

罗汉果叶黄酮甙的分离与结构鉴定*

Separation, Purification and Identification of Flavonol Glycoside from *Momordica grosvenori* Leafs

陈全斌¹, 杨建香², 程忠泉², 义祥辉², 韦正波³

CHEN Quan-bin¹, YANG Jian-xiang², CHENG Zhong-quan², YI Xiang-hui², WEI Zheng-bo³

(1. 广西师范大学资源与环境学系, 广西桂林 541004; 2. 桂林师范高等专科学校, 广西桂林 541001; 3. 广西医科大学附属肿瘤医院, 广西南宁 530021)

(1. Department of Resources and Environment, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China; 2. Guilin Normal College, Guilin, Guangxi, 541001, China; 3. Tumor Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:以罗汉果叶为原料提取黄酮, 用溶剂萃取、柱层析、HPLC 纯化等方法进行黄酮甙的分离和提纯后, 采用 TLC、HPLC、IR、NMR、MS 等分析方法进行结构鉴定。结果表明, 罗汉果叶含有 2 种黄酮甙, 它们分别是: 山奈酚-3,7-O- α -L-二鼠李糖甙和槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖 7-O- α -L-鼠李糖甙。

关键词: 罗汉果 叶 黄酮甙 结构鉴定

中图分类号: O629 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2006)01-0035-02

Abstract: The coarse flavone is extracted from *Momordica grosvenori* leaves by boiling water. Two compounds of flavone glycosides are obtained by silica gel column chromatography and HPLC purification. Two flavonol glycosides' structures are verified by different kinds of spectrum and chemistry methods. They are quercetin-3-O- β -D-glucose-7-O- α -L-rhamnopyranoside and kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside

Key words: *Momordica grosvenori*, leaves, flavonol glycoside, structural identification

罗汉果 (*Momordica grosvenori*) 是葫芦科罗汉果属植物, 罗汉果的成熟果实为广西桂北地区的传统特产, 广泛用于医药、饮料和调味品中^[1]。罗汉果的果实中的甜甙^[2~4]、多糖^[5]、黄酮^[6,7]、块根中淀粉^[8]及其药用成份^[9]及种仁油^[10]等已有文献报道, 对罗汉果叶研究证实罗汉果叶含有黄酮类化合物, 其甙元为: 槲皮素和山奈酚^[11], 但对罗汉果叶黄酮甙的结构研究未见报道。我们以罗汉果叶为原料提取黄酮, 经溶剂萃取、柱层析、HPLC 纯化等方法, 进行了罗汉果叶黄酮甙分离和提纯; 采用 TLC、HPLC、IR、NMR、MS 等分析方法进行结构鉴定。

收稿日期: 2005-07-05

修回日期: 2005-08-22

作者简介: 陈全斌(1957-), 男, 广西人, 高级工程师, 从事天然产品开发与研究工作。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 0443001-12)和广西师范大学重点科研项目(2005-2007)。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

罗汉果叶: 2004 年秋季采于广西临桂县和永福县。样品经广西师范大学李伯林教授鉴定。

D-101 大孔吸附树脂(天津富帮化工科技有限公司生产)、薄层层析板用硅胶 GF254 板(青岛海洋化工厂生产)、95%乙醇(食用)、甲醇(AR)、氯仿(AR)、槲皮素及山奈酚对照品(中国药品生物制品检定所生产)。

1.2 仪器

RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚生化仪器厂生产), WS210S 型电子天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司生产), P200 II 型高压液相色谱仪, 包括 UV20 II 紫外可变波长检测器; HypersilC18(5 μ m, 4.6mm \times 200mm) 色谱柱; Echrom98 色谱工作站(大连依利特分析仪器有限公司生产); Hi-Tech 半制备高效液相

色谱仪(美国)。

5-DX 红外光谱仪(美国 Nicolet 公司生产); Bruker AV500MHZ/DRX 500 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司生产); Finnigan Trace DSQ 四极杆质谱仪(电离方式:EI⁺, 电子能量:70eV)

1.3 黄酮的提取

称取罗汉果叶 100g, 破碎, 置入 1000ml 圆底烧瓶, 加 500ml 蒸馏水, 煮沸 20min, 冷却过滤, 重复 3 次, 合并滤液。将滤液以 20ml/min 的速度过大孔吸附树脂柱(4.0cm×60cm)。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, 得粗黄酮 6.0g, 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, 将滤液旋干得精制黄酮 2.85g。

1.4 黄酮甙的分离

1.4.1 柱层析分离

称取 5g 精制黄酮, 用 95% 乙醇溶解, 待柱顶流动相近干时, 加样, 进行硅胶柱层析, 以氯仿: 甲醇: 水(50: 10: 1~30: 30: 1)梯度洗脱。

合并: 氯仿: 甲醇: 水(45: 15: 1)部分, 得 A 混合物, 将 A 混合物浓缩, 除去有机溶剂, 放置, 有晶体析出, 过滤得化合物 0.1512g。

合并: 氯仿: 甲醇: 水(30: 30: 1)部分, 得 B 混合物 0.4653g。

1.4.2 化合物 A 和 B 的 HPLC 分析

色谱条件如下。色谱柱: Turner YW GC18(5 μ m, 4.6mm×250mm); 流动相: V(甲醇): V(水)=43: 57; 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 360nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C。

色谱图见图 1 和图 2。

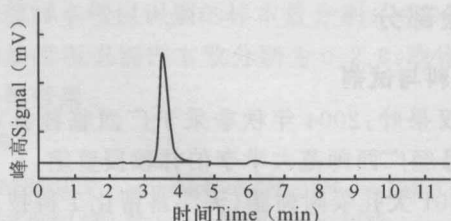


图 1 化合物 A 的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of compound A

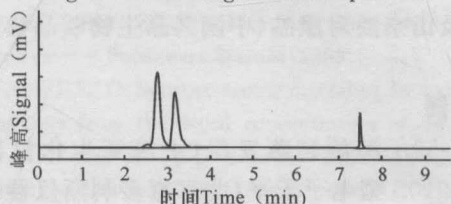


图 2 化合物 B 的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of compound B

2.2.3 化合物 B 的 HPLC 纯化

色谱条件如下, 流动相: V_{甲醇}: V_水=(35: 65);

色谱柱: (9mm×400mm, 自填, 柱材料 ODS-A, 20 μ m, 美国 YMC CO. LTD); 检测波长: 360nm; 柱温为室温; 流速: 5ml/min, 进样量为 500 μ l。

将化合物 B 0.3g 以少量流动相溶解, 进样, 分别收集保留时间为 3.16min 和 4.48min 的组分。收集物经旋转蒸发、干燥, 得淡黄色粉末化合物 I (17.28mg); 淡黄色粉末化合物 II (37.12mg)。

1.5 样品的纯度检测

1.5.1 TLC 分析

薄层层析板用硅胶 GF₂₅₄, 展开剂为乙酸乙酯: 丁酮: 甲酸: 水(8: 3: 3: 1), 360nm 紫外灯下观察: 化合物 I 显 1 个紫色荧光斑点, R_f=0.63; 化合物 II 显 1 个紫色荧光斑点, R_f=0.45。

1.5.2 HPLC 分析

色谱条件同 1.4.3, 采用归一化法定量, 结果化合物 I 纯度为 99%; 化合物 II 纯度为 98.5%。

1.6 样品的结构表征

1.6.1 样品甙元的确定

分别取化合物 I、II 水解样和槲皮素及山奈酚对照品溶液, 进行 HPLC 分析^[11]。实验表明: 样品 I 与标样山奈酚的保留时间相同, 可知化合物 I 的甙元为山奈酚; 样品 II 与标样槲皮素的出峰时间相同, 可知化合物 II 的甙元为槲皮素。

1.6.2 样品中糖类 TLC 分析

薄层层析用硅胶 GF₂₅₄板, 展开剂: 正丁醇: 乙酸: 乙醚=9: 6: 3: 1, 显色液: 二苯胺(4g)+苯胺(4ml)+磷酸(20ml, 85%), 取 1.6.1 水解样和多种糖的标准样进行 TLC 分析, 以 R_f 值定性, 结果表明: 化合物 I 仅有鼠李糖, R_f=0.61; 化合物 II 含有鼠李糖, R_f=0.61; 葡萄糖, R_f=0.46。

1.7 样品结构鉴定

1.7.1 化合物 I 的结构鉴定

化合物 I 为淡黄色针状结晶; IR(KBr)cm⁻¹: 3396(-OH); 2984, 2925(-CH₂-), 1658(-C=O), 1598, 1513, 1513, 1494 为芳环的特征吸收; FAB-MS: 579(M⁺+1), 即化合物的分子量为 578, 其中, 433(M⁺+1-146), 415(M⁺+1-rha), 287(M⁺+1-146-146), 与文献[6]对照后知道化合物 I 的分子式为 C₂₇H₃₀O₁₂。¹³C-NMR(DMSO): 156.6(C-2), 135.0(C-3), 178.4(C-4), 161.4(C-5), 99.9(C-6), 162.2(C-7), 95.0(C-8), 158.3(C-9), 106.3(C-10), 120.8(C-1'), 131.2(C-2', 6'), 115.9(C-3', 5'), 160.7(C-4'); 3-Rha: 102.4, 70.5, 70.7, 71.6, 70.3, 17.9; 7-Rha: 98.9, 70.5, 70.8, 72.0, 70.0, 18.3。¹H-NMR

(下转第 42 页 Continue on page 42)

表3 样品分析结果

Table 3 Analytical results of cerium in samples

样品 Sample	原含量 Content (%)	测定值 Measured value(%)						RSD (%)	本底值 Original (μg)	加入量 Added (μg)	测得量 Measured amount(μg)			平均 回收率 Average recovery rate(%)	
		1	2	3	4	5	6				平均值 Average	1	2		平均值 Average
1	0.24	0.228	0.250	0.240	0.250	0.226	0.240	0.239	4.3	28	20	47.2	47.6	47.4	97
2	0.46	0.462	0.474	0.440	0.435	0.426	0.440	0.446	4.1	37	20	58	57.6	57.8	104

参考文献:

[1] 张孙玮,吴水生,刘绍璞. 有机试剂在分析化学中的应用[M]. 北京:科学出版社,1983:183.
 [2] 陶慧林,钟福新,张成. 铈与氯代磺酞 S 的氧化褪色反应及应用[J]. 广西化工,1998,27(3):46-49.
 [3] 汪效祖,于文涛,姚成,等. 氧化罗丹明 B 褪色分光光度法测定微量铈[J]. 南京化工大学学报,1998,20(增刊):56-58.
 [4] 黄典文,张宁. 甲基绿显色分光光度法测定微量铈[J].

岩矿测试,2003,22(2):158-160.

[5] 邹本义,李晶,王日朝,等. 偶氮氮磷 III 褪色光度法测定球墨铸铁中的铈[J]. 冶金分析,2002,22(5):47-48.
 [6] 王玉宝. 二溴硝基偶氮磷褪色光度法测定微量铈[J]. 高师理科学刊,2003,23(3):27-29.
 [7] 夏畅斌,黄念东,何湘柱. 偶氮磷 III 褪色光度法测定煤灰中微量铈[J]. 冶金分析,2004,24(4):49-51.

(责任编辑:韦廷宗 邓大玉)

(上接第36页 Continue from page 36)

(CDCl₃): 0.82(3H, d, J=2.76, 3-O-rha, -CH₃), 1.13(3H, d, J=2.71, 7-O-rha, -CH₃), 6.46(1H, d, J=1.92, H-6), 6.80(1H, d, J=1.92), H-8, 6.94(2H, d, J=8.68, H-3', 5'), 7.79(2H, d, J=8.68, H-2', 6'), 10.29(1H, s, OH-4'), 12.61(1H, s, OH-5).

经过 FAB-MS、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 分析,可以推断化合物 I 的结构式为山奈酚-3,7-O-α-L-二鼠李糖甙。

1.7.2 化合物 II 的结构鉴定

化合物 II 为淡黄色粉末;IR(KBr)cm⁻¹:3425(-OH);2932(-CH₂-),1655(-C=O),1600,1493,1452,为芳环的特征吸收.FAB-MS:621(M⁺+1),知化合物 II 的分子量为620,即化合物 II 的分子式为 C₂₇H₃₀O₁₆。¹³C-NMR(DMSO):156.6(C-2),133.9(C-3),178.4(C-4),161.4(C-5),99.9(C-6),162.0(C-7),94.9(C-8),158.3(C-9),106.2(C-10),121.7(C-1'),115.6(C-2'),145.7(C-3'),149.1(C-4'),116.2(C-5'),121.0(C-6');3-Glu:101.2,74.7,76.9,70.2,78.0,61.4;7-Rha:99.9,70.5,70.7,71.6,70.4,17.9。¹H-NMR(CDCl₃):1.12(3H, d, 7-O-rha, -CH₃),5.56(1H, brs, 7-O-rha, H-1),5.48(1H, d, 3-O-glu, H-1),6.45(1H, d, H-6),6.83(1H, d, H-8),6.89(1H, d, H-5'),12.50(1H, s, OH-5)。

经过 FAB-MS、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 分析,可以推断化合物 II 为槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖7-O-α-L-鼠李糖甙。

2 结论

实验结果表明,罗汉果叶含有2种黄酮甙。分别

是:山奈酚-3,7-O-α-L-二鼠李糖甙和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖7-O-α-L-鼠李糖甙。

参考文献:

[1] 李典鹏,张厚瑞. 广西特产植物罗汉果的研究与应用[J]. 广西植物,2000,20(3):270-276.
 [2] Tsurtematsu T, Shigenobu A. Study on the constituents from fruits of *Momordica grosvenori* [J]. J Pharm (Japan), 1983, 103: 1151-1173.
 [3] 陈全斌,义祥辉,扬瑞云,等. 不同生长周期的罗汉果鲜果中甜甙 V 和总黄酮含量变化规律研究[J]. 广西植物, 2005, 25(3): 274-277.
 [4] 余丽娟,陈全斌,义祥辉,等. 高效液相色谱法制备罗汉果甜甙 V 标准品[J]. 色谱, 2003, 21(4): 397-399.
 [5] 陈全斌,陈海燕,李俊,等. RP-HPLC 法测定罗汉果多糖的相对分子质量[J]. 中草药, 2003, 34(12): 1075-1076.
 [6] 斯建勇,常琪,等. 鲜罗汉果中黄酮甙的分离及结构鉴定[J]. 药学学报, 1994, 29(2): 114-120.
 [7] 陈全斌,杨瑞云,义祥辉,等. RP-HPLC 法测定罗汉果鲜果及甜甙中总黄酮含量[J]. 食品科学, 2003, 24(5): 133-135.
 [8] 陈全斌,汤桂梅,义祥辉. 罗汉果块根淀粉的提取及其性质研究[J]. 食品科学, 2002, 23(4): 37-41.
 [9] 陈全斌,汤桂梅,徐庆,等. 罗汉果块根中药用成份提取及其药理初探[J]. 化学世界, 2003, 44(1): 21-23.
 [10] 陈全斌,程忠泉,义祥辉. 罗汉果种仁油脂的提取及其性质研究[J]. 食品科学, 2004, 12(2): 25-27.
 [11] 陈全斌,杨建香,程忠泉. RP-HPLC 法测定罗汉果叶中总黄酮含量[J]. 广西科学, 2005, 12(1): 43-45.

(责任编辑:邓大玉)