

反相高效液相色谱法测定人参皂甙 Compound-K 的含量

周 伟, 罗振时, 周 珮

(复旦大学药学院生物合成教研室, 上海 200032)

摘要 : 人参皂甙 compound-K (C-K) 在人参中的含量极低, 但它是其他含量较高的人参皂甙 Rb1 和 Rb2 等在人体肠道内的主要降解产物和最终吸收形式, 具有很高的生物活性。采用反相高效液相色谱法测定了人参总皂甙发酵液中 C-K 的含量。色谱条件为: 反相 C_{18} 柱; 乙腈-水(体积比为 48:52) 溶液为流动相, 流速 1.0 mL/min; 紫外检测波长 203 nm; 柱温 35 °C; 外标法定量。结果表明: C-K 的质量浓度为 0.05 ~ 0.8 g/L 时, 其峰面积与质量浓度具有良好的线性关系, 相关系数为 0.999 8。方法的检测限($S/N=3$) 为 2.5 mg/L, 峰面积测定值的相对标准偏差($n=6$) 为 2.20%。测定栽培人参总皂甙及三七茎叶总皂甙微生物发酵液中 C-K 的平均加标回收率($n=3$) 分别为 98.6% 和 99.7%。该方法快速简便, 准确可靠, 可用于 C-K 的制备研究及药物开发。

关键词 : 高效液相色谱法; 人参皂甙 compound-K; 人参; 三七

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)03-0270-03

Determination of Ginsenoside Compound-K by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

ZHOU Wei, LUO Zhenshi, ZHOU Pei

(Department of Biosynthetic Drug, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract : Ginsenoside compound-K content in ginseng is very low, while it is the main intestinal bacterial metabolite and the final absorption style of the major components, such as ginsenosides Rb1 and Rb2. The determination of ginsenoside compound-K in the fermentation liquor of ginseng saponins by reversed-phase high performance liquid chromatography was established. The separation was carried out under the following conditions: a Waters Symmetry C_{18} column (4.6 mm i. d. \times 150 mm, 5 μ m) was used at 35 °C with acetonitrile-water (48:52, v/v) as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. UV detection wavelength was set at 203 nm. The experimental results showed a good linear relationship between the peak area and mass concentration for ginsenoside compound-K within the range of 0.05 - 0.8 g/L ($r=0.9998$). The relative standard deviation of peak area ($n=6$) was 2.20%. The lowest detection limit ($S/N=3$) was 2.5 mg/L. The average recoveries ($n=3$) for the culture broth of ginseng saponins and notoginseng saponins were 98.6% and 99.7%, respectively. The method is rapid, simple, accurate and reproducible and can be utilized for the research and development of ginsenoside compound-K in pharmaceutical industry.

Key words : high performance liquid chromatography; ginsenoside compound-K; ginseng; notoginseng

人参在我国和东亚的应用已有数千年, 作为滋补强身的药材也已闻名全世界。人参皂甙(ginsenoside) 被认为是人参各种药理和生物活性的主要有效成分, 属于三萜皂甙, 其中人参皂甙 Rb1, Rb2, Rc, Re 和 Rg1 等含量较高。人参皂甙 compound-K (C-K) [20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol], 其分子式为 $C_{36}H_{64}O_8$, 在人参中的含

量极低, 但它是人参皂甙 Rb1, Rb2 和 Rc 在人体肠道内的主要降解产物和最终吸收形式^[1]。近年来, 体内体外试验研究发现, 许多生物学活性都是由该化合物引起的, 如抑制肿瘤细胞的增殖、浸润和转移, 抗过敏, 抑制化学致癌剂诱导的染色体基因突变等^[2,3], 因此对它的研究越来越受到重视。目前, C-K 主要是通过微生物发酵法和酶法获得^[4,5]。C-K

收稿日期 2004-07-10

作者简介: 周 伟, 男, 硕士研究生。

通讯联系人: 周 珮, 女, 博士, 教授, Tel (021) 54237431, E-mail: zhou@shmu.edu.cn.

基金项目: 上海-SK 研究与发展基金资助项目。

含量测定方法学的研究对人参皂甙发酵液及其制品的质量控制、发酵工艺的优化以及 C-K 体内代谢吸收的研究均有十分重要的意义。采用高效液相色谱法(HPLC)测定人参皂甙含量,在国内外均有报道^[6-8],而有关人参及其制品中 C-K 的含量测定则未见报道。本文采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定栽培人参总皂甙和三七茎叶总皂甙微生物发酵液中 C-K 的含量,方法具有简便快速、结果准确等优点,且样品经提取、浓缩、定容后不需要进一步纯化。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及样品

Waters 1525 二元梯度泵(包括 Rheodyne 7725i 六通阀进样器);Waters 2487 双波长紫外检测器和 Breeze 色谱工作站;Agilent 1100 LC/MSD;Acculab ALC-110.4 型分析天平(德国 Sartorius 公司);RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

甲醇、乙醇(分析纯,上海化学试剂公司);乙腈(HPLC 纯,DIKMA 公司);超纯水(由德国 Sartorius 公司 Arium 631 系列实验室超纯水器制备)。

C-K 标准品:本实验室自制;栽培人参总皂甙:抚顺鑫泰参茸保健品公司提供,总皂甙含量 81.56%(质量分数);三七茎叶总皂甙:云南红云生物技术公司提供,总皂甙含量 80.52%(质量分数)。

1.2 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm i. d. × 150 mm 5 μm);流动相:乙腈-水(体积比为 48:52)溶液,流速 1.0 mL/min;检测波长:203 nm;柱温 35 °C;进样量:10 μL。

1.3 标准溶液的制备

精密称取 C-K 标准品 5.0 mg,用甲醇溶解并定容至 5 mL,配制成 1.0 g/L 的标准储备溶液。从中准确吸取适量配成 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 的系列标准溶液。

1.4 样液的制备

1.4.1 人参总皂甙样液的制备

分别准确称取 30.0 mg 栽培人参总皂甙和三七茎叶总皂甙,各用甲醇配成 10 mL 质量浓度为 3 g/L 的溶液,经 0.45 μm 滤膜过滤后作为测定样液。

1.4.2 人参总皂甙发酵液样品溶液的制备

取栽培人参总皂甙和三七茎叶总皂甙的发酵液各 30 mL(人参总皂甙质量浓度为 5 g/L),先用 30 mL 乙醇浸提 24 h,再过滤除去菌体。滤液减压蒸干后,用 5 mL 甲醇溶解,将溶解液高速离心(12 000 r/min)10 min。准确移取上清液 1 mL,用甲醇稀释 30 倍,经 0.45 μm 滤膜过滤后供试。

1.5 定量方法

采用外标法定量。以峰面积对质量浓度做工作曲线,再由试样中组分的峰面积求出试样中组分的实际浓度。

2 结果与讨论

2.1 人参皂甙 compound-K 的色谱行为

本研究在乙腈-水流动相体系中进行,选择乙腈与水的体积比分别为 30:70、43:57、48:52、55:45、60:40,结果以乙腈与水的体积比为 48:52 的分离效果最好。在此条件下不仅 C-K 与其他皂甙类成分达到基线分离,而且峰形好,检测灵敏度高。C-K 标准品、发酵前后栽培人参总皂甙及三七茎叶总皂甙的色谱图见图 1。

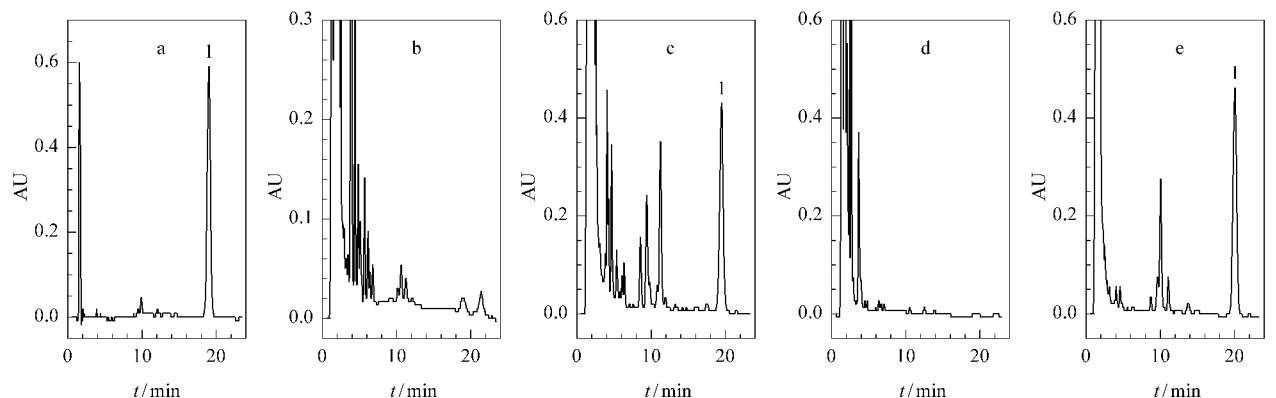


图 1 C-K 标准品(a)、栽培人参总皂甙(b)及其发酵液(c)、三七茎叶总皂甙(d)及其发酵液(e)的色谱图

Fig.1 Chromatograms of ginsenoside compound-K standard (a), ginseng saponins (b) and its fermentation liquor (c), notoginseng saponins (d) and its fermentation liquor (e)

Column: Waters Symmetry C₁₈ column (4.6 mm i. d. × 150 mm, 5 μm); mobile phase: acetonitrile-water (48:52, v/v); flow rate: 1 mL/min; detection wavelength: 203 nm.

1. ginsenoside compound-K.

2.2 纯度检测

采用高效液相色谱-二极管阵列检测器-电喷雾离子化质谱(HPLC-DAD-ESI-MS)分析检测了样品谱图中 C-K 的纯度。在紫外检测色谱图中 C-K 峰的两侧和峰中心得出的光谱图一致;在质谱检测总离子流色谱图中 C-K 峰的两侧和峰中心得出的质谱图也完全一致。表明此条件下样品中其他成分对 C-K 的分析无干扰,对其定量是可行的。

2.3 检出限与线性范围

吸取“1.3”节中配制的系列标准溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪中,按“1.2”节所述色谱条件进行测定。以峰面积 Y 对 C-K 的质量浓度 X(g/L)做线性回归,得回归方程为 $Y = 5\,459\,777X - 69\,010$ ($r = 0.9998$)。对该方程的线性范围进行考察,结果表明质量浓度为 0.05 ~ 0.8 g/L 时具有良好的线性关系。以 3 倍信噪比计,测得方法的最低检测限为 2.5 mg/L。

2.4 回收率

在已知 C-K 含量的栽培人参总皂甙发酵液(A)及三七茎叶总皂甙发酵液(B)样品溶液中分别加入适量的 C-K 标准溶液。每份样液进样 3 次平行测定,考察方法的回收率,结果见表 1。

表 1 人参皂甙 compound-K 回收率的测定($n = 3$)
Table 1 Recoveries of ginsenoside compound-K ($n = 3$)

Sample*	Added/mg	Found/mg	Recovery/%	RSD/%
A	0.100	0.098	98.0	0.64
	0.200	0.196	98.0	1.32
	0.400	0.399	99.8	2.00
B	0.200	0.198	99.0	2.38
	0.400	0.400	100	1.24
	0.600	0.600	100	1.88

* Sample A : ginseng saponins fermentation liquor ; sample B : notoginseng saponins fermentation liquor.

2.5 精密度

取质量浓度为 0.4 g/L 的标准溶液,在“1.2”节所述色谱条件下平行进样 6 次,测得峰面积的相对标准偏差为 2.20%。

2.6 样品分析

分别取栽培人参总皂甙及三七茎叶总皂甙的发酵液,按“1.4.2”节所述方法制得发酵液样品溶液,取 10 μL 按“1.2”节所述色谱条件进样测定,测得 C-K 含量(质量分数)分别为 6.81% 和 9.39%。

3 结语

本方法的建立为菌株改良、发酵与分离工艺优化,提高发酵转化率和分离提取的收率提供了一个有效的分离分析手段,为实现人参皂甙 compound-K 生产工业化及开发抗肿瘤新药奠定了基础。

参考文献:

[1] Akao T, Kida H, Kanaoka M, Hattori M, Kobashi K. J Pharm Pharmacol, 1998, 50 : 1 155

[2] Lee S J, Sung J H, Lee S J, Moon C K, Lee B H. Cancer Letters, 1999, 144(1) : 39

[3] Lee B H, Lee S J, Hui J H, Lee S, Sung J H, Huh J D, Moon C K. Planta Med, 1998, 64(6) : 500

[4] Chen Xin, Zhou Qiuli, Wang Benxiang. Acta Pharmaceutica Sinica (陈 昕, 周秋丽, 王本祥. 药学学报), 1999, 34(6) : 410

[5] Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Tainiyawa T, Takino Y. Chem Pharm Bull, 1991, 39(9) : 2 357

[6] Zhang H J, Wu Y J, Cheng Y Y. J Pharm Biomed Anal, 2003, 31(1) : 175

[7] Court W A, Hendel J G, Elmi J. J Chromatogr A, 1997, 771 : 387

[8] Ma Xiaoqiong, Wang Longxing, Xu Qing, Zhang Feng, Xiao Hongbin, Liang Xinmiao. Chemical Journal of Chinese Universities (马小琼, 王龙星, 徐 青, 张 峰, 肖红斌, 梁鑫淼. 高等学校化学学报), 2004, 25(2) : 238