

HPLC-UV 对栝楼各部位中葫芦素 B 的含量测定

孙文¹, 巢志茂^{1*}, 王淳¹, 吴晓毅¹, 杨保成², 谭志高¹

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 北京天尊栝楼植物研究所 安阳种植开发示范基地, 河南 安阳 455000)

[摘要] 目的:对栝楼的多个部位进行葫芦素 B 的含量测定。方法:样品以 50% 甲醇超声提取,采用 HPLC-UV 测定, ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(70:30), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm, 柱温 30 °C。结果:栝楼的雄根、雌根、茎、叶、幼果、未成熟果实、成熟果实、未成熟果瓢、成熟果瓢、种子、雄花、果柄、未成熟果皮、成熟果皮等部位分别进行了葫芦素 B 的测定。栝楼各部位中葫芦素 B 的含量从 0 到 0.231 3 mg·g⁻¹, 均未检测到葫芦素 E。结论:栝楼各部位中葫芦素 B 的含量高低不等,除一株三年生雌株栝楼粗大的根中含量高达 0.231 3 mg·g⁻¹外,大部分都低于 0.09 mg·g⁻¹, 含量的高低与栝楼的部位、生长年限等因素有关。

[关键词] 栝楼; 葫芦素 B; 不同部位; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0086-0003

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230086

Determination of Cucurbitacin B in Some Parts of *Trichosanthes kirilowii* by HPLC-UV Method

SUN Wen¹, CHAO Zhi-mao^{1*}, WANG Chun¹, WU Xiao-yi¹, YANG Bao-cheng², TAN Zhi-gao¹

(1. Institute of Chinese Meteria Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Anyang Demonstration Base, Beijing Tianzun Institute of *Trichosanthes kirilowii* Botany, Anyang 455000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of cucurbitacins B in some parts of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. Method The sample solutions were prepared in 50% MeOH by the supersonic extraction. An HPLC-UV method was performed on ODS column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-water (70:30) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was at 230 nm, and column temperature at 30°C. Result Cucurbitacins B and E were determined in male root, female root, stem, leaf, young fruit, unripe fruit, ripe fruit, unripe flesh, ripe flesh, seed, male flower, carpopodium, unripe pericarp, and ripe pericarp. The contents of cucurbitacin B were 0-23.13 mg per 100 g sample of each part of *T. kirilowii*. Cucurbitacin E was not detected in any parts of *T. kirilowii*. **Conclusion:** There are different contents of cucurbitacin B in different parts of *T. kirilowii*. The content of cucurbitacin B was 23.13 mg per 100 g of a stouk root of female *T. kirilowii* growth for 3 years and lower than 9 mg per 100 g of other samples. The contents of cucurbitacin B were related to some factors such as the growth period and the part of *T. kirilowii*.

[Key words] *Trichosanthes kirilowii*; cucurbitacin B; different part; HPLC; content determination

栝楼雌雄异株,其干燥块根、成熟果实、成熟种子、成熟果皮为我国历版药典收录,分别为中药天花

粉、瓜蒌、瓜蒌子、瓜蒌皮,具有不尽相同的功能和主治^[1]。栝楼的茎叶也有一定的药用价值,为《中药

[收稿日期] 20131015(007)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(201107009)

[第一作者] 孙文,在读硕士,从事中药化学和分析研究, Tel: 18165601794, E-mail: sun.w@outlook.com

[通讯作者] *巢志茂,研究员,博士生导师,从事中药化学和分析研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: chaozhimao@icmm.ac.cn

大辞典》收录^[2]。

葫芦素是一类高度氧化的四环三萜类植物次生代谢物质,是葫芦科植物的特征性化合物,对葫芦科具有化学分类学意义^[3,4]。葫芦素 B 具有保肝、抗炎、抗肿瘤等多种生物学活性^[5-7]。葫芦素 B 因具有抑制多种肿瘤的作用,被认为是潜在的抗肿瘤药物^[8]。另外,葫芦素 B 还具有抑制甜菜夜蛾幼虫取食和成虫产卵的活性^[9],能降低美洲斑潜蝇幼虫对植物叶片的危害^[10]。

本文采用高效液相色谱紫外检测技术,对栝楼多个部位进行了葫芦素 B 的含量测定。对葫芦科同一植物的多个部位进行葫芦素 B 的含量测定,具有一定的创新性。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪(DGU-20A₅型自动脱气机,LC-20AT 型泵,SPD-M20A 型二极管阵列检测器,SIL-20A 型自动进样器,CTO-10AS 柱温箱,LC-solution 色谱工作站,日本岛津),BP211D 型电子天平(Sartorius)。

葫芦素 B(四川省维克奇生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$),甲醇(德国 Merck 公司,色谱纯),水(娃娃哈哈纯净水),其他试剂均为分析纯。

栝楼各部位的样品大多采自河南省安阳栝楼种植开发示范基地,少数采自河北省安国海市村栝楼种植基地,经中国中医科学院中药研究所巢志茂研究员鉴定为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii*。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(70:30),流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 230 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取葫芦素 B 对照品适量,加 50% 甲醇配制成质量浓度为 43.50 mg · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取栝楼各部位的样品,粉碎(过 40 目筛),取粉末约 1.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声 20 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足失重,摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取葫芦素 B 对照品溶液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL 于 5 mL 量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成 0.870, 1.740, 4.350, 8.700, 17.40, 43.50 mg · L⁻¹ 的溶液,依次进样,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积

(Y) 为纵坐标,进样量(X) 为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程 $Y = 15\ 072 X + 11\ 145$ ($r = 0.999\ 6$),葫芦素 B 进样量在 0.008 7 ~ 0.435 μg 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液(0.870 mg · L⁻¹) 10 μL,连续进样 6 次,测定葫芦素 B 峰面积,其 RSD 0.1%,表明仪器精密度良好。

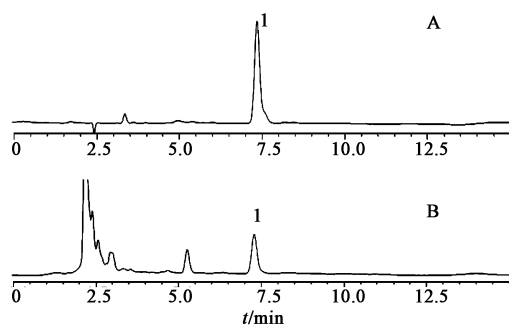
2.6 稳定性试验 精密吸取(No. 10) 供试品溶液,室温放置,分别在 0, 2, 4, 8, 12 h 进样分析,测定葫芦素 B 峰面积值,其 RSD 0.5%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一供试品(No. 10) 粉末 6 份,按上述供试品溶液的制备方法制备,分别进行测定,测得葫芦素 B 平均质量分数为 0.063 4 mg · g⁻¹, RSD 0.6%,表明本试验方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取 No. 10 样品粉末 6 份,每份约 0.7 g,精密称定,分别精密加入对照品溶液 1 mL,按供试品溶液制备方法处理并测定葫芦素 B,结果平均加样回收率为 100.91%, RSD 0.8%。

2.9 检测限及定量限 在选定的色谱条件下,将葫芦素 B 对照品溶液逐级稀释,最终确定检测限 2.61×10^{-2} ng (S/N = 3),定量限 8.30×10^{-2} ng (S/N = 10)。

2.10 样品含量测定 按 2.3 项方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定, HPLC 图谱见图 1。葫芦素 B 的含量结果见表 1。



1. 葫芦素 B

图 1 葫芦素 B(A)、栝楼根供试品(B) 的 HPLC

3 讨论

3.1 检测条件的选择 应用 DAD 全波长扫描,葫芦素 B 的紫外吸收光谱在 230 nm 处有最大吸收。

比较甲醇、乙醇、50% 乙醇以及 50% 甲醇作为提取溶剂时,测定葫芦素 B 的吸收峰,其中使用 50% 甲醇时吸收峰最大。与文献[11] 的报道结果一致。

表 1 栝楼不同部位中葫芦素 B 含量测定

No.	部位	采样地	采样时间	样品处理及说明	含量/mg·g ⁻¹
1	雄根	A	10月7日	晾干	0.028 0
2	雄根	B	10月20日	晾干	0.024 7
3	雄根	B	10月20日	晾干	0.034 7
4	雌根 ¹⁾	A	10月7日	晾干	0.231 3
5	雌根	B	10月20日	晾干	0.044 4
6	雌根	B	10月20日	晾干	0.033 8
7	茎	A	10月20日	晾干	0.018 2
8	茎叶	A	10月7日	晾干	0.049 8
9	叶	A	10月7日	晾干	0.032 0
10	茎	A	10月7日	晾干	0.063 4
11	果柄	A	10月7日	晾干	-
12	青果皮	A	7月18日	未成熟果皮,晾干	0.085 9
13	黄色果皮	A	10月7日	成熟果皮,晾干	-
14	成熟果瓢	A	10月7日	成熟果实中掏取,晾干	-
15	未成熟果瓢	A	7月18日	白色,晾干	-
16	种子	A	10月7日	晾干	0.012 1
17	成熟果实	A	10月7日	晾干	0.007 8
18	幼果	A	7月18日	鲜品	0.033 4 ^{1,2)}
19	雄花	A	7月18日	鲜品	0.017 1 ^{1,2)}

注:A. 安国栝楼种植开发示范基地;B. 安国海市村栝楼种植基地;¹⁾三年生粗大块根;^{1,2)}鲜品中的含量;- . 低于检测限。

比较了回流提取 30 min, 超声提取 10 min, 超声提取 20 min 的处理条件, 结果表明使用超声提取 20 min 时样品中葫芦素 B 含量最高, 考虑到超声提取操作较为简便, 故最终提取方法确定为超声提取 20 min。

3.2 与同科其他植物葫芦素 B 含量比较 文献曾报道, 葫芦素 B 在河北产天花粉中的质量分数为 0.002 10 mg·g⁻¹, 贵州盘县、水城产天花粉中的含量为 0.102 1 ~ 0.715 1 mg·g⁻¹^[12], 在大方油栝楼的块根及果皮中的质量分数为 4.926 ~ 6.068 及 1.293 ~ 1.519 mg·g⁻¹^[11], 在异叶马交儿及湖北栝楼的根中的质量分数为 0.426 0 及 0.89 mg·g⁻¹^[13-14], 在苦味西葫芦果实中的平均为 0.068 mg·g⁻¹^[15]。这些文献数据显示, 葫芦素 B 的含量在葫芦科不同的植物中, 或者在同一植物的不同部位中的含量均不等, 数据出入很大。与本文测得的同一植物不同部位中含量不等的结论是一致的, 这种相关性有待我们进行进一步的研究。本文中, 唯有 4 号样品中葫芦素 B 的含量显著高于其他样品, 且高于同为雌根的 5, 6 号样品, 推测这种现象与生长年限可能有关, 4 号样品为 3 年生、10 cm 直径的粗大

块根, 而 5, 6 号样品为当年或二年生, 仅 2 cm 的直径。

3.3 样品中葫芦素 E 的含量测定 本文采用同样的方法和条件, 对这些样品还进行了葫芦素 E 的含量测定, 结果均未能检出。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:104.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986:781.

[3] 凌冰, 张茂新, 王玉赞. 葫芦素的生态功能及其应用前景[J]. 生态学报, 2010, 30(3):780.

[4] 邱明华, 陈书坤, 陈剑超, 等. 葫芦科化学分类学[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(6):673.

[5] 朱靖静, 邹坤. 葫芦素类四环三萜化合物的研究进展[J]. 三峡大学学报, 2009, 31(5):82.

[6] Jayaprakasam B, Seeram N P, Nair M G. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana* [J]. Cancer Lett, 2003, 189(1):11.

[7] Liu T, Zhang M, Zhang H, et al. Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008, 265(10):1225.

[8] 张延亭, 欧阳东云, 何贤辉. 葫芦素 B 抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(1):112.

[9] 董易之, 张茂新, 凌冰. 葫芦素 B 对甜菜夜蛾幼虫取食和成虫产卵的影响[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(2):56.

[10] 张茂新, 凌冰, 曾玲, 等. 六种植物叶片中葫芦素 B 对美洲斑潜蝇寄主选择性的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(11):2564.

[11] 彭朝霞, 曹敏, 张运杰, 等. HPLC 测定天花粉中葫芦素 B 的含量[J]. 中国现代应用药学, 2009, 26(11):946.

[12] 黄璐琦, 姚三桃. 高效液相色谱法测定异叶马交儿根中葫芦素 B 的含量[J]. 中草药, 2004, 25(10):555.

[13] 黄璐琦, 姚三桃. 高效液相色谱法测定湖北栝楼根中葫芦素 B 的含量[J], 中国中药杂志, 1994, 19(8):490, 506.

[14] 冯雪松, 王大成, 蔡辉, 等. 高效液相色谱测定苦味西葫芦中葫芦素的含量[J]. 中药材, 2007, 30(4):418.

[责任编辑 顾雪竹]