

超高效液相色谱法测定清咽含片中罗汉果皂苷 V

蔡伟江*, 魏鲜娥, 陈珊珊, 林 丽

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)测定清咽含片中罗汉果皂苷 V 含量的方法。**方法** 色谱条件为色谱柱: XSELECT HSS T₃ (100 mm×2.1 mm, 2.5 μm); 流动相: 乙腈: 0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL; 检测波长: 203 nm。**结果** 结果表明, 罗汉果皂苷 V 线性范围为 0.033~0.333 mg/mL($r=1.0000$), 检出限 66.4 μg/g, 定量限 221.6 μg/g, 精密度 (relative standard deviation, RSD)为 1.5%, 平均回收率 97.6%($n=9$)。**结论** 此法操作简单、准确、快速, 可作为清咽含片中罗汉果皂苷 V 含量的检测方法。

关键词: 罗汉果皂苷 V; 超高效液相色谱法; 清咽含片

Determination of saponin V from *Siraitia grosvenorii* in Chinese pharynx tablets by ultra performance liquid chromatography

CAI Wei-Jiang*, WEI Xian-E, CHEN Shan-Shan, LIN Li

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of the content of saponin V from *Siraitia grosvenorii* in Chinese pharynx tablets by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** The chromatographic conditions were as follows: chromatographic column was XSELECT HSS T₃ (100 mm×2.1 mm, 2.5 μm), flow phase was acetonitrile: 0.1% phosphoric acid water with gradient elution, flow rate was 0.4 mL/min, column temperature was 40 °C, sample amount was 5 L, and detection wavelength was 203 nm. **Results** The results showed that the linear range of saponin V was 0.033~0.333 mg/mL ($r=1.0000$). The limit of detection was 66.4 g/g, and the limit of quantitative was 221.6 g/g, the relative standard deviation (RSD) was 1.5%, and the average recovery rate was 97.6% ($n=9$). **Conclusion** This method is simple, accurate and rapid, which can be used for determination of the content of saponin from *Siraitia grosvenorii* in Chinese pharynx tablets.

KEY WORDS: saponin V from *Siraitia grosvenorii*; ultra performance liquid chromatography; Chinese pharynx tablets

1 引言

罗汉果是广西特产中药, 性凉、味甘、无毒, 归肺、大肠经, 有润肺止咳、凉血滑肠之功效, 用于治疗肺火燥咳、咽痛失音、肠燥便秘等^[1], 其药理作用有: 止咳祛痰^[2]、

降血糖^[3,4]、免疫调节^[5]、调节胃肠收缩^[6]、抑制变链菌致龋^[7]、抗癌^[8]、保肝^[5]、抗氧化活性^[9]及活血化瘀^[10]等。近年的研究表明, 罗汉果皂苷属葫芦素烷型化合物, 迄今已从罗汉果果实中分离并鉴定了 11 种葫芦素三萜苷类化合物, 其中罗汉果皂苷 V 为罗汉果果实中主要的甜味成分,

*通讯作者: 蔡伟江, 中药师, 主要研究方向为保健食品安全检测。E-mail: 714524253@qq.com

*Corresponding author: CAI Wei-Jiang, Herbalists, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 714524253@qq.com

三萜类成分罗汉果皂苷是其主要的有效成分^[11]。其含量是评价罗汉果苷产品质量的指标之一^[12]。由于罗汉果皂苷种类较多,结构相似,其定量分析方法现普遍为比色法^[13]和液相色谱法^[14,15],比色法存在误差较大、结果不准确等缺点,液相色谱法的检测时间比较长,本文采用超高效液相色谱法检测罗汉果皂苷 V,对其色谱条件进行改进,以期对罗汉果皂苷 V 进行准确定量提供依据。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

罗汉果皂苷 V 对照品(批号:111754-200601,纯度:100%,中国检验检疫科学研究院);乙腈(色谱纯,上海安普实验科技股份有限公司);磷酸(分析纯,广州化学试剂厂)、清咽含片(汤臣倍健股份有限公司);实验用水均为一级水。

EQ-500 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);waters 超高效液相色谱仪(沃特世科技(上海)有限公司);电子天平(感量 0.1mg,梅特勒-托利多科学仪器有限公司);XSELECT HSS T3 C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.5 μm, 沃特世科技(上海)有限公司)。

2.2 色谱条件

色谱柱(C₁₈, XSELECT HSS T3, 100 mm×2.1 mm, 2.5 μm);流速:0.4 mL/min;柱温:40 °C;进样量:5 μL;检测波长:203 nm,流动相:乙腈:0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱,见表1。

表1 流动相梯度表
Table 1 Gradient table of flow phase

时间(min)	乙腈(%)	0.1%磷酸水(%)
0	18	82
1	18	82
5	27	73
7.5	27	73
7.6	18	82
10	18	82

2.3 标准品溶液的配制

精密称取罗汉果皂苷 V 对照品 20.81 mg,置于 100 mL 烧杯,用适量甲醇超声溶解,转移至 25 mL 棕色容量瓶中,并定容至刻度,摇匀,即得罗汉果皂苷 V 对照品溶液,为储备液。分别精密吸取罗汉果皂苷 V 标准贮备液稀释成 5 个罗汉果皂苷 V 标准浓度分别为 0.033、0.050、0.083、0.166、0.333 mg/mL。

2.4 供试品溶液的配制

取清咽含片试样 20 片,研磨成细粉,精密称取样品 0.29 g,置于 100 mL 烧杯,加甲醇适量,于 45 °C 超声 30 min,冷却后转移至 25 mL 棕色容量瓶中,并定容至刻度,摇匀。

2.5 标准曲线的绘制

将标准系列溶液浓度为 0.033、0.050、0.083、0.166、0.333 mg/mL 的罗汉果皂苷 V 标准液进行超高效液相色谱仪分析,记录色谱图,以标准品的浓度为横坐标,标准品的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,求得回归方程。

2.6 检出限与定量限实验

将浓度为 0.77 μg/mL 的对照溶液进样测定,分析方法的检出限和定量限由信噪比(S/N)计算。检出限定义为 S/N=3 时对应的待分析浓度,定量限定义为 S/N=10 时对应的待分析浓度。

2.7 精密度实验

精密称取样品 6 份,按 2.4 供试品制备方法处理样品,检测样品含量,计算其 RSD(%)。

2.8 回收率实验

取清咽含片研磨成的细粉,精密称取约 0.29 g 样品 9 份,分成 3 组,每组 3 份,于每一组中分别精密加入罗汉果皂苷 V 标准使用液(浓度为 0.8324 mg/mL) 1.6、2.0、2.4 mL,按照 2.4 供试品溶液配制方法进行处理,经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,即可。

3 结果与分析

3.1 标准曲线确证结果

测定罗汉果皂苷 V 的标准曲线见图 1,其标准方程为 $Y=2877896.2267X+2312.4018$ ($r=1.0000$),线性范围为 0.033~0.333 mg/mL。

3.2 检出限和定量限

将浓度为 0.77 μg/mL 的对照溶液进样,通过工作软

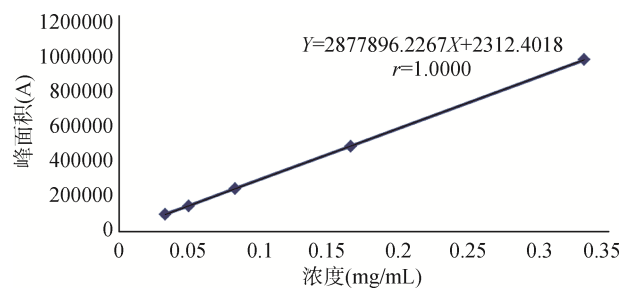


图1 罗汉果皂苷 V 标准品曲线图

Fig. 1 Standard curve of saponin V from *Siraitia grosvenorii*

件的计算得 $S/N=3$ 。按实际样品的处理过程计算, 方法的检出限为: $0.77 \mu\text{g/mL} \times 25 \text{ mL} / 0.29 \text{ g} = 66.4 \mu\text{g/g}$ 。

取信噪比=10:1 定为检测浓度, $DL=2.57 \mu\text{g/mL}$, 按照实际样品的处理过程计算, 方法的定量限为: $2.57 \mu\text{g/mL} \times 25 \text{ mL} / 0.29 \text{ g} = 221.6 \mu\text{g/g}$ 。

3.3 精密度实验结果

罗汉果皂苷 V 的精密度结果见表 2, 6 个样品的含量范围为 $0.4325 \sim 0.4471 \text{ g/100 g}$, 平均含量 0.44 g/100 g , 相对标准偏差(RSD)为 1.5%, 表明该方法有良好的精密度。

3.4 回收率实验结果

罗汉果皂苷 V 在 3 个不同添加水平下浓度的回收率结果见表 3, 3 个浓度下样品中的罗汉果皂苷 V 的提取回收率范围是 94.98%~100.83%, 平均回收率为 97.6%, 相对标准偏差(RSD)为 1.8%。

3.5 测定条件讨论

经紫外扫描, 罗汉果皂苷 V 在 203 nm 处有最大的吸收, 分析结果显示色谱图基线平稳, 且各色谱峰峰形、分离度较好, 所以选择了 203 nm 作为检测波长。由于制剂配方成分的

表 3 加标回收率实验结果
Table 3 Results of standard addition recovery experiment

序号	理论加标量(mg)	实测加标量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	1.33184	1.30079	97.668		
2	1.33184	1.30239	97.788		
3	1.33184	1.34284	100.826		
4	1.6648	1.59282	95.676		
5	1.6648	1.58125	94.981	97.58	1.8
6	1.6648	1.60273	96.271		
7	1.99776	1.95674	97.947		
8	1.99776	1.96715	98.467		
9	1.99776	1.97061	98.641		

复杂, 采用等度并不能很好的得到分离, 因此试验所用的流动相比例是经过调整得来, 罗汉果皂苷 V 测定所用流动相是在普通液相色谱条件的基础上进行梯度洗脱优化, 经多次试验达到了良好的分离效果, 且基线比较平稳, 同时配合超高效色谱柱, 检测时间短, 适合本品的含量测定, 如图 2 和图 3 所示。

4 结论

本文通过甲醇对样品进行溶解, 采用乙腈和 0.1%磷酸水作为流动相梯度洗脱, 经超高效色谱柱, 能很快分离清咽含片中的罗汉果皂苷 V, 并进行定量检测。检出限 $66.4 \mu\text{g/g}$, 定量限 $221.6 \mu\text{g/g}$, 精密度(relative standard deviation, RSD)为 1.5%, 平均回收率 97.6%($n=9$)。表明该方法适用于测定清咽含片中罗汉果皂苷 V 的含量检测。

表 2 精密度的实验结果
Table 2 Results of precision of the experiment

序号	称样量(g)	浓度(mg/mL)	含量(g/100 g)	平均含量(g/100 g)	RSD(%)
1	0.29263	0.05203	0.4445		
2	0.29711	0.0516	0.4341		
3	0.29574	0.05156	0.4358		
4	0.29017	0.05021	0.4325	0.44	1.5
5	0.28762	0.05107	0.4439		
6	0.28839	0.05158	0.4471		

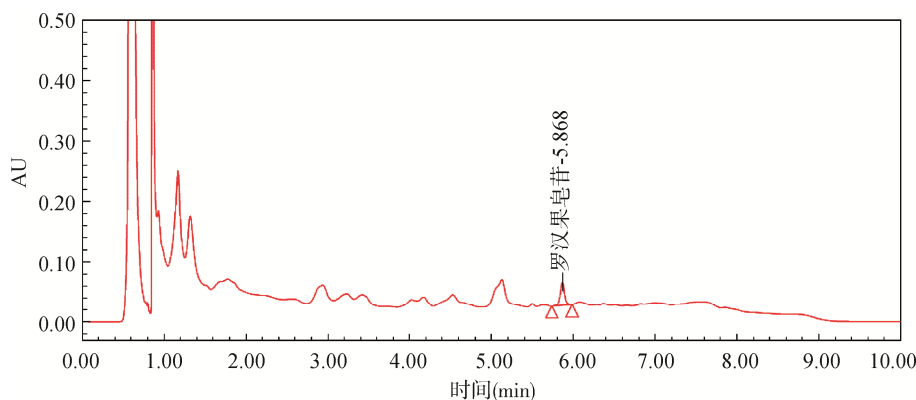


图 2 样品色谱峰图

Fig. 2 Chromatographic peaks of sample

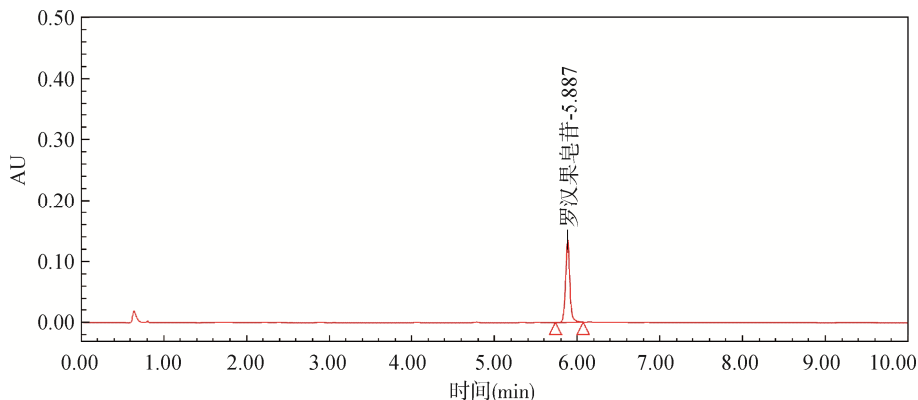


图3 罗汉果皂苷V标准品色谱峰图

Fig. 3 Chromatographic peaks of standard of saponin V from *Siraitia grosvenorii*

参考文献

- [1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
Chinese pharmacopoeia commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (part 1) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- [2] Zhou XX, Song JS. Study on the pharmacological function of fruit and extracts from *Momordica grosvenorii* [J]. Chin Achieves Tradit Chin Med, 2004, 22(9): 1723–1724.
- [3] Qi XY, Chen WJ, Song YF, et al. Efficacy study on *Siraitia Grosvenori* powder and its extracts on reducing blood glucose in diabetic rabbits [J]. Food Sci, 2003, 24(12): 124–127.
- [4] Zhang LY, Qi XY, Chen WJ, et al. Effect of mogroside extracts on blood glucose, blood lipid and antioxidation of hyperglycemic mice induced by Alloxan [J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(2): 237–240.
- [5] Wang Q, Wang K, Dai SM, et al. Regulation on the immunological effect of mogrosides in the mice [J]. J Chin Med Mater, 2001, 24(11): 811–814.
- [6] Wang Q, Li YY, Li XP, et al. Research on the pharmacological action of *Momordica grosvenorii* [J]. China J Chin Mater Med, 1999, 24(7): 425–428.
- [7] Li HB, Wang Y, Bai XF, et al. Influence of microwave irradiation on active component of Luohanguo extracts [J]. Fine Chem, 2006, 23(3): 264–268.
- [8] Takao K. Anticancer effects of sweet components from *Siraitia grosvenorii* fruits [J]. Foreign Med Sci, 2003, 25(3): 174.
- [9] Zhang LQ, Qi XY, Chen WJ, et al. Study on *in vitro* antioxidant activity of extracts from *Siraitia grosvenorii* fruits [J]. Food Sci, 2006, 27(1): 213–216.
- [10] Chen QB, Shen ZS, Wei ZB, et al. Study on the pharmacol functional of stimulate circulation to end stasis of flavones from *Momordica grosvenori* [J]. Guangxi Sci, 2005, 12(4): 316–319.
- [11] 张俐勤, 戚向阳, 陈维军. 罗汉果提取物的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 213–216.
- Zhang LQ, Qi XY, Chen WJ. Study on *in vitro* antioxidant activity of extracts from *Siraitia grosvenori* fruits [J]. Food Sci, 2006, 27(1): 213–216.
- [12] 陈维军, 张俐勤, 戚向阳. 反相高效液相色谱法测定罗汉果皂苷的含量[J]. 中药材, 2005, 28(7): 559–561.
Chen WJ, Zhang LQ, Qi XY. Determination of the content of saponins from *Siraitia grosvenori* fruits by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chin Herb Med, 2005, 28(7): 559–561.
- [13] 高山林. 罗汉果皂苷的含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 1(2): 36–40.
Gao SL. The technique on extraction and content determination of saponin from *Siraitia grosvenori* fruits [J]. Nat Prod Res Dev, 2000, 1(2): 36–40.
- [14] 屠寒, 卢金清, 江汉美, 等. HPLC法测定罗麦颗粒中罗汉果皂苷V、甘草苷和甘草酸的含量[J]. 中医药导报, 2017, 23(4): 56–62.
Tu H, Lu JQ, Jiang HM, et al. HPLC method for determining the content of saponins V, glycyrrhizin and glycyrrhizic acid in *Siraitia grosvenori* fruits [J]. Chin Med Guide, 2013, 23(4): 56–62.
- [15] 胡军影, 马双成, 程显隆. RP-HPLC法测定罗汉果中罗汉果皂苷V的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(4): 544–546.
Hu JY, Ma SC, Cheng XL. RP-HPLC method for the determination of the content of rhesus soap in *Siraitia grosvenori* fruits [J]. J Pharm Anal, 2008, 28(4): 544–546.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



蔡伟江, 中药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 714524253@qq.com