

HPLC 同时测定人参药材中 12 种人参皂苷的含量

胥秀英^{1,2*}, 郑一敏^{1,2}, 傅善权^{1,2}, 赵颖^{1,2}, 李杰^{1,2}, 王琳琳^{1,2}

(1. 重庆理工大学 药学与生物工程学院, 重庆 400054;
2. 重庆市现代中药制药工程技术研究中心, 重庆 400054)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定人参药材中 12 种人参皂苷含量的方法。方法:采用 lunna NH₂ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm 5 μm); 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹ 检测波长 203 nm, 柱温为室温。结果:12 种人参皂苷 Rh₂, Rh₁, Rg₂, Rg₃, Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₃, Rb₁ 在 60 min 内达基线分离, 线性关系良好 (r ≥ 0.999 5)。加样回收率分别为 98.1%, 95.3%, 96.1%, 95.6%, 97.3%, 98.6%, 98.0%, 96.4%, 96.1%, 97.6%, 96.8%, 96.9% (RSD ≤ 3%)。结论:该方法简便, 快速, 可作为人参药材质量控制指标。

[关键词] 人参; 人参皂苷; HPLC; 含量测定

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科人参属植物。我国现存最早的药理学专著《神农百草经》中对人参的药用价值有详细的描述, 其要点为强身益智, 明目, 安精神, 止惊悸, 久服后延年益寿, 因其具有神奇而广泛的作用, 享有“百草之王”的美誉^[1]。在人参的多种化学成分中, 国内外均证明人参皂苷是其主要活性成分^[1-3], 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^[4]。赵亮^[5]等报道了人参中主要 8 种皂苷类成分的含量, 但未见同时测定 12 种人参皂苷成分的报道。本实验采用高效液相色谱法同时测定了人参药材中 12 种主要皂苷类成分的含量, 为提升人参药材的质量控制提供了实验依据。

1 材料

Waters 高效液相色谱仪(美国), 1515 泵, 2487 检测器, Breeze 工作站。

人参药材购于重庆市药材市场, 经本院傅善权副主任药师鉴定为人参 *P. ginseng*。

人参皂苷 Rh₂ (111748-200501), Rg₂ (111779-200801), Rg₃ (110804-200603), Rf (111719-200703), Re (110754-200822), Rb₂ (111715-200802), Rb₃ (111686-200501), Rb₁ (11074-200921) (中国药品生物

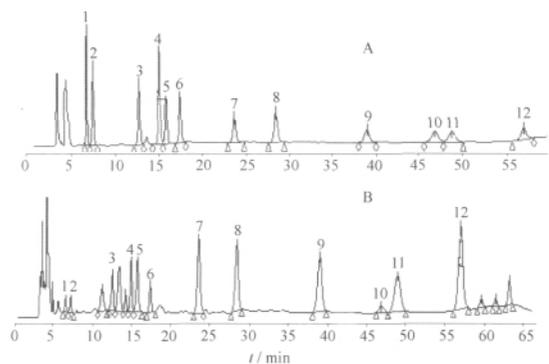
制品检定所)。Rh₁ (A0240), Rd (A0245), Rc (A0243), Rg₁ (A0237) (成都曼斯特生物科技公司), 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为市售分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 Lunna NH₂ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm 5 μm); 流动相乙腈-水梯度洗脱, 洗脱条件见表 1; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 203 nm; 柱温室温。对照品与样品色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱

t/min	乙腈	水
1	90	10
60	65	35



A. 人参皂苷对照品; B. 人参样品; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 号峰分别为 Rh₂, Rh₁, Rg₂, Rg₃, Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₃, Rb₁。

图 1 人参皂苷对照品与人参样品图谱

[稿件编号] 20101016005

[基金项目] 重庆市科委产业化项目 (CSTC, 2008AB5116); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2010ZX09401-306-2-23)

[通信作者] * 胥秀英, 研究员, Tel/Fax: (023) 68852881, E-mail: yxx651116@cqut.edu.cn

2.2 对照品溶液的制备 精密称取12种人参皂苷对照品适量,加甲醇制成浓度为Rh₂ 0.16, Rh₁ 0.17, Rg₂ 0.18, Rg₃ 0.18, Rg₁ 0.16, Rf 0.16, Re 0.16, Rd 0.20, Rc 0.18, Rb₂ 0.18, Rb₃ 0.16, Rb₁ 0.19 g·L⁻¹的对照品混合溶液,0.45 μm滤膜滤过,备用。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取人参药材10g(3份),分别加入药材量的10倍,8倍,7倍水在80~90℃煎煮3次,收集滤液,冷后过预先处理好的大孔吸附树脂柱,再用80%乙醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩至干得提取物。取该提取物一定量,加甲醇溶解制成质量浓度为5.0 g·L⁻¹的溶液,0.45 μm滤膜滤过,备用。

2.4 线性关系考察 分别精密取2.2项下对照品混合液2,4,6,8,10 μL进样,以色谱峰面积(Y)对质量浓度(X)进行回归统计,Rh₂线性方程为Y=689 588X+45 976,r=0.999 3,线性范围0.32~1.60 μg;Rh₁线性方程为Y=625 736X+16 695,r=0.999 4,线性范围0.34~1.70 μg;Rg₂线性方程为Y=527 155X+27 122,r=0.999 2,线性范围0.36~1.80 μg;Rg₃线性关系为Y=75 1261X+24 101,r=0.999 4,线性范围0.36~1.80 μg;Rg₁线性关系为Y=519 798X+2 180.1,r=0.999 1,线性范围0.32~1.60 μg;Rf线性关系为Y=528 020X+1 408,r=0.999 1,线性范围0.32~1.60 μg;Re线性关系为Y=354 323X+38 897,r=0.999 7,线性范围0.32~1.60 μg;Rd线性关系为Y=398 647X+10 854,r=0.999 2,线性范围0.40~2.00 μg;Rc线性关系为Y=280 122X+15 976,r=0.999 3,线性范围0.36~1.80 μg;Rb₂线性关系为Y=377 758X+4 455.7,r=0.999 3,线性范围0.36~1.80 μg;Rb₃线性关系为Y=360 398X-7 544.3,r=0.999 5,线性范围0.32~1.60 μg;Rb₁线性关系为Y=283 972

X-12 308,r=0.999 3,线性范围0.38~1.90 μg。

2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液10 μL,在2.1色谱条件下进样5次,计算Rh₂,Rh₁,Rg₂,Rg₃,Rg₁,Rf,Re,Rd,Rc,Rb₂,Rb₃,Rb₁峰面积RSD分别为2.4%,2.0%,1.2%,2.18%,2.9%,2.5%,2.6%,2.7%,2.9%,2.2%,2.5%,2.9%。结果表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取2.3供试品溶液,分别在0,2,4,8,16 h进样10 μL,计算Rh₂,Rh₁,Rg₂,Rg₃,Rg₁,Rf,Re,Rd,Rc,Rb₂,Rb₃,Rb₁峰面积RSD分别为2.8%,2.6%,0.6%,2.0%,1.0%,1.1%,1.5%,2.3%,2.3%,1.0%,0.9%,1.9%。表明样品溶液在16 h内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批人参药材,按2.3样品制备方法制备6份,分别进样10 μL,计算Rh₂,Rh₁,Rg₂,Rg₃,Rg₁,Rf,Re,Rd,Rc,Rb₂,Rb₃,Rb₁含量RSD分别为2.3%,1.6%,1.4%,1.3%,1.2%,1.3%,2.8%,2.4%,1.6%,1.3%,2.9%,2.4%。表明该方法的重复性较好。

2.9 回收率试验 取同一批药材6份,分别加入Rh₂流分,Rh₁流分,Rg₂流分,Rg₃流分,Rg₁流分,Rf流分,Re流分,Rd流分,Rc流分,Rb₂流分,Rb₃流分,Rb₁对照品,按2.3方法制备,在2.1色谱条件下进样10 μL,计算回收率分别为100.6%,99.7%,100.7%,100.6%,101.7%,101.4%,99.0%,100.6%,99.7%,99.7%,99.7%,98.7%,RSD分别为2.1%,2.9%,2.5%,2.6%,2.3%,2.1%,2.7%,3.0%,2.8%,3.0%,2.4%,2.0%。

2.10 样品含量测定 取3批人参药材按2.3供试品制备方法制成样品溶液,在2.1色谱条件下进样10 μL(n=3),测定峰面积,由线性方程计算得3批人参药材中12种人参皂苷含量,见表2。

表2 3批人参药材中12种人参皂苷含量(n=3)

批号	Rh ₂	Rh ₁	Rg ₂	Rg ₃	Rg ₁	Rf	Re	Rd	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rb ₁
090811	0.009	0.008	0.027	0.019	0.044	0.027	0.112	0.115	0.202	0.017	0.176	0.295
090822	0.007	0.007	0.028	0.020	0.046	0.023	0.118	0.119	0.198	0.018	0.172	0.307
090906	0.007	0.008	0.030	0.022	0.049	0.024	0.118	0.118	0.204	0.020	0.175	0.313

3 讨论

在色谱分离实验中,曾采用C₁₈色谱柱,甲醇-水、乙腈-水为流动相等度、梯度洗脱及以NH₂色

谱柱,甲醇-水为流动相,分离效果均不理想;以NH₂色谱柱和乙腈-水(50:50)、乙腈-水(60:40)、乙腈-水(70:30)、乙腈-水(80:20)等流动相等度洗脱,分离

效果仍不理想;再筛选梯度洗脱条件,结果以乙腈-水(90~65:10~35)为流动相,在0~60 min内能将12种皂苷成分完全分离。

含量测定结果表明,12种人参皂苷中Rb₁含量最高,其次为Rc,流分Rb₃,流分Rd,流分Re,流分Rg₁,流分Rg₃,流分Rg₂,流分Rf,而Rh₂,Rh₁含量很低,为评价人参药材的质量提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 张均田. 人参研究的最新进展[J]. 江苏大学学报:医学版, 2009, 19(3): 185.

[2] 朱岚翎. 人参功效的再认识[J]. 中医临床研究 2010, 2(11): 99.

[3] 王莎莉,李英博,王亚平等. 人参总皂苷对人胚胎神经干细胞增殖及定向诱导为多巴胺能神经元的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1310.

[4] 阎正,苑若瑶,王春云,等. 人参 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 河北大学学报:自然科学版, 2009, 29(3): 278.

[5] 赵亮,吕磊,纪松刚,等. 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[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(12): 1507.

Determination of twelve ginsenosides in *Panax ginseng* by HPLC

XU Xiuying^{1,2*}, ZHENG Yimin^{1,2}, FU Shanquan^{1,2}, ZHAO Ying^{1,2}, LI Jie^{1,2}, WANG Linlin^{1,2}

(1. College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;
2. Chongqing Modern Chinese Medicine Pharmacy Engineering Research Center, Chongqing 400054, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of twelve ginsenosides in the root of *Panax ginseng* by HPLC. **Method:** The analysis is carried out at room temperature on a Luna NH₂ column (4.6 mm × 150 mm 5 μm) eluted with acetonitrile and water as the mobile phases in a gradient elution. The flow-rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 203 nm. **Result:** Twelve ginsenosides (Rh₂, Rh₁, Rg₂, Rg₃, Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₃, Rb₁) were separated at baseline within 60 min with good linearity ($r \geq 0.9995$). The recovery rates were 98.1%, 95.3%, 96.1%, 95.6%, 97.3%, 98.6%, 98.0%, 96.4%, 96.1%, 97.6%, 96.8%, 96.9% (RSD ≤ 3.0%). **Conclusion:** The method was simple fast and could control the quality of *P. ginseng* effectively.

[Key words] *Panax ginseng*; ginsenosides; HPLC; assay

doi: 10.4268/cjcm20111112

[责任编辑 丁广治]