

西洋参根及茎叶皂苷提取物中 12种主要皂苷成分的分析研究

薛燕¹, 闻莉²

(1. 中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050 2 首都医科大学北京同仁医院, 北京 100730)

摘要 目的: 测定西洋参根及茎叶皂苷提取物中 12种单体人参皂苷的含量。方法: 采用 Waters Alliance 2690 液相色谱仪, 配 Waters 996型 - PDA 检测器, XTerra RP18 色谱柱 (3.9 mm × 150 mm, 5 μm), 乙腈 (A) - 水 (B) 为流动相, 梯度洗脱 [0 min (20% A) → 20 min (20% A) → 25 min (25% A) → 45 min (26% A) → 55 min (27% A) → 70 min (32% A) → 80 min (47% A) → 85 min (53% A) → 90 min (53% A)], 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 40 ℃。结果: 12种人参皂苷 R_{g1}、R_{g2}、R_{g3}、R_e、R_d、R_{h1}、R_{h2}、R_f、R_c、R_{b1}、R_{b2} 和 R_{b3} 浓度在其各自的线性范围内, 与峰面积呈良好的线性关系, *r* 值均 > 0.99 (*n* = 6); 回收率在 91.0% ~ 100.4% 范围内。结论: 本方法精密度和重现性良好, 适用于西洋参根及茎叶皂苷提取物中的单体人参皂苷的分析研究, 可用于控制西洋参根及茎叶皂苷提取物的质量。

关键词: 西洋参; 单体皂苷; RP-HPLC

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0079-03

RP-HPLC determination of twelve ginsenosides in extract of root and stem and leaf from *Panax quinquefolius* L.

XUE Yan¹, WEN Li²

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

(2. Beijing Tong Ren Hospital Capital Medical University, Beijing 100730, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for determination of the contents of twelve active constituents ginsenoside R_{g1}, R_{g2}, R_{g3}, R_e, R_d, R_{h1}, R_{h2}, R_f, R_c, R_{b1}, R_{b2} and R_{b3} in extract of root and stem and leaf from *Panax quinquefolius*. **Method** The separating was performed on a XTerra RP18 column (3.9 mm × 150 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile (A) - water (B), with gradient elution [0 min (20% A) → 20 min (20% A) → 25 min (25% A) → 45 min (26% A) → 55 min (27% A) → 70 min (32% A) → 80 min (47% A) → 85 min (53% A) → 90 min (53% A)] at a flow-rate of 1.0 mL · min⁻¹. Detection was at 203 nm, and the column temperature was set up at 40 ℃. **Results** R_{g1}, R_{g2}, R_{g3}, R_e, R_d, R_{h1}, R_{h2}, R_f, R_c, R_{b1}, R_{b2} and R_{b3} had good linear relation in their linear ranges (*r* ≥ 0.99), the average recoveries were between 91.0% - 100.4%. **Conclusion** This method is accurate and reproducible as well as specific and can assess the quality of extract of root and stem and leaf from *Panax quinquefolius*.

Key words extract of *Panax quinquefolius* L; ginsenoside; RP-HPLC

西洋参是五加科 *Panax quinquefolium* L 的干燥根, 原产北美地区, 近年来在我国不少地区引种成功。研究表明, 西洋参中含有的多种人参皂苷, 具有镇静、镇痛、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、调节免疫功能^[1]等多方面的药理活性, 而人参皂苷作为人参类保健食品的功能成分已得到了广泛的认同^[2]。西洋参是多年生草本植物, 地下根的采集一般以 4~5 年为好, 而每年枯萎的地上部分因含丰富的人参皂

苷同样可以被充分利用。本文采用乙腈 - 水梯度洗脱, 将不同来源的 11 批西洋参根及茎叶的皂苷提取物进行了比较分析, 为其质量评价提供了依据。

1 仪器、试剂

HPLC 系统: Waters Alliance 2690 液相色谱仪, 配 Waters 996 型 PDA 检测器, Millennium 32 色谱管理软件, T 680 H 超声清洗器 (Ema 公司)。

对照品: 人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} 由中国药品生物制品检定所提供, R_{g_2} , R_{g_3} , R_e , R_d , R_{h_1} , R_{h_2} , R_f , R_c , R_{b_2} , R_{b_3} (纯度均在 98% 以上), 由吉林大学基础医学院提供。

试剂: 乙腈、甲醇均为色谱纯 (美国 B&G 公司), 水为重蒸水。被测样品西洋参根及茎叶的皂苷提取物共 11 批 (皂苷含量均在 80% 以上), 购自吉林省不同厂家。

2 色谱分析条件

色谱柱: XTerra PR18 (3.9 mm × 150 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 [0 min (20% A) → 20 min (20% A) → 25 min (25% A) → 45 min (26% A) → 55 min (27% A) → 70 min (32% A) → 80 min (47% A) → 85 min (53% A) → 90 min (53% A)]; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 203 nm; 柱温 40 °C; 进样量: 10 μ L。

3 溶液制备

3.1 混合对照品储备液 精密称定对照品人参皂苷 R_g , R_{g_2} , R_{g_3} , R_e , R_d , R_{h_1} , R_{h_2} , R_f , R_c , R_{b_1} , R_{b_2} 和 R_{b_3} 适量, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成上述 12 种人参皂苷浓度分别为 1.47, 0.95, 0.97, 1.375, 1.48, 0.965, 0.98, 1.41, 1.48, 1.48, 1.435, 1.335 mg · mL⁻¹ 的混合对照品储备液。

3.2 供试品溶液 参考文献 [3] 制备供试品溶液: 取样品粉末 2 g 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 超声 (250 W, 40 kHz) 处理 30 min, 放至室温, 用甲醇补足至刻度, 滤过, 即得。

4 色谱峰的归属

利用上述色谱条件, 获得对照品溶液及供试品溶液的色谱图 (见图 1)。由图可见, 从对照品溶液中可以检出 12 个单体人参皂苷, 供试品溶液中待检的单体人参皂苷也能和其他的杂峰分开。

5 方法学考察

5.1 线性关系的考察 取混合对照品储备液适量, 加甲醇倍比稀释制成 6 个浓度的对照品稀释液后进样 10 μ L, 记录峰面积, 以峰面积 Y 为纵坐标, 浓度 X (μ g) 为横坐标, 绘制工作曲线, 结果见表 1。

5.2 精密度试验 取 10 号样品, 按“3.2”项下方法操作, 取 10 μ L 进样测定, 重复 5 次, 峰面积的 RSD 均小于 1.9%。

5.3 重复性试验 取 10 号样品 5 份, 按“3.2”项下方法操作, 取 10 μ L 进样测定, 结果除人参皂苷 R_{g_2} , R_{h_2} 峰面积的 RSD 值为 4.3% 和 3.3% 以外, 其余的峰面积的 RSD 均小于 3%。

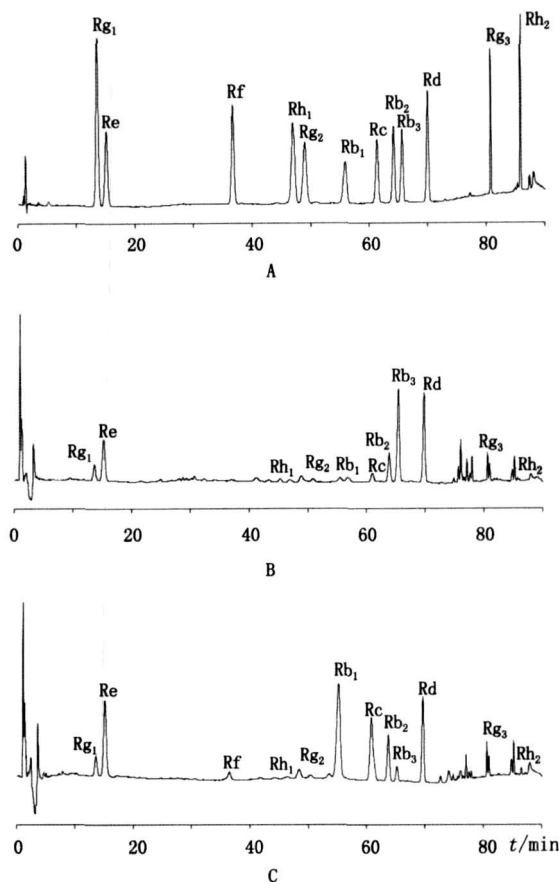


图 1 对照品 (A)、茎叶提取物 7 号样品 (B)、根提取物 10 号样品 (C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), No. 7 ginsenosides extract of stem and leaf (B), and No. 10 ginsenosides extract of root (C)

表 1 12 种人参皂苷的线性关系

Tab 1 The linear equation, correlation coefficient and the linear range of the twelve ginsenosides

成分 (component)	方程 (linear equation)	r	线性范围 (linear range) / μ g · mL ⁻¹
R_{g_1}	$Y = 6.25 \times 10^3 X + 652$	0.9994	1470 ~ 29.4
R_{g_2}	$Y = 3.84 \times 10^4 X - 2.4 \times 10^4$	0.9990	950 ~ 19.0
R_{g_3}	$Y = 2.96 \times 10^3 X - 5.99 \times 10^3$	0.9995	970.5 ~ 19.4
Re	$Y = 3.5 \times 10^4 X - 1.3 \times 10^4$	0.9993	1375 ~ 27.5
Rd	$Y = 3.61 \times 10^3 X - 5.02 \times 10^3$	0.9995	1480 ~ 29.6
R_{h_1}	$Y = 4.74 \times 10^3 X - 3.43 \times 10^3$	0.9991	965 ~ 19.3
R_{h_2}	$Y = 3.93 \times 10^3 X + 6.11 \times 10^3$	0.9994	980 ~ 19.6
Rf	$Y = 4.21 \times 10^3 X - 1.49 \times 10^4$	0.9994	1410 ~ 28.2
Rc	$Y = 2.66 \times 10^3 X - 4.39 \times 10^4$	0.9996	1480 ~ 29.6
R_{b_1}	$Y = 2.3 \times 10^3 X - 2.15 \times 10^3$	0.9993	1480 ~ 29.6
R_{b_2}	$Y = 2.67 \times 10^3 X + 3.22 \times 10^4$	0.9987	1435 ~ 28.7
R_{b_3}	$Y = 3.06 \times 10^3 X - 3.39 \times 10^3$	0.9994	1335 ~ 26.7

5.4 稳定性试验 取 10 号样品, 按“3.2”项下方法操作, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 取 10 μ L 进样测

定,结果除人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 峰面积的 RSD 值为 3.3%和 3.1%以外,其余的峰面积的 RSD 均小于 2.2%。

5.5 回收率试验 精密称取已知人参皂苷含量的 10号样品 5份(约 1 g),精密称定,加入混合对照品储备液 0.5 mL,加甲醇补足到 10 mL后,按“3.2”项下方法操作,取 10 μ L进样测定,计算平均加样回收率,结果见表 2。

5.6 含量测定 取不同来源的 11批西洋参根及茎叶的皂苷提取物样品,按“3.2”项下方法操作,取 10 μ L进样测定,以外标法计算样品中 R_{g_1} 、 R_{g_2} 、 R_{g_3} 、 R_e 、 R_d 、 R_{h_1} 、 R_{h_2} 、 R_f 、 R_c 、 R_{b_1} 、 R_{b_2} 和 R_{b_3} 的含量,测定结果见表 3。

表 2 回收率测定结果 ($n = 5$)

Tab 2 The recovery of the twelve ginsenosides		
成分 (component)	回收率 (recovery) %	RSD %
R_{g_1}	94.5	3.5
R_{g_2}	93.5	3.6
R_{g_3}	91.0	4.6
R_e	94.5	3.6
R_d	91.2	3.0
R_{h_1}	94.1	4.4
R_{h_2}	100.4	4.8
R_f	96.1	1.6
R_c	99.2	3.0
R_{b_1}	95.6	2.8
R_{b_2}	93.5	3.4
R_{b_3}	93.2	2.9

表 3 吉林不同来源样品中 12种皂苷的含量测定结果 (%)

Tab 3 The test results of ginsenosides in the samples from different sources of Jilin

样品类型 (type)	序号 (No.)	来源 (source)	R_{g_1}	R_{g_2}	R_{g_3}	R_e	R_d	R_{h_1}	R_{h_2}	R_f	R_c	R_{b_1}	R_{b_2}	R_{b_3}
茎叶提取物 (extract of stem and leaf)	1	辉南 (Huinan)	1.75	0.95	1.21	9.47	9.57	0.70	0.005	—	2.37	0.85	4.32	12.98
	2	靖宇 (Jingyu)	0.87	0.74	1.60	6.15	9.95	—	0.005	—	1.84	0.79	4.12	15.25
	3	永吉 (Yongji)	4.61	1.26	0.69	16.88	7.03	0.96	0.067	—	3.02	1.26	3.02	0.99
	4	靖宇 (Jingyu)	0.68	0.74	1.01	8.14	8.92	—	0.17	—	1.91	—	3.81	14.93
	5	抚松 (Fusong)	0.96	0.87	1.80	6.74	10.67	—	0.002	—	1.77	1.14	4.62	6.03
	6	新宾 (Xinbin)	1.81	1.39	1.26	8.66	10.49	0.45	0.16	—	2.36	1.03	4.56	12.06
	7	辉南 (Huinan)	1.28	1.12	1.64	7.07	10.87	0.48	0.12	—	2.26	1.28	4.96	14.84
根提取物 (extract of root)	8	靖宇 (Jingyu)	1.18	1.13	0.22	0.78	5.70	—	0.23	0.64	11.62	18.36	5.43	1.87
	9	永吉 (Yongji)	4.69	12.99	0.70	17.31	7.28	0.89	0.09	0.32	3.05	1.18	3.23	1.01
	10	辉南 (Huinan)	1.18	1.39	1.83	10.02	7.96	0.61	1.23	0.78	1.40	25.20	6.35	2.34
	11	抚松 (Fusong)	0.94	0.55	0.66	8.37	6.08	—	0.22	0.72	12.47	19.92	6.06	1.82

6 讨论

6.1 本文建立了西洋参根及茎叶皂苷提取物中 12种人参皂苷的含量测定方法,本方法简便、准确,流动相配制方便,重复性好。

6.2 本文对流动相的组成系统进行了比较研究。由于人参皂苷的结构中缺少发色团,紫外吸收较差,需要在低波长的范围内进行检测,因而在进行分离时以乙腈-水进行梯度洗脱为最好,若改用甲醇等溶剂作为流动相,会因在低波长的范围内引起分离度的下降或背景噪音增高,造成检测的灵敏度下降。本方法中乙腈的起始比例为 20%,梯度洗脱,12种人参皂苷在此条件下能够得到很好的分离。

6.3 本文测定了不同产地的 11批西洋参的根及茎叶的皂苷提取物中 12种人参皂苷的含量,从总体来看,根的提取物中人参皂苷 R_{b_1} 和 R_{b_2} 含量较高, R_f 只存在于根的提取物中;茎叶提取物中以 R_{b_3} 含量较高。另外,从测定结果可以看出,不同产地人参皂苷的提取物之间,单体人参皂苷的含量差异较大,其中

R_{b_1} 、 R_{b_2} 的含量差异最大, R_{b_1} 甚至能差 30倍,另有一半的提取物中找不到 R_{h_1} 。由于人参二醇组皂苷和三醇组皂苷的药理作用侧重点不同,而西洋参是多年生草本植物,茎叶是一年一收,其根一般要生长 3~4 年才能采收,提取物中人参皂苷的组成和其含量会直接影响到它的临床疗效,所以在实际使用时,对西洋参的根和茎叶的皂苷提取物应该有所选择。

参考文献

- 1 WANG Jun-mo(王筠默). Recent advances on the pharmacological activities of *Panax quinquefolius* L. (西洋参药理作用研究的最新进展). *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2001, 17 (4): 6
- 2 Wagner H, Farnsworth NR. *Economic and Medicinal Plant Research*. Vol 5 New York Academic Press 1991 253
- 3 SU Jian(苏建), LI Hai-zhou(李海舟), KONG Ling-yi(孔令义), et al HPLC analysis of saponins American Ginseng produced in different areas(不同产地西洋参皂甙成分的 HPLC 分析). *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16(6): 561

(本文于 2008 年 2 月 29 日修改回)