

西洋参药材皂苷类成分 HPLC-UV-ELSD 特征图谱及模式识别研究

董 梁^{1,2}, 张翠英², 陈士林^{2*}

(1. 河南中医学院, 河南 郑州 450003; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 采用 HPLC-UV-ELSD 串联技术, 建立西洋参药材皂苷类成分 HPLC-UV-ELSD 特征图谱的质量控制方法。色谱柱为 Agilent Extend-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水二元梯度洗脱模式, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 203 nm, 漂移管温度为 106.5 °C, 空气流速为 2.9 L·min⁻¹, 对 20 批西洋参药材进行 HPLC-UV-ELSD 测定, 采用聚类分析和主成分分析对特征图谱数据进行了模式识别研究, 并指认了人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 及拟人参皂苷 F₁₁ 等 8 个色谱峰。所建立的西洋参皂苷类成分特征图谱特征性和专属性强, 方法快速、简便、可靠, 可用于西洋参质量控制及综合评价。

关键词: 西洋参; 皂苷类成分; HPLC-UV-ELSD; 特征图谱; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 02-0198-05

HPLC-UV-ELSD characteristic figure and chemical pattern recognition of Panacis Quinquefolii Radix

DONG Liang^{1,2}, ZHANG Cui-ying², CHEN Shi-lin^{2*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: The paper is to report the establishment of a method of characteristic figure analysis for the quality control of Panacis Quinquefolii Radix. Application of HPLC-UV-ELSD techniques was connected in series and applied. The separation was carried out on the Agilent Extend-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of water and acetonitrile with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the wavelength of measurement was 203 nm. The temperature of drift tube was maintained at 106.5 °C and the flow rate of air was set at 2.9 L·min⁻¹. Twenty batches of the Panacis Quinquefolii Radix were determined. Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were applied to study on the HPLC characteristic figure and chemical pattern recognition. The HPLC-UV and HPLC-ELSD characteristic figure of Panacis Quinquefolii Radix was developed, the ginsenosides Rg₁, Re, Rb₁, Rc, Rb₂, Rb₃, Rd and the pseudoginsenoside F₁₁ were identified. This method is accurate and reliable, and it can be used to control the quality of the Panacis Quinquefolii Radix.

Key words: Panacis Quinquefolii Radix; ginsenosides; HPLC-UV-ELSD; chromatographic characteristic figure; hierarchical clustering analysis; principle component analysis

收稿日期: 2010-08-21.

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAI09B02); 中国博士后科学基金 (20080440329).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-62899700, E-mail: slchen@implad.ac.cn

西洋参为五加科植物西洋参 (*Panax quinquefolium* L.) 的干燥根, 具有补气养阴、清热生津的功效, 临床主要用于气虚阴亏、虚热烦倦、咳喘痰血、内热消渴、口燥咽干等症^[1]。西洋参原产于加拿大和美国, 自我国引种栽培成功后, 不但能满足国内西洋参市场需求, 同时还大量出口, 成为全世界第二生产国和第一消费国。西洋参活性成分为人参皂苷类, 目前已报道有 40 种以上^[2]。质量控制是保证临床疗效的有效手段, 《中国药典》2010 年版 (一部) 以活性成分人参皂苷 Rg_1 、 Re 和 Rb_1 作为西洋参的质量控制指标, 难以全面反映其内在质量^[1]。特征图谱是中药质量控制方法的一个研究热点, 能综合反映药材中各主要成分及其相对含量, 所提供的信息更加丰富全面^[3,4]。本实验采用 HPLC-UV-ELSD 法建立了西洋参药材皂苷类成分 HPLC 特征图谱, 并将系统聚类分析与主成分分析应用于该特征图谱的建立, 为全面控制西洋参质量提供了实验依据。

材料与方法

美国 Waters 高效液相色谱仪, 包括 Waters1525 型 HPLC 泵, 2487 型紫外双波长检测器; 717 型自动进样器; Waters In-Line 脱气机, Waters Breeze 工作站。Alltech 2000ES 型蒸发光散射检测器, XWK-III 型无油空气泵, 2500DE 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2004 版) 软件。

人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Rb_3 、 Rd 及拟人参皂苷 F_{11} 对照品购自中国药品生物制品检定所, 纯度大于 98%; 色谱乙腈购自美国 Merck 公司, 色谱甲醇购自美国 Fisher 公司; 水为蒸馏水, 经 ELGA 制水仪得到 (英国, ELGA-PURELAB Classic 型), 用前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。20 批不同产地西洋参药材来源见表 1, 均经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定。

色谱条件与系统适用性 色谱柱 Agilent Extend- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)。流动相 A-乙腈, B-水; 梯度洗脱: 0~15 min, 19% A; 15~20 min, 19%~21% A; 20~35 min, 21%~27% A; 35~55 min, 27%~32% A; 55~70 min, 32%~43% A; 70~85 min, 43%~60% A。柱温 30 $^{\circ}C$, 流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 检测波长 203 nm, 进样量 10 μL , 漂移管温度 106.5 $^{\circ}C$, 空气流速为 2.9 L $\cdot$ min $^{-1}$ 。

Table 1 Sources of *Panax quinquefolii* Radix samples

No.	Source	No.	Source
S1	Qingyuan, Liaoning Prov.	S11	Ning'an, Heilongjiang Prov.
S2	Qingyuan, Liaoning Prov.	S12	Muling, Heilongjiang Prov.
S3	Qingyuan, Liaoning Prov.	S13	Wendeng, Shandong Prov.
S4	Xinbin, Liaoning Prov.	S14	Wendeng, Shandong Prov.
S5	Tonghua, Jilin Prov.	S15	Wendeng, Shandong Prov.
S6	Ji'an, Jilin Prov.	S16	Huairou, Beijing
S7	Fusong, Jilin Prov.	S17	Huairou, Beijing
S8	Fusong, Jilin Prov.	S18	Huairou, Beijing
S9	Jingyu, Jilin Prov.	S19	Canada
S10	Jingyu, Jilin Prov.	S20	Canada

对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Rb_3 、 Rd 及拟人参皂苷 F_{11} 对照品适量, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液 (浓度 0.2 mg $\cdot$ mL $^{-1}$), 备用。

供试品溶液的制备 精密称取西洋参样品粉末 (过 4 号筛) 1 g, 置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称重, 超声提取 30 min, 放置至室温, 用甲醇补足减失的重量, 滤过。精密吸取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中挥去溶剂, 残渣用适量甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液作为供试品溶液。

结果

1 方法学考察

1.1 仪器精密度 取同一供试品溶液 (样品 S16) 连续进样 6 次, 计算各主要色谱峰的相对峰面积和保留时间。结果两种检测器得到的相对峰面积的 RSD 均小于 5%、相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%, 符合特征图谱要求。

1.2 方法精密度 取样品 (S16) 共 6 份, 按供试品溶液制备方法制备供试液, 分别进行 HPLC 测定, 计算各主要色谱峰的相对峰面积和保留时间。结果两种检测器得到的相对峰面积的 RSD 均小于 5%、相对保留时间的 RSD 均小于 1.5%, 说明重现性良好, 符合特征图谱要求。

1.3 样品稳定性 取同一供试品溶液 (样品 S16) 分别在 0、4、8、12、16、20 和 24 h 进样分析, 计算各主要色谱峰的相对峰面积和相对保留时间。结果两种检测器得到的相对峰面积的 RSD 均小于 5%、相对保留时间的 RSD 均小于 0.8%, 说明西洋参样品溶液

在 24 h 内稳定。

2 特征图谱及各项技术参数

2.1 样品测定及共有特征峰的确定 通过对 20 批样品的测定, 应用“中药色谱指纹图谱特征图谱相似度评价系统”(2004 版) 建立西洋参药材皂苷类成分 HPLC-UV-ELSD 特征图谱, 各主要色谱峰的出峰时间基本一致, 分别确定了 UV 和 ELSD 检测条件下峰面积较大的 11 个峰和 7 个峰为其共有色谱峰。西洋参药材皂苷类成分 HPLC-UV 和 HPLC-ELSD 特征色谱图分别见图 1、2。

2.2 20 批西洋参药材特征图谱的分析 从 HPLC-UV 特征图谱中选取峰面积较大、保留时间适中的 3 号峰人参皂苷 Rb₁ 为参照峰 (S), 以其保留时间、峰面积为 1, 计算其余各共有峰的相对保留时间及相对

峰面积。其相对保留时间 (峰面积) 均值分别为: 0.490 (0.098)、0.505 (0.597)、1.000 (1.000)、1.047 (0.241)、1.103 (0.041)、1.121 (0.047)、1.162 (0.044)、1.200 (0.154)、1.254 (0.151)、1.521 (0.040) 和 1.540 (0.035)。同法在 HPLC-ELSD 特征图谱中选取峰面积较大、保留时间适中的人参皂苷 Rb₁ 峰为参照峰 (S), 以其保留时间、峰面积为 1, 计算其余各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。其相对保留时间 (峰面积) 均值分别为: 0.491 (0.012)、0.507 (0.454)、0.864 (0.018)、1.000 (1.000)、1.047 (0.056)、1.199 (0.053) 和 1.253 (0.055)。

3 西洋参质量评价方法的确立

3.1 相似度评价 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 版) 对 20 批样品进行相似度评价,

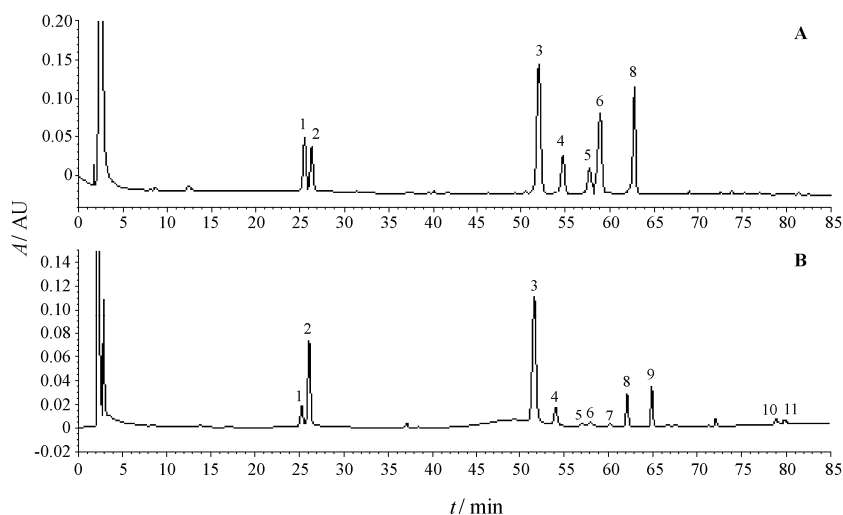


Figure 1 HPLC-UV chromatograms of mixed standards (A) and Panacis Quinquefolii Radix sample (B). 1: Ginsenoside Rg₁; 2: Ginsenoside Re; 3: Ginsenoside Rb₁; 4: Ginsenoside Rc; 5: Ginsenoside Rb₂; 6: Ginsenoside Rb₃; 8: Ginsenoside Rd. Others are unknown

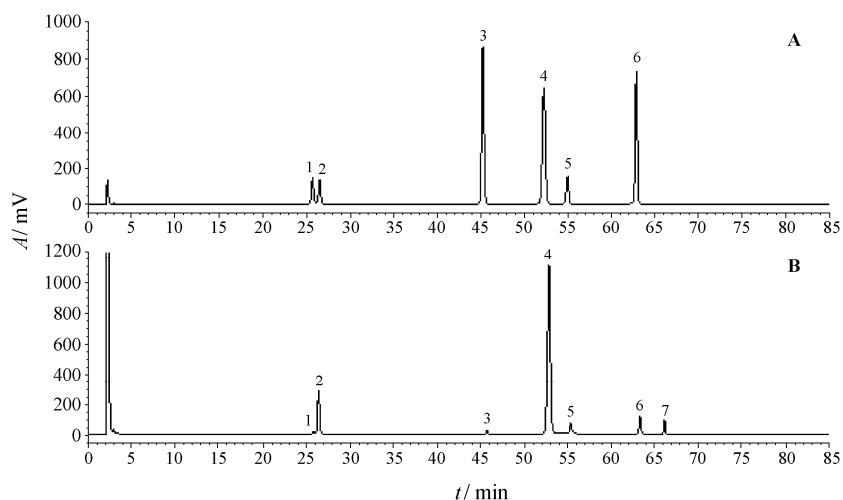


Figure 2 HPLC-ELSD chromatograms of mixed standards (A) and Panacis Quinquefolii Radix sample (B). 1: Ginsenoside Rg₁; 2: Ginsenoside Re; 3: Pseudoginsenoside F₁₁; 4: Ginsenoside Rb₁; 5: Ginsenoside Rc; 6: Ginsenoside Rd; 7: Unknown

以 S19 批西洋参药材色谱图作为参照图谱, 利用中位数法, 时间窗为 0.1 min, 计算西洋参药材共有色谱峰的相似度。两种检测器得到的各批西洋参药材相似度为 0.876~0.996, 表明西洋参药材由于产地、气候等原因, 内在质量存在着一定差异。为进一步评价西洋参各批次样品间的差异, 建立真实可靠的西洋参药材皂苷类成分标准特征图谱, 本实验采用系统聚类分析和主成分分析处理方法对各样品图谱数据进行了化学模式识别的研究。

3.2 系统聚类分析 聚类分析是根据同类样品在空间的距离远近进行聚类, 将 20 批西洋参药材皂苷类成分的 HPLC-UV 特征图谱各色谱峰的峰面积相对药材称样量之比, 即单位质量药材峰面积进行量化, 得到 20×11 阶的原始数据矩阵。运用“SPSS 16.0”软件的 Ward's 法, 欧式距离平方作为样品的测度, 对其进行系统聚类分析。同法将 HPLC-ELSD 特征图谱各色谱峰的数据进行量化后, 得到 20×7 阶的原始数据矩阵, 进行系统聚类分析。HPLC-UV 特征图谱数据系统聚类分析结果见图 3。

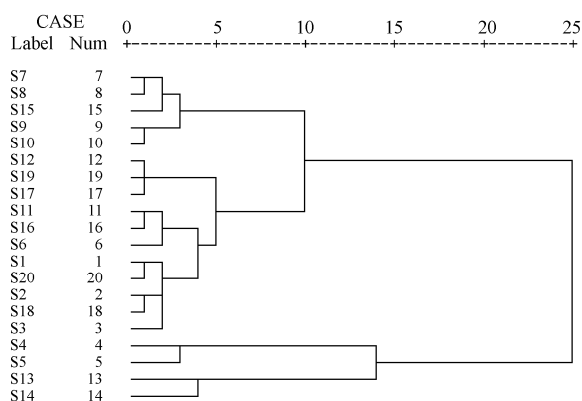


Figure 3 Hierarchical clustering analysis of Panacis Quinquefolii Radix samples based on HPLC-UV data

3.3 主成分分析 将 HPLC-UV 特征图谱 20×11 阶的原始数据矩阵, 应用“SPSS 16.0”进行主成分分析, 以特征值大于 1 为提取标准, 得到基于前 2 个主成分得分图 (图 4)。同法将 HPLC-ELSD 特征图谱 20×7 阶的原始数据矩阵进行主成分分析。结果显示 20 批西洋参样品均被分为 3 组, 故选取质量比较稳定的第 II 组西洋参样品, 用来分别建立西洋参药材皂苷类成分的 HPLC-UV 和 HPLC-ELSD 标准特征图谱。

4 西洋参药材皂苷类成分标准特征图谱的建立

经上述模式识别研究, 选取药材质量比较稳定的 17 批西洋参样品建立西洋参药材皂苷类成分的标

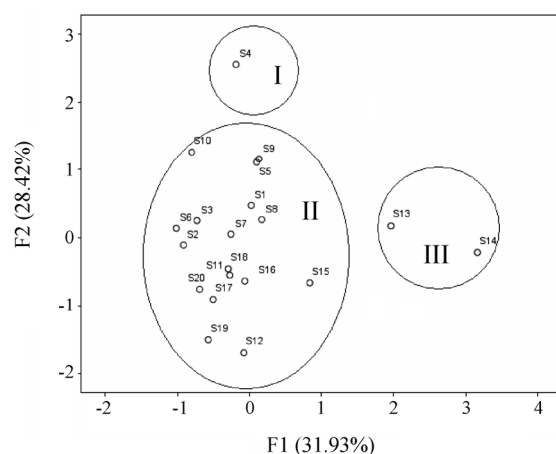


Figure 4 PCA figure of Panacis Quinquefolii Radix based on HPLC-UV data

准特征图谱, 17 批西洋参批号为: S1、S2、S3、S5~S12 和 S15~S20。将 17 批样品 HPLC-UV-ELSD 数据导入“中药色谱指纹图谱特征图谱相似度评价系统”(2004 版), 以 S19 色谱图作为参照图谱, 利用中位数法, 时间窗为 0.1 min, 多点校正生成对照图谱 R, 计算相似度。其结果分别为 0.980、0.933、0.965、0.942、0.966、0.992、0.993、0.972、0.982、0.967、0.979、0.996、0.951、0.978、0.989、0.906 和 0.918。所得 17 批西洋参样品相似度均在 0.90 以上, 符合特征图谱要求。西洋参药材皂苷类成分 HPLC-UV-ELSD 标准特征图谱色谱图分别见图 5、6。

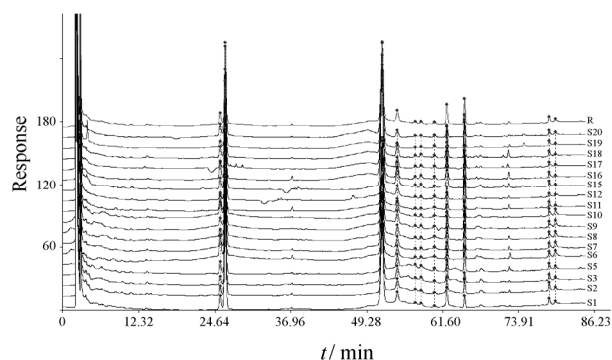


Figure 5 HPLC-UV characteristic figure chromatograms of Panacis Quinquefolii Radix

讨论

实验建立了西洋参药材皂苷类成分 HPLC 色谱特征图谱, 应用于 20 批不同来源西洋参药材的分析。UV 与 ELSD 串联使用, 可以起到相互补充和验证的作用。特别是无紫外吸收的拟人参皂苷 F_{11} 作为与其他人参皂苷类药材区别的主要信息, 用 ELSD 检测器测定更为合适。采用相似度评价软件, 针对色谱图

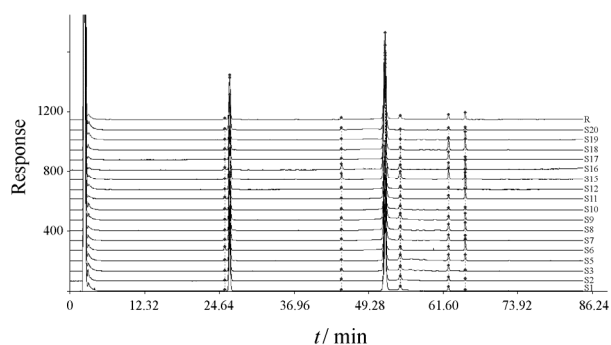


Figure 6 HPLC-ELSD characteristic figure chromatograms of *Panacis Quinquefolii Radix*

中的全部图像信息进行数据处理, 采用化学模式识别来全面反映西洋参药材的质量, 且两种检测方法对西洋参药材所做出的聚类分析与主成分分析结果一致。

本实验应用系统聚类分析和主成分分析两种化学计量学方法, 对西洋参 HPLC 特征图谱的色谱积分数据进行了模式识别的研究。聚类分析选择离差平方和法 (Ward's method) 作为聚类方法、欧氏距离平方 (squared Euclidean distance) 作为测度, 这种聚类方法在特征图谱研究中比较常用^[5, 6]。聚类分析结果表明西洋参样品的确存在差异。主成分分析法是一种减少原始数据变量数目的方法^[7], 对某些样本如银杏制剂添加黄酮类成分、人参与西洋参鉴别等方面起到辅助判断筛查的作用^[8, 9]。本实验西洋参色谱数据的 PCA 图中除第 I、III 类 3 个样品外, 其他样品没有十分明显的区分, 说明各西洋参样品之间既存在差异又存在较程度的相关性。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2010 ed. Part I. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010: 122.
- [2] Teng RW, Ang CS, McManus D, et al. Regioselective acylation of ginsenosides by Novozyme 435. [J]. Tetrahedron Lett, 2003, 44: 5661–5664.
- [3] Zhou YL, Yan H, Zhong XQ, et al. Fingerprint of hydrophobic components in *Smilax china* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2008, 39: 1246–1248.
- [4] Liu EH, Cai GM, Zhu HS, et al. HPLC fingerprint of *Bupleurum smithii* var. *parvifolia* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2008, 39: 1560–1562.
- [5] WU H, Tian YH, Guo PP. Application of multivariate statistics analysis in HPLC fingerprint of Shenmai injection [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2002, 24: 3–6.
- [6] Liu YF, Yang XW. HPLC fingerprint of chemical constituents of *Flos Farfarae* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 510–514.
- [7] Zhou X, Liang HM, Feng YF. Study on TLC specific (fingerprint) spectrum of *Alpinia officinarum* Hance [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2005, 25: 916–919.
- [8] Xie PS, Chen SB, Liang YZ, et al. Chromatographic fingerprint analysis – a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine [J]. J Chromatogr A, 2006, 1112: 171–180.
- [9] Yap KYL, Chan SY, Lim CS. The reliability of traditional authentication – a case of ginseng misfit [J]. Food Chem, 2008, 107: 570–575.