

- QuEChERS 方法检测蔬菜、水果中 62 种农药残留 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(8): 1119-1124.
- [11] 刘佳, 蔡滔, 庞宏宇, 等. QuEChERS-超高效液相色谱三重四级杆线性离子阱串联质谱法测定果蔬中 64 种农药残留量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(12): 3936-3945.
- [12] 张爱芝, 王全林, 曹丽丽, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中 250 种农药残留 [J]. 色谱, 2016, 34(2): 158-164.
- [13] 陈波, 吴卫东, 卞学海, 等. QuEChERS-分散液液微萃取-气相色谱串联质谱技术检测果蔬中 31 种农药残留 [J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(17): 2060-2067.
- [14] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and " dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce [J]. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412-431.
- [15] 国家药典委员会. "0212 药材和饮片检定通则, 2341 农药残留量测定法" 修订草案公示稿 [S].
- [16] 中华人民共和国农业部, GB2763-2016 食品安全部标准-食品中农药最大残留限量 [S].
- [17] 吕盼, 张飞, 侯俊杰, 等. GC-MS/MS 检测陈皮药材中 179 种农药残留 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16): 34-42.
- [18] 李安平, 贺军权, 杨平荣, 等. GC-MS/MS 法测定当归中禁限用农药残留量 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(8): 1463-1482.

渝产川党参药材质量差异性分析

杨丹, 邹艳, 刘艳, 徐广, 朱晓富, 邓才富*

(重庆市药物种植研究所, 重庆市道地药材规范化生产工程技术研究中心, 重庆 408400)

摘要: 目的 分析渝产川党参药材质量差异性。方法 测定各产区药材总多糖、党参炔苷含量, 总多糖进行聚类分析, 药材进行指纹图谱分析。结果 重庆云阳上坎乡、重庆奉节太和乡、重庆巫山红椿乡、重庆南川区归为一类, 重庆奉节吐祥镇归为一类, 重庆云阳桑坪镇归为一类。同一产区不同土壤栽培并未归为一类, 药材整体质量存在一定的差异, 栽培的环境和土壤对主产区药材质量有一定的影响。结论 在各主产区栽培种植川党参时, 要找到适宜土壤进行栽培, 以期提高药材的整体质量。

关键词: 党参; 党参炔苷; 总多糖; 重庆; 化学模式分析

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)06-1668-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.054

党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen 或川党参 *Codonopsis tangshen* Oliv. 的干燥根, 具有补中益气、生津养血、扶正祛邪的功效^[1], 主要有效成分包括多糖类、挥发油类、炔苷类^[2-4]等, 主要活性包括抗氧化、增强免疫力、抗肿瘤^[5]等。川党参主要集中在湖北西部、重庆东部及四川东部, 不同主产区其质量状况良好, 作为我国出口药材和中成药生产中最常用的药材之一, 其质量控制一直备受关注。重庆市巫山县、巫溪县、奉节县及贵州省道真县 4 个产地川党参的质量差异不大, 而湖北恩施与其他 4 个产地的质量差异较大^[6], 不同主产区栽培土壤差异性是造成药材质量差异性最主要的原因。

原因之一, 土壤酸碱性、微生物环境会直接影响药材生长过程中生理指标变化^[7], 间接影响其有效成分含量及种类^[8]等。同时, 党参产地加工方式等也是造成其质量差异的原因^[9]。目前, 重庆党参的种植现状、质量参差不齐、现行商品等级划分不合理等存在一系列问题, 为了探索不同主产区、栽培土壤对药材质量的影响, 本实验应用 HPLC-DAD 对川党参中党参炔苷的含量进行分析, 建立 HPLC 指纹图谱, 根据化学模式评价结果, 确定各主产区土壤因素及不同主产区之间药材质量差异性, 以期提出科学、规范、合理的种植建议, 为行业商品等级标准的规范化提供参考, 为现代精准扶贫项目和重庆市中药材种植产业化提供依据。

收稿日期: 2020-01-10

基金项目: 重庆市基本科研业务费项目 (cstc2017jxjl-jbky120018); 重庆市绩效激励基本科研业务费项目 (cstc2019jxjl-jbky10001); 重庆市基科费项目 (cstc2018jxjl-jbky0018)

作者简介: 杨丹 (1991—), 女, 硕士, 实习研究员, 从事中药化学与药效作用基础研究。Tel: 15095836763, E-mail: 1334542035@qq.com

* 通信作者: 邓才富 (1971—), 男 (土家族), 研究员, 从事生态环境与药材质量研究

1 材料

高效液相色谱仪 LC-20AD、UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津公司); 纯水仪(重庆摩尔水处理公司); KQ3200DE 数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH8 恒温数显水浴锅(上海汗诺仪器有限公司); 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

川党参信息见表 1, 经重庆市药物种植研究所邓才富研究员鉴定为桔梗科植物川党参 *Codonopsis pilosula*, 标本保存于重庆市药物种植研究所中药材生产质量控制研究中心。党参炔苷(纯度≥98%)。色谱纯甲醇、乙腈及分析纯 D-葡萄糖对照品(阿拉丁试剂有限公司); 水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

表 1 样品信息

编号	来源	信息	栽培土壤
1	重庆云阳	上坎乡	黄泥
2			黄泥
3	重庆市奉节县	吐祥镇	黄泥
4	(万力收购品)		黄泥
5	重庆市奉节县	太和乡尖山 2 组	黄沙壤
6		太和乡高桥 5 组	黄泥
7	重庆巫山县	红椿乡高炉村 5 组	白鳞泥
8		红椿乡飞播林场	灰包土
9			灰包土
10			灰包土
11			灰包土
12	重庆云阳	桑坪镇(马刀子丫口)	黄泥
13		桑坪镇	鸭屎泥
14		桑坪镇	黄泥巴
15	重庆市南川区	三泉镇大河坝扇子坪	腐殖土
16			石骨子土
17	重庆市南川区	市售党参	—

2 方法与结果

2.1 党参总多糖含量

2.1.1 葡萄糖对照品溶液制备 取 D-无水葡萄糖对照品, 105 °C 烘箱内烘干至恒重, 精密称取 110 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解定容至刻度, 即得, 4 °C 保存备用。

2.1.2 线性关系考察 精密量取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL “2.1.1” 项下对照品溶液至 10 mL 量瓶中, 定容得系列质量浓度溶液, 分别精密量取 1 mL 于试管中, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摆匀, 迅速加入浓硫酸 5 mL, 放置 5 min, 置沸水浴中加热 15 min, 取出冷却至室温。取 1 mL 蒸馏水平行操作, 作为空白对照, 采用紫外-可见分光光度法在 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标 (A), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程 $A = 8.0378X - 0.0131$ ($r = 0.9973$), 在 1.10~110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液制备 参考文献[9], 取样品粉末 2.0 g, 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 80% 乙醇 100 mL, 水浴回流 2 h, 滤过, 残渣用 80% 热醇洗涤, 滤过, 残渣放至室温, 将残渣同滤纸放入锥形瓶中, 加入蒸馏水 50 mL, 水浴提取 2 h, 离心, 取上清液, 残渣及烧瓶

用热水 10 mL 洗涤, 洗液并入滤液, 重复上述步骤, 提取 3 次, 浓缩滤液定容至 100 mL, 取 1 mL 稀释至 100 mL, 即得。精密量取供试品溶液 2 mL, 按“2.1.1” 项下方法测定吸光度, 数据用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

表 2 各产区党参总多糖含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

编号	总多糖/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	编号	总多糖/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	261.61±0.25	10	63.79±1.08
2	462.84±0.25	11	184.16±0.27
3	124.44±0.32	12	244.19±0.22
4	77.17±0.59	13	168.61±0.25
5	255.39±0.41	14	146.84±0.13
6	304.53±0.49	15	163.01±0.31
7	235.17±1.06	16	134.71±0.29
8	284.00±0.19	17	55.71±0.25
9	195.67±0.40		

2.1.4 聚类分析 将 16 批样品中多糖含量进行预处理后, 导入 SIMCA 14.1 软件, 在 Analyse 下进行聚类分析, 见图 1, 可知主要分为 4 类, I 类包含 2, II 类包含 1、5~8、12, III 类包含 4、10、17, IV 类包括 3、9、11、13~16。

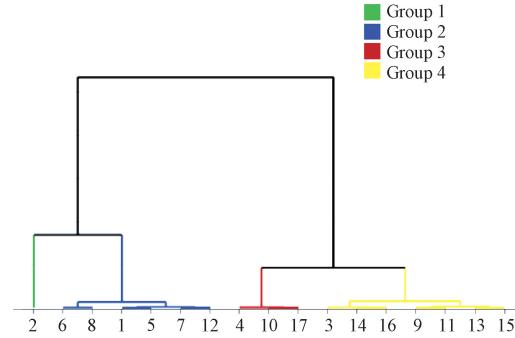


图 1 16 批样品聚类分析图

2.2 党参炔苷含量

2.2.1 色谱条件 参考文献[10], 岛津 VP-ODS 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 检测波长 268 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 流动相乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱 (0~7 min, 5% A; 7~15 min, 5%~15% A; 15~40 min, 15%~30% A; 30~45 min, 30%~40% A; 45~60 min, 40% A; 60~70 min, 5% A)。

2.2.2 对照品溶液制备 取党参炔苷对照品 9.9 mg, 甲醇溶解并定容 50 mL 量瓶中, 即得, 置于 4 °C 冰箱中备用。

2.2.3 供试品溶液制备 取样品粉末 0.5 g, 精密称定, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声 (250 W、40 kHz) 提取 30 min, 甲醇补足减失质量, 滤过, 取滤液, 即得。在“2.2.1”项色谱条件下测定, 计算含量, 数据用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.2.4 精密度试验 精密吸取 3 号供试品溶液 10 μL , 在“2.2.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱图, 以党参炔苷为参照峰, 考察特征色谱峰保留时间和峰面积的一致性。结果, 各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1%, 共有峰峰面积 RSD 小于 2%, 表明仪器精密度良好。

表3 各产地党参炔苷含量 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

编号	党参炔苷/(mg·g ⁻¹)	编号	党参炔苷/(mg·g ⁻¹)
1	1.224 0±0.004 1	10	1.717 0±0.005 8
2	0.811 9±0.002 3	11	0.872 6±0.002 1
3	0.504 8±0.002 5	12	1.969 5±0.021 0
4	0.888 3±0.001 6	13	1.747 1±0.002 1
5	0.565 2±0.005 2	14	2.022 2±0.006 9
6	0.948 9±0.005 6	15	0.708 0±0.009 7
7	1.148 9±0.003 7	16	0.668 1±0.002 2
8	0.622 5±0.004 4	17	0.154 0±0.002 2
9	0.747 6±0.004 1		

2.2.5 稳定性试验 精密吸取3号供试品溶液10 μL，在“2.2.1”项色谱条件下于0、4、8、12、24 h进样测定，记录色谱图，以党参炔苷为参照峰，考察色谱峰保留时间

和峰面积的一致性。结果，各共有峰相对保留时间RSD均小于1%，共有峰峰面积RSD小于3%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 同时取3号供试品6份，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样10 μL测定，记录色谱图，以党参炔苷为参照峰，考察特征色谱峰保留时间和峰面积的一致性。结果，各共有峰相对保留时间RSD均小于1%，共有峰峰面积RSD小于2%，表明该方法重复性良好。

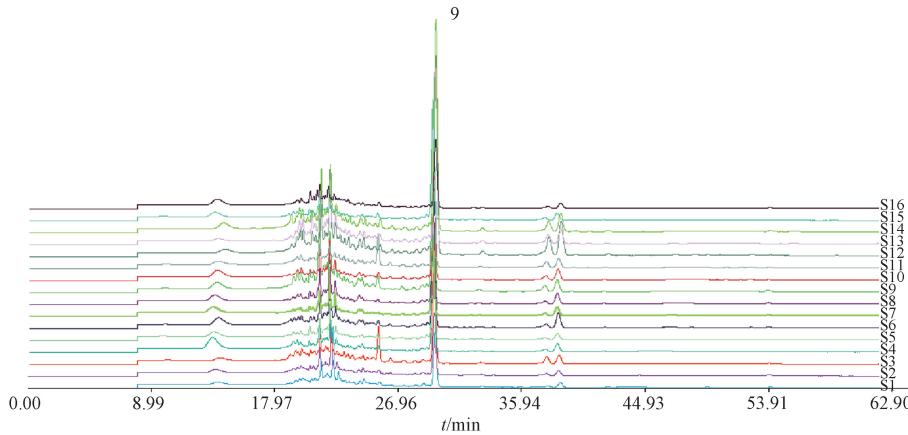
2.2.7 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的同一批样品约0.25 g，共6份，加入一定量对照品溶液。按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样，计算回收率，结果见表4。

表4 党参炔苷加样回收率试验结果 (n=6)

原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.126 2	0.118	0.247 1	102.45		
0.127 4	0.118	0.243 1	98.05		
0.113 2	0.118	0.229 3	98.38	100.55	2.472 0
0.132 9	0.118	0.254 9	103.38		
0.128 7	0.118	0.244 9	98.47		
0.128 8	0.118	0.249 8	102.54		

2.3 指纹图谱建立及相似度分析 在“2.2.1”项色谱条件下，建立了16批样品的HPLC指纹图谱（图2），采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A版）”软件对图谱进行处理，其中共有峰12个。通过与图3比较，指认9号峰为党参炔苷，将其设为参照峰。各主产区指纹图

谱相似度均大于0.8，表明药材整体化学成分相似，但个别含量可能存在较大差异。17号样品为市售，由于其质量较各主产区相差较大，与其他样品指纹图谱相似度为0.568，故后续不以其为研究对象。



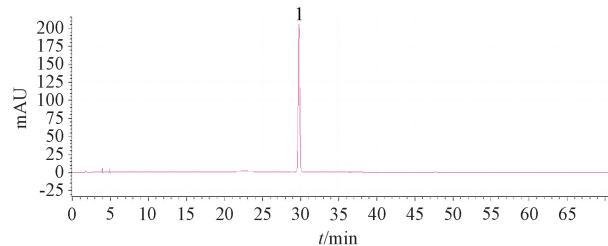
注：9号峰为党参炔苷。

图2 16批样品HPLC指纹图谱

2.4 化学模式分析 将16批样品12个色谱峰峰面积进行预处理后，以共有峰为变量，导入SIMCA 14.1软件进行聚类分析、主成分分析、OPLS-DA分析，研究重庆不同主产区药材质量差异，以及各产区不同土壤栽培党参的影响。

2.4.1 聚类分析 将16批样品12个色谱峰峰面积进行预处理后，导入SIMCA 14.1分析软件进行聚类分析，见图4，主要分为3类，I类包含1~2、5~9、11、15~16，II类包括3~4、III类包含10、12~14。

2.4.2 主成分分析 参考文献[11]，将16批样品共有峰峰面积输入Excel表格，得到16×12列的数据矩阵，导入SIMCA 14.1软件进行主成分分析，见图5，I类包含1~2、5~9、11、15~16，II类包括3~4，III类包含10、12~14，与聚类分析结果一致，表明各主产区党参质量存在一定差异，同时部分同一产区由于栽培土壤不同，药材质量也存在相对差异。但各数据分布不集中，难以区分，因此需采用OPLS-DA作进一步分析。



1. 党参炔苷

图3 党参炔苷对照品HPLC色谱图

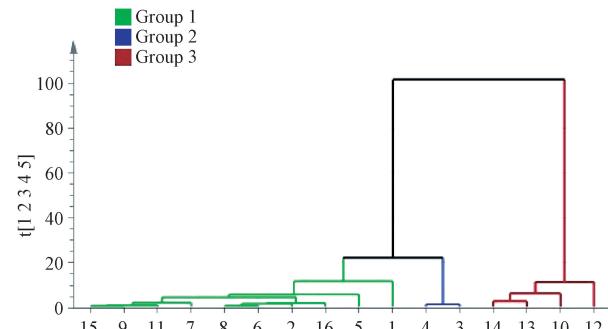


图4 16批样品聚类分析图

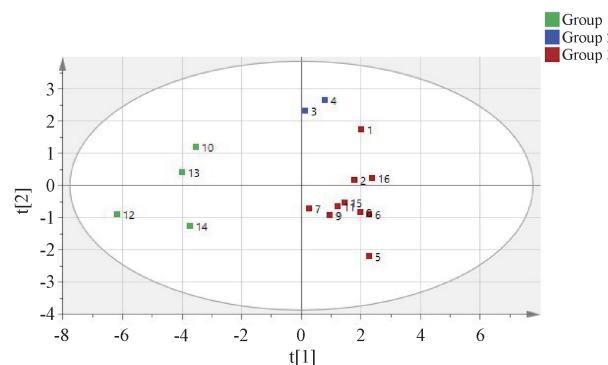


图5 16批样品主成分分析图

2.4.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA) 参考文献 [12] 进行 OPLS-DA 分析, 将 16 批样品共有峰面积导入 SIMCA14.1 软件进行 OPLS-DA 分析, 见图 6, 可知模型参数 $R^2X = 0.993$, $R^2Y = 0.998$, $Q^2 = 0.968$, 其中 R^2X 和 R^2Y 表示模型的拟合程度, 自变量 X 和因变量 Y 表示模型的解释表明的能力, Q^2Y 表示模型的预测能力, 三者的数值越接近 1, 表明模型的拟合程度和预测能力越好; 各产区数据均落在 95% 的置信区间范围内, 表明药材成分相似, 质量稳定, 但各数据分布在不同区域, 且同一产区大多集中在一个区域并比较集中, 表明药材总体质量差异不显著, 同时不同产区药材整体质量上存在一定的差异。载荷散点图见图 7, 距离远点越远, 权重值越大, 表明该成分的变化对区分各产区药材质量的作用越大。将 $VIP > 1$ 的成分确定为贡献较大者, 共有 4 个, 即 1 号峰 ($VIP = 1.2328$)、5 号峰 ($VIP = 1.1982$)、6 号峰 ($VIP = 1.0963$)、7 号峰 ($VIP = 1.2377$)、9 号峰 ($VIP = 1.1962$), 均对各产区药材质量分类具有显著性影响, 见图 8。

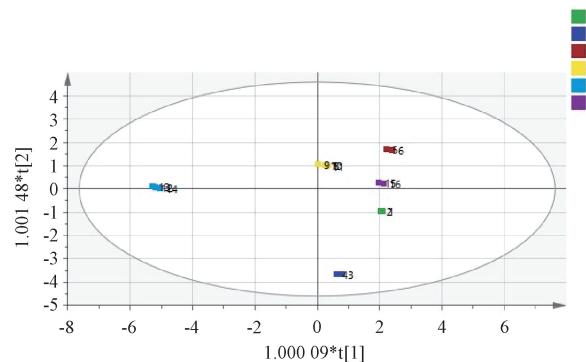


图6 16批样品OPLS-DA得分图

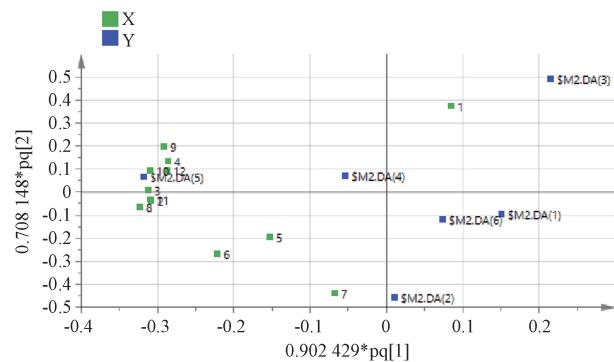


图7 16批样品载荷散点图

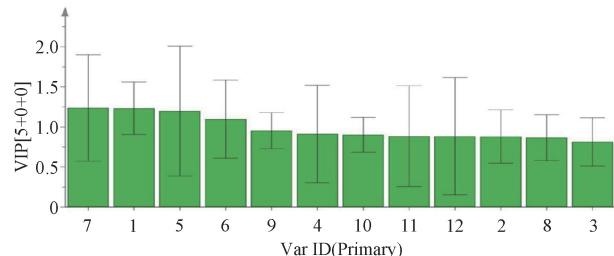


图8 16批样品共有峰VIP值

3 讨论

党参是一种滋补中草药, 广泛的应用在日常生活中和中药复方中, 为我国用量居多的中药材之一。近年来, 研究党参质量评价等方面越来越多, 通过调整施肥量、施肥种类、施用激素来改变党参生产质量和药材质量^[13-14], 提高药农经济效益。同时党参药材质量还受环境和遗传因素的影响, 种内居群间遗传相似性与地理分布又呈一定相关性, 不同基原党参药材的化学成分受到栽培环境因素的影响^[15-16], 这些观念的提出为中药材生产的产地环境选择、栽培措施管理提供了方法和依据。

对 17 批药材分析其总多糖、党参炔苷含量, 发现不同产区、同一产区不同土壤栽培均有所差异, 由于 17 号为市售党参, 与其他重庆周边主产区川党参药材质量差异比较大。将 16 批党参药材 12 个色谱峰峰面积进行预处理后, 进行化学模式分析, 通过聚类分析, 经过细致分类, 同一产区不同土壤栽培并未归为一类, 表明党参整体质量存在一定的差异, 因此在各主产区栽培种植党参药材时要找到

相适宜的土壤进行栽培，以提高党参药材的整体质量。OPLS-DA 分析结果与聚类分析相同，各主产区之间党参总体质量存在差异，同一栽培环境不同的栽培土壤对党参质量存在影响。甘肃省发布了针对中药党参的相关地方质量标准，贵州省则申请了贵州威宁党参地理标志^[17-18]，同时有学者针对甘肃主产党参做出了商品规格等级及研究不同栽培措施对党参质量的影响^[19-20]等。重庆市对川党参种苗繁育技术发布了地方标准，但本课题组所购买的市售党参与栽培川党参比较质量较差，因此研究其产地质量标准、栽培技术规章、商品等级、加工炮制规章，是今后亟待解决的主要问题。建议根据产品质量要求配合不同的栽培土壤，结合产地生态因子，继续研究川党参栽培土壤微生物环境等条件，做好药材栽培规划，建立药材种植区 GAP 基地建设，从而提高药材总体质量。同时，应在党参主产区建立种苗培育基地，稳定药材品质，保证优质、稳定、高效的生产格局及西南地区相关生产的持续、健康发展。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.
- [2] 任丽婧，张 静，刘志存，等. 党参多糖的分离纯化及其结构研究[J]. 中草药，2008，39(7)：986-989.
- [3] 罗会贤，刘绍华，杨 靖，等. 党参提取物制备工艺优化及其挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 郑州轻工业学院学报（自然科学版），2015，30(2)：34-37.
- [4] 戚欢阳，王 瑞，刘 勇，等. 白条党参化学成分研究 [J]. 中药材，2011，34(4)：546-548.
- [5] 黄圆圆，张 元，康利平，等. 党参属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药，2018，49(1)：239-250.
- [6] 任风鸣，谢贤明，章文伟，等. 不同产地川党参质量评价研究[J]. 实用中医药杂志，2014，30(3)：241-242.
- [7] 周武先，何银生，朱盈徽，等. 生石灰和钙镁磷肥对酸化川党参土壤的改良效果[J]. 应用生态学报，2019，30(9)：3224-3232.
- [8] 李家宇，左之文，王曦璠，等. 不同品种党参游离糖成分的气相色谱-质谱研究[J]. 湖南中医药大学学报，2018，38(12)：1398-1402.
- [9] 郭振宇，张 谦，张正锋，等. 川党参产地加工方法对化学成分的影响[J]. 中药材，2018，41(12)：2807-2810.
- [10] 窦 霞，杨锡仓，甄小龙，等. 党参及其不同炮制品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材，2017，5(40)：1092-1095.
- [11] 潘玄玄，宋粉云，林秀莲，等. 沉香化气丸的 UPLC 指纹图谱与化学模式识别[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(19)：105-110.
- [12] 李 潮，于 欢，温 柔，等. 江西不同产区车前子药材的 HPLC 指纹图谱及其多成分化学模式识别分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(15)：161-167.
- [13] 查 钦，阮培均，王 永，等. 不同施肥量对纹党参产量及质量的影响[J]. 北方园艺，2018(20)：138-144.
- [14] 吴发明，赵文吉，任振丽，等. 控制结实对党参产量、质量及经济效益的影响[J]. 北方园艺，2018(6)：124-128.
- [15] 彭 锐. 川党参质量及影响其质量的遗传和环境因素研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2008.
- [16] 谷 聪，曹玲亚，苏 强，等. 党参原产地及其迁地引种后 AFLP 与 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中药材，2016，39(8)：1716-1722.
- [17] DB52/T850-2013，地理标志产品威宁党参[S].
- [18] DB82/816-2002，定西地区无公害中药材党参质量安全[S].
- [19] 彭 锐，马 鹏，莫让瑜，等. 川党参药材质量标准研究 [J]. 世界科学技术（中医药现代化），2014，16(3)：578-581.
- [20] 胡佳栋. 栽培措施对党参生长和有效成分含量影响研究 [D]. 杨凌：西北农林科技大学，2019.