论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0658-03

RP-HPLC 法测定西洋参茎叶中二醇皂苷5种成分含量

尹尚军[1],吴鸿雁[2],徐芳菲[3],尹笠佥[3] (315100 浙江 宁波,浙江万里学院生物与环境学院[1];100084 北京,中国学术期刊(光盘版)电子杂志社[2];134200 吉林 集安,吉林省集安益盛药业股份有限公司[3])

[摘要] 目的 建立反相高效液相色谱法(RP-HPLC)同时测定西洋参茎叶二醇皂苷中5个成分(人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd)含量测定方法。**方法** 采用高效液相色谱法。色谱柱 Agilent TC-C_{18}(4.6 mm×250 mm,5 μm);乙腈-0.2%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱;检测波长 203 nm;体积流量 1.0 ml/min;柱温 40 ℃。**结果** 5种成分均达到基线分离,线性良好。人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 平均回收率分别为 98.39%、97.36%、98.02%、97.70%、97.01%。**结论** 该方法能快速、准确地测定西洋叁茎叶二醇皂苷5种成分的含量,而且重复性好。

[关键词] 西洋参茎叶二醇皂苷;人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd;高效液相色谱法

[中图法分类号] R282.71; R284.3; R927.2 **[文献标志码]** A

Determination of 5 constituents in 20(S)-protopanaxdiol saponins from *Panax quinquefolium* stem leaf by RP-HPLC

Yin Shangjun[1], Wu Hongyan[2], Xu Fangfei[3], Yin liqian[3] ([1]College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang Province, 315100; [2]China Academic Journals (CD) Electronic Publishing House, Beijing, 100084; [3]Ji'an Yisheng Pharmaceutical Stock Co. Ltd., Ji'an, Jilin Province, 134200, China)

[Abstract] Objective To establish a simultaneous method for determination of 5 constituents from *Panax quinquefolium* stem leaf 20(S)-protopanaxdiol saponins, Ginsenoside-Rb_1, Rc, Rb_2, Rb_3 and Rd by RP-HPLC. **Methods** *Panax quinquefolium* stem leaf 20(S)-protopanaxdiol saponins was provided by the Ji'an Yisheng Pharmaceutical Stock Co. Ltd.. The Agilent ODS column (5 μm, 4.6 mm×250 mm) was used, and eluted with acetonitrile-0.2% phosphoric acid water in gradient mode. The UV detection wavelength was 203 nm, and the flow rate was 1.0 ml/min, with the temperature of column at 40 ℃. The accuracy, stability and repeability of this method was evaluated. The yield rate was measured. **Results** Five compounds were baseline separated, with good linearity. A standard curve was plotted. Our method was proved to have sound accuracy, stability and repeability. The yield rate was 98.39%, 97.36%, 98.02%, 97.70% and 97.01% respectively for Ginsenoside-Rb_1, Rc, Rb_2, Rb_3 and Rd. **Conclusion** Our method of determination is rapid and accurate, and can be used for controlling the quality of *Panax quinquefolium* 20(S)-protopanaxdiol saponins.

[Key words] *Panax quinquefolium* 20(S)-protopanaxdiol saponins; Ginsenoside-Rb_1, Rc, Rb_2, Rb_3, Rd; high performance liquid chromatography

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2004AA2Z3681). Corresponding author: Xu Fangfei, Tel: 86-574-88222234, E-mail: fangfeixu@yahoo.cn

西洋参茎叶二醇皂苷是从西洋参的茎叶中提取制得的20(S)原人参二醇型皂苷类组分,主要含有人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd,其中皂苷类成分占95%以上。化学成分分析表明:西洋参茎叶部分的皂苷含量(9.05%~10.45%)明显高于根部(3.89%~6.49%)。目前国内外学者对西洋参茎叶二醇皂苷的药理学活性进行了多方面的研究,主要集中在心血管[1-4]和糖尿病肾病[5,6]方面。本研究建立了 HPLC 同时测定西洋参茎叶二醇皂苷中人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 含量的方法,并测定了不同批号的西洋参茎叶二醇皂苷中人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 的含量,旨在为西洋

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2004AA2Z3681)

[通信作者] 徐芳菲,E-mail: fangfeixu@yahoo.cn

参茎叶二醇皂苷的质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

1.1.1 仪器 美国 Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪；UWD 紫外检测器；MA110 型电子分析天平（上海精密科学仪器有限公司）。

1.1.2 试药 乙腈、甲醇为色谱纯（fisher USA）；水为去离子水，其他试剂均为优级纯。

西洋参茎叶二醇皂苷由吉林省集安益盛药业股份有限公司提供，批号：080401、080402、080403；人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 标准品（纯度≥98%）由吉林大学化学学院有机化学教研室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱：AgilentTC-C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：采用梯度洗脱，以乙腈为流动相 A，以磷酸-水（0.2∶100）为流动相 B，梯度洗脱：0～27 min，流动相 B 的比例为 67%，27～35 min，流动相 B 的比例为 67%～55%，35～40 min，流动相 B 的比例为 55%；流速：1.0 ml/min；检测波长：203 nm；柱温：40 ℃；手动进样器，进样量：10 μl。对供试品溶液和标准品溶液进样测定。

1.2.2 溶液的配置 标准品溶液：准确称取人参皂苷标准品 Rb_1、Rc 各 7.9 mg，加甲醇溶解后定容于 25 ml 量瓶中，摇匀，为标准品储备液 A。从标准品储备液 A 中精密吸取4 ml，置于 25 ml 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，为标准品溶液 A。准确称取人参皂苷 Rb_2 9.8 mg、Rb_3 20.4 mg、Rd 12.0 mg，加甲醇定容于 25 ml 容量瓶中，摇匀，为标准品溶液 B。

供试品溶液：称取本品 40 mg，加甲醇定容于 25 ml 量瓶中，摇匀。

空白对照溶液：取甲醇溶剂进行空白测定，按样品溶液的制备方法制备空白对照溶液。

1.2.3 标准曲线的制作 分别精密吸取标准品储备液 A 2、4、6、8、10 μl，标准品溶液 A 2、4、6、8 μl，标准品溶液 B 2、4、6、8、10、12 μl 注入液相色谱仪，以色谱峰面积积分值为纵坐标，进样量（μg）为横坐标，绘制标准工作曲线，得回归方程。

1.2.4 精密度试验 取同一供试品溶液，连续进样 6 次，测定峰面积。

1.2.5 稳定性试验 取室温放置的供试品溶液，于 0、2、4、20、21 h 按上述色谱条件分别测定峰面积。

1.2.6 重现性试验 取同一批样品 5 份，各 40 mg，按上述供试品溶液制备方法和色谱条件测定峰面积。

1.2.7 回收率试验 精密称取同一批已知含量的样品（含量：人参皂苷 Rb_1 含量为 4.130%，人参皂苷 Rc 含量为 4.426%，人参皂苷 Rb_2 含量为 12.582%，人参皂苷 Rb_3 含量为 44.248%，人参皂苷 Rd 含量为 15.818%，加和为 81.204%）20 mg，6 份，分别精密加入配置好的混合标准溶液 2 ml，按 1.2.2 方法处理样品，进样 10 μl，同法检测。

1.2.8 样品测定 按 1.2.2 方法制备 3 批样品溶液，分别进样 10 μl，同法检测，记录色谱图，以外标法计算百分含量。

2 结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验

所得液相图谱中被测组分人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 的分离度均大于 1.5，无其他干扰，理论塔板数均大于 5 000。

2.2 线性回归方程

人参皂苷 Rb1、Rc、Rb2、Rb3、Rd 线性回归方程见表 1。

表 1 人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 线性回归方程

人参皂苷	范围（μg）	回归方程	相关系数
Rb_1	0.10～3.16	$y=244.67x+0.9652$	0.9999
Rc	0.10～3.16	$y=210.69x+1.5072$	0.9999
Rb_2	0.78～4.70	$y=247.72x-39.151$	0.9999
Rb_3	1.63～9.79	$y=251.96x-59.36$	0.9999
Rd	0.96～5.76	$y=292.01x-31.331$	0.9999

2.3 精密度试验

人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 的平均峰面积分别为：97.70、96.12、456.58、1 551.83、688.57，RSD 分别为 1.96%、1.03%、1.60%、1.76%、1.95%。结果表明，仪器精密度良好，符合实验要求。

2.4 稳定性试验

人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 的平均峰面积分别为 94.00、95.96、450.95、1 533.25、682.94，RSD 分别为 0.57%、1.17%、0.82%、0.82%、0.86%。结果表明，样品溶液在 21 h 内基本稳定。

2.5 重现性试验

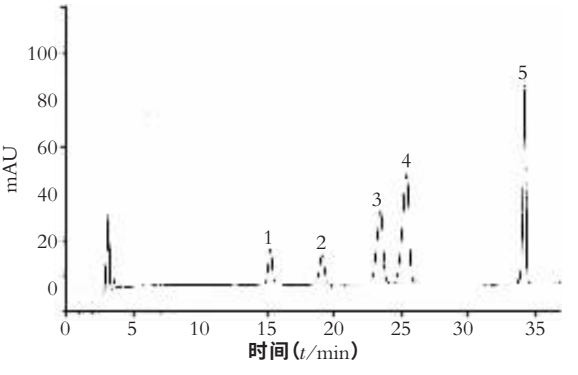
人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 的平均含量分别为 4.13%、4.43%、12.58%、44.25%、15.82%、81.20%，RSD 分别为 1.07%、1.50%、1.27%、1.81%、1.64%。结果表明，方法重现性良好。

2.6 回收率试验

人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 平均回收率分别为 98.39%、97.36%、98.02%、97.70%、97.01%。结果表明，回收率较好。

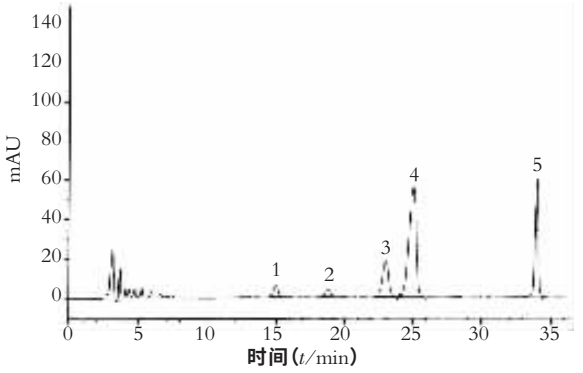
2.7 样品测定

洗脱色谱分析结果见图 1、2。以外标法定量结果见表 2。



1：人参皂苷 Rb_1；2：人参皂苷 Rc；3：人参皂苷 Rb_2；4：人参皂苷 Rb_3；5：人参皂苷 Rd

图 1 标准品色谱分析



1:人参皂苷 Rb_1;2:人参皂苷 Rc;3:人参皂苷 Rb_2;4:人参皂苷 Rb_3;5:人参皂苷 Rd

图2 西洋参茎叶二醇皂苷色谱分析

表2 3批样品中人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 含量测定结果(mg/ml)

各成分	080401		080402		080403	
	第1组	第2组	第1组	第2组	第1组	第2组
Rb_1	2.81	2.75	3.18	3.24	3.09	3.10
Rc	2.70	2.68	2.47	2.47	2.91	2.80
Rb_2	11.48	11.42	13.25	13.26	11.58	11.57
Rb_3	42.46	41.99	44.21	44.13	45.50	45.57
Rd	22.44	22.17	17.12	17.27	19.26	19.23
加和	81.90	81.01	80.23	80.36	82.34	82.27
平均加和	81.46		80.30		82.31	
平均含量			81.36			

3 讨论

本品中的主要成分为西洋参茎叶20(S)原人参二醇型皂苷,包括人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd,十几年来我们对西洋参茎叶20(S)原人参二醇型皂苷进行了较为系统研究,包括主要成分的结构确定、提取纯化、成分分析、药理作用等,并获得国家专利授权(专利号:ZL98100069.X)。但此类有效部位或组分,成分较多,一般质量标准多采用HPLC测定其中一个含量较高或具专属性的特征成分进行含量测定[7-9],局限性很大,很难全面的反应产品的质量。本研究利用HPLC同时测定西洋参茎叶二醇皂苷中人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 的含量,而其结构特点均为20(S)原人参二醇型皂苷元,仅连接糖的位置、种类和数量不同,极性相似。以往对西洋参或其部位进行含量分析的多为人参皂苷 Rb_1、Re、Rg_1 的含量测定[10-12],少见同时测定人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 含量的方法。本试验过程中根据此5个成分的极性,曾采用乙腈:磷酸水溶液(30:70)为流动相进行洗脱,此条件虽可将该5个成分分离,但检测时间长达70 min,且除 Rb_2、Rb_3 峰外,各特征峰出峰时间的间隔较长。而加大乙腈的比例 Rb_2、Rb_3 峰又很难有效地分离。为了寻找一个适合的流动相条件,我们根据人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3、Rd 的性质进行流动相的梯度条件摸索,结果表明,流动相采用梯度洗脱,乙腈为流动相A,以磷酸-水(0.2:100)为流动相B,梯度洗脱:0~27 min,流动相B的比例为67%,27~35 min,流动相B的比例为67%~55%,35~40 min,流动相B的比例为55%,可以在较短的时间内将5个成分基线分离。该方法用于测定西洋参茎叶二醇皂苷的含量,简便、准确、灵敏度高、重现性好。

参考文献:

[1] 睢大员,于晓风,曲绍春,等. 西洋参叶20s-原人参二醇组皂苷对大鼠实验性心室重构的影响[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(2): 108-112.

[2] 王绚卉,徐华丽,于晓风,等. 洋参二醇皂苷注射液对犬实验性心肌梗死的保护作用及其机制[J]. 中国药学杂志,2008, 43(10): 754-757.

[3] Sui D Y, Xu H L, Yu X F, *et al*. Effect of 20(S)-protopanaxadiol saponins on blood lipid metabolism and antioxidative active in hyperlipidemia rats[J]. Chin Trad Herb Drags, 2004, 35(4): 416-419.

[4] He F, Guo R, Wu S L, *et al*. Protective effects of ginsenoside Rb1 on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 50(3): 314-320.

[5] 臧晓峰,谢湘林,吴轶川,等. 西洋参二醇组皂苷对糖尿病肾病大鼠肾脏葡萄糖转运蛋白、尿 β_2-微球蛋白的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(6): 1237-1239.

[6] 臧晓峰,谢湘林,吴轶川,等. 西洋参二醇皂苷对糖尿病肾病大鼠血常规的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2466-2467.

[7] 刘国臣,李盛钰,何大俊,等. 甾体皂苷的选择性酸水解研究[J]. 东北师大学报:自然科学版, 2007, 39(2): 87-91.

[8] 张秋红,闫滨,江涛,等. HPLC同时测定心脑治胶囊中三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1含量[J]. 中成药, 2006, 28(5): 655-658.

[9] 梁永欣,林鹏程,潘国庆,等. 高效液相色谱法测定二十五味大汤散中没食子酸含量[J]. 东北师大学报:自然科学版, 2006, 38(2): 86-87.

[10] 杨立伟,郑传奇,蒋忠军,等. 超高效液相色谱法测定西洋参中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 的含量[J]. 中药材, 2008, 31(1): 55-57.

[11] 郭忠奎,张炜煜. RP-HPLC法同时测定三七安宫胶囊中人参皂苷和三七皂苷的含量[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2008, 40(3): 126-130.

[12] 李素娟,樊文娟,杨瑞芬,等. RP-HPLC法测定三七总皂苷缓释片中人参皂苷Rg1的含量[J]. 湖北中医学院学报, 2009, 11(2): 28-30.

(**收稿**:2009-10-10;**修回**:2009-11-01)

(编辑 王小寒)