

HPLC-ELSD 测定复方罗汉果止咳冲剂中罗汉果皂苷 V 的含量

覃俏峰¹, 蓝晓庆², 温庆伟², 刘婷², 陆东², 韦红言², 宋景政^{2*} (1.广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2.培力(南宁)药业有限公司, 南宁 530007)

摘要: 目的 建立 HPLC-ELSD 测定止咳冲剂中的罗汉果皂苷复方罗汉果 V 的含量的方法。方法 色谱条件是 AlltimaTM-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水(23 : 77), 柱温 30 ℃, ELSD 检测条件, 漂移管温度为 105 ℃, 气流流量为 2.0 L·min⁻¹。结果 罗汉果皂苷 V 进样量在 1.608~9.648 μg 内时, 进样量的对数与峰面积的对数呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y=1.634\ 3X+12.591$ ($r=0.999\ 7$), 平均回收率为 101.36%, RSD 为 1.29%。结论 该方法准确、专属性强, 可用于测定复方罗汉果止咳冲剂中罗汉果皂苷 V 的含量。

关键词: 复方罗汉果止咳冲剂; 罗汉果皂苷 V; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)07-0850-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.020

Determination of Mogroside V in Fufang Luohanguo Zhike Granule by HPLC-ELSD

QIN Qiaofeng¹, LAN Xiaoping², WEN Qingwei², LIU Ting², LU Dong², WEI Hongyan², SONG Jingzheng^{2*} (1.The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2.PuraPharm (Nanning) Pharmaceuticals Co., Ltd., Nanning 530007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-ELSD method for the determination of mogroside V in Fufang Luohanguo Zhike granule. **METHODS** AlltimaTM-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase: acetonitrile-water(23 : 77), column temperature: 30 ℃. ELSD condition: temperature of drift tube: 105 ℃, flow rate of gas: 2.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** Mogroside V was linear in the range of 1.608-9.648 μg, with regression equation of $Y=1.634\ 3X+12.591$ ($r=0.999\ 7$), the average recovery was 101.36%(RSD=1.29%). **CONCLUSION** The established method is accurate, specific and reliable for the determination of mogroside V in Fufang Luohanguo Zhike granule.

KEY WORDS: Fufang Luohanguo Zhike granule; mogroside V; HPLC-ELSD

复方罗汉果止咳冲剂是部颁标准(中药成方制剂)第 3 册收载的传统制剂, 由罗汉果、桑白皮、百部、枇杷叶等 6 味中药组成, 具有清热泻肺、镇咳祛痰的功效, 用于肺热、肺燥咳嗽。罗汉果

基金项目: 广西创新计划专项经费项目(2014CXJHA02); 南宁市科学研究与技术开发计划项目(20141060, 20133163)

作者简介: 覃俏峰, 女, 主管中药师 Tel: 13517661971 E-mail: xqlan@purapharm.com.cn *通信作者: 宋景政, 男, 博士, 研究员 Tel: 18878792195 E-mail: jzsong@purapharm.com

为本方的君药。文献研究表明:三萜类成分是罗汉果主要的药效成分^[1],其中罗汉果皂苷V(mogroside V)是罗汉果皂苷的主要成分之一,具有镇咳祛痰等作用^[2]。

复方罗汉果止咳冲剂现行的部颁标准只有性状和检查项目,近年来虽有关于罗汉果止咳糖浆等质量控制的报道^[3-4],但多数都是采用HPLC-UV测定罗汉果皂苷V的含量^[5-8],也有文献^[9]采用薄层扫描法测定罗汉果皂苷V的含量。由于罗汉果皂苷V为三萜类,紫外吸收低,测定复方制剂中的该成分含量干扰较大。采用HPLC-ELSD测定罗汉果皂苷V的含量未见报道。因此,本实验采用HPLC-ELSD测定复方罗汉果止咳冲剂中罗汉果皂苷V的含量,可以避免复方成分中其他成分的干扰,提高方法的专属性和准确性。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱仪(G1322A 真空脱气机, G1311A 四元梯度泵, G1329A 自动进样器, G1314B VWD 检测器, 美国 Agilent 公司); 2000ES 蒸发光散射检测器(美国奥泰公司)。色谱柱为 AlltimaTM-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(23:77)为流动相, 2000ES 蒸发光散射检测器, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 漂移管温度为 105℃, 气流流量为 2.0 L·min⁻¹, 进样量 20 μL。MILLI-Q Academic 超纯水机; GR-202 电子分析天平(日本); KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

罗汉果皂苷V对照品(成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: A022, 含量≥98%); 复方罗汉果止咳冲剂(批号: A101, A102, A103; 规格: 10 g·袋⁻¹)和缺罗汉果药材的复方罗汉果止咳冲剂阴性对照样品均由培力(南宁)药业有限公司提供。乙腈(色谱纯), 水(超纯水), 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取罗汉果皂苷V对照品 8.04 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 0.804 0 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取本品适量, 研细, 取约 5.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 超声(250 W, 50 kHz)处理 45 min, 取出放冷, 称定重

量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密吸取滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 残渣加流动相使溶解, 并转移至 5 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.3 阴性样品溶液的制备

按复方罗汉果止咳冲剂的处方比例, 称取除去罗汉果的其余处方药味, 制成缺罗汉果的阴性对照。取该阴性对照浸膏 5.0 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制得阴性对照溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 提取方法考察 分别考察了加热回流、冷浸(各 1 h)和超声处理(45 min), 结果表明冷浸法提取的罗汉果皂苷V含量最低(0.54 mg·g⁻¹), 加热回流和超声处理的罗汉果皂苷V的含量无明显差异(分别为 0.55 和 0.56 mg·g⁻¹), 但超声处理操作简便, 因此选择超声提取法。

提取溶剂和超声处理时间进行考察的结果表明: 甲醇的提取率比乙醇高(分别为 0.55 和 0.32 mg·g⁻¹)。比较超声 30, 45 和 60 min, 结果表明提取 30 min 的含量较低(0.52 mg·g⁻¹), 而提取 45 min 和 60 min 的结果一致(分别为 0.543 和 0.541 mg·g⁻¹)。因此选择以甲醇为提取溶剂, 超声处理 45 min。

2.4.2 线性范围的考察 分别精密吸取对照品溶液(浓度为 0.804 0 mg·mL⁻¹)2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 μL 进行分析, 以峰面积的对数(Y)作为纵坐标, 进样量的对数(X)作为横坐标进行线性回归, 得回归方程为 $Y=1.634\ 3X+12.591$ ($r=0.999\ 7, n=6$)。结果表明罗汉果皂苷V进样量在 1.608~9.648 μg 内时, 进样量的对数与峰面积的对数呈良好的线性关系。

2.4.3 仪器精密度试验 精密吸取上述对照品溶液(浓度为 0.804 0 mg·mL⁻¹)20 μL, 连续进样 5 次, 测定峰面积, 罗汉果皂苷V峰面积的 RSD 为 1.27%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一批供试品溶液 20 μL, 分别于 0, 3, 6, 12, 24 h 进样测定, 峰面积的 RSD 为 1.06%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批样品(批号: A101277-01), 按样品测定方法平行测定 6 份, 结果罗汉果皂苷V的平均含量为 0.553 7 mg·g⁻¹

(RSD=1.63%), 说明本法的重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已知含量的本品 6 份(批号: A101, 罗汉果皂苷 V 的含量为 $0.553\ 7\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), 每份约 2.0 g, 精密称定, 分别精密加入适量的对照品, 按“2.2”项下方法操作, 精密吸取供试品溶液各 20 μL , 测定, 计算加样回收率, 结果罗汉果皂苷 V 平均回收率为 101.36%, RSD 为 1.29%, 符合定量分析的要求, 说明本方法回收率良好。

2.5 含量测定

2.5.1 干扰试验 精密吸取阴性供试液 20 μL , 进

样测定, 在罗汉果皂苷 V 色谱峰相应的保留时间无吸收峰, 表明其他成分对测定无干扰, 色谱图见图 1。

2.5.2 样品测定 取复方罗汉果止咳冲剂各约 5.0 g, 按“2.2”项下方法制得供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液 10, 20 μL , 供试品溶液 20 μL , 注入液相色谱仪, 测定, 以外标两点法对数方程计算, 即得。共测定了批号为 A101, A102, A103 的 3 批样品, 罗汉果皂苷 V 的含量分别为 0.553 7, 0.579 0, 0.683 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

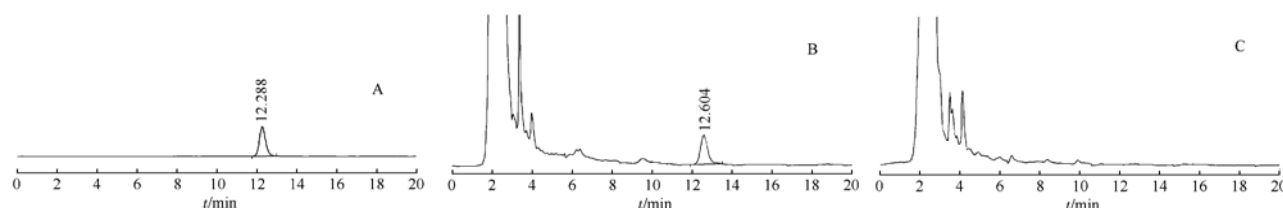


图 1 复方罗汉果止咳冲剂 HPLC 色谱图

A-罗汉果皂苷 V 对照品; B-供试品; C-阴性对照品

Fig. 1 HPLC chromatograms of Fufang Luohanguo Zhike granule

A-standard solution of mogroside V; B-sample; C-negative solution

3 讨论

3.1 测定方法的选择

笔者曾参考相关文献和中国药典 2010 年版一部“罗汉果”药材含量测定方法, 采用 HPLC-UV 测定“复方罗汉果止咳冲剂”中罗汉果皂苷 V 的含量, 在试验中发现罗汉果皂苷 V 的色谱峰与其相邻组分的色谱峰未能达到基线分离, 罗汉果皂苷 V 的色谱峰响应值较低。罗汉果皂苷 V 为三萜类皂苷, 分子结构中没有明显的紫外吸收基团, 用紫外检测器测定时, 容易被其它成分干扰。该化合物的分子量较大(分子式为 $\text{C}_{60}\text{H}_{102}\text{O}_{29}$, 分子量为 1 287.43 Da), 对 ELSD 检测器的响应较大, 因此本实验选择 ELSD 检测器进行测定。

3.2 提取方式的选择

本实验参考文献^[3,10]采用超声处理提取后, 经过大孔吸附树脂纯化或用水饱和正丁醇萃取纯化后再进行分析; 试验结果发现, 纯化前后样品杂质峰均未对测定成分色谱峰造成干扰, 故采用超声提取未经纯化的操作方法。

罗汉果皂苷 V 在紫外区仅有末端吸收, 本实验所建立的测定方法与药典方法相比, 专属性、准确性得到明显提高。

REFERENCES

- [1] CHEN W J, ZHANG L Q, QI X Y, et al. Determination of saponin V by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2005, 28(7): 559-561.
- [2] LIU T, WANG X H, LI C, et al. Study on the antitussive, expectorant and antispasmodic effects of saponin V from *Momordica grosvenori* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2007, 42(20): 1534-1536, 1590.
- [3] DENG M L, ZHANG G F, LIU H. Determination of saponin V in Fructus Momordicae Zhike Tangjiang by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(2): 340-341.
- [4] LIU Y, MO H T, WEN Z Y, et al. Study on the quality standard of complex Siraitiae Fructus tablet [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(2): 341-343.
- [5] HU J Y, MA S C, CHENG X L, et al. RP-HPLC determination of mogroside V in Fructus Momordicae [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(4): 544-546.
- [6] MA S M. Separation of Luohanguo glucoside by HPLC [J]. Fujian Anal Test(福建分析测试), 2006, 15(4): 3-6.
- [7] OU Y, CHEN J Y, QIN T L. Determination of mogroside V in Fructus Momordicae by HPLC [J]. J Guangxi Tradit Chin Med Univ(广西中医学院学报), 2007, 10(4): 85-86.
- [8] LU F L, LIU J L, HUANG Y L, et al. Simultaneous determination of six cucurbitane triterpene glycoside in Siraitia Grosvenorii Fruits using high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2008, 26(4): 504-508.
- [9] LIANG C Q, SU X J, LI J, et al. Determination of mogroside V by thin layer scan [J]. Guangxi J Light Ind(广西轻工业), 2005, 22(3): 13-15.
- [10] Ch.P(2010) Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 197.

收稿日期: 2013-07-26