

参考文献:

- [1] 张伟江, 潘德济, 张罗修, 等. 雷公藤三萜成分研究 [J]. 药学学报, 1986, 21(8): 592-598.
- [2] 姚新生. 天然药物化学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [3] 杨晓东, 刘四妹. 雷公藤多甙片的紫外分光光度测定 [J]. 中国医药工业杂志, 1995, 26(3): 128-129.
- [4] 张一萍, 杨小平. 复方雷公藤药膜检测方法研究 [J]. 中药材, 2005, 28(9): 825-827.

人参果中化合物 K 的 HPLC 法测定¹

王继彦^{1,2}, 李向高², 杨秀伟^{3*}

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117; 2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118;
3. 北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科人参属植物, 不但其根药用, 而且其叶和果实亦供药用, 并有广泛的生物学活性。笔者从人参浆果中分离得到苯甲酸、异人参皂苷 Rh₃、人参皂苷 Rh₂、人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₁、β-谷甾醇和化合物 K 12 个化合物^[1,2]。药理学研究表明: 不但化合物 K 原形有广泛的药理学活性^[3~7], 而且其在肝脏转化形成的脂肪酸酯(EM I) 在抗癌转移方面亦表现出了特殊性, 如在离体试验中, 化合物 K 及其代谢产物 EM I 皆能抑制 B16-F10 黑色素瘤细胞的生长, 但 EM I 的毒性比化合物 K 低。在整体试验中, 将 EM I 和化合物 K 分别直接注入(静脉注射可能会导致血浆酯酶水解 EM I) 肝移植性 B16-F10 黑色素瘤细胞癌灶内, 发现 EM I 对肿瘤细胞生长的抑制作用比化合物 K 更强; 在抗癌细胞转移方面, 两者的作用几乎相同。因此, 化合物 K 在人参果药理作用上可能扮演了重要作用。因此本文报道人参果中化合物 K 的 HPLC 法测定, 为其质量控制提供方法。

1 仪器、试剂和样品

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(四元梯度泵、再线脱气机、柱温箱、VWD 检测器), Agilent Chem Station 色谱数据工作站。

实验材料于 2001 年 8 月上旬采自吉林省长白县, 经吉林农业大学中药材学院李向高教授鉴定为人参 *P. ginseng* C. A. Meyer 的新鲜果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(150

mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: H₂O(A)-CH₃CN(B), 二元梯度洗脱: 0-16 min, 56%B; 16-20 min, 56%-100%B; 20-38 min, 100%B; 38-45 min, 100%-56%B, 45-60 min, 56%B; 检测波长: 203 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 40℃。供试品和对照品溶液进样量分别为 20 μL。所有组分皆在 50 min 内分析完成, 分析时间定为 60 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取在 60℃ 减压干燥 10 h 的化合物 K 10 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度。精密吸取 0.4 mL 溶液置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取两份粉碎后的人参果肉冻干粉(40 目), 每份 2 g, 精密称定, 1 份干燥测定含水量; 1 份置索氏提取器中加氯仿-甲醇(15:1) 100 mL, 于水浴上加热回流提取至无色。将提取液滤过后置水浴上蒸发皿中挥干, 加甲醇溶解、滤过并定容于 25 mL 量瓶中, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液, 备用。

2.3 线性关系考察: 精密称取在 60℃ 减压干燥 10 h 的化合物 K 10 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 使对照品溶液的质量浓度约为 1 mg/mL。分别吸取此溶液 50、100、200、400、800、1 600、3 200 μL 分别置于 10 mL 量瓶中。加甲醇稀释至刻度, 即得不同质量浓度的对照品溶液。分别精密吸取 20 μL, 进样分析。以色谱峰面积(Y)为纵坐标, 进样质量(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: $Y = 405.3819X + 32.4856$ ($r = 0.99924$), 表明化合物 K 在 0.103~6.592 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

¹ 收稿日期: 2007-04-10

作者简介: 王继彦(1953—), 男, 长春人, 教授, 博士, 主要从事中药化学和中药新药开发研究。

Tel: (0431) 86172211 E-mail: jianwang126@126.com

* 通讯作者 杨秀伟 Tel: (010) 82805106 E-mail: xwuamg@bjmu.edu.cn

2.4 精密度试验: 精密吸取 1 mg/mL 化合物 K 对照品溶液 20 μ L, 按上述色谱条件进行分析, 重复进样 5 次, 测定化合物 K 峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 2.07%。

2.5 稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液 20 μ L, 在 0、2、4、8 h 按上述色谱条件进样, 测定化合物 K 峰面积积分值, 结果其 RSD 为 2.6%。表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.6 重现性试验: 取同一批人参果肉样品 5 份, 精密称定, 按上述方法处理制备供试品溶液。进样 20 μ L, 按上述色谱条件进行分析, 测定化合物 K 的峰面积积分值, 计算其质量分数, 结果其 RSD 为 2.91%。

2.7 回收率试验: 精密称取 6 份含化合物 K 0.26 mg/g 人参果肉干燥粉末, 每份 2.0 g, 分别精密加入 0.5 mg 化合物 K 对照品, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 结果化合物 K 的平均回收率为 99.76%, RSD 为 3.18%。

2.8 样品测定: 分别取 6 批人参的鲜果肉冻干粉 (40 目) 2 g, 精密称定, 按上述样品制备方法处理, 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液 20 μ L, 以外标法按上述色谱条件进行分析, 结果见表 1。色谱行为见图 1。

表 1 人参浆果中化合物 K 的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of compound K in *P. ginseng* berry ($n=3$)

批号	化合物 K / %	批号	化合物 K / %
1-1	0.032 6	2-2	0.026 7
1-2	0.033 8	3-1	0.027 8
2-1	0.027 4	3-2	0.027 1

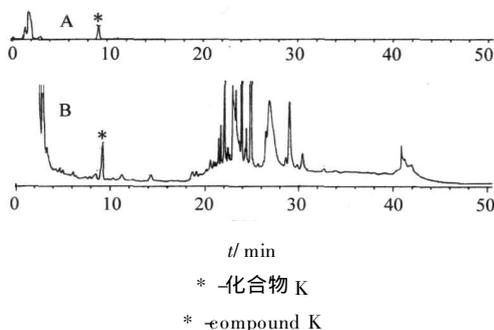


图 1 化合物 K 对照品 (A) 和人参浆果 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of compound K reference substance (A) and *P. ginseng* berry (B)

3 讨论

有关生物体液和组织中化合物 K 的分析, 已开发了酶免疫测定法^[8]。EM 1 中化合物 K 的定量测定时, 采用 10% NaOH-MeOH 溶液水解 EM 1, 水饱和正丁醇萃取, 直接注入 LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18 色谱柱, 流动相为 CH₃CN-H₂O (55:45), 检测波长为 203 nm, 体积流量为 1.0 mL/min 进行测定^[9]。

本实验建立了人参浆果中化合物 K 的 HPLC 色谱测定法, 样品处理简单, 分析方法灵敏, 化合物 K 在 0.103 ~ 6.592 μ g 与峰面积线性关系良好; 并且结果重现性好, 加样回收率高, 平均回收率为 99.76%, RSD 为 3.18%, 测定结果准确, 适用于人参浆果中化合物 K 的定量分析, 并对含有化合物 K 的其他产品的检测亦具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 王继彦, 李向高, 杨秀伟. 人参中一个新的天然化合物的分离 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1761-1764.
- [2] Wang J Y, Li X G, Zheng Y N, et al. Isoginsenoside Rh₃, a new triterpenoid saponin from the fruits of *Panax ginseng* C. A. Mey. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 6(4): 289-293.
- [3] 杨秀伟, 郝美荣, 服部征雄. 中药成分代谢分析 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003.
- [4] Lee B H, Jeong S M, Lee J H, et al. Differential effect of ginsenoside metabolites on the 5-HT_{3A} receptor-mediated ion current in *Xenopus* oocytes [J]. *Mol Cells*, 2004, 17(1): 51-56.
- [5] Lee J H, Jeong S M, Lee B H, et al. Differential effect of bovine serum albumin on ginsenoside metabolite-induced inhibition of alpha₃, beta₄ nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus* oocytes [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(10): 868-873.
- [6] Choo M K, Park E K, Han M J, et al. Antiallergic activity of ginseng and its ginsenosides [J]. *Planta Med*, 2003, 69(6): 518-522.
- [7] Kim D H, Jung J S, Moon Y S, et al. Inhibition of intracerebroventricular injection stress-induced plasma corticosterone levels by intracerebroventricularly administered compound K, a ginseng saponin metabolite, in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(7): 1035-1038.
- [8] Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb₁ by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration—measurement of compound K by enzyme immunoassay [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(3): 245-249.
- [9] Hasegawa H, Lee K S, Nagaoka T, et al. Pharmacokinetics of ginsenoside deglycosylated by intestinal bacteria and its transformation to biologically active fatty acid esters [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(3): 298-304.