

人参茎叶总皂苷中人参皂苷 R_c 的含量分析

何厚罗¹, 黄章倍¹, 盛佳钰¹, 岳小强¹, 李敏², 辛海量^{1,3} (1. 第二军医大学中医系, 上海 200433; 2. 第二军医大学海医系军队卫生教研室, 上海 200433; 3. 中国人民解放军第 546 医院, 新疆 乌鲁木齐 841700)

摘要 目的: 分析人参茎叶总皂苷中人参皂苷 R_c 的含量, 为人参总皂苷的质量控制提供依据。方法: 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 25 mm, 5 μm), 保护柱: DIKMA EasyGuard C₁₈ (10 mm × 4.6 mm), 流动相: 乙腈-0.5% 冰醋酸水溶液, 梯度洗脱, 流速: 1.25 mL/min; ELSD: 漂移管温度 40℃, 载气压力 3.5 bar, 放大系数为 7。结果: 标准曲线: $C = 1.191 \times 10^{-7} A - 0.1876$, 线性范围: 0.038 ~ 1.14 mg/mL, $r = 0.9993$, 检出限: 20 ng (S/N > 3), 加样回收率: 96.84% ~ 104.21%。结论: 该方法前处理简单, 分析准确、快速, 可作为人参茎叶总皂苷中人参皂苷 R_c 的含量分析方法。

关键词 总皂苷; 人参皂苷 R_c; HPLC-ELSD

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)04-0291-03

Determination of ginsenoside R_c in total ginsenoside from stalk and leaf of *Panax ginseng*

HE Hou-luo¹, HUANG Zhang-bei¹, SHENG Jia-yu¹, YUE Xiao-qiang¹, LI Min², XIN Hai-liang^{1,3} (1. Department of Traditional Chinese Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Military Health, Naval Faculty, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. 546th Hospital of PLA, Urumqi 841700, China)

ABSTRACT Objective: To determine quantitatively ginsenoside R_c in total ginsenoside from stalk and leaf of *Panax ginseng*, and to provide experimental evidence for total ginsenoside quality control of *Panax ginseng*. **Methods:** The method was developed with the condition as follows: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 25 mm, 5 μm) and DIKMA EasyGuard C₁₈ (10 mm × 4.6 mm) was used as chromatographic column and guard column respectively. Gradient elution was employed with the mobile phase of acetonitrile-0.5% acetic acid/water at a flow rate of 1.25 mL/min. ELSD: temperature of the drift tube 40℃; gas pressure: 3.4 bar; gain: 7. **Results:** The standard curve: $C = 1.191 \times 10^{-7} A - 0.1876$; the linear range: 0.038 ~ 1.14 mg/mL, $r = 0.9993$; the limits of detection: 20 ng (S/N > 3); recovery rate of the added sample: 96.84% ~ 104.21%. **Conclusion:** With its accuracy, sensitivity, reproducibility as well as the simplicity of sample preparation, this method is feasible for quality control of total ginsenoside from stalk and leaf of *Panax ginseng*.

KEY WORDS *Panax ginseng*; total ginsenoside; ginsenoside R_c; HPLC-ELSD

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 是五加科植物, 其多种提取物均被广泛应用^[1]。人参茎叶总皂苷系从人参茎叶中提取获得, 具有抗休克^[2-6]、抗衰老^[7]等多方面的药理作用^[8]。人参茎叶总皂苷富含多种人参皂苷类成分, 其中人参皂苷 R_c 含量较高, 可用于对其进行质量控制。由于人参皂苷类成分中的呈色基团不活泼, 紫外吸收较差, 仅限于短波长处的吸收可用于检测。但是在检测工作中, 末端吸收易受试剂影响, 存在背景干扰, 采用梯度洗脱法, 基线漂移严重, 给分析工作带来困难。因此, 应

用 HPLC-UV 法检测人参皂苷类成分, 效果并不理想。ELSD 检测器是一种通用型检测器, 可部分弥补 UV 法的缺点。本实验尝试采用 HPLC-ELSD 方法分析人参茎叶总皂苷中人参皂苷 R_c 的含量, 取得了满意的结果。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪, 配有四元梯度泵, Sedex 75 型 ELSD 蒸发光检测器; XWK-3A 无油空气压缩机。

1.2 试剂 人参皂苷 R_c 对照品 (供含量测定用, 中国药品生物制品检定所), 乙腈 (色谱纯, DIKMA 公司), 水 (高纯水, 自制), 甲醇 (分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司), 人参茎叶总皂苷 (吉林宏久生物科技股份有限公司)。

基金项目: 总后“十一五”专项项目 (No. 06Z024), “十一五”军队中医药研发推广专项课题 (No. 2006172002)。

作者简介: 何厚罗 (1987-), 男, 第二军医大学本科学员。Tel: 15900414117, E-mail: hhhqwll@163.com。

通讯作者: 辛海量。E-mail: hailiangxin@163.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: DIKMA Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 25 mm, 5 μm), 保护柱: DIKMA Easy-Guard C₁₈ (10 mm × 4.6 mm); 流动相: 乙腈-0.5%冰醋酸水溶液; 梯度洗脱: 0~45 min: 乙腈从 18% 梯度变化至 23%; 流速: 1.25 mL/min; ELSD: 漂移管温度 40 °C, 载气压力 3.5 bar, 放大系数为 7。

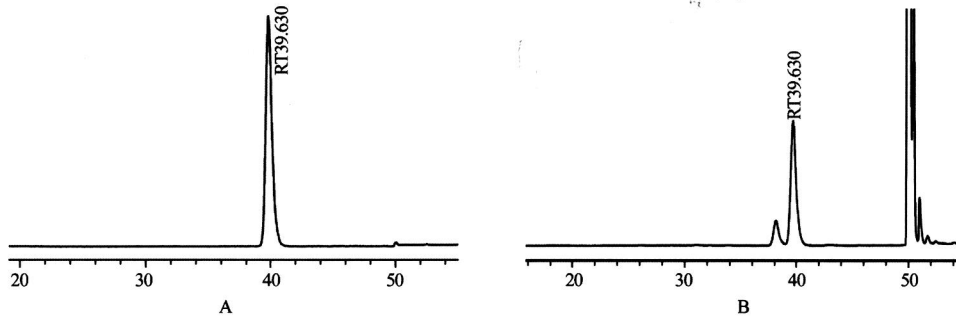


图 1 人参皂苷 R_e HPLC 色谱图

A 对照组; B 样品

2.4 线性关系考察 精密称取人参皂苷 R_e 对照品 0.19、0.95、1.90、3.80、5.70 mg, 置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 即得浓度分别为 0.038、0.190、0.380、0.76、1.14 mg/mL 的系列对照品溶液。吸取各对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定。以峰面积积分值自然对数值 (lnA) 对对照品浓度自然对数值 (lnC) 进行线性回归, 回归方程为 $\ln A = 1.53 \ln C + 14.61$, $r = 0.9993$; 线性范围: 0.038 ~ 1.14 mg/mL; 检测限 (S/N > 3): 20 ng。

2.5 精密度试验 吸取浓度为 0.38 mg/mL 的人参皂苷 R_e 对照品溶液 10 μL, 按上述色谱条件重复进样 6 次, RSD = 1.12%, 表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验 取批号 060801 供试品溶液, 在上述色谱条件下, 精密吸取供试品溶液 10 μL, 每隔 2 h 进样 1 次, 共测定 6 次, 峰面积的 RSD = 2.56%, 表明样品在 12 h 内稳定。

2.7 重现性试验 准确称取批号 060801 的样品, 共 5 份, 按供试品制备方法处理。分别测定人参皂苷 R_e 的含量, 结果人参皂苷 R_e 平均含量为 17.78%, RSD = 3.54%。

2.8 加样回收率试验 精密称取批号 060801 样品, 共 6 份, 含量为 17.80%, 分别加入人参皂苷 R_e 对照品适量, 样品处理和测定同前, 结果见表 1。

2.9 样品测定 分别准确称取多批人参茎叶总皂苷样品, 每批 3 份, 样品处理和测定同前, 精密吸取

2.2 供试品液的制备 准确称取人参茎叶总皂苷 12.33 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 以色谱纯甲醇溶解并加至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 备用。

2.3 系统适应性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 理论板数按人参皂苷 R_e 峰计算不低于 5000, 人参皂苷 R_e 与相邻色谱峰分离度大于 1.5, 人参皂苷 R_e 色谱峰拖尾因子在 0.95 ~ 1.05 内。色谱图见图 1。

10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 计算, 结果见表 2。

表 1 人参皂苷 R_e 加样回收率实验结果

No	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
1	0.095	0.099	104.21	
2	0.095	0.099	104.21	
3	0.095	0.098	103.15	
4	0.095	0.093	97.89	3.18
5	0.095	0.092	96.84	
6	0.095	0.096	101.05	

表 2 人参茎叶总皂苷样品含量测定结果 (n=3)

批号	含量 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
060801	18.06		
070207	20.51	19.16	5.30
071103	18.91		

3 讨论

在流动相的选择过程中, 曾采用甲醇-水多个梯度条件, 但均不能达到人参皂苷 R_e 与其保留时间邻近干扰成分的完全分离, 选择乙腈-0.5%冰醋酸水溶液梯度洗脱, 既能做到较好分离, 同时由于醋酸沸点较低, 也不影响 ELSD 的检测。但在此条件下, 保留时间过长, 可通过适当增加流速, 以达到缩短分析时间的目的。

文献报道对于人参皂苷 R_e 的测定, 多采用

HPLC-UV方法,但是由于人参皂苷 R_c 较弱的紫外吸收,只能选择末端吸收作为检测波长,势必带来较大的测定误差^[9~12]。本实验结果表明,采用 HPLC-ELSD方法测定人参茎叶总皂苷中人参皂苷 R_c 的含量,简便、准确、可靠,可用于人参茎叶总皂苷的质量控制。

参考文献:

- [1] 罗兰,殷惠军,张颖,等. 人参总皂苷对高脂饲养大鼠胰岛素敏感指数的影响[J]. 中西医结合学报, 2005, 3(6): 463.
- [2] 李敏,凌昌全,黄雪强,等. 人参茎叶皂苷对热损伤大鼠不同脏器糖皮质激素受体的影响[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(2): 156.
- [3] 李勇,李敏,王喜,等. 人参茎叶皂苷增强糖皮质激素受体转录激活效应的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 710.
- [4] 李敏,凌昌全,沈志雷,等. 人参茎叶皂苷提高机体热耐受能力作用[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(12): 1473.
- [5] 凌昌全,李敏,苏永华,等. 人参茎叶皂苷对失血性休克

大鼠糖皮质激素受体的影响[J]. 中草药, 2003, 34(5): 433.

- [6] 凌昌全,沈志雷,黄雪强,等. 人参茎叶皂苷对热损伤大鼠糖皮质激素受体的影响[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(8): S16, F003.
- [7] 程俊霖,朱玲,赵妍妍. 人参茎叶总皂苷对衰老小鼠的作用研究[J]. 四川生理科学杂志, 2004, 26(3): 97.
- [8] 庞慧民,朱玉琢,明月,等. 人参茎叶总皂苷对培养的人胚视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2002, 28(4): 363.
- [9] 王光忠,胡迪,邹阳. RP-HPLC测定五参芪口服液人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_c 的含量[J]. 中成药, 2006, 28(4): 495.
- [10] 朱照静,邓开英. 红参中人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_c 的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(5): 10.
- [11] 李长新,元校鹏. 高效液相色谱法测定人参茎叶总皂苷胶囊中人参皂苷 R_c 的含量[J]. 黑龙江医药, 2005, 18(4): 244.
- [12] 朱文良,李发美. HPLC法同时测定复方黄芪注射液人参皂苷 R_c 、 R_{g1} 含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(9): 577.

收稿日期:2008-11-05

(上接第 283页)

的 SH(从 0 增加至 1 mg/mL,因 SH 溶液的黏度较大,未对更高浓度的 SH 进行相关实验),测定 CS 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。同样在已知浓度为 1 mg/mL SH 溶液中加入不同浓度的 CS(从 0 增加至 5 mg/mL),测定 SH 的含量,结果也均在本方法的误差范围内。可见,本实验条件下 SH 和 CS 浓度的不同比例对本方法无影响。

3.2 不同批次的 SH 对本方法的影响 在已知浓度为 1 mg/mL CS 溶液中,分别加入 3 个不同批次的 SH(浓度均为 1 mg/mL),分别测定 CS 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。这表明,本实验条件下,不同批次的 SH 对本方法无影响。

3.3 不同批次的 CS 对本方法的影响 在已知浓度为 1 mg/mL SH 溶液中,分别加入 3 个不同批次的 CS(浓度均为 1 mg/mL),分别测定 SH 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。这表明,本实验条件下,不同批次的 CS 对本方法无影响。

参考文献:

- [1] Koshiishi I, Takenouchi M, Hasegawa T, *et al*. Enzymatic method for the simultaneous determination of hyaluronan and chondroitin sulfates using high-performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1998, 265: 49.
- [2] 凌沛学. 透明质酸[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002: 41.

收稿日期:2008-07-01

(上接第 290页)

发表的方法相比^[4,5],流动相简单,可节约成本,减少污染。由于采用梯度洗脱,分离效果好,简化了样品的预处理步骤,使测定方法更加快捷简便。

3种菊花中木樨草素含量的测定结果显示,毫菊中含量最高,如从预防癌症和心血管病的角度出发,在选择食用菊花品种时应更多考虑毫菊。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科技出版社, 1997: 2008.
- [2] 国家药监局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册

[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986: 681.

- [3] Chan EC, Pannan Gpetch P, Woodman OL. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships Cardiovasc Pharmacol, 2000, 35(2): 326.
- [4] 胡碧波,蒋惠娣,杨俊,等. HPLC法测定不同采收期杭白菊中木樨草素及其苷的含量[J]. 浙江大学学报(医学版), 2004, 33: 29.
- [5] 张洪坤,国兴明. 应用反相高效液相色谱法测定菊花中的木樨草素[J]. 贵州大学学报(农业与生物科学版), 2002, 21: 424.

收稿日期:2009-01-06