

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.019

# 快速溶剂萃取-超高效液相色谱法测定罗汉果中 罗汉果皂苷 V 含量

黄林杰

(广西壮族自治区梧州市食品药品检验所, 广西 梧州 543002)

**摘要:**目的 建立测定罗汉果中罗汉果皂苷 V 含量的超高效液相色谱法。方法 快速溶剂萃取条件, 萃取剂为甲醇, 萃取温度为 100 ℃, 静态萃取 5 min; 色谱条件, 色谱柱为 Thermo Synchronis C<sub>18</sub> 柱(100 mm × 3.0 mm, 3 μm), 流动相为乙腈-水(23:77, V/V), 流速为 0.5 mL/min, 检测波长为 203 nm, 柱温为 40 ℃, 进样量为 2 μL。结果 罗汉果皂苷 V 质量浓度在 4.402~440.2 μg/mL,  $r=0.999\ 98$  ( $n=6$ ) 范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ( $n=6$ ); 平均回收率为 95.40%, RSD 为 3.91% ( $n=9$ )。结论 该方法简便、快捷、准确、重复性好, 可用于测定罗汉果中罗汉果皂苷 V 的含量。

**关键词:**快速溶剂萃取法; 超高效液相色谱法; 罗汉果; 罗汉果皂苷 V; 含量测定

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)18-0076-03

## Content Determination of Mogroside V in Siraitiae Fructus by Accelerated Solvent Extraction-UPLC

HUANG Linjie

(Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Wuzhou, Guangxi, China 543002)

**Abstract: Objective** To establish an ultra high-performance liquid chromatography(UPLC) method for the content determination of mogroside V in Siraitiae Fructus. **Methods** The conditions of accelerated solvent extraction(ASE) were as follows: the extractant was methanol, the extraction temperature was 100 ℃ with static extraction for 5 min. The chromatographic conditions were as follows: the chromatographic column was Thermo Synchronis C<sub>18</sub> column(100 mm × 3.0 mm, 3 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(23:77, V/V), the flow rate was 0.5 mL/min, the detection wavelength was 203 nm, the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 2 μL. **Results** The linear ranges of mogroside V was 4.402-440.2 μg/mL ( $r=0.999\ 98$ ,  $n=6$ ). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% ( $n=6$ ). The average recovery of mogroside V was 95.40% with RSD of 3.91% ( $n=9$ ). **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reproducible, which can be used for the content determination of mogroside V in Siraitiae Fructus.

**Key words:** accelerated solvent extraction; UPLC; Siraitiae Fructus; mogroside V; content determination

罗汉果为葫芦科多年生藤本植物罗汉果 *Siraitia grosvenorii*(Swingle) C. Jeffrey et al. M. Lu et Z. Y. Zhang 的干燥果实, 味甘、酸, 性凉, 可用于治疗肺热燥咳、咽痛失音、肠燥便秘等症<sup>[1]</sup>, 主产于桂林市临桂区和永福县的山区, 为广西名贵特产中药, 药食两用。罗汉果营养价值丰富, 多用于泡茶饮用, 也可作为煲汤时的配料, 罗汉果皂苷 V 是其主要甜味成分, 甜度超过蔗糖的 300 倍, 但糖尿病患者也可食用<sup>[2]</sup>, 其含量是评价药材质量的重要指标<sup>[3]</sup>。2020 年版《中国药典(一部)》中采用罗汉果皂苷 V 作为指标性成分对罗汉果进行鉴别和质量控制, 但所用提取方法为回流提取, 操作较繁杂, 耗时较长, 溶剂用量较大。快速溶剂萃取法是指在密闭容器内, 于高温、高压条件下, 在短时间内用有机溶剂提取固体或半固体样品的前处理方法<sup>[4]</sup>。与超声、回流、超临界萃取等

方法相比, 其具有萃取溶剂用量少、提取时间短、萃取效率高、操作简便、自动化程度高等优点<sup>[5]</sup>。本研究中采用快速溶剂萃取法提取罗汉果药材有效成分, 并采用超高效液相色谱法对其含量进行测定。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

XA205DU 型电子分析天平(德国 Mettler Toledo 公司); ASE350 型快速溶剂萃取仪、U3000 型超快速液相色谱仪, 均购自美国 Thermo 公司; Milli-Q Integral 型水纯化系统(德国 Merck 公司)。

#### 1.2 试剂

罗汉果皂苷 V 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 111754-201502, 含量 > 98%); 罗汉果药材(批号分别为 1910180, 1908166, 190723, 产地均为广西),

第一作者: 黄林杰, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为食品、药品检验, (电话)0774-3823896(电子信箱)destory1981@163.com。

购于广西壮族自治区梧州市和玉林市药材市场,经笔者鉴定为正品;乙腈为色谱纯,甲醇、乙醇为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

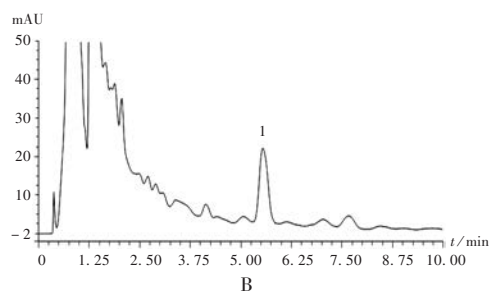
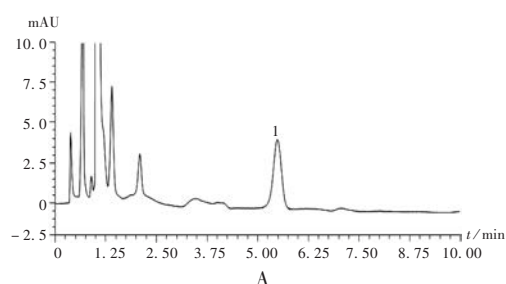
色谱柱:Thermo Synchronis C<sub>18</sub> 柱(100 mm × 3.0 mm, 3 μm);流动相:乙腈-水(23:77, V/V);流速:0.5 mL/min;检测波长:203 nm;柱温:40 °C;进样量:2 μL。

### 2.2 溶液制备

取罗汉果皂苷 V 对照品 22.01 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为 0.880 4 mg/mL 的对照品溶液。取药材样品粉末(过 3 号筛)约 0.5 g,精密称定,与适量硅藻土混合均匀得样品 1,待用;在预先放好过滤膜的 10 mL 萃取池中先加入 3 g 硅胶,后加入混合均匀的样品 1,再加入适量硅藻土,轻轻振摇使之与池口在同一水平线上,拧紧萃取池上盖;快速溶剂萃取条件,温度 100 °C,压力 1 500 psi,甲醇静态萃取 5 min,循环 1 次;萃取结束后,将萃取液移至 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容,滤过,取上清液,即得供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

系统适用性试验:取 2.2 项下 2 种溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果。理论板数按罗汉果皂苷 V 峰计应不低于 3 000;分离度均大于 1.5,基线分离良好。详见图 1。



1. 罗汉果皂苷 V

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 超高效液相色谱图

1. mogroside V

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 UPLC chromatograms

线性关系考察:分别精密量取 2.2 项下对照品溶液适量,加液动相分别制成质量浓度为 4.402, 44.02, 88.04, 220.1, 352.16, 440.2 μg/mL 的系列对照品溶液。量取 2 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以罗汉果皂苷 V 质量浓度( $X$ , μg/mL)为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程  $Y = 1\,679.460\,8X - 2.348\,1$ ,  $r = 0.999\,98$  ( $n = 6$ )。结果表明,罗汉果皂苷 V 质量浓度在 4.402 ~ 440.2 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2 项下对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果的  $RSD$  为 1.51% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0, 1, 3, 6, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的  $RSD$  为 1.62% ( $n = 6$ ),表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为 1910180)适量,精密称定,各 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果罗汉果皂苷 V 平均含量为 1.01%,  $RSD$  分别为 1.50% ( $n = 6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 1910180)适量,共 9 份,分别加入低、中、高质量浓度的罗汉果皂苷 V 对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 1。

### 2.4 样品含量测定

取 3 批药材样品各适量,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,平行测定 3 次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表 2。

## 3 讨论

### 3.1 测定方法选择

参考文献[6-12],流动相均为乙腈-水,乙腈的比例在 20% ~ 23% 之间,色谱柱均为 250 mm 的长柱,分析时间较长,洗脱能力差,保留时间基本为 20 min,最短 13 min。本研究中选择流动相为乙腈-水(23:77, V/V),使用 100 mm 的短柱,采用超高效液相色谱仪<sup>[13]</sup>进行检测,由于超高效液相色谱法具有分析速度快、分离度好的特点,主成分不到 6 min 即出峰。

### 3.2 提取方法比较

回流提取法与快速溶剂萃取法所得成分含量相当,但前者操作烦琐,总时长要 4 ~ 5 h;后者过程操作简单,自动化程度高,提取效率好,整个提取过程短于 15 min,降低了运行成本,提高了工作效率。

表1 加样回收试验结果( $n=9$ )  
Tab. 1 Results of the recovery test( $n=9$ )

| 取样量(g)  | 样品含量( $\mu\text{g}$ ) | 加入量( $\mu\text{g}$ ) | 测得量( $\mu\text{g}$ ) | 回收率(%) | $\bar{X}$ (%) | RSD(%) |
|---------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------|---------------|--------|
| 0.500 5 | 5 055                 | 880                  | 5 868                | 92.39  | 95.40         | 3.91   |
| 0.502 0 | 5 070                 | 880                  | 5 880                | 92.05  |               |        |
| 0.501 6 | 5 066                 | 880                  | 5 846                | 88.63  |               |        |
| 0.501 0 | 5 060                 | 2 641                | 7 624                | 97.08  |               |        |
| 0.501 1 | 5 061                 | 2 641                | 7 590                | 95.76  |               |        |
| 0.502 4 | 5 074                 | 2 641                | 7 593                | 95.38  |               |        |
| 0.501 5 | 5 065                 | 4 402                | 9 430                | 99.16  |               |        |
| 0.502 2 | 5 072                 | 4 402                | 9 409                | 98.52  |               |        |
| 0.503 0 | 5 080                 | 4 402                | 9 467                | 99.66  |               |        |

表2 样品含量测定结果(%,  $n=2$ )  
Tab. 2 Content determination of mogroside V in the samples  
(%,  $n=2$ )

| 批号      | 快速溶剂萃取法 | 回流提取法 | RSD  |
|---------|---------|-------|------|
| 1910180 | 1.01    | 0.99  | 1.02 |
| 1908166 | 0.97    | 0.94  | 1.61 |
| 190723  | 0.68    | 0.67  | 0.74 |

### 3.3 提取因素考察

提取溶剂及萃取池:预试验中分别将药材样品粉末用甲醇、乙醇、乙腈作为提取溶剂进行提取,并比较结果。结果显示,在相同条件下,提取效率甲醇>乙醇>乙腈,故以甲醇作为提取溶剂。其他条件不变,选择10 mL和5 mL萃取池同步考察,结果后者提取效果低于前者,考虑原因为溶剂冲洗体积有限,提取不充分。

提取时间:预试验中,将药材样品粉末于100℃下分别用甲醇提取3,5,8 min,提取1次。结果显示,在5 min时提取效果最好,随着提取时间的延长,提取效果无明显增加,其原因可能是罗汉果皂苷V在5 min时已提取完全,故选择提取时间为5 min。

提取温度:甲醇的沸点约为64℃,结合快速溶液萃取剂的高压穿透性,选择80,100,120℃对提取方法进行考察。结果显示,温度对提取效率的影响较大,在考虑提取效率的同时,还应考虑高温对成分降解的影响及所使用溶剂的熔沸点。100℃和120℃效果最好,且2种条件下含量几乎相等,故采用100℃作为萃取温度。

提取次数:将药材样品粉末在100℃下用甲醇提取5 min,分别提取1,2,3次。结果显示,萃取1次即可达到较好的萃取率,故选择萃取1次。

净化剂:罗汉果中富含多糖类成分<sup>[14]</sup>,考虑到糖类成分杂质较多<sup>[15]</sup>,分别使用了N-丙基乙二胺(PSA)、氧化铝(中性、酸性、碱性)、硅胶作为净化剂对样品进行净化。结果3种氧化铝均会降低罗汉果皂苷V的含量。PSA和硅胶均对罗汉果皂苷V的含量无影响,净化效

果较好,结合试验成本的考虑,最终采用硅胶作为净化剂。经过对硅胶用量的考察,添加3 g和4 g的效果类似,且比1 g和2 g的略优,故选择3 g硅胶。

综上所述,本研究中的方法简便、快捷、准确、重复性好,可用于测定罗汉果中罗汉果皂苷V的含量。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:221.
- [2] 张静,吴友良,张婵娟,等. 罗汉果药理活性研究进展[J]. 中国药业,2010,19(20):84-86.
- [3] 陈敏,王翠红. 罗汉果中罗汉果皂苷提取工艺的优化及其止咳祛痰作用[J]. 中成药,2019,41(5):1129-1132.
- [4] 牟世芬,刘勇建. 加速溶剂萃取的原理及应用[J]. 现代科学仪器,2001(3):18-20.
- [5] 张薇英,赵巧灵,戴意飞,等. 快速溶剂萃取技术在农兽药残留检测中的应用与展望[J]. 山东化工,2019,48(6):54-56.
- [6] 胡军影,马双城,程显隆,等. 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.
- [7] 陈维军,张俐勤,戚向阳,等. 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.
- [8] 陈薇,刘庚贵,段小群,等. 富硒罗汉果中罗汉果皂苷V的HPLC测定[J]. 湖北农业科学,2015,54(2):444-446.
- [9] 张庆莲,皮凤娟,黄娟,等. HPLC法测定罗汉果中罗汉果皂苷V的含量[J]. 云南中医中药杂志,2018,39(10):57-59.
- [10] 蔡伟江,魏鲜娥,陈珊珊,等. 超高效液相色谱法测定清咽含片中罗汉果皂苷V[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(5):1017-1020.
- [11] 刘雯,王志宏,杨裴庆,等. 不同果龄罗汉果中甜苷含量分布研究[J]. 山东化工,2017,46(12):12-15.
- [12] 张云竹,戚向阳,陈维军,等. 罗汉果中主要皂甙成分的高效液相分析研究[J]. 食品科学,2006,27(7):224-227.
- [13] 邓梦霞,张桂芬,刘欢,等. 罗汉果止咳糖浆中罗汉果皂苷V的含量测定[J]. 中成药,2010,32(2):340-341.
- [14] 彭瑾,张蓉,彭梅. 紫外-可见分光光度法测定不同产地罗汉果中多糖含量[J]. 中国药业,2016,25(2):51-53.
- [15] 王海英,马小军,莫长明,等. 罗汉果果肉中糖类物质组成与含量分析[J]. 广西植物,2015,35(6):775-781.

(收稿日期:2020-11-27;修回日期:2021-03-06)