

高效液相色谱法测定罗汉果 根中两个降三萜配糖体

卢凤来¹, 卢艺芳^{1,2}, 陈换莹^{1,2}, 刘金磊¹, 李典鹏^{1*}

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 广西师范大学, 广西 桂林 541004)

摘要: 建立了高效液相色谱测定罗汉果根中两个结构新颖的降三萜糖苷, 罗汉果酸苷乙II(Siraitic acid IIB)和罗汉果酸苷甲II(Siraitic acid IIA)含量的方法。色谱条件: 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流动相: 乙腈-水(梯度洗脱: 0→4 min: 35%乙腈; 4→16 min: 35%→45%乙腈); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 230 nm; 进样量: 10 μL。结果表明, 罗汉果酸苷乙II在 0.05~0.3 mg/mL, 罗汉果酸苷甲II在 0.05~0.25 mg/mL 之间线性关系良好。该方法稳定, 精密度、重现性好, 且样品处理简单, 提取与检测时间短。

关键词: 罗汉果酸苷乙II; 罗汉果酸苷甲II; HPLC; 测定

中图分类号: Q946.83 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)06-0891-04

Determination of two nor-triterpenoid glycosides in the roots of *Siraitia grosvenorii* by HPLC method

LU Feng-Lai¹, LU Yi-Fang^{1,2}, CHEN Huan-Ying^{1,2},
LIU Jin-Lei¹, LI Dian-Peng^{1*}

(1. *Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China*; 2. *Gangxi Normal University, Guilin 541004, China*)

Abstract: A HPLC method was developed for determining the contents of Siraitic acid IIB and Siraitic acid IIA, which were novel 29-norcucurbitane triterpene glycosides in the roots of *Siraitia grosvenorii*. The chromatographic analysis was carried out on a ZORBAX SB-C₁₈ column(4.6 mm×150 mm, 5 μm), and the mobile phase was acetonitrile(A)-water(gradient elution: 0→4 min, 0→35%A, 4→16 min, 35%→45%A). The flow rate was maintained at 0.5 mL/min. The detection wavelength was set at 230 nm, and the column temperature was controlled at 25 °C. The sample injection volume was 10 μL. The results indicated that Siraitic acid IIB had a linear relationship at the range of 0.05—0.3 mg/mL, and Siraitic acid IIA had a linear relationship at the range of 0.05—0.25 mg/mL. This method was accurate, stable and reproducible, while the preparation of samples was simple and detected time was short.

Key words: Siraitic acid IIB; Siraitic acid IIA; HPLC; determination

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)是我国特有的经济、药用植物(国家药典委员会, 2005)。其植株根系

发达, 块根肥大, 原料资源极为丰富。罗汉果根味苦、性微寒, 具有清热祛湿、通络止痛之功效, 是广西

收稿日期: 2010-01-12 修回日期: 2010-05-21

基金项目: 中科院“西部之光”人才培养计划专项(科发人教字[2009]24号); 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室资助(桂科能07109001-13); 广西植物研究所基本业务费(桂科植1003)[Supported by West Light Doctoral Foundation of the Chinese Academy of Sciences(2009), Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources(Guangxi Normal University), Ministry of Education of China(07109001-13); Fundamental Research Fund of Guangxi Institute of Botany(1003)]

作者简介: 卢凤来(1979-), 女(壮族), 广西来宾人, 硕士, 主要从事植物资源开发与利用研究, (E-mail)lufenglai@gxib.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: ldp@gxib.cn)

桂林永福等地的一种习用药材,民间常用于治疗咳嗽、咽炎、风湿性关节炎及抗肿瘤等。然而,由于缺乏深入系统的理论研究,罗汉果根的原料资源现阶段仍未得到有效的开发利用。在产区,罗汉果块根大量废弃,造成了自然资源极大的浪费。

国内学者王雪芬等从罗汉果根乙醇提取物的乙酸乙酯部位已分离出了一些结构特别的葫芦烷降三萜类化合物,即罗汉果酸甲、乙、丙、丁、戊(王雪芬等,1996,1998;斯建勇等,1999)。初步药理实验发现罗汉果酸乙在体外有抗肿瘤活性(斯建勇等,1999)。为了开发利用罗汉果根资源,我们对罗汉果根的水提取物进行抗肿瘤筛选,发现它在体内外对多种瘤谱均有较强的抗癌活性,体外细胞试验发现其活性成分可能是水溶性较好的植物配糖体。通过

对罗汉果根的水溶性部分化学成分研究,我们首次分离得到结构新颖的降三萜酸糖苷罗汉果酸苷乙 II (Siraitic acid II B)和罗汉果酸苷甲 II (Siraitic acid II A)(Li 等,2009)。本文建立高效液相色谱法测定罗汉果根原料中这两个化合物的含量,为罗汉果根标准提取物的开发提供可靠的含量分析方法。

1 材料与仪器、试剂

材料:罗汉果块根采自桂林市永福,挖出后洗净泥土,切成薄片,阴干,再在烘箱内低温干燥,碾碎过筛并干燥保存备用。仪器:Agilent-1100 分析型高效液相色谱仪,包括二极管阵列多波长检测器(DAD)、四元梯度泵、在线真空脱气机、7725i 手动

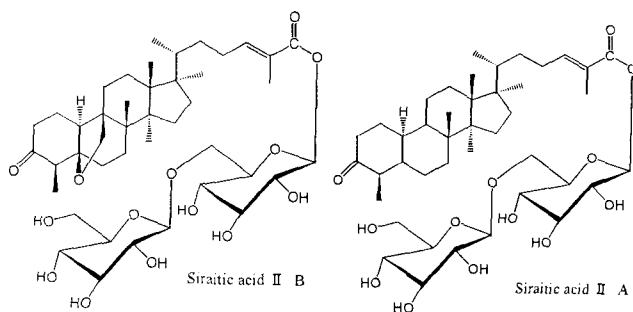


图 1 罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 的化学结构
Fig. 1 Structures of Siraitic acid II B and Siraitic acid II A

进样器、HP 化学工作站(美国 Agilent 公司)。BS110S 赛多利斯电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);B3500S-MT 超声清洗器(必能信超声有限公司)。标准品与试剂:罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 由本实验小组从罗汉果根中分离获得,化学结构如图 1,所有的化合物均有严格的光谱学鉴定数据,并经 HPLC 法测定得出质量分数分别为 99.1%、98.9%;乙腈为色谱纯(美国 TEDIA 公司);重蒸蒸馏水为自制,其他试剂均为 AR 级。

2 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);柱温:25 °C;流动相:乙腈-水(梯度洗脱:0→4 min:35%乙腈;4→16 min:35%→45%乙腈);检测时间:16 min;流速:0.5 mL/min;检测波长:230 nm;进样量:10 μL。此条件下检测得到的典型色谱图见图 2。

3 试验方法与结果

3.1 对照品溶液制备

分别精密称取罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 各 10.0 mg,各置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,超声使其充分混匀,即得标准品储备液。

3.2 供试品溶液制备

精密称定罗汉果根粉末 5.0 g,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇溶液 25 mL,摇匀,超声提取 1 h,过滤,滤渣再重复超声提取一次,合并滤液,减压回收甲醇至浸膏状。甲醇溶解浸膏并定容至 10 mL 容量瓶中,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜后即得样品测试液。

3.3 检测波长的选择

对 200~400 nm 扫描的各波长下的色谱图进行分析比较,发现 230 nm 处各峰的分离良好,且基线比较平稳,两个对照品在此波长下有最大吸收(图

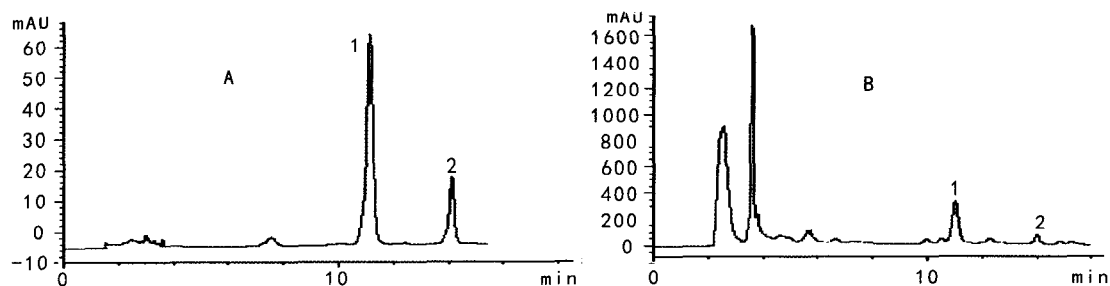


图 2 对照品(A)及样品(B)的 HPLC 图 1. 罗汉果酸苷乙 II; 2. 罗汉果酸苷甲 II。

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference standards(A) and sample(B) 1. Siraitic acid II B; 2. Siraitic acid II A.

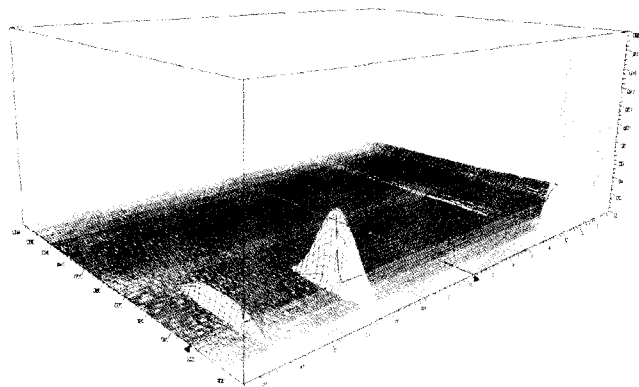


图 3 罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 在 HPLC 中的 3D 图

Fig. 3 3D chromatograms of Siraitic acid II B and Siraitic acid II A

表 1 不同提取方法对罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 的提取效果

Table 1 Extractive effect of Siraitic acid II B and Siraitic acid II A by different extraction methods

提取方法 Extraction methods	提取时间 Extraction time(h)	提取溶剂量 Volume of solvent (mL)	罗汉果酸苷乙 II 峰面积 Peak area of Siraitic acid II B	罗汉果酸苷甲 II 峰面积 Peak area of Siraitic acid II A
提取 Reflux extraction	6	200	4957	789
索氏提取 Soxhlet extraction	9	150	4983	796
超声提取 Ultra-sonic extraction	2	100	5011	801

3), 因此选择 230 nm 作为检测波长。

3.4 提取方法及提取溶剂量的考察

比较了 100 mL 甲醇加热回流 3 h, 重复两次, 150 mL 甲醇索氏提取 9 h, 100 mL 甲醇超声提取 2 h 三种提取方法的提取效果(表 1)。结果表明, 超声提取方便快捷, 消耗溶剂少, 故选之作为提取方法。按 3.2 方法, 比较甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇、乙醇四

种提取液超声提取的效果, 结果表明, 甲醇的提取效果最好。另外比较甲醇超声提取罗汉果根粉末 0.5 h、1 h、2 h 的提取效果, 结果表明, 1 h 后即可把罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 提取完全。最后分别比较 50 mL、75 mL、100 mL 甲醇溶液作为供试品制备提取溶液的提取效果, 结果表明, 75 mL 甲醇溶液已经提取完全。因此确定提取方法为 75 mL 甲醇超声提取 1 h。

3.5 标准曲线的绘制

将罗汉果酸苷乙 II 的标准品储备液稀释为 0.05、0.10、0.20、0.25、0.30 mg/mL 的浓度系列, 罗汉果酸苷甲 II 的标准品储备液稀释为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的浓度系列, 分别进样 10 μ L, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标, 标准品浓度 (mg/mL) 为横坐标做标准曲线, 计算得罗汉果酸苷乙 II 的回归方程为 $y = 17494x + 56.806$, 相关系数 $r = 0.9999$, 罗汉果酸苷甲 II 的回归方程为 $y = 8701.3x - 0.3625$, 相关系数 $r = 0.9996$, 表明以上两个标准品分别在 0.05~0.30 mg/mL 和 0.05~0.25 mg/mL 之间, 呈现良好的线性关系。

3.6 精密度实验

精密吸取罗汉果酸苷乙 II 的对照品溶液 10 μ L, 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 其峰面积分别为 3548.83、3385.84、3598.91、3481.53、3487.77、3523.11, 计算峰面积的 RSD 为 2.06% (<5%), 说明精密度良好。

3.7 稳定性实验

取罗汉果根粉末 5.0 g, 精密称定, 按上述方法制备供试溶液, 分别于 72 h 内不同时间段检测, 记录峰面积。计算得罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 的 RSD 分别为 3.7% 和 4.6% (<5%)。表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

3.8 重现性实验

精密称定罗汉果根粉末 5.0 g 共 6 份,分别按 3.2 项制备,3.1 项测定,记录峰面积。计算得罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 的 RSD 分别为 2.6% 和 2.2% (<5%),说明其重现性良好。

3.9 加样回收实验

取已知含量的罗汉果根 4 份,精密称定,分别加入罗汉果酸苷乙 II 和罗汉果酸苷甲 II 标准品适量,按上述方法制备及检测,计算回收率,结果见表 2。

表 2 罗汉果酸苷乙 II 与罗汉果酸苷甲 II 的加样回收率
Table 2 Recoveries of Siraitic acid II B and Siraitic acid II A

化合物 Compound	样品量 Sample (mg)	加样量 Added (mg)	测得量 Found (mg)	回收率 Recovery (%)	平均值 (%)	RSD (n=4,)
罗汉果酸 苷乙 II B	1.601	0.8	0.264	103.4	102.7	0.068
Siraitic acid II B	1.625	1	0.265	102.8		
罗汉果酸 苷甲 II A	1.710	1	0.273	101.7		
Siraitic acid II A	1.612	1.2	0.284	102.7		
罗汉果酸 苷乙 II B	0.950	1.5	0.241	97.5	97.85	0.889
Siraitic acid II A	0.965	1	0.195	98.2		
罗汉果酸 苷甲 II A	1.02	1.2	0.215	96.7		
Siraitic acid II A	0.957	0.8	0.175	98.7		

表 3 样品测定结果

Table 3 The results of sample determination

编号 No.	罗汉果酸苷乙 II Siraitic acid II B (%)	罗汉果酸苷甲 II Siraitic acid II A (%)
1	0.032	0.018
2	0.031	0.020
3	0.030	0.019
4	0.032	0.019
5	0.030	0.019
6	0.032	0.019
平均值	0.031	0.019
RSD	3.23	3.82

3.10 样品测定

取罗汉果根粉末 5.0 g 共 6 份,按上述方法制备及检测,记录峰面积,按外标法计算样品中罗汉果酸苷乙 II 与罗汉果酸苷甲 II 的含量,分别为 0.

031%、0.019%(表 3)。

4 结论

随着罗汉果组培苗的推广应用,原来经典的罗汉果压蔓繁殖、种薯繁殖方式已逐渐被淘汰,组培苗与传统薯苗相比具有种苗不带毒、繁殖系数高、生长旺盛、抗性强等优点。现阶段罗汉果的种植方式也由原来的几年一轮作到现在的每年种植,罗汉果组培苗根系发达,每年收获罗汉果后会留下大量的根资源未被利用。经研究证实罗汉果根尚含有大量对人体有用的功能性配糖体成分。本研究开发的高效液相色谱测定方法,精密度好、重现性好,准确度高。样品处理简单,分析快速。可作为罗汉果根中主要配糖体成分罗汉果酸苷乙 II 与罗汉果酸苷甲 II 含量的方法,为今后罗汉果根资源的开发利用提供定量的理论依据。

参考文献:

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京:化学工业出版社:147-148
- Li DP, Mona El-aasr, Ikeda T, et al. 2009. Two new cucurbitane-type glycosides obtained from roots of *Siraitia grosvenori*[J]. *Chem Pharm Bull*, 57(8):870-872
- Si JY(斯建勇), Chen D(陈迪华), Chen LG(沈连钢), et al. 1999. Studies on the chemical constituents from the root of *Siraitia grosvenorii*(广西特产植物罗汉果根的化学成分研究)[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 34(12):918-920
- Wang XF(王雪芬), Lu WJ(卢文杰), Chen JY(陈家源), et al. 1996. Studies on the chemical constituents of root of *Luohanguo* (*Siraitia grosvenori*)(罗汉果根化学成分的研究(I))[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), 27(9):515-518
- Wang XF(王雪芬), Lu WJ(卢文杰), Chen JY(陈家源), et al. 1998. Studies on the chemical constituents of root of *Luohanguo* (*Siraitia grosvenori*)(罗汉果根化学成分的研究(II))[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), 29(5):293-296