

文章编号: 1006-2858(2011)09-0712-04

RP-HPLC法同时测定人参提取物转化产物中 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、 20(R)-人参皂苷 Rh₁的含量

徐敬朴¹, 孙从新², 庄桂霞², 赵怀清¹

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国医药研究开发有限公司, 北京 102206)

摘要: 目的 建立同时测定人参提取物转化产物中 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁含量的方法。方法 采用 RP-HPLC法。色谱柱为迪马 C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 检测波长为 203 nm, 流速为 1.0 mL min⁻¹, 柱温为 30℃。结果 人参提取物转化产物中 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁质量浓度分别在 4.0~80 mg L⁻¹、2.8~56 mg L⁻¹、3.2~64 mg L⁻¹、2.4~48 mg L⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数分别为 0.999 8、0.999 8、0.999 1、0.999 7, 回收率分别为 100.3%、98.1%、98.0%、99.9%, 回收率的 RSD 值分别为 3.1%、2.7%、4.7%、4.0%。结论 方法准确、可靠、重现性好, 为人参提取物转化产物的质量控制提供参考依据。

关键词: 人参提取物; 转化产物; 高效液相色谱法; 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂; 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁含量测定

中图分类号: R 917 文献标志码: A

人参提取物转化产物是驰名中外的传统中药人参(*Ginseng Radix et Rhizoma*)经提取转化得到的, 所含有效成分较人参提取物更易吸收, 具有起效快、活性强等特点。具有补气振阳、活血化瘀等功效, 用于治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死。人参提取物转化产物的成分主要为皂苷类成分, 其中人参皂苷 Rg₂和 Rh₁是该提取物中主要生物活性成分中的一部分。人参皂苷 Rg₂具有抗休克、抗心力衰竭、抗心肌缺血、抗脑梗死等生理活性^[1], 人参皂苷 Rh₁具有抗肿瘤、免疫调节等作用^[2-3]。两者均存在两种不同的构型, 目前已有文献对两者各自的含量测定方法进行过报道^[4-5], 同时测定该两种皂苷的文章也有过报道^[6]; 但是, 至今没有同时对该两种皂苷的差向异构体进行含量测定的文章。作者采用高效液相色谱法在同一色谱条件下对人参提取物转化产物中 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁(化学结构式见图 1)的含量进行测定, 为人参提取物转化产物的质量控制研究提供参考依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(包括四元泵、在线脱气机、柱温箱、紫外检测器、chem station system 工作站, 美国安捷伦公司), 固相萃取小柱(美国艾杰尔公司)。

20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁对照品(中国医药研究开发有限公司提取分离制得, 纯度质量分数分别为 94.5%、91.8%、96.8%、95.1%), 人参提取物转化产物(中国医药研究开发有限公司提取制备, 批号 192324)。乙腈、甲醇(色谱纯, 市售), 二次蒸馏水(自制)。

2 方法与结果

2.1 对照溶液的制备

取已干燥至恒定质量的 20(S)-人参皂苷 Rg₂对照品约 10 mg, 20(R)-人参皂苷 Rg₂对照品约 7 mg, 20(S)-人参皂苷 Rh₁对照品约 8 mg,

收稿日期: 2010-11-05

作者简介: 徐敬朴(1985-), 女(汉族), 河北石家庄人, 硕士研究生, E-mail: woshixujingpu@126.com; 赵怀清(1955-), 男(汉族), 辽宁锦州人, 教授, 主要从事中药质量控制方法和药动学研究, Tel: 024-23986250, E-mail: zhaohq1955@sina.com.

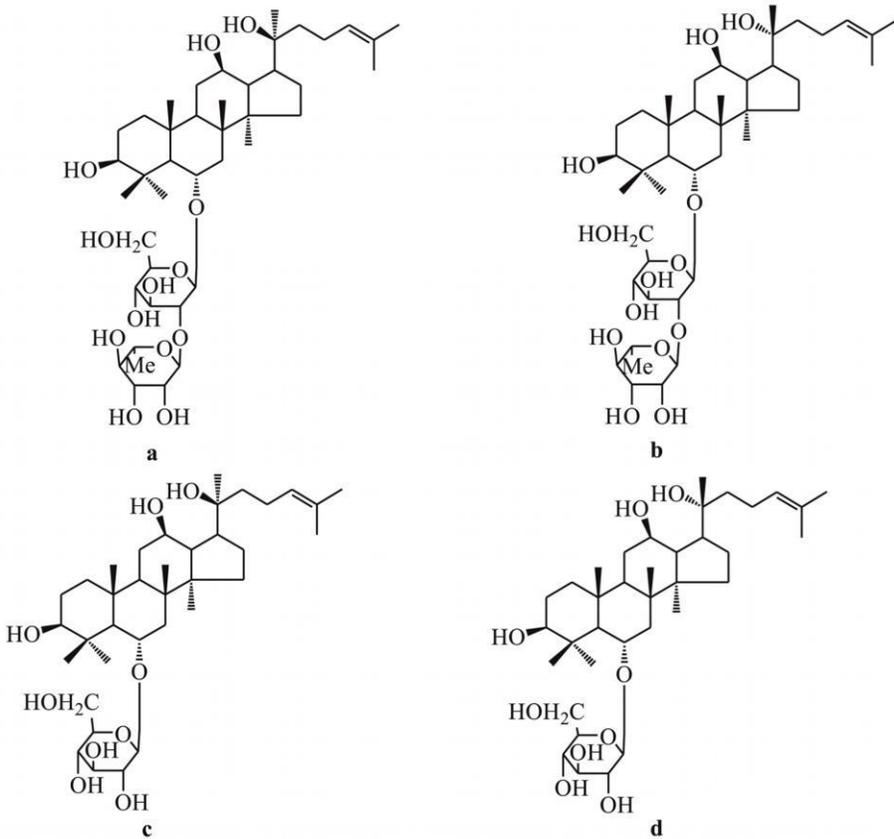


Fig 1 Structures of 20(S)-ginsenoside Rg2(a), 20(R)-ginsenoside Rg2(b), 20(S)-ginsenoside Rh1(c) and 20(R)-ginsenoside Rh1(d)

20(R)-人参皂苷 Rh1对照品约 6 mg 精密称定, 分别置 25 mL 量瓶中, 用体积分数 50% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度; 取上述溶液各 5 mL 置同一 25 mL 量瓶中, 用体积分数 50% 甲醇溶液稀释至刻度, 作为对照储备液。精密量取对照储备液 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用体积分数 50% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

2.2 供试溶液的制备

取人参提取物转化产物样品 30 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用蒸馏水超声溶解并稀释至刻度; 精密量取上述溶液 10 mL 上样于固相萃取小柱, 先用体积分数 50% 甲醇溶液 6 mL 淋洗, 然后用体积分数 70% 甲醇溶液 6 mL 洗脱; 将洗脱液浓缩至干燥后, 用甲醇溶解残渣并定容至 2 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

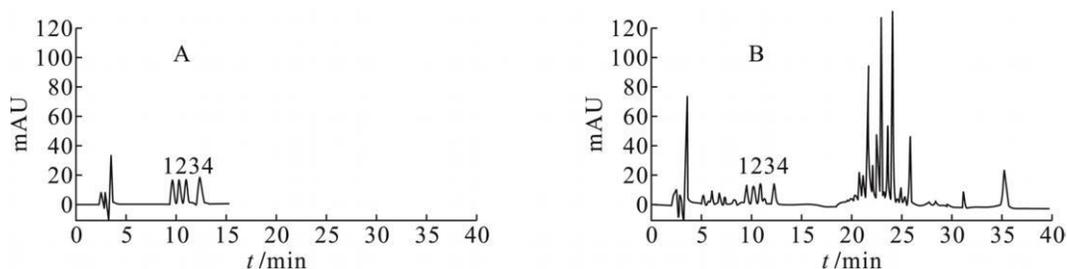
2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: 迪马 C_{18} 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相: 水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱, 梯度洗脱条件为 0~15 min 30%~40% B, 15~20 min 40%~60% B, 20~30 min 60%~80% B, 30~40 min 80% B, 40~45 min 80%~30% B; 柱温:

30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 203 nm; 流速: 1.0 mL \cdot min $^{-1}$; 进样量: 20 μL 。按上述色谱条件, 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg2和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh1的对照溶液和供试溶液的色谱图见图 2。4种成分的理论塔板数均大于 10 000, 4个色谱峰之间的分离度均大于 1.5。

2.4 标准曲线的绘制

分别精密量取对照储备液 0.5、1、2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 量瓶中, 用体积分数 50% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为系列标准溶液。分别吸取系列标准溶液 20 μL 进样分析, 记录色谱峰峰面积, 以对照品质量浓度 (ρ) 为横坐标, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 进行线性回归。20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg2和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh1的回归方程分别为: $A = 5.311\rho + 2.120$ ($r^2 = 0.9998$)、 $A = 7.553\rho + 1.615$ ($r^2 = 0.9998$)、 $A = 8.810\rho - 3.057$ ($r^2 = 0.9991$)、 $A = 7.977\rho + 2.171$ ($r^2 = 0.9997$)。20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg2和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh1的质量浓度分别在 4.0~80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2.8~56 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、3.2~64 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2.4~48 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与峰面积呈良好



1—20(S)-ginsenoside Rg₂; 2—20(R)-ginsenoside Rg₂; 3—20(R)-ginsenoside Rh₁; 4—20(S)-ginsenoside Rh₁

Fig 2 HPLC chromatograms of standard (A) and samples (B)

的线性关系。

2.5 精密度试验

取对照溶液 20 μL, 按“2.3”条色谱条件重复进样 6 次, 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁ 峰面积的 RSD 值分别为 1.6%、2.1%、3.1%、1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批(批号 23)人参提取物转化产物样品, 按“2.2”条方法平行制备 6 份供试溶液, 按“2.3”条色谱条件进行测定, 测得 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁ 含量的 RSD 值分别为 2.0%、2.5%、1.4%、2.0%, 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一份供试溶液置于室温下, 按“2.3”条色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁ 峰面积的 RSD 值分别为 1.1%、2.1%、3.0%、1.8%, 表明样品室温放置 12 h 内稳定。

取同一份供试溶液置于室温下, 按“2.3”条色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁ 峰面积的 RSD 值分别为 1.1%、2.1%、3.0%、1.8%, 表明样品室温放置 12 h 内稳定。

2.8 回收率试验

取人参提取物转化产物样品约 30 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用水超声溶解并稀释至刻度。取上述溶液 5 mL 与对照溶液 1 mL 混合, 上样, 按供试溶液的处理方法淋洗、洗脱、浓缩、过滤, 平行制备 6 份, 各取 20 μL 进样。20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁ 的加样回收率结果见表 1。

Table 1 Results of recovery (n = 6)

Compound	$m_{\text{original}} / \mu\text{g}$	$m_{\text{added}} / \mu\text{g}$	$m_{\text{found}} / \mu\text{g}$	Average recovery / %	RSD / %
20(S)-ginsenoside Rg ₂	37.9	36.1	74.1	100.3	3.1
20(R)-ginsenoside Rg ₂	25.6	25.7	50.8	98.1	2.7
20(S)-ginsenoside Rh ₁	28.6	30.2	58.2	98.0	4.7
20(R)-ginsenoside Rh ₁	25.8	23.9	49.6	99.9	4.0

2.9 样品含量测定

取不同批次 3 批人参提取物转化产物样品, 按“2.2”条方法制备供试溶液, 按“2.3”条色谱条

件进行测定, 平行测定 3 次, 记录色谱峰面积, 外标一点法计算含量, 结果见表 2。

Table 2 Contents (c) of the samples (n = 3)

Batch	$c / (\text{mg g}^{-1})$			
	20(S)-ginsenoside Rg ₂	20(R)-ginsenoside Rg ₂	20(S)-ginsenoside Rh ₁	20(R)-ginsenoside Rh ₁
19	12.0	7.9	5.0	6.7
23	10.0	7.3	7.2	6.8
24	12.1	7.6	7.0	6.8

3 讨论

a. 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁ 4 种成分性质极其相似, 难以分离, 在对乙腈-水、乙腈-磷酸水溶液等不同比例

流动相色谱条件进行考察后, 优选出乙腈-水梯度洗脱条件, 使 4 个化合物得到较好的分离。

b. 比较了蒸发光散射检测器和紫外检测器, 结果发现蒸发光散射检测器比紫外检测器精密度差, 采用紫外检测器对其进行测定, 精密度较好。

c. 由于人参提取物转化产物中所含成分较多, 对目标物干扰较大, 故对样品进行了固相萃取的处理, 以尽可能地除去目标物以外的组分。比较了体积分数 10% 甲醇水溶液、50% 甲醇水溶液、60% 甲醇水溶液作为淋洗液对样品的处理效果, 结果发现体积分数 50% 甲醇水溶液作为淋洗液能最大程度上减少其他物质的干扰, 并且不会将目标物洗脱下来。比较了体积分数 70% 甲醇水溶液和 100% 甲醇作为洗脱液对目标物的洗脱效果, 发现两者对目标物的洗脱效果无明显差异, 故采用体积分数 70% 甲醇水溶液作为洗脱液, 以尽可能地减少目标物以外的杂质被洗脱下来。经试验验证, 无论是样品溶液还是对照溶液经该固相萃取方法处理后, 待测物提取回收率均大于 90%, 证明该方法可行。

d. 考察了人参皂苷 R_{g1} 人参皂苷 R_e 人参皂苷 R_b 3种成分在该液相条件下的保留情况, 结

果 3种成分均不干扰待测组分的分离。

参考文献:

- [1] 杨秀伟, 郝美荣, 服部征雄. 中药成分代谢分析 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 394-395.
- [2] 陈声武, 王岩, 王毅, 等. 人参皂苷 R_{g1}和 Rh1抗肿瘤作用的研究 [J]. 吉林大学学报, 2003, 29(1): 25-28.
- [3] 王毅, 蒋艳, 王本祥, 等. 人参皂苷 R_{g1}及其肠内菌代谢产物 Rh1对小鼠免疫功能的影响 [J]. 药学学报, 2002, 37(12): 927-929.
- [4] 郭伟芳, 潘书洋, 李超生, 等. 高效液相色谱法分离 20(S)和 20(R)-人参皂苷 R_{g2}构型异构体 [J]. 中国卫生工程学, 2005, 4(6): 361-363.
- [5] 周劫. 高效液相色谱法同时测定人参皂苷 R_{g1}、Rh1的含量 [J]. 天津药学, 2005, 17(4): 17-19.
- [6] KM SN, HA Y W, SH N H, et al Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C. A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45(1): 164-170.

Simultaneous determination of contents of 20(S), 20(R)-ginsenoside R_{g2} and 20(S), 20(R)-ginsenoside Rh1 in converted products of ginseng extract by RP-HPLC

XU Jing-pu¹, SUN Cong-xin², ZHUANG Gu-rxia², ZHAO Hua-rqing¹

(1 School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China; 2 The National Institutes of Pharmaceutical R&D Co., Ltd., Beijing 102206 China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of 20(S), 20(R)-ginsenoside R_{g2} and 20(S), 20(R)-ginsenoside Rh1 in converted products of ginseng extract. **Methods** The RP-HPLC analysis was carried out on a Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with a gradient of water-acetonitrile at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 203 nm, and the column temperature was set at 30 °C. **Results** The calibration curve was linear within the range of 4.0-80 mg·L⁻¹ for 20(S)-ginsenoside R_{g2} (r² = 0.9998), 2.8-56 mg·L⁻¹ for 20(R)-ginsenoside R_{g2} (r² = 0.9998), 3.2-64 mg·L⁻¹ for 20(S)-ginsenoside Rh1 (r² = 0.9991), 2.4-48 mg·L⁻¹ for 20(R)-ginsenoside Rh1 (r² = 0.9997), respectively. The average recoveries for four marker compounds were from 98.0% to 100.3%. **Conclusions** This method is accurate, reliable and reproducible for quality control of converted products of ginseng extract.

Key words ginseng extract; converted product; HPLC; 20(S), 20(R)-ginsenoside R_{g2}; 20(S), 20(R)-ginsenoside Rh1; content determination