

人参中人参皂苷类成分含量测定方法优化

郭凤霞 陈路晓 刘斌 姜艳艳

【摘要】 目的 优化人参中皂苷类成分人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 含量测定方法。**方法** 采用单因素考察方式,对提取方式、提取溶剂、溶剂倍量和提取时间 4 个因素进行考察,采用 HPLC 法测定人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 含量,分析比较含量测定结果。**结果** 人参中皂苷类成分含量测定供试品溶液制备最佳方法为采用 50 倍的 70% 甲醇回流提取人参 2.5 小时。**结论** 本实验所建立的方法操作简单、准确可靠、重现性好,为人参皂苷的含量测定提供较优方法。

【关键词】 人参皂苷; 含量测定; 优化

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.10.001

Improvement in determination method for Ginsenosides in Ginseng GUO Feng-xia, CHEN Lu-xiao, LIU Bin, et al. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
Corresponding author: JIANG Yan-yan, E-mail: jyyjm1129@163.com

【Abstract】 Objective To improve the determination method of ginsenoside Rg_1 , ginsenoside Re

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院 [郭凤霞(硕士研究生)、陈路晓(硕士研究生)、刘斌、姜艳艳]

作者简介: 郭凤霞(1990-),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础研究。E-mail: gfx521713@163.com

通讯作者: 姜艳艳(1980-),女,博士,副教授。研究方向:中药药效物质基础及质量控制方法研究。E-mail: jyyjm1129@163.com

and ginsenoside Rb₁ in ginseng. **Methods** Four factors including extraction method, extraction solvent, solvent volume and extraction time were studied through single-factor test method. And HPLC method was adopted to analyze the determination results of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re and ginsenoside Rb₁.

Results The best sample preparation conditions for the content determination of ginsenosides were 50 times 70% methanol, reflux extraction and duration of 2.5 h. **Conclusions** The improved method is simple, accurate, and reproducible which could supply a better method for the content determination of ginsenosides.

[Key words] Ginsenosides; Determination; Improvement

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 的干燥根和根茎,为常用名贵药材。人参具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血和安神益智的功效,临床上用于体虚欲脱,脾虚食少,肺虚喘咳,津伤口渴,气血亏虚。人参中主要含有皂苷、多糖、挥发油等化学成分^[1],《中华人民共和国药典》(一部)^[2]中,以人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁为含量测定指标性成分,对其进行质量控制。在《中华人民共和国药典》(一部)人参“含量测定”项下供试品溶液制备方法中,人参药材粉末采用氯仿连续回流提取,药渣挥去氯仿,再用水饱和正丁醇浸泡,放置过夜后超声处理提取皂苷类成分。《中华人民共和国药典》(一部)中规定人参中人参皂苷含量限度为含人参皂苷 Rg₁和人参皂苷 Re 的总量不得少于 0.30%,人参皂苷 Rb₁不得少于 0.20%。

在采用人参含量测定项下方法进行供试品溶液制备时,发现该方法存在以下问题:(1)该方法中,氯仿回流提取的目的是为了除去脂溶性杂质,而实际工作中发现,人参药材粉末采用氯仿连续回流提取后,氯仿提取液几乎无色,且蒸干后残渣量很少,此步骤未除去脂溶性杂质;(2)采用水饱和正丁醇提取人参皂苷时,先放置过夜(约 12 小时),再超声处理,此过程所需时间太长,且无实际意义,故“放置过夜”步骤可以省略;超声处理提取皂苷类成分时,发现所得正丁醇提取液颜色较浅,溶液蒸干后,所得残渣量较少,且平行操作两份差距较大。综合分析实验现象和结果,并结合文献^[3-5]中方法推测,采用正丁醇作为提取溶剂进行超声处理,未能把人参中皂苷类成分提取完全,故导致含量测定结果偏低且误差较大。其原因可能在于正丁醇为脂溶性有机溶剂,在提取过程中,不能有效穿透细胞膜,因而不能将皂苷类成分完全溶出。

中药指标性成分含量测定方法的正确性、合理性是中药质量控制和开发应用的基础。针对人参中人

参皂苷类成分含量测定方法中供试品溶液制备过程的不合理问题,本文拟对人参中皂苷类成分含量测定中供试品制备方法进行优化,以保证人参含量测定结果的真实可靠,结果可信。改进后人参中皂苷类成分含量测定方法中供试品溶液制备方法简单、适用,结果准确可靠,重复性好,为人参科学的质量控制与评价及进一步开发应用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 药材与试剂

人参药材购自河北安国药材市场(三批样批号分别是 1:140201CP390,2:301002041,3:20140416,经北京中医药大学药系张贵君教授鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Mey),甲醇、三氯甲烷、正丁醇、乙醇(分析纯,北京化工试剂厂),乙腈(色谱纯,塞默飞世尔科技有限公司),水(娃哈哈纯净水),人参皂苷 Rg₁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110703-201529),人参皂苷 Re 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110754-201324),人参皂苷 Rb₁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110704-201424)。

1.2 仪器

Waters 1525-2489 高效液相色谱系统, Breeze2 色谱工作站(美国 Waters 公司), Sartorius BT 25S 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司), EQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), HH-S2 二孔智控水浴锅(郑州长城科工贸有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

参照《中华人民共和国药典》(一部)中人参含量测定项下方法色谱条件。SunFireC₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 检测波长: 203 nm, 流速: 1.0 mL/min, 流动相 A 为乙腈, B 为水, 按表 1 中

规定进行梯度洗脱,理论板数按人参皂苷 Rg_1 峰计算应不低于 6000。

表 1 流动相梯度洗脱表

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~35	19	81
35~55	19→29	81→71
55~70	29	71
70~100	29→40	71→60

2.2 对照品溶液的制备

精密称取人参皂苷 Rg_1 对照品 7.89 mg, 人参皂苷 Re 对照品 8.03 mg 和人参皂苷 Rb_1 对照品 8.61 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解、稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密量取人参皂苷 Rg_1 对照品储备液 2.5 mL, 人参皂苷 Re 对照品储备液 2.5 mL 和人参皂苷 Rb_1 对照品储备液 2.3 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液制备方法的建立

2.3.1 提取方式考察 (1) 药典方法^[2]: 取人参药材粉末(过 4 号筛) 1 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加三氯甲烷, 加热回流 3 小时, 弃去三氯甲烷, 药渣挥干溶剂, 连同滤纸筒移入 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 30 分钟, 过滤, 取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转溶至 5 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

(2) 回流提取: 取人参药材粉末(过 4 号筛) 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流 2 小时, 取出, 密塞, 放冷, 补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转溶至 5 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

(3) 超声处理: 取人参药材粉末(过 4 号筛) 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 1 小时, 取出, 密塞, 放冷, 补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转溶至 5 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

依上述色谱条件, 精密吸取对照品溶液 10 μ L 和上述供试品溶液 20 μ L, 分别进样分析, 测定色谱峰峰面积, 计算含量。

由表 2 可见, 采用回流提取方式, 所测人参皂苷 Rg_1 , 人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb_1 的含量最高, 故确

定提取方式为回流提取。

表 2 提取方式考察结果

提取方法	人参皂苷 Rg_1 含量(%)	人参皂苷 Re 含量(%)	人参皂苷 Rb_1 含量(%)
药典方法	0.41	0.19	0.37
回流提取	0.96	0.53	1.60
超声处理	0.77	0.46	1.04

2.3.2 提取溶剂考察 取人参药材粉末(过 4 号筛) 1 g, 精密称定, 置具锥形瓶中, 分别精密加入甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇和乙醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流 2 小时, 取出, 补足减失的重量, 过滤, 取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中蒸干, 残渣分别加甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇和乙醇溶解, 转溶至 5 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

由表 3 可见, 以 70% 甲醇作为提取溶剂, 所测人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb_1 含量高于其他提取溶剂结果, 故选择提取溶剂为 70% 甲醇。

表 3 提取溶剂考察结果

提取溶剂	人参皂苷 Rg_1 含量(%)	人参皂苷 Re 含量(%)	人参皂苷 Rb_1 含量(%)
甲醇	0.90	0.50	1.61
70% 甲醇	1.26	0.54	2.18
50% 甲醇	1.26	0.54	2.06
乙醇	0.76	0.45	1.22

2.3.3 提取时间考察 取人参药材粉末(过 4 号筛) 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定重量, 加热回流 1 小时, 1.5 小时, 2 小时, 2.5 小时, 3 小时, 取出, 放冷, 补足减失的重量, 过滤, 取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加 70% 甲醇溶解, 转溶至 5 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

由表 4 可见, 加热回流 2.5 小时后人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb_1 总含量基本不再增加, 故选用 2.5 小时作为提取时间。

表 4 提取时间考察结果

提取时间	人参皂苷 Rg_1 含量(%)	人参皂苷 Re 含量(%)	人参皂苷 Rb_1 含量(%)
1 小时	1.35	0.66	1.98
1.5 小时	1.35	0.67	2.12
2 小时	1.37	0.65	2.23
2.5 小时	1.36	0.67	2.55
3 小时	1.36	0.67	2.59

2.3.4 溶剂倍量考察 取人参药材粉末(过 4 号筛)1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 70% 甲醇 30 mL(30 倍量),40 mL(40 倍量),50 mL(50 倍量),60 mL(60 倍量),称定重量,加热回流 2.5 小时,取出,补足减失的重量,过滤,分别取续滤液 15 mL、20 mL、25 mL、30 mL 置蒸发皿中蒸干,残渣加 70% 甲醇溶解,转溶至 5 mL 量瓶中,稀释至刻度,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

表 5 数据说明,采用 50 倍和 60 倍 70% 甲醇提取,所测人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb_1 总含量基本相当,故选择 50 倍作为提取倍量。

表 5 溶剂倍量考察结果

溶剂倍量 (mL/g)	人参皂苷 Rg_1 含量(%)	人参皂苷 Re 含量(%)	人参皂苷 Rb_1 含量(%)
30	1.37	0.66	2.16
40	1.37	0.66	2.18
50	1.38	0.65	2.27
60	1.40	0.66	2.24

综上,人参中皂苷类成分含量测定供试品溶液制备最佳方法为:取人参药材粉末(过 4 号筛)1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,密塞,称定重量,加热回流 2.5 小时,取出,密塞,放冷,补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液 25 mL,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解,转溶至 5 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 样品测定

取市售三批人参药材样品,按样品供试品溶液制备方法制备,测定色谱峰峰面积,计算含量。结果见表 6。

表 6 三批样品测定结果($n=3$)

批号	人参 皂苷 Rg_1 含量(%)	RSD (%)	人参 皂苷 Re 含量(%)	RSD (%)	人参 皂苷 Rb_1 含量(%)	RSD (%)
1	1.39	2.44	0.70	2.70	2.22	2.08
2	3.05	1.09	1.48	0.86	4.12	1.39
3	1.11	0.90	0.80	0.38	1.53	1.30

3 讨论

3.1 提取方式选择

通过比较药典方法、回流提取和超声处理的含量测定结果,发现药典方法测定结果明显偏低。采用回流提取不仅可以缩短样品处理时间,省去氯仿除杂环节,节省有机溶剂,减少实验步骤,同时可以提高人参皂苷提取率,保证实验结果的准确度和重复性。

3.2 提取溶剂选择

比较甲醇溶液提取与乙醇溶液提取的含量测定结果,乙醇提取率明显较低。进一步研究发现 70% 甲醇提取率略高于 50% 甲醇溶液提取率,且在实验中发现,采用 50% 甲醇作为提取溶剂,提取得到的水溶性杂质较多,故选择提取溶剂为 70% 甲醇溶液。

3.3 提取时间选择

比较 1 小时、1.5 小时、2 小时、2.5 小时和 3 小时回流提取含量测定的结果,人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 的含量基本不变,人参皂苷 Rb_1 的含量随时间延长明显增加,2.5 小时后基本不再增加,故选 2.5 小时作为提取时间。

3.4 溶剂倍量选择

实验中采用 50 倍量和 60 倍量 70% 甲醇提取时,人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb_1 总含量大致相同,考虑节省成本,本实验采用 50 倍量 70% 甲醇提取。

此外,研究过程中还发现采用本方法处理样品,人参皂苷提取率会明显增加,若以此法测定人参中人参皂苷的含量,其含量限度的制订尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:8.

[3] 曲帅. 人参有效活性成分的提取分离及含量测定[D]. 长春:吉林大学,2013.

[4] 杨雨,郑斯文,金银萍,等. 人参皂苷的提取分离方法研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):214-217.

[5] 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.

(收稿日期: 2015-05-28)
(本文编辑: 董历华)