



中华人民共和国林业行业标准

LY/T 2675—2016

石斛种质鉴定技术规范

Technical manual of identification for *Dendrobium* spp. Germplasms

2016-07-27 发布

2016-12-01 实施

国家林业局 发布

目 次

前言 I

1 范围 1

2 术语和定义 1

3 种质鉴定 1

附录 A（规范性附录） 检测实验方法 20

附录 B（资料性附录） 石斛薄层色谱参考图谱 31

附录 C（资料性附录） 石斛分类描述 35

附录 D（资料性附录） 石斛毒副残留检测 39

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家兰科植物种质资源保护中心(深圳市兰科植物保护研究中心)提出。

本标准由国家林业局归口。

本标准负责起草单位:国家兰科植物种质资源保护中心(深圳市兰科植物保护研究中心)。

本标准参加起草单位:清华大学、北京蓝标一成科技有限公司。

本标准主要起草人:刘仲健、梁琼麟、赵田、罗毅波、陈利君、张国强、邵自星、梁晓萍、邹婷婷、孙阳纳、王美娜。

石斛种质鉴定技术规范

1 范围

本标准规定了石斛种质鉴定技术规范及相应指标。

本标准适用于铁皮石斛(*Dendrobium catenatum* Lindley, *Dendrobium officinale* Kimura & Migo)、金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindley)、鼓槌石斛(*Dendrobium chrysotoxum* Lindley)、流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook.)、齿瓣石斛(*Dendrobium devonianum* Paxton)、兜唇石斛[*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. Fischer]、叠鞘石斛(*Dendrobium denneanum* Kerr)、美花石斛(*Dendrobium loddigesii* Rolfe)、霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang & S. J. Cheng)等种的实生苗、组织克隆苗、鲜茎、干燥茎的种质鉴定。

注 1：铁皮石斛拉丁名 *Dendrobium catenatum* Lindley 参考 Floral of China, 2009, 又名黄石斛。

注 2：铁皮石斛拉丁名 *Dendrobium officinale* Kimura & Migo 参考 CITES 附录 Checklist。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

种质 germplasms

九个石斛种的实生苗、组织克隆苗、鲜茎、干燥茎遗传物质所属物种。

2.2

实生苗 seedling

直接由种子繁殖的幼苗,包括播种苗、野生苗。

2.3

组织克隆苗 clone plantlet

通过无性繁殖得到的幼苗,包括通过愈伤组织进行组织培养得到的幼苗和成体植株出芽分离栽培得到的幼苗。

3 种质鉴定

3.1 实生苗

3.1.1 描述说明

铁皮石斛、金钗石斛、鼓槌石斛、兜唇石斛描述为出瓶后 90 d 苗,其他种类石斛为出瓶后 7 d 苗,整个培养周期不超过 12 个月。野生苗则为与播种苗处于相同生长阶段的幼苗。

3.1.2 铁皮石斛

3.1.2.1 形态

茎直立,丛状,肉质,圆柱形,长 2 cm~7 cm,直径 0.4 cm~0.6 cm,不分枝,具多节,节间长 0.6 cm~1.0 cm,中间稍膨大;互生 3 枚~5 枚叶片,纸质,长圆状披针形,长 1 cm~3 cm,宽 0.5 cm~1.0 cm,先

LY/T 2675—2016

端钝并多少钩转，叶基部下延为抱茎的鞘，鞘通常短于抱茎的节长，边缘和中肋常带淡紫色，叶鞘常具紫褐色晕状斑。

3.1.2.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验，记录色谱图(见图 1)。按色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算，相似度不低于 0.85。

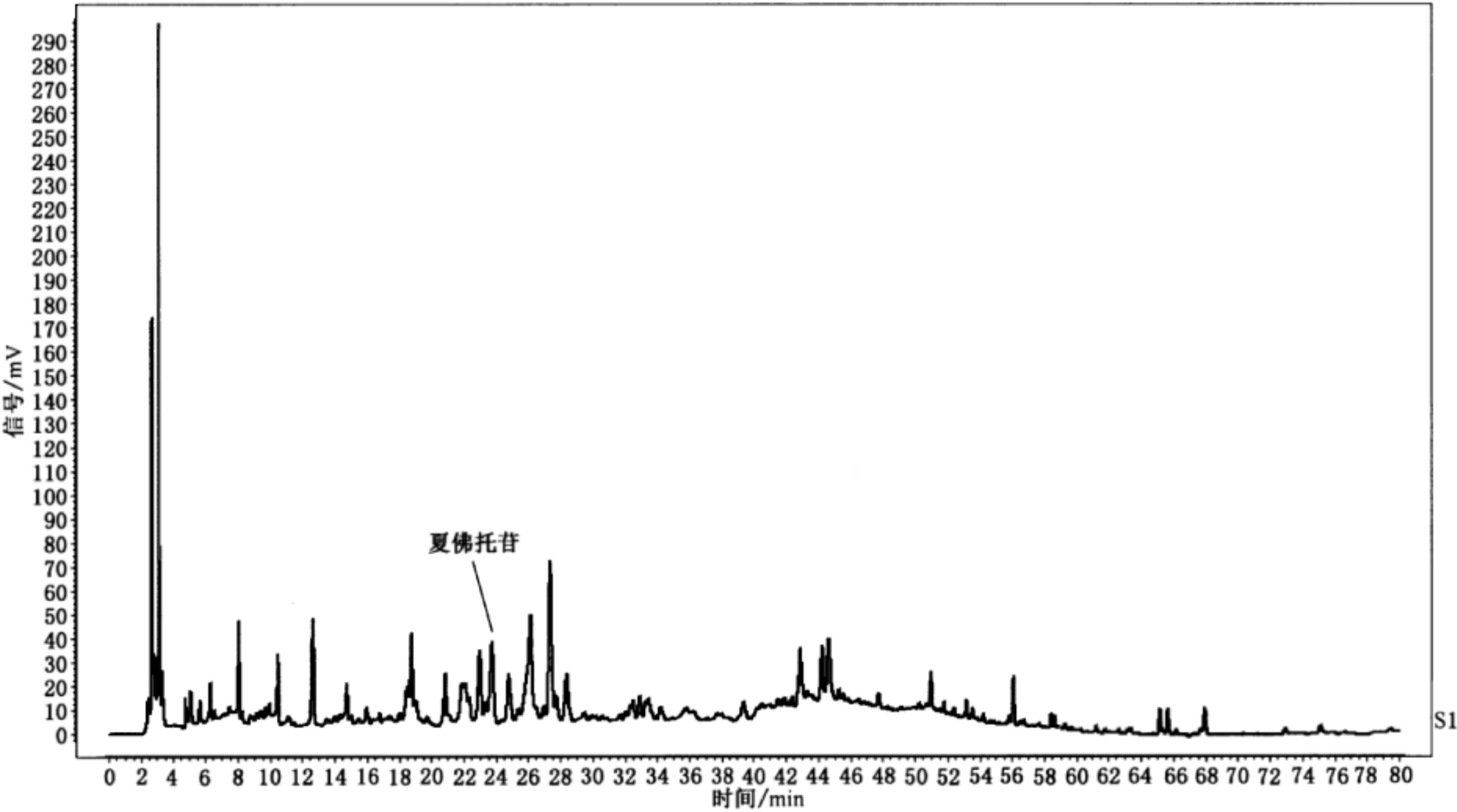


图 1 铁皮石斛对照指纹图谱

3.1.2.3 薄层色谱鉴别

照薄层色谱法试验(见 A.2)，供试品色谱中，应在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

3.1.2.4 DNA 检测

本标准中铁皮石斛样品(样品批号：TP20150439，原产地云南广南)已经完成基因组测序，基因组大小 1.1G[基因组测序详细信息见论文：The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution. Scientific Reports 6: 19029 (2016). DOI: 10.1038/srep19029;基因组序列 NCBI 索取号为 JSDN00000000 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/262478>)]。

3.1.3 金钗石斛

3.1.3.1 形态

茎直立，丛状，肉质，具分蘖，稍扁的圆柱形，长 3 cm~8 cm，中部直径 0.7 cm~0.9 cm，中部以上回折弯曲，基部明显收狭，具多节，节有时稍肿大，节间多少呈倒圆锥形，长 0.8 cm~1.5 cm；具 3 枚~5 枚叶，叶革质，长圆形，长 4 cm~6 cm，宽 0.6 cm~0.7 cm，先端钝并且不等二裂，基部具抱茎的鞘。

3.1.3.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验,记录色谱图(见图 2)。按色谱指纹图谱相似度评价系统,供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算,相似度不低于 0.85。

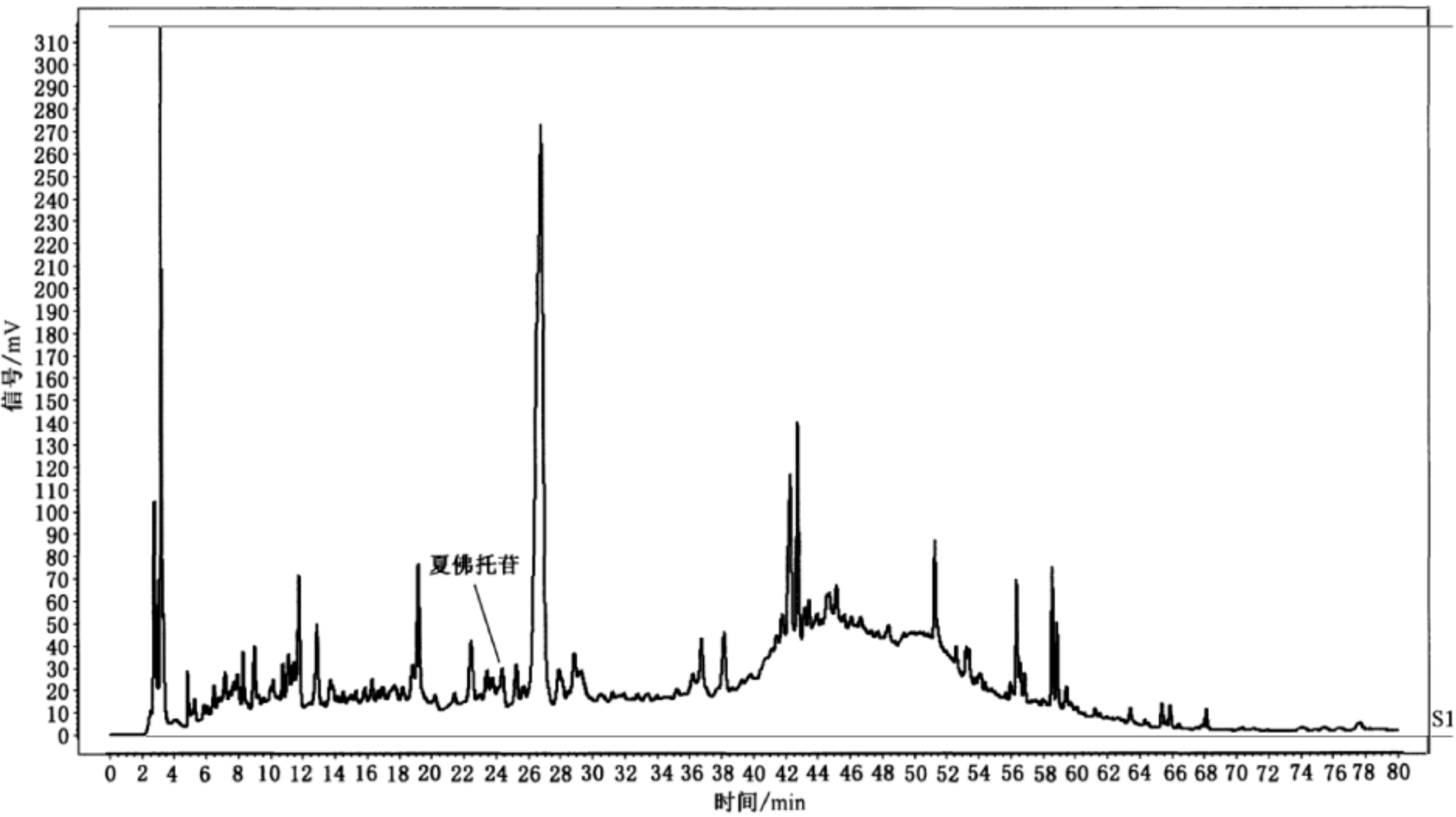


图 2 金钗石斛对照指纹图谱

3.1.3.3 薄层色谱鉴别

照薄层色谱法试验(见 A.2),供试品色谱中,应在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

3.1.4 鼓槌石斛

3.1.4.1 形态

茎直立,丛状,肉质,长卵形,长 0.8 cm~1.5 cm,中部直径 0.6 cm~1.5 cm,具 1 节~2 节间,节间长 0.4 cm~1.0 cm;近顶端具 1 枚~2 枚叶,叶革质,长圆形,长 1.0 cm~5.0 cm,宽 0.4 cm~1.0 cm,先端急尖而钩转,基部收狭,但不下延为抱茎的鞘。

3.1.4.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验,记录色谱图(见图 3)。按色谱指纹图谱相似度评价系统,供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算,相似度不低于 0.85。

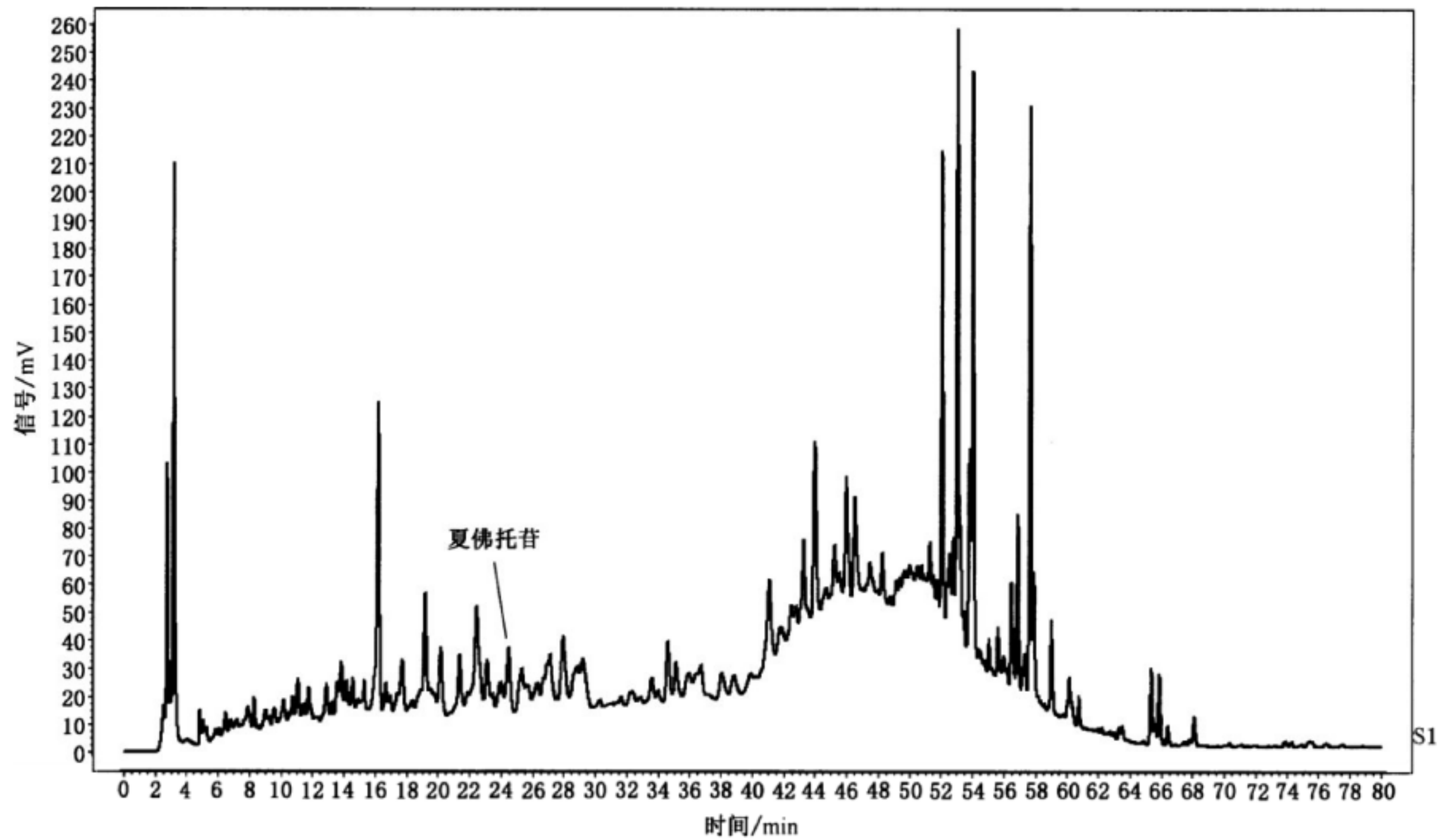


图 3 鼓槌石斛对照指纹图谱

3.1.4.3 薄层色谱鉴别

照薄层色谱法试验(见 A.2),供试品色谱中,应在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

3.1.5 流苏石斛

3.1.5.1 形态

茎直立或斜立,肉质,细圆柱形,长 3 cm~8 cm,中部直径 0.3 cm~0.4 cm,具多节,节间长 0.8 cm~1.7 cm;具 5 枚~8 枚叶,叶纸质,长圆形,长 2.8 cm~3.7 cm,宽 0.6 cm~0.8 cm,先端急尖,不对称,基部具抱茎的鞘。

3.1.5.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验,记录色谱图(见图 4)。按色谱指纹图谱相似度评价系统,供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算,相似度不低于 0.85。

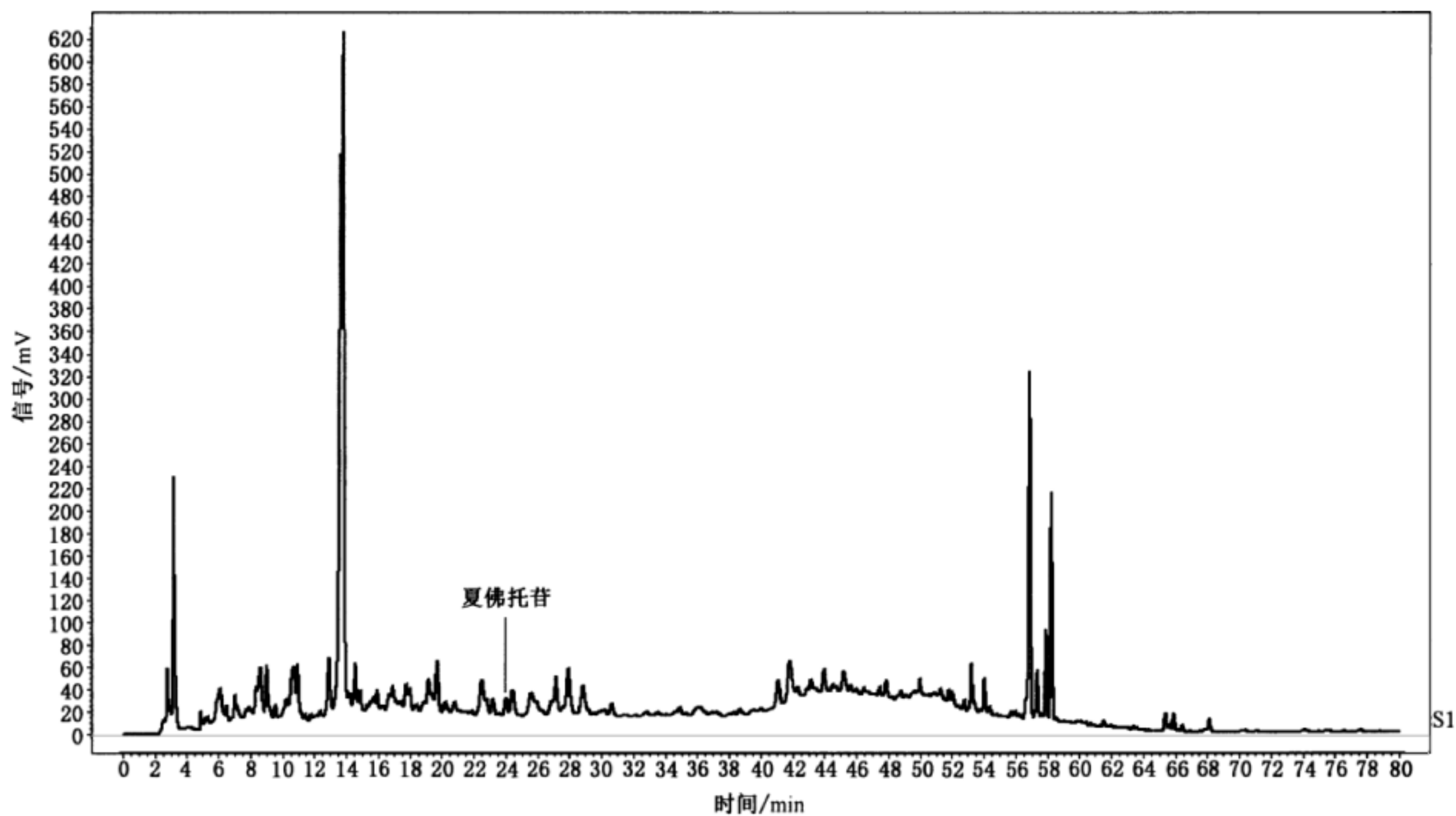


图 4 流苏石斛对照指纹图谱

3.1.5.3 薄层色谱鉴别

照薄层色谱法试验(见 A.2),供试品色谱中,应在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

3.1.6 齿瓣石斛

3.1.6.1 形态

茎直立或斜立,肉质,细圆柱形,长 4 cm~8.5 cm,中部直径 0.1 cm~0.2 cm,具多节,节间长 0.8 cm~1.5 cm;具 3 枚~5 枚叶,叶纸质,长圆形,长 2.2 cm~3.1 cm,宽 0.4 cm~0.6 cm,先端急尖,不对称,基部具抱茎的鞘,叶鞘常具紫红色斑点。

3.1.6.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验,记录色谱图(见图 5)。按色谱指纹图谱相似度评价系统,供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算,相似度不低于 0.85。

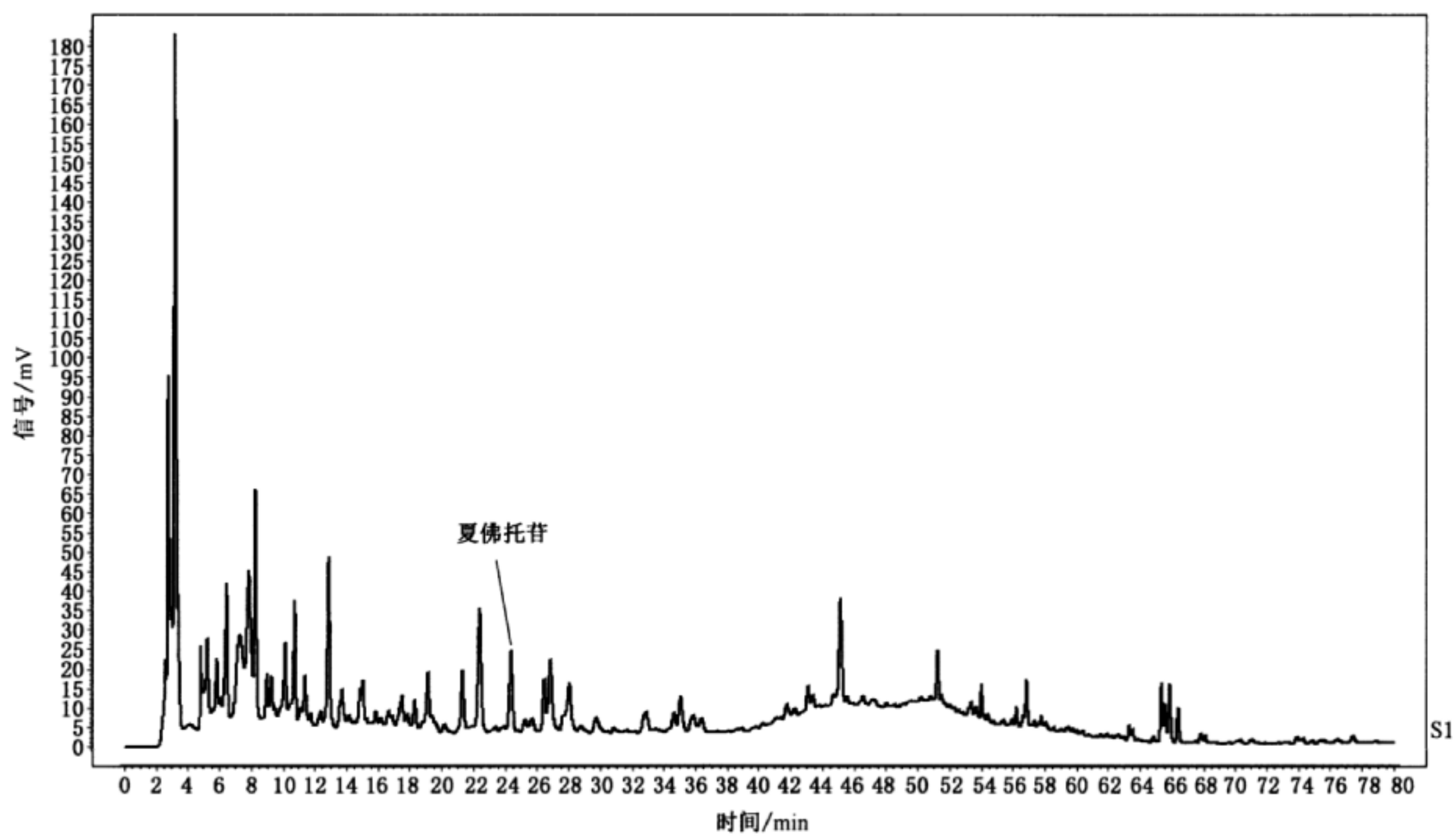


图 5 齿瓣石斛对照指纹图谱

3.1.7 兜唇石斛

3.1.7.1 形态

茎直立或倾斜，丛状，肉质，细圆柱形，长 3 cm~10 cm，直径 0.3 cm~0.6 cm，具 3 节~6 节间，节间长 0.4 cm~1.0 cm；互生 3 枚~5 枚叶，叶纸质，披针形或卵状披针形，长 1 cm~4 cm，宽 0.6 cm~1.1 cm，先端渐尖，基部具鞘，叶鞘纸质，干后浅白色，鞘口呈杯状张开。

3.1.7.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验，记录色谱图(见图 6)。按色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算，相似度不低于 0.85。

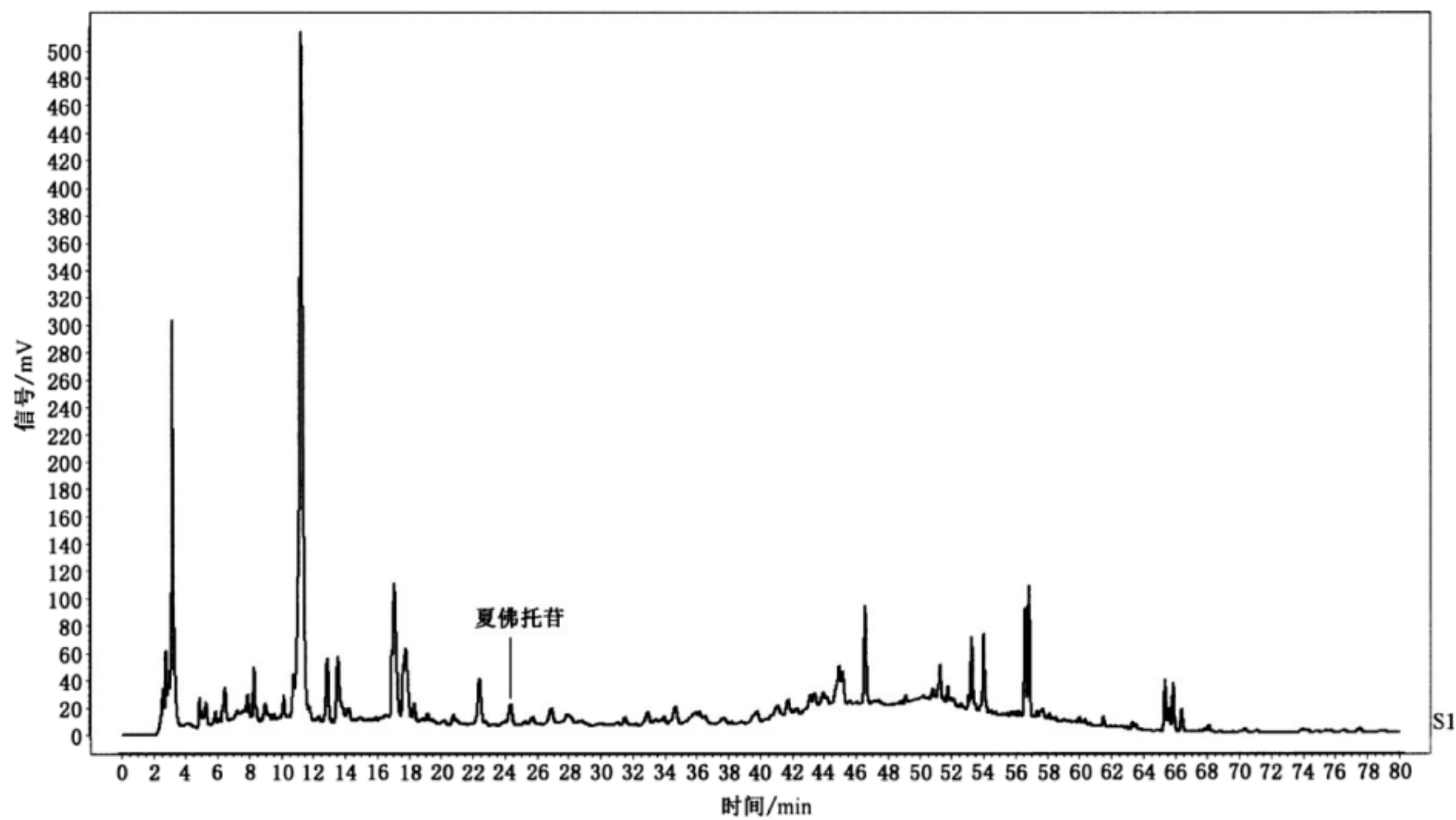


图 6 兜唇石斛对照指纹图谱

3.1.8 叠鞘石斛

3.1.8.1 形态

茎直立，肉质，细圆柱形，长 2 cm~8 cm，中部直径 0.5 cm~0.8 cm，具多节，节间长 1.2 cm~1.5 cm；叶纸质，披针形或椭圆形，长 2.5 cm~3.2 cm，宽 0.6 cm~0.9 cm，先端急尖，不对称，基部具抱茎的鞘。

3.1.8.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验，记录色谱图(见图 7)。按色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算，相似度不低于 0.85。

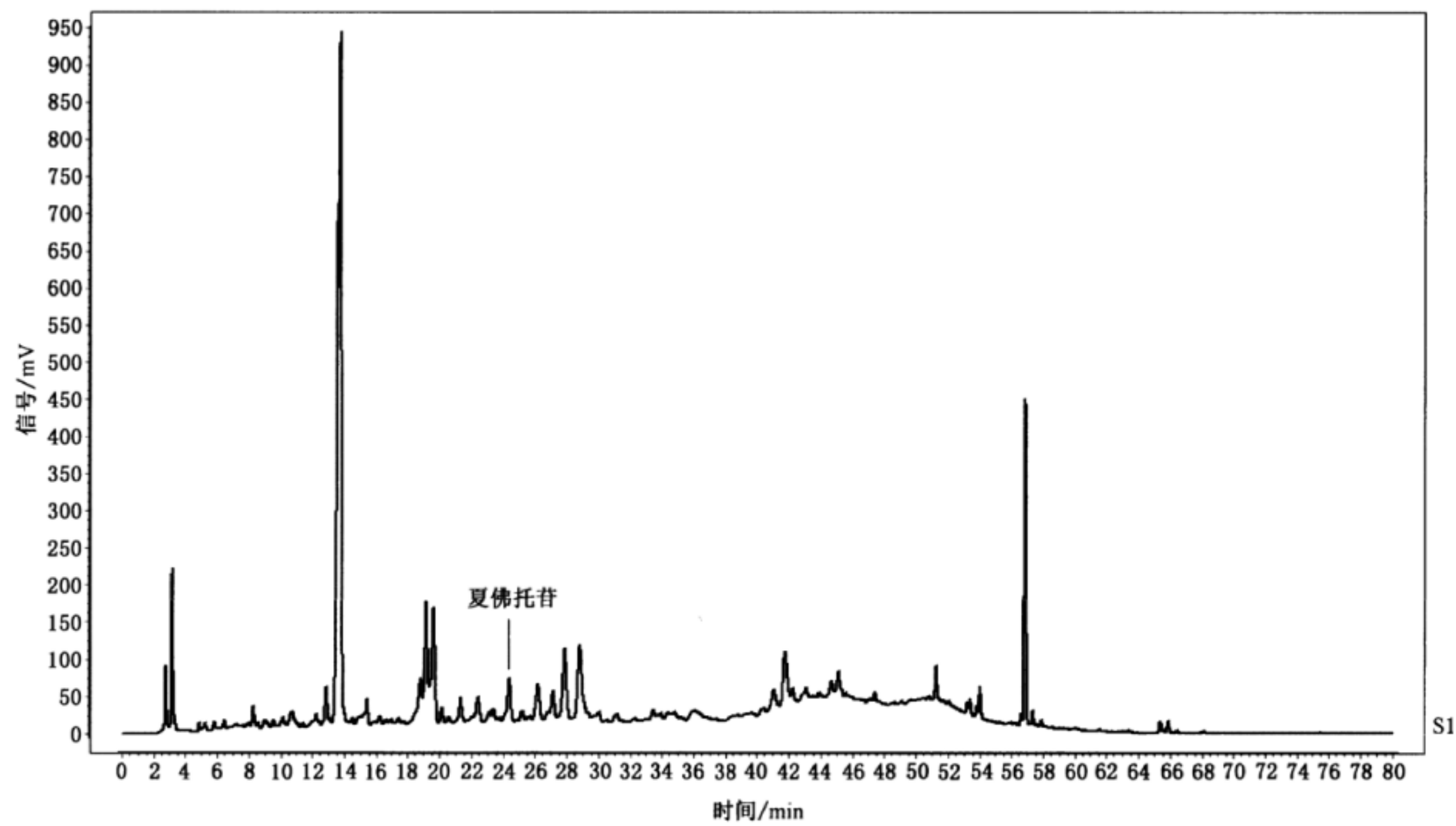


图 7 叠鞘石斛对照指纹图谱

3.1.9 美花石斛

3.1.9.1 形态

茎下垂或卷曲，肉质，细圆柱形，长 3 cm~6.5 cm，中部直径 0.2 cm~0.4 cm，具多节，节间长 0.5 cm~0.8 cm；具 3 枚~5 枚叶，叶纸质，披针形或椭圆形，长 0.8 cm~1.5 cm，宽 0.4 cm~0.6 cm，先端急尖，不对称，基部具抱茎的鞘。

3.1.9.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验，记录色谱图(见图 8)。按色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算，相似度不低于 0.85。

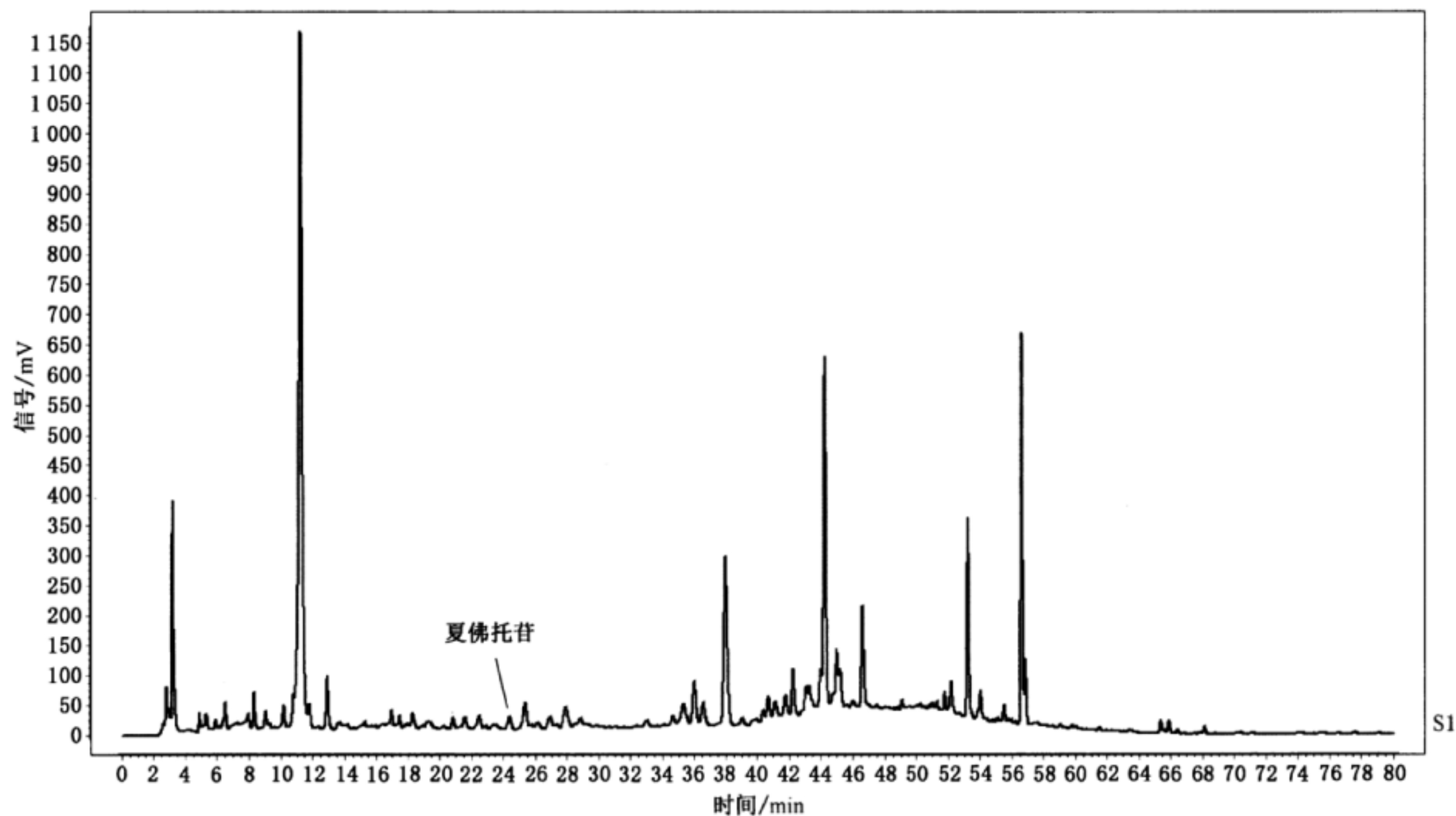


图 8 美花石斛对照指纹图谱

3.1.10 霍山石斛

3.1.10.1 形态

茎直立，肉质，长 2 cm~7 cm，从基部上方第二节膨大，然后向上开始逐节变细，基部上方茎直径 0.3 cm~0.7 cm，不分枝，具 3 节~7 节，节间长 0.3 cm~1.5 cm，淡黄绿色，有时末端几节表面带淡紫红色斑点；叶 3 枚~7 枚互生于茎的上部，斜出，舌状长圆形，长 1 cm~3 cm，宽 0.3 cm~1.0 cm，先端钝并且微凹，叶脉两侧叶片略不对称，基部具抱茎的鞘，叶鞘膜质。

3.1.10.2 指纹图谱

照高效液相色谱法结合特征指纹图谱检测法(见 A.1.5)试验，记录色谱图(见图 9)。按色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算，相似度不低于 0.85。

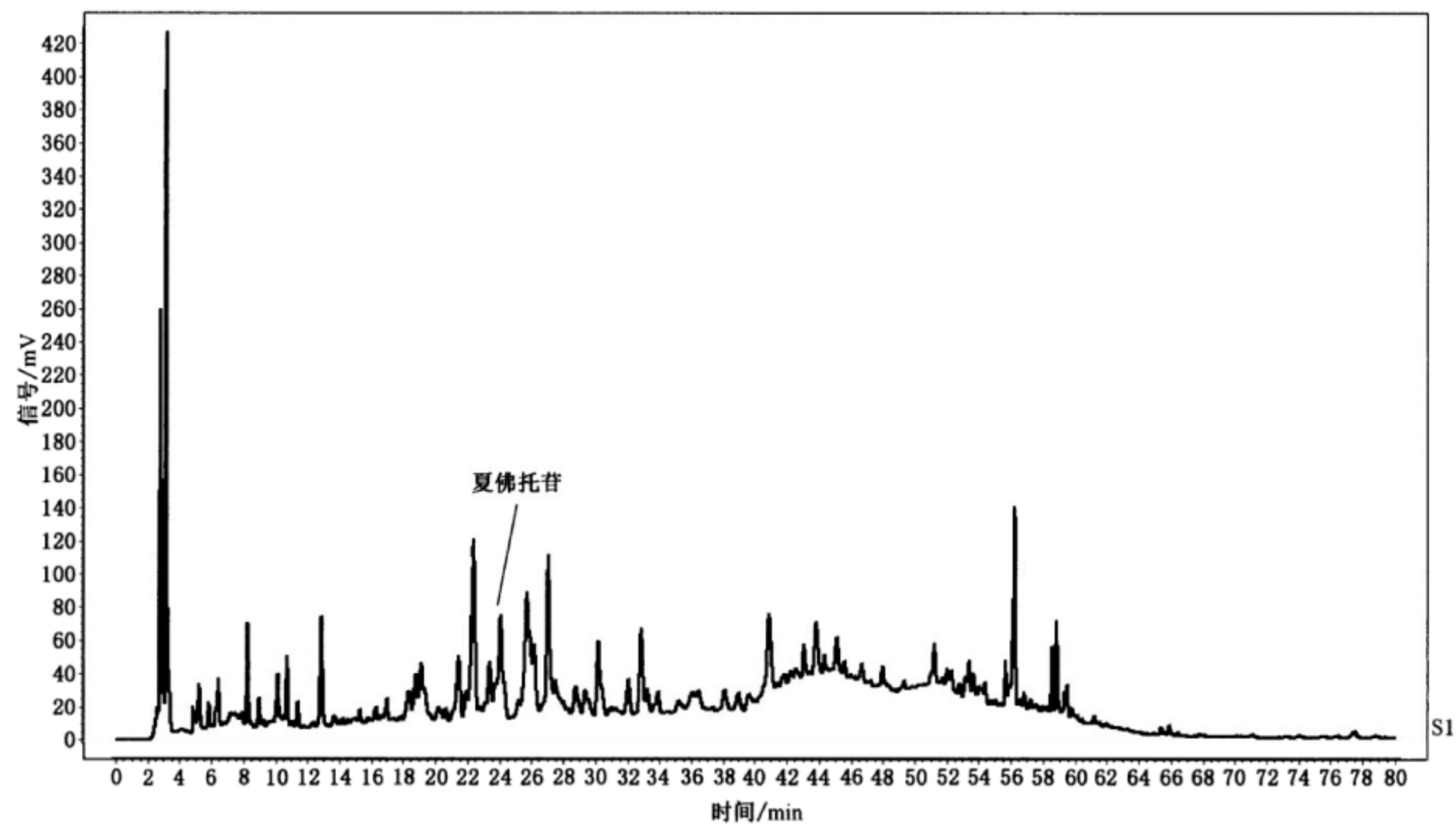


图 9 霍山石斛对照指纹图谱

3.2 组织克隆苗

3.2.1 描述说明

组织培养克隆苗均为出瓶后 90 d 苗,整个培养周期不超过 12 个月。出芽栽培克隆苗则为与组织培养克隆苗处于相同生长阶段的幼苗。

3.2.2 铁皮石斛

3.2.2.1 形态

茎直立,丛状,肉质,圆柱形,长 5 cm~8 cm,直径 0.4 cm~0.6 cm,不分枝,具多节,节间长 0.6 cm~1.0 cm,中间稍膨大;互生 3 枚~5 枚叶片,纸质,长圆状披针形,长 1 cm~3 cm,宽 0.5 cm~1.0 cm,先端钝并多少钩转,叶基部下延为抱茎的鞘,鞘通常短于抱茎的节长,边缘和中肋常带淡紫色,叶鞘常具紫褐色晕状斑。

3.2.2.2 指纹图谱

同 3.1.2.2。

3.2.2.3 薄层色谱鉴别

同 3.1.2.3。

3.2.2.4 DNA 检测

同 3.1.2.4。

3.2.3 金钗石斛

3.2.3.1 形态

茎直立,丛状,肉质,具分蘖,稍扁的圆柱形,长 3 cm~8 cm,中部直径 0.7 cm~0.9 cm,中部以上回折弯曲,基部明显收狭,具多节,节有时稍肿大,节间多少呈倒圆锥形,长 0.8 cm~1.5 cm;具 3 枚~5 枚叶,叶革质,长圆形,长 4 cm~6 cm,宽 0.6 cm~0.7 cm,先端钝并且不等二裂,基部具抱茎的鞘。

3.2.3.2 指纹图谱

同 3.1.3.2。

3.2.3.3 薄层色谱鉴别

同 3.1.3.3。

3.2.4 鼓槌石斛

3.2.4.1 形态

茎直立,丛状,肉质,长卵形,长 0.8 cm~1.5 cm,中部直径 0.6 cm~1.5 cm,具 1 节~2 节间,节间长 0.4 cm~1.0 cm;近顶端具 1 枚~2 枚叶,叶革质,长圆形,长 1.0 cm~5.0 cm,宽 0.4 cm~1.0 cm,先端急尖而钩转,基部收狭,但不下延为抱茎的鞘。

3.2.4.2 指纹图谱

同 3.1.4.2。

3.2.4.3 薄层色谱鉴别

同 3.1.4.3。

3.2.5 流苏石斛

3.2.5.1 形态

茎斜立,质地硬,圆柱形或有时基部上方稍呈纺锤形,长 3 cm~8 cm,直径 0.3 cm~0.4 cm,具多节,节间长 0.8 cm~2.0 cm;叶二列,革质,长圆形或长圆状披针形,长 3 cm~5 cm,宽 0.6 cm~0.8 cm,先端急尖,有时稍 2 裂,基部具紧抱于茎的革质鞘。

3.2.5.2 指纹图谱

同 3.1.5.2。

3.2.5.3 薄层色谱鉴别

同 3.1.5.3。

3.2.6 齿瓣石斛

3.2.6.1 形态

茎直立,细圆柱形,长 4 cm~10 cm,直径 0.1 cm~0.2 cm,不分枝,表面绿色带紫色斑点;具多节,节间长 1 cm~2 cm;叶二列,纸质,互生于整个茎上,狭卵状披针形,长 3 cm~5 cm,宽 0.4 cm~0.6 cm,

先端长渐尖，基部具抱茎的鞘，叶鞘常具紫红色斑点。

3.2.6.2 指纹图谱

同 3.1.6.2。

3.2.7 兜唇石斛

3.2.7.1 形态

茎直立或倾斜，丛状，肉质，细圆柱形，长 3 cm~10 cm，直径 0.3 cm~0.6 cm，具 3 节~6 节间，节间长 0.4 cm~1.0 cm；互生 3 枚~5 枚叶，叶纸质，披针形或卵状披针形，长 1 cm~4 cm，宽 0.6 cm~1.1 cm，先端渐尖，基部具鞘，叶鞘纸质，干后浅白色，鞘口呈杯状张开。

3.2.7.2 指纹图谱

同 3.1.7.2。

3.2.8 叠鞘石斛

3.2.8.1 形态

茎直立或斜立，细圆柱形，长 2 cm~8 cm，直径 0.7 cm~0.9 cm，表面绿色，具多节，节间长 1.2 cm~3.5 cm；叶革质，线形或狭长圆形，长 4 cm~10 cm，宽 1.0 cm~1.2 cm，先端钝且微凹或有时近锐尖而一侧稍钩转，基部具抱茎的鞘。

3.2.8.2 指纹图谱

同 3.1.8.2。

3.2.9 美花石斛

3.2.9.1 形态

茎柔弱，常下垂，肉质，细圆柱形，长 3 cm~10 cm，直径 0.2 cm~0.6 cm，具多节，节间长 0.5 cm~1.5 cm，浅绿色；叶二列互生，纸质，舌形、长圆状披针形或稍斜长圆形，通常长 0.8 cm~3.0 cm，宽 0.6 cm~1.0 cm，先端锐尖而稍钩转，基部具鞘，干后上表面的叶脉隆起呈网格状，叶鞘膜质，干后鞘口常张开。

3.2.9.2 指纹图谱

同 3.1.9.2。

3.2.10 霍山石斛

3.2.10.1 形态

茎直立，肉质，密集着生，自基部向上明显变细，长 1 cm~3 cm，基部上方直径 0.3 cm~0.5 cm，不分枝，具 3 节~7 节，节间长 1.0 cm~1.2 cm，淡黄绿色，有时带淡紫红色斑点；叶革质，2 枚~3 枚互生于茎的上部，斜出，舌状长圆形，长 0.8 cm~1.5 cm，宽 0.3 cm~0.4 cm，先端钝并微凹，基部具抱茎的鞘，叶鞘膜质，宿存。

3.2.10.2 指纹图谱

同 3.1.10.2。

3.3 鲜茎

3.3.1 铁皮石斛

3.3.1.1 形态

呈圆柱形,肉质,长 9 cm~35 cm,直径 0.2 cm~0.4 cm,不分枝,具多节,节间长 1.3 cm~1.7 cm;表面黄绿色,或具紫红色条纹;叶鞘常具紫斑,老时其上缘与茎松离而张开,并且与节留下一个环状铁青色的间隙。气微,味淡,嚼之有黏性。

在显微鉴别(见附录 A.3)下,茎横切面表皮细胞 I 列,扁平,外壁及侧壁稍增厚、微木化,外被黄色角质层,有的外层可见无色的薄壁细胞组成的叶鞘层;基本薄壁组织细胞多角形,大小相似,其间散在多数维管束,略排成 4 圈~5 圈,维管束外韧型,外围排列有厚壁的纤维束,有的外侧小型薄壁细胞中含有硅质块。含草酸钙针晶束的黏液细胞多见于近表皮处。

3.3.1.2 指纹图谱

同 3.1.2.2。

3.3.1.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干品计,柚皮素含量应不低于 0.002 4%。

3.3.1.4 薄层色谱鉴别

同 3.1.2.3。

3.3.1.5 DNA 检测

同 3.1.2.4。

3.3.2 金钗石斛

3.3.2.1 形态

呈稍扁的圆柱形,肉质状肥厚,长 20 cm~40 cm,直径可达 1.3 cm,上部多少回折状弯曲,基部明显收狭,不分枝,具多节,节有时稍肿大;节间多少呈倒圆锥形,长 2 cm~4 cm;具抱茎的叶鞘。气微,味苦。

在显微鉴别(见 A.3)下,茎横切面表皮细胞 I 列,扁平,外被鲜黄色角质层。基本组织细胞大小较悬殊,有壁孔,散在多数外韧型维管束,排成 7 圈~8 圈。维管束外侧纤维束新月形或半圆形,其外侧薄壁细胞有的含类圆形硅质块,木质部有 1~3 个导管直径较大。含草酸钙针晶细胞多见于维管束旁。

3.3.2.2 指纹图谱

同 3.1.3.2。

3.3.2.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干品计,柚皮素含量应不低于 0.002 4%;照气相色谱法(见 A.4)测定,按干品计,石斛碱含量应不低于 0.4%。

3.3.2.4 薄层色谱鉴别

同 3.1.3.3。

3.3.3 鼓槌石斛

3.3.3.1 形态

呈粗纺锤形,肉质,长 6 cm~30 cm,中部直径 1.5 cm~5.0 cm,具 2 节~5 节;表面光滑,黄绿色或黄色,老后有时具红色,具多数圆钝的条棱;无叶鞘。气微,老茎嚼之有黏性,微苦。

在显微鉴别(见 A.3)下,茎横切面表皮细胞扁平,外壁及侧壁增厚,胞腔狭长型;角质层淡黄色。基本组织细胞大小差异较显著。多数外韧型维管束略排成 10 圈~12 圈。木质部导管大小近似。有的可见含草酸钙针晶束细胞。

3.3.3.2 指纹图谱

同 3.1.4.2。

3.3.3.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干品计,柚皮素含量应不低于 0.001 3%;照高效液相色谱法(见 A.1.7)测定,毛兰素含量应不低于 0.4%。

3.3.3.4 薄层色谱鉴别

同 3.1.4.3。

3.3.4 流苏石斛

3.3.4.1 形态

粗壮,质地硬,呈长圆柱形或有时基部上方稍呈纺锤形,长 50 cm~85 cm,直径 0.8 cm~1.5 cm;不分枝,具多节,节间长 3.5 cm~4.8 cm;表面绿色、黄绿色或黄色至暗黄色;节明显,节间长 2 cm~6 cm,具多数纵槽;具紧抱于茎的革质叶鞘。味淡或微苦,嚼之有黏性。

3.3.4.2 指纹图谱

同 3.1.5.2。

3.3.4.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干燥品计算,柚皮素含量应不低于 0.002 0%。

3.3.4.4 薄层色谱鉴别

同 3.1.5.3。

3.3.5 齿瓣石斛

3.3.5.1 形态

呈细圆柱形,稍肉质,长 50 cm~70 cm,直径 0.3 cm~0.5 cm,不分枝,具多节,节间长 2.5 cm~4.0 cm,表面光滑,绿色或紫绿色;具抱茎的鞘,叶鞘常具紫红色斑点,干后白色纸质或破碎成纤维状。气微,味淡,嚼之有黏性。

3.3.5.2 指纹图谱

同 3.1.6.2。

3.3.5.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干燥品计算,柚皮素含量应不低于 0.001 8%。

3.3.6 兜唇石斛

3.3.6.1 形态

呈细圆柱形,肉质,长 30 cm~60 cm,直径 0.4 cm~0.7 cm,不分枝,具多节,节间长 2.0 cm~3.5 cm;绿色或黄绿色,有时带紫色;具叶鞘,叶鞘纸质,干后浅白色,鞘口呈杯状张开。气微,味淡,嚼之有黏性。

3.3.6.2 指纹图谱

同 3.1.7.2。

3.3.6.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干燥品计算,柚皮素含量应不低于 0.002 5%。

3.3.7 叠鞘石斛

3.3.7.1 形态

呈圆柱形,纤细,质硬易折断,长 25 cm~35 cm,直径 0.4 cm~0.7 cm,不分枝,具多节,节间长 2.5 cm~4.0 cm,表面绿色或黄绿色,有纵棱;具紧抱于茎的叶鞘。气微,味苦。

3.3.7.2 指纹图谱

同 3.1.8.2。

3.3.7.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干燥品计算,柚皮素含量应不低于 0.002 1%。

3.3.8 美花石斛

3.3.8.1 形态

茎柔弱,呈细圆柱形,长 10 cm~30 cm,直径 0.2 cm~0.4 cm,有时分枝,具多节,节间长 1.5 cm~2.0 cm;绿色或黄绿色;具膜质叶鞘,干后鞘口常张开。气微,味淡,嚼之有黏性。

3.3.8.2 指纹图谱

同 3.1.9.2。

3.3.8.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干燥品计算,柚皮素含量应不低于 0.001 2%。

3.3.9 霍山石斛

3.3.9.1 形态

呈肉质,长 3 cm~9 cm,圆柱状自基部向上明显变细,基部上方直径 0.3 cm~1.0 cm,不分枝,具 3~7 节,节间长 0.3 cm~0.8 cm,淡黄绿色,有时带淡紫红色斑点;具抱茎的叶鞘,叶鞘膜质,宿存。气微,

味淡,嚼之有黏性。

3.3.9.2 指纹图谱

同 3.1.10.2。

3.3.9.3 含量检测

照高效液相色谱法(见 A.1.6)测定,按干燥品计算,柚皮素含量应不低于 0.001 4%。

3.4 干燥茎

3.4.1 铁皮石斛

3.4.1.1 形态

呈圆柱形,长 9 cm~35 cm,直径 0.2 cm~0.4 cm,节间长 1.3 cm~1.7 cm;表面黄绿色,或具紫红色条纹,质坚实,易折断,断面平坦,灰白色至灰绿色;气微,味淡,嚼之有黏性。

3.4.1.2 指纹图谱

同 3.1.2.2。

3.4.1.3 含量检测

同 3.3.1.3。

3.4.1.4 水分及总灰分

供试品水分含量不超过 12%(检测方法见 A.5),总灰分不超过 5%(检测方法见 A.6)。

3.4.1.5 薄层色谱鉴别

同 3.1.2.3。

3.4.1.6 DNA 检测

60 ℃以下条件干燥的供试品可进行 DNA 检测,同 3.1.2.4。

3.4.2 金钗石斛

3.4.2.1 形态

呈扁圆柱形,长 20 cm~40 cm,直径 0.4 cm~0.6 cm,节间长 2.0 cm~3.0 cm。表面金黄色或黄中带绿色,有深纵沟。质硬而脆,断面较平坦而疏松。气微,味苦。

3.4.2.2 指纹图谱

同 3.1.3.2。

3.4.2.3 含量检测

同 3.3.2.3。

3.4.2.4 水分及总灰分

同 3.4.1.4。

3.4.2.5 薄层色谱鉴别

同 3.1.3.3。

3.4.3 鼓槌石斛

3.4.3.1 形态

呈粗纺锤形,长 6 cm~40 cm,中部直径 1 cm~3 cm,具 2 节~5 节。表面光滑,金黄色,有明显凸起的棱。质轻而松脆,断面海绵状。气微,味淡或微苦,嚼之有黏性。

3.4.3.2 指纹图谱

同 3.1.4.2。

3.4.3.3 含量检测

同 3.3.3.3。

3.4.3.4 水分及总灰分

同 3.4.1.4。

3.4.3.5 薄层色谱鉴别

同 3.1.4.3。

3.4.4 流苏石斛

3.4.4.1 形态

呈长圆柱形,长 50 cm~85 cm,直径 0.4 cm~1.2 cm,节明显,节间长 2 cm~6 cm。表面黄色至暗黄色,有深纵槽。质疏松,断面平坦或呈纤维性。味淡或微苦,嚼之有黏性。

3.4.4.2 指纹图谱

同 3.1.5.2。

3.4.4.3 含量检测

同 3.3.4.3。

3.4.4.4 水分及总灰分

同 3.4.1.4。

3.4.4.5 薄层色谱鉴别

同 3.1.5.3。

3.4.5 齿瓣石斛

3.4.5.1 形态

呈细圆柱形,长 50 cm~70 cm,直径 0.3 cm~0.5 cm;不分枝,具多节,节间长 2.5 cm~4.0 cm,表

皮常紫色或淡褐色带黑色；质坚实，易折断，断面较平坦，灰白色至灰绿色；残留叶鞘有或无，纸质或破碎为纤维状，白色；气微，味淡，嚼之有黏性。

3.4.5.2 指纹图谱

同 3.1.6.2。

3.4.5.3 含量检测

同 3.3.5.3。

3.4.5.4 水分及总灰分

同 3.4.1.4。

3.4.6 兜唇石斛

3.4.6.1 形态

呈细圆柱形，长 30 cm～60 cm，直径 0.4 cm～0.7 cm，不分枝，具多节，节间长 2.0 cm～3.5 cm。气微，味淡，嚼之有黏性。

3.4.6.2 指纹图谱

同 3.1.7.2。

3.4.6.3 含量检测

同 3.3.6.3。

3.4.6.4 水分及总灰分

同 3.4.1.4。

3.4.7 叠鞘石斛

3.4.7.1 形态

呈细圆柱形，长 25 cm～35 cm，直径 0.4 cm～0.6 cm，不分枝，具多节，节间长 2.5 cm～4.0 cm，表皮淡黄色或黄褐色。气微，味苦。

3.4.7.2 指纹图谱

同 3.1.8.2。

3.4.7.3 含量检测

同 3.3.7.3。

3.4.7.4 水分及总灰分

同 3.4.1.4。

3.4.8 美花石斛

3.4.8.1 形态

呈细圆柱形，长 10 cm～30 cm，直径 0.2 cm～0.4 cm，有时分枝，具多节，节间长 1.5 cm～2.0 cm，

表皮金黄色。气微，味淡，嚼之有黏性。

3.4.8.2 指纹图谱

同 3.1.9.2。

3.4.8.3 含量检测

同 3.3.8.3。

3.4.8.4 水分及总灰分

同 3.4.1.4。

3.4.9 霍山石斛

3.4.9.1 形态

呈细圆柱形，长 3 cm～9 cm，自基部向上明显变细，不分枝，具 3 节～7 节，节间长 0.3 cm～0.8 cm，表皮淡黄色，有时带淡紫红色斑点。质坚实，断面灰白色至灰绿色；气微，味淡，嚼之有黏性。

3.4.9.2 指纹图谱

同 3.1.10.2。

3.4.9.3 含量检测

同 3.3.9.3。

3.4.9.4 水分及总灰分

同 3.4.1.4。

附 录 A
(规范性附录)
检测实验方法

A.1 高效液相色谱法

A.1.1 方法说明

高效液相色谱法系采用高压输液泵将规定的流动相泵入装有填充剂的色谱柱,对供试品进行分离测定的色谱方法。注入的供试品,由流动相带入色谱柱内,各组分在柱内被分离,并进入检测器检测,由积分仪或数据处理系统记录和处理色谱信号。

A.1.2 仪器和色谱条件

A.1.2.1 高效液相色谱仪

由高压输液泵、进样器、色谱柱、检测器、积分仪或数据处理系统组成。色谱柱内径一般为 3.9 cm~4.6 mm,填充剂粒径为 3 μm~10 μm。超高效液相色谱仪是适应小粒径(约 2 μm)填充剂的耐超高压、小进样量、低死体积、高灵敏度检测的高效液相色谱仪。

A.1.2.2 色谱柱

本标准相关检测采用反相色谱柱。反相色谱柱是以键合非极性基团的载体为填充剂填充而成的色谱柱。常见的载体有硅胶、聚合物复合硅胶和聚合物等;常用的填充剂有十八烷基硅烷键合硅胶、辛基硅烷键合硅胶和苯基键合硅胶等。

温度会影响分离效果,本标准中未指明色谱柱温度时系指 30 ℃。为改善分离效果可适当提高色谱柱的温度,但一般不宜超过 50 ℃。残余硅羟基未封闭的硅胶色谱柱,流动相 pH 一般应在 2~8。残余硅羟基已封闭的硅胶、聚合物复合硅胶或聚合物色谱柱可耐受更广泛 pH 的流动相,适合于 pH 小于 2 或大于 8 的流动相。

A.1.2.3 检测器

最常用的检测器为紫外可见分光检测器,包括二极管阵列检测器,其他常见的检测器有荧光检测器、蒸发光散射检测器、示差折光检测器、电化学检测器和质谱检测器等。本标准采用紫外-可见分光检测器,为选择性检测器,其响应值不仅与被测物质的量有关,还与其结构有关;紫外可见分光检测器所用流动相应符合紫外可见分光光度法对溶剂的要求;采用低波长检测时,还应考虑有机溶剂的截止使用波长,并选用色谱级有机溶剂。蒸发光散射检测器和质谱检测器不应使用含不挥发性盐的流动相。

A.1.2.4 流动相

反相色谱系统的流动相常用甲醇-水系统和乙腈-水系统,用紫外末端波长检测时,宜选用乙腈-水系统。流动相中应尽可能不用缓冲盐,如需用时,应尽可能使用低浓度缓冲盐。用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱时,流动相中有机溶剂一般不能为零,否则易导致柱效下降、色谱系统不稳定。本标准采用流动相为乙腈-水系统。

本标准各品种项下规定的条件除填充剂种类、流动相组分、检测器类型不得改变外,其余如色谱柱

内径与长度、填充剂粒径、流动相流速、流动相组分比例、柱温、进样量、检测器灵敏度等,均可适当改变,以达到系统适用性试验的要求。调整流动相组分比例时,当小比例组分的百分比例 X 小于等于 33% 时,允许改变范围为 $0.7X \sim 1.3X$; 当 X 大于 33% 时,允许改变范围为 $X - 10\% \sim X + 10\%$ 。若需使用小粒径(约 $2 \mu\text{m}$)填充剂,输液泵的性能、进样体积、检测池体积和系统的死体积等必须与之匹配;如有必要,色谱条件也应作适当的调整。当对其测定结果产生争议时,应以品种项下规定的色谱条件的测定结果为准。

A.1.3 系统适用性试验概述

A.1.3.1 适用性试验说明

色谱系统的适用性试验通常包括理论板数、分离度、灵敏度、拖尾因子和重复性等五个参数。按本标准中各品种相关要求对色谱系统进行适用性试验,即用规定的对照品溶液或系统适用性试验溶液在规定的色谱系统进行试验,必要时,可对色谱系统进行适当调整,以符合要求。

A.1.3.2 色谱柱的理论板数(n)

用于评价色谱柱的分离效能。由于不同物质在同一色谱柱上的色谱行为不同,采用理论板数作为衡量色谱柱效能的指标时,应指明测定物质,一般为待测物质或内标物质的理论板数。在规定的色谱条件下,注入供试品溶液或各品种项下规定的内标物质溶液,记录色谱图,量出供试品主成分色谱峰或内标物质色谱峰的保留时间 t_R 和峰宽(W)或半高峰宽($W_{h/2}$),理论板数计算见式(A.1)或(A.2):

$$n = 16 \times (t_R/W)^2 \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

或

$$n = 5.54 \times (t_R/W_{h/2})^2 \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

计算色谱柱的理论板数。 t_R 、 W 、 $W_{h/2}$ 可用时间或长度计(下同),但应取相同单位。

A.1.3.3 分离度(R)

用于评价待测物质与被分离物质之间的分离程度,是衡量色谱系统分离效能的关键指标。可以通过测定待测物质与已知杂质的分离度,也可以通过测定待测物质与某一指标性成分(内标物质或其他难分离物质)的分离度,或将供试、品或对照品用适当的方法降解,通过测定待测物质与某一降解产物的分离度,对色谱系统分离效能进行评价与调整。

无论是定性鉴别还是定量测定,均要求待测物质色谱峰与内标物质色谱峰或特定的杂质对照色谱峰及其他色谱峰之间有较好的分离度。

除另有规定外,待测物质色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度应大于 1.5。分离度的计算见式(A.3)或(A.4):

$$R = 2 \times (t_{R_2} - t_{R_1}) / (W_1 + W_2) \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

或

$$R = 2 \times (t_{R_2} - t_{R_1}) / [1.70 \times (W_{1,h/2} + W_{2,h/2})] \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

t_{R_2} ——相邻两色谱峰中后一峰的保留时间;

t_{R_1} ——相邻两色谱峰中前一峰的保留时间;

W_1 ——相邻两色谱峰中前一峰的峰宽;

W_2 ——相邻两色谱峰中后一峰的峰宽;

$W_{1,h/2}$ ——相邻两色谱峰中前一峰的半高峰宽;

$W_{2,h/2}$ ——相邻两色谱峰中后一峰的半高峰宽。
当对测定结果有异议时,色谱柱的理论板数(n)和分离度(R)均以峰宽(W)的计算结果为准。

A.1.3.4 灵敏度

用于评价色谱系统检测微量物质的能力,通常以信噪比(S/N)来表示。通过测定一系列不同浓度的供试品或对照品溶液来测定信噪比。定量测定时,信噪比应不小于 10;定性测定时,信噪比应不小于 3。系统适用性试验中可以设置灵敏度实验溶液来评价色谱系统的检测能力。

A.1.3.5 拖尾因子(T)

用于评价色谱峰的对称性。拖尾因子计算见式(A.5)为:
$$T = W_{0.05h} / (2d_1) \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:
 $W_{0.05h}$ ——5%峰高处的峰宽;
 d_1 ——峰顶在 5%峰高处横坐标平行线的投影点至峰前沿与此平行线交点的距离。
以峰高作定量参数时, T 值应在 0.95~1.05。

A.1.3.6 重复性

用于评价色谱系统连续进样时响应值的重复性能。采用外标法时,通常取各品种项下的对照品溶液,连续进样 5 次,除另有规定外,其峰面积测量值的相对标准偏差应不大于 5.0%。

A.1.4 测定法

按各品种项下的规定,称(量)取对照品和供试品,配制成溶液,分别取一定量,进样,记录色谱图,测量对照品溶液和供试品溶液中待测物质的峰面积(或峰高),按式(A.6)计算含量:
$$c_X = c_R \times (A_X / A_R) \dots\dots\dots (A.6)$$

式中:
 c_X ——待测物质含量;
 A_X ——供试品的峰面积或峰高;
 A_R ——对照品的峰面积或峰高;
 c_R ——对照品浓度。

由于微量注射器不易精确控制进样量,当采用外标法测定时,以手动进样器定量环或自动进样器进样为宜。

A.1.5 特征指纹图谱检测

A.1.5.1 检测方法

采用高效液相色谱法,结合指纹图谱要求测定。

A.1.5.2 色谱条件及系统适用性实验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为 250 mm,内径为 4.6 mm,粒径为 5 μ m);以含 0.4%乙酸和 20 mmol/L 乙酸铵的水溶液为流动相 A,以乙腈为流动相 B,按表 A.1 中的规定进行梯度洗脱;流速为每分钟 1.0 mL;检测波长为 280 nm;柱温 30 $^{\circ}$ C。

表 A.1 特征指纹图谱梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0~12	98→85	2→15
12~35	85→76	15→24
35~45	76→64	24→36
45~60	64→25	36→75
60~80	25→5	75→95

A.1.5.3 参照物溶液制备

指纹图谱采用夏佛托苷做为实验标准对照品。夏佛托苷别称 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]-8-[(2R, 3R, 4S, 5S)-3, 4, 5-trihydroxyoxan-2-yl]chromen-4-one, CAS 号 52012-29-0, 分子式 C₂₆ H₂₈ O₁₄, 分子量 564.49, 质量纯度≥98% (mixture of isomers), 密度 1.766, 属于联苕类化合物。

取夏佛托苷对照品适量称定, 加甲醇-水(75 : 25)溶解, 制成每 1 mL 含 16.4 μg 对照品的溶液, 摇匀, 即得。

A.1.5.4 供试品溶液制备

取供试品(鲜品干燥后粉碎, 干燥温度应低于 60 ℃)粉末(过三号筛)约 1 g, 称定, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇-水(75 : 25)15 mL, 密塞, 称定重量, 浸渍 20 min, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)20 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液。残渣再加入甲醇-水(75 : 25)15 mL, 重复上述步骤, 合并两次滤液, 旋蒸至溶液剩约 5 mL, 转移至 5 mL 容量瓶。用甲醇-水(75 : 25)定容至 10 mL, 即得。

A.1.5.5 样品检测

分别吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 照高效液相色谱法测定, 即得。

A.1.6 柚皮素含量检测

A.1.6.1 色谱条件与系统适应性试验

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以 0.2% 乙酸溶液为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 按表 A.2 的规定进行梯度洗脱; 检测波长柚皮素为 290 nm, 参比波长 500 nm; 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL/min。理论塔板数按柚皮素峰计算, 应不低于 6 000。

表 A.2 柚皮素梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0~12	85→80	15→20
12~35	80→40	20→60
35~45	40→5	60→95

A.1.6.2 对照品溶液的制备

柚皮素含量检测以柚皮素标准品作为对照品。柚皮素别称 4',5,7-三羟基黄酮,4',5,7-Tri-hydroxyflavanone 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,CAS 号 480-41-1,标定号 GZDD-0063,分子式 $C_{15}H_{12}O_5$,分子量 272.25,质量纯度 $\geq 98\%$ (mixture of isomers),熔点 247℃~254℃。属于二氢黄酮类化合物。

取柚皮素对照品适量,称定,加甲醇-水(75:25)制成每 1 mL 含 50 μg 的混合溶液,即得。

A.1.6.3 供试品溶液的制备

取供试品(鲜品干燥后粉碎,干燥温度应低于 60℃)粉末(过三号筛)约 1 g,称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇-水(75:25)15 mL,密塞,称定重量,浸渍 20 min,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)20 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液。残渣再加入甲醇-水(75:25)15 mL,重复上述步骤,合并两次滤液,旋蒸至溶液剩约 5 mL,转移至 10 mL 容量瓶。用甲醇-水(75:25)定容至 10 mL,即得。

A.1.6.4 样品检测

分别吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,照高效液相色谱法测定,即得。

A.1.7 毛兰素含量检测

A.1.7.1 色谱条件与系统适用性试验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-0.05%磷酸溶液(37:63)为流动相;检测波长为 230 nm。理论板数按毛兰素峰计算应不低于 6 000。

A.1.7.2 对照品溶液的制备

取毛兰素对照品适量,称定,加甲醇制成每 1 mL 含 15 μg 的溶液,即得。

A.1.7.3 供试品溶液的制备

取供试品(鲜品干燥后粉碎,干燥温度应低于 60℃)粉末(过三号筛)约 1 g,称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,密塞,称定重量,浸渍 20 min,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)45 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

A.1.7.4 样品检测

分别吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,按高效液相色谱法测定,即得。

A.2 薄层色谱法

A.2.1 方法说明

薄层色谱法系将供试品溶液点于薄层板上,在展开容器内用展开剂展开,使供试品所含成分分离,所得色谱图与适宜的标准物质按同法所得的色谱图对比,亦可用薄层色谱扫描仪进行扫描,用于鉴别、检查或含量测定。

鉴别按各下文规定方法,制备供试品溶液和对照标准溶液,在同一薄层板上点样、展开与检视,供试品色谱图中所显斑点的位置和颜色(或荧光)应与标准物质色谱图的斑点一致。

A.2.2 仪器与材料

A.2.2.1 薄层板

薄层色谱采用聚酰胺薄层板或硅胶 G 薄层版,保证色谱质量的前提下,可对薄层板进行特别处理和化学改性以适应分离的要求,可用实验室自制的薄层板。自制薄层版固定相颗粒大小一般要求粒径为 10 μm ~40 μm 。玻板应光滑、平整,洗净后不附水珠。

A.2.2.2 点样器

一般采用微升毛细管或手动、半自动、全自动点样器材。

A.2.2.3 展开容器

本标准采用上行展开法,一般可用适合薄层板大小的专用平底或双槽展开缸,展开时须能密闭。

A.2.2.4 显色装置

喷雾显色应使用玻璃喷雾瓶或专用喷雾器,要求用压缩气体使显色剂呈均匀细雾状喷出。

A.2.2.5 检视装置

为装有可见光、254 nm 及 365 nm 紫外光光源及相应的滤光片的暗箱,可附加摄像设备供拍摄图像用。暗箱内光源应有足够的光照度。

A.2.2.6 薄层色谱扫描仪

系指用一定波长的光对薄层板上有吸收的斑点,或经激发后能发射出荧光的斑点,进行扫描,将扫描得到的谱图和积分数据用于物质定性或定量的分析仪器。

A.2.3 操作方法

A.2.3.1 薄层板制备

市售薄层板临用前一般应在 110 $^{\circ}\text{C}$ 活化 30 min。如在存放期间被空气中杂质污染,使用前可用三氯甲烷、甲醇或二者的混合溶剂在展开缸中上行展开预洗,晾干,110 $^{\circ}\text{C}$ 活化,置干燥器中备用。自制薄层板除另有规定外,将 1 份固定相和 3 份水(或加有黏合剂的水溶液,如 0.2%~0.5% 羟甲基纤维素钠水溶液,或为规定浓度的改性剂溶液)在研钵中按同一方向研磨混合,去除表面的气泡后,倒入涂布器中,在玻板上平稳地移动涂布器进行涂布(厚度为 0.2 mm~0.3 mm),取下涂好薄层的玻板,置水平台上于室温下晾干后,在 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘 30 min,随即置于有干燥剂的干燥箱中备用。使用前检查其均匀度,在反射光及透视光下检视,表面应均匀、平整、光滑,并且无麻点、无气泡、无破损及污染。

A.2.3.2 供试品及对照品溶液制备

A.2.3.2.1 铁皮石斛

取本石斛供试品(鲜品干燥后粉碎,干燥温度应低于 60 $^{\circ}\text{C}$)粉末 1 g,加甲醇 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 15 mL 使溶解,用石油醚(60 $^{\circ}\text{C}$ ~90 $^{\circ}\text{C}$)洗涤 2 次,每次 20 mL,弃去石油醚液,水液用乙酸乙酯洗涤 2 次,每次 20 mL,弃去洗液,用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取铁皮石斛对照品 1 g,同法制成对照品溶液。以溶剂甲醇作为空白对照。

A.2.3.2.2 金钗石斛

取本石斛供试品(鲜品干燥后粉碎,干燥温度应低于 60 ℃)粉末 1 g,加甲醇 10 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取石斛碱对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。以溶剂甲醇作为空白对照。

A.2.3.2.3 鼓槌石斛

取本石斛供试品(鲜品干燥后粉碎,干燥温度应低于 60 ℃)粉末 1 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,密塞,称定重量,浸渍 20 min,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)45 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,取上述续滤液 25 mL,蒸干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取毛兰素对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液,作为对照品溶液。以溶剂甲醇作为空白对照。

A.2.3.2.4 流苏石斛

取石斛供试品(鲜品干燥后粉碎,干燥温度应低于 60 ℃)粉末 0.5 g,加甲醇 25 mL,超声处理 45 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取石斛酚对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液,作为对照品溶液。以溶剂甲醇作为空白对照。

A.2.3.3 点样

在洁净干燥的环境中,用专用毛细管或配合相应的半自动、自动点样器械点样于薄层板上。一般基线距底边 10 mm~15 mm,点样时一个薄层板上可同时点多个供试品并同时包括对照品、供试品和空白对照,接触点样时注意勿损伤薄层表面。不同供试品间距离可视斑点扩散情况以相邻斑点互不干扰为宜,一般不少于 8 mm。不同种供试品点样量按表 A.3 进行。

表 A.3 薄层色谱点样

石斛种类	薄板类型	点样量 μL			备注
		对照品	供试品	空白对照	
铁皮石斛	聚酰胺薄膜	2~5	2~5	2~5	点样时使成条状
金钗石斛	高效硅胶 G 薄层板	20	5	5	无
鼓槌石斛	高效硅胶 G 薄层板	5~10	5	5	无
流苏石斛	高效硅胶 G 薄层板	5~10	5	5	无

A.2.3.4 展开

将点好供试品的薄层板放统入展开缸中,浸入展开剂的深度为距原点 5 mm,密闭。上行展开 8 cm~15 cm。溶剂前沿达到规定的展距,取出薄层板,晾干,待检测。展开前需在展开缸中加入适量展开剂,密闭,保持 15 cm~30 min 以达到溶剂蒸汽预平衡。溶剂蒸汽预平衡后,应迅速放入载有供试品的薄层板,立即密闭,展开。如需使展开缸达到溶剂蒸汽饱和的状态,则须在展开缸的内壁贴与展开缸高、宽同样大小的滤纸,一端浸入展开剂中,密闭一定时间,使溶剂蒸汽达到饱和再如法展开。必要时,可进行二次展开,进行第二次展开前,应使薄层板残留的展开剂完全挥干。

铁皮石斛以乙醇-丁酮-乙酰丙酮-水(15 : 15 : 5 : 85)为展开剂;金钗石斛以石油醚(60 ℃~90 ℃)-

丙酮(7：3)为展开剂；鼓槌石斛和流苏石斛以石油醚(60℃～90℃)-乙酸乙酯(3：2)为展开剂。

A.2.3.5 显色与检视

取出展开完毕的薄层板，干燥，按喷雾显色法，喷以相应显色剂，显色后检视。供试品与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。显色及检视按表 A.4 进行。

表 A.4 薄层色谱显色及检视

石斛种类	干燥	显色剂	显色	检视
铁皮石斛	烘干	三氯化铝试液	105℃烘约 3 min	紫外光灯(365 nm)下检视
金钗石斛	晾干	碘化铋钾试液	室温条件下直接显色	直接检视
鼓槌石斛	晾干	10%硫酸乙醇溶液	105℃加热至斑点显色清晰	直接检视
流苏石斛	晾干	10%硫酸乙醇溶液	105℃加热至斑点显色清晰	直接检视

A.3 显微鉴别法

A.3.1 方法说明

显微鉴别法系指用显微镜对植物样品切片、粉末、解离组织或表面制片及含该植物粉末的制品中植物的组织、细胞或内含物等特征进行鉴别的一种方法。鉴别时选择具有代表性的供试品，根据各品种鉴别项的规定制片。制品根据不同类型适当处理后制片。

A.3.2 显微制片

A.3.2.1 横切片制片

取供试品欲观察部位，经软化处理后，用徒手或滑走切片法，切成 10 μm～2 μm 的薄片，必要时可包埋后切片。选取平整的薄片置载玻片上，根据观察对象不同，滴加甘油醋酸试液、水合氯醛试液或其他试液 1 滴～2 滴，盖上盖玻片。必要时滴加水合氯醛试液后，在酒精灯上加热透化，并滴加甘油乙醇试液或稀甘油，盖上盖玻片。

A.3.2.2 粉末制片

供试品粉末过四或五号筛，挑取少许置载玻片上，滴加甘油醋酸试液、水合氯醛试液或其他适宜的试液，盖上盖玻片。必要时，按横切片制片法加热透化。

A.4 气相色谱法

A.4.1 方法说明

气相色谱法系采用气体为流动相(载气)流经装有填充剂的色谱柱进行分离测定的色谱方法。物质或其衍生物气化后，被载气带入色谱柱进行分离，各组分先后进扩检测器，用数据处理系统记录色谱信号。

A.4.2 仪器

A.4.2.1 气相色谱仪

所用的仪器为气相色谱仪，由载气源、进样部分、色谱柱、柱温箱、检测器和数据处理系统等组成。

规定的色谱条件,除检测器种类、固定液品种及特殊指定的色谱柱材料不得改变外,其余如色谱柱内径、长度、载体牌号、粒度、固定液涂布浓度、载气流速、柱温、进样量、检测器的灵敏度等,均可适当改变,以适应具体品种并符合系统适用性试验的要求。一般色谱图于 30 min 内采集完毕。

A.4.2.2 载气源

气相色谱法的流动相为气体,称为载气,氮、氮和氢可用作载气,可由高压钢瓶或高纯度气体发生器提供,经过适当的减压装置,以一定的流速经过进样器和色谱柱;根据供试品的性质和检测器种类选择载气,常用载气为氮气。

A.4.2.3 进样部分

进样方式一般可采用溶液直接进样、自动进样或顶空进样。溶液直接进样采用微量注射器、微量进样阀或有分流装置的气化室进样;采用溶液直接进样或自动进样时,进样口温度应高于柱温 30℃~50℃;进样量一般不超过数微升;柱径越细,进样量应越少,采用毛细管柱时,一般应分流以免过载。顶空进样适用于固体和液体供试品中挥发性组分的分离和测定。将固态或液态的供试品制成供试液后,置于密闭小瓶中,在恒温控制的加热室中加热至供试品中挥发性组分在液态和气态达到平衡后,由进样器自动吸取一定体积的顶空气注入色谱柱中。

A.4.2.4 色谱柱

色谱柱为填充柱或毛细管柱。填充柱的材质为不锈钢或玻璃,内径为 2 mm~4 mm,柱长为 2 m~4 m,内装吸附剂、高分子多孔小球或涂渍固定液的载体,粒径为 0.18 mm~0.25 mm、0.15 mm~0.18 mm 或 0.125 mm~0.15 mm。常用载体为经酸洗并硅烷化处理的硅藻土或高分子多孔小球,常用固定液有甲基聚硅氧烷、聚乙二醇等。毛细管柱的材质为玻璃或石英,内壁或载体经涂渍或交联固定液,内径一般为 0.25 mm、0.32 mm 或 0.53 mm,柱长 5 m~60 m,固定液膜厚 0.1 μm~5.0 μm,常用的固定液有甲基聚硅氧烷、不同比例组成的苯基甲基聚硅氧烷、聚乙二醇等。

新填充柱和毛细管柱在使用前需老化处理,以除去残留溶剂及易流失的物质,色谱柱如长期未用,使用前应老化处理,使基线稳定。

A.4.2.5 柱温箱

由于柱温箱温度的波动会影响色谱分析结果的重现性,因此柱温箱控温精度应在±1℃,且温度波动小于每小时 0.1℃。温度控制系统分为恒温 and 程序升温两种。

A.4.2.6 检测器

一般使用火焰离子化检测器,用氢气作为燃气,空气作为助燃气。在使用火焰离子化检测器时,检测器温度一般应高于柱温,并不应低于 150℃,以免水汽凝结,通常为 250℃~350℃。

A.4.2.7 数据处理系统

可分为记录仪、积分仪以及计算机工作站等。

A.4.3 系统适用性试验

除另有规定外,均按高效液相色谱法(附录 A.1.3)项下的规定进行。

A.4.4 测定法—内标法

按本文件对应品种项下的规定,称取对照品和内标物质,分别配成溶液,各量取适量,混合配成校正

因子测定用的对照溶液。取一定量进样,记录色谱图。测量对照品和内标物质的峰面积或峰高,按式(A.7)计算校正因子:

$$f = (A_S/c_S)/(A_R/c_R) \quad \dots\dots\dots (A.7)$$

式中:

f ——校正因子;

A_S ——内标物质的峰面积或峰高;

A_R ——对照品的峰面积或峰高;

c_S ——内标物质的浓度;

c_R ——对照品浓度。

再取对应品种项下含有内标物质的供试品溶液,进样,记录色谱图,测量供试品中待测成分和内标物质的峰面积或峰高,按式(A.8)计算含量:

$$c_X = f \times A_X/(A'_S/c'_S) \quad \dots\dots\dots (A.8)$$

式中:

c_X ——待测成分含量;

A_X ——供试品的峰面积或峰高;

A'_S ——内标物质的峰面积或峰高;

c'_S ——内标物质的浓度;

f ——内标法校正因子。

采用内标法,可避免因供试品前处理及进样体积误差对测定结果的影响。

A.4.5 石斛碱含量检测

A.4.5.1 色谱条件与系统适用性试验

DB-1 毛细管柱(1.0%二甲基聚硅氧烷为固定相)(柱长为 30 m,内径为 0.25 mm,膜厚度为 0.25 μm);程序升温:初始温度为 80 $^{\circ}\text{C}$,以每分钟 10 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$,检测器温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按石斛碱峰计算应不低于 10 000。

A.4.5.2 校正因子测定

取萘对照品适量,称定,加甲醇制成每 1 mL 含 25 μg 的溶液,作为内标溶液。取石斛碱对照品适量,称定,加甲醇制成每 1 mL 含 50 μg 的溶液,作为对照品溶液。量取对照品溶液 2 mL,置 5 mL 量瓶中,加入内标溶液 1 mL,加甲醇至刻度,摇匀,吸取 1 μL ,注入气相色谱仪,计算校正因子。

A.4.5.3 供试品溶液制备及检测

取供试品(鲜品干燥后粉碎)粉末(过三号筛)约 0.25 g,称定,置圆底烧瓶中,加入 0.05%甲酸的甲醇溶液 25 mL,称定重量,加热回流 3 h,放冷,再称定重量,用 0.05%甲酸的甲醇溶液补足减失的重量,摇匀,滤过。量取续滤液 2 mL,置 5 mL 量瓶中,加入内标溶液 1 mL,加甲醇至刻度,摇匀,吸取 1 μL ,注入气相色谱仪,按气相色谱法测定,即得。

A.5 水分测定法

取供试品 2 g~5 g,平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中,厚度不超过 0.5 cm,疏松供试品不超过 1 cm,称定,开启瓶盖在 100 $^{\circ}\text{C}$ ~105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 300 min,将瓶盖盖好,移置干燥器中,放冷 30 min,称定,再在上述温度干燥 60 min,放冷,称重,至连续两次称重的差异不超过 5 mg 为止。根据减失的重量,计

算供试品中含水量(%)。

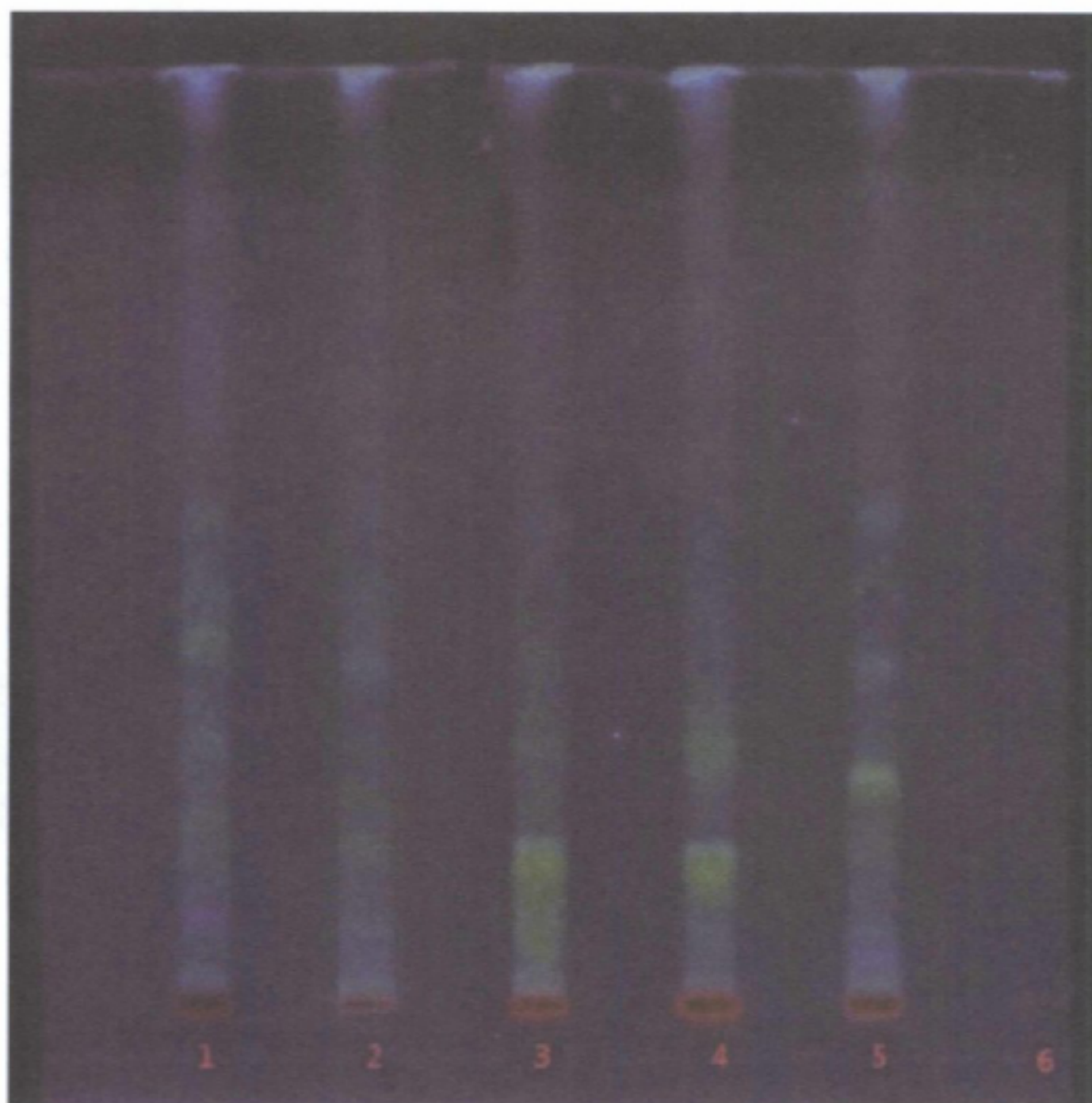
A.6 灰分测定法

将供试品粉碎,使能通过二号筛,混合均匀后,取供试品 2 g~3 g,置炽灼至恒重的坩埚中,称定重量(准确至 0.01 g),缓缓炽热,注意避免燃烧,至完全炭化时,逐渐升高温度至 500 ℃~600 ℃,使完全灰化并至恒重。根据残渣重量,计算供试品中总灰分的含量(%)。

如供试品不易灰化,可将坩埚放冷,加热水或 10%硝酸铵溶液 2 mL,使残渣湿润,然后置水浴上蒸干,残渣照前法炽灼,至坩埚内容物完全灰化。

附 录 B
(资料性附录)
石斛薄层色谱参考图谱

铁皮石斛薄层色谱参考图谱见图 B.1。

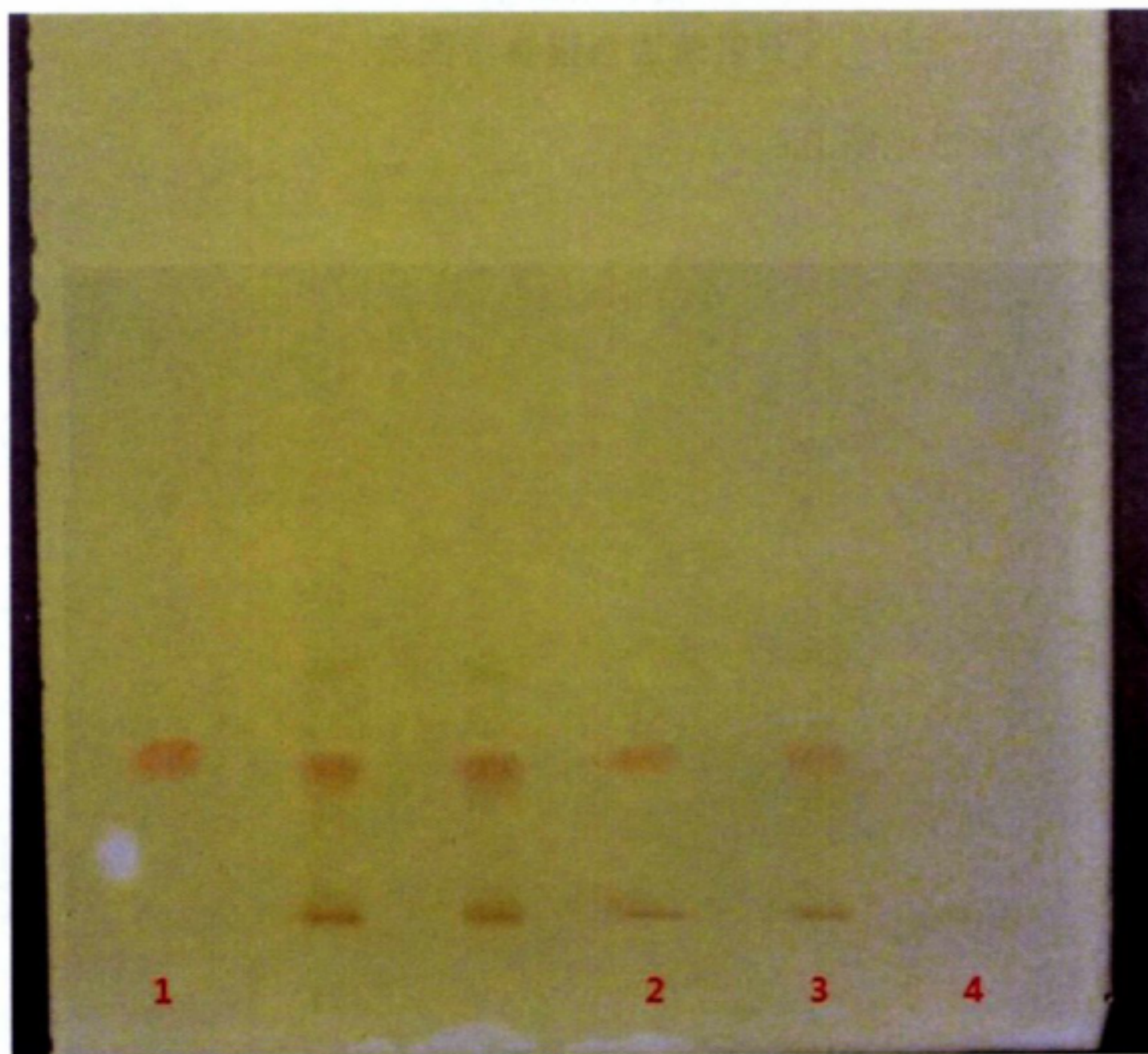


说明：

- 1——铁皮石斛对照品(中检所)；
- 2——样品批号：XGQT201503096；
- 3——样品批号：XGQT201502083；
- 4——样品批号：XGQT201503091；
- 5——样品批号：XGQT201502082；
- 6——阴性空白对照。

图 B.1 铁皮石斛薄层色谱参考图谱

金钗石斛薄层色谱参考图谱见图 B.2。



说明：

1——石斛碱对照品(中检所)；

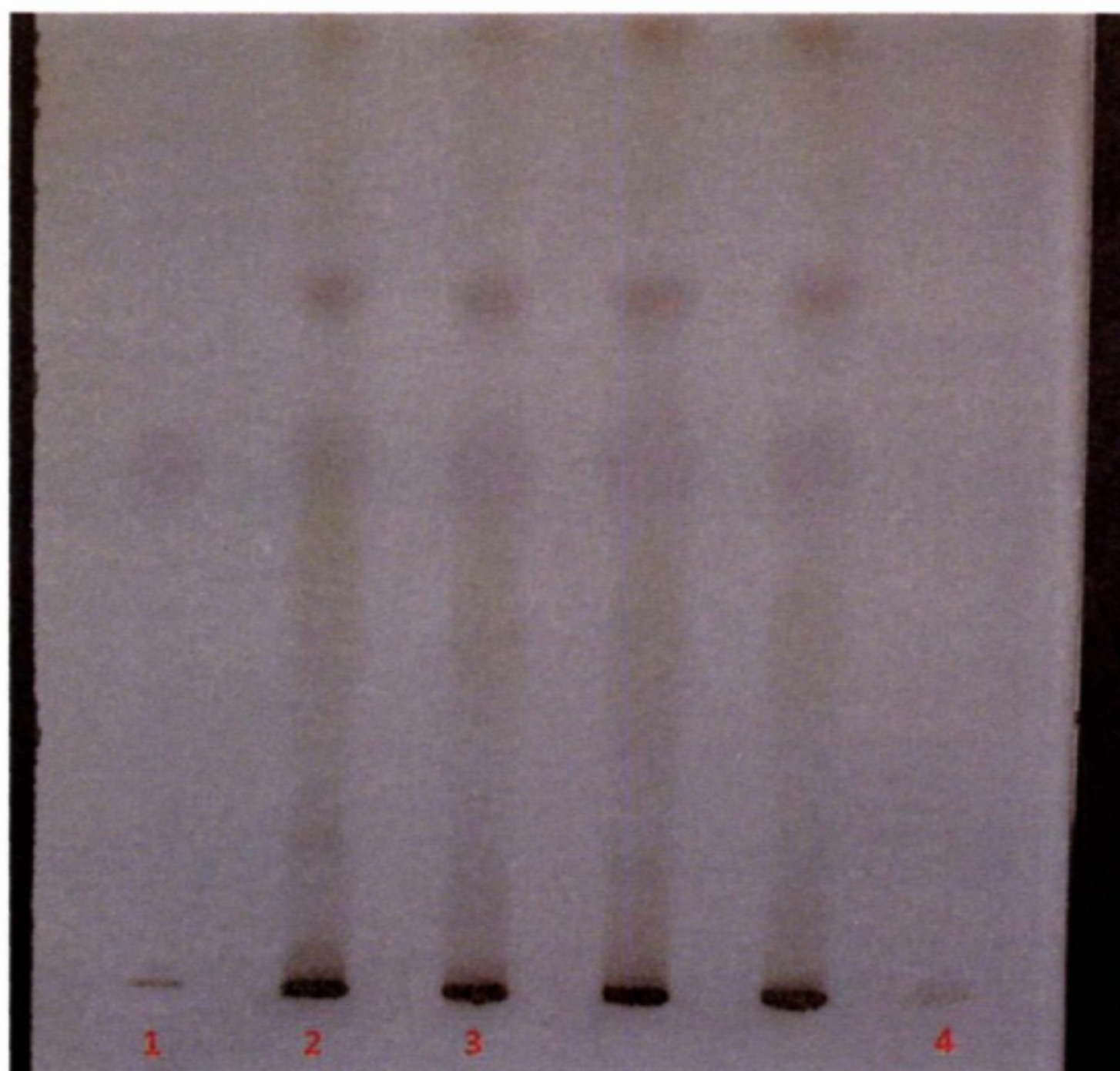
2——样品批号:SH0830084；

3——样品批号:SH0830083；

4——阴性空白对照。

图 B.2 金钗石斛薄层色谱参考图谱

鼓槌石斛薄层色谱参考图谱见图 B.3。



说明：

1——毛兰素对照品(中检所)；

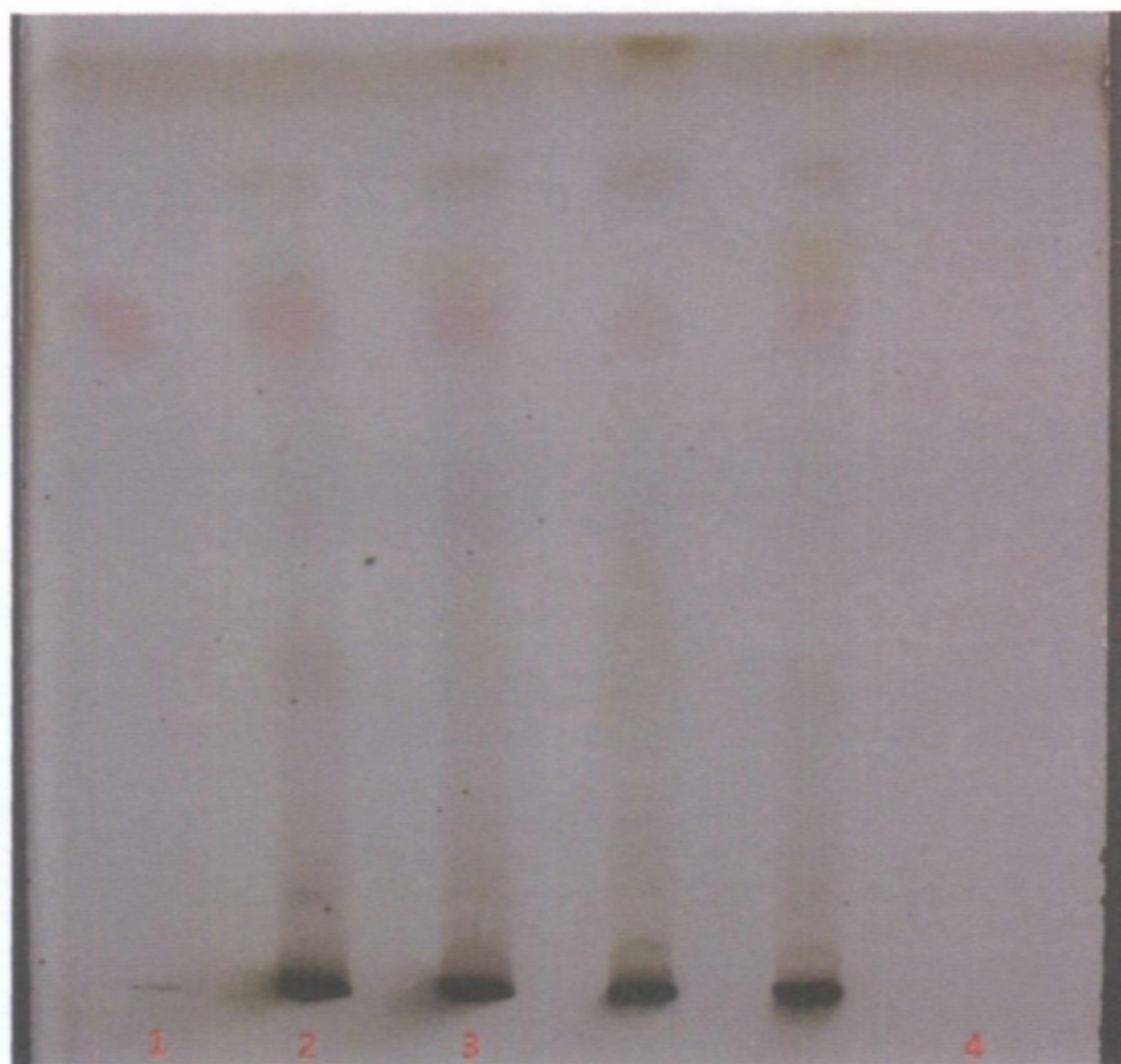
2——样品批号：SH0808024；

3——样品批号：SH0816047；

4——阴性空白对照。

图 B.3 鼓槌石斛薄层色谱参考图谱

流苏石斛薄层色谱参考图谱见图 B.4。



说明：

- 1——石斛酚对照品(中检所)；
- 2——样品批号：GZP20150731；
- 3——样品批号：GYP20150201；
- 4——阴性空白对照。

图 B.4 流苏石斛薄层色谱参考图谱

附 录 C
(资料性附录)
石斛分类描述

C.1 铁皮石斛(*Dendrobium catenatum* Lindley, *Dendrobium officinale* Kimura & Migo)

又名黑节草。茎直立,少匍匐或斜立,肉质,圆柱形,长 9 cm~35 cm,直径 0.2 cm~0.4 cm,不分枝,具多节,节间长 1.3 cm~1.7 cm;叶基部下延为抱茎的鞘,边缘和中肋常带淡紫色,叶鞘常具紫斑,老时其上缘与茎分离而张开,并且与节留下一个环状铁青色的间隙。总状花序常从落叶的老茎上部发出,具 2 朵~3 朵花;花序柄长 0.5 cm~1.0 cm,基部具 2 枚~3 枚短鞘;花序轴回折状弯曲,长 2 cm~4 cm;花苞片干膜质,浅白色,卵形,长 0.5 cm~0.7 cm,先端稍钝;花梗和子房长 2 cm~2.5 cm;萼片和花瓣黄绿色,近相似,长圆状披针形,长约 1.8 cm,宽 0.4 cm~0.5 cm,先端锐尖,具 5 条脉;侧萼片基部较宽阔,宽约 1 cm;萼囊圆锥形,长约 0.5 cm,末端圆形;唇瓣白色,浅绿色或浅黄绿色,基部具一个绿色或黄色的胼胝体,卵状披针形,比萼片稍短,中部反折,先端急尖,不裂或不明显 3 裂,中部以下两侧具紫红色条纹,边缘多少波状;唇瓣密布细乳突状的毛,并且在中部以上具 1 个紫红色斑块,或 2 个分离的紫色斑块;蕊柱黄绿色,长约 0.3 cm,先端两侧各具 1 个紫点;蕊柱足黄绿色带紫红色条纹,疏生毛;药帽白色,长卵状三角形,长约 0.2 cm~0.3 cm,顶端近锐尖并且 2 裂。

本种着生于疏林中树干上或岩石上。我国分布于安徽、浙江、福建、江西、湖南、广东、广西、四川、云南。

C.2 金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindley)

茎直立,肉质状肥厚,稍扁的圆柱形,长 10 cm~40 cm,直径可达 1.3 cm,上部多少回折状弯曲,基部明显收狭,不分枝,具多节,节有时稍肿大;节间多少呈倒圆锥形,长 2 cm~4 cm,干后金黄色。叶基部具抱茎的鞘。总状花序常从具叶或落叶的老茎中部以上发出,长 2 cm~4 cm,具 1 朵~4 朵花;花序柄长 0.5 cm~1.5 cm,基部具数枚筒状鞘;花苞片膜质,卵状披针形,长 0.6 cm~1.3 cm,先端渐尖;花梗和子房淡紫色,长 0.3 cm~0.6 cm;花大,白色带淡紫色先端,有时全体淡紫红色,或除唇瓣上具一个紫红色斑块外其余均为白色;中萼片,长圆形,长 2.5 cm~3.5 cm,宽 1 cm~1.4 cm,先端钝,具 5 条脉;侧萼片与中萼片相似,先端锐尖,基部歪斜,具 5 条脉;萼囊圆锥形,长 0.6 cm;花瓣多少斜宽卵形,长 2.5 cm~3.5 cm,宽 1.8 cm~2.5 cm,先端钝,基部具短爪,全缘,具 3 条主脉和许多支脉;唇瓣宽卵形,长 2.5 cm~3.5 cm,宽 2.2 cm~3.2 cm,先端钝,基部两侧具紫红色条纹并且收狭为短爪,中部以下两侧围抱蕊柱,边缘具短的睫毛,两面密布短绒毛;唇瓣中央具 1 个紫红色大斑块;蕊柱绿色,长 0.5 cm,基部稍扩大,具绿色的蕊柱足;药帽紫红色,圆锥形,密布细乳突,前端边缘具不整齐的尖齿。

我国产于湖北、广西、贵州、海南、云南和西藏东南部。

C.3 鼓槌石斛(*Dendrobium chrysotoxum* Lindley)

茎直立,肉质,纺锤形,长 6 cm~30 cm,中部直径 1.5 cm~5 cm,具 2 节~5 节间,具多数圆钝的条棱,干后金黄色,近顶端具 2 枚~5 枚叶;叶不下延为抱茎的鞘。总状花序从近茎顶端发出。斜出或稍下垂,长达 20 cm;花序轴粗壮,疏生多数花;花序柄基部具 4 枚~5 枚鞘;花苞片小,膜质,卵状披针形,长 0.2 cm~0.3 cm,先端急尖;花梗和子房黄色,长达 5 cm;花质地厚,金黄色,稍带香气;中萼片长圆

形,长 1.2 cm~2 cm,中部宽 0.5 cm~0.9 cm,先端稍钝,具 7 条脉;侧萼片与中萼片近等大;萼囊近球形,宽约 0.4 cm;花瓣倒卵形,等长于中萼片,宽约为萼片的 2 倍,先端近圆形,具约 10 条脉;唇瓣颜色比萼片和花瓣深,近肾状圆形,长约 2 cm,宽 2.3 cm,先端浅 2 裂,基部两侧多少具红色条纹,边缘波状,上面密被短绒毛;唇瓣通常呈倒 V 型隆起,有时具 U 型的栗色斑块;蕊柱长约 0.5 cm;药帽淡黄色,尖塔状。

我国产于云南的南部至西南部。

C.4 流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook.)

茎粗壮,斜立或下垂,质地硬,圆柱形或有时基部上方稍呈纺锤形,长 50 cm~85 cm,直径 0.8 cm~1.5 cm,不分枝,具多节,干后淡黄色或淡黄褐色,节间长 3.5 cm~4.8 cm,具多数纵槽;叶基部具紧抱于茎的革质鞘。总状花序长 5 cm~15 cm,疏生 6 朵~12 朵花;花序轴较细,多少弯曲;花序柄长 2 cm~4 cm,基部被数枚套叠的鞘;鞘革质,筒状,位于基部的最短,长约 0.3 cm,顶端的最长,达 1 cm;花苞片膜质,卵状三角形,长 0.3 cm~0.5 cm,先端锐尖;花梗和子房浅绿色,长 2.5 cm~3 cm;花金黄色,质地薄,开展,稍具香气;中萼片长圆形,长 1.3 cm~1.8 cm,宽 0.6 cm~0.8 cm,先端钝,边缘全缘,具 5 条脉;侧萼片卵状披针形,与中萼片等长而稍狭窄,先端钝,基部歪斜,全缘,具 5 条脉;萼囊近圆形,长约 0.3 cm;花瓣长圆状椭圆形,长 1.2 cm~1.9 cm,宽 0.7 cm~1.0 cm,先端钝,边缘微啮蚀状,具 5 条脉;唇瓣比萼片和花瓣的颜色深,近圆形,长 1.5 cm~2 cm,基部两侧具紫红色条纹并且收狭为长约 0.3 cm 的爪,边缘具复流苏,唇瓣具一个新月形横生的深紫色斑块,上面密布短绒毛;蕊柱黄色,长约 0.2 cm,具长约 0.4 cm 的蕊柱足;药帽黄色,圆锥形,光滑,前端边缘具细齿。

我国产于广西、贵州、云南。

C.5 齿瓣石斛(*Dendrobium devonianum* Paxton)

茎下垂,稍肉质,细圆柱形,长 50 cm~70 cm,直径 0.3 cm~0.5 cm,不分枝,具多节,节间长 2.5 cm~4 cm,干后常淡褐色带黑色。叶基部具抱茎的鞘,叶鞘常具紫红色斑点,干后纸质。总状花序常数个,生长在落叶的老茎上,每个花序具 1 朵~2 朵花;花序柄绿色,长约 0.4 cm,基部具 2 枚~3 枚干膜质的鞘;花苞片膜质,卵形,长约 0.4 cm,先端近锐尖;花梗和子房绿色带褐色,长 2 cm~2.5 cm;花质地薄,开展,具香气;中萼片白色,上部具紫红色晕,卵状披针形,长约 2.5 cm,宽 0.9 cm,先端急尖,具 5 条紫色脉;侧萼片与中萼片同色,相似并等大,但基部稍歪斜;萼囊近球形,长约 0.4 cm;花瓣与萼片同色,相似并大小相等,先端近急尖,基部收狭为短爪,边缘具短流苏,具 3 条脉,两侧的的主脉多分枝;唇瓣白色,前部紫红色,中部以下两侧具紫红色条纹,近圆形,长 3 cm 左右,基部收狭为短爪,边缘具复式流苏,上面密布短毛;唇瓣两侧各具一个黄色斑块;蕊柱白色,长约 0.3 cm,前面两侧具紫红色条纹;药帽白色,近圆锥形,顶端稍凹下,密布细乳突,前端边缘具不整齐的齿。

本种在云南又称为紫皮石斛,即干后茎颜色为紫色。我国产广西西北部、贵州西南部、云南东南部至西部,西藏东南部等地。

C.6 兜唇石斛[*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C.Fischer]

又名天宫石斛。茎下垂,肉质,细圆柱形,长 30 cm~60 cm,直径 0.4 cm~0.7 cm,不分枝,具多节,节间长 2 cm~3.5 cm;叶基部具鞘,叶鞘纸质,干后浅白色,鞘口呈杯状张开。总状花序几乎无花序轴,每 1 朵~3 朵为一束,从落叶的老茎或具叶的老茎上部发出;花序柄长约 0.2 cm~0.5 cm,基部被 3 枚~4 枚鞘;鞘膜质,长 0.2 cm~0.3 cm;花苞片浅白色,膜质,卵形,长约 0.3 cm,先端急尖;花梗和子房暗褐

色带绿色,长 2 cm~2.5 cm;花开展,下垂;萼片和花瓣白色带淡紫红色或浅紫红色的上部或有时全体紫红色;中萼片近披针形,长约 2.3 cm,宽 0.5 cm~0.6 cm,先端近锐尖,具 5 条脉;侧萼片与中萼片相似,等大,先端急尖,基部歪斜;萼囊狭圆锥形,长约 0.5 cm,末端钝;花瓣椭圆形,长 2.3 cm,宽 0.9 cm~1.0 cm,先端钝,全缘,具 5 条脉;唇瓣宽倒卵形或近圆形,长、宽各约 2.5 cm,两侧向上围抱蕊柱而形成喇叭状,基部两侧具紫红色条纹并且收狭成为短爪,中部以上部分为淡黄色,中部以下部分浅粉红色,边缘具部整齐的细齿,两面密布短柔毛;蕊柱白色,其前面两侧具红色条纹,长约 0.3 cm;药帽白色,近圆锥形,顶端稍凹缺,密布细乳突状毛,前端边缘宽凹缺。蒴果狭倒卵形,长约 4 cm,直径 1.2 cm。

我国产于广西西北部、贵州西南部、云南东南部至西部。

C.7 叠鞘石斛(*Dendrobium denneanum* Kerr)

茎纤细,圆柱形,长 25 cm~35 cm,直径 0.4 cm~0.7 cm,不分枝,具多节,节间长 2.5 cm~4 cm,干后常淡黄色或黄褐色。叶基部具抱茎的鞘。总状花序侧生于二年生落叶老茎的上端,长约 1 cm,通常疏生 2 朵~7 朵花;花序柄近直立,长约 0.5 cm,基部套叠 3 枚~4 枚鞘;鞘纸质,浅白色,杯状或筒状,基部鞘较短,向上逐渐变长,长 0.5 cm~2.0 cm;花苞片膜质,浅白色,舟状,长约 1.2 cm,宽约 0.5 cm,先端钝;花梗和子房长约 3 cm;花黄色或橙黄色,开展;中萼片长圆状椭圆形,长 2.3 cm~2.5 cm,宽 1.1 cm~1.4 cm,先端钝,全缘,具 5 条脉;侧萼片长圆形,等长于中萼片而稍狭窄,先端钝,基部歪斜,具 5 条脉;萼囊圆锥形,长约 0.6 cm;花瓣椭圆形或宽椭圆状卵形,长 2.4 cm~2.6 cm,宽 1.3 cm~1.7 cm,先端钝,全缘,具 3 条脉,侧边的主脉具分支;唇瓣近圆形,长 2.5 cm,宽约 2.2 cm,基部具长约 0.3 cm 的爪并且其内面有时具数条红色条纹,中部以下两侧围抱蕊柱,上面密布绒毛,边缘具不整齐的细齿;唇瓣具一大紫色斑块;蕊柱长约 0.4 cm,具长约 0.3 cm 的蕊柱足;药帽狭圆锥形,长约 0.4 cm,光滑,前端近截形。

我国产于海南、广西、贵州、云南。

C.8 美花石斛(*Dendrobium loddigesii* Rolfe)

又名环草石斛、蟠龙石斛。茎柔弱,常下垂,细圆柱形,长 10 cm~30 cm,直径 0.2 cm~0.4 cm,有时分枝,具多节,节间长 1.5 cm~2 cm,干后金黄色;叶基部具鞘,叶鞘膜质,干后鞘口常张开。总状花序侧生于具叶的老茎上部,具 1 朵~2 朵花;花序柄长 0.2 cm~0.3 cm,基部具 1 枚~2 枚短的、杯状膜质鞘;花白色或紫红色;花苞片膜质,卵形,长 0.2 cm,先端钝;花梗和子房淡绿色,长 2 cm~3 cm;中萼片卵状长圆形,长 1.7 cm~2 cm,宽 0.6 cm~0.7 cm,先端锐尖,具 5 条脉;侧萼片披针形,长 1.7 cm~2 cm,宽 0.6 cm~0.7 cm,先端急尖,具 5 条脉,基部歪斜;萼囊近球形,长约 0.5 cm;花瓣椭圆形,与中萼片等长,宽 0.8 cm~0.9 cm,先端稍钝,全缘,具 3 条~5 条脉;唇瓣近圆形,直径 1.7 cm~2 cm,上面中央金黄色,周边淡紫红色,稍凹,边缘具短流苏,两面密布短柔毛;蕊柱白色,正面两侧具红色条纹,长约 0.4 cm;药帽白色,近圆锥形,密布细乳突状毛,前端边缘具不整齐的齿。

我国产于广东、广西、贵州和云南。

C.9 霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang & S.J.Cheng)

又名霍石斛。茎直立,肉质,密集着生,长 3 cm~9 cm,自基部向上明显变细,基部上方直径 0.3 cm~1.0 cm,不分枝,具 3 节~7 节,节间长 0.3 cm~0.8 cm,淡黄绿色,有时带淡紫红色斑点,干后淡黄色。叶基部具抱茎的鞘,叶鞘膜质,宿存。总状花序 1 个~3 个,从落叶的老茎上部发出,具 1 朵~2 朵花;花序柄长 0.2 cm~0.3 cm,基部具 1 枚~2 枚鞘;鞘纸质,卵状披针形,长 0.3 cm~0.4 cm,先端锐尖;花苞片浅白色带栗色,卵形,长 0.3 cm~0.4 cm,先端锐尖;花梗和子房浅黄绿色,长 2 cm~2.7 cm;花淡黄绿

色,开展;中萼片卵状披针形,长约 1.2 cm~1.4 cm,宽 0.4 cm~0.5 cm,先端钝,具 5 条脉;侧萼片镰状披针形,长 1.2 cm~1.4 cm,宽 0.5 cm~0.7 cm,先端钝,基部歪斜;萼囊近矩形,长 0.5 cm~0.7 cm,末端近圆形;花瓣卵状长圆形,通常长 1.2 cm~1.5 cm,宽 0.6 cm~0.7 cm,先端钝,具 5 条脉;唇瓣近菱形,长和宽约相等,1 cm~1.5 cm,基部楔形并具一个胼胝体,上部稍 3 裂,两侧裂片之间密生短毛,近基部处密生长白毛;中裂片半圆状三角形,先端近钝尖,基部密生长白毛并且具一个黄色横向椭圆形的斑块;蕊柱淡绿色,长约 0.4 cm,具长 0.7 cm 的蕊柱足;蕊柱足基部黄色,密生长白毛,两侧偶具齿突;药帽绿白色,近半球形,长约 0.15 cm,顶端微凹。

我国产于河南西南部、安徽西南部、湖北东北部和江西西北部。

附 录 D
(资料性附录)
石斛毒副残留检测

D.1 毒副残留量测定**D.1.1 有机氯类农药残留量测定****D.1.1.1 色谱条件与系统适用性试验**

照气相色谱法(见附录 A.1.4),以(14%-氰丙基-苯基)甲基聚硅氧烷或(5%苯基)甲基聚硅氧烷为固定液的弹性石英毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm),⁶³Ni-ECD 电子捕获检测器。进样口温度 230 ℃,检测器温度 300 ℃,不分流进样。程序升温:初始 100 ℃,每分钟 10 ℃升至 220 ℃,每分钟 8 ℃升至 250 ℃,保持 10 min。理论板数按 α-BHC 峰计算应不低于 1×10^6 ,两个相邻色谱峰的分离度应大于 1.5。

D.1.1.2 对照品储备液的制备

称取六六六(BHC)(α-BHC,β-BHC,γ-BHC,δ-BHC)、滴滴涕(DDT)(*p*,*p'*-DDE,*p*,*p'*-DDD,*o*,*p'*-DDT,*p*,*p'*-DDT)及五氯硝基苯(PCNB)农药对照品适量,用石油醚(60 ℃~90 ℃)分别制成每 1 mL 约含 4 μL~5 μL 的溶液,即得。混合对照品贮备溶液的制备量取上述各对照品贮备液 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中,用石油醚(60 ℃~90 ℃)稀释至刻度,摇匀,即得。

D.1.1.3 混合对照品储备液的制备

量取上述各对照品储备液 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中,用石油醚(60 ℃~90 ℃)稀释至刻度,摇匀,即得。

D.1.1.4 混合对照品溶液的制备

量取上述混合对照品贮备液,用石油醚(60 ℃~90 ℃)制成每 1 L 分别含 0 μg、1 μg、5 μg、10 μg、50 μg、100 μg、250 μg 的溶液,即得。

D.1.1.5 供试品溶液的制备

取供试品(鲜品干燥后粉碎)粉末(过三号筛)约 2 g,称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加水 20 mL 浸泡过夜,加丙酮 40 mL,称定重量,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用丙酮补足减失的重量,再加氯化钠约 6 g,加二氯甲烷 30 mL,称定重量,超声 15 min,再称定重量,用二氯甲烷补足减失的重量,静置(使分层),将有机相迅速移入装有适量无水硫酸钠的 100 mL 具塞锥形瓶中,放置 4 h。量取 35 mL,于 40 ℃水浴上减压浓缩至近干,加少量石油醚(60 ℃~90 ℃)如前反复操作至二氯甲烷及丙酮除净,用石油醚(60 ℃~90 ℃)溶解并转移至 10 mL 具塞刻度离心管中,加石油醚(60 ℃~90 ℃)稀释至 5 mL,小心加入硫酸 1 mL,振摇 1 min,离心(3 000 rpm)10 min,量取上清液 2 mL,置具刻度的浓缩瓶中,连接旋转蒸发器,40 ℃下(或用氮气)将溶液浓缩至适量,稀释至 1 mL,即得。

D.1.1.6 测定法

分别吸取供试品溶液和与之相对应浓度的混合对照品溶液各 1 μL,注入气相色谱仪,按外标法计

算供试品中六六六(总 BHC)、滴滴涕(总 DDT)、五氯硝基苯(PCNB)残留量。

D.1.1.7 有机氯类农药参考限量

有机氯类农药残留限量见表 D.1。

表 D.1 有机氯类农药残留限量

检测项目		含量要求(以干品计) mg/kg
有机氯类	六六六(总 BHC)	≤0.2
	滴滴涕(总 DDT)	≤0.2
	五氯硝基苯(PCNB)	≤0.1

D.1.2 有机磷类农药残留量测定

D.1.2.1 色谱条件与系统适用性试验

照气相色谱法(见附录 A.1.4),弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)DB-17MS(或 HP-5),氮磷检测器(NPD)。进样口温度 220 ℃,检测器温度 300 ℃,不分流进样。程序升温:初始 120 ℃,每分钟 10 ℃升至 200 ℃,每分钟 5 ℃升至 240 ℃,保持 2 min,每分钟 20℃升至 270 ℃,保持 0.5 min。理论板数按敌敌畏峰计算应不低于 6 000,两个相邻色谱峰的分离度应大于 1.5。

D.1.2.2 对照品贮备溶液的制备

称取对硫磷、甲基对硫磷、乐果、氧化乐果、甲胺磷、久效磷、二嗪农、乙硫磷、马拉硫磷、杀扑磷、敌敌畏、乙酰甲胺磷农药对照品适量,用乙酸乙酯分别制成每 1 mL 约含 100 μg 的溶液,即得。

D.1.2.3 混合对照品储备液的制备

量取上述各对照品储备液 1 mL,置 20 mL 棕色量瓶中,加乙酸乙酯稀释至刻度,摇匀,即得。

D.1.2.4 混合对照品溶液的制备

量取上述混合对照品储备液,用乙酸乙酯制成每 1 mL 分别含 0.1 μg,0.5 μg,1 μg,2 μg,5 μg 的溶液,即得。

D.1.2.5 供试品溶液的制备

取供试品(鲜品干燥后粉碎)粉末(过二号筛)约 5 g,称定,加无水硫酸钠 5 g,加入乙酸乙酯 50 mL~100 mL,冰浴超声处理 3 min,放置,取上层液滤过,药渣加乙酸乙酯 30 mL~50 mL,冰浴超声处理 2 min,放置,滤过,合并两次滤液,用少量乙酸乙酯洗涤滤纸及残渣,与上述滤液合并。取滤液于 40 ℃以下减压浓缩至近干,用乙酸乙酯转移至 5 mL 量瓶中,并稀释至刻度,量取 1 mL,置活性炭小柱[120 目~400 目,0.25 g,内径 0.9 cm(如 Supelclean ENVI-Carb SPE Tubes,3 mL 活性炭小柱),用乙酸乙酯 5 mL 预洗]上,置多功能真空样品处理器上,用正己烷-乙酸乙酯(1:1)混合溶液 5 mL 洗脱,收集洗脱液,里氮吹仪上浓缩至近干,加入乙酸乙酯 1 mL 使溶解,即得。

D.1.2.6 测定法

分别精锈吸取供试品溶液和与之相对应浓度的混合对照品溶液各 1 μL,分别连续进样 3 次,取

3 次平均值,按外标法计算供试品中 12 种有机磷农药残留量。

D.1.2.7 有机磷类农药参考限量

有机磷农药残留限量见表 D.2。

表 D.2 有机磷类农药残留限量

检测项目		含量要求(以干品计) mg/kg
有机磷类	对硫磷	≤0.01
	甲基对硫磷	≤0.01
	乐果	≤0.005
	氧化乐果	≤0.05
	甲胺磷	≤0.005
	久效磷	≤0.005
	二嗪农	≤0.005
	乙硫磷	≤0.005
	马拉硫磷	≤0.005
	杀扑磷	≤0.05
	敌敌畏	≤0.005
	乙酰甲胺磷	≤0.05

D.1.3 拟除虫菊酯类农药残留量测定

D.1.3.1 色谱条件与系统适用性试验

照气液相色谱法(见附录 A.1.4),弹性石英毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm) SE-54(或 DB-5), 63Ni-ECD 电子捕获检测器。进样口温度 270 ℃,检测器温度 330 ℃。分流比 20 : 1 : 5 : 1(或根据仪器设置选择最佳的分流比)。程序升温:初始 160 ℃,保持 1 min,每分钟 10 ℃升至 278 ℃,保持 0.5 min,每分钟 1 ℃升至 290 ℃,保持 5 min。理论板数按溴氰菊酯峰计算应不低于 1×10⁵,两个相邻色谱峰的分离度应大于 1.5。

D.1.3.2 对照品储备液的制备

量取上述各对照品储备液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用石油醚(60 ℃~90 ℃)稀释至刻度,摇匀,即得。

D.1.3.3 混合对照品储备液的制备

量取上述各对照品储备液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用石油醚(60 ℃~90 ℃)稀释至刻度,摇匀,即得。

D.1.3.4 混合对照品溶液的制备

量取上述混合对照品储备液,用石油醚(60 ℃~90 ℃)稀释制成每 1 L 分别含 0 μg、4 μg、8 μg、

40 μg、200 μg 的溶液，即得。

D.1.3.5 供试品溶液的制备

取供试品于 60℃干燥 4 h，粉碎成细粉(过五号筛)，取约 1 g~2 g，称定，置 100 mL 具塞锥形瓶中，加石油醚(60℃~90℃)-丙酮(4：1)混合溶液 30 mL，超声处理 15 min，滤过，药渣再重复上述操作 2 次后，合并滤液。滤液加入适量无水硫酸钠脱水后，于 40℃~45℃减压浓缩至近干，用少量石油醚(60℃~90℃)反复操作至丙酮除净，残渣加适量石油醚(60℃~90℃)溶解，置混合小柱[从下至上依次为无水硫酸钠 2 g，弗罗里硅土 4 g，微晶纤维素 1 g，氧化铝 1 g，无水硫酸钠 2 g，用石油醚(60℃~90℃)-乙醚(4：1)混合溶液 20 mL 预洗]上，用石油醚(60℃~90℃)-乙醚(4：1)混合溶液 90 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40℃~45℃减压浓缩至近干，再用石油醚(60℃~90℃)3 mL~4 mL 重复操作至乙醚除净，用石油醚(60℃~90℃)溶解转移至 5 mL 量瓶中，并稀释至刻度，即得。

D.1.3.6 测定法

分别吸取供试品溶液和与之相对应浓度的混合对照品溶液各 1 μL，分别连续进样 3 次，取 3 次平均值，按外标法计算供试品中 3 种拟除虫菊酯农药残留量。

D.1.3.7 拟除虫菊酯类农药参考限量

拟除虫菊酯类农药残留限量见表 D.3。

表 D.3 拟除虫菊酯类农药残留限量

检测项目		含量要求(以干品计) mg/kg
拟除虫菊酯类	氯氰菊酯	≤0.025
	溴氰菊脂	≤0.025
	氰戊菊脂	≤0.025

D.2 铅、镉、砷、汞、铜测定——电感耦合等离子体质谱法

D.2.1 方法说明

本法系采用电感耦合等离子体质谱仪测定样品中的铅、砷、镉、汞、铜。

D.2.2 标准品贮备溶液制备

分别量取铅、砷、镉、汞、铜单元素标准溶液适量，用 10%硝酸溶液稀释制成每 1.0 mL 分别含铅、砷、镉、汞、铜为 1 μg、0.5 μg、1 μg、1 μg、10 μg 的溶液，即得。

D.2.3 标准品溶液制备

量取铅、砷、镉、铜标准品贮备液适量，用 10%硝酸溶液稀释制成每 1 mL 含铅、砷 0 ng、1 ng、5 ng、10 ng、20 ng，含镉 0 ng、0.5 ng、2.5 ng、5 ng、10 ng，含铜 0 ng、50 ng、100 ng、200 ng、500 ng 的系列浓度混合溶液。另量取汞标准品贮备液适量，用 10%硝酸溶液稀释制成每 1 mL 分别含汞 0 ng、0.2 ng、0.5 ng、1 ng、2 ng、5 ng 的溶液，本液应临用配制。

D.2.4 内标溶液制备

量取锗、铟、铋单元素标准溶液适量,用水稀释制成每 1 mL 各含 1 μg 的混合溶液,即得。

D.2.5 供试品溶液制备

供试品于 60 ℃干燥 2 h,粉碎成粗粉,取约 0.5 g,称定,置耐压耐高温微波消解罐中,加硝酸 5 mL~10 mL(如果反应剧烈,放置至反应停止)。密闭并按各微波消解仪的相应要求及一定的消解程序进行消解。消解完全后,消解液冷却至 60 ℃以下,取出消解罐,放冷,将消解液转入 50 mL 量瓶中,用少量水洗涤消解罐 3 次,洗液合并于量瓶中,加入金单元素标准溶液(1 μg/mL)200 μL,用水稀释至刻度,摇匀,即得(如有少量沉淀,必要时可离心分取上清液)。

除不加金单元素标准溶液外,余同法制备试剂空白溶液。

D.2.6 测定法

测定时选取的同位素为⁶³Cu、⁷⁵As、¹¹⁴Cd、²⁰²Hg 和²⁰⁸Pb,其中⁶³Cu、⁷⁵As 以⁷²Ge 作为内标,¹¹⁴Cd 以¹¹⁵In 作为内标,²⁰²Hg、²⁰⁸Pb 以²⁰⁹Bi 作为内标,并根据不同仪器的要求选用适宜校正方程对测定的元素进行校正。仪器的内标进样管在仪器分析工作过程中始终插入内标溶液中,依次将仪器的样品管插入各个浓度的标准品溶液中进行测定(浓度依次递增),以测量值(3 次读数的平均值)为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。将仪器的样品管插入供试品溶液中,测定,取 3 次读数的平均值。从标准曲线上计算得相应的浓度。在同样的分析条件下进行空白试验,根据仪器说明书的要求扣除空白干扰。

D.2.7 重金属参考限量

重金属限量见表 D.4。

表 D.4 重金属限量

检测项目		含量要求(以干品计) mg/kg
重金属	铅	≤5.0
	镉	≤0.3
	砷	≤2.0
	汞	≤0.2
	铜	≤20.0

中 华 人 民 共 和 国 林 业
行 业 标 准

石斛种质鉴定技术规范

LY/T 2675—2016

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 3 字数 87 千字
2016 年 11 月第一版 2016 年 11 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-30856 定价 54.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



LY/T 2675-2016