

不同产地西洋参皂甙成分的 HPLC 分析

苏建² 李海舟¹ 孔令义³ 杨崇仁^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204; 2. 云南省药品检验所 昆明 650011;
3. 中国药科大学 南京 210009)

摘要 以西洋参的主要皂甙成分人参皂甙 Re 和 Rb₁ 为标准对照品,建立西洋参药材的 HPLC 定量分析技术,并参考人参皂甙 Rc, Rd 及 Rg₂ 的相对峰面积进行主成分分析。色谱条件为: C18 柱 (5 μ m, 3.9 $\times$ 150 mm), 乙腈: 水流动相, 二元梯度洗脱, 检测波长 203 nm。结果表明, 就皂甙成分的组成与含量而言通过人参皂甙 Re 和 Rb₁ 的含量测定和皂甙的主成分分析, 不同产地的西洋参药材皂甙成分存在一定的差别。吉林省靖宇县产的西洋参与进口品最为接近。

关键词 HPLC; 西洋参; 人参皂甙 Re; 人参皂甙 Rb₁; 主成分分析

HPLC ANALYSIS OF SAPONINS AMERICAN GINSENG PRODUCED IN DIFFERENT AREAS

SU Jian², LI Hai-zhou¹, KONG Ling-yi³, YANG Chong-ren^{1*}

(1. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;
2. Yunnan Institute for Drug Control, Kunming 650011, China;
3. Chinese University of Pharmacy, Nanjing 210009, China)

Abstract To control the quality of American Ginseng, HPLC was carried out with C18 column (5 μ m, 3.9 $\times$ 150 mm) using acetonitrile and water as mobile phase, and detected at 203 nm. Ginsenoside Re and Rb₁ were used as the standard for quantitative analysis. The relative contents of Ginsenoside Rc, Rd and Rg₂ were used for principle components analysis (PCA). Distinct differences were found among American Ginseng produced in different places through quantitative analysis and PCA. American Ginseng produced in Jingyu, Jilin province is the mostly close one to those imported in view of glycosides and their contents.

Key words HPLC; *Panax quinquefolium*; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; PCA analysis

西洋参 (*Panax quinquefolium* L.) 原产北美州, 晚清以来输入我国, 成为著名的传统中药, 并长期依赖进口^[1]。上世纪八十年代以来, 通过引种驯化, 我国逐渐发展了西洋参的种植, 栽培区域与范围不断扩大, 栽培技术日愈成熟与规范, 有的地区建立了西洋参 GAP 种植基地, 在西洋参的生产过程中实施 SOP 的规范操作, 加强了质量管理, 以保证产品的质量。目前, 国产西洋参正在逐渐取代进口品, 西洋参的国产化已指日可待。然而, 对国产西洋参与进口品的经济性状、化学成分以及质量等均缺乏系统的比较研究。

化学研究结果表明, 达玛烷型四环三萜皂甙是西洋参的主要生理活性成分之一, 其中, 人参皂甙 Rb₁ 和 Re 的含量最高。西洋参中人参皂甙的含量分析, 早期曾用薄层比色法^[2] 和薄层色谱扫描法^[3]。近年多用高效液相色谱法^[4-7]。后者方法简便、准确、灵敏、快速, 已逐渐广泛应用, 本实验室曾报道用 HPLC 技术分析云南丽江栽培西洋参的皂甙成分^[8]。本文从西洋参生产实践中质量控制的实际需要出发, 以人参皂甙 Rb₁ 和 Re 为标准对照品, 建立西洋参皂甙成分的 HPLC 定量分析技术, 并参考人参皂甙 Rc、Rd 及 Rg₂ 的相对含量, 对美国威斯康辛, 加拿大温哥华、多伦多, 北京, 山东文登, 吉林靖宇的不同来源和不同规格的西洋参样品进行主成分分析比较, 为西洋参的质量控制以及优质国

产西洋参的生产提供依据。

1 仪器与试剂

Waters alliance 2695 液相色谱仪, Waters 2996 PAD 检测器, Millennium32 色谱工作站。人参皂甙 Re, Rb₁, Rc, Rd 及 Rg₂ 对照品均为自制; HPLC 峰面积归一化法检测纯度均达 99.0%。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余溶剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及检测波长的选择

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(实验中用 Symmetry Shield C18 柱, 5 μ m, 3.9 $\times$ 150 mm); 乙腈(A): 水(B)为流动相, 二元梯度洗脱, 0~20 min

(A)等度 20%, 20~45 min(A)20%到 45%, 45~60 min(A)45%到 80%。柱温: 30 $^{\circ}$ C。流速: 1.0 mL/min。人参皂甙 Re 及 Rb₁ 等对照品用流动相制备的溶液测其紫外光谱, 在 203 nm 波长处有末端吸收, 故检测波长设定为 203 nm。理论板数按人参皂甙 Re 峰计算不低于 1500, 按人参皂甙 Rb₁ 峰计算不低于 90000。人参皂甙 Re 及 Rb₁ 峰的分离度均符合要求, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的人参皂甙 Re 对照品 6.30 mg、人参皂甙 Rb₁ 对照品 12.82 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 中含人参皂甙 Re 0.63 mg、人参皂甙 Rb₁ 1.282 mg)。

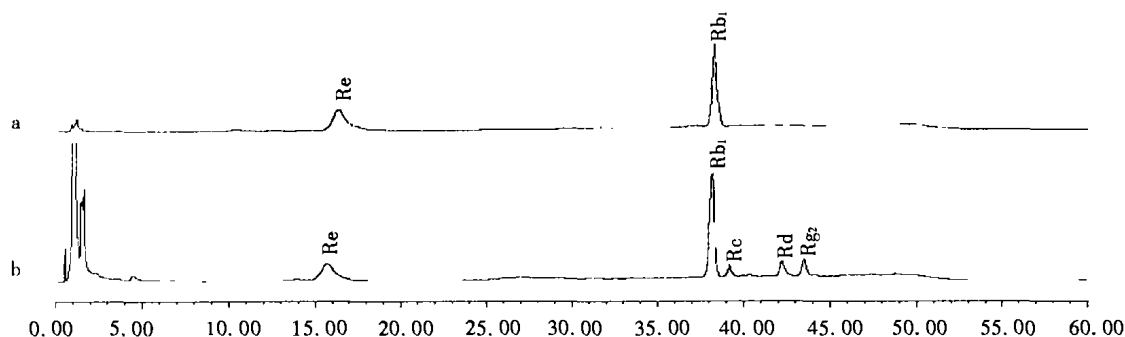


图 1 人参皂甙 Re、Rb₁ 对照品、西洋参总皂甙色谱图(a. 对照品 b. 样品)

Fig. 1 The Chromatograms of Ginsenoside Re and Rb₁ (a. Reference b. Sample)

2.3 供试品溶液的制备条件选择

取西洋参粉末(过三号筛)约 650 mg, 精密称定, 置 10 mL 离心管中, 加入甲醇约 8 mL, 分别超声处理 20, 30, 40 min, 放冷, 离心, 取上清液用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过, 滤液置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 按上述液相色谱条件测定(对照品与供试品进样量各 20 μ L)。实验结果表明, 超声处理 20, 30, 40 min 结果近似, 故超声提取时间定为 30 min。

2.4 方法学考察

2.4.1 线形关系考察

分别精密吸取对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25, 30 μ L 按上述色谱条件测定峰面积, 结果见表 3。以峰面积积分值对进样量进行回归处理, 人参皂甙 Re 在 3.1~18.9 μ g、人参皂甙 Rb₁ 在 6.4~38.5 μ g 范围内呈现良好的线性关系。回归方程人参皂甙 Re 为 $Y = 2.53e + 005X - 9.82e + 004$, $R^2 = 0.9999$; 人参皂甙 Rb₁ 为 $Y = 1.62e + 005X + 1.78e + 004$, R^2

= 0.9998。结果表明两种皂甙色谱响应线性良好

2.4.2 精密度实验

取同一人参皂甙 Re 及 Rb₁ 对照品溶液, 按上述色谱条件, 连续测定 6 次(进样量 20 μ L), 测得峰面积积分值分别为人参皂甙 Re: 3099154, 3067738, 3144917, 3123229, 3153513, 3130352, RSD = 1.0% ($n = 6$)。人参皂甙 Rb₁: 4179203, 4232735, 4174081, 4122799, 4144754, 4106576, RSD = 1.1% ($n = 6$)。结果表明精密度良好。

2.4.3 稳定性实验

取同一供试品溶液, 按上述色谱条件测定 6 次(进样量 20 μ L), 每次间隔约 2 h, 测得峰面积积分值分别为人参皂甙 Re: 3116821, 3157454, 2965261, 3028658, 3045583, 3058616, RSD = 2.2% ($n = 6$)。人参皂甙 Rb₁: 5240985, 5112331, 5117772, 5069382, 5096015, 5098328, RSD = 1.2% ($n = 6$)。结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定; 且室温下放置 10 d 后测定, 结果也稳定。

2.4.4 重现性实验

取西洋参粉末 5 份,按供试品溶液的制备方法如法制备,按上述色谱条件测定人参皂甙 Re 及 Rb₁ 的含量,结果见表 1。证明该法重现性良好。

表 1 重现性实验结果

Table 1 The result of fidelity

取样量 (mg) Sample wt.	样品 Re 峰面积 Area of Re	Re 含量 (%) Content of Re	样品 Rb ₁ 峰面积 Area of Rb ₁	Rb ₁ 含量 (%) Content of Rb ₁
696	3046640	0.5899	6059462	1.7969
701	3130542	0.6018	6015284	1.7711
627	2934993	0.6308	5116135	1.6842
652	3083450	0.6373	5293887	1.6759
671	3184421	0.6396	5436245	1.6722
平均值		0.6199		1.7200
RSD (%)		3.64		3.45

2.4.5 回收率实验

采用加样回收法,取已测定含量的西洋参样品约 0.6 g,6 份,精密称定。分别精密加入人参皂甙 Re 及 Rb₁ 对照品溶液(每 1 mL 中含人参皂甙 Re 0.6378 mg,人参皂甙 Rb₁ 1.3396 mg)4,6,8 mL,按供试品溶液的制备方法如法制备、测定,计算回收率。平均回收率人参皂甙 Re 为 101.84%,RSD = 1.0% (n = 6); 人参皂甙 Rb₁ 为 96.79%,RSD = 1.2% (n = 6)。结果见表 2、3。

表 2 人参皂甙 Re 加样回收实验结果

Table 2 The result of Re recovery

取样量 (mg) Sample wt.	人参皂甙 Re 含量 (mg) Re content	峰面积 Area	测定总量 (mg) Mensuration wt.	对照品加入 量(mg) Addition wt.	回收率 (%) Recovery
607	6.5556	3659455	9.1481	2.5512	101.62
558	6.0264	3461356	8.6529	2.5512	102.95
723	7.8084	4683358	11.7077	3.8268	101.89
770	8.3160	4879000	12.1967	3.8268	101.41
727	7.8516	5241525	13.1030	5.1024	102.92
723	7.8084	5169258	12.9223	5.1024	100.23

表 3 人参皂甙 Rb₁ 加样回收实验结果

Table 3 The result of Rb₁ recovery

取样量 (mg) Sample wt.	人参皂甙 Rb ₁ 含量 (mg) Rb ₁ content	峰面积 Area	测定总量 (mg) Mensuration wt.	对照品加入 量(mg) Addition wt.	回收率 (%) Recovery
607	10.9867	5623836	16.2033	5.3584	97.35
558	10.0998	5261073	15.1581	5.3584	94.40
723	13.0863	7250427	20.8898	8.0376	97.09
770	13.9370	7550087	21.7532	8.0376	97.24
727	13.1587	8184574	23.5812	10.7168	97.25
723	13.0863	8165318	23.5257	10.7168	97.41

2.5 样品测定

分别取不同产地的西洋参样品(粉末均过三号

筛),按上述方法进行含量测定,结果见图 2 和表 4。

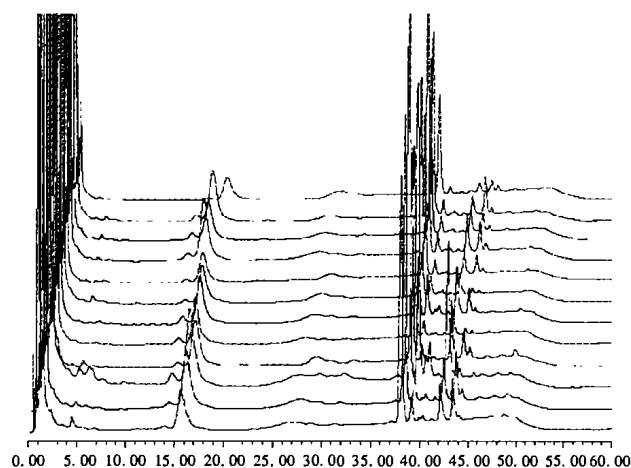


图 2 产地对西洋参药材皂甙成分组成的影响

(自上至下,分别为样品 1 到 12)

Fig. 2 The saponins of American Ginseng produced in different areas

表 4 西洋参样品含量测定结果

Table 4 The result of saponin contents

编号 No.	样品名称 Sample name	人参皂甙 Re 含量 (%) Re content	人参皂甙 Rb ₁ 含量 (%) Rb ₁ content
1	北京产主根	0.7357	1.6567
2	山东文登产主根	1.0560	1.6606
3	吉林靖宇产主根(短支)	0.8695	1.5227
4	吉林靖宇产主根(长支)	1.2467	2.6839
5	山东产主根	1.0370	2.0887
6	北京产主根	0.8461	1.9442
7	威斯康辛产主根	0.7647	1.6145
8	温哥华产主根	1.0489	1.9850
9	多伦多产主根	1.0812	1.9665
10	吉林靖宇产须根	1.5036	3.2489
11	吉林靖宇产主根(长支)	0.8536	1.8047
12	吉林靖宇产主根(短支)	0.6951	1.9247

2.6 主成分分析

采用 SPSS 软件对 12 批西洋参药材的人参皂甙 Rb₁、Re、Rc、Rd 及 Rg₂ 的相对峰面积进行主成分分析(PCA 分析),发现其聚类度与产地、规格密切相关,见图 3。

3 讨论

本文以西洋参的主要皂甙成分人参皂甙 Re 和 Rb₁ 为标准对照品,参考人参皂甙 Rc、Rd 及 Rg₂ 的相对含量,建立了西洋参药材及其加工产品质量控制的 HPLC 定量分析技术。该法分离度高,线性良好,重现性高,操作简便,适于西洋参生产过程中和产品的质量控制。

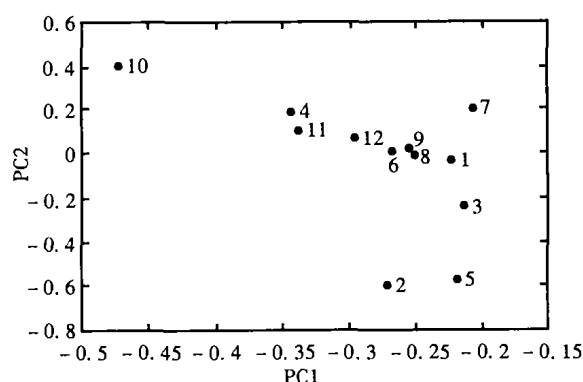


图3 主成分分析图

Fig.3 PCA

HPLC 分析结果表明,人参皂甙 Re 和 Rb₁ 在总皂甙中含量最高。二者的含量在不同产地的西洋参药材中有一定的差别,其余皂甙成分的组成也有差异(见图2)。

对不同产地的比较分析结果提示,美国威斯康辛产西洋参的人参皂甙 Re, Rb₁, Rc, Rd 及 Rg₂ 含量均较高,加拿大多伦多产西洋参的人参皂甙 Rc 含量偏低,温哥华产西洋参的人参皂甙 Rc, Rd 及 Rg₂ 含量偏低。主成分分析结果表明,就皂甙成分的组成与含量而言,在已分析的国产西洋参中,吉林省靖宇县产的西洋参与进口品最为接近,特别是人参皂甙 Rc 和 Rg₂ 含量明显高于其它产地。北京及山东

产西洋参的人参皂甙 Rc, Rd 及 Rg₂ 含量较进口品和靖宇产西洋参偏低。

因此,通过总皂甙指纹图谱的比较及 Re 和 Rb₁ 的含量测定可以很好的评价西洋参质量的优劣,可为西洋参的合理开发利用提供依据;也可为人参属植物的质量控制提供参考。

参考文献

- 1 阴健,郭力弓主编.中药现代研究与临床应用 I.北京:学苑出版社,1993.279
- 2 李仪侠,刘淑芬,潘苏萍,等.西洋参茎叶总皂甙的薄层层离—比色法测定.西北药学杂志,1990,5(1):23
- 3 汤毅,曹兆波,边立新,等.西洋参精口服液中人参皂甙的分析.中草药,1990,21(2):17
- 4 同志华,章观德.人参的分析 IV.人参皂甙的高效液相色谱测定.药学学报,1988,23(2):137
- 5 马鹏,张强,王秀兰.RP-HPLC 法测定西洋参浸膏的西洋参茶中人参皂甙 Rg₁ 与 Re 的含量.天然产物研究与开发,1999,12(1):54-57
- 6 王旭,周富荣.HPLC 法测定西洋参中人参皂甙 Rb₁ 的含量.中国中药杂志,1999,24(4):227-228
- 7 江英桥,王强.高效液相色谱蒸发光散射检测器分析西洋参中的人参皂甙.中国药科大学学报,2001,32(1):41-43
- 8 杨崇仁,姚荣成,阮德春,等.云南栽培西洋参皂苷德高压液相色谱定量分析.云南植物研究,1989,11(3):276-284

(上接第 568 页)

- 3 Apostolo NM, Brutti C, Ferrarotti SA, et al. Stimulation of root development with cyclodextrins on jojoba shoots *in vitro*. In *vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 2001, 37(3): 414-418
- 4 Agrawal V, Prakash S, Gupta SC. Effective Protocol for *in vitro* shoot production through nodal explants of *Simmondsia Chinensis*. *Biologia Plantarum*, 2002, 45(3): 449-453
- 5 Apostolo NM, Llorente BE. Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia Chinensis* (link) Schn. In *vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 2000, 36(4): 243-249
- 6 Mills D, Friedman R, Benzioni A. Response of Jojoba shoots to ventilation *in vitro*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 2001, 49(3): 197-202
- 7 Hu QH, Ye ZJ. Physiological effects of rare earth elements on plant. *Chin Plant Physiology Communication*, 1996, 32(4): 296-300(in chinese)
- 8 Jiang L, Wang ZR, Zhou X. Effect of La(NO₃)₃ on root growth and IAA content of Masson pine seedlings. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40(3): 251-255(in chinese)
- 9 Wang J, An ZM, Feng XZ. The effects of Lanthanum nitrate on potato plantlets *in vitro*. *Plant Physiology Communication*, 2003, 39(1): 25-26(in chinese)
- 10 Qian Y, Guang L, Ge WD, et al. Effect of Lanthanum nitrate on growth characteristic of *microcystis aeruginosa*. *China Environmental Science*, 2003, 23(1): 7-11(in chinese)
- 11 Diao JM. Promotive effect of La³⁺ on the rooting of mung bean hypocotyl cuttings. *Journal of Jia Ying University (natural sciences)*, 1998, 3: 74-77(in chinese)
- 12 Song SX, Deng ZF, WY, et al. The protective effect of Lanthanum Chloride on apoptosis during Cerebral Ischemia in Rats. *Acta Academiae Medicine JiangXi*, 2003, 43(6): 41-44(in chinese)
- 13 Guo FO, Wang YQ, Chen M. REE bound proteins in natural plant fern *Dicranopteris Dichitoma*. *J Radioanal Nucl Chem*, 1996, 209: 91-99
- 14 Leonard RT, Nagahashi G, Thomason WW. Effect of Lanthanum on ion absorption in corn roots. *Plant Physiol*, 1975, 55: 542-546
- 15 Yang YS, Liu DL, Bai J, et al. Effect of Lanthanide on wheat seedling growth and its protein and calmodulin levels. *Rare Earth*, 1997, 18(2): 61-63(in chinese)