

分光光度法测定苦瓜总皂甙含量

徐 斌, 董 英

(江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 用甲醇回流浸提苦瓜总甙, 并经硅胶柱分离制备单体皂甙 Momordicoside A。以 Momordicoside A 为标样, 选择波长 546nm, 采用分光光度法, 建立了苦瓜总皂甙含量测定方法。实验结果表明: 全苦瓜干粉中总皂甙质量分数为 0.0432%; 标准曲线下, 皂甙含量自 40 μ g 到 200 μ g 呈线性关系, 回归方程为 $A=0.0058C-0.1125$ ($R^2=0.9994$)。加样回收率为 102.72%, RSD 为 3.99%。本法操作简便、快速、准确, 可作为苦瓜原料及苦瓜制品质量评价方法。

关键词: 苦瓜; 总皂甙; 苦瓜甙 A; 分光光度法; 测定

Determination on Total Saponins of *Momordica Charantia* L. by Spectrophotometry

XU Bin, DONG Ying

(School of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: A method for the determination on total saponins of *Momordica charantia* L. was established: using MeOH by continuous thermal reflux to extract its total saponins, taking mordicoside A as standard sample, selecting 546nm wavelength and by spectrometric method. The results showed that the Total Saponins accounted for 0.0432% of the dried powder of *Momordica charantia* L. And the regression equation within the range of the standard sample concentration in 40~200 μ g was ($A=0.0058C-0.1125$) with a good linearity ($R^2=0.9994$). The average recovery rate was 102.72% and RSD =3.99%. The method is simple, rapid and accurate and suitable for the quality evaluation of *Momordica Charantia* L. material and products.

Key words: *Momordica charantia* L.; total saponins; Mordicoside A; spectrometric method; determination

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)10-0165-05

苦瓜皂甙是苦瓜中最主要生理活性成分之一, 具有显著的降低血糖生理活性^[1~3]。但是, 由于不同品种的苦瓜, 甚至是同一品种不同的种植条件都会对苦瓜中皂

甙含量造成影响, 因此, 有必要建立一个操作简单、容易实施的苦瓜皂甙测定方法, 便于苦瓜种植基地和加工企业控制、检测苦瓜原料的质量, 进而控制和确保

收稿日期: 2004-10-26

基金项目: 江苏省科技攻关项目(BE2004360)

作者简介: 徐斌(1969-), 男, 工程师, 硕士, 主要从事天然产物的研究与开发。

- multiresidue, screening of chloramphenicol, nitrofurans and sulphonamide residues in pork and beef [J]. J AOAC Int, 1997, 80(4):737-740.
- [7] Schmid P, et al. Determination of nitrofurans derivatives and cyano-metabolites in swine tissues [J]. Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg, 1990, 81 (4): 461-483.
- [8] Degroodt J M, et al. Chloramphenicol and nitrofurans residue analysis by HPLC and photodiode array detection in meat and fish [J]. J Liq Chromatogr Sep, 1992, 15 (13): 2355-2371.
- [9] Posyniak A, et al. Solid-phase extraction and liquid chroma-

- tography analysis of nitrofurans compounds in meat [J]. Chem. Anal (Narsaw), 1994, 39(3): 289-294.
- [10] Draisci R, et al. Determination of nitrofurans residues in avian eggs by Liquid Chromatography UV Photodiode array detection and confirmation by Liquid chromatography ionspray mass spectrometry [J]. Journal of chromatography A, 1997, 777 (1):201-211.
- [11] David W, et al. Depletion and bioavailability of [14 C] furazolidone residues in swine tissues [J]. J Agric Food Chem, 1995, 43: 2520-2525.

苦瓜制品的质量。

有文献报道^[4,5], 苦瓜中皂甙类化合物主要是四环三萜皂甙和甾体皂甙, 还有少量五环三萜皂甙。它们的结构非常相近, 甙元部位仅含有 $C=C$ 孤立双键, 紫外光谱图在 208nm 为末端吸收。在已分离得到的约 60 余种苦瓜皂甙中, Momordicoside A 的含量约占苦瓜总皂甙含量的 50%^[6]。

由于目前国家没有苦瓜皂甙的对照品, 所以本研究首先制备了单体皂甙 Momordicoside A, 并以此绘制标准曲线, 采用比色法测定苦瓜总皂甙含量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

山苦瓜, 扬中绿健苦瓜茶厂提供。

Agilent 1100 高效液相色谱仪 安捷伦科技公司; Cary 紫外-可见分光系统 美国 VARIAN 公司; 旋转蒸发器 上海精科实业有限公司; 微电脑真空干燥箱 美国 SHELLAB 公司; ALPHA2-4 冷冻干燥机 德国 CHRIST 公司; Avanti J 25 高速冷冻离心机 美国 BECKMAN 公司; LD5-2A 离心机 北京医用离心机厂; XT4-100 显微熔点仪(未校正); WZZ-1 型自动旋光仪; 层析柱 i.d 5 × 100(床体积 2000ml), i.d 2 × 100(床体积 300ml) 上海华美实验仪器公司; 硅胶(200~300 目), 薄层层析硅胶, 硅胶板 青岛海洋化工厂; 氯仿、乙醇、石油醚、正丁醇、香草醛、甲醇、丙酮、浓硫酸、冰醋酸、高氯酸等均为分析纯。

1.2 苦瓜皂甙的提取^[7]

提取工艺流程如图 1 所示。

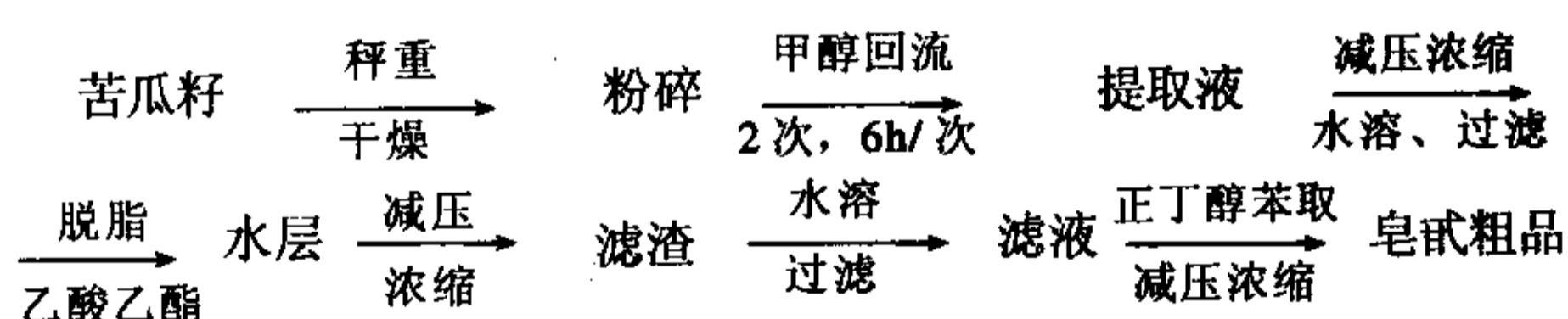


图 1 苦瓜皂甙有机溶剂提取流程图

Fig.1 The extract process of *Momordica charantia* L.saponins

1.2.1 原料预处理 称取一定量的苦瓜籽, 50℃低温干燥后, 60 目粉碎, 得到苦瓜籽粉。

1.2.2 提取 称取 1.5kg 干燥苦瓜籽粉, 然后向其中加入甲醇 4500ml 在 60℃条件下, 回流 5h, 用布氏漏斗过滤; 残渣加入 4500ml 甲醇溶液(甲醇:水 = 1:1), 60℃浸泡 5h; 将滤液合并, 减压浓缩至干。

1.2.3 脱脂 用 500ml 蒸馏水溶解, 每次加乙酸乙酯 400ml 脱脂 4 次, 合并水层, 减压浓缩至 400ml。

1.2.4 萃取 水溶液用水饱和的正丁醇萃取 4 次(400、400、300、300ml), 取正丁醇相, 减压浓缩至呈褐色

粘稠状时冷却。得苦瓜皂甙粗品。

1.3 单体苦瓜皂 A 的制备

1.3.1 装柱

称取 750 克硅胶(200~300 目), 加氯仿 1500ml。在柱中(i.d 5 × 100cm)注入 500ml 氯仿, 将湿硅胶缓缓倒入柱中, 并轻轻敲击柱壁。装柱完成后用氯仿平衡 24h。

1.3.2 上样

取苦瓜皂甙 8g 加入 5ml 甲醇溶解, 3000r/min 离心, 取上清上样。

1.3.3 洗脱

采用梯度洗脱(氯仿:甲醇:水 10:3:1, 下层, 2500ml → 65:35:10, 下层, 3500ml), 用部分收集器分部收集, 流速 1.5ml/min, 25ml/管。TLC 检识,(展开剂氯仿:甲醇:水 = 10:3:1, 下层), 合并相同流分, 减压浓缩。

1.3.4 纯化

将主组分 A 挥去溶剂, 冷冻干燥; 称取 1g 主组分 A, 用 2ml 甲醇溶解, 3000r/min 离心, 取上清备用; 称取 100g 硅胶, 同上法装柱(2 × 100cm); 用氯仿:甲醇:水 65:35:10, 下层溶液洗脱, 部分收集器分部收集, 流速 1ml/min, 25ml/管; TLC 检识(展开剂氯仿:甲醇:水 = 7:3:1, 下层), 合并相同流分, 减压浓缩; 反复数次。

洗脱液浓缩后甲醇溶解, 重结晶即得苦瓜单体皂甙化合物纯品。

1.3.5 熔点测定

样品按要求焙干, 在干燥和洁净的碾钵中碾碎, 用自由落体法敲击毛细管, 使样品填装结实, 样品填装高度不小于 3mm。平行测 3 次, 保持样品高度一致, 以确保测量结果的一致性。提前 3~5min 插入毛细管, 线性升温速率选 2℃/min, 起始温度选 140℃。

1.3.6 比旋光度测定

样品配成 0.1% 水溶液, 测定温度 20℃, 以 WZZ-1 型自动指示旋光仪测定其比旋度。

1.3.7 高效液相检测单体苦瓜皂 A^[8]

色谱柱为 C18, 流动相为 V(乙腈):V(甲醇):V(50mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液) = 25:20:60, 流速为 0.8ml/min, 检测波长为 208nm。

1.4 比色法测定苦瓜总皂甙的含量^[9]

1.4.1 分析方法

1.4.1.1 测定波长的选择

吸取 Momordicoside A 甲醇标准液(1.274mg/ml)80μl, 自然挥干溶剂, 加 5% 草醛冰醋酸溶液 0.2ml, 高氯酸 0.8ml, 摇匀、密塞, 于 60℃水浴加热 15min, 冰浴冷却, 加冰醋酸 5.0ml, 用美国瓦里安公司紫外可见分光系统于 400~700nm 波长之间测定吸收曲线 2。

1.4.1.2 建立回归方程

Momordicoside A 12.74mg, 加甲醇溶解定容于 10ml 量瓶中, 摇匀, 分别吸取 40、80、120、160、200 μ l 置 10ml 具塞试管中, 自然挥干溶剂, 各加 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2ml, 高氯酸 0.8ml, 混匀, 密塞, 置 60℃ 水浴中加热 15min, 冰水浴冷却 10min, 各加冰醋酸 5.0ml, 摇匀, 于 546nm 波长处测定吸光度。

1.4.2 样品溶液制备

准确称取苦瓜(含籽)干燥粉末 50g 置于 500ml 烧瓶中, 用 60% 乙醇以 60℃ 搅拌回流 5h, 反复 3 次。合并提取液, 浓缩回收乙醇至干, 加蒸馏水溶解, 然后用水饱和的正丁醇萃取数次, 合并正丁醇相, 减压回收正丁醇至干, 用甲醇溶解后, 3000r/min 离心后移至 10ml 容量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀备用。

1.4.3 样品皂甙质量分数的测定

准确吸取样品溶液 80 μ l 置于 10ml 具塞试管中。同标准曲线制作方法, 在最大吸收波长处测定吸光度。从标准曲线中找出对应的质量浓度。

总皂甙质量分数 / % = (样品液皂甙的质量浓度 \times 样品液的体积 / 苦瓜粉末质量) \times 100%

1.4.4 重复性试验

取上述样品进行 6 次测定, 计算相对标准偏差, 分析其重现性。

1.4.5 回收率试验

准确称取已知质量分数的苦瓜粉末 50g, 各加入苦瓜皂甙对照品 20mg, 用乙醇溶液进行提取, 提取方法按 2.3.2 操作, 测定按 2.3.3 方法。

1.4.6 稳定性考察

精密吸取供试品溶液 80 μ l、对照品溶液 60 μ l, 按照 2.3.1 标准曲线的绘制方法, 分别在不同时间(5~120min)测定吸光度, 每隔 5~10min 测定一次。根据供试品和对照品吸光度时间变化曲线, 观察样品随时间变化的稳定性, 选择两者显色稳定的时间段测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 苦瓜皂甙的提取

1.5kg 苦瓜籽得苦瓜皂甙粗品 12.6g。

2.2 苦瓜皂甙的分离、纯化

苦瓜皂甙粗品经过硅胶柱层析分离得到苦瓜甙 A 主要峰和 3 个小的洗脱峰。收集 A 峰的洗脱液, 反复硅胶柱层析, 洗脱液浓缩后甲醇溶解, 离心后甲醇重结晶, 得苦瓜皂甙化合物纯品 572mg。

2.3 结构分析

苦瓜皂甙化合物纯品的熔点为 180~188℃; 比旋光度 $[\alpha]^{20} + 1.05$; 高效液相检测呈单一峰(苦瓜甙 A 的保留

时间 6.354min, 1.930、2.400 为甲醇溶剂峰), 如图 2。对照文献可推测该化合物为 Momordicoside A, 结构式如图 3。

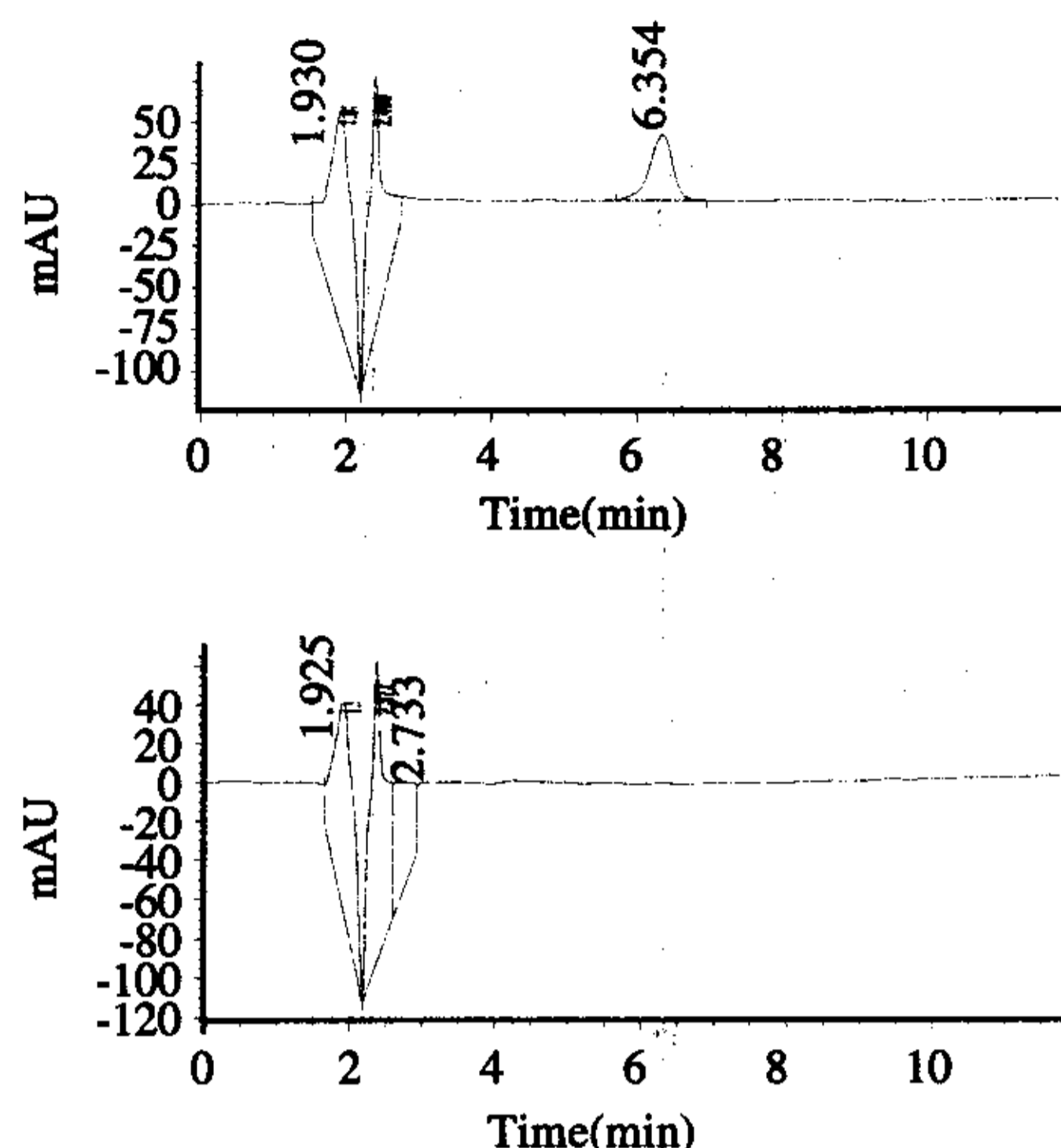


图 2 Momordicoside A 高效液相图谱
Fig.2 HPLC chromatograms of Momordicoside A

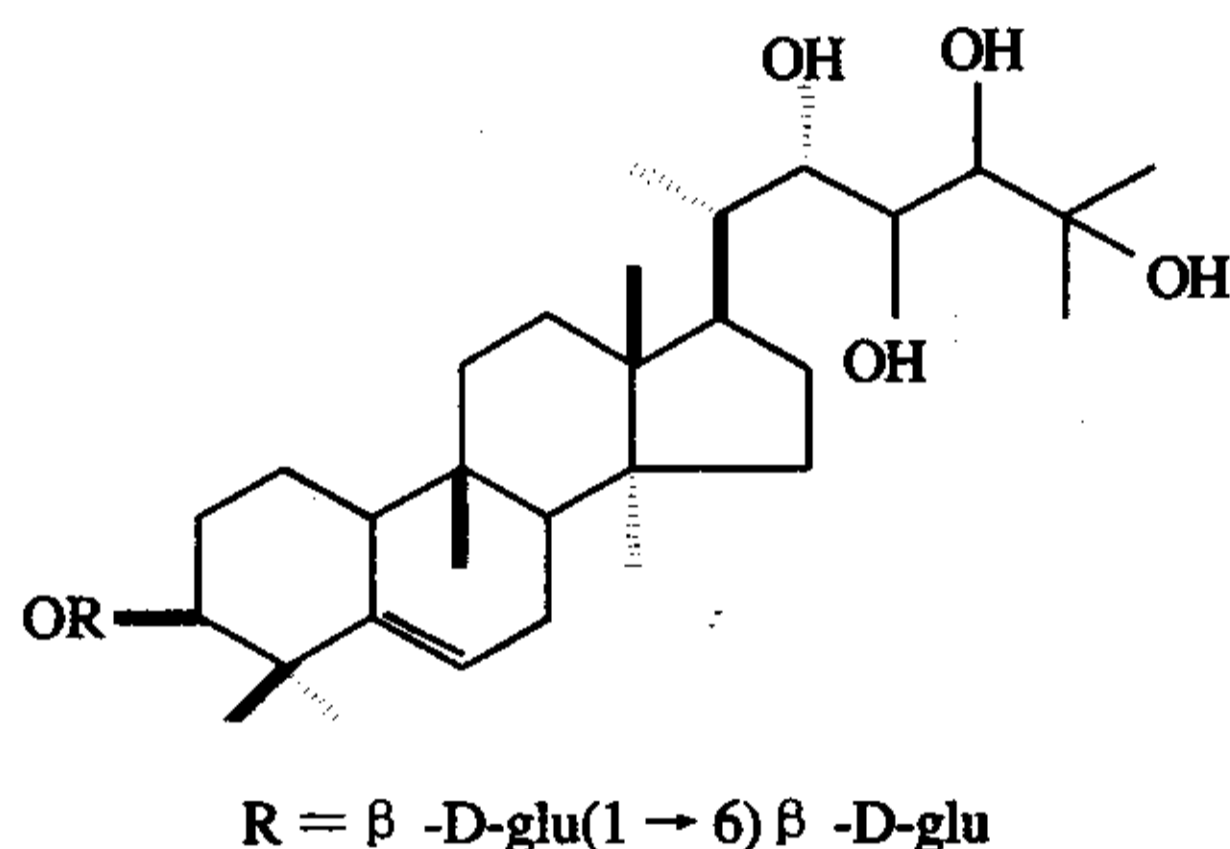


图 3 Momordicoside A 结构式
Fig.3 Structures of Momordicoside A

2.4 分光光度法测定苦瓜总皂甙含量

2.4.1 波长的选择

Momordicoside A 最大吸收波长为 546nm(图 4)。苦瓜总皂甙测定液的最大吸收波长亦在 544~550nm 之间(图 5), 因此选用 546nm 为测定波长。

2.4.2 回归方程

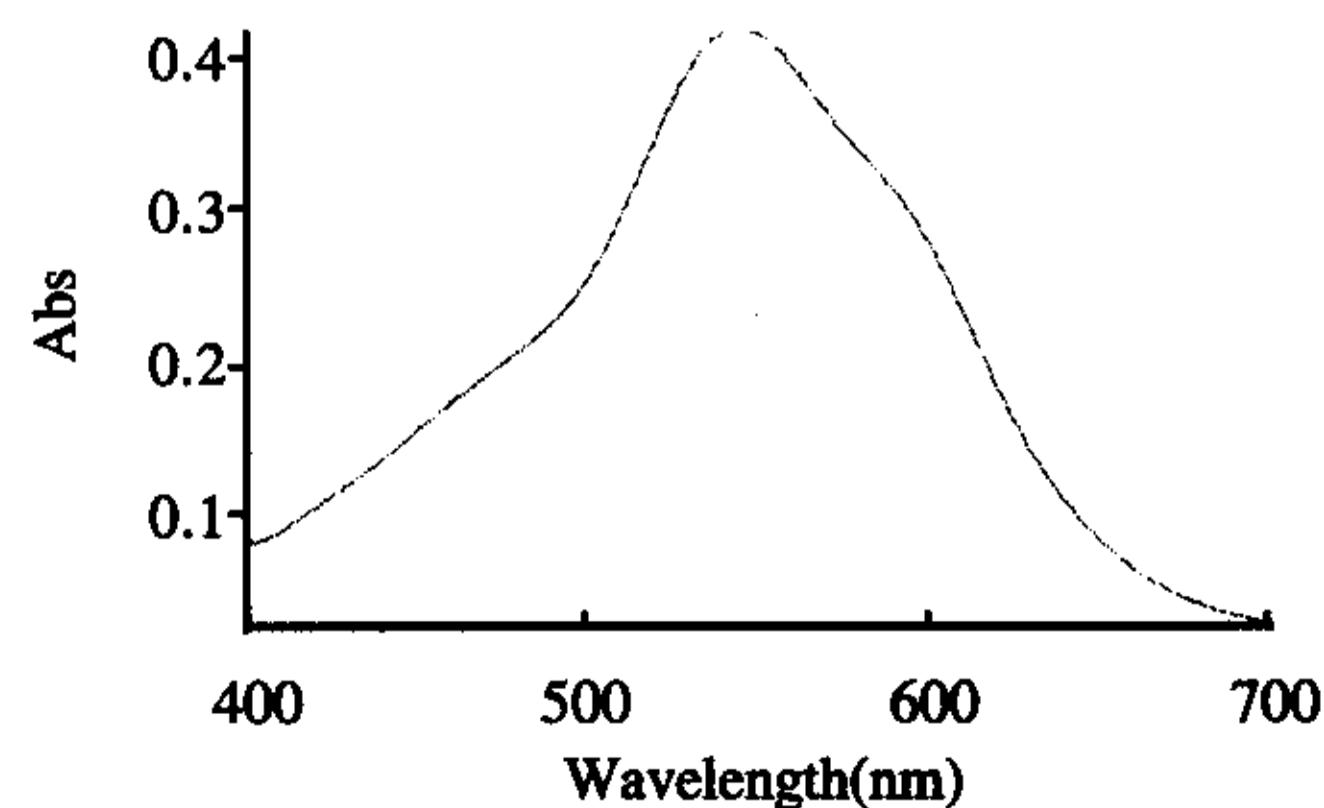


图 4 Momordicoside A 的紫外-可见光谱图
Fig.4 UV-Spectrometer pattern of Momordicoside A

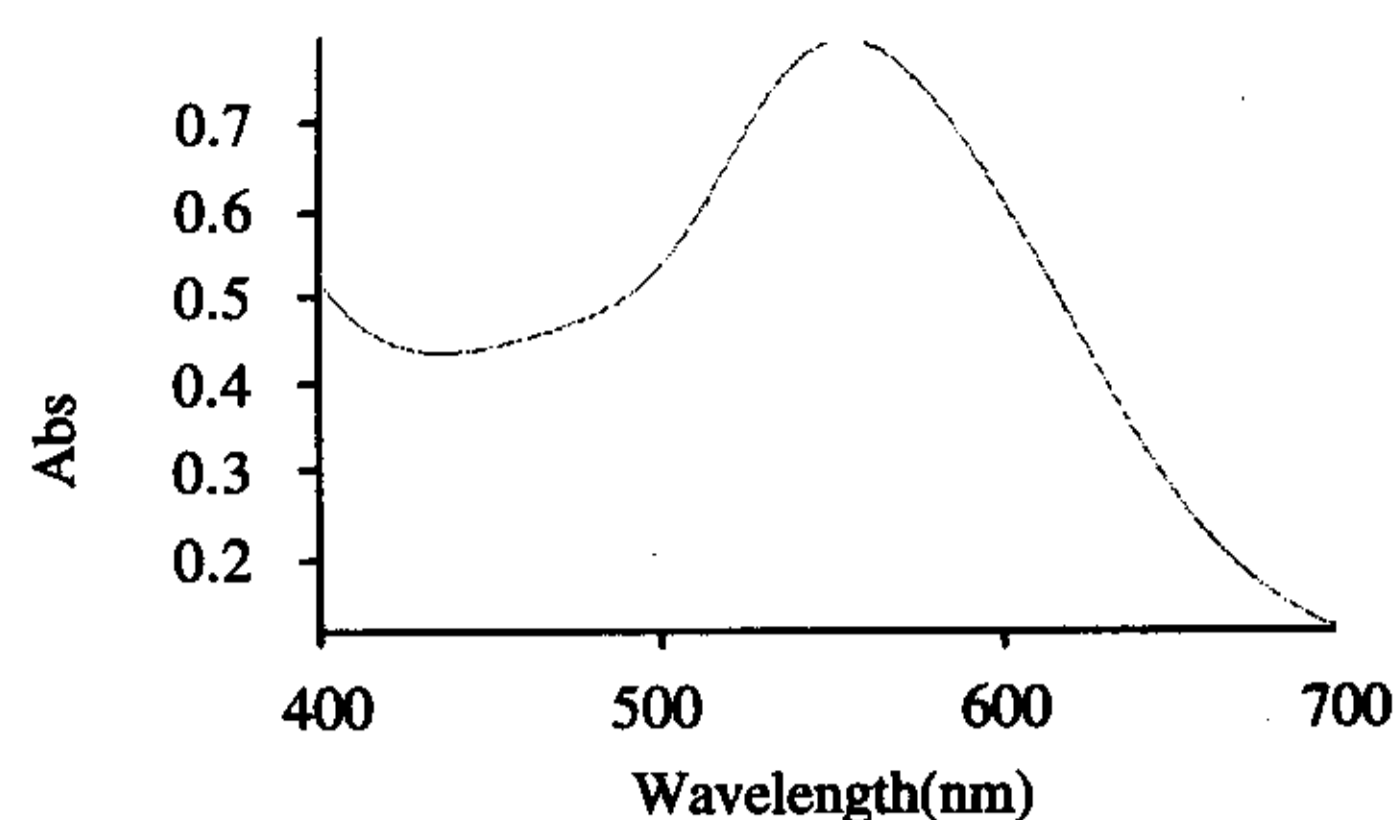


图5 苦瓜总甙的紫外-可见光谱图

Fig.5 UV-Spectrometer pattern of total *Momordica charantia* L. saponins

Momordicoside A 系列标准溶液标准曲线如图 6 所示。皂甙含量和吸收值经回归处理, 回归方程为: $A=0.0058C-0.1125$, $R^2=0.9994$, ($n=5$)。苦瓜皂甙含量在 $40\sim 200\mu\text{g}$ 线性较好。

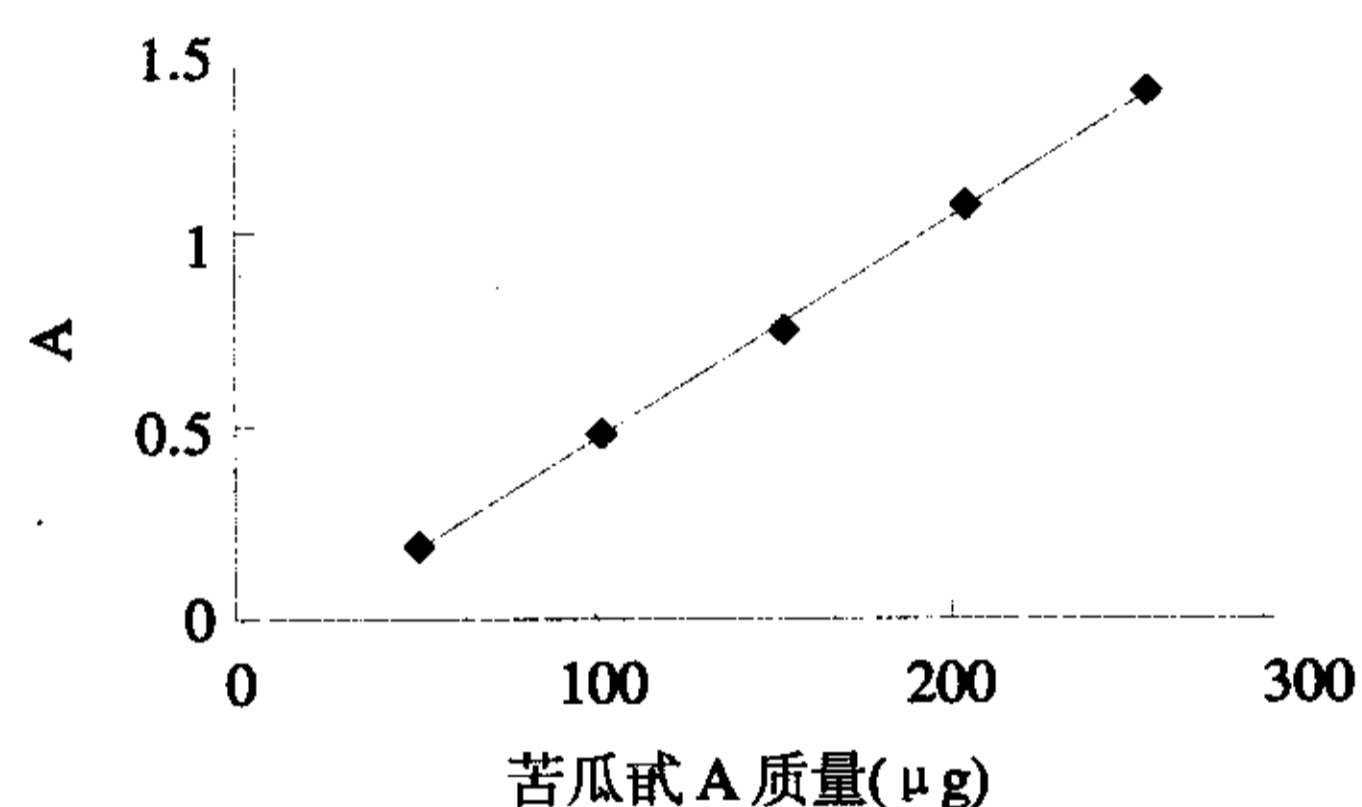


图6 Momordicoside A 标准曲线

Fig.6 The standard curve of Momordicoside A

2.4.3 样品皂甙质量分数的测定

样品加香草醛高氯酸显色后在 546nm 波长处测得吸光度 $A=0.890$, 从回归方程得出样品液皂甙的质量浓度 2.16mg/ml , 并计算苦瓜中总皂甙质量分数为 0.0432% 。

2.4.4 重复性试验

将上述苦瓜浸提条件下制备的苦瓜皂甙定量测定, 重复六次, 计算所得的 R_{sd} 为 4.37% ($n=6$), 表明重现性良好(表 1)。

表1 糖密度的测定结果
Table 1 Result of the accuracy

吸光度(A)	0.891	0.895	0.893	0.889	0.892	0.893
苦瓜皂甙(mg)	21.627	21.713	21.670	21.584	21.649	21.670

2.4.5 回收率试验结果

苦瓜皂甙的平均回收率为 102.72% , RSD 为 3.99% ($n=5$)(表 2)。

2.4.6 稳定性考察结果

显色稳定性如图 7、8 所示, 结果表明 Momordicoside A 显色稳定; 苦瓜皂甙在 40min 后测试的结果基本稳定。(对照品 Momordicoside A RSD 为 0.38% , $n=17$; 苦瓜皂甙 RSD 为 1.25% , $n=10$),

表2 回收率的测定结果

Table 2 Result of the average recovery rate

样品量 (μg)	对照品加入量 (μg)	计算值 (μg)	实测值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
23.10	20.00	43.10	44.85	108.75	102.72
23.10	20.00	43.10	43.22	100.60	
46.20	20.00	66.20	66.90	103.50	
46.20	20.00	66.20	66.75	102.75	
69.30	40.00	109.3	108.5	98.00	

故含量测定应在显色 $35\sim 60\text{min}$ 内进行。

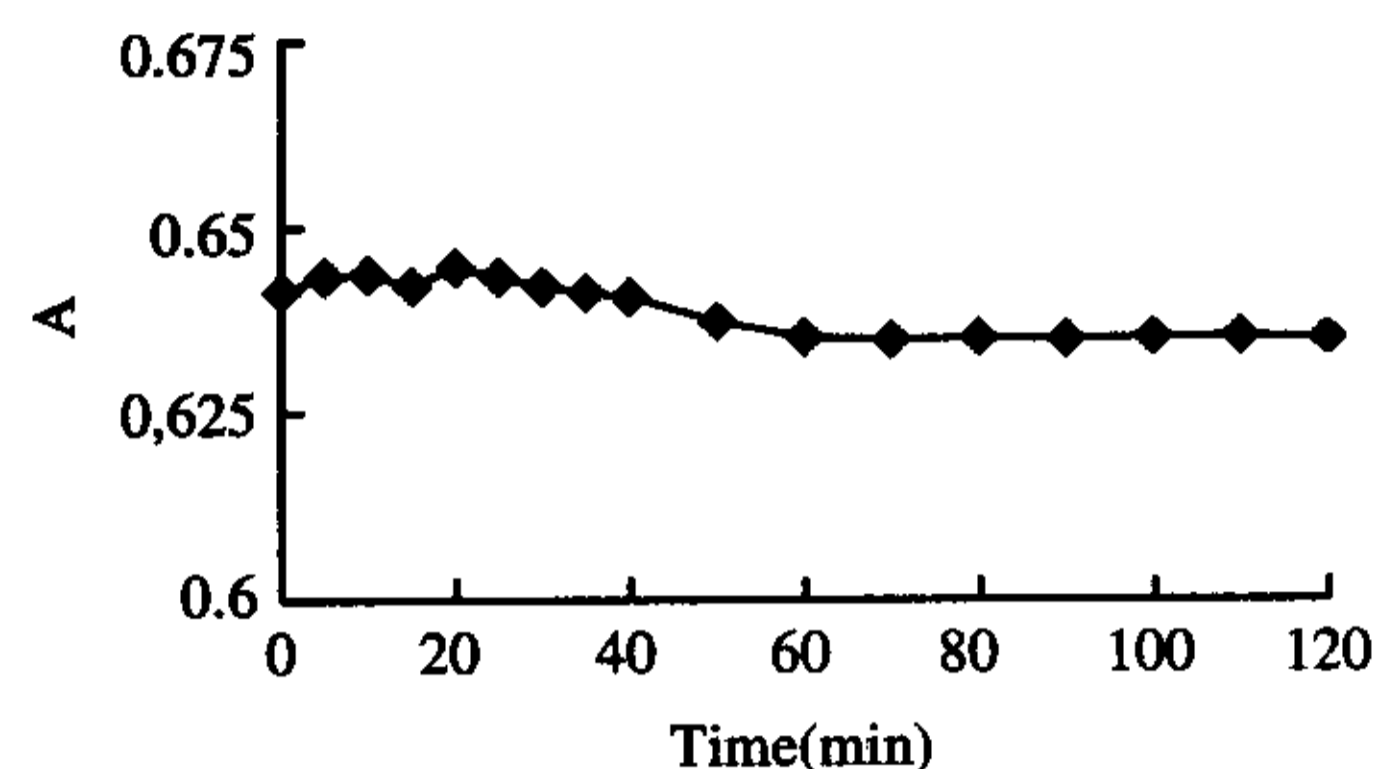


图7 Momordicoside A 显色稳定性曲线

Fig.7 The stability curve of Momordicoside A

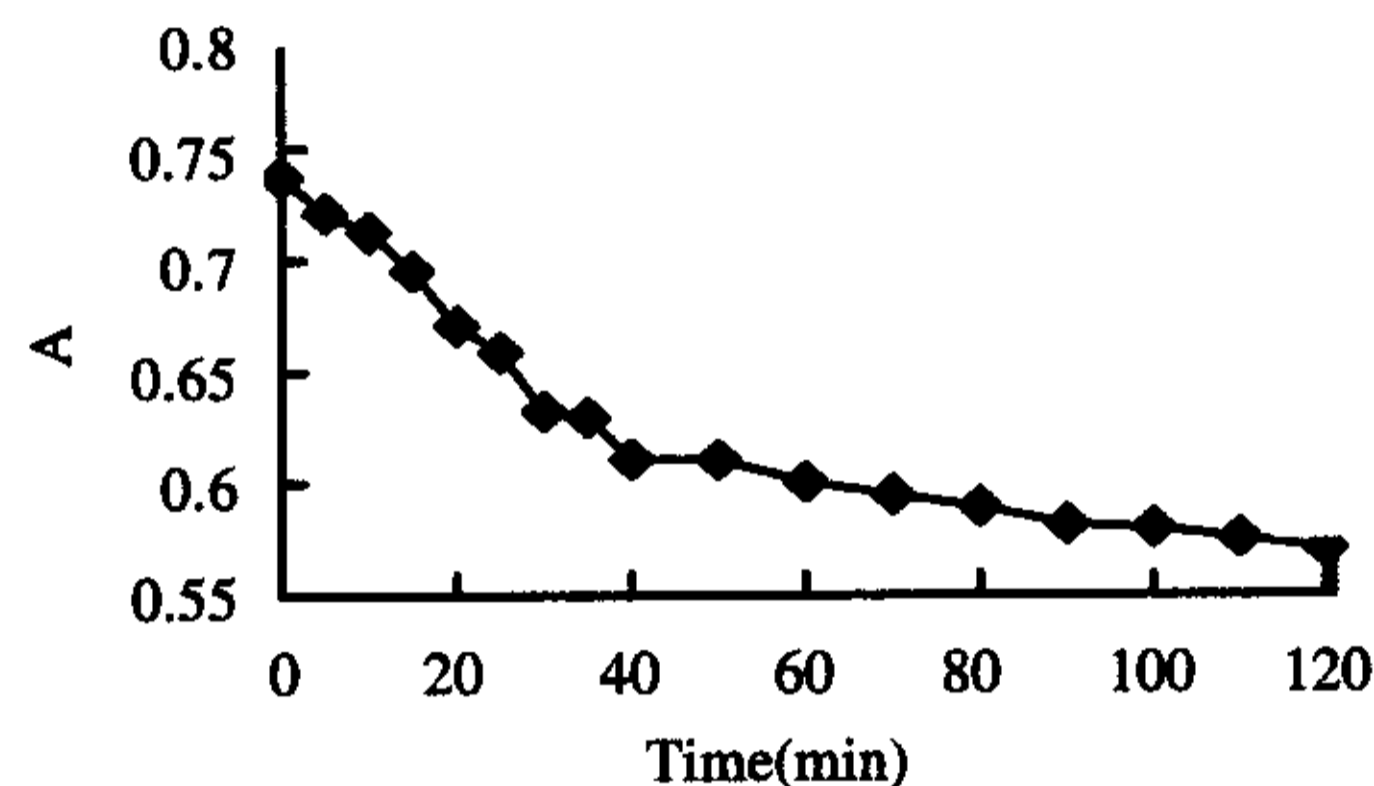


图8 样品液显色稳定性曲线

Fig.8 The stability curve of sample

3 结 论

3.1 有机溶剂法从苦瓜中提取皂甙化合物, 反复硅胶柱层析进行分离纯化, 甲醇重结晶得到单体皂甙 Momordicoside A。以 Momordicoside A 为对照品测定苦瓜总皂甙含量理论依据充分。

3.2 建立了苦瓜总皂甙的测定方法, 以香草醛高氯酸氧化苦瓜皂甙化合物, 采用紫外分光光度法, 在最大吸收波长 546nm 处测定吸光度, 标准曲线皂甙含量自 $40\mu\text{g}$ 到 $200\mu\text{g}$ 呈线性关系($R^2=0.9994$), 含量测定应在显色 $35\sim 60\text{min}$ 内进行基本稳定, 具有很好的重现性($R_{sd}=4.37\%$), 样品平均回收率为 102.72% ($RSD=3.99\%$)。结果表明: 该法操作简便可靠。

3.3 全苦瓜干粉中总皂甙质量分数为 0.0432% 。

3.4 国外有人采用薄层层析测定单体苦瓜皂甙 charantin 含量^[10,11], 本实验室也对薄层法和高效液相法测定苦瓜单体皂甙含量进行了研究, 将另文报道。

GC-MS 联用分析金柚外黄皮和内白皮中挥发性化学成分

陈卫东, 张友胜, 肖更生, 刘子放

(广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省果蔬深加工重点实验室, 广东 广州 510640)

摘 要: 采用水蒸气蒸馏法分别提取金柚外黄皮和内白皮中挥发性成分, 经 GC-MS 联用分析, 分别鉴定出 72 种和 16 种化合物。金柚外黄皮中挥发性成分以柠檬烯碳氢化合物为主体成分, 其中柠檬烯含量占粗精油的 84.07%, 金柚内白皮则以十八碳二烯酸、棕榈酸和七聚氧化乙烯为主体成分。

关键词: 金柚; 挥发性成分; 外黄皮; 内白皮

The Volatile Components in Outer and Inner Peel of Citrus Grandis by GC-MS

CHEN Wei-dong, ZHANG You-sheng, XIAO Geng-sheng, LIU Zi-fang

(The Sericulture and Farm Product Research Processing Institute of Guangdong Academy of Agricultural Science, Key Lab of Guangdong for Deep Processing of Fruit and Vegetable, Guangzhou 510640, China)

收稿日期: 2004-09-24

基金项目: 广州市科技攻关项目(2003Z2 - E0031)

作者简介: 陈卫东(1962-), 男, 副研究员, 研究方向为农产品加工。

参考文献:

- [1] C Day, T Cartwright J. Hypoglycaemic effect of Momordica Charantia extracts[J]. *Planta Med*, 1990, 56(5): 426-429.
- [2] Ahmed I, Lakhani, M S, Gillett M. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic Momordica charantia (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Diabetes Research Clinical Practices*, 2001, 51: 155-161.
- [3] Rathi S S, Grover J K, Vats V. The effect of Momordica charantia and Mucuna pruriens in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism[J]. *Phytotherapy Research*, 2002, 16: 236-243.
- [4] Okabe H, Miyahara Y, Yamauchi T. Studies on the Constituent of Momordica charantia L. 3. Characterization of new cucurbitacin glycosides of the immature fruits. (1). structures of Momordicosides G, F1, F2 and I. [J] *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(11): 3977-3986.
- [5] Miyahara Y, Okabe H, Yamauchi T. Studies on the Constituent of Momordica charantia L. II. Isolation and Characterization of minor seed glycosides, Momordicosides C, D and E. [J] *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(6): 1561-1566.
- [6] Toshiyuki MURAKAMI, Medicinal Foodstuffs. XXI. Structures of New Cucurbitane-Type Triterpene Glycosides, Goyaglycosides-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, and -h, and New Oleanane-Type Triterpene Saponins, Goyasaponins I, II, and III, from the Fresh Fruit of Japanese Momordica charantia L. [J], *Pharmaceutical Society of Japan*, 2001, 149: 54-63.
- [7] Okabe H, Miyahara Y, Yamauchi T, et al. Studies on the Constituent of Momordica charantia L. Isolation and Characterization of Momordicosides A and B [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28: 2753-2762.
- [8] Wang Shui, et al. Rapid Analysis of Momordicoside A in Bitter Melon by High Performance Liquid Chromatography Following Solid Phase Extraction [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2001, 19: 128-131.
- [9] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [10] Oleszek W A. Chromatographic determination of plant saponins [J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, (1): 147-162.
- [11] Suthar A C, Banavaliker M M, Biyani M K, et al. A high performance thin layer chromatography method for quantitative estimation of charantin in Momordica charantia Linn [J]. *Indian Drugs*, 2001, 38(5): 230-235.