

经过超低温保存的茎尖, TTC 法检测成活率在 80% 左右, 而微嫁接再生率仅 52% 左右(采用优化的茎尖微嫁接方法, 一般嫁接成活率可达 75% 以上), 即再生率低于成活率。这可能是因为, 在进行超低温保存时, 保存的材料因受到伤害的程度不同, 有些材料完全没有受到伤害, 所以很快就恢复生长; 有的材料受到了稍重的伤害, 但在恢复生长过程中又被修复, 最终也恢复了生长, 这与在用 TTC 检测时, 发现有的茎尖只是顶芽或侧芽的部位变红, 而其他部分仍保持绿色相一致, 因为 TTC 法检测是以过氧化氢酶的活力为标准, 反映的是细胞内的活性, 而真正的细胞或许除了各种酶的综合作用外, 还需要保持细胞结构的完整性^[8]; 另一方面, 也可能在进行超低温保存后再培养时, 培养条件未能达到材料超低温冻存后恢复的要求。

本研究采用玻璃化超低温保存佛手茎尖, 获得了较高的成活率, 并结合茎尖微嫁接技术获得再生脱病原体植株, 为佛手种质资源的保存和可持续利

用开辟了一条新的途径。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 张桂芳, 徐鸿华. 佛手种质资源研究概况[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(1): 69-72.
- [3] 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑橘茎尖及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 301-306.
- [4] 李明军, 洪森荣, 徐鑫, 等. 怀山药种质资源的玻璃化超低温保存[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 288-292.
- [5] 艾鹏飞, 罗正荣. 柿休眠芽茎尖玻璃化超低温保存及植株再生[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 553-556.
- [6] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998.
- [7] 张桂芳, 贺红, 徐鸿华. 佛手茎尖微嫁接技术研究[J]. 中草药, 2007, 38(7): 1081-1084.
- [8] 张玉进, 张兴国, 刘佩英, 等. 植物茎尖的玻璃化冻存研究[J]. 武汉植物学研究, 1999, 17(增刊): 78-82.
- [9] 梁宏. 植物种质的玻璃化超低温保存[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27: 43-45.
- [10] Helliot B, Swennen R, Poumay Y, et al. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa spp.*) highly proliferating meristems [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21: 690-698.

白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

王文燕¹, 赵强², 张铁军¹, 朱宏吉², 黎阳³

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072; 3. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要:目的 研究白芍药材的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱建立了白芍药材的 HPLC 的指纹图谱, 收集了不同批次的 47 批样品进行测定, 并使用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行了模式识别研究。结果 主成分分析和聚类分析结果一致, 样品分为药材和饮片两类。结论 该方法可用于白芍质量控制及综合评价。

关键词:白芍; 指纹图谱; 主成分分析

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1810-05

HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition method of *Radix Paeoniae Alba*

WANG Wen-yan¹, ZHAO Qiang², ZHANG Tie-jun¹, ZHU Hong-ji², LI Yang³

(1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To establish a method for quality control of *Radix Paeoniae Alba*. **Methods** A high performance liquid chromatographic method was developed to establish the fingerprint of *Radix Paeoniae Alba* and 47 samples from various batches were analyzed. Cluster analysis and principal component analysis (PCA) were applied to study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition method. **Results** The result of PCA and cluster analysis showed that the samples were divided into two types. The HPLC fingerprinting of *Radix Paeoniae Alba*, showing 10 characteristic peaks, was established from 47 batches of *Radix Paeoniae Alba*. **Conclusion** The method provides an academic reference for the quality

control of *Radix Paeoniae Alba*.

Key words: *Radix Paeoniae Alba*; fingerprint; principal component analysis (PCA)

白芍为毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根^[1]。目前,多用芍药苷作为白芍的质控指标,难于全面控制白芍的内在质量,不能对其真伪优劣做出判断^[1~5]。通过 HPLC 方法建立药材的指纹图谱,并将聚类分析和相似度分析的数据分析技术应用于药材的指纹图谱已有少量报道^[6,7],本实验通过此法分析、比较不同产地的白芍药材指纹图谱,对所得图谱进行分析、解析,建立白芍指纹图谱的指标参数评判标准,为全面控制白芍的质量提供了方法。

1 仪器与材料

2695 高效液相色谱仪 Waters, Waters996 型 PDA 检测器, HS3120 超声波(海卓康生物科技有限公司), Mettler Toledo PB303-N 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

甲醇、乙腈色谱纯,乙醇(95%)、三氯甲烷、盐酸、磷酸、甲酸、醋酸、无水乙醇、丙酮均为分析纯。芍药苷(中国药品生物制品检定所)。所用白芍药材见表 1,药材经天津药物研究院张铁军研究员鉴定。

表 1 白芍药材产地及来源

Table 1 Origin sources of *Radix Paeoniae Alba*

批号	来源	药材状态	批号	来源	药材状态
B1	杭州	饮片	B25	天津敬一堂药店	饮片
B2	河南安国	饮片	B26	天津胜利药店	饮片
B3	河南安国	饮片	B27	天津本草堂药店	饮片
B4	河南安国	饮片	B28	达仁堂制药厂	原药材
B5	河南安国	饮片	B29	达仁堂制药厂	原药材
B6	亳州槐陵	饮片	B30	达仁堂制药厂	原药材
B7	达仁堂制药厂	原药材	B31	达仁堂制药厂	原药材
B8	达仁堂制药厂	原药材	B32	达仁堂制药厂	原药材
B9	达仁堂制药厂	原药材	B33	达仁堂制药厂	原药材
B10	达仁堂制药厂	原药材	B34	达仁堂制药厂	原药材
B11	达仁堂制药厂	原药材	B35	达仁堂制药厂	原药材
B12	天津杏春州药店	饮片	B36	达仁堂制药厂	原药材
B13	天津和平药店	饮片	B37	达仁堂制药厂	原药材
B14	天津桐君阁药店	饮片	B38	河南商丘	饮片
B15	吉林	饮片	B39	河北保定	饮片
B16	天津福瑞祥药店	饮片	B40	亳州	饮片
B17	天津华济堂药店	饮片	B41	安徽	饮片
B18	天津源盈药店	饮片	B42	蚌埠	饮片
B19	天津协和药店	饮片	B43	亳州	饮片
B20	天津华丰药店	饮片	B44	保定	饮片
B21	天津世纪三潭药店	饮片	B45	扬州	饮片
B22	天津北洋药店	饮片	B46	江苏	饮片
B23	天津中新药店	饮片	B47	杭州	原药材
B24	津永新药店	饮片			

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Suntik C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;检测波长:230 nm;柱温:35 ℃。体积流量:0.8 mL/min;流动相:A-乙腈, B-0.1% 磷酸梯度洗脱:0~5 min 5%~10% A, 5~25 min 10%~20% A, 25~45 min 20% A, 45~60 min 20%~100% A, 60~70 min 100% A;体积流量 0.8 mL/min。进样量:10 μL。

2.2 对照品溶液的制备:取芍药苷对照品适量,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,超声 20 min,冷却后补足体积,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,得到芍药苷对照品溶液。相同方法制得芍药内酯苷对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:将白芍药材粉碎过 40 目筛,精密称取白芍粉末 2 g,加入 50%乙醇 40 mL 置圆底烧瓶中,称定质量,回流提取 2 h,滤过,旋转蒸发回收溶剂,残渣用甲醇溶解置 10 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀。精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取供试品溶液,连续进样 5 次,考察结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化,各色谱峰的相对保留时间和单峰面积大于或等于 5% 的色谱峰的比值基本一致, RSD 值均不大于 1.674 (RSD 在 3.0% 以下),符合指纹图谱的要求。

2.4.2 稳定性试验:取同一批号的供试品溶液,分别在 0、3、6、9、12、24 h 进样,考察结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均不大于 2.986%,符合指纹图谱的要求(不大于 3%)。建议样品溶液在 24 h 内测定为好。

2.4.3 重现性试验:取同一批号的供试品溶液 5 份,进行测定,考察结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化,各共有峰的相对保留时间和单峰面积占总峰面积大于或等于 5% 的色谱峰面积比值基本一致 (RSD 在 3.0% 以下),符合指纹图谱要求。

2.5 样品测定:实验测定了不同产地和不同批次白芍样品,详细比较多批次样品的液相色谱图,确定了 10 个主要的色谱特征峰,构成白芍的指纹图谱。其

中 6 号峰芍药苷为白芍主要指标成分,将其作为内参比峰,5 号峰为芍药内酯苷,代表性色谱图见图 1。

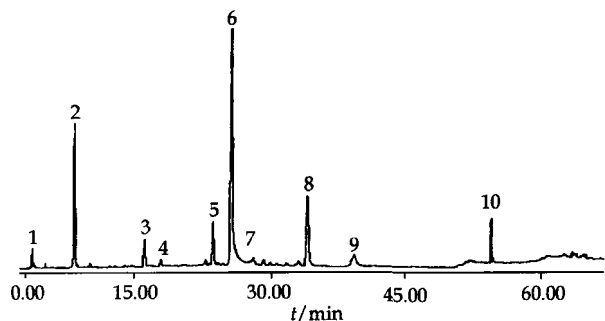


图 1 白芍液相色谱图及主要特征峰

Fig. 1 HPLC Chromatogram and main characteristic peaks of *Radix Paeoniae Alba*

2.6 相似度评价:利用 2004A 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》计算软件,对上述 47 批样品进行相似度评价,以 B28 批白芍药材色谱图作为参照图谱,利用中位数法进行多点校正生成对照图谱 R。由白芍相似度评价结果可以看出,各批白芍药材与对照指纹图谱间的相似度为 0.987~0.718,表明白芍药材由于产地、气候、炮制等原因,内在质量存在很大差异,不能直接建立白芍药材指纹图谱的共有模式。需对白芍各批药材进行进一步评价样品间差异,进行图谱模式识别分类,以便建立真实可靠的白芍药材标准指纹图谱。

2.7 主成分分析:各白芍样本经过上述实验方法获得各自的色谱数据,通过色谱工作站将图谱进行积分后以保留时间和色谱峰面积作为数据的信息,一个白芍样本的数据为一个数据向量生成样本数据,47 个样本数据组成白芍样本指纹信息数据矩阵。对数据矩阵进行主成分分析(PCA)后,分别以其第一、第二、第三主成分建立坐标系,进行投影即可得到所有样本的 PCA 平面和 3D 投影图,样本间内在的相互关系即可较好地表现出来,进而实现样本之间的分类。

图 2 和 3 是白芍数据进行的 PCA 平面和 3D 投影分类图。图中可以看出白芍色谱数据可以明显地将白芍分为两大类,结合样本来源,可知原药材和饮片各成一类。

为了更好地体现出白芍的类别关系,特将白芍原药材的多个样本进行 PCA 投影分析(图 4),结果发现 PCA 投影图中各品种之间的距离都不大,没有实现“分类”,说明所收集的不同白芍原药材之间有一定差异性,但差异性较小。

2.8 系统聚类分析:本研究以经形态学鉴定的 47

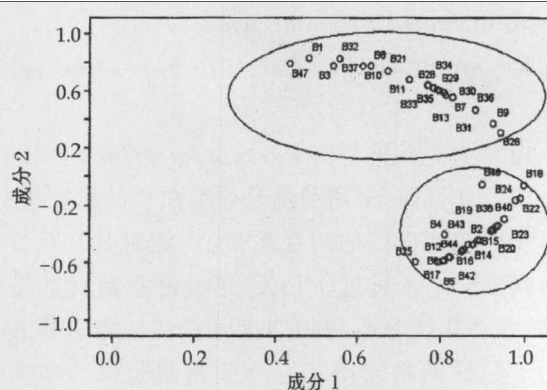


图 2 样品主成分得分图

Fig. 2 PCA Figure of samples

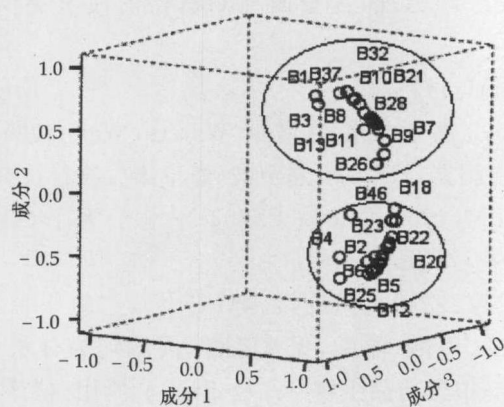


图 3 主成分 3D 得分图

Fig. 3 3D PCA Figure of samples

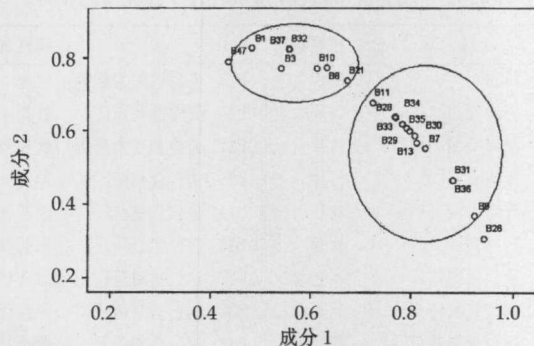


图 4 白芍药材主成分得分图

Fig. 4 PCA Figure of *Radix Paeoniae Alba*

个不同批次和产地的白芍样品为研究对象,进行指纹图谱研究,获得包括芍药苷(6 号峰)在内的 10 个色谱峰。将各色谱峰相对于内参比色谱峰的峰面积量化,得到 47×10 阶原始数据矩阵,运用“SPSS 软件”对其进行系统聚类分析,采用类内平均锁链法(average linkage),变量矢量的夹角余弦(cosine)法作为样品的测度。聚类分析将 47 个白芍样品分为 2 大类,通过结合主成分分析结果,可判定原药材与饮片内在质量差异很大。可判定第 I 类为原药材,第 II 类为一般市售饮片。分类聚类谱系图见图 5。

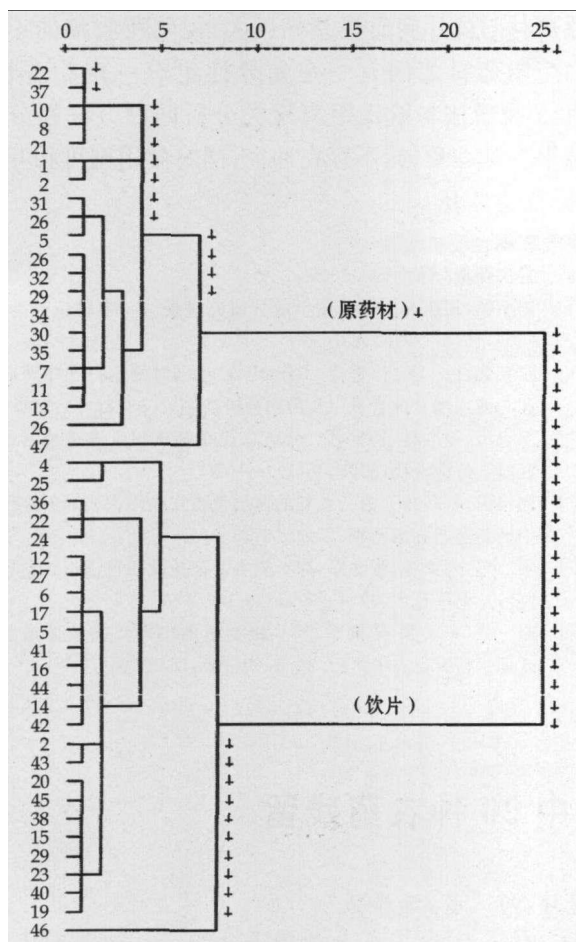


图 5 白芍样品聚类分析

Fig. 5 Hierarchical clustering analysis of samples

2.9 白芍药材标准指纹图谱的建立:经上述分析,参考主成分分析和系统聚类分析结果,取其中投影距离最近的 10 批白芍药材建立白芍药材的标准指纹图谱(见图 6),10 批白芍批号为: B31、B36、B9、B28、B33、B29、B34、B30、B35、B7。其中除 B9 外,其余白芍都由达仁堂提供。将上述 10 批样品数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版),经选峰,设定 B9 批白芍药材色谱图作为参照图谱匹配模板,将谱峰自动匹配;然后设定标准模板,利用中位数法进行多点校正生成对照图谱 R,进行谱峰差异性评价和整体相似性评价,得出白芍指纹图谱的共有模式见图 7,相似度计算结果见表 2。

相似度计算结果表明,10 批样品均在 0.95 以上,符合国家药典委员会的要求。本实验对白芍药材 HPLC 指纹图谱的构建进行了探讨,可为白芍药材的品质评价、质量标准的制定提供科学依据。

3 讨论

3.1 流动相的选择:芍药苷在 25.7 min 出峰,流动相中的磷酸明显降低芍药苷峰的拖尾现象,共检测出 10 种主要物质,各物质分离良好,并且在图谱中

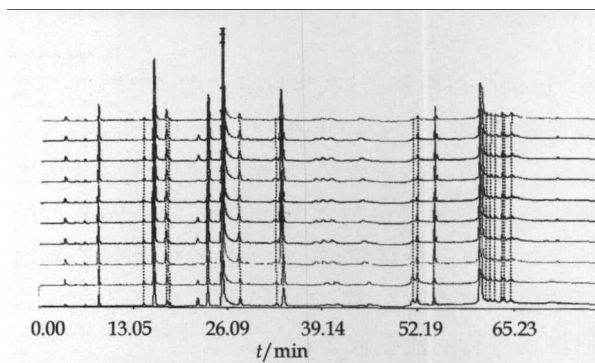


图 6 10 批样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 6 HPLC Fingerprints for ten batches of samples

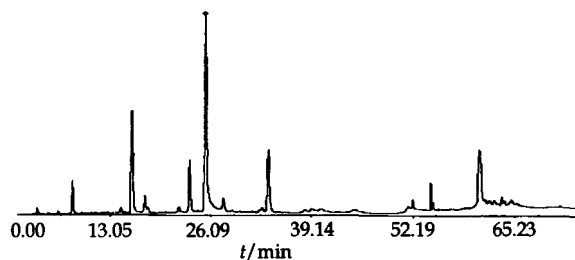


图 7 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 7 Compared fingerprints by HPLC

表 2 10 批样品相似度评价结果

Table 2 Similarities for ten batches of samples

批号	参照图谱	对照图谱	批号	参照图谱	对照图谱
B9	1.000	0.958	B31	0.933	0.985
B7	0.965	0.985	B33	0.956	0.999
B28	0.954	0.999	B34	0.959	0.999
B29	0.953	0.999	B35	0.958	0.999
B30	0.953	0.999	B36	0.934	0.984

分布较均匀。过高的洗脱强度会使各物质的峰高大大增加,半峰宽变小,峰形得到改善,但同样使得保留时间大大缩短,甚至导致各物质由于保留时间相对接近而无法得到分离和分析;过低的洗脱强度则造成实验时间过长,并且使得半峰宽变大,使得保留时间相对接近的物质分离度不好。

3.2 检测波长的选择:取供试品溶液,进样 10 μ L,进行 200~400 nm 的全波长扫描,并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在 230 nm 下,各峰分离良好,特征峰明显且峰型较好,从图谱中可以尽可能地获取色谱组分信息以反映体系组成的全貌,因此选定 230 nm 为指纹图谱测定波长。

3.3 色谱柱的选择:其他条件相同,相比较 3 根色谱保留时间一致,但 Dikma C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μ m) 较 Suntik C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 和 Accurasil Suntik C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱出峰少,分离度低,故考虑使用后两者,本实验使用的色谱柱为 Suntik C₁₈ (250 mm×4.6 mm,

5 μm)。

3.4 供试品溶液制备:实验分别对水、甲醇、95%乙醇超声提取 30 min,水、甲醇、95%乙醇回流提取 2 h 进行了考察。结果表明,乙醇回流提取后所得色谱峰的峰数为最多。后又对 50%、75%、95%乙醇回流 2 h 提取进行试验,发现 3 者之间 50%乙醇出峰峰数较其他各方法多,本实验采用 50%乙醇作为提取溶剂进行回流提取 2 h。

3.5 聚类分析与主成分分析:应用了 PCA 投影法和系统聚类分析法两种化学计量学方法对白芍色谱积分数据进行了模式识别的初探。从整体分类效果上来看,PCA 投影法更为直观,能一目了然地看出各个白芍药材分类样本之间的聚类关系。系统聚类分析法更能体现出分类样本间内在的相互联系,分类结果较 PCA 投影法更为细致。

综合 47 批白芍药材相似度结果分析,表明白芍

原药材与饮片间质量差异巨大,说明所收集的不同白芍原药材之间有一定差异性也有一定相关性。PCA 投影法与欧氏距离聚类分析两种方法在分类结果上是一致的,不存在冲突,同时使用则可相互支持、互为依托。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 高小荣,田庚元.白芍化学成分研究进展[J].中国新药杂志,2006,15(6):416-418.
- [3] 张克荣,白丽,徐赞美.RP-HPLC法同时测定白芍中芍药苷和芍药内酯苷的含量[J].药物分析杂志,2003,23(2):222.
- [4] 邹忠梅,徐丽珍,杨世林.芍药总苷高效液相色谱指纹图谱研究[J].药学学报,2003,38(1):46-49.
- [5] 谢培山,林巧玲.白芍总苷的薄层色谱指纹图谱实验研究[J].中药新药与临床药理,2004,15(3):171.
- [6] 黎阳,刘素香,张铁军,等.枳实的高效液相色谱指纹图谱研究[J].中草药,2009,40(9):1469-1474.
- [7] 赵强,王文燕,张铁军,等.决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J].中草药,2009,40(10):1638-1641.

MSPD-GC 法测定黄芪中 20 种农药残留

沈旭,陈晓辉,果德安,张舒婷,勾萌,毕开顺*

(沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立黄芪中 20 种有机氯和拟除虫菊酯类农药的检测方法。方法 采用基质固相分散-气相色谱法(MSPD-GC),色谱柱为 PH-5 石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm);柱温(程序升温):150 $^{\circ}\text{C}$ 为起始温度,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,再以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 270 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;进样口温度:230 $^{\circ}\text{C}$;ECD 检测器温度:280 $^{\circ}\text{C}$;载气为氮气,测定黄芪中 20 种有机氯和拟除虫菊酯类农药残留量。结果 有机氯和拟除虫菊酯类农药分别在 5~500、10~1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 呈良好线性关系, r 为 0.997 9~0.999 7。平均回收率($n=9$)为 83.6%~110.3% ($\text{RSD}<10\%$)。结论 该方法操作简便快速,可作为中药材中有机氯和拟除虫菊酯类农药残留的测定方法。

关键词:基质固相分散;气相色谱法;黄芪;有机氯;拟除虫菊酯类农药

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)11-1814-04

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根,属根类药材,易被农药污染^[1]。对中药中污染程度较高的有机氯和拟除虫菊酯类农药残留的测定,传统的前处理方法繁琐,且有机试剂消耗量大^[2,3]。基质固相分散法(MSPD)是一种较新的样品前处理技术,可同时完成对样品待测组分的提取和净化,耗时短,溶剂用量少^[4]。已有应用 MSPD 法测定果蔬中农药残留的报道,但在药材中

的应用报道较少,未见到应用 MSPD 法同时测定中药材中有机氯和拟除虫菊酯类农药的报道。本实验采用基质固相分散-气相色谱法(MSPD-GC)对黄芪中残留的 20 种有机氯和拟除虫菊酯类农药进行检测,得到了比较满意的效果。

1 仪器与试剂

Agilent-6890N 毛细管气相色谱仪(美国 Agilent 公司),配⁶³Ni-ECD 检测器,HP COPE 色谱工作站;BP210S 电子天平(Sartorius 公司);玻璃柱(2.5 cm $\times$ 20 cm)。

收稿日期:2009-02-08

作者简介:沈旭(1983—),女,硕士研究生,药物分析专业,研究方向为中药材农药残留研究。

Tel:13591468470 E-mail:shenxv1983@163.com

* 通讯作者 毕开顺 Tel:(024)23986296 E-mail:ksbi@mail.sy.ln.cn