

HPLC法测定罗汉果多糖的相对分子质量

陈全斌,陈海燕,李俊,义祥辉*,苏小建*
(广西师范大学 资源与环境学系,广西 桂林 541004)

广西著名特产罗汉果是葫芦科罗汉果属罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 植物的成熟果实,主产于广西永福、临桂和龙胜等县,资源丰富,是我国传统出口商品之一,在港澳地区、东南亚和欧美国家久负盛名,颇受欢迎。其性凉味甘,无毒,有润肺止咳、清热解暑、凉血健胃、润肠通便的功效,在治疗咽喉炎、百日咳、急慢性气管炎、胃肠疾病方面疗效显著,被收载于 1977, 1985, 1990, 1995 年《中华人民共和国药典》,作为常用中药使用^[1,2],国家卫生部、中医药管理局将其列入第一批“既是食品又是药品的品种名单”^[3]。

目前对罗汉果的研究局限于占罗汉果重量约 2% 的甜苷^[4,5],迄今为止尚未见有关罗汉果多糖成分的报道。而许多植物的多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老等独特功效以及不良反应低的特点^[6],使之成为新药开发和研究的热点之一。多糖是大分子化合物,它的纯度标准不能用通常小分子化合物的纯度标准来衡量,因为即使是多糖纯品其微观也是不均匀的。它的纯度只代表某一多糖的相似链长的平均分布,通常所说的多糖纯品实质上是一定相对分子质量范围的均一组份。目前最常用的且较为正确的方法为 HPLC 法^[7,8]。本文对罗汉果多糖进行分离并进行了相对分子质量的测定,为进一步开发和利用罗汉果这一宝贵资源提供了应用基础,对提高罗汉果的经济价值和使用价值具有重要意义。

1 材料、试剂与仪器

罗汉果鲜果(采于桂林永福县); 95% 乙醇(食用), 苯酚(AR), 浓硫酸(AR), 氯化钠(AR), DEAE 纤维(柱色谱用,上海试剂二厂), Sephadex G-200 T-系列葡聚糖(北京经科宏达生物技术有限公司); FD-1 型冷冻干燥机(北京博医康技术公司), P200II 高压恒流泵(大连依利特分析仪器有限公司), Shim-pack DIO L-150 柱(日本岛津), RID-6A 示差折光仪(日本岛津), Echrom 98 色谱数据

处理工作站(大连依利特分析仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 罗汉果多糖样品的制备: 将罗汉果鲜果捣碎, 用蒸馏水回流提取 5 次, 每次 1.5 h。提取液浓缩后用 95% 乙醇沉淀, 并静置 24 h, 离心, 用 95% 乙醇反复洗涤沉淀至乙醇溶液颜色较浅。将沉淀溶于水, 用 Sevag 法^[7]脱蛋白反复几次直至水相部分与茚三酮反应为阴性, 将水相部分浓缩后冷冻干燥, 得脱蛋白粗多糖。取一定量的脱蛋白粗多糖溶于水(0.45 μm 微滤)上样进行第一次 DEAE 纤维素柱色谱(H₂O 0.1, 0.5 mol/L NaCl 洗脱)分级, 苯酚-硫酸法^[8]测定洗脱曲线, 将高峰部分合并、浓缩后冷冻干燥得到 PS1, PS2, PS3。PS1, PS2 分别再过一次 DEAE 纤维素柱色谱(H₂O 0.1 mol/L NaCl 洗脱), 苯酚-硫酸法测定洗脱曲线, 将高峰部分合并、浓缩后冷冻干燥得到 2 个多糖 SGPS1, SGPS2。

2.2 HPLC 法^[9,10]测定罗汉果多糖相对分子质量

2.2.1 柱的标定: 标准品: 葡聚糖(Dextran)相对分子质量为 10 500(T-10), 42 000(T-40), 70 000(T-70), 482 000(T-500), 2 000 000(T-2000), 葡萄糖(AR); 各标准品配制成 0.5% 的溶液(用超声波助溶); 流动相: 二次蒸馏水; 流速: 1.0 min; 柱压: 1.0 MPa; 柱温: 环境温度; 进样体积: 20 μL。标准品由小分子到大分子依次进样, 每个样品平等进样 3 次, 正确记录各样品相应的保留时间 t_R 和色谱图。

2.2.2 罗汉果多糖相对分子质量的测定: 将罗汉果多糖 SGPS1, SGPS2 配制成浓度为 0.5% 的溶液; 各样品的 HPLC 操作条件同 2.2.1 项, 正确记录样品相应保留时间 t_R 和色谱图。

3 结果与讨论

3.1 将各标样的相对分子质量与 HPLC 测得的保留时间综合见表 1。

以 t_R 为横坐标, 标样相对分子质量的常用对数 $\log M_w$ 为纵坐标, 作图得一直线, 经过统计直线回

* 收稿日期: 2003-02-20

基金项目: 美国西太平洋癌症基金资助项目; 广西区教育厅自然科学基金资助项目; 广西师范大学科研基金资助项目

作者简介: 陈全斌(1957-), 男, 广西桂林人, 高级工程师, 多年从事植物有效成分提取与分离工作。

* 通讯作者 Tel: (0773) 5812637 Fax: (0773) 5817286 E-mail: xhy@mailbox.gxnu.edu.cn

归处理,得回归方程: $\log M_W = -0.8813t_R + 10.3781$ ($r=0.8681$).

表 1 各标样的保留时间 ($n=3$)

Table 1 Retention time of standard samples ($n=3$)		
样品名称	样品相对分子质量	保留时间 t_R/min
葡萄糖	180	9.50
T-10	10 500	7.26
T-40	44 000	5.83
T-70	78 000	5.70
T-500	482 000	5.53
T-2000	2 000 000	5.05

样品 SGPS1, SGPS2 的 HPLC 色谱图,由 Echrom 98 色谱数据处理工作站的峰面积百分比计算,SGPS1 的面积百分比为 100%,即 SGPS1 的纯度为 100%,其保留时间 t_R 为 5.38 min; SGPS2 的面积百分比为 100%,即 SGPS2 的纯度为 100%,其保留时间 t_R 为 5.18 min

由样品的保留时间,用校正曲线计算得各多糖的相对分子质量,见表 2

表 2 HPLC 法测定罗汉果多糖的相对分子质量 ($n=3$)

Table 2 Relative polysaccharides of <i>S. grosvenorii</i> by molecular weight in HPLC ($n=3$)		
多糖名称	保留时间 t_R/min	得相对分子质量
SGPS1	5.38	430 000
SGPS2	5.18	650 000

3.2 本研究首次从罗汉果中分离得到 2 个多糖,建立了 HPLC 法测定其相对分子质量的便捷方法 测定得到多糖 SGPS1,SGPS2 的相对分子质量分别为

430 000, 650 000 有关 2 个多糖 SGPS1, SGPS2 的结构测定和生物活性的测定有待进一步研究.

References

[1] Ch P (中国药典) [S]. 1990.

[2] Guangxi Public Health Agency. *Guangxi Herb Dictionary* (II) (广西中药志) [M]. Nanning: Guangxi People's Publishing House, 1993.

[3] Fan J S. *Practical Food Additives* (实用食品添加剂) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Publishing House, 1993.

[4] Tsurtematsu T, Shigenobu A. Study on the Constituents from fruits of Momordicae Grosvenori [J]. *J Pharm (Japan)* [药学杂志(日)], 1983, 103: 1151-1173.

[5] Kasai R, Nie R L, Nashi K, et al. Sweet cucurbitane-glucosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* [J]. *Agric Biochem Chem*, 1989, 55: 3347-3349.

[6] Tian G Y, Feng Y C. Study and application of polysaccharide immunoregulators [J]. *Prog Chem* (化学进展), 1994, 6 (2): 114-124.

[7] Zhang L N, Zhang P Y, Li X. Study on components and molecular weights of polysaccharides from *Lentinus edodes* [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1998, 19(9): 1513-1517.

[8] Si S L, Zhao C G. The application of phenol-sulfuric colorimetric estimation to assay sugar [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学和生物物理进展), 1986, 5: 68-69.

[9] Zhang W J. *Biochemical Study Technics of Polysaccharide* (糖复合物生化研究技术) [M]. 2nd ed, Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999.

[10] Lin Z K. *Chromatography* (I) (色谱法) [M]. Beijing: Science Press, 1982.

延边川芎的化学成分研究

陈 赤,王大志*,柏 川,杜蕾蕾*
(四川大学华西药学院,四川 成都 610041)

延边川芎 *Cnidium officinale* Makino,又名东川芎、洋川芎,为地方药材品种,其干燥根茎入药,功效与川芎相同 延边川芎源于日本川芎,是本世纪初经朝鲜传入我国东北地区的,此后主要在吉林省延边朝鲜族自治州栽培,并在局部地区作为川芎使用^[1] 日本川芎根茎的化学成分已见于文献报道,主要为苯酞类、酚类和糖类化合物,而延边川芎的化学成分研究尚属空白 为了进一步了解引种至四川栽培的延边川芎的化学成分,为生药的品质评价奠定基础,本课题

采用不同极性溶剂提取、低压柱色谱等方法对其化学成分进行了分离和纯化,共获得 11 个单体化合物 通过熔点测定,IR,MS,¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定出 9 个成分(化合物 I ~ IX),其中化合物 I, V, VII, VIII, IX 为首次从该种植物中分离获得.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和材料: Buchi 旋转蒸发仪(瑞士); ZF-1 型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂); PERKIN-ELMER 983 型红外光谱仪;美国

* 收稿日期: 2003-05-16
* 通讯作者