

傅里叶红外光谱法测定罗汉果中罗汉果总甙含量*

Determination of Mogrosides Contents in *Siraitia grosvenorii* with FTIR

郑娟梅^{1,2}, 李武钢^{3,5}, 毛晓丽⁴, 王一兵¹, 叶月华², 黄庶识^{1**}

ZHENG Juan-mei^{1,2}, LI Wu-gang^{3,5}, MAO Xiao-li⁴, WANG Yi-bing¹, YE Yue-hua², HUANG Shu-shi¹

(1. 广西科学院,广西南宁 530007;2. 广西食品药品检验所,广西南宁 530021;3. 广西师范大学物理科学与技术学院,广西桂林 541004;4. 广西中医学院,广西南宁 530001;5. 广西师范学院物理与电子工程学院,广西南宁 530023)

(1. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning, Guangxi, 530021, China; 3. College of Physics Sciences and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China; 4. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi, 530001, China; 5. College of Physics and Electronics Engineering, Guangxi Teachers Education University, Nanning, Guangxi, 530023, China)

摘要:利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)技术建立一种测定罗汉果中罗汉果总甙含量的新方法,通过最小二乘法拟合罗汉果总甙标准品红外光谱 1059 cm^{-1} 特征峰强度的标准曲线,得到回归方程,根据回归方程计算罗汉果样品甲醇超声波提取物中的总甙含量。将计算结果分别进行精密度、重复性和稳定性检验,平行测定 6 次,罗汉果总甙的峰高相对标准偏差(RSD)分别为 5.41%、5.47%和 5.47%;FTIR 法测定不同罗汉果样品的总甙含量与紫外分光光度计法的测定结果差异不显著($P > 0.05$)。本方法具有可行性与可靠性,能够满足实验室的准确度要求,可以作为罗汉果总甙定量测定的方法。

关键词:罗汉果 总甙 红外光谱 定量分析

中图分类号:O657.3 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2011)04-0355-04

Abstract: Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was utilized as a new approach to investigate the mogrosides contents of *Siraitia grosvenorii*. A serial intensity value of 1059 cm^{-1} peak, which was intended to be the characteristic peak of mogrosides within its IR fingerprint spectra, was obtained from the IR spectra of different contents of mogrosides standards and used to draw standard curve as a function of mogrosides contents, in which the curve was fitted with least square fitting (LSF) for establishing linear regression equation. The concentration of mogrosides extracted from fructus momordicae sample with methanol combining ultrasonic method was determined by using the regression equation. The relative standard deviation (RSD) was calculated from 6 replicate determinations, of which the precision, repeatability and stability were 5.41%, 5.47% and 5.47%, respectively. The mogrosides contents measured from different *Siraitia grosvenorii* samples by FT-IR were not significant differences compared with those determined by UV spectrophotometry ($P > 0.05$), suggesting that FT-IR is a feasible method for quantificational detection of mogrosides content in *Siraitia grosvenorii*.

Key words: *Siraitia grosvenorii*, mogrosides, infrared spectra, quantitative analysis

收稿日期:2011-01-07

作者简介:郑娟梅(1982-),女,硕士研究生,主要从事中药分析研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0992003A-20)资助。

** 通讯作者。

罗汉果 [*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey] 是我国特有的经济和药膳两用植物,主要分布在两广、贵州、江西、云南等地区。罗汉果果实中含有丰富的葡萄糖、果糖、蛋白质、脂肪酸,含有多种氨基酸、

维生素、甜甙^[1]。罗汉果甜苷是罗汉果中的主要有效成分,也是主要的甜味成分,甜度大约相当于蔗糖的350倍^[2]。罗汉果甜苷除了在食品行业作为一种优良甜味剂使用外,还是肥胖症、糖尿病、高血压等患者最好的甜味剂和保健品^[3]。到目前为止,我国以及美国、日本、韩国、台湾、香港、泰国、新加坡、英国等国家已经批准罗汉果甜苷作为食品添加剂使用。

由于罗汉果果实中主要有效化学成分是罗汉果总皂甙,所以在评价罗汉果质量时可以通过测定总皂甙的含量来衡量^[4]。目前,罗汉果总皂甙的测定方法有高效液相法^[5]、薄层色谱法^[6]、香草醛-高氯酸试剂分光光度比色法^[2]等,这些理化测定方法太过繁琐、专业,样品需要量大,样品前处理复杂,检测周期长,应用受到一定的限制。红外光谱技术是利用分子在红外区域的振动跃迁吸收原理,研究分子的结构和化学键,作为表征和鉴别化学物种的方法已广泛用于各种物质的定性鉴定和定量分析,以及研究分子间和分子内部的相互作用。红外光谱方法的特点是取样量少、制样简单、不需对样品进行提取分离,具有方便、快速、高效、准确和成本较低,不破坏样品,不消耗化学试剂,不污染环境等优点。由于分子中邻近基团的相互作用,使同一基团在不同分子中的特征波数有一定变化范围,不同种类中药材之间的化学组成不同,整体分子光谱谱图也不同,因此,红外光谱法可以对中药材全组分进行直接测定^[7,8]。红外光谱的宏观指纹性,是中药混合物中各种成分的叠加谱,可以反映药材整体信息,所以红外光谱技术可以用于中药材及其制剂的真伪、产地鉴别^[9,10],野生和栽培药材鉴别^[11],药材品种的分类与鉴定^[12]等。本研究运用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)技术,结合香草醛-高氯酸试剂分光光度比色法进行比较,取罗汉果总皂甙的特征峰强度的加和性计算总皂甙的含量,建立罗汉果总皂甙含量的测定方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

实验所用仪器有:Nicolet 5700型红外光谱仪(美国 Thermo 公司出品),FW 24A型压片机(天津光学仪器厂出品),Cary100型紫外可见分光光度计(美国 Varian 公司出品)。实验所用罗汉果干果由广西师范大学生命科学学院提供(样品喷施生物有机肥,其中W12喷2次,W24喷4次,W42喷8次),罗汉果总皂甙由广西师范大学环境与资源科学学院提供,溴化钾为光谱纯。AB-8吸附树脂用乙醇溶液浸泡,用时抽滤,称重。其它所用试剂均为分析纯,水为去

离子水。

1.2 实验方法

1.2.1 罗汉果干果红外光谱测定

罗汉果样品在55℃下干燥48h,粉碎过200目筛,每个样品做3个重复,各样品精确称1.00mg与200.0mg溴化钾(碎晶)混合研磨充分均匀,压片成厚度约1mm的锭片,将锭片放入红外光谱仪测定,每片随机扫描3个不同点,再取其平均谱图作为最后的样品谱图。实验测试条件:光谱范围4000~400 cm^{-1} ,光谱分辨率4 cm^{-1} ,扫描次数为32次。

1.2.2 红外标准曲线配制溶液

精确称取18mg总皂甙用甲醇溶解后定容至100ml。精密取50 μl 、100 μl 、150 μl 、200 μl 、300 μl 标准溶液,分别加入到200.0mg溴化钾碎晶中,待甲醇挥干之后,用玛瑙研钵研磨至极细粉末,全部转移到模具中用压片机压成透明锭片,将锭片放入红外光谱仪测定,每片随机扫描3个不同点,再取其平均谱图作为最后的样品谱图。最后根据1059 cm^{-1} 的峰高做标准曲线。

分别称取500.0mg罗汉果样品,加入20ml甲醇,超声提取30min,取上清液50 μl 加入到200.0mg溴化钾碎晶中,待甲醇挥干之后,用玛瑙研钵研磨至极细粉末,全部转移到模具中用压片机压成透明锭片,将锭片放入红外光谱仪测定,每片随机扫描3个不同点,再取其平均谱图作为最后的样品谱图,最后以1059 cm^{-1} 的峰高代入标准曲线计算总皂甙含量。

1.2.3 紫外标准曲线配制溶液

精确称取30mg总皂甙用甲醇溶解后定容至5ml。精密吸取该标准液10 μl 、20 μl 、30 μl 、40 μl 、50 μl ,置于具塞刻度试管中,挥尽溶剂,加入0.2ml香草醛-冰醋酸溶液(5%),冰浴上加入高氯酸0.8ml,摇匀,60℃水浴加热15min,立即用冰水冷却5min,加入5ml冰醋酸,摇匀,溶液为蓝紫色,10min后于590nm波长处测定吸收值A,以皂甙含量对A值作标准曲线。

精密称取500.0mg罗汉果粉(40目筛)9份,分别精密加入25ml甲醇,称重,浸泡过夜,超声波提取3h,冷却至室温后,滴加甲醇至原重,摇匀,静置澄清。精密吸取上清液10ml,蒸干,以20ml蒸馏水溶解洗涤,上AB-8吸附树脂柱,控制流速,使缓慢流下,先用50ml蒸馏水慢慢洗去糖类等杂质,然后以90%乙醇溶液30ml洗脱,收集醇液,水浴蒸干,残渣以甲醇溶解并定容为5ml。精密吸取样品液240 μl ,挥干,加入0.2ml香草醛-冰醋酸溶液(5%),冰浴上

加入高氯酸 0.8 ml, 摇匀, 60℃ 水浴加热 15 min, 立即用冰水冷却 5 min, 加入 5 ml 冰醋酸, 摇匀, 溶液为蓝紫色, 10 min 后于 590 nm 波长处测定吸收值 A , 以随行(树脂)为空白, 并根据标准曲线计算总皂甙含量。

1.3 数据处理

傅里叶变换红外光谱实验系统收集的样品信号中, 通常都带有一定的仪器本身和实验环境的系统噪声干扰, 本实验选用比较常用的 9 点 S-G 平滑滤波和基线校正(系统自带, OMNIC) 进行去噪处理及 OriginPro 8.0 和 SPSS 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 罗汉果干果、罗汉果总甙和罗汉果甲醇物提取红外图谱的比较分析

图 1 是罗汉果干果(a)、罗汉果总甙(b)和罗汉果甲醇提取物(c)的红外图谱。曲线(a)中 1059 cm^{-1} 附近的吸收峰宽而强, 说明含有大量的 C—O 基团, 是苷键的特征吸收峰^[12]。曲线(b)中 1072~1034 cm^{-1} 的吸收峰是 C—O—C 的伸缩振动峰, 1059 cm^{-1} 是苷键的特征吸收峰^[13]。与曲线(a)相比较, 少了 1745 cm^{-1} 处的羰基 $\nu(\text{C}=\text{O})$ 吸收峰, 说明总甙在提取和纯化过程中去除了该成分。曲线(c)比曲线(a)、曲线(b)中的吸收峰少很多, 说明罗汉果经甲醇提取后杂质含量很低。但是在 1059 cm^{-1} 处苷键的特征吸收峰很强, 由此可知, 罗汉果用甲醇提取的红外光谱图中含有总甙等。

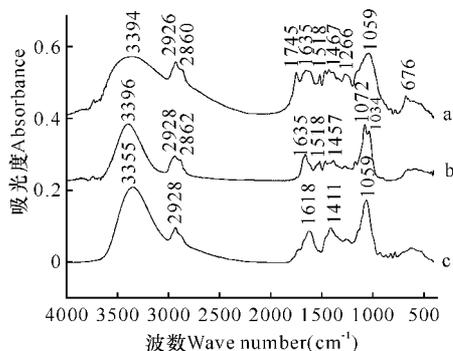


图 1 罗汉果(a)、总甙(b)和罗汉果甲醇提取物(c)的红外光谱

Fig. 1 Fourier transform infrared spectra of *Siraitia grosvenorii* (a), mogrosides (b) and methanolic extract in *Siraitia grosvenorii* (c)

在图 1(a)、(b)、(c)中都出现了罗汉果总甙的特征吸收峰, 分别在 1059 cm^{-1} 、1072~1034 cm^{-1} 和 1059 cm^{-1} , 经过数据处理之后, 可以根据 1059 cm^{-1} 的峰高来定量分析罗汉果干果中总甙的含量。

2.2 标准曲线的绘制

红外标准曲线为 $Y = 38.7306X + 0.2377 (R^2 =$

0.9909)。结果(图 2)表明, 罗汉果总甙含量的测定在 0.0072~0.036 mg/锭片范围内呈线性关系。将样品测定的结果代入标准曲线方程, 求其罗汉果中总甙的含量见表 1。

紫外测得标准曲线回归方程为 $A = 0.4740C + 0.1172 (R = 0.9997)$ 。结果(图 2)表明, 罗汉果总甙含量的测定在 0.018~0.09 mg 范围内呈线性关系。将样品测定的结果代入标准曲线方程, 求其罗汉果中总甙的含量见表 1。

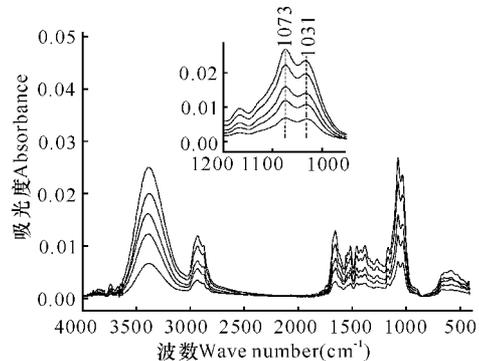


图 2 总甙不同标准浓度的红外光谱(小图为 1200~990 cm^{-1} 的放大区域)

Fig. 2 Fourier transform infrared spectra of mogrosides from different dimension (a part of magnified spectra)

2.2.1 精密度试验

精密称量同一罗汉果 500.0mg, 加入 20 ml 甲醇, 超声提取 30min, 取上清液 50 μl 加入到 200.0mg 溴化钾碎晶中, 挥尽溶剂后均匀研磨制片, 测定光谱, 每片随机扫描 3 个不同点, 再取其平均谱图作为最后的样品谱图, 最后以 1059 cm^{-1} 的峰高代入标准曲线计算总皂甙含量。平行测定 6 次, 罗汉果总甙的峰高 $RSD = 5.41\%$ 。

2.2.2 重复性试验

精密称量同一罗汉果 500.0mg, 分别加入 20 ml 甲醇, 超声提取 30 min, 取上清液 50 μl 加入到 200.0mg 溴化钾碎晶中, 挥尽溶剂后均匀研磨制片, 测定光谱, 每片随机扫描 3 个不同点, 再取其平均谱图作为最后的样品谱图, 最后以 1059 cm^{-1} 的峰高代入标准曲线计算总皂甙含量。罗汉果总甙的峰高 $RSD = 5.47\%$ 。

2.2.3 稳定性试验

精密称量同一罗汉果 500.0mg, 加入 20 ml 甲醇, 超声提取 30 min, 分别于 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 取上清液 50 μl 加入到 200.0mg 溴化钾碎晶中, 挥尽溶剂后均匀研磨制片, 测定光谱。每片随机扫描 3 个不同点, 再取其平均谱图作为最后的样品谱图, 最后以 1059 cm^{-1} 的峰高代入标准曲线计算总皂

甙含量。罗汉果总甙的峰高 $RSD = 5.47\%$ 。

2.3 紫外和红外两种测定总甙结果的比较

我们对同一品种不同处理方法的罗汉果采用紫外和红外两种不同方法进行总甙的含量测定,总甙所测数据进行 SPSS 方差处理分析。结果(表 1)表明,采用紫外和红外两种方法测定每克干果总甙的含量差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 红外和紫外方法测定罗汉果中总甙含量的比较

Table 1 The determination of mogrosides contents in *Siraitia grosvenorii* with FT-IR and UV method

样品 Samples	平均含量 Average content(mg/g)	
	FT-IR	UV
W12	15.81±0.08 ^a	15.60±0.32 ^a
W24	13.39±0.16 ^b	12.72±0.16 ^b
W42	15.33±0.08 ^a	15.11±0.08 ^a

数据后不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著($P < 0.05$)。

Values followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ level.

3 结论

本实验采用傅里叶红外光谱技术,通过最小二乘法拟合罗汉果总甙标准品红外光谱 1059 cm^{-1} 特征峰强度的标准曲线,得到回归方程,根据回归方程计算罗汉果样品甲醇超声波提取出物中的总甙含量。精密度、重复性和稳定性检验表明,罗汉果总甙的峰高相对标准偏差(RSD)分别在为 5%左右;FTIR 法测定不同罗汉果样品的总甙结果与紫外分光光度计法的测定结果差异性不显著($P < 0.05$)。该方法具有可行性与可靠性,能够满足实验室的准确度要求,可作为罗汉果总甙定量测定的方法。

参考文献:

[1] 杨建香. 罗汉果叶子中黄酮成分的提取与分离[D]. 南

宁:广西师范大学,2005.

- [2] 刘金磊,李典鹏,黄永林. 桂北地区不同品种、不同产地鲜罗汉果中总甙、甙 V 含量测定[J]. 广西植物,2007,27(2):281-284.
- [3] 斯建勇,陈迪华,常琪,等. 鲜罗汉果中黄酮甙的分离及结构测定[J]. 药学学报,1994,29(2):158-160.
- [4] 高山林,汪红. 罗汉果皂甙的含量测定[J]. 天然产物研究与开发,2000,13(2):36-39.
- [5] 胡军影,马双成,程显隆,等. RP-HPLC 法测定罗汉果中罗汉果皂甙 V 的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(4):544-546.
- [6] 李典鹏,陈月圆,潘争红,等. 不同生长日龄罗汉果甙类成分变化研究[J]. 广西植物,2004,24(6):546-549.
- [7] 孙素琴,周群,郁鉴源,等. 分子振动光谱法与中药研究的最新进展[J]. 光谱学与光谱分析,2000,20(2):199.
- [8] 刘红霞,孙素琴,杨峻山. 现代红外光谱技术用于复方四逆汤的配伍研究[J]. 光谱学与光谱分析,2007,27(7):1316-1318.
- [9] 周群,李静,孙素琴,等. 中药配方颗粒红外光谱法的快速鉴别[J]. 分析化学,2003,31(3):292-295.
- [10] 孙素琴,梁曦云,杨显荣. 6 种燕窝的傅里叶变换红外光谱法原性状快速鉴别[J]. 分析化学,2001,29(5):552-554.
- [11] 董彬,孙素琴,周红涛,等. 红外光谱和聚类分析法无损快速鉴别赤芍[J]. 光谱学与光谱分析,2002,22(2):232-234.
- [12] 孙素琴,周群,梁曦云,等. 七种花旗参茶包的 FTIR 光谱法无损鉴别[J]. 光谱学与光谱分析,2002,22(4):600-602.
- [13] 王一兵,吴卫红,陈植成,等. 傅里叶变换红外光谱法和紫外-可见谱线组法分析广西特产罗汉果[J]. 光谱实验室,2009,26(4):907-911.

(责任编辑:邓大玉)