

UHPLC 同时测定进口西洋参 4 个化学成分的含量

陆静娴, 施贝, 董婷, 陈碧莲, 马临科, 祝明* (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310000)

摘要: 目的 建立 UHPLC 同时测定进口西洋参中 4 个活性成分(人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd)含量的方法。方法 采用 Zorbax SB C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱, 以乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长为 203 nm。结果 4 种成分的分离度良好, 且在各自浓度范围内呈现良好的线性关系($r \geq 0.999$), 平均回收率为 95.7%~100.3%(RSD 1.4%~1.8%)。结论 该方法操作简单, 缩短了分析时间, 重复性好, 为评价进口西洋参的质量提供了可靠的方法。

关键词: 西洋参; 超高效液相色谱法; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Rd

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)10-1443-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.10.002

引用本文: 陆静娴, 施贝, 董婷, 等. UHPLC 同时测定进口西洋参 4 个化学成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(10): 1443-1446.

Simultaneous Determination of Four Constituents in Imported *Panax quinquefolium* L. by UHPLC

LU Jingxian, SHI Bei, DONG Ting, CHEN Bilian, MA Linke, ZHU Ming* (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UHPLC method for simultaneous determination of four active components (ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁ and ginsenoside Rd) in imported *Panax quinquefolium* L.. **METHODS** An Agilent Zorbax SB C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used, with mobile phase of acetonitrile as mobile phase A and water as mobile phase B (gradient elution) at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹, column temperature was 30 °C and detector wavelength was 203 nm. **RESULTS** The four components showed good separation and linearity within the tested range. The mean recoveries were in the range of 95.7%–100.3% (RSD 1.4%–1.8%). **CONCLUSION** It provides a rapid and reliable UHPLC method which is suitable for the quality control of *Panax quinquefolium* L..

KEY WORDS: *Panax quinquefolium* L.; UHPLC; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rd

西洋参为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根, 系栽培品^[1]。研究表明, 西洋参具有抗氧化, 抗自由基等功效, 具有镇静、镇痛、催眠、镇惊、解热、全身性抗缺氧、抗疲劳、促进学习记忆等作用^[2-4]。西洋参中的化学成分包括皂苷类、挥发油类、氨基酸类、糖类和聚炔类等, 其主要活性成分为皂苷类^[5]。进口西洋参标准收载于《儿茶等 43 种进口药材质量标准》, 以 2 个普通液相系统分别对西洋参中人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 的总量及人参皂苷 Rb₁ 的含量进行测定。但采用常规 HPLC 对皂苷类成分进行分析往往时间较长^[6], 且各成分间较难达到完全分离, 因此有必要对分析方法进行改进。近年来, 由于超高效液相色谱法(UHPLC)的使用, 很多成分复杂

的中药都达到了良好的分离, 同时分析时间较短^[7]。刘莉等^[8-10]采用 UHPLC 对西洋参中人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb₁ 进行定量分析, 提高了分析效率的同时又节约溶剂。研究表明, 除上述 3 种成分外, 人参皂苷 Rd 同样具有较好的活性, 可以通过抑制自由基介导的脂质过氧化反应, 使细胞膜免受氧自由基的影响, 保护肾近端小管^[11]。同时, 人参皂苷 Rd 能使高糖状态下 HMC(human message cells)对 TGF-β1 合成和分泌减少, 可能是防治糖尿病肾病的有效成分之一^[12]。综上, 本研究采用 UHPLC 对上述 4 种皂苷类成分进行同时分离测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1290 型 UHPLC 液相色谱仪、Agilent

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2016ZB081)

作者简介: 陆静娴, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)86459414
药师 Tel: (0571)86454617 E-mail: zhumingd@hotmail.com

E-mail: lujingxian1984@126.com *通信作者: 祝明, 女, 主任中

1100 型 HPLC 液相色谱仪(Agilent 科技有限公司); 戴安 U3000RSLC 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技); AE240 型电子天平(梅特勒-托利多); Milli-Q 超纯水处理系统(默克生命科学)。

人参皂苷 Rg_1 对照品(批号: 110703-201128; 纯度为 93.4%)、人参皂苷 Re 对照品(批号: 110754-201324; 纯度为 92.7%)、人参皂苷 Rb_1 对照品(批号: 110705-200306; 纯度为 92.9%)和人参皂苷 Rd 对照品(批号: 111818-201001; 纯度为 94.4%)均由中国食品药品检定研究院提供。甲醇、正丁醇均为分析纯; 乙腈为色谱纯。西洋参样品共 23 批, 经浙江省食品药品检验研究院中药所郭增喜主任中药师鉴定为五加科植物 *Panax quinquefolium* L. 的根茎, 供样信息详见表 1。

表 1 进口西洋参样品来源

Tab. 1 Origins of imported *Panax quinquefolium* L.

编号	批号	来源	供样单位	质量/ g
1	XYS-ZJS-1	加拿大	广州普宁药材市场	50
2	XYS-ZJS-2	美国	广州清平药材市场	100
3	XYS-ZJS-3	加拿大	浙江英特医药有限公司	500
4	XYS-ZJS-4	加拿大	浙江震元医药公司	250
5	XYS-ZJS-5	加拿大	浙江英特医药有限公司	500
6	XYS-ZJS-6	加拿大	杭州华东医药股份有限公司	1 500
7	XYS-ZJS-7	加拿大	衢州南孔中药有限公司	50
8	XYS-ZJS-8	加拿大温哥华	广东普宁药材市场	200
9	XYS-ZJS-9	加拿大多伦多	广东普宁药材市场	250
10	XYS-ZJS-10	美种	广东普宁药材市场	100
11	XYS-ZJS-11	美种	广东普宁药材市场	100
12	XYS-ZJS-12	加货多伦多软肉	广东普宁药材市场	250
13	XYS-ZJS-13	加货多伦多硬肉	广东普宁药材市场	250
14	XYS-ZJS-14	加拿大安大略	广州市食品药品检验所	50
15	XYS-ZJS-15	美国威斯康辛	广州市食品药品检验所	15
16	XYS-ZJS-16	美国威斯康辛	广州市食品药品检验所	15
17	XYS-ZJS-17	美国威斯康辛	广州市食品药品检验所	15
18	XYS-ZJS-18	美国威斯康辛	广州市食品药品检验所	15
19	XYS-ZJS-19	美国	北京市药品检验所	50
20	XYS-ZJS-20	美国	北京市药品检验所	50
21	XYS-ZJS-21	美国	北京市药品检验所	50
22	XYS-ZJS-22	美国	北京市药品检验所	50
23	XYS-ZJS-23	美国威斯康辛	广州市食品药品检验所	15

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 取人参皂苷 Rg_1 对照品、人参皂苷 Re 对照品、人参皂苷 Rb_1 对照品和人参皂苷 Rd 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 各含人参皂苷 Rg_1 0.1 mg、人参皂苷 Re 0.4 mg、人参皂苷 Rb_1 1 mg、人参皂苷 Rd 0.3 mg 的混合溶

液, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取本品粉末(过三号筛)约 0.75 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入水饱和的正丁醇 50 mL, 称定质量, 置水浴加热回流提取 2 h, 放冷, 再称定质量, 用水饱和正丁醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 残渣加 50% 甲醇适量使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

Agilent Zorbax SB C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μ m); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~9.5 min, 20%A; 9.5~11.5 min, 20%→75%A; 11.5~25 min, 75%→60%A); 检测波长: 203 nm; 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 进样量: 2 μ L。在上述色谱条件下, 人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 和人参皂苷 Rd 与其邻近峰均可达到基线分离, 见图 1。

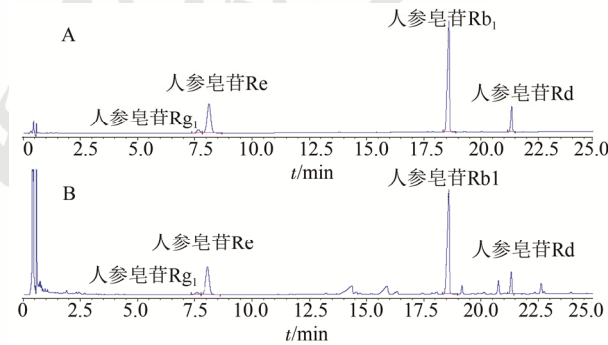


图 1 西洋参含量测定色谱图

A-混合对照品; B-西洋参供试品溶液。

Fig. 1 Typical HPLC chromatograms of *Panax quinquefolium* L.

A-mixed standards; B-samples of *Panax quinquefolium* L..

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系 精密称取人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 和人参皂苷 Rd 对照品适量, 分别用甲醇溶解制成浓度为 0.069 1, 0.682 5, 0.962 2, 0.239 0 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 精密吸取混合对照品溶液 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 μ L, 注入液相色谱仪, 按“2.2”项下色谱条件测定, 以色谱峰面积为纵坐标(y), 以进样量(ng)为横坐标(x), 进行线性回归, 结果表明, 人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rd 进样量分别在 34.5~345.5, 198.1~2 137.6, 428.3~4 416.8 和 74.72~777.8 ng 内与峰面积呈良好线性关系, 结果见表 2。

表 2 西洋参 4 个成分线性关系考察表

Tab. 2 Linear relationship of 4 components in *Panax quinquefolium* L.

对照品名称	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围/ng
人参皂苷 Rg ₁	$y=0.636x-2.434$	0.999 9	34.5~345.5
人参皂苷 Re	$y=632.5x-22.11$	1.000 0	198.1~2 137.6
人参皂苷 Rb ₁	$y=452.8x-19.76$	1.000 0	428.3~4 416.8
人参皂苷 Rd	$y=655.3x-5.050$	1.000 0	74.72~777.8

2.3.2 仪器精密度试验 取供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定,重复进样 6 次,测定峰面积,结果人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd 的 RSD 分别为 1.0%, 0.1%, 0.2%和 0.2%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别间隔 0, 3, 9.5, 13, 15, 18 h 按“2.2”项下色谱条件测定 1 次,人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 0.3%, 0.4%和 0.7%,结果显示供试品溶液在 18 h 内基本稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批样品(批号: XYS-ZJS-6)6 份,按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品,按“2.2”项下色谱条件测定,结果人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 的平均含量分别为 0.93 mg·g⁻¹(RSD 1.3%), 12.44 mg·g⁻¹(RSD 1.0%), 38.59 mg·g⁻¹(RSD 1.0%)和 3.85 mg·g⁻¹(RSD 1.5%),说明方法重复性好。

2.3.5 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的样品(批号: XYS-ZJS-6),按中间浓度,精密加入对照品溶液适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定供试品中人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 的含量,计算回收率,结果见表 3。结果平均回收率分别为 98.3%(RSD 1.7%), 95.7%(RSD 1.4%), 100.3%(RSD 1.8%), 96.2%(RSD 1.6%)。

2.4 耐用性试验

2.4.1 不同色谱柱比较 对不同的色谱柱进行比较: Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Kromasil KR100-5 C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)和 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),结果 3 种色谱柱均能得到很好的分离,人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 含量的 RSD 分别为 2.6%, 4.0%, 1.4%和 2.3%。

表 3 进口西洋参中 4 个成分加样回收率测定(n=6)

Tab. 3 Results of recovery test of 4 components in imprinted *Panax quinquefolium* L.(n=6)

成分	样品含量/ mg	加入量/ mg	实测值/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
人参 皂苷 Rg ₁	0.324	0.415	0.722	95.9	98.3	1.7
	0.325	0.415	0.732	98.2		
	0.325	0.415	0.733	98.4		
	0.325	0.415	0.744	101.1		
	0.325	0.415	0.734	98.8		
人参 皂苷 Re	0.323	0.415	0.728	97.6	95.7	1.4
	4.345	4.095	8.231	94.9		
	4.354	4.095	8.232	94.7		
	4.361	4.095	8.265	95.3		
	4.356	4.095	8.378	98.2		
人参 皂苷 Rb ₁	4.355	4.095	8.278	95.8	100.3	1.8
	4.332	4.095	8.221	94.9		
	13.481	11.773	25.246	99.9		
	13.508	11.773	25.269	99.9		
	13.531	11.773	25.202	99.1		
人参 皂苷 Rd	13.516	11.773	25.735	103.8	96.2	1.6
	13.512	11.773	25.321	100.3		
	13.439	11.773	25.072	98.8		
	1.345	1.434	2.721	95.9		
	1.347	1.434	2.715	95.4		

2.4.2 不同柱温比较 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱,柱温分别为 20, 25, 30, 35 °C 进行试验,人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 含量的 RSD 分别为 2.8%, 0.4%, 0.3%和 0.4%。但随着柱温升高,人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 之间的分离度变差,而柱温降低会导致柱压升高。综合考虑后确定柱温为 30 °C。

2.4.3 不同流速比较 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱,流速分别为 0.4, 0.5, 0.6 mL·min⁻¹ 进行试验,结果在不同流速下 4 个成分均得到较好的分离。人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 含量的 RSD 分别为 1.6%, 0.2%, 0.2%和 0.5%。

2.4.4 不同仪器比较 试验中比较了不同生产厂家(Agilent 公司和戴安公司)的仪器,结果 2 个公司的仪器均能得到很好的分离。人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 含量的 RSD 分别为 1.4%, 2.9%, 1.6%和 2.2%。

2.5 样品测定

取进口西洋参样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,每个样品平行 2 份,并按照“2.2”项下色谱条件进行测定,计算各进口西洋参样品中 4 个成分的含量,结果见表 4。

表 4 进口西洋参含量测定结果

Tab. 4 Contents of 4 constituents in imported *Panax quinquefolium* L. %

批号	人参皂苷 R _g ₁	人参皂苷 Re	人参皂苷 R _b ₁	人参皂苷 Rd	总和
XYS-ZJS-1	0.17	1.35	5.70	0.60	7.81
XYS-ZJS-2	0.11	1.03	3.21	0.65	4.99
XYS-ZJS-3	0.11	1.90	6.21	0.61	8.82
XYS-ZJS-4	0.12	2.13	5.85	0.50	8.60
XYS-ZJS-5	0.12	1.45	4.83	0.32	6.73
XYS-ZJS-6	0.10	1.36	4.22	0.43	6.11
XYS-ZJS-7	0.08	1.28	4.13	0.28	5.77
XYS-ZJS-8	0.41	1.22	4.35	0.50	6.48
XYS-ZJS-9	0.11	1.48	3.80	0.29	5.69
XYS-ZJS-10	0.09	0.96	3.10	0.65	4.80
XYS-ZJS-11	0.08	1.18	3.80	0.32	5.38
XYS-ZJS-12	0.18	1.24	4.15	0.49	6.05
XYS-ZJS-13	0.10	1.31	4.17	0.70	6.28
XYS-ZJS-14	0.12	1.42	4.18	0.35	6.07
XYS-ZJS-15	1.39	1.35	4.75	0.25	7.74
XYS-ZJS-16	0.11	1.49	5.09	1.34	8.03
XYS-ZJS-17	0.12	1.36	3.97	0.78	6.23
XYS-ZJS-18	0.12	1.20	4.48	0.75	6.54
XYS-ZJS-19	0.17	1.34	3.52	0.52	5.55
XYS-ZJS-20	0.19	1.40	3.79	0.53	5.90
XYS-ZJS-21	0.16	1.27	4.35	0.51	6.29
XYS-ZJS-22	0.15	1.58	4.53	0.48	6.74
XYS-ZJS-23	0.10	1.24	3.51	0.40	5.25

3 讨论

本实验建立的 UHPLC 同时测定进口西洋参中人参皂苷 R_g₁、Re、R_b₁ 和 Rd 4 种成分, 与原标准中 HPLC 相比, 显著缩短分析时间, 节约大量溶剂, 同时含量测定结果接近, RSD 均<4.5%。

3.1 供试品溶液制备方法的考察

考察了甲醇、50%甲醇和水饱和正丁醇 50 mL 3 种溶剂的提取效率, 结果水饱和正丁醇作为溶剂提取效率较高, 杂质较少; 考察回流 2 h 和超声 30 min 2 种提取方式对试验的影响, 结果回流提取方式提取效果较好。分别称取样品粉末 0.5、0.75、1.0 g 进行试验, 结果显示不同取样量对含量测定结果影响不大, 以 0.75 g 时峰响应值较为理想, 因此选择取样量为 0.75 g。对提取时间进行考察, 分别回流 1, 2, 3 h, 结果显示, 2 h 即可提取完全。

3.2 测定结果分析

《儿茶等 43 种进口药材质量标准》中对西洋参中皂苷含量限度规定为: 含人参皂苷 R_b₁ 不得<1.2%, 含人参皂苷 R_g₁ 和人参皂苷 Re 不得<0.8%; 中国药典 2015 年版一部对西洋参中皂苷含量限度规定为: 含人参皂苷 R_g₁、人参皂苷 Re 和人参皂苷 R_b₁ 的总量不得<2.0%。同时上述标准中对西洋参水分的要求均为不得>13.0%。本次 23 批样品以

干燥品计, 故含量限度有所提高。测得人参皂苷 Rd 的含量平均为 0.5%, 人参皂苷 R_g₁、人参皂苷 Re 和人参皂苷 R_b₁ 的总量平均为 5.9%。综合已有标准中皂苷含量限度及样品测定结果, 暂定西洋参中皂苷类成分含量限度为: 本品按干燥品计算, 含人参皂苷 R_g₁(C₄₂H₇₂O₁₄)、人参皂苷 Re (C₄₈H₈₂O₁₈)、人参皂苷 R_b₁(C₅₄H₉₂O₂₃)和人参皂苷 Rd(C₄₈H₈₂O₁₈)的总量不得<3.0%。

REFERENCES

[1] 王旭, 周富荣. HPLC 法测定西洋参中人参皂苷 R_b₁ 的含量 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(4): 227.

[2] NG T B, LIU F, WANG H X. The antioxidant effects of aqueous and organic extracts of *Panax quinquefolium*, *Panax notoginseng*, *Codonopsis pilosula*, *Pseudostellaria heterophylla* and *Glehnia littoralis* [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 93(2/3): 285-288.

[3] LIU F, NG T B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs [J]. Life Sci, 2000, 66(8): 725-735.

[4] KITTS D D, WIJEWICKREME A N, HU C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract [J]. Mol Cell Biochem, 2000, 203(1/2): 1-10.

[5] MEN-OLIVIER L L, RENAULT J H, THEPENIER P, et al. Purification of the main ginsenosides from a French crop of *Panax quinquefolius* L. [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 1995, 18(8): 1655-1662.

[6] ZHANG C X, BAO J C, LI X G, et al. HPLC determination of the amount of ginsenosides in different part of *Panax ginseng* C. A. Mey. and *P. quinquefolius* L. and *P. notoginseng* (Burk) F. H. Chen [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2005, 25(10): 1190-1194.

[7] ZHANG H K, GUO C D, GAO G B, et al. Processing technology study of *Crataegi Fructus* charcoal based on pilot-scale level and multi-component quantification by UPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(10): 1413-1417.

[8] LIU L, CHENG L Q, ZHOU S Y, et al. Content determination of ginsenoside R_g₁, ginsenoside Re and ginsenoside R_b₁ in *Radix Panax Quinque Folium* L. [J]. Her Med(医药导报), 2011, 30(9): 1208-1209.

[9] BI F J, ZHONG S H, GU L H. Comparison between RRLC and HPLC for determination of ginsenoside R_g₁, Re and R_b₁ in *Radix et Rhizoma Ginseng Rubra* and *Radix Panacis Quinquefolii* [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(9): 1720-1724.

[10] 杨立伟, 郑传奇, 蒋忠军, 等. 超高效液相色谱法测定西洋参中人参皂苷 R_g₁、Re、R_b₁ 的含量[J]. 中药材, 2008, 31(1): 55-57.

[11] YOKOZAWA T, LIU Z W, DONG E. A study of ginsenoside-Rd in a renal ischemia-reperfusion model[J]. Nephron, 1998, 78(2): 201-206.

[12] ZHAO Y, HU D J, ZHANG X, et al. *In vitro* effects of ginsenoside Rd on proliferation and expression of TGF-β1 in human mesangial cells induced by high glucose [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(7): 786-789.

收稿日期: 2017-10-17

(本文责编: 李艳芳)