

## HPLC 法同时测定林下参、鲜人参、生晒参和红参中 14 种人参皂苷

刘 志<sup>1,2,3</sup>, 阮长春<sup>1,3</sup>, 刘天志<sup>4</sup>, 王立娟<sup>4</sup>, 郑毅男<sup>4</sup>, 孙光芝<sup>1\*</sup>

1. 吉林农业大学农业现代化综合技术研究所, 吉林 长春 130118
2. 吉林农业大学食用菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118
3. 吉林农业大学天敌昆虫应用技术工程研究中心, 吉林 长春 130118
4. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

**摘要:** 目的 建立同时测定林下参、鲜人参、生晒参和红参中 14 种中性和酸性皂苷量的方法。方法 采用反相高效液相色谱法, 以 COSMOSIL 5 C<sub>18</sub>-MS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相梯度洗脱, 柱温 25 °C, 体积流量为 1 mL/min, 检测波长 203 nm。结果 人参皂苷在 0.010~0.640 mg/mL 内线性关系良好; 加样回收率为 97.4%~103.6%。结论 本法简便、准确、分离度好, 可作为林下参、鲜人参、生晒参和红参的质量评价的方法, 并首次发现了林下参中酸性皂苷的存在。

**关键词:** 林下参; 鲜人参; 生晒参; 红参; 人参皂苷; 酸性皂苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2431-04

## Simultaneous determination of 14 kinds of ginsenosides in similar wild ginseng, fresh ginseng, white ginseng, and red ginseng by HPLC

LIU Zhi<sup>1,2,3</sup>, RUAN Chang-chun<sup>1,3</sup>, LIU Tian-zhi<sup>4</sup>, WANG Li-juan<sup>4</sup>, ZHENG Yi-nan<sup>4</sup>, SUN Guang-zhi<sup>1</sup>

1. Institute of Agricultural Modernization, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China
2. Engineering Research Center of Edible and Medicinal Fungi, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China
3. Engineering Research Center of Natural Enemy Insects, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China
4. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Key words:** similar wild ginseng; fresh ginseng; white ginseng; red ginseng; ginsenoside; acidic ginsenoside

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 是我国名贵的中药, 被誉为“百草之王”。目前在林下参、园参及其制品的质量评价上, 使用高效液相色谱测定人参皂苷的方法多以测定多种中性皂苷 (人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc、Rd、Re、Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rf、Rg<sub>3</sub> 和 Rg<sub>2</sub>) 为主<sup>[1-6]</sup>; 而酸性人参皂苷如人参皂苷 Ro、丙二酰基人参皂苷-Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc 和 Rd (M-Rb<sub>1</sub>、M-Rb<sub>2</sub>、M-Rc、M-Rd)<sup>[7-9]</sup>, 占人参总皂苷的 35%~60%<sup>[10-12]</sup>, 却被忽略, 造成了人参总皂苷测定的不准确性, 严重地影响了人参的质量评价。因此本实验建立了简单、准确的 HPLC 方法, 同时测定了包括酸性皂苷在内的林下参、鲜人参、生晒参和红参中 14 种人参皂苷的量;

且首次报道了林下参中酸性皂苷的存在, 为林下参、园参及其制品的质量评价提供了科学的方法。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 乙腈 (美国 Fisher 公司), 其他试剂为分析纯。酸性皂苷对照品 M-Rb<sub>1</sub>、M-Rb<sub>2</sub>、M-Rc、M-Rd 和 Ro (自制, 经 IR、MS、NMR 鉴定, 质量分数 >99%); 中性皂苷对照品人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc、Rd、Re、Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rf 和 Rg<sub>2</sub> (中国药品生物制品检定所)。林下参和鲜人参采自吉林省抚松县, 生晒参和红参购于吉林省抚松县万良药材市场, 均经吉林农业大学中药材学院郑毅男教授鉴定。

收稿日期: 2012-02-16

基金项目: 吉林省科技厅科技支撑计划重点项目 (20100914)

作者简介: 刘 志 (1978—), 男, 助理研究员, 在读博士研究生, 研究方向为天然产物研究及新药开发。

Tel: (0431)84510949 E-mail: lzhiu@126.com

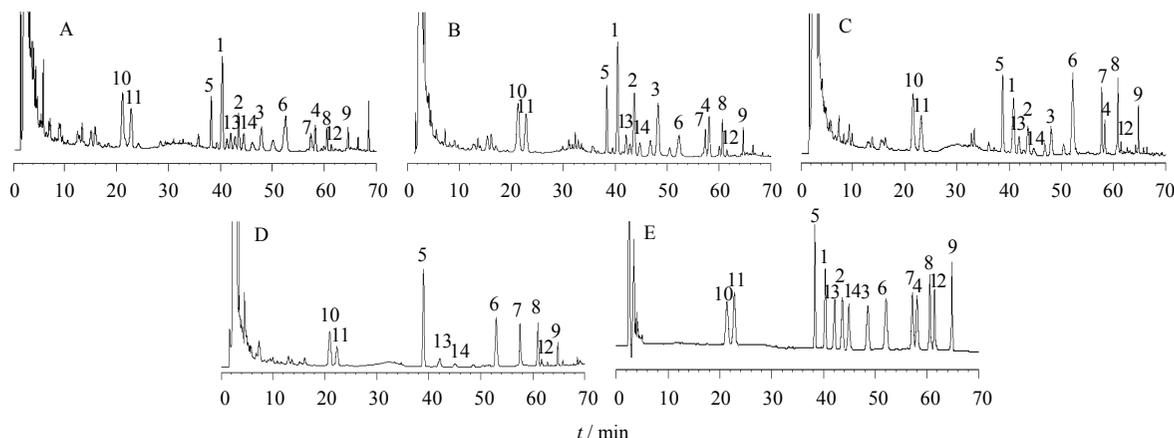
\*通讯作者 孙光芝 E-mail: gzsun1967@yahoo.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Cosmosil 5 C<sub>18</sub>-MS(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液 (B); 洗脱梯度: 0~22 min, 21%A;

22~30 min, 21%~29%A; 30~50 min, 29%A; 50~60 min, 29%~35%A; 60~70 min, 35%~50%A; 柱温 25 °C; 检测波长 203 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 20 μL; 分析时间 70 min。色谱图见图 1。



1-M-Rb<sub>1</sub> 2-M-Rc 3-M-Rb<sub>2</sub> 4-M-Rd 5-人参皂苷 Ro 6-人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 7-人参皂苷 Rc 8-人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 9-人参皂苷 Rd 10-人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 11-人参皂苷 Re 12-人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 13-人参皂苷 Rf 14-人参皂苷 Rg<sub>2</sub>  
1-M-Rb<sub>1</sub> 2-M-Rc 3-M-Rb<sub>2</sub> 4-M-Rd 5-ginsenoside Ro 6-ginsenoside Rb<sub>1</sub> 7-ginsenoside Rc 8-ginsenoside Rb<sub>2</sub> 9-ginsenoside Rd 10-ginsenoside Rg<sub>1</sub> 11-ginsenoside Re 12-ginsenoside Rb<sub>3</sub> 13-ginsenoside Rf 14-ginsenoside Rg<sub>2</sub>

图 1 林下参 (A)、鲜人参 (B)、生晒参 (C)、红参 (D) 和对照品 (E) 的高效液相色谱图  
Fig. 1 HPLC chromatograms of similar wild ginseng (A), fresh ginseng (B), white ginseng (C), red ginseng (D), and reference substances (E)

2.2 供试品溶液的制备

林下参和鲜人参根切成碎末, 各精密称取 2.5 g, 生晒参和红参粉碎后过 4 号筛, 各精密称取 1 g, 各供试样品分别用 80% 甲醇 50 mL 冷浸提取 5 次, 每次 12 h, 40 °C 下浓缩提取液至干, 用 30% 乙腈溶解, 定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀放置, 用前以 0.25 μm 的滤膜滤过, 作为供试品溶液, 4 °C 下低温储藏。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取人参单体皂苷 M-Rb<sub>1</sub>、M-Rb<sub>2</sub>、M-Rc、M-Rd、Ro、Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc、Rd、Re、Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rf 和 Rg<sub>2</sub> 对照品各适量, 用 30% 乙腈定容, 得到质量浓度分别为 1.012、0.997、1.011、1.003、1.001、1.008、1.01、1.02、0.997、1.011、0.995、0.999、0.100 和 1.003 mg/mL 混和对照品储备液, 摇匀, 即得, 4 °C 下低温储藏。

2.4 线性关系的考察

分别吸取上述对照品母液 10、20、40、80、160、320、640 μL, 分别置于 1 mL 量瓶中, 加 30% 乙腈

稀释至刻度, 制备成不同质量浓度的系列对照品溶液, 分别精密吸取系列对照品溶液各 20 μL 进样。结果表明上述 14 个成分分别在 0.010~0.640 mg/mL, 与峰面积呈良好的线性关系。以色谱峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 线性回归方程和相关系数见表 1。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液各 20 μL, 按上述色谱条件进样分析, 1 d 内连续 6 次, 测定峰面积, 结果人参皂苷单体 (图 1 中 1~14 号峰对应) 峰面积的日内精密度 RSD 分别为 1.33%、2.65%、1.24%、1.78%、1.59%、2.04%、2.42%、1.25%、1.76%、1.93%、2.07%、2.45%、1.81% 和 2.14%。连续 3 d 内进样 6 次, 其日间精密度 RSD 分别为 2.52%、2.37%、2.64%、2.24%、2.45%、2.71%、2.55%、2.69%、3.09%、2.32%、2.27%、4.55%、3.91% 和 3.76%。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 h 检测峰面积, 每次进样均为 20 μL, 测得人参

表 1 14 种人参皂苷的回归曲线方程和相关系数  
Table 1 Regression curves equation and relative coefficients of 14 kinds of ginsenosides

人参皂苷	回归方程	r
M-Rb <sub>1</sub>	$Y=2.24 \times 10^3 X-2.79$	0.999 7
M-Rb <sub>2</sub>	$Y=2.18 \times 10^3 X-3.42$	0.999 6
M-Rc	$Y=2.27 \times 10^3 X-5.24$	0.999 6
M-Rd	$Y=2.12 \times 10^3 X-7.01$	0.999 1
Ro	$Y=2.39 \times 10^3 X-5.52$	0.999 0
Rb <sub>1</sub>	$Y=2.43 \times 10^3 X-3.56$	0.999 8
Rb <sub>2</sub>	$Y=1.99 \times 10^3 X-2.86$	0.999 5
Rc	$Y=2.74 \times 10^3 X-8.64$	0.998 7
Rd	$Y=2.32 \times 10^3 X-3.25$	0.999 9
Re	$Y=2.17 \times 10^3 X-2.01$	0.999 2
Rg <sub>1</sub>	$Y=2.27 \times 10^3 X-3.48$	0.999 3
Rb <sub>3</sub>	$Y=2.88 \times 10^3 X-9.24$	0.999 1
Rf	$Y=2.81 \times 10^3 X-8.78$	0.999 0
Rg <sub>2</sub>	$Y=2.89 \times 10^3 X-8.83$	0.999 3

皂苷单体(图 1 中 1~14 号峰对应)峰面积 RSD 分别为 0.98%、1.24%、0.75%、1.69%、1.04%、1.52%、2.17%、1.74%、0.93%、2.43%、1.88%、1.34%、0.88% 和 1.97%。

表 2 人参皂苷的测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of ginsenosides (n=3)

样品	质量分数 / %													
	M-Rb <sub>1</sub>	M-Rc	M-Rb <sub>2</sub>	M-Rd	Ro	Rb <sub>1</sub>	Rc	Rb <sub>2</sub>	Rd	Rg <sub>1</sub>	Re	Rb <sub>3</sub>	Rf	Rg <sub>2</sub>
林下参	0.410	0.139	0.156	0.084	0.148	0.307	0.101	0.120	0.067	0.345	0.247	0.011	0.038	0.047
鲜人参	0.527	0.282	0.341	0.144	0.454	0.231	0.088	0.124	0.035	0.381	0.249	0.017	0.078	0.029
生晒参	0.333	0.165	0.194	0.085	0.402	0.318	0.168	0.206	0.118	0.350	0.246	0.012	0.054	0.033
红参	0	0	0	0	0.395	0.325	0.219	0.215	0.084	0.281	0.086	0.015	0.021	0.011

### 3 讨论

在酸性皂苷的定量测定研究上,杨崇仁等<sup>[12]</sup>报道了云南栽培西洋参中 10 种皂苷的测定方法,用乙腈-0.05 mol/L 的磷酸二氢钾测定 M-Rb<sub>1</sub>、M-Rb<sub>2</sub>、M-Rc、Ro、Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc 和 Rd,用乙腈-磷酸测定 Re 和 Rg<sub>1</sub>。Court 等<sup>[11]</sup>报道了采用间接的测定方法,即测定中性皂苷后将丙二酰基人参皂苷脱丙二酰基变成相应的人参皂苷再测定,需要测定 2 次。本实验建立的 HPLC 方法,同时测定了包括酸性皂苷在内的林下参、鲜人参、生晒参和红参中 14 种人参皂苷的量;结果表明酸性皂苷在林下参、鲜人参、生晒参中的量非常高,分别为 0.937%、1.748%和 1.179%,分别占其总皂苷的 42.21%、58.66%和

### 2.7 重复性试验

取同一鲜人参根样品 6 份,分别按供试样品的制备方法处理后,分别精密吸取 20 μL,按上述色谱条件测定,结果人参皂苷单体(图 1 中 1~14 号峰对应)质量分数的 RSD 分别为 2.85%、3.09%、3.52%、2.47%、1.72%、2.71%、1.96%、3.03%、3.24%、3.85%、3.14%、2.02%、2.56%和 1.71%。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取 6 份已测定的鲜人参根样品适量,分别准确加入一定量的人参皂苷对照品,按供试样品的制备方法处理后,按上述色谱条件测定,结果人参皂苷单体(图 1 中 1~14 号峰对应)的平均回收率(RSD)分别为 100.6%(1.35%)、102.2%(2.01%)、98.4%(1.47%)、99.5%(1.08%)、98.5%(1.46%)、101.5%(1.73%)、103.6%(2.25%)、101.8%(1.51%)、97.4%(2.33%)、99.1%(1.75%)、102.7%(1.84%)、100.1%(0.98%)、98.7%(2.15%)和 97.9%(3.03%)。

### 2.9 样品测定

按“2.2”项下的方法制备供试品溶液,分别进样 20 μL,按上述色谱条件进行测定,以外标法计算,结果见图 1 和表 2。

43.93%。本方法避免了由于忽略酸性皂苷而使总皂苷测定的不准确,为林下参和园参及其制品提供了一个较科学的质量评价方法。

在林下参的化学成分研究上,从林下参中分离得到了多种已知化合物,分别鉴定为人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc、Rd、20(R)-Rg<sub>3</sub>、20(R)-Rh<sub>2</sub>、Re、Rh<sub>1</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rf、20(R)-Rg<sub>2</sub> 和 Rg<sub>1</sub> 等<sup>[13-15]</sup>。但林下参中酸性皂苷的研究未见报道,本实验首次报道了林下参中酸性皂苷(M-Rb<sub>1</sub>、M-Rb<sub>2</sub>、M-Rc、M-Rd、Ro)的存在并对其进行定量分析。

### 参考文献

[1] 郑毅男. 林下参人参皂苷分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4): 486-491.

- [2] 石威, 王玉堂, 权新军, 等. 高效液相色谱蒸发光散射检测法测定人参根中人参皂苷的含量 [J]. 分析化学, 2006, 34(2): 243-246.
- [3] 徐静, 贾力, 赵余庆. 人参的化学成分与人参产品的质量评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 199-203.
- [4] 潘坚扬, 程翼宇, 王毅, 等. 9 种人参皂苷同时测定方法及在人参质量鉴别中的应用 [J]. 分析化学, 2005, 33(11): 1565-1568.
- [5] Kim S N, Ha Y W, Shin H, *et al.* Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C. A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45: 164-170.
- [6] Sun B S, Gu L J, Fang Z M, *et al.* Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50: 15-22.
- [7] Kitagawa I, Taniyama T, Hayashi T, *et al.* Malonylginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, four new malonylated dammarane-type triterpene oligoglucoside from *Ginseng Radix* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(9): 3353.
- [8] 孙光芝, 刘志, 李向高, 等. 鲜人参中 2 种丙二酰基人参皂苷的分离鉴定 [J]. 分析化学, 2005, 33(12): 1783-1786.
- [9] 孙光芝, 李向高, 刘志, 等. 人参根中丙二酰基三七人参皂苷-R<sub>4</sub> 的分离及其结构表征 [J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(7): 1316-1318.
- [10] Chuang W C, Wu H K, Sheu S J, *et al.* A comparative study on commercial samples of *Ginseng Radix* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(5): 459-465.
- [11] Court W A, Hendel J G, Elmi J. Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of ginsenosides of *Panax quinquefolium* [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 755: 11-17.
- [12] 杨崇仁, 姚荣成, 阮德婧, 等. 云南栽培西洋参皂甙的高相色谱定量分析 [J]. 云南植物研究, 1989, 11(3): 276-284.
- [13] 钟方丽, 刘金平, 卢丹, 等. 林下参的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 869-871.
- [14] 姜海平, 窦德强, 荆淑琴, 等. 林下山参的人参皂苷含量分析及指纹图谱的研究 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(4): 12-15.
- [15] 周志勋, 窦德强, 赵河新. 不同季节林下山参人参皂苷的动态积累变化和规律 [J]. 人参研究, 2010, 23(2): 12-18.