

基于UPLC-MS/MS法对17种罗汉果苷含量的测定

王哲斐¹, 裴继影², 卢歆怡³, 李检秀^{4*}, 谢能中^{4*}, 蒋水元⁵, 蒙健宗^{1,6*}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530003) (2. 广西大学海洋学院, 广西南宁 530003)
(3. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530003) (4. 非粮生物质能技术全国重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西科学院, 广西南宁 530007) (5. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006) (6. 广西农业职业技术大学食品药品研究院, 广西南宁 530007)

摘要: 为建立高效快速的检测方法, 该研究应用靶向代谢组学技术, 通过超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪, 分析比较罗汉果中 17 种罗汉果苷的含量差异以及罗汉果果实发育过程中的变化趋势。结果表明 17 种罗汉果苷在线性范围内都呈现良好的线性关系 ($R>0.990$), 平均加标回收率均高于 95%。在 17 种罗汉果苷的不同线性范围下, 检测限最低和最高分别为 0.047 和 3.834 $\mu\text{g/L}$, 定量限最低和最高分别为 0.158 $\mu\text{g/L}$ 和 12.780 $\mu\text{g/L}$ 。罗汉果果实生长前期 15~30 d 罗汉果苷主要以罗汉果苷 IIe 为主, 并持续积累。果实生长中期 30~50 d 时罗汉果苷 III 等逐渐积累, 随果实生长向赛门苷 I 等转化。果实生长 50~70 d 时, 赛门苷 I 等糖基化生成罗汉果苷 V 等。果实生长后期 70~90 d 通过糖基化生成罗汉果苷 V 为主的皂苷积累量达到最高后趋于稳定。本研究基于 UPLC-MS/MS 建立的罗汉果苷分离检测方法, 可同时对罗汉果样品中多个同分异构体苷进行定性定量分析, 检测方法高效、灵敏、精准。

关键词: 罗汉果; 罗汉果苷; 超高效液相色谱串联质谱; 四环三萜皂苷

文章编号: 1673-9078(2025)06-286-297

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0229

Determination of 17 Mogrosides by UPLC-MS/MS

WANG Zhefei¹, PEI Jiying², LU Xinyi³, LI Jianxiu^{4*}, XIE Nengzhong^{4*},
JIANG Shuiyuan⁵, MENG Jianzong^{1,6*}

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530003, China) (2. College of Marine Sciences, Guangxi University, Nanning 530003, China) (3. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530003, China) (4. National key Laboratory of Non-food Biomass Energy Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, 98 Daling Road, Nanning 530007, China) (5. Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China) (6. Institute of Food & Pharmaceutical Science, Guangxi Vocational University of Agriculture, Guangxi 530007, China)

引文格式:

王哲斐,裴继影,卢歆怡,等.基于UPLC-MS/MS法对17种罗汉果苷含量的测定[J].现代食品科技,2025,41(6):286-297.

WANG Zhefei, PEI Jiying, LU Xinyi, et al. Determination of 17 mogrosides by UPLC-MS/MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 286-297.

收稿日期: 2024-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21868007); 广西创新驱动发展专项资金项目 (桂科 AA19254025); 中国科学院科技服务网络计划 STS 项目 (KFJ-STG-QYZD-200; KFJ-STG-QYZD-201); 广西自然科学基金项目 (2021GXNSFBA196087; 2021AC19176); 广西重点研发计划项目 (桂科 AB19259001); 广西科学院基金项目 (CQ-D-2415; 2021YFJ1210); 南宁市科学研究与技术开发计划项目 (20206057); 广西农业职业技术大学科研项目 (XKJ2320)

作者简介: 王哲斐 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物工程, E-mail: Zhef_W001@163.com

通讯作者: 李检秀 (1985-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然代谢产物和合成生物学研究, E-mail: jianxiuli@gxas.cn; 共同通讯作者:

蒙健宗 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物工程技术研究, E-mail: meng_jz@163.com

Abstract: Mogrosides are a class of tetracyclic triterpenoid saponins found predominantly in *Siraitia grosvenorii* (Luo Han Guo), a fruit widely used in traditional Chinese medicine. In this study, an efficient and rapid detection method was developed to detect 17 kinds of mogrosides in *S. grosvenorii* using ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) combined with targeted metabolomics and their variations during fruit development. The results demonstrated that the 17 mogrosides exhibited good linearity ($R>0.990$) within their detection ranges, with the average spiked recovery rate exceeding 95%. In the different linear ranges of the mogrosides, detection limits were between 0.047 and 3.834 $\mu\text{g/L}$, while quantitation limits were between 0.158 and 12.780 $\mu\text{g/L}$. At the early fruit growth stage (15 to 30 d) of *S. grosvenorii*, mogroside IIe was the predominant mogroside that continued to accumulate. At the middle growth stage (30 to 50 d), mogroside III and other mogrosides gradually accumulated. As the fruit continued to grow, these mogrosides transformed into various compounds, such as siamenoside I. At 50 to 70 d, compounds such as siamenoside I glycosylated to generate mogrosides, including mogroside V. In the final growth stage (70 to 90 d), saponin accumulation mainly consisted of mogroside V, generated through glycosylation, which reached its peak and then stabilized. The proposed method offers an ideal approach for qualitative and quantitative analysis of multiple isomers of mogrosides in *S. grosvenorii* samples, providing high sensitivity and accuracy.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; mogrosides; ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry; triterpenoid saponins

罗汉果 [*Siraitia grosvenorii* (Swingle.) C. Jeffrey] 学名“光果木鳖”，为葫芦科多年生藤本植物的果实^[1]，属于中国特有的经济和药用植物^[2]。现代药理学研究证明罗汉果苷和罗汉果多糖具有抗氧化^[3,4]及提高免疫力^[5,6]、降血糖^[7,8]、调血脂^[9]、保肝^[10]、抗肿瘤^[11]等多种生理活性。研究发现，罗汉果的主要活性成分是葫芦烷型四环三萜类皂苷^[12]。1977年，日本学者竹本常松首次将罗汉果苷 IV、罗汉果苷 V、罗汉果苷 VI 从罗汉果中提取出来，并发现它们的苷元结构—罗汉果醇^[13]。至今已从罗汉果植株中发现 40 多种皂苷成份^[14]。罗汉果苷 V 是罗汉果中主要甜味成分，具有高甜度、低能量、安全无毒、可为糖尿病和肥胖病人食用等特点，成为国际市场中炙手可热的植物提取物，需求量逐步提升^[15]。2020 年，全球罗汉果甜苷市场规模超过 10 亿美元，年复合增长率超过 40%^[16]。

罗汉果苷主要是葫芦烷型四环三萜皂苷，由葫芦烯二醇和糖苷组成，C-7、C-11 位羟基构型及 C-3、C-24 位葡萄糖基结合方式和数量的不同，导致罗汉果苷的甜度、口感、生物活性和药用价值上的差异。然而，结构上的相似性对其分离纯化造成了一定的干扰^[17]，且罗汉果苷的紫外检测波长低于 210 nm，背景干扰大，仅用高效液相色谱法很难获得最佳的检测和分离结果。代谢组学作为获得代谢信息和显著识别不同代谢物的常用技术，广泛用于鉴定和量化植物和食品等的代谢物研究^[18]。靶向代谢组学通常针对某个代谢通路或某些感兴趣的已知

代谢物进行高灵敏度检测和准确定量分析^[19]，目前 LC-MS 普遍适用于极性和非极性化合物的靶向代谢组学分析^[20]。液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS) 集液相色谱的高效、快速分离效能与质谱高灵敏度、高专属性等优点于一体，已成为广泛使用的一种代谢物检测手段^[21]。牟俊飞等^[22]通过 HPLC-MS 法分析比较了不同产地罗汉果中 6 种罗汉果苷的含量及该 6 种成分在提取和纯化过程中的含量变化，为罗汉果种植和生产提供质量控制方法。邓绍倩等^[23]利用 HPLC-MS 测定了罗汉果不同批次、不同部位 4 种皂苷的含量，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。周凌等^[24]利用 HPLC-MS，建立了 10 种罗汉果苷的分析方法，为科学加工罗汉果提供了定性定量分析的手段与依据。Luo 等^[25]通过 LC-MS-MS 建立了 8 种罗汉果苷及市售甜味剂的检测方法，以此考察罗汉果中 8 种罗汉果苷含量与市售甜味剂含量的差异，并为罗汉果及市售甜味剂的质量控制提供理论依据。普遍采用的质谱串联技术，大幅度提高了检测的灵敏度和准确性；采用正负极快速转化和实时动态检测技术，极大地增加了所能检测到的代谢产物的数量。因 UPLC-MS/MS 具有定量分析灵敏度高、专属性强等特点，目前被广泛应用于天然药物的成分含量测定及体内药物血药浓度及代谢产物的定量分析中^[26]。

为探究罗汉果果实生长发育过程中各罗汉果苷的含量变化及趋势，需建立快速有效的检测方法，对各罗汉果苷进行定量检测。本实验采用 UPLC-

MS/MS 方法对桂林地区罗汉果果实不同发育阶段罗汉果苷组分差异和含量变化趋势进行研究。通过对特定代谢通路生物合成途径中 17 种罗汉果苷的定性定量检测, 分析罗汉果不同生长时期代谢表型差异, 以解析罗汉果苷代谢合成路径, 探究不同罗汉果苷含量变化与果实生长发育之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

用于本实验研究的罗汉果样品(青果皮扦插苗的果实, 品种来源: 龙胜)采摘于中国科学院广西桂林植物研究所, 详细信息见表 1。

表 1 样品采集信息
Table 1 Samples collection information

品种	简写	采集组织部位	生长时间/d	采摘日期	备注
龙胜	A	果实	15	2020.08.06	2020.7.22 授粉
			30	2020.08.21	
			50	2020.09.10	
			70	2020.09.30	
			90	2020.10.20	

1.2 试剂

罗汉果醇(批号 PRF20032301)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 Ia1(批号 PRF10110841)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 Ie1(批号 PRF20070844)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 IIa(批号 PRF10010303)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 IIe(批号 PRF9012003)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 11-O-IIa(批号 PRF10011603)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 III(批号 PRF10110743)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 11-O-IIIe(批号 PRF10081441)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 IVa(批号 PRF10050743)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、赛门苷 I(批号 PRF9120401)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 V(批号 PRF10102441)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯), 成都普瑞法生物科技有限公司; 罗汉果苷 IIa1(批号 MUST-20041808)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 IIa2(批号 MUST-20071501)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 11-O-III(批号 MUST-

20081211)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 IVe(批号 MUST-20072608)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 11-O-V(批号 MUST-20072707)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯)、罗汉果苷 VI(批号 MUST-20041213)对照品($\geq 98\%$, HPLC 色谱纯), 成都曼斯特生物科技有限公司; 甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯), 美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 主要仪器

Agilent 1290 超高效液相色谱仪、G6470A 型三重四极杆串联质谱仪, 美国 Agilent Technologies 公司; FA-2004 型电子天平, 上海衡平仪器仪表厂; 超声波清洗器, 深华泰超声洗净设备有限公司; FC-12A-E 型冷冻真空干燥仪, 西盟(中国)公司; SCIENTZ-48 型高通量研磨仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Centrifuge5424R 型低温冷冻离心机, 艾本德(中国)公司; 超纯水系统, 威立雅水处理技术(上海)有限公司。

1.4 溶液的制备

1.4.1 混合对照品溶液配制

用甲醇溶液将罗汉果醇、罗汉果苷 Ia1、罗汉果苷 Ie1、罗汉果苷 IIa、罗汉果苷 11-O-IIa、罗汉果苷 IIa1、罗汉果苷 IIa2、罗汉果苷 IIe、罗汉果苷 III、罗汉果苷 11-O-IIIe、罗汉果苷 11-O-III、赛门苷 I、罗汉果苷 IVa、罗汉果苷 IVe、罗汉果苷 V、罗汉果苷 11-O-V、罗汉果苷 VI 对照品溶解, 均配制成 1 000 mg/L 的单一对照品储备液, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存。精密吸取上述 17 种单一对照品储备液各 0.45 mL 混合, 50% 甲醇水溶液(V/V)定容制成混合对照品溶液, 混合对照品储备液中各罗汉果苷质量浓度均为 50 mg/L。精密吸取混合对照品储备液用 50% 甲醇水溶液(V/V)梯度稀释, 分别得到 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L 不同质量浓度的混合对照品溶液。

1.4.2 供试品溶液

参考 Qiao 等^[27]处理方法并做改进, 取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏样品放置真空冷冻干燥仪脱水干燥 72 h, 研钵初研后加适量钢珠转入高通量研磨仪, 研磨后样品过 60 目筛。准确称取 50 mg 过筛粉末于 2 mL 离心管中, 加入 0.5 mL $\varphi=80\%$ 甲醇水溶液, 涡旋震荡。室温下超声提取 10 min, 样品置低温冷冻离心机

12 000 r/min 离心 10 min, 转移上清液。重复提取 2 次, 合并 3 次提取液, 氮吹仪吹干上清液, 样品用 0.5 mL $\varphi=50\%$ 甲醇水溶液复溶、低温冷冻离心机 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清过滤供 UPLC-MS/MS 分析。

1.4.3 质控 (QC) 样品溶液

每个样品粉末精密称取 10 mg, 涡旋震荡混匀制作 QC 样品。质控样品提取处理步骤和“1.4.2”相同。

1.4.4 空白对照溶液

实验用 $\varphi=50\%$ 甲醇水溶液 (V/V) 作为空白对照溶液。

1.5 色谱条件

1.5.1 超高效液相色谱条件

色谱柱: Poroshell 120 SB-C18 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流量 0.2 mL/min, 进样体积 2 μ L。流动相: 二元梯度模式, A: 超纯水 (含 $\varphi=0.1\%$ 甲酸溶液); B: 乙腈。梯度洗脱程序: 0.00~8.00 min, 25% B; 8.00~11.00 min, 25%~80% B; 11.00~16.60 min, 80% B; 16.60~20.00 min, 80%~25% B; 20.00~23.00 min, 25% B。

1.5.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI), 负离子扫描模式, 选择离子监控模式 (SIM) 和多重反应监测采集模式 (MRM), 鞘气温度 250 $^{\circ}$ C; 鞘气流速 11 L/min; 喷嘴电压 500 V; 雾化气压力 35 psi; 干燥气流量 5 L/min; 干燥气温度 300 $^{\circ}$ C。

1.6 方法学考察

1.6.1 线性关系

按“1.5”项条件, 进样体积 2 μ L, 依次对“1.4.1”项配制的不同质量浓度的 17 种混合对照品溶液 (0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L) 进样检测, 平行进样三次, 峰面积取平均值进行计算。以峰面积为纵坐标 (y), 浓度为横坐标 (x), 制作标准曲线, 得到 17 种化合物的回归方程及相关系数。实验以 50% 甲醇水溶液 (V/V) 作为空白对照。

1.6.2 检测限、定量限、精密度、稳定性、重复性实验

按“1.5”项条件, 进样体积 2 μ L, 依次对“1.4.1”项配制的不同质量浓度的 17 种混合对照品溶液 (0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L) 进样检测, 对 17 种罗汉果苷的检测限 (LOD)、方法定量限 (LOQ) 进行考察。

以同一份 QC 样品进行重复进样 6 次, 按“1.5”项条件, 测定 17 种罗汉果苷的峰面积并计算峰面积的相对标准偏差 (RSD), 以考察仪器的精密度。

取 QC 样品按“1.4.2”项方法制备供试品溶液 6 份, 在“1.5”项条件下测定峰面积并计算含量, 以考察检测方法的重复性。

取在室温下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h 时间段的同一份质控 QC 样品溶液并对其进行测定, 以考察样品溶液的稳定性。

1.7 数据分析

本实验采用 Analyst Software 软件进行采集数据, 用 Origin 软件和 Excel 办公软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 液相色谱分离条件的优化

考察 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱和 Agilent Zorbax C18 色谱柱的分离效果, 如图 1 所示。Poroshell 120 SB-C18 色谱柱 (a) 与 Zorbax C18 色谱柱 (b) 相比可分离出更多物质峰、峰型对称且尖锐, 因此 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱 (a) 的分离效果略好于 Agilent Zorbax C18 色谱柱 (b), 故选择使用 Agilent Poroshell 120 SB-C18 (a) 作为分析色谱柱。

空白对照溶液 (a)、混合对照品溶液 (b)、供试品溶液 (c) 的多反应监测模式提取总离子图如图 2 所示。结果表明, 该洗脱程序具有较好分离效果, 各物质的保留时间稳定, 峰型单一且尖锐。因供试品溶液中罗汉果醇含量较低, 故总离子色谱图中峰型不明显。本实验为消除基质效应的影响, 使用基质匹配标准工作溶液外标法进行定量, 即供试品溶液、混合对照品溶液均采用空白对照溶液作为稀释液, 使其具有相同的离子化条件。

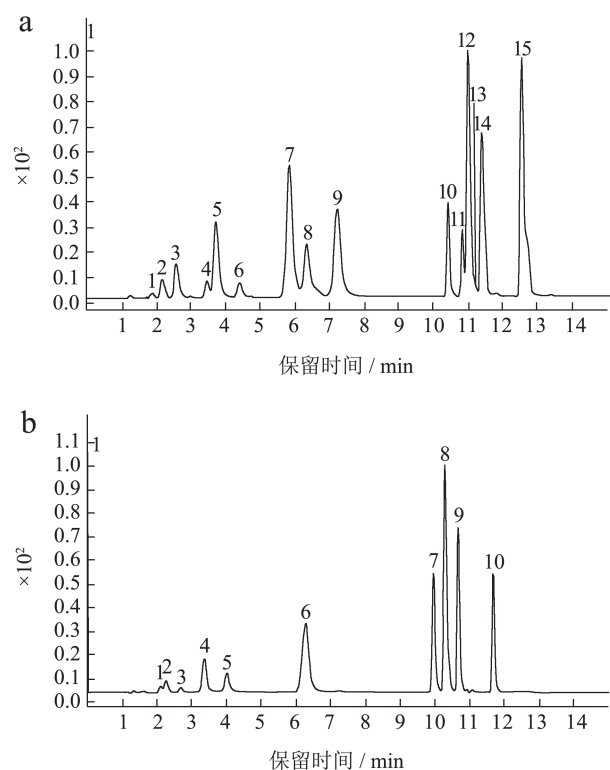


图 1 混合对照品溶液总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of reference solution

注: (a) Poroshell 120 C18 色谱柱混合对照品溶液总离子流图, 1. 罗汉果苷 VI, 2. 罗汉果苷 11-O-V, 3. 罗汉果苷 V, 4. 赛门苷 I, 5. 罗汉果苷 IVa, 6. 罗汉果苷 IVe, 7. 罗汉果苷 III, 8. 罗汉果苷 11-O-IIIe, 9. 罗汉果苷 11-O-III, 10. 罗汉果苷 IIe, 11. 罗汉果苷 IIa2, 12. 罗汉果苷 IIa/11-O-IIa/IIa1, 13. 罗汉果 Ie1, 14. 罗汉果 Ia1, 15. 罗汉果醇。(b) Zorbax C18 色谱柱混合对照品溶液总离子流图, 1. 赛门苷 I, 2. 罗汉果苷 IVa, 3. 罗汉果苷 IVe, 4. 罗汉果苷 III, 8. 罗汉果苷 11-O-IIIe/11-O-III, 6. 罗汉果苷 IIe, 7. 罗汉果苷 IIa2, 8. 罗汉果苷 IIa/11-O-IIa/IIa1, 9. 罗汉果 Ia1/Ie1, 10. 罗汉果醇。

2.2 质谱检测条件的优化

通过全扫描模式确定适合的离子模式和母离子信息, 再进行二级扫描选择 1 个信号最优的碎片离子作为定量离子对裂解电压、碰撞能量等进行优化得到质谱各参数。多反应监测 (MRM) 模式有利于提高对复杂样品中痕量目标化合物的定性定量。17 种罗汉果苷监测离子对、裂解电压、碰撞能、各物质保留时间详见表 2。各物质离子信息见图 3。

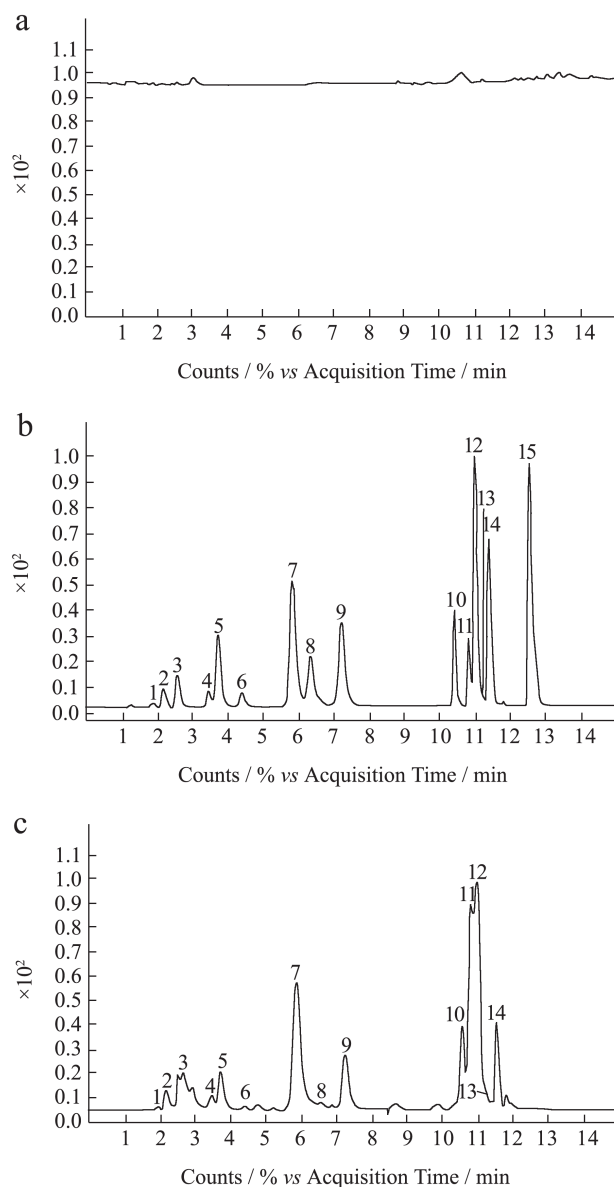
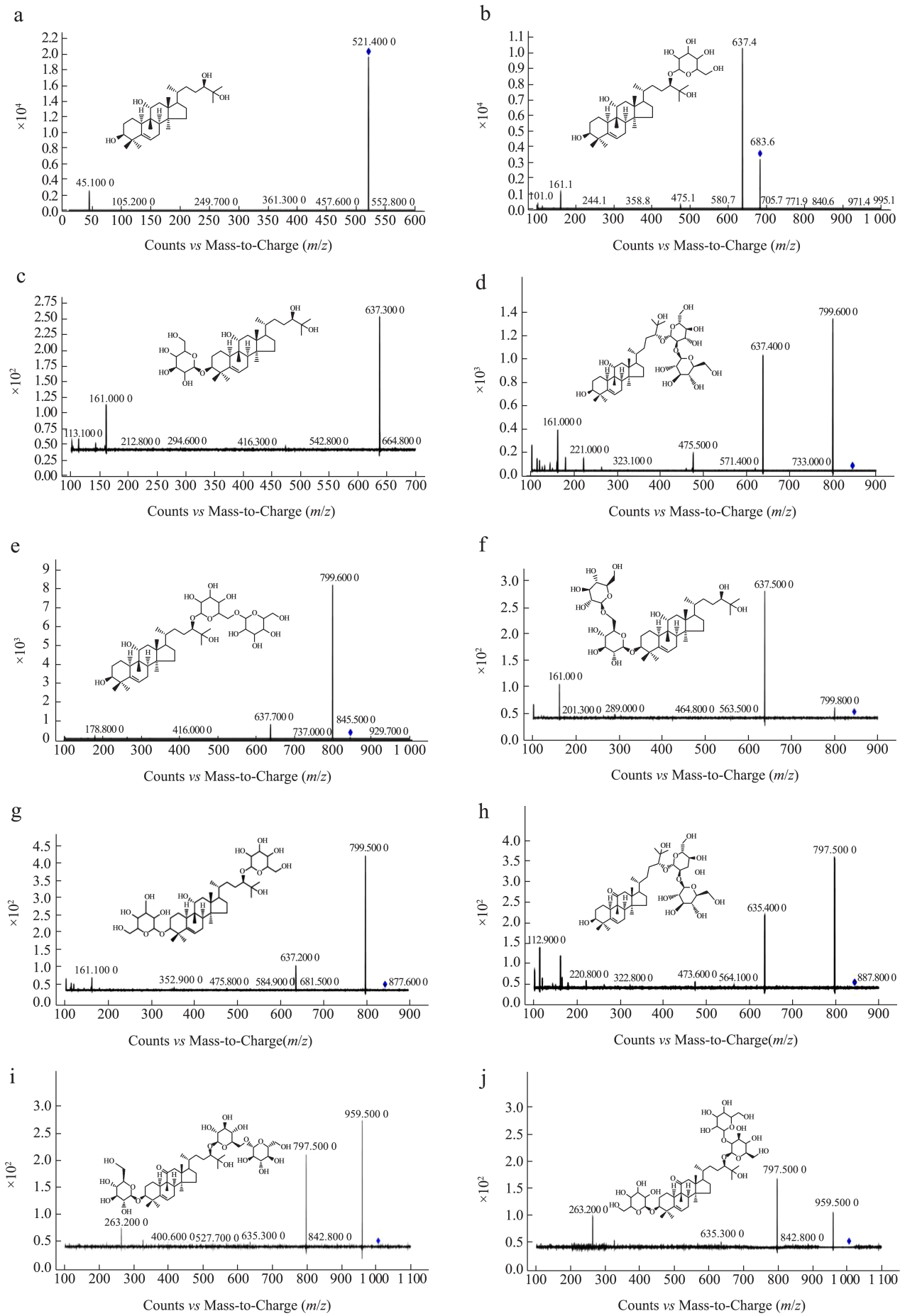


图 2 不同溶液的各成分多反应监测模式提取总离子图

Fig.2 Extraction of total ion map by MRM modes of various components in solution

注: (a) 空白对照溶液各成分多反应监测模式提取总离子图; (b) 混合对照品溶液各成分多反应监测模式提取总离子图; (c) 供试品溶液各成分多反应监测模式提取总离子图。1. 罗汉果苷 VI, 2. 罗汉果苷 11-O-V, 3. 罗汉果苷 V, 4. 赛门苷 I, 5. 罗汉果苷 IVa, 6. 罗汉果苷 IVe, 7. 罗汉果苷 III, 8. 罗汉果苷 11-O-IIIe, 9. 罗汉果苷 11-O-III, 10. 罗汉果苷 IIe, 11. 罗汉果苷 IIa2, 12. 罗汉果苷 IIa/11-O-IIa/IIa1, 13. 罗汉果 Ie1, 14. 罗汉果 Ia1, 15. 罗汉果醇。



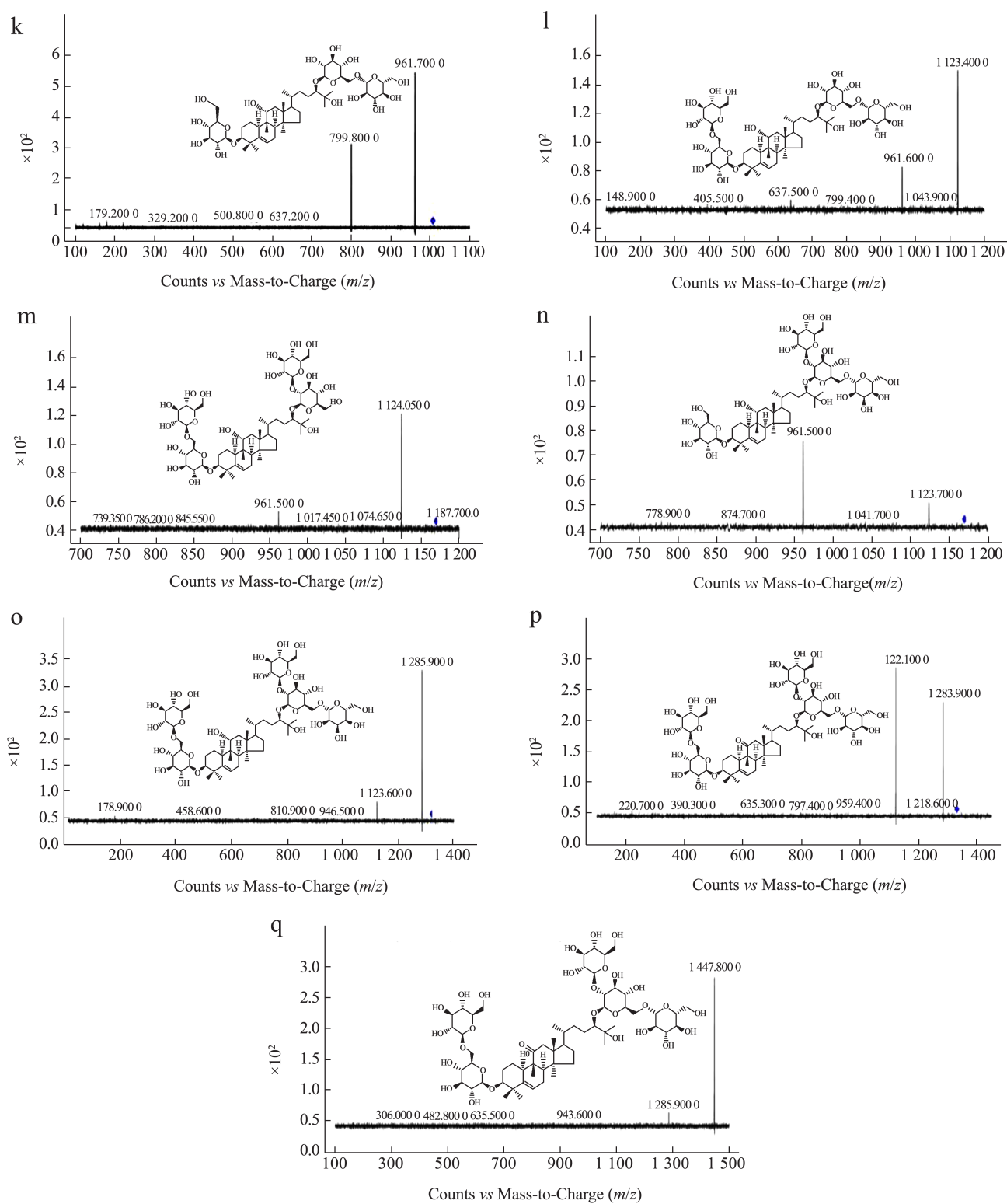


图 3 17 个标准品的离子信息图和对应的结构图

Fig.3 Product ion information diagram and corresponding structure diagram of 17 standards

注:(a) 罗汉果醇, (b) 罗汉果苷 Ia1, (c) 罗汉果苷 Ie1, (d) 罗汉果苷 IIa, (e) 罗汉果苷 IIa1, (f) 罗汉果苷 IIa2, (g) 罗汉果苷 IIe, (h) 罗汉果苷 11-O-IIa, (i) 罗汉果苷 11-O-III, (j) 罗汉果苷 11-O-IIIe, (k) 罗汉果苷 III, (l) 罗汉果苷 IVa, (m) 罗汉果苷 IVe, (n) 赛门苷 I, (o) 罗汉果苷 V, (p) 罗汉果苷 11-O-V, (q) 罗汉果苷 VI。

表 2 各成分质谱参数
Table 2 UPLC-MS/MS data of various constituents

化合物	保留时间/min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	裂解电压	碰撞能
罗汉果醇	12.541	521.4	521.4 ^a , 255.2	115.0, 105.0	0.0, 25.0
罗汉果苷 Ia1	11.382	683.6	637.4 ^a , 161.1	145.0	25.0, 35.0
罗汉果苷 Ie1	11.165	683.5	637.3 ^a , 161.0	145.0	25.0, 35.0
罗汉果苷 IIa	10.991	845.9	799.6 ^a , 637.4	145.0	25.0, 40.0
罗汉果苷 11-O-IIa	10.994	843.6	797.5 ^a , 635.4	145.0	20.0, 40.0
罗汉果苷 IIa1	10.991	845.5	799.6 ^a , 637.7	145.0	25.0, 40.0
罗汉果苷 IIa2	10.811	845.5	799.8 ^a , 637.5	145.0	25.0, 40.0
罗汉果苷 IIe	10.439	845.9	799.5 ^a , 637.2	145.0	25.0, 40.0
罗汉果苷 III	5.927	1 007.6	961.7 ^a , 799.8	145.0	25.0, 60.0
罗汉果苷 11-O-IIIe	6.473	1 005.7	959.5 ^a , 797.5	130.0	50.0, 55.0
罗汉果苷 11-O-III	7.324	1 005.7	959.5 ^a , 797.5	130.0	20.0, 55.0
赛门苷 I	3.492	1 169.5	1 123.7 ^a , 961.5	135.0	20.0, 65.0
罗汉果苷 IVa	3.761	1 169.6	1 123.4 ^a , 961.6	135.0	20.0, 65.0
罗汉果苷 IVe	4.390	1 169.5	1 124.1 ^a , 961.5	135.0	20.0, 60.0
罗汉果苷 V	2.583	1 321.6	1 285.4 ^a , 1 285.9	350.0, 250.0	0.0, 50.0
罗汉果苷 11-O-V	2.178	1 329.8	1 283.9 ^a , 1 122.1	115.0	20.0, 70.0
罗汉果苷 VI	1.874	1 447.8	1 285.9 ^a , 1 123.6	350.0	75.0, 80.0

注: a 代表定量离子。

表 3 17种罗汉果苷回归方程、相关系数
Table 3 Standard curves, correlation coefficient of 17 mogrosides

化合物	回归方程	相关系数 (<i>R</i>)
罗汉果醇	$y=22.044\ 4x+2\ 888.068\ 7$	0.995 7
罗汉果苷 Ia1	$y=28.306\ 2x+3\ 044.101\ 7$	0.990 4
罗汉果苷 Ie1	$y=1.826\ 5x+296.564\ 1$	0.998 9
罗汉果苷 IIa	$y=21.064\ 2x+2\ 297.877\ 4$	0.990 0
罗汉果苷 11-O-IIa	$y=11.208\ 9x+1\ 110.931\ 2$	0.991 9
罗汉果苷 IIa1	$y=21.056\ 3x+2\ 300.873\ 4$	0.990 1
罗汉果苷 IIa2	$y=14.383\ 1x+1\ 012.863\ 3$	0.998 7
罗汉果苷 IIe	$y=21.469\ 1x+1\ 080.549\ 5$	0.999 4
罗汉果苷 III	$y=2.096\ 2x-66.252\ 7$	0.999 7
罗汉果苷 11-O-IIIe	$y=1.754\ 3x-57.985\ 3$	0.992 7
罗汉果苷 11-O-III	$y=1.983\ 2x-50.014\ 1$	0.999 8
赛门苷 I	$y=0.832\ 0x-23.553\ 5$	0.999 6
罗汉果苷 IVa	$y=4.595\ 3x-192.772\ 9$	0.999 0
罗汉果苷 IVe	$y=0.638\ 1x-13.000\ 6$	0.999 4
罗汉果苷 V	$y=0.706\ 0x-0.535\ 3$	0.999 8
罗汉果苷 11-O-V	$y=0.277\ 6x-2.226\ 3$	0.999 6
罗汉果苷 VI	$y=0.035\ 0x+3.892\ 0$	0.997 9

2.3 线性关系考察

17 种罗汉果苷的线性回归方程和相关系数 (*R*) 如表 3 所示。结果表明: 17 种罗汉果苷浓度在线性范围内呈良好线性关系, 相关系数均大于 0.990 0。

2.4 检测限、定量限、精密度、稳定性、重复性实验

按“1.6”项条件方法, LOD 是以信噪比 *S/N*=3 的浓度为检测限, LOQ 是以信噪比 *S/N*=10 的浓度为定量限^[28]。结果表明, 在 17 种罗汉果苷的不同线性范围下, 检测限最低和最高分别为 0.047 μg/L 和 3.834 μg/L, 定量限最低和最高分别为 0.158 μg/L 和 12.780 μg/L。其中罗汉果苷 V、VI 和 11-O-罗汉果苷 V 的检测限和定量限较高, 显著高于其它低糖罗汉果苷。考察仪器的精密度如表 4 所示, 结果表明 17 种罗汉果苷的 RSD 值处于 0.85%~6.21% 之间。考察检测方法的重复性结果显示, QC 样品中

17 种罗汉果苷的 RSD 值处于 1.02%~6.74% 之间, 说明方法重复性良好。考察样品溶液的稳定性结果表明, 17 种罗汉果苷的稳定性良好, RSD 值处于 2.01%~7.36% 之间, 能满足测定的要求。

2.5 准确度实验

精密称取“1.4.3”项下同一供试品样品共 54 份, 每份 10.0 mg, 每 3 份为 1 组, 每组分别向已知 6 种罗汉果苷(罗汉果苷 Ie1、罗汉果苷 IIe、罗汉果苷 III、罗汉果苷 IVe、罗汉果苷 V、罗汉果苷 VI) 含量的供试品中精密加入不同浓度(80%、100%、120%) 的 6 种罗汉果苷单一对照品溶液, 按“1.4.2”项下方法制备供试品溶液。在“1.5”项条件进样检测。结果见表 5, 罗汉果苷 Ie1、罗汉果苷 IIe、罗汉果苷 III、罗汉果苷 IVe、罗汉果苷 V、罗汉果苷 VI 的平均回收率(*n*=3) 在 96.9%~105.4%, RSD 均小于 4.48%, 满足分析要求。

表 4 17种罗汉果苷的检测限、定量限、精密度、重复性及稳定性结果

Table 4 Limit of detection, limit of quantitation, precision, repeatability and stability of 17 mogrosides

化合物	检测限/(μg/L)	定量限/(μg/L)	精密度 RSD/%	重复性 RSD/%	稳定性 RSD/%
罗汉果醇	0.047	0.158	1.25	1.14	6.34
罗汉果苷 Ia1	0.110	0.381	2.18	1.68	5.25
罗汉果苷 Ie1	0.163	0.545	0.85	1.19	6.06
罗汉果苷 IIa	0.075	0.250	1.63	1.47	2.01
罗汉果苷 11-O-IIa	0.136	0.450	1.64	1.64	2.32
罗汉果苷 IIa1	0.075	0.250	1.63	1.47	2.01
罗汉果苷 IIa2	0.104	0.347	3.51	4.06	4.21
罗汉果苷 IIe	0.136	0.454	1.64	1.64	2.32
罗汉果苷 III	0.091	0.304	2.93	2.92	7.36
罗汉果苷 11-O-IIIe	0.362	1.205	2.84	2.46	6.60
罗汉果苷 11-O-III	0.211	0.704	2.32	1.02	6.39
赛门苷 I	0.793	2.640	6.21	5.44	6.94
罗汉果苷 IVa	0.110	0.370	5.56	2.63	4.04
罗汉果苷 IVe	0.635	2.120	1.00	1.20	5.29
罗汉果苷 V	2.123	7.077	4.62	6.74	5.81
罗汉果苷 11-O-V	1.875	6.250	4.82	1.55	5.70
罗汉果苷 VI	3.834	12.780	5.74	5.76	6.12

表 5 6种罗汉果苷准确度实验结果
Table 5 Experimental results of recovery rate of 6 mogrosides

名称	原有量/(mg/L)	加入量/(mg/L)	测得量/(mg/L)				平均回收率/%	RSD/%
罗汉果苷 Ie1	0.453	0.360	0.801	0.840	0.816		100.80	4.33
		0.453	0.909	0.925	0.960		105.40	4.48
		0.540	0.997	1.011	1.008		101.50	1.11
罗汉果苷 IIe	90.739	72.590	161.341	164.456	160.798		98.40	2.23
		90.739	186.809	181.689	180.181		101.60	3.08
		108.890	198.349	200.463	197.863		99.30	1.04
罗汉果苷 III	28.825	23.060	51.150	53.484	52.849		102.60	4.16
		28.825	57.850	57.355	58.286		100.60	1.31
		34.590	63.086	64.596	63.692		101.10	1.78
罗汉果苷 IVe	2.757	2.205	4.899	4.964	4.964		99.10	1.41
		2.757	5.658	5.624	5.598		104.10	0.86
		3.310	6.167	6.201	6.188		103.70	0.42
罗汉果苷 V	118.023	94.420	211.719	217.186	214.436		102.10	2.32
		118.023	238.054	236.015	233.939		100.00	1.42
		141.630	256.320	256.611	252.797		96.90	1.26
罗汉果苷 VI	0.552	0.440	0.999	0.989	1.003		100.90	1.39
		0.552	1.119	1.090	1.096		99.70	2.27
		0.660	1.232	1.218	1.220		101.50	0.94

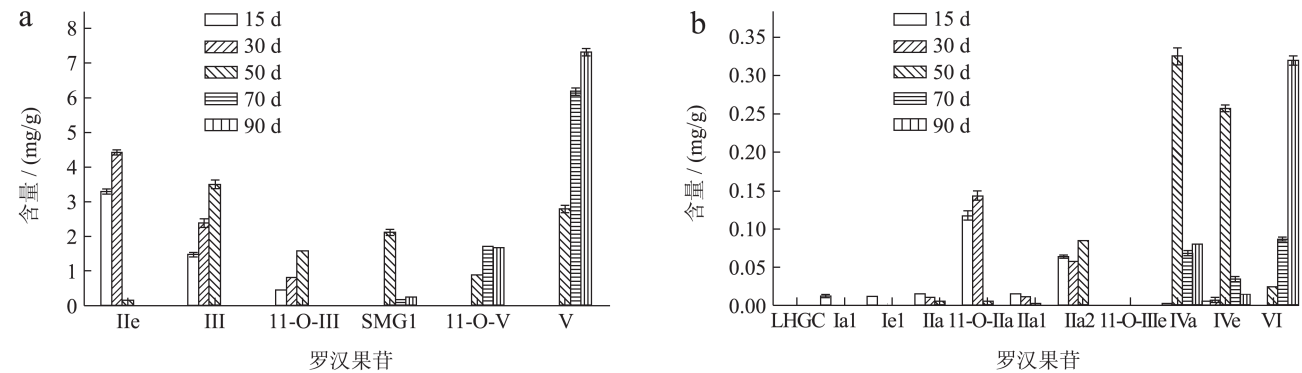


图 4 果实中 17 种罗汉果苷在不同生长时期（15、30、50、70、90 d）含量变化

Fig.4 Content changed of 17 mogrosides in *Siraitia grosvenorii* at different growth stages (15, 30, 50, 70, 90 days) in fruits
注: (a) 果实中高含量罗汉果苷 IIe/III/11-O-III/SMG1/11-O-V/V; (b) 果实中低含量罗汉果苷。

2.6 样品测定

取“1.4.2”项供试品溶液，在“1.5”项条件进样检测，样品信息见表 1，每组样品 6 个平行，测定峰面积，根据标准曲线计算含有量，结果见图 4。罗汉果生长前期果实 15~30 d 时主要以罗汉果苷 IIe 为主，并持续积累；罗汉果苷 III、11-O-III 等在罗汉果生长中期 30~50 d 持续积累，并逐渐向罗汉果

苷 IVa、IVe 和赛门苷 I 转化，50 d 时赛门苷含量居于罗汉果苷 III、罗汉果苷 11-O-III 之间，同时可检测到罗汉果苷 V 生成，表明 50 d 时由三糖苷糖基化的赛门苷 I 等四糖苷部分已开始转化为五糖苷；50~70 d，罗汉果苷 IVa、IVe 和赛门苷 I 逐渐转化生成罗汉果苷 V，该阶段同时积累大量罗汉果苷 11-O-V；70~90 d，罗汉果苷 V 和 11-O-V 进一步积累，并伴有少量罗汉果苷 VI 生成。

3 结论

本实验利用 UPLC-MS/MS 液质联用技术,建立了可快速高效测定的检测方法,探究了 17 种罗汉果苷在罗汉果不同果龄中代谢表型的差异,以及不同罗汉果苷含量变化与果实生长发育之间的关系。17 种罗汉果苷的含量随着果实处于不同生长阶段出现一定的规律性,在糖基转移酶的作用下低糖苷逐步发生糖基化反应向高糖苷转变并积累。

罗汉果苷主要由母核罗汉果醇和糖基组成,不同罗汉果苷之间的甜度、口感、生物活性和药用价值上产生极大的差异。然而,化学结构以及理化性质上的相似性对罗汉果苷,尤其是糖苷数量相同、分子量相同的同分异构体的分离鉴定带来困难。本研究的创新点在于通过 UPLC-MS/MS 建立的罗汉果苷分离检测方法,可同时对罗汉果样品中多个同分异构体苷,如罗汉果苷 Ie1/Ia1、罗汉果苷 IIe/IIa/IIa1/IIa2、罗汉果苷 11-O-III/11-O-IIIe、罗汉果苷 IVa/IVe/赛门苷 I 等进行定性定量分析,检测方法高效、灵敏、精准。通过对特定代谢通路生物合成途径中罗汉果苷的定量检测,分析罗汉果不同生长时期代谢表型差异,探究不同果龄期罗汉果苷含量变化与果实生长发育之间的关系,为解析罗汉果苷的生物合成机制,后续利用合成生物学技术定向合成罗汉果苷提供依据。

参考文献

- [1] 黎杏玉,蓝福生.中国罗汉果产业发展前景展望[J].广西农学报,2019,34(5):30-33.
- [2] 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.
- [3] 唐昀彤,侯小涛,杜正彩,等.罗汉果化学成分与药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].中草药,2021,52(9):2843-2850.
- [4] 李珊,梁俭,刘晓凤,等.罗汉果籽多糖的提取纯化及其抗氧化活性测试[J].粮食与油脂,2020,33(2):78-83.
- [5] XU Q, CHEN S Y, DENG L D, et al. Antioxidant effect of mogrosides against oxidative stress induced by palmitic acid in mouse insulinoma NIT-1 cells [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2013, 46(11): 949-955.
- [6] PAN M H, YANG J R, TSAI M L, et al. Anti-inflammatory effect of *Momordica grosvenori* Swingle extract through suppressed LPS-induced upregulation of iNOS and COX-2 in murine macrophages [J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(2): 145-152.
- [7] 于万芹,杜晓娜,刘巧敏,等.罗汉果皂苷对妊娠糖尿病大鼠氧化应激损伤影响[J].中国临床药理学杂志,2019,21(35):2723-2727.
- [8] LIU H S, QI X Y, YU K K, et al. AMPK activation is involved in hypoglycemic and hypolipidemic activities of mogroside-rich extract from *Siraitia grosvenorii* (Swingle) fruits on high-fat diet/ streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Food & Function, 2019, 10(1): 151-162.
- [9] 喻柯柯,刘合生,张境,等.罗汉果皂苷提取物对INS-1胰岛 β 细胞糖脂毒性的保护作用研究[J].核农学报,2020,34(2):348-355.
- [10] 黄琰菁,王琳,李赛,等.罗汉果醇通过激活AMPK信号通路调控肝细胞癌HepG2细胞的脂代谢[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2019,26(8):876-881.
- [11] 符毓夏,王磊,李典鹏.罗汉果醇抗肿瘤活性及其作用机制研究[J].广西植物,2016,36(11):1369-1375.
- [12] 卢凤来,刘金磊,黄永林,等.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[J].色谱,2008,26(4):504-508.
- [13] 郭捷,邓小钰,李嘉欣,等.罗汉果皂苷活性的研究进展[J].继续医学教育,2021,35(5):165-166.
- [14] GONG X, CHEN N, REN K, et al. The fruits of *Siraitia grosvenorii*: A review of a Chinese food-medicine [J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 1-11.
- [15] 王晨,张思聪,王健,等.罗汉果甜苷应用研究进展及发展建议[J].现代食品,2020,14(21):61-65.
- [16] 黄华学,刘庚贵,何安乐,等.高纯度罗汉果甜苷产业的发展现状与趋势[J].企业科技与发展,2021,5:34-39.
- [17] XU F, LI D P, HUANG Z C, et al. Exploring *in vitro*, *in vivo* metabolism of mogroside V and distribution of its metabolites in rats by HPLC-ESI-IT-TOF-MSn [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 115: 418-430.
- [18] 李萌,耿婉茹,庞蕾,等.基于UPLC-MS/MS分析红豆杉鲜叶和茶叶非挥发性差异成分[J].现代食品科技,2023,39(11):225-234.
- [19] 赵春霞,许国旺.基于液相色谱-质谱技术的代谢组学分析方法新进展[J].分析科学学报,2014,30(5):761-766.
- [20] 杨琳琳,柴建新,陈强,等.靶向代谢组学应用于衰老相关疾病的研究进展[J].药学进展,2021,45(1):55-64.
- [21] WILLIAM A, ROYSTON G. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses [J]. Phytochemical Analysis, 2009, 21(1): 33-47.
- [22] 牟俊飞,王韶旭,罗琴,等.HPLC-MS法测定罗汉果中6种罗汉果甜苷含量[J].食品研究与开发,2018,39(15):139-144.

- [23] 邓绍倩,李壮壮,孙小鑫,等. HPLC-MS法同时测定罗汉果不同部位中4种皂苷[J]. 中成药,2018,40(11):2486-2490.
- [24] 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,2014,34(2):275-280.
- [25] LUO Z L, SHI H W, ZHANG K L, et al. Liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of multiple sweet mogrosides in the fruits of *Siraitia grosvenorii* and its marketed sweeteners [J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(21): 4124-4135.
- [26] 李良,吕国红,钟晓凌,等. 罗汉果植物保健饮料的研制[J]. 试验报告与理论研究,2010,13(10):30-33.
- [27] QIAO J, LUO Z L, GU Z, et al. Identification of a novel specific cucurbitadienol synthase allele in *Siraitia grosvenorii* correlates with high catalytic efficiency [J]. Molecules, 2019, 24(3): 1-21.
- [28] 刘振营,王玲娜,蒲高斌,等. IAC-HPLC-ESI-MS/MS法测定不同产地柏子仁中4种黄曲霉毒素[J]. 中成药,43(5): 1236-1241.