

何福江 石晓峰 编著

甘肃民族出版社

zhongcaoyao

youxiao chengfen de gaoxiao yixiang sepu ceding fa

中草药

有效成分的高效液相色谱测定法

前 言

中草药与合成药是当代人类用于医治伤病和卫生保健的两大类药物。随着 20 世纪 70 年代由西方国家兴起、而后波及世界的“回归大自然”浪潮的发展以及合成药物研制成本的高昂,加之毒副作用,使几被遗弃的传统药物重获宠幸。80 年代初,世界范围内掀起了重新评价和深入研究传统药物的热潮。这意味着用现代分离分析技术、现代药理学实验方法和现代医药高新技术对传统中草药进行去粗取精、去伪存真的改造并重新评价。现在,无论西方还是东方,无论发达国家还是发展中国家,莫不对中草药的研究开发表现出巨大热忱。中草药正以强大的魅力和独特的优势风靡世界,预示着中草药发展新纪元的到来。

中医中药是中华民族与疾病斗争的经验总结,是中华民族文化的重要组成部分,是世界民族医药的奇葩。在中医药理论指导下,中草药如何与现代国际要求接轨,与现代医药科学发展水平相适应并真正走向世界是一个不容回避、富有挑战性的课题。

中草药质量的评价与控制是中草药现代化研究的重要内容之一,对中草药中与其主治相吻合的重要活性成分进行定量分析、评价是当务之急。中国药典虽然收载了很多中草药品种,但列有高效液相色谱测定法的不多,因而满足不了控制药材质量的需要。

近年来由于仪器分析技术的不断更新与发展,应用高效液相色谱法对中草药质量分析的文献越来越多,研究的内容也不断深入。为了促进中草药质量标准规范化、现代化,我们收集了 1990 年至 2000 年国内外有关文献并结合我们多年来的工作经验,加以整理,编写了《中草药有效成分的高效液相色谱测定法》一书。全书收载了 201 种中草药,采用逐一介绍。内容包括基源、化学成分、含量测定及回收率等,并附有图谱与表格。

由于我们水平有限,经验不足,书中的缺点和错误在所难免,切望读者批评指正。

本书在编写过程中得到甘肃省医学科学研究所所长、甘肃省药品检验所所长的大力支持,特此表示衷心感谢。

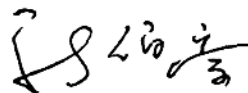
编 者

2000 年 12 月

序

中药所含化学成分,尤其是有效成分是中药发挥疗效的物质基础。中药有效成分的含量测定已成为评估中药质量的重要标志。随着仪器分析技术的进步和天然化学药物成果的积累,建立准确、灵敏、快速、简便的客观评估中药质量优劣,控制中药质量的新技术、新方法具有重要的理论价值和现实意义。近年来关于中药及其制剂的质量分析方法研究较多,发展很快,不少成果已用于中药及其制剂的质量控制。在诸多的中药分析方法中,首推 HPLC 法,其分析速度快,分离效率高,适应范围广、灵敏度高、专属性强、信息量大,已成为国家中药质量评估的常用方法。但有关这方面的研究资料较为分散,尚不系统,给中药工作者带来许多不便。《中草药有效成分的高效液相色谱测定法》是作者多年从事中药分析研究工作积累并广泛收集 1990 年以来国内外有关文献资料编著而成。全书收载 201 种中草药,内容新颖,记述翔实,图文并茂,材料丰富,排列有序,综合恰到好处。重点介绍的实验方法,突出了立书之特点。本书的出版是近一阶段 HPLC 法用于中草药有效成分分析研究成果的总结,具有较高实用价值,可为从事中药质检、教育、生产和科研工作者提供借鉴和参考。这是一项十分有益的工作,本人拜读之后,受益匪浅,故乐而为此作序。

甘肃省药品监督检验所



2002.05.28

目 录

1 十大功劳	(1)	34 水蛭	(84)
2 丁公藤	(4)	35 内南五味子	(85)
3 人参	(6)	36 贝母	(87)
4 八角莲	(12)	37 文冠木	(89)
5 儿茶	(13)	38 甘草	(90)
6 九里香	(15)	39 石刁柏	(95)
7 三七	(17)	40 石韦	(96)
8 三尖杉	(19)	41 石吊兰	(98)
9 三颗针	(21)	42 石斛	(99)
10 土鳖虫	(23)	43 龙胆	(101)
11 大青叶	(24)	44 北豆根	(104)
12 大蒜	(30)	45 仙茅	(106)
13 大黄	(31)	46 冬虫夏草	(108)
14 山茱萸	(34)	47 冬凌草	(112)
15 山荷叶	(35)	48 白头翁	(115)
16 山药	(37)	49 白芍	(116)
17 山楂	(38)	50 白花蛇舌草	(119)
18 千层塔	(43)	51 白芷	(120)
19 千金子	(44)	52 白屈菜	(122)
20 川乌	(45)	53 白鲜皮	(125)
21 女贞子	(47)	54 长春花	(126)
22 马钱子	(50)	55 玄参	(128)
23 马兜铃	(54)	56 半夏	(130)
24 天花粉	(56)	57 四季菜	(131)
25 天麻	(57)	58 加哇	(132)
26 木豆	(59)	59 生等	(134)
27 王不留行	(60)	60 地龙	(135)
28 五味子	(62)	61 地黄	(137)
29 车前	(64)	62 地榆	(139)
30 牛黄	(66)	63 西洋参	(140)
31 牛蒡子	(70)	64 西红花	(142)
32 牛膝	(73)	65 当归	(143)
33 丹参	(76)	66 肉苁蓉	(145)

67	肉豆蔻·····	(148)	104	青娘子·····	(235)
68	安息香·····	(151)	105	青蒿·····	(236)
69	关白附·····	(152)	106	板蓝根·····	(238)
70	关木通·····	(155)	107	刺五加·····	(239)
71	异型南五味子·····	(156)	108	苦木·····	(240)
72	异叶马交儿·····	(157)	109	苦地丁·····	(242)
73	延胡索·····	(158)	110	苦参·····	(244)
74	全蝎·····	(162)	111	侧金盏花·····	(247)
75	血竭·····	(163)	112	虎杖·····	(248)
76	决明子·····	(166)	113	知母·····	(249)
77	防己·····	(172)	114	金银花·····	(250)
78	红曲·····	(173)	115	鱼腥草·····	(254)
79	红花·····	(175)	116	细辛·····	(255)
80	红豆杉·····	(177)	117	贯叶连翘·····	(257)
81	红景天·····	(181)	118	河套大黄·····	(258)
82	红娘子·····	(185)	119	枳壳·····	(259)
83	麦冬·····	(186)	120	枳实·····	(261)
84	杜仲·····	(189)	121	栀子·····	(263)
85	芫花·····	(193)	122	茜草·····	(269)
86	苍术·····	(195)	123	草乌·····	(270)
87	杨树皮·····	(196)	124	草豆蔻·····	(273)
88	芦荟·····	(198)	125	草珊瑚·····	(275)
89	两头尖·····	(201)	126	茵陈·····	(277)
90	两面针·····	(203)	127	茶叶·····	(279)
91	灵芝·····	(204)	128	柳芽·····	(283)
92	连翘·····	(206)	129	独活·····	(284)
93	吴茱萸·····	(211)	130	厚朴·····	(286)
94	何首乌·····	(213)	131	柞柳·····	(289)
95	豆腐果·····	(219)	132	虻虫·····	(290)
96	附子·····	(220)	133	骨碎补·····	(291)
97	苏合香·····	(221)	134	钩藤·····	(292)
98	补骨脂·····	(223)	135	香茶菜·····	(295)
99	沙棘·····	(226)	136	重楼·····	(297)
100	羌活·····	(228)	137	前胡·····	(301)
101	诃子·····	(230)	138	洋金花·····	(305)
102	陈皮·····	(232)	139	穿山甲·····	(309)
103	青木香·····	(234)	140	穿山龙·····	(310)

141	穿心莲	(311)	173	斑蝥	(385)
142	姜	(313)	174	葛根	(386)
143	姜黄	(314)	175	紫金牛	(390)
144	秦艽	(315)	176	紫草	(391)
145	秦皮	(316)	177	紫菀	(392)
146	桂皮	(317)	178	越橘	(393)
147	桃儿七	(319)	179	葡萄	(395)
148	柴胡	(322)	180	喜树果	(397)
149	鸦胆子	(325)	181	蒺藜	(398)
150	积雪草	(326)	182	蒲公英	(400)
151	射干	(328)	183	蒲黄	(402)
152	狼毒	(331)	184	滇白珠	(407)
153	莲子心	(333)	185	滇桂艾纳香	(409)
154	莪术	(334)	186	蜈蚣	(410)
155	唐松草	(336)	187	蜂王浆	(412)
156	菝葜叶	(338)	188	蔓荆子	(414)
157	桑叶	(339)	189	槟榔	(415)
158	黄芩	(340)	190	酸枣仁	(417)
159	黄芪	(344)	191	酸模	(419)
160	黄连	(352)	192	罂粟壳	(421)
161	黄柏	(353)	193	熊胆	(424)
162	菟丝子	(355)	194	獐牙菜	(428)
163	槿花叶	(356)	195	僵蚕	(430)
164	雪胆	(357)	196	颠茄草	(432)
165	雪莲	(358)	197	橘红	(433)
166	野芙蓉	(359)	198	藏茵陈	(435)
167	蛇胆	(360)	199	藁本	(436)
168	银杏叶	(361)	200	藤黄	(441)
169	桉木	(369)	201	蟾酥	(443)
170	鹿茸	(374)			
171	断血流	(377)		附录 1 汉语拼单索引	
172	淫羊藿	(378)		附录 2 拉丁学名索引	

1 十 大 功 劳

Shidagonglao

本品为小檗科植物甘平十大功劳 *Mahonia eurybracteata* Fedde Subsp. *ganpinensis* (H. leveill) T. S. Ving et Boufford、狭叶十大功劳 *M. fortunei* (Lindl.) Fedde、长苞十大功劳 *M. langibracteata* Takeda 或其同属其它种植物。

成份 含苕基异喹啉类生物碱：尖刺碱(oxyacanthine)、小檗胺(berbamine)、异汉防己甲素(isotetradrine)、小檗碱(berberine)、药根碱(jatrorrhizine)、巴马亭(palmatine)、非洲防己胺(columbamine)。

含量测定

1.7 种生物碱的测定^[1]

仪器 Waters 高效液相色谱仪(510 泵, 490E 检测器, U6K 进样器, 810 色谱工作站)。

色谱条件 色谱柱: μ -Bondapak 苯基柱(3.9mm $\times$ 300mm, 10 μ m); 流动相: 0.02mol/L 磷酸二氢钾—乙腈(7:3); 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 0.0~10.0min 用 203nm, 10.0min 以后用 346nm; 柱温: 室温; 7 种生物碱对照品色谱图见图 1-1。

线性关系 按三颗针文献^[1]以进样量(μ g)为横坐标, 峰面积为纵坐标(Y)作图, 呈线性关系, 其回归方程等见表 1-1。

表 1-1 4 种生物碱的回归方程和线性范围

编号	回归方程	r	线性范围(μ g)
I	$Y = 9.017X \times 10^4 + 4.318 \times 10^5$	0.9993(n=7)	0.019~0.296
II	$Y = 4.239X \times 10^4 - 8.228 \times 10^4$	0.9999(n=9)	0.019~0.996
III	$Y = 4.191X \times 10^4 + 1.446 \times 10^5$	0.9998(n=9)	0.020~1.008
VI	$Y = 4.209X \times 10^4 + 1.278 \times 10^5$	0.9998(n=9)	0.020~1.010

样品测定 按三颗针文献^[1]精密吸取样品液 10 μ l 进行, 用 203~346nm 变波长检测, 对 II、III、IV、VI 进行定量分析, 对 I、III 定性分析。再精密吸取 10 μ l 进样, 203nm 波长检测, 得各样品的特征图谱, 并定性分析成分 V。对十大功劳属 3 种植物的根、根皮、根木、茎皮、茎木和 10 种不同产地的植物根中生物碱的分析结果见表 1-2, 表 1-3。

回收率试验 分别精密称取狭叶十大功劳茎的干粉 0.05g 5 份, 按样品测定项测定。计算 II、IV、VI、VII 的回收率, 分别为 97.2%~102.1%, 98.9%~100.3%, 97.2%~100.1% 和 99.4%~100.1%; RSD 分别为 2.0%, 0.62%, 1.3% 和 0.3%。

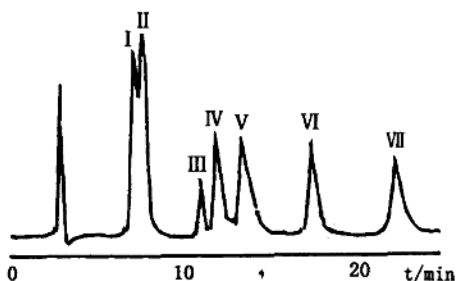


图 1-1 7 种生物碱对照品的色谱图 (203nm)

I 尖刺碱 II 小檗胺 III 非洲防己胺
IV 药根碱 V 异汉防己甲素
VI 巴马亭 VII 小檗碱

表 1-2 3 种十大功劳属植物不同部位 7 种生物碱的分析结果(%, n=2)

植物名称	部位	I	II	III	IV	V	VI	VII
甘平十大功劳	根	-	±	+	0.68	+	0.05	0.78
	根皮	+	0.01	-	1.66	+	0.14	3.76
	根木	+	±	+	0.69	+	0.06	0.84
	茎皮	-	±	-	0.34	+	0.05	0.47
	茎木	+	±	-	0.53	+	0.08	0.21
狭叶十大功劳	根	+	0.34	+	1.17	+	0.06	1.27
	根皮	+	0.98	+	3.02	+	0.20	3.54
	根木	+	0.18	+	0.54	+	±	0.70
	茎皮	+	0.29	+	1.47	+	1.19	0.41
	茎木	+	0.28	+	0.89	+	0.05	1.36
长苞十大功劳	根	+	±	+	0.40	+	0.62	1.73
	根皮	+	±	+	1.10	+	1.30	6.94
	根木	-	±	+	0.33	+	0.80	0.98
	茎皮	-	±	+	0.74	-	0.60	1.24
	茎木	-	-	+	0.24	-	0.28	0.45

表 1-3 10 种十大功劳属植物根中 7 种生物碱的分析结果(%, n=2)

植物名称	产地	I	II	III	IV	V	VI	VII
阔叶十大功劳	四川峨边	+	±	+	0.44	+	0.18	1.44
	重庆奉节	+	0.02	+	0.50	+	0.64	2.07
鼠刺十大功劳	重庆金佛山	+	0.10	+	0.81	+	0.09	0.77
	重庆药物种植所	+	0.08	+	0.79	+	0.06	1.11
	重庆中药研究院	+	±	+	0.41	+	0.05	0.78
	湖南新化	+	±	+	0.16	+	0.53	1.44
川鄂十大功劳	四川峨眉山	-	±	+	0.45	+	0.14	1.10
	四川峨边	-	±	+	0.82	+	0.12	1.22
	重庆缙云山	+	±	+	0.35	+	0.02	0.73
甘平十大功劳	重庆南川	-	±	+	1.01	+	0.04	1.58
	四川中医学校	+	0.34	+	0.68	+	0.05	0.78
狭叶十大功劳	重庆药物种植所	+	0.34	+	1.17	+	0.06	1.27
	四川峨眉山	+	±	+	0.82	+	0.06	1.42
	湖南新化	+	0.19	+	0.88	+	0.07	0.59
细梗十大功劳	四川峨眉山	-	±	+	0.67	+	0.15	0.99
长苞十大功劳	四川峨边	+	±	+	0.40	+	0.62	1.73
岩紫黄	四川峨眉山	-	0.02	+	1.05	+	0.17	0.35
多齿十大功劳	四川峨眉山	-	0.02	+	0.67	+	0.10	0.52
	重庆金佛山	-	0.01	+	0.22	+	0.13	0.30
M.SP.	重庆金佛山	-	0.01	+	0.28	+	1.38	1.30

2. 小檗碱的测定^[2]

仪器 Waters 高效液相色谱仪(510 泵, 481 可变波长检测器, 680 梯度控制器, 730 数据处理机)。

色谱条件 色谱柱: μ -BondapaK C_{18} 柱(8mm $\times$ 10cm); 流动相: 辛烷基磺酸钠 + 1% 醋酸—乙腈(65:35); 流速: 1.5ml/min, 检测波长: 345nm; 灵敏度: 0.05AUFs。

线性关系 精密吸取盐酸小檗碱甲醇对照液(0.1mg/ml) 2, 5, 10, 15, 20, 30 μ l 进样测定, 以对照品进样量对对照品峰面积积分值作图, 呈良好线性关系, 其回归方程为:

$$Y = 646072 + 2069851X \quad r = 0.9994 \quad \text{线性范围 } 2 \sim 30\mu\text{l}$$

样品测定 精密称取十大功劳叶粉末 0.6g, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 10ml 密塞, 称重, 超声 20min, 甲醇补足失重, 印匀。用 0.5 μ m 滤膜过滤, 取续滤液 10 μ l 测定。以外标法计算含量, 结果, 十大功劳中小檗碱含量在 0.037%~0.042% 之间。色谱图见图 1-2。

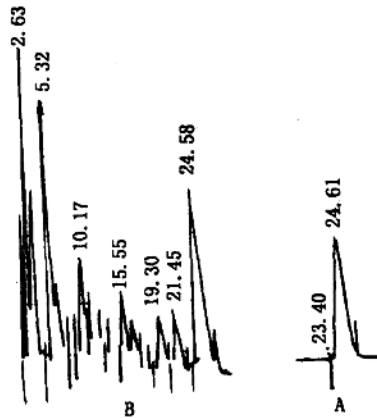


图 1-2 对照品(A)与十大功劳叶(B)的色谱图

盐酸小檗碱 t_R 24.61

回收率试验 精密吸取盐酸小檗碱加入十大功劳叶粉末中, 加甲醇 10ml, 按样品测定法提取, 测定。结果回收率为 96.93%。

参 考 文 献

- [1] 吕光华. 高效液相色谱法测定十大功劳属植物中 7 种生物碱成分. 药物分析杂志, 1999, 19(4): 271
- [2] 陈燮芳. 反相高效液相色谱法测定十大功劳中小檗碱的含量. 中成药, 1977, 19(12): 36

2 丁公藤

Dinggongteng

本品为旋花科植物丁公藤 *Erycibe obtusifolia* Benth. 的干燥藤茎。

成分 含丁公藤甲素(baogongteng A, 包公藤甲素, *erycibe* II)、东莨菪碱(scopolamine)、东莨菪素(scopoletin)、6-甲氧基-7-羟基香豆素(6-methoxy-hydroxycoumarin)、东莨菪甙(scopolin, 东莨菪内酯)等。

含量测定

总东莨菪内酯的测定^[1]

仪器 岛津 LC-6A 高效液相色谱仪, SPD-6A 紫外检测器, CR4AX 数据处理机。

色谱条件 色谱柱: CLC-ODS 柱(6mm×150mm, 5μm), 保护柱: CLC-ODS(6mm×10mm, 5μm); 流动相: 0.5% 冰醋酸甲醇—水(26:55), 流速: 0.9ml·min⁻¹; 柱温: 50℃; 检测波长: 310nm; 灵敏度: 0.02AUFS; 进样量: 20μl; 内标: 丙酮。

线性关系 精密量取东莨菪内酯甲醇对照液(1mg/ml) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 4.8ml, 分别置于 10ml 量瓶中, 加丙酮 1ml, 甲醇定容。进样, 按色谱条件测定, 东莨菪内酯和丙酮峰高的比值与对照品进样量呈良好线性关系, 回归方程为:

$$Y = 73.7509X + 413.9656 \quad r = 0.9999$$

样品测定 精密称取样品粗粉(60 目) 1g, 加乙醇 150ml, 回流 8h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣用甲醇 2ml 溶解, 移至 20ml 具塞试管中, 挥干, 残渣加盐酸(3mol/L) 10ml 溶解, 水浴水解 3h, 转至分液漏斗中, 水洗涤 3 次(10, 5, 5ml), 加氯化钠 2g 溶解, 氯仿提取 4 次(各 10ml), 合并提取液, 加无水硫酸钠 1g, 静置 1h 后滤过, 滤液挥干, 残渣加 2ml 甲醇溶解移入 10ml 量瓶中, 甲醇定容。进样, 按色谱条件测定。测定了丁公藤药材(3 种 14 个样品)结果见表 2-1。色谱图见图 2-1。

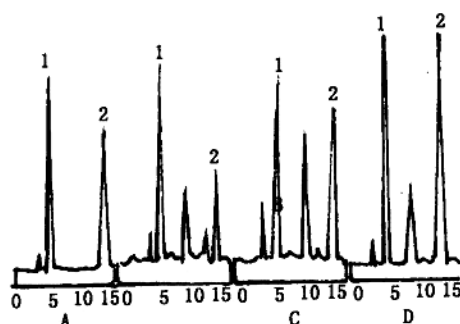


图 2-1 对照品及丁公藤药材的 HPLC 图

A. 对照品 B. 丁公藤(S-3) C. 光叶丁公藤(S-7) D. 毛叶丁公藤(S-14)

1. 内标 2. 东莨菪内酯

回收率试验 精密称取样品粗粉(S-6)约 1g, 其中 5 份加对照品 200μg, 另 5 份加 600μg, 按样品测定法提取、测定。内标法计算, 结果平均回收率为 99.37%, RSD=0.39%。

表 2-1 丁公藤药材中总东茛菪内酯的含量

编 号	品 种	来 源	$\bar{X}$ mg/100g	RSD %
S-1	丁公藤 <i>Erycibe obtusifolia</i>	广西桂平(自采)	160.8	0.65
S-2	丁公藤 <i>E. obtusifolia</i>	广西武兴县医药站	135.1	1.03
S-3	丁公藤 同上	广西上林县(自采)	44.5	0.48
S-4	丁公藤 同上	广西上思县	143.8	0.52
S-5	丁公藤 同上	广东佛山制药厂	98.6	0.94
S-6	光叶丁公藤 <i>E. schmidtii</i>	海南乐东县医药公司	30.7	1.06
S-7	光叶丁公藤 同上	南宁市医药公司	58.4	0.86
S-8	光叶丁公藤 同上	南宁药材站	222.8	0.76
S-9	毛叶丁公藤 <i>E. hainanensis</i>	海南乐东县医药公司	112.2	1.13
S-10	毛叶丁公藤 同上	南宁市医药公司	93.0	1.08
S-11	毛叶丁公藤 同上	南宁药材站	135.2	0.93
S-12	毛叶丁公藤 同上	海南乐东县尖峰岭	64.1	1.17
S-13	毛叶丁公藤 同上	广西上思县(自采)	235.2	1.20
S-14	毛叶丁公藤 同上	广西上思县医药公司	332.4	1.15

n=6 总东茛菪内酯为样品中游离东茛菪内酯与东茛菪甙水解产生的东茛菪内酯的总和。

参 考 文 献

- [1]李梅等. HPLC法测定丁公藤中总东茛菪内酯含量. 中国中药杂志, 1999, 24(1): 41

3 人 参

Renshen

本品为五加科植物 *Panax ginseng* C. A. Mey 的干燥根。

成分 含 30 多种皂甙, 根据结构可分为三类:

1) 齐墩果烷类: 人参皂甙 (ginsenoside Ro)。

2) 原人参二醇类: 人参皂甙 $Ra_1, Ra_2, Ra_3, Rb_1, Rb_2, Rb_3, Rc, Rb_1$ (ginsenoside $Ra_1, Ra_2, Ra_3, Rb_1, Rb_2, Rb_3, Rc, Rd_1$)、20(s) 人参皂甙 Rg_3 [20(s) ginsenoside Rg_3]、人参皂甙 Rg_3, Rh_2, Rs_1, Rs_2 (ginsenoside Rg_3, Rh_2, Rs_1, Rs_2)、丙二酰人参皂甙 Rb_1, Rb_2, Rc, Rd (malonylginsenoside Rb_1, Rb_2, Rc, Rd)、三七皂甙 R_4 (notoginsenoside R_4)、20(R) 人参皂甙 Rh_2 [20(R) ginsenoside Rh_2]、20(S) 人参皂甙 Rh_2 [20(S) ginsenoside Rh_2]。

3) 原人参三醇类: 人参皂甙 Rc, Rf (ginsenoside Re, Rf)、20-葡萄糖基人参皂甙 R_f (20-glucoginsenoside Rf)、人参皂甙 Rg_1, Rg_2 (ginsenoside Rg_1, Rg_2)、20(R) 人参皂甙 Rg_2, Rh_1 [20(R) ginsenoside Rg_2, Rh_1]、三七人参皂甙 R_1 (notoginsenoside R_1) 等。

另外, 尚含挥发性成分: 人参炔醇 (panaxynol)、人参环炔醇 (panaxydol)、人参炔三醇 (panaxytriol)、 α -人参烯 (α -nanesinsene)、 β -人参烯 (β -nanesinsene)、 β -金合欢烯 (β -farnesene) 等。

多胺类: 腐胺 (putrescine)、精脒 (spermidine) 和精胺 (spermine) 等。

含量测定

1.7 种皂甙类成分的测定^[1]

仪器 岛津 LC-6AD 高效液相色谱仪; SPD-M6A 光敏二极管阵列检测器。

色谱条件 色谱柱: Cosmosil 5C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5 μ m), 预柱 (Millipore, Milford, MA); 流动相: 梯度洗脱 A: 10mmol/L 磷酸二氢钾-乙腈 (80:20); B: 水-乙腈 (15:85), 梯度洗脱程序为 0-15min: 98% → 96% A, 2% → 4% B; 15-25min: 96% → 85% A, 4% → 15% B; 25-40min: 85% → 75% A, 15% → 25% B; 40-50min: 75% → 0% A, 25% → 100% B; 50-62min: 100% B; 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 203nm。

线性关系 以人参皂甙对照品的峰面积与内标物的峰面积比值(Y)对浓度(X, mg/ml)进行线性回归, 其回归方程为:

$$\text{人参皂甙 } Rb_1 \quad Y = 2.34X + 0.03 \quad r = 0.9988$$

$$\text{人参皂甙 } Rb_2 \quad Y = 2.09X + 0.04 \quad r = 0.9990$$

$$\text{人参皂甙 } Rc \quad Y = 3.03X + 0.05 \quad r = 0.9992$$

$$\text{人参皂甙 } Rd \quad Y = 2.13X + 0.04 \quad r = 0.9987$$

$$\text{人参皂甙 } Re \quad Y = 2.60X + 0.01 \quad r = 0.9998$$

$$\text{人参皂甙 } Rf \quad Y = 2.31X + 0.03 \quad r = 0.9992$$

$$\text{人参皂甙 } Rg_1 \quad Y = 3.45X + 0.02 \quad r = 0.9988$$

样品测定 精密称取人参粉末约 2.0g, 用 50% 乙醇 7ml 回流提取 15min, 然后离心

(1500r/min),反复提取2次,合并提取液,经1号滤纸过滤,于提取液中,加1.0ml内标溶液(取乙酰苯80 μ l溶于50%乙醇溶液500ml中),然后用50%乙醇定容至25ml,作为供试液。吸取20 μ l进样、测定,色谱图见图3-1,结果见表3-1。

表3-1 人参中人参皂甙的测定结果 (n=3)

样品	Rg1	Re	Rf	Rb1	Rc	Rb3	Rd	总皂甙
生晒参	3.96	2.23	0.84	3.31	1.71	1.93	0.43	11.40
红 参	3.56	2.91	1.45	5.67	3.86	2.51	1.77	22.71
组织培养人参 (毛状根)	4.23	6.77	2.51	11.34	9.47	8.13	7.53	49.96

回收率试验 采用对照品加样法,测定了7种人参皂甙的回收率。除化合物7(人参皂甙R_f)回收率为96.1%外,其余均为98.5%~103.2%。

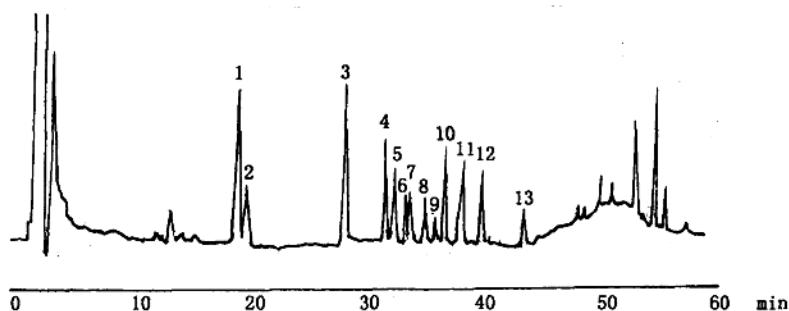


图3-1 生晒参的HPLC图

1. 人参皂甙R_{g1} 2. 人参皂甙Re 3. 内标物(乙酰苯) 4. 人参皂甙Ro 5. 丙二酰人参皂甙R_{b1}
6. 丙二酰人参皂甙Rc 7. 人参皂甙R_f 8. 丙二酰人参皂甙R_{b2} 9. 人参皂甙R_{g2}
10. 人参皂甙R_{b1} 11. 人参皂甙Rc 12. 人参皂甙R_{b2} 13. 人参皂甙Rd。

2. 皂甙类成分的测定^[2]

仪器 岛津LC-6A高效液相色谱仪。

色谱条件 色谱柱:Superspher RP-18柱(4.0mm×25cm);流动相:a. 乙腈—水—0.1%磷酸水溶液(20:72:8),b. 乙腈。梯度洗脱程序如下:a的比例0~19min:100%,19~20min:100%→90%,20~73min:90%,73~103min:90%→70%,103~120min:70%;流速:0.8ml/min;柱温:0~30min:35℃,30~60min:55℃,60~120min:35℃;检测波长:202nm。

线性关系 测定了17种人参皂甙的回归方程、检测限及回收率,见表3-2。

表3-2 人参皂甙的回归方程、检测限及回收率试验结果

人 参 皂 甙	回 归 方 程	检测限 (μ g)	平均回收率 (%)
人参皂甙Ro	$Y = 7.2 \times 10^{-6}X + 0.1097818 (r = 0.9998)$	0.20	99.67
人参皂甙R _{b1}	$Y = 7.6 \times 10^{-6}X + 0.0881716 (r = 0.9999)$	0.10	99.58
人参皂甙R _{b2}	$Y = 7.6 \times 10^{-6}X + 0.0371787 (r = 0.9999)$	0.09	99.45
人参皂甙R _{b3}	$Y = 8.5 \times 10^{-6}X + 0.1341795 (r = 0.9966)$	0.20	98.76

人 参 皂 甙	回 归 方 程	检测限 (μg)	平均回收率 (%)
人参皂甙 Rc	$Y = 7.0 \times 10^{-6}X + 0.125040 (r = 0.9999)$	0.09	98.76
人参皂甙 Rd	$Y = 6.3 \times 10^{-6}X + 0.0121816 (r = 0.9999)$	0.09	99.79
人参皂甙 Re	$Y = 6.4 \times 10^{-6}X + 0.0733543 (r = 0.9999)$	0.10	99.36
人参皂甙 Rf	$Y = 7.2 \times 10^{-6}X + 0.0164232 (r = 0.9999)$	0.06	99.58
人参皂甙 Rg_1	$Y = 5.7 \times 10^{-6}X + 0.0778712 (r = 0.9999)$	0.09	99.42
20(S)人参皂甙 Rg_2	$Y = 4.9 \times 10^{-6}X + 0.0361426 (r = 0.9999)$	0.07	102.16
20(R)人参皂甙 Rg_2	$Y = 4.5 \times 10^{-6}X + 0.0359725 (r = 0.9999)$	0.06	102.68
20(S)人参皂甙 Rg_3	$Y = 4.7 \times 10^{-6}X + 0.0250572 (r = 0.9999)$	0.07	101.67
20(R)人参皂甙 Rg_3	$Y = 5.2 \times 10^{-6}X + 0.0116887 (r = 0.9993)$	0.03	99.79
20(S)人参皂甙 Rh_1	$Y = 4.0 \times 10^{-6}X + 0.0206970 (r = 0.9999)$	0.07	99.97
20(R)人参皂甙 Rh_1	$Y = 3.9 \times 10^{-6}X + 0.0365324 (r = 0.9999)$	0.06	102.87
人参皂甙 Rs_1	$Y = 8.7 \times 10^{-6}X + 0.0746179 (r = 0.9984)$	0.09	100.54
quiquenoside R_1	$Y = 8.5 \times 10^{-6}X + 0.1172577 (r = 0.9971)$	0.09	101.67

样品测定 精密称取人参粉末约 3g, 加 20ml 70% 甲醇室温提取 5 次, 每次 20min, 合并提取液, 减压浓缩至干, 以 30ml 的乙腈—水 (20:80) 溶解, 经内径 0.45mm 小柱 (Hicdisk25 柱) 滤过, 吸取滤液 20 μl 进行测定, 色谱图见图 3-2。

3.3 种皂甙的测定^[3]

仪器 岛津 LC-9A 高效液相色谱仪; SPD-M6A 检测器; 486 数据处理机。

色谱条件 色谱柱: Nucleosil NH_2 柱 (4.6mm $\times$ 250mm, 5 μm); 流动相: 甲醇—异丙醇 (62:38); 流速: 0.5ml/min; 检测波长: 204nm。

线性关系 精密称取人参皂甙 Rg_1 、Re、 Rb_1 对照品适量, 制成浓度均为 1mg/ml 的甲醇液, 作为贮备液, 并稀释成系列浓度, 取一定量进样, 色谱条件测定, Rg_1 、Re、 Rb_1 峰高对进样量 (μg) 进行线性回归, 其回归方程为:

$$\text{Rg}_1 \quad Y = 1.758 + 22.38X \quad 0.9999 \quad 0.2 \sim 30 \mu\text{g}$$

$$\text{Re} \quad Y = 3.326 + 15.58X \quad 0.9999 \quad 0.3 \sim 30 \mu\text{g}$$

$$\text{Rb}_1 \quad Y = 0.9583 + 9.820X \quad 0.9999 \quad 0.4 \sim 30 \mu\text{g}$$

样品测试 精密称取样品粉末 (60 $^\circ\text{C}$ 干燥) 约 1g, 加甲醇 25ml, 加热回流 7h, 放冷、过滤, 用甲醇 20ml 分 5 次洗涤残渣与容器, 洗液与滤液合并于 50ml 量瓶中并定容。取滤液 2ml, 蒸干, 残渣用 2ml 水溶解。每次加乙醚 2ml, 提取 4 次, 弃去乙醚液, 用水饱和正丁醇提取水相 3 次, 每次 1ml, 合并提取液, 用水洗 2 次, 每次 2ml。将水饱和正丁醇减压蒸干, 残渣用甲醇定容至 1ml。进样, 按色谱条件测定。色谱图见图 3-3。样品中各皂甙的含量测定结果见表 3-3。

表 3-3 样品中皂甙的含量测定结果 (n=3)

样 品	含 量 (%)		
	Rg_1	Re	Rb_1
生晒参须根	0.47	0.43	0.98
西 洋 参	0.72	0.19	0.31
高 丽 参	0.40	0.32	0.74

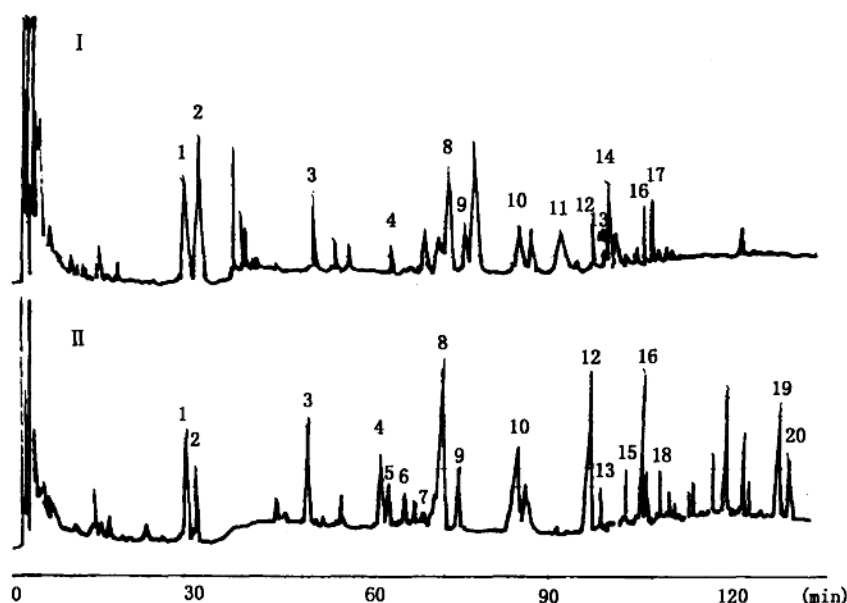


图 3-2 人参的 HPLC 图

I 生晒参 II 红参

1. 人参皂甙 R_{g1} 2. 人参皂甙 R_e 3. 人参皂甙 R_f 4. 人参皂甙 $20(S)R_{g2}$
 5. 人参皂甙 $20(S)R_{b1}$ 6. 人参皂甙 $20(R)R_{g2}$ 7. 人参皂甙 $20(R)R_{b1}$ 8. 人参皂甙 R_{b1}
 9. 人参皂甙 R_o 10. 人参皂甙 R_c 11. 丙二酰人参皂甙 R_c (混合物) 12. 人参皂甙 R_{b2}
 13. 人参皂甙 R_{b3} 14. 丙二酰人参皂甙 R_{b2} 15. quinquenoside R_1 16. 人参皂甙 R_d
 17. 丙二酰人参皂甙 R_d 18. 人参皂甙 R_{s1} 19. 人参皂甙 $20(S)R_{g3}$
 20. 人参皂甙 $20(R)R_{g3}$

回收率试验 精密称取西洋参粉末 4 份, 将其中 3 份分别加入一定量的单体皂甙对照品, 按样品测定项操作。结果西洋参的回收率在 94%~102% 之间。

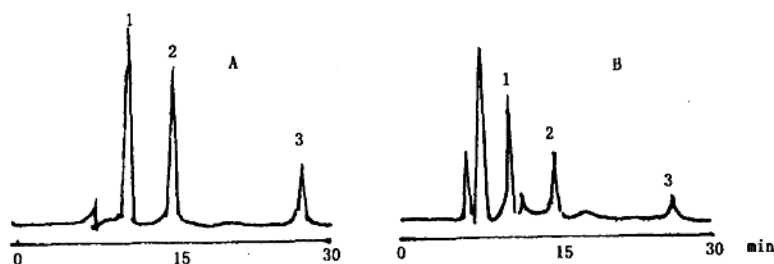


图 3-3 人参对照品(A)与西洋参样品(B)的色谱图

1. R_{g1} 2. R_e 3. R_{b1}

4. 人参皂甙的测定^[4]

仪器 HPLC 系统由 SLC-100 型泵 (Sumsung, Suwon 南韩), 7125 型进样阀 (Rheodyne, Cotati CA, 美国), 蒸发光散射检测器 (ELSD II Varex, Burtonsville MD, 美国), C-R4A

数据处理机(岛津,日本)组成。

色谱条件 色谱柱: Lichrosorb NH_2 柱 (4mm $\times$ 250mm, 5 μm)、Capcell pak NH_2 柱 (4.6mm $\times$ 250mm, 5 μm) 岛津, 日本; 流动相: A. 乙腈—水—2-异丙醇 (80:5:15), B. 乙醇—水—2-异丙醇 (80:20:15) 梯度洗脱, 按下列次序: 0~7min, 80% A~20% B; 7~25min, 线性梯度 80% A~20% B 到 10% A~90% B; 25~40min, 10% A~20% B; 流速: 1.0ml/min。

线性关系 精密称取 4 种人参皂甙对照品 (人参皂甙 Rg_1 、 Rd 、 Rg_3 、 Re) 适量, 溶于水或甲醇—水中, 制成不同浓度梯度的溶液, 按色谱条件测定。ELSD 的响应由 $Y = ax^b$ 给出, 式中 Y 表示峰面积, x 为对照品的量, a 和 b 为数字系数。4 种人参皂甙在 0.5~1.0 μg 范围内呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9985~0.9996, 斜率 b 的范围为 1.21~1.47。10 种人参皂甙对照品色谱图见图 3-4(A)。

样品测定 白参或红参用甲醇回流提取 6h, 减压浓缩, 残渣用乙醚—水萃取, 水层进一步用水饱和正丁醇提取, 正丁醇提取液经减压蒸干, 残渣用甲醇溶解, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 得供试液。进样测定, 其色谱图见图 3-4(B), (C)。

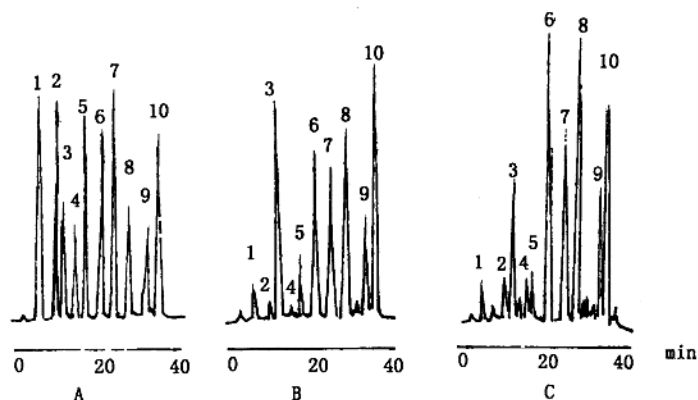


图 3-4 对照品(A)与白参(B)、红参(C)的 HPLC 图

- | | | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 1. Rh_1 | 2. Rg_2 | 3. Rg_1 | 4. Rg_3 | 5. Rf |
| 6. Re | 7. Rd | 8. Rc | 9. Rb_2 | 10. Rb_1 |

该法检测限 ($S/N=3$) 取决于检测器状态, 人参皂甙的可观察检测限为: Rb_1 80ng, Rb_2 85ng, Rc 45ng, Rd 40ng, Re 65ng, Rf 40ng, Rg_1 50ng, Rg_2 155ng, Rg_3 35ng, Rh_1 55ng。

本文采用蒸发光散射检测器 (ELSD) 优于紫外检测器, 它的优越性在于可用梯度洗脱测定出主要的人参皂甙。

5. 焦谷氨酸的测定^[5]

仪器 Waters 高效液相色谱仪; 490 程序多波长检测器。

色谱条件 色谱柱: μ -Bondapak C_{18} 柱 (3.9mm $\times$ 30cm); 流动相: $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (1:9) 0.005mol/LNaAc; 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 210nm; 灵敏度: 0.5AUFS。

5.1 不同品种人参中焦谷氨酸的测定

取鲜人参、生晒参、大力参、红参的粉末 (鲜人参捣成匀浆) 各约 10g (以干品计), 加 7 倍量无水乙醇浸泡过夜后, 超声提取 30min, 滤过, 滤液减压浓缩至一定体积后, 用无水乙醇定

容至 10ml 量瓶中。以焦谷氨酸对照品的无水乙醇(1mg/ml)液作对照,进样,按色谱条件测定,按下式计算:

$$\text{焦谷氨酸含量} = \frac{C_{\text{对}} \times h_{\text{样}} \times V_{\text{对}} / h_{\text{对}} \times V_{\text{样}}}{W \times 10^2} \times V'_{\text{样}} \times 100\%$$

$C_{\text{对}}$:对照液浓度(mg/ml); $h_{\text{样}}$:样品液中焦谷氨酸的峰高(cm); $h_{\text{对}}$:对照品峰高(cm); $V_{\text{对}}$:对照液进样量(μ l); $V_{\text{样}}$:样品液进样量(μ l); $V'_{\text{样}}$:样品液定容体积(ml); W :样品重(g)。

测定结果,鲜人参、生晒参、大力参、红参的焦谷氨酸的含量分别为 0.326%,0.003%,0.005%,0.049%。

5.2 红参不同部位中焦谷氨酸的测定

精密称取红参不同部位及去须红参和全须红参的细粉约 10.0g,加 7 倍量无水乙醇浸泡,超声提取 30min,按上法操作,结果红参芦头、须根、侧根、主根、去须红参、全须红参焦谷氨酸的含量分别为 0.092%,0.105%,0.036%,0.022%,0.037%,0.049%。

研究表明:鲜人参中焦谷氨酸的含量远高于加工品人参。红参中不同部位焦谷氨酸的含量顺序是须根>芦头>侧根>主根。须根中焦谷氨酸的含量是主根的 4.7 倍,是侧根的 2.9 倍,芦头中含量虽低于须根,但都是主根的 4 倍多,侧根的 2.5 倍。红参中焦谷氨酸主要分布在须根和芦头中。

参 考 文 献

- [1]Wu-Chang Chuang, et al. Determination of ginsenosides in ginseng crude extracts by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. A, 1994, 685:243
- [2]Kei-Ichi Samukawa, et al. Simultaneous analysis of saponine in ginseng radix by HPLC. Chem Pharm Bull. 1995, 43(1):137
- [3]刘军等. HPLC 光敏二极管阵列检测法测定人参单体皂甙的研究. 中草药, 1998, 29(4):228
- [4]Man Ki Park, et al. 高效液相色谱法—光散射检测器用于人参皂甙的测定. 药物分析杂志, 1996, 16(6):412
- [5]秦波等. 用高效液相色谱法测定不同品类人参及红参不同部位焦谷氨酸的含量. 中草药, 1994, 25(2):