

HPLC 法测定罗汉果中罗汉果苷 II E、苷 III 的含量

李典鹏*, 黄永林, 刘金磊, 潘争红

(广西壮族自治区、中国科学院广西植物研究所, 桂林 541006)

摘要: 采用 ZORBAX SB C18(4.6 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水(25:75)为流动相, 流速 1 mL/min, 柱温 25 °C, 二极管阵列检测器, 检测波长为 203 nm, 以外标法测定了罗汉果中罗汉果苷 II E、苷 III 的含量。罗汉果苷 II E 在 1.934~25.142 μg, 苷 III 在 2.070~26.910 μg 范围内呈线性关系, 平均加样回收率为 96.6% 与 97.9%。

关键词: 罗汉果; 罗汉果苷 II E; 罗汉果苷 III; 高效液相色谱法

中图分类号: Q946.91; O657.7⁺ 2

文献标识码: A

Quantitative Determination of Mogrosides II E and III in the Fruit of *Siraitia grosvenorii* by HPLC

LI Dian peng*, HUANG Yong-lin, LIU Jin-lei, PAN Zheng-hong

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and Chinese Academy of Science, Guilin 541006, China)

Abstract: To determine mogrosides II E and III in the fruit of *Siraitia grosvenorii*, the following measurement conditions were used: ZORBAX SB C18(4.6 mm×150 mm, 5 μm) column, at 25 °C and detected at 203 nm; acetonitrile-water (25:75) as mobile phase, at a flow rate of 1 mL/min. The calibration curve was linear over a range from 1.934 μg to 25.142 μg for mogroside II E and from 2.070 μg to 26.910 μg for mogroside III. The average recovery rates for mogrosides II E and III ($n=5$) were 96.6% and 97.9%.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; mogroside II E; mogroside III; HPLC

罗汉果[*Siraitia grosvenorii* (swingle) C. Jeffrey] 为葫芦科罗汉果属多年生宿根茎性的藤本植物, 是我国特有的经济、药用植物, 为广西桂北地区传统特产。罗汉果有清热润肺、凉血、润肠通便的功效, 特别是用作祛痰剂, 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^[1]。研究表明, 罗汉果的甜味物质为葫芦烷型三萜苷类成分, 甜度约为蔗糖的 250~300 倍, 热量仅为蔗糖的五十分之一, 是十分理想的天然甜味剂。目前, 由罗汉果提取制成的天然甜味剂—罗汉果甜苷已投入工业化生产。但是, 罗汉果的花期果期较长, 因受生长后期低温影响, 每年都有大量果实未能自然充分成熟, 甜度不高, 甚至有明显苦味, 这部分果如果混入原料中, 势必影响提取的罗汉果苷质量。不同生长时期罗汉果果实苷类成分不一致^[2], 成熟罗汉果富含罗汉果甜

苷, 主要为罗汉果苷 IV、V (mogroside IV、V)^[3], 未成熟的嫩果中主要含有罗汉果苦苷 A (mogroside II E)^[4], 甜苷与苦苷具有相同的苷元结构, 差异仅在于葫芦烷型四环三萜 3 位和 24 位连接的葡萄糖数目。而现阶段罗汉果提取物的质量控制标准多采用分光光度比色法测定罗汉果总苷的含量, 但比色法只能反映苷元一致的罗汉果总皂甙含量。国外商家要求采用 HPLC 法测定罗汉果苷 V 的含量^[5-7], 罗汉果苷 V 也只说明单一甜味成分含量。因此我们认为, 要有效控制罗汉果的质量, 有必要在准确测定罗汉果甜苷 V 的同时, 限制和标示出罗汉果苦苷 II E、II 的含量, 这样才能真正反映罗汉果原料及其提取物的甜度和品质。本实验探索出一套反相 HPLC 法测定罗汉果苷 II E、III 在果实中含量。该方法简便易行, 稳定性好, 准确度高, 适用于检验罗汉果品质、确定罗汉果的最佳采收日期以及控制罗汉果深加工产品的质量。

1 仪器与试剂

收稿日期: 2005-04-14

接受日期: 2005-05-27

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); 广西科学基金项目(桂科基 0236052)

* 通讯作者, Tel: 86-773-3550075; E-mail: ldp@gxib.cn

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);R-114 型旋转蒸发器(瑞士 Büchi 公司制造)。

罗汉果样品采集于广西桂林临桂两江乡、宛田乡(鲜罗汉果直接经冷冻干燥,磨成粉过 40 目筛备用)。罗汉果苷 II E、II 对照品(本实验室自制, TLC 的 R_f 值、IR、UV、NMR 值均与文献值^[8]一致,液相色谱峰为单峰,纯度分别达到 98.1%、98.5%)。HPD-200 大孔吸附树脂(沧州宝恩厂生产)。330、732 型离子交换树脂(山东鲁抗树脂分厂产)。色谱纯乙腈(美国 TEDIA 公司)。重蒸蒸馏水为自制,其他试剂均为 AR 级。

2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C18 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);柱温: 25 °C;流动相: 乙腈-水(体积比 25:75);流速: 1 mL/min;检测波长: 203 nm;进样量: 10 μL。定量方法: 外标法。在上述条件下罗汉果苷 II E、罗汉果苷 III 色谱峰与其它组分达到了良好分离;在确定了上述条件后,经阴性对照实验,证明阴性对照无干扰,证明此分离条件可行。

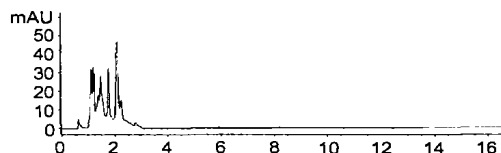


图 1 阴性对照

Fig. 1 HPLC chromatogram of negative sample

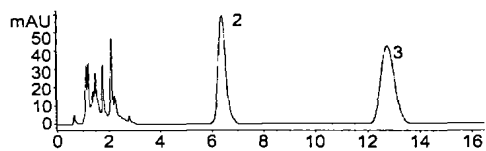


图 2 罗汉果苷 II E、III 对照品

Fig. 2 HPLC chromatogram of mogroside II E and III

3 溶液配制

3.1 对照品溶液的制备

精密称取罗汉果苷 II E 和 II 对照品 9.67 mg、10.35 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用流动相乙腈-水(体积比 25:75)溶液,超声溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液备用。

3.2 供试品溶液的制备

精密称取样品 1.0000 g 于 100 mL 锥形瓶,加入

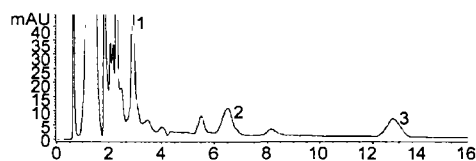


图 3 样品

Fig. 3 HPLC chromatogram of sample

甲醇 20 mL 回流提取 3 次(2 h × 1 h × 1 h),过滤,滤液减压回收甲醇至干,干状物加入蒸馏水适量,超声溶解,上 HPD-200 大孔树脂柱,先水洗 80 mL,再用 85 °C 乙醇 100 mL 洗脱,乙醇洗脱液直接通过 330、732 阴阳离子交换柱,收集流出液,柱再用约 100 mL 85 °C 乙醇洗脱,合并洗脱液减压回收至干,用乙腈-水(体积比 25:75)溶液定容至 5 mL 容量瓶,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,滤液作为供试品溶液备用。

4 线性关系的考察

分别精密吸取罗汉果苷 II E 和 II 对照品溶液 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 20.0, 26.0 μL,注入液相色谱仪中,按上述色谱条件测定,记录峰面积和进样量,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程:

罗汉果苷 II E: $Y = 313X + 34.03$, $R = 0.9986$

罗汉果苷 III $Y = 250.48X + 4.39$, $R = 0.9992$

结果表明罗汉果苷 II E 在进样量 1.934 ~ 25.142 μg,罗汉果苷 III 在进样量 2.070 ~ 26.910 μg 范围内呈线性关系。

5 精密度试验

精密吸取罗汉果苷 II E、II 对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,按含量测定方法测定峰面积,结果罗汉果苷 II E 峰面积值的 RSD 为 0.33%,罗汉果苷 III 峰面积的 RSD 为 0.23%,说明仪器精密度良好。

6 重复性试验

精密称取批号为 20040812 样品 5 份,按 3.2 项下方法提取制备,进行 5 次平行测定,计算罗汉果苷 II E、III 含量, RSD 分别为 1.68%、1.12%。说明本法重复性较好。

7 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批号样品(批号为 20041010) 5 份,准确加入罗汉果苷 II E、II 对照品溶

液 1 mL(C= 1 mg/mL), 按 3. 2 项下方法提取测定, 测定结果见表 1。

表 1 罗汉果中苷 II E、苷 III 的加样回收试验结果
Table 1 Recoveries of mogrosides II E and III

编号 No.	样品中含苷 II E、苷 III 的量 Content of mogrosides II E and III in sample(mg)	添加的苷 II E 苷 III 对照品的量 Standard added (mg)	测出苷 II E、苷 III 的总量 Total found (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	0. 246(0. 385)	1(1)	1. 212(1. 373)	96. 6(98. 8)		
2	0. 251(0. 381)	1(1)	1. 200 (1. 355)	94. 9(97. 4)		
3	0. 245(0. 386)	1(1)	1. 214(1. 352)	96. 9(96. 6)	96. 6	3. 7
4	0. 253(0. 378)	1(1)	1. 226(1. 369)	97. 3(99. 1)	(97. 9)	(0. 8)
5	0. 242(0. 390)	1(1)	1. 217(1. 368)	97. 5(97. 8)		

注: 括号内为苷 III 的测试数据
Note: The data in bracket is for mogroside III

8 样品测定

精确称取不同采收期、不同批号的罗汉果冻干粉 1. 0000 g, 桂林宛田乡罗汉果批号为 20041010 (50 d 果)、20041020(60 d 果)、20041030(70 d 果), 桂林两江乡罗汉果批号为 20041017 (50 d 果)、20041027(60 d 果)、20041107(70 d 果), 按 2. 3 项制备供试品溶液, 分别精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪测定, 记录色谱图, 结果见图 1。外标法定量, 计算含量, 样品测定结果见表 2。

表 2 罗汉果中的苷 II E、苷 III 的含量测定结果
Table 2 Content of mogrosides II E and III in sample

批号 No.	苷 II E Mogroside II E (%)	苷 III Mogroside III (%)	苷 V Mogroside V (%)	比色法测定总皂甙 Total saponin determined by UV-vis (%)
20041010	0. 246	0. 385	0. 45	3. 25
20041020	0. 067	0. 212	0. 83	3. 28
20041030	0. 012	0. 043	1. 23	3. 57
20041017	0. 200	0. 423	0. 55	3. 12
20041027	0. 089	0. 234	0. 89	3. 18
20041107	0. 013	0. 065	1. 45	3. 47

9 讨论

9. 1 罗汉果苷类成分紫外吸收较弱, 仅在 203 nm 弱吸收, 二极管阵列检测器较紫外检测器检测的波长范围稍宽, 在 190~ 950 nm 可检, 另外我们通过用乙腈-水取代传统的甲醇-水为流动相, 避免了溶剂峰干扰, 使罗汉果苷 II E、III 峰与杂质峰有较好分离, 达到定量测定目的。

9. 2 在供试品样品制备时, 为避免成分损失, 方法

应越简单越好, 但甲醇提取物直接进样色素等杂质干扰严重, 基线漂移。我们采用甲醇提取后过 HPD-200 大孔树脂柱脱糖除杂, 再经 330、732 阴阳离子交换柱脱色, 可大大减少杂质对苷 II E、苷 III 检测结果的影响。

9. 3 样品测定结果表明不同生长时期的罗汉果原料苷 II E、苷 III 的含量不同, 随着生长日龄增长, 罗汉果的果形大小虽不再变化, 但成分却不同, 罗汉果苷 II E、苷 III 的含量逐渐减少, 而相应罗汉果苷 V 含量增加, 这与文献报道的薄层层析定性检测结果相吻合^[2], 这也为什么未成熟罗汉果为无味的或苦味的, 而成熟罗汉果为甜味的这一事实提供科学证据。但从采用比色法^[5]测定总苷的结果来看, 变化不是很明显, 这也说明总苷的含量并不能真正反映产品的质量。

9. 4 本实验探索出的 HPLC 法测定罗汉果苷 II E、III 在果实中含量的工艺, 方法简便易行, 稳定性好, 准确度高, 适用于推广对罗汉果品质的检验、确定罗汉果的最佳采收日期以及控制罗汉果深加工产品的质量。

参考文献

1 Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Traditional Medicine(中药大辞典). Beijing: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1977. 1356 1357.

2 Li DP (李典鹏), Chen YY (陈月圆), Pan ZH (潘争红), et al. Study on variation of mogrol glycosides from fruits of Sraitia grosvenorii in different grow ages. Guihaia(广西植物), 2004, 24: 546 549.

3 Takemoto T, Ariara S, Nakajima T. et al. Studies on the constituents of fructus momordicae (I). Yakugaku Zasshi, 1983,

- 103: 1151-1156.
- 4 Xu WK(徐位坤), Mong LSH(孟丽珊), Li ZHY(李仲瑶). Isolation and identification of a bitter constituent from Luo Hanguo, s unripe fruits. *Guihaia*(广西植物), 1992, 12: 136-138.
 - 5 Gao SL(高山林), Wang H(汪红). The technique on extraction and content determine of saponin from *Momordica grosvenorii*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2000, 13(2): 36-39.
 - 6 Yu LJ(余丽娟), Chen QB(陈全斌), Yi XH(义祥辉), et al. Preparation of mogroside V from fresh fruits of Luo Hanguo by high performance liquid Chromatography. *Chin J Chromatography*(色谱), 2003, 21: 397-399.
 - 7 Li F(李锋), Li DP(李典鹏), Jiang SY(蒋水元), et al. Cultivation and development of Luo Hanguo(罗汉果栽培与开发利用). Beijing: China Forest Publishing House, 2003. 148-158.
 - 8 Matsumoto K, Kasai R, Ohtani K, et al. Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* (cucurbitaceae). *Chem Pharm Bull*, 1990, 38: 2030-2034.

(上接第 847 页)

- 2 学院学报), 1994, 15(4): 21-23.
- 3 Zhuang SH(庄世宏), Li ML(李孟楼). Ingredient analysis of prickly ash seed oil. *Acta Agric Boreo-orientalis Sinica*(西北农业学报), 2002, 11(2): 43-45.
- 4 Fan WX(范文询). α -linoleic acid and its metabolite. *Prog in Physiological Sci*(生理科学进展), 1988, (2): 112.
- 5 Zhang HM(张海满), Liu FZ(刘福祯), Dai LM(戴玲妹). Parity method of α -linolenic acid based on the theory of urea ad-dution fractionation(I) ——study on the purification process with orthogonal experiment. *China Oils and Fats*(中国油脂), 2001, 26(2): 41-44.
- 6 Zhang HM(张海满), Liu FZ(刘福祯), Dai LM(戴玲妹). Parity method of α -linolenic acid based on the theory of urea ad-dution fractionation(I) ——study on the purification process with orthogonal experiment. *China Oils and Fats*(中国油脂), 2001, 26(3): 53-54.
- 7 Zhang S(张余), Kan JQ(阚建全), Chen ZD(陈宗道). Study of separation α -linolenic acid from pricklyash seed oil with the urea-Inclusion method. *China Food Additives*(中国食品添加剂), 2004, (2): 28-31.
- 8 Han XJ(韩喜江), Xu P(徐平), Meng XL(孟祥丽), et al. Preraction of high purity linolenic acid from oil of *Lithospermum erythrorhizon* by urea inclusion and column chromatography. *J Chin Pharm Sci*, 2004, 13: 53-57.