

## 高效液相色谱法同时测定罗汉果中的六种葫芦烷三萜类皂苷

卢凤来, 刘金磊, 黄永林, 李典鹏

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

**摘要** :建立了高效液相色谱测定罗汉果中罗汉果苷 V、罗汉果苷 IV A、罗汉果苷 III、11-氧化罗汉果苷 III、罗汉果苷 II E 和 11-氧化罗汉果苷 II E 等 6 种苷类化合物含量的方法。采用的色谱条件 :ZORBAX SB-C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温 30 ℃;以水(A相)和乙腈(B相)为流动相,梯度洗脱程序 0~3 min 20% B~30% B;3~8 min 30% B~35% B;8~9 min 35% B;流速 0.8 mL/min;检测波长 203 nm;进样量 10 μL。结果表明,以上 6 种苷类化合物分别在 0.04~1.0 mg/mL、0.011~0.68 mg/mL、0.010~0.80 mg/mL、0.0097~0.58 mg/mL、0.025~1.0 mg/mL、0.013~0.76 mg/mL 范围内线性关系良好( $r > 0.9991$ )。加标回收率依次为 99.65%、101.6%、97.05%、103.1%、99.25%和 103.0%。相对标准偏差分别为 0.83%、3.1%、1.9%、3.3%、0.59%和 2.0%。该方法简便、快速、准确,适用于罗汉果原材料及其制品中苷类化合物的检测和含量测定。

**关键词** :高效液相色谱法;葫芦烷三萜类皂苷;罗汉果

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)04-0504-05 栏目类别 :研究论文

## Simultaneous determination of six cucurbitane triterpene glycosides in *Siraitia grosvenorii* fruits using high performance liquid chromatography

LU Fenglai, LIU Jinlei, HUANG Yonglin, LI Dianpeng

(Guangxi Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

**Abstract** :*Siraitia grosvenorii*, a traditional Chinese fruit, belongs to the family Cucurbitaceae and has been used as a pulmonary demulcent and emollient for the treatment of dry cough, sore throat, dire thirst, and constipation in folk medicine. A high performance liquid chromatographic method was developed for simultaneous determining the contents of mogroside V, mogroside IV A, mogroside III, 11-oxomogroside III, mogroside II E and 11-oxomogroside II E in *Siraitia grosvenorii* fruits. The chromatographic analysis was carried out on a ZORBAX SB-C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was water (A) and acetonitrile (B) with gradient elution (0–3 min, 20% B–30% B; 3–8 min, 30% B–35% B; 8–9 min, 35% B). The flow rate was maintained at 0.8 mL/min. The detection wavelength was set at 203 nm and the column temperature was controlled at 30 ℃. The sample injection volume was 10 μL. The calibration curves were linear over the ranges of 0.04–1.0 mg/mL, 0.011–0.68 mg/mL, 0.010–0.80 mg/mL, 0.0097–0.58 mg/mL, 0.025–1.0 mg/mL and 0.013–0.76 mg/mL ( $r > 0.9991$ ) for the above cucurbitane triterpene glycosides, respectively. The average recoveries were 99.65% for mogroside V, 101.6% for mogroside IV A, 97.05% for mogroside III, 103.1% for 11-oxomogroside III, 99.25% for mogroside II E, and 103.0% for 11-oxomogroside II E, with the relative standard deviations of 0.83%, 3.1%, 1.9%, 3.3%, 0.59% and 2.0%, respectively. This simple, rapid and accurate method is suitable for quality control and determination of raw materials and products of *Siraitia grosvenorii* fruits.

**Key words** : high performance liquid chromatography (HPLC); cucurbitane triterpene glycosides; *Siraitia grosvenorii*

收稿日期 2007-10-11

第一作者 :卢凤来, 硕士研究生. Tel : (0773)3550075, E-mail : lufenglai@gxib.cn.

通讯联系人 :李典鹏, 副研究员, 主要从事植物资源开发与利用研究. Tel : (0773)3550075, E-mail : ldp@gxib.cn.

基金项目 :中国科学院“西部之光”人才培养计划入选项目(科发人教字[2002]101号)和桂林市科技经费资助项目(编号 20070304-2).

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)为葫芦科罗汉果属多年生宿根茎性藤本植物,是我国特有的经济、药用植物,为广西桂北地区的传统特产,具有清热润肺、凉血、润肠通便的功效,在治疗百日咳、慢性气管炎、感冒、便秘、胃肠小疾等方面疗效显著<sup>[1]</sup>。临床实验表明,罗汉果的主要活性成分是葫芦烷三萜类皂苷<sup>[2]</sup>,其在干果中的总含量为 3.76%~3.86%<sup>[3]</sup>。罗汉果甜苷具有甜度高、口感纯正、热量低、无毒副作用等特点,是糖尿病、肥胖症等患者最理想的天然甜味剂与保健品,也是儿童预防龋齿的最佳食品添加剂之一。最近研究发现其还可能具有抗衰老、抗癌与防肺结核<sup>[4-6]</sup>等作用,所以罗汉果及其制品也越来越受到国内外医药及食品行业的青睐。

不同生长期的罗汉果果实中的苷类成分及其含量不一样。成熟的罗汉果中富含罗汉果甜苷,主要为罗汉果Ⅳ、Ⅴ(mogrosideⅣ、Ⅴ),未成熟的果实中主要含有罗汉果苦苷,即罗汉果苷ⅡE(mogrosideⅡE)。我们研究了罗汉果中主要苷类成分的季节性变化<sup>[7,8]</sup>,并分别建立了罗汉果苷Ⅴ、罗汉果苷ⅡE和罗汉果苷Ⅲ的测定方法<sup>[9,10]</sup>。本文在以往研究以及在分离得到新的罗汉果三萜类皂苷成分标准品(11-氧化罗汉果苷ⅡE和11-氧化罗汉果苷Ⅲ<sup>[11,12]</sup>)的基础上,对样品的处理方法以及高效液相色谱(HPLC)的测定条件进行了改进,目的在于建立一种简便、可靠的方法,能在同一条件下同时测定罗汉果中6种主要苷类化合物的含量,以便更准确地反映与控制罗汉果原料及制品的质量,为罗汉果产品的标准化、国际化奠定基础。

## 1 实验部分

### 1.1 药品与试剂

对照品罗汉果苷Ⅴ(mogrosideⅤ, LHG1)、罗汉果苷ⅣA(mogrosideⅣA, LHG2)、罗汉果苷Ⅲ(mogrosideⅢ, LHG3)、11-氧化罗汉果苷Ⅲ(11-oxomogrosideⅢ, LHG4)、罗汉果苷ⅡE(mogrosideⅡE, LHG5)和11-氧化罗汉果苷ⅡE(11-oxomogrosideⅡE, LHG6)由本实验小组从罗汉果中分离获得,化学结构如图1所示;所有的化合物均有严格的光谱学鉴定数据<sup>[11,12]</sup>,并经HPLC法测定其含量分别为99.1%、98.9%、98.1%、99.3%、98.5%、98.9%(质量分数)。乙腈为色谱纯(美国TEDIA公司),重蒸蒸馏水为自制,其他试剂均为分析纯。

罗汉果药材采集于广西植物研究所罗汉果实验地。在罗汉果盛花期点花并挂牌标记,相继采摘不同生长期的青皮果与长滩果果实适量,采集后分别冷冻干燥,碾碎过40目筛,干燥保存备用。

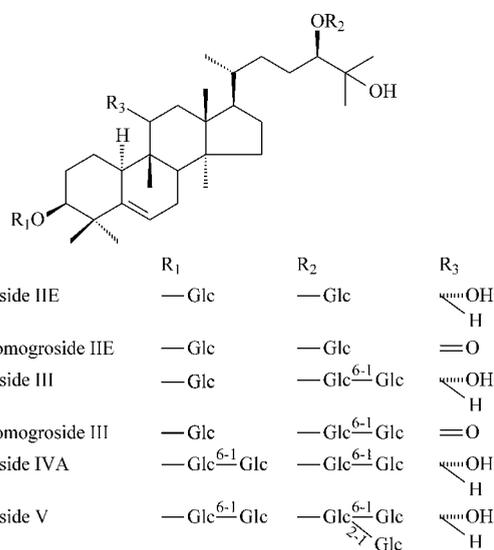


图 1 6种苷类化合物的化学结构

Fig. 1 Structures of six cucurbitane triterpene glycosides

### 1.2 仪器与色谱条件

Agilent 1100 分析型高效液相色谱仪,包括二极管阵列多波长检测器(DAD)、四元梯度泵、在线真空脱气机、7725i 手动进样器、HP 化学工作站(美国Agilent公司)。

色谱柱:ZORBAX SB-C18柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温 30℃;流动相:水(A相)和乙腈(B相);梯度洗脱程序 0~3 min 20% B~30% B;3~8 min 30% B~35% B;8~9 min 35% B;流速:0.8 mL/min;检测波长 203 nm;进样量:10 μL。此条件下 LHG1、LHG2、LHG3、LHG4、LHG5 和 LHG6 的色谱峰与其他组分达到了良好的分离,保留时间分别为 5.23、5.71、6.31、6.59、7.73 和 8.10 min;以甲醇作空白对照实验,溶剂峰在 2.5 min 以前出现,未对目标峰造成影响(见图2)。

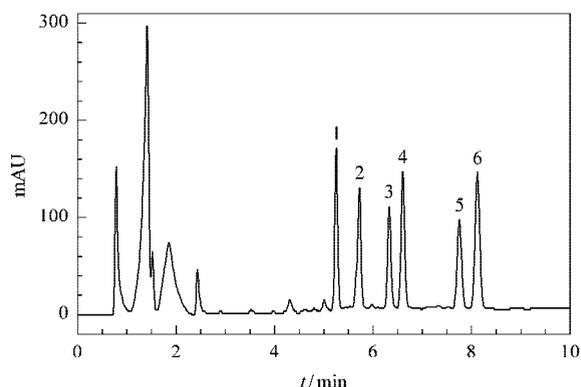


图 2 6种葫芦烷三萜类皂苷对照品混合物的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a mixture of six cucurbitane triterpene glycoside controls

1. mogrosideⅤ(LHG1); 2. mogrosideⅣA(LHG2); 3. mogrosideⅢ(LHG3); 4. 11-oxomogrosideⅢ(LHG4); 5. mogrosideⅡE(LHG5); 6. 11-oxomogrosideⅡE(LHG6)。

### 1.3 供试品溶液的制备

取罗汉果药材粉末 0.5 g,精密称定,置于 100 mL 具磨口塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,摇匀,称定重量。超声处理 1 h,放冷,再称定重量,并用甲醇补足减失的重量,摇匀,以 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤,滤液作为供试品溶液。

### 1.4 对照品溶液的制备

分别精确称量 6 种葫芦烷三帖类皂苷对照品适量,用甲醇溶解到 6 个 10 mL 的容量瓶中,超声溶解,并用甲醇定容制成储备液,然后分别吸取一定的体积,用甲醇稀释,得到 LHG1 对照品溶液的质量浓度为 0.040,0.10,0.20,0.50,0.80,1.0 mg/mL; LHG2 对照品溶液的质量浓度为 0.011,0.046,0.11,0.23,0.46,0.68 mg/mL; LHG3 对照品溶液的质量浓度为 0.010,0.040,0.10,0.20,0.40,0.80 mg/mL; LHG4 对照品溶液的质量浓度为 0.0097,0.039,0.097,0.19,0.39,0.58 mg/mL; LHG5 对照品溶液的质量浓度为 0.025,0.10,0.25,0.50,0.80,1.0 mg/mL; LHG6 对照品溶液的质量浓度为 0.013,0.050,0.13,0.25,0.50,0.76 mg/mL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 供试品溶液制备方法的选择

本实验比较了加热回流(以往罗汉果提取多采用此法)与超声提取两种方法,发现两种方法的提取效果无明显差别,但超声提取具有操作简单、快捷,溶剂消耗少的优点,故选之作为本实验的提取方法。分别用甲醇、95% 乙醇、乙腈、水和 50% 甲醇为提取溶剂对罗汉果皂苷的超声提取效果进行了比较,发现在相同的提取条件下,乙腈与水的提取率低,50% 甲醇与甲醇的提取率高且相差不大,但前者提取液中出现较多的悬浮物,难以用微孔滤膜过滤,因此本文最后选用甲醇作为提取溶剂。进一步考察了超声提取时间及提取溶剂的用量对提取效果的影响,结果表明用 25 mL 甲醇提取 0.5 g 样品 1 h,可将样品中的皂苷成分提取完全。

随机选择 5 个样品,分别称定 6 份,各分为 2 组,每组 3 份,其中一组提取后直接过微孔滤膜,滤液作为供试品溶液;另外一组样品提取后经过 D-101 大孔树脂处理<sup>[10]</sup>。采用相同的方法检测,结果发现前一组含量要比后一组的含量高 0.07% ~ 0.20%。这可能是由于后一组制备步骤多,操作过程造成一些有效成分的损失。因此,本文采用甲醇提取样品并经微孔滤膜过滤后直接进样分析。

### 2.2 流动相洗脱梯度的优化

由试验可知选用乙腈和水作流动相比较合理。

由于样品中成分复杂,采用等度洗脱时有些峰(如 1 号峰 LHG1)容易与杂质峰重叠,且分离时间较长,色谱峰扩展(见图 3-a)。为使所有组分能在合理的时间全部流出色谱柱,并具有良好的分离度,本文采用梯度洗脱。实验发现,梯度洗脱初期流动相中乙腈比例的确定很重要,合适的比例能使极性大的杂质较快地流出色谱柱,从而与目标化合物分离。流动相的流速与色谱柱的温度对各化合物之间的分离度有较大的影响,尤其对 5 号峰与其前面的一个峰的分离,在其他条件相同的情况下流速快或柱温低均会使这两个峰合并为一个峰。经过多次改变洗脱程序,并考察柱温和流速,最后确定了“1.2”节的色谱条件。在该条件下,样品中 6 种葫芦烷三帖类皂苷在 9 min 内全部流出色谱柱,目标峰与相邻峰分离良好,峰形好(见图 3-b)。

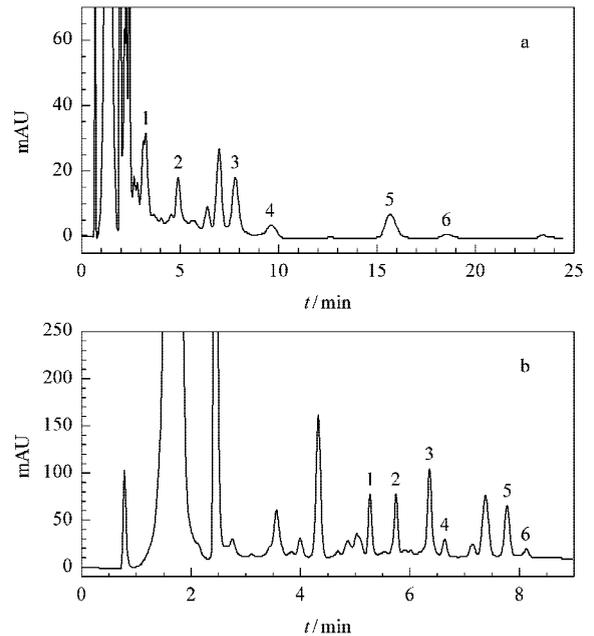


图 3 (a)等度洗脱和(b)梯度洗脱条件下生长期为 45 d 的罗汉果样品的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of *Siraitia grosvenorii* of 45 d growing ages by (a) isocratic elution and (b) gradient elution

The peak identifications are the same as in Fig. 2.

### 2.3 线性关系与检出限

分别精密吸取不同浓度的 6 种对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,按“1.2”节色谱条件测定,记录峰面积和进样浓度,以峰面积  $y$  对进样浓度  $x$  (mg/mL) 进行线性回归。并将线性关系考察中各化合物的最小浓度的溶液进行不断的稀释及检测。稀释 50 倍后仍能检测到色谱峰,且信噪比在规定的范围内,确定此浓度为 6 种化合物在该色谱条件下的检出限。结果表明 6 种被测化合物的峰面积与进样浓度线性关系良好,线性范围宽,检出限低,灵敏度高(见表 1)。

表 1 6 种葫芦烷三萜类皂苷对照品的回归方程、相关系数、线性范围与检出限  
**Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges and limits of detection (LOD) of six cucurbitane triterpene glycoside controls**

Component	Regression equation *	r	Linear range/(mg/mL)	LOD/(μg/mL)
LHG1	$y = 3332.9x + 13.733$	0.9995	0.04 - 1.0	0.83
LHG2	$y = 3593.4x + 4.3947$	0.9999	0.011 - 0.68	0.24
LHG3	$y = 3151.3x + 3.7583$	0.9997	0.010 - 0.80	0.21
LHG4	$y = 5036.1x + 7.175$	0.9999	0.0097 - 0.58	0.20
LHG5	$y = 6568.8x + 16.503$	0.9991	0.025 - 1.0	0.52
LHG6	$y = 4976.5x + 12.995$	0.9998	0.013 - 0.76	0.26

\* y: peak area; x: mass concentration, mg/mL.

2.4 精密度与稳定性

精密称取 45 d 青皮果样品 5 份, 按“1.3”节方法制备供试品溶液, 按“1.2”节色谱条件测定, 计算各组分测定结果的相对标准偏差 (RSD)。罗汉果苷 LHG1 ~ 6 的 RSD 分别为 1.8%, 2.1%, 2.6%, 1.2%, 1.1%, 1.9%。说明该方法的精密度良好。

再取 45 d 青皮果样品粉末, 精密称定, 按“1.3”节方法制备供试品溶液, 分别放置 0, 12, 24, 36, 48, 72 h 后进样, 测定其峰面积并计算含量, 结果表明罗汉果苷 LHG1 ~ 6 含量的 RSD 依次为 1.8%, 1.5%, 1.4%, 4.4%, 2.5%, 1.2%。说明样品在 72 h 内的稳定性良好。

2.5 加标回收率

准确称取 20 d 和 45 d 青皮果样品各 6 份, 分为 2 组, 每组 3 份, 其中一组 20 d 样品中精密加入已知量的 LHG5 和 LHG6, 45 d 样品中加入另外 4 种对照品; 另一组不加对照品。分别按建立的方法对样品进行制备及测定, 结果见表 2。需要说明的是, 由于对照品有限, 每个化合物未能按低、中、高 3 个水平来检测。但从整个实验来看, 同样是考察了不同

的加标水平, 且平均回收率在 97.05% ~ 103.1% 之间, 说明该方法具有良好的准确性。

表 2 罗汉果中 6 种苷类化合物的加标回收率 (n = 3)

Table 2 Recoveries of the six mogrosides in *Siraitia grosvenorii* (n = 3)

Component	Background/ mg	Added/ mg	Found/ mg	Recovery/ %	RSD/ %
LHG1	1.93	2.53	4.45	99.65	0.83
LHG2	1.42	0.570	2.00	101.6	3.1
LHG3	2.53	1.01	3.51	97.05	1.9
LHG4	0.364	0.970	1.36	103.1	3.3
LHG5	11.1	1.33	12.3	99.25	0.59
LHG6	2.25	0.504	2.44	103.0	2.0

2.6 样品分析

按本文所建立的方法测定了 34 份不同生长期的罗汉果样品。如表 3 所示, 在罗汉果早期嫩果中主要检测到了 LHG5 和 LHG6; 随着生长时间的增加, 在罗汉果中逐渐检测到了 LHG3、LHG4、LHG2 和 LHG1, 成熟果实中以 LHG1 为主, 其典型的图谱见图 4。这说明本文方法能准确测定罗汉果苷类成分的含量, 可用于控制罗汉果原料的质量。

表 3 不同生长期的青皮果与长滩果中皂苷成分的测定结果

Table 3 Contents of six cucurbitane triterpene glycosides in Qingpiguo and Changtanguo samples of different growing ages

Growing age/d	LHG5/%		LHG6/%		LHG3/%		LHG4/%		LHG2/%		LHG1/%	
	a <sup>1)</sup>	b <sup>2)</sup>	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5	1.77	1.28	0.48	0.45	-	-	-	-	-	-	-	-
10	2.54	2.70	0.52	0.53	-	-	-	-	-	-	-	-
15	2.46	2.54	0.45	0.42	0.04	-	-	-	-	-	-	-
20	1.95	2.20	0.40	0.32	0.04	0.04	-	0.02	-	-	-	-
25	1.65	2.00	0.34	0.31	0.05	0.05	-	0.03	-	-	-	-
30	1.14	1.48	0.21	0.26	0.12	0.07	-	0.04	-	-	-	-
35	1.04	1.42	0.18	0.23	0.18	0.09	0.02	0.05	-	-	-	-
40	0.52	0.85	0.09	0.12	0.47	0.46	0.05	0.07	0.04	0.05	0.02	-
45	0.25	0.37	0.03	0.05	0.58	0.64	0.07	0.12	0.29	0.39	0.36	0.24
50	0.03	0.22	-	0.03	0.25	0.52	0.04	0.10	0.28	0.26	0.78	0.14
55	-	0.14	-	0.01	0.16	0.35	-	0.05	0.22	0.28	1.23	0.74
60	-	-	-	-	-	0.04	-	0.02	-	0.30	1.50	1.12
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.50	1.69
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.45	1.86
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.50	1.67
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.42	1.53
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.51	1.53

1) a. Qingpiguo; 2) b. Changtanguo.

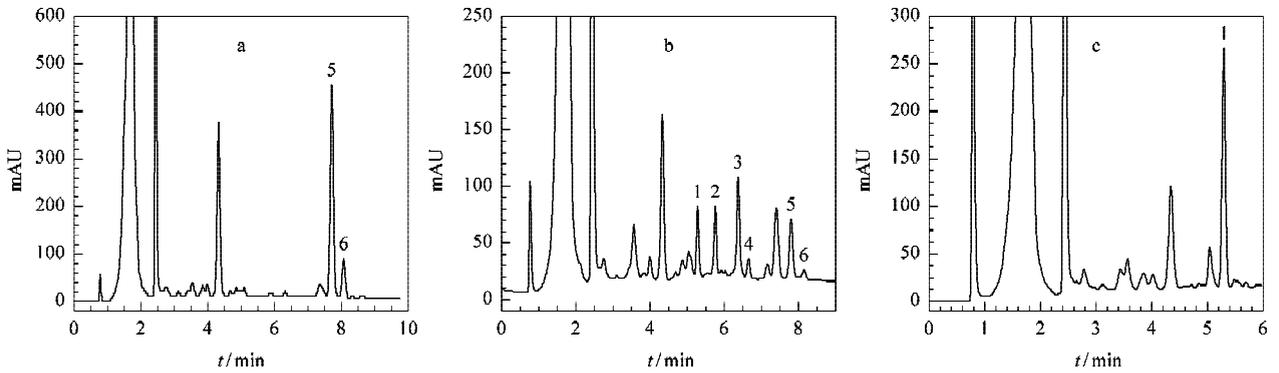


图 4 不同生长期的青皮果样品的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of Qingpigu samples of different growing ages

Growing ages : a. 10 d ; b. 45 d ; c. 85 d. The peak identifications are the same as in Fig. 2.

### 3 结论

本实验应用 HPLC 法建立了罗汉果中 6 种皂苷类化合物的测定方法并进行了详细的方法学验证。本实验的特点在于在同一条件下可同时对罗汉果中多种皂苷类成分进行定量分析。通过比较实验发现,利用超声提取所得到的提取液经微孔滤膜过滤后可直接进样分析,方法简单,避免了因操作繁琐而导致成分损失等弊端,且方便快捷,溶剂消耗少;采用梯度洗脱能使多个化合物在较短时间内分开,克服了等度洗脱使色谱峰展宽,检测时间较长等缺陷,可应用于罗汉果原料及罗汉果制品的质量控制。

#### 参考文献:

[ 1 ] New Medical College of Jiangsu. Great Dictionary of chinese medicine. Shanghai : Shanghai Scientific & Technical Publishers ( 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海 : 上海科学技术出版社 ), 1977 : 1 356  
 [ 2 ] Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, et al. Yakugaku Zasshi, 1983, 103( 11 ): 1 151

[ 3 ] Chang Q, Si J Y, Chen D H, et al. China Journal of Chinese Materia Medica ( 常琪, 斯建勇, 陈迪华, 等. 中国中药杂志 ), 1995, 20( 9 ): 554  
 [ 4 ] Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, et al. J Agric Food Chem, 2002, 50 : 6 710  
 [ 5 ] Takasaki M, Konoshima T, Murata Y, et al. Cancer Lett, 2003, 198 : 37  
 [ 6 ] Takeo E, Yoshida S, Tada S, et al. Atheroscler Thromb, 2002, 9 : 114  
 [ 7 ] Li D P, Chen Y Y, Pan Z H, et al. Guihaia ( 李典鹏, 陈月圆, 潘争红, 等. 广西植物 ), 2004, 24( 6 ): 546  
 [ 8 ] Li D, Ikeda T, Huang Y, et al. J Nat Med, 2007, 61 : 307  
 [ 9 ] Pan Z H, Li D P, Chen Y Y, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs ( 潘争红, 李典鹏, 陈月圆, 等. 中草药 ), 2004 ( Suppl ): 175  
 [ 10 ] Li D P, Huang Y L, Liu J L, et al. Natural Product Research and Development ( 李典鹏, 黄永林, 刘金磊, 等. 天然产物研究与开发 ), 2006, 18( 5 ): 850  
 [ 11 ] Li D P, Ikeda T, Matsuoka N, et al. Chem Pharm Bull, 2006, 54( 10 ): 1 425  
 [ 12 ] Li D P, Ikeda T, Nohara T, et al. Chem Pharm Bull, 2007, 55( 7 ): 1 082