

文章编号: 1006-2858(2010)01-0048-04

# HPLC法测定石柱参药材及其片剂中 5种人参皂苷的含量

彭绪玲, 付永慧, 熊志立, 孙长山, 李发美

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 目的 建立测定石柱参药材及其片剂中 5 种人参皂苷含量的方法, 为石柱参的质量控制提供科学依据。方法 色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> 柱; 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱; 柱温为 25 °C; 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 203 nm。结果 5 种人参皂苷的色谱峰与相邻色谱峰分离良好。人参皂苷 R<sub>g</sub> 质量浓度在 19.8~198 mg·L<sup>-1</sup> 内、人参皂苷 R<sub>e</sub> 质量浓度在 20.6~206 mg·L<sup>-1</sup> 内、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 质量浓度在 33.0~330 mg·L<sup>-1</sup> 内、人参皂苷 R<sub>c</sub> 质量浓度在 18.0~180 mg·L<sup>-1</sup> 内、人参皂苷 R<sub>b<sub>2</sub></sub> 质量浓度在 13.0~130 mg·L<sup>-1</sup> 内与峰面积呈良好的线性关系。石柱参药材中人参皂苷 R<sub>g</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b<sub>1</sub></sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b<sub>2</sub></sub> 的平均回收率分别为 99.8%、98.3%、99.2%、95.4%、96.8%, RSD 分别为 3.0%、3.0%、2.6%、2.2%、2.8% (n=6); 石柱参片剂中人参皂苷 R<sub>g</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b<sub>1</sub></sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b<sub>2</sub></sub> 的平均回收率分别为 100.2%、99.0%、99.7%、96.4%、98.4%, RSD 分别为 2.2%、3.1%、3.6%、2.6%、2.8% (n=6)。结论 本实验中所建立的方法可用于石柱参药材及其片剂的质量控制。

**关键词:** 石柱参; 石柱参片剂; 人参皂苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R 917 文献标志码: A

人参以主产区栽培特点、生态条件和商品价值的不同分为普通参、边条参和石柱参<sup>[1]</sup>。石柱参为人参野生变家种的优良品种, 来源于五加科植物人参 (*Panax ginseng* C.A.Mey) 的干燥根<sup>[2]</sup>, 产于辽宁省宽甸县, 至今已有 300 多年的栽培历史, 现保留的主要农家品种类型为长脖类<sup>[3]</sup>。目前对于石柱参的研究主要集中在对其历史考证<sup>[2]</sup>、生长环境和形态或显微特征等方面<sup>[4-6]</sup>。作者采用 HPLC 法对石柱参药材及其片剂中的 5 种主要人参皂苷进行含量测定, 为石柱参药材及其片剂的质量控制提供参考, 并为石柱参的开发利用提供科学依据。五种人参皂苷的化学结构式见图 1。

## 1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (DAD 二极管阵列检测器、Agilent A 10.02 Chem station 工作站, 美国 Agilent 公司)。

人参皂苷 R<sub>g</sub> (批号 110703-200726)、人参皂

苷 R<sub>e</sub> (批号 110754-200421)、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 对照品 (批号 110704-200420) (中国药品生物制品检定所)、人参皂苷 R<sub>c</sub>、R<sub>b<sub>2</sub></sub> (吉林大学药学院, 纯度质量分数均大于 98%), 乙腈 (色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司), 超纯水 (自制), 其余试剂 (分析纯, 市售)。

石柱参药材 (编号 0804061、0804062、0804063) 采于辽宁省宽甸县振江镇石柱子村, 由沈阳药科大学孙启时教授鉴定为五加科植物人参 (*Panax ginseng* C.A.Mey) 的根; 石柱参片剂 (批号分别 080925、080926、080927) 和阴性样品均为自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件选择与系统适用性试验

色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~15 min 为 20% A, 15~30 min 为 20%~24% A, 30~35 min 为 24%~33% A, 35~50 min 为 33%~35% A; 检测波长: 203 nm; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 25 °C。

收稿日期: 2009-03-02

基金简介: 辽宁省科学技术计划重大、重点项目 (2006414008)

作者简介: 彭绪玲 (1984-), 女 (汉族), 江西宜春人, 硕士研究生, E-mail peng\_friend@126.com; 李发美 (1947-), 女 (汉族), 江西兴国人, 教授, 主要从事药物色谱分析和中药质量控制研究, Tel 024-23986289, E-mail lifamei@syphu.edu.cn

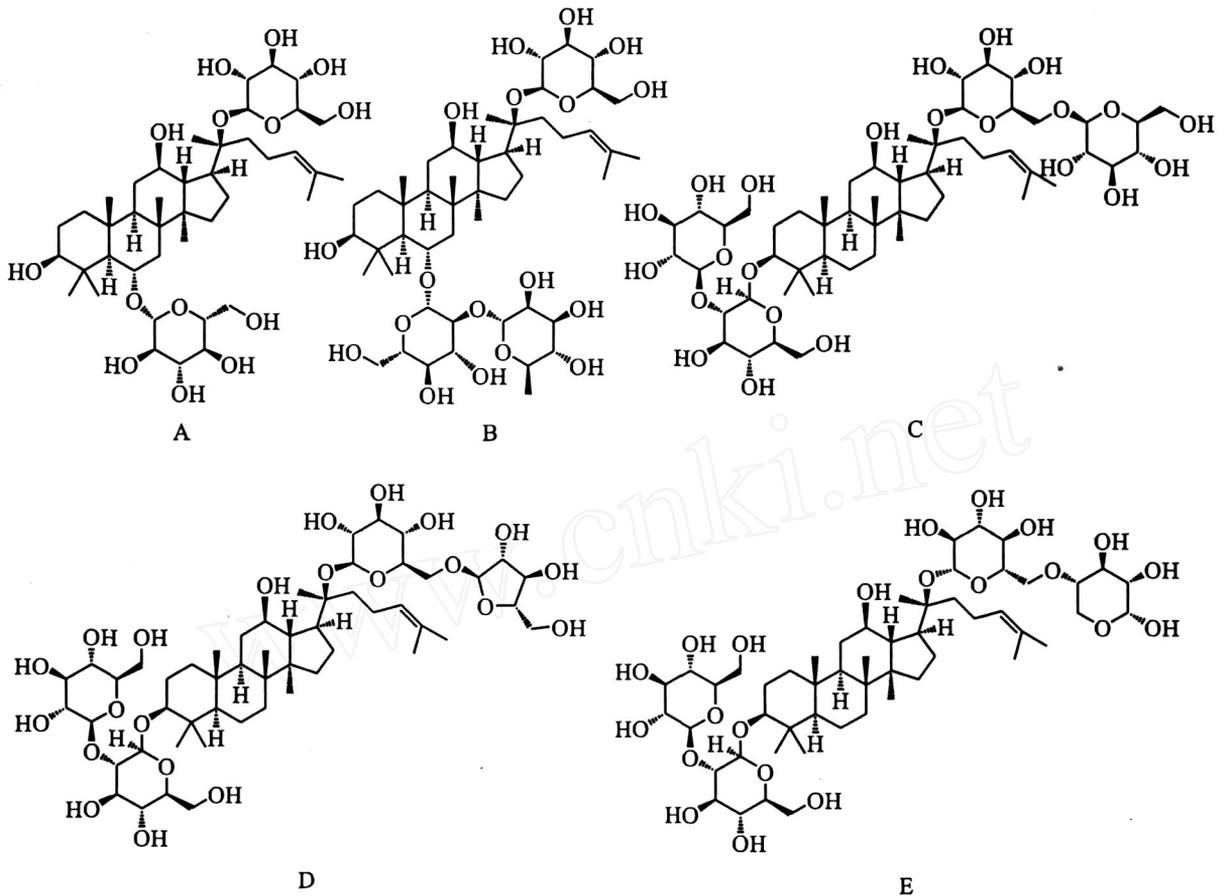


Fig 1 The structures of ginsenoside R<sub>g</sub><sub>1</sub> (A), ginsenoside Re (B), ginsenoside R<sub>b</sub><sub>1</sub> (C), ginsenoside Rc (D) and ginsenoside R<sub>b</sub><sub>2</sub> (E)

用石柱参药材供试溶液在上述色谱条件下分析,理论塔板数以人参皂苷 R<sub>b</sub><sub>1</sub> 计不小于 10 000; 5种成分的色谱峰对称因子在 0.95 ~ 1.05 之间; 5种成分的色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度均大于 1.5。用混合对照溶液在上述色谱条件下分析,人参皂苷 R<sub>g</sub>、Re、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、Rc、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 的色谱峰峰面积的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 1.5%、1.4%、1.2%、1.6%、1.5%。混合对照品、石柱参药材、石柱参片剂及阴性样品的色谱图见图 2。

## 2.2 溶液的制备

### 2.2.1 混合对照储备溶液

取人参皂苷 R<sub>g</sub>、Re、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、Rc、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 对照品适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 1.98、1.47、2.08、1.00、0.93 g·L<sup>-1</sup> 的对照储备液。分别精密量取对照储备溶液 5.0、7.0、8.0、9.0、7.0 mL 置同一 50 mL 量瓶中,加体积分数 20% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度分别为 198、206、330、180、130 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照储备溶液。

### 2.2.2 供试溶液

石柱参药材供试溶液:取石柱参药材 0.2 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入体积分数 70% 乙醇溶液 15 mL,回流提取 2 h,滤过,滤液减压浓缩至干,残渣用体积分数 20% 乙腈溶解,移至 10 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得。

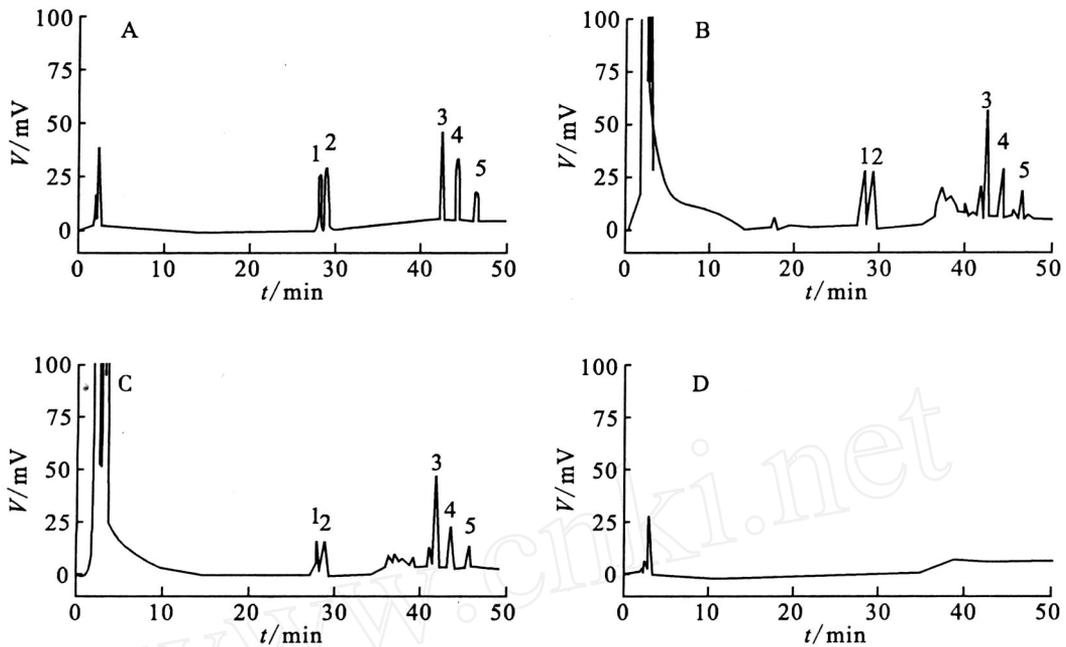
石柱参片供试溶液:取石柱参片 20 片,研细,取片粉约 0.2 g,按“石柱参药材供试溶液”方法制备石柱参片供试溶液。

石柱参片阴性供试溶液:取石柱参片剂中缺石柱参的阴性样品 0.2 g,按“石柱参药材供试溶液”方法制备石柱参片阴性供试溶液。

## 2.3 方法学考察

### 2.3.1 线性关系考察

精密量取混合对照储备溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置同一 5 mL 量瓶中,用体积分数 20% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀。在“2.1 条”色谱条件下分析,以峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标,以质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标进行回归计算,得人参皂苷



1—Ginsenoside R<sub>g</sub><sub>1</sub>; 2—Ginsenoside Re; 3—Ginsenoside R<sub>b</sub><sub>1</sub>; 4—Ginsenoside R<sub>c</sub>; 5—Ginsenoside R<sub>b</sub><sub>2</sub>

Fig 2 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A), Shizhu Ginseng (B), tablets of Shizhu Ginseng (C), negative sample(D)

R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 的回归方程和线性范围分别为： $A = 6.881 \times 10^3 + 14.56$ ,  $r = 0.999 0$ ,  $19.8 \sim 198 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ； $A = 5.972 \times 10^3 + 9.949$ ,  $r = 0.999 9$ ,  $20.6 \sim 206 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ； $A = 4.865 \times 10^3 + 0.840 0$ ,  $r = 0.999 9$ ,  $33.0 \sim 330 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ； $A = 5.589 \times 10^3 + 1.625$ ,  $r = 0.999 5$ ,  $18.0 \sim 180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ； $A = 4.754 \times 10^3 + 3.179$ ,  $r = 0.999 5$ ,  $13.0 \sim 130 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.3.2 重复性试验

取同一批石柱参药材(批号 0804061)和石柱参片剂(批号 080926)粉末各 6 份,分别按照“2.2.2 条方法操作,制备供试溶液,在“2.1 条色谱条件下分析,计算含量和 RSD。石柱参药材中人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 含量的 RSD 分别为 1.5%、2.6%、3.0%、2.8%、2.7%；石柱参片剂中人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 含量的 RSD 分别为 2.8%、2.4%、2.2%、2.1%、2.1%，表明此方法重复性良好。

### 2.3.3 日间精密度试验

取同一批石柱参药材(批号 0804061)和石柱参片剂(批号 080926)粉末各 6 份,连续 3 d,分别按照“2.2.2 条方法操作,制备供试溶液,在“2.1 条色谱条件下分析,计算含量和 RSD。石柱参药材中人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 含量的日间精密度 RSD 分别为 1.1%、0.60%、0.9%、

1.0%、0.8%；石柱参片剂中人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 含量的日间精密度 RSD 分别为 1.4%、1.6%、1.4%、0.9%、1.6%，表明此方法日间精密度良好。

### 2.3.4 稳定性试验

分别制备石柱参药材(批号 0804061)和石柱参片剂(批号 080926)供试溶液各 1 份,制备后室温放置 0、4、8、16、24 h,在“2.1 条色谱条件下分析,记录色谱峰面积。石柱参药材中人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 各时间点测得的峰面积的 RSD 分别为 2.1%、1.7%、2.9%、2.4%、2.2%；石柱参片剂中人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 各时间点测得的峰面积的 RSD 分别为 2.5%、2.8%、1.6%、1.8%、2.3%，表明石柱参药材和片剂的供试溶液室温放置 24 h 内稳定。

### 2.3.5 回收率试验

取已知含量的同一批石柱参药材(批号 0804061,约 0.1 g)和石柱参片剂(批号 080926,约 0.1 g)粉末各 6 份,分别精密加入一定量的 5 种人参皂苷对照溶液,分别按照“2.2.2 条方法操作,制备供试溶液,在“2.1 条色谱条件下分析,计算回收率及 RSD。石柱参药材中人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>b</sub><sub>2</sub> 的平均回收率分别为 99.8%、98.3%、99.2%、95.4%、96.8%，RSD 为 3.0%、3.0%、2.6%、2.2%、2.8% ( $n = 6$ )；石柱

参片剂中人参皂苷  $R_g$ 、 $R_e$ 、 $R_{b_1}$ 、 $R_c$ 、 $R_{b_2}$  的平均回收率分别为 100.2%、99.0%、99.7%、96.4%、98.4%，RSD 为 2.2%、3.1%、3.6%、2.6%、2.8% ( $n=6$ )。

Table 1 Contents (c) of ginsenoside  $R_g$ ,  $R_e$ ,  $R_{b_1}$ ,  $R_c$  and  $R_{b_2}$  in Shizhu Ginseng ( $n=3$ )

Batch No	$c(\text{ginsenoside } R_g) / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$c(\text{ginsenoside } R_e) / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$c(\text{ginsenoside } R_{b_1}) / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$c(\text{ginsenoside } R_c) / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$c(\text{ginsenoside } R_{b_2}) / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
0804061	4.794	4.123	8.718	3.522	2.694
0804062	3.607	3.928	7.906	3.961	2.318
0804063	3.965	4.473	9.307	4.037	2.535

Table 2 Contents (c) of ginsenoside  $R_g$ ,  $R_e$ ,  $R_{b_1}$ ,  $R_c$  and  $R_{b_2}$  in tablets of Shizhu Ginseng ( $n=3$ )

Batch No	$c(\text{ginsenoside } R_g) / (\text{mg} \cdot \text{tablet}^{-1})$	$c(\text{ginsenoside } R_e) / (\text{mg} \cdot \text{tablet}^{-1})$	$c(\text{ginsenoside } R_{b_1}) / (\text{mg} \cdot \text{tablet}^{-1})$	$c(\text{ginsenoside } R_c) / (\text{mg} \cdot \text{tablet}^{-1})$	$c(\text{ginsenoside } R_{b_2}) / (\text{mg} \cdot \text{tablet}^{-1})$
080925	1.526	1.642	4.152	1.988	1.284
080926	1.651	1.781	4.339	2.073	1.346
080927	1.643	1.730	4.237	1.953	1.321

### 3 讨论与结论

a. 采用 HPLC 法测定人参皂苷  $R_g$ 、 $R_e$ 、 $R_{b_1}$ 、 $R_c$ 、 $R_{b_2}$  的含量,结果高于文献报道的普通园参中此 5 种成分的含量<sup>[7-8]</sup>,而与生长年限较高的移山参相似。人参皂苷  $R_{b_1}$  与  $R_g$  含量的比值明显高于文献中的这 2 个成分含量的比值,这也可能与样品处理方法有关,加热回流导致石柱参中含有的热不稳定丙二酰基人参皂苷  $R_{b_1}$  等水解为相应的中性皂苷  $R_{b_1}$  等。

b. 考察了在流动相中加酸对保留时间和峰形的影响。结果表明,流动相中加磷酸后,保留时间没有缩短,峰形也没有改善,因此选择不加酸。考察了不同柱温 (35、30、25) 对色谱分离的影响,结果表明,柱温为 25 时人参皂苷  $R_g$  与  $R_e$  分离较好,保留时间适中,故选择柱温为 25。最终确定的色谱条件流动相组成简单,各成分间分离良好,分析时间短。

c. 考察了以不同提取溶剂 (体积分数 70% 乙醇溶液、水饱和正丁醇、甲醇) 超声提取,结果用体积分数 70% 乙醇溶液提取效果最佳。继而以体积分数 70% 乙醇溶液为溶剂考察不同的提取方法 (加热回流提取和超声提取) 对提取效率的影响,结果表明加热回流提取效率优于超声提取。

### 2.4 供试品含量测定

分别称取石柱参药材和石柱参片适量,每批 3 份,按“2.2.2 条方法操作,制备供试溶液,在“2.1”条色谱条件下分析,计算含量,结果见表 1、2。

又对提取时间和提取次数进行了考察。最终确定以体积分数 70% 乙醇溶液为提取溶剂,加热回流提取 2 h,提取 1 次。

d. 本实验中所建立的方法可用于石柱参药材及其片剂的质量控制。

### 参考文献:

- [1] 赵亚会,辜旭飞,吴连举,等. 栽培人参种质资源的类别、特点和利用价值研究概况 [J]. 中草药, 2007, 38 (2): 294 - 296
- [2] 王荣祥,赵建东,许亮. 石柱参的历史考证 [J]. 辽宁中医学院学报, 2005, 7 (3): 269
- [3] 王贺新,王占伟,范俊岗,等. 中国石柱参的生态条件、栽培特点及其生长特征 [J]. 特产研究, 1995 (1): 14 - 17
- [4] 寒颖,王娜. 辽宁宽甸县石柱参地区柱参和马牙参生态地球化学研究 [J]. 人参研究, 1996 (3): 17 - 23
- [5] 王贺新. 中国石柱参生长特征研究 [J]. 辽宁林业科技, 2001 (5): 4 - 7
- [6] 王荣祥,许亮,任百林,等. 石柱参的性状与显微鉴别 [J]. 中药材, 2007, 30 (9): 1076 - 1078
- [7] 张崇禧,鲍建才,李向高,等. HPLC 法测定人参、西洋参和三七不同部位中人参皂苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25 (10): 1190 - 1194
- [8] 肖新月,尹继飞,张南平,等. 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 (3): 238 - 244

(下转至第 55 页)

668 - 670

[9] JORGEN H, ANDERS G Optimization of the separation of enantiomers of basic drugs retention mechanisms and

dynamic modification of the chiral bonding properties on an  $\alpha_1$ -acid glycoprotein column [J]. J Chromatogr A, 1995, 694: 57 - 69.

## Chiral separation of homatropine methylbromide and atropine sulfate using high performance liquid chromatography with $\alpha_1$ -acid glycoprotein column

LIN Li-na, ZHANG Hua-yan, GUO Xing-jie

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract: Objective** To investigate the separation of the enantiomers of homatropine methylbromide and atropine sulfate using high performance liquid chromatographic (HPLC) on  $\alpha_1$ -acid glycoprotein ( $\alpha_1$ -AGP) chiral stationary phase **Methods** The influence of the pH value and flow rate of the mobile phase, the concentration of buffer solution and organic solvents and temperature were examined **Results** The best separation was obtained with 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc (pH 5.5) buffer as mobile phase for homatropine methylbromide and 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc (pH 6.5) buffer as mobile phase for atropine sulfate at ambient temperature. The optimal flow rate was 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. **Conclusions** Homatropine methylbromide and atropine sulfate enantiomers can be separated completely on the  $\alpha_1$ -AGP chiral stationary phase

**Key words:**  $\alpha_1$ -acid glycoprotein stationary phase; HPLC; homatropine methylbromide; atropine sulfate; enantiomeric separation

(上接第 51 页)

## Quantitative determination of five ginsenosides in Shizhu Ginseng and its tablets by HPLC

PENG Xu-ling, FU Yong-hui, XIONG Zhi-li, SUN Chang-shan, LI Fa-mei

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract: Objective** To provide a scientific data for quality control of Shizhu ginseng, and determine the contents of five ginsenosides in Shizhu Ginseng (a kind of Panax ginseng C. A. Mey) and its tablets **Methods** A Kromasil C<sub>18</sub> column with the mobile phase consisted of acetonitrile-water was used. The column temperature was set at 25 °C. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the UV detection wavelength was set at 203 nm. **Results** Five Ginsenosides were baseline separated. The calibration curves of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub>, Rc and Rb<sub>2</sub> were linear in the concentration range of 19.8-198 mg·L<sup>-1</sup>, 20.6-206 mg·L<sup>-1</sup>, 33.0-330 mg·L<sup>-1</sup>, 18.0-180 mg·L<sup>-1</sup> and 13.0-130 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. The average recoveries of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub>, Rc and Rb<sub>2</sub> of Shizhu Ginseng were 99.8%, 98.3%, 99.2%, 95.4% and 96.8%, the RSD were 3.0%, 3.0%, 2.6%, 2.2% and 2.8% (n=6), respectively. And the average recoveries of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub>, Rc and Rb<sub>2</sub> of the tablets of Shizhu Ginseng were 100.2%, 99.0%, 99.7%, 96.4% and 98.4%, the RSD were 2.2%, 3.1%, 3.6%, 2.6% and 2.8% (n=6), respectively. **Conclusions** The method can be applied to the quality control of Shizhu Ginseng and its tablets

**Key words:** Shizhu Ginseng; Shizhu Ginseng tablet; ginsenoside; HPLC; quantitative determination