

RP-HPLC 法测定水果中的蛇麻醇酯

肖维强¹, 黄桂颖², 戴宏芬¹, 陈悦娇², 黄炳雄¹, 马应丹², 王晓容^{1,*}

(1. 广东省农业科学院果树研究所, 广东 广州 510640; 2. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

摘 要: 应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立蛇麻醇酯简便的分析方法。分析条件为: 色谱柱 Nucleosil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5 μm), 流动相 A 为甲醇和水(甲醇:水=20:80), 用体积分数 50% 的磷酸调 pH 值至 3.2 ± 0.05, 流动相 B 为甲醇(含 0.01% 的磷酸), A:B=4:96, 流速 1.2mL/min, 检测波长为 210nm, 柱温 40℃。蛇麻醇酯的标准曲线为 5~250 μg/mL 7 个治疗质量浓度梯度, $y=4.6068x + 11.2640$, $R^2=0.9992$ 。精密度实验结果: 连续 5 次进样, 保留时间 RSD 为 0.2107%, 峰面积的 RSD 为 1.2843%; 同一样品, 在 0~48h 内 9 次进样, 保留时间的 RSD 为 0.3383%, 峰面积的 RSD 为 1.9737%。准确度实验结果: 回收率为 94.971%~101.964%, 回收率的 RSD 为 2.5825%。仪器的最低检出限为 1.8886 μg/mL。被测定的几种水果(青果、草莓、香蕉、巨峰葡萄、美国红提、番木瓜)中, 以青果(干粉)中含量最高, 达 359 μg/g 以上。本研究建立的分析条件, 能满足水果等样品中蛇麻醇酯定性定量分析的需要。

关键词: 反相高效液相色谱法(RP-HPLC); 蛇麻醇酯; 水果

Determination of Lupeol in Fruits by RP-HPLC

XIAO Wei-qiang¹, HUANG Gui-ying², DAI Hong-fen¹, CHEN Yue-jiao², HUANG Bing-xiong¹,

MA Ying-dan², WANG Xiao-rong^{1,*}

(1. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: A simple method was developed for determining lupeol in fruits by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Separation was carried out on reversed-phase Nucleosil C₁₈ column (5 μm, 250 mm × 4.6 mm i.d.) by using a mixture of methanol and water (20:80, pH 3.2 ± 0.05 adjusted by 50% phosphoric acid) as mobile phase A, and methanol containing 0.01% phosphoric acid as mobile phase B (A:B = 4:96) at a flow rate of 1.2 mL/min. The column temperature was hold at 40 °C, and the detection wavelength was set as 210 nm. The correlation coefficient of the linear calibration curve ($y=4.6068x + 11.2640$) was 0.9992 at the concentration range of 5 to 250 μg/mL. The relative standard deviations (RSDs) of retention time and peak area in precision experiments for 5 replicate analyses and 9 replicate analyses in 48 h were 0.2107% and 1.2843%, and 0.3383% and 1.9737%, respectively. The recovery rate range was between 94.971% and 101.964% with a RSD of 2.5825%. The detection limit of this method was 1.8886 μg/mL. The content of lupeol in dried Chinese olive powder was 359 μg/g, which was higher than that in strawberry, banana, Jufeng grape, American red grape and papaya. Therefore, the developed method is practicable for qualitative and quantitative determination of lupeol in fruits.

Key words: reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); lupeol; fruit

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)10-0183-03

蛇麻醇酯(lupeol), 别名羽扁豆醇、羽扁醇等, 属三萜系化合物, 由于在羽扁豆(*Lupinus luteus*)种子中存在而得名^[1]。据报道: 蛇麻醇酯存在于许多种水果和药用植物中, 如白色甘蓝、绿胡椒、草莓、橄榄、芒

果、葡萄等^[2]; 蛇麻醇酯对鼠皮过氧化苯甲酰诱导的皮肤癌具有有效的抑制作用^[3]; 可阻断前列腺癌细胞中生存素(survivin/cFLIP)的激活, 抑制来源于人类雄性激素的肿瘤的生长, 有可能作为其他微管剂的辅助剂, 发

收稿日期: 2010-08-30

基金项目: 广东省科技厅农业攻关项目(2006B20201045)

作者简介: 肖维强(1968—), 男, 高级农艺师, 硕士, 研究方向为果品加工及水果中保健成分的分析。E-mail: xwq6817@126.com

* 通信作者: 王晓容(1954—), 女, 研究员, 本科, 研究方向为仪器分析。E-mail: wang999983@126.com

展成为一种人类 CaP 治疗的潜在剂^[4]; 蛇麻醇酯可减少人体肝细胞瘤细胞中甘油三酯和胆固醇的合成^[5], 蛇麻醇酯和它的酯化派生物对血胆固醇过多诱导产生的氧化和发炎具有治疗作用^[6]; 蛇麻醇酯在瑞士白化变种鼠中由 DMBA 引起的 DNA 烷化损害上具有预防作用^[7]; 蛇麻醇酯在体内和体外系统中还显示出了一些生物活性, 如抗炎、治风湿、抗诱变、抗变、抗疟等, 为一个强有力的抗肿瘤剂, 已发现的大量高活性的派生物显示出更强的效力和更好的治疗指数, 证实了蛇麻醇酯的化学预防前景并揭示了潜在的化学预防靶标, 主要是细胞周期调解途径基因, 并设法解释作用后的运作机制^[8]。因此, 蛇麻醇酯是一个新发现的强有力的抗癌物质, 有关此物质的反相高效液相色谱分离及在水果和蔬菜中的定性定量测定, 国内外少报道。Mathe 等^[9]曾报道过用 HPLC 法测定了 15 种三萜系化合物, 分离时间达 70min; Martelanc 等^[10]应用 HPLC/MS 等方法测定了白色甘蓝中的蛇麻醇酯, 并建立了较简便快捷的分离方法。本实验在蛇麻醇酯的反相高效液相色谱法(reverse-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)分离^[11]基础上, 拟建立蛇麻醇酯的简便分析方法, 用于样品中蛇麻醇酯含量的快速测定。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

橄榄(又名青果, 品种: 八枝香), 取自广东省普宁市成熟期果实; 番木瓜采自广州市郊, 成熟期(三划黄)的果实, 品种为穗中红; 草莓、香蕉、芒果、葡萄等均市售水果。

蛇麻醇酯标准品(批号为 049K0996) 美国 Sigma 公司; 甲醇(色谱级) 德国 Merck 公司; 其余试剂均为国产分析纯; 实验用水为自制双蒸水。

1.2 仪器与设备

1100 型高效液相色谱仪(配 Agilent 化学工作站和 DAD 检测器, 自动进样器) 美国 Agilent 公司; 分离柱(填料为 Nucleosil C₁₈ 反相柱, 250mm × 4.6mm, 5 μm, 卡套柱) 德国 Macherey-Nagel 公司。

1.3 样品前处理

将青果、番木瓜、草莓、香蕉、芒果、葡萄等去核(或者皮), 切成小块, 于 65℃ 烘箱中烘干后打粉, 60% 以上过 60 筛目, 其余颗粒直径在 1mm 左右为宜, 65℃ 烘至质量恒定, 保存于干燥器中。

1.4 样品中蛇麻醇酯的提取

各样品中蛇麻醇酯的提取按文献^[9]和^[11]进行, 分别称取各样品干粉 2g 左右于 25mL 容量瓶中, 加入甲醇 15mL 浸泡 12~18h, 超声波提取 30min, 用甲醇定容, 充分混匀后取上清液经 0.5 μm 的微孔膜过滤后上机分

析, 均重复 3 次。

1.5 RP-HPLC 条件

蛇麻醇酯的 RP-HPLC 分析条件按参考文献^[11]的方法并加以改进。色谱柱为 Nucleosil C₁₈ 反相柱(250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相 A: 甲醇-水(甲醇:水=20:80, V/V), 用体积分数 50% 的磷酸调 pH 值至 3.2 ± 0.05, 流动相 B: 甲醇(含 0.01% 的磷酸), A:B = 4:96; 流速 1.2mL/min; 检测波长为 210nm; 柱温 40℃。

1.6 标准曲线的制作

将蛇麻醇酯标准品用流动相溶解, 配制最高含量为 250 μg/mL 标准溶液, 然后逐级稀释, 分别为 200、150、100、50、10、5 μg/mL 7 个质量浓度梯度。按 1.5 节色谱条件进行分析, 进样量为 20 μL。根据峰面积和标准品质量浓度, 经 Excel 计算, 得线性回归方程和相关系数(R²)。

1.7 精密度及稳定性实验

选择 200 μg/mL 的标准品, 连续 5 次进样, 和在 0~48h 内多次进样, 进样量均为 20 μL。对 0、1、2、4、9、12、24、36、48h 共 9 个点的分析结果, 计算标准品峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)。

1.8 准确度实验

参照戴宏芬等^[12]的方法进行回收实验。按 1.4 节方法, 称取青果干粉 1g 于 10mL 容量瓶中, 加入最终质量浓度 50 μg/mL 的蛇麻醇酯标准品, 以不加标准品的青果样品和 50 μg/mL 的蛇麻醇酯为参照, 样品的处理方法同 1.4 节。根据峰面积计算回收率和回收率的相对标准偏差(RSD)。

1.9 仪器最低检出限

根据仪器提供的软件, 计算仪器的最低检出限。

2 结果与分析

2.1 蛇麻醇酯标准品的分离

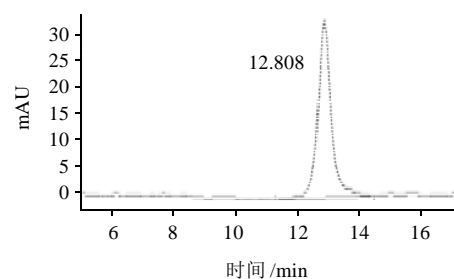


图1 蛇麻醇酯标准品 RP-HPLC 图
Fig.1 RP-HPLC of standard lupeol

按 1.5 节中的 RP-HPLC 条件, 蛇麻醇酯标准品的分离图如图 1 所示。蛇麻醇酯标准品在 RP-HPLC 条件下得到了良好的分离, 在波长 210nm 时, 能与其他杂质分开, 保留时间为 12.808min。

2.2 蛇麻醇酯标准曲线

按 1.6 节中 7 个点标准品的质量浓度梯度, 经计算, 5~250 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 蛇麻醇酯的标准曲线为 $y = 4.6068x + 11.2640$, $R^2 = 0.9992$ 。

2.3 仪器精密度及标准品稳定性结果

选择 200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液, 连续 5 次进样, 其保留时间的相对标准偏差(RSD)为 0.2107%, 峰面积的 RSD 为 1.2843%。

稳定性实验结果表明, 多次进样其保留时间的 RSD 为 0.3383%, 峰面积的 RSD 为 1.9737%。上述结果说明仪器稳定且精密度高, 标准品在 48h 内稳定。

2.4 准确度实验结果

表 1 准确度实验结果
Table 1 Results of recovery rate experiments

本底值	加标值 50 $\mu\text{g/mL}$	测定值	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
378.837	175.059	552.201	99.032	98.397	2.5825
		551.418	98.584		
		557.335	101.964		
		549.402	97.433		
		545.092	94.971		

注: 数据为峰面积。

由表 1 可见, 样品的回收率为 94.971%~101.964%, 平均回收率为 98.397%, 回收率的 RSD 值为 2.5825%, 此结果说明本实验分析方法可靠。

2.5 仪器最低检出限

本仪器对蛇麻醇酯的最低检出限为 1.8886 $\mu\text{g/mL}$ ($R_{\text{SN}} = 2$), 能满足仪器条件对样品分析的要求。

2.6 多种水果中蛇麻醇酯含量的 RP-HPLC 测定

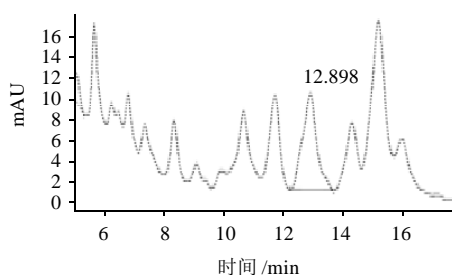


图 2 青果中蛇麻醇酯的 RP-HPLC 图
Fig.2 RP-HPLC of lupeol in Chinese olive

根据上述所设定的分析条件和样品的处理方法, 被测定的几种水果中蛇麻醇酯的含量(以干粉计算)分别为青果(八枝香)359 $\mu\text{g/g}$ 以上、草莓 298 $\mu\text{g/g}$ 、香蕉 92 $\mu\text{g/g}$ 、巨峰葡萄 8 $\mu\text{g/g}$ 、美国红提 9 $\mu\text{g/g}$ 、番木瓜(穗中红)70 $\mu\text{g/g}$ 以上, 以青果中含量最高, 其次是草莓, 芒果含量最少。青果干粉中蛇麻醇酯 RP-HPLC 分离图谱见图

2。样品中的蛇麻醇酯基本能与其他杂质分开, 并能积分做定量分析。

3 讨论与结论

蛇麻醇酯是近几年来人们发现的具有强抗癌作用的一种天然三萜系化合物, 存在多种水果、蔬菜和药用植物中^[2-3,5]。据中国香港大学一项研究成果(2007 年 10 月 17 日文汇报美洲版)报道: “一种蔬果中天然含有的物质 - 蛇麻醇酯, 抑制头颈癌的功效比化疗药强 3 倍, 与化疗药混合使用, 疗效更较单独使用化疗药高 40 倍, 以蔬果天然含有的蛇麻醇酯来制抗癌药, 不含毒性, 副作用将大大减低”。

有关蛇麻醇酯的简便分析方法国内外研究者很少, 试剂公司提供本标准品的分析方法为薄层色谱法, 这种分析方法对于定量分析的准确度和精确度均不高。有研究采用 HPLC 法分析蛇麻醇酯, 与其他三萜系化合物同时分离, 其分离时间长达 70min 以上^[9], 不经济也不快捷。本研究在 Martelanc 等^[10]对蛇麻醇酯较简便快速分析的基础上, 改用甲醇为主要流动相, 可使蛇麻醇酯标准品和样品中的蛇麻醇酯得到快速分离, 分离时间为 12.808min, 同时也较为经济。本实验分析的青果(橄榄)中含有高含量的蛇麻醇酯, 经液相/质谱(LC/MS)验证, 结果一致的^[11]。因此, 本研究建立的蛇麻醇酯 RP-HPLC 快速分离方法, 能满足样品分析的需要。

参考文献:

- [1] 谭仁祥, 孟军才, 陈道峰, 等. 植物成分分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] SALEEM M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene[J]. Cancer Letters, 2009, 285(2): 109-115.
- [3] SALEEM M, ALAM A, ARIFIN S, et al. Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin[J]. Pharmacological Research, 2001, 43(2): 127-134.
- [4] SALEEM M, MURTAZA I, WITKOWSKY O, et al. Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: disrupts survivin/cFLIP activation in prostate cancer cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 388(3): 576-582.
- [5] ITOH M, HIWATASHI K, ABE Y, et al. Lupeol reduces triglyceride and cholesterol synthesis in human hepatoma cells[J]. Phytochemistry Letters, 2009, 2(4): 176-178.
- [6] SUDHAHAR V, KUMAR S A, MYTHILI Y, et al. Remedial effect of lupeol and its ester derivative on hypercholesterolemia-induced oxidative and inflammatory stresses[J]. Nutrition Research, 2007, 27(9): 778-787.
- [7] NIGAM N, PRASAD S, SHUKLA Y. Preventive effects of lupeol on DMBA induced DNA alkylation damage in mouse skin[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(6): 2331-2335.
- [8] CHATURVEDI P K, BHUI K, SHUKLA Y, et al. Lupeol: connotations for chemoprevention[J]. Cancer Letters, 2008, 263(1): 1-13.
- [9] MATHE C, CULIOLI G, ARCHIER P, et al. High performance liquid chromatographic analysis of triterpenoids in commercial frankincense[J]. Chromatographia, 2004, 60(9/10): 493-499.
- [10] MARTELANC M, VOVK I, SIMONOVSKA B. Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1164(7): 145-152.
- [11] 肖维强, 黄桂颖, 戴宏芬, 等. RP-HPLC 法测定水果中蛇麻醇酯含量方法的初步研究[J]. 广东农业科学, 2010, 37(2): 172-174.
- [12] 戴宏芬, 赖志勇, 李建光, 等. 黄皮和杨梅果肉中绿原酸、表儿茶素及芦丁含量的 HPLC 测定[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(3): 445-449.