

HPLC 测定农田土、腐殖土西洋参皂苷含量及对比与分析

刘哲^{1*}, 武晓林², 张连学³

(1. 吉林医药学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101;
3. 吉林农业大学, 长春 130118)

[摘要] 目的: 以西洋参皂苷为指标, 比较 2 种土壤环境种植西洋参皂苷的含量。方法: 采用药典方法提取西洋参皂苷, 用紫外分光光度计测定总皂苷含量, HPLC 测定 8 种单体皂苷的含量。结果: 2 种土壤环境种植西洋参的总皂苷含量均 >6%, 腐殖土西洋参单体皂苷含量高于农田土西洋参单体皂苷含量。结论: 2 种土壤西洋参总皂苷含量无明显差异; 各单体皂苷中腐殖土西洋参 Rc, Re 含量略高于农田土西洋参。

[关键词] 不同土壤环境; 西洋参; 总皂苷; 单体皂苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)19-0079-03

[doi] 10.11653/syjf2013190079

Determination and Contrast Analysis on Ginsenosides Contents of *Panax quinquefolium* Cultivated in Farmland or Humus Soils

LIU Zhe^{1*}, WU Xiao-lin², ZHANG Lian-xue³

(1. Jilin Medical College, Jilin 132013, China;
2. Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China;
3. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

[Abstract] **Objective:** To determine and analyze the ginsenosides contents of *Panax quinquefolium* which cultivated in farmland or humus soils. **Method:** Ginsenoside was extracted to determine the total content of ginsenosides with the ultraviolet spectrophotometry, and 8 kinds of monoginsenosides were measured with HPLC. **Result:** The content of total ginsenosides from two kinds of soils, were more than 6% and the content of monoginsenosides in humus soil was more than that in farmland soil. **Conclusion:** The total ginsenosides content is not different obviously; but the monoginsenoside Rc and Re in humus soil is higher.

[Key words] different soil; *Panax quinquefolium*; total ginsenosides; monoginsenosides

西洋参为五加科植物西洋参的干燥根原产北美, 我国北京、吉林、辽宁等地也有栽培^[1], 西洋参, 味甘、微苦, 性凉, 归心、肺、肾经, 能补气养阴, 清热生津^[2], 主要用于气热烦倦、咳嗽痰血、内热消渴、口燥咽干^[3]等。自 1975 年以来, 我国在华东、华北等地对西洋参进行了大面积的引种栽培, 并取得了成功^[4]。但伐林栽参极大的破坏了森林资源, 而利用农田栽种西洋参则从根本上解决了参、林争地矛盾。有报道称农田栽参与林区腐殖土栽参相比存在

产量低、病害重、品质降低等问题^[5-6]。但有关农田土种植西洋参质量评价的研究一直以来却鲜有报道。因此, 本文选取同年生 2 种土壤种植的西洋参, 以总皂苷及 8 种单体皂苷含量为指标作对比分析, 对农田土环境生长西洋参的质量作出评价。

1 材料

DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备有限公司), UV-754 型紫外分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司), TG628A 型分析电子天平(日本岛津公司), 6 孔恒温水浴锅(常州奥华仪器有限公司), TP 型电子天平(余姚汇铭称量校验设备有限公司), LC-2010AHT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。美国 Fiser 色谱甲醇, 美国 Fiser 色谱乙腈, 其他试剂均为国内分析纯。

[收稿日期] 20120806(004)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2007BA138B01)

[通讯作者] * 刘哲, 助教, 从事生药学及新药研发研究, Tel: 0432-64560319, E-mail: oscarlzh@163.com

本实验用西洋参样品采自吉林省抚松县。采样方式采取五点采样法,在同一地域内分别采集四年生,腐殖土和农田土种植的西洋参各 1 kg(同一地域各点样品作为 1 份样本进行测定),经吉林林农业大学张连学教授鉴定为 *Panax quinquefolium* L. 正品。样品洗净后 40 ℃ 烘干备用。

2 方法

2.1 人参皂苷的提取 对西洋参样品进行烘干至恒质量,样品折干率在 41.89% ~ 43.90%,粉碎,过 40 目筛,干燥保存备用。

分别称取西洋参样品粉末 3 份,每份 50 g,10 倍量水浸泡过夜,放入超声波中提取,设定提取时间为 30 min、功率 100 Hz、温度 30 ℃,溶剂量分别为 10,8,6 倍,提取次数 3 次,抽滤,合并滤液,用水饱和正丁醇萃取 3 次,合并有机层,蒸干回收得总皂苷^[7-9]。

2.2 标准曲线的制作 精密称定人参皂苷对照品 3 mg,用甲醇定容至 10 mL 量瓶中摇匀备用,分别取上述溶液 0.0(空白对照管),0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL 于 6 只 10 mL 刻度试管内,分别加甲醇 0.5,0.4,0.3,0.2,0.1,0 mL 混匀,在冰水浴中加入 8% 香草醛乙醇液 0.5 mL,77% 的硫酸 5 mL 摇匀,于 60 ℃ 水浴中加热 10 min,立即置于冰水浴中冷却 15 min,以第 1 只试管(空白对照管)溶液为空白对照,在 544 nm 处测定其余 5 只试管的吸光度(A),以人参皂苷浓度为横坐标,A 为纵坐标,得标准曲线。

2.3 样品总皂苷量的测定

2.3.1 样品液的测定 精密称取待测样品各 30 mg,分别用甲醇定容到 100 mL 量瓶中,分别精密量取 0.3 mL 于 10 mL 刻度试管中,加 0.2 mL 甲醇,另取 1 支 10 mL 刻度试管,加入 0.5 mL 甲醇(空白对照管),在冰水浴中向 2 只试管中同时加入 8% 香草醛乙醇液 0.5 mL,77% 的硫酸 5 mL 摇匀,60 ℃ 水浴中加热 10 min,冰水浴中冷却 15 min,在 544 nm 处测定 A,将所得 A 带入标准曲线计算含量。

2.3.2 稳定性试验 精密称取 1 份腐殖土西洋参皂苷样品 30 mg,甲醇定容于 100 mL 量瓶中,分别取 6 支 10 mL 刻度试管,精密加入 0.3 mL 样品溶液,再加 0.2 mL 甲醇,于室温下放置 0,2,4,6,16,24 h 待测。按照不同时间,分别在冰水浴中向试管中同时加入 8% 香草醛乙醇液 0.5 mL,77% 的硫酸 5 mL 摇匀,60 ℃ 水浴中加热 10 min,冰水浴中冷却 15 min 后,在 544 nm 处测定 A。

2.3.3 重复性试验 分别精密称取 5 份农田土西洋参皂苷样品 30 mg,甲醇定容于 100 mL 量瓶中,

按样品液测定方法逐一测定。

2.3.4 加样回收试验 取 3 份已知含量农田土西洋参样品皂苷溶液,分别精密量取 0.3 mL 于 10 mL 刻度试管中,加 0.2 mL 甲醇,加入 1 mg 总皂苷对照品充分振荡摇匀后,另取 1 支 10 mL 刻度试管,加入 0.5 mL 甲醇(空白对照管),在冰水浴中各试管中同时加入 8% 香草醛乙醇液 0.5 mL,77% 的硫酸 5 mL 摇匀,60 ℃ 水浴中加热 10 min,冰水浴中冷却 15 min,在 544 nm 处测定 A,测定含量。

2.4 HPLC 测定提取物中各单体皂苷的含量

2.4.1 色谱条件 Nucleosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm),柱温 40 ℃,检测波长 203 nm,流速 1.5 mL·min⁻¹,流动相乙腈-水梯度洗脱,(A-乙腈,B-水),梯度洗脱 0 ~ 42.1 min:82% ~ 71% B;42.1 ~ 59 min:71% ~ 65% B;59 ~ 66 min:65% ~ 0% B;66 ~ 70 min:0% ~ 82% B),分析时间 80 min,流速 1.5 mL·min⁻¹,进样量 20 μL^[10]。

2.4.2 标准曲线的制作及样品溶液的制备 分别精密称取人参皂苷对照品-Re,-Rf,-Rg₂,-Rb₁,-Rb₂,-Rb₃,-Rc,-Rd 各 5 mg,用色谱甲醇溶解,定容于 5 mL 量瓶中,摇匀作为母液备用。分别称取母液 12,14,16,18,20 μL,均用甲醇定容至 1 mL,摇匀,得到系列浓度的对照品混合溶液。分别取上述样品溶液 0.5 mL,用 0.45 μm 滤膜滤过备用。分别进样 3 针,每次 20 μL,记录色谱图,以对照品的浓度(g·L⁻¹)为横坐标(X),对照品的峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归计算。

2.4.3 样品溶液的制备及各单体皂苷含量测定 分别精密称取各皂苷样品 30 mg,甲醇定容于 100 mL 量瓶中,分别取样品液 1 mL 过 0.45 μm 滤膜,即得样品液。在标准曲线同一液相条件下,分别进样 3 针,每次 20 μL,记录色谱图,将峰面积值代入相应的回归方程中,计算含量。

3 结果与讨论

3.1 线性关系考察 根据标准曲线测定结果,得到回归方程 $Y = 30.19X + 4.20 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0.9997$) 人参总皂苷含量在 0.005 ~ 0.025 g·L⁻¹ 与其 A 呈良好线形关系,测得数值准确可靠。

3.2 样品总皂苷含量测定 结果表明 4 年生腐殖土和农田土西洋参总皂苷含量分别为 6.23%,6.19%,通过 SPSS 统计软件对表 1 结果进行分析,2 种土壤种植西洋参的总皂苷含量差异不显著。

3.3 稳定性试验、重复性试验 腐殖土西洋参样品溶液,分别在 0,2,4,6,16,24 h 测定 A(分别编号为

1~6), RSD 2.64%,符合 2010 年版《中国药典》规定,表明稳定性良好。

3.4 重复性试验 分别对 4 年生农田土西洋参皂苷样品溶液逐一测定,RSD 0.91%,表明实验的重复性良好。

3.5 加样回收率实验测定结果 平均加样回收率为 99.60% 在 95%~105%,RSD 为 0.19%,符合 2010 年版《中国药典》规定。

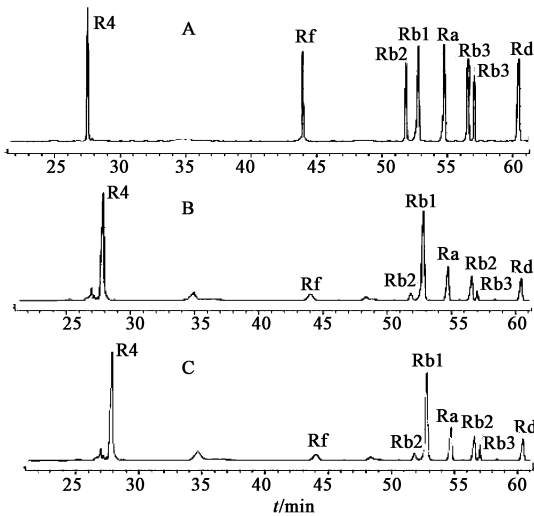
3.6 各单体皂苷的含量测定

3.6.1 各单体标准曲线制作 根据 2.4.2 得到各单体标准曲线。见表 1。

表 1 单体皂苷标准曲线

单体皂苷	标准曲线	r
Ginsenoside-Rb ₁	$Y = 5.07 \times 10^6 X - 240.09$	0.999 6
Ginsenoside-Rb ₂	$Y = 5.40 \times 10^6 X - 2 054.20$	0.999 5
Ginsenoside-Rb ₃	$Y = 5.11 \times 10^6 X + 10 948.54$	0.999 5
Ginsenoside-Rc	$Y = 5.50 \times 10^6 X - 12 580.55$	0.999 8
Ginsenoside-Rd	$Y = 6.34 \times 10^6 X + 12 836.77$	0.999 0
Ginsenoside-Re	$Y = 1.41 \times 10^7 X + 28 144.75$	0.999 2
Ginsenoside-Rf	$Y = 6.52 \times 10^6 X + 1 735.33$	0.999 3
Ginsenoside-Rg ₂	$Y = 7.80 \times 10^6 X + 1 237.69$	0.999 8

3.6.2 各单体皂苷含量 在 2.4.1 色谱条件下测定各单体皂苷含量,记录色谱图,结果见图 1,将峰面积值代入相应的回归方程中,计算含量,结果见表 2。



A. 对照品;B. 农田土;C. 腐殖土

图 1 不同土质西洋参单体皂苷 HPLC

表 2 不同土质四年生西洋参总皂苷中

各单体皂苷含量的比较($\bar{x} \pm s, n = 5$) %

皂苷种类	农田土	腐殖土
ginsenoside-Rb ₁	0.169 ± 0.001	1.74 ± 0.015
ginsenoside-Rb ₂	0.092 ± 0.001	0.102 ± 0.009
ginsenoside-Rb ₃	0.015 ± 0.005	0.017 ± 0.005
ginsenoside-Rc	0.110 ± 0.006 ¹⁾	0.126 ± 0.002
ginsenoside-Rd	0.117 ± 0.001	0.123 ± 0.002
ginsenoside-Rf	0.012 ± 0.003	0.015 ± 0.011
ginsenoside-Re	0.542 ± 0.003 ¹⁾	0.596 ± 0.010
ginsenoside-Rg ₂	0.015 ± 0.005	0.017 ± 0.006

注:与同年生腐殖土西洋参相比¹⁾ P < 0.05。

从表 2 中可以看出,农田土与腐殖土种植的西洋参 8 种单体皂苷均有测出;通过 SPSS 分析统计软件,农田土西洋参中单体皂苷含量与其同年生腐殖土西洋参比较,Rb₁,Rb₂,Rb₃,Rd,Rf,Rg₂ 的含量无显著性差异,Rc,Re 的含量差别显著(P < 0.05)。

4 结论

本文对农田土和腐殖土种植的四年生西洋参皂苷总量及单体含量进行了比较分析。结果显示四年生腐殖土和农田土西洋参总皂苷含量分别为 6.23%,6.19%,两种土壤种植西洋参的总皂苷含量差异不显著;测定的 8 种单体皂苷中,除 Rc,Re 含量差别显著外,其他无明显差别。

有实验证明,我国传统西洋参林地栽培土壤(集安,抚松等地)的土壤有机质通常为 3.65%~4.20%,高于我国大面积农田栽培西洋参土壤有机质含量的 0.80%~2.00%^[11]。以皂苷含量为指标来看,腐殖土种植的西洋参高于农田土种植的西洋参,这可能与土壤的微生物环境、有机质含量的高低以及 pH、水分、光照等因素的影响有关,还有待于进一步的研究证明。

[参考文献]

[1] 许冬瑾,黄云,刘再强,等.西洋参切制工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):36.
 [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:化工出版社,2005.
 [3] 刘玉梅,张军,匙峰,等.参元片的提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):18.
 [4] 王丽君,李平亚,赵春芳,等.西洋参果化学成分的研究[J].中草药,2000,31(10):723.
 [5] 于得荣.农田栽参技术研究报告.全国人参科技资料汇编编审委员会.全国人参科技资料汇编(栽培分册)[M].北京:国家医药管理局,1987:428.
 [6] 金永善,许永华,庞立杰,等.农田种植绿色人参技术研究[J].人参研究,2006,18(3):10.
 [7] 蔡雄,刘中秋,王培训,等.大孔吸附树脂富集纯化人参总皂苷工艺[J].中成药,2001,23(9):631.
 [8] 张崇禧.不同方法提取人参总皂苷工艺的优化研究[J].人参研究,2003,4(4):5.
 [9] 张春红,张崇禧,郑友兰,等.浸渍法提取人参皂苷最佳工艺的研究[J].吉林农业大学学报,2001,25(1):73.
 [10] 张春红.人参皂苷常规水提取法和新提取方法的比较研究[J].中药材,2006,29(10):1040.
 [11] 赵杨景.药用植物营养与施肥技术[M].北京:中国农业出版社,2001:152.

[责任编辑 邹晓翠]