

不同栽培方式对金线莲中微量元素的影响

程伟青¹, 吴水华¹, 邓笑治² (1. 福建生物工程职业技术学院, 福建福州 350002; 2. 广西药用植物园, 广西南宁 530023)

摘要 [目的]建立微波消解-ICP-MS测定金线莲中微量元素,为企业种植金线莲及质量标准的制定提供依据。[方法]样品微波消解后,采用ICP-MS法测定各元素含量,比较不同品种、不同栽培方式及月龄对金线莲中各微量元素的影响。[结果]各微量元素标准液工作曲线的线性良好,相关系数 ≥ 0.999 ,精密度 $RSD \leq 4.4\%$,重复性 $RSD \leq 5.8\%$,回收率 $89.4\% \sim 114.2\%$,回收率 $RSD \leq 4.8\%$ 。金线莲不同品种间微量元素含量有较大差异,其中以Ca、Mg、Fe、Mn、Zn的含量较高。[结论]金线莲中的微量元素含量随种植周期的延长而增长。该方法快捷准确、灵敏稳定、重现性好,可用于同时测定金线莲中各微量元素的含量。

关键词 金线莲;微量元素;ICP-MS;微波消解;栽培方式

中图分类号 S567.23*9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)20-0123-03

Effects of Different Cultivation Methods on Trace Elements in *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl

CHENG Wei-qing¹, WU Shui-hua¹, DENG Xiao-zhi² (1. Fujian Vocational College of Bioengineering, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Guangxi Botanical Garden of Medicine Plant, Nanning, Guangxi 530023)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the microwave digestion inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for content determination of trace elements in *A. roxburghii*, which provided the basis for the development of *A. roxburghii* and the quality standard. [Method] After the treatment of microwave digestion, ICP-MS method was used in the determination. The effects of different cultivars, different cultivation methods and age on the trace elements of *A. roxburghii* were studied. [Result] The standard liquid working curves of trace elements had good linearity, with the correlation coefficients of more than 0.999. The relative standard deviation (RSD) of precision was less than 4.4% and RSD of repeatability was less than 5.8%. The average recovery was 89.4%–114.2%, with RSD of less than 4.8%. Different varieties of *A. roxburghii* presented great differences in contents of inorganic elements, with high content of Ca, Mg, Fe, Mn, Zn. [Conclusion] The content of trace elements increase along with the prolonged cultivation cycle. The method is fast and accurate, sensitive and stable, good reproducibility. It can be used for the simultaneous determination of trace elements in *A. roxburghii*.

Key words *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl; Trace elements; Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); Microwave digestion; Cultivation methods

金线莲是兰科开唇兰属多年生草本植物,全草入药,性平味甘,清热凉血、解毒除湿,在我国有20种^[1],俗称“药王”“金草”,含有多糖、黄酮、氨基酸等有效成分^[2],在民间食用广泛。现今,民众对食品重金属污染问题日趋关注,野生及人工培育后林下种植的金线莲都有可能受污染。微量元素的检测多为原子吸收分光光度法(AAS法)^[3-4],该分析方法耗时费力,一次只能完成一个样品的一种元素分析。电感耦合等离子质谱法(ICP-MS)检测微量元素具有灵敏度高、抗干扰能力强、快速准确等优点,在食品药品微量元素检测领域有广泛应用^[5-6]。目前,对市场流通的金线莲品质并无质量标准,该试验建立了准确、快速的微波消解-ICP-MS法测定不同品种不同月龄金线莲的微量元素,以为金线莲产品的微量化学成分阐明、质量标准的建立和安全评价提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器。微波消解仪(Anton Paar-Multiwave PRO);电感耦合等离子体质谱仪(Agilent-7700 Series ICP-MS); Milli-Q超纯水系统;电子天平(Mettler Toledo);玻璃仪器和聚四氟乙烯罐以10%硝酸浸泡过夜,超纯水洗净备用。

1.1.2 试剂。安捷伦混合标准溶液(8500-6940),内标液

(Sc、Ge、In、Bi),协调液(⁵⁹Co、⁸⁹Y、²⁰⁵Tl、¹⁵⁶CeO、¹⁴⁰Ce);硝酸(优级纯);试验用水均为新制的超纯水。

1.1.3 试材。金线莲由福建某金线莲生物科技有限公司提供,经福建农林大学张大鹏教授鉴定为兰科开唇兰属多年生草本植物金线莲[*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl]。样品共8种,分别为福建野生金线莲(Y₁);移植林下4个月(Y₂),12个月(Y₃),18个月(Y₄);尖叶福建种组培5个月(Y₅),移植林下4个月(Y₆);台湾种组培5个月(Y₇),移植野外4个月(Y₈)。药材粉碎成细粉备用。

1.2 方法

1.2.1 标准品溶液的制备。取混合标准溶液适量,以2% HNO₃溶液为溶剂,临用现配0、2、4、6、10、20、50、100 ng/mL的标准系列溶液。

1.2.2 样品溶液的制备。取样品粉末约0.5 g,精密称定,置消解管内,加入硝酸8 mL,消化炉预消解(120 °C, 30 min),放冷。移至微波消解炉,按功率从0→700运行10 min,保持5 min,功率从700→15 000运行10 min,保持20 min的微波消解程序进行消解后,少量水冲洗消解管内壁,以130 °C在消化炉上赶酸至剩余液体约2 mL,放冷。转移置25 mL量瓶中,以2% HNO₃溶液定容至刻度,即得样品贮备液。取各样品贮备液分别稀释10、100、1 000倍,以满足不同元素的线性范围。

1.2.3 ICP-MS工作条件。载气流量1.0 L/min,补偿气流量1.0 L/min,冷却气流量15.0 L/min,射频功率1 490 W;内标元素:Sc、Ge、In、Bi;八极杆反应池模式:氦气。

1.2.4 方法学考察。

1.2.4.1 线性范围及检测限。取标准品系列溶液在ICP-

基金项目 福建省生物医药产业中试与检测技术公共服务平台(2014Y2008);福建省教育厅项目(JB14165)。

作者简介 程伟青(1982—),女,福建长汀人,讲师,硕士,从事药品质量标准研究。

收稿日期 2017-05-05

MS的工作条件下进行测试,以浓度为横坐标、各待测元素与内标相应值的比值为纵坐标,绘制标准工作曲线。以空白溶液平行测定10次,仪器显示各元素检出限。

1.2.4.2 精密度试验。取各元素10 ng/mL的混合标准溶液、Hg元素2 ng/mL,平行进样6次,测定各元素的浓度,并计算RSD。

1.2.4.3 重复性试验。取Y₂样品,按“1.2.2”方法平行制备供试品溶液6份,测定各元素的浓度,并计算RSD。

1.2.4.4 加标回收率。取Y₂样品溶液6份,各添加10 ng/mL的混合标准溶液,进行加样回收试验,测定各元素的加样回收率及其RSD。

1.2.5 样品的含量测定。按“1.2.2”方法对不同产地、月龄的金线莲制备供试品溶液,进行测定。平行读数3次,扣除空白后代入线性方程计算各品种中各种元素的含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 线性关系与检测限考察。按“1.2.4.1”方法操作,各元素的线性范围和检测限结果见表1。由表1可知,各种元素的工作曲线在对应范围内相关系数 $r > 0.999$,呈良好的线性关系。

表1 线性范围及检测限

Table 1 Linear range and test limit

元素 Element	线性方程 Linear equation	范围 Range ng/mL	相关系数(r) Correlation coefficient	检出限 Test limit ng/mL
Pb	$Y = 0.031 0X + 0.015 5$	0~100	1	0.002 7
As	$Y = 0.011 5X + 0.001 5$	0~100	1	0.105 3
Hg	$Y = 0.006 7X + 1.453 5 \times 10^{-4}$	0~4	0.999 8	0.056 49
Cr	$Y = 0.123 6X + 0.026 8$	0~100	0.999 9	0.075 55
Mn	$Y = 0.089 3X + 0.078 5$	0~100	0.999 9	0.211
Ca	$Y = 0.001 5X + 0.262 7$	0~100	0.999 8	7.373
Mg	$Y = 0.026 9X + 0.678 9$	0~100	1	4.672
Fe	$Y = 0.125 2X + 2.546 5$	0~100	0.999 9	1.223
Zn	$Y = 0.033 8X + 0.083 9$	0~100	0.999 9	0.222 4
Ni	$Y = 0.057 2X + 0.034 7$	0~100	1	0.331 5
V	$Y = 0.093 2X + 0.006 4$	0~100	1	0.021 4
Be	$Y = 0.008 7X$	0~100	0.999 7	0
Li	$Y = 0.012 2X + 0.018 3$	0~100	0.999 2	2.613
Se	$Y = 0.001X$	0~100	0.999 9	0
Sr	$Y = 0.036 1X + 0.069 4$	0~100	1	0.072 67
Cs	$Y = 0.019 4X + 1.693 8 \times 10^{-4}$	0~100	1	0.035 52
Ga	$Y = 0.098 7X + 0.009 9$	0~100	0.999 9	0.031 78
Co	$Y = 0.223 3X + 0.005 5$	0~100	1	0.016 85

2.1.2 精密度、重复性和回收率试验。按照“1.2.4.2”“1.2.4.3”“1.2.4.4”方法操作,结果见表2。由表2可知,该方法的精密度RSD在0.7%~4.4%,重复性RSD在0.3%~5.8%,回收率在89.4%~114.2%,回收率的RSD在0.32%~4.80%。表明该方法在该条件下精密度、重复性良好,方法准确、可靠,可用于金线莲中微量元素的含量测定。

表2 精密度、重复性和回收率试验结果

Table 2 Test results of precision, repeatability and recovery rate

元素 Element	精密度 RSD Precision RSD//%	重复性 RSD Repeatability RSD//%	回收率 Recovery rate//%	回收率 RSD Recovery rate RSD//%
Pb	1.2	0.3	95.7	0.83
As	2.1	3.3	93.4	1.10
Hg	1.3	4.9	105.1	3.50
Cr	1.2	2.4	103.9	0.62
Mn	3.7	2.6	94.8	0.53
Ca	1.4	1.9	102.4	0.32
Mg	3.1	2.8	92.6	0.34
Fe	3.9	2.2	92.1	0.62
Zn	2.6	2.6	105.3	1.20
Ni	1.5	4.1	112.1	2.70
V	1.3	5.8	89.4	4.80
Be	4.4	4.1	92.6	3.10
Li	3.4	4.3	114.2	3.50
Se	2.8	3.9	105.7	2.90
Sr	2.0	0.5	95.3	1.10
Cs	1.7	3.1	92.4	2.50
Ga	1.2	2.5	109.5	1.30
Co	0.7	5.8	108.6	1.00

2.2 含量测定 由表3可知,金线莲中微量元素以Ca、Mg含量为最高,其次是Fe、Mn、Zn含量。野生金线莲(Y₁)中含有的微量元素总量比较高,超过4 g/kg,其中有害元素Pb、As和Hg均高于组织培养和林下种植的样品,这或许与其野外生长环境中土壤母质有关;同一产地,不同月龄金线莲样品(Y₂、Y₃、Y₄和Y₅、Y₆、Y₇、Y₈)中的微量元素含量随月龄的增长而增长,总体呈随种植周期的延长而增长的趋势,即微量元素在药材的生长过程中进行累积。

3 小结与讨论

许多微量元素是药材中酶或辅酶的一部分,对药材的生长起关键作用,甚至影响药材有效成分的含量^[7]。通过对不同产地和月龄金线莲样品中的微量元素含量进行比较发现,各品种的各微量元素含量随土壤母质的不同而有所区别,微量元素在药材的生长过程中进行累积。金线莲中含有的的人体必需微量元素,以Ca、Mg含量最高,其次是Fe、Mn、Zn含量,这些元素影响着人体的生长发育、造血功能和免疫功能^[8],这或许是金线莲发挥其药理作用的重要因素。

Pb、As和Hg均是对人体有毒的重金属,在体内蓄积会造成慢性中毒。对比2012年国家药典委员会公布“除矿物、动物、海洋类以外的中药材中,Pb≤10 mg/kg、As≤5 mg/kg、Hg≤1 mg/kg”的标准,野生金线莲样品Pb超标,这可能与金线莲为多年生草本植物,且野生金线莲生长的土壤母质重金属元素不受控相关。被检样本的Hg均超标,说明所测金线莲或许对Hg有富集作用,在Hg含量上存在使用风险,需要对金线莲的规范化种植条件进行进一步优化。

该试验建立测定金线莲中微量元素含量的方法简便、灵敏、重现性好,可推广使用,检测结果也为金线莲质量标准的建立提供参考依据。

表 3 ICP-MS 测定金线莲中微量元素含量

Table 3 Trace elements content from *A. roxburghii* by ICP-MS

样品 Sample	Pb	As	Hg	Cr	Mn	Ca	Mg	Fe	Zn	Ni	mg/kg
Y ₁	10.540 0	0.331 7	19.520 0	1.647 0	213.40	2 046.0	1 390.0	271.20	59.520	1.504 0	
Y ₂	0.738 3	0.224 7	2.518 0	0.358 1	151.00	1 685.0	993.1	71.91	23.030	0.303 6	
Y ₃	0.490 6	0.256 3	2.544 0	1.086 0	175.40	2 405.0	1 293.0	61.24	61.210	0.350 9	
Y ₄	0.633 6	0.444 1	1.207 0	1.617 0	207.30	3 055.0	1 339.0	147.90	42.520	0.590 7	
Y ₅	0.331 9	0.082 6	2.309 0	1.703 0	79.07	1 156.0	1 118.0	118.40	8.179	0.161 6	
Y ₆	3.048 0	0.155 0	4.011 0	3.327 0	32.24	958.5	1 104.8	577.10	48.910	0.295 0	
Y ₇	0.173 2	0.127 2	1.442 7	0.427 2	128.35	1 476.6	1 945.6	94.47	47.596	0.143 2	
Y ₈	1.055 0	0.213 5	2.897 0	0.348 4	226.30	1 053.0	2 770.0	156.70	36.110	0.361 5	
样品 Sample	V	Be	Li	Se	Sr	Cs	Ga	Co	总量 Total amount		
Y ₁	0.688 6	0.059 2	0.416 9	0.402 4	14.200	0.344 5	1.425 0	0.392 0	4 031.9		
Y ₂	0.099 0	0.001 3	0.355 5	0.080 9	11.910	0.026 8	0.343 9	0.100 8	2 941.1		
Y ₃	0.079 0	0.008 7	0.351 0	0.066 7	14.380	0.027 9	0.400 1	0.111 1	4 016.0		
Y ₄	0.199 4	0.017 7	0.398 6	0.106 5	21.220	0.038 3	0.645 6	0.142 9	4 820.1		
Y ₅	0.052 8	0.008 5	0.109 3	0.022 0	5.894	0.024 1	0.214 9	0.088 3	2 489.5		
Y ₆	2.457 0	0.022 9	0.419 5	0.026 2	7.517	0.120 1	0.302 8	0.079 8	2 743.3		
Y ₇	0.025 3	0.008 5	0.126 9	0.006 6	4.641	0.049 0	0.270 9	0.042 2	3 700.1		
Y ₈	0.280 9	0.012 4	0.354 3	0.105 7	17.740	0.227 0	0.986 6	0.209 4	4 267.0		

参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物,第十三卷[M]. 青岛:青岛出版社,2002.
- [2] 吴水华,程伟青. 不同栽培方式对金线莲中多糖含量的影响[J]. 现代中药研究与实践,2016,30(6):8-11.
- [3] 许兰淑,周金池. 原子吸收光谱法测定环境及食品样品中痕量元素的样品前处理方法的研究进展[J]. 理化检验-化学分册,2016,52(2):244-248.
- [4] 薛福玲,蔺志锋,韩明,等. 三种中药材微量元素测定及其多糖抗氧化性研究[J]. 中药材,2010,33(2):293-296.

- [5] 吴水华,程伟青,柯伙钊,等. 不同来源金线莲中水分灰分及微量元素的测定[J]. 时珍国医国药,2010,21(12):3185-3186.
- [6] 钱保勇,蔡鹏,袁华峰. ICP-MS 法测定薄荷脑中的 5 种重金属元素[J]. 华西药理学杂志,2015,30(4):521-522.
- [7] 杨雁芳,张友波,杨秀伟. 基于微波消解的 ICP-OES 和 ICP-MS 法测定中药独活中的 24 种微量元素[J]. 药物分析杂志,2016,6(11):2004-2008.
- [8] 袁珂,薛月芹,桂仁意,等. 微波消解-原子吸收光谱法测定不同产地淡竹叶中微量元素的含量[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(3):804-808.

(上接第 118 页)

鉴定出 198 个血清型,其中以 O₇₈、O₁₈、O₂、O₈₈、O₁、O₁₁ 为主,共 119 株,占分离菌株总数的 60.1%,与该试验结果相一致。该试验结果也为今后大肠杆菌毒力检测与自家多价灭活苗的制备奠定基础。

禽大肠杆菌是一种条件性病原微生物,在饲养管理不当、环境卫生不良、生物安全措施不到位、应激和其他病原感染等情况下,容易诱发大肠杆菌病。因此,防治该病时,应加强饲养管理,增强机体抗病力,采取综合预防措施来控制。目前,各规模养殖场对该病的防治主要依赖抗生素或其他抗菌药物,但由于抗生素的滥用,大肠杆菌的耐药现象已相当严重,以前对大肠杆菌敏感的药物(如氟苯尼考、环丙沙星、阿莫西林等)现在可能变得不敏感或耐药。因此,在对禽大肠杆菌病进行防治时,应进行药敏试验,选择敏感的药物使用,而且最好能选用几种药物交替使用,并严格按疗程和剂量用药,以防止耐药菌株的出现。徐树强等^[5]对从扬州地区分离鉴定出 42 株鸡大肠杆菌,用 15 种药物进行敏感试验,结果表明所有分离菌株对丁胺卡那霉素、卡那霉素和新霉素均敏感,对复方新诺明、链霉素和四环素均耐药;刘明生等^[2]从海安地区分离并鉴定出 198 株鸡大肠杆菌,用 18 种药物对其进行药敏试验,结果表明分离的大肠杆菌多数对头孢噻

呋、头孢噻肟、阿米卡星、氧氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星高度敏感,对四环素、庆大霉素、链霉素、复方新诺明、头孢氨苄耐药。翟向和等^[6]检测了 38 株鸡源大肠杆菌对 24 种常用药物的敏感性,结果发现均有不同程度的耐药性,且大多为多重耐药,其中 36 株对 5 种或 5 种以上的药物产生了耐药性。在此次药敏试验使用的药物中,大肠杆菌对氨苄青霉素、四环素、万古霉素、红霉素、复方新诺明、林可霉素、链霉素等有很强的耐药性。大多数菌株对硫酸黏菌素、头孢噻呋、头孢噻肟、卡那霉素、氧氟沙星等敏感性较高,这为今后选择临床药物来防治大肠杆菌病提供了科学依据和参考。

参考文献

- [1] 羊建平,张君胜. 动物病原体检测技术[M]. 北京:中国农业出版社,2013.
- [2] 刘明生,甘辉群,徐小琴,等. 海安县鸡:大肠杆菌病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2010(4):223-224.
- [3] 丁红雷,王豪举,杨红军,等. 鸡大肠杆菌病原的分离鉴定和部分生物学特性研究[J]. 微生物学杂志,2006,26(1):48-50.
- [4] 吴华俊,任文,周梅霞,等. 扬州地区鸡病原性大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 现代农业科技,2009(15):306-308.
- [5] 徐树强,杨安龙,吴兆林,等. 扬州地区鸡大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 江苏农业科学,2006(6):330-332.
- [6] 翟向和,张铁,韩伟,等. 38 株鸡大肠杆菌的耐药谱分析[J]. 中国家禽,2008,30(8):50-52.