

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01507

• 技术和方法 •

高效液相色谱法快速测定人参中8种主要皂苷类成分的含量

赵亮¹, 吕磊¹, 纪松岗², 李捷伟^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

2. 海军 401 医院药剂科, 青岛 266071

[摘要] **目的:** 采用高效液相色谱法测定人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 中 8 种主要皂苷类成分的含量。**方法:** 人参药材以甲醇超声 30 min 提取。采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (3.0 mm×100 mm, 3.5 μm), 流动相为乙腈 (A) 和水 (B), 梯度洗脱; A 相含量随时间的变化为 18%~20% (0~14 min), 20%~29% (14~20 min), 29% (20~25 min), 29%~37% (25~34 min), 37%~55% (34~40 min); 流速 0.6 ml/min; 检测波长 203 nm; 柱温 25℃; 进样量 10 μl。**结果:** 8 种人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁ 在 35 min 内基线分离, 线性良好 ($r=0.9999$)。方法学考察表明, 日内日间精密度, 最低检测限和定量限的范围均符合相关标准, 加样回收率 ($n=3$) 分别为 101.07%、98.72%、101.57%、101.71%、102.12%、99.58%、98.62%、100.12%。测定了 3 个厂家 6 个批次人参药材中 8 种人参皂苷的含量。**结论:** 该方法快速简便, 稳定可靠, 可以用来对人参药材进行质量控制。

[关键词] 人参; 人参皂苷; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R 931.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1507-04

High performance liquid chromatography in rapid determination of eight ginsenosides in the root of *Panax ginseng*

ZHAO Liang¹, LÜ Lei¹, JI Song-gang², LI Jie-wei^{1*}

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071

[ABSTRACT] **Objective:** To determine the contents of eight ginsenosides in the root of *Panax ginseng* by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods:** *Panax ginseng* was extracted with methanol solution for 30 min. The HPLC condition was as follows-column: Agilent SB-C₁₈ (3.0 mm×100 mm, 3.5 μm); mobile phase: A was ACN, B was H₂O, with gradient elution; the gradient of A phase: 18%-20% (0-14 min), 20%-29% (14-20 min), 29% (20-25 min), 29%-37% (25-34 min), 37%-55% (34-40 min); flow speed: 0.6 ml/min; detection: 203 nm; temperature of column: 25℃; injection volume: 10 μl.

Results: Eight ginsenosides (Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf and Rg₁) were separated at baseline within 35 min with good linearity ($r=0.9999$). The result of intra-day and inter-day precisions, limits of detection and quantitation were all within the normal range. The recovery rates ($n=3$) were 101.07%, 98.72%, 101.57%, 101.71%, 102.12%, 99.58%, 98.62%, and 100.12%, respectively. The contents of eight ginsenosides in 6 different batches of *Panax ginseng* from 3 sources were determined.

Conclusion: The present method is rapid, simple, accurate and can be used to control the quality of *Panax ginseng*.

[KEY WORDS] *Panax ginseng*; ginsenosides; high performance liquid chromatography; determination

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1507-1510]

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 为五加科人参属植物, 具有大补元气、益肺、生津、安神等功效, 在《神农本草经》中被列为上品, 是常用的滋补强壮药^[1]。现代药物学研究已证明人参皂苷是其活性成分, 因此人参皂苷含量的多少是评价人参内在质量的重要指标。

《中华人民共和国药典》(2005 年版)一部以高效液相色谱

法测定人参皂苷 Rg₁ 与 Re 含量之和、Rb₁ 含量分别不低于 0.30% 和 0.20% 作为人参的质量标准^[1]。该方法测定成分比较单一, 很难反映药材整体质量的优劣。人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁ 为人参中的主要皂苷类成分。人参药材及其复方中人参皂苷的含量测定已有不少报道^[2-3], 但大多局限于对药典中规定的 Rg₁、Re 和 Rb₁ 的测

[收稿日期] 2008-08-07

[接受日期] 2008-09-18

[作者简介] 赵亮, 硕士, 主管药师. E-mail: zhaoliangphar@hotmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070802, E-mail: jwli@smmu.edu.cn

定。国内已报道^[4-5]的多种人参皂苷含量测定的研究,或分析时间较长,条件繁琐,或未能较好地解决 R_{G1} 与 R_e 以及 R_{b2} 与 R_{b3} 的分离问题,未见同时测定这 8 种成分的报道。国外近年对人参的研究大多致力于利用液质联用技术对多种皂苷类成分的定性鉴别^[6-7] 以及体内活性研究^[8-9]。本研究采用高效液相色谱法首次选用粒径为 3.5 μm 的快速液相柱,在 35 min 内同时测定了人参中这 8 种主要皂苷类成分的含量,有利于更全面、有效地控制人参药材的质量。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括 G1379A 真空脱气机、G1311A 四元泵、G1367A 自动进样器、G1316A 柱温箱和 G1315B DAD 检测器;KUDOS-SK2200H 超声发生器(上海科导超声仪器公司);METTLER AE240 型十万分之一电子天平(德国梅特勒公司);DJ-04 药材粉碎机(上海淀久公司)。

1.2 药品和试剂 人参皂苷对照品 R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_e、R_f、R_{G1} 购自中国药品生物制品检定所(纯度>98.0%),R_c、R_d 购自上海融禾医药科技发展有限公司(纯度>98.0%)。人参药材购自不同厂家:上海华宇制药有限公司,批号 20071121 和 20071215;上海德康药店,批号 20080104 和 20080409;上海雷允上大药房,批号 20080329 和 20080517。乙腈和甲醇为色谱纯(Fisher,USA),水为娃哈哈纯净水。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷对照品 R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_c、R_d、R_e、R_f、R_{G1},分别为 4.70、5.83、2.09、6.26、6.33、5.18、4.80、5.62 mg,置 10 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度分别为 470、583、209、626、633、518、480、562 μg/ml 的母液。精密量取上述混合对照品溶液 0.5、0.2、0.1、0.05、0.02、0.01 ml,分别置 1 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得系列浓度的混合对照品溶液,置于 4℃ 冰箱保存。

2.1.2 人参药材样品溶液的制备 精密称取人参药材粉末(过三号筛)约 1.0 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇 30 ml,超声 30 min,降至室温,补足失重,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,即得,置于 4℃ 冰箱保存。

2.2 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈(3.0 mm×100 mm,3.5 μm);流动相为乙腈(A)和水(B),梯度洗脱;A 相含量随时间的变化:18%~20%(0~14 min),20%~29%(14~20 min),29%(20~25 min),29%~37%(25~34 min),37%~55%(34~40 min),流速 0.6 ml/min;检测波长 203 nm;柱温 25℃;进样量 10 μl。

2.3 方法学考察 按出峰顺序,8 种人参皂苷 R_{G1}、R_e、R_f、R_{b1}、R_c、R_{b2}、R_{b3}、R_d 的保留时间分别为:15.713、16.814、23.510、28.599、30.030、31.254、31.677、33.292 min。根据

对照品溶液的色谱图中 8 个峰的相关参数计算系统适应性,其理论塔板数分别为:11 529、17 022、156 222、89 949、166 291、222 362、236 437、276 995,分离度分别为:2.00、17.75、16.41、4.23、4.36、1.61、6.28,脱尾因子分别为:1.013、0.958、0.987、0.973、0.979、0.981、0.950、0.985。空白、对照品以及样品的色谱图见图 1。

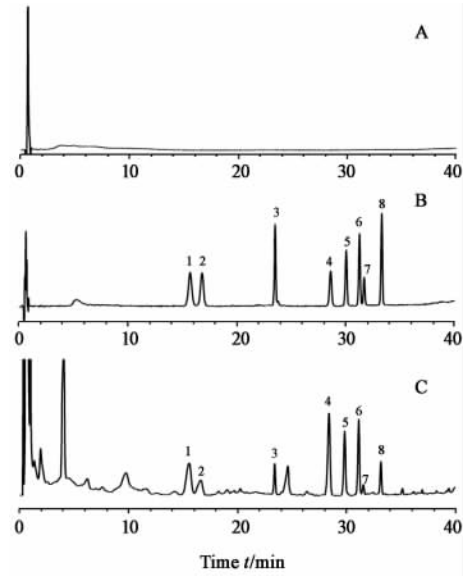


图 1 空白(A)、对照品溶液(B)及人参样品溶液(C)的 HPLC/DAD 色谱图

Fig 1 HPLC/DAD chromatograms of blank control(A), reference substance(B), and sample of *Panax ginseng* (C)

1:R_{G1};2:R_e;3:R_f;4:R_{b1};5:R_c;6:R_{b2};7:R_{b3};8:R_d

2.3.1 线性关系 分别将“2.1.1”项下制备的不同浓度的系列对照品溶液按“2.2”项下色谱条件依次连续进样,分别重复 3 次,以对照品溶液浓度(X, μg/ml)对峰面积(Y)进行线性回归,呈良好的线性关系(表 1)。

表 1 8 种人参皂苷的线性关系

Tab 1 Linear relationship of 8 ginsenosides

Component	Regression equation	Linear range ρ _B /(μg·ml ⁻¹)	r
R _{G1}	Y=4.682X+0.140	5.62-281.0	0.999 9
R _e	Y=4.567X-1.764	5.18-259.0	0.999 9
R _f	Y=5.502X+1.588	4.80-240.0	0.999 9
R _{b1}	Y=3.898X-0.381	4.70-235.0	0.999 9
R _c	Y=3.560X-0.485	6.26-313.0	0.999 9
R _{b2}	Y=4.409X-0.255	5.83-291.5	0.999 9
R _{b3}	Y=4.685X+1.129	2.09-104.5	0.999 9
R _d	Y=4.966X+0.791	6.33-316.5	0.999 9

2.3.2 精密度试验 取“2.1.1”项下制备的人参皂苷系列混合对照品溶液中的第 1、4、6 三个点作为低、中、高三个浓度点,在 1 d 以内分别连续进样 3 次,以及连续 3 d 分别进样,根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密度。结果 8

种人参皂苷的日内精密度高浓度点 RSD% 均 < 2.0%, 中、高浓度点 RSD% 均 < 1.5%; 日间精密度高、中浓度点 RSD% 均 < 2.0%, 高浓度点 RSD% 均 < 1.5%, 表明方法的精密度高。

2.3.3 定量限和检测限考察 将人参皂苷对照品溶液进行逐级稀释, 以信噪比 10:1 时, 确定其最低定量限; 以信噪比 3:1 时, 确定其最低检测限。8 种人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁ 的最低定量限分别为 4.70、5.83、2.09、6.26、5.18、6.33、4.80、5.62 μg/ml; 最低检测限分别为 2.462、2.002、1.482、2.050、3.129、2.369、1.083、3.095 μg/ml。样品色谱图(图 1C)中, 2 号峰 Re 和 7 号峰 Rb₃ 的信噪比分别为 52.8:1 和 36.3:1。

2.3.4 稳定性试验 取制备的人参药材样品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 测定 8 种人参皂苷的峰面积, 考察稳定性。8 种人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁ 峰面积 RSD% 分别为 1.58%、1.81%、1.52%、0.81%、1.13%、1.47%、1.74%、1.96%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 精密称取同一批次人参药材样品 5 份, 各约 1 g, 按“2.1.2”项下方法分别制成样品溶液, 进样分析。人参中 8 种皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁ 的平

均含量和 RSD% (n=5) 分别为 2.811 mg/g (RSD% = 0.13%), 1.366 mg/g (RSD% = 1.70%), 0.715 mg/g (RSD% = 1.49%), 4.658 mg/g (RSD% = 1.44%), 3.171 mg/g (RSD% = 0.33%), 2.652 mg/g (RSD% = 0.92%), 0.338 mg/g (RSD% = 1.43%), 0.928 mg/g (RSD% = 1.62%)。结果表明本方法的重复性良好。

2.3.6 加样回收试验 精密称取已知含量的同一批次人参样品 1 g 共 9 份, 每 3 份为 1 组, 按低、中、高 3 个水平分别加入对照品一定量(样品中各成分含量的 50%、100%、150%), 按“2.1.2”项下制备, 进样分析, 结果 8 种人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁ 的回收率和 RSD% (n=3) 分别为 101.07% (RSD% = 1.07%), 98.72% (RSD% = 1.18%), 101.57% (RSD% = 1.01%), 101.71% (RSD% = 1.28%), 102.12% (RSD% = 1.09%), 99.58% (RSD% = 0.93%), 98.62% (RSD% = 1.19%), 100.12% (RSD% = 1.21%)。结果表明, 以本法同时测定 8 种人参皂苷的含量回收率结果良好。

2.4 样品测定 按“2.1.2”项下方法制备华宇药业、德康药店和雷允上大药房 3 个厂家 6 个批次的人参药材样品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析计算样品含量, 结果见表 2。

表 2 各批次人参药材中 8 种人参皂苷含量测定结果

Tab 2 Determination results of 8 ginsenosides in each batch of *Panax ginseng*

[n=3, $\bar{x} \pm s, w_B / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$]

Source	Batch	Rg ₁	Re	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd
HuaYu	20071121	2.467 ± 0.021	1.272 ± 0.013	0.600 ± 0.007	3.786 ± 0.025	2.481 ± 0.014	2.079 ± 0.017	0.225 ± 0.003	0.707 ± 0.008
	20071215	2.435 ± 0.015	1.240 ± 0.007	0.626 ± 0.003	3.777 ± 0.020	2.562 ± 0.016	2.122 ± 0.005	0.238 ± 0.002	0.737 ± 0.009
DeKang	20080104	2.904 ± 0.022	1.414 ± 0.011	0.743 ± 0.006	4.694 ± 0.029	3.227 ± 0.006	2.712 ± 0.008	0.357 ± 0.005	0.969 ± 0.006
	20080409	2.928 ± 0.010	1.423 ± 0.009	0.745 ± 0.010	4.800 ± 0.027	3.277 ± 0.019	2.735 ± 0.017	0.333 ± 0.006	0.972 ± 0.005
LeiYunShang	20080329	2.889 ± 0.020	1.391 ± 0.009	0.738 ± 0.007	4.790 ± 0.013	3.233 ± 0.009	2.730 ± 0.017	0.342 ± 0.005	0.934 ± 0.007
	20080517	2.880 ± 0.014	1.456 ± 0.012	0.747 ± 0.003	4.770 ± 0.018	3.237 ± 0.013	2.507 ± 0.015	0.339 ± 0.003	0.913 ± 0.005

3 讨论

3.1 提取方法的选择 对提取方法的选择, 考察了回流法和超声法, 采用文献报道^[2,10] 的氯仿回流法得到的总皂苷含量 17.17 mg/g, 与用甲醇超声得到的 17.23 mg/g 结果非常接近, 而且回流法过程繁琐, 易造成损失, 于是选用简便的超声法。对于超声提取, 本实验采用了 3 因素 3 水平的 3×3 拉丁方设计, 溶剂种类考察了甲醇、50% 甲醇、95% 乙醇; 溶剂体积考察了 30、40、50 ml; 超声时间考察了 30、40、50 min。结果表明甲醇的提取效率最高, 体积以 30 ml 最佳, 而超声时间的影响不大, 所以采用以 1 g 样品中加入甲醇 30 ml 提取 30 min 作为最佳前处理条件。正交试验结果见表 3。

表 3 正交试验结果

Tab 3 The results of orthogonal experiment

No.	Solvent	Volume of solvent V/ml	Time of extraction t/min	Total content of ginsenosides w _B /(mg · g ⁻¹)
1	Methanol	30	30	17.23
2	Methanol	40	40	16.95
3	Methanol	50	50	16.73
4	50% Methanol	30	40	12.88
5	50% Methanol	40	50	12.65
6	50% Methanol	50	30	12.51
7	95% Ethanol	30	50	10.46
8	95% Ethanol	40	30	10.31
9	95% Ethanol	50	40	10.15

3.2 液相条件的选择

3.2.1 色谱柱的选择 在色谱柱的选择上考察了250 mm×4.6 mm(粒径 5 μm)、150 mm×4.6 mm(粒径 5 μm)以及 100 mm×3.0 mm(粒径 3.5 μm)三种规格的柱子,长柱有利于提高分离度但会延长分析时间,3.5 μm 粒径的短柱能有效提高柱效并缩短分析时间还能获得良好的分离度,因此选用此柱。

3.2.2 流动相的选择 流动相的选择比较了甲醇-水和乙腈-水系统,后者的洗脱效果要明显好于前者,并且由于乙腈黏度小,可以有效降低系统压力,于是采用乙腈-水系统。由于人参皂苷类成分的最佳紫外吸收波长为 203 nm,接近末端吸收,在流动相中加入甲酸或乙酸等含羧基的有机酸会明显造成基线波动,而加入磷酸对整体分离情况没有明显影响,最终选择乙腈和纯水作为最佳流动相。

3.2.3 梯度的摸索 选择合适的梯度是分离的关键,本文中 8 种人参皂苷分离的难点在 R_{g₁} 与 R_e 以及 R_{b₂} 和 R_{b₃} 的分离。R_{g₁} 与 R_e 的极性非常相似,曾有多篇单独分离这两种成分的报道^[10-12],但或分离时间较长,条件繁琐,或峰形不佳。本实验采用快速分离柱,考察出了最佳的梯度比例,乙腈 18%~20%(0~14 min),在保证峰形和柱效的前提下在较短时间内完成了两种皂苷的基线分离;R_{b₂} 和 R_{b₃} 是同分异构体,并且后者的含量很低,容易包裹在 R_{b₂} 中一起出峰,目前未见对 R_{b₃} 测定的报道。本实验选择了合适的梯度,乙腈 29%~37%(25~34 min),成功将 R_{b₂} 和 R_{b₃} 基线分离,准确测出了 R_{b₃} 的含量。

3.2.4 温度和流速的选择 温度和流速对分离的影响较大,降低温度能有效提高皂苷的分离度,但由于降低温度会增加流动相的黏度,这样明显会增加系统的压力,综合考虑选择室温 25℃ 为运行温度。低流速有利于提高分离度但会延长分析时间,实验表明,选择 0.6 ml/min 的流速既能保证分离度又能良好控制分析时间,因此选为最佳流速。

本实验对 3 个厂家 6 个批次的人参药材中 8 种皂苷成分进行了含量测定,其结果符合《中华人民共和国药典》(2005 年版)中人参项下 HPLC 法对 R_{g₁} 和 R_e 总含量以及 R_{b₁} 含量的要求。方法学考察表明,日内日间精密度、最低检测限、加样回收率的范围均符合相关标准。结果表明,在本研究介绍的

的供试品制备方法和色谱条件下,人参皂苷 R_{b₁}、R_{b₂}、R_{b₃}、R_c、R_d、R_e、R_f、R_{g₁} 在较短时间内分离良好,所建立的方法快速简便,稳定可靠,可以用来对人参药材进行质量控制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:8.

[2] 陈桂云,陈卫平. HPLC-ELSD 测定红参中人参皂苷 R_{g₁}、R_e、R_{b₁} 含量[J]. 药物分析杂志,2007,27:754-755.

[3] 魏 萍. 参术片中人参皂苷 R_{g₁}、R_e 和 R_{b₁} 的 HPLC 测定[J]. 世界中西医结合杂志,2007,2:215-216.

[4] 曹俊岭,李祖伦,付 强,鄢 丹,廖庆文,肖小河. 人参中 8 种皂苷的 HPLC 测定[J]. 中药材,2006,29:1038-1040.

[5] 肖新月,尹继飞,张南平,林瑞超. 不同生长年限的人参中 8 种主要皂苷成分的分析研究[J]. 药物分析杂志,2004,24:238-244.

[6] Ma X Q, Liang X M, Xu Q, Zhang X Z, Xiao H B. Identification of ginsenosides in roots of *Panax ginseng* by HPLC-APCI/MS [J]. Phytochem Anal, 2005, 16: 181-187.

[7] Leung K S, Chan K, Bensoussan A, Munroe M J. Application of atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry in the identification and differentiation of *Panax* species [J]. Phytochem Anal, 2007, 18: 146-150.

[8] Yu L C, Chen S C, Chang W C, Huang Y C, Lin K M, Lai P H, et al. Stability of angiogenic agents, ginsenoside R_{g₁} and Re, isolated from *Panax ginseng*: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. Intern J Pharmaceut, 2007, 328: 168-176.

[9] Chang Y, Huang W J, Tien L T, Wang S J. Ginsenosides R_{g₁} and R_{b₁} enhance glutamate release through activation of protein kinase A in rat cerebrocortical nerve terminals (synaptosomes) [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 578: 28-36.

[10] 阮 鸣. 高效液相色谱法测定人参总皂苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18: 134-135.

[11] 王晓辉,李 清,陈晓辉,王志玮,戴锦娜,毕开顺. HPLC 法同时测定注射用艾迪(冻干)中人参皂苷 R_{g₁} 和人参皂苷 R_e 的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27: 503-505.

[12] 王淑红,宋潇潇,熊 英. RP-HPLC 法测定人参健牌片中人参皂苷 R_{g₁}、R_e 的含量[J]. 中国药事, 2007, 21: 601-603.

[本文编辑] 尹 茶