

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2018.11.003

超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱法 同时测定不同贮藏条件下红参中 17种人参皂苷类成分

石婧婧¹, 陈舒舒¹, 邹立思¹, 刘训红^{1*}, 唐仁茂²,
马继梅², 严颖¹, 赵慧¹

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023; 2. 江苏苏中药业集团股份有限公司, 江苏泰州 225500)

摘要:建立了超快速液相色谱-三重四级杆/线性离子阱质谱(UFLC-QTRAP-MS/MS)同时测定红参中17种皂苷成分含量的方法,分析了不同贮藏条件对红参中目标成分的影响。采用SynergiTM Hydro-RP 100 Å(100 mm × 2.0 mm, 2.5 μm)色谱柱分离,以0.1%甲酸水-乙腈为流动相,0.4 mL/min梯度洗脱,在电喷雾负离子(ESI⁻)模式下,进行多反应监测(MRM)模式检测。根据17种皂苷成分的含量,用聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA)对不同贮藏条件红参进行综合评价。结果表明,17种人参皂苷在一定浓度范围内均呈良好的线性关系,相关系数均大于0.999 0;精密度、重复性和稳定性良好;加标样品的回收率为96.4%~103%,相对标准偏差(RSD)均小于5%。HCA和PCA结果显示,红参的适宜贮藏条件为以纸箱为外包装避光存放于-20℃。该方法准确、灵敏,为红参药材内在质量的综合评价和全面控制提供了可靠的检测方法,同时为红参适宜贮藏方法的优选提供了基础资料。

关键词:红参;超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱(UFLC-QTRAP-MS/MS);人参皂苷;贮藏方法;聚类分析;主成分分析

中图分类号:O657.63;TQ460.72 文献标识码:A 文章编号:1004-4957(2018)11-1294-08

Simultaneous Determination of 17 Ginsenosides in Different Stored Products of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra by UFLC-QTRAP-MS/MS

SHI Jing-jing¹, CHEN Shu-yu¹, ZOU Li-si¹, LIU Xun-hong^{1*}, TANG Ren-mao²,
MA Ji-mei², YAN Ying¹, ZHAO Hui¹

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Suzhong Yaoye Group Pharmaceutical Limited, Taizhou 225500, China)

Abstract: A comprehensive analytical method based on ultra-fast liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry(UFLC-QTRAP-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of 17 ginsenosides in different stored samples of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra. Under the optimized chromatographic conditions, good separation for seventeen target compounds were obtained on a SynergiTM Hydro-RP 100 Å column(100 mm × 2.0 mm, 2.5 μm) using 0.1% aqueous formic acid-acetonitrile as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min. The target compounds were analyzed under multiple reaction monitoring(MRM) mode with an ESI source operating in negative ion mode, hierarchical cluster analysis(HCA) and principal component analysis(PCA) were used for data processing. The results showed that there existed good linearities for the 17 components in the certain concentration ranges, with their correlation coefficients larger than 0.999 0. The precision, repeatability and stability of the method were all satisfactory. The spiked recoveries for the compounds were between 96.4% and 103%, with relative standard deviations less than 5%. The results showed that the optimum storage conditions for Ginseng Radix et Rhizoma Rubra were as follows: storing it

收稿日期:2018-05-14;修回日期:2018-07-20

基金项目:国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JS-32);江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSXK-2014);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A070)

* 通讯作者:刘训红,教授,研究方向:中药鉴定与品质评价, E-mail: liuxunh1959@163.com

with a carton at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protected from light. The proposed method is useful for assessment and control on the quality of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra, and provides a scientific basis for choosing the most suitable storage condition of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra.

Key words: Ginseng Radix et Rhizoma Rubra; ultra-fast liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry(UFLC-QTRAP-MS/MS); ginsenosides; storage conditions; principal component analysis(PCA); hierarchical cluster analysis(HCA)

红参是我国名贵中药材之一,系五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的栽培品经蒸制后的干燥根和根茎,具有大补元气、复脉固脱、益气摄血的功效,用于治疗体虚欲脱、肢冷脉微、气不摄血、崩漏下血等症^[1]。现代研究表明,红参的主要药效成分为人参皂苷类,具有抗肝毒活性、抗糖尿病、抗衰老、抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤等药理作用^[2]。中药疗效的发挥是多种活性成分综合作用的结果,针对红参多种药效成分的特点,建立多种药效成分同时测定的方法,对探讨多指标成分的综合评价体系具有实用性和有效性。

药材的品质受种质资源、生态环境、采收加工、贮藏保管等因素的影响,其中贮藏保管是药材品质形成的重要环节。关于红参的品质形成研究,种质资源、生态环境和药材采收等方面的研究较成熟,且普遍得到公认,以上研究多集中于加工对红参品质的影响^[3-4],贮藏条件对商品药材品质变化的影响常被忽略。科学的贮藏方法可以减少药材存放过程中由于自身特点及贮藏环境因素对其质量产生的不良影响,确保临床用药的疗效^[5-7]。红参的质量评价多以含量较高的几种人参皂苷为指标^[8-11],尚少见基于多种人参皂苷同时测定考察与评价红参药材贮藏的研究报道^[12]。本实验基于超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱(UFLC-QTRAP-MS/MS)技术,建立了同时测定红参中原人参二醇型皂苷(人参皂苷 Rb₁、Rc、Rb₂、Rd、F₂、20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、CK)、原人参三醇型皂苷(人参皂苷 Re、Rg₁、Rf、20(S)-Rg₂、20(S)-Rh₁、20(R)-Rg₂、20(R)-Rh₁、F₁)、齐墩果烷型皂苷(人参皂苷 Ro)17种指标成分含量的方法,并结合主成分分析(PCA)和聚类分析法(HCA)对不同贮藏(不同包装材料和贮藏温度)条件下的红参药材进行比较与综合评价,旨在为红参贮藏方法和条件的优选提供基础资料,同时为红参药材内在质量的综合评价和全面控制提供新的方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液质联用系统: Shimadzu SIL-20A XR 超快速液相色谱仪(日本岛津公司)包括 LC-20AD 二元输液泵、STL-20A XR 自动进样器。CTO-20AC 柱温箱; AB QTRAP 5500 三重四极杆线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司),配有电喷雾离子源及 Analyst 1.5.2 软件。KQ-500B 超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司,超声功率 500 W,40 kHz); BSA2245 型电子分析天平(十万分之一,德国赛多利斯公司); ME36S 型电子分析天平(百万分之一,德国赛多利斯公司); H1650-W 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市英峪仪器厂); Q-500B 高速多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司); Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Millipore 公司)。

人参皂苷 Rb₁(Rb₁, 批号: 16060402)、人参皂苷 Rc(Rc, 批号: 15121701)、人参皂苷 20(R)-Rg₃(20(R)-Rg₃, 批号: 15121701)、人参皂苷 Rd(Rd, 批号: 16051604)、人参皂苷 Rf(Rf, 批号: 16052502)、人参皂苷 CK(CK, 批号: 16072902)、人参皂苷 20(S)-Rg₂(20(S)-Rg₂, 批号: 15123004)、人参皂苷 20(S)-Rh₁(20(S)-Rh₁, 批号: 16081802)、人参皂苷 Re(Re, 批号: 16081605)、人参皂苷 F₂(F₂, 批号: 16081105)、人参皂苷 Rg₁(Rg₁, 批号: 15121303)、人参皂苷 Rb₂(Rb₂, 批号: 16061503)、人参皂苷 Ro(Ro, 批号: 16050405)、人参皂苷 20(R)-Rh₁(20(R)-Rh₁, 批号: 15121903)、人参皂苷 20(S)-Rg₃(20(S)-Rg₃, 批号: 16012405)、人参皂苷 20(R)-Rg₂(20(R)-Rg₂, 批号: 17022103)、人参皂苷 F₁(F₁, 批号: 16081205)经 HPLC 测定纯度均大于 98%,购自南京良纬生物科技有限公司。实验用水为超纯水;乙腈、乙醇、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

实验样品(人参)采自吉林省长白市靖宇县人参规范种植基地,经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根及根茎,按产地的传统加工方法加工成红参药材。通过产地和市场调研,结合实际设计贮藏考察方法,各取红参药材 500 g,按不同贮藏条件(包装材料及贮藏温度)避光贮藏半年后取出,样品信息见表 1。留样凭证存放于南京中医药大学中药鉴定实验室。

1.2 溶液制备

1.2.1 对照品溶液的制备 分别称取人参皂苷 Re、Rg₁、Rf、20(S) - Rg₂、20(R) - Rg₂、20(S) - Rh₁、Rb₁、20(R) - Rh₁、Rc、Ro、Rb₂、F₁、Rd、F₂、20(S) - Rg₃、20(R) - Rg₃ 和 CK 对照品适量,精密称定,加 60% 乙醇配制成质量浓度分别为 956、992、1 036、1 004、966、988、922、954、948、974、1 042、1 010、996、952、1 070、1 056、980 mg/L 的对照品母液;取适量的各对照品母液,加甲醇配制成含上述对照品的混合储备液,并逐级稀释,得到一系列的混合对照品溶液,于 4 °C 保存,备用。

1.2.2 供试品溶液的制备 取干燥至恒重的样品粉碎,过 60 目筛,精密称定 0.5 g 样品粉末,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 25 mL 60% 乙醇,于室温下超声(500 W、40 kHz)提取 2 h 后取出,放至室温以 60% 乙醇补足失重,静置冷却,4 °C 保存,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱: SynergiTM Hydro - RP 100 Å 柱(100 mm × 2.0 mm, 2.5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水(A) - 乙腈(B); 梯度洗脱: 0 ~ 0.01 min, 10% B; 0.01 ~ 2.0 min, 10% ~ 25% B; 2.0 ~ 11.0 min, 25% B; 11.0 ~ 13.5 min, 25% ~ 45% B; 13.5 ~ 15.5 min, 45% B; 15.5 ~ 16.5 min, 45% ~ 98% B; 16.5 ~ 18.0 min, 98% ~ 10% B; 柱温 40 °C; 流速 0.4 mL/min; 进样量 2 μL。

1.3.2 质谱条件 使用 AB Sciex QTRAP 5500 三重四极杆线性离子阱串联质谱仪在电喷雾负离子(ESI⁻)模式下进行多反应监测模式(MRM)检测,气帘气(CUR)压力为 241.4 kPa,雾化气(Gas1)压力为 379.3 kPa,辅助气(Gas2)压力为 379.3 kPa,温度(TEM)为 550 °C,喷雾电压为 5 500 V。

2 结果与讨论

2.1 色谱 - 质谱条件的优化

考察了水 - 甲醇、水 - 乙腈和 0.1% 甲酸水 - 乙腈作为流动相时的分离效果。结果表明,乙腈作为流动相时的分离效果明显优于甲醇,在流动相中加入一定量的甲酸可以减少色谱峰的拖尾,提高分离效果和检测灵敏度。因此,本实验最终采用 0.1% 甲酸水 - 乙腈作为流动相。

采用正、负两种离子模式测定 17 种化学成分的含量,经过反复试验,发现各成分在负离子模式下检测具有较高的稳定性、较高的响应值和较好的峰形,因此选择负离子模式检测。17 种人参皂苷类成分的具体质谱参数及其 MRM 色谱图见表 2 及图 1。

表 2 17 种目标成分的质谱分析参数
Table 2 MS/MS parameters of seventeen components

No.	Compound	Molecular formula	t _R /min	Mass data(m/z)	DP/V	CE/eV
1	Ginsenoside Re(Re)	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	4.19	991.7/799.4	-120	-45
2	Ginsenoside Rg ₁ (Rg ₁)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	4.25	845.7/637.4	-20	-35
3	Ginsenoside Rf(Rf)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	8.76	845.7/637.4	-20	-45
4	Ginsenoside 20(S) - Rg ₂ (20(S) - Rg ₂)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	12.57	829.6/637.4	-20	-40
5	Ginsenoside 20(S) - Rh ₁ (20(S) - Rh ₁)	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	13.00	683.6/475.3	-20	-40
6	Ginsenoside 20(R) - Rg ₂ (20(R) - Rg ₂)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	13.18	783.4/475.4	-10	-54

表 1 不同贮藏条件的样品信息

Table 1 Information of samples under different storage conditions		
No.	Packaging materials	Storage temperature
S1	Carton	Room temperature(20 ~ 30 °C)
S2	Carton	Cool warehouse(< 20 °C)
S3	Carton	-3 °C
S4	Carton	-20 °C
S5	Carton	-40 °C
S6	Sack	Cool warehouse(< 20 °C)
S7	Woven bag	Cool warehouse(< 20 °C)
S8	Kraft bag	Cool warehouse(< 20 °C)
S9	Aluminum foil bag	Cool warehouse(< 20 °C)
S10	Polythene bag	Cool warehouse(< 20 °C)

(续表 2)

No.	Compound	Molecular formula	t_R/min	Mass data(m/z)	DP/V	CE/eV
7	Ginsenoside Rb ₁ (Rb ₁)	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	13.31	1 107.6/945.7	-20	-58
8	Ginsenoside 20(R)-Rh ₁ (20(R)-Rh ₁)	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	13.53	683.6/475.3	-20	-35
9	Ginsenoside Rc(Rc)	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	13.66	1 077.6/945.7	-20	-58
10	Ginsenoside Ro(Ro)	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	13.69	955.6/793.4	-5	-60
11	Ginsenoside Rb ₂ (Rb ₂)	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	13.89	1 077.6/945.5	-100	-55
12	Ginsenoside F ₁ (F ₁)	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	14.07	683.4/475.3	-20	-30
13	Ginsenoside Rd(Rd)	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	14.23	991.7/783.4	-120	-55
14	Ginsenoside F ₂ (F ₂)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	15.27	829.6/621.4	-20	-35
15	Ginsenoside 20(S)-Rg ₃ (20(S)-Rg ₃)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	15.85	783.5/59.1	-10	-106
16	Ginsenoside 20(R)-Rg ₃ (20(R)-Rg ₃)	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	16.00	829.6/621.4	-20	-45
17	Ginsenoside CK(CK)	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	17.75	667.4/459.3	-20	-30

2.2 供试品制备方法的优化

实验对提取溶剂(60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇)、料液比(1:20、1:30、1:50)及提取时间(1、1.5、2 h)进行正交实验考察,以人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁ 的含量总和为指标。结果表明,最佳提取溶剂为 60%乙醇,料液比为 1:50,提取时间为 2 h。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、检出限与定量下限

精密吸取“1.2.1”中不同浓度系列的对照品溶液及混合对照品储备液各 2 μL,按“1.3”色谱、质谱条件进行测定,以对照品的峰面积(Y)对相应的质量浓度(X , μg/L)进行线性回归,线性方程、

相关系数及线性范围结果见表 3。17 种人参皂苷类成分均呈良好的线性关系,相关系数(r)均大于 0.999 0。以信噪比(S/N)约为 3 计算各成分的检出限(LOD),以 $S/N \approx 10$ 计算各成分的定量下限(LOQ),结果见表 3。17 种人参皂苷类成分的 LOD 为 0.73~27.81 μg/L, LOQ 为 3.87~84.12 μg/L。

表 3 17 种化合物的线性关系、检出限和定量下限

Table 3 Linear relations, LODs and LOQs of seventeen components

Compound	Regression equation	r	Linear range(μg/L)	LOD(μg/L)	LOQ(μg/L)
Re	$Y = 0.182X + 284$	0.999 9	3 060 ~ 306 000	27.81	84.12
Rg ₁	$Y = 84.5X + 3 490$	0.999 3	175 ~ 175 000	14.58	46.66
Rf	$Y = 9.51X + 2 870$	0.999 7	78.70 ~ 157 400	7.64	21.96
20(S)-Rg ₂	$Y = 13.9X + 128$	0.999 1	482 ~ 48 200	17.25	50.03
20(S)-Rh ₁	$Y = 53.8X - 561$	0.999 7	29.60 ~ 14 800	2.79	9.66
20(R)-Rg ₂	$Y = 15.8X - 586$	0.999 4	77.30 ~ 15 460	7.43	22.66
Rb ₁	$Y = 3.2X + 69 300$	0.999 7	23 050 ~ 461 000	22.16	68.70
20(R)-Rh ₁	$Y = 40.8X + 4 190$	0.999 3	7.63 ~ 7 630	0.73	3.87
Rc	$Y = 3.14X + 1 900$	0.999 1	190 ~ 190 000	18.56	56.42
Ro	$Y = 262X - 27 000$	0.999 8	194.80 ~ 19 480	18.20	65.52
Rb ₂	$Y = 2.1X + 3 660$	0.999 9	183 ~ 183 000	18.21	70.12
F ₁	$Y = 643X - 3 620$	0.999 7	20.20 ~ 2 020	1.68	5.71
Rd	$Y = 0.284X + 1 010$	0.999 5	1 195 ~ 239 040	9.19	33.08
F ₂	$Y = 24.9X - 749$	0.999 8	38.10 ~ 3 810	3.93	13.52
20(S)-Rg ₃	$Y = 2.52X + 192$	0.999 6	171 ~ 171 000	15.55	46.03
20(R)-Rg ₃	$Y = 3.61X + 664$	0.999 2	127 ~ 127 000	14.57	44.44
CK	$Y = 102X - 745$	0.999 4	19.60 ~ 1 960	1.51	5.51

2.3.2 精密度、重复性与稳定性试验

精密吸取一定浓度的混合对照品溶液,连续进样 6 次,测定各对照品峰面积,计算得 17 种目标成分峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.77%~2.6% (表 4),说明仪器精密度良好;称取同一红参样品 6 份,每份 0.5 g,精密称定,分别按“1.2.2”制备供试液,进样测

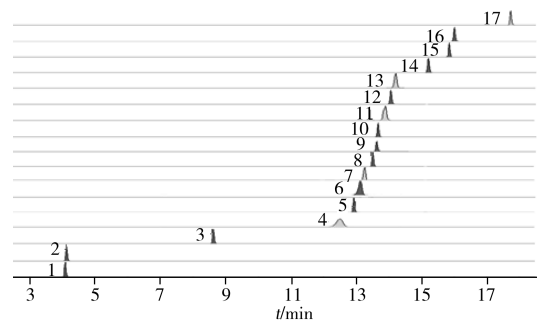


图 1 17 种目标成分的混合对照品的 MRM 色谱图
Fig. 1 MRM chromatograms of seventeen components in reference substances
the peak numbers(1-17) denoted were the same as those in Table 1

定, 计算得 17 种目标成分含量的 RSD 为 1.2%~2.4% (表 4), 表明该方法重复性良好; 取同一红参样品供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 测定峰面积, 计算得 17 种目标成分峰面积的 RSD 为 1.0%~3.8% (表 4), 表明供试品溶液在 24 h 内具有较好的稳定性。

2.3.3 加标回收率试验 精密称取已知含量的红参样品 0.25 g (9 份), 精密称定, 分别加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液 (分别相当于样品中各对照品含量为 50%、100%、150%), 每个浓度平行制备 3 份, 按“1.2.2”制备加标回收供试品溶液并进行测定, 计算回收率及相对标准偏差 (表 4)。17 种人参皂苷类成分的平均回收率为 96.4%~103%, RSD 为 0.68%~4.3%。结果表明该方法的准确度和精密度良好, 可以满足日常样品的分析要求。

表 4 精密度、重复性、稳定性及加标回收率结果

Table 4 Precision, repeatability, stability and recovery of the method

Compound	Precision RSD (%)	Repeatability RSD (%)	Stability RSD (%)	Mean recovery (%)	RSD (%)
Re	1.2	1.3	1.1	101	1.4
Rg ₁	1.3	2.0	2.3	98.8	2.3
Rf	0.95	1.5	1.8	98.9	1.8
20(S) - Rg ₂	1.0	2.2	1.0	99.8	2.9
20(S) - Rh ₁	1.6	2.1	2.1	100	4.3
20(R) - Rg ₂	1.1	1.7	1.8	99.4	2.6
Rb ₁	1.3	1.2	1.0	96.4	0.68
20(R) - Rh ₁	1.6	1.8	1.8	99.9	3.0
Rc	0.77	2.4	2.4	101	3.5
Ro	1.3	2.4	2.4	100	3.3
Rb ₂	1.2	1.4	2.6	96.4	1.8
F ₁	2.0	1.7	1.8	100	1.0
Rd	0.92	1.8	1.7	99.7	2.5
F ₂	2.6	1.5	1.6	98.2	2.6
20(S) - Rg ₃	1.8	1.5	1.5	103	1.8
20(R) - Rg ₃	0.85	1.7	3.8	101	3.0
CK	2.6	1.7	1.7	101	1.5

2.4 样品含量的测定

取供试品溶液 2 μ L, 注入液相色谱-质谱联用仪, 按照优化条件进行测定, 根据相应的线性关系计算供试样品中 17 种目标成分的含量, 结果见表 5。结果表明, 不同贮藏条件下红参样品中 17 种人参皂苷类成分差异明显, 其中人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 的含量较高, 分别为 6 983.81~11 538.24、3 801.15~6 093.83、7 937.33~10 492.05 μ g/g。从 17 种人参皂苷总量来看, 以纸箱为包装, 贮藏于 -20 $^{\circ}$ C 条件下的红参样品 (S4) 总含量最高, 达到 53 835.10 μ g/g; 以牛皮纸袋为包装, 贮藏于阴凉库 (<20 $^{\circ}$ C) 条件下的红参样品 (S8) 总含量最低, 仅 4 4603.17 μ g/g。由此可见, 不同的贮藏条件会影响红参药材中人参皂苷类成分的含量。

表 5 不同贮藏条件下红参样品的测定结果 (μ g/g, $n=3$)

Table 5 Contents of samples under different storage conditions (μ g/g, $n=3$)

Compound	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Re	6 983.81	11 412.42	9 235.16	10 918.81	9 447.39	11 538.24	8 405.95	8 685.71	10 414.40	9 798.37
Rg ₁	6 093.83	4 451.46	4 329.30	4 681.82	5 212.70	3 801.15	4 273.48	4 193.20	4 239.69	4 358.70
Rf	3 829.00	4 104.76	4 942.85	4 886.73	2 974.12	4 136.78	5 239.39	4 317.19	3 217.71	4 573.67
20(S) - Rg ₂	1 140.06	1 403.49	1 513.93	1 701.51	1 311.44	1 470.17	1 293.73	1 388.03	1 157.58	1 386.09
20(S) - Rh ₁	29.17	92.51	36.03	50.18	10.20	24.66	41.07	54.39	72.09	79.59
20(R) - Rg ₂	157.62	110.92	141.79	156.37	112.88	107.36	120.34	112.05	120.39	132.31
Rb ₁	10 216.11	8 480.05	8 526.56	10 492.05	8 925.67	9 022.95	8 240.37	8 760.94	8 884.16	7 937.33
20(R) - Rh ₁	199.56	133.11	213.00	230.97	118.54	124.72	149.19	95.60	171.30	179.66
Rc	4 158.48	3 991.22	3 727.71	4 436.28	3 899.75	4 617.58	3 884.61	4 364.65	4 013.53	3 468.07
Ro	499.53	502.34	575.76	618.54	527.63	684.27	573.51	671.18	609.99	689.30
Rb ₂	3 223.03	3 573.09	3 674.76	3 573.09	3 576.66	3 387.69	3 839.13	3 222.38	3 602.61	2 908.78
F ₁	5.15	6.93	6.04	6.02	5.32	3.12	4.52	3.56	4.31	4.41

(续表 5)

Compound	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Rd	8 151.28	6 535.77	7 128.52	8 644.65	5 750.68	7 213.66	7 458.55	5 755.28	6 053.37	6 380.15
F ₂	34.84	36.98	23.59	27.16	23.77	20.01	20.39	11.64	20.21	14.11
20(S) - Rg ₅	887.24	1 683.64	232.30	984.50	1 056.85	989.84	1 259.32	1 168.81	1 460.18	1 331.63
20(R) - Rg ₅	2 207.31	1 622.23	2 165.32	2 410.29	1 789.93	1 942.93	2 164.02	1 777.51	2 095.65	1 761.19
CK	17.43	10.93	20.56	16.12	22.50	21.14	21.09	21.05	20.75	21.36
Sum	47 833.45	48 151.18	46 493.18	53 835.10	44 766.03	49 106.27	46 988.66	44 603.17	46 157.92	45 024.72

2.5 聚类分析

根据不同贮藏条件红参样品中各目标成分含量的测定结果,用聚类分析中的 Ward 法,利用 SPSS 中的 Hierarchical Cluster 分析,对 10 个样品进行聚类分析。聚类的原则是相近的聚为一类,即距离最近或最相似的聚为一类,距离值越小,个体或变量之间越相近^[18]。当临界值为 20~25 时可将不同贮藏方法的红参样品分为 2 类, S1、S4 聚为一类,其他样品聚为一类(图 2),结果表明不同贮藏条件下红参样品的质量存在一定差异。

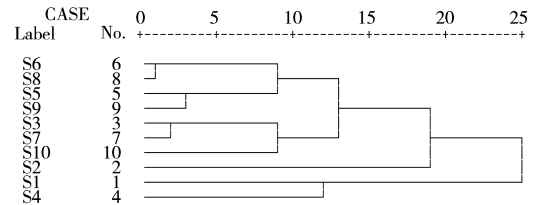


图 2 不同贮藏条件下红参样品的聚类分析谱系图
Fig. 2 Dendrogram of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra under different storage conditions

2.6 主成分分析

主成分分析是一种降维或将多个指标转化为少数几个综合指标的方法,有利于克服单一指标的局限性,通过综合多种指标来准确、可靠地评判药材品质^[13-14],对于红参质量的综合评价具有重要意义。

本文以人参皂苷类成分为指标,对不同贮藏条件下红参药材中 17 种指标成分进行主成分分析。通过 SPSS 16.0 计算主成分的特征值、贡献率和累积贡献率,结果如下:第一主成分的特征值为 5.406,方差贡献率为 31.801%;第二主成分的特征值为 3.228,方差贡献率为 18.991%;第三主成分的特征值为 2.793,方差贡献率为 16.431%;第四主成分的特征值为 1.947,方差贡献率为 11.450%;第五主成分的特征值为 1.531,方差贡献率为 9.007%;其他主成分特征值的贡献率依次减少。前 5 个主成分的累积贡献率达 87.681%,且特征值均大于 1,满足主成分的选取要求^[15],表明前 5 个主成分可以反映 17 种人参皂苷的综合质量。

每个主成分均为原始变量的线性组合,线性组合中各变量对主成分的影响用载荷表示,载荷绝对值越大,其影响越大^[16],在主成分分析中,一般认为大于 0.30,表明载荷显著^[17]。不同贮藏条件下 17 种人参皂苷的载荷如表 6 所示,在第一主成分中,人参皂苷 20(S) - Rh₁ 和 Rd 的因子载荷量最大,说明第一主成分主要反映了人参皂苷 20(S) - Rh₁、Rd 的信息;同理,第二主成分主要反映了人参皂苷 Ro、CK 的信息;第三主成分主要反映了人参皂苷 Re、20(S) - Rg₂ 的信息;第四主成分主要反映了人参皂苷 Rc、Rb₁ 的信息;第五主成分主要反映了人参皂苷 Rb₂、20(R) - Rg₂ 的信息。前 5 个主成分基本包含了大部分成分的信息。

表 6 初始因子载荷矩阵

Table 6 Component matrix

Compound	Principal component				
	1	2	3	4	5
Re	-0.268	-0.095	0.767	0.342	-0.033
Rg ₁	0.628	-0.349	-0.615	-0.005	0.229
Rf	0.235	0.475	0.513	-0.414	-0.123
20(S) - Rg ₂	0.196	0.404	0.734	0.090	-0.112
20(S) - Rh ₁	0.863	0.230	-0.062	-0.306	0.300
20(R) - Rg ₂	-0.257	-0.411	0.586	-0.380	0.408
Rb ₁	0.745	0.116	-0.100	0.532	0.313
20(R) - Rh ₁	0.785	0.225	0.175	-0.390	0.137

(续表 6)

Compound	Principal component				
	1	2	3	4	5
Re	0.125	0.261	0.141	0.899	0.166
Ro	-0.531	0.723	0.276	-0.006	0.331
Rb ₂	0.255	-0.129	0.179	0.193	-0.835
F ₁	0.593	-0.578	0.326	-0.247	-0.237
Rd	0.844	0.290	0.217	0.091	0.105
F ₂	0.687	-0.652	0.090	0.185	-0.045
20(S) - Rg ₃	-0.469	-0.572	0.223	0.111	0.349
20(R) - Rg ₃	0.750	0.492	-0.020	0.040	-0.093
CK	-0.427	0.635	-0.545	-0.122	-0.204

2.7 综合评价

不同贮藏条件下红参样品的主成分各因子总得分见表 7, 可根据权重系数计算得出各样品的综合得分。权重系数的计算依据其方差贡献的大小, 即各主成分的贡献率与 5 个主成分的总贡献率之比, 第一主成分的权重为 $31.801\% / 87.681\% = 0.3627$, 同理可得第二、三、四、五的权重为 0.2167、0.1874、0.1306、0.1027。各主成分的因子得分与其权重乘积之和相加, 得出各红参样品的总因子得分 F, 得分越高, 表明质量越好^[18]。由表 7 可知, 以纸箱为包装, 贮藏于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和常温条件下的红参样品(S4、S1)综合得分较高, 说明这两种贮藏条件下的红参样品整体质量较好。以纸箱为包装, 贮藏于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的红参样品(S5)综合质量较差。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 与 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 均为冷冻贮藏, 但 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为缓冻, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为速冻, 两者的冰冻速度有差异, 这有可能是 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 与 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏条件下的红参样品质量相差较大的原因^[19]。

聚类分析结果表明, 以纸箱为包装, 贮藏于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和常温条件下的红参样品(S4、S1)聚为一类, 说明这两个样品之间的相似性较高。综合评价得分结果表明, 以纸箱为包装, 贮藏于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和常温条件下的红参样品(S4、S1)整体质量较好。但本文只考察了半年的贮藏期, 若贮藏期更长, 常温贮藏下的红参样品可能会出现虫蛀、发霉等现象^[20], 所以在短期贮藏中, 考虑以纸箱为包装, 存放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或常温条件下; 但需要长期贮藏时, 以纸箱为包装, 存放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下较为合适, 这与已有文献报道结果一致^[21]。

表 7 不同贮藏条件红参主成分的得分和综合得分
Table 7 Component scores and comprehensive scores of samples

No.	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F
S1	1.627	-0.455	-1.656	0.108	1.171	0.316
S2	-0.131	-2.312	1.435	0.127	-0.072	-0.270
S3	0.734	0.722	0.210	-1.220	-1.492	0.149
S4	1.597	0.784	1.392	0.634	0.511	1.145
S5	-0.368	-0.698	-1.355	0.574	-1.042	-0.571
S6	-0.728	1.060	0.405	1.654	-0.016	0.256
S7	-0.064	0.334	-0.112	-0.586	-1.274	-0.179
S8	-1.198	0.592	-0.304	0.415	0.593	-0.248
S9	-0.563	-0.361	-0.242	0.159	0.193	-0.287
S10	-0.906	0.333	0.227	-1.864	1.427	-0.311

3 结 论

本文建立了 UFLC - QTRAP - MS/MS 法同时测定红参中人参皂苷 Rb₁、Rc、Rb₂、Rd、F₂、20(S) - Rg₃、20(R) - Rg₃、CK、Re、Rg₁、Rf、20(S) - Rg₂、20(S) - Rh₁、20(R) - Rg₂、20(R) - Rh₁、F₁、Ro 17 种指标成分含量的方法, 并结合主成分分析和聚类分析法对不同贮藏条件下红参药材进行比较分析与综合评价。本研究可为红参适宜贮藏条件的优选提供基础资料, 同时为红参药材内在质量的综合评价和全面控制提供新的方法参考。

参考文献：

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. *Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Part 1*. Beijing: China Medical Science Press(中国国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 第一部. 北京: 中国医药科技出版社), **2015**: 153 - 154.
- [2] Zhou Q Q, Ren W M, Wang Y H, Yang D, Wang G M, Li Y R. *Shanghai J. Tradit. Chin. Med.* (周秋秋, 任谓明, 王艳红, 杨丹, 王国明, 李月茹. 上海中医药杂志), **2016**, 50(2): 97 - 100.
- [3] Hwang I G, Kim H Y, Joung E M, Woo K S, Jeong J H, Yu K W, Lee J, Jeong H S. *Food Sci. Biotechnol.*, **2010**, 19(4): 941 - 949.
- [4] Sun B S, Xu M Y, Li Z, Wang Y B, Sung C K. *J. Ginseng Res.*, **2012**, 36(3): 277 - 290.
- [5] Liu S J, Wang Z L, Zhang X, Chen H P, Chen L, Liu Y P. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* (刘素娟, 王智磊, 张鑫, 陈鸿平, 陈林, 刘友平. 时珍国医国药), **2017**, 28(4): 949 - 951.
- [6] Zhu W X, Li A G, Chen F, Zhang Y D, Zhu Z B, Li X Y. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* (朱卫星, 李爱光, 陈方, 张彦东, 朱志冰, 李晓燕. 时珍国医国药), **2006**, 17(11): 2304 - 2305.
- [7] Wan Y, Sun X Y, Tian Y N, Wang Q, Duan J A, Yan H. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* (万颖, 孙晓燕, 田亚男, 王强, 段金璇, 严辉. 时珍国医国药), **2010**, 21(11): 2984 - 2985.
- [8] Bi F J, Zhong S H, Gu L H. *Chin. J. Pharm. Anal.* (毕福钧, 钟顺好, 顾利红. 药物分析杂志), **2010**, 30(9): 1720 - 1724.
- [9] Wu X S, Ye Z L, Guo Q S, Lu Z M. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*(吴雪松, 叶正良, 郭巧生, 路政民. 中草药), **2013**, 44(24): 3551 - 3556.
- [10] Zhang C Y, Chen S L, Dong L. *Chin. J. Chromatogr.* (张翠英, 陈士林, 董梁. 色谱), **2015**, 33(5): 514 - 521.
- [11] Ye J, Gao Y, Tian S, Su J, Zhang W. *Phytomedicine*, **2018**, 44: 164 - 172.
- [12] Chung I M, Kim J W, Seguin P, Jun Y M, Kim S H. *Food Chem.*, **2012**, 130(1): 73 - 83.
- [13] Zhou J, Wu Q N, Dai S L, Liang Q L, Yue W. *Acta Chin. Med. Pharm.* (周婧, 吴启南, 戴仕林, 梁侨丽, 乐巍. 中医药学报), **2012**, 40(6): 25 - 28.
- [14] Jiang H F, Ouyang Z, Su S L, Yan H. *Chin. Med. Mat.* (蒋海峰, 欧阳臻, 宿树兰, 严辉. 中药材), **2011**, 34(6): 904 - 911.
- [15] Xia Y M, Wang X, Mao R, Huang Y F, Liu B L. *J. Instrum. Anal.* (夏义苗, 王欣, 毛锐, 黄远芬, 刘宝林. 分析测试学报), **2015**, 34(9): 999 - 1007.
- [16] Luo Y Y, Liu J X, Liu X H, Lan C W, Hou Y, Ma Y, Wang S N, Cai B C. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*(罗益远, 刘娟秀, 刘训红, 兰才武, 侯娅, 马阳, 王胜男, 蔡宝昌. 中草药), **2016**, 47(2): 318 - 323.
- [17] Zhao X S, Li X H. *Stud. Trace Elem. Health*(赵旭升, 李西辉. 微量元素与健康研究), **2007**, 24(3): 25 - 26.
- [18] Cheng C. *Statistical Product and Service Solutions*. Beijing: China Statistics Press(程琮. SPSS 统计分析. 北京: 中国统计出版社), **2016**.
- [19] Yu D D, Hou X N. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*(余大地, 侯晓宁. 中草药), **1996**, 27(4): 240 - 241.
- [20] Song C J. *Pharm. Bull.* (宋承吉. 药学通报), **1982**, 17(9): 519 - 522.
- [21] Mou J F, Li S J. *Chin. Wild Plant Resour.* (牟君富, 李淑久. 中国野生植物资源), **2012**, 31(3): 63 - 66.