

高效液相色谱法测定罗汉参中的西瑞香素

李刚¹, 林玉洁², 张隆龙¹, 赵阳¹, 李红霞¹, 孙姗姗^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 北京天坛药物生物技术开发公司, 北京 100050)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定罗汉参中西瑞香素含量的分析方法。**方法** 样品经过乙醇溶液提取, 超声 30 min, 水浴温度 70 °C, 旋蒸定容。采用 C₁₈ 反向色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离, 以甲醇-0.2%磷酸水溶液(56:44, V:V)为流动相等度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 °C, 检测波长 345 nm。**结果** 西瑞香素浓度在 1~20 μg/mL 内与色谱峰面积呈良好的线性关系, $Y=1.2872X+0.0921$, $r^2=0.9998$ 。方法精密度为 0.34% ($n=6$), 样品中加标回收率的范围从 99.9%~101.2%。测定结果的相对标准差为 1.73% ($n=6$), 检出限($S/N=3$)为 0.06 μg/g。**结论** 该方法灵敏度高, 可快速准确对罗汉参中的西瑞香素进行检测。

关键词: 罗汉参; 西瑞香素; 高效液相色谱法

Determination of daphnoretin content in Luohanshen by high performance liquid chromatography

LI Gang¹, LIN Yu-Jie², ZHANG Long-Long¹, ZHAO Yang¹, LI Hong-Xia¹, SUN Shan-Shan^{1*}

(1. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Beijing Tiantan Pharmaceutical Biotechnology Development Co. Ltd, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of daphnoretin in Luohanshen by high performance liquid chromatography. **Methods** The sample was extracted by ethanol solution, ultrasonic for 30 minutes, water bath temperature of 70 °C, spin evaporation and constant volume. The separation was performed on reverse C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with methanol-0.2% phosphoric acid aqueous solution (55:44, V:V) mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 35 °C and the detection wavelength was 345 nm. **Results** There was a good linear relationship between the peak area and the concentration of daphnoretin in the range of 1-20 μg/mL, $Y=1.2872X+0.0921$, $r^2=0.9998$. The precision of method was 0.34% ($n=6$). The recoveries of samples were from 99.9% to 101.2%. The relative standard deviation was 1.73% ($n=6$), and the limit of detection was 0.06 μg/g ($S/N=3$). **Conclusion** This method has high sensitivity and can be used for the rapid and accurate determination of daphnoretin in Luohanshen.

KEY WORDS: Luohanshen; daphnoretin; high performance liquid chromatography

1 引言

罗汉参是单县独家特产, 2015 年被评为国家地理标志保护产品, 有悠久的历史文化, 具有显著的药物保健功能。早在 1628 年明代的《农政全书》就有记载, 为皇宫贡

品; 《本草纲目》《中药大辞典》《中华医药大辞典》中都视为重要药材^[1]。罗汉参形似大肚罗汉, 不施农药, 喜有机肥, 是天然、无公害保健抗癌滋补美食, 熟食之清香甘甜, 风味独特。罗汉参是国家稀有名贵作物, 营养全面丰富, 其果实中含西瑞香素、总黄酮、金属元素(钾、钙、铁、锌、

*通讯作者: 孙姗姗, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品营养与食品安全。E-mail: shanshans112@163.com

*Corresponding author: SUN Shan-Shan, Ph.D, Assistant Professor, National Institute for Food and Drug Control, No2, Tiantanxili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: shanshans112@163.com

镁、硒、锰), 且蛋白质含量较高, 碳水化合物(还原糖)及脂肪含量较少, 具有很高的药用和食用价值^[2]。罗汉参丰富的抗淀粉含量, 可降低餐后血糖水平^[2,3], 以及对肠道起到良好的保健作用^[4,5]。西瑞香素为双香豆素类衍生物, 在菊科、芸香科、云实科、豆科以及瑞香科植物中均有发现, 有报道称西瑞香素有抗肿瘤的作用^[6-8], 还有较强的血浆蛋白结合率^[9]以及抗炎抑菌的作用^[10,11], 西瑞香素也可以明显降低心肌耗氧量^[12], 且具有抑制破骨细胞分化和促进成骨细胞增殖的作用^[13], 同时西瑞香素还可以有效地降低血压和血脂^[14]。但近年鲜有对罗汉参中的西瑞香素进行测定的研究。本研究建立了以高效液相色谱法测定罗汉参中西瑞香素含量的方法, 先后进行了温度和超声时间对西瑞香素提取率的影响实验, 优化了提取条件, 以期在日常罗汉参中西瑞香素的测定提供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

U3000 高效液相色谱仪[赛默飞(中国)科技有限公司]; GL2201i-1SCN 电子天平[赛多利斯(北京)科技有限公司]; HC-2518 离心机[安徽中科中佳科学仪器有限公司]; KQ-300DE 超声仪(昆山市超声仪器有限公司); R210 旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司); Pulverisette 14 高速粉碎机(德国 WMF 完美服公司)。

西瑞香素对照品(纯度 $\geq 90\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 磷酸、95%乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司)。

罗汉参样品: 取罗汉参若干, 洗净后放入高速粉碎机中打碎, 取出备用。该样品产自山东省菏泽市单县, 由山

东单养千秋品牌运营管理有限公司提供。

2.2 实验方法

2.2.1 西瑞香素标准储备液的配制

精密称取西瑞香素对照品 10 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶液定容至标线。摇匀, 配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的西瑞香素标准储备溶液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.2.2 西瑞香素标准工作液的配制

分别取西瑞香素标准储备液 0.10、0.25、0.50、1.0、2.0 mL 于 10 mL 容量瓶中用甲醇定容至标线, 得到浓度为 1.0、2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 系列标准工作液, 过 0.45 μm 滤膜上机测定。

2.2.3 试样的制备

超声水浴: 精密称取罗汉参粉碎状样品 2.000 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 95%乙醇溶液 16 mL 于超声水浴 70 $^{\circ}\text{C}$ 中超声 30 min, 取出离心 3 min, 5000 r/min。将上清液转移至旋蒸瓶中。重复提取 1 次, 合并提取液, 减压浓缩, 旋蒸至近干, 用甲醇溶液残渣, 转移定容至 5 mL。取滤液经 0.45 μm 滤膜过滤, 上机测定。

加热回流^[11]。

2.2.4 色谱条件

色谱柱: C_{18} 反向色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2%磷酸水溶液(56:44, V:V); 流速: 1.0 mL/min; 等度洗脱; 进样体积: 20 μL ; 检测波长: 345 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.5 色谱图

通过 2.2.4 的洗脱条件进行高效液相色谱法测定, 对照空白组中西瑞香素的保留时间为 5.590 min, 而实验样品的色谱图在 5.593min 有相应显现波长, 且样品中西瑞香素色谱图附近无其他杂质峰的干扰, 可判断罗汉参中含有西瑞香素。西瑞香素对照品与罗汉参样品色谱图分别见图 1、图 2。

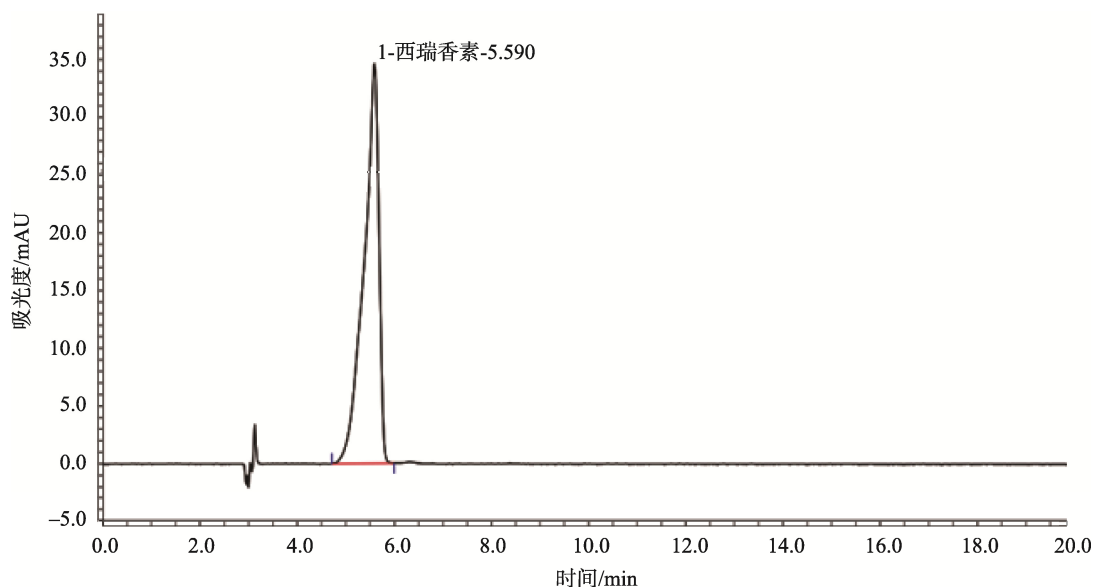


图 1 西瑞香素对照品色谱图

Fig.1 Chromatogram of daphnoretin in reference

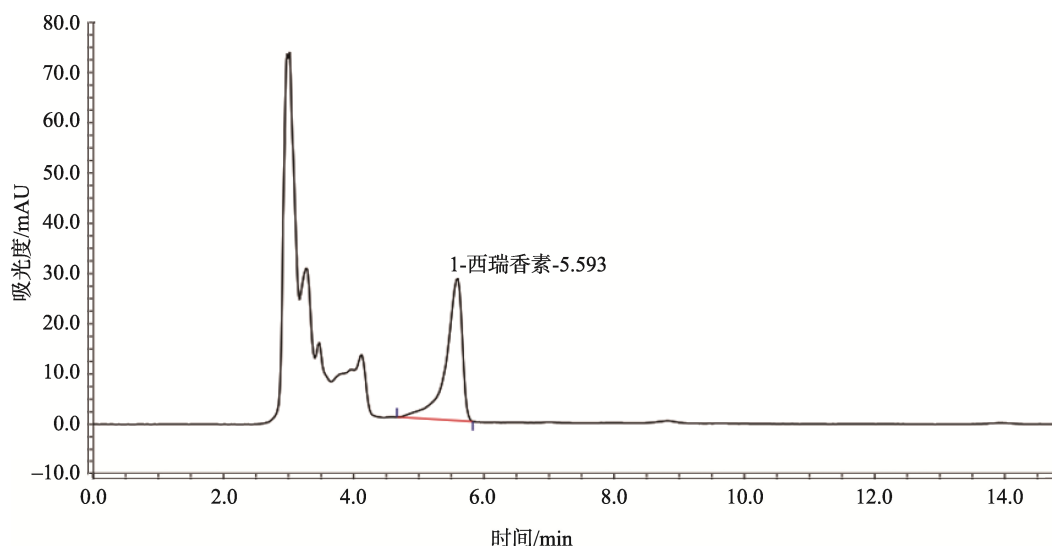


图 2 罗汉参中西瑞香素色谱图

Fig.2 Chromatogram of daphnoretin in Luohanshen sample

2.2.6 提取效率

提取效率的计算,是用设置条件得到的西瑞香素含量与最佳条件下得到的西瑞香素含量做比所得到的数据。

3 结果与分析

3.1 提取条件优化

采用传统的加热回流法处理样品的最佳提取率为 98.1%。

采用超声水浴法提取罗汉参中西瑞香素,先考察温度对西瑞香素提取率的影响,在相同的超声时间下(30 min),分别在 40、50、60、70、80 °C 进行超声提取。结果见图 3 水浴温度对提取率的影响。当温度在 70 °C 时,西瑞香素的提取率达到 99.1%,确定 70 °C 为提取罗汉参中西瑞香素最佳的超声水浴提取温度,与加热回流法比较,还提高了 1.0% 的提取效率。

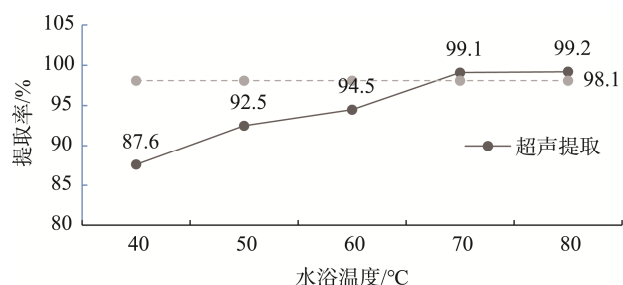


图 3 水浴温度对西瑞香素提取率的影响(n=3)

Fig.3 Effect of water bath temperature on the extraction rate of daphnoretin (n=3)

再考察超声时间对西瑞香素提取率的影响,在相同的温度下(70 °C),选择不同超声时间,分别为 15、20、30、35、45 min,结果见图 4,超声时间对西瑞香素提取率的影响。当超声时间达到 30 min 时,西瑞香素的提取率达到 98.4%,确定超声时间为 30 min 为西瑞香素最佳的提取时间,与加热回流法比较,还缩短了 60% 的提取操作时间。

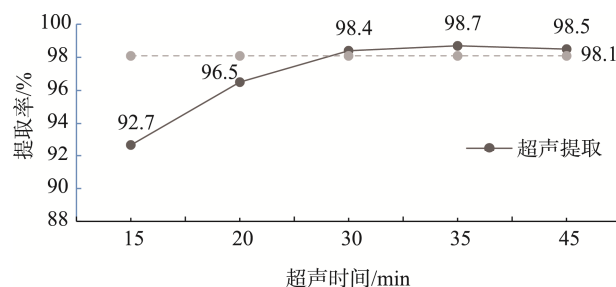


图 4 超声时间对西瑞香素提取率的影响(n=3)

Fig.4 Effect of water ultrasonic time on the extraction rate of daphnoretin (n=3)

3.2 线性关系

将 2.2.2 中配制的标准工作液上机测定,以西瑞香素浓度(X, $\mu\text{g/mL}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得到回归方程为 $Y=1.2872X+0.0921$, $r^2=0.9998$ 。结果表明西瑞香素在 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 内与色谱峰面积呈良好的线性关系。

3.3 精密度

取浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液, 在 2.2.4 的色谱条件下重复进样 6 针, 色谱峰面积测定结果及相对标准偏差计算结果见表 1。测定结果相对标准偏差(RSD)为 0.34%, 说明该方法精密度良好。

3.4 加标回收率

称取已经测定含量的罗汉参样品约 2.000 g, 共 6 份。按照 2.2.3 超声水浴提取西瑞香素的方法制备所需测定的溶液, 在 2.2.4 的色谱条件下进行测定, 加标回收率的实验结果参照表 2。样品中加标回收率的范围是 99.9% ~ 101.2%,

相对标准偏差为 1.04%以内。说明该方法的准确度高且稳定性好。

3.5 重复性

精确称取罗汉参粉末 2 g 精确至 0.001 g, 进行 6 组重复性实验, 按照 2.2.3 超声水浴的方法提取样品中的西瑞香素, 制备所需测定的样品溶液, 然后在 2.2.4 的洗脱条件下进行测定。

测定的结果见表 3。由表 3 可知, 本样品中的西瑞香素平均含量为 15.5 $\mu\text{g/g}$, RSD 为 1.73%, 说明用本方法测定西瑞香素所呈现的结果稳定灵敏。

表 1 精密度测试结果($n=6$)
Table 1 Results of relative standard deviation ($n=6$)

样品名称	峰面积/(mAU*min)	平均值	RSD/%
西瑞香素	23.747、23.769、23.851、23.889、23.994、23.848	23.849	0.34

表 2 加标回收率实验结果($n=6$)
Table 2 Results of standard addition recovery rate ($n=6$)

样品编号	本底值/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg			平均回收率/%	RSD/%
			第 1 次	第 2 次	第 3 次		
1	30	32.0	62.66	61.98	62.17	100.4	0.56
2		31.1	61.53	60.99	61.21	100.2	0.44
3		30.6	60.61	60.63	60.73	100.0	0.11
4		30.0	59.97	60.39	60.11	100.0	0.36
5		31.1	61.18	61.05	61.01	99.9	0.15
6		31.1	61.25	61.69	62.52	101.2	1.04

表 3 重复性实验结果($n=6$)
Table 3 Results of repeatability ($n=6$)

样品编号	取样量/g	测定浓度/($\mu\text{g/mL}$)	西瑞香素含量/($\mu\text{g/g}$)	平均含量/($\mu\text{g/g}$)	RSD/%
1	2.0031	6.1371	15.32	15.5	1.73
2	2.0363	6.4014	15.72		
3	2.0111	6.2290	15.49		
4	2.0132	6.1551	15.29		

续表 3

样品编号	取样量/g	测定浓度/(μg/mL)	西瑞香素含量/(μg/g)	平均含量/(μg/g)	RSD/%
5	2.0311	6.4971	15.99		
6	2.0001	6.1812	15.45		

3.6 检出限

向空白样品中加入西瑞香素对照品溶液, 加入的西瑞香素含量为 0.5 μg, 按照 2.2.3 超声水浴的方法制备, 在 2.2.4 的色谱条件下进行测定。计算当(S/N=3)时西瑞香素的检出限, 当取样量为 2.000 g, 复溶体积为 5 mL 时, 重复 3 组实验可得平均检出限为: 0.06 μg/g, 证实该方法灵敏度高, 可用于测量样品中微量西瑞香素的含量。

3.7 色谱条件的确定

本研究中涉及的色谱条件参考吕武清等^[15], 从罗汉参中提取西瑞香素的色谱条件, 把该条件应用到检测罗汉参中, 基线平稳, 各指标峰、峰形良好, 可用于测定罗汉参中西瑞香素的仪器条件。

4 结 论

比较传统的加热回流提取方法^[11], 在温度为 70 ℃、超声时间达到 30 min 时, 采用超声水浴的操作方式提取西瑞香素, 更为简单快捷, 结合本研究中建立的高效液相色谱法测定罗汉参中的西瑞香素, 其精密度、准确度、重复性及灵敏度均能满足实验要求, 也可用于日常罗汉参中西瑞香素的含量测定, 其针对性强、灵敏度高、简单快捷。

参考文献

[1] 杨峰. “单县罗汉参”变“金”记[J]. 中华商标, 2015, (6): 91–92.
Yang F. Shanxian Luohanshen changed into Jin record [J]. China Trad, 2015, (6): 91–92.

[2] 韩文婷, 徐贵发, 刘彬. 罗汉参血糖生成指数的测定分析[J]. 山东大学学报(医学版), 2009, 47(3): 98–100.
Han WT, Xu GF, Liu B. Determination and analysis of glycemic index of Luohanshen [J]. J Shandong Univ (Med Ed), 2009, 47(3): 98–100.

[3] 韩文婷, 徐贵发, 刘彬. 罗汉参对糖尿病小鼠降糖作用的研究[J]. 卫生研究, 2009, 38(4): 475–477.
Han WT, Xu GF, Liu B. Luohanshen hypoglycemic effect on diabetic mice [J]. J Hyg Res, 2009, 38(4): 475–477.

[4] 刘彬. 罗汉参的抗性淀粉含量测定及对肠道保健作用的研究[D]. 济南: 山东大学, 2009.

Liu B. Determination of resistant starch content of Luohanshen and its effect on intestinal health [D]. Jinan: Shandong University, 2009.

[5] 刘彬, 徐贵发, 韩文婷, 等. 罗汉参对小鼠通便作用的研究[J]. 山东大学学报(医学版), 2009, 47(2): 95–98.
Liu B, Xu GF, Han WT, et al. Study on the effect of Luohanshen on defecation in mice [J]. J Shandong Univ (Med Ed), 2009, 47(2): 95–98.

[6] Fang Y, Dong XL, Dong LP, et al. Doxorubicin-loaded biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect: Preparation, in vitro evaluation, and cellular uptake [J]. Colloids Surfaces B: Bioint, 2016, 140: 324–331.

[7] 李怡静, 敖惠, 李好文, 等. 西瑞香素纳米混悬剂的制备及其体外抗肿瘤作用研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(2): 231–237.
Li YJ, Ao H, Li HW, et al. Study on the preparation and in vitro antitumor effect of daphnetin suspension [J]. Drugs Clin, 2018, 33(2): 231–237.

[8] 谢敏. 瑞香素对卵巢癌细胞增殖、凋亡的作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
Xie M. Effect and mechanism of daphnetin on proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells [D]. Changchun: Jilin University, 2019.

[9] 佟立今, 郑玲, 张石, 等. 西瑞香素与大鼠血浆蛋白结合率的测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(2): 109–113.
Tong LJ, Zheng L, Zhang S, et al. Determination of the binding rate of daphnetin to rat plasma protein [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2013, 30(2): 109–113.

[10] 张立, 喻文进, 刘慧琼, 等. 西瑞香素抗炎抑菌作用的初步实验研究[J]. 中医药导报, 2012, 18(6): 72–73.
Zhang L, Yu WJ, Liu HQ, et al. Preliminary experimental study on the anti-inflammatory and bacteriostatic effects of daphnetin [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2012, 18(6): 72–73.

[11] 冉延涛. 西瑞香素抗炎及转运机制的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
Ran YT. Study on the anti-inflammatory and transport mechanism of daphnetin [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2019.

[12] 张国民, 齐赤虹, 柏萍, 等. 西瑞香素的心脏效应[J]. 中国中药杂志, 1993, (12): 751–752.
Zhang GM, Qi CH, Bai P, et al. The heart effect of daphnetin [J]. China J Chin Mater Med, 1993, (12): 751–752.

[13] 黄俊飞, 俸婷婷, 陆毅, 等. 西瑞香素体外抑制破骨细胞分化和促进成骨细胞增殖的活性研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 69–72.
Huang JF, Feng TT, Lu Y, et al. Study on the activity of daphnetinin

inhibiting osteoclast differentiation and promoting osteoblast proliferation
in vitro [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2016, 32(1): 69–72.

- [14] 陈伟, 张照英, 田险峰, 等. 美洲土圉儿研究现状对罗汉参研究的启示
[J]. *亚太传统医药*, 2016, 12(17): 36–38.

Chen W, Zhang ZY, Tian XF, *et al*. The Enlightenment of the current
situation of the study of American indigo on the study of Luohanshen [J].
Asia-Pacif Tradit Med, 2016, 12(17): 36–38.

- [15] 吕武清, 余良忠, 李六平, 等. HPLC 测定了哥王片中西瑞香素含量[J].
中成药, 2005, (7): 858–859.

Lv WQ, Yu LZ, Li LP, *et al*. HPLC determination of daphnetinin gewang
tablets [J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2005, (7): 858–859.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李 刚, 主要研究方向为食品质量与
安全。

E-mail: 13701314258@163.com



孙姗姗, 博士, 助理研究员, 主要研究
方向为食品营养与食品安全。

E-mail: shanshans112@163.com