

HPLC 法同时测定不同生长年限、部位西洋参中 2 类成分

李嘉欣¹, 李梦瑶², 张单丽¹, 温馨¹, 屈春园¹, 刘志^{1,3*}
(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林市食品药品检验所, 吉林 吉林 132000;
3. 吉林农业大学农业现代化综合技术研究所, 吉林 长春 130118)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定西洋参中丙二酰基人参皂苷、中性人参皂苷的含有量。**方法** 西洋参 80% 甲醇提取液的分析采用 COSMOSIL 5C₁₈-MS-Ⅱ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-磷酸缓冲盐, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃, 检测波长 203 nm。**结果** 丙二酰基人参皂苷、中性人参皂苷在 0.010~0.640 mg/mL 范围内线性关系良好 ($r>0.999\ 1$), 平均加样回收率 96.2%~104.6%, RSD 0.74%~2.58%。**结论** 该方法简便、重复性好, 可用于西洋参的质量控制。
关键词: 西洋参; 丙二酰基人参皂苷; 中性人参皂苷; HPLC
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)10-2670-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.025

Simultaneous determination of two types of constituents in *Panax quinquefolium* with different growing years and parts by HPLC

LI Jia-xin¹, LI Meng-yao², ZHANG Dan-li¹, WEN Xin¹, QU Chun-yuan¹, LIU Zhi^{1,3*}
(1. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin Municipal Institute of Food and Drug Control, Jilin 132000, China 3. Institute of Agricultural Modernization, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of malonyl ginsenosides and neutral ginsenosides in *Panax quinquefolium* L.. **METHODS** The analysis of 80% methanol extract of *P. quinquefolium* was performed on a 25 ℃ thermostatic COSMOSIL 5C₁₈-MS-Ⅱ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase of acetonitrile-phosphate buffer flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 203 nm. **RESULTS** Malonyl ginsenosides and neutral ginsenosides showed good linear relationships within the range of 0.010–0.640 mg/mL ($r>0.999\ 1$), whose average recoveries were 96.2%–104.6%, with the RSDs of 0.74%–2.58%. **CONCLUSION** This simple and reproducible method can be used for the quality control of *P. quinquefolium*.
KEY WORDS: *Panax quinquefolium* L.; malonyl ginsenosides; neutral ginsenosides; HPLC

西洋参 *Panax quinquefolium* L. 是五加科人参属多年生草本植物^[1], 原产于北美洲的美国和加拿大, 为世界名贵药材, 具有补气养血、滋阴补肾、延缓衰老等功效^[2-4]。人参皂苷为西洋参的主要有效成分, 可分为人参中性皂苷 (人参皂苷-Rb₁、-Rb₂、-Rb₃、-Rc、-Rd、-Re、-Rg₁) 和人参酸性皂苷 (丙二酰基人参皂苷-Rb₁、-Rb₂、-Rc、-Rd和人参皂苷 Ro)^[5-6], 其中丙二酰基人参皂苷大量存在于人参和西洋参中, 含有量较高, 约占人参总皂苷的 50%^[7], 具有显著的降血糖、调节脂代谢、保护神经系统等作用^[8-9], 但该类化合物极性大、亲水强、结构不稳定, 遇酸、碱或高温条件会发生转化, 脱去丙二酸, 变为相应的中性皂苷。目前, 采用 HPLC 法测定人参皂苷时以人参中

收稿日期: 2019-10-27
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31770378); 吉林省自然科学基金项目 (20180101183JC)
作者简介: 李嘉欣 (1997—), 女, 硕士生, 从事天然产物及新药开发研究。Tel: 18943109357, E-mail: xjxnp16@163.com
* 通信作者: 刘 志 (1978—), 男, 副教授, 硕士生导师, 从事天然产物及新药开发研究。Tel: 18684310049, E-mail: liuzhi1978@126.com

性皂苷为主^[10-12]，而含有量较高的丙二酰基人参皂苷不能同时被测出，造成西洋参总皂苷定量分析的不准确，严重影响其质量评价。本研究采用 HPLC 法同时测定西洋参不同生长年限、部位中丙二酰基人参皂苷、中性人参皂苷的含有量，为该药材的科学鉴定和质量评价提供依据。

1 材料

1.1 仪器与药物 LC-20AT 型高效液相色谱仪，配置 SPD-20A/20AV 紫外检测器、LC-20AT 二元输液泵、LC solution 色谱工作站、COSMOSIL 5C₁₈-MS-II（250 mm×4.6 mm，5 μm）（日本岛津公司）；旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）。人参皂苷-Rb₁、-Rb₂、-Rb₃、-Rc、-Rd、-Re、-Rg₁ 均购于中国食品药品检定研究院；丙二酰基人参皂苷-Rb₁、-Rb₂、-Rc、-Rd 和人参皂苷 Ro 均为实验室自制，纯度为 99%。乙腈、甲醇为色谱纯（美国 Fisher 公司）；其他试剂均为分析纯（北京化工厂）。

1.2 药材 鲜西洋参（S1~S4）、西洋参茎叶（S5）采自靖宇县，经吉林农业大学中药材学院郑毅男教授鉴定五加科植物西洋参 *Panax quinque folium* L.，相应部位经 4 年生鲜参分离得到（S6~S13），具体信息见表 1。

将 4 年生鲜西洋参切分为主根、支根、须根、芦头个 4 部分，洗净去除表面泥沙，切碎备用。主根经剥皮分离得周皮、木质部与韧皮部，切碎后备用。

2 方法

2.1 对照品溶液制备 准确称取人参皂苷-Rb₁、-Rb₂、-Rb₃、-Rc、-Rd、-Re、-Rg₁、Ro 和丙二酰基人参皂苷-Rb₁、-Rb₂、-Rc、-Rd 对照品适量，置于同一量瓶内，80% 甲醇溶解定容至 5 mL 量瓶中，制成质量浓度均为 1 mg/mL 的溶液，摇匀，作为贮备液。精密移取 0.2 mL 置于 1 mL 量瓶内，80% 甲醇稀释至刻度，即得，于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

2.2 供试品溶液制备 精密称取鲜西洋参主根、支根、须根、芦头、周皮、韧皮部、木质部、茎叶各 1 g，加入 80% 甲醇 30 mL，25 ℃ 下超声提取 3 次，每次 20 min，40 ℃ 下浓缩提取液至干，30% 乙腈溶解后定容至 10 mL 量瓶中，摇匀放置，0.25 μm 微孔滤膜过滤，即得，4 ℃ 下低温储存。

2.3 色谱条件 COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 0.05 mol/L 磷酸二氢钾（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~20 min，

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	产地	测定部位	生长年限/年
S1	吉林省靖宇县	全参	1
S2	吉林省靖宇县	全参	2
S3	吉林省靖宇县	全参	3
S4	吉林省靖宇县	全参	4
S6	吉林省靖宇县	茎叶	4
S7	吉林省靖宇县	主根	4
S8	吉林省靖宇县	支根	4
S9	吉林省靖宇县	须根	4
S10	吉林省靖宇县	芦头	4
S11	吉林省靖宇县	主根周皮	4
S12	吉林省靖宇县	主根木质部	4
S13	吉林省靖宇县	主根韧皮部	4

22% B；20~25 min，22%~29% B；25~45 min，29% B；45~55 min，29%~35% B；55~60 min，35%~50% B；60~70 min，50%~70% B）；体积流量 1 mL/min；柱温 25 ℃；检测波长 203 nm；进样量 20 μL；分析时间 70 min。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 精密移取“2.1”项下贮备液适量，稀释成 7 个质量浓度，各准确吸取 20 μL，在“2.3”项条件下进样。以人参皂苷峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归，结果见表 2，表明各人参皂苷在 0.01~0.64 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密移取“2.1”项下对照品溶液 20 μL，在“2.3”项条件下连续进样 6 次，测得各人参皂苷峰面积 RSD 分别为 1.46%、1.59%、1.98%、2.07%、0.89%、1.34%、1.63%、1.08%、1.44%、1.25%、2.62%、1.43%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液，在“2.3”项条件下于 0、2、4、8、10、12 h 进样，每次 20 μL，测得各人参皂苷峰面积 RSD 分别为 2.52%、2.01%、1.89%、1.14%、1.64%、1.17%、0.83%、0.97%、1.93%、1.33%、2.08%、1.01%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一供试品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，分别准确移取 20 μL，在“2.3”项条件下进样，测得各皂苷单体质量分数 RSD 分别为 0.97%、2.45%、0.99%、1.45%、0.79%、2.17%、1.08%、1.76%、0.67%、1.63%、1.94%、0.96%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取 4 年生样品，按一定比例加入对照品粉末，按“2.2”项下方法制备供试

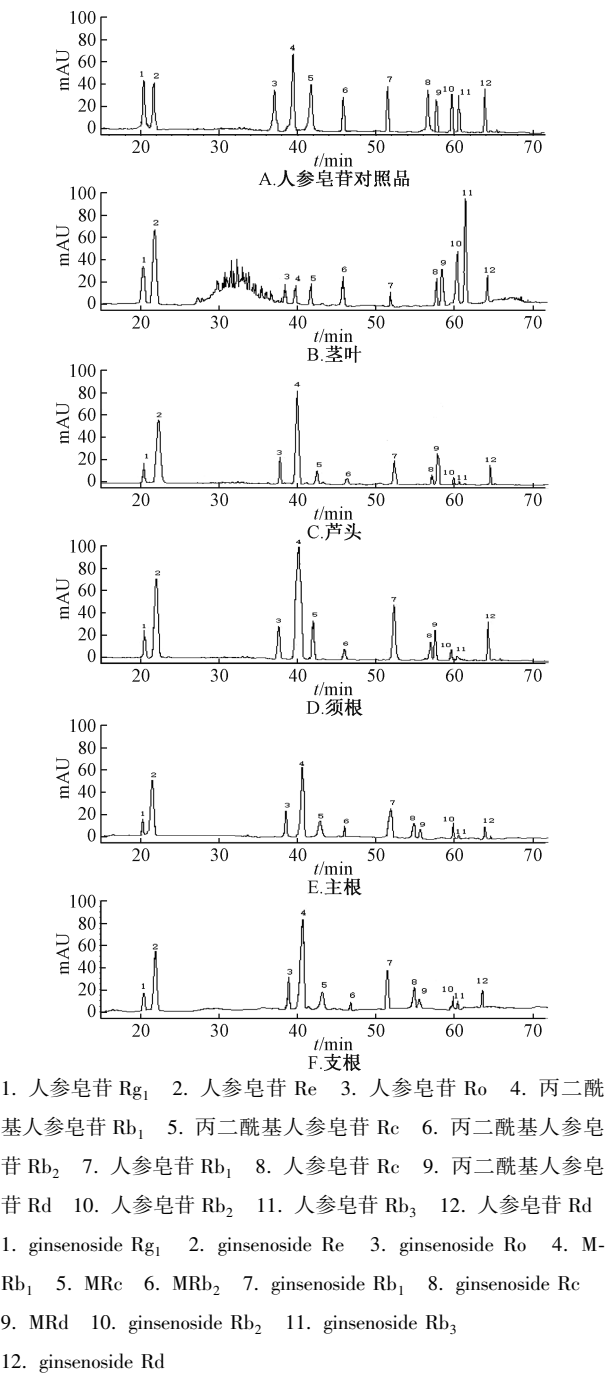


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of various constituents

品溶液，平行 6 份，在“2.3”项条件下进样，计算回收率，结果见表 3。

2.9 样品含有量测定 精密称取 3 份样品，在“2.3”项条件下进样，峰面积法计算 MRb₁、MRb₂、MRc、MRd 及各中性人参皂苷含有量，平行 3 份，取平均值。

3 结果

3.1 不同生长年限西洋参中人参皂苷含有量测定 图2 显示，鲜西洋参中主要含有 12 种人参皂

表 2 各成分线性关系

Tab.2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ (mg·mL ⁻¹)
M-Rb ₁	$Y=5.84\times10^6X+2.98\times10^4$	0.999 5	
M-Rb ₂	$Y=6.14\times10^6X+3.13\times10^4$	0.999 2	
M-Rc	$Y=6.29\times10^6X+3.20\times10^4$	0.999 6	
M-Rd	$Y=6.51\times10^6X+3.31\times10^4$	0.999 3	
Re	$Y=7.73\times10^6X+3.77\times10^4$	0.999 1	
Rg ₁	$Y=8.17\times10^6X+3.99\times10^4$	0.999 5	0.01~0.64
Ro	$Y=6.29\times10^6X+3.94\times10^4$	0.999 8	
Rb ₁	$Y=6.51\times10^6X+3.32\times10^4$	0.999 2	
Rc	$Y=5.85\times10^6X+2.98\times10^4$	0.999 3	
Rb ₂	$Y=5.93\times10^6X+3.02\times10^4$	0.999 8	
Rb ₃	$Y=6.18\times10^6X+2.81\times10^4$	0.999 1	
Rd	$Y=6.27\times10^6X+3.20\times10^4$	0.999 5	

表 3 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

Tab.3 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	平均回收 率/%	RSD/ %
MRb ₁	1.001	1.389	1.396	2.793	100.60	1.72
MRb ₂	1.002	0.055	0.050	0.105	101.30	2.06
MRc	1.001	0.094	0.101	1.130	102.60	1.86
MRd	1.001	0.259	0.255	0.526	104.60	1.36
Re	1.003	0.984	0.996	1.969	98.90	1.52
Rg ₁	1.001	0.106	0.109	0.217	102.10	2.64
Ro	1.002	0.409	0.413	0.819	99.30	2.05
Rb ₁	1.002	0.645	0.655	1.323	103.50	1.16
Rc	1.001	0.063	0.067	0.128	97.50	0.74
Rb ₂	1.002	0.055	0.058	0.114	101.80	1.93
Rb ₃	1.001	0.026	0.023	0.048	99.80	2.58
Rd	1.002	0.157	0.163	0.313	96.20	2.24

苷，分别是 MRb₁、MRb₂、MRc、MRd、Ro、Rg₁、Re、Rb₁、Rb₂、Rc、Rb₃、Rd，其中 MRb₁、Rb₁、Re 的含有量较高，1 年生西洋参中各人参皂苷含有量较低，随着年份增长逐年增加，从 1 年生到 4 年生，MRb₁ 含有量从 0.49% 到 1.39%，增长了 2.85 倍；Rb₁ 含有量从 0.19% 到 0.65%，增长了 3.34 倍；Re 含有量从 0.51% 到 0.98%，增长了 1.94 倍。在不同年生西洋参中 4 种丙二酰基人参皂苷总含有量较高，分别为 0.69%、1.15%、1.38%、1.8%，为其相应 4 种中性人参皂苷的 1.9、2.91、1.82、1.95 倍。

3.2 西洋参不同部位人参皂苷含有量测定 图 3 显示，西洋参须根中人参总皂苷含有量最高，为 7.66%，其次为茎叶、芦头和侧根，主根最低；丙二酰基人参皂苷含有量在芦头和须根中较高，主根和支根次之，茎叶中较低；MRb₁、Rb₁、Re 含有

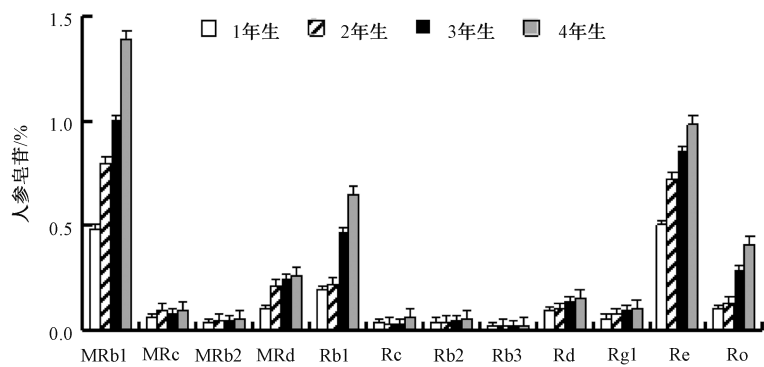


图 2 不同生长年限样品中人参皂苷含有量变化
Fig. 2 Changes of ginsenoside contents in samples with different growing years

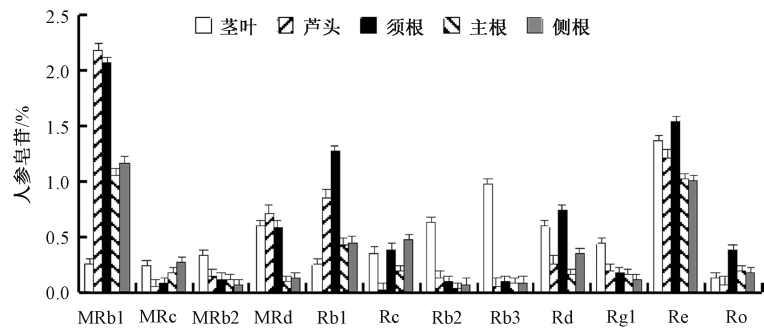


图 3 不同部位中人参皂苷含有量变化
Fig. 3 Changes of ginsenoside contents in different parts

量在须根、芦头、主根和支根中较高，而 Rb_2 、 Rb_3 、Re 在茎叶中较高。

3.3 西洋参根中不同组织部位皂苷含有量测定 图 4 显示，西洋参根中人参皂苷主要分布于韧

皮部和周皮中，木质部中含有量较少；丙二酰基人参皂苷的含有量也是韧皮部最高，周皮次之，木质部最低。此外，西洋参不同组织部位中人参皂苷的比例和轮廓十分相近，无明显差异。

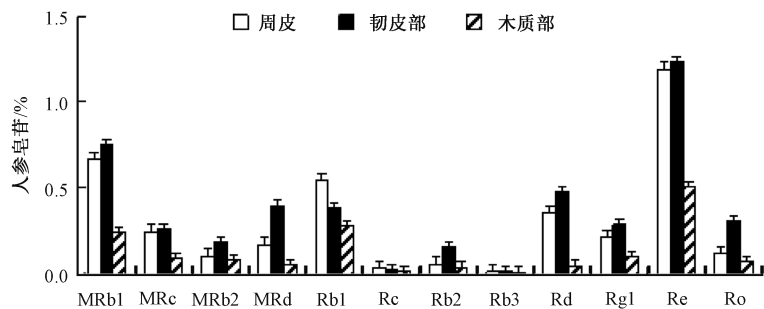


图 4 不同组织中人参皂苷含有量变化
Fig. 4 Changes of ginsenoside contents in different tissues

4 讨论

丙二酰基人参皂苷是西洋参中的天然原苷，含有量很高，是主要皂苷类成分。已有文献大多测定西洋参中性皂苷，对丙二酰基人参皂苷的研究较少，Qu 等^[13]对不同年限西洋参和主根、侧根等部位进行含有量测定，但只涉及 Rg_1 、Rh、Rf 等 12 种中性皂苷进行分析；Court 等^[14]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 2 次；刘俊文等^[15]对西洋参不同部位中 Rg_1 、Re、 Rb_1 等 7 种中性皂苷进行测定；本实验对 1~4 年生西洋参中丙二酰基人参皂苷、中性人参皂苷同时测定，结果准确可靠。

丙二酰基人参皂苷在加工、储存和提取过程中，随着温度升高其含有量会发生显著变化^[16]。

张崇禧^[17]、刘伟灿等^[18]测定人参皂苷时，均使用索氏提取方法对样品进行处理；Zhang 等^[19]在研究西洋参根中性皂苷含有量时，采用高压加热提取，但均会使丙二酰基人参皂苷降解，并转化为相应中性皂苷，导致测定结果不准确^[20]。本实验采取超声提取法，操作简单，而且不会使丙二酰基人参皂苷发生转化，结果表明西洋参中丙二酰基人参皂苷、中性人参皂苷含有量随着生长年限的增加而增加，且 4 年生丙二酰基人参皂苷最高；西洋参不同部位总皂苷含有量由高到低，依次为须根、茎叶、芦头、支根、主根。本实验可为西洋参用药部位选择和质量评价研究提供依据，也能为人参皂苷成分的提取及利用提供可靠来源。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2010 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2010：122-123.

[2] 王欢，曾凡琳，谢彩香. 西洋参 UPLC-UV-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中草药，2016，47(1)：143-148.

[3] Huang X, Liu Y, Zhang Y, *et al.* Multicomponent assessment and ginsenoside conversions of *Panax quinquefolium* L. roots before and after steaming by HPLC-MSn. [J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(1)：27-37.

[4] Wang Y S, Jin Y P, Gao W, *et al.* Complete ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectral assignment of five malonyl ginsenosides from the fresh flower buds of *Panax ginseng* [J]. *J Ginseng Res*, 2016, 40(3)：245-250.

[5] 赵瑛，谢海龙，王冬雪，等. 西洋参中 8 种人参皂苷类成分的 UPLC-MS/MS 定量分析[J]. 天然产物研究与开发，2017，29(9)：1529-1534.

[6] 刘志，阮长春，刘天志，等. 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[J]. 中草药，2012，43(12)：2431-2434.

[7] 刘志，王立娟，郑毅男，等. RP-HPLC 法测定鲜人参中丙二酰基人参皂苷的含量[J]. 药物分析杂志，2007，27(9)：1322-1324.

[8] Abe K, Cho S L, Kitagawa I, *et al.* Differential effects of

ginsenoside Rb₁ and malonylginsenoside Rb₁ on long-term potentiation in the dentate gyrus of rats[J]. *Brain Res*, 1994, 649(1-2)：7-11.

[9] Liu Z, Li W, Li X, *et al.* Antidiabetic effects of malonyl ginsenosides from *Panax ginseng* on type 2 diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1)：233-240.

[10] 陈桂云，陈卫平. HPLC-ELSD 测定红参中人参皂苷 Rg₁，Re，Rb₁ 含量[J]. 药物分析杂志，2007，27(5)：754-756.

[11] 张丹，吴兰芳，王乾，等. 不同产地西洋参药材中 8 种人参皂苷类成分含量测定及指纹图谱研究[J]. 中药材，2016，39(10)：2276-2280.

[12] 逢世峰，孙成贺，李亚丽，等. UPLC 法测定西洋参中 7 种人参皂苷含量[J]. 人参研究，2013，25(4)：9-11.

[13] Qu C L, Bai Y P, Jin X Q, *et al.* Study on ginsenosides in different parts and ages of *Panax quinquefolius* L [J]. *Food Chem*, 2009, 115(1)：340-346.

[14] 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(1)：11-17.

[15] 刘俊文，徐美利，徐冰，等. 西洋参不同部位皂苷成分研究[J]. 天津中医药，2019，36(7)：715-718.

[16] Du X W, Wills R B H, Stuart D L. Changes in neutral and malonyl ginsenosides in American ginseng (*Panax quinquefolium*) during drying, storage and ethanolic extraction [J]. *Food Chem*, 2004, 86(2)：155-159.

[17] 张崇禧，鲍建才，李向高，等. HPLC 法测定人参、西洋参和三七不同部位中人参皂苷的含量[J]. 药物分析杂志，2005，25(10)：1190-1194.

[18] 刘伟灿，张美萍，李超生，等. 西洋参各部位皂苷成分的 HPLC 测定[J]. 人参研究，2010，22(1)：20-23.

[19] Zhang S Q, Chen R Z, Wu H, *et al.* Ginsenoside extraction from *Panax quinquefolium* L. (American ginseng) root by using ultrahigh pressure[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(1)：57-63.

[20] Liu Z, Li Y, Li X, *et al.* The effect of dynamic changes of malonyl ginsenosides on evaluation and quality control of *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 64-65：56-63.