HPLC 法测定林下山参制浆前后人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 含量的变化

闫　彤[1]，石国慧[2]，吴　韶[2]，肖　婷[2]，沈光海[1*]，赵余庆[2, 3*]

1. 延边大学药学院，吉林 延吉　133002
2. 沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院，辽宁 沈阳　110016
3. 沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室，辽宁 沈阳　110016

摘　要：目的　分析林下山参制浆后人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 含量的变化情况。**方法**　采用 HPLC-UV 法，Innoval ODS-2 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水溶液进行梯度洗脱；柱温 30 ℃；体积流量 1.0 mL/min；进样体积 20 μL；检测波长 203 nm。**结果**　林下山参中 6 种人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 质量分数分别由制浆前的 0.651、0.506、0.363、0.014、0.023、0.031 mg/g 变化为制浆后的 0.517、0.413、0.105、0.122、0.214、0.098 mg/g。人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 分别在 2.5～100 mg/L 具有良好的线性关系，r^2 均大于 0.999 5；精密度、稳定性及重复性良好；平均加样回收率为 95%～105%，RSD 为 1.25%～3.05%。**结论**　林下山参中 6 种人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量在制浆前、后发生变化。林下山参制浆后人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1 的含量降低，稀有人参皂苷 Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量分别增高 8.7、9.3、3.2 倍。基于 HPLC 最佳分离参数建立的 6 种人参皂苷成分同时分析的方法具有较好的准确性和可靠性，可为林下山参浆的质量评价提供科学依据。

关键词：林下山参浆；人参皂苷 Re；人参皂苷 Rg_1；人参皂苷 Rb_1；人参皂苷 Rg_3；人参皂苷 Rh_1；人参皂苷 Rh_2；HPLC

中图分类号：R282.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2018)17 - 4148 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.028

Determination of content changes of ginsenoside Re, Rg_1, Rb_1, Rg_3, Rh_1, and Rh_2 before and after pulping of mountain cultivated ginseng by HPLC

YAN Tong[1], SHI Guo-hui[2], WU Shao[2], XIAO Ting[2], SHEN Guang-hai[1], ZHAO Yu-qing[2, 3]

1. School of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China
2. School of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China
3. Key Laboratory of Structure-based Drug Design and Discovery, Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective　To analyze the content changes of six kinds of ginsenosides Re, Rg_1, Rb_1, Rg_3, Rh_1, and Rh_2 after pulping of mountain cultivated ginseng. **Methods**　The HPLC-UV method was performed on an Innoval ODS-2 chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), gradient elution of acetonitrile and water with column temperature 30 ℃, at a flow rate of 1.0 mL/min, and detected at 203 nm with injection volume as 20.0 μL. **Results**　The content of six kinds of ginsenosides Re, Rg_1, Rb_1, Rg_3, Rh_1 and Rh_2 were changed from 0.651, 0.506, 0.363, 0.014, 0.023, 0.031 mg/g to 0.517, 0.413, 0.105, 0.122, 0.214, 0.098 mg/g after pulping of mountain cultivated ginseng. The calibration curve was liner within 2.5—100 mg/L for ginsenoside Re, Rg_1, Rb_1, Rg_3, Rh_1, and Rh_2, respectively, with the correlation r^2 > 0.999 5 and perfect precision, stability, and repeatability. The average recoveries ranged from 95% to 105%, and RSD values varied from 1.25% to 3.5%. **Conclusion**　The content of six kinds of ginsenosides Re, Rg_1, Rb_1, Rg_3, Rh_1, and Rh_2 in mountain cultivated ginseng were changed after the pulping. The content of ginsenoside Re, Rg_1, and Rb_1 was reduced and rare ginsenoside Rg_3, Rh_1, and Rh_2 was increased by 8.7 times, 9.3 times, and 3.2 times respectively after the pulping. The HPLC method for simultaneous determination of six kinds of ginsenosides has good accuracy and reliability and can provide scientific basis for the quality evaluation of mountain cultivated ginseng pulp.

Key words: mountain cultivated ginseng pulp; ginsenoside Re; ginsenoside Rg_1; ginsenoside Rb_1; ginsenoside Rg_3; ginsenoside Rh_1; ginsenoside Rh_2; HPLC

收稿日期：2018-03-06

基金项目：天然创新药物原料及提取物工业化色谱制备工程研究中心资助项目

作者简介：闫　彤（1994—），女，内蒙古满洲里人，硕士研究生。E-mail: 597223052@qq.com

***通信作者**　赵余庆（1957—），男，教授，博士生导师，主要从事天然产物、药食同源品的活性成分的发现与创新研究。
Tel: (024)23986522　E-mail: zyq4885@126.com

沈光海（1972—），男，朝鲜族，吉林延吉人，副教授，硕士生导师，主要从事天然产物成分及机制研究。
Tel: (0433)2436007　E-mail: ghshen@ybu.edu.cn

林下山参（mountain cultivated ginseng，MCG）指人工播种在山林，野生状态下自然生长的人参，是一味名贵的中药材[1]。我国林下山参主产地为辽东地区[2]，中国山参之乡-辽宁桓仁产的林下山参五形好、有效成分含量高、质量上乘[3]。近年来，随着对林下山参的深入研究，明确其主要药理活性成分是人参皂苷。人参皂苷具有抗肿瘤[4]、增强免疫[5]、调节神经系统[6]、改善心脑血管功能[7]、保护肝脏[8]和延缓衰老[9]等功效。

林下山参含有多种化学成分，其中人参皂苷含量是评价林下山参内在质量的重要指标[10]。目前已发现林下山参含有人参皂苷 Re、Rg_1、Rg_2、Rf、Rh_1、Rh_2、Rb_2、Rc、Rd、Ro 等[11]，其中人参皂苷 Re、Rg_1 和 Rb_1 等在林下山参中含量较高。人参皂苷 Rg_3、Rh_1、Rh_2 等多数为人参皂苷发生转化而来的次生皂苷，在人参属植物中含量极低，称为稀有人参皂苷[12]。现代研究表明，人参在加工处理过程中，原生皂苷能够转化为易被机体吸收的次生皂苷和苷元，从而发挥更好的生物活性[13]。

野生人参因为对于环境和土壤的要求严格导致存活率极低，滥采及污染等因素也导致野生人参产量逐年下降。但是随着人参效用广为人知，人们对于林下山参的需求量逐年增加。林下山参经过数十年的生长，品质和化学成分均与野生山参相似，具有广阔的市场前景。目前对于林下山参的深加工研究少见报道。本课题组选用辽宁桓仁产鲜林下山参原浆工艺的研究，并首次对林下山参制浆前后人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1（《中国药典》规定检测指标）和 3 个稀有活性皂苷 Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量进行检测，对比林下山参在制浆过程中稀有人参皂苷产生和 6 种人参皂苷的含量变化，为林下山参浆的质量控制提供可行的检测方法，也为林下山参制剂的保健作用和应用价值研究提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

JYL-Y915 匀质打浆机（中国九阳电器有限公司）；KQ-300B 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；BSA124S 电子天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司，万分之一）；UV Detecter L-2400、Autosampler L-2200、Pump L-2130 高效液相色谱仪（株式会社日立制作所）；甲醇（色谱纯，天津市康科德科技有限公司）；乙腈（色谱纯，天津市康科德科技有限公司）；娃哈哈水（杭州娃哈哈集团）；其他所用试剂（分析纯，市售）。

1.2 样品

林下山参样品购自辽宁桓仁满族自治县中国东北参茸城，经沈阳药科大学中药学院路金才教授鉴定为林下山参 *Panax ginseng* C. A. Mey.；人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 对照品均为实验室自制，HPLC 峰面积归一化法测得质量分数大于 98%。

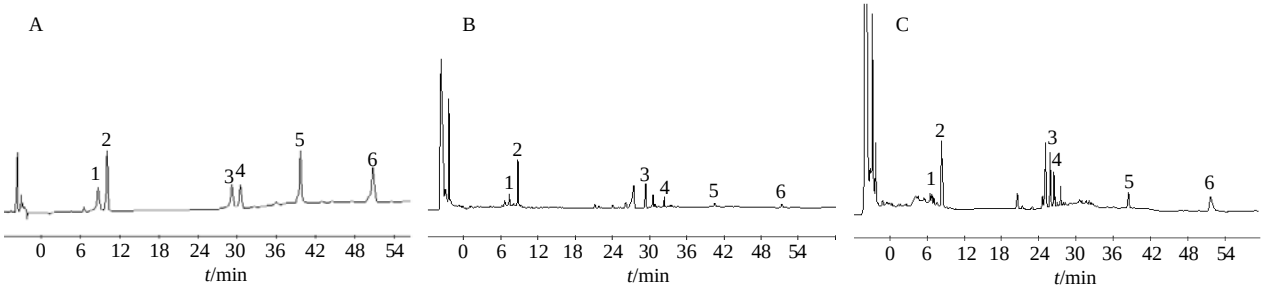
2 方法与结果

2.1 色谱条件

Innoval ODS-2 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-水（B），线性梯度洗脱 0～10 min，18%～27% A；10～30 min，27%～33% A；30～40 min，33%～52% A；40～70 min，52%～68% A；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 203 nm；进样量 20 μL。在该色谱条件下，各成分色谱峰与相邻峰的分离度良好，分离度均大于 1.5，色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 各 1.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇晃均



1-人参皂苷 Rg_1 2-人参皂苷 Re 3-人参皂苷 Rb_1 4-人参皂苷 Rh_1 5-人参皂苷 Rg_3 6-人参皂苷 Rh_2
1-ginsenoside Rg_1 2-ginsenoside Re 3-ginsenoside Rb_1 4-ginsenoside Rh_1 5-ginsenoside Rg_3 6-ginsenoside Rh_2

图 1 对照品溶液 (A)、林下山参药材 (B) 和林下山参浆 (C) 样品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of reference solution (A), mountain cultivated ginseng herbs (B), and mountain cultivated ginseng pulp (C)

匀，制备成质量浓度为 100.0 mg/L 的混合对照品溶液，用 0.45 μm 有机微孔滤膜滤过，备用。

2.2.2 林下山参原浆的制备 将林下山参样品放入超声波清洗器中，超声清洗 10 min，去除参体表面附着的泥土，清洗干净后将林下山参取出置于阴凉通风处晾干；精密称取 50 g 林下山参置于均质打浆机中，加入 100 mL 饮用水 70 ℃加热均质 5 min，即得林下山参原浆（每 3 克浆体中含 1 g 林下山参），备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取 1.0 g 林下山参药材及 3.0 g 林下山参浆，分别精密加入 20 倍量 70%乙醇溶液，超声处理 30 min，冷却至室温后离心取上清液，残渣如上述方法处理一次，合并上清液。将上清液减压浓缩至干。提取物加色谱甲醇溶解定容至 5 mL，摇匀。溶液经 0.45 μm 有机微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线的制备 分别量取“2.2.1”项下对照品溶液适量，以甲醇依次稀释配成质量浓度为 100、75、50、25、10、2.5 mg/L 的标准系列溶液。分别精密吸取 20 μL，在“2.1”项色谱条件下测定峰面积，以对照品质量浓度为横纵标（X），峰面积为纵坐标（Y），绘制标准曲线，计算得到线性回归方程，见表 1。结果表明 6 个被测化合物在标准曲线范围内质量浓度与峰面积呈良好线性关系。

2.3.2 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 20 μL，连续重复进样 6 次，按照“2.1”项下色谱条件进行测定，记录峰面积数值，人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 色谱峰面积的 RSD 值分别为 1.02%、1.21%、1.15%、0.70%、1.33%、1.80%，结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一林下山参浆供试品溶液，室温下放置，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 按照“2.1”项下色谱条件进行测定，每次进样 20 μL，记录峰面积数值。经计算，人参皂苷 Re，Rg_1，Rb_1，Rg_3，Rh_1，Rh_2 色谱峰面积的 RSD 分别为 1.84%、1.99%、1.76%、1.80%、1.95%、1.93%，均小于 3%，结果表明供试样品溶液在制备后的 24 h 内稳定性良好。

表 1 6 种人参皂苷的回归方程和线性范围

Table 1 Regression equation and linear range of six ginsenosides

人参皂苷	回归方程	r^2	线性范围/(mg·L^{-1})
Re	$Y=7\times10^6X+294\,497$	0.999 6	2.5～100
Rg_1	$Y=5\times10^6X+123\,412$	0.999 9	2.5～100
Rb_1	$Y=8\times10^6X+144\,388$	0.999 8	2.5～100
Rh_1	$Y=9\times10^6X+449\,595$	0.999 8	2.5～100
Rh_2	$Y=2\times10^7X-519\,407$	0.999 9	2.5～100
Rg_3	$Y=4\times10^6X+2\,576.7$	0.999 7	2.5～100

2.3.4 重复性试验 按照“2.2.2”项下处理样品，平行制备 6 份林下山参原浆供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进行测定，计算人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 质量分数的 RSD 分别为 1.04%、1.74%、1.21%、1.67%、1.93%、2.15%，结果表明该制备方法具有良好的重复性。

2.3.5 加样回收率试验 取已测定的林下山参原浆样品 3 份，每份 1.0 g，精密称定，分别加入适量的对照品溶液，按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进行测定，记录各人参皂苷峰面积数值，计算含量及回收率。结果显示 6 个人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 的平均加样回收率在 95%～105%，RSD 值为 1.25%～3.05%，表明该方法的准确度较好。

2.4 样品测定

按“2.2.2”项下所述方法制备林下山参原浆 6 份，分别于 4 ℃环境下保存 0、5、10、15、20、25 d，在放置一定天数后分别准确称取林下山参药材 1.0 g 及各林下山参原浆样品 3.0 g，按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件测定，采用外标法计算样品中人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量，考察制浆前、后以及保存一定时间内 6 种人参皂苷的含量变化，测定结果见表 2。

从测定结果可以看出，林下山参制原浆前、后人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量均发生变化。林下山参制浆后人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1 的含量减少，而人参皂苷 Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量增加，其可能原因为林下山参制浆有加热过程，加热过程可以使人参皂苷发生转化。此外，林下山参浆于 4 ℃环境下保存 25 d 内，人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量无明显变化。

3 讨论

人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1 为《中国药典》规定的人参（林下山参）药材检测指标。人参皂苷 Rg_3、Rh_1、Rh_2 为具有多种生物活性的稀有人参皂苷[14-16]，它们可在一定条件下（加热、酸碱、微生物和酶水解）由人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1 转化

表 2 林下山参及林下山参原浆中 6 种人参皂苷的测定结果 (n = 3)

Table 2 Results of determination of six ginsenosides in mountain cultivated ginseng and mountain cultivated ginseng pulp (n = 3)

成分/(mg·g^{-1})	制浆前人参皂苷/(mg·g^{-1})	制浆后人参皂苷/(mg·g^{-1})					
		0 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
人参皂苷 Re	0.651	0.517	0.514	0.499	0.506	0.512	0.503
人参皂苷 Rg_1	0.506	0.413	0.409	0.411	0.409	0.404	0.408
人参皂苷 Rb_1	0.363	0.105	0.102	0.105	0.101	0.104	0.104
人参皂苷 Rg_3	0.014	0.122	0.122	0.119	0.121	0.118	0.120
人参皂苷 Rh_1	0.023	0.214	0.215	0.210	0.212	0.214	0.211
人参皂苷 Rh_2	0.031	0.098	0.096	0.099	0.093	0.095	0.095

而来[17-19]。如人参皂苷在胃肠道转化代谢后生成易被胃肠道吸收的苷元或次苷，且活性增强[20]。在红参加工过程中，由于持续的高温加热蒸制，人参皂苷发生脱羧、水解和异构化反应，使稀有人参皂苷 Rg_3、Rh_2、Rh_1 的含量增加[13]。本实验通过测定和对比林下山参制浆前后人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量，探讨林下山参制浆过程中稀有皂苷成分的产生和6种皂苷的含量变化。林下山参经加热、均质破壁制成林下山参原浆，结果表明，林下山参制浆后人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1 含量减少，而稀有活性皂苷 Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量在制浆后的当天分别增加了 8.7 倍、9.3 倍和 3.2 倍。且实验结果显示，林下山参制浆后于 4 ℃下冷藏保存 25 d 内，人参皂苷 Re、Rg_1、Rb_1、Rg_3、Rh_1、Rh_2 的含量无明显变化，说明制浆工艺可行，林下山参原浆成分稳定不易变化，能够长时间保存。已有研究报道证明，稀有活性皂苷 Rg_3、Rh_1、Rh_2 具有明显的免疫增强、抗肿瘤等功效。稀有皂苷的产生和含量增加，使制浆后林下山参不但去除了燥性，且服用方便，并通过更易吸收增强了该产品的保健和滋补效用，从而体现出珍贵药材的应用价值，也为林下山参及其制品的质量控制提供简便、可行的检测方法。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 李凤祥. 辽东林下山参高效栽培管理 [J]. 特种经济动植物, 2017, 20(4): 38-41.

[3] 张 毅, 田景鑫. 桓仁县林下参科学种植管理技术 [J]. 中国园艺文摘, 2010, 26(5): 168-169.

[4] 姜卫卫, 刘 嘉. 人参皂苷 Rb_1、Rg_3、Rh_2 抗肿瘤作用与机制概况 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(7): 1634-1637.

[5] Qu D F, Yu H J, Liu Z, *et al*. Ginsenoside Rg_1 enhances immune response nduced by recombinant toxoplasma gondii SAG1 antigen [J]. *Vet Parasitol*, 2011, 179(1/3): 28-34.

[6] 杜依楚, 潘玉君. 人参皂苷 Rg_1 在神经系统疾病中的作用机制进展 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(10): 178-182.

[7] 鲁美丽, 王洪新, 张 静, 等. 人参皂苷 Rg_1 对脂多糖诱导心肌细胞肥大的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(6): 32-34.

[21] 李晓宇, 李 晶, 王一博, 等. 人参皂苷对酒精性肝损伤的保护作用研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(5): 512-515.

[8] 向 玥, 陈鄱波, 姚 辉, 等. 人参皂苷 Rg_1 对 *D*-半乳糖所致衰老小鼠海马的保护机制 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3789-3795.

[9] 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.

[10] 常相伟, 赵 颖, 李德坤, 等. 林下山参化学成分及鉴别评价研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1982-1991.

[11] 姚 华. 人参皂苷微波辅助降解产物及其生物活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.

[12] 孙 娜, 徐 钢, 徐 珊, 等. 人参炮制对其化学成分和药理作用的影响 [J]. 中国药房, 2016, 27(6): 857-859.

[13] Sun M, Ye Y, Xiao L, *et al*. Anticancer effects of ginsenoside Rg_3 [J]. *Inter J Mol Med*, 2017, 39(3): 507.

[14] Tam D N H, Truong D H, Nguyen T T H, *et al*. Ginsenoside Rh_1: A systematic review of its pharmacological properties [J]. *Planta Med*, 2018, 84(3): 139-152.

[15] Liu G W, Liu Y H, Jiang G S, *et al*. The reversal effect of ginsenoside Rh_2 on drug resistance in human colorectal carcinoma cells and its mechanism [J]. *Human Cell*, 2018, 31(3): 189-198.

[16] 张丽娜, 明有山, 曲波权, 等. 微生物转化人参皂苷 Re 为人参皂苷 Rh_1 的研究 [J]. 中国酿造, 2017, 36(11): 114-117.

[17] Song B K, Kim K M, Choi K D, *et al*. Production of the rare ginsenoside Rh_2-MIX [20(*S*)-Rh_2, 20 (*R*)-Rh_2, Rk_2, and Rh_3] by enzymatic conversion combined with acid treatment and evaluation of its anti-cancer [J]. *J Microb Biotechnol*, 2017, 27(9): 1233-1241.

[18] 张益铭, 杨喆茗, 许伟民, 等. 人参皂苷转化研究 [J]. 人参研究, 2013, 25(2): 56-59.

[19] 张洋婷, 郗艳丽, 白春燕, 等. 人参皂苷体外转化和分析方法的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2015, 36(2): 121-124.