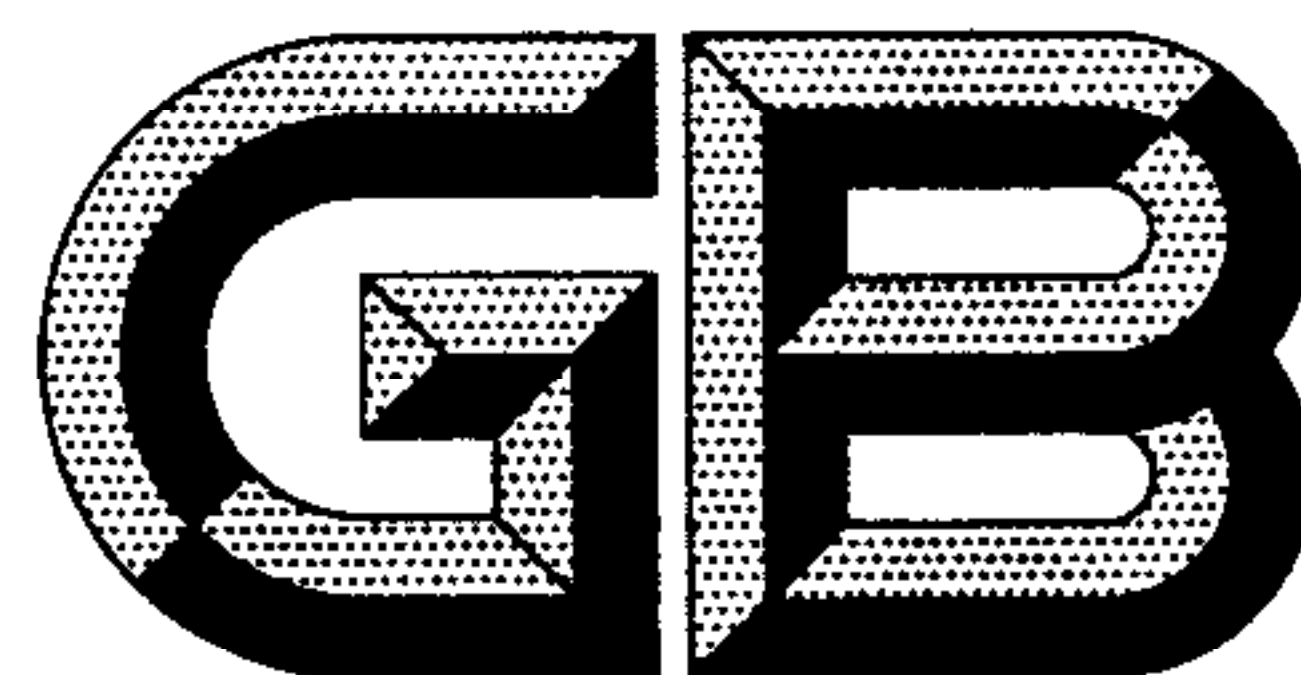




中华人民共和国国家标准

GB/T 22996—2008

人参中多种人参皂甙含量的测定 液相色谱-紫外检测法

Determination of ginsenosides in ginseng—
LC-UV method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局，中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：宋文斌、李军、董振霖、孙玉岭、隋凯、李佳昌、于一茫、代英成、李姝、庞国芳。

人参中多种人参皂甙含量的测定

液相色谱-紫外检测法

1 范围

本标准规定了人参中人参皂甙(ginsenosides)Re、Rg₁、Rf、Rb₁、Rc、Rb₂含量的液相色谱-紫外检测方法。

本标准适用于生晒人参中人参皂甙 Re、Rg₁、Rf、Rb₁、Rc、Rb₂ 含量的测定。

本标准的方法检出限:人参皂甙 Re、Rg₁、Rb₁、Rc、Rb₂ 均为 50 mg/kg,人参皂甙 Rf 为 25 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准。然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

采用快速溶剂萃取法(ASE)在高温、高压的条件下,使人参皂甙完全彻底地被萃取到甲醇中,经浓缩、定容,液相色谱测定,外标法定量。

4 试剂和材料

水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 海砂:化学纯,粒度:0.65 mm~0.85 mm。

4.4 人参皂甙标准物质:Re、Rg₁、Rf、Rb₁、Rc、Rb₂ 纯度均大于 99%。

4.5 人参皂甙标准液

4.5.1 六种人参皂甙 Re、Rg₁、Rf、Rb₁、Rc、Rb₂ 标准储备液:1.0 mg/mL。用分析天平准确称取适量上述物质(4.4),分别用甲醇(4.1)配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液。储备液避光在 2℃~4℃下保存。

4.5.2 六种人参皂甙混合标准工作液:根据每种人参皂甙的灵敏度和仪器的线性范围,量取适当的六种人参皂甙标准储备液(4.5.1),用甲醇配制成混合标准工作液,避光在 2℃~4℃下保存。

注:称取标准物质的质量是按照纯度修正过的质量。

5 仪器

5.1 液相色谱仪:配有紫外检测器。

- 5.2 加速溶剂萃取仪:型号 ASE200,配有 11 mL 萃取池。
- 5.3 电子天平:感量为 0.01 g 和 0.000 1 g。
- 5.4 旋转蒸发仪。
- 5.5 鸡心瓶:150 mL。
- 5.6 容量瓶:10 mL。
- 5.7 微量移液器:10 μL ~100 μL 和 1 000 μL ~5 000 μL 。
- 5.8 样品过滤器:PTFE,0.45 μm 。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

将人参样品混合均匀。分出 0.5 kg 作为试样,用粉碎机粉碎并通过孔径 20 目筛。混匀密封,并做标记。

6.2 试样保存

将试样置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

7 分析步骤

7.1 提取

分别称取人参试样 1 g(精确到 0.01 g)和海砂 13.0 g,将试样与海砂充分混匀,装入事先放入纤维素滤膜的加速溶剂萃取仪的 11 mL 萃取池中,拧紧池盖,进行萃取。

加速溶剂萃取条件如下:

- a) 萃取溶剂:甲醇;
- b) 压力:10.7 MPa;
- c) 温度:140 $^{\circ}\text{C}$;
- d) 静态萃取时间:5 min;
- e) 静态循环次数:2 次;
- f) 冲洗体积:50%;
- g) 吹扫时间:100 s。

将收集到瓶中的提取液转移到鸡心瓶中,50 $^{\circ}\text{C}$ 下真空浓缩至小于 10 mL,转移到 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,混匀。取部分样液用 0.45 μm 滤膜过滤到进样瓶中,待液相色谱测定。

7.2 色谱测定

7.2.1 液相色谱测定条件

液相色谱测定条件如下:

- a) 色谱柱:Acclaim 120C₁₈,5 μm ,250 mm $\times$ 4.6 mm(内径)或相当者;
- b) 流速:1 mL/min;
- c) 检测波长:203 nm;
- d) 柱温:50 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 进样量:10 μL ;
- f) 流动相及梯度见表 1。

表 1 流动相及梯度

步骤	运行时间/min	流动相水/%	流动相乙腈/%
0	0.00	70	30
1	5.50	64	36
2	12.00	20	80
3	20.00	0	100
4	25.00	70	30
5	30.00	70	30

7.2.2 液相色谱测定

用不同浓度的人参皂甙混合标准液分别进样,以峰面积和标准工作溶液的浓度绘制标准工作曲线,样品溶液中人参皂甙的响应值均在仪器的测定线性范围内。在上述色谱条件下,各种人参皂甙的保留时间见表 2。各种人参皂甙的标准物质色谱图参见附录 A 中的图 A.1。各种人参皂甙的添加浓度及其平均回收率的结果参见附录 B 中的表 B.1。

表 2 各种人参皂甙参考保留时间

人参皂甙	保留时间/min	人参皂甙	保留时间/min
Re	4.632	Rb ₁	10.310
Rg ₁	4.871	Rc	10.540
Rf	10.014	Rb ₂	11.215

7.3 平行试验

按照上述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.4 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

人参中人参皂甙含量按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——试样中被测组分含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
 - c——从标准曲线上得到被测组分溶液的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 - V——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);
 - m——样品溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。
- 计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,其重复性和再现性的值是以 95%的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r,人参中人参皂甙添加浓度范围及重复性方程见表 3。

表 3 人参中人参皂甙的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每千克

人参皂甙	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
Re	50~200	$\lg r=5.773+2.653 \lg m$	$\lg R=5.639+2.661 \lg m$
Rg ₁	50~200	$\lg r=3.510+1.482 \lg m$	$\lg R=3.367+1.485 \lg m$
Rf	25~100	$\lg r=1.803+0.623 \lg m$	$\lg R=1.653+0.623 \lg m$
Rb ₁	50~200	$\lg r=2.523+0.970 \lg m$	$\lg R=2.388+0.977 7 \lg m$
Rc	50~200	$\lg r=1.248+0.318 \lg m$	$\lg R=3.445+1.528 \lg m$
Rb ₂	50~200	$\lg r=7.354+3.432 \lg m$	$\lg R=7.216+3.429 \lg m$
注： m 为两次测定结果的算术平均值。			

如果差值超过重复性限 r ,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,人参中人参皂甙添加浓度范围及再现性方程见表 3。

附录 A
(资料性附录)
标准物质色谱图

人参皂甙标准物质色谱图, 见图 A. 1。

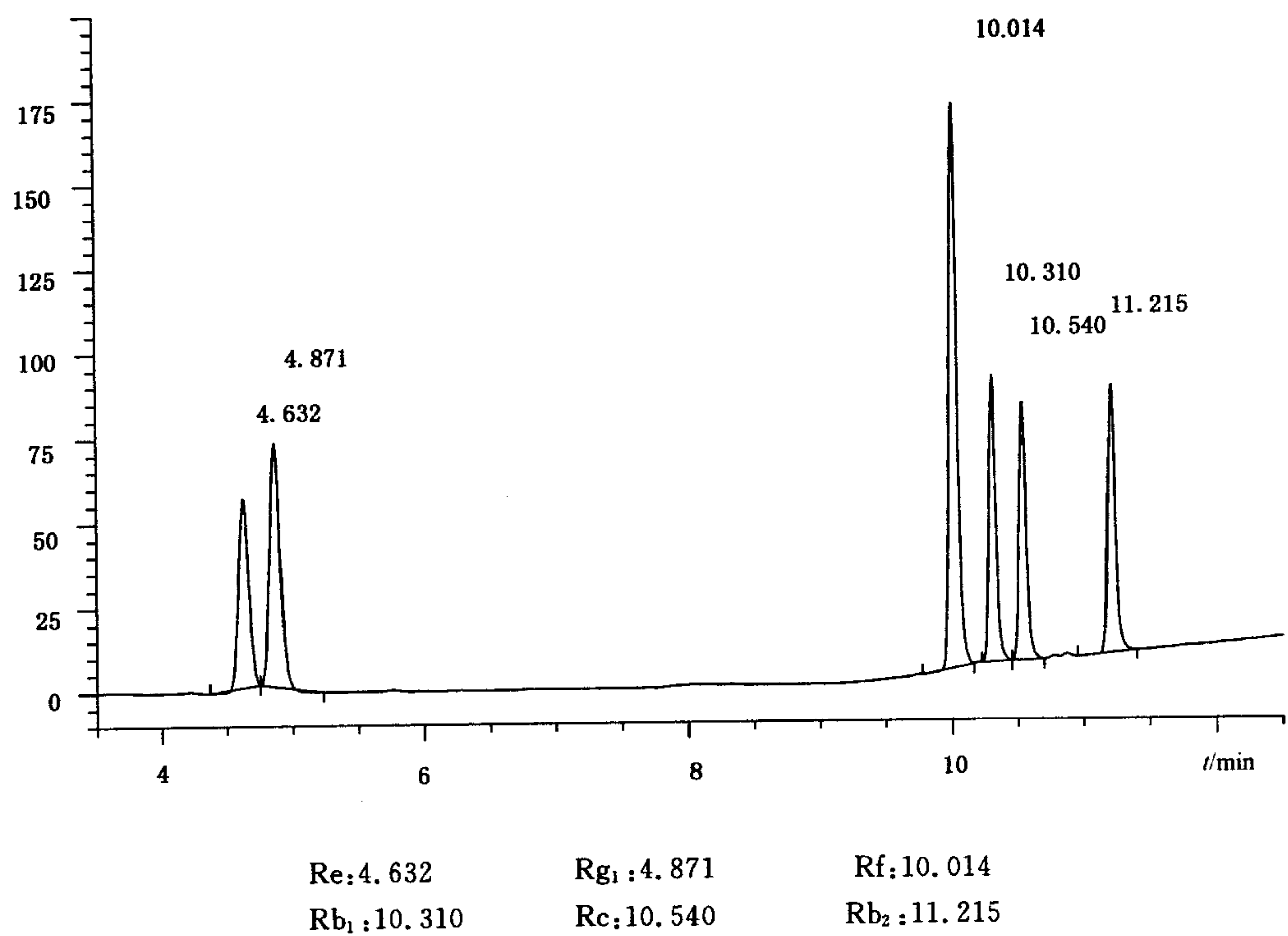


图 A. 1 人参皂甙标准物质色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中人参皂甙添加浓度及其平均回收率试验数据,见表 B. 1。

表 B. 1 人参皂甙添加浓度及其平均回收率试验数据

人参皂甙	添加浓度/(mg/kg)	平均回收率/%
Re	50	91.98
	100	87.19
	150	91.37
	200	94.78
Rg ₁	50	94.22
	100	86.69
	150	91.28
	200	97.12
Rf	25	90.69
	50	91.09
	75	102.79
	100	98.52
Rb ₁	50	85.69
	100	92.26
	150	93.95
	200	99.95
Rc	50	90.73
	100	87.09
	150	94.17
	200	99.61
Rb ₂	50	89.95
	100	87.24
	150	96.60
	200	100.43