

快速溶剂萃取 - 液相色谱法测定人参药材中人参皂苷的含量

袁斌, 车金水, 金燕, 叶明立

(戴安中国有限公司应用研究中心, 上海 201203)

摘要 目的:建立快速溶剂萃取(ASE) - 液相色谱法测定人参药材中人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd。**方法:**用三氯甲烷脱脂,水饱和正丁醇提取药材中人参皂苷;采用 C₁₈柱,乙腈 - 水为流动相进行梯度洗脱,检测波长为 203 nm,柱温为 35℃,进行含量测定。**结果:**人参皂苷化合物响应值与进样量呈良好线性关系($r > 0.999$),测定精密度 RSD < 2.0%。**结论:**本法操作简便、快速,结果准确,可用于人参药材质量控制。

关键词:快速溶剂萃取;液相色谱;人参;人参皂苷,质量控制

中图分类号:R917 **文献标识码:**A **文章编号:**0254 - 1793(2013)07 - 0000 - 00

Determination of ginsenosides in Ginseng Radix et Rhizoma by ASE - HPLC

YUAN Bin, CHE Jin - shui, JIN Yan, YE Ming - li

(Shanghai Laboratory of Application and Research Center, Dionex China Limited, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective:To establish an accelerated solvent extraction(ASE) - HPLC method to determine ginsenosides Re, Rg₁, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd in Ginseng Radix et Rhizoma. **Methods:** Trichloromethane was used to remove the lipid ingredients and water - saturated butanol solution was adopted to extract the ginsenosides. A C₁₈ column with mobile phase of acetonitrile aqueous solution was used, and the contents of ginsenosides were determined at a wavelength of 203 nm with the column compartment set at 35 °C. **Results:** The response factor of ginsenosides regarding to the different injections is linear, which generates a satisfactory correlation coefficient ($r > 0.999$). The method precision showed a sound coefficient (RSD% < 2.0%). **Conclusion:** The method is simple, fast and accurate, which is suitable for quality control of Ginseng Radix et Rhizoma.

Key words: ASE; HPLC; Ginseng Radix et Rhizoma; ginsenosides; quality control

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根及根茎,最早出现在《神农本草经》中,记载其具有大补元气、补精益神的功效。在其后的历代医药书籍中均有其功效的记载和大量的临床使用记录。随着现代化学和药理学的综合研究,已经表明其中所含的人参皂苷为其增强人体免疫力,提高血氧量的主要活性成分^[1]。中国药典(2010年版一部)采用测定人参药材中人参皂苷的含量来控制人参药材的质量^[2],但该法中药材样品前处理过程花费时间较长,不利于日常样品测试。快速溶剂萃取(accelerated solvent extraction, ASE)^[3-7]技术利用常见溶剂在加温加压条件下提取样品。在高温高压条件下,溶剂粘度降低,分子扩散增强,提高分子运动能力,使溶剂和溶质分子能够快速渗透和分散,

且溶质分子更易于挣脱基质的束缚。与传统超声提取、索氏提取等样品处理比较,传统萃取技术通常以小时计算,甚至超过 24 h,但 ASE 技术通常所用时间为 10 ~ 20 min。同时与其他技术相比,ASE 还可节省 50% - 90% 的溶剂消耗。ASE 技术已经被国家标准(GB/T 19649 - 2006)^[8]指定为样品萃取技术。本研究工作中采用 ASE - 液相色谱法测定人参药材中人参皂苷的含量,其操作简便,时间短,结果准确。

1 仪器与试剂

Thermo Fisher 公司 UltiMate3000 液相色谱仪,配低压四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和 Chromeleon[®] 变色龙色谱数据管理软件。ThermoFisher 公司 ASE350 快速溶剂萃取仪。

人参药材由山东烟台绿叶制药公司提供,经鉴

定为五加科植物 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根部。人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 的对照品购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈 (Fisher 公司) 为色谱级, 纯化水 (Millipore 公司), 三氯甲烷、正丁醇 (国药集团化学有限公司) 均为分析纯。

2 实验条件

2.1 快速溶剂萃取 温度: 140 °C; 压力: 10 MPa; 多步萃取程序: ①三氯甲烷萃取 2 次 (20 mL · 次⁻¹)、弃去萃取液, ②水饱和正丁醇萃取 2 次 (20 mL · 次⁻¹), 收集萃取液; 静态循环次数: 2

2.2 色谱条件 色谱柱: Acclaim® 120 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 30 min, 21% B; 30 ~ 65 min, 21% B → 40% B; 65 ~ 75 min, 40% B → 90% B; 75 ~ 80 min, 90% B; 80 ~ 80.1 min, 90% B → 21% B; 80.1 ~ 90 min, 21% B); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 203 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。

3 结果与讨论

3.1 ASE 提取条件的确定

中国药典 (2010 年版一部) 人参药材中人参皂苷的含量测定方法处理过程耗时长, 且操作烦琐。为提高提取效率, 决定使用 ASE 技术提取人参皂苷。在 ASE 过程中, 通过改变温度等试验参数来加速溶剂从样品中提取目标成分, 减少样品处理时间。在本实验中, 比较了不同温度和循环次数对萃取效果的影响, 当温度升至 140 °C 时, 提取效率达到最佳, 在 160 °C 时, 萃取液颜色变深, 色谱峰杂质增多, 且人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 与 Rd 的含量有所下降, 同时色谱图中未知杂质成分增多, 因此选择 140 °C 为萃取温度 (见图 1)。

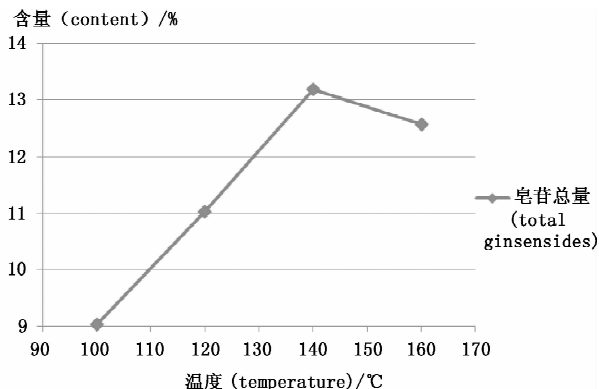


图 1 温度对萃取效率的影响

Fig 1 Temperature effect on extraction

在静态循环时间 (5 min) 不变的条件下, 循环 1 次时, 皂苷萃取量为 90%, 循环第 2 次时皂苷提取量约为 10%, 增加到第 3 次时, 皂苷萃取量则约为 2%, 即再增加循环次数时, 皂苷提取效率无明显增加, 见图 2。

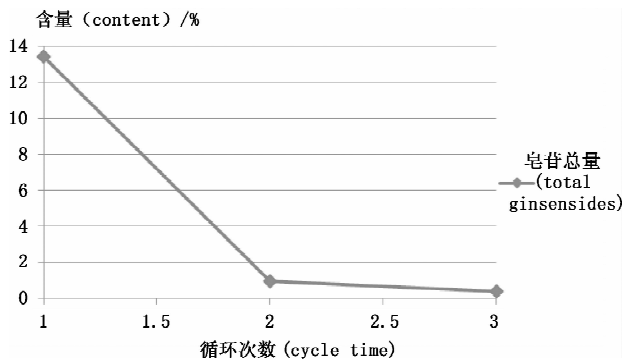


图 2 循环次数对萃取效率的影响

Fig 2 Cycle times effect on extraction

在样品量为 1 g 的条件下, 比较了提取溶剂体积为 5、10、20、30 mL 对皂苷提取率的影响, 结果表明当溶剂量为 20 mL 时皂苷提取效率达到最大值, 再增大溶剂体积, 皂苷提取效率无明显变化, 见图 3。

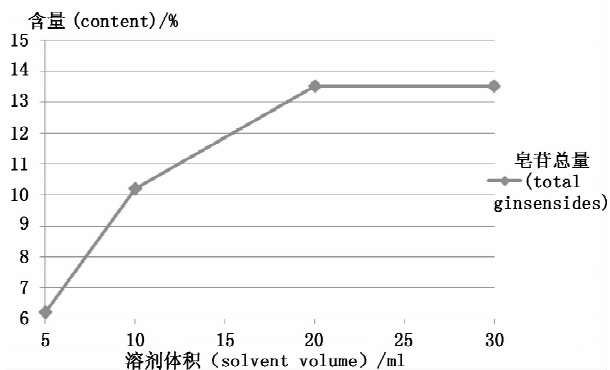


图 3 溶剂体积对萃取效率的影响

Fig 3 Solvent volume effect on extraction

通过比较后采用提取温度为 140 °C, 压力为 10 MPa, 静态循环 2 次的条件提取药材中皂苷化合物, 所需溶剂为 20 mL, 样品处理总时间为 30 min。

3.2 色谱分离条件的确定 参考中国药典中人参皂苷的色谱分离条件对人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 6 个皂苷进行分析, 分离结果表明在该条件下, 其中 2 个皂苷无法达到基线分离。通过对分离条件的优化后, 在本文确定的色谱条件下 6 个皂苷与相邻峰均可达到基线分离 (见图 4), 以人参皂苷 Rg₁ 峰计算理论塔板数为 2800, 人参皂苷 Rg₁ 与相邻色谱峰的分度为 1.7。

3.3 线性关系考察 准确称取人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 的对照品各 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 各含 1 mg 人参皂苷的混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20 μL, 依次进样, 在本文确定的色谱条件下进行分析并记录色谱图。以对

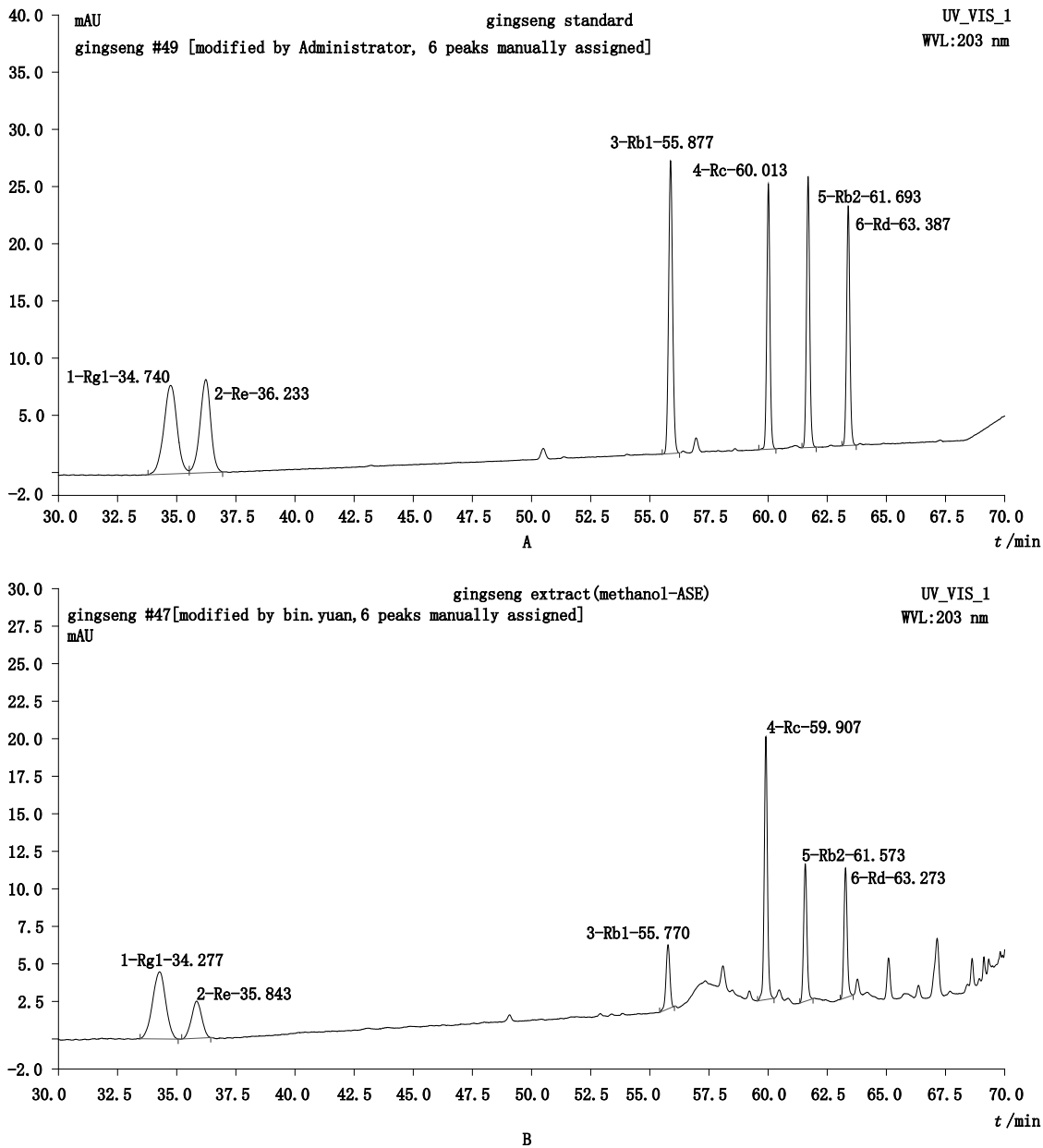


图4 对照品(A)及人参药材(B)色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of reference substances(A) and Ginseng Radix et Rhizoma(B)

人参皂苷(ginsenosides): 1. Rg₁ 2. Re 3. Rb₁ 4. Rc 5. Rb₂ 6. Rd

照品进样量 X (μg) 为横坐标, 以峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归处理。人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 进样量在 1~20 μg 的范围内呈良好线性关系, 回归方程分别为:

$$Y = 0.2211X + 0.005 \quad r = 0.9991$$

$$Y = 0.1954X + 0.023 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 0.2219X - 0.007 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 0.1576X + 0.013 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 0.1612X + 0.011 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 0.1416X + 0.003 \quad r = 0.9999$$

3.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10

μL , 在本文色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱图。人参皂苷 Rg₁ 峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.45%、0.59%、0.23%、0.35%、0.21%、0.16%。

3.5 重复性试验 采用本文确定的 ASE 法平行制备供试品溶液 6 份, 进样测定, 测得样品中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 含量 ($n=3$) 分别为 1.23、1.47、2.24、1.78、2.56、1.62 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.7%、1.2%、0.8%、1.2%、1.2%、1.1%。

3.6 加样回收试验 精密称取药材粉末 0.5 g, 加入混合对照品溶液 0.5 mL, 室温下挥干溶剂, 按本

文确定的 ASE 法制备 6 份供试溶液,测定人参皂苷的量。计算加样回收率,结果见表 1。

3.7 样品测定 称取样品粉末(过 4 号筛)1 g,加入硅藻土约 2 g,混匀,置 20 mL 样品池中,置于快速溶剂萃取仪上,依次用三氯甲烷、水饱和正丁醇按照“2.1”项中萃取条件提取样品中人参皂苷。将正丁醇提取液置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中,摇匀,即得供试品溶液。精密吸取供试品溶液在本文色谱条件下进样分析。另采用中国药典法^[2]制备供试品溶液,在本文确定的色谱条件下进样分析。将 2 种方法的测定结果进行统计分析(*F* 检验)比较,结果见表 2 与表 3。在表 3 中,对于给定 $\alpha = 0.05$ 条件下,*F* 值(2.596)小于临界 *F* 值(5.318),表明 2 种样品处理方法在对药材中目标成分的提取效果没有明显差异,但从表 2 中得知 ASE 方法较药典的样品处理方法所需时间少,从而提高效率,故可用 ASE 联合液相色谱方法来检测人参药材中人参皂苷的含量。

表 1 加样回收率实验(*n* = 6)

Tab 1 Study of recovery tests

人参皂苷 (ginsenosides)	含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
Rg ₁	0.652	0.522	102.7	1.2
Re	0.733	0.536	99.3	1.2
Rb ₁	1.122	0.511	100.4	0.8
Rc	0.886	0.508	102.8	1.2
Rb ₂	1.246	0.521	101.9	0.8
Rd	0.813	0.511	99.6	1.1

表 2 中国药典提取法与 ASE 提取法的结果比较($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, *n* = 5)

Tab 2 Results comparison of ChP extraction method and ASE extraction method

人参皂苷 (ginsenosides)	ASE 提取法 (ASE extraction method)	中国药典提取法 (ChP extraction method)
Rg ₁	1.23	1.22
Re	1.45	1.46
Rb ₁	2.26	2.25
Rc	1.78	1.76
Rb ₂	2.55	2.54
Rd	1.63	1.62
总量(total)	10.90	10.85
所需时间(elapsed time)/h	0.5	16

表 3 不同提取方法的人参皂苷总量方差分析结果(*n* = 5)

Tab 3 ANOVA results of total ginsenosides from different extraction methods

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
ASE 提取法 (ASE extraction method)	5	54.42	10.884	0.00083		
中国药典提取法 (ChP extraction method)	5	54.28	10.856	0.00068		
方差分析(ANOVA)						
(source of variation)	SS	df	MS	<i>F</i>	<i>P</i> - value	<i>F</i> _{crit}
组间(between groups)	0.00196	1	0.00196	2.596	0.146	5.318
组内(within groups)	0.00604	8	0.000755			
总和(total)	0.008	9				

4 结论

ASE 技术在加压加温条件下进行样品提取,其优势在于:在提取过程中溶剂始终保持液态,保证其与样品有最大接触面积,且溶剂粘度降低易于进入样品基质,同时高温条件下分子运动能力提高,扩散加强,从而加速提取过程,提高萃取效率。本法采用 ASE 方法提取人参药材中皂苷化合物,与中国药典的样品处理方法比较,其样品处理时间由传统前处理所需 16 h 降低到快速萃取只需约 0.5 h,大幅度提高样品处理效率,而分析结果无明显较大差别。因此,快速溶剂萃取可用于人参等天然产物中活性成分的提取。

参考文献

- LI Tai - ping(李泰平). Research progress on pharmacological activity of ginsenosides(人参皂苷药理活性的研究进展). *Biol Teach* (生物学教学), 2003, 28(4): 1
- ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 8
- Richter BE, Jones BA, Porter LN, et al. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal Chem*, 1996, 68(6): 1033
- WANG Shu - hong(王淑红), XIONG Ying(熊英), WANG Xiang - hong(王祥红). Sample preparation of *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hant. - Mazz. for determination of content by accelerated solvent extraction(加速溶剂萃取法用于灯盏细辛中灯盏乙素的测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2006, 26(5): 703
- CHEN - Jian(陈舰), ZHANG Jing - hua(张景华). Determination of carbendazim residue of tea leaflet by ASE - HPLC(快速溶剂萃取 - 高效液相法测定茶叶中多菌灵残留量). *Guangdong Chem Ind*(广东化工), 2011, 38(1): 170
- LIU Bin(刘斌). Simultaneous quantification of seven flavonoids in eagle tea using pressurized liquid extraction and HPLC(加压溶剂提取 - HPLC 法同时测定老鹰茶中 7 个黄酮类化合物). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2010, 30(8): 1424
- Wong LJ, Curtis LW. Recent Advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 17(6): 300
- GB/T 19649 - 2005. Determination of 475 pesticides residue in ceramic wheat(粮谷中 475 种农药残留测定方法)

(本文于 2013 年 5 月 28 日修改回)