

一测多评法同时测定红参中 11 种人参皂苷的含量

徐文武, 谢涛, 吕东峰, 杨婷, 张臻臻, 魏西羽, 孙越, 刘厚汝, 李伟*, 于德红*
华北理工大学药学院, 河北唐山 063200

摘要: 目的 建立一测多评法 (quantitative analysis single-marker, QAMS) 测定红参药材中 11 种皂苷类成分的含量, 为红参质量控制提供科学依据。方法 采用 HPLC 法, Agilent C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量 1.3 mL/min, 柱温 30 °C, 波长 203 nm。以人参皂苷 Rb₁ 为参照物, 建立其与人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 的相对校正因子, 外标法与 QAMS 分别测定 11 个成分含量。结果 在一定线性范围内, 人参皂苷 Rb₁ 相对人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 的相对校正因子重复性好, 2 种方法所得 11 种成分的含量无明显差异, 实验得相对校正因子可供参考。结论 本研究建立的 QAMS 法, 快速、简便、重复性好, 可为红参药材的质量控制提供参考。

关键词: 红参; 高效液相色谱法; 一测多评; 相对校正因子; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rf; 人参皂苷 Rh₁; 人参皂苷 Rc; 人参皂苷 Ro; 人参皂苷 Rb₂; 人参皂苷 Rb₃; 人参皂苷 Rd; 人参皂苷 Rg₃; 质量控制

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)07-2099-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.027

Simultaneous determination of 11 saponins components in red ginseng by QAMS method

XU Wen-wu, XIE Tao, LV Dong-feng, YANG Ting, ZHANG Zhen-zhen, WEI Xi-yu, SUN Yue, LIU Hou-ru, LI Wei, YU De-hong

School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single maker (QAMS) for the content determination of eleven saponins in red ginseng, so as to provide a scientific basis for the quality control of red ginseng. **Methods** The HPLC analysis was performed on Agilent C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), using acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase at a flow rate of 1.3 mL/min, and column temperature was 30 °C and the detection wavelength was set at 203 nm. Ginsenoside Rb₁ was used as reference to establish its relative correction factor of Rg₁, Re, Rf, Rh₁, Rc, Ro, Rb₂, Rb₃, Rd and Rg₃. The contents of eleven components were determined by both external standard method and QAMS. **Results** Within a certain linear range, ginsenoside Rb₁ had better reproducibility than ginsenoside Rg₁, Re, Rf, Rh₁, Rc, Ro, Rb₂, Rb₃, Rd, and Rg₃ in terms of relative correction factors. There was no significant difference in the contents of 11 components obtained by the two methods. The relative correction factors obtained in the experiment could be used for reference. **Conclusion** The establishment of multi-components by single maker method in this study is rapid, simple and reproducible, which can provide reference for the quality control of red ginseng.

Key words: red ginseng; HPLC; quantitative analysis of multi components with a single marker; relative correction factor; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rf; ginsenoside Rh₁; ginsenoside Rc; ginsenoside Ro; ginsenoside Rb₂; ginsenoside Rb₃; ginsenoside Rd; ginsenoside Rg₃ quality control

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 作为世界上最常用的草药之一, 已经有几千年的使用历史。红参

是人参采收后经过加工的产物, 在《中国药典》2020年版中红参为五加科植物人参 *P. ginseng* C. A. Mey.

收稿日期: 2020-09-06

基金项目: 华北理工大学博士科研启动基金项目 (No.28418499)

作者简介: 徐文武 (1993—), 在读硕士, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 1150403761@qq.com

*通信作者: 李伟 (1977—), 研究员, 研究方向为药物分析与药物代谢动力学。E-mail: liwei@ncst.edu.cn

于德红 (1971—), 副教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: ydh613@163.com

的栽培品经蒸制后的干燥根及根茎，秋季采挖、洗净、蒸制后，干燥^[1]。红参具有大补元气、复脉固脱、益气摄血的功效，是历史悠久的传统名贵中药材。红参含有人参皂苷、多糖、脂肪酸和挥发油等多种活性成分，其中人参皂苷是红参主要的生物活性成分，目前已经从红参中分离鉴定出了一百多种人参皂苷^[2-4]，人参皂苷是评价红参内在质量的重要指标。研究表明，人参皂苷具有抗炎^[5]、抗肿瘤^[6]、免疫调节^[7]、保护神经系统^[8]、抗糖尿病^[9]等药理作用。

在红参药材质量控制方面，《中国药典》2020年版只对人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 3种人参皂苷含量做出规定，质量控制指标少。另外使用传统的外标法进行人参皂苷的含量测定，存在实验操作繁琐、对照品稀缺昂贵等情况^[10]。在本研究对红参中主要人参皂苷（人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd）测定的同时，对红参中稀有人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rb₃ 及人参皂苷 Rg₃ 进行测定，且针对传统使用的外标法操作繁琐、对照品昂贵稀缺等情况，本实验采用一测多评法（QAMS）同时测定红参中 11 种人参皂苷的含量，不仅可以节省对照品用量，简化实验流程，还可以更加全面地评价红参质量，为红参的质量控制提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

人参皂苷 Rg₁（批号 110703-201832，质量分数 92.4%）、人参皂苷 Re（批号 110754-201827，质量分数 93.4%）、人参皂苷 Rb₁（批号 110704-201827，91.2%）、人参皂苷 Rb₂（批号 111715-201203，质量分数 93.8%）、人参皂苷 Rd（批号 111818-201603，质量分数 92.1%）对照品购自中国食品药品检定研究院；人参皂苷 Rf（批号 100269-201903）、人参皂苷 Rc（批号 110006-201810）、人参皂苷 Ro（批号 180002-202005）、人参皂苷 Rb₃（批号 200613-201906）、人参皂苷 Rg₃（批号 100274-201908）对照品购自南京源植生物科技有限公司，质量分数均≥98%；红参药材来源见表 1，经华北理工大学药学院于德红教授鉴定为五加科植物人参 *P. ginseng* C. A. Mey. 的干燥根及根茎。

1.2 仪器

Shimadzu LC-2030 高效液相色谱仪，LC

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

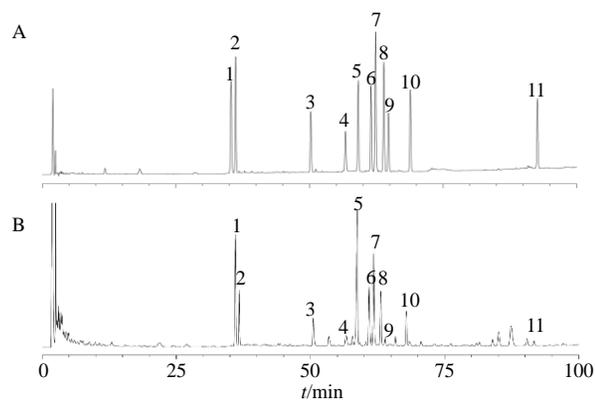
| 编号 | 购买地 | 产地 | 批号 |
|-----|--------------|-------|----------|
| S1 | 安徽省亳州中药材交易市场 | 吉林长白山 | 20160601 |
| S2 | 安徽省亳州中药材交易市场 | 吉林长白山 | 20160901 |
| S3 | 吉林省吉林大药房 | 吉林集安 | 20150201 |
| S4 | 吉林省康象参茸店 | 吉林长白山 | 20170112 |
| S5 | 吉林省御海丰参茸店 | 辽宁抚顺 | 20170803 |
| S6 | 河北省唐山市锦和大药房 | 吉林集安 | 20181125 |
| S7 | 北京市老百姓大药房 | 吉林长白山 | 20171102 |
| S8 | 辽宁省营盘大药房 | 辽宁抚顺 | 20160723 |
| S9 | 河北省安国药材批发市场 | 吉林长白山 | 20170812 |
| S10 | 河北省安国药材批发市场 | 吉林长白山 | 20160625 |

Solution 色谱工作站（日本岛津公司）；KQ-300DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；YS-04 小型高速粉碎机（北京燕山正德机械设备有限公司）；ME155DU/02 十万分之一电子天平（梅特勒-托利多仪器上海有限公司）。甲醇、乙腈均为液相色谱级；水为娃哈哈纯净水；其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）流动相为乙腈（A）-0.1%磷酸水溶液（B），梯度洗脱：0~30 min，19% A；30~35 min，19%~24% A；35~80 min，24%~40% A；80~100 min，40%~49% A；体积流量 1.3 mL/min；柱温 30 °C；检测波长 203 nm；进样量 10 μL。HPLC 图谱见图 1。



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 Rc 7-人参皂苷 Ro 8-人参皂苷 Rb₂
9-人参皂苷 Rb₃ 10-人参皂苷 Rd 11-人参皂苷 Rg₃
1-ginsenoside Rg₁ 2-ginsenoside Re 3-ginsenoside Rf 4-ginsenoside Rh₁
5-ginsenoside Rb₁ 6-ginsenoside Rc 7-ginsenoside Ro 8-ginsenoside Rb₂
9-ginsenoside Rb₃ 10-ginsenoside Rd 11-ginsenoside Rg₃

图 1 混合对照品 (A) 和红参样品 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC spectrum of mixed reference substances (A) and samples (B)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量,加甲醇溶解制成人参皂苷 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 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 对照品质量浓度分别为 0.115、0.100、0.081、0.050、0.102、0.105、0.140、0.140、0.080、0.095、0.056 mg/mL 的混合对照品溶液。放于冰箱 4 °C 保存、备用。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取红参(粉碎后过四号筛)粉末 1 g,用滤纸包裹后放入索氏提取器中,加适量三氯甲烷,75 °C 加热回流 3 h 后,弃去三氯甲烷液,待药渣溶剂挥干,同滤纸筒转移到具塞锥形瓶中,再精密量取水饱和正丁醇 50 mL 加入锥形瓶,密塞,放置过夜,超声处理 30 min,滤过。精密量取续滤液 25 mL,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀、过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系的考察 分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 1、2、4、8、10、20 μL 注入高效液相色谱仪,平行 3 针,按“2.1”项下色谱条件测定,记录相应的色谱峰面积。以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得人参皂苷 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 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 的回归方程及线性范围。结果表明 11 个成分的线性关系良好,如表 2 所示。

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品 10 μL,按“2.1”色谱条件下进样分析,在同一日内连续重复进样 6 次,记录各色谱峰面积值,结果人参皂苷 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 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 峰面积的 RSD 分别为 0.84%、1.32%、0.75%、0.88%、0.79%、1.47%、0.64%、0.46%、0.91%、1.47%、0.81%,表明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批红参药材(批号 20181125)按“2.3”供试品溶液的制备方法,平行制备 6 份供试品,在“2.1”色谱条件下测定,每次进样量 10 μL,计算人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、

表 2 11 个人参皂苷成分回归方程与线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges of eleven components

| 成分 | 回归方程 | r | 线性范围/μg |
|----------------------|--------------------|---------|------------|
| 人参皂苷 Rg ₁ | Y=209 866 X-12.491 | 1.000 0 | 0.115~2.30 |
| 人参皂苷 Re | Y=226 981 X-54.498 | 1.000 0 | 0.100~2.00 |
| 人参皂苷 Rf | Y=185 467 X+60.312 | 1.000 0 | 0.081~1.62 |
| 人参皂苷 Rh ₁ | Y=221 224 X-63.598 | 0.999 9 | 0.050~1.00 |
| 人参皂苷 Rb ₁ | Y=206 915 X-92.17 | 0.999 7 | 0.102~2.04 |
| 人参皂苷 Rc | Y=187 159 X+15.27 | 0.999 9 | 0.105~2.10 |
| 人参皂苷 Ro | Y=226 008 X+77.499 | 1.000 0 | 0.140~2.80 |
| 人参皂苷 Rb ₂ | Y=186 074 X+58.2 | 1.000 0 | 0.140~2.80 |
| 人参皂苷 Rb ₃ | Y=168 933 X+88.993 | 1.000 0 | 0.080~1.60 |
| 人参皂苷 Rd | Y=208 326 X+37.351 | 1.000 0 | 0.095~1.90 |
| 人参皂苷 Rg ₃ | Y=282 593 X+91.9 | 0.999 8 | 0.056~1.12 |

人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 的平均质量分数分别为 2.372、0.637、0.573、0.136、3.679、1.838、1.936、1.149、0.083、0.569、0.086 mg/g, RSD 分别为 1.85%、2.63%、2.59%、1.10%、2.96%、2.20%、2.92%、2.33%、1.62%、1.24%、2.56%,表明该方法的重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份红参供试品溶液(批号 20181125),室温下放置,分别于 0、2、4、8、12、24 h 在上述色谱条件下测定,每次进样量 10 μL,记录峰面积。计算得,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 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 峰面积的 RSD 分别为 0.75%、0.88%、0.34%、0.91%、1.63%、1.43%、2.58%、0.88%、0.94%、1.71%、1.83%,表明溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已测定红参(批号 20181125,相当于含人参皂苷 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 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 分别为 1.186、0.318、0.286、0.068、1.839、0.919、0.499、0.574、0.041、0.284、0.043 mg)粉末 0.5 g,平行称取 6 份,以药材中各成分-对照品量(1:1)的比例加入一定量的对照品,再按“2.3”项方法平行制备 6 份供试品溶液,测定 11 种人参皂苷的峰面积,并计算出相应的加样回收率和 RSD。人参皂苷 Rg₁、人

皂苷 Re、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 的加样回收率分别为 100.60%、99.15%、101.82%、98.95%、101.93%、98.30%、100.52%、99.57%、98.54%、102.59%、101.74%，RSD 分别为 1.65%、1.43%、1.57%、1.12%、1.96%、1.21%、2.24%、1.68%、1.57%、1.12%、2.41%。

2.5 相对校正因子 (f) 的确定

校正因子的计算按线性关系考察项下的试验方

法, $f=f_i/f_s=(A_i/W_i)/(A_s/W_s)^{[11]}$, A_i 为待测成分的峰面积, W_i 为待测成分的质量; A_s 为内参物 s 的峰面积, W_s 为内参物 s 的质量。取“2.2”项下混合对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下, 进样体积 1、2、4、6、8、10、15、20 μL 下, 分别计算人参皂苷 Rb₁、Ro 作为内参物时, 11 种人参皂苷的 f , 并将结果进行比较, 结果见表 4、5。结果表明, 人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Ro 作为内参物时 RSD 均小于 3% 符合实验要求, 根据价廉易得的原则本实验选取人参皂苷 Rb₁ 作为内参物。

表 4 人参皂苷 Rb₁ 作为内参物各成分 f

Table 4 f of each component used Ginsenoside Rb1 as the internal reference substance

| 进样体积/ μl | $f_{Rg1/Rb1}$ | $f_{Re/Rb1}$ | $f_{Rf/Rb1}$ | $f_{Rh1/Rb1}$ | $f_{Rc/Rb1}$ | $f_{Ro/Rb1}$ | $f_{Rb2/Rb1}$ | $f_{Rb3/Rb1}$ | $f_{Rd/Rb1}$ | $f_{Rg3/Rb1}$ |
|---------------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 1 | 1.030 8 | 1.118 7 | 0.921 5 | 1.096 1 | 0.911 9 | 1.115 0 | 0.892 8 | 0.838 6 | 1.028 1 | 1.393 9 |
| 2 | 1.041 4 | 1.104 2 | 0.915 4 | 1.080 8 | 0.929 8 | 1.114 4 | 0.917 2 | 0.834 7 | 1.030 1 | 1.429 7 |
| 4 | 1.027 5 | 1.098 2 | 0.912 3 | 1.077 1 | 0.920 4 | 1.106 3 | 0.901 7 | 0.830 7 | 1.022 1 | 1.386 3 |
| 6 | 1.007 4 | 1.091 5 | 0.889 9 | 1.066 9 | 0.904 6 | 1.084 5 | 0.890 7 | 0.811 1 | 1.000 2 | 1.344 4 |
| 8 | 1.035 4 | 1.105 3 | 0.908 7 | 1.081 7 | 0.924 0 | 1.109 9 | 0.910 4 | 0.828 6 | 1.022 4 | 1.390 5 |
| 10 | 1.025 2 | 1.106 9 | 0.904 7 | 1.131 1 | 0.929 3 | 1.103 7 | 0.903 3 | 0.824 8 | 1.018 8 | 1.377 8 |
| 15 | 1.023 7 | 1.103 3 | 0.913 8 | 1.058 7 | 0.914 5 | 1.094 2 | 0.911 5 | 0.833 7 | 1.016 4 | 1.374 1 |
| 20 | 1.004 7 | 1.097 6 | 0.902 3 | 1.078 6 | 0.906 5 | 1.102 4 | 0.905 6 | 0.824 7 | 1.012 1 | 1.394 3 |
| 均值 | 1.024 5 | 1.103 2 | 0.908 6 | 1.083 9 | 0.917 6 | 1.103 8 | 0.904 2 | 0.828 4 | 1.018 8 | 1.386 4 |
| RSD/% | 1.243 5 | 0.727 8 | 1.066 3 | 2.029 5 | 1.092 0 | 0.868 6 | 1.009 9 | 1.022 0 | 0.933 1 | 1.724 5 |

表 5 人参皂苷 Ro 作为内参物各成分 f

Table 5 f of each component Ginsenoside Ro as the internal reference substance

| 进样体积/ μl | $f_{Rg1/Ro}$ | $f_{Re/Ro}$ | $f_{Rf/Ro}$ | $f_{Rh1/Ro}$ | $f_{Rb1/Ro}$ | $f_{Rc/Ro}$ | $f_{Rb2/Ro}$ | $f_{Rb3/Ro}$ | $f_{Rd/Ro}$ | $f_{Rg3/Ro}$ |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 1 | 0.928 6 | 1.007 8 | 0.830 1 | 0.987 4 | 0.918 6 | 0.821 5 | 0.832 1 | 0.755 4 | 0.926 1 | 1.288 4 |
| 2 | 0.937 7 | 1.007 7 | 0.824 7 | 0.973 7 | 0.901 4 | 0.837 7 | 0.826 3 | 0.752 0 | 0.928 0 | 1.277 4 |
| 4 | 0.932 4 | 1.007 8 | 0.828 3 | 0.977 9 | 0.908 4 | 0.835 6 | 0.827 7 | 0.754 2 | 0.928 0 | 1.258 6 |
| 6 | 0.930 2 | 1.007 4 | 0.821 3 | 0.984 6 | 0.923 3 | 0.834 8 | 0.822 0 | 0.748 6 | 0.923 1 | 1.249 7 |
| 8 | 0.928 2 | 1.000 4 | 0.815 0 | 0.970 2 | 0.896 5 | 0.828 8 | 0.816 6 | 0.743 2 | 0.917 0 | 1.247 2 |
| 10 | 0.933 6 | 1.007 5 | 0.823 4 | 1.029 5 | 0.909 7 | 0.832 5 | 0.822 2 | 0.750 8 | 0.927 2 | 1.254 0 |
| 15 | 0.927 0 | 1.003 3 | 0.812 3 | 0.985 2 | 0.902 3 | 0.812 2 | 0.829 3 | 0.733 8 | 0.925 4 | 1.264 1 |
| 20 | 0.934 6 | 1.001 3 | 0.807 2 | 0.970 4 | 0.905 7 | 0.824 2 | 0.814 5 | 0.742 7 | 0.928 6 | 1.288 4 |
| 均值 | 0.931 5 | 1.005 4 | 0.820 3 | 0.984 9 | 0.908 2 | 0.828 4 | 0.823 9 | 0.747 6 | 0.925 4 | 1.262 8 |
| RSD/% | 0.394 6 | 0.311 7 | 0.980 0 | 1.953 9 | 0.988 7 | 0.711 7 | 0.748 0 | 0.970 3 | 0.414 3 | 1.201 2 |

2.6 f 的耐用性评价

2.6.1 不同色谱柱系统对 f 的影响 实验采用 Shimadzu LC-2030 高效液相色谱系统和 Agilent 1260 高效液相色谱系统, 分别考察了 3 根不同厂家的色谱柱 (Agilent XDB C₁₈、Waters sunfire C₁₈、H&E ODS C₁₈) 对各人参皂苷 f 的影响, 结果人参皂苷 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 Rc、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₃ 的 RSD

依次为 1.22%、1.62%、1.30%、2.70%、1.30%、1.63%、1.08%、0.91%、0.99%、1.75%, 表明不同色谱系统 & 不同色谱柱对各成分 f 无显著性影响, 结果见表 6。

2.6.2 柱温对 f 的影响 实验采用 Shimadzu LC-2030 高效液相色谱仪系统, Agilent XDB C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 考察不同柱温 (28、30、32、34 $^{\circ}\text{C}$) 对 f 的影响, 结果显示各成分 f 的 RSD 均小于 3%, 表明柱温对各成分的 f 无显著影响, 结果见表 7。

表6 不同色谱柱系统对*f*的影响

Table 6 Effects of different columns and HPLC instruments on *f* values

| 仪器 | 色谱柱 | $f_{Rg1/Rb1}$ | $f_{Re/Rb1}$ | $f_{Rf/Rb1}$ | $f_{Rh1/Rb1}$ | $f_{Rc/Rb1}$ | $f_{Ro/Rb1}$ | $f_{Rb2/Rb1}$ | $f_{Rb3/Rb1}$ | $f_{Rd/Rb1}$ | $f_{Rg3/Rb1}$ |
|-------|-----|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 仪器 1 | 柱 1 | 1.025 2 | 1.106 9 | 0.904 7 | 1.1311 | 0.929 3 | 1.103 7 | 0.903 3 | 0.824 8 | 1.018 8 | 1.377 8 |
| | 柱 2 | 1.018 3 | 1.088 3 | 0.889 7 | 1.1179 | 0.914 9 | 1.134 2 | 0.931 7 | 0.818 3 | 1.023 3 | 1.392 1 |
| | 柱 3 | 1.024 7 | 1.098 9 | 0.912 1 | 1.128 7 | 0.923 8 | 1.156 7 | 0.912 6 | 0.822 5 | 1.013 7 | 1.383 4 |
| 仪器 2 | 柱 1 | 1.048 9 | 1.122 7 | 0.918 9 | 1.076 2 | 0.903 7 | 1.112 8 | 0.923 3 | 0.817 4 | 1.008 9 | 1.362 7 |
| | 柱 2 | 1.015 6 | 1.097 1 | 0.903 2 | 1.084 1 | 0.934 1 | 1.124 5 | 0.911 5 | 0.831 7 | 1.014 8 | 1.383 9 |
| | 柱 3 | 1.037 3 | 1.136 2 | 0.921 7 | 1.155 4 | 0.908 7 | 1.128 6 | 0.914 2 | 0.809 7 | 1.037 5 | 1.371 6 |
| 平均值 | | 1.029 3 | 1.104 2 | 0.904 7 | 1.113 5 | 0.917 9 | 1.126 9 | 0.917 7 | 0.820 8 | 1.016 2 | 1.379 0 |
| RSD/% | | 1.220 6 | 1.620 8 | 1.297 3 | 2.707 9 | 1.307 9 | 1.630 0 | 1.085 3 | 0.909 6 | 0.991 0 | 1.750 7 |

表7 不同柱温对*f*的影响

Table 7 Effects of different column temperature on *f* values

| 柱温/°C | $f_{Rg1/Rb1}$ | $f_{Re/Rb1}$ | $f_{Rf/Rb1}$ | $f_{Rh1/Rb1}$ | $f_{Rc/Rb1}$ | $f_{Ro/Rb1}$ | $f_{Rb2/Rb1}$ | $f_{Rb3/Rb1}$ | $f_{Rd/Rb1}$ | $f_{Rg3/Rb1}$ |
|-------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 28 | 1.028 7 | 1.121 3 | 0.909 1 | 1.074 1 | 0.917 2 | 1.113 5 | 0.913 8 | 0.829 0 | 1.022 9 | 1.391 2 |
| 30 | 1.038 6 | 1.108 2 | 0.913 7 | 1.093 8 | 0.918 9 | 1.134 6 | 0.904 2 | 0.833 1 | 1.029 6 | 1.454 3 |
| 32 | 1.039 4 | 1.103 1 | 0.918 4 | 1.087 6 | 0.924 7 | 1.142 8 | 0.937 8 | 0.825 0 | 1.037 1 | 1.456 8 |
| 34 | 1.033 9 | 1.096 5 | 0.917 3 | 1.059 3 | 0.933 6 | 1.121 0 | 0.927 1 | 0.822 6 | 1.067 7 | 1.429 9 |
| 均值 | 1.035 2 | 1.107 3 | 0.914 6 | 1.078 7 | 0.923 6 | 1.128 0 | 0.920 7 | 0.826 3 | 1.024 6 | 1.411 0 |
| RSD/% | 0.4770 | 0.9488 | 0.486 | 1.4209 | 0.8012 | 1.1693 | 1.6027 | 0.7281 | 0.7065 | 1.6112 |

2.6.3 不同流动相体积流量对*f*的影响 实验采用了不同体积流量（1.0、1.1、1.2、1.3 mL/min）对 Shimadzu LC-2030 高效液相色谱仪系统，Agilent XDB C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），考察了各成分*f*的 RSD 均小于 3%，表明不同体积流量对各成分*f*无显著影响，结果见表 8。

表8 不同体积流量对*f*的影响

Table 8 Effects of volume flow rate on *f*

| 体积流量/(mL·min ⁻¹) | $f_{Rg1/Rb1}$ | $f_{Re/Rb1}$ | $f_{Rf/Rb1}$ | $f_{Rh1/Rb1}$ | $f_{Rc/Rb1}$ | $f_{Ro/Rb1}$ | $f_{Rb2/Rb1}$ | $f_{Rb3/Rb1}$ | $f_{Rd/Rb1}$ | $f_{Rg3/Rb1}$ |
|------------------------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 1.0 | 1.032 7 | 1.102 4 | 0.923 3 | 1.044 6 | 0.913 3 | 1.143 7 | 0.898 7 | 0.833 7 | 1.024 3 | 1.404 9 |
| 1.1 | 1.004 2 | 1.117 2 | 0.919 7 | 1.063 1 | 0.943 7 | 1.109 6 | 0.886 1 | 0.799 2 | 1.036 4 | 1.453 8 |
| 1.2 | 1.024 1 | 1.091 8 | 0.894 5 | 1.092 1 | 0.914 8 | 1.115 8 | 0.913 8 | 0.804 8 | 1.017 7 | 1.417 3 |
| 1.3 | 1.031 5 | 1.126 4 | 0.905 1 | 1.088 4 | 0.923 8 | 1.166 2 | 0.924 9 | 0.816 9 | 1.028 4 | 1.395 1 |
| 均值 | 1.023 1 | 1.109 5 | 0.910 7 | 1.072 1 | 0.923 9 | 1.133 8 | 0.905 9 | 0.813 7 | 1.026 7 | 1.417 8 |
| RSD/% | 1.288 0 | 1.385 3 | 1.464 5 | 2.087 8 | 1.514 3 | 2.309 7 | 1.876 9 | 1.877 0 | 0.762 3 | 1.811 1 |

2.7 待测成分色谱峰的定位

在 QAMS 的运用中，目前常用的色谱峰定位方法有相对保留值法、保留时间差、时间校正法、对照提取物法等。保留时间差法计算公式： $\Delta t_{i/s} = t_i - t_s$ 。相对保留值计算公式： $t_{i/s} = t_i / t_s$ 。本实验选取相对保留值作为色谱峰的定位方法^[12-13]。本实验采用相对保留时间进行待测组分色谱峰的定位，采用 Shimadzu LC-2030 高效液相色谱系统和 Agilent 1260 高效液相色谱系统，分别考察了 3 根不同厂家的色谱柱（Agilent XDB C₁₈、Waters sunfire C₁₈、H&E ODS-A C₁₈）中各待测成分的相对保留时间。测定结果为 $t_{Rg1/Rb1} = 0.6040$ 、 $t_{Re/Rb1} = 0.6165$ 、 $t_{Rf/Rb1} = 0.8548$ 、 $t_{Rh1/Rb1} = 0.9598$ 、 $t_{Rc/Rb1} = 1.0425$ 、 $t_{Ro/Rb1} = 1.0499$ 、 $t_{Rb2/Rb1} = 1.0828$ 、 $t_{Rb3/Rb1} = 1.0975$ 、 $t_{Rd/Rb1} =$

1.1630、 $t_{Rg3/Rb1} = 1.5656$ ，波动较小，RSD 分别为 0.342 2%、1.217 5%、0.954 9%、0.643 8%、0.374 0%、1.005 9%、0.357 8%、0.381 3%、0.250 8%、0.284 2% 均小于 3%，无显著性差异，如表 9 所示。

2.8 QAMS 和外标法测定结果比较

10 批红参药材，按“2.3”项下供试品制备方法，“2.1”项下方法分析，采用 QAMS 与外标法分别计算各成分含量，QAMS 定量计算公式如下。 $w_i = (w_s \times A_i) / (f \times A_s)$ ， A_s 为参照物峰面积， w_s 为参照物量； A_i 为待测成分峰面积， w_i 为待测分量； f 为参照物与待测成分 f ^[14-15]，将 QAMS 计算值与外标法实测值进行配对 t 检验，结果 P 值均 > 0.05 ，表明 2 种测定方法的结果无显著性差异，结果见表 10。

表9 相对保留时间

Table 9 Relative retention time values

| 仪器 | 色谱柱 | $t_{Rg1}/Rb1$ | $t_{Re}/Rb1$ | $t_{Rf}/Rb1$ | $t_{Rh1}/Rb1$ | $t_{Rc}/Rb1$ | $t_{Ro}/Rb1$ | $t_{Rb2}/Rb1$ | $t_{Rb3}/Rb1$ | $t_{Rd}/Rb1$ | $t_{Rg3}/Rb1$ |
|-------|-----|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 仪器 1 | 柱 1 | 0.607 4 | 0.619 8 | 0.867 2 | 0.956 9 | 1.045 7 | 1.056 2 | 1.085 6 | 1.100 7 | 1.163 2 | 1.560 2 |
| | 柱 2 | 0.604 8 | 0.617 3 | 0.854 8 | 0.964 6 | 1.043 9 | 1.058 3 | 1.084 2 | 1.099 3 | 1.168 2 | 1.568 3 |
| | 柱 3 | 0.603 5 | 0.626 2 | 0.843 8 | 0.964 3 | 1.044 1 | 1.038 4 | 1.084 4 | 1.099 3 | 1.162 7 | 1.568 7 |
| 仪器 2 | 柱 1 | 0.604 1 | 0.617 1 | 0.855 2 | 0.965 6 | 1.045 9 | 1.034 8 | 1.086 4 | 1.101 2 | 1.160 8 | 1.570 6 |
| | 柱 2 | 0.603 1 | 0.615 2 | 0.859 3 | 0.949 8 | 1.038 7 | 1.052 9 | 1.079 1 | 1.093 7 | 1.163 1 | 1.560 3 |
| | 柱 3 | 0.601 2 | 0.603 3 | 0.848 6 | 0.957 4 | 1.036 5 | 1.058 7 | 1.076 8 | 1.091 0 | 1.159 8 | 1.565 3 |
| 平均值 | | 0.604 0 | 0.616 5 | 0.854 8 | 0.959 8 | 1.042 5 | 1.049 9 | 1.082 8 | 1.097 5 | 1.163 0 | 1.565 6 |
| RSD/% | | 0.342 2 | 1.217 5 | 0.954 9 | 0.643 8 | 0.374 0 | 1.005 9 | 0.357 8 | 0.381 3 | 0.250 8 | 0.284 2 |

表10 QAMS 与外标法含量测定结果

Table 10 Determination results of QAMS and external standard method

| 编号 | 人参皂苷 Rb ₁ | 人参皂苷 Rg ₁ | | 人参皂苷 Re | | 人参皂苷 Rf | | 人参皂苷 Rh ₁ | | 人参皂苷 Rc | |
|-----|----------------------|----------------------|-------|---------|-------|---------|-------|----------------------|-------|---------|-------|
| | | 外标法 | QAMS | 外标法 | QAMS | 外标法 | QAMS | 外标法 | QAMS | 外标法 | QAMS |
| S1 | 5.138 | 3.287 | 3.304 | 0.906 | 0.922 | 0.850 | 0.868 | 0.389 | 0.403 | 3.575 | 3.626 |
| S2 | 5.226 | 3.046 | 3.075 | 0.827 | 0.854 | 0.853 | 0.871 | 0.367 | 0.382 | 2.420 | 2.453 |
| S3 | 2.917 | 2.348 | 2.386 | 0.721 | 0.738 | 0.478 | 0.493 | 0.128 | 0.148 | 1.260 | 1.269 |
| S4 | 3.284 | 2.521 | 2.542 | 0.683 | 0.707 | 0.604 | 0.610 | 0.241 | 0.246 | 1.130 | 1.217 |
| S5 | 2.554 | 1.882 | 1.893 | 0.448 | 0.471 | 0.462 | 0.479 | 0.122 | 0.132 | 1.450 | 1.462 |
| S6 | 3.668 | 2.366 | 2.381 | 0.622 | 0.635 | 0.566 | 0.580 | 0.141 | 0.161 | 1.838 | 1.897 |
| S7 | 3.811 | 2.673 | 2.686 | 0.583 | 0.594 | 0.375 | 0.399 | 0.098 | 0.112 | 1.464 | 1.502 |
| S8 | 4.053 | 3.445 | 3.457 | 0.664 | 0.667 | 0.437 | 0.450 | 0.194 | 0.205 | 1.917 | 1.986 |
| S9 | 2.572 | 1.883 | 1.885 | 0.425 | 0.437 | 0.348 | 0.361 | 0.088 | 0.093 | 1.535 | 1.542 |
| S10 | 2.658 | 1.948 | 1.976 | 0.443 | 0.456 | 0.395 | 0.414 | 0.113 | 0.122 | 1.677 | 1.682 |

| 编号 | 人参皂苷 Ro | | 人参皂苷 Rb ₂ | | 人参皂苷 Rb ₃ | | 人参皂苷 Rd | | 人参皂苷 Rg ₃ | |
|-----|---------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|---------|-------|----------------------|-------|
| | 外标法 | QAMS | 外标法 | QAMS | 外标法 | QAMS | 外标法 | QAMS | 外标法 | QAMS |
| S1 | 4.113 | 4.142 | 2.815 | 2.828 | 0.285 | 0.299 | 1.604 | 1.629 | 0.162 | 0.172 |
| S2 | 4.027 | 4.059 | 2.047 | 2.061 | 0.246 | 0.260 | 1.336 | 1.361 | 0.145 | 0.147 |
| S3 | 2.724 | 2.736 | 1.336 | 1.374 | 0.183 | 0.194 | 0.644 | 0.658 | 0.096 | 0.098 |
| S4 | 3.018 | 3.041 | 1.082 | 1.098 | 0.157 | 0.168 | 0.693 | 0.717 | 0.083 | 0.096 |
| S5 | 2.237 | 2.258 | 1.225 | 1.238 | 0.148 | 0.150 | 0.535 | 0.552 | 0.075 | 0.080 |
| S6 | 1.918 | 1.958 | 1.143 | 1.147 | 0.092 | 0.088 | 0.564 | 0.599 | 0.094 | 0.102 |
| S7 | 2.635 | 2.667 | 1.258 | 1.305 | 0.120 | 0.121 | 0.817 | 0.842 | 0.093 | 0.101 |
| S8 | 3.248 | 3.282 | 1.739 | 1.746 | 0.194 | 0.205 | 0.872 | 0.893 | 0.115 | 0.119 |
| S9 | 2.397 | 2.414 | 1.543 | 1.547 | 0.107 | 0.116 | 0.932 | 0.950 | 0.124 | 0.128 |
| S10 | 2.423 | 2.441 | 1.615 | 1.621 | 0.143 | 0.158 | 0.953 | 0.974 | 0.135 | 0.137 |

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

本实验考察了流动相磷酸水比例, 流动相体积流量, 在流动相磷酸水比例选取方面考察了乙腈-0.05%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水以及乙腈-水 3 种比例, 结果在乙腈-0.05%磷酸水和乙腈-水为流动相时, 基线出现较大漂移, 而以乙腈-0.1%磷酸水为流动相基线稳定性好且峰形尖锐。在流动相体积流量方面, 考察了 1.0、1.1、1.2、1.3 mL/min 4 种体

积流量, 结果发现前 3 种体积流量人参皂苷 Rg₁ 与 人参皂苷 Re 的峰没能得到完全分离, 在体积流量为 1.3 mL/min 时人参皂苷 Rg₁ 与 人参皂苷 Re 得到有效分离, 且其它各成分峰形均较好。因此本实验在乙腈-0.1%磷酸水为流动相的基础上设定流动相体积流量为 1.3 mL/min。

3.2 红参 QAMS 质量评价

在红参的质量控制方面, 《中国药典》2020 年版规定红参中人参皂苷 Rg₁ 和 人参皂苷 Re 含量不

少于 0.25%，人参皂苷 Rb₁ 含量不少于 0.20%。本研究在此基础上，采用 QAMS 同时测定了 11 种人参皂苷的含量，并且其中人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rb₃ 和人参皂苷 Rg₃ 是红参中稀有皂苷，对其进行测定可以更好的全面评价红参的质量。QAMS 含量测定结果与外标法进行了验证，结果表明 QAMS 测定结果与外标法测定结果无显著性差异，因此可用 QAMS 代替外标法对红参中人参皂苷进行含量测定，采用 QAMS 可用一个内参物即可求得其它成分的含量，在节省实验成本的同时，也减少了科研人员的时间成本，更加快速准确的对红参质量做出评价。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 160-161.
 [2] 石婧婧, 陈舒好, 邹立思, 等. 超快速液相色谱-三重四级杆-线性离子阱质谱法分析人参和红参中皂苷类成分 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(22): 1944-1951.
 [3] 王京辉, 陈晶, 郭洪祝, 等. 进口红参与国产红参皂苷类成分含量及鉴别成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(13): 1070-1076.
 [4] Wang C M, Liu J, Deng J Q, et al. Advances in the chemistry, pharmacological diversity, and metabolism of 20(R)-ginseng saponins [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(1): 14-23.
 [5] 鲁文茜, 张斯琪, 沈尚竹, 等. 人参皂苷 Rc 药理作用和药动学研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5961-5967.
 [6] Chung K S, Cho S H, Shin J S, et al. Ginsenoside Rh₂

induces cell cycle arrest and differentiation in human leukemia cells by upregulating TGF-β expression [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(2): 331-340.
 [7] Takei M, Tachikawa E, Umeyama A. Dendritic cells promoted by ginseng saponins drive a potent Th1 polarization [J]. *Biomark Insights*, 2008, 3: 269-286.
 [8] Seo J Y, Ju S H, Oh J, et al. Neuroprotective and cognition-enhancing effects of compound K isolated from red ginseng [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(14): 2855-2864.
 [9] Shen L, Haas M, Wang D Q H, et al. Ginsenoside Rb₁ increases insulin sensitivity by activating AMP-activated protein kinase in male rats [J]. *Physiol Rep*, 2015, 3(9): e12543.
 [10] 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.
 [11] 冯伟红, 李春, 吉丽娜, 等. 基于高分离度和对照图谱的红参中 9 种人参皂苷类成分“一测多评”质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3389-3399.
 [12] 谭诗涵, 伍红年, 雷雅婷, 等. 一测多评法测定竹节参中 7 种皂苷类成分的含量 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4164-4169.
 [13] 孙磊, 叶六平, 于新兰, 等. HPLC 相对保留时间法中参照物的优选 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(3): 420-428.
 [14] 刘小妹, 程中琴, 施崇精, 等. 一测多评法同时测定人参中人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Re、Rc、Rb₂、Rd [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1413-1417.
 [15] 李晓青, 田雅娟, 杜娟, 等. 一测多评法测定人参花中 7 种人参皂苷含量 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6120-6124.

[责任编辑 时圣明]