

简便快捷测定人参中9种皂苷含量的方法

郝丽珊, 王莹, 范宏, 谭丽, 宋志峰*, 姜晓莉*

(吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘要:建立高效液相色谱法测定人参中9种人参皂苷的方法。以甲醇为提取剂超声提取, 采用 C_{18} 色谱柱, 0.01%磷酸水和乙腈为流动相梯度洗脱, 流速1.0 mL/min, 柱温50 °C, 进样量10 μ L, 检测波长203 nm, 液相色谱法同时测定人参中9种皂苷含量。结果表明, 9种人参皂苷在3.940~245.6 μ g/mL线性关系良好, 相关系数均在0.999以上; 检出限在0.40~2.35 μ g/g, 定量限1.33~7.75 μ g/g; 高、中、低3个加标水平的回收率在93.03%~109.30%, RSD在2.34%~7.47%, 均满足检测要求。该方法操作简捷, 节约成本, 可应用于人参的质量控制及检测分析。

关键词:超声提取; 高效液相; 人参皂苷; 简便快捷

中图分类号: 0657.7*2

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2024)06-0094-05

A Simple and Rapid Determination of 9 Kinds of Saponins in Ginseng

HAO Lishan, WANG Ying, FAN Hong, TAN Li, SONG Zhifeng*, JIANG Xiaoli*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: A simple and accurate HPLC method for determining the contents of 9 ginsenosides from *P. ginseng* was established. In the method, the ginsenosides were extracted ultrasonically by methanol, achieved on a C_{18} column using a mobile phase made up of acetonitrile and water+0.01% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength and column temperature were set as 203 nm and 50°C, respectively. Results shows that, the liner relationship of 9 kinds of ginsenosides were good in the concentration range of 3.940–245.6 μ g/mL, the correlation coefficient was above 0.999, the detection limit was 0.40–2.35 μ g/g, the quantitative limit was 1.33–7.75 μ g/g, the recovery rate was 93.03%–109.30%, the relative standard deviation was 2.34%–7.47%. The method is simple and cost saving, which could be applied to the quality control and detection analysis of *P. ginseng*.

Key words: Ultrasonic extraction; HPLC; Ginsenoside; Simple and quick

人参为五加科植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)的干燥根及根茎, 是我国传统中药材, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智之功效^[1]。现代药理研究表明, 人参皂苷具有多种药理活性^[2-6], 人参中皂苷含量是评价人参内在品质的重要指标。

在现行的皂苷测定标准中, 常用乙醚、石油醚等回流去杂质, 再加甲醇回流提取^[7-10], 受加热装置数量的影响, 无法一次性完成大批量样品的同时提取, 加之回流时间长、涉及管控药品, 导致提取环节成为皂苷测定速度的关键性步骤。

本研究以人参根茎为试验材料, 甲醇超声为提取方法, 对色谱条件进行优化, 测定结果与《NY/T1842-2010 人参皂苷的测定》的结果进行对比, 旨在提高人参皂苷检测的效率, 为人参皂苷的日常检测提供更方便、快捷的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

供试人参购自百草大药房, 于实验室粉碎, 过65目筛, 封装待测。

人参皂苷 Re 购自成都曼思特生物技术有限公司, 其余对照品均购自坛墨质检科技股份有限公司, 含量分别为 Re (99.3%)、R_{g1} (98.8%)、Rf (98.5%)、Rb₁ (99.5%)、R_{g2} (99.9%)、Rc (98.4%)、Rb₂ (99.8)、Rb₃ (99.1%)、Rd (99.1%)。

乙腈、甲醇: 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 乙醚: 天津天泰精细化学品有限公司; 乙醇、磷酸: 成

收稿日期: 2023-12-02

项目基金: 吉林省科技发展计划项目(20230505056ZP)

作者简介: 郝丽珊(1992-), 女, 研究实习生, 硕士, 主要从事农产品品质分析工作。

通信作者: 宋志峰, 男, 硕士, 研究员, E-mail: mhsr@sina.com

姜晓莉, 女, 硕士, 研究员, E-mail: jxl1990@sohu.com

都市科隆化学品有限公司;C₁₈固相萃取小柱:中检(沈阳)科技有限公司;水为试验用超纯水。

1.2 仪器与设备

1260 II 高效液相色谱仪:安捷伦科技有限公司;XSE105 电子分析天平:梅特勒-托利多集团;KQ-250DB 超声清洗器:昆山舒美。

1.3 方法

1.3.1 色谱分析条件

色谱柱:C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.01% 磷酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序见表1。流速为1.0 mL/min;检测波长203 nm;柱温50 °C;进样量10 μL。

1.3.2 对照品溶液的制备

分别称取人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 对照品 20.0 mg 和 Rf、Rg₂、Rb₃ 对照品 10.0 mg 于小烧杯中,加甲醇溶解定容至 5 mL,制得质量浓度

表1 液相梯度洗脱程序

时间/min	A. 0.01% 磷酸水/%	B. 乙腈/%
0.00	70	30
5.50	64	36
15.00	64	36
20.00	60	40
25.00	0	100
30.00	0	100
30.10	70	30
35.00	70	30

分别为 4.01、4.01、3.90、4.09、4.07、4.06 mg/mL 和 1.97、2.04、2.02 mg/mL 的对照品储备液。

分别精密吸取上述对照品储备液 0.01、0.05、0.10、0.20、0.30 mL 置于 5 mL 容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得对照品工作液,浓度见表2。

表2 对照品工作液浓度

名称	μg/mL				
	级别1	级别2	级别3	级别4	级别5
Re	8.023	40.12	80.23	160.5	240.7
Rg ₁	8.023	40.11	80.23	160.5	240.7
Rf	3.940	19.70	39.40	78.80	118.2
Rb ₁	7.801	39.00	78.01	156.0	234.0
Rg ₂	4.076	20.38	40.76	81.52	122.3
Rc	8.187	40.93	81.87	163.7	245.6
Rb ₂	8.144	40.72	81.44	162.9	244.3
Rb ₃	4.043	20.22	40.43	80.87	121.3
Rd	8.126	40.63	81.26	162.5	243.8

1.3.3 供试品溶液的制备

超声提取法:精密称取1 g(精确到0.000 1 g)人参粉末于50 mL具塞磨口三角瓶中,加入25 mL甲醇,摇匀,密塞,超声提取30 min,静置,取上清液过0.45 μm滤膜,待测。

《NY/T1842-2010 人参皂苷的测定》提取方法:精密称取1 g(精确到0.000 1 g)人参粉末用滤纸包好,置于索氏提取器内,加入适量乙醚加热回流1 h,弃去乙醚,待滤纸包挥干,再加入甲醇回流8 h,收集提取液于60 °C水浴蒸干,加4 mL水溶解,取2 mL过C₁₈固相萃取小柱,用70%乙醇溶液洗脱,收集洗脱液用甲醇定容至25 mL,过0.45 μm滤膜,上机^[7]。

1.3.4 统计分析

利用仪器自带的软件 Openlab CDS 2.x 查看色

谱图,采用SPSS 22软件进行数据统计分析。

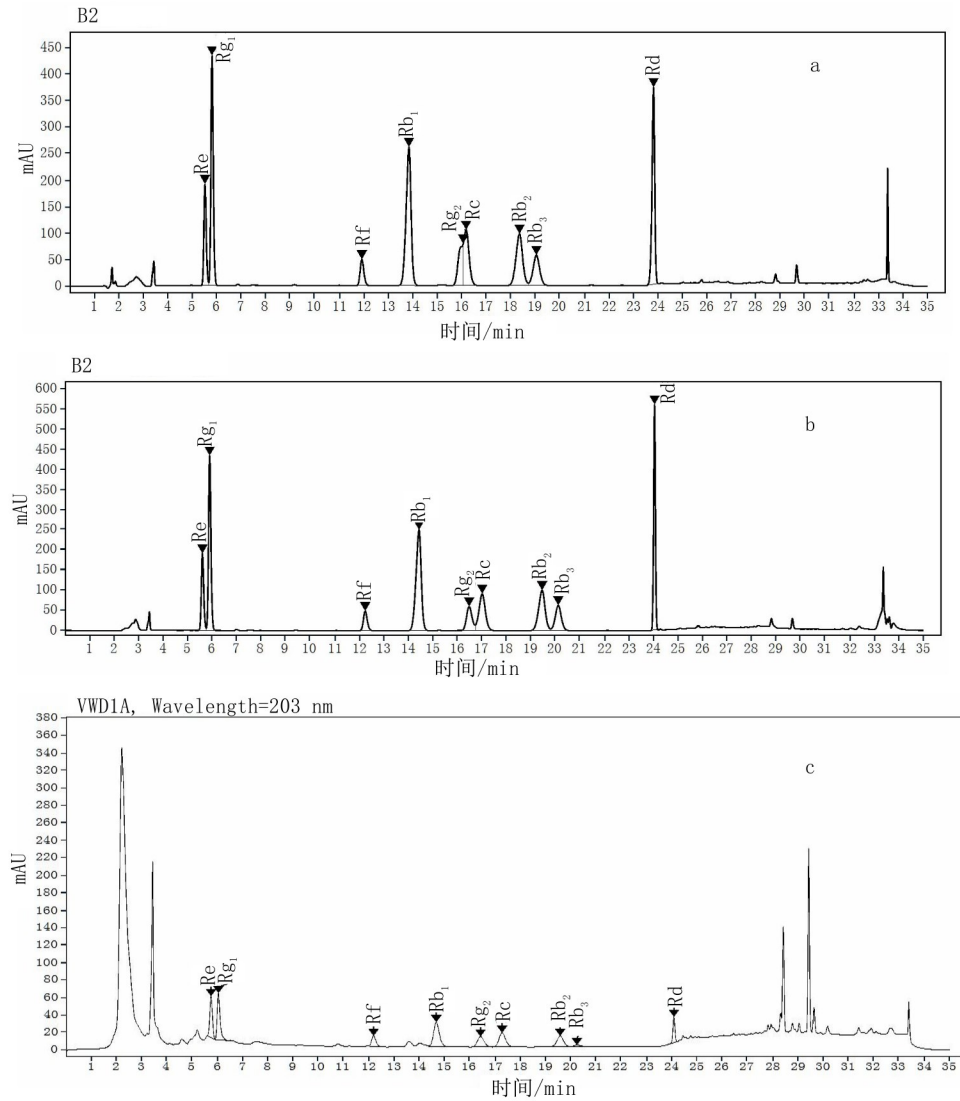
2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

考察了水-乙腈和磷酸水-乙腈溶液作为流动相,9种人参皂苷的分离效果。结果发现水-乙腈为流动相时,Rg₂和Rc色谱峰重叠(见图1a),不能满足试验的要求。研究表明,在流动相中加入磷酸有助于皂苷色谱峰分离^[11],本试验结果表明,0.01%磷酸水-乙腈为流动相时,经过优化梯度洗脱程序,9种人参皂苷均能达到基线分离,对照品和样品的色谱图见图1b和图1c。

2.2 前处理方法的优化

本研究选择甲醇作为提取剂,超声法提取人参中人参皂苷,并对料液比和超声时间进行了



注：目标化合物依次为 Re、Rg₁、Rf、Rb₁、Rg₂、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd，下同

图1 不同流动相对照品和样品色谱图

优化。

分别考察了料液比为 1:10、1:25、1:50 时，人参皂苷的提取效率。由图 2 可知，当人参称样量为 1 g，甲醇 25 mL 时，提取效果最佳；分别考察了超声时间为 10 min、20 min、30 min、40 min 时人参皂苷的提取效率。由图 3 可知，随着超声时间的

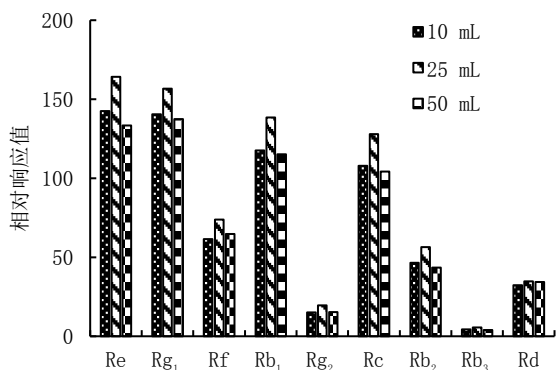


图2 不同料液比对9种人参皂苷提取效率的影响

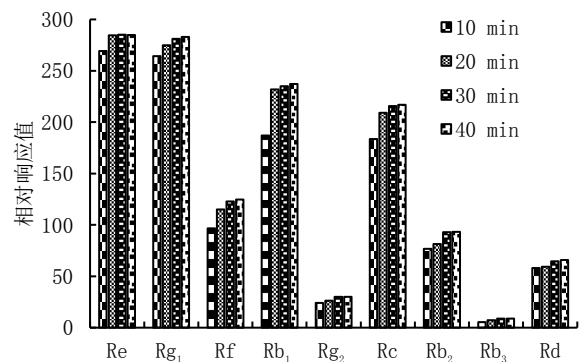


图3 不同超声时间对9种人参皂苷提取效率的影响

增加，人参皂苷提取效率逐渐增加，当超声时间达到 30 min 后，人参皂苷提取率不再增加，所以确定超声时间为 30 min。

2.3 方法检出限和定量限

将 9 种人参皂苷对照品溶液进行适当稀释，当信噪比等于 3 时对应的质量浓度作为检出限，

当信噪比等于10时对应的质量浓度作为定量限,测定人参皂苷 Re、Rg₁、Rf、Rb₁、Rg₂、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 的检出限分别为 1.18、0.53、2.20、1.35、1.73、1.75、2.35、2.13、0.40 μg/g;定量限分别为 4.00、1.73、7.25、4.50、5.75、5.75、7.75、7.00、1.33 μg/g。

2.4 线性关系考察

按“1.3.1”项下色谱条件,测定“1.3.2”中对照品工作液色谱峰面积,以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果表明,9种人参皂苷在相应的线性范围内线性关系良好,结果见表3。

表3 9种人参皂苷标准曲线线性回归方程、相关系数、线性范围

名称	线性回归方程	相关系数	线性范围/μg·mL ⁻¹
Re	$y=4.833 9x+3.958 9$	0.999 99	8.023~240.7
Rg ₁	$y=11.131 6x+19.431 9$	0.999 77	8.023~240.7
Rf	$y=4.041 2x+3.246 7$	0.999 79	3.940~118.2
Rb ₁	$y=9.380 5x+24.647 7$	0.999 77	7.801~234.0
Rg ₂	$y=7.343 4x+6.147 5$	0.999 80	4.076~122.3
Rc	$y=6.244 8x+10.273 8$	0.999 81	8.187~245.6
Rb ₂	$y=7.025 6x+10.592 1$	0.999 87	8.144~244.3
Rb ₃	$y=8.231 4x+5.843 5$	0.999 91	4.043~121.3
Rd	$y=10.807 8x+19.150 9$	0.999 78	8.126~243.8

2.5 方法正确度及精密度

使用标准添加样品验证方法的正确度及精密度。准确称取同一批次已经测定的人参样品,分别加入相当于样品含量0.5、1.0、1.5倍的对照品储备液,挥干后按超声提取法做7次平行,计算回收率和RSD,结果见表4。表4结果表明,3个不同浓度的添加水平下,9种人参皂苷的平均回收率在93.03%~109.30%,RSD在2.34%~7.47%,均满足相关标准要求^[12]。

2.6 方法比对

甲醇超声提取法的结果与《NY/T1842-2010 人参皂苷的测定》提取的结果进行比对,结果见表5。9种人参皂苷均无显著差异。由图4可知,甲醇超声提取的样品待测液杂峰稍多,过C₁₈固相萃取小柱效果不明显,仅对Re、Rg₁的色谱峰基线产生较小影响。

3 讨论

对比现有人参皂苷的测定方法,多为乙醚、甲烷回流脱脂,再用甲醇或正丁醇提取,耗时长,方法繁琐,且涉及管控试剂,对检测人员的健康和操作都是一种考验。超声法方便、快捷,常被用

表4 加标回收率及RSD

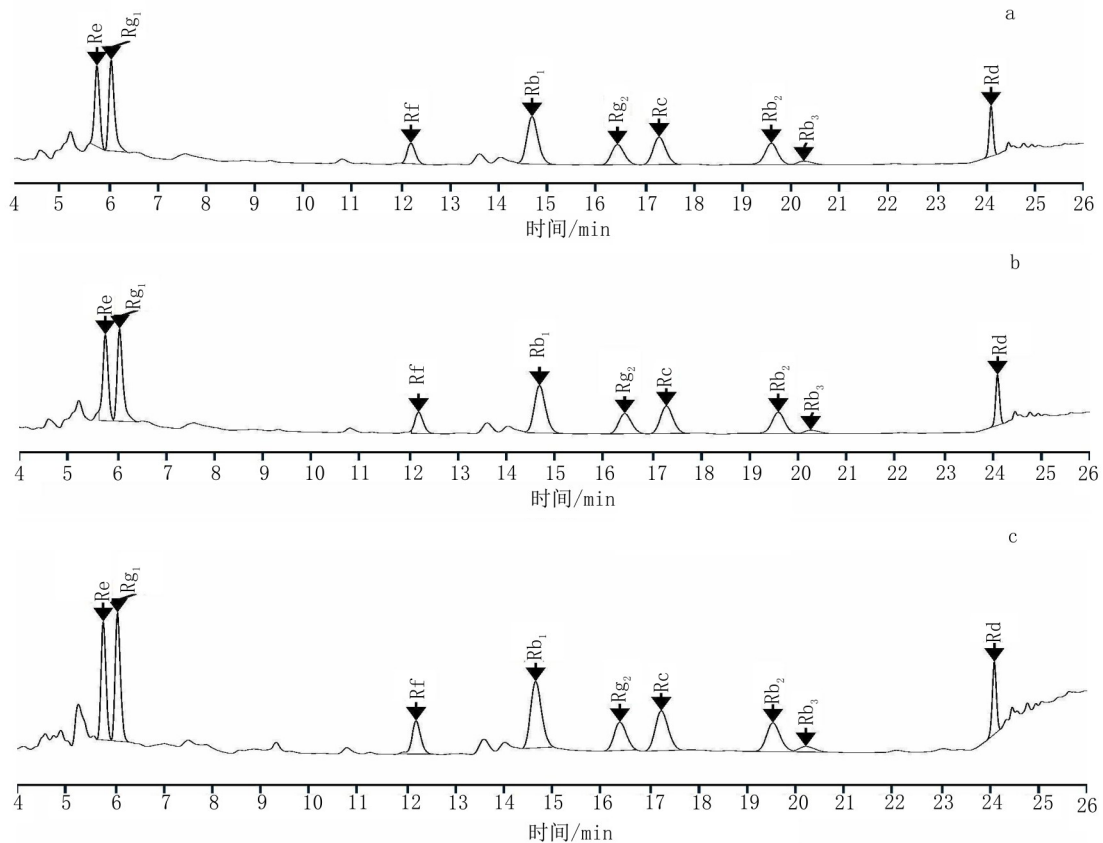
名称	样品含量/mg·g ⁻¹	添加量/mg	回收率/%	RSD/%
Re	1.664	0.802	96.28	6.24
		1.600	99.16	6.05
		2.410	100.00	7.34
Rg ₁	0.706	0.401	105.20	4.75
		0.802	103.70	5.03
		1.200	98.47	6.39
Rf	0.820	0.394	109.30	7.47
		0.788	98.85	6.59
		1.180	107.90	7.44
Rb ₁	1.074	0.507	93.70	4.24
		1.010	95.07	4.91
		1.520	100.70	6.04
Rg ₂	0.676	0.306	107.60	4.88
		0.611	99.34	5.59
		0.917	96.14	2.34
Rc	1.062	0.512	95.14	7.28
		1.020	93.03	6.81
		1.540	96.89	6.55
Rb ₂	0.700	0.407	100.00	6.28
		0.814	101.90	6.06
		1.220	96.54	5.31
Rb ₃	0.097	0.051	100.70	4.22
		0.101	97.77	4.47
		1.520	99.96	4.70
Rd	0.326	0.163	103.40	3.63
		0.325	98.21	7.00
		0.488	96.87	4.97

表5 不同提取方法测定的人参皂苷结果 mg/g

名称	超声提取	NY/T1842-2010
Re	1.664a±0.062 2	1.601a±0.015 2
Rg ₁	0.706a±0.006 7	0.711a±0.001 8
Rf	0.820a±0.082 6	0.800a±0.007 6
Rb ₁	1.074a±0.025 2	1.083a±0.056 3
Rg ₂	0.676a±0.017 8	0.659a±0.060 3
Rc	1.062a±0.008 4	1.059a±0.089 8
Rb ₂	0.700a±0.017 2	0.706a±0.059 8
Rb ₃	0.097a±0.002 3	0.094a±0.000 8
Rd	0.326a±0.009 2	0.306a±0.030 4

注:小写字母相同表示不同前处理对皂苷含量结果无显著影响($P<0.05$)

于目标化合物的提取^[13-17]。本研究以甲醇超声为提取方法,通过改善流动相的pH值使9种人参皂苷在35 min内得到较好的分离,缩短了检测时



注:a为NY/T1842-2010前处理色谱图;b为甲醇超声提取色谱图;c为甲醇超声提取 C_{18} 小柱净化色谱图

图4 不同前处理的样品色谱图

间^[18-19],经方法学验证均满足检测需求,对比《NY/T1842-2010 人参皂苷的测定》的测定结果,无显著差异。此方法操作简便,适合大批量操作,为人参皂苷批量检测提供依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 8-9.
- [2] 姜楠, 王铁成, 刘宏莹, 等. 人参皂苷 Rb_1 药理作用及其联合普用疫苗的应用[J]. 特种经济动植物, 2023, 26(3): 87-89.
- [3] 钟光成, 廖志涵, 陈依, 等. 人参皂苷 Rb_1 治疗非酒精性脂肪性肝病药理作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(4): 162-168.
- [4] 张晟郡, 张学武, 朴英实. 人参皂苷对癌前病变药理作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(11): 1283-1286.
- [5] 宋佳, 何俊桓, 王仙婷, 等. 人参皂苷神经药理作用研究进展[J]. 人参研究, 2021, 33(6): 52-56.
- [6] 吕丽娜, 姜丽红. 人参皂苷 Rg_1 对心血管系统的药理作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34(6): 83-86.
- [8] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 22996-2008 人参中多种人参皂苷含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [9] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 19506-2009 地理标志农产品 吉林长白山人参[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [10] 吉林省质量技术监督局. DB22/T 2478-2016 人参中人参皂苷的测定 重量法[S]. 长春: 吉林省农业委员会, 2016.
- [11] 曹欣欣, 孔凡丽, 杨粉团, 等. 不同氮素水平对西洋参皂苷积累的影响[J]. 东北农业科学, 2020, 45(6): 78-81, 99.
- [12] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. GB 5009.295-2023 食品安全国家标准 化学分析方法 验证通则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
- [13] 陈林, 郑红英, 郭建鹏. 基于响应面法的人参新炮制品“黑参”提取工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1607-1611.
- [14] 吴冬雪, 王秋颖, 王淑敏, 等. 人参皂苷的仿生提取研究[J]. 分析实验室, 2021, 40(2): 145-149.
- [15] 都昊贤, 王步江. 红参酒总皂苷的超声提取工艺研究[J]. 农产品加工, 2022(23): 35-38, 42.
- [16] 刘月含, 吕明俊, 姜晓坤. 超声辅助低共熔溶剂提取油橄榄果渣中羟基酪醇的工艺优化研究[J]. 东北农业科学, 2024, 49(2): 102-107.
- [17] 姜晓坤, 古慧莹, 魏伶俐, 等. 玉竹多糖的微波超声提取及其抗氧化研究[J]. 东北农业科学, 2020, 45(1): 87-93.
- [18] 陈驰, 关琴笑, 朱冬宁, 等. 一测多评法测定人参中9种人参皂苷的含量[J]. 中药材, 2017, 40(1): 122-126.
- [19] 郝玉钢, 郝建勋, 臧埔, 等. 高效液相色谱法测定农田人参中9种人参皂苷单体含量[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 189-193.

(责任编辑: 王 昱)