

UPLC-MS 结合模式识别用于罗汉果不同部位化学成分的比较分析

章弘扬¹, 杨辉华^{2*}, 张敏³, 王月荣¹, 王静蓉⁴, 姜志宏⁴, 胡坪^{1*}

1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237

2. 桂林电子科技大学计算机科学与工程学院, 广西 桂林 541004

3. 华东理工大学药学院 中药现代化工程研究中心, 上海 200237

4. 澳门科技大学 中药质量研究国家重点实验室, 澳门

摘要: 目的 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱 (UPLC-TOF-MS) 技术建立了罗汉果不同部位 (果瓢、果皮、叶、茎) 化学成分的分析方法。方法 色谱分离采用 Waters Acquity HSS C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱。质谱分析采用电喷雾离子源, 负离子模式检测; 所得数据应用主成分分析法 (PCA) 进行模式识别。结果 PCA 结果显示, 果瓢和果皮的成分类似, 但与叶、茎部位存在显著差异; 13 种对分类贡献较大的特征化合物被筛选为“标志物”; 利用 TOF-MS 精确分子质量、同位素匹配以及色谱保留规律, 鉴定出其中 5 种罗汉果苷 (果实标志物) 和 5 种黄酮苷 (叶、茎标志物)。结论 为罗汉果不同部位的识别和化学成分的比较提供了一种新模式, 并为其活性研究提供了科学数据。

关键词: 罗汉果; 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 主成分分析; 罗汉果苷; 黄酮苷

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)01-0019-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.005

Comparative analysis of chemical constituents in different parts of *Siraitia grosvenorii* using UPLC-MS combined with pattern recognition

ZHANG Hong-yang¹, YANG Hui-hua², ZHANG Min³, WANG Yue-rong¹, WANG Jing-rong⁴,
JIANG Zhi-hong⁴, HU Ping¹

1. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2. College of Computer Science and Control, Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, China

3. Modern Engineering Center for Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

4. State Key Laboratory for Quality Research in Chinese Medicines, Macau University of Science and Technology, Macau, China

Abstract: Objective To develop an ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC/TOF-MS) method for the comparative analysis of chemical constituents in the different parts (pulp, pericarp, leaf, and stem) of *Siraitia grosvenorii*. **Methods** Chromatographic separation was performed on the Waters Acquity HSS C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and eluted by gradient way with the mobile phase of 0.1% formic acid in water-acetonitrile. Electrospray ionization source was used for the mass spectrometric analysis under negative ion mode. The obtained data were then analyzed via pattern recognition using principle component analysis (PCA). **Results** The PCA indicated that the constituents existed in the pulp and pericarp were similar, which were significantly different from those in the leaf and stem. Thirteen characteristic compounds accounting for such variations were screened as “markers”. TOF-MS was used for accurating molecular mass, isotopic matching, and chromatographic retention regulation, five mogrosides (markers of fruit) and five flavonol glycosides (markers of leaf and stem) were identified. **Conclusion** This research could provide a novel pattern for the identification and comparison of chemical constituents in the different parts of *S. grosvenorii* and the scientific information for the study on its active components.

Key words: *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang; ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry; principle component analysis; mogrosides; flavonol glycosides

收稿日期: 2012-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860381 和 21006023)

作者简介: 章弘扬, 男, 讲师, 研究方向为天然产物分析与代谢组学研究。Tel: (021)64252844 E-mail: hongyang_zhang@ecust.edu.cn

*通信作者 胡坪 Tel: (021)64252844 E-mail: huping@ecust.edu.cn

杨辉华 Tel: (010)62772265 E-mail: yang98@guet.edu.cn

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang 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。罗汉果果实具有清热润肺、润肠通便的功效^[1], 其主要活性成分为罗汉果苷, 迄今已分离出 20 余种^[2]。其中, 罗汉果苷 V 等具有甜度高、热量低、无毒副作用的特点, 是糖尿病患者理想的天然甜味剂, 还具有抗衰老、抗癌作用^[3-4]。此外, 罗汉果其他部位如叶、茎中富含黄酮类等活性成分, 具有抗菌、抗氧化等作用, 也具有一定的药用及食用价值^[5-6]。然而, 在产区有大量的叶、茎被废弃, 造成了资源的浪费。因此, 建立罗汉果不同部位化学成分快速、准确的分析方法, 对其活性研究和后续开发利用具有重要意义。

由于罗汉果不同部位化学成分十分复杂, 因此, 以往采用常规薄层色谱、高效液相色谱法进行分析, 存在分离度不够、定性能力差等不足^[7]。近年来, 液质联用技术 (LC-MS) 被越来越多地应用到天然产物分析中, 特别是具有高分离能力的超高效液相色谱 (UPLC) 与高分辨飞行时间质谱 (TOF-MS) 的联用, 能够实现复杂成分的快速、高分辨和高灵敏度检测^[8]。然而, 目前仅有少量研究^[9]采用 LC-MS 对罗汉果果实成分进行分析, 其他部位尚未见相关报道。本实验采用 UPLC-TOF-MS 技术建立了罗汉果不同部位 (果瓢、果皮、叶、茎) 化学成分的分析方法, 并应用主成分分析 (PCA) 对这些部位进行了模式识别, 以期寻找区分不同部位化学差异的“标志物”, 为其活性成分研究提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Waters AcquityTM 超高效液相色谱仪 (Waters, Millford, MA, 美国), 配备高压二元梯度泵、可控温自动进样器和二极管阵列检测器; Waters Premier TOF 飞行时间质谱仪 (Waters, Millford, MA, 美国), 配有 ESI 电离源接口和 Lock-spray 接口; PB303—N 电子天平 (Mettler-Toledo, 瑞士); KQ—500E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 高速离心机 (Eppendorf, Hamburg, 德国); HPLC 级乙腈、甲醇 (Merck, 德国); HPLC 级甲酸 (Fluka, 瑞典); Milli—Q 超纯水系统 (Millipore, 法国)。

罗汉果苷 V (批号 111754-200601) 和芦丁对照品 (批号 0080-9705) 购自中国食品药品检定研究院; 成熟罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C.

Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang 的果实 ($n=12$)、叶 ($n=8$)、茎 ($n=20$) 均采自广西省永福县, 并经澳门科技大学姜志宏教授鉴定。

1.2 供试品制备

取罗汉果果瓢、果皮、叶和茎, 粉碎至 40 目。分别称取上述不同部位的粉末 0.2 g, 加入 20 mL 甲醇, 超声提取 2 次, 每次 30 min。提取液在 $1\,800\times g$ 下离心 5 min, 上清液用 0.22 μm 滤膜滤过, 进样 2 μL 。

1.3 UPLC-MS 条件

色谱柱: Waters Acquity HSS C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~15 min, 5%~50% B; 15~20 min, 50%~95% B; 20~21 min, 95% B; 体积流量: 0.35 mL/min; 柱温: 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱分析采用 “W-” 模式, 脱溶剂气流量 700 L/min, 脱溶剂气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 锥孔气流量 40 L/h, 离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 2 500 V, 锥孔电压 50 V, 微通道板电压 2 200 V。质谱图平均扫描速率设为 0.1 s, 质量扫描范围 50~1 600 m/z 。实验数据采用 Masslynx 软件处理, 元素组成: $\text{C}\leq 100$, $\text{H}\leq 200$, $\text{O}\leq 100$; 环加双键数为 0~50; 带电状态: 偶电子离子; 带电个数: -1; 允许质量误差 ≤ 10 。

1.4 数据处理

所得数据采用 Waters 公司 Markerlynx 软件 (Version 4.1) 进行峰提取、峰对齐及归一化等处理。将预处理后的数据导入 SIMCA-P+ (Version 12.0, Umetrics, Umea, Sweden) 软件, 经 Pareto 缩放处理后进行 PCA 分析。

2 结果与讨论

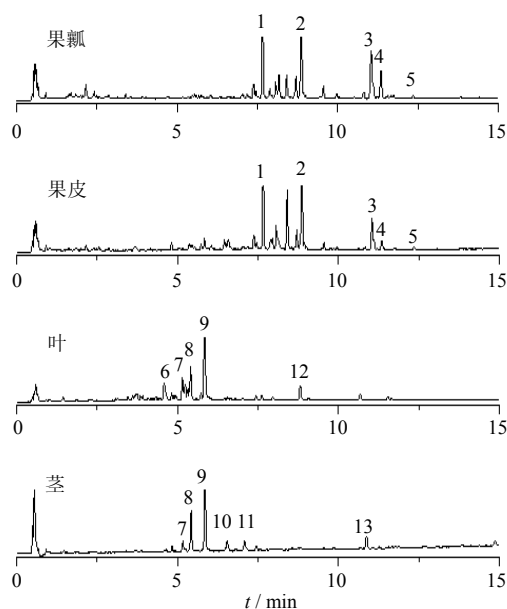
2.1 分析条件优化

实验比较了加热回流与超声提取 2 种方法, 结果发现两者的提取效果无明显差别, 但超声提取操作简单且耗溶剂少, 故作为本实验的提取方法。比较了水和甲醇 2 种溶剂的提取效果, 发现水提取时色谱峰数目较少, 且提取液中多糖等大分子对色谱柱的损伤较大, 故最终选择甲醇作为提取溶剂。

实验考察了流动相体积流量 (0.2~0.5 mL/min) 对色谱分离的影响。结果发现, 当体积流量低于 0.3 mL/min 时, 洗脱时间长, 难以显出其快速分离的优势; 而当体积流量高于 0.4 mL/min 时, 虽然洗脱时间短, 但分离效果变差。综合考虑, 最终选择体积流量为 0.35 mL/min。UPLC 柱采用了小粒径填料, 可通过提高柱温来减小流动相黏度, 降低柱压, 并

加快传质,以获得更高的柱效和实现快速分离。综合考虑固定相的最高使用温度和分离效果,柱温最终选择了 50 ℃。

对于质谱条件的选择,实验分别考察了待测成分在正、负模式中的响应情况。结果发现,负模式能比正模式提供更多的峰信息,故最终采用负模式进行分析。罗汉果不同部位化学成分的代表性 UPLC-TOF-MS 总离子流图见图 1。由图可见,由于采用了高柱效的 UPLC,不仅使各色谱峰分离良好,且分析时间短,分析通量高。



图中峰的标号与表 1 中一致

Peak numbers are consistent with those in Table 1

图 1 罗汉果不同部位的 UPLC-MS 总离子流图
Fig. 1 UPLC-MS total ion chromatograms in different parts of *S. grosvenorii*

2.2 不同部位化学成分 PCA 分析

为了区分罗汉果不同部位化学成分的差异、找到相关标志物,采用了 PCA 模式识别技术对其进行进一步分析,所得 PCA 得分图见图 2-A。根据图中不同组样本的空间投影距离和混杂程度来看,果瓢和果皮的成分相近(体现在 2 组样本的空间距离短、且部分混杂);但与叶、茎成分在 PC1 轴上均存在显著差别。而叶与茎相比,其化学成分在 PC1 轴上差异不大,但在 PC2 轴上存在较显著差异。

为了进一步找到区分这些不同部位的标志物,采用 PCA 载荷图进行筛查分析。在图 2-B 中,有 15 个化合物离子距离原点较远,对于 PCA 分类的

贡献较大,因此可被视为用于区分罗汉果不同部位的标志物离子。对应于 PCA 得分图可看出,在载荷图中分布于 PC1 轴右半区的离子为罗汉果果实(包括果瓢和果皮)标志物离子,而分布于 PC1 轴左半区的离子为叶、茎标志物离子。其中,位于左半区上半部分的离子化合物主要存在于叶中,位于下半部分的离子化合物则主要存在于茎中,而 m/z 577.2 的离子化合物(位于上、下半部分交界处)在叶、茎中均为主要标志物成分。

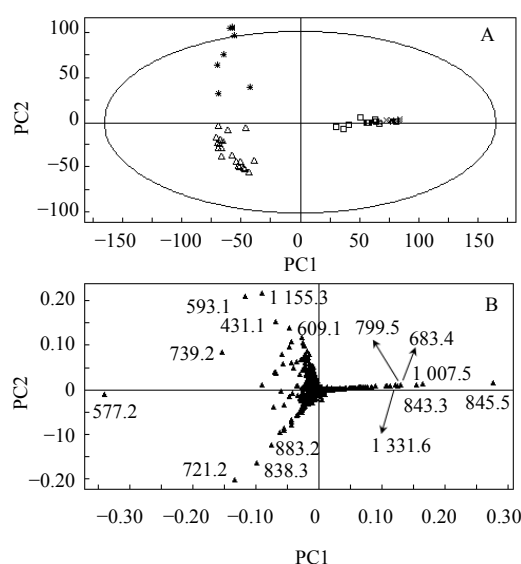


图 2 罗汉果不同部位的 PCA 得分图 (A) 和载荷图 (B)
Fig. 2 PCA score plot (A) and loading plot (B) in different parts of *S. grosvenorii*

2.3 标志物鉴定

对于上述 15 个离子,通过 TOF-MS 进行精确质量定性分析,确定它们来源于 13 个标志化合物(其中 3 和 9 号物质在载荷图上同时出现了 $[M+HCOO]^-$ 和 $[M-H]^-$ 两种离子形式),所得鉴定结果见表 1。从表中可看出,由 TOF-MS 所测得的质量数偏差 $\leq 6.1 \times 10^{-6}$,匹配分子式的同位素分布与理论预测很吻合(匹配值越小越可靠),说明本实验测得的相对分子质量及匹配的分子式准确可信。

由表 1 可见,罗汉果果实中的标志物为其特征性成分——罗汉果苷类,其结构上的主要差别在于连接葡萄糖基的数目不同(图 3)。这些化合物在负模式下极易产生 $[M+HCOO]^-$ 加合离子峰,依据精确质量测定数据和相关文献^[2,10],可对其进行鉴定。从色谱保留来看,含糖基越少的罗汉果苷(如罗汉果苷 IE),其极性越小,保留时间越长,这也

表 1 罗汉果不同部位标志物的鉴定结果

Table 1 Identification of markers from different parts of *S. grosvenorii*

峰号	t_R / min	选择离子	分子式	测得质量 (m/z)	偏差 / ($\times 10^{-6}$)	同位素 匹配度	标志物鉴定
1	7.67	$[M+HCOO]^-$	$C_{60}H_{102}O_{29}$	1 331.643 8	3.4	1.1	罗汉果苷 V
2	8.86	$[M+HCOO]^-$	$C_{48}H_{82}O_{19}$	1 007.537 5	5.2	1.1	罗汉果苷 III/isomer
3	11.04	$[M+HCOO]^-$	$C_{42}H_{72}O_{14}$	845.488 5	1.7	3.1	罗汉果苷 IIE/isomer
	11.04	$[M-H]^-$		799.482 9	1.9	1.5	
4	11.11	$[M+HCOO]^-$	$C_{42}H_{70}O_{14}$	843.475 6	1.7	2.4	11- <i>O</i> -罗汉果苷 IIE/isomer
5	12.34	$[M+HCOO]^-$	$C_{36}H_{62}O_9$	683.444 6	6.1	0.3	罗汉果苷 IE/isomer
6	4.60	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.143 3	3.8	1.3	芦丁
7	5.19	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.150 3	0.5	0.0	槲皮苷-3, 7- <i>O</i> -二吡喃鼠李糖苷/isomer
8	5.41	$[M-H]^-$	$C_{33}H_{40}O_{19}$	739.212 0	4.6	2.9	罗汉果黄素 I/isomer
9	5.86	$[2M-H]^-$	$C_{27}H_{30}O_{14}$	1 155.322 3	2.6	6.8	罗汉果黄素 II/isomer
	5.86	$[M-H]^-$		577.155 9	0.3	0.2	
10	6.55	$[M-H]^-$	$C_{39}H_{48}O_{23}$	883.255 6	5.4	5.9	未鉴定
11	7.09	$[M-H]^-$	$C_{33}H_{38}O_{18}$	721.199 8	2.5	2.3	未鉴定
12	8.81	$[M-H]^-$	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.100 2	5.6	2.4	山柰酚-3- <i>O</i> -吡喃鼠李糖苷/isomer
13	10.86	$[M-H]^-$	$C_{49}H_{60}O_{12}$	838.400 9	0.2	2.6	未鉴定

化合物 1~5 为果实标志物, 化合物 6~13 为叶、茎标志物; 化合物 1 和 6 由对照品进行了确认

Compounds 1—5 were markers of fruit; Compounds 6—13 were markers of leaf and stem; Compounds 1 and 6 were confirmed by reference substances

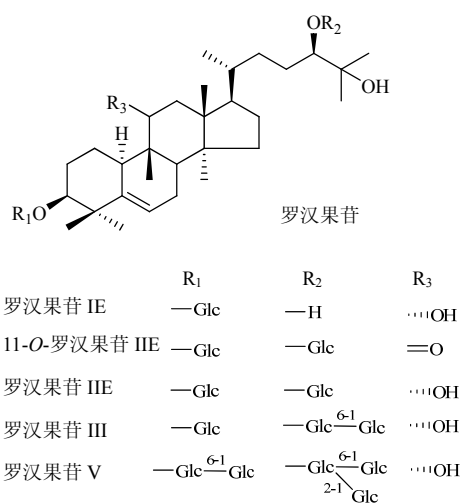


图 3 罗汉果皂苷和黄酮苷标志物的结构

Fig. 3 Structures of mogrosin and flavonol glycoside markers

与本研究的推断结果吻合。

罗汉果叶、茎中的标志成分主要为黄酮苷类, 其中 2 种罗汉果黄素类成分已被分离得到^[11]。由文献报道^[12]可知, 罗汉果叶中富含以槲皮素和山柰酚为苷元所组成的黄酮苷类化合物。从色谱保留规律来看, 母核以槲皮素为苷元的苷类比母核以山柰酚

为苷元的苷类极性大, 保留时间越短; 而连接糖基数目越多的苷类极性越大, 保留时间也越短。因此, 在精确质量测定得到可能分子式的基础上, 通过 SciFinder 和 ChemSpider 数据库检索, 可推断出 6、7 和 12 号化合物 (表 1)。其中, 6 号化合物鉴定为芦丁, 但由于芦丁在很多植物中都存在, 因此缺乏特征性, 不宜作为罗汉果叶的鉴别指标。在本研究中, 10、11 和 13 号化合物 (主要存在于茎部) 可匹配出分子式, 但因缺少相应的文献数据未能鉴定出其结构, 需进一步研究。

上述罗汉果苷和黄酮苷类化合物由于糖基连接位点的不同等因素, 会产生多种同分异构体。表 1 中除 1 和 6 号物质已通过对照品确认结构外, 其余化合物仅依靠质谱数据无法区分异构体, 其结构需经分离后采用 NMR 等手段进行准确鉴定。

3 结论

近年来, 黄酮类化合物以其显著的药理活性, 在医药和功能食品开发上受到日益广泛的重视。从本研究结果可看出, 除了果实中含有大量已知的皂苷类成分外, 罗汉果叶、茎部位还富含不同类型的黄酮苷类成分, 因此具有很大的药用开发潜力。

本实验建立了一种 UPLC-MS 结合 PCA 模式识别的方法,可用于罗汉果不同部位化学成分的比较分析。PCA 结果显示,果瓢和果皮的化学成分类似,但与叶、茎部位存在显著差别。5 种罗汉果苷被筛选为果实标志物,8 种化合物被筛选为叶、茎标志物(其中 5 种被鉴定为黄酮苷)。本研究为天然产物不同部位的识别和化学成分的比较提供了一种新模式,为其活性研究提供了科学数据,并对相关产品开发利用具有指导意义。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [2] 陈瑶, 贾恩礼. 罗汉果化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 解放军药学学报, 2011, 27(2): 171-174.
- [3] 李典鹏, 张厚瑞. 广西特产植物罗汉果的研究与应用 [J]. 广西植物, 2000, 20(3): 270-276.
- [4] Takasski M, Konoshima T, Murata Y, *et al.* Anti-carcinogenic activity of natural sweeteners, cucurbitane glycosides, from *Momordica grosvenori* [J]. *Cancer Lett*, 2003, 198(1): 37-42.
- [5] 周莉, 吴和珍, 刘焱文. RP-HPLC 测定罗汉果茎、叶及其提取物中山柰苷的含量 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(11): 24-25.
- [6] 陈全斌, 杨建香, 程忠泉, 等. 罗汉果叶黄酮苷的分离与结构鉴定 [J]. 广西科学, 2006, 13(1): 35-36.
- [7] Li D P, Ikeda T, Huang Y L, *et al.* Seasonal variation of mogrosides in *Lo Han Kuo (Siraitia grosvenorii)* fruits [J]. *J Nat Med*, 2007, 61(3): 307-312.
- [8] 郑振佳, 王晓, 王明林, 等. 固相萃取-快速分离液相-四级杆串联飞行时间质谱联用分析荷叶中的生物碱 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1066-1068.
- [9] 戚向阳, 张俐勤, 单夏锋, 等. 高效液相色谱-电喷雾质谱联用法分析罗汉果皂苷 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(10): 2096-2101.
- [10] 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.
- [11] 斯建勇, 陈迪华, 常琪, 等. 鲜罗汉果中黄酮苷的分离及结构测定 [J]. 药学学报, 1994, 29(2): 158-160.
- [12] 陈全斌, 杨建香, 程忠泉, 等. RP-HPLC 法测定罗汉果叶中总黄酮含量 [J]. 广西科学, 2005, 12(1): 43-45.