

文章编号:1673-1689(2008)06-0044-05

癩葡萄皂苷的分离、纯化及其结构鉴定

赵明禹^{1,2}, 陶冠军¹, 顾小红¹, 汤坚^{*1}, 蒋超³

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214125; 3. 无锡富仁生物科技有限公司, 江苏 宜兴 214255)

摘要: 分别使用 AB-8 大孔树脂、C₁₈ 填料柱, 从癩葡萄醇提取物中分离纯化癩葡萄皂苷, 并用高效液相色谱法测定所得化合物的相对含量, 最后使用质谱、核磁共振的方法对其分子结构进行了鉴定。结果成功分离纯化出一种皂苷, 经测定, 该皂苷的纯度为 95.70%, 结构鉴定为葫芦烷-5-烯-3 β , 22, 23, 24, 25-四羟基-3-O-3- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 6)-D-吡喃葡萄糖苷。

关键词: 癩葡萄; 皂苷; 纯化; 电喷雾质谱; 核磁共振

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Separation, Purification and Structure Identification of a Saponin from *Momordica charantia* L. Var. *abbreviate* Ser

ZHAO Ming-yu^{1,2}, TAO Guan-jun¹, GU Xiao-hong¹, TANG Jian^{*1}, JIANG Chao³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214125, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214125, China; 3. Wuxi Furen Biological Technology CO., LTD. Yingxing 214255, China)

Abstract: To separate, purify and identify saponins from *Momordica charantia* L. Var. *abbreviate* Ser were studied. The ethonal extract of *Momordica charantia* L. Var. *abbreviate* Ser was purified through AB-8 and C₁₈ column. The relative content of the obtained saponin was determined by HPLC and its structure was identified by NMR. One saponin, the relative content 95.70% and the structure cucurbitane-5-en-3 β -22, 23, 24, 25-tetrahydroxyl -3-O-3- β -D- glucopyranose(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucopyranoside was obtained succedssfully, and was same to the Momordicoside A that has been reported in peer view international journals.

Key words: *Momordica. Charantia* L. Var. *abbreviate* Ser; saponin; purification; ESI-MS; NMR

癩葡萄(*Momordica. charantia* L. Var. *abbreviate* Ser)属于葫芦科苦瓜属的一个变种, 原产于印

收稿日期: 2007-09-10.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(20060BA027SB03).

作者简介: 赵明禹(1982-), 男, 江苏无锡人, 食品科学硕士研究生.

* 通讯作者: 汤坚(1945-), 男, 江苏武进人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品风味、食品功能因子和食品分析等研究. Email: tkjie999@sina.com

度,由江苏省优质产品开发服务中心驯化改良而成,无锡富仁生物科技有限公司大面积栽培获得成功。癩葡萄富含皂苷、多肽、多糖等活性成分,具有降血糖、降血脂、抗癌、抗艾滋病、抑菌、抗氧化、增强免疫力等功效^[1-6]。皂苷是癩葡萄重要的活性成分之一,癩葡萄皂苷占果实干重的3.1%,具有明显的降血糖活性^[7]。

苦瓜中主要含有葫芦素烷型、齐墩果烷型、乌苏烷型等三萜类皂苷。现在共有 *Momordicoside A*、*Momordicoside B*、*Goyaglycoside a*、*Goyaglycoside b* 等30多种苦瓜皂苷已见报道^[8-10],而对于苦瓜的变种癩葡萄,目前还未见有关其皂苷单体的研究报道。传统的皂苷分离纯化方法是将皂苷的粗提物经大孔树脂、硅胶柱和 C_{18} 填料柱反复洗脱,并采用薄层层析法检测得到不同种类的皂苷,这种方法操作繁琐,工作量大,使用了大量有毒的有机溶剂^[11]。作者将粗皂苷经大孔吸附树脂初步洗脱后直接上 C_{18} 填料柱分离,采用电喷雾质谱检测,合并分子离子峰相同的洗脱液,得到一种皂苷纯品,简化了分离步骤,缩短了分离纯化周期,避免使用如氯仿等毒性大的有机溶剂。电喷雾质谱是一种很“软”的质谱,可以得到物质的准分子离子峰,通常没有碎片离子峰,对皂苷等极性较大的物质测定十分有利。通过质谱、核磁共振确定了该皂苷的分子结构。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

癩葡萄干粉:无锡富仁科技有限公司提供;Aglient 1100 型高效液相色谱仪;Aglient 公司产品;Waters Platform ZMD 4000 质谱仪;Waters 公司产品;旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂产品;Unico FWJ2000 型可见光分光光度计;尤尼科仪器有限公司生产; C_{18} 填料:日本 YMC 公司生产;大孔树脂 AB-8:南开大学化工厂生产;Bruker AVANCE AV-500 核磁共振仪;Bruker 公司产品。

1.2 癩葡萄皂苷的分离纯化

癩葡萄干粉 1 kg,置于 10 L 的容器中,加入体积分数 75% 乙醇 9 L,70 °C 下提取 24 h。用旋转蒸发器将提取液浓缩至一定体积,再用正丁醇萃取。蒸干萃取液中的正丁醇,用水复溶,再用 AB-8 大孔树脂吸附,分别用体积分数 40%、60% 及 95% 的工业乙醇洗脱^[12-13]。取体积分数 60% 乙醇洗脱液,浓缩后上 C_{18} 填料柱(20 mm×800 mm,200~300 目),用体积分数 60%~100% 甲醇水溶液梯度洗

脱,再用分步收集器收集洗脱液,每管收集 10 mL,使用质谱作为检测器,将所得质谱信息中分子离子峰相同的洗脱液合并,浓缩后得到一种癩葡萄皂苷单体。

1.3 癩葡萄皂苷纯度鉴定

使用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定癩葡萄皂苷的纯度。条件为:色谱柱:Zorbax SB C_{18} , 4.6×150 mm;柱温:30 °C;流动相:体积分数 60%~100% 甲醇水溶液梯度洗脱;体积流量:0.3 mL/min;进样量:1 μ L;检测器:蒸发光散射(ELSD)。

1.4 癩葡萄皂苷分子结构的质谱法推测

将癩葡萄皂苷溶于甲醇中,用 ESI/MS 进行测定。质谱条件:离子方式 ESI^+ 和 ESI^-/MS ,毛细管电压 4.23 kV,锥孔电压 36 V; ESI^+/MS :毛细管电压 4.20 kV,锥孔电压 36 V;离子源温度 100 °C;脱溶剂汽温度 250 °C;相对分子质量范围:200~1 000 m/z ;光电倍增器电压 700 V;检测器真空 2.6 Pa;载气为氮气,体积流量 4.3 L/h;进样方式:直接进样。

1.5 癩葡萄皂苷分子结构的 NMR 法测定

将分离得到的化合物溶于氘代甲醇(CD_3OD)中,以四甲基硅烷(TMS)作内标,核磁共振仪测定该化合物的氢谱(^1H-NMR)、全去偶碳谱($^{13}C-NMR$)、不失真极化转移增强谱(DEPT-NMR)。

2 结果与讨论

2.1 癩葡萄皂苷的纯度检测

癩葡萄皂苷的紫外吸收很弱,如果在用 HPLC 测定其浓度时使用紫外检测器,则会产生很大的误差,因此这里使用蒸发光散射检测器。由图 1 知,保留时间为 3.055 min 处的峰为杂质峰,而保留时间为 5.268 min 处的峰则为样品峰。面积归一化法显示其相对含量为 95.70%,已达到进行核磁共振检测所需的纯度。

2.2 质谱法推测癩葡萄皂苷的结构

使用电喷雾质谱法推测癩葡萄皂苷的结构^[13],结果见图 2。

在正离子谱图中, m/z 840 为该化合物分子结合了一个钠离子后形成的准分子离子峰;而在负离子谱图中,一共有一个准分子离子峰和两个主要的离子碎片峰,其中, m/z 816 为该化合物失去了一个质子后的准分子离子峰,由此可推断该化合物的相对分子质量为 817, m/z 654 可能为该化合物掉了一个糖基碎片(816~162)后形成的碎片离子峰, m/z 492 可能为该化合物掉了两个糖基(816-162-

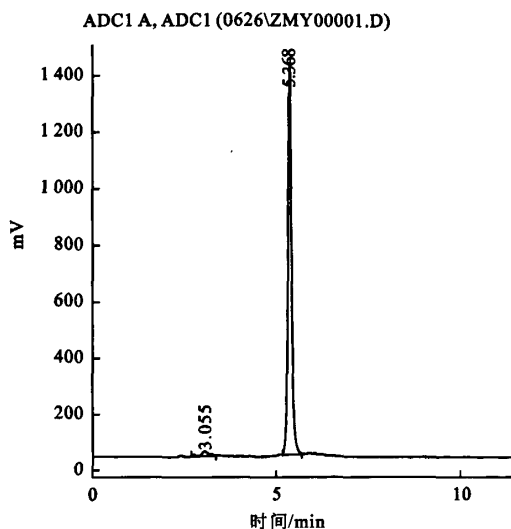


图 1 癩葡萄皂苷的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC result of the saponin from *Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser

162)后形成的碎片离子峰。癩葡萄皂苷同苦瓜皂苷一样,都是四环三萜类皂苷,由于四环三萜类皂苷含有 30 个碳原子,其相对分子质量应大于 360,

因此 m/z 492 可能是该化合物的母核形的碎片离子峰。

2.3 癩葡萄皂苷的磁核共振数据及其结构鉴定

该化合物为白色粉末,溶于甲醇,在甲醇水溶液中析出白色沉淀。 $^1\text{H-NMR}$ 显示苷元部分共含有 8 个甲基质子信号 [δ 0.82(3H,s), 0.95(3H,d, $J=6.77$ Hz), 1.05(3H,s), 1.34(3H,s), 1.35(3H,s), 1.55(3H,s), 1.56(3H,s), 2.05(3H,s)], 3 个相对于低场的含氧碳上的质子信号 [δ 3.64(1H,d, $J=6.81$ Hz), 3.66(1H,d, $J=4.96$ Hz), 3.68(1H,d, $J=4.35$ Hz)] 和一个多重峰烯基质子信号 [δ 5.68]。在化学位移为 3~6 的范围内,还存在着 2 个糖基上的 12 个质子信号,分别为 [δ 3.18(2H,d, $J=8.07$ Hz), 3.36(2H,d, $J=9.98$ Hz), 3.42(1H,t, $J=7.75$ Hz), 3.55(1H,t, $J=7.65$), 3.76(1H,d, $J=7.12$ Hz), 3.82(1H,d, $J=7.20$ Hz), 3.85(1H,d, $J=9.88$ Hz), 4.08(1H,d, $J=9.82$ Hz), 4.28(1H,d, $J=7.81$ Hz), 4.42(1H,d, $J=7.81$ Hz), 5.45(1H,d, $J=6.23$), 5.52(1H,d, $J=5.43$)]。

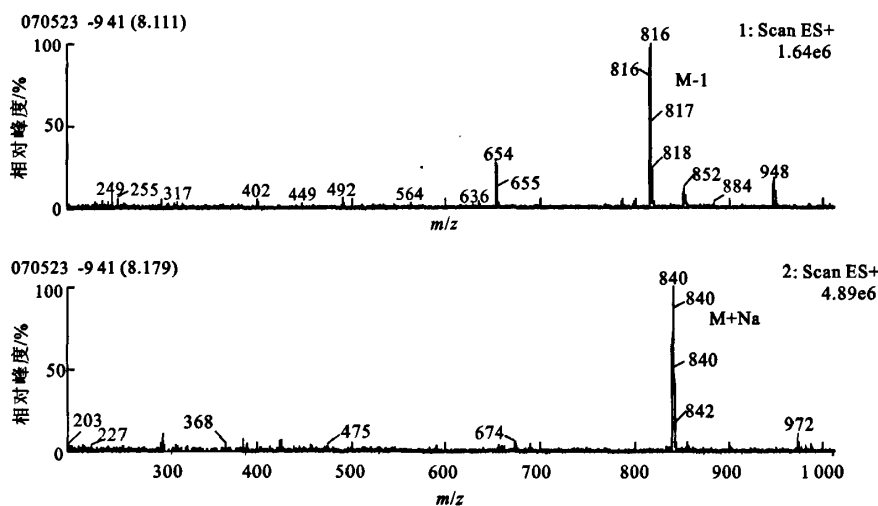


图 2 癩葡萄皂苷的 ESI-MS 图

Fig. 2 ESI-MS of the *Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser

该化合物碳谱中各碳化学位移数据如下: $^{13}\text{C-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) [δ 23.4 (C-1), 28.7 (C-2), 88.5 (C-3), 42.6 (C-4), 144.6 (C-5), 120.3 (C-6), 25.6 (C-7), 45.5 (C-8), 39.8 (C-9), 33.8 (C-10), 29.9 (C-11), 30.0 (C-12), 48.1 (C-13), 49.1 (C-14), 36.4 (C-15), 26.2 (C-16), 48.8 (C-17), 16.0 (C-18), 29.0 (C-19), 43.7 (C-20), 14.9 (C-21), 72.4 (C-

22), 76.0 (C-23), 72.6 (C-24), 75.3 (C-25), 28.4 (C-26), 28.8 (C-27), 23.9 (C-28), 26.6 (C-29), 18.9 (C-30), 106.8 (C-1'), 75.9 (C-2'), 78.4 (C-3'), 72.0 (C-4'), 78.3 (C-5'), 70.2 (C-6'), 105.1 (C-1''), 75.4 (C-2''), 78.3 (C-3''), 71.9 (C-4''), 77.4 (C-5''), 63.1 (C-6'')]. $^{13}\text{C-NMR}$ 显示了此化合物含有 42 个碳,除了两个糖之外,母环上有 30 个碳原子,说明它为

三萜类皂苷。其中共有8个甲基,从双键的化学位移判断此化合物为四环三萜类皂苷。除了糖分子上的10个碳原子外,另外还有4个碳含有羟基信号,表明该化合物有多个取代羟基。这一点从DEPT谱中仅有7个CH₂也得到了证实。两个糖的连接方式为1→6相连,并接在C-3上。由此推断该化合物为葫芦烷-5-烯-3β,22,23,24,25-四羟基-3-O-3-β-D-吡喃葡萄糖(1→6)-D-吡喃葡萄糖苷。这种皂苷与1980年日本学者Okabe等人报道的苦瓜皂苷A相一致^[14]。该皂苷分子式为C₄₂H₇₂O₁₅。

3 结 语

通过大孔树脂柱及C₁₈填料柱纯化癩葡萄皂苷粗提物,得到一种癩葡萄皂苷纯品。皂苷的分离纯化一般采用薄板层析作为检测方法,用质谱作为检测方法目前应用还不多,在C₁₈填料的洗脱液中,还含有许多其它纯度不是很高的皂苷,倘若可以结合制备高效液相色谱法,还可以得到更多种皂苷纯品,因此该方法有着很好的应用前景。

参考文献(References):

- [1] Shubhashish Sarkar. Demonstration of the hypoglycemic action of momordica charantia in a validated animal model of diabetes[J]. *Pharmacological Research*, 1996, 33(1): 3.
- [2] 王争光,俞颂东. 苦瓜的有效成分和药用价值[J]. 浙江中医杂志, 2003(10): 448-450.
WANG Zheng-guang, YU Song-dong. Active constituents and medical value of *Momordica charantia*[J]. *Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2003(10): 448-450. (in Chinese)
- [3] Takemoto D J, Dounford C, McMurray M M. The cytotoxic and cytostatic efforts of the bitter melon on human lymphocytes[J]. *Toxicol*, 1982, 20(3): 597-599.
- [4] 张素. 植物药材中抗艾滋病活性成分研究[J]. 中医药信息, 1994(4): 30.
ZHANG Su. Studies on anti-HIV active constituents from plant medicine[J]. *Information on Traditional Chinese Medicine*, 1994(4): 30. (in Chinese)
- [5] 袁晓晴,顾小红,蒋在良,等. 癩葡萄降糖活性成分的提取及其降糖活性研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 20(3): 30-31.
YUAN Xiao-qing, GU Xiao-hong, JIANG Zai-liang, et al. Studies on extraction of active extract and its hypoglycemic activity of *Momordica charantia* Var. *abbreviata* Ser. [J]. *Food Research and Development*, 2006, 20(3): 30-31. (in Chinese)
- [6] 袁晓晴,顾小红,汤坚. 癩葡萄水提物的降糖效果研究[J]. 食品科技, 2007(1): 215-218.
YUAN Xiao-qing, GU Xiao-hong, TANG Jian. Antihyperglycemic effect of aqueous extract from *Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. on alloxan-induced rats[J]. *Food Science and Technology*, 2007(1): 215-218. (in Chinese)
- [7] 赵海雯. 癩葡萄皂苷的分离纯化及降血糖功效研究[D]. 江南大学, 2005.
- [8] Begum S, Ahmed M, Siddiqui B S, et al. Triterpenes, a sterol and a monocyclic alcohol from *Momordica charantia* L. [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(7): 1313-1320.
- [9] 朱照静. 苦瓜有效成分研究[J]. 药科学报, 1990(12): 898-903.
ZHU Zhao-jing. Studies on active constituents of *Momordica charantia* L. [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1990(12): 898-903. (in Chinese)
- [10] 肖志艳,陈迪华,斯建勇. 苦瓜的化学成分研究[J]. 中草药, 2000, 31(8): 571-573.
XIAO Zhi-yan, CHEN Di-hua, SI Jian-yong. Studies on chemical constituents from *Momordica charantia* L. [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2000, 31(8): 571-573. (in Chinese)
- [11] 石雪萍,李迎秋,姚惠元. 一种苦瓜甙的分离纯化及结构推断[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 25(3): 109-111.
SHI Xue-ping, LI Ying-qiu, YAO Hui-yuan. Separation, purification and structure deduction of a saponin from *Momordica charantia* L. [J]. *Chinese Traditional Plant Medicine*, 2005, 25(3): 109-111. (in Chinese)
- [12] 王昌利,宋小妹,高文平,等. 长梗绞股蓝总甙提取工艺[J]. 中成药, 1994, 16(2): 3-6.
WANG Chang-li, SONG Xiao-mei, GAO Wen-ping, et al. Study on process for extracting total saponins of *Gynostemma Longipes* [J]. *Chinese Traditional Plant Medicine*, 1994, 16(2): 3-6. (in Chinese)
- [13] 梁静谊,蒋建新,朱莉伟,等. 皂荚皂甙提取工艺的研究[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(6): 58-61.
LIANG Jing-yi, JIANG Jian-xin, ZHU Li-wei, et al. Study on the extraction technics of the pod of *Gleditsia sinensis* [J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2003, 22(6): 58-61. (in Chinese)
- [14] Hikaru Okabe, Yumi Miyahara, Tatsuo Yamauchi, et al. Study on the constituents of *Momordica charantia* L. I. Isolation and characterization momordicosides A and B. Glycosides of a pentahydroxy-cucurbitane triterpene[J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(9): 2753-2762.

(责任编辑:杨 萌)