

罗汉果叶中黄酮甙元的研究

陈全斌, 杨建香, 义祥辉, 程忠泉

(广西师范大学 资源与环境学系, 广西 桂林 541004)

摘要: 以罗汉果叶为原料提取出黄酮, 黄酮经水解、溶剂萃取、柱层析等手段, 得到高纯度甙元; 经 TLC、液相色谱、红外光谱、核磁共振法等分析手段进行结构鉴定, 证实甙元分别为山奈酚、槲皮素。

关键词: 罗汉果叶; 分离提纯; 山奈酚; 槲皮素; 鉴定

中图分类号: Q946.83 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)02-0217-04

Separation, purification and determination of flavone aglycones from *Momordica grosvenori* leaf

CHEN Quan-bin, YANG Jian-xiang,
YI Xiang-hui, CHENG Zhong-quan

(Department of Natural Resources and Environment, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: Flavone is extracted from *Momordica grosvenori* leaf. Flavone aglycones is obtained from hydrolyzation and purified by solvent extraction, column chromatography. Then the flavone aglycones is identified by Molting-Point, TLC, HPLC, UV and MS, the results show that the flavone aglycones is kaempferol and quercetin.

Key words: *Momordica grosvenori* leaf; purify; kaempferol; quercetin; identify

罗汉果 [*Momordica grosvenori* (Swingle) C. Jeffrey], 植物学名为“光果木鳖”, 是葫芦科 (Cucurbitaceae) 罗汉果属植物的成熟果实, 俗名汉果、长寿果, 为我国特产。罗汉果营养价值高, 含有丰富的果糖、蛋白质、氨基酸和多种维生素, 其性凉味甘, 无毒, 有润肺止咳、凉血、润肠通便的功效, 特别是用作祛痰剂, 在治疗百日咳、慢性气管炎、咽喉炎、胃肠疾病方面疗效显著 (广西壮族自治区卫生厅, 1983)。前人对罗汉果的研究针对果实中的甜甙 (Tsurtematsu 等, 1983; 刘钟栋, 1999)、黄酮 (斯建勇等, 1994; 陈全斌等, 2003a)、块根药用成分的药理 (陈全斌等, 2003b) 及块根淀粉 (陈全斌等, 2002) 等进行了系统

的研究, 但至今尚未有人对罗汉果叶进行研究。为此, 罗汉果叶的研究, 对罗汉果植株的化学成分分析、开发罗汉果系列产品具有重大的意义。我们以罗汉果叶为原料进行提取、水解、萃取、柱层析、重结晶等手段, 得到高纯度的黄酮甙元; 用熔点、TLC、液相色谱、红外光谱、核磁共振法等分析手段进行了结构鉴定。

1 试验部分

1.1 原料与试剂

罗汉果叶: 2003 年采于广西临桂茶洞乡。

收稿日期: 2004-08-21 修回日期: 2005-02-20

基金项目: 广西科学研究与开发项目 (桂科能 0443012) 资助 [Supported by Foundation of Scientific Research and Development of Guangxi (0443012)].

作者简介: 陈全斌 (1957-), 广西北流人, 高级工程师, 从事天然产品开发与研究。

LSA-10 大孔吸附树脂(西安蓝深交换吸附材料有限责任公司),95%乙醇(食用级),薄层层析用硅胶 GF,乙酸乙酯(A. R),甲醇(A. R),甲苯(A. R),氯仿(A. R),丙酮(A. R)。槲皮素及山奈酚对照品(中国药品生物制品检定所)。

1.2 仪器与装置

RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚生化仪器厂),WS210S 型电子天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司),P200 II 型高压液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司),红外光谱仪(5-DX 美国尼高利),超导核磁共振仪(Bruker AV400MHZ/DRX500 瑞士 Bruker 公司)。

硅胶层析柱:4.0 cm×40 cm 称取一定量硅胶,加入乙酸乙酯中,不断搅拌待空气泡除去,混合均匀。将上述吸附着乙酸乙酯的硅胶湿法装柱,不断轻敲管壁,使硅胶压紧,保持浸泡状态,备用。

1.3 罗汉果黄酮的提取

提取按下列工艺进行:罗汉果叶→煮沸(3次)→过滤→合并滤液→柱层析→水洗至无色→75%乙醇洗脱→洗脱液干燥→粗黄酮→无水乙醇溶解→过滤→干燥→精制黄酮。

称取破碎罗汉果叶 100 g,置入 1 000 mL 圆底烧瓶,再加 500 mL 蒸馏水,煮沸 20 min,冷却过滤,重复 3 次,合并滤液。将滤液以 10 mL/min 的速度过大孔吸附树脂柱(4.0 cm×60 cm)。吸附完毕后,首先用蒸馏水洗柱,至流出液无色,然后用 75%的乙醇洗脱。洗脱液用旋转蒸发仪旋干,得到粗黄酮 6.0 g,颜色为灰黄。粗黄酮再经无水乙醇溶解、过滤(重复 3 次),弃残渣,将滤液干燥得浅黄色精制黄酮 2.85 g。

1.4 罗汉果黄酮的水解及黄酮甙元的分离

黄酮甙→水解→浓缩成浸膏状→甲醇溶解→过硅胶柱→收集洗脱液→甲醇溶于水析→过滤→甲醇重结晶→浅黄绿色结晶 A 和浅黄色结晶 B。

称取精制黄酮 8.0 g,加入甲醇 200 mL,盐酸(1:1)100 mL,加热回流水解 2 h,然后浓缩成浸膏状,用甲醇溶解。将制备好样品的甲醇溶液加于硅胶柱顶,以氯仿:甲醇(15:1~1:5)进行洗脱(2 mL/min),每 25 mL 收集一份。将收集的溶液分别用液相色谱检验,分别合并仅有保留时间为 8.57 min、15.05 min 单一峰的洗脱液,浓缩成膏状,将浸膏状物加入甲醇溶解,再加入一定量的水,析出浅黄色物质,过滤。重复上述过程,重结晶,最后得到 72

mg 浅黄色结晶 A、41 mg 结晶 B。

2 样品分析

2.1 熔点的测定

取少量结晶 A 样品,采用齐氏熔点管熔点测定仪进行熔点测定,5 次测定结果 mp:277.5 °C 与山奈酚熔点相符(滑艳等,2003)。同理,结晶 B 样品测定结果 mp:316.5 °C 与槲皮素熔点相符(战旗等,2000)。

2.2 薄层层析分析

(1)甙元薄层层析:分别将上述两晶体及槲皮素、山奈酚对照品进行薄层层析分析,所用的展开剂为:甲苯/氯仿/丙酮=40/25/35,实验结果证实结晶 A Rf 值与山奈酚一致,Rf 值=0.736;结晶 B Rf 值与槲皮素一致,Rf 值=0.520。

(2)糖的薄层层析分析:取 1.3 中所得精制黄酮,水解后点样鉴定黄酮甙中的糖。展开剂:正丁醇/乙酸/乙醚/显色剂=9/6/3/1。显色剂:4 g 二甲胺、4 mL 苯胺和 20 mL 磷酸,用丙酮稀释至 200 mL(于棕色瓶中保存)。可明显鉴定有葡萄糖和鼠李糖,其 Rf 值分别为:Rf(葡萄糖)=0.55,Rf(鼠李糖)=0.75。

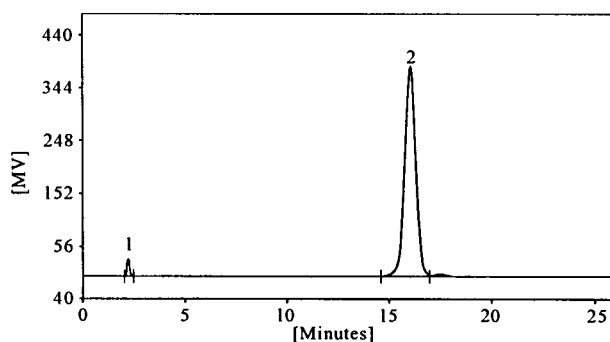


图 1 结晶 A 色谱图

Fig. 1 Crystal A ($t_R=15.05$ min)

2.3 HPLC 分析

将 1.4 所得两晶体及槲皮素、山奈酚对照品溶于甲醇进行 HPLC 分析,采用保留时间定性。

色谱条件:色谱柱:Turner YWG C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm);流动相:V(甲醇):V(水):V(磷酸)=60:40:0.3;流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;灵敏度:0.08;柱温:室温。

结晶 A 色谱图见图 1,结晶 B 色谱图见图 2。

结果表明结晶 A 与标样山奈酚的出峰时间一致, 结晶 B 与标样槲皮素的出峰时间一致。

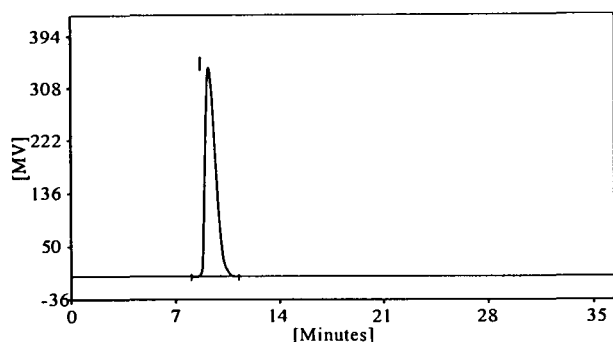


图 2 结晶 B 色谱图

Fig. 2 Crystal B ($t_R=8.57$ min)

2.4 红外光谱分析

采用 KBr 压片法, 在波数为 $5\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 范围分别对结晶 A 和山奈酚对照品进行扫描, 其图谱见图 3、图 4, 对结晶 B 和槲皮素对照品进行扫描, 其图谱见图 5、图 6。

结晶 A 与山奈酚对照品的红外谱图在指纹区各峰的波数一致, 结晶 B 与槲皮素对照品的红外谱图在指纹区各峰的波数一致。

2.5 NMR 分析

(1) 结晶 A ^{13}C -NMR 图谱分析: ^{13}C -NMR (500 MHz, DMSO) δ : 176.2 (s, C-4), 163.9 (s, C-7), 160.98 (s, C-5), 159.46 (s, C-4'), 157.04 (s, C-9), 145.91 (s, C-2), 135.6 (s, C-3), 129.51 (d, C-2', 6'),

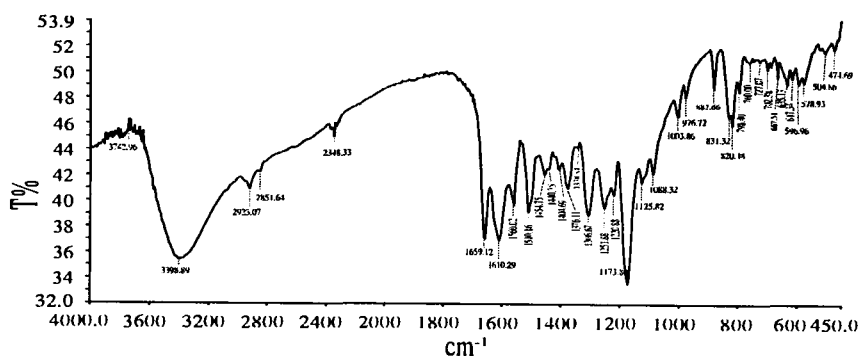


图 3 结晶 A 红外光谱

Fig. 3 IR Spectrum of Crystal A

IR ν/cm^{-1} (KBr): 3398, 2926, 1659, 1610, 1560, 1510, 1454, 1376, 1306, 1251, 1220, 1173, 1125, 1088, 1008, 977, 882, 832, 820, 797.

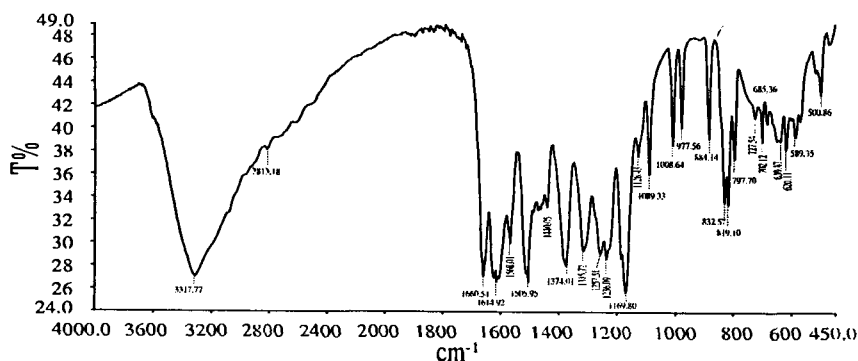


图 4 山奈酚对照品红外光谱图

Fig. 4 IR Spectrum of Sample Kaempferol

IR ν/cm^{-1} (KBr): 3317, 2813, 1660, 1614, 1568, 1505, 1440, 1374, 1315, 1257, 1236, 1169, 1126, 1089, 1008, 977, 884, 832, 819, 797.

122.52 (s, C-1'), 115.86 (d, C-5' 3'), 101.79 (s, C-10), 99.83 (d, C-6), 94.43 (d, C-8).

(2) 结晶 B ^{13}C -NMR 图谱分析: ^{13}C -NMR (500 MHz, DMSO) δ : 176.29 (s, C-4), 164.34 (s, C-7), 161.18 (s, C-5), 156.60 (s, C-9), 148.16 (s, C-4'),

147.28 (s, C-2), 145.52 (s, C-3'), 136.18 (s, C-3), 122.42 (s, C-1'), 120.45 (s, C-6'), 116.06 (s, C-5'), 115.52 (s, C-2'), 103.47 (s, C-10), 98.64 (s, C-6), 93.82 (s, C-8).

结晶 A、结晶 B 样品的 ^{13}C -NMR 图谱显示各化

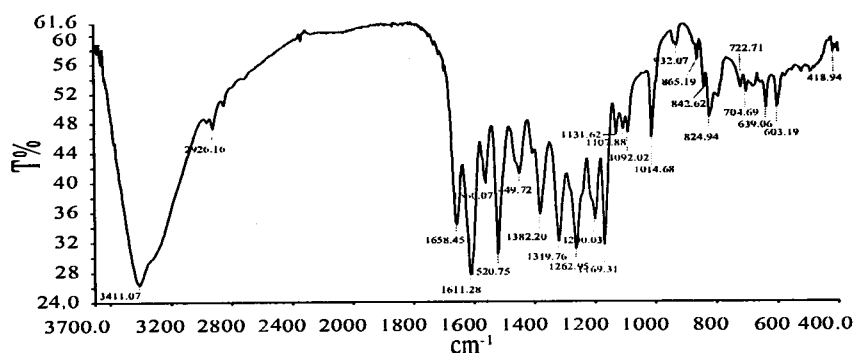


图 5 结晶 B 的红外图谱

Fig. 5 IR Spectrum of Crystal B

IR ν /cm $^{-1}$ (KBr): 3411, 2851, 1658, 1611, 1560, 1520, 1449, 1382, 1319, 1262, 1200, 1169.

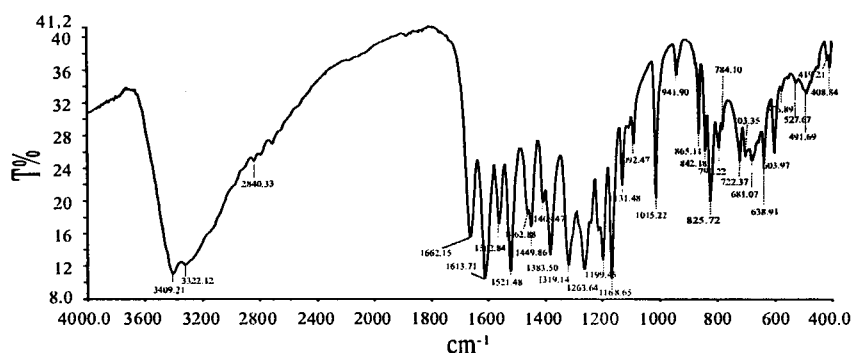


图 6 槲皮素对照品红外图谱

Fig. 6 IR Spectrum of Sample Quercetin

IR ν /cm $^{-1}$ (KBr): 3409, 2845, 1662, 1613, 1562, 1521, 1449, 1383, 1319, 1263, 1199, 1168.

学位移动数值分别与山奈酚、槲皮素相同(肖宗厚, 2002)。

3 结论

实验结果表明罗汉果叶中含有黄酮甙,其甙元为山奈酚和槲皮素,这与果实含有甙元(陈全斌等, 2003)一致。

参考文献:

- 广西壮族自治区卫生厅. 1983. 广西中药志第二辑[M]. 南宁:广西壮族自治区人民出版社,195.
- 肖宗厚. 2002. 中药化学[M]. 上海科学技术出版社,2:309.
- Chen QB(陈全斌), Yang RY(杨瑞云), Yi XH(义祥辉). 2003a. Determination of flavone in Luohanguo fresh fruits and its glycosides (RP-HPLC 法测定罗汉果鲜果及甜甙中总黄酮含量)[J]. *Food Sci*(食品科学), 24(5):133-135.
- Chen QB(陈全斌), Tang GM(汤桂梅), Yi XH(义祥辉). 2003b. Preliminary studies on extraction process and pharmacology of the medicinal component from Luohanguo root (罗汉果块根中药用成份提取及其药理初探)[J]. *Chemistry World*(化学世界), 44(1):21-23.
- Chen QB(陈全斌), Tang GM(汤桂梅), Yi XH(义祥辉). 2002. Study on the properties and extraction of starch of *Siraitia grosvenorii*'s root(罗汉果块根淀粉的提取及其性质研究)[J]. *Food Sci*(食品科学), 23.
- Hua Y(滑艳), He L(何荔), Wang HQ(汪汉卿). 2003. Studies on flavonoids of *Anaphalis sinica*(香青黄酮类化合物的研究)[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志), 28(6):530-533.
- Liu ZD(刘钟栋). 1999. Extraction and purification of Mogroside(V)(罗汉果甙(V)的精制研究)[J]. *Exchange and Adsorption of Ion*(离子交换与吸附), 15(4):364-368.
- Si JY(斯建勇), Chen DH(陈迪华), Chang Q(常琪). 1994. Isolation and structure determination of flavonol glycosides from the fresh fruits of *Siraitia grosvenorii*(鲜罗汉果中黄酮甙的分离及结构测定)[J]. *Acta Pharmaceutica Sin*(药学报), 29(2):114-120.
- Tsurtematsu T, Shigenobu A. 1983. Study on the constituents from fruits of *Momordica grosvenorii*[J]. *J Pharm(Japan)*(药学杂志(日)), 103:1151-1173.
- Zhan Q(战旗), Zhang ZP(张仲平). 2000. Extraction, separation and identify of quercetin in *Toona sinensis*(A. Juss) Roem(香椿叶中槲皮素的提取分离鉴定)[J]. *Study on Chinese Materia Medica*(中药研究).