DOI:10.11656/j.issn.1673-9043.2017.03.15

石柱和抚松产人参叶指纹图谱分析*

栾晓宁,袁 颖,窦德强
(辽宁中医药大学 药学院,大连 116600)

摘要:[目的] 建立石柱和抚松人参叶药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,以探讨两产地人参叶皂苷含量的差异。**[方法]** 采用HPLC法分别测定采于辽宁宽甸石柱、吉林抚松的人参叶HPLC指纹图谱,运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对各样品进行分析。**[结果]** 10批人参叶样品的HPLC指纹图谱相似度均大于0.9,标定了22个共有峰,不同产地人参叶共有峰相对含量存在一定的差异。**[结论]** 建立的人参叶HPLC指纹图谱分析方法科学可靠,可为人参叶药材质量研究提供参考。

关键词:石柱参;人参叶;高效液相色谱;指纹图谱
中图分类号:R282.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-9043(2017)03-0219-04

石柱参也称柱参,为人参从野生变种植的优良品种,至今已有40余年的栽培历史[1]。石柱参原是指产于辽宁省宽甸满族自治县下露河乡(现为振江镇)石柱子村的人参,并由此而得名,民间素有"柱参不到不开行"的说法,在中国栽培人参中占有重要地位。2013年5月21日中国农业部批准"辽宁宽甸柱参传统栽培体系"为"中国重要农业文化遗产"。人参叶为2015版《中国药典》收载品种[2],经研究人员发现人参叶的主要成分为皂苷类化合物[3],现已分离并确定的单体皂苷已有60多种,人参叶中皂苷类成分具有抗肿瘤、抗衰老、护心护肝、调节免疫,以及促进细胞增殖等多种作用[4-11]。人参茎叶与人参根的药理作用相似,但是人参茎叶的总皂苷含量明显高于人参根的含量[12],且人参叶具有资源丰富、价格低廉、皂苷类有效成分含量高等特点,因此具有广阔的开发前景。由于受阳光、土壤、水分等影响,不同产地人参叶质量存在差异,药材的化学成分含量不尽相同。本实验将研究丹东市宽甸石柱满族自治县和吉林省抚松县两个产地的人参叶,利用指纹图谱比较两者的相似度及分析石柱参的特点,为人参叶资源的合理应用和质量控制提供依据。

1 仪器及试药

1.1 仪器 Agilent1260高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);万分之一分析天平(Acculab型,Sartorius group);超声波清洗器(KQ-250DE型,昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发仪(RE-52C型,巩义市予华仪器有限公司)。

1.2 试药试剂 色谱乙腈(Simark,韩国);色谱甲醇(Oceanpakalexative chemical,瑞典);水为纯净水;磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)。

人参叶分别采于丹东市宽甸石柱满族自治县、吉林省抚松县,共10批样品,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为(*Panaxginseng* C. A.Mey.)的叶子。

2 溶液制备

2.1 供试品溶液的制备 取人参叶干燥粉末(过60目筛)0.2 g,精密称定,用滤纸包成茶叶包,放入圆底烧瓶,加石油醚30 mL回流1 h,弃去溶剂,甲醇50 mL,80 ℃回流3 h,将提取液旋干,加甲醇溶解后,转至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷Rg1、Re、Rb1、20(S)-人参皂苷Rg2、20(R)-人参皂苷Rg2、F1、Rc、Rb2、Rh1、Rd对照品适量(由本实验室自制),加甲醇制成每1 mL含1.0 mg的溶液,即得。

3 高效液相色谱法(HPLC)色谱条件

安捷伦ZORBAX SB-C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)柱,二极管阵列检测器(DAD),以乙腈为流动相A,以0.1%磷酸水溶液为流动相B梯度洗脱[13],流速1.3 mL/min;柱温30 ℃;检测波长203 nm。见表1。

* **基金项目:**国家自然科学基金项目(81373939)。
作者简介:栾晓宁(1992-),女,硕士研究生,主要从事中药药效物质基础及新药开发工作。
通讯作者:窦德强,E-mail: deqiangdou@126.com。

表 1　HPLC 梯度洗脱条件　%

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~ 30	19	81
30~ 35	19~24	81~76
35~ 40	24~30	76~70
40~ 52	30~33	70~67
52~ 75	33~42	67~58
75~ 90	42~60	58~40
90~100	60~85	40~15
100~110	85~100	15~0
110~120	100	0

4　实验结果

4.1　精密度　取人参叶供试品进样 20 μL,即得供试品溶液,连续进样 6 次,以 Rd 为参照,计算各峰与 Rd 峰面积比值、相对保留时间的 RSD,测得各记录色谱图,结果表明各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,其 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱技术要求。

4.2　重复性　分别精密称定人参叶样品 6 份,按照 2.1 项下操作,分别进样 20 μL,记录色谱图。以 Rd 为参照,计算各峰与 Rd 峰面积比值、相对保留时间的 RSD,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,其 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱技术要求。结果表明,本方法重复性良好。

4.3　稳定性　精密吸取同一供试品溶液 20 μL,按照上述色谱条件,分别于 0、4、8、12、18、24 h,记录色谱图。各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,其 RSD 均小于 3%,结果表明供试品溶液在 24 h 内成分稳定。

4.4　两个产地人参叶的 HPLC 指纹图谱中的特征峰及指纹图谱的确立　分别精密吸取供试液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录 120 min 色谱图。用国家药典委员会发布的"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)"对数据进行分析,提取共有峰并生成标准图谱。通过与皂苷的标准品对比,人参叶色谱图中确定 1 为 Rg1,2 为 Re,6 为 Rb1,7 为 20(S)-人参皂苷 Rg2,8 为 20(R)-人参皂苷 Rg2 或 F1,9 为 Rc,10 为 Rb2,11 为 Rh1,12 为 Rd(S)。借助软件对 10 批供试品的检测结果进行处理,以 Rd 参照峰,提取面积百分比大于 0.35%(峰面积 100)的峰作为有效峰组成相应样本。数据和色谱图见图 1、图 2、表 2、表 3。

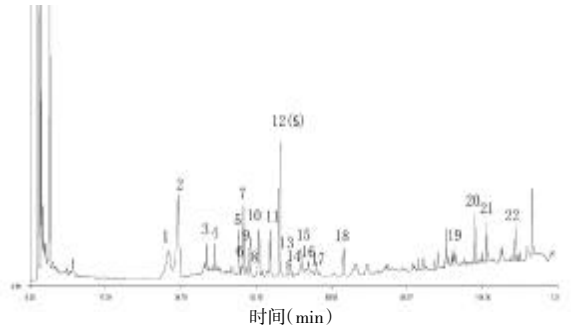

图 1　人参叶 HPLC 对照指纹图谱

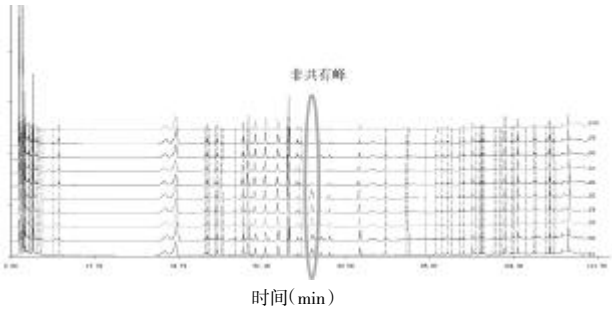

图 2　两个产地人参叶的指纹图谱

该实验首次对辽宁石柱县和吉林抚松产地的人参叶进行指纹图谱比较分析,共有 22 个共有峰,采用 HPLC 法确定了其中的 10 个峰。对 10 批两个产地人参叶样品进行处理分析,样品的 HPLC 指纹图谱基本一致,各个峰的相对峰面积有差异性,表明不同产地人参药材的质量存在差异性。吉林产地 Rb2、Rd 含量较高,辽宁产石柱参叶 Rg1、Re、Rb1、20(R)-人参皂苷 Rg2、Rh1 含量多,且辽宁石柱产人参叶比吉林产人参叶多了一个非共有峰(占总峰面积的 2%)。

5　讨论

本研究中人参叶的液相条件根据药典中人参根的液相条件经过反复摸索、优化获得。调整人参叶液相条件中的流动相比例和梯度洗脱时间从而使人参叶中各皂苷成分达到很好分离,本实验中选用了 1%磷酸水溶液作为流动相 B,通过添加改性剂可以有效改善色谱峰峰型。在方法学考察时,精密度实验、重复性实验和稳定性实验中计算各峰与 Rd 峰面积比值、相对保留时间的 RSD,测得各记录色谱图,结果表明各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,其 RSD 均小于 3%,符合中药指纹图谱的要求。采用 HPLC 法以人参皂苷 Rg1、Re、Rb1、20(S)-人参皂苷 Rg2、20(R)-人参皂苷 Rg2、F1、

表 2　10 批人参叶药材相对保留时间的指纹图谱测定结果

峰编号	辽 1	辽 2	辽 3	辽 4	辽 5	吉 1	吉 2	吉 3	吉 4	吉 5	平均值	RSD%
1	0.553	0.560	0.558	0.557	0.555	0.553	0.553	0.554	0.556	0.555	0.555	0.424
2	0.592	0.597	0.596	0.596	0.595	0.594	0.593	0.594	0.594	0.593	0.594	0.251
3	0.706	0.706	0.707	0.707	0.708	0.707	0.707	0.706	0.706	0.705	0.707	0.128
4	0.740	0.740	0.741	0.742	0.742	0.741	0.742	0.740	0.740	0.740	0.741	0.104
5	0.835	0.836	0.836	0.836	0.836	0.835	0.836	0.835	0.835	0.835	0.835	0.062
6	0.846	0.847	0.846	0.846	0.847	0.846	0.846	0.846	0.846	0.846	0.846	0.056
7	0.854	0.855	0.854	0.855	0.855	0.854	0.854	0.854	0.854	0.854	0.854	0.053
8	0.865	0.866	0.865	0.865	0.866	0.865	0.865	0.865	0.865	0.865	0.865	0.046
9	0.880	0.881	0.880	0.880	0.880	0.879	0.880	0.879	0.880	0.879	0.880	0.047
10	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.915	0.915	0.916	0.915	0.915	0.916	0.033
11	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.960	0.961	0.960	0.960	0.960	0.961	0.043
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
13	1.031	1.031	1.030	1.031	1.031	1.031	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	0.043
14	1.042	1.042	1.043	1.043	1.043	1.043	1.043	1.042	1.041	1.041	1.042	0.051
15	1.082	1.083	1.084	1.085	1.085	1.086	1.088	0.000	1.088	0.000	0.868	52.705
16	1.114	1.114	1.114	1.114	1.114	1.113	1.113	1.114	1.113	1.113	1.113	0.049
17	1.147	1.147	1.147	1.147	1.147	1.146	1.147	1.147	1.145	1.146	1.147	0.054
18	1.256	1.256	1.256	1.256	1.256	1.255	1.255	1.255	1.254	1.255	1.255	0.061
19	1.702	1.701	1.704	1.706	1.706	1.705	1.704	1.701	1.699	1.698	1.703	0.169
20	1.777	1.777	1.780	1.782	1.782	1.783	1.782	1.778	1.776	1.775	1.779	0.164
21	1.824	1.823	1.826	1.829	1.829	1.830	1.828	1.824	1.823	1.821	1.826	0.173
22	1.935	1.935	1.939	1.942	1.943	1.943	1.941	1.936	1.935	1.933	1.938	0.197

表 3　10 批人参叶药材峰面积比的指纹图谱测定结果

峰编号	辽 1	辽 2	辽 3	辽 4	辽 5	吉 1	吉 2	吉 3	吉 4	吉 5	平均值	RSD(%)
1	0.532	0.657	0.571	0.601	0.589	0.411	0.395	0.327	0.377	0.401	0.486	23.821
2	1.225	1.574	1.357	1.384	1.320	0.835	0.942	0.988	1.061	0.980	1.166	20.511
3	0.056	0.130	0.110	0.118	0.054	0.096	0.110	0.114	0.126	0.095	0.101	26.456
4	0.103	0.107	0.122	0.123	0.112	0.076	0.066	0.050	0.060	0.053	0.087	33.587
5	0.229	0.237	0.235	0.235	0.243	0.166	0.173	0.178	0.168	0.166	0.203	17.186
6	0.075	0.070	0.079	0.083	0.079	0.036	0.037	0.035	0.035	0.030	0.056	40.435
7	0.421	0.459	0.435	0.443	0.435	0.329	0.350	0.347	0.330	0.337	0.388	13.895
8	0.060	0.068	0.064	0.067	0.056	0.033	0.034	0.032	0.031	0.038	0.048	33.157
9	0.282	0.276	0.293	0.284	0.270	0.232	0.250	0.259	0.252	0.247	0.264	7.426
10	0.341	0.335	0.344	0.352	0.329	0.336	0.360	0.378	0.357	0.358	0.349	4.234
11	0.362	0.374	0.371	0.373	0.402	0.274	0.273	0.264	0.253	0.261	0.321	18.670
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
13	0.062	0.095	0.091	0.091	0.064	0.108	0.115	0.112	0.106	0.096	0.094	19.404
14	0.072	0.098	0.094	0.097	0.065	0.080	0.087	0.083	0.083	0.072	0.083	13.550
15	0.304	0.283	0.421	0.377	0.484	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.191	105.641
16	0.086	0.125	0.103	0.102	0.109	0.040	0.048	0.051	0.034	0.043	0.074	45.981
17	0.111	0.158	0.125	0.126	0.134	0.049	0.057	0.060	0.037	0.049	0.091	48.825
18	0.264	0.386	0.291	0.311	0.317	0.124	0.143	0.141	0.096	0.125	0.220	47.481
19	0.034	0.046	0.042	0.068	0.058	0.030	0.022	0.048	0.053	0.043	0.045	30.733
20	0.107	0.117	0.110	0.124	0.126	0.102	0.150	0.118	0.139	0.153	0.124	14.170
21	0.142	0.141	0.134	0.145	0.153	0.013	0.148	0.129	0.128	0.141	0.127	32.213
22	0.063	0.057	0.055	0.046	0.046	0.084	0.089	0.075	0.087	0.092	0.070	25.777

Rc、Rb2、Rh1、Rd 为对照品确定了其中的 10 个峰，并标定出 22 个 10 批两个产地人参叶样品指纹图谱的共有峰，通过与对照指纹图谱比较，得到 HPLC 指纹图谱的相似度，均大于 0.9，相似度较高。

由于人参茎叶与人参根具有相似的药理作用，而且人参叶资源丰富，价格相对便宜，目前以人参叶为原料药材提取人参皂苷应用逐渐增多，为了更有效地控制其内在质量，从而保证制剂质量的稳定，用 HPLC 建立了石柱和抚松产人参叶指纹图谱分析方法，本研究用 10 个人参皂苷标准品标定了辽宁石柱参和吉林抚松参，并进一步改进并提高了人参叶药材的质量标准。尤其石柱参是辽宁道地名贵药材，品质优越，在中国栽培人参中占有非常重要的地位，在进行指纹图谱比较分析时发现多种皂苷含量多于吉林产人参叶，而且比吉林产人参叶多了一个非共有峰（占总峰面积的 2%），多出的非共有峰，其物质基础尚不清楚，有待进一步研究，非共有峰的存在可能与人参生长环境有关，应给予广泛关注。

参考文献：

[1] 王荣祥，赵建东，许　亮.石柱参的历史考证[J].辽宁中医学院学报，2005，7(3)：269.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典（一部）[S].北京：中国医药科技出版社，2015：9-10.

[3] Park EK, Choo MK, Kim EJ, et al. Antiallergic activity of ginseosideRh2[J]. BiologicalPharmaceutical Bulletin, 2003, 26(11): 1581-1584.

[4] 张晓文，宋　清，徐志伟.人参茎叶总皂苷对心理应激荷瘤小鼠肿瘤生长及化疗效果的影响[J].现代食品科技，2010，26(4)：348-350.

[5] 李连昆，程俊霖，赵妍妍，等.人参茎叶总皂苷对衰老皮肤胶原纤维和弹力纤维的保护作用[J].四川生理科学杂志，2007，29(1)：26-28.

[6] 程秀娟. 人参、人参茎叶皂甙和参杞安泰抗衰老作用的比较研究[J].老年学杂志，1992，12(1)：52-54.

[7] 王秋静，刘　芬，崔新明，等.人参茎叶三醇皂苷对心肌缺血大鼠心肌酶及超微结构的影响[J].中成药，2011，33(2)：2153-2154.

[8] 娄建石，白凤菊，田秀英，等.人参茎叶皂甙对大鼠心功能的作用研究[J].天津医科大学学报，2001,7(4)：488-491.

[9] 胡巢凤，陆大祥，孙丽萍，等.人参茎叶皂苷对小鼠脂肪肝的作用及机制研究[J].中国药理学通报，2009，25(5)：663-667.

[10] 马　肃，王北辰，吕俊华，等.人参茎叶皂甙对小鼠免疫功能的影响[J].中国病理生理杂志，1991，7(2)：126-128.

[11] 刘　菲，赵文杰，刘　南，等.人参茎叶皂苷对毛囊间充质干细胞增殖的影响[J].黑龙江医药，2012,25(2)：232-234.

[12] 程俊霖，周黎明，朱　玲，等.人参茎叶总皂苷对衰老小鼠的作用研究[J].四川生理科学杂志，2004，26(3)：97-99.

[13] 马小琼，王龙星，徐　青，等.人参皂甙的反相高效液相色谱多台阶梯度优化方法[J].高等学校化学学报，2004，25(2)：238-242.

（收稿日期：2017-01-22）

Analysis on HPLC fingerprint of ginseng leaffrom Shizhuand Fusong

LUAN Xiao-ning, YUAN Ying, DOU De-qiang

(*College of pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China*)

Abstract: **[Objective]** To study the difference of ginsenoside content from different production places by establishing HPLC fingerprints of ginseng leaf. **[Methods]** HPLC fingerprints of ginseng leaf samples from Liaoning Province, Dandong City, Kuandian Manchu Autonomous County Township Shizhu Village and Jilin Province, Fusong County were analyzed by HPLC. The similarity of each sample was analyzed by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of chinese materia media. **[Results]** The chromatographic fingerprint similarity of ten batches of ginseng leaf samples is more than 0.9 and there are altogether 22 common peaks, but has some differences between the relative area of the common peaks. **[Conclusion]** HPLC fingerprints of ginseng leaf from different production places will provide a reference standard for the study of ginseng leaf from different production places.

Key words: Shizhu ginseng; ginseng leaf; HPLC; fingerprint