

[饮片炮制]

HPLC-MS 法同时测定罗汉果不同部位中 4 种皂苷

邓绍倩, 李壮壮, 孙小鑫, 王晓蕾, 马文琪, 元双芝, 蒋海强, 容 蓉, 吕青涛*
(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 建立 HPLC-MS 法同时测定罗汉果 *Siraitia grosvenorii* 不同部位中 11-*O*-罗汉果苷 V、罗汉果苷 V、赛门苷 I、罗汉果苷 IV 的含有量。**方法** 罗汉果甲醇提取物的分析采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 ℃。**结果** 11-*O*-罗汉果苷 V 在 3.5 ~ 24.4 μg/mL ($r=0.995\ 5$)、罗汉果苷 V 在 4.0 ~ 193.2 μg/mL ($r=0.996\ 7$)、赛门苷 I 在 0.1 ~ 4.9 μg/mL ($r=0.995\ 9$)、罗汉果苷 IV 在 0.4 ~ 11.5 μg/mL ($r=0.995\ 5$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率 96.9 ~ 108.7%, RSD 3.2 ~ 7.5%。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于罗汉果的质量控制。

关键词: 罗汉果; 11-*O*-罗汉果苷 V; 罗汉果苷 V; 赛门苷 I; 罗汉果苷 IV; HPLC-MS

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)11-2486-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.025

Simultaneous determination of four saponins in different parts of *Siraitia grosvenorii* by HPLC-MS

DENG Shao-qian, LI Zhuang-zhuang, SUN Xiao-xin, WANG Xiao-lei, MA Wen-qi,
YUAN Shuang-zhi, JIANG Hai-qiang, RONG Rong, LÜ Qing-tao*

(School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC-MS method for the simultaneous content determination of 11-oxo- mogroside V, mogroside V, siamenside I and mogroside IV in different parts of *Siraitia grosvenorii*. **METHOD** The analysis of methanol extract of *S. grosvenorii* was performed on a 30 ℃ Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm), with the mobile phase comprising of 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile flowing at 0.5 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** 11-oxo- mogroside V, mogroside V, siamenside I and mogroside IV showed good linear relationships within the ranges of 3.5 – 24.4 μg/mL ($r=0.995\ 5$), 4.0 – 193.2 μg/mL ($r=0.996\ 7$), 0.1 – 4.9 μg/mL ($r=0.995\ 9$) and 0.4 – 11.5 μg/mL ($r=0.995\ 5$), whose average recoveries were 96.9 – 108.7% with the RSDs of 3.2 – 7.5%, respectively. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *S. grosvenorii*.

KEY WORDS: *Siraitia grosvenorii*; 11-oxo- mogroside V; mogroside V; siamenside I; mogroside IV; HPLC-MS

罗汉果为葫芦科植物罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex A. M. Lu et Z. Y. Zhang 的干燥果实, 性甘、凉, 具有清热润肺、利咽开音、滑肠通便的功效^[1-3]。罗汉果为我国特有的经济和

药用植物, 主产于广西, 在广西民间的药用历史已有 300 多年, 具有良好的医用保健价值^[5-6]。罗汉果苷类、黄酮类、脂肪酸等是其主要特征性成分, 而其中药用活性成分葫芦烷型三萜皂苷主要包括

收稿日期: 2018-03-29

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX09711001-003-004); 山东省重点研发计划 (2017CXGC1309); 山东中医药大学大学生研究训练计划项目 (2017016)

作者简介: 邓绍倩 (1996—), 女, 主要从事天然药物化学成分及化学分析研究。Tel: 17864190515, E-mail: 2944163539@qq.com

* 通信作者: 吕青涛 (1965—), 男, 博士, 教授, 主要从事天然药物化学成分及化学分析研究。Tel: 13905316839, E-mail: luqing-tao9@163.com

11-*O*-罗汉果苷 V、罗汉果苷 V、赛门苷 I、罗汉果苷 IV 等^[4]。现代药理研究证明,这些成分具有抗菌消炎、降血压、降血脂、抗氧化、抗癌等作用。因其具有高甜度、低卡路里的特点,亦可被用作新型甜味剂^[7-9]。

目前对罗汉果主要皂苷成分的含有量测定方法主要以 HPLC 为主,采用 HPLC-MS 分析的较少^[10-12],且这 4 种罗汉果皂苷具有相似的结构,仅用高效液相色谱很难得到满意的分离结果;灵敏度不高是另一个问题,在复杂的实际样品中含有量较低,响应值不高;加之检测波长在 210 nm 以下,背景干扰也较大。本实验利用 HPLC-MS 测定了 3 个批次罗汉果不同部位中 4 种皂苷的含有量,为罗汉果的应用及质量控制与评价提供了实验基础和理论依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪、G6420A 型三重四级杆质谱联用仪、Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm)(美国 Agilent 公司);AE240 型电子天平(十万分之一,瑞士特勒公司);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);QE-200 型高速粉碎机(浙江屹立工贸有限公司)。

1.2 试药 罗汉果苷 V(批号 527A022)对照品

表 1 各成分质谱参数

Tab. 1 HPLC-MS data of various constituents

成分	分子量	保留时间/min	母离子/(<i>m/z</i>)	子离子/(<i>m/z</i>)	裂解电压/V	碰撞能/V
11- <i>O</i> -罗汉果苷 V	1 285.43	5.93	1 283.5	959.0	280	75
罗汉果苷 V	1 287.43	7.30	1 285.6	961.4	260	60
赛门苷 I	1 125.29	9.17	1 123.6	799.5	260	15
罗汉果苷 IV	1 125.29	10.82	1 123.6	799.5	220	60

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液配制 分别精密称取“1.2”项下的 4 种皂苷对照品适量,加甲醇溶解并稀释制成含 11-*O*-罗汉果苷 V 0.95 mg/mL、罗汉果苷 V 2.06 mg/mL、赛门苷 I 0.39 mg/mL、罗汉果苷 IV 0.53 mg/mL 的混合对照品贮备液。精密吸取贮备液用甲醇稀释,依次逐级稀释 2 倍,得到系列等比质量浓度混合对照品溶液,分别含 11-*O*-罗汉果苷 V(0.095、0.048、0.024、0.012、0.006、0.003、0.001 mg/mL)、罗汉果苷 V(0.206、0.103、0.052、0.026、0.013、0.006、0.003 mg/mL)、赛门 I(0.039、0.020、0.010、0.005、0.002、0.001、0.000 6 mg/mL)、罗汉果苷 IV(0.053、0.027、

(北京索莱宝科技有限公司,含有量≥98%);11-*O*-罗汉果苷 V(批号 C2708Y46683)、罗汉果皂苷 IV(批号 Y20FBY29522)、赛门苷 I(批号 M02D7S26085)对照品(上海源叶生物科技有限公司,含有量≥98%)。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯(美国 Thermo Fisher 公司);水为实验室自制超纯水。3 批次罗汉果药材均购于山东中医药大学附属医院药房,经山东中医药大学李峰教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm);流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0.00~15.00 min, 20%~26% B;15.00~15.01 min, 26%~100% B;15.01~25.00 min, 100% B);体积流量 0.5 mL/min;柱温 30℃;进样量 2 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子模式;多反应离子监测(MRM);干燥气温度 350℃;雾化气压力 314.325 kPa;氮气体积流量 8 L/min;电子扫描电压-3 500 V。监测离子对、裂解电压、碰撞能见表 1。4 种待测成分二级质谱图见图 1。

0.013、0.007、0.003、0.002、0.000 8 mg/mL),0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.2 供试品溶液制备 取“1.2”项下罗汉果样品,分取果瓢、果皮、种子 3 个部位,分别粉碎,过 40 目筛,分别取不同部位药材粉末 1.00 g,精密称定后置具塞锥形瓶内,精密加入甲醇 100 mL,称定质量,超声(200 W, 40 kHz)提取 30 min,取出放置室温,补足失去的质量,溶液过滤后再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 空白对照溶液 取纯甲醇作为空白对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、定量限和检测限 取“2.2.1”

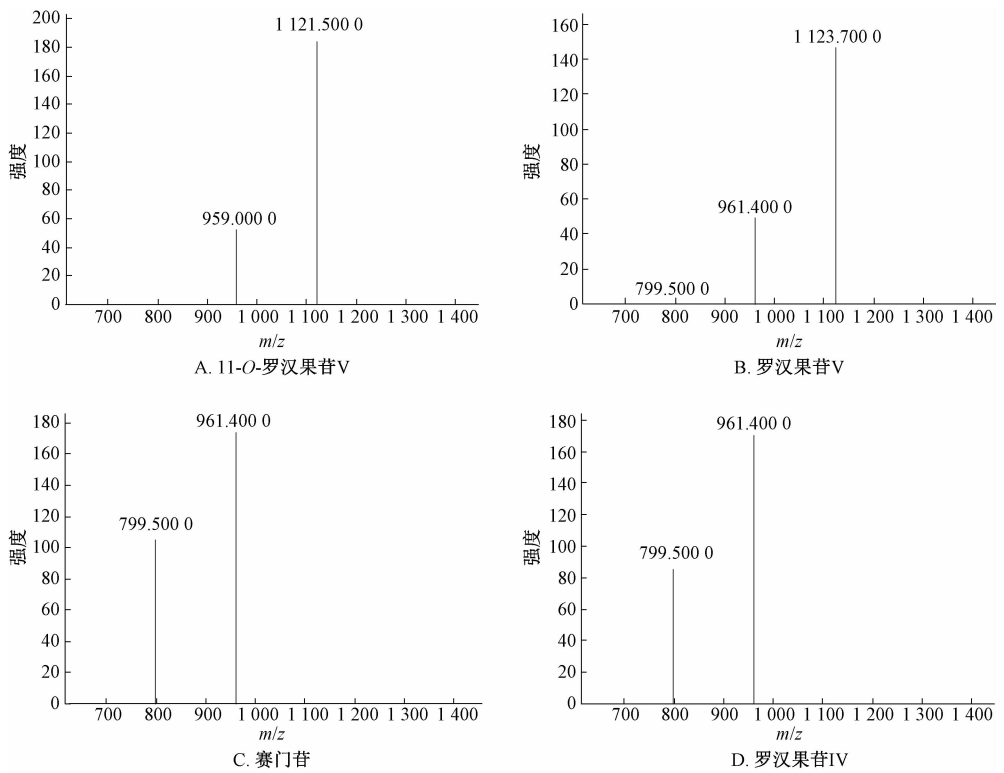


图 1 各成分对照品二级质谱图

Fig. 1 Second mass spectrum of reference substances of various constituents

项下混合对照品溶液，按“2.1”项下条件测定。以各组分的质量浓度为横坐标（ X ），相应峰面积为纵坐标（ Y ），得回归方程及相关系数；将混合对照品溶液逐步稀释，分别以信噪比 $S/N = 10$ 和 $S/N = 3$ 时各组分的浓度作为定量限（LOQ）和检测限（LOD），结果见表 2。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents					
成分	回归方程	r	线性范围/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
11-O-罗汉果苷 V	$Y = 110\,042X + 254.17$	0.995	0.001 ~ 0.095	0.000 05	0.000 18
罗汉果苷 V	$Y = 56\,284X + 227.04$	0.997	0.003 ~ 0.206	0.000 11	0.000 36
赛门苷 I	$Y = 221\,298X + 177.40$	0.996	0.000 6 ~ 0.039	0.000 03	0.000 09
罗汉果苷 IV	$Y = 116\,398X + 131.72$	0.995	0.000 8 ~ 0.053	0.000 05	0.000 20

2.3.2 方法专属性试验 分别取“2.2”项下空白对照溶液、混合对照品溶液、3 个批次各个不同部位制备的供试品溶液，在“2.1”项条件下进样。各成分峰形良好，与相邻峰之间的分离度均在 1.5 以上，基本无杂质干扰且基线平稳，空白对照样品溶液、对照品和样品的多反应监测模式（MRM）提取色谱图见图 2。

2.3.3 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液连续 6 次进样，测得 11-O-罗汉果苷 V、罗汉果苷 V、赛门苷 I、罗汉果苷 IV 峰面积的 RSD 分别为 1.7%、3.2%、1.9%、5.4%，表明该仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液，在室温下放置 0、6、12、18、24 h，在“2.1”项条件下进样测得 11-O-罗汉果苷 V、罗汉果苷 V、赛门苷 I、罗汉果苷 IV 峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.3%、1.9%、1.5%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批次的罗汉果样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，在“2.1”项条件下进样测得 11-O-罗汉果苷 V、罗汉果苷 V、赛门苷 I、罗汉果苷 IV 峰面积的 RSD 分别为 3.6%、1.7%、1.1%、4.4%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取“2.2.2”项下同一批次已知含有量的果瓢样品粉末 9 份，每 3 份为 1 组，分别向其中精密加入供试品中相应成分 150%、100%、50% 3 个水平的混合对照品溶液适

量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。在“2.1”项条件下进样，计算加样回收率，结果见表 3。

表 3 各成分加样回收率试验结果 (n=3)
Tab. 3 Results of recovery tests for various constituents (n=3)

成分	添加水平	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
11- <i>O</i> -罗汉果苷 V	1 : 1.5		0.030	0.057 2	109.2	108.7	0.961
	1 : 1	0.024 4	0.020	0.045 9	107.5		
	1 : 0.5		0.010	0.035 3	109.4		
罗汉果苷 V	1 : 1.5		0.280	0.472 4	99.7	98.3	1.30
	1 : 1	0.193 2	0.190	0.377 9	97.2		
	1 : 0.5		0.090	0.281 4	98.0		
赛门苷 I	1 : 1.5		0.007	0.011 8	98.1	96.9	1.49
	1 : 1	0.004 9	0.004	0.008 8	97.3		
	1 : 0.5		0.002	0.006 8	95.3		
罗汉果苷 IV	1 : 1.5		0.010	0.016 9	99.0	102.4	2.89
	1 : 1	0.007 0	0.007	0.014 3	104.3		
	1 : 0.5		0.003	0.010 1	103.9		

表 4 各成分含有量测定结果 (mg · mL⁻¹)

Tab. 4 Results of content determination of various constituents (mg · mL⁻¹)

样品		11- <i>O</i> - 罗汉果苷 V	罗汉果苷 V	赛门苷 I	罗汉果苷 IV
部位	批次				
果瓢	170101	0.024 4	0.193 2	0.004 9	0.007 0
	170401	0.014 9	0.130 1	0.003 1	0.011 5
	170606	0.021 5	0.165 7	0.003 6	0.005 5
	平均值	0.020 3	0.163 0	0.003 9	0.008 0
		0.003 5	0.128 6	0.002 8	0.006 5
果皮	170101	0.003 5	0.128 6	0.002 8	0.006 5
	170401	0.014 2	0.126 8	0.003 3	0.008 7
	170606	0.004 3	0.059 7	0.000 4	0.001 2
	平均值	0.007 3	0.105 0	0.002 2	0.005 5
种子	170101	0.003 5	0.045 2	0.000 4	0.002 2
	170401	0.007 9	0.074 5	0.000 7	0.001 5
	170606	0.004 3	0.044 0	0.000 1	0.000 4
	平均值	0.005 2	0.054 6	0.000 4	0.001 4

3 讨论

3.1 色谱、质谱条件选择 对质谱参数进行优化，通过流动注射将标准品溶液直接注射进入质谱仪，在正负离子模式下进行全扫描。结果表明在负离子模式下，[M-H]⁻为最高强度峰。在选择母离子之后，优化碎裂电压和碰撞能，得到各个皂苷所对应的响应值较高的特征子离子。参考 2015 版《中国药典》罗汉果的色谱条件，流动相最终选用 0.1% 甲酸水-乙腈体系。

3.2 检测器选择 罗汉果皂苷的紫外吸收较弱，一般为 203 nm 左右。但在该波长下，背景干扰较大影响检测的灵敏度和方法的检测限。罗汉果苷 V 含有量最高，可检测出来，而 11-*O*-罗汉果

2.3.7 样品含有量测定 取“2.2.2”项下供试品溶液，在“2.1”项条件下测定峰面积，根据标准曲线计算含有量，结果见表 4。

量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。在“2.1”项条件下进样，计算加样回收率，结果见表 3。

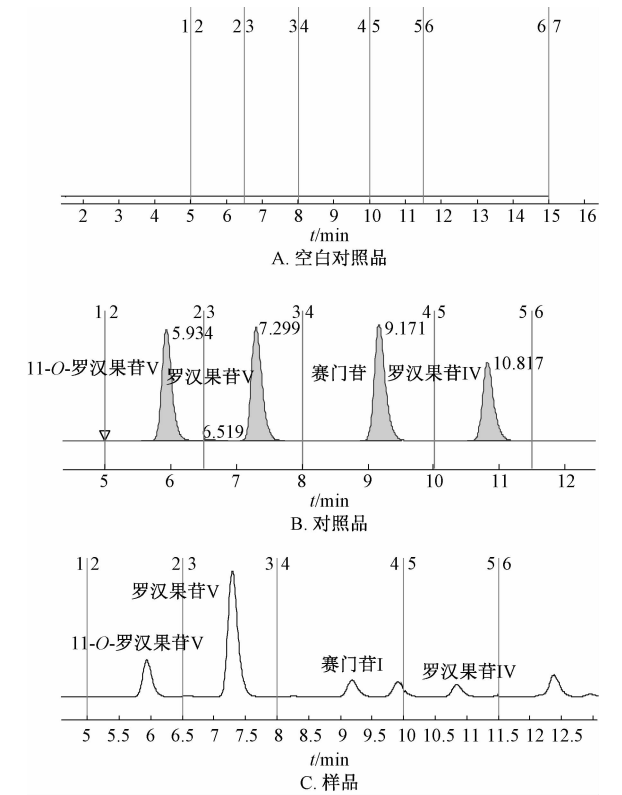


图 2 各成分多反应监测模式提取色谱图
Fig. 2 Multiple-reaction monitoring chromatograms of various constituents

苷 V、赛门苷 I、罗汉果苷 IV 的含有量较低，响应值太低。三重四极杆 HPLC-MS 技术具有定量分析灵敏度高、选择性好，抗干扰能力强的优点^[13-14]，目前广泛应用于天然药物的成分含有量测定及体内药物血药浓度及代谢产物的定量分析中^[15]。本实验选择了三重四级杆质谱检测器，利用多反应监测模式进行定量分析，实验证明效果较好。

3.3 提取方法选择 在参考相关文献的基础上，对比甲醇、乙醇的提取效率，以甲醇为提取溶剂，提取的较完全，杂质少，故选用甲醇作提取溶剂。同时考察了超声提取、加热回流提取，发现超声提取法较加热回流提取法的效果好，且前者速率快，操作简便，因而采用超声甲醇提取的方法。

3.4 小结 由于中药材的化学成分复杂，药材不同部位的相对含有量亦不同，仅检测药材中单一成分或单一部位中成分的含有量，对药材的质量控制与评价不够全面、充分^[16]。本文利用 HPLC-MS，结合多反应监测模式，建立了同时测定罗汉果不同部位中 4 种皂苷的定量方法，并测定了 3 个批次罗汉果不同部位中的含有量，可用来较全面地评价罗汉果药材的质量，为其应用提供实验依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：212.
[2] 梁琨，孙辉，安叡，等. LC-MS/MS 法同时测定护心口服液中 11 种成分 [J]. 中成药，2018，40（1）：105-109.

[3] 黄秋妹，郇艳妮，朱艳琳，等. UPLC-QQQ-MS 法同时测定片仔癀中 13 种成分 [J]. 中成药，2018，40（1）：101-105.
[4] 张庆莲，黄娟，吴智惠，等. 罗汉果的药理及开发应用的研究概况 [J]. 药学研究，2017，36（3）：164-165，186.
[5] 赵妍，张梅，任爱农，等. LC-MS/MS 分析大鼠口服清清颗粒后血浆中 9 种成分的药代动力学 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（1）：85-90.
[6] 赵秀玲. 罗汉果生理活性成分研究进展 [J]. 包装与食品机械，2015，33（3）：54-57.
[7] 潘俊，潘聿，肖丹，等. LC-MS/MS 法同时测定滇龙胆中 4 种苯甲酸酯类成分 [J]. 中成药，2014，36（12）：2550-2553.
[8] 覃俏峰，蓝晓庆，温庆伟，等. HPLC-ELSD 测定复方罗汉果止咳冲剂中罗汉果皂苷 V 的含量 [J]. 中国现代应用药学，2014，31（7）：850-852.
[9] 周凌，朱吟吟. HPLC-MS 考察真空低温干燥法对罗汉果中 10 个皂苷含量的影响 [J]. 药物分析杂志，2014，34（2）：275-280.
[10] 张维，王斌，周丽，等. 罗汉果成分及药理研究进展 [J]. 食品工业科技，2014，35（12）：393-397.
[11] 何伟平，朱晓韵，何超文. 罗汉果的功能作用及食品应用研究进展 [J]. 轻工科技，2012，28（1）：1-3.
[12] 张文清. 罗汉果中活性成分的高效液相色谱测定与指纹图谱研究 [J]. 湖北农业科学，2011，50（18）：3826-3827，3831.
[13] 陈瑶，贾恩礼. 罗汉果化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 解放军药学报，2011，27（2）：171-174.
[14] 周小雷，王硕，陈路，等. HPLC 法测定不同罗汉果品系甜苷 V 的含量 [J]. 现代预防医学，2011，38（5）：924-926.
[15] 李良，吕国红，钟晓凌，等. 罗汉果植物保健饮料的研制 [J]. 饮料工业，2010，13（10）：30-33.
[16] 肖聪. HPLC 法测定不同规格和不同部位罗汉果药材中罗汉果苷 V 的含量 [C] // 中华中医药学会第九届中药鉴定学术会议论文集. 北京：中华中医药学会.