

# 高效液相色谱法分离测定人参 保健制品中的人参皂甙

任一平,黄百芬,沈向红,王彤宇

(浙江省疾病预防控制中心 310009)

**摘要:**样品经60%的甲醇水溶液溶解,超声提取30 min。冷却至室温后,用60%甲醇溶液准确定容。再经15 000 r/min离心10 min,取上清液经高效液相反相色谱法测定,以乙腈-水为流动相,经梯度洗脱分离测定人参保健制品中的6种主要的人参皂甙。使用紫外检测器在203 nm波长处检测。应用方法对皂甙Rb<sub>1</sub>进行线性范围测定,测得其在0~378 μg/mL浓度范围内有良好的线性,测得其回收率在95%以上,最低检测限为2.2 ng。

**关键词:**高效液相色谱法;梯度洗脱法;人参皂甙

中图分类号:O658

文献标识号:A

文章编号:1671-8798(2003)S0-0064-04

人参皂甙的测定方法目前普遍采用比色法,该方法干扰大,定量不够准确,处理过程过于复杂,无法对各种皂甙分别进行定量,已不能适应目前众多复杂人参保健制品的分离测定。采用液相色谱质谱联用(LC-MS),液相色谱折光检测(LC-IR),毛细管电泳(CE)等检测手段也有相关报道。LC-MS法具有较高的准确性,但使用的仪器昂贵,操作复杂,对操作环境和人员要求较高,目前还不能普遍推广;HPLC-IR法因检测器的检测灵敏度相对较低,不能满足人参保健品中所添加的微量人参皂甙的检测;CE法的仪器价格虽较LC-MS法便宜,但其重现性和准确性不及LC-MS法,且由于进样量极少(仅为几个纳升),检测灵敏度不够。本方法在原LC-UV法的基础上,针对低含量样品中杂质干扰多,分离中基线漂移大,时间长等不足,对提取溶剂种类、分离柱、流动相梯度洗脱程序控制等方面作了最优化选择。旨建立一个简便、快速、灵敏而准确地分离测定人参保健制品中常见皂甙的HPLC-UV方法。使该方法能普遍适用于人参保健品的生产监控和质量检测。

## 1 实验条件与方法

### 1.1 仪器与试剂:

BECKMAN SYSTEM GOLD 微流高压液相色谱系统;配置508自动进样器,126溶剂泵,166紫外检测器,32 Karate 数据处理系统。实验选用3种BECKMAN分离柱,均为4.6mm(i.d)ODS-C<sub>18</sub>(5 μm),仅长度不同:250 mm(长柱),150 mm(中长柱),75 mm(短柱)。人参皂甙Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>标样(中国药品生物制品检定所);甲醇,乙腈(HPLC级、上海化学试剂研究所);超纯水(HPLC级)。

### 1.2 标准液制备:

精确称取5种人参皂甙各适量,配成Rg<sub>1</sub>:95 μg/mL;Re:145 μg/mL;Rb<sub>1</sub>:100 μg/mL;Rc:31.25 μg/mL;Rb<sub>2</sub>:12.5 μg/mL的标准液。由于Rd标准品极少无法称量,故Rd的定量参照结构相近的Rb<sub>2</sub>的峰面积得出。

收稿日期:2003-10-10

作者简介:任一平(1952—),男,教授级高级工程师,山东人,主要从事食品、医药等分析监测方法的开发研究。



### 1.3 人参皂甙的提取:

准确称取样品 0.50 g, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 加入 15 mL 60% 的甲醇水溶液, 超声提取 30 min。冷却至室温后用 60% 甲醇溶液准确定容。各取适量提取液于离心管中, 在 15 000 r/min 的转速下离心 10 min, 取上清液在 4℃ 下密封保存供 HPLC 测定。

### 1.4 色谱分离条件:

色谱柱 ODS - C<sub>18</sub> 4.6 mm × 150 mm, 5 μm, BECKMAN, 流动相: 乙腈/水, 进样体积: 20 μL, 流速: 1 mL/min, 梯度程序: 开始时乙腈: 水 = 19:81, 25 min 乙腈: 水 = 32:68, 25.5 ~ 50 min 保持乙腈: 水 = 32:68, 检测波长: 203 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

2.1.1 分离柱的选择: 在各自相适应的色谱条件, 用人参皂甙混合标准进样分离。由实验结果选择中长柱即 ODS 柱(5 μm, 4.6 mm × 15 cm)为本实验分离柱。

2.1.2 检测波长选择: 经紫外扫描, 可以确定人参皂甙在 190 至 200 nm 处有最大吸收。考虑在 200 nm 以下流动相将会造成基线干扰大幅增大, 本实验选用 203 nm 的检测波长。

2.1.3 梯度洗脱条件: 本实验着重对长柱即 ODS 柱分离人参皂甙的梯度洗脱时间程序, 水与乙腈的变量进行了摸索优化。最优化条件见 1.4 色谱分离条件。

### 2.2 样品前处理方法的选择

现行提取人参制品中的人参皂甙主要用 100% 甲醇提取, 经超声后浸泡过夜, 过滤, 用甲醇多次洗涤残渣, 将合并液用旋转蒸发仪在约 50℃ 条件下蒸干后再定容。本实验分别选用 50%, 60%, 70%, 80% 和 100% 的甲醇水溶液做提取实验比较。改进后的方法见 1.3。方法具有操作简便, 提取效率高, 省时的特点。

2.3 线性范围: 取 Rg1 标准溶液, 配成不同的浓度进样测定。由结果可知人参皂甙 Rg1 在 0 - 74.4 μg/mL 浓度范围内, 其浓度和峰面积有良好的线性。其相关系数为 0.9996, 线性方程  $y = 21851x + 2838.8$ 。该浓度范围已满足实际样品测定的需要。

2.4 检测下限的测定: 本文用 Rb1 进行最低检测下限的测定, 由于梯度洗脱程序前段的乙腈体积分数(19.1%)和后段的体积分数(32%)都比目前常用的方法有一定降低, 这就减少了乙腈和其中的杂质在低紫外处的吸收, 降低了基线的噪音, 提高了检测灵敏度, 实验测得其最低检测下限为 2.2 ng, 在 20 μL 的进样量下, 其检测浓度为 110 μg/mL。这个检测下限对于检出目前市场上的人参保健制品中的人参皂甙已足够。

2.5 回收率实验: 由于标准品极昂贵, 本文仅以皂甙 Rb1 进行回收率实验。实验样品选用冠康洋参丸, 称取 1.000 g 样品四份, 分别加入 Rb1 标准品 0.3.7 mg, 7.4 mg, 13.4 mg。经前处理后定容至 50 mL。实验所数数据见表 1。

表 1 回收率实验结果

样 品	样品含量	样品 + 74 μg/mL	样品 + 148 μg/mL	样品 + 268 μg/mL
总浓度 (μg/mL)	272.845	348.537	415.810	546.081
加入的 Rb1 浓度 (μg/mL)	0	74.00	148.00	268.00
回收的 Rb1 浓度 (μg/mL)	0	75.69	142.97	273.236
回收率 (%)	-	102	96.6	102

96.6% - 102% 的回收率归功于前处理方法的简便、有效, 减少了过多的繁杂操作, 使前处理过程中的操作和系统误差大大减小, 使回收率稳定在较高的水准范围内, 使实验结果与样品实际含量充分符合, 达到了准确测定的目的。

### 2.6 重复性试验

实验采用同一样品(冠康洋参丸)8 份进行系统稳定性实验, 分别称取样品 0.50 g, 经前处理后定容至

25 ml。

由实验数据可知,6 种皂甙的变异系数在 0.6% - 3.5% 之间,这说明本系统有良好的稳定性。由于样品中含量越低越易受到系统操作误差的影响,故  $R_{g1}$  和  $R_{b2}$  的变异系数相对较大,而  $R_{b1}$  的变异系数仅为 0.6%。

2.7 对比实验:实验选取 4 个样品进行香草醛比色法和 HPLC 法对比实验,结果见表 2。

表 2 方法对比实验

样品名称方法	洋参胶囊	洋参含片 1	洋参丸	洋参含片 2
HPLC 法总皂甙含量/%	4.00	2.07	2.24	1.06
香草醛比色法总皂甙含量/%	10.40	8.20	7.10	6.80

由表中数据可以看出 HPLC 法测得的总皂甙含量比香草醛比色法测得的总皂甙浓度均低 6% 左右,由此可见传统的香草醛比色法由于样品中杂质的干扰导致测得的总皂甙含量有所偏高。对 HPLC 法来说由于是将各皂甙分离后再测定其含量,完全排除杂质的干扰。

2.8 实样测定:本文共测定了 12 个实际样品,其一样品的皂甙分离情况见图 1。

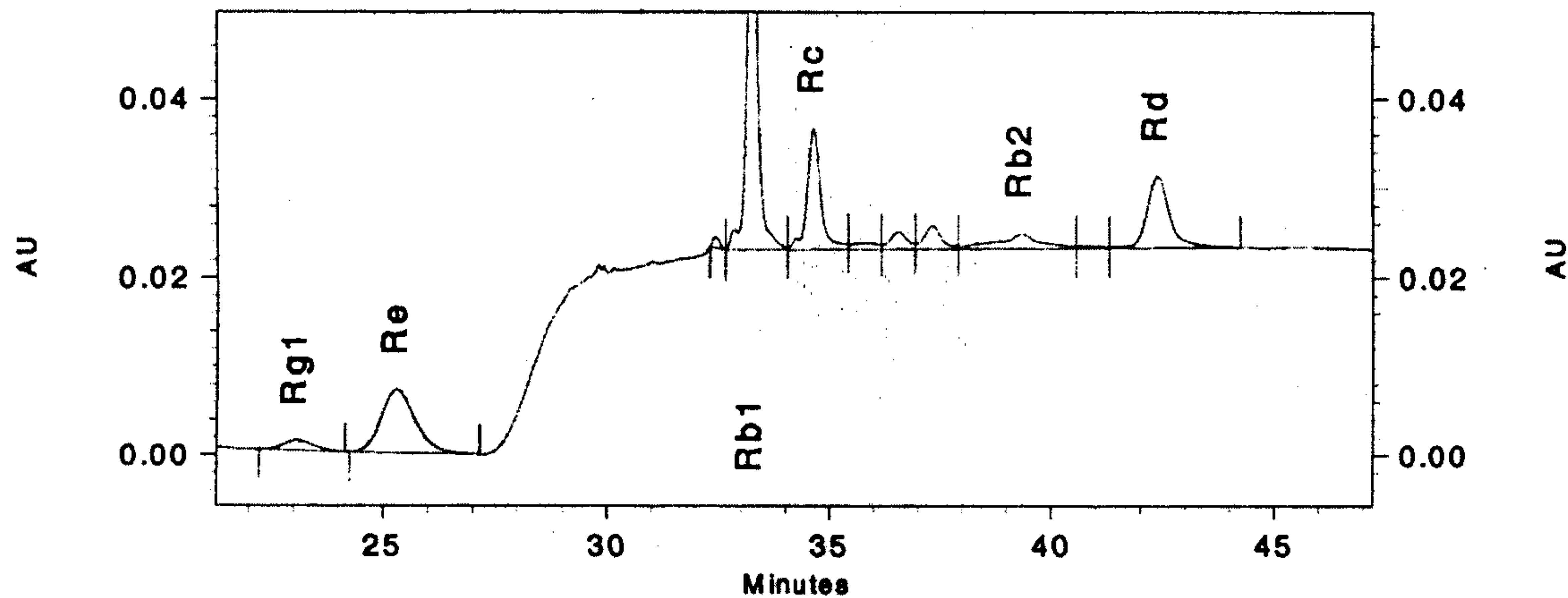


图 1 洋参含片 2 分离图谱色谱条件:色谱柱: ODS,5  $\mu$ m,4.6mm  $\times$  150 mm,检测波长:203 nm,流速:1 mL/min,梯度程序:乙腈的体积分,0 - 25 min 为 19.1%,25 min 后在 0.5 min 内升至 32%

3 结 论

本研究在现有的 HPLC - UV 法测定人参皂方法基础上,针对其不足之处改进如下:

- (1)通过选择 60% 的甲醇水溶液作提取溶剂,以简便有效的提取方法改善了样品的前处理,使提取更加完全,操作更加简便省时,且排除了其他低紫外有机物的检测干扰。
- (2)通过选用 150 mm 的中长度色谱柱,既保证了良好的分离效果又缩短了分离时间(减少了 1/4 的分析时间),提高了测定效率。
- (3)采用低乙腈含量的梯度洗脱程序(0 ~ 25 min,乙腈 19.1%,25 ~ 50 min,乙腈 32%),降低了基线噪音和漂移,提高了检测灵敏度。经过对不同种类、产地的人参保健制品的检测,证明本方法完全可作为快速,简便,准确而灵敏的人参皂甙检测方法加以普遍推广。

由于标准品价格昂贵,因此本研究在回收率实验和最低检测下限测定时仅以  $R_{b1}$  为依据,使得还有几个人参皂甙虽能分离,但未能定性、定量。这些都有待于继续摸索完善。

参考文献:

[1] 闫天午,宋承吉,人参首乌精中人参皂甙含量的测定[J]. 中成药,1993,15(11):14 - 15.

[2] 王 林,赵春杰,比色法测定君春乐胶囊中人参皂甙的含量[J]. 中国药学杂志,1995,30(6): 364 - 365.



- [3] 刘高峰,张丽梅,薄层扫描法测定肝速宁胶囊人参皂甙 Rg18 的含量[J]. 中国中药杂志,1996,21(9): 542 - 543.
- [4] 马鹏,林涛,古方生脉散剂中人参皂甙的 RP - HPLC 分离和含量测定[J]. 华西药学杂志,1995,10(1): 21 - 24.
- [5] 顾光华,周蕾, HPLC 法测定人参单体皂甙的研究[J]. 色谱,1994,12(1): 40 - 42.
- [6] Park M K , Park J H, Han S B, et al. J Chromatography A, 1996, 736: 77 - 81.
- [7] Elkin Y N, Mahankvo V V, Uvarova L, et al. Acta Pharmacologica Sinica, 1993, 14(2): 97 - 100.
- [8] Wang X, Sakuma T, Asafu - Adjaye E B , et al. Pharm Res, 1997, 14(11): S591 - S601.
- [9] Iwagami S, Swabe Y, Nakagawa T, Shoyokugaku Zasshi, 1992, 46: 339 - 340.
- [10] Samukawa K, Yamashita H, Matsuda H, et al. Chem Pharm Bull, 1995, 43(1):137 - 141.

## The determination of ginsenoside in health food by HPLC

REN Yi-ping, HUANG Bai-feng<sup>1</sup> SHEN Xiang-hong, WANG Tong-yu

(Zhejiang center for disease prevention and control , HangZhou 310009, China)

**Abstract:** The ginsenoside in health food is determined by HPLC, after solved with methanol, extracted by ultrasonic disintegrator and separated by centrifuge. 6 kinds of ginsenoside were detected in 203 nm in acetonitrile - water solution, gradient elution. The linear range is 0 ~ 378  $\mu\text{g/mL}$ , the recovery is above 95%, the minimum detectable quantity is 2.2 ng.

**Key words:** HPLC; gradient elution; ginsenoside

(上接第 74 页)

### 参考文献:

- [1] 洪惠馨、林利民、陈学豪等. 鲈鱼人工配合饲料中脂肪的适宜含量研究.[J]. 集美大学学报, 1999, 4(2): 41 - 43
- [2] 张本、陈国华 四种石斑鱼氨基酸组成的研究[J]. 水产学报. 1996, 6: 111 ~ 119
- [3] 清水隆子. 六种天然鱼与养殖鱼的成分比较[J]. 日本水产学会志 1991, 57(10): 1927 ~ 1934
- [4] 张显鹏. 牙鲆稚鱼对蛋白质、脂肪及碳水化合物营养需求的研究[J]. 上海水产大学学报(第三届世界华人鱼虾营养研讨会论文集). 1998, 7(Suppl Aug): 98 ~ 103.
- [5] 段青源、钟惠英、斯列刚等. 网箱养殖大黄鱼与天然大黄鱼营养成分比较分析[J]. 浙江海洋学院学报 2000, 19(2): 125 - 128.
- [6] 舒妙安、马有智、张建成. 黄鳍肌肉营养成分分析[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 339 - 344.

## Analysis of amino acid in muscle of *lateolabrax japonicus*

ZHENG Chong-ying<sup>1</sup>, ZHENG Bin<sup>2</sup>

(1. Fishery Technique Extension Station of Zhejiang Province, HangZhou 310012, China;

2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

**Abstract:** The AA concentrations in muscle of *Lateolabrax japonicus* are measured with advanced Post - Column Derivatizer technique together with HPLC. The Composition and ratio of amino acids of *L. japonicus* were analyzed for evaluation in nutrition. The results showed that the total content of amino acid in muscle was 1.308%. Total content of four delicate flavour amino acids in total amino acids was 42.5%.

**Key word:** *Lateolabrax japonicus*; amino acid; HPLC