

HPLC同时测定人参药性菌质中8种皂苷含量

朱莹莹, 刘鑫, 贾艾玲, 王琳, 邱智东, 朱凯*
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] **目的:**建立一种可以同时测定人参药性菌质中8种人参皂苷(人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rf, 人参皂苷 Rh₁, 人参皂苷 Rb₁, 人参皂苷 Ro, 人参皂苷 Rb₂, 人参皂苷 Rd)含量的 HPLC 方法。**方法:**采用高效液相法, Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.4% 磷酸水梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 30 °C, 测定人参药性菌质 8 种皂苷的含量。**结果:**8 种单体皂苷在 100 min 内可良好分离, 线性关系良好(R² > 0.999 7), 平均加样回收率分别为 100.15%, 101.54%, 101.87%, 100.88%, 102.10%, 102.84%, 101.38%, 101.23%, RSD 分别为 1.6%, 2.3%, 1.9%, 2.1%, 1.5%, 0.8%, 2.7%, 1.6%。**结论:**该研究提供了一种能方便、简单、准确、重复性好的 HPLC 分析人参药性菌质中 8 种人参皂苷含量的方法, 可为人参药性菌质成分转化研究的质量标准制定提供科学依据。

[关键词] 人参药性菌质; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rf; 人参皂苷 Rh₁;

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0096-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070096

Simultaneous Determination of 8 Saponins in Ginseng Medicinal Fungal Substance by HPLC

ZHU Ying-ying, LIU Xin, JIA Ai-ling, WANG Lin, QIU Zhi-dong, ZHU Kai*
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rf, ginsenoside Rh₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Ro, ginsenoside Rb₂, and ginsenoside Rd in ginseng medicinal fungal substance. **Method:** High performance liquid chromatography was carried out on Inertsil ODS-SP chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.4% phosphate as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, and detection wavelength was 203 nm. The column temperature was at 30 °C. **Result:** Eight kinds of monomer saponins could be separated well in 100 min, with good linear relationship (R² > 0.999 7). The average recovery rate was 100.15% (RSD 1.6%), 101.54% (RSD 2.3%), 101.87% (RSD 1.9%), 100.88% (RSD 2.1%), 102.10% (RSD 1.5%), 102.84% (RSD 0.8%), 101.38% (RSD 2.7%), and 101.23% (RSD 1.6%). **Conclusion:** The HPLC method is accurate, reliable and reproducible to analyze 8 saponins in ginseng medicinal fungal substance, which can provide the scientific basis for formulating the quality standard of the research on composition transformation of the ginseng medicinal fungal substance.

[Key words] ginseng medicinal fungal substance; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rf; ginsenoside Rh₁

人参中化学成分复杂,具有广泛的药理作用和 强大的生物活性,其中人参皂苷类成分被认为是其

[收稿日期] 20150917(016)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI29B05);吉林省科技厅项目(20130206205YY)

[第一作者] 朱莹莹,在读硕士,从事中药药效物质基础研究, Tel:0431-86172786, E-mail:123.zhuyingying@163.com

[通讯作者] *朱凯,博士,副教授,从事中药药效物质基础研究, Tel:0431-86172786, E-mail:18686659711@163.com

活性成分的主要来源^[1]。近年来,药理学研究证明一些稀有人参皂苷的活性明显高于主要人参皂苷。为此科研工作者们采用各种不同的方法合成及制备稀有人参皂苷,如化学法、酶法、组织培养法、微生物发酵法等。人参药性菌质是以人参做为药性基质,以药用真菌做为菌株,通过双向固体发酵后所得产物。借助药用真菌的生物转化能力炮制人参药材,增加稀有皂苷含量,经发酵培养后获得新型药用材料。其中人参皂苷 Rg₁,人参皂苷 Re,人参皂苷 Rf,人参皂苷 Rh₁,人参皂苷 Rb₁,人参皂苷 Ro,人参皂苷 Rb₂,人参皂苷 Rd 是人参中具有代表性的主要皂苷成分及稀有皂苷成分,同时是进一步研究人参药性菌质内成分转化关系的主要成分。目前 HPLC 方法同时测定几种人参单体皂苷含量研究多有报道^[2-8],但未见能同时测定 8 种常见皂苷成分含量的报道。本文建立了一种新的 HPLC 方法同时测定 8 种皂苷进行含量,以全面控制人参药性菌质质量,为人参药性菌质成分转化研究的质量标准制定提供科学依据。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),AL204 型 1/1 万电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),MS205DU 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司),H. H-4 型数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司),KQ3200E 型超声波清洗机(天鹏电子新技术有限公司),高效液相色谱仪滤膜(0.45 μm)和针式滤头(0.22 μm)。对照品人参皂苷 Rg₁,人参皂苷 Re,人参皂苷 Rf,人参皂苷 Rh₁,人参皂苷 Rb₁,人参皂苷 Ro,人参皂苷 Rb₂,人参皂苷 Rd(购自成都曼斯特,批号分别为 MUST-13110602, MUST-13041211, MUST-13041301, MUST-13101010, MUST-13041212, MUST-13041201, MUST-13052205, MUST-13051501);乙腈分析纯,娃哈哈纯净水。人参药性菌质由长春中医药大学自制。

2 方法与结果

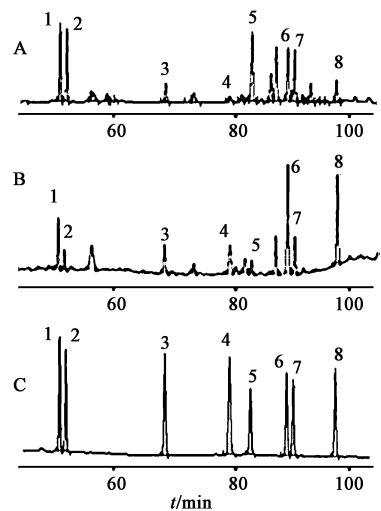
2.1 样品的制备

2.1.1 对照品溶液 分别取人参皂苷 Rg₁,人参皂苷 Re,人参皂苷 Rf,人参皂苷 Rh₁,人参皂苷 Rb₁,人参皂苷 Ro,人参皂苷 Rb₂,人参皂苷 Rd 对照品各约 5 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得。

2.1.2 供试品溶液 取人参药材粉末及人参药性菌质粉末(过四号筛)约 1 g,精密称定,置索氏提取器中,加三氯甲烷加热回流 3 h,弃去三氯甲烷,药渣

挥干溶剂,连同滤纸移入 100 mL 锥形瓶中,精密加入水饱和正丁醇 50 mL,密塞放置过夜,超声处理(功率 2 500 W,频率 50 kHz)30 min,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 25 mL,置蒸发皿蒸干,残渣加入甲醇溶解,并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 色谱条件 Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸水(B)溶液洗脱梯度(0 ~ 35 min,19% A;35 ~ 55 min,19% ~ 29% A;55 ~ 70 min,29% A;70 ~ 100 min,29% ~ 40% A),检测波长 203 nm,流速 1 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL,按上述条件进行测定,结果样品溶液在与对照品相同的保留时间位置上有色谱峰,其保留时间分别为 48.3,49.6,67.6,79.5,83.5,89.9,91.1,98.8 min,见图 1。



A. 人参药材;B. 供试品;C. 对照品;1. 人参皂苷 Rg₁;2. 人参皂苷 Re;3. 人参皂苷 Rf;4. 人参皂苷 Rh₁;5. 人参皂苷 Rb₁;6. 人参皂苷 Ro;7. 人参皂苷 Rb₂;8. 人参皂苷 Rd

图 1 人参药性菌质 8 种单体皂苷 HPLC

Fig. 1 HPLC of 8 components in ginseng medicinal fungal substance

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 精密吸取人参皂苷 Rg₁,人参皂苷 Re,人参皂苷 Rf,人参皂苷 Rh₁,人参皂苷 Rb₁,人参皂苷 Ro,人参皂苷 Rb₂,人参皂苷 Rd 对照品溶液 2,4,8,10,12,15 μL,注入高效液相色谱仪测定。以进样量为横坐标,峰面积的积分值为纵坐标,分别进行线性回归。结果 8 种皂苷的回归方程分别为 $Y = 140.59X + 8.7012 (R^2 = 0.9998)$, $Y = 99.949X + 3.7734 (R^2 = 0.9997)$, $Y = 67.010X + 1.3953 (R^2 = 0.9998)$, $Y = 843.02X - 6.1810 (R^2 = 0.9999)$,

$Y = 785.10X - 5.5909 (R^2 = 0.9999)$, $Y = 331.21X - 2.7922 (R^2 = 0.9999)$, $Y = 298.71X + 4.9005 (R^2 = 0.9999)$, $Y = 230.29X + 4.3370 (R^2 = 0.9998)$ 。线性范围均在 $0.4 \sim 3.0 \mu\text{g}$, 表明 8 种单体人参皂苷在一定范围内线性良好。

2.3.2 精密度的考察 精密吸取对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 注入高相相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 8 种人参皂苷峰面积的 RSD 分别为 2.1%, 1.0%, 0.6%, 1.0%, 1.1%, 1.1%, 0.2%, 0.1%, 结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性的考察 将对照品溶液和供试品溶液分别在制备后 0, 4, 8, 12, 24, 36 h, 精密吸取 $10 \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪测定。结果 8 种人参皂苷对照品峰面积的 RSD 分别为 2.1%, 1.9%, 2.6%, 2.8%, 2.4%, 1.9%, 2.8%, 1.9%, 供试品峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 1.8%, 0.8%, 0.9%, 0.2%, 0.6%, 2.5%。表明对照品与供试品在 36 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性的考察 按照 2.1.2 项下方法制备 6 个供试品溶液, 分别进样 $10 \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积。结果 8 种人参皂苷峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.4%, 0.5%, 0.8%, 0.6%, 0.7%, 0.7%, 1.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率的考察 精密称取人参药性菌质样品 6 份, 每份约 0.5 g, 添加相应浓度的 8 种人参皂苷对照品适量, 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, 计算回收率, 结果表明 8 种人参皂苷的回收率均在 95.0% ~ 105.0%, RSD 亦符合相关规定。结果见表 1。

2.3.6 样品含量测定 按 2.1.2 项下方法制备人参药材供试品 1 份、取不同批次人参药性菌质供试品 2 份, 按 2.2 项下色谱条件测定。结果见表 2。

3 讨论

人参药性菌质组分复杂, 只对其中的一种或几种活性成分进行检测并不能完全反应其内部质量。本方法建立了简单的处理方法与梯度洗脱条件, 能同时测得 8 种人参皂苷含量。比较发酵前后成分变化, 发现人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 等常规人参皂苷成分的含量均有不同程度的减少, 而具有抗肿瘤作用的稀有皂苷人参 Rh_1 , Rd 含量则有所增加, 这可能是由于经过人参与药用真菌通过双向固体发酵后二醇组类人参皂苷成分主要转化成为了人参皂苷 Rd , 三醇组类皂苷主要转化成为了人参皂苷 Rh_1 。本试验检测方法基线相对平稳, 色谱峰峰形较好, 方

表 1 人参药性菌质 8 种单体皂苷的加样回收率

Table 1 Recoveries of 8 components in Ginseng medicinal fungal substance

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值
						(RSD) /%
人参皂苷 Rg_1	0.500 2	0.493	0.424	0.925	102.0	100.0
	0.500 1	0.498	0.459	0.946	97.6	(1.9)
	0.499 8	0.505	0.672	1.175	99.7	
	0.500 2	0.507	0.332	0.835	98.8	
	0.499 9	0.495	0.389	0.894	102.5	
人参皂苷 Re	0.500 1	0.508	0.429	0.935	99.5	
	0.500 2	0.170	0.172	0.347	102.9	100.7
	0.500 1	0.175	0.174	0.352	102.0	(1.6)
	0.499 8	0.185	0.162	0.346	99.4	
	0.500 2	0.189	0.186	0.374	99.3	
人参皂苷 Rf	0.499 9	0.185	0.227	0.416	101.5	
	0.500 1	0.172	0.163	0.333	99.0	
	0.500 2	0.272	0.283	0.563	102.7	102.4
	0.500 1	0.274	0.253	0.538	104.2	(1.8)
	0.499 8	0.269	0.264	0.542	103.4	
人参皂苷 Rh_1	0.500 2	0.272	0.259	0.534	101.3	
	0.499 9	0.281	0.264	0.543	99.2	
	0.500 1	0.277	0.267	0.554	103.8	
	0.500 2	0.362	0.376	0.734	98.8	99.9
	0.500 1	0.354	0.354	0.714	101.7	(2.1)
人参皂苷 Rb_1	0.499 8	0.391	0.384	0.764	97.1	
	0.500 2	0.382	0.292	0.675	100.5	
	0.499 9	0.391	0.402	0.804	102.7	
	0.500 1	0.384	0.385	0.764	98.6	
	0.500 2	0.217	0.193	0.415	102.5	101.2
人参皂苷 Rb_2	0.500 1	0.234	0.183	0.423	103.3	(2.0)
	0.499 8	0.221	0.230	0.456	102.2	
	0.500 2	0.217	0.186	0.399	98.4	
	0.499 9	0.228	0.249	0.474	98.8	
	0.500 1	0.218	0.269	0.493	102.1	
人参皂苷 Rd	0.500 2	1.274	1.145	2.398	98.2	100.7
	0.500 1	1.266	1.372	2.634	99.7	(2.0)
	0.499 8	1.253	1.351	2.623	101.4	
	0.500 2	1.223	1.285	2.524	101.3	
	0.499 9	1.242	1.382	2.680	104.1	
人参皂苷 Rb_2	0.500 1	1.218	1.418	2.628	99.4	
	0.500 2	0.492	0.437	0.924	98.7	101.3
	0.500 1	0.503	0.482	0.994	101.7	(1.9)
	0.499 8	0.489	0.492	1.001	103.9	
	0.500 2	0.495	0.528	1.036	102.5	
人参皂苷 Rd	0.499 9	0.483	0.536	1.026	101.3	
	0.500 1	0.505	0.422	0.925	99.5	
	0.500 2	1.165	1.036	2.185	98.4	99.6
	0.500 1	1.158	0.986	2.116	97.2	(1.7)
	0.499 8	1.159	1.326	2.484	99.9	
人参皂苷 Rd	0.500 2	1.158	0.936	2.092	99.7	
	0.499 9	1.164	1.138	2.304	100.2	
	0.500 1	1.165	1.065	2.254	102.3	

法简单、稳定、重复性好。可为人参药性菌质成分转化研究的质量标准制定提供科学依据。

表 2 人参药性菌质 8 种单体皂苷的含量测定 (n=2)

样品	人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rf	人参皂苷 Rh ₁	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Ro	人参皂苷 Rb ₂	人参皂苷 Rd
人参药材	3.090 7	3.257 2	0.878 0	0.286 3	4.824 9	3.207 2	3.729 9	1.142 4
人参药性菌质 1	0.908 8	0.382 1	0.592 0	0.697 1	0.414 6	2.661 3	0.965 7	2.076 3
人参药性菌质 2	0.927 8	0.394 3	0.570 6	0.661 3	0.446 6	2.592 6	0.978 6	2.090 6

[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,2010.

[2] 张泰,袁萍,茅仁刚,等. RP-HPLC 同时测定西洋参总皂苷转化产物中人参皂苷 Rh₁、Rg₃ 和 Rh₂ 的含量[J]. 中成药,2010,32(6):1059-1061.

[3] 许勇,诸艳蓉,王柯,等. HPLC 测定复方丹参胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(6):148-151.

[4] 李波,任焯,杨正明,等. 加拿大产西洋参茎中 9 种人参皂苷和 2 种拟人参皂苷的含量变化研究[J]. 华西

药学杂志,2015,30(1):74-78.

[5] 徐敬朴,孙从新,庄桂霞,等. RP-HPLC 法同时测定人参提取物转化产物中 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rg₂ 和 20(S)、20(R)-人参皂苷 Rh₁ 的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(9):712-715.

[6] 赫玉芳,赵昱玮,司学玲,等. HPLC 法同时测定三七花盘中人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rb₃ 的含量[J]. 中国医药科学,2015,6(5):42-44.

[7] 陆娟,李绪文,魏巍,等. RP-HPLC 测定生脉注射液中 7 个人参皂苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(12):2302-2304.

[8] 乔雪,李月茹. 黑参中 7 种人参皂苷含量测定[J]. 人参研究,2012,24(1):10-12.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》入选“2015—2016 RCCSE 中国核心学术期刊”

由武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)、武汉大学图书馆、中国科教评价网(www.nseac.com)共同研制的第 4 版《RCCSE 中国学术期刊评价研究报告——权威、核心学术期刊排行榜(2015—2016)》已于 2015 年 1 月 13 日公布,《中国实验方剂学杂志》被评定为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”,在参评的 112 本中医学与中药学类期刊中综合排名第 15 名。

本次学术期刊评价在重点突出期刊学术影响力的同时,也注重了对期刊网络传播效率和期刊即时反应速率的考察,主要评价指标有:总被引频次、2 年影响因子、即年指标、基金论文比、Web 即年下载率、二次文献转载量(或国外重要数据库收录情况)和专家定性评价。参评期刊共 6201 种,排名前 5% 的“RCCSE 中国权威学术期刊”(A⁺)316 种,排名前 5% ~ 20% 的“RCCSE 中国核心学术期刊”(A)和排名前 20% ~ 30% 的“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)”(A⁻)共 1572 种,准核心的学术期刊 1848 种(B⁺),一般期刊 1828(B)种,较差期刊 637 种(C)。

“RCCSE 中国核心学术期刊”是继“中文核心期刊(北大)”和“中国科技核心期刊”之后国内推出的又一核心期刊评价体系。