

西洋参 UPLC-UV-ELSD 指纹图谱研究

王欢^{1,2}, 曾凡琳¹, 谢彩香^{1*}

1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100193

2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 采用 UPLC-UV-ELSD 法研究 6 个产地 28 个批次西洋参药材, 对不同产地西洋参采用指纹图谱聚类分析、主成分分析(PCA)及相似度评价等技术进行研究, 为西洋参药材的品质评价及生产区划提供参考。方法 采用 Waters Acquity UPLC 色谱系统, TUV 检测器, ELSD 检测器, 色谱柱为 ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈-水进行二元梯度洗脱, 检测波长 203 nm, 柱温 30 °C, 漂移管温度为 50 °C, 喷雾器参数 50%, 氮气压力为 275.8 kPa (40 psi)。结果 建立了西洋参的 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 标定 12 个共有峰, 采用 10 个对照品指认了 10 个共有峰, PCA 分析结果显示, 北京、吉林、黑龙江地区的西洋参中人参皂苷 Rg₁、Re、Rc、Rb₂、Rb₃ 等成分要区别于美国、山东、陕西地区的西洋参; 而美国、山东、陕西产区西洋参中人参皂苷 Rg₂、Rb₁、Rd 区别于北京、吉林、黑龙江地区。结论 所建立色谱条件稳定性及重复性良好, 可为西洋参药材的质量评价及质量控制提供依据。

关键词: 西洋参; UPLC-UV-ELSD; 指纹图谱; 系统聚类分析; PCA; 质量评价; 人参皂苷

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)01-0143-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.022

Study on UPLC-UV-ELSD fingerprint for roots of *Panax quinquefolius*

WANG Huan^{1,2}, ZENG Fan-lin¹, XIE Cai-xiang¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To establish a method of UPLC-UV-ELSD fingerprint and chemical pattern recognition which could provide a reliable evidence for the scientific evaluation and quality control for the roots of *Panax quinquefolius*, based on clustering analysis, principal component analysis, and similarity assessment techniques. **Methods** The chromatographic separation was achieved on Waters Acquity UPLC system, TUV detector, and ELSD detector, performed on Acquity UPLC™ BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and gradient eluted with acetonitrile-water, and the column temperature was maintained at 30 °C; The detection wavelength was set at 203 nm; The temperature of drift tube was maintained at 50 °C, sprayer parameter was 50%, and nitrogen pressure was 275.8 kPa. The common mode of UPLC fingerprint for the roots of *P. quinquefolius* was set up. There were 12 common peaks in the fingerprints, with 10 reference substance identified ten common peaks, the PCA analysis showed that ginsenosides Rg₁, Re, Rc, Rb₂, and Rb₃ in the roots of *P. quinquefolius* in Beijing, Jilin, and Heilongjiang regions distinguish from the United States, Shandong and Shaanxi, while ginsenosides Rg₂, Rb₁, and Rd conversely. **Conclusion** This method has the advantages of high reproducibility and stability, and it can be used to control the quality of the roots in *P. quinquefolius*.

Key words: *Panax quinquefolius* L.; UPLC-UV-ELSD; fingerprint; system clustering analysis; PCA; quality evaluation; ginsenosides

收稿日期: 2015-09-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目: 人参药材中人参皂苷地理变异气候特征研究 (81473304); 国家“十二五”科技支撑课题: 毕节市喀斯特山区中药材生态适宜性区划关键技术研究 (2015BAI05B01); 吉林省科技成果转化计划: 基于 GIS 的吉林省人参精细区划构建及生产布局研究 (20130305047YY)

作者简介: 王欢 (1988—), 女, 硕士研究生在读, 主要从事中药质量标准及产地适宜性方面的研究。

Tel: (010)57833198 E-mail: huan92j@126.com

***通信作者** 谢彩香, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为药用植物空间分布及生态适宜性研究。

Tel: (010)57833198 E-mail: caixiangxie@163.com

西洋参为五加科(Araliaceae)植物西洋参 *Panax quinquefolius* L. 的干燥根, 味苦, 性凉, 具有补肺阴、清火、养胃生津之功效^[1], 主产于美国、加拿大、法国, 目前我国已引种栽培多年^[2], 形成了吉林、黑龙江、北京、山东、陕西等栽培区, 皂苷类成分是西洋参中主要活性物质, 现代药理学研究表明皂苷类成分具有抗动脉粥样硬化、抗疲劳、增强记忆和提高学习能力的作用。综合文献报道发现, 人参皂苷 Rg₁、Re、Ro、F₁₁、Rh₁、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 为西洋参质量分数较高的 11 种皂苷, 其质量分数占总皂苷的 90%以上^[3]。皂苷类成分为紫外检测器的末端吸收成分, 易出现基线漂移现象。利用 HPLC-ELSD 检测西洋参中人参皂苷类成分有一定报道^[4-6], 但 UPLC 方法明显减少了分析时间及溶剂使用量, 提高了灵敏度和分离效率^[7]。本实验对不同产地 28 个批次的西洋参中 10 种人参皂苷的量进行测定比较, 并建立一种同时测定西洋参中人参皂苷 Rg₁、Re、Ro、F₁₁、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 的 UPLC 法, 进一步采用相似度分析(SA)、聚类分析(HCA)及主成分分析(PCA)等化学计量学方法对指纹图谱的测定结果进行了深入分析。结果显示, 不同产地西洋参的皂苷类成分存在差异, UPLC-UV-ELSD 指纹图谱结合化学计量学分析可用于不同产地西洋参药材的质量评价。

1 仪器与材料

1.1 仪器

美国 Waters Acquity TM UPLC 色谱系统, 包括二元超高压泵系统(ACQUITY UPLC Binary Solvent Manager)、样品管理器(ACQUITY UPLC Sample Manager)、TUV 检测器(ACQUITY UPLC TUV Detector)、ELSD 2420 蒸发光散射检测器(ACQUITY UPLC ELS Detector)、柱温箱以及 WATERS Empower 2 色谱工作站、电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司, AL204-IC)、高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, KQ-400KDE)、高纯氮气发生器(北京京高气体有限公司)。

1.2 材料

色谱乙腈(美国, MERCK 公司), 色谱甲醇(美国, Fisher 公司), 超纯水(法国, Milli-Q Advantage A10 超纯水系统); 人参皂苷 Rg₁(批号 110703-201128)、人参皂苷 Re(批号 110754-201324)、人参皂苷 Rb₁(批号 110704-201223)、人参皂苷 Rc(批号 11021-14-0)、人参皂苷 Rb₂(批号 111715-201203)、人参皂苷 Rb₃

(批号 11686-201203)、人参皂苷 Rd(批号 111818-201302)对照品购自中国食品药品检定研究院; 对照品人参皂苷 Ro(批号 131102)、人参皂苷 F₁₁(批号 131125)、人参皂苷 Rg₂(批号 131115)购自成都普菲德生物技术有限公司, 质量分数大于 98%。

西洋参样品材料于 2012 年 9 月至 2013 年 10 月间根据主产区及近年新增种植区, 直接从产地采集共计 28 批西洋参药材(表 1), 经中国医学科学院药用植物研究所谢彩香教授鉴定, 所有生药样品凭证标本存于中国医学科学院药用植物研究所标本室。

表 1 西洋参药材样品来源

Table 1 Origins of *P. quinquefolius* roots

编号	来源	编号	来源
S1	北京杨宋 1	S15	黑龙江宁安 3
S2	北京杨宋 2	S16	黑龙江逊克
S3	北京杨宋 3	S17	美国威斯康星州 1
S4	北京杨宋 4	S18	美国威斯康星州 2
S5	吉林安图 1	S19	美国威斯康星州 3
S6	吉林珲春 1	S20	美国威斯康星州 4
S7	吉林汪清	S21	山东文登 1
S8	吉林长白 1	S22	山东文登 2
S9	吉林长白 2	S23	山东文登 3
S10	吉林珲春 2	S24	山东文登 4
S11	吉林安图 2	S25	陕西留坝 1
S12	吉林抚松	S26	陕西留坝 2
S13	黑龙江宁安 1	S27	陕西留坝 3
S14	黑龙江宁安 2	S28	陕西留坝 4

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 柱温 30 °C。ACQ-TUV 检测波长 203 nm, ACQ-ELSD 检测器: 增益 100, 喷雾器为加热模式, 动力级别 50%, 漂移管温度 50 °C, 气体压力 275.8 kPa (40 psi)。进样量 5 μL, 样品温度 30 °C。流动相为乙腈和水, 梯度洗脱条件见表 2。每一进样针结束后均以弱洗(乙腈-水 2:8)600 μL、强洗(乙腈-水 8:2)200 μL 清洗进样针。

2.2 混合对照品制备

精密称定人参皂苷 Rg₁、Re、Ro、F₁₁、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 共计 10 种对照品适量, 置于 5 mL 量瓶中, 用色谱纯甲醇溶解后稀释定容至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 2 °C 冰箱贮存备用。

表 2 流动相梯度洗脱条件

时间/min	体积流量/(mL·min ⁻¹)	乙腈/%	水/%
0.0	0.4	18.0	82.0
3.0	0.4	18.0	82.0
6.0	0.4	19.0	81.0
8.0	0.4	21.0	79.0
8.5	0.3	27.0	73.0
8.8	0.3	28.0	72.0
9.0	0.3	28.5	71.5
13.0	0.3	28.6	71.4
14.0	0.3	28.8	71.2
15.0	0.3	28.9	71.1
16.0	0.3	29.0	71.0
17.0	0.3	29.9	70.1
18.0	0.3	30.0	70.0
19.0	0.3	31.0	69.0
20.0	0.3	32.0	68.0
21.0	0.3	32.0	68.0
23.0	0.3	43.0	57.0
24.0	0.3	60.0	40.0
25.0	0.3	80.0	20.0
26.0	0.3	100.0	0.0

2.3 供试品溶液的制备

精密称取西洋参样品粉末(过四号筛) 1 g, 置具塞的三角瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞并称质量, 浸泡 4 h, 超声提取 30 min, 放置至室温后, 重新称质量, 用甲醇补足损失的质量, 滤过, 取续滤液并用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

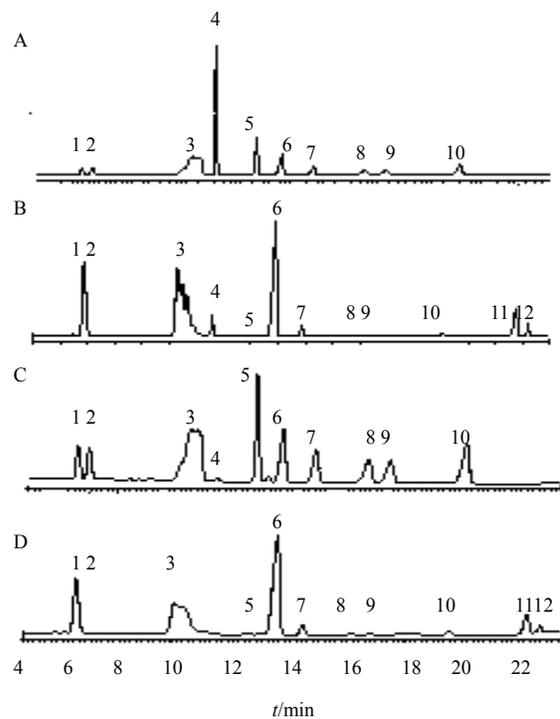
2.4.1 精密度试验 取样品(S4)供试品溶液连续进样 6 次, 按样品分析条件项 UPLC 色谱条件测定, 计算各主要色谱峰的相对峰面积和保留时间。结果相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%, 符合指纹图谱要求。

2.4.2 稳定性试验 将样品(S4)供试品溶液分别在 0、4、8、12、16、20、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。结果相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.6%, 说明西洋参样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取样品(S4)共 6 份, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 分别进行 UPLC 测定, 计算各主要色谱峰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 1.5%, 说明重复性良好, 符合指纹图谱要求。

2.5 指纹图谱的建立及共有指纹峰的确定

通过对 28 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 UPLC-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 12 个峰, 其中 11 个峰为其共有色谱峰, 西洋参药材皂苷类成分 UPLC-ELSD 和 UPLC-UV 特征色谱图见图 1。在相同的色谱条件下, 测定人参皂苷 Rg₁、Re、Ro、F₁₁、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 对照品混合溶液, 并与样品指纹图谱中相应色谱峰进行比较, 确定样品指纹图谱中的 1~10 号峰分别为人参皂苷 Rg₁、Re、Ro、F₁₁、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 色谱峰。



1-人参皂苷 Rg₁ 2-人参皂苷 Re 3-人参皂苷 Ro 4-人参皂苷 F₁₁
 5-人参皂苷 Rg₂ 6-人参皂苷 Rb₁ 7-人参皂苷 Rc 8-人参皂苷 Rb₂
 9-人参皂苷 Rb₃ 10-人参皂苷 Rd 11-未知成分 1 12-未知成分 2
 1-ginsenoside Rg₁ 2-ginsenoside Re 3-ginsenoside Ro 4-ginsenoside F₁₁
 5-ginsenoside Rg₂ 6-ginsenoside Rb₁ 7-ginsenoside Rc 8-ginsenoside Rb₂
 9-ginsenoside Rb₃ 10-ginsenoside Rd 11-unknown ingredient 1
 12-unknown ingredient 2

图 1 UPLC-ELSD 检测对照品 (A)、样品 (B) 和 UPLC-UV 检测对照品 (C)、样品 (D) 色谱图

Fig. 1 UPLC-ELSD chromatogram of reference substances (A) and sample 25 (B), and UPLC-UV chromatogram of reference substances (C) and sample (D)

2.6 相似度分析

本研究利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版)”对28批样品进行相似度评价,以S21批西洋参药材色谱图作为参照图谱,基于中位数法,时间窗设置为0.1min,通过多点校正生成对照图谱(R),计算多个批次西洋参药材共有色谱峰的相似度。由相似度评价结果可知,S5~S12批次的西洋参样品相似度较差,其他批次西洋参药材的相似度为0.766~0.904,表明吉林产区西洋参药材具有多样化特点,内在质量存在着一定差异。

2.7 系统聚类分析

将28批西洋参药材皂苷类成分的UPLC指纹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,得到的原始数据矩阵,运用“SPSS 16.0”软件对其进行系统聚类分析,采用组间联接,欧式距离平方法,聚类分析结果将28批西洋参样品分为2类,其中ELSD分析结果显示吉林地区聚为一大支,陕西、山东、美国样品聚为一小支,北京、黑龙江样品聚为一小支,并聚为一大支;UV聚类分析结果显示,陕西、北京、黑龙江聚为一大支,美国、山东、吉林聚为一大支(图2)。

2.8 28批西洋参药材特征图谱的PCA分析

从UPLC-ELSD特征图谱和UPLC-UV特征图谱中选取峰面积较大的皂苷类成分(人参皂苷Rg₁、Re、Ro、F₁₁、Rg₂、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、未知1、未知2)进行主成分分析(图3),28批西洋参样品中ELSD峰面积PCA分析载荷图结果中,第一主成分中人参皂苷Rg₁、Re、Rc、F₁₁、Rb₃贡献值最大,为ELSD检测法主要特征性成分;UV峰面积PCA分析载荷图结果中,第1主成分中人参皂苷Rg₁、Re、Rc、Rb₂、Rb₃贡献值最大,为UV检测法主要特征性成分。结合PCA载荷图及PCA散点图(图4)结果显示,人参皂苷Rg₁、Re、Rc、Rb₂、Rb₃的贡献值最大,北京、吉林、黑龙江地区的西洋参中Rg₁、Re、Rc、Rb₂、Rb₃等皂苷类成分要区别于美国和山东、陕西地区的西洋参;而人参皂苷Rg₂、Rb₁、Rd则对美国和山东、陕西产区的贡献值大,表明美国和山东、陕西产区人参皂苷Rg₂、Rb₁、Rd要区别北京、吉林、黑龙江地区,正是这种皂苷成分的差异,呈现不同的品质分型。

2.9 西洋参药材皂苷类成分标准指纹图谱的建立

经上述模式识别研究,选取药材质量比较稳定

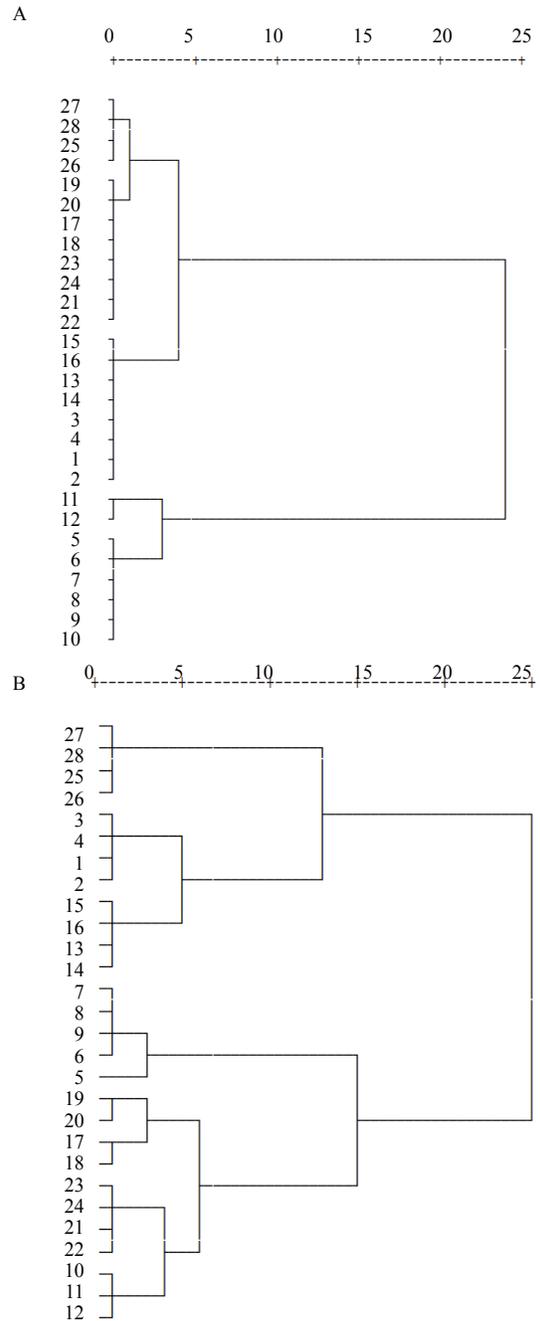


图 2 ELSD (A) 和 UV (B) 检测皂苷类成分聚类分析图
Fig. 2 Cluster analysis of ingredients saponin by ELSD (A) and UV (B)

的24批西洋参样品建立西洋参药材皂苷类成分的标准指纹图谱(图5),24批西洋参批号为S1~S6、S11~S28。将24批样品数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004版),以S21色谱图作为参照图谱,基于中位数法,时间窗为0.1min,多点校正生成对照图谱(R),所得24批西洋参样品相似度均在0.90以上,符合指纹图谱要求。

分时串联使用 2 种检测器。紫外检测器基线易漂移, 蒸发光散射检测器基线平稳但出峰不多; 对 2 种检测器均有响应的皂苷类成分, 出峰时间基本一致, 蒸发光散射检测器下所得色谱峰峰面积明显高于紫外检测器。

本实验应用系统聚类分析和主成分分析 2 种化学计量学方法, 对西洋参 UPLC 指纹图谱的色谱积分数据进行了模式识别的研究。聚类分析选择组间联接、欧氏距离平方法作为测度, 这种聚类方法在指纹图谱研究中比较常用^[8-12], 其中北京怀柔及黑龙江样品聚为一类, 山东和美国样品聚为一类, 吉林地区西洋参样品多样性显著, 我国引种的西洋参种子主要来自美国及加拿大的不同地区, 多为天然混杂品种, 非单一纯合种, 种源与种质资源混杂及栽培地生态环境多样化, 可能为吉林地区西洋参个体之间差异较大的原因^[13]。

PCA 法研究结果显示, 28 个批次西洋参样品中 ELSD 检测器所检测皂苷类成分峰面积值均较大, 不同皂苷类成分结果变异度较大, 故多个皂苷类成分贡献值较高, 而 UV 检测器灵敏度及稳定性较好, 对于在 ELSD 检测器上灵敏度较差的 Rb₂、Rb₃ 类成分均有较好的响应, 故在 PCA 散点图结果中, 不同地区散点图在 2 种检测器的结果存在差异性。总体分析结果显示, 在北京、吉林、黑龙江地区的西洋参中人参皂苷 Rg₁、Re、Rc、Rb₂、Rb₃ 等皂苷类成分要区别于美国、陕西、山东地区的西洋参; 而美国、陕西、山东地区的西洋参中 Rg₂、Rb₁、Rd 类成分要区别北京、吉林、黑龙江地区, 说明各西洋参样品之间不同产地的西洋参中存在相应的特征性成分, 有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 王蕾, 王英平, 许世泉, 等. 西洋参化学成分及药理活性研究进展 [J]. 特产研究, 2007(3): 73-77.
- [2] 黄林芳, 索风梅, 宋经元, 等. 中国产西洋参品质变异及生态型划分 [J]. 药学学报, 2013, 48(4): 580-589.
- [3] 陈军辉. 西洋参活性成分及其指纹图谱研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2005.
- [4] 王桂英. HPLC 法测定西洋参中五种皂苷方法研究 [J]. 光明中医, 2014(4): 890-893.
- [5] 董梁, 张翠英, 陈士林. 西洋参药材皂苷类成分 HPLC-UV-ELSD 特征图谱及模式识别研究 [J]. 药学学报, 2011, 46(2): 198-202.
- [6] 蔡艳, 郭文胜. HPLC-ELSD 测定西洋参中人参皂苷含量 [J]. 陕西中医学院学报, 2009(1): 64-65.
- [7] 段宝忠, 黄林芳, 陈士林. UPLC-ELSD 法同时测定伊贝母中贝母辛和西贝母碱的含量 [J]. 药学学报, 2010, 45(12): 1541-1544.
- [8] 尤春雪, 张振秋, 李峰, 等. HPLC 波长切换技术对葛根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 616-621.
- [9] 吴昊, 田燕华, 郭平干. 多元统计学在参麦注射液指纹图谱中的应用 [J]. 中成药, 2002, 24(1): 3-6.
- [10] 郝子博, 王丽莉, 张铁军. 落花生茎叶 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2050-2054.
- [11] 刘玉峰, 杨秀伟. 款冬花药材的 HPLC 化学成分指纹图谱研究 [J]. 药学学报, 2009, 44(5): 510-514.
- [12] 靳怡然, 杜英峰, 田婷婷, 等. HPLC-PDA 指纹图谱结合主成分分析评价不同产地冬凌草药材的质量 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2291-2295.
- [13] 屈新运. 陕西留坝西洋参药材质量评价研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2006.