

人参药材皂苷类成分 UPLC 特征图谱的质量评价方法

张翠英¹, 董 梁², 陈士林^{1*}, 谢彩香¹, 常断铃²

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

摘要: 建立人参药材皂苷类成分超高效液相色谱 (UPLC) 特征图谱的质量评价方法。以人参药材为研究对象, 采用 RP-UPLC 法, 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm), 乙腈-水二元梯度洗脱模式, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 检测波长为 203 nm, 建立了 11 批不同产地人参药材皂苷类成分 UPLC 特征图谱。特征图谱有 15 个共有色谱峰, 并采用对照品指认了其中的 9 个色谱峰。对不同产地的人参皂苷类成分特征图谱进行聚类分析和主成分分析, 并用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004B 版)”对其质量进行了评价。所建立的人参皂苷类成分的特征图谱特征性和专属性强, 且该方法快速、简便、可靠, 可用于全面控制人参的质量。

关键词: 人参; 皂苷类成分; 特征图谱; 超高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1296-05

UPLC fingerprint for quality assessment of ginsenosides of Ginseng Radix et Rhizoma

ZHANG Cui-ying¹, DONG Liang², CHEN Shi-lin^{1*}, XIE Cai-xiang¹, CHANG Duan-ling²

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

Abstract: This paper is aimed to establish the method of fingerprint analysis of chemical constituents by reversed-phase ultra-performance liquid chromatography (UPLC) for the quality control of the roots and rhizomes of *Panax ginseng* (Ginseng Radix et Rhizoma). The method was performed on a ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm) with a mixed mobile phase of water and acetonitrile in a gradient mode. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹ and the wavelength of measurement was 203 nm. Eleven batches of the Ginseng Radix et Rhizoma were determined. The UPLC chromatographic fingerprints of chemical constituents were established from the eleven batches of the Ginseng Radix et Rhizoma and showed fifteen characteristic common peaks, among which fifteen peaks were recognized and nine compounds (ginsenosides Rg₁, Re, Rf, Rg₂, Rb₁, Rc, Rb₂, Rb₃ and Rd) were determined by comparison with chromatographic behaviors and UV spectra of the authentic compounds. The eleven batches of samples were classified as two clusters by hierarchical clustering analysis (HCA) and principle component analysis (PCA), and six samples were confirmed to establish the mutual model. The quality was assessed by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (2004B Version). The convenient and high specific method can be used to identify and evaluate the quality of the Ginseng Radix et Rhizoma.

Key words: Ginseng Radix et Rhizoma; ginsenoside; chromatographic fingerprint; ultra-performance liquid chromatography

收稿日期: 2010-03-19.

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

人参来源于五加科人参属植物人参 (*Panax ginseng* C.A. Mey.) 的干燥根及根茎, 具有大补元气、固脱生津、安神等功效^[1], 在临床上应用非常广泛。文献^[2]记载人参的引种栽培历史悠久, 自然环境的恶化、滥采滥挖严重破坏了人参赖以生存的生态环境, 目前人参主要分布于辽宁东部、吉林东半部和黑龙江东部。人参皂苷是人参的主要活性成分, 其中人参皂苷 Rb₁、Re 和 Rg₁ 作为人参含量较高的主要活性成分, 《中国药典》2010 年版 (一部) 通过对这 3 种皂苷的最低含量限定来控制人参药材的质量^[1]。但人参中人参皂苷的种类繁多、药理活性各异, 仅以 3 种人参皂苷为指标来控制人参药材的质量难以全面反映其质量的优劣。

中药特征图谱是中药整体性的化学表征, 该项研究是近年来中药质量控制方法的一个研究热点, GC-MS、HPLC、CE 和 TLC 等技术在中药特征图谱研究方面已经取得了很大的进展。目前, 人参的特征图谱研究包括 HPTLC、HPLC、CE、NMR、FT-IR 和 X 衍射等多方面色谱、光谱手段探究人参的质量控制^[3-9], 比较来讲, HPLC 法具有高效、快速、灵敏、重现性好、应用范围广等特点, 已成为中药色谱特征图谱研究的首选方法。但人参皂苷类成分结构差异在糖的位置、数量, 极性非常相近而难以达到很好的分离, 导致色谱分析时间长达 80 min 以上, 特别是人参的特征图谱^[4]。超高效液相色谱 (ultra-performance liquid chromatography, UPLC) 是一种新的液相色谱技术, 该技术突破了传统 HPLC 的系统耐压 6 000 psi 而达到 15 000 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa), 并采用 1.7 μm 的小粒径作为色谱柱填料, 极大地提高了分离速度、分析灵敏度, 缩短了分析时间。本文采用二元梯度洗脱模式, 建立了人参药材的 UPLC 特征图谱和质量评价方法, 11 批不同产地的人参样品均得到了较好的分离; 同时应用 SPSS16.0 软件对数据结果进行系统聚类分析和主成分分析, 并采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2004 版) 软件对不同产地人参进行质量评价, 取得了比较理想的分析结果, 为人参药材的质量评价提供了依据。

材料与方法

仪器与试剂 美国 Waters Acquity UPLC 色谱仪系统, 包括二元超高压泵系统、样品管理系统、PDA 检测器、柱温箱, Waters Empower 色谱工作站。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 Rg₁、Re、Rf、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃ 和 Rd 对照品购自中国药品生物制品检定所, 纯度大于 98%。色谱用乙腈购自美国 Merck 公司, 色谱用甲醇购自美国 Fisher 公司, 水为蒸馏水经 ELGA 制水仪得到 (英国, ELGA-PURELAB Classic 型), 用前经 0.2 μm 微孔滤膜过滤。11 批人参药材直接从产地收集, 经中国医学科学院药用植物研究所林余霖教授鉴定。所有生药样品凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所标本室。

色谱条件与系统适用性 色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm)。柱温 30 °C, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm, 进样量 2 μL。流动相 A 为乙腈, B 为水; 梯度洗脱: 0→3 min, 19% A; 3→4 min, 19%→21% A; 4→5 min, 21%→26% A; 5→9 min, 26%→27% A; 9→12 min, 27%→32% A; 12→15 min, 32%→43% A; 15→18 min, 43%→60% A; 18→20 min, 100% A。以人参皂苷 Rf (色谱峰 5) 计算理论塔板数不低于 63 000。

对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃ 和 Rd 对照品适量, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 备用。

供试品溶液的制备 精密称取人参样品粉末 (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, 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 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 滤液作为供试品溶液。

方法学考察

精密度 取样品 (S3) 共 6 份, 按供试品溶液制备方法制备供试液, 分别进行 UPLC 测定, 计算各色谱峰 (单峰面积大于 5% 总峰面积) 与参比峰 (峰 5) 的相对峰面积和保留时间。结果相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.25%, 说明重现性良好, 符合特征图谱要求。

样品稳定性 将样品 (S3) 供试品溶液分别在 0、4、8、12、16、20 和 24 h 进样分析, 计算各色谱峰 (单峰面积大于 5% 总峰面积) 的相对峰面积和相对保留时间。结果相对峰面积的 RSD 均小于 4%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.15%, 说明人参样品溶液在 24 h 内稳定。

数据处理 选择离差平方和法 (Ward's method) 为聚类方法、欧氏距离平方法 (squared Euclidean

distance) 为测量距离方法进行聚类分析, 将 11 批不同产地人参样品的 UPLC 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 11×15 阶的数据矩阵, 应用 SPSS (版本 16.0) 软件得聚类谱系图。对于聚为一组的人参药材质量, 可进一步应用化学模式识别方法进行主成分分析。

结果

1 人参药材 UPLC 特征图谱的建立

通过对 11 批样品的测定, 确定在 11 批人参特征图谱中出峰时间基本一致、峰面积较大 15 个峰为共有特征色谱峰, 可以较为全面地反映人参的内在质量。特征峰的选取原则为: 主要的特征峰与相邻峰的分离度达到 1.5 以上, 其他特征峰也达到一定分离, 峰尖到峰谷的距离至少大于该峰高的 2/3 以上, 如果未达到, 则两个峰可以合并为一个峰计算^[10]。样品 (11 号) 特征色谱图的色谱峰情况见图 1A。各样品中的共有峰 4 均为双峰, 其中峰 1、2、5 和 9 的峰面积较大。

在相同的色谱条件下, 将人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃ 和 Rd 对照品混合溶液进样分析, 并与样品特征图谱中相应色谱峰进行比较, 确定样品特征图谱中的峰 1、2、5、7、9、10、12、13 和 14 分别为人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃ 和 Rd, 见图 1。

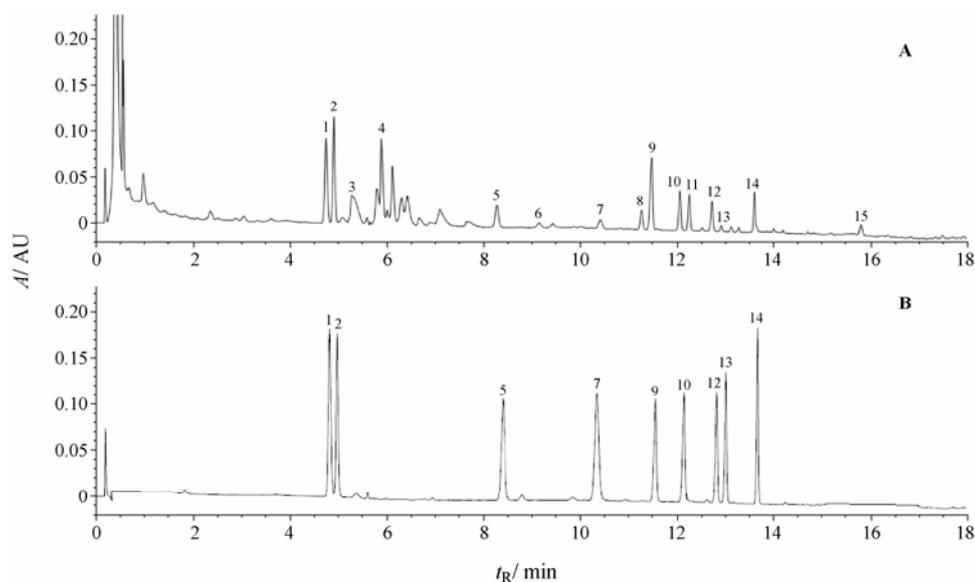


Figure 1 UPLC chromatogram of standardized chromatographic fingerprint of *Panax ginseng* sample (A) and mixed standards (B). 1: Ginsenoside Rg₁; 2: Ginsenoside Re; 5: Ginsenoside Rf; 7: Ginsenoside Rg₂; 9: Ginsenoside Rb₁; 10: Ginsenoside Rc; 12: Ginsenoside Rb₂; 13: Ginsenoside Rb₃; 14: Ginsenoside Rd

2 人参质量评价方法的确立

2.1 系统聚类分析 11 批人参样品被分为 2 组, 聚类谱系图见图 2。

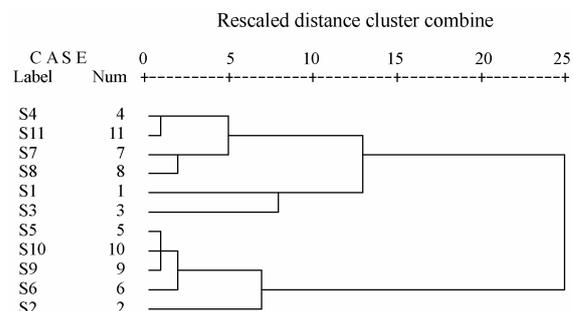


Figure 2 The results of dendrograms analysis. Dendrograms resulting from average linkage within groups hierarchical cluster analysis. The hierarchical clustering was done by SPSS software. A method named as Ward's method was applied, and squared Euclidean distance was chosen as measurement

2.2 主成分分析 以特征值大于 1 为提取标准, 得到 2 个主成分, 累积贡献率达到 64.49%, 得到基于前 2 个主成分得分图 (图 3)。主成分分析的贡献, PC1 为 37.46%, PC2 次之为 27.03%, 其他的贡献率较小, 累积贡献率为 64.49%。根据主成分分析原理, 取前 2 个为主成分基本可以说明各指标的所有信息。由特征向量表可以看出, PC1 主要反映了原始指标的 2 号色谱峰 (人参皂苷 Re)、7 号色谱峰 (人参皂苷 Rg₂) 和 15 号色谱峰, PC2 主要反映了原始指标的 8 号色谱峰和 11 号色谱峰的信息。从图 3 可见 11 批人参样品被

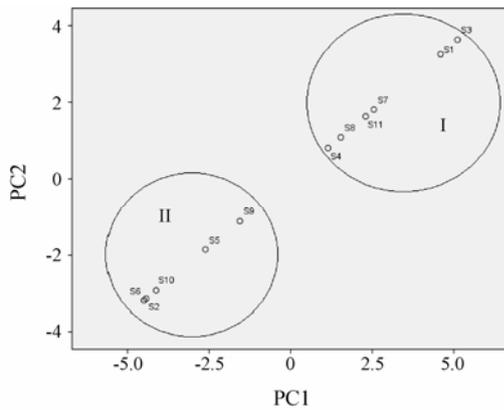


Figure 3 Scores plot of PCA of *Panax ginseng* samples from various sources on the first two principal components (PC1 and PC2). This plot of PCA on the first two PCs with the original peak areas of the 15 common compounds as input data was obtained using software of SPSS (Version 16.0). The labels of the sample refer to Table 1

分为 2 组, 其分组结果与聚类分析结果相一致, 结果显示第 I 组的 6 批人参样品 (编号 S3、S1、S7、S11、S8 和 S4) 的质量好于第 II 组的 5 批人参样品 (编号 S9、S5、S10、S6 和 S2)。

2.3 特征图谱相似度评价 结合聚类分析和主成分分析结果, 选取药材质量较好的第 I 组 6 批样品 (编号 S1、S3、S4、S7、S8 和 S11) 建立共有模式。将 6 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版”(2004 A 版), 选取“时间窗宽度”为 0.10 min, 对照图谱的生成方法为“中位数”, 自动匹配后, 得到“对照图谱”, 继而得到样品与对照图谱的匹配图 (图 4)。再将对照图谱和 11 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统检验版”(2004 B 版), 软件可计算出样品与对照品图谱的相似度数据 (表 1)。若相似度在 0.9 以上, 则判定为

优质药材; 若相似度在 0.7~0.9, 则药材质量一般; 若相似度低于 0.7, 则判定为伪品, 11 批人参药材未见伪品, 相似度的分析结果与专家对药材的鉴定结果一致。药材的质量与产地、环境密切相关, 其主要表现为化学成分上的差异。11 批次人参样品中, 相似度较低的样品色谱图有 S2、S6 和 S9, 这 3 批样品被判定为质量一般, 这与主成分分析的结果一致, 其原因可能与采样地的土壤、气候等生态因子相关。但具体由哪些生态因子引起而导致化学成分上的变化, 还需要再做进一步的研究探讨。

Table 1 The similarity evaluation results of *Panax ginseng* from different habitats. $n = 2$

Sample No.	Source	Similarity
S1	Qingyuan, Liaoning Prov.	0.925
S2	Kuandian, Liaoning Prov.	0.820
S3	Huanren, Liaoning Prov.	0.913
S4	Xinbin, Liaoning Prov.	0.943
S5	Tonghua, Jilin Prov.	0.906
S6	Ji'an, Jilin Prov.	0.793
S7	Jingyu, Jilin Prov.	0.918
S8	Dunhua, Jilin Prov.	0.965
S9	Huichun, Jilin Prov.	0.843
S10	Wangqing, Jilin Prov.	0.944
S11	Ning'an, Heilongjiang Prov.	0.895

讨论

UPLC 技术应用于人参药材的特征图谱研究, 检测仅需 18 min, 比 HPLC 方法^[4]缩短了分析时间, 同时也提高了分离度和灵敏度, 减少了流动相的消耗。

采用二极管阵列检测器对样品进行全波长扫描, 考察不同吸收波长图谱分离情况及信号强度, 重点考察了 190、195、200、203 和 210 nm 处的图谱特征。

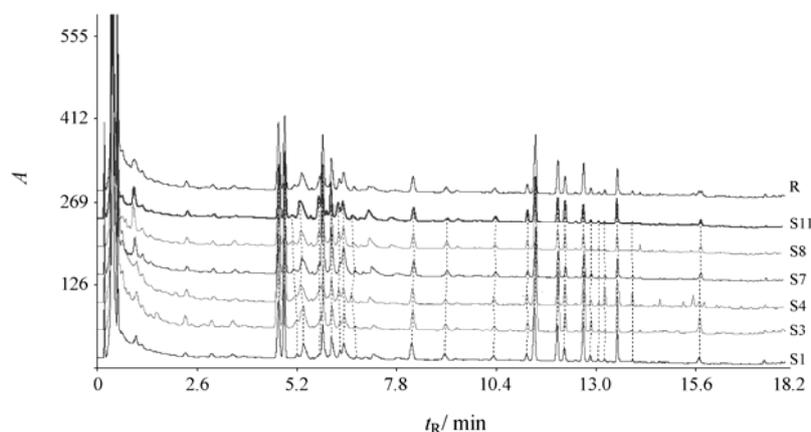


Figure 4 The chromatographic peaks matching result of *Panax ginseng* from different habitats. S1, S3, S4, S7, S8 and S11 were samples listed in Table 1. R was the reference

结果表明 203 nm 处人参皂苷类活性成分色谱峰具有较好的紫外末端吸收, 色谱峰强度较高, 基线平稳, 且其他峰干扰较小, 故选择该波长作为检测波长。

采用甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、50%乙醇及水饱和正丁醇作为提取溶剂, 冷浸、索氏提取、加热回流和超声提取 4 种提取方法以及不同提取时间对比同一人参药材样品的提取效果。结果表明, 甲醇作为提取溶剂、超声提取 30 min 的提取效率最高, 谱图中的色谱峰特征性较强, 分离度高。

本文选择的聚类方法在特征图谱研究中比较常用^[10, 11], 文中应用此方法所做的聚类结果与生药鉴别专家对人参药材质量进行分级的结果一致, 其分析结果侧重于各药材之间化学成分“量”的差异, 说明聚类分析不但适合于药材产地的区分及不同生产工艺的判别^[11, 12], 同时也适合药材不同等级、规格的鉴定^[13]。主成分分析是研究如何将多指标转化为新的既彼此互不相关, 具有较强的信息凝聚能综合指标。文中将 11 批不同产地的人参药材 15 个共有峰的单位质量峰面积作为变量, 进行的主成分分析结果与聚类分析结果基本一致。由此可见, 在人参特征图谱的研究中, 聚类分析可以对不同产地人参药材做出初步分组, 而主成分分析又能进一步验证聚类分析结果的准确性, 并对药材的优劣进行初步评价, 为建立品质优良药材的共有模式而选定具有代表性的药材提供依据。

在利用色谱特征图谱评价中药质量的过程中, 如何建立共有模式极为重要。本文结合聚类分析和主成分分析的结果, 选取了 6 批具有代表性的人参药材建立共有模式, 保证了共有模式建立的代表性和科学性。11 批不同产地人参药材的相似度分析结果表明, 不同产地的人参药材特征图谱相似度较高, 基本大于 0.9, 说明不同产地人参药材的化学组成较一致, 但还应注意注意到各色谱峰的相对峰面积存在着一定的差别。因此, 在生产人参相关制剂产品时, 人参的来源对于控制人参药材及其相关制品质量的稳定性具有重要意义。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人们共和国药典) [S]. 2010 ed. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 8.
- [2] The Editorial Board of Flora of China. Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol 54. Beijing: Science Press, 1978: 180-181.
- [3] 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.
- [4] Zeng F, Wang XM, Yang M, et al. Fingerprint analysis of different *Panax* herbal species by HPLC-UV method [J]. J Chin Pharm Sci, 2007, 16: 277-281.
- [5] Qiu X, Jia XB, Ye YD, et al. The study on fingerprint of Compound Ginseng Injection by powder X-ray diffraction. [J]. J Chin Med Mater (中草药), 2003, 26: 552-554.
- [6] Qiu X, Jia XB, Chen L, et al. Study of fingerprint of Compound Renshen Injection by NMR [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2004, 26: 173-174.
- [7] Yan Z, Wang CY, Wan RY, et al. Fingerprint chromatogram of Ginseng by HPCE [J]. J Hebei Univ (Nat Sci Edit) (河北大学学报·自然科学版), 2009, 29: 55-60, 64.
- [8] Wang Q, Cheng Z, Zhang L, et al. Distinguishing wild *Panax ginseng* from cultivated *Panax ginseng* based on direct amplification of length polymorphism (DALP) analysis [J]. J Fudan Univ (Nat Sci Edit) (复旦学报·自然科学版), 2004, 43: 1030-1034.
- [9] Liu D, Li YG, Xu H, et al. Differentiation of the root of cultivated Ginseng, mountain cultivated Ginseng and mountain wild Ginseng using FT-IR and two-dimensional correlation IR spectroscopy [J]. J Mol Struct, 2008, 883-884: 228-235.
- [10] Wang TT, Chen XH, Hu QQ, et al. RP-HPLC fingerprint for quality assessment of Radix Angelicae dahuricae [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 747-751.
- [11] Zhao G, Du W, Wei YH, et al. HPLC-ELSD fingerprints of Yinhuang preparations [J]. Chin Tradit Herbal Drugs (中草药), 2009, 40: 1053-1056.
- [12] Hu HS, Yu YY, Wan CH, et al. The HPLC fingerprint of Flos Loniceræ and clustering analysis [J]. J Nanchang Univ (Natural Science) (南昌大学学报·理科版), 2009, 33: 253-256.
- [13] Wu YY, Shang MY, Cai SQ. HPLC fingerprint of the components of Radix Angelicae Sinensis. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 728-732.