

DOI: 10.19403/j.cnki.1671-1521.2020.04.002

HPLC 法测定不同年生野山参中 9 种人参皂苷含量

杨怀雷, 查琳, 王影, 徐芳菲, 李蕾, 曹志强*

(吉林人参研究院·吉林通化·134001)

摘要:目的 建立测定不同年生野山参中人参单体皂苷含量的方法。方法 采用高效液相色谱法(HPLC)进行测定,色谱柱为 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水,梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 203 nm,柱温为 40 °C,进样量为 5 μL。结果 不同年生野山参中人参单体皂苷的含量为 0.1449~6.9259 mg/g,该方法线性良好, r 均大于 0.9995,具有较高的精密性、稳定性和重复性,平均加样回收率为 96.29~98.95%,RSD 均小于 2%($n=6$)。结论 本文所建立的含量测定方法简便易行、专属性强、准确可靠,为野山参的基础成分研究提供了参考依据,为野山参的质量控制奠定了基础。

关键词: 野山参; 人参单体皂苷; 高效液相色谱法(HPLC); 含量测定

Determination of Nine Ginsenosides in Wild Ginseng of Different Ages by HPLC

YANG Huai-lei, ZHA Lin, WANG Ying, XU Fang-fei, LI Lei, CAO Zhi-qiang*

(Jilin Ginseng Research Institute, Tonghua, Jilin, 134001)

Abstract: Objective The HPLC method for content determination of ginsenosides in Wild Ginseng of different ages was established in this paper. Methods The content of ginsenosides were determined by HPLC method. The analysis was performed on an Thermo BDS Hypersil C₁₈ column (250mm×4.6mm, 5 μm) maintained at the temperature of 40°C using acetonitrile-water as the mobile phase. Gradient elution was used in this determination with the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths was set at 203 nm. The injection volume was 5 μL. Results The content of ginsenosides in Wild Ginseng of different ages were in the range of 0.1449 and 6.9259 mg/g. Nine constituents showed good linear relationships within their own concentration ranges($r>0.9995$). The method showed good precision, stability and repeatability. The average recoveries were found to be 96.29%~98.95% with the RSD all less than 2% ($n=6$). Conclusion The proposed method is simple, accurate and reproducible and can provide a reference for the basic constituents research and lay foundation for the quality control of Wild Ginseng.

Keywords: Wild Ginseng; Ginsenosides; HPLC; Content Determination

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C.A.Mey 的干燥根。以生态不同区分为野山参、移山参和园参^[1],在山野天然生长者被称为野山参。野山参是我国传统的名贵中药材,其药用历史源远流长,具有大补元气、生津、益肺、安神等功效^[2]。现代药理学研究表明人参皂苷是其主要活性成分,故野山参中人参皂苷的含量可作为评价其内在质量的重要指标之一。近年来,对于野山参的研究主要集中在鉴别、培育、指纹图谱等方面^[3-7],对其人参皂苷含量研究较少^[8]。本文采用高效液相色谱法对不同年生野山参中的 9 种人参单体皂苷成分进行测定,为野山参的基础成分研究提供了参考

依据,可用于野山参的质量评价和质量控制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Ultimate 3000),美国赛默飞有限公司;电热恒温水浴锅(HH-6),金坛市白塔金昌实验仪器厂;电子天平(SQP),赛多利斯科学仪器有限公司。

1.2 材料

野山参(5~18年生);人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、F1、Rb₂、Rb₃ 和 Rd 标准品均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯(Fisher, USA),甲醇和正丁

* 通信作者: 曹志强,男,研究员,主要从事人参、西洋参研究、标准制定、产品研发、规范化种植。E-mail: th5161@163.com.

醇为分析纯(北京化工厂);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取人参皂苷 R_{g1} 、Re、Rf、 R_{b1} 、Rc、F1、 R_{b2} 、 R_{b3} 、Rd 对照品适量,制成人参皂苷 R_{g1} 、Re、Rf、 R_{b1} 、Rc、F1、 R_{b2} 、 R_{b3} 、Rd 对照品浓度分别为 0.1185、0.1290、0.1090、0.1160、0.1580、0.1160、0.1070、0.1345、0.1055 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取不同年生野山参于烘箱中(65℃)烘干,粉碎,过 80 目筛。精密称取野山参粉末(5~18 年)0.5g,加 10mL(20 倍量)75%乙醇加热回流 2h,重复提取 3 次,合并滤液,蒸干。残渣加 10mL 水溶解并转移至分液漏斗中,再加 10mL 水饱和正丁醇萃取,重复萃取 5 次,合并正丁醇萃取液,蒸干。残渣加甲醇溶解并转移至 2mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5μm),流动相为乙腈-水(A-B),梯度洗脱,0 ~ 30 min (19% A),30 ~ 35 min(19% ~ 24% A),35 ~ 40 min (24%A),40 ~ 55 min(24% ~ 28% A),55 ~ 110 min(28% ~ 29% A),110 ~ 130 min (29% ~ 33% A),110 ~ 130 min (29% ~ 33% A),110 ~ 130 min (29% ~ 33% A);流速为 1.0mL/min;检测波长为 203 nm;柱温为 40℃;进样量为 5μL。

2.4 测定

精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 5μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。供试品色谱图中,在与对照品色谱峰相应的位置上,显示出保留时间相同的色谱峰,结果见图 1。

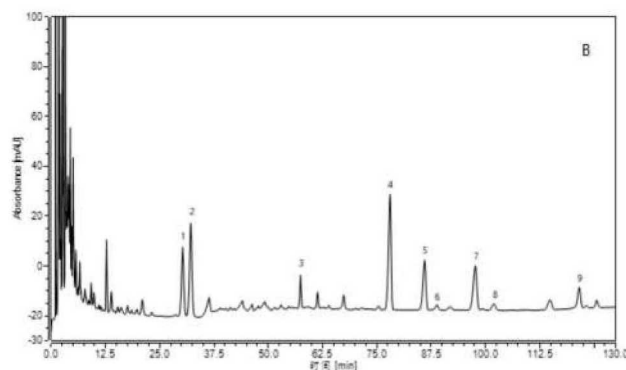
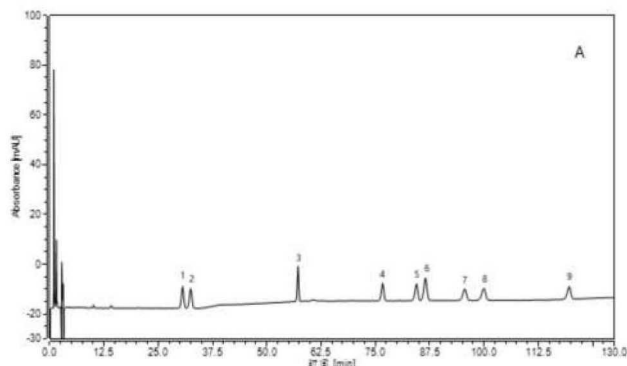


图 1 混合对照品(A)和供试品(B)色谱图

R_{g1} ;2 Re;3 Rf;4. R_{b1} ;5. Rc;6. F1;7. R_{b2} ;8. R_{b3} ;9. Rd

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系

精密称取人参皂苷 R_{g1} 、Re、Rf、 R_{b1} 、Rc、F1、 R_{b2} 、 R_{b3} 、Rd 对照品适量,制成人参皂苷 R_{g1} 、Re、Rf、 R_{b1} 、Rc、F1、 R_{b2} 、 R_{b3} 、Rd 对照品浓度分别为 1.0258、1.0473、0.3047、2.5086、1.0921、1.0546、0.8282、0.1391、0.2084 mg/mL 的混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 分别置于 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,配制出不同浓度的混合对照品溶液(1~6 号)备用。精密吸取 1 号混合对照品溶液 0.5mL 置于 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得 7 号混合对照品溶液。分别精确吸取 1~7 号各浓度的混合对照品溶液 5μL,注入液相色谱仪进行测定,记录峰面积。以各标准品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标做回归曲线,得到人参皂苷 R_{g1} 、Re、Rf、 R_{b1} 、Rc、 R_{b2} 、 R_{b3} 、Rd 回归方程,详见表 1。

表 1 回归方程

	回归方程	相关系数	线性范围(mg/mL)
人参皂苷 R_{g1}	$y = 44.538x + 0.4211$	0.9995	0.1026 ~ 1.0258
人参皂苷 Re	$y = 41.685x + 0.0928$	0.9996	0.1047 ~ 1.0473
人参皂苷 Rf	$y = 46.625x + 0.2128$	0.9995	0.0305 ~ 0.3047
人参皂苷 R_{b1}	$y = 38.962x + 0.3193$	0.9997	0.2509 ~ 2.5086
人参皂苷 Rc	$y = 32.747x + 0.0168$	0.9996	0.1092 ~ 1.0921
人参皂苷 F1	$y = 64.875x + 0.0493$	0.9995	0.0105 ~ 1.0546
人参皂苷 R_{b2}	$y = 42.628x - 0.1137$	0.9997	0.0828 ~ 0.8282
人参皂苷 R_{b3}	$y = 37.811x - 0.0568$	0.9996	0.0139 ~ 0.1391
人参皂苷 Rd	$y = 48.229x - 0.271$	0.9996	0.0208 ~ 0.2084

结果表明,各对照品回归方程的相关系数均不小于 0.9995, 人参皂苷 R_{g1} 、Re、Rf、 R_{b1} 、Rc、F1、 R_{b2} 、 R_{b3}

和 Rd 分别在 0.1026 ~ 1.0258 mg/mL、0.1047 ~ 1.0473 mg/mL、0.0305 ~ 0.3047 mg/mL、0.2509 ~ 2.5086 mg/mL、0.1092 ~ 1.0921 mg/mL、0.0105 ~ 1.0546 mg/mL、0.0828 ~ 0.8282 mg/mL、0.0139 ~ 0.1391 mg/mL 和 0.0208 ~ 0.2084 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.5.2 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液 5 μ L, 重复进样 6 次, 记录峰面积。测得人参皂苷 R_{g1}、Re、Rf、R_{b1}、Rc、F1、R_{b2}、R_{b3} 和 Rd 峰面积的 RSD (n=6) 分别为 0.76%、0.87%、0.96%、1.03%、0.98%、1.19%、0.58%、0.83% 和 1.37%, 表明此方法精密度良好。

2.5.3 稳定性实验

精密吸取供试品溶液 5 μ L, 分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样, 记录峰面积。人参皂苷 R_{g1}、Re、Rf、R_{b1}、Rc、F1、R_{b2}、R_{b3} 和 Rd 峰面积的 RSD 分别为 0.67%、0.92%、1.07%、0.51%、0.79%、1.26%、0.82%、1.49% 和 1.25%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.4 重复性实验

取 5 年生野山参样品 6 份, 精密称定, 按照“2.2”

项下方法平行制备供试品溶液 6 份。精密吸取供试品溶液 5 μ L 进样, 分别进行测定。结果表明, 人参皂苷 R_{g1}、Re、Rf、R_{b1}、Rc、F1、R_{b2}、R_{b3} 和 Rd 的含量平均值分别为 1.8546、2.0628、0.5849、3.5011、1.5447、0.4482、1.1539、0.2006 和 0.5494 mg/g, RSD 值分别为 1.19%、1.02%、0.95%、1.42%、1.81%、1.77%、1.69%、1.91% 和 1.36%, 表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率实验

分别称取已知含量的 5 年生野山参样品粉末 6 份, 每份 0.25 g, 每份分别加入适量人参皂苷 R_{g1}、Re、Rf、R_{b1}、Rc、F1、R_{b2}、R_{b3} 和 Rd 对照品溶液, 按照“2.2”项下方法进行制备, 并按照“2.3”项下色谱条件进样分析, 计算回收率。结果(表 2)人参皂苷 R_{g1}、Re、Rf、R_{b1}、Rc、F1、R_{b2}、R_{b3} 和 Rd 对照品的平均回收率 (n=6) 分别为 98.08%、97.80%、96.80%、98.93%、99.22%、96.29%、98.01%、96.48% 和 98.95%。回收率的 RSD 值分别为 0.80%、0.76%、0.78%、0.62%、0.99%、0.89%、1.27%、1.10% 和 1.18%。实验结果表明, 各测定组分的平均加样回收率均在 95%~105% 之间, 加样回收率良好。

表 2 回收率实验结果

组分	称样量 (g)	含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
R _{g1}	0.2508~0.2579	0.4666~0.4798	0.4521	0.9077~0.9276	97.56~99.04	1.08
Re	0.2508~0.2579	0.5194~0.5341	0.5017	1.0078~1.0298	97.35~98.80	0.76
Rf	0.2508~0.2579	0.1504~0.1546	0.1523	0.2966~0.3032	96.02~97.56	1.28
R _{b1}	0.2508~0.2579	0.8742~0.8990	0.9011	1.7586~1.7964	98.15~99.59	0.82
Rc	0.2508~0.2579	0.3911~0.4022	0.4075	0.8002~0.8017	98.03~100.38	0.99
F1	0.2508~0.2579	0.1122~0.1154	0.1092	0.2183~0.2194	95.25~97.15	1.89
R _{b2}	0.2508~0.2579	0.2904~0.2986	0.3047	0.5857~0.6023	96.91~99.66	1.27
R _{b3}	0.2508~0.2579	0.0488~0.0502	0.0528	0.0992~0.1017	95.40~97.51	1.96
Rd	0.2508~0.2579	0.1357~0.1395	0.1502	0.2827~0.2907	97.88~100.65	1.18

2.6 样品含量测定

分别取 5~18 年生野山参样品, 精密称定, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液

5 μ L, 分别按照“2.3”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 并根据外标法计算各组分的含量, 结果见表 3。

表3 含量测定结果(mg/g)

含量	R _{g1}	Re	Rf	Rb ₁	Rc	F1	Rb ₂	Rb ₃	Rd
5 年	1.8605	2.0710	0.5995	3.4857	1.5596	0.4474	1.1580	0.1947	0.5410
6 年	1.4642	2.3039	0.4022	3.2251	1.9004	0.1081	1.6220	0.2857	0.5798
7 年	0.7970	0.9043	0.2332	1.6134	0.7953	0.2538	0.5948	0.1723	0.2233
8 年	2.3944	2.0419	0.5623	4.3684	1.8623	0.5869	1.3838	0.2614	0.5516
9 年	3.6704	3.1123	1.0600	6.9259	2.0306	1.0670	1.4957	0.3002	0.6673
10 年	2.8239	2.6625	0.7521	6.0192	2.5723	0.6041	1.8541	0.3306	0.2725
11 年	2.3608	2.0791	1.8591	4.3078	1.8769	0.4866	1.4881	0.2611	0.4826
12 年	2.9387	2.1645	0.7394	4.4808	1.6236	1.0331	1.0277	0.1853	0.6143
13 年	3.2460	3.8956	0.9430	7.6983	2.1565	2.0016	1.3630	0.3307	0.5576
14 年	3.1192	2.6093	0.7975	5.6093	2.6634	0.2447	2.2569	0.3848	0.4163
15 年	3.0013	2.3246	0.6455	6.3120	1.8754	0.7398	1.4819	0.2445	0.4547
16 年	2.9983	2.3029	0.5463	5.4037	1.9765	0.6741	1.3602	0.2899	0.4271
17 年	3.7778	2.5372	0.8437	7.1811	2.1331	0.6440	1.6676	0.3513	0.4684
18 年	2.8977	1.8561	0.6351	5.1258	1.1368	0.9177	0.7619	0.1449	0.3705

3 讨论

参 考 文 献

本文比较了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-磷酸-水流动相体系,乙腈-水的分离效果最好。而加入磷酸对供试品中人参皂苷整体的分离度及峰形没有显著改善,且增加了色谱柱清洗难度,故最终确定乙腈-水为最佳流动相体系。本实验采用一种梯度洗脱色谱条件实现了野山参中9种人参单体皂苷成分的同时测定,与文献方法相比^[9-10],分离时间短,分离度良好,检测效率高。

本实验采用不同提取方法,超声法和回流法对样品中皂苷类成分进行提取,结果显示回流法提取的供试品溶液中皂苷含量相对较高,故采用回流法作为供试品溶液的制备方法。同时对不同提取溶剂进行考察,包括甲醇、乙醇、75%乙醇、75%甲醇、水等,结果显示75%乙醇和75%甲醇提取效果较好,提取皂苷类成分较多且分离度较好,测定时不会对待测成分造成干扰。考虑到75%乙醇溶液安全性高,毒性小,且成本低廉,最终确定75%乙醇溶液为供试品的最佳提取溶剂。

本实验同时对5~18年生野山参药材中的9种皂苷类成分进行了测定,经方法学验证,该方法准确度高,重复性好,稳定可靠,可以用于野山参的质量控制,为野山参的有效成分基础研究工作奠定了基础,为野山参的药理研究、质量评价和质量控制提供了参考依据。

[1]祖舜华. 论野山参真伪鉴别[J]. 北京中医药, 2001(3).

[2]国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 8.

[3]慕特. 探讨野山参的鉴别及其相关问题[J]. 食品安全导刊, 2019(09), 155.

[4]方土福. 试论野山参真伪鉴别技术[J]. 人参研究, 2003(4).

[5]徐世义, 孙国祥, 慕善学等. 林下山参与野山参 HPLC 指纹图谱比较研究 [J]. 中药材, 2013, 36(2): 213~216.

[6]田景鑫, 张毅. 野山参的特征与鉴别[J]. 中国园艺文摘, 2010(6).

[7]颜冰, 高忠. 黑龙江省野山参培育初探[J]. 中国林副特产, 2010(6): 99~100.

[8]张静, 张聪, 胡馨等. 野山参中7种人参皂苷的测定[J]. 中成药, 2012, 34(10): 1954~1957.

[9]欧阳庆. HPLC 法测定参雄温阳胶囊中人参皂苷 R_{g1}、Re 的含量 [J]. 中国药师, 2010, 13 (2): 215~217.

[10]张雪光, 俄丽丹, 孙巍等. 高效液相色谱法测定人参片中人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 Re 的含量[J]. 药品检测, 2003, 12(10): 42~43.