

## · 基础研究 ·

黑参中人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 的含量测定<sup>△</sup>

朱连连, 栾晓宁, 窦德强\*

辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

**[摘要]** 目的: 建立黑参中人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 的含量测定方法。方法: 利用高效液相色谱法, 采用 Thermo 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 测定黑参中人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 含量。结果: 研究表明, 不同批次黑参中人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 的含量差别明显, 平均含量为 1.236 5 mg·g<sup>-1</sup>, 最低含量为 0.368 7 mg·g<sup>-1</sup>, 最高含量为 2.500 7 mg·g<sup>-1</sup>, 相差 6.8 倍。结论: 建立了黑参中人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 含量的测定方法, 对不同批次样品进行测定后发现, 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 含量差别明显, 为黑参的质量控制和开发利用提供参考。

**[关键词]** 黑参; 人参皂苷 Rg<sub>3</sub>; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1; R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)03-0323-05

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20180825002

**Determination of Ginsenoside-Rg<sub>3</sub> in Black Ginseng**

ZHU Lian-lian, LUAN Xiao-ning, DOU De-qiang\*

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600, China

**[Abstract]** **Objective:** An HPLC method was established and validated for the determination of ginsenoside-Rg<sub>3</sub> in black ginseng. **Methods:** Ginsenoside-Rg<sub>3</sub> in black ginseng was determined by HPLC with Thermo column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) as stationary phase and acetonitrile-water in gradient elution mode as mobile phase. **Results:** The content of ginsenoside-Rg<sub>3</sub> in different batches of black ginseng was significantly different. The average content of ginsenoside-Rg<sub>3</sub> was 1.236 5 mg·g<sup>-1</sup>, the lowest was 0.368 7 mg·g<sup>-1</sup>, and the highest was 2.500 7 mg·g<sup>-1</sup>, with a difference of 6.8 times. **Conclusion:** The method for determination of the ginsenoside-Rg<sub>3</sub> content of in the black ginseng by HPLC was established, and different batches of samples were measured. The difference of ginsenoside-Rg<sub>3</sub> content in different batches was obvious, the results provided a theoretical basis for the quality control and development and utilization of black ginseng.

**[Keywords]** black ginseng; ginsenoside-Rg<sub>3</sub>; HPLC

黑参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 经过九蒸九晒等炮制工艺加工而成的一种继红参之后的人参新加工炮制品, 目前还没有被《中华人民共和国药典》所记载, 黑参最早产于韩国, 经过九蒸九晒等炮制工艺加工而成<sup>[1]</sup>。近几年我国也在对黑参进行开发研究, 黑参比生晒参、红参有更强的生物活性, 如抗炎、抗氧化、增强免疫功能、降血糖、抗肿瘤等<sup>[2]</sup>。人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 属于稀有皂苷, 是黑参的主要成分, 具有明显的生理活性, 因此建立人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 的含量测定方法, 为黑参资源的质量控制和开发应用提供参考。

**1 材料****1.1 仪器**

万分之一分析天平 (Acculab 型, Sartorius group, 德国); 十万分之一分析天平 (CP225D 型, Sartorius group, 德国); 电热鼓风干燥箱 (202-1 型, 上海阳光实验仪器有限公司); 高速万能粉碎机 (武义县屹立工具有限公司); 称量瓶 (规格: 40 × 25); Agilent 1100 series 高效液相色谱仪; KQ-250DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 恒温水浴锅 (HH-S 型, 巩义市予华仪器有限公司)。

<sup>△</sup> [基金项目] 国家自然科学基金 (81773858)

\* [通信作者] 窦德强, 教授, 研究方向: 中药药效 (性) 物质基础及新药开发研究; E-mail: deqiangdou@126.com

## 1.2 试药

人参皂苷 Rg<sub>3</sub>对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110804-200603);三氯甲烷(天津市科密欧化学试剂有限公司);液相用乙腈、甲醇均为色谱纯;水为超纯水。

黑参样品1~14由辽宁中书堂黑参有限公司提供;样品15为吉林白山地炮制高丽黑参;样品16~20为韩国产黑参(样品信息见表1)。

## 2 方法

### 2.1 溶液配制

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取人参皂苷 Rg<sub>3</sub>对照品5.48 mg,用甲醇定容至25 mL容量瓶,配成质量浓度为0.219 2 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液,摇匀,即得,4℃下低温储藏。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约1.5 g,精密称定,加三氯甲烷置索氏提取器中,加热回流3 h,弃去三氯甲烷液,药渣挥干溶剂,连同滤纸筒移入50 mL具塞锥形瓶中,精密加水饱和和正丁醇50 mL,密塞,浸泡2 h,超声处理30 min,取滤液25 mL,正丁醇饱和氨试液洗3次,每次10 mL,取正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解,定容于5 mL容量瓶中,过滤,即得<sup>[3]</sup>。

### 2.2 色谱条件

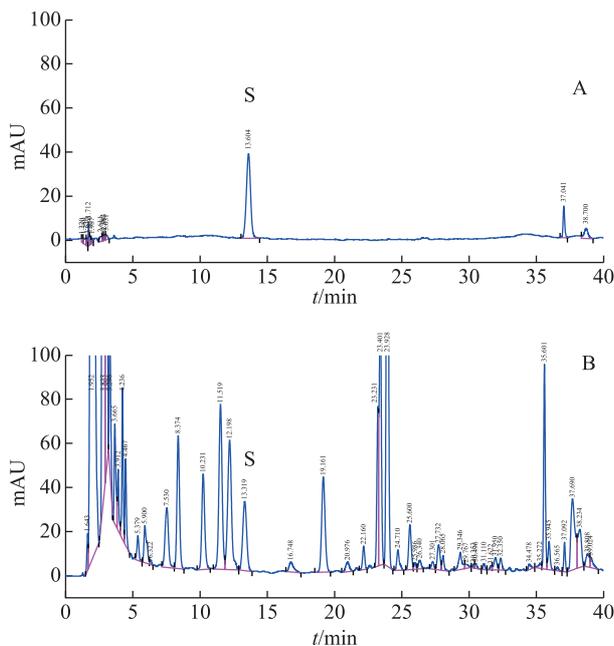
色谱柱:Thermo柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);二极管阵列检测器(DAD);流动相:乙腈-水梯度洗脱(见表2);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:30℃;检测波长:203 nm;检测时间:40 min;进样量:10 μL。在选定色谱条件下人参皂苷 Rg<sub>3</sub>与相邻组分分离良好<sup>[4]</sup>。

表1 黑参样品信息表

编号	芦长/cm	主根长/cm	总长/cm	芦质量/g	主根质量/g	总质量/g	批号
S1	2.0	11.0	17.0	0.889 9	20.234 1	33.071 8	20170312
S2	1.0	7.5	21.0	0.906 3	19.907 4	29.107 1	20170325
S3	1.0	7.0	16.5	0.561 0	15.195 0	23.803 6	20170328
S4	1.0	7.0	17.0	0.449 5	14.718 0	22.578 2	20170405
S5	0.6	14.0	19.3	0.683 0	19.525 0	21.565 0	20170412
S6	1.0	6.0	19.0	0.590 5	11.874 3	19.610 7	20170423
S7	2.0	6.0	25.0	0.928 8	11.522 1	19.520 3	20170509
S8	1.0	7.5	12.0	0.712 0	16.438 0	18.079 0	20170510
S9	1.0	12.0	16.4	0.441 0	16.500 0	18.062 0	20170528
S10	0.5	6.0	9.9	0.213 0	9.830 0	10.606 0	20170606
S11	0.5	7.0	11.9	0.294 0	10.351 0	11.085 0	20170611
S12	1.0	4.0	10.0	0.246 1	6.545 0	7.062 6	20170615
S13	0.5	5.0	9.5	0.270 1	5.420 4	6.415 7	20170705
S14	0.6	9.5	19.3	0.683 0	19.525 0	21.565 0	20170708
S15	0.3	9.0	14.6	0.473 0	8.585 0	9.786 0	20170721
S16	0.2	6.0	12.3	0.350 6	9.420 4	11.047 2	20170726
S17	0.3	9.0	13.0	0.354 7	16.523 3	17.878 0	20170806
S18	0.4	5.0	12.1	0.223 0	8.312 6	9.535 6	20170814
S19	0.6	7.0	14.5	0.532 2	9.603 1	11.135 3	20170822
S20	0.5	6.0	10.2	0.347 3	9.538 9	9.886 2	20170826

表2 HPLC 梯度洗脱条件

时间/min	乙腈/%
0~15	45
15~25	45~70
25~35	70~92
35~40	92



注: A. 对照品; B. 供试品; S. 人参皂苷  $Rg_3$  色谱峰。

图1 对照品及样品的 HPLC 图

### 2.3 系统适用性试验

选取 3 根不同商品规格的色谱柱 Thermo (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Chiral (150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 和 Phenomenex (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 按 2.2 色谱条件, 对照品和样品各进 10  $\mu$ L, 根据报告得出目标峰在每根柱子上的分离度、对称因子、拖尾因子和理论塔板数等数据。

### 2.4 供试品制备方法考察

供试品 1: 取本品粉末(过四号筛)1.5 g, 精密称定至 50 mL 锥形瓶中, 精密加甲醇 50 mL, 密塞, 浸泡 2 h, 超声处理 30 min, 取滤液 25 mL, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 容量瓶, 过滤, 待测。

供试品 2: 取本品粉末(过四号筛)1.5 g, 精密称定, 加三氯甲烷置索氏提取器中, 加热回流 3 h, 弃去三氯甲烷液, 药渣挥干溶剂, 连同滤纸筒移入 50 mL 锥形瓶中, 精密加水饱和正丁醇 50 mL, 密塞,

浸泡 2 h, 超声处理 30 min, 取滤液 25 mL, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 容量瓶, 过滤, 待测。

供试品 3: 取本品粉末(过四号筛)1.5 g, 精密称定, 加三氯甲烷置索氏提取器中, 加热回流 3 h, 弃去三氯甲烷液, 药渣挥干溶剂, 连同滤纸筒移入 50 mL 锥形瓶中, 精密加水饱和正丁醇 50 mL, 密塞, 浸泡 2 h, 超声处理 30 min, 取滤液 25 mL, 正丁醇饱和氨试液提取 3 次, 每次 25 mL, 取正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇溶解, 定容于 5 mL 容量瓶中, 过滤, 待测。

### 2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 (0.219 2 mg·mL<sup>-1</sup>) 6、8、10、12、16、20  $\mu$ L, 按上述色谱条件进行测定, 以峰面积积分值为纵坐标 Y, 以人参皂苷  $Rg_3$  进样量为横坐标 X ( $\mu$ g), 计算线性回归方程。

2.5.2 精密度考察 精密称定样品 1.502 3 g, 按样品制备方法制备供试品, 在上述色谱条件下, 对同一样品溶液连续进样 6 次, 计算各峰面积的 RSD。

2.5.3 重复性考察 按供试品溶液制备方法, 制备黑参样品 6 份, 在上述色谱条件下, 对其进行含量测定, 计算出样品中人参皂苷  $Rg_3$  含量, 并计算出 6 份样品含量的 RSD 值。

2.5.4 稳定性考察 在室温条件下, 精密吸取同一样品溶液, 按样品测定方法, 测定放置 0、2、6、8、12 h 内样品中人参皂苷  $Rg_3$  的峰面积, 并计算出样品含量的 RSD 值。

2.5.5 定量下限的测定 进已知浓度的对照品, 选出一段基线平稳的时间段, 测出噪音值, 根据其相应的峰高值, 将对照品溶液稀释至 10 倍信噪比的浓度, 重复进样 6 次, 计算 RSD 值。

2.5.6 加样回收率考察 由样品重复性测定项, 得知样品中人参皂苷  $Rg_3$  的含量为 1.805 6 mg·g<sup>-1</sup>。称取黑参样品 6 份, 每份 0.75 g, 精密称定, 精密加入质量浓度为 0.219 2 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液 6.18 mL, 挥干样品, 按测定项下方法处理, 计算回收率。

### 2.6 水分的测定

按 2015 版《中华人民共和国药典》第四部水分测定法中第二法的操作<sup>[5]</sup>, 测定不同批次黑参的含水量。

### 2.7 含量测定

按供试品溶液制备项下方法制备样品液, 每份

样品平行做3份。精密吸取样品液10  $\mu\text{L}$ ，注入高效液相色谱仪中，测定人参皂苷  $\text{Rg}_3$  的色谱峰面积，用外标法计算不同批次黑参样品中人参皂苷  $\text{Rg}_3$  的含量。

### 3 结果

#### 3.1 色谱柱考察

3根不同的色谱柱对于人参皂苷  $\text{Rg}_3$  的分析符合要求。3根色谱柱所测样品分离度均大于1.5，理论塔板数均大于5000，最小理论塔板数考察结果符合有关规定。Thermo 柱的柱效最大，且拖尾因子0.969符合《中华人民共和国药典》标准(0.95~1.05)，所以选择 Thermo 柱进行含量测定。

#### 3.2 提取方法考察

见表3。

表3 不同提取方法考察

供试品	样品量/g	$\text{Rg}_3$ 峰面积	提取量( $\text{Rg}_3$ 量/药材量, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1	1.504 9	957.4	1.649 0
2	1.506 4	962.4	1.655 9
3	1.508 5	1 003.5	1.712 9

正丁醇提取比甲醇好，正丁醇提取液经正丁醇饱和氨试液反洗后，提取液更澄清，且不影响含量，最后选择供试品3的提取方法。

#### 3.3 方法学考察

线性回归方程为  $Y = 385.49X - 12.517$ ， $r = 0.999 2$ ，人参皂苷  $\text{Rg}_3$  在1.315~4.384  $\mu\text{g}$  线型关系良好；精密度考察中 RSD 为1.88%，精密度良好；重复性考察中 RSD 为2.73%，表明方法重复性良好；稳定性考察中 RSD 为2.44%，表明样品在12 h 内稳定性良好；进质量浓度为  $0.876 8 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品，选出一段基线平稳的时间段(9~9.5 min)，测出噪音值，则定量下限为  $0.876 8 \times 10^{-2}$ ；平均加样回收率99.04%，RSD 小于3%，符合有关规定。由方法学考察结果可知，本实验方法检测灵敏度高，检测结果可靠。

#### 3.4 黑参中人参皂苷 $\text{Rg}_3$ 含量测定

见表4。

以干燥品计算人参皂苷  $\text{Rg}_3$  含量，根据实验数据建议黑参中的水分不超过12%；不同批次黑参中人参皂苷  $\text{Rg}_3$  的含量差异明显，其中人参皂苷  $\text{Rg}_3$  的平均含量(以干燥品计)为  $1.236 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，最低为

$0.368 7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，最高为  $2.500 7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，相差6.8倍；国产和韩国产黑参中人参皂苷  $\text{Rg}_3$  的平均含量分别为  $1.515 9$ 、 $0.398 4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，相比较而言韩国产黑参中人参皂苷  $\text{Rg}_3$  的含量较低，其黑参质量较差。

$$\text{人参皂苷 } \text{Rg}_3 \text{ 含量}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\text{Rg}_3 \text{ 含量}}{1 - \text{含水量}} \times 100\% \quad (1)$$

表4 黑参中以干燥品计人参皂苷  $\text{Rg}_3$  含量

编号	$\text{Rg}_3$ 平均质量分数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	含水量/ %	以干燥品计算 $\text{Rg}_3$ 质量 分数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
S1	0.921 2	2.92	0.948 9
S2	1.143 8	4.79	1.201 3
S3	1.441 2	4.54	1.509 7
S4	2.261 1	9.58	2.500 7
S5	0.991 3	6.81	1.063 7
S6	1.376 5	3.47	1.426 0
S7	1.006 6	11.35	1.135 5
S8	1.981 2	10.36	2.280 4
S9	1.325 6	6.21	1.413 4
S10	1.625 7	8.10	1.769 0
S11	0.900 0	8.67	0.985 4
S12	1.460 7	9.28	1.610 1
S13	1.371 8	7.13	1.477 1
S14	1.805 6	9.20	1.988 5
S15	1.314 1	7.98	1.428 1
S16	0.369 5	5.74	0.392 0
S17	0.349 4	5.23	0.368 7
S18	0.368 7	5.58	0.390 5
S19	0.404 0	4.67	0.423 8
S20	0.398 2	4.47	0.416 8

#### 3.5 黑参中人参皂苷 $\text{Rg}_3$ 含量与外观性状的相关性分析

采用 SPSS 20.0、Masslynx 软件对数据分别进行相关分析，黑参中人参皂苷  $\text{Rg}_3$  含量与黑参外观各项指标无相关性， $P$  值均大于0.01。

### 4 讨论

本实验考察了脱脂溶剂及时间，未脱脂和用三氯甲烷脱脂几乎没有区别，皂苷未损失，石油醚脱脂使皂苷峰面积降低，考虑到尽可能除去脂溶性等杂质，保护色谱柱，选择用三氯甲烷脱脂再提取皂苷，时间为3 h；考察提取方式得到回流和超声相差

不大,与其他研究相比,超声提取更简便快速;通过对不同提取溶剂的考察,结果发现提取率依次为乙醇<甲醇<正丁醇,因此最终选择正丁醇。得到的正丁醇提取液再用氨水反洗是为了中和提取成分中的酸性物质,防止酸性环境使提取药物中的一些成分改变,也会防止酸性物质进液相损坏柱子,经考察氨水反洗后,皂苷含量不受影响,而且反洗后的提取液更澄清。

由于不同样品人参皂苷单体含量差别很大,很难评价黑参的质量,在保证影响人参药材品质的生长年限及保存条件等因素一致的情况下,造成这种差距的原因可能是与黑参炮制的方法有关。同时不同批次黑参中人参皂苷  $Rg_3$  含量与黑参外观各项指标无相关性,其原因也是黑参炮制过程中的加工方法和温度等工艺的影响。因此应该严格规范黑参的炮制工艺。黑参的制作需要将鲜人参在蒸参设备中用蒸汽或其他方法进行蒸煮后晾干的过程反复进行9次,其加工流程为:收获鲜参-清洗-干燥-第一次蒸曝-第二次蒸曝-第三次蒸曝-第四次蒸曝-第五次蒸曝-第六次蒸曝-第七次蒸曝-第八次蒸曝-第九次蒸曝<sup>[6]</sup>。除此之外,不同黑参样品中多糖、多酚、游离氨基酸等的含量都具有一定的差距<sup>[7]</sup>。目前,

国内外对黑参的质量没有统一的标准,这就造成了评价黑参质量的困难。因此,建立统一的质量标准来评价黑参已经迫在眉睫。本实验研究有助于推进黑参质量控制的标准化进程,为黑参的开发利用提供参考。

### 参考文献

- [1] 孙佰申,叶光耀,张超超. HPLC-ELSD 同时测定九蒸九曝法炮制的黑参中极性和非极性皂苷[J]. 药物分析杂志,2013,33(3):388-394.
- [2] 袁媛,徐荣培. 人参新炮制品——黑参的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2013,31(11):2379-2381.
- [3] 陈爽,张楠,翁丽丽. 西洋参发酵前后人参皂苷  $Rb_1$ 、 $Rg_3$  含量比较研究[J]. 人参研究,2017,29(2):28-31.
- [4] 姜海平,窦德强,荆淑琴,等. 林下山参的人参皂苷含量分析和指纹图谱研究[J]. 中国现代中药,2008,10(4):12-15.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:104.
- [6] 窦德强,王谷强,匡海学,等. 中国石柱参及相关中药研究[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2016:157-158.
- [7] 曾露露,丁传波,赵婷,等. 不同产地黑参化学成分含量测定及质量评价[J]. 营养学报,2017,39(5):498-503.

(收稿日期:2018-08-25 编辑:王笑辉)