

高效液相色谱法测定保健食品中绞股蓝皂苷 XLIX 的含量

马玉凤*, 黄文, 赵芸卉, 李崇勇

(汉中市食品药品检验检测中心, 汉中 723000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法检测保健食品中绞股蓝皂苷 XLIX 含量的检测方法。**方法** 样品经甲醇提取, 采用 Ultimate XB-C₁₈ 柱(4.6 mm×100 mm, 3 μm)进行色谱分离, 以乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 检测波长为 203 nm, 柱温 40 °C。**结果** 绞股蓝皂苷 XLIX 在 0.001~1 mg/mL 范围内线性关系良好(线性方程: $Y=53.06X+86.3$, $r=0.999$); 绞股蓝皂苷 XLIX 在 0.1、0.2、1.0 g/kg 3 个添加水平上进行加标回收实验, 平均回收率为 86.1%~104.9%, 相对标准偏差为 1.6%~6.0%, 方法检出限为 5 mg/100 g 或 5 mg/100 mL, 定量限为 10 mg/100 g 或 10 mg/100 mL。**结论** 本方法前处理过程简单、分析时间短、准确度高, 适用于保健食品中绞股蓝皂苷 XLIX 的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 绞股蓝皂苷 XLIX; 保健食品

Determination of gypenoside XLIX in health food by high performance liquid chromatography

MA Yu-Feng*, HUANG Wen, ZHAO Yun-Hui, LI Chong-Yong

(Hanzhong Control and Testing Center for Food and Drug, Hanzhong 723000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of gypenoside XLIX in health food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The sample was extracted by methanol and performed on a Ultimate XB-C₁₈ column with gradient elution program of acetonitrile-water. The flow rate was 0.5 mL/min, the detection wavelength was 203 nm, and the column temperature was 40 °C. **Results** Gypenoside XLIX had good linear relationships in the range of 0.001–1 mg/mL($Y=53.06X+86.3$, $r=0.999$). Average recoveries at 3 spiked levels (0.1, 0.2, 1.0 g/kg) were 86.1%–104.9%, and the relative standard deviations (RSDs) were in the ranges of 1.6%–6.0%. The limits of detection (LOD) was 5 mg/100 g or 5 mg/100 mL, and the limits of quantitation (LOQ) was 10 mg/100 g or 10 mg/100 mL. **Conclusion** This method has the advantages of simple pretreatment, short analysis time and high accuracy, which is suitable for the detection of gypenoside XLIX in health food.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; gypenoside XLIX; health food

1 引言

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)

为葫芦科绞股蓝属, 又名七叶胆、七叶参、小苦药等^[1]。绞股蓝中含有皂苷、多糖、黄酮、有机酸、氨基酸及微量元素等多种化学成分^[2,3]。目前普遍认为皂苷、黄酮等是其

*通讯作者: 马玉凤, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品药品安全。 E-mail: 845572483@qq.com

*Corresponding author: MA Yu-Feng, Master, Engineer, Hanzhong Control and Testing Center for Food and Drug, Hanzhong 723000, China. E-mail: 845572483@qq.com

主要活性成分, 包括绞股蓝皂苷 A、绞股蓝皂苷 B、绞股蓝皂苷 XLIX^[4]。绞股蓝总苷提取物是以绞股蓝为原料经提取分离制成的总苷原料药, 其药品制剂有绞股蓝总甙片^[5]、绞股蓝总苷胶囊^[6]等, 临床主治养心健脾、益气和血、除痰化瘀、降血脂。用于高血脂症, 见有心悸气短、胸闷肢麻、眩晕头痛、健忘耳鸣^[7,8]。药理学研究表明, 绞股蓝皂苷 XLIX 具有降血脂、降血压、抗氧化、抗癌等药理活性^[9,10], 其含量在绞股蓝总苷中高达 6%~20%, 是其中含量最高的活性特征成分之一^[11], 目前其他科属植物中该组分的报道研究较少。

目前, 有文献报道用分光光度法测定绞股蓝中总皂苷的含量^[12], 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定不同产地、不同品种绞股蓝中芦丁和槲皮素的含量^[13], 高效液相色谱-蒸发光散射法(high performance liquid chromatography-evaporative light scattering method, HPLC-ELSD)测定葛兰心宁软胶囊中绞股蓝皂苷 XLIX 的含量^[14], 超快速液相色谱-三重四级杆/线性离子阱质谱法(ultrafast liquid chromatography-triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry, UFLC-QTRAP-MS/MS)同时测定绞股蓝中 11 种氨基酸^[15], 但对保健食品中 HPLC 法绞股蓝皂苷 XLIX 含量测定的文献报道较少。

本研究通过对色谱条件的研究、优化, 建立了高效液相色谱测定绞股蓝皂苷 XLIX 的方法, 以期对保健食品中绞股蓝皂苷 XLIX 的含量测定提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent2760 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Milli-Q Integral 纯水仪(美国 Millipore 公司); KQ-500DE 型超声波清洗器 MS1003S(昆山市超声仪器有限公司); MS1003S 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

绞股蓝皂苷 XLIX(纯度 $\geq 99.0\%$, 中国药品生物制品检定所); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Merck 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 水为超纯水。

绞股蓝茶、口服液、药片样品各 5 份, 购自于本地超市及药店。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

标准溶液的制备: 准确称取适量固体标准品, 加甲醇制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的储备溶液, 密封, 于 4 °C 保存。

2.2.2 样品前处理

(1) 固体样品提取

取样品适量混匀, 准确称取 0.5 g(精确至 0.001 g), 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇 9 mL, 超声处理(功率

300 W、频率 50 kHz)10 min, 冷却至室温, 用甲醇定容至 10 mL, 过滤膜(0.22 μm , 有机相), 取续滤液, 待测。

(2) 液体样品提取

取样品适量摇匀, 准确吸取 0.5 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇 9 mL, 超声处理(功率 300 W、频率 50 kHz)10 min, 冷却至室温, 用甲醇定容至 10 mL, 过滤膜(0.22 μm , 有机相), 取续滤液, 待测。

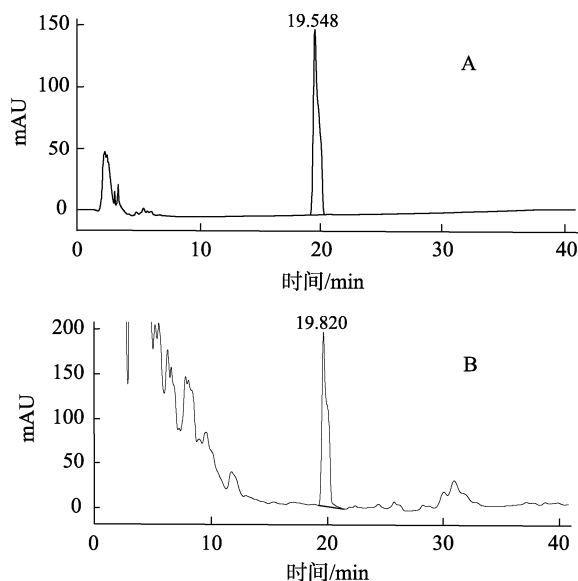
2.2.3 仪器条件

色谱条件: Ultimate XB-C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 100 mm, 3 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 203 nm; 进样量: 10 μL ; 柱温: 40 °C。液相色谱梯度洗脱程序: 0~15.0 min, 75%B~65%B; 15.0~35.0 min, 65%B~55%B; 35.0~40.0 min, 55%B~55%B; 40.0~41.0 min, 55%B~75%B。

3 结果与分析

3.1 色谱条件选择

对于极性相差较大的药物残留分析检测, 液相色谱分离常用的液相色谱柱为 C₁₈ 柱, 色谱柱规格主要有 2.1 mm $\times$ 150 mm、2.1 mm $\times$ 100 mm、3.0 mm $\times$ 150 mm、4.6 mm $\times$ 100 mm 等, 内径越小, 流动相流速降低, 灵敏度可显著提高, 故选用色谱柱为 C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 100 mm, 3 μm)。实验考察了不同溶剂系统洗脱的方式, 在将各色谱峰基本分开, 尽量节省分析时间, 经过反复实验摸索, 确立了乙腈-水梯度洗脱流动相条件。在上述色谱条件下, 绞股蓝皂苷 XLIX 与相邻色谱峰分离度大于 2.0, 理论板数大于 10000, 色谱图见图 1。



注: A. 对照品溶液; B. 供试品溶液。

图 1 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms

3.2 提取溶剂的选择

药品测定时常用的提取试剂为甲醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮、正己烷等其他的混合溶剂。通过对比实验,发现用甲醇提取很充分,乙酸乙酯、丙酮、正己烷对组织的渗透性不够,提取率低。用甲醇提取,极性大小较合适,其他受杂质提取影响较少。鉴于此,采用甲醇作为溶剂提取样品。

3.3 方法的线性范围及检出限

分别准确吸取“2.2.1”项对照品溶液,以甲醇为稀释液配制 0.001、0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1 mg/mL 7 个浓度的标准工作液,注入液相色谱仪,记录色谱图,以峰面积积分值 Y 为纵坐标,进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $Y=53.06X+86.3$, $r=0.999$ 。结果表明,绞股蓝皂苷 XLIX 的进样量在绞股蓝皂苷 XLIX 0.001~1 mg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系。在各种空白

样品中添加低浓度的绞股蓝皂苷 XLIX 标准溶液,获得信噪比为 3($S/N=3$)时对应的浓度为此方法的检出限,信噪比为 10($S/N=10$)时对应的浓度为此方法的定量限。当称样量为 0.5 g 或 0.5 mL,定容体积为 10 mL 时,绞股蓝皂苷 XLIX 的检出限为 5 mg/100 g 或 5 mg/100 mL,定量限为 10 mg/100 g 或 10 mg/100 mL。

3.4 回收率及精密度实验

向阴性样品(绞股蓝茶、口服液、药片)中添加低、中、高 3 个浓度水平的标准溶液,每个浓度样品平行测定 6 次,计算添加平均回收率和相对标准偏差,结果如表 1 所示,绞股蓝皂苷 XLIX 的平均加标回收率为 86.1%~104.9%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.6%~6.0%。该方法的准确度和精密度均符合定量分析要求,可用于日常保健食品中绞股蓝皂苷 XLIX 含量检测。

表 1 绞股蓝皂苷 XLIX 回收率($n=6$)
Table 1 Recoveries of gypenosides XLIX ($n=6$)

分析物	加入量/(g/kg)	茶		口服液		片剂	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
绞股蓝皂苷 XLIX	0.1	104.9	3.4	100.1	5.8	86.1	6.0
	0.2	99.8	4.6	97.3	5.1	89.3	4.1
	1.0	98.5	2.8	90.6	1.6	90.3	4.8

3.5 实际样品测定

采用本研究建立的方法对我市售的保健食品绞股蓝茶、口服液、药片各 5 个批次进行检测,绞股蓝茶中的绞股蓝皂苷 XLIX 的含量为 6.75 g/kg,口服液的含量为 2.02 g/mL,药片的含量为 2.58 g/kg。

4 结 论

本研究建立了 HPLC 检测方法测定保健食品中的绞股蓝皂苷 XLIX,样品经甲醇提取后直接进样分析,避免了复杂的前处理过程,此方法操作简便,提高了检验效率。本测定方法灵敏度、准确度高,适用于保健食品中的绞股蓝皂苷 XLIX 检测。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
Editorial board of Chinese flora, Chinese academy of sciences. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 2010.

[2] 金亭亭, 孙兆林, 江蔚新. 绞股蓝化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(16): 30–32.
Jin TT, Sun ZL, Jiang WX. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Gynostemma pentaphyllum* [J].

Asia-Pacific Tradit Med, 2014, 10(16): 30–32.

[3] Jang H. Flavonol glycosides from the aerial parts of *Gynostemma pentaphyllum* and their antioxidant activity [J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(9): 1–5.

[4] 于渤浩, 李男, 赵幻希, 等. 嗜糖苷酶 Fpendo5A 转化绞股蓝皂苷 XLIX 的产物鉴定及分离纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(3): 307–311.
Yu BH, Li N, Zhao HX, et al. Identification, isolation and purification of transformed product of gpenoside XLIX by thermophilic glycosidase Fpendo5A [J]. Chin J Biol, 2017, 30(3): 307–311.

[5] 邢雁伟, 滕菲, 高永红, 等. 绞股蓝总甙片联合阿托伐他汀钙片治疗对冠心病合并血脂症患者血脂以及炎症指标的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(6): 655–657.
Xing YW, Teng F, Gao YH, et al. Effects of compound *Gynostemma pentaphyllum* and Atorvastatin calcium on serum lipids and inflammation indexes of Patients with coronary heart disease complicated with hyperlipidemia [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis, 2013, 11(6): 655–657.

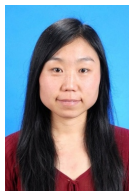
[6] 刘春祥, 覃玉梅, 张群, 等. HPLC 法测定绞股蓝总苷胶囊中绞股蓝皂苷 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1611–1613, 1616.
Liu CX, Xing YM, Zhang Q, et al. HPLC determination of gypenoside B in jiaogulan zonggan capsules [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(9): 1611–1613, 1616.

[7] 刘胜芳, 张莉芳, 袁坤, 等. 针刺联合药物治疗面神经炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(15): 1640–1642.

- Liu SF, Zhang LF, Yuan K, *et al.* Observations on the efficacy of medicine in treating facial neuritis [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2016, 25(15): 1640–1642.
- [8] 高晓艳, 林海, 孙平, 等. 甘露醇与甲钴胺治疗面神经炎的临床效果比较[J]. *当代医学*, 2016, 22(23): 120–121.
- Gao XY, Lin H, Sun P, *et al.* Clinical comparison of mannitol and mecobalamin in the treatment of peripheral facial paralysis [J]. *China Contemp Med*, 2016, 22(23): 120–121.
- [9] 吴柳松, 钱民章. 绞股蓝总苷对 PCSK9 基因表达及辛伐他汀降血脂作用的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(1): 79–85.
- Wu LS, Qian MZ. Effects of gypenosides on PCSK9 gene expression and blood lipids lowered by simvastatin [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2017, 33(1): 79–85.
- [10] Liu JJ. Vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1, is associated with diabetic kidney disease in Asians with type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Complicat*, 2015, 29(5): 707–712.
- [11] 蒋慧宣, 陈黎文, 徐茂保, 等. HPLC 法同时测定绞股蓝药材中 8 种皂苷的含量[J]. *广州中医药大学学报*, 2018, 35(2): 325–328.
- Jiang HX, Chen CW, Xu MB, *et al.* Simultaneous determination of eight saponins in *Gynostemma pentaphyllum*(thumb.) Makino by HPLC [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2018, 35(2): 325–328.
- [12] 卢金清, 肖波, 陈黎, 等. 分光光度法测定绞股蓝中总皂苷的含量[J]. *湖北中医杂志*, 2007, 29(1): 50–52.
- Lu JQ, Xiao B, Chen L, *et al.* Detection of total flavone content of *Gynostemma pentaphyllum*(thumb.) by spectrophotometry [J]. *Hubei J Tradit Chin Med*, 2007, 29(1): 50–52.
- [13] 彭亮, 李诒光, 陈杰, 等. HPLC 测定不同产地、不同品种绞股蓝中芦丁和槲皮素的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(6): 45–47.
- Peng L, Li YG, Chen J, *et al.* Content determination of rutin and quercetin in *Gynostemma pentaphyllum* from different producing areas by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2016, 22(6): 45–47.
- [14] 阎博, 吴芳, 刘海静, 等. HPLC-ELSD 法测定葛兰心宁软胶囊中绞股蓝皂苷 XLIL 的含量[J]. *安徽医药*, 2015, 19(5): 256–258.
- Yan B, Wu F, Liu HJ, *et al.* Determination of gypenoside XLIL in Gelan Xinning soft capsule by HPLC-ELSD [J]. *Anhui Med Pharm*, 2015, 19(5): 256–258.
- [15] 马赞, 蔡静, 张园娇, 等. UFLC-QTRAP-MS/MS 法同时测定绞股蓝中 11 种氨基酸[J]. *中成药*, 2018, 40(1): 133–137.
- Ma Y, Cai J, Zhang YJ, *et al.* Simultaneous determination of eleven amino acids in *Gynostemma pentaphyllum* by UFLC-QTRAP-MS/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2018, 40(1): 133–137.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



马玉凤, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品药品安全。
E-mail: 845572483@qq.com