

UPLC 法评价硫磺熏蒸对西洋参皂苷类成分的影响

闵春艳^{1,2}, 游本刚², 吴杨¹, 郭青^{3*}, 狄恒建³, 顾炳仁¹ (1. 苏州市药品检验检测研究中心, 苏州 215104; 2. 苏州大学, 苏州 215123; 3. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008)

摘要 目的: 评价硫磺熏蒸对西洋参皂苷类成分的影响。方法: 建立超高效液相色谱法, 测定并比较分析硫磺熏蒸前后西洋参中人参皂苷Rg₁、Re和Rb₁的含量。结果: 硫磺熏蒸后西洋参中人参皂苷Rg₁、Re和Rb₁总量仍符合《中国药典》规定; 但当硫磺熏蒸致二氧化硫残留量大于400 mg·kg⁻¹时, 人参皂苷Re、Rb₁的含量及人参皂苷Rg₁、Re和Rb₁三者的总量显著降低。当二氧化硫残留量不大于150 mg·kg⁻¹时, 人参皂苷Rg₁、Re和Rb₁的含量及其总量基本不受影响。结论: 《中国药典》规定的西洋参二氧化硫残留量不得大于150 mg·kg⁻¹有其科学性, 硫磺过度熏蒸西洋参(二氧化硫残留量大于400 mg·kg⁻¹)对西洋参中皂苷类成分的含量有显著影响。

关键词: 硫磺熏蒸; 西洋参; 人参皂苷Rg₁, Re, Rb₁; UPLC

中图分类号: R282; R927.11 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)11-1297-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.11.014

Evaluation of the Effect of Sulfur Fumigation on Ginsenosides in *Panax quinquefolium* by UPLC

Min Chunyan^{1,2}, You Bengang², Wu Yang¹, Guo Qing^{3*}, Di Hengjian³, Gu Bingren¹ (1. Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou 215104, China; 2. Soochow University, Suzhou 215123, China; 3. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

Abstract Objective: To evaluate the effect of sulfur fumigation on ginsenosides in *panax quinquefolium*. **Methods:** A UPLC method was established to measure the contents of ginsenoside Rg₁, Re and Rb₁ in *panax quinquefolium* before and after sulfur fumigation. The results were compared using variance analysis method. **Results:** The total contents of ginsenoside Rg₁, Re and Rb₁ in sulfur-fumigated *panax quinquefolium* met the criterion of Chinese Pharmacopoeia. However, the contents of ginsenoside Re and Rb₁ as well as the total contents of ginsenoside Rg₁, Re and Rb₁ significantly decreased compared with the non-fumigated *panax quinquefolium* when the sulfur dioxide residue in *panax quinquefolium* was more than 400 mg·kg⁻¹. The contents of ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁ and the contents of ginsenoside Rg₁, Re and Rb₁ in *panax quinquefolium* were not affected by sulfur fumigation when the sulfur dioxide residue of *panax quinquefolium* was not more than 150 mg·kg⁻¹. **Conclusion:** That the sulfur dioxide residue of *panax quinquefolium* should not be more than 150 mg·kg⁻¹ provided by Chinese Pharmacopoeia was reasonable. Over sulfur fumigation on *panax quinquefolium* would significantly affect the contents of ginsenosides in *panax quinquefolium*.

基金项目: 中国药典 2015 版一部科研项目 - 未经硫磺熏蒸中药材中药饮片性状修订研究; 苏州市社会发展项目 - 中药材生产加工过程中质量控制和控制关键技术研究 (编号 SS201330)

作者简介: 闵春艳, 副主任药师; 研究方向: 中药质量评价; E-mail: 944757490@qq.com

通信作者: 郭青, 主任药师; 研究方向: 中药质量控制和标准研究; E-mail: 494615112@qq.com

Keywords: sulfur fumigation; *panax quinquefolium*; ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁; UPLC

西洋参为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L.的干燥根,又名花旗参。其味甘、苦,性凉,归心、肺、肾经,具有补气养阴、清热生津之功效,现代研究表明西洋参具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、降血糖等作用^[1-2],是人们保健补益之佳品。近年来,在中药材的仓储和流通过程中,出现硫磺熏蒸西洋参现象。硫熏后的西洋参饮片色泽白晰,外观水润,其外观优于未经硫磺熏蒸的西洋参,且能够防虫,防霉,延长保质期。但硫熏过程产生的二氧化硫,为活泼的氧化还原剂,对药材的化学成分均有不同程度的影响^[3-4]。

《中国药典》2010年版第二增补本规定,对药典收载的山药、牛膝、粉葛、甘遂、天冬、天麻、天花粉、白及、白芍、白术、党参等11味药材及其饮片品种限度规定为“二氧化硫残留量不得超过400 mg·kg⁻¹”;对其他中药材及饮片,规定“二氧化硫残留量不得超过150 mg·kg⁻¹”^[5]。根据此规定,西洋参二氧化硫残留量不得过150 mg·kg⁻¹。

考虑西洋参饮片较原药材更容易吸附二氧化硫,易受硫磺熏蒸的影响,本文以西洋参饮片为研究对象,模拟库房熏蒸法,对西洋参饮片进行硫磺熏蒸,将二氧化硫残留量分别控制在150 mg·kg⁻¹及其以下(药典规定的合格限度之内)和400 mg·kg⁻¹以上(模拟过度熏蒸),以人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁为指标,考察硫磺熏蒸对其主要活性成分皂苷类成分的影响。

1 仪器与材料

美国Waters UPLC超高效液相色谱仪,工作站:Empower 3;梅特勒-托利多XS205DU电子天平;Millipore Milli-Q Reference 纯水仪;大德牌DFY-400粉碎机;上海跃进HH.S21-6S电热恒温水浴锅。

人参皂苷Rg₁(批号:110703-201128,含量为93.4%)、人参皂苷Re(批号:110754-201123,含量为89.1%)、人参皂苷Rb₁(批号:110704-201223,含量为95.9%),均购自中国食品药品检定研究院;供试品由苏州天灵中药饮片有限公司提供,经江苏省食品药品监督检验研究院狄恒建老师鉴定为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L.饮片。

2 方法与结果

2.1 西洋参饮片的硫磺熏蒸方法

取西洋参饮片供试品,模拟库房熏蒸法对其进行硫磺熏蒸,将二氧化硫残留量分别控制在150 mg·kg⁻¹以下、150 mg·kg⁻¹、400 mg·kg⁻¹以上三级级别。将熏蒸饮片按《中国药典》2010年版第一增补本附录IX U 二氧化硫残留量测定法测定二氧化硫残留量^[6]。

二氧化硫残留量测定方法:取西洋参饮片,打粉,过五号筛,取过筛粉末10 g,精密称定,置《中国药典》规定用二氧化硫测定用圆底烧瓶中,加水400 mL,取6 mol·L⁻¹盐酸溶液10 mL加入带刻度分液漏斗中,待回流开始加入烧瓶内。另准备一锥形瓶,加入125 mL水和淀粉指示液1 mL作为吸收液,置于磁力搅拌器上不断搅拌。开通氮气,调整氮气流速为0.2 mL·min⁻¹,至上述锥形瓶内有气泡均匀排出。打开上述分液漏斗活塞,使盐酸溶液流入烧瓶中,摇匀,加热烧瓶内的溶液至沸,并保持微沸3 min,立即用碘滴定液(0.01 mol·L⁻¹)滴定锥形瓶内二氧化硫吸收液,至吸收液显蓝色或蓝紫色持续30 s不完全消退,并将滴定结果用空白试验校正。每1 mL的碘滴定液(0.01 mol·L⁻¹)相当于0.6406 mg的SO₂。

2.2 UPLC法测定硫熏西洋参与非硫熏西洋参中人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁的含量

2.2.1 溶液的制备

1) 对照品储备液的制备:分别取人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁适量,精密称定,置同一10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,使成终浓度分别为241.91、749.33、1583.31 μg·mL⁻¹的混合对照品储备液。

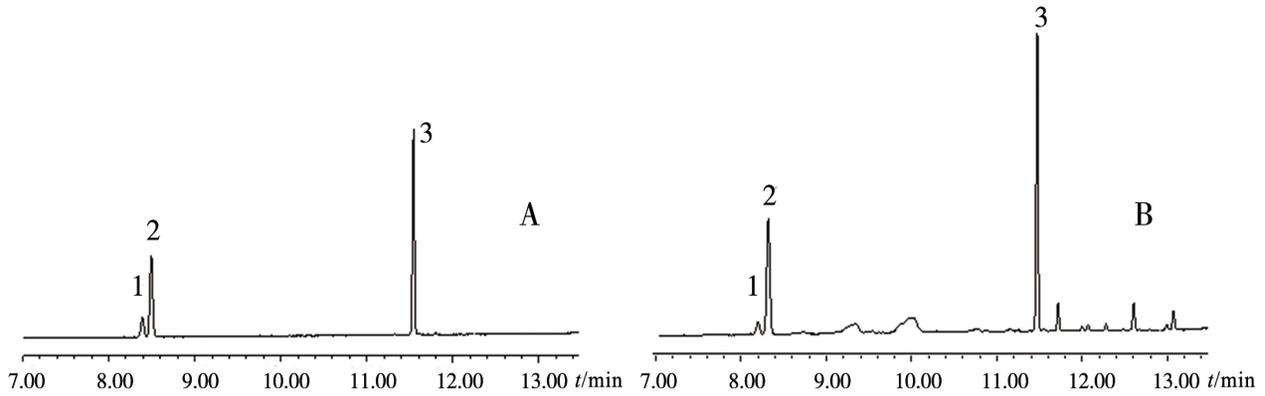
2) 供试品溶液的制备:将西洋参供试品于60℃干燥2 h,粉碎成中粉,取约0.5 g,精密称定,置250 mL三角锥形瓶内,精密加甲醇50 mL,称定重量,水浴回流1.5 h,放冷,称定重量,用甲醇补足缺失重量,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.2.2 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱:Acquity BEH C18柱(2.1 mm×100 mm,

1.7 μm) ; 柱温: 40℃; 检测波长: 203 nm; 流速: 0.5 mL · min⁻¹; 进样量: 2 μL^[7]。采用二元梯度洗脱, 洗脱程序见表1。其中流动相A为乙腈,

流动相B为水相。人参皂苷R_{g1}和人参皂苷Re分离度大于1.5, 人参皂苷R_{g1}、Re、R_{b1}峰理论板数均超过250000, 结果见图1。



A. 混合对照品; B. 西洋参供试品; 1. 人参皂苷 R_{g1}; 2. 人参皂苷 Re; 3. 人参皂苷 R_{b1}。

图1 混合对照品和西洋参供试品的UPLC色谱图

表1 西洋参人参皂苷 R_{g1}、Re、R_{b1} 含量测定梯度洗脱程序

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 6	19 → 20	81 → 80
6 ~ 17	20 → 60	80 → 40
17 ~ 18	60 → 100	40 → 0
18 ~ 19	100	0
19 ~ 20	100 → 19	0 → 81
20 ~ 22	19	81

2.2.3 标准曲线和线性范围

取“2.2.1”节人参皂苷R_{g1}、Re、R_{b1}混合对照品储备液, 用甲醇逐步稀释, 使人参皂苷R_{g1}的系列浓度分别为12.10、24.19、72.57、120.95、241.91 μg · mL⁻¹; 人参皂苷Re的系列浓

度分别为37.47、74.93、224.80、374.67、749.33 μg · mL⁻¹; 人参皂苷R_{b1}的系列浓度分别为79.17、158.33、474.99、791.65、1583.31 μg · mL⁻¹。进样2 μL, 以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程, 结果见表2。

表2 人参皂苷 R_{g1}、Re、R_{b1} 标准曲线和线性范围

指标成分	标准曲线	R ²	线性范围/(μg · mL ⁻¹)
人参皂苷R _{g1}	Y=1138.467X+369.8395	0.9995	12.10 ~ 241.91
人参皂苷Re	Y=1386.756X+2664.658	0.9994	37.47 ~ 749.31
人参皂苷R _{b1}	Y=1125.631X+5799.586	0.9995	79.17 ~ 1583.31

2.2.4 精密度试验

取人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 混合对照品溶液(浓度分别为24.19、74.93、158.33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),重复进样6次,测定峰面积值,RSD分别为1.0%、0.2%、0.3%,精密度良好。

2.2.5 稳定性试验

称取西洋参供试品(苏州天灵,批号:130427-3),按“2.2.1”节方法制备西洋参供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24 h进样,测定人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 峰面积值,RSD分别为2.8%、2.0%、2.6%,表明西洋参供试品在24 h内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验

称取西洋参供试品(苏州天灵,批号:130427-3),每份约0.5 g,精密称定,共6份,按照“2.2.1”节方法制备供试品溶液,测定峰面积,

计算样品中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 质量分数的平均值分别为0.17%、1.37%、2.98%,RSD分别为2.4%、1.9%、2.6%。

2.2.7 加样回收试验

称取西洋参供试品(苏州天灵,批号:130427-3),每份约0.25 g,精密称定,共6份,精密加入人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 混合对照品溶液50 mL,其中,人参皂苷 R_{g_1} 对照品的加入量为436.03 μg ,人参皂苷 R_e 对照品的加入量为1554 μg ,人参皂苷 R_{b_1} 对照品的加入量为5249.57 μg ,按照“2.2.1”节方法制备供试品溶液并测定。计算得到人参皂苷 R_{g_1} 的平均加样回收率为98.8%,RSD为3.2%;人参皂苷 R_e 的平均加样回收率为98.3%,RSD为2.9%;人参皂苷 R_{b_1} 的平均加样回收率为98.1%,RSD为2.4%,结果见表3。

表3 西洋参中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 的加样回收率结果($n=6$)

被测组分	序号	称样量/g	样品量 μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
人参皂苷 R_{g_1}	1	0.2593	440.81	436.03	855.10	95.01	98.8	3.15
	2	0.2494	423.98	436.03	843.95	96.32		
	3	0.2386	405.62	436.03	833.30	98.09		
	4	0.2730	464.10	436.03	894.90	98.80		
	5	0.2710	460.70	436.03	899.55	100.65		
	6	0.2987	507.79	436.03	960.00	103.71		
人参皂苷 R_e	1	0.2593	3552.41	1554.00	5013.30	94.01	98.3	2.91
	2	0.2494	3416.78	1554.00	4935.70	97.74		
	3	0.2386	3268.82	1554.00	4848.65	101.66		
	4	0.2730	3740.10	1554.00	5308.90	100.95		
	5	0.2710	3712.70	1554.00	5252.35	99.08		
	6	0.2987	4092.19	1554.00	5592.00	96.51		
人参皂苷 R_{b_1}	1	0.2593	7727.14	5249.57	12949.85	99.49	98.1	2.42
	2	0.2494	7432.12	5249.57	12463.15	95.84		
	3	0.2386	7110.28	5249.57	12065.90	94.40		
	4	0.2730	8135.40	5249.57	13353.00	99.39		
	5	0.2710	8075.80	5249.57	13346.75	100.41		
	6	0.2987	8901.26	5249.57	14089.60	98.83		

2.2.8 样品测定

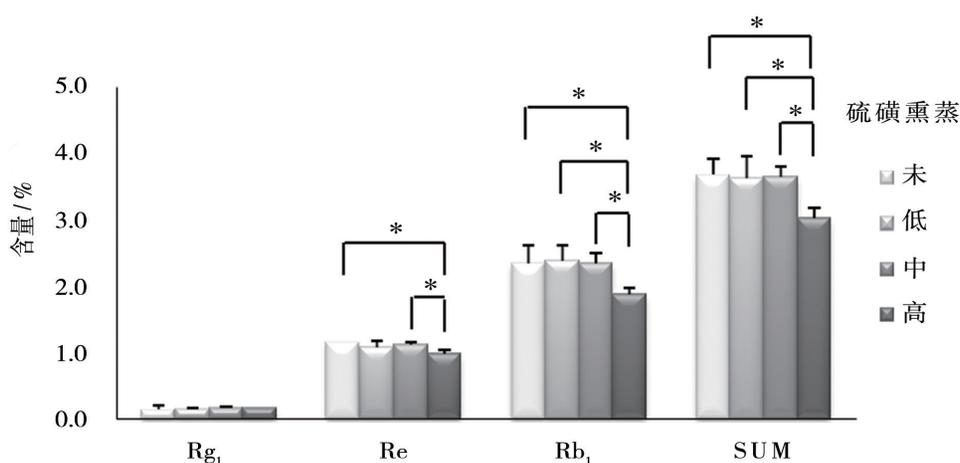
取3批未经硫磺熏蒸的西洋参饮片和其对应的经过硫磺熏蒸的西洋参饮片粉末，每份取约0.5 g，精密称定，平行制备2份供试品溶液并进行

含量测定，结果见表4。

根据表4中的测定结果，采用方差分析法分别比较硫磺熏蒸前后西洋参中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的含量及三者总含量，结果如图2所示。

表4 西洋参供试品中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的含量测定 (n=2)

批号	SO ₂ / (mg · kg ⁻¹)	Rg ₁ /%	Re/%	Rb ₁ /%	(Rg ₁ +Re+Rb ₁)/%
130427-1	-	0.21	1.17	2.19	3.57
130427-2	70	0.14	1.00	2.20	3.34
130427-3	150	0.15	1.17	2.52	3.84
130427-4	420	0.17	1.02	1.97	3.16
130426-1	-	0.11	1.19	2.66	3.96
130426-2	70	0.16	1.05	2.35	3.56
130426-3	150	0.16	1.09	2.33	3.58
130426-4	420	0.17	1.02	1.88	3.07
130428-1	-	0.14	1.17	2.22	3.53
130428-2	70	0.16	1.19	2.64	3.99
130428-3	155	0.19	1.13	2.20	3.52
130428-4	411	0.18	0.91	1.78	2.87



低剂量组 SO₂ 残留量 < 150 mg · kg⁻¹；中剂量组 SO₂ 残留量约为 150 mg · kg⁻¹；高剂量组 SO₂ 残留量 > 400 mg · kg⁻¹。

图2 硫磺熏蒸组西洋参与未熏蒸组西洋参中人参皂苷 Rg₁、Re 和 Rb₁ 的比较

方差分析结果表明: 1) 硫磺熏蒸前后, 西洋参中人参皂苷 R_{g_1} 含量无显著性差异, 说明硫磺熏蒸对西洋参中人参皂苷 R_{g_1} 的含量无显著性影响。2) 经过高剂量硫磺熏蒸的西洋参组与未熏蒸组相比较, 人参皂苷Re含量存在显著性差异, 说明硫磺熏蒸至西洋参中二氧化硫残留量 $>400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 会引起西洋参中人参皂苷Re含量的显著性降低; 硫磺熏蒸中剂量组与高剂量组西洋参人参皂苷Re存在显著性差异, 且低、中剂量组与未熏蒸组西洋参相比, 人参皂苷Re不存在显著性差异, 说明硫磺熏蒸至西洋参中二氧化硫残留量至 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 成为一个分水岭。本试验表明二氧化硫残留量在 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及以下, 西洋参中的人参皂苷Re含量不受显著性影响。3) 经过高剂量硫磺熏蒸的西洋参组与未熏蒸组、低剂量组、中剂量组西洋参相比较, 人参皂苷 R_{b_1} 含量均存在显著性差异, 说明硫磺熏蒸至西洋参二氧化硫残留量 $>400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 会引起西洋参中人参皂苷 R_{b_1} 含量的显著性降低; 未熏蒸组与低、中剂量组西洋参人参皂苷 R_{b_1} 不存在显著性差异, 说明二氧化硫残留量在 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及以下, 西洋参中的人参皂苷 R_{b_1} 含量不受显著性影响。4) 硫磺熏蒸高剂量组与未熏蒸组、低剂量组、中剂量组西洋参相比较, 人参皂苷 R_{g_1} 、Re和 R_{b_1} 三者总量均存在显著性差异, 说明硫磺熏蒸至西洋参二氧化硫残留量 $>400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 会引起西洋参中人参皂苷 R_{g_1} 、Re和 R_{b_1} 三者总量的显著性降低; 但未熏蒸组与低、中剂量组相比, 人参皂苷 R_{g_1} 、Re和 R_{b_1} 三者总量不存在显著性差异, 说明二氧化硫残留量在 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及以下时, 西洋参中人参皂苷 R_{g_1} 、Re和 R_{b_1} 三者总量不受显著性影响。

3 讨论

1) 人参皂苷 R_{g_1} 、Re和 R_{b_1} 是西洋参中含量较高的3个特征性皂苷成分, 也是《中国药典》^[8]西洋参含量测定项下的指标成分, 本文通过测定三者含量来考察硫磺熏蒸对其产生的影响。结果表明, 硫磺熏蒸后人参皂苷 R_{g_1} 、Re和 R_{b_1} 总量均符合《中国药典》规定, 总量不少于2.0%; 但当硫磺熏蒸西洋参导致二氧化硫残留量大于 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 能够引起人参皂苷Re、 R_{b_1} 含量及人参皂苷 R_{g_1} 、Re和 R_{b_1} 三者总量的显著性降低。当二氧化硫残留量小于等于 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 人参皂苷 R_{g_1} 、Re和

R_{b_1} 的含量和总量基本不受影响。本文选取3批次西洋参饮片, 经过控制硫磺熏蒸程度, 使其二氧化硫残留量分别控制在 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以内、 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以上, 基本能够证明药典规定的西洋参二氧化硫残留量不得大于 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 有其科学合理性。但对 $150\sim 400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 二氧化硫残留量的样本尚缺少考察, 有待进一步的试验。

2) 硫磺熏蒸产生的二氧化硫气体遇水能够生成亚硫酸, 再遇空气能够氧化生成硫酸, 可与人参皂苷母核或糖基上的羟基发生磺酸化反应。有文献报道^[9-10], 人参经过硫熏后生成磺酸化人参皂苷Re和磺酸化人参皂苷 R_{b_1} , 推测西洋参硫熏后可能也容易使人参皂苷Re、 R_{b_1} 发生磺化反应, 从而引起含量的降低。

3) 《中国药典》西洋参项下人参皂苷 R_{g_1} 、Re和 R_{b_1} 含量测定采用水饱和的正丁醇水浴回流提取, 经过比较, 发现用甲醇水浴回流提取, 加样回收率也较好, 因此采用甲醇提取, 该方法较药典方法简单。且《中国药典》采用HPLC检测, 分析时间长达2 h左右, 本文采用UPLC法进行测定, 可对人参皂苷 R_{g_1} 、Re、 R_{b_1} 进行快速高效的含量测定。

4) 试验结果表明, 过度的硫磺熏蒸西洋参能显著降低其皂苷类成分的含量, 影响西洋参品质, 且西洋参饮片质地泡松, 表面积大, 容易吸附二氧化硫, 造成二氧化硫超标, 为了公众健康, 并不提倡硫磺熏蒸西洋参。建议采用更为科学合理的存贮方法来延长西洋参的保质期和保持其品质。

参考文献:

- [1] 王艳红, 刘中申, 关枫, 等. 西洋参及其制剂的免疫调节作用研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22(3): 566-567.
- [2] 张西珍, 苏光悦, 夏晓艳, 等. 天然达玛烷型皂苷降血糖作用的研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(8): 2758-2763.
- [3] 孙艳菲, 牛韬, 刘静静, 等. 硫磺熏蒸中药材现状及解决措施[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1): 125-127.
- [4] Xiao-qing Ma, Alexander Kai Man Leung, Chi Leung Chan, et al. UHPLC UHD Q-TOF MS/MS Analysis of the Impact of Sulfur Fumigation on the Chemical Profile of Codonopsis Radix(Dangshen) [J]. Analyst, 2014, 139:

- 505-516.
- [5] 中国药典：第二增补本[S]. 2010: 180.
- [6] 中国药典：第一增补本[S]. 2010: 262.
- [7] 吴银生, 闵春艳. 不同参类中人参皂苷R_{g1}、Re、Rb₁的质量测定[J]. 抗感染药学, 2011, 8(2): 106-108.
- [8] 中国药典：一部[S]. 2015: 132.
- [9] 周珊珊, 徐金娣, 沈红, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS结合对照药材法快速筛查硫磺熏蒸商品人参[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2807-2813.
- [10] Xin Jin, Lingying Zhu, Hong Shen, et al. Influence of Sulphur-fumigation on the Quality of White Ginseng: A Quantitative Evaluation of Major Ginsengsides by High Performance Liquid Chromatography [J]. Food Chemistry, 2012, 135: 1141-1147.

(收稿日期 2017年1月22日 编辑 邹宇玲)