38	115.06	115.96	217.63	340.30	231.45
15	119.10	183.14	122.64	549.34	374.68	105.82	93.045	104.28	73.980	537.56	96.535	765.48
16	65.327	52.609	185.52	298.84	426.55	191.24	195.96	315.75	262.88	563.44	85.927	654.35
17	304.74	249.09	320.02	769.45	346.87	576.54	624.38	325.45	547.30	444.15	531.18	376.50
18	400.18	350.71	128.56	876.09	78.075	342.70	617.29	892.52	296.14	222.04	355.26	278.94
19	555.25	667.31	654.82	198.85	435.82	306.45	466.35	543.23	286.97	196.74	288.06	197.43
20	271.15	520.17	445.34	168.10	577.33	180.59	377.20	244.87	153.07	196.74	162.37	75.987
21	174.75	161.54	478.54	141.36	86.105	158.76	94.859	91.826	104.23	109.03	198.30	675.94
22	240.96	363.39	109.78	403.69	370.97	602.32	286.11	442.38	570.13	363.28	250.62	765.09
23	205.62	318.11	398.79	705.51	115.89	131.70	218.98	279.93	427.37	477.23	105.41	478.85
共有峰总面积 Common peak area	7 398.2	13 949	8 635.0	17 856	17 322	23 110	15 378	11 110	14 114	34 851	21 908	9 739.3

表 6 12 种不同产地铁皮石斛 4 种重金属含量(n=3)

Table 6 Heavy metals contents of *D. officinale*
produced from different areas/(mg · kg⁻¹)

编号 Code	铜 Cu	镉 Cd	汞 Hg	铅 Pb
S1	4.119	0.056	0.023	0.198
S2	12.510	0.060	0.109	0.557
S3	5.526	0.005	0.034	0.258
S4	25.250	0.070	0.012	1.086
S5	8.407	0.076	0.052	0.384
S6	7.549	0.042	0.012	0.340
S7	4.149	0.040	0.033	0.206
S8	10.500	0.382	0.167	0.500
S9	15.340	0.667	0.029	0.651
S10	3.019	0.257	0.042	0.164
S11	3.834	0.136	0.067	0.187
S12	3.230	0.126	0.059	0.151

3 讨 论

据文献报道,铁皮石斛多糖含量较高,其他化学

成分含量偏低^[18],本试验对色谱条件及供试品溶液的制备方法仍需要改进,此次筛选的较优试验条件为:色谱柱(Ultimate XB C₁₈),流动相采用乙腈-0.1% H₃PO₄ 溶液梯度洗脱系统,在波长 270 nm 条件下检验特征峰。试验发现,新鲜的铁皮石斛茎段多糖含量高、黏性大,不易粉碎,前期处理需将样品剪成小段并置于低温冰箱放置 12 h,取出粉碎后进行供试样品的制备。

本试验建立了 12 种不同产地铁皮石斛特征指纹图谱,共检测出 30 个匹配峰,其中共有峰有 23 个,由此说明不同产地铁皮石斛化学成分种类无差别,而共有峰的相对面积差异明显,这与何铁光等^[8]在其化学成分含量方面的研究结果一致。通过指纹图谱相似度比较和聚类分析,将 12 种不同产地铁皮石斛分为四大类,其中产自安徽大别山、云南文山与共有模式图谱间的相似度最低,分别为 0.918、0.935,这可能与铁皮石斛栽培时的组培苗、栽培基

质、气候、环境以及后期的施肥管理、采收加工等因素有关,具体影响程度还有待于进一步研究;其余产地相似度均在 0.944 以上,差别不大。通过对 12 种不同产地铁皮石斛指纹图谱分析发现,铁皮石斛具有相对较稳定的特征指纹峰,不同产地相似度均高于 0.918,表明铁皮石斛 HPLC 特征图谱专属性强,为铁皮石斛质量控制提供了方法依据。

指纹图谱仅作为衡量铁皮石斛药材质量的指标之一^[19],并不能完全体现药材的品质,随着工业化进程的快速发展,重金属污染也严重影响着药材质量。本试验通过 ICP-AES 原子吸收法测定 12 种不同产地铁皮石斛茎段中 4 种重金属元素含量,依现行《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》限量指标对比分析结果为:产自云南玉溪的铁皮石斛茎段中铜含量超标 26.25%,产自福建宁化和江苏南京的

镉含量分别超标 27.33%和 122.30%,其它产地铜、镉、铅、汞含量在国家现行安全值以内,这直接影响药材的品质,降低了药材的安全性。已有研究表明,重金属很容易在人体内蓄积,并且人体自身解毒能力较弱,会使重金属在人体内较长时间滞留,造成的危害也相应增加^[20]。重金属的潜在污染与药用植物生长环境、采收季节和加工仓储等许多复杂因素有关^[21]。整体来看,12 种不同产地铁皮石斛茎段未受到严重的重金属污染,铜、铅、镉、汞等 4 种重金属含量差异不大,但部分产地铁皮石斛重金属含量已超出国家规定水平,一旦患者误食反而会加重患者的疾病。因此,必须加强铁皮石斛茎段及相关商品中有害重金属的检测及控制,为中药材的质量控制提供完善的理论依据。

参考文献:

- [1] LI L(李玲), DENG X L(邓晓兰), ZHAO X B(赵兴兵), et al. Advances in studies on chemical constituents in *Dendrobium candidum* and their pharmacological effects[J]. *Antitumor Pharmacology* (肿瘤药理学), 2011, **1**(2): 90—94(in Chinese).
- [2] LÜ G Y(吕圭源), YAN M Q(颜美秋), CHEN S H(陈素红). Review of pharmacological activities of *Dendrobium officinale* based on traditional functions[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药), 2013, **38**(4): 489—493(in Chinese).
- [3] ZHANG ZH G(詹忠根), XU CH(徐程). Study on colchicoid of *Dendrobium officinale* induced by colchicine[J]. *Journal of Zhejiang University* (浙江大学学报), 2011, **38**(3): 321—325(in Chinese).
- [4] AI J(艾娟), YAN N(严宁), HU H(胡虹), et al. Effects of temperature on the growth and physiological characteristics of *Dendrobium officinale* (Orchidaceae)[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2010, **32**(5): 420—426(in Chinese).
- [5] 中华人民共和国药典(2010 年一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 265.
- [6] YAN M Q(颜美秋), CHEN S H(陈素红), LÜ G Y(吕圭源), et al. HPLC specific chromatogram of *Dendrobium officinale*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药), 2013, **38**(4): 516—519(in Chinese).
- [7] YIN F ZH(殷放宙), LU T L(陆兔林), CAI B CH(蔡宝昌), et al. Fingerprint of dry stem in *Dendrobium candidum* by HPLC[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2008, **3**(39): 433—435(in Chinese).
- [8] HE T G(何铁光), LU SH X(卢声仙), WANG A Q(王爱勤), et al. HPLC fingerprint of *Dendrobium candidum* from Guangxi[J]. *Natural Product and Development* (天然产物研究与开发), 2012, **24**: 353—358, 320(in Chinese).
- [9] JIA W(贾薇), JIANG B(江滨), ZENG Y E(曾元儿). Determination of heavy metals content in five kinds of Chinese medicinal material by ICP-MS[J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology* (中药新药与临床药理), 2009, **3**(20): 150—153(in Chinese).
- [10] LI J(李娟), LI SH X(李顺祥), HUANG D(黄丹), et al. Advances in the of resources, constituents and pharmacological effects of *Dendrobium officinale*[J]. *Science & Technology Review* (科技导报), 2011, **29**(18): 74—79(in Chinese).
- [11] SHAO H(邵华), ZHANG L Q(张玲琪), LI J M(李俊梅), et al. Advances in research of *Dendrobium officinale*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2004, **1**(35): 109—110(in Chinese).
- [12] GONG Q F(龚庆芳), ZHOU H(周浩), WANG X G(王新桂), et al. Comparative study on quality of *Dendrobium officinale* from different habits[J]. *Northern Horticulture* (北方园艺), 2013, (8): 162—165(in Chinese).
- [13] LI Y(李燕), WANG CH L(王春兰), WANG F F(王芳菲), et al. Chemical constituents of *Dendrobium candidum*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药), 2010, **35**(13): 1715—1719(in Chinese).
- [14] ZENG ZH(曾志), YANG D H(杨东晖), SONG L F(宋力飞), et al. The identification of *Isatis indigotica* Fort. by high performance liquid chromatographic fingerprint[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (分析化学), 2002, **7**: 849—852(in Chinese).
- [15] LIAO W(廖婉), FU CH M(傅超美), WANG J S(王继森), et al. Determination of heavy metals in indigo naturalis by ICP-MS[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences* (华西药理学杂志), 2010, **25**(4): 483—484(in Chinese).
- [16] LI J(李杰), ZHANG J H(章金辉), ZHU G F(朱根发), et al. Progress in application of germplasm identification and fingerprinting of *Dendrobium* species[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2013, **29**(16): 63—68(in Chinese).
- [17] 中华人民共和国对外贸易经济合作部. 药用植物及制剂进出口绿色行业标准[S]. 2001: 121.
- [18] SHENG J R(盛家荣), LI ZH H(李志华), YI Y B(易艳波), et al. Advances in the study of polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences* (广西科学院学报), 2011, **27**(4): 338—340(in Chinese).
- [19] LIU W J(刘文杰), SUN ZH R(孙志蓉), et al. Main chemical compositions and fingerprints of Tiepishihu (*Dendrobium candidum*) produced from different areas[J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine* (北京中医药大学学报), 2013, (2): 117—120(in Chinese).
- [20] ZHENG F CH(郑方超), CUI T(崔婷), LI R X(李容萱). Research status of measuring method of heavy metal content in plants[J]. *Hubei Agricultural Sciences* (湖北农业科学), 2012, **10**(51): 449—452(in Chinese).
- [21] LIN G M(林光美), HOU CH H(侯长红). A pilot study on economic crop Taizishen's good agricultural practice(GAP)[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* (Philosophy and Social Sciences) (福建农林大学学报·哲学社会科学版), 2003, **6**(2): 51—54(in Chinese).