

# 西洋参中人参皂苷类 HPLC 测定 及其指纹图谱研究

陈军辉, 谢明勇, 王慧琴, 彭日煌, 王远兴  
(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

**摘 要:** 对 12 种西洋参中的 7 种人参皂苷进行 HPLC 同时测定, 建立西洋参中人参皂苷含量测定的现代分析方法, 并建立起西洋参人参皂苷类的色谱指纹图谱。HPLC 测定条件: 梯度洗脱, Alltima C<sub>18</sub> 色谱柱, 乙腈-0.05% 磷酸水溶液为流动相, 流速为 1.2 ml/min, 柱温为 35℃, 紫外检测器, 检测波长 203 nm。在选定的最佳色谱条件下每种成分在各自的浓度范围内均具有较好的线性相关性, 7 种人参皂苷的加标回收率为 94.1%~97.9%。对色谱指纹图谱进行相似度和聚类分析计算, 得到了令人满意的结果。该法为西洋参样品的质量和品种鉴定提供了较全面的信息, 并为 HPLC 应用于样品复杂组分的分析和鉴别开拓了新的领域。

**关键词:** 高效液相色谱法; 西洋参; 人参皂苷; 指纹图谱

Determination of Ginsenosides in *Panax quinquefolium* L by HPLC and Study on Their Fingerprints Analysis

CHEN Jun-hui, XIE Ming-yong, WANG Hui-qin, PENG Ri-huang, WANG Yuan-xing

收稿日期: 2004-11-11

作者简介: 陈军辉(1978-), 男, 在读硕士, 主要从事食品化学与天然活性成分的分析利用。

## 3.1 定性方面

固相微萃取纤维的吸附方式对待测物的物理、化学性质不造成破坏, 顶空分析可以直接得到样品所释放出的气体的化学组成, 因此顶空分析法在气味分析方面有独特的意义和价值<sup>[5]</sup>, 因此它不仅可用于已知产品的挥发性、半挥发性成分的定性鉴定研究, 更重要的是可以用于从自然或加工环境中寻找未知的、新的香料来源, 如从国内外某些著名的地方风味小吃挥发性成分中、从某种自然环境或原料(如某些熏香草类、香木类等)挥发性成分中吸附、辨别和开发出新的香料品种。在此类应用中, 由于对未知待测物性质不了解, 须根据预计沸点、挥发度的不同采用多种萃取温度, 根据预计极性的不同采用合适的萃取纤维、色谱柱和电解质, 经过多次试验来得到最佳的检测方法。

## 3.2 定量方面

在挥发性、半挥发性成分的 SPME 定量检测中, 若待测成分需要准确定量或待测成分是复杂的体系, 特别是对于那些低、高沸点成分均有, 保留时间范围较宽的体系, 应该采取多个萃取温度和多种内标物进行分段操作。采用单一萃取温度、单一内标物来检测复杂体系中待测成分的含量是不够完整的。根据预备试验总离

子流图(或色谱图)中各成分的保留时间情况, 用不同的萃取温度萃取不同挥发性、保留时间的成分。并在每次萃取时使用与该次挥发性成分保留时间接近、性质相似的内标物, 使得每阶段的含量都最接近真实。

## 参考文献:

- [1] Posen H, Zupanic-Krajic L. Solid-phase microextraction [J]. Trends Anal Chem, 1999, 18: 272-282.
- [2] Maria Pia Gianelli, Monica Flores, Fidel Toldra. Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham [J]. J Sci Food Agric, 2002, 82: 1703-1709.
- [3] 帅琴, 杨薇, 郑岳君, 等. 固相微萃取与气相色谱-质谱联用测定有机磷杀虫剂的残留量[J]. 色谱, 2003, 21(3): 273-276.
- [4] 周菊珍, 周培庆. 固相微萃取实验条件的优化[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2000, (1): 103-106.
- [5] Philip Marriott, Robert Shellie, Charles Cornwell. Gas Chromatographic technologies for analysis of essential oil [J]. J Chromatogr A, 2001, 934: 1-22.

(Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** A modern HPLC analysis method was developed for the determination of seven major ginsenosides in 12 kinds of *Panax quinquefolium*. L. Their chromatographic fingerprints were established by HPLC. Separations and determinations were carried out by linear gradient elution under following conditions: Alltima C<sub>18</sub> (250mm×4.6mm, 5μm) column, acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution as mobile phase, detection length of UV at 203nm, flow-rate of 1.2ml/min, column temperature of 35 °C. The obtained results indicated that the developed method was simple, accurate and reliable for the determination of seven ginsenosides in *Panax quinquefolium*. L with a good linearity with the recovery ranges of 94.1%~97.9%. Hierarchical clustering analysis was performed and the similarity of the HPLC chromatograms was analyzed for the research of fingerprints and classification of *Panax quinquefolium*. L samples. The results could provide useful information for quality control of Traditional Chinese Medicine. The method was developed for the HPLC analysis and identification of complex components of samples.

**Key words:** HPLC; *Panax quinquefolium*. L; ginsenoside; fingerprints

中图分类号 R284.1

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0200-07

西洋参(*Panax quinquefolium*. L)又名西洋人参、洋参、花旗参、广东人参,为五加科植物。西洋参主产于美国、加拿大及法国,近年我国亦有栽培。西洋参味苦,性凉,入心、肺、肾经,功能以补益为主,可滋阴降火、益气生津<sup>[1]</sup>。皂苷类成分是西洋参中主要活性物质,其化学研究比较全面和深入。迄今为止,中外学者已自原产和引种西洋参根中分离鉴定出皂苷类成分19种以上<sup>[2]</sup>。综合文献报道发现<sup>[3~5]</sup>,人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1、Rg2、Re为西洋参中含量较高的7种皂苷,其质量分数占总皂苷的90%以上。因此,西洋参中最主要的7种人参皂苷的含量成为评价西洋参及其制剂的重要指标。国内外对西洋参皂苷的测定基本同人参皂苷,多采用比色法、薄层光密度法、薄层扫描法、高效液相色谱法进行<sup>[6]</sup>。文献中针对人参皂苷的HPLC分析工作已有报道。陈薇<sup>[5]</sup>等采用高效液相色谱法分离测定人参中的6种人参皂苷,许传莲<sup>[7]</sup>等采用RP-HPLC法测定西洋参茎叶中6种人参皂苷,徐智秀<sup>[8]</sup>等采用高效液相色谱-质谱-质谱法分析人参皂苷。目前,中药指纹图谱技术已成为国内外公认的鉴别中药品种和评价中药质量的最有效手段,中药指纹图谱的整体性和模糊性正好符合中药质控的要求,较之单一成分或指标成分的质控方法,更具有科学性和全面性<sup>[9,10]</sup>。贾晓斌<sup>[11,12]</sup>等报道了人参中皂苷类成分的HPLC指纹谱研究和复方人参注射液的HPLC指纹图谱研究;翟为民<sup>[13]</sup>等报道了人参、西洋参及三七参指纹图谱的鉴别。但迄今为止,西洋参中人参皂苷类指纹图谱的研究还未见报道。本文建立了一种同步测定西洋参根中7种人参皂苷含量的反相高效液相色谱法,为西洋参皂苷类含量的测定提供了一种快速分离测定新方法,并建立起12种西洋参样品的液相色谱指纹图谱。从而可为进一步研究西洋参产地、气候、收获期与各种皂苷含量

之间的关系奠定方法学基础,也可为西洋参样品的质量和品种鉴定提供较全面的信息和检测标准。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器试剂和样品

仪器: FA1104 电子天平 上海精天电子仪器厂; 电子恒温不锈钢水浴锅 上海宏兴机械仪器实业制造公司; 旋转蒸发器 上海荣生有限公司; SY3200 超声波清洗器 上海声源超声波仪器设备有限公司; 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; 515 二元高压梯度系统, 2487 紫外可变检测器, PCM 泵控制器, Millennium32 色谱工作软件, 柱温箱, 手动进样器(20 μl 定量环)。

试剂与药品: 人参皂苷对照品 Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1、Rg2、Re 吉林大学化学学院(含量测定用); 乙腈: HPLC 级试剂美国 Fisher 公司; 甲醇: HPLC 级试剂上海陆都化学试剂厂; 水为重蒸水, 正丁醇: 分析纯上海海申化学试剂有限公司; HPLC 用所有试剂均经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤及超声脱气处理。

样品: 西洋参样品见表 1。

表 1 西洋参样品来源  
Table 1 Samples used in this work

编号	样品	采集时间	编号	样品	采集时间
1	新加坡 1	2002-10-17	7	吉林洋参 4	2003-04-10
2	吉林洋参 7	2002-10-17	8	吉林洋参 5	2003-04-10
3	加拿大	2002-12-06	9	吉林洋参 6	2003-04-10
4	吉林洋参 1	2003-04-10	10	广州洋参	2002-12-06
5	吉林洋参 2	2003-04-10	11	新加坡 2	2002-10-17
6	吉林洋参 3	2003-04-10	12	吉林洋参 8	2002-10-17

### 1.2 色谱条件

参考文献所列资料<sup>[14~16]</sup>经实验确定以下色谱条件: 色谱柱为 Alltima C<sub>18</sub> (250mm×4.6mm, 5 μm); 检测波

长为 203nm; 柱温为 35℃; 进样量为 20μl; 流速为 1.2ml/min; 流动相为乙腈-0.05% 磷酸水溶液; 梯度洗脱程序为: 0~35min, 乙腈的体积分数为 20%, 35~65min, 乙腈的体积分数由 20% 增至 35%, 65~75min, 乙腈的体积分数由 35% 增至 45%, 75~80min, 乙腈的体积分数由 45% 减至 20%。

### 1.3 对照品溶液的制备

精确称取七种人参皂苷对照品, 分别置于 5ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得储备液, 作为各组分的标准对照品溶液; 按一定比例分别精确移取上述对照品溶液适量, 置于 10ml 容量瓶中, 摇匀, 作为混合对照品溶液备用。七种人参皂苷的称取量(mg) 分别为: Rb1 11.5、Rb2 5.4、Rc 9.3、Rd 11.5、Rg1 11.0、Rg2 5.7、Re 9.0。

### 1.4 供试品溶液的制备<sup>[17]</sup>

精密称取西洋参干燥粉(40 目)2g, 包入滤纸中, 置于 100ml 烧杯中, 加乙醚 60ml, 于超声波提取仪中脱脂 15min, 取出晾干, 待乙醚挥尽, 加 80% 的甲醇水溶液超声波法提取 4 次(50、40、40、40ml), 每次提取 30min。合并各次提取液抽滤, 滤液真空浓缩至干, 加蒸馏水溶解残渣, 并用蒸馏水洗涤容器数次, 合并各次洗液(约 30ml), 置于分液漏斗中, 用正丁醇萃取 5 次(正丁醇分别为 20、20、15、15、15ml), 合并各次正丁醇萃取液, 转移到分液漏斗中, 用 20ml 蒸馏水洗涤合并液, 洗涤后正丁醇液真空浓缩至干, 残渣加甲醇溶解并转移至 50ml 容量瓶中, 用甲醇多次洗涤容器, 洗液并入容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得待测液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 供试品液相色谱分离情况

按 1.2 色谱条件测定混合对照品溶液和供试品溶液, 混合人参皂苷对照品的色谱图如图 1 所示, Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg2 间达到基线分离, 且峰形较好。其它两种人参皂苷 Rg1 和 Re 基本分开, 基本不影响定量分析。7 种人参皂苷在本实验条件下的色谱峰较为对称, 不对称因子变化范围为 0.9~1.1。比较七种人参皂苷标准品溶液及供试品溶液色谱图(见图 1 和图 2), 可看出在此条件下供试品溶液色谱峰分离良好, 可准确测定其峰面积, 并以峰面积进行定量分析。

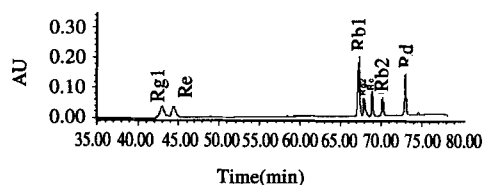


图 1 人参皂苷混合标准品色谱图

Fig.1 The chromatogram of mixed standard ginsenosides

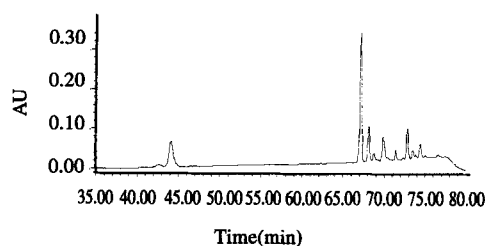


图 2 9 号西洋参样品色谱图

Fig.2 The Chromatogram of Panax quinquefolium.L (Sample No.9)

### 2.2 标准曲线的绘制

吸取一定量的混合标准储备液, 用甲醇稀释, 配制一系列不同浓度的混合标准液; 精密吸取对照品溶液 25μl, 按 1.2 色谱条件分别进样, 测定各人参皂苷的峰面积, 以人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1、Rg2、Re 峰面积为横坐标, 对照品浓度(mg/ml) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 求得回归方程分别为:

$$\text{Rb1 } Y=0.1984E-6X-0.004, r=0.9992;$$

$$\text{Rb2 } Y=0.1941E-6X+0.0005, r=0.9996;$$

$$\text{Rc } Y=0.2174E-6X-0.0013, r=0.9993;$$

$$\text{Rd } Y=0.1872E-6X-0.0024, r=0.9992;$$

$$\text{Rg1 } Y=0.1048E-6X+0.0012, r=0.9994;$$

$$\text{Rg2 } Y=0.1297E-6X-0.0002, r=0.9994;$$

$$\text{Re } Y=0.1689E-6X+0.0033, r=0.9993.$$

### 2.3 方法学考察

#### 2.3.1 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 按 1.2 液相色谱条件, 重复测定 6 次, 测得各色谱峰的峰面积和保留时间, 以 7 种组分峰面积分别计算标准偏差, 得人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1、Rg2、Re 峰面积的 RSD 值分别为: 0.22%, 0.35%, 0.20%, 0.39%, 0.42%, 0.28%, 0.60%, 7 种组分保留时间的 RSD 值为: 0.14%~0.46%, 表明仪器精密度良好。

#### 2.3.2 稳定性试验

精密吸取供试品溶液, 按 1.2 液相色谱条件, 分别在 0、1、2、4、8、12、24、36、48h 进样测定, 结果供试品溶液中各人参皂苷在 48h 内峰面积和保留时间无明显变化, 人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1、Rg2、Re 峰面积的 RSD 值分别为: 0.51%, 1.47%, 1.78%, 1.20%, 1.89%, 0.76%, 0.67%, 7 种组分保留时间的 RSD 值为: 0.39%~0.76%, 说明供试品溶液在 48h 内其化学性质稳定。

#### 2.3.3 重现性试验

精密称取同一样品 5 份, 按 1.4 处理方法将其制成

供试品溶液,按1.2液相色谱条件,分别进样测定,测得各色谱峰的峰面积和保留时间,以7种组分峰面积分别计算标准偏差,得人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1、Rg2、Re峰面积的RSD值分别为:2.52%,2.35%,2.00%,1.89%,2.12%,2.23%,2.87%,7种组分保留时间的RSD值为:0.21%~0.49%,表明该方法重现性良好。

### 2.3.4 回收率试验

精密称取2.0g西洋参干燥粉(40目)3份,按1.4处理方法将其制成供试品溶液,精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各1ml,置于具塞比色管中摇匀;再分别精密吸取甲醇和供试品溶液各1ml,置于具塞比色管中摇匀作为空白,按1.2液相色谱条件测定加样回收率,结果见表2。

### 2.3.5 色谱系统的选择

表2 人参皂苷加样回收率实验结果(n=3)  
Table 2 Results for recovery of ginsenosides (n=3)

人参皂苷	初始量 (mg)	加入量 (mg)	检出量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
Rb1	18.58	16.572	34.456	95.8	1.54
Rb2	4.71	4.422	8.884	94.4	2.69
Rc	1.258	1.196	2.389	94.5	2.83
Rd	2.89	2.355	5.17	96.8	2.41
Rg1	0.601	0.685	1.246	94.1	2.96
Rg2	1.57	0.833	2.364	95.3	1.73
Re	9.66	6.59	16.115	97.9	1.67

人参皂苷的高效液相色谱测定一般采用C<sub>18</sub>柱,结合本实验室仪器条件,选用Alltima C<sub>18</sub>柱,UV检测器,203nm为检测波长,乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相。人参皂苷Rg1、Re在此测定系统条件下容量因子相差不大,且此两种人参皂苷的容量因子与另外五种人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg2的容量因子相差较大,故采用梯度洗脱。

### 2.3.6 梯度洗脱程序的建立

据文献[14]报道,Rg1、Re两物质达到分离的流动相组成乙腈-水的最大浓度为20.7%,以此为参考,本文以20%的乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相,测定人参皂苷Rg1、Re,图谱分离结果能达到定量要求;在以等度条件分离5种人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg2时,经反复试验发现以33.4%的乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相能达到良好分离,且发现乙腈的比例过高或过低该5种人参皂苷都达不到基线分离的要求。此外,实验发现乙腈比例为35%时Rc出峰先于Rb2,Rb2先于Rg2;而乙腈比例降至32%时则Rg2出峰先于Rc,Rc先于Rb2。在此基础上,经多次试验最终确定本文所采用的梯度程序。在梯度程序的摸索过程中发现,

35~65min的梯度设置是人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg2达到基线分离的关键。采用梯度洗脱时,每个分析周期均在基线平稳20min以后开始,为保证分析结果的稳定性和重现性,在每个分析周期结束后不需用纯有机相溶剂对色谱柱冲洗,试验发现80min以后色谱柱并没有其它物质残留。

### 2.3.7 酸度对分离的影响

在所选择的最佳梯度洗脱程序条件下,考察了不加酸时对7种人参皂苷的保留值及分离度的影响,试验结果表明:(1)流动相中不加酸时,峰形较差;加酸后峰形变得较尖锐对称。(2)流动相中不加酸时Rg2会在60.24min出峰,Rb2会在62.35min出峰,虽然Rg2、Rb2出峰提前,但是Rg2、Rb2响应值降低,且色谱峰严重拓宽拖尾,降低了分析的灵敏度。(3)流动相中加酸与不加酸时另外5种人参皂苷的分离没有明显变化。至于人参皂苷Rg2、Rb2受酸度影响较大的原因有待进一步探讨。

### 2.3.8 色谱柱、柱温与流速对分离的影响

比较同一厂家不同批号的色谱柱对测定结果的影响,发现不同批号的色谱柱对分离影响较小,只是出峰时间略有变化,所以在指纹图谱测定过程中使用固定厂家同一型号的色谱柱即可。在所选择的最佳梯度洗脱程序条件下,分别试验了不同柱温对7种人参皂苷保留值及分离度的影响。在25℃条件下,由于流动相的粘度太大,造成柱压升高,以至于不能满足梯度程序的需要。45℃时柱温过高,Rg1、Re分离度变差不能满足定量要求,Rc、Rb2也不能达到基线分离。在35℃条件下,7种人参皂苷分离度才能满足定性定量要求。

在所选择的最佳梯度洗脱程序条件下,将流速由1.2ml/min改为1.0ml/min进行实验,结果表明,7种人参皂苷的保留时间大大延长,但对分离度没有明显影响。

### 2.3.9 色谱峰的定位

本文主要根据对照品的保留时间对7种人参皂苷色谱峰定性。实验中以适量的一种标准储备液加入混合标样中同步分析,通过对比各峰的吸光度,确认吸光度明显增大的峰为对照品峰,并将其UV谱图与相应的已知标准品图谱进行比较印证,以确定7种人参皂苷的相应峰位。

### 2.3.10 人参皂苷检测线性范围和检测限

在覆盖上述所有西洋参样品中7种人参皂苷含量范围内,考察了它们在C<sub>18</sub>柱上分离、检测时的线性关系。将标准液逐级稀释进样,测其峰高响应值及基线噪音强度,以三倍信噪比计算出检出限。结果表明:在选定的色谱条件下每种成分在各自的浓度范围内均具有较好的线性相关性,检测限(μg/ml)分别是Rg1 1.4、Re 3.6、Rb1 4.0、Rg2 2.6、Rc 4.4、Rb2 3.9、Rd 3.7。

### 2.3.11 不同预处理方法的影响

在试验过程中,选用甲醇作为提取溶剂,分别采用超声法、回流法对人参皂苷进行提取,用有机试剂萃取法、大孔树脂吸附法除杂制备供试品溶液。试验结果表明,回流提取法与超声提取法相比,人参皂苷提取率更高,但提取率相差不大,与文献[17]报道一致,超声法方便快捷,故本文采用超声提取法。大孔树脂吸附法与萃取法相比除杂更彻底,但人参皂苷损失较大,故本文采用正丁醇萃取法。

减去1.4制备方法中乙醚脱脂的处理步骤进行实验,结果表明,脱脂处理对7种人参皂苷的测定结果没有明显影响,这与文献[18]报道的结果不一致。

人参皂苷在正丁醇中溶解度最大,对正丁醇萃取次数进行考察的结果表明,用水饱和正丁醇萃取5次,7种人参皂苷才能基本萃取完全,与文献[19]报道的结果一致。

据文献[20]报道,目前,生物酶解技术,超临界流体萃取技术,微波技术等已广泛应用于中药有效成分的提取工艺中。Joong-Ho Kwon<sup>[21]</sup>等采用微波法辅助提取人参皂苷,这些新技术应用于西洋参中人参皂苷的提取会产生什么影响,有待进一步确定。

### 2.4 人参皂苷含量测定

将不同产地西洋参中7种人参皂苷的峰面积分别代入2.2所得出的回归方程,计算人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1、Rg2和Re的含量,结果见表3。

表3 不同西洋参样品中人参皂苷的含量  
Table 3 Contents of ginsenosides in different Panax quinquefolium. L samples

No.	Rb1(%)	Rb2(%)	Rc(%)	Rd(%)	Rg1(%)	Rg2(%)	Re(%)	total(%)
1	1.90	0.52	0.14	0.19	0.06	0.25	1.05	4.11
2	2.48	0.64	0.16	0.36	0.07	0.41	1.12	5.68
3	3.12	0.67	0.42	0.62	0.07	0.47	1.30	6.68
4	2.74	0.61	0.32	0.63	0.06	0.38	1.19	5.92
5	1.97	0.45	0.18	0.45	0.06	0.32	0.90	4.33
6	3.25	0.80	0.25	0.46	0.10	0.50	1.27	6.67
7	3.08	0.65	0.19	0.39	0.08	0.53	1.10	6.02
8	3.27	0.68	0.21	0.57	0.08	0.48	1.15	6.45
9	3.03	0.68	0.41	0.42	0.08	0.46	1.45	6.52
10	0.62	0.22	0.11	0.05	0.15	0.08	0.20	1.28
11	0.71	0.35	0.10	0.02	0.09	0.08	0.19	1.54
12	0.53	0.42	0.12	0.03	0.14	0.09	0.09	1.42
平均值	2.23	0.56	0.22	0.35	0.09	0.34	0.92	4.72

由以上结果可以看出西洋参中人参皂苷Rb1含量最高,占各人参皂苷总量的50%左右,Re次之含量在1%左右,其它几种人参皂苷的含量相对较低。

### 2.5 不同西洋参样品 HPLC 指纹图谱的建立

取不同的西洋参样品,按1.4处理方法将其制备成供试品溶液,按1.2液相色谱条件,建立不同西洋参样

品的指纹图谱。然后进行谱图积分获得保留时间,峰高等信息,再根据分析时的基线噪声水平,将信噪比 $<10$ 的色谱峰除去不作考虑。在本试验所建立的分析系统下,皂苷类成分的出峰时间集中在40~75min之间,因此40min之前的出峰不作考虑。表4列出了不同西洋参样品在相同提取条件指纹图谱中的保留时间,从中可看出12个西洋参样品有13个共有峰,可作为鉴别西洋参样品的必要条件之一,与标准品图谱峰对照,鉴定了其中的人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1、Rg2、Re等7个峰均为共有强峰。表4结果也表明,12个西洋参样品的总峰数各不相同,在18~27个之间。但是表4的结果并不能准确表明各西洋参样品的总峰数,只是粗略表示,因为一部分信噪比 $<10$ 的色谱峰已经被除去。

不同产地、气候、收获期对中药材有效成分的含量甚至种类有一定的影响,所以需要建立指纹图谱来控制中药材质量。色谱指纹图谱是通过对各样本色谱图进行比较,来反映产品化学成分的差异。

2.5.1 峰匹配及差异性评价 从表4可以看到,各峰的保留时间漂移不大,可以按保留时间来直接进行峰匹配。匹配好的数据点见表4,为确保匹配结果的正确性,利用Excel 2002软件的图表功能,绘出各批样品指纹图谱数据的点折线图,见图3。从中可以看出西洋参样品保留时间的数据点重合较好,无溢出的数据点,即各色谱峰已匹配好。对各号峰进行相对标准偏差计算,结果表明,只有12号峰的RSD值较大,其它各峰的RSD值均小于1%。

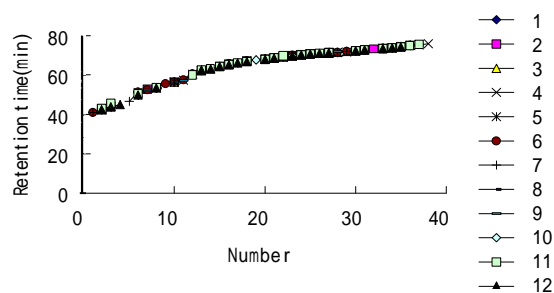


图3 不同西洋参样品色谱峰匹配结果  
Fig.3 Match results of peaks

本文用保留时间进行峰匹配,该法不足之处为需手动进行峰匹配,当指纹图谱较复杂时,工作量大。但手动进行峰匹配的优点是对保留时间相近的峰可以通过峰保留时间和同时观察色谱峰的峰形,做出最佳判断。本文各指纹峰保留时间的相对标准偏差RSD均 $<3\%$ ,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》。

### 2.5.2 相似度分析

本实验分别以各样品峰面积平均值和9号样品为模板,利用EXCEL 2002软件系统<sup>[22]</sup>,以夹角余弦、相

表 4 不同西洋参指纹图谱保留时间  
Table 4 Retention time from fingerprints of different Panax quenquifolium.L samples

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	RSD (%)
1						40,917	40,972						0.1
2	42,493	42,764	42,466	42,333	42,585	42,664	42,687	42,658	42,747	42,248	43,101	42,381	0.5
3	44,131	44,236	44,003	43,88	44,097	44,166	44,183	44,144	44,224	43,79	44,661	43,905	0.5
4												44,948	
5							46,583						
6				51,112		51,283	51,308	51,277	51,313	50,76	50,539	50,846	0.6
7		52,94				52,417			52,398				0.6
8				53,198		53,336	53,352	53,341	53,373	53,349	53,616	53,417	0.2
9						55,548							
10	56,348	56,498	56,505	56,366	56,5	56,525	56,533	56,531	56,53	56,41			0.1
11				57,25		57,415		57,414	57,393				0.1
12				60,469		60,706	60,667				60,085		6.4
13	62,165	62,236	62,275	62,15	62,35	62,256	62,262	62,29	62,258	62,531	62,697	62,564	0.3
14											63,179	63,07	0.1
15		64,352			64,365					64,296	64,274	64,281	0.1
16	65,562	65,614	65,628	65,537	65,656	65,683	65,725	65,648	65,642	65,345	65,276	65,188	0.3
17										66,261	66,2	66,194	0.1
18	67,001	67,108	67,077	67,002	67,102	67,18	67,18	67,181	67,172	66,988	66,91	66,901	0.2
19										67,651			
20	68,031	68,096	68,099	67,995	68,119	68,149	68,151	68,134	68,14	68,052	68	67,98	0.1
21	68,651	68,734	68,746	68,637	68,755	68,783	68,781	68,766	68,781	68,717	68,653	68,628	0.1
22	69,075	69,143	69,157	69,058	69,164	69,181	69,18	69,169	69,179	69,346	69,84		0.3
23	69,842	69,88	69,888	69,818	69,902	69,922	69,923	69,906	69,916	69,843		69,813	0.1
24		70,396	70,407	70,319	70,413	70,438	70,442	70,422	70,435	70,401	70,342	70,329	0.1
25	70,832	70,888	70,886	70,812	70,879	70,923	70,911	70,89	70,893	70,799	70,741	70,727	0.1
26											71,059	71,05	0.1
27		71,427	71,139	71,074	71,159		71,25	71,443	71,452	71,44	71,373	71,361	0.2
28	71,369		71,427	71,361	71,444	71,455	71,46	71,845	71,857				0.3
29			71,845	71,782		71,856	71,859						0.1
30	72,319	72,361	72,389	72,3	72,373	72,38	72,398	72,366	72,389	72,421	72,383	72,402	0.1
31	72,757	72,823	72,814	72,772	72,843	72,849	72,852	72,843	72,843	72,834	72,742	72,755	0.1
32		73,15											
33	73,467	73,515	73,505	73,464	73,529	73,535	73,544	73,527	73,537	73,525	73,45	73,468	0.1
34	73,783	73,843	73,847	73,801	73,857	73,874	73,886	73,875	73,874	73,832	73,795	73,815	0.1
35	74,401	74,452	74,424	74,397	74,464	74,451	74,475	74,45	74,45	74,452	74,27	74,284	0.1
36	74,993	75,037	75,019	75,022	75,053	75,08	75,129	75,045	75,038	75,035	74,967		0.1
37				75,434				75,515	75,524		75,554		0.1
38				75,949									

关系数作为测度, 分别计算各样本的相似度, 结果见表 5。

从表中可看出, 与平均模板相似度最高的是 6 号样品, 其次依次是 2、7、4、5、8、9、1、10 号样

品, 12、3、11 号样品与平均模板相似度较差。以具有代表性的 9 号西洋参样品作为对照模板来进行相似度计算, 结果表明, 夹角余弦值近似相等的样品有 6、2、7、4、5、8、1、10 号, 而 12、3、11 号样品与

表 5 相似度计算结果  
Table 5 Results of similarity analysis

编号	平均模板 (CVVA)	平均模板 (CC)	9 号模板 (CVVA)	9 号模板 (CC)	编号	平均模板 (CVVA)	平均模板 (CC)	9 号模板 (CVVA)	9 号模板 (CC)
1	0.9847	0.9793	0.9824	0.9800	7	0.9945	0.9933	0.9868	0.9835
2	0.9947	0.9947	0.9941	0.9924	8	0.9919	0.9910	0.9892	0.9864
3	0.6021	0.5458	0.6586	0.6112	9	0.9919	0.9905	1	1
4	0.9934	0.9919	0.9916	0.9895	10	0.8640	0.8129	0.8297	0.7683
5	0.9922	0.9896	0.9882	0.9847	11	0.5892	0.4729	0.5821	0.4399
6	0.9967	0.9969	0.9910	0.9909	12	0.6410	0.4775	0.5747	0.3777

CVVA= cosine value of vectorial angle, CC=coefficient of correlation.

9号模板的夹角余弦值相差较大。

目前,中药材的鉴别和分类很大程度上还依赖于经验和表观分析,缺乏从定性定量分析数据中获取评价依据的统一、实用的方法。相似度计算方法数学概念简单,数据处理过程简便、快速,在定量计算色谱指纹图谱相似度方面有其优势。在指纹图谱相似度计算中,一般将所选取的色谱峰同时作比较计算,反映指纹图谱的整体相似性,可对中药产品质量做出较全面、准确的评价。本文以不同西洋参样品的平均峰面积作为对照模板,进行相似度计算,优点是能较全面反映不同西洋参样品的整体特征。

如果利用多种道地药材的标准提取物建立了标准谱图,则通过待测样品与标准谱图的相似度,有可能判断样品的品种,这也是今后进一步研究的目标。

### 2.5.3 系统聚类分析

系统聚类分析是一种无管理、无指导的模式识别方法。可依据所测样品的数据,对样品进行分类。先把N个对象(样品或观察指标)看成N类,然后逐步合并,直到N个对象并成一类为止。本文运用SPSS软件对其进行系统聚类分析,采用欧氏距离作为样品的测度,12个西洋参样品基本可分为两大类,第一大类为3号样品(加拿大西洋参),其它西洋参样品归为第二大类。图4为层次聚类分析的树形图,直观地显示了整个聚类过程。聚类分析能反映出样品间的亲疏远近关系,对西洋参品种与质量的鉴定有一定的理论意义和实用价值。

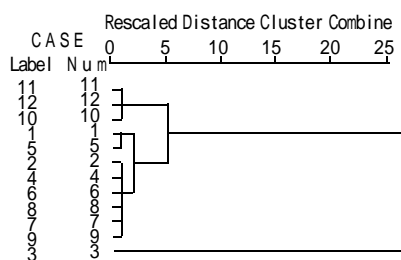


图4 层次聚类分析的树形图

Fig.4 Hierarchical clustering analysis figure of *Panax quenquifolium*.L

聚类分析在数据分类等方面有效,本文以峰面积进行聚类分析。本实验将相似度计算和聚类分析结合起来发挥各自优势,使西洋参指纹图谱对质量控制的作用更全面。

参考文献:

- [1] 孟凡征,李柏.西洋参[M].北京科学技术出版社,2003.
- [2] 魏春雁,牟金明.西洋参化学成分研究现状[J].特产研究,1997,4:39-41.
- [3] 鲍建材,刘刚,郑友兰,等.西洋参中皂苷类成分的研究[J].人参研究,2004,(1):7-9.
- [4] 刘铁成.中国西洋参[M].人民卫生出版社,1995.
- [5] 陈薇,胡广林,王翊如,等.高效液相色谱法分离测定人参中的6种人参皂甙[J].色谱,2000,18(5):439-441.
- [6] 祁晓玲,吕归宝,等.人参与西洋参中人参皂苷分析方法的研究概况[J].天津药学,1998,10(2):5-10.
- [7] 许传莲,郑毅男,崔淑玉,等.RP-HPLC法测定西洋参茎叶中6种人参皂苷的含量[J].吉林农业大学学报,2002,24(3):50-52.
- [8] 徐智秀,肖红斌,王加宁,等.高效液相色谱-质谱-质谱法分析人参皂甙[J].色谱,2000,18(6):521-524.
- [9] 石志红,何建涛,常文保.中药指纹图谱技术[J].大学化学,2004,19(1):33-39.
- [10] Fan Gong, Yi-Zeng Liang, Pei-Shan Xie, Foo-Tim chau[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1002: 25-40.
- [11] 贾晓斌,施亚芳,黄一平,等.人参皂苷类成分的HPLC指纹谱研究[J].中药材,2001,24(10):722-723.
- [12] 贾晓斌,施亚芳,陈彦,等.复方人参注射液的HPLC指纹谱研究[J].中成药,2002,24(4):243-245.
- [13] 翟为民,袁永生,周玉新,等.人参、西洋参及三七参指纹图谱鉴别[J].中国中药杂志,2001,26(7):481-482.
- [14] 马小琼,王龙星,徐青,等.分离人参皂甙的高效液相色谱多台阶梯度法的建立[J].高等学校化学学报,2004,25(2):238-242.
- [15] William A Court, John G Hendel, Jama Elmi. Journal of Chromatography A, 1996: (755), 11-17.
- [16] Wu-Chang Chuang, Shuenn-Jyi Sheu. Journal of Chromatography A, 685, 1994, 243-251.
- [17] 韩义欣,徐秀珍.西洋参总皂甙含量中两种提取方法比较[J].宁夏医学院学报,1996,18(2):27-28.
- [18] 周晶,乔卫,冯淑华,等.不同提取方法对西洋参皂甙含量的影响[J].天津医科大学学报,2000,6(1):26-27.
- [19] 闻利毓,于洋,李炳根,等.HPLC法测定生脉注射液中人参皂甙Re的含量[J].中草药,1998,(4):232-234.
- [20] 韩丽.实用中药制剂新技术[M].化学工业出版社,2002.
- [21] Joong-Ho Kwon, Jacqueline M R Belanger, J R Jocelyn Pare. Food Research International, 2003, 36: 491-498.
- [22] 苗爱东,孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹谱相似度计算中的应用[J].药学进展,2003,27(1):51-54.