

固相萃取精制苦瓜皂苷工艺研究

李 健, 刘 鑫, 刘 宁, 陈姝娟, 黄 艳

(哈尔滨商业大学 食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要:以苦瓜为原料,建立了 SPE 精制、HPLC 检测、ESI-MS 定性为主要步骤的苦瓜皂苷的分析方法。通过 HPLC 测定,得到了 SPE 精制的最佳工艺条件为:上样 pH 为 8,经 10%、20%乙醇各 15 mL 淋洗后用 10 mL 40%乙醇淋洗,洗脱液为 65%乙醇,洗脱体积为 7 mL,流速为 1 mL/min,此条件下所得液相色谱的峰数、峰形、峰面积均较理想。测得最佳条件下精制的苦瓜总皂苷含量为 82.13%。经 ESI-MS 定性分析得出,精制后的产物为三萜类皂苷。苦瓜皂苷快速分离方法的研究,对其构效关系和生物活性研究提供了重要的前提条件。

关键词:苦瓜皂苷;固相萃取(SPE);高效液相色谱(HPLC)

中图分类号:R 284.2 **文献标志码:**A

文章编号:0367-6358(2009)08-0472-04

Study on the Purification Technology of Momordica Saponins by Solid-phase Extraction

LI Jian, LIU Xin, LIU Ning, CHEN Shu-juan, HUANG Yan

(Institute of Food Sciences and Engineering, Harbin University of Commerce, Heilongjiang Harbin 150076, China)

Abstract: The analysis method of momordica saponins with SPE purification, HPLC detection and ESI-MS qualitative analysis was established using momordica as raw material. The optimum conditions of SPE purification were determined by HPLC, and the results were as follows: the sample pH value was 8; it was leached with 10 mL 40% ethanol after washing with 10% and 20% ethanol; the elution solution was 7 mL 65% ethanol; and the flow rate was 1 mL/min. On this condition, the peak numbers, peak shape and peak areas of the HPLC profile were all relatively ideal. Under optimum conditions, the content of momordica saponins was 82.13%. The ESI-MS qualitative analysis result showed that the refining product was triterpenes saponins. The rapid separation method of momordica saponins provides the basis for the study of their structure-effect relationship and biological activity.

Key words: momordica saponins; solid-phase extraction; HPLC

苦瓜皂苷具有降血糖、抗氧化、提高免疫力、降低胆固醇、抗艾滋病毒和抗肿瘤等生理功能^[1]。

在其分离纯化方面,大都用硅胶柱层析或聚酰胺柱层析,这些方法耗时较长,有机溶剂使用量大,耗能多。而固相萃取(SPE)具有回收率高,分离效果

好,避免乳化现象,操作简单、省时、省力等优点。且由于 SPE 内的填充物,可与高效液相色谱柱的填充物相同,所以经 SPE 分离后的物质再经高效液相分析,可以有效地保护仪器,延长色谱柱的使用期限。

本文尝试应用固相萃取装置探讨苦瓜皂苷的高

收稿日期:2008-11-26;修回日期:2009-06-20

基金项目:黑龙江省自然科学基金重点项目(ZN0606-02)

作者简介:李 健(1956~)男,黑龙江哈尔滨人,教授,主要从事食品化学方面的研究。E-mail:lijian4852147@163.com; Mobile: 13384607068

效分离方法,用高效液相色谱对分离后的结果进行分析。研究苦瓜皂苷的快速分离纯化,对进一步研究其构效关系和生理功能具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

苦瓜,(山东寿光出产,购于哈达果蔬批发市场)

1.1.2 试剂

人参皂苷 Rg1 标准品,购于黑龙江省药检所。甲醇、乙腈,色谱纯;重蒸水;无水乙醇、正丁醇、石油醚皆为分析纯;大孔树脂 AB-8,购于天津南开大学。

1.1.3 仪器

LC2000 高效液相色谱,上海天美科学仪器有限公司;萃取小柱 C₁₈ (500 mg, 1 mL);固相萃取装置 HSE-12D,天津市恒奥科技发展有限公司;超声波发生器,昆山市超声仪器有限公司 (KQ-500 VDE);RE52-98 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;普利塞电热恒温箱,上海跃进医疗器械厂;固相超纯水仪,Hitachi Instruments Co. Ltd.

1.2 实验方法

1.2.1 苦瓜皂苷标准曲线的绘制^[2]

得到回归方程 $y = 28.85265x - 0.00574$ ($r^2 = 0.9988$)。

1.2.2 固相萃取法精制苦瓜皂苷

苦瓜皂苷溶剂提取、超声辅提^[3]、大孔树脂纯化^[4]后,经 C₁₈ 固相萃取小柱精制苦瓜皂苷。

1.2.3 固相萃取条件的确定

1.2.3.1 柱预处理

本实验使用的是反相 C₁₈ 小柱,用 10 mL 甲醇通过 SPE 小柱,再用 10 mL 重蒸水通过小柱,对其进行活化。

1.2.3.2 加样

称取 100 mg 纯化后苦瓜皂苷溶于 10 mL 重蒸水中调节 pH,充分溶解过 0.45 μm 滤膜,以 1 mL/min 的流速通过小柱。

1.2.3.3 上样 pH 值的确定

将苦瓜皂苷纯化物水溶液调至不同的 pH 值,上柱,高效液相色谱检测流出液的出峰面积,因为色谱图的出峰面积与皂苷的含量呈正比,因此以出峰面积作为评价标准来确定样液的最适 pH 值。

1.2.3.4 固定相淋洗

配制 10%、20%、30%、40% 的乙醇溶液梯度洗脱,目的是将干扰物洗出,而将目的物保留,流速为 1 mL/min,每个浓度 20 mL 上样总量,5 mL/管收集,淋洗液经高效液相色谱法进行分析。以出峰数

量和峰面积作为评定标准选出最佳的淋洗液浓度。

1.2.3.5 分析物的洗脱和收集

分别配制 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80% 的乙醇,待小柱上样、淋洗后,将小柱真空抽干,洗脱液以 1 mL/min 的流速通过小柱,对目的物进行洗脱,5 mL/管进行收集,共收集两管,待高效液相分析,以出峰数量和峰面积作为评定标准,将出峰数量多,峰面积大的洗脱浓度确定为最佳洗脱浓度。

1.2.3.6 最佳洗脱量的确定

在确定最佳洗脱浓度的基础上,1 mL/管收集洗脱液,高效液相进行分析,确定最佳洗脱量。

1.2.3.7 液相色谱分析条件

检测器:UV 检测器, = 203 nm;色谱柱:ODS-3 250 mm × 4.6 mm, 5 μm;柱温:室温;流动相:乙腈 + 水为 (55 + 45);流速 1.0 mL/min;进样量:20 μL。

1.2.4 香草醛-高氯酸法测定固相萃取精制苦瓜皂苷的含量

准确称取干燥至恒重的精制苦瓜皂苷 5 mg 加甲醇溶解定容至 5 mL,摇匀。精密吸取精制苦瓜皂苷溶液 0.2 mL 与具塞试管中,水浴挥去溶剂,其他步骤与 1.2.1 相同。

1.2.5 高效液相色谱-点喷雾离子阱质谱联用分析

质谱条件:离子阱质谱;离子源:电喷雾 (ESI);雾化压力:0.207 MPa;干燥器流速:12 L/min;干燥器温度:345 ;分流比为 1 : 3;添加少量甲酸。

2 结果与amp;讨论

2.1 固相萃取精制苦瓜皂苷工艺研究结果

2.1.1 样液上样 pH 值的确定

将 C₁₈ 小柱活化后,将不同 pH 的样液上柱,用高效液相色谱检测,峰面积为评价标准,结果如图 1 所示。

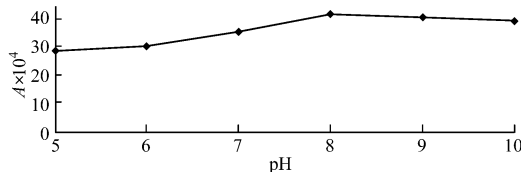


图 1 样液 pH 对吸附效果的影响

吸附过程中吸附质以分子状态被吸附剂吸附,因此要达到较好的效果必须使吸附质保持分子状态,而不是离子状态。实验结果表明,pH 值呈弱碱性时,大孔树脂对苦瓜皂苷的选择吸附性能好,这可能和苦瓜皂苷是非离子性物质有关。苦瓜皂苷在碱性条件下比较稳定,因此,苦瓜皂苷溶液的 pH 选为

8 为宜。

2.1.2 淋洗液的选择结果

对淋洗液进行液相分析, 10%~40%淋洗液洗出的皂苷很少, 出峰面积很小, 其中 10%乙醇浓度的淋洗液基本上没有峰出现, 见图 2。40%洗脱液中有 4.7 min 处明显的峰, 见图 3, 说明 40%的乙醇洗脱时会有少量皂苷被洗脱, 但是相对而言, 杂质基本已完全洗脱。总体而言, 10%~40%的乙醇对苦瓜果皂苷的洗脱能力较差, 对淋洗液体积进行分析发现, 当 10%和 20%淋洗液洗脱量累积到 15 mL, 40%乙醇淋洗液到 10 mL 时基本已经没有杂质峰出现。

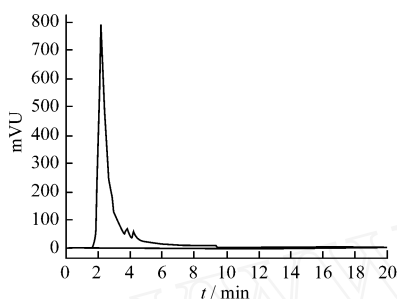


图 2 10%乙醇梯度洗脱高效液相色谱图

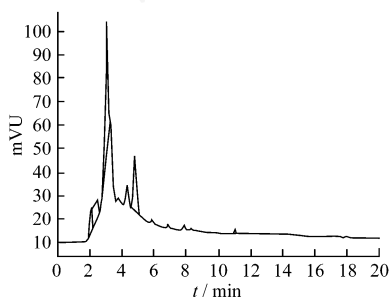


图 3 40%乙醇梯度洗脱高效液相色谱图

最终确定淋洗液浓度为 10%乙醇、20%乙醇各 15 mL 通过固相萃取小柱后, 再用 10 mL 40%乙醇淋洗小柱, 流速为 1 mL/min。

2.1.3 洗脱浓度的选择结果

准备 8 个小柱, 同时上样, 比较不同洗脱液的洗脱效果, 确定最佳的洗脱浓度。选择洗脱液的高效液相色谱中峰型较好、峰高相对高的峰进行峰面积分析, 结果见图 4。图 5 为峰号的参照色谱图。

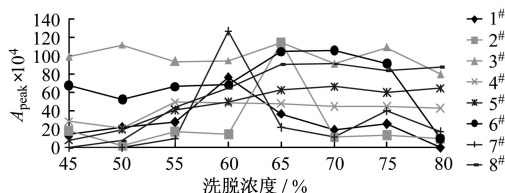


图 4 洗脱浓度对 1#~8# 峰洗脱效果的影响

通过以上分析可见, 大部分峰在乙醇浓度为 65% 时峰面积最大, 只有 1# 和 6# 的峰面积在乙醇浓度为 60% 时峰面积最大。总体而言, 乙醇浓度为 65% 时洗脱效果为最佳, 洗脱液高效液相色谱图见图 5, 其中前三个峰为溶剂峰。之所以出现这样的结果, 是由皂苷的性质决定的。皂苷易溶于稀乙醇和热的无水乙醇, 由于实验是在常温下进行, 所以在乙醇浓度 65% 时的洗脱能力较好, 浓度偏小或偏大均不利于皂苷的溶解。

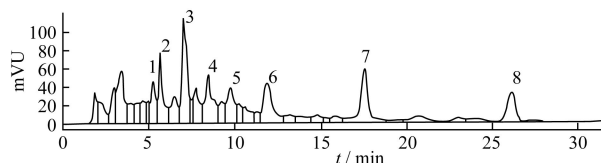


图 5 65%乙醇洗脱液液相色谱图

2.1.4 最佳洗脱量的确定结果

前期所做工作中, 洗脱液采用的是 5 mL/tub 分析的, 选择的范围比较宽, 后期经过调整, 采用 65%乙醇洗脱液 1 mL/tub 收集, 经高效液相分析得出, 65%乙醇的洗脱量在 7 mL 时就可以将皂苷全部洗出。

2.2 香草醛-高氯酸法测定固相萃取精制苦瓜果皂苷的含量

由表 1 可以看出, 用固相萃取精制的皂苷含量要比纯化后的苦瓜果皂苷大 30.62%, 比苦瓜果粗皂苷含量高 55.65%, 固相萃取方法大大增大了苦瓜果皂苷的纯度, 此方法可行。

表 1 不同提纯方法所得苦瓜果总皂苷含量表

皂苷含量 / %	溶剂提取超声辅	大孔树脂纯化	固相萃取精制
	提苦瓜果粗皂苷	苦瓜果皂苷	苦瓜果皂苷
	26.48	51.51	82.13

2.3 液质分析结果

分别在正、负离子检测方式下, 将 65%乙醇洗脱皂苷注入液质联用仪, 获得了高效液相色谱图和对应图 12 中的 8 个峰的苦瓜果皂苷的一级全扫描质谱图, 如表 2 所描述。

经与文献^[5]对照可知, 1~5 号峰为苦瓜果皂苷 L (*momordicoside L*), 6 号苦瓜果皂苷结构可能为苦瓜果皂苷 F₂ (*momordicoside F₂*) 或苦瓜果皂苷 I (*momordicoside I*), 7、8 号苦瓜果皂苷结构可能为 3, 7, 25-三羟基-葫芦烷-5, (23E)-二烯-19-醛 (3, 7, 25-trihydroxy-cucurbitar-5, (23E)-diene-19-al) 或苦瓜果素 I (*momordicine I*)。因此可判定经固相萃取精制所得的产物为皂苷类物质, 且为三萜类皂苷。

表 2 固相萃取所得精制苦瓜皂苷 1[#] ~ 8[#] 的 LC-MS 测定数据

峰号	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+H-162-2H ₂ O] ⁺	[M+2H-H ₂ O] ⁺	[M+H-162-H ₂ O] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺	[2M-H] ⁻	M
1~5	657	673	437	—	—	—	—	634
6	641	657	—	602	439	—	—	618
7,8	495	511	—	—	—	437	943	472

3 结论

建立了固相萃取法精制苦瓜皂苷。固相萃取精制的最佳工艺条件为:上样 pH 为 8, 10%、20% 乙醇各 15 mL 淋洗后用 10 mL 40% 乙醇淋洗, 洗脱液浓度为 65%, 洗脱体积为 7 mL, 流速为 1 mL/min 时, 此条件下所得液相色谱峰数、峰形、峰面积均较理想。测得最佳条件下精制的苦瓜总皂苷含量为 82.13%。经 ES-MS 定性, 判定精制后产物为皂苷类物质且为三萜类皂苷。固相萃取方法不仅可以省时, 省力, 还可以显著的提高皂苷的含量, 为对苦瓜皂苷进行进一步分析奠定了良好的基础。

参考文献:

(上接第 452 页)

- [2] Fujishima A, Rao T N, Tryk D A. Titanium dioxide photocatalysis[J]. *J of Photochem and Photobiology C:Photochem Rev*, 2000, 1:1-21.
- [3] 付贤智, 丁正新, 苏文悦, 等. 二氧化钛基固体超强酸的结构及其光催化氧化性能[J]. *催化学报*, 1999, 20(3):321-324.
- [4] 郑金玉, 丘坤元, 危岩. 有机小分子模板法合成三氧化钛中孔材料[J]. *高等学校化学学报*, 2000, 21(4):647-649.
- [5] Fu X Z, Zeltner W A, Yang Q, *et al.* Catalytic hydrolysis of dichlorodifluoromethane (CFC-12) on sol-gel-derived titania unmodified and modified with H₂SO₄[J]. *J Catal*, 1997, 168:482.

(上接第 471 页)

- [20] Corbin P S, Zimmerman S C. *J Am Chem Soc* [J], 2000, 122:3779-3781.
- [21] Mazik M, Cavga H, Jones P G. *J Am Chem Soc* [J], 2005, 127:9045-9052.
- [22] Kiyonaka S, Sugiyasu K, Hamachi I, *et al.* *J Am*

- [1] 李健, 张令文, 闫恩志, 等. 苦瓜皂苷的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2005, 26(3):21-24.
- [2] 陈勋, 于海宁, 唐德松, 等. 苦瓜皂甙快速分离纯化方法研究[J]. *食品科学*, 2004, 25(2):114-117.
- [3] 李健, 张令文, 刘宁. 超声波提取苦瓜总皂苷的研究[J]. *化学世界*, 2007, 48(2):104-106.
- [4] 李健, 张令文, 等. 大孔吸附树脂法纯化苦瓜皂苷工艺的研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 29(7):127-130.
- [5] Okabe H, Miyahara Y, Yamauchi T, *et al.* Studies on the constituents of *Momordica Charantia* L. I. Isolation and characterization of momordicoside A and B, glycosides of apentahydroxy-cucurbitane triterpene[J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(9):2753-2762.

- [6] 王怡中, 符雁, 汤鸿霄. 二氧化钛悬浆体系太阳光降解甲基橙研究[J]. *环境科学学报*, 1999, 19(1):65-69.
- [7] 王怡中, 符雁, 汤鸿霄. 平板构型太阳光催化反应系统中甲基橙降解脱色研究[J]. *环境科学学报*, 1999, 19(2):32-36.
- [8] Siham A Q, Salman R S. Photocatalytic degradation of methyl orange as a model compound [J]. *J of Photochem and Photobiology A: Chemistry*, 2002, 148:161.
- [9] 方世杰, 徐明霞, 黄卫友, 等. 纳米 TiO₂ 光催化降解甲基橙[J]. *硅酸盐学报*, 2001, 29(5):439-442.
- [10] 柯顿主编, 陈大华, 等译. *光源与照明*[M]. 第四版. 上海: 复旦大学出版社, 2000:309.

(上接第 487 页)

- [10] 凌绍明, 沈文闻, 隆金桥. (Ag)_n · (Au)_m 复合纳米粒子的制备[J]. *化学世界*, 2003, 44(12):622-625.
- [11] Jiang Z L, Feng Z W, Jiang Y M, *et al.* Microwave high-pressure synthesis of titania nanoparticles and its

- Chem Soc* [J], 2002, 124:10954-10955.
- [23] Wang W H, Xi P H, Su X Y, *et al.* *Cryst Growth Des* [J], 2007, 7(4):741-746.
- [24] Hofmeier H, El-ghayoury A, Schubert U S. *Chem. Commun* [J], 2004, 318-319.
- resonance scattering spectroscopic study[J]. *Chemical Journal on Internet*, 2001, 3(4):17-20.
- [12] 金钦汉. *微波化学*[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 94-144.