

不同产地人参根和根茎中人参皂苷的含量分析*

杨秀伟¹, 王洪平¹, 徐崑¹, 王英平², 徐永华³, 张连学³

(1. 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 药学院天然药物学系, 北京 100191;

2. 中国农业科学院特产研究所, 长春 130112; 3. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

摘要 目的: 研究不同产地人参根和根茎中 14 个人参皂苷的含量, 为制定人参皂苷的质量标准提供科学依据。**方法:** 采用 Diamonsil[®] ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈和乙腈-水 -0.1% 磷酸水溶液 (5:90:8, v/v/v) 为流动相, 梯度洗脱, 203 nm 波长处二极管阵列检测器检测, 外标对照品法测定人参根和根茎中人参皂苷 (G) Ra₁、Ra₂、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁、Ro, 20-O-葡萄糖基人参皂苷 Rf (20-GG-Rf), 三七人参皂苷 (NG) R₁、R₂ 14 个化合物。**结果:** 不同产地人参根和根茎中人参皂苷含量的变化较大, 26 批次五年生人参根和根茎样品中 14 个人参皂苷的含量 (μg·g⁻¹, 人参根和根茎) 变化幅度分别为 G-Ra₁, 0~2 958; G-Ra₂, 0~1 320; G-Rb₁, 1 195~7 129; G-Rb₂, 835~6 993; G-Rb₃, 178~1 812; G-Rc, 414~5 569; G-Rd, 393~5 529; G-Re, 603~3 564; G-Rf, 301~1 504; G-Rg₁, 738~4 710; G-Ro, 893~8 569; 20-GG-Rf, 110~656; NG-R₁, 74~778; NG-R₂, 0~844。**结论:** G-Ra₁、Ra₂、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 和 Rd 为典型的原人参二醇型人参皂苷, G-Re、Rf、Rg₁、20-GG-Rf、NG-R₁ 和 R₂ 为典型的原人参三醇型人参皂苷, G-Ro 为典型的齐墩果酸型人参皂苷, 三大类人参皂苷能代表体现人参药物活性的皂苷成分。其中, 又以 G-Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁、Ro 和 20-GG-Rf 含量更高, 作为判定人参根和根茎中人参皂苷质量的指标性成分更科学。

关键词: 人参; 人参根; 人参根茎; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Rb₂; 人参皂苷 Rb₃; 人参皂苷 Rc; 人参皂苷 Rd; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rf; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Ro; 高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 01-0030-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.01.04

Content analyses of ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* from different regions*

YANG Xiu-wei¹, WANG Hong-ping¹, XU Wei¹, WANG Ying-ping²,
XU Yong-hua³, ZHANG Lian-xue³

(1. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2. Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China; 3. College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract Objective: To determine the contents of fourteen ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* C. A. Meyer from different regions, so as to provide a scientific basis for quality standard establishment

* “十二五”国家科技支撑专项 (2012BAI29B02; 2011BAI07B08); 吉林省医药产业发展引导资金资助项目 (20150311022YY)

第一作者 Tel: (010) 82801569; E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

of ginsenosides. **Methods:** The analysis was carried out on a Diamonsil™ ODS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution with acetonitrile (A) and acetonitrile–water–0.1% phosphoric acid aqueous solution (5:90:8, v/v/v) (B). The detection wavelength was at 203 nm and the detector was diode array detector (DAD). External standard as well as standard reference methods were adopted to determine the contents of fourteen ginsenosides including ginsenosides (G) Ra₁, Ra₂, Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Ro, 20-O-glucopyranosylginsenoside Rf (20-GG-Rf), notoginsenosides (NG) R₁ and R₂. **Results:** The investigated ginsenoside contents varied greatly among the 26 batches of five-year old ginseng roots and rhizomes samples collected from different localities, and the change ranges of fourteen ginsenoside contents (μg·g⁻¹ ginseng roots and rhizomes) were 0–2 958 for G-Ra₁, 0–1 320 for G-Ra₂, 1 195–7 129 for G-Rb₁, 835–6 993 for G-Rb₂, 178–1 812 for G-Rb₃, 414–5 569 for G-Rc, 393–5 529 for G-Rd, 603–3 564 for G-Re, 301–1 504 for G-Rf, 738–4 710 for G-Rg₁, 893–8 569 for G-Ro, 110–656 for 20-GG-Rf, 74–778 for NG-R₁, and 0–844 for NG-R₂, respectively. **Conclusion:** G-Ra₁, Ra₂, Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, and Rd represent the typical protopanaxadiol-type ginsenoside, whereas G-Re, Rf, Rg₁, and 20-GG-Rf, NG-R₁, as well as NG-R₂ represent typical protopanaxatriol-type ginsenoside, and G-Ro represents typical oleanolic acid-type ginsenoside, which has been claimed to be responsible for the wide pharmacological activities of total saponins in the roots and rhizomes of *P. ginseng*. Among them, the contents of G-Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Ro, and 20-GG-Rf were found to be much higher than other ginsenosides. These ten ginsenosides should be selected as markers to evaluate the quality of total saponins in the roots and rhizomes of *P. ginseng*.

Keywords: *Panax ginseng*; Ginseng Radix; Ginseng Rhizoma; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rb₂; ginsenoside Rb₃; ginsenoside Rc; ginsenoside Rd; ginsenoside Re; ginsenoside Rf; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Ro; HPLC

传统中药人参(*Ginseng Radix et Rhizoma*)系五加科人参属植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)的干燥根和根茎,历版中国药典^[1]均已收载,且驰名世界。由于其在世界范围内的食品添加剂中的广泛使用和中国政府批准栽培人参为新功能性食品,人参的应用量激增。人参具有广泛的药理学活性和临床应用^[2-3],已从人参根和根茎^[4-8]及其炮制品红参^[6,9-10]应用色谱方法分离、谱学数据鉴定了130余个皂苷类成分,人参皂苷(ginsenoside,略写为G)几乎反映了人参的全部生物学活性^[2-3]。因此,人参皂苷已作为评价人参质量的重要指标性成分^[1],人参质量的评价已从感官向物质基础分析迈进,更加科学化^[11]。

我国东北是人参的栽培基地,为保证人参的质量,一些基地已通过国家人参规范化种植基地认证和推广,但种植户众多,各地小气候各异且有些因素难以人工控制,导致产品质量不一致,如人参总皂苷的含量高低和各类型人参皂苷的比例是否一致等等。人参皂苷,按苷元结构类型不同^[6],分为原人参二醇型人参皂苷(G),如G-Ra₁、Ra₂、Rb₁、Rb₂、Rb₃、

Rc和Rd;原人参三醇型人参皂苷,如G-Re、Rf、Rg₁、20-O-葡萄糖基人参皂苷Rf(20-GG-Rf)、三七人参皂苷(NG)-R₁和R₂等;齐墩果酸型人参皂苷,如G-Ro等,生物学活性不尽相同^[2-3]。为制定科学合理的人参皂苷标准,在产地收集了96批次人参根和根茎样品,分析其人参皂苷含量。关于人参皂苷含量的测定方法,文献报道有较早建立的双光束薄层色谱扫描法^[12]、高效液相色谱偶联紫外检测器(HPLC-UV)^[13]或偶联蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法^[14-15]、液质联用法(LC-MS)^[16-17]等,尽管有报道建立了LC-MS法测定人参根和根茎中19个人参皂苷含量^[8],但不菲的仪器成本使其在基层单位难于推广;虽然双光束薄层色谱扫描法简单,但属于半定量分析方法;ELSD虽然是一款通用型检测器,但是其较低的灵敏度和非线性的响应特性限制了其在定量分析领域的应用。Wang等^[7]应用HPLC-偶联二极管阵列检测器(DAD)定量分析66批次不同产地人参根和根茎中14个人参皂苷的含量,方法有利于推广普及。本文继续报道其他30批次不同产地人参根和根茎中14个人参皂苷的含量。

1 仪器、试剂与试验材料

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪 (Agilent Technologies), 配置 G1311C 四元梯度泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315D 光电二极管阵列检测器 (DAD), Agilent Chemstation 色谱工作站 (version B.04.02); Diamonsil® ODS C₁₈ (2) 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 北京迪马欧泰科技发展中心); KQ5200 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司; 功率 250 W, 频率 40 kHz); Milli-Q Advantage A10 (Millipore) 纯水机; Mettler XS105DU 十万分之一电子天平。

对照品 G-Ra₁、Ra₂、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁、Ro、20-GG-Rf、NG-R₁、R₂ 由本文课题组从人参根和根茎^[4]中分离制备, HPLC-DAD 法测定纯度均大于 99.0%。甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸为优级纯, 水为超纯水, 其余试剂为分析纯。

本研究所用的 30 批次人参根和根茎药材样品于 2012 年 9 月采集于各人参栽培地, 经本文作者之一王英平研究员鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎, 凭证标本存放在北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 详细信息见表 1。

表 1 人参根和根茎样品采集地

Tab. 1 Collecting locations of ginseng root and rhizome samples

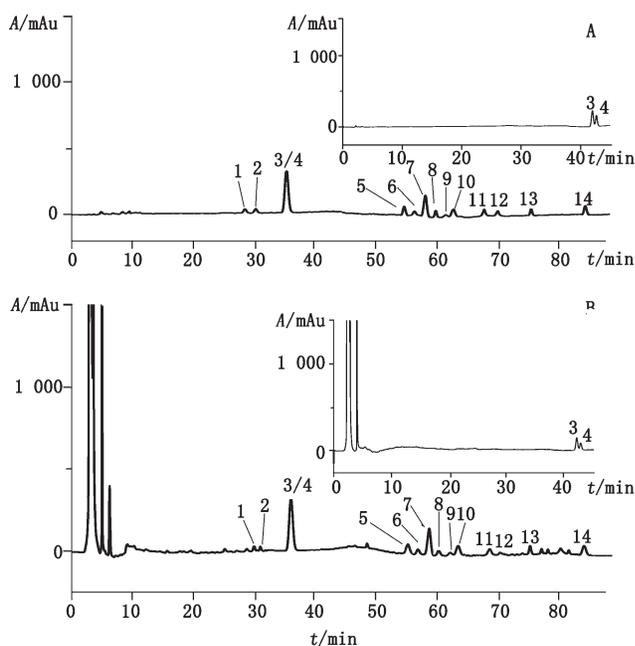
样品编号 (sample No.)	采集地 (collecting locations)
S1	吉林省集安市榆林镇复兴村 (Fuxing village, Yulin town, Ji'an city, Jilin province)
S2	吉林省集安市台上镇光明村 (Guangming village, Taishang town, Ji'an city, Jilin province)
S3	吉林省集安市台上镇板盆村 (Banacha village, Taishang town, Ji'an city, Jilin province)
S4	吉林省集安市财源镇泉眼村 (Quanyan village, Caiyuan town, Ji'an city, Jilin province)
S5	吉林省集安市花甸镇柞树村 (Zuoshu village, Huadian town, Ji'an city, Jilin province)
S6	吉林省集安市头道镇砬子沟村 (Lazigou village, Toudao town, Ji'an city, Jilin province)
S7	吉林省抚松县泉阳镇 (Quanyang town, Fusong county, Jilin province)
S8	吉林省抚松县泉阳镇错草村 (Cuocao village, Quanyang town, Fusong county, Jilin province)
S9	吉林省抚松县江乡 (Jiang township, Fusong county, Jilin province)
S10	吉林省抚松县露水河镇九支线 3 号班 (Jiuzhixiansanhaoban, Lushuihe town, Fusong county, Jilin province)
S11	吉林省抚松县露水河镇 (Lushuihe town, Fusong county, Jilin province)
S12	吉林省抚松县露水河镇清水河村东山 (Dongshan of Qingshuihe village, Lushuihe town, Fusong county, Jilin province)
S13	吉林省抚松县东岗镇 (Donggang town, Fusong county, Jilin province)
S14	吉林省敦化市官地镇 (Guandi town, Dunhua city, Jilin province)
S15	吉林省汪清县天桥岭镇缎树背村 (Duanshubei village, Tianqiaoling town, Wangqing county, Jilin province)
S16	吉林省汪清县天桥岭镇桃源村 (Taoyuan village, Tianqiaoling town, Wangqing county, Jilin province)
S17	吉林省汪清县复兴镇 (Fuxing town, Wangqing county, Jilin province)
S18	吉林省靖宇县赤松乡 (Chisong township, Jingyu county, Jilin province)
S19	吉林省靖宇县龙泉镇 (Longquan town, Jingyu county, Jilin province)
S20	吉林省靖宇县濛江乡三通岭 (Santongling of Mengjiang township, Jingyu county)
S21	吉林省安图县永庆乡 (Yongqing township, Antu county, Jilin province)
S22	吉林省安图县小沙河镇 (Xiaoshahe town, Antu county, Jilin province)
S23	吉林省安图县白河林业局宝马林场 (Baoma forestry of Baihe forestry bureau, Antu county, Jilin province)
S24	吉林省长白县二道岗村 (Erdaogang village, Changbai county, Jilin province)
S25	吉林省蛟河市前进镇义气岗村 (Yiqigang village, Qianjin town, Jiaohe city, Jilin province)
S26	吉林省蛟河市前进镇敬老院 (Nursing home of Qianjin town, Jiaohe city, Jilin province)
S27	黑龙江省高楞林业局 (Gaoleng forestry bureau, Heilongjiang province)
S28	黑龙江省海伦市 (Hailun city, Heilongjiang province)
S29	韩国锦山郡 (Geumsan-gun, Korea)
S30	韩国锦山郡 (Geumsan-gun, Korea)

注 (note): 样品 S1-S26 为五年生人参 (S1-S26 were five-year old ginseng); 样品 S27-S30 为四年生人参 (S27-S30 were four-year old ginseng)

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Diamonsil® ODS C₁₈(2) 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 偶联 Dikma Easy Guard C₁₈ 保护柱(20 mm × 4.6 mm, 5 μm)。分离 G-Ra₁、Ra₂、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Rf、Ro, 20-GG-Rf, NG-R₁、R₂ 的流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为乙腈-水-0.1% 磷酸水溶液(5:90:8; v/v/v), 线性梯度洗脱(0~20 min, 10%A; 20~30 min, 10% → 20%A; 30~40 min, 20% → 22%A; 40~75 min, 22% → 31%A; 75~80 min, 31% → 33%A; 80~90 min, 33% → 40%A; 90~110 min, 40% → 50%A)。流速为 0~32 min, 0.8 mL·min⁻¹; 32.1~110 min, 0.5 mL·min⁻¹。检测波长为 203 nm, 柱温为 35 °C。分离 G-Re、Rg₁ 的流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为水, 线性梯度洗脱(0~30 min, 20%A; 30~45 min, 20% → 30%A), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 203 nm, 柱温为 25 °C。色谱图见图 1。



1. 20-GG-Rf 2. NG-R₁ 3. G-Rg₁ 4. G-Re 5. G-Rf 6. G-Ra₂
7. G-Rb₁ 8. NG-R₂ 9. G-Ra₁ 10. G-Rc 11. G-Rb₂ 12. G-Rb₃
13. G-Ro 14. G-Rd

图 1 人参皂苷对照品(A)和人参根和根茎样品(B)的HPLC-DAD 色谱图

Fig. 1 The HPLC-DAD chromatographic profiles of ginsenoside reference standards (A) and ginseng root and rhizome samples (B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取上述 14 个人参皂苷

适量,溶于甲醇配制对照品储备液。由于所测定的人参皂苷分为 2 个色谱条件,因此将 14 个人参皂苷分为 2 组混标。第 1 组混标对照品储备液每 1 mL 含各人参皂苷质量分别为:G-Ra₁, 9 000 μg; G-Ra₂, 6 000 μg; G-Rb₁, 40 000 μg; G-Rb₂, 20 000 μg; G-Rb₃, 6 000 μg; G-Rc, 20 000 μg; G-Rd, 24 000 μg; G-Rf, 12 000 μg; G-Ro, 24 000 μg; 20-GG-Rf, 3 000 μg; NG-R₁, 3 000 μg; NG-R₂, 3 000 μg; 第 2 组混标对照品储备液每 1 mL 含各人参皂苷质量数分别为:G-Re, 15 000 μg; G-Rg₁, 20 000 μg。由储备液用甲醇逐一稀释,得到 6 个不同浓度的对照品溶液,G-Ra₁ 为 720、360、180、90、45、22.5 μg·mL⁻¹, G-Ra₂ 为 480、240、120、60、30、15 μg·mL⁻¹, G-Rb₁ 为 3 200、1 600、800、400、200、100 μg·mL⁻¹, G-Rb₂ 为 1 600、800、400、200、100、50 μg·mL⁻¹, G-Rb₃ 为 480、240、120、60、30、15 μg·mL⁻¹, G-Rc 为 1 600、800、400、200、100、50 μg·mL⁻¹, G-Rd 为 1 920、960、480、240、120、60 μg·mL⁻¹, G-Rf 为 960、480、240、120、60、30 μg·mL⁻¹, G-Ro 为 1 920、960、480、240、60、7.5 μg·mL⁻¹, 20-GG-Rf 为 240、120、60、30、15、7.5 μg·mL⁻¹, NG-R₁ 为 240、120、60、30、15、7.5 μg·mL⁻¹, NG-R₂ 为 240、120、60、30、15、7.5 μg·mL⁻¹, G-Re 为 1 200、600、300、150、75、37.5 μg·mL⁻¹, G-Rg₁ 为 1 600、800、400、200、100、50 μg·mL⁻¹。所有储备液和对照品溶液分析前在 4 °C 下保存。

2.2.2 供试品溶液 精密称取过 40 目筛的人参根和根茎药材粉末 1.00 g, 置于具塞磨口量瓶中, 精密加入 70% 甲醇水溶液 20 mL, 25 °C 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 过滤, 再重复提取 2 次, 合并滤液, 减压回收溶剂, 得到的干膏用 70% 甲醇水溶液溶解并定容至 5 mL。过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液^[7]。

2.3 方法学验证

本研究建立的分析方法经方法学验证, 包括特异性、线性关系考察、仪器的精密度、重复性试验、稳定性试验、加样回收率试验、检测下限和定量下限等^[7], 符合定量分析要求。14 个人参皂苷的标准曲线在各自线性浓度范围内的相关系数为 0.999 4~0.999 9; 日内和日间精密度分别为 0.16%~1.31% 和 0.22%~1.24%; 重复性试验峰面积

的RSD为0.44%~2.22%;稳定性试验中,样品溶液分别在制备后0、4、8、16、32、48 h按HPLC法测定,峰面积的RSD为0.13%~1.95%;加样回收率为95.93%~103.93%,RSD为0.11%~2.64%;检测下限为0.66~8.82 μg,定量下限为2.21~29.39 μg。

2.4 样品含量测定

按“2.2.2”项方法制备30批次样品的供试品溶液,各进样10 μL,按“2.1”项色谱方法和条件测定,记录各分析物的色谱峰面积,以外标法计算含量,结果见表2。

表2 不同产地人参根和根茎样品(S1~S30)中人参皂苷的含量(μg·g⁻¹, n=3)

Tab.2 Determination results of ginsenoside content of ginseng root and rhizome (S1~S30) from different regions (μg·g⁻¹, n=3)

样品 (sample)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	TC
S1	—	—	2 579±4	2 115±1	535±16	1 777±6	604±1	1 721±20	683±11	2 318±9	2 138±6	307±8	106±2	62±2	14 943±85
S2	282±2	—	3 482±14	2 426±15	617±11	1 946±0	1 069±8	1 977±8	850±8	2 429±2	1 682±20	325±1	93±1	39±1	17 218±90
S3	—	125±2	3 032±6	2 198±15	347±1	1 961±10	883±3	1 674±22	349±4	1 895±3	1 096±21	248±6	543±5	561±12	14 913±110
S4	2 958±3	1 320±4	4 559±1	2 099±8	1 812±5	2 889±11	1 805±12	3 196±0	1 002±11	3 382±18	2 844±10	449±8	90±1	—	28 406±92
S5	378±2	—	6 191±7	3 546±10	804±5	3 138±5	925±5	3 564±4	1 056±1	4 508±2	2 702±13	366±7	778±12	760±8	28 718±80
S6	385±6	—	2 830±7	1 701±10	449±11	1 560±52	561±11	1 791±3	660±1	2 000±7	1 296±1	110±2	137±7	238±0	13 719±118
S7	—	163±2	3 180±4	2 728±21	566±8	1 974±8	1 481±14	1 646±1	454±2	1 522±14	3 852±22	248±6	308±4	134±8	18 256±114
S8	—	—	4 765±8	3 557±1	512±10	3 045±9	1 965±7	2 194±13	593±13	1 969±2	8 569±8	394±7	656±10	529±11	28 747±98
S9	—	99±3	2 743±5	2 384±13	722±10	1 743±21	1 037±15	1 709±26	348±5	1 254±32	2 833±1	125±2	195±3	117±7	15 309±143
S10	—	—	4 016±3	5 851±4	970±8	4 577±21	5 529±24	3 500±5	1 165±10	3 229±4	933±16	267±7	82±5	38±1	30 156±108
S11	—	—	3 994±334	4 514±20	645±23	3 851±15	2 818±11	2 316±9	673±2	2 651±12	2 526±1	341±7	541±8	536±7	25 406±448
S12	—	—	2 212±0	2 813±14	440±2	2 138±8	1 111±24	1 456±25	318±2	1 254±23	4 149±1	166±5	275±4	272±12	16 605±118
S13	—	—	7 129±13	5 234±26	819±13	4 588±6	3 474±3	3 447±19	1 504±12	4 710±32	3 751±4	560±6	133±1	89±3	35 438±138
S14	7±1	—	2 192±14	835±5	178±0	414±3	393±21	603±9	401±8	2 839±10	1 209±20	237±7	494±9	—	9 803±106
S15	—	—	5 389±5	4 223±2	668±14	2 953±13	2 276±1	2 400±15	675±22	2 120±6	1 814±5	300±13	656±10	581±4	24 056±110
S16	—	—	3 960±44	2 659±27	428±15	2 225±5	1 574±17	1 785±0	473±5	2 594±20	1 887±5	317±4	629±14	390±7	18 921±165
S17	—	—	2 774±10	2 521±13	382±16	2 033±1	1 449±4	1 564±16	347±6	1 661±19	1 198±6	166±2	103±0	91±1	14 288±94
S18	—	—	3 069±21	2 309±22	568±12	1 377±5	1 079±22	2 163±10	595±17	2 138±11	3 441±5	280±3	260±0	193±8	17 472±136
S19	123±1	—	3 711±11	3 399±9	532±17	2 512±20	1 666±9	1 667±9	726±3	2 348±2	2 079±6	282±10	74±2	—	19 119±99
S20	—	—	6 400±4	4 259±13	731±5	3 449±13	2 452±21	2 476±3	1 166±6	4 534±4	2 862±6	656±3	698±10	576±8	30 260±96
S21	245±6	—	5 627±5	4 394±24	620±10	3 753±7	2 418±1	2 554±4	909±3	2 911±6	3 140±1	412±14	289±10	218±8	27 490±100
S22	128±7	—	2 902±15	2 708±7	435±5	2 236±6	2 000±1	2 299±19	601±1	2 264±1	1 558±2	284±3	256±3	335±2	18 003±71
S23	—	—	2 726±7	1 700±3	394±16	1 350±5	957±20	1 376±3	468±10	1 716±2	2 483±3	262±13	524±4	134±2	14 091±88
S24	—	—	6 192±6	6 993±16	892±1	5 569±16	3 794±22	3 119±21	988±2	3 772±7	3 496±15	355±15	716±9	844±11	36 730±141
S25	—	—	1 195±4	1 386±1	325±9	1 169±5	612±11	1 314±6	301±5	738±7	893±6	181±11	139±3	117±4	8 372±71
S26	—	—	2 091±12	2 134±27	437±15	1 687±14	1 102±4	747±19	490±14	1 796±2	3 260±1	180±5	85±6	111±4	14 119±124
S27	—	—	4 410±20	3 860±17	652±22	3 260±5	2 040±15	3 062±21	876±10	2 767±17	1 513±8	269±1	70±3	35±0	22 813±139
S28	—	—	4 457±21	3 988±3	648±13	2 949±24	1 349±4	2 218±14	550±13	2 226±11	2 366±26	223±11	463±3	541±4	21 978±148
S29	184±3	169±10	3 900±37	2 643±38	610±7	2 207±33	860±6	1 955±6	960±9	2 466±13	1 388±8	389±10	34±2	73±3	17 839±184
S30	498±3	174±12	1 614±18	1 566±119	461±4	1 524±7	387±3	1 490±5	500±1	1 817±16	1 400±5	264±10	144±6	105±3	11 943±212

注(note): TC:总含量(total content); -:检测限以下(below the detection limit); 1:人参皂苷 Ra₁(G-Ra₁); 2:人参皂苷 Ra₂(G-Ra₂); 3:人参皂苷 Rb₁(G-Rb₁); 4:人参皂苷 G-Rb₂(G-Rb₂); 5:人参皂苷 Rb₃(G-Rb₃); 6:人参皂苷 Rc(G-Rc); 7:人参皂苷 Rd(G-Rd); 8:人参皂苷 Re(G-Re); 9:人参皂苷 Rf(G-Rf); 10:人参皂苷 Rg₁(G-Rg₁); 11:人参皂苷 Ro(G-Ro); 12:20-葡萄糖基人参皂苷 Rf(20-glu-G-Rf); 13:三七人参皂苷 R₁(NG-R₁); 14:三七人参皂苷 R₂(NG-R₂)。

3 结果与讨论

3.1 检测方法的选择

人参皂苷的含量测定,较早开发的是双光束薄层色谱扫描法^[12],由于属于半定量的分析方法,已趋于淘汰。随后相继开发出HPLC-UV^[13]、HPLC-ELSD^[14-15]等方法,但存在灵敏度低等问题,晚近开发出HPLC-DAD^[7,18]方法,灵敏度和准确度大大提高,

测定的相对成本较低,有利于在基层单位推广应用。尽管LC-MS法在人参皂苷含量测定上的应用逐渐增多^[8,16-17],但仪器价格不菲,测定成本大大提高,难以在基层单位推广应用。因此,本文选择了HPLC-DAD法测定30个产地的人参根和根茎中14个人参皂苷的含量。由于人参皂苷分子结构中没有生色团,只能在末端吸收203 nm处测定。

3.2 色谱柱的选择

文献报道的方法中使用的色谱柱各异,本研究应用人参皂苷对照品考察了 Diamonsil[®] ODS C₁₈ (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Varian Microsorb[™]-MV C₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和 Symmetry[®] ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 3种色谱柱的分离能力。通过比较三者的色谱图,发现用 Varian Microsorb[™]-MV C₈ 色谱柱,图1中的色谱峰6和8、9和10没有分开,11和13未达到基线分离;用 Symmetry[®] ODS C₁₈ 色谱柱,图1中的色谱峰9和10、12和13均未分开;而用 Diamonsil 色谱柱对分析目标物分离效果最好。因此最终确定使用 Diamonsil 为人参皂苷含量测定用色谱柱。

3.3 流动相的选择

本研究考察了不同配比的乙腈-水、甲醇-水以及含有甲酸、乙酸、磷酸等含酸溶液作为流动相对人参皂苷的分离能力,并结合相关文献中人参皂苷分析方法的报道,最终确定乙腈和乙腈-水-0.1%磷酸水溶液(5:90:8; *v/v/v*)作为流动相,梯度洗脱。但发现图1中的色谱峰3(G-Rg₁)和4(G-Re)尚不能分离,为分离这2个人参皂苷,又建立洗脱条件,流动相A为乙腈,流动相B为水,梯度洗脱(0~30 min, 20%A; 30~45 min, 20%A → 30%A),流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温为25℃,G-Rg₁和G-Re的分离度达到了定量分析要求。

3.4 含量测定成分的选择

Wang等^[8]采用UPLC-DAD-QTOF-MS/MS法在人参根和根茎中鉴定出至少130余个人参皂苷类成分,结合柱色谱法对人参根和根茎^[4-5]及其炮制品红参^[10]中人参皂苷类成分的分离鉴定结果,推断人参根和根茎中的主要人参皂苷类成分不足20个,大部分为微量成分。同时考虑文献报道原人参二醇型皂苷G-Ra₁、Ra₂、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd可能在人参加工为红参或口服人参在人肠内细菌的作用下产生生物活性更强的G-Rg₃、Rg₅、Rh₂,人参皂苷C-K^[3,19]等;G-Re、Rf、Rg₁、20-GG-Rf, NG-R₁、R₂为人参特征性成分原人参三醇型皂苷的代表,且G-Re可能在人参加工为红参或口服人参在人肠内细菌的作用下产生生物活性更强、具有良好药代动力学性质的G-Rg₂^[3,19-21], G-Re、Rf、Rg₁、20-GG-Rf, NG-R₁、R₂可能转化为生物活性更强的G-Rh₁^[3,19];G-Ro为人参中齐墩果酸型皂苷的代表,且对神经内分泌细胞

缺氧、氧化损伤具有保护作用^[22]。因此,选择了上述14个人参皂苷作为含量测定成分。

3.5 定量分析结果讨论

Wang等^[7]报道了不同产地66个批次人参根和根茎中上述14个人参皂苷的含量,并总结了它们的含量范围(μg·g⁻¹,人参根和根茎),G-Ra₁, 112~5326; G-Ra₂, 65~2656; G-Rb₁, 888~7723; G-Rb₂, 275~8247; G-Rb₃, 303~1609; G-Rc, 529~6122; G-Rd, 387~4338; G-Re, 539~4815; G-Rf, 289~1577; G-Rg₁, 870~6095; G-Ro, 667~6959; 20-GG-Rf, 108~739; NG-R₁, 26~943; NG-R₂, 25~699^[7]。本文报道另外不同产地30个批次人参根和根茎中上述14个人参皂苷的含量。由表2结果,五年生人参根和根茎样品S1~S26上述14个人参皂苷的含量范围(μg·g⁻¹,人参根和根茎),G-Ra₁, 0~2958; G-Ra₂, 0~1320; G-Rb₁, 1195~7129; G-Rb₂, 835~6993; G-Rb₃, 178~1812; G-Rc, 414~5569; G-Rd, 393~5529; G-Re, 603~3564; G-Rf, 301~1504; G-Rg₁, 738~4710; G-Ro, 893~8569; 20-GG-Rf, 110~656; NG-R₁, 74~778; NG-R₂, 0~844。在这些样品中,大部分样品G-Ra₁和Ra₂的含量以及样品S4、S14、S19的NG-R₂含量在检测线以下;NG-R₁的含量亦偏低。因此,建议这4个人参皂苷不纳入人参根和根茎中人参皂苷的质量评价中。同时亦发现它们含量的变异幅度较大,与前文^[7]报道结果的趋势基本一致。四年生人参根和根茎样品S27~S30的人参皂苷含量范围(μg·g⁻¹,人参根和根茎),G-Rb₁, 1614~4457; G-Rb₂, 1566~3988; G-Rb₃, 461~652; G-Rc, 1524~3260; G-Rd, 387~2040; G-Re, 1490~3062; G-Rf, 500~960; G-Rg₁, 1817~2767; G-Ro, 1388~2366; 20-GG-Rf, 223~389; NG-R₁, 34~463; NG-R₂, 35~541。S27和S28为国产人参样品,G-Ra₁和G-Ra₂的含量在定量限以下,但在韩国锦山郡产人参样品S29和S30中可定量分析出这2个人参皂苷。同时,亦发现它们含量的变异幅度较大。总的趋势是国产比韩国产人参样品的人参皂苷含量高。无论是中国产人参还是韩国产人参,物种皆为*P. ginseng*,未见发生遗传变异的报道,因此,栽培环境条件和规范化栽培技术方法是影响人参皂苷含量的主要因素。本文结果为人参中人参皂苷含量测定标记物的选择、制定人参皂苷的含量范围、进一步完善“人参规范化种植技术指南”^[23]提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 8
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 8
- [2] 杨秀伟, 富力. 人参中三萜类化学成分的生物学活性和药理学作用 [J]. 中国现代中药, 2016, 18 (1): 36
YANG XW, FU L. Biological and pharmacological activities of triterpenoids from of *Panax ginseng* [J]. Mod Chin Med, 2016, 18 (1): 36
- [3] 杨秀伟. 人参化学成分的代谢动力学研究 [J]. 中国现代中药, 2016, 18 (1): 16
YANG XW. Pharmacokinetic studies of chemical constituents of ginseng [J]. Mod Chin Med, 2016, 18 (1): 16
- [4] 王洪平, 杨鑫宝, 杨秀伟, 等. 吉林人参根和根茎的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (17): 2807
WANG HP, YANG XB, YANG XW, et al. Chemical constituents from roots and rhizomes of *Panax ginseng* cultivated in Jilin province [J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38 (17): 2807
- [5] WANG HP, YANG XB, YANG XW, et al. Ginsenjinol, a new protopanaxatriol type saponin with inhibitory activity on LPS-activated NO production in macrophage RAW 264.7 cells from the roots and rhizomes of *Panax ginseng* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15 (5): 579
- [6] 杨秀伟. 人参中三萜类化学成分的研究 [J]. 中国现代中药, 2016, 18 (1): 7
YANG XW. Triterpenoids in *Panax ginseng* [J]. Mod Chin Med, 2016, 18 (1): 7
- [7] WANG HP, ZHANG YB, YANG XW, et al. High-performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry to evaluate ginseng roots and rhizomes from different regions [J]. Molecules, 2016, 21 (5): 603
- [8] WANG HP, ZHANG YB, YANG XW, et al. Rapid characterization of ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS and simultaneous determination of 19 ginsenosides by HPLC-ESI-MS [J]. J Ginseng Res, 2016, 40 (4): 382
- [9] ZHOU QL, YANG XW. Four new ginsenosides from red ginseng with inhibitory activity on melanogenesis in melanoma cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25: 3112
- [10] 周琪乐, 徐崑, 杨秀伟. 中国红参化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (2): 233
ZHOU QL, XU W, YANG XW. Chemical constituents of Chinese red ginseng [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41 (2): 233
- [11] 杨秀伟. 中药物质基础研究是中药继承、发展、创新的关键科学问题 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (17): 3429
YANG XW. Substance basis research on Chinese materia medica is one of key scientific problems of inheriting, development and innovation of Chinese materia medica [J]. China J Chin Mater Med, 2015, 40 (17): 3429
- [12] CORTHOOUT J, NAESSENS T, APERS S, et al. Quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng* roots and ginseng preparations by thin layer chromatography-densitometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 1999, 21 (1): 187
- [13] SHI W, WANG YT, LI J, et al. Investigation of ginsenosides in different parts and ages of *Panax ginseng* [J]. Food Chem, 2007, 102 (3): 664
- [14] SUN BS, GU LJ, FANG ZM, et al. Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50 (1): 15
- [15] LEE DY, CHO JG, LEE MK, et al. Discrimination of *Panax ginseng* roots cultivated in different areas in Korea using HPLC-ELSD and principal component analysis [J]. J Ginseng Res, 2011, 35 (1): 31
- [16] JI QC, HARKEY MR, HENDERSON GL, et al. Quantitative determination of ginsenosides by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2001, 12 (5): 320
- [17] XIE YY, LUO D, CHENG YJ, et al. Steaming induced chemical transformations and holistic quality assessment of red ginseng derived from *Panax ginseng* by means of HPLC-ESI-MS/MSⁿ based multicomponent quantification fingerprint [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60 (33): 8213
- [18] 张高菊, 沈勇, 孟珍贵, 等. HPLC 法测定姜状三七 5 种皂苷含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (3): 500
ZHANG GJ, SHEN Y, MENG ZG, et al. Determination of 5 saponins in *Panax zingiberensis* by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36 (3): 500
- [19] 杨鑫宝, 杨秀伟, 刘建勋. 人参中皂苷类化学成分的研究 [J]. 中国现代中药, 2013, 15 (5): 349
YANG XB, YANG XW, LIU JX. Study on ginsenoside in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* [J]. Mod Chin Med, 2013, 15 (5): 349
- [20] GUI FJ, YANG XW, LI LY, et al. Simultaneous enantiomer determination of 20 (R)- and 20 (S)-ginsenoside-Rg₂ in rat plasma after intravenous administration using HPLC method [J]. J Chromatogr B, 2007, 850 (1-2): 1
- [21] 杨秀伟, 桂方晋, 田建明, 等. 人参皂苷-Rg₂ 在大鼠体内的药代动力学 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25 (7): 967
YANG XW, GUI FJ, TIAN JM, et al. Pharmacokinetics of ginsenoside-Rg₂ in rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2009, 25 (7): 967
- [22] JIANG Z, WANG YH, ZHANG XY, et al. Protective effect of ginsenoside Ro on anoxic and oxidative [J]. Biomol Ther, 2012, 20 (6): 544
- [23] 么厉, 程惠珍, 杨智. 中药材规范化种植 (养殖) 技术指南 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 293
YAO L, CHENG HZ, YANG Z. Guidelines for Good Agricultural Practice of Chinese Crude Drugs [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 293

(本文于 2016 年 5 月 29 日收到)