

香椿老叶中黄酮类和皂苷类物质的分离鉴定

陈伟, 李晨晨, 冉浩, 李文华, 刘常金

(天津科技大学 食品工程与生物技术学院食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457)

摘要: **目的** 对香椿老叶中的黄酮类和皂苷类活性物质进行分离鉴定, 为进一步开发香椿老叶产品提供理论基础。**方法** 使用柱色谱和高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 对香椿老叶中的物质进行分离纯化, 并采用核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 和红外光谱 (Infrared Spectroscopy, IR) 对分离物质进行测定。**结果** 香椿老叶中含有芦丁、表儿茶素、槲皮素、异槲皮素、番石榴苷等。利用显色反应初步定性鉴定出香椿皂苷中包括甾体皂苷和三萜皂苷。**结论** 香椿老叶中含有丰富的黄酮类和皂苷类物质, 具有广阔的开发前景。

关键词: 香椿老叶; 黄酮; 皂苷; 分离鉴定

中图分类号: S644.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2019)09-0036-07

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2019.09.006

Isolation and Identification of Flavonoids and Saponins in Old *Toona Sinensis* Leaves

CHEN Wei, LI Chen-chen, RAN Hao, LI Wen-hua, LIU Chang-jin

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, School of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT: The paper aims to isolate and identify flavonoids and saponins in old *toonasinensis* leaves to provide a theoretical basis for further development of old *toonasinensis* leaves. Column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to separate and purify the substances in old *toonasinensis* leaves. Nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared spectroscopy (IR) were used for to determine the isolated substances. The old *toonasinensis* leaves of contain rutin, epicatechin, quercetin, isoquercetin, guava glucoside, etc. The steroidal saponins and triterpenoids saponins in *toonasinensis* saponins were identified by chromogenic reaction. Old *toonasinensis* leaves are rich in flavonoids and saponins, which have broad development prospects.

KEY WORDS: old *toonasinensis* leaves; flavonoids; saponins; isolation and identification

香椿 (*Toonasinensis*) 属于楝科香椿属落叶乔木, 在中国种植广泛且面积逐年扩大, 在山东、安徽、河南、河北、广西、湖南、四川、山西、陕西和云南等地均有大面积的香椿种植地^[1]。

传统医学认为香椿味性平、辛、苦, 归脾、胃经, 具有解毒杀虫、祛暑化湿之效。据《四川中药志》记载, 香椿子味辛苦, 性温, 无毒, 入肝、肺, 具有散寒、祛风、止痛之功效, 主治风湿关节痛、风寒外感、

疝气、十二指肠溃疡、心胃气痛及冷骨风^[2]。现代医学研究发现, 香椿叶具有显著的抑菌、抗氧化、抗肿瘤、抗癌等生物学活性, 此外香椿叶提取物还有体外抗菌、抗氧化口、抑制病毒复制的作用, 以及对害虫的毒杀或驱避活性等^[3]。据报道, 香椿叶含有较高的黄酮、皂苷、酚类等生物活性成分, 其主要化学成分为黄酮类化合物^[4-7]。目前对香椿树中总黄酮的研究主要集中在叶、果实及其嫩芽方面。香椿总黄酮具有

收稿日期: 2019-03-06

基金项目: 陈伟 (1991—), 女, 天津科技大学硕士生, 主攻天然产物化学。

通信作者: 刘常金 (1969—), 男, 博士, 天津科技大学副教授, 主要研究方向为农产品贮藏与加工。

较强的药理活性, 能明显降低糖尿病餐后血糖值^[8]。香椿嫩芽可用做蔬菜或入药, 而每年各种种植地区产生数量较大的香椿老叶, 却没有得到充分利用。

笔者所在研究组前期致力于香椿贮藏保鲜以及香椿叶活性成分的研究, 研究过程中发现香椿老叶含有丰富的黄酮与皂苷类化合物^[9], 但是具体的单体以及结构不明。为此, 文中拟结合前期研究, 通过用柱色谱技术和 HPLC 技术分离纯化香椿叶黄酮, 利用 NMR 及 IR 技术对黄酮类物质单体结构进行分析, 并使用化学显色法初步鉴定皂苷的种类。

1 实验

1.1 材料与试剂

材料: 香椿, 2015 年 9 月采收于天津科技大学实验基地, 样品采后用水冲洗, 并将其在烘箱中 50 °C 烘干, 粉碎之后过 60 目筛, 密封, 置暗处保存。

试剂: AB-8 大孔树脂, D101 大孔吸附树脂, 鲁南制药集团树脂厂; 硅胶, 100~200 目, 青岛海洋化工; HSGF254 薄层硅胶板, 烟台市化学工业研究所; 甲醇, 色谱纯, 天津市康科德科技有限公司; 甲醇, 无水乙醇, 分析纯, 天津北方天医试剂厂; 正丁醇, 碘化钾, 氯仿, 二氯甲烷, 硫酸, 分析纯, 天津江天化工技术有限公司; 凝胶 Sephadex LH-20, 50 μm, Yield Microelectronics Corp。

1.2 仪器与设备

主要仪器: DHG 电热鼓风干燥箱, 巩义市予平仪器有限责任公司; HK-02A 粉碎机, 广州旭朗机械设备有限公司; HYG 恒温摇瓶柜, 上海欣蕊自动化设备有限公司; LGJ0.5 真空冷冻干燥机, Thermo Fisher Scientific Inc; SCL-10A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; AV III 400M 核磁共振仪, Bruker 科技有限公司; ZF-C 紫外分析仪, 上海长明光学电子仪器厂; IS 50 红外广谱仪, Thermo Scientific Nicolet。

1.3 实验处理

称取 2 kg 香椿老叶粉末, 用 20 L 体积分数为 60% 的无水乙醇于 50 °C 水浴中震荡浸提 4 h 后抽滤, 滤渣加入 10 L 体积分数为 60% 的无水乙醇, 利用上述工艺进行提取, 重复 1 次, 合并提取液。将提取液浓缩, 用正丁醇反复萃取至正丁醇相无色, 然后与正丁醇相合并, 浓缩, 冻干备用。

1.3.1 纯化处理方法

将正丁醇提取物过 AB-8 大孔树脂分离, 过硅胶柱分离纯化。经高效薄层板分析分离物纯度, 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化, 进一步通过 HPLC 定性分析验证化合物单体纯度, 以确定是否达到结构分析要求。

将正丁醇提取物过 D101 大孔吸附树脂分离提取, 经硅胶柱分离后, 浓缩, 冻干备用。

1.3.2 化合物的分离与鉴定

准确称取 1 mg 样品, 在红外灯的照射下, 放置于玛瑙研钵中, 再加入 150 mg 左右的干燥碘化钾粉末混合研磨 3~5 min。将研磨好的混合干燥粉末倒在称量纸上灌注于压模中, 压真空, 缓慢去除压力, 取出样品薄片, 放入样品铁架上, 置于傅里叶变换红外光谱仪内扫描。光谱范围为 4000~400 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描累加 64 次。将样品溶解于 DMSO, 使用 Bruker DMX-400 核磁共振仪, 测定单体化合物的氢谱 (¹H-NMR) 和碳谱 (¹³C-NMR), 将四甲基硅烷 (TMS) 作为内标物。

氯仿-浓硫酸反应将分离的香椿精提物的粉末溶于氯仿并加入硫酸后, 若氯仿层出现红色, 同时硫酸层在紫外灯照射(365 nm)下出现绿色荧光, 则可证明香椿皂苷中存在甾体皂苷^[10]。

硫酸-乙醇反应将待测样品溶液用毛细管分别吸取少量溶液点薄层板, 用二氯甲烷、甲醇(两者体积比为 10:1)展开剂分离, 等干燥后进行加热至 100 °C 以上, 用质量分数为 5% 的硫酸乙醇溶液喷板显色。若板显示有红紫色斑点, 则证明有三萜类皂苷; 若为蓝色, 则证明有甾体皂苷^[11]。

2 结果与分析

2.1 柱色谱分离得到 5 种单体化合物纯度鉴定结果

通过柱色谱方法, 从香椿老叶中分离纯化出 5 种黄酮类化合物, 经过 HPLC 检测, 均出现一个色谱峰, 满足纯度鉴定和结构解析的需要。

2.2 5 种单体黄酮类化合物结构分析结果

经红外光谱和核磁共振分析得到 5 种结构单体化合物, 见图 1。

2.2.1 化合物 I 的结构鉴定

化合物 I 为淡黄色粉末, 其波谱分析见图 2, IR 出现 3423, 1655 cm⁻¹ 的羟基吸收峰, 2917 cm⁻¹ 的亚甲基吸收峰, 1598, 1504, 1457 cm⁻¹ 的苯环吸收峰, 1363 cm⁻¹ 的甲基吸收峰, 1296, 1204 cm⁻¹ 的 C—O 键吸收峰, 1062 cm⁻¹ 醚键吸收峰。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 12.61(1H, 5-OH), 7.53(2H, brs, H-2', 6'), 6.85(1H, s, H-5'), 6.38(1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.19(1H, brs, H-6), 5.35(2H, brs, H-1''), 5.07(2H, brs, H-1'''), 1.00(3H, s, H-6'''); ¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 177.8(C-4), 164.5 (C-7), 161.6(C-5), 156.9 (C-2), 148.8(C-9), 145.2(C-3), 133.7(C-3), 122.0(C-1'), 121.6(C-6'), 116.6(C-5'), 115.6(C-2'), 104.4(C-10), 101.6(C-1''), 101.2(C-1'''), 99.1 (C-6), 94.0(C-8),

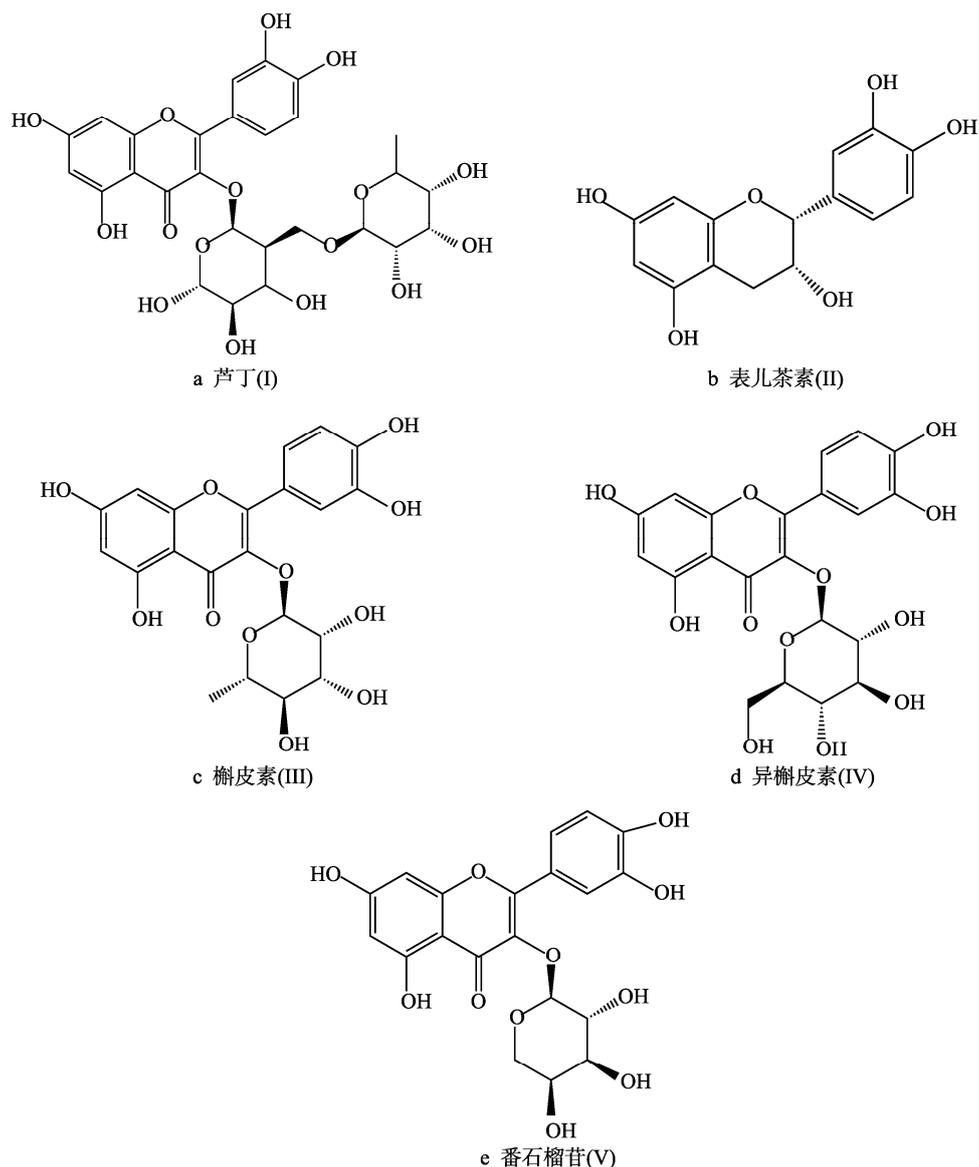


图1 化合物结构 I—V

Fig.1 Structure of compound I—V

76.9(C-5''), 76.3(C-3''), 74.5(C-2''), 72.3(C-4'''), 71.0(C-3'''), 70.8(C-2'''), 70.4(C-4''), 68.7(C-5'''), 67.4(C-6''), 18.2(C-6'''). 以上数据与 Lin L 等^[12]的报道一致, 确定化合物 I 为芦丁。

2.2.2 化合物 II 的结构鉴定

化合物 II 为淡黄色粉末, 其波谱分析见图 3。

¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz)δ:2.68(1H, dd, *J*=16.4,8.0 Hz, H-4a), 3.09(1H, m, H-4b), 4.00(1H, m, H-3), 4.73(1H,s,H-2), 5.71(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 5.89(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 6.72(1H, dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, H-6'), 6.76(1H, d, *J*=8.2 Hz, H-5'), 6.85(1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2'); ¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz) δ:157.0(C-7), 156.7(C-5), 156.2(C-9), 144.9(C-3'), 131.8(C-4'), 118.4(C-1'), 115.3(C-5'), 115.2(C-2'), 98.9(C-10), 95.6(C-6), 94.4(C-8), 78.5(C-2), 65.3(C-3), 28.6(C-4)。

以上数据与 Lee D F^[13]等的报道一致, 确定化合物 II

为表儿茶素。

2.2.3 化合物 III 的结构鉴定

化合物 III 为淡黄色粉末, 其波谱分析见图 4。IR 出现了 3346 cm⁻¹ 羟基吸收峰, 1659 cm⁻¹ 的羰基吸收峰, 1618, 1567, 1504 cm⁻¹ 出现苯环吸收峰。

¹H-NMR(DMSO-d₆,400 MHz)δ:6.21(1H, s, H-8), 6.40(1H, s, H-6), 6.88(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 7.27(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6'), 7.30(1H, s, H-2'), 12.66(1H, s, 5-OH), 5.26(1H, s, Rha); ¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz)δ:178.2(C-4), 164.6(C-7), 161.8(C-5), 157.7(C-9), 156.9(C-2), 148.9(C-4'), 145.6(C-3'), 134.6(C-3), 121.5(C-6'), 121.2(C-1'), 116.1(C-5'), 115.9(C-2'), 104.5(C-10), 102.3(C-1'), 99.1(C-6), 94.0(C-8), 71.6(C-4''), 71.0(C-3''), 70.8(C-2''), 70.5(C-5'')18.3(C-6'')。上数据与 Koolen H H^[14]等的报道一致, 确定化合物 III 为槲皮苷。

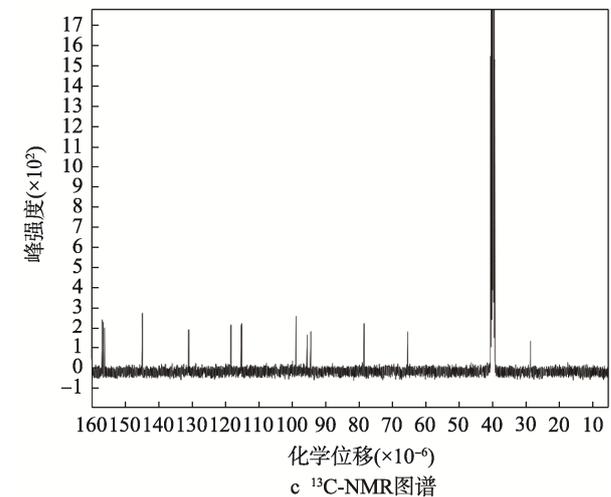
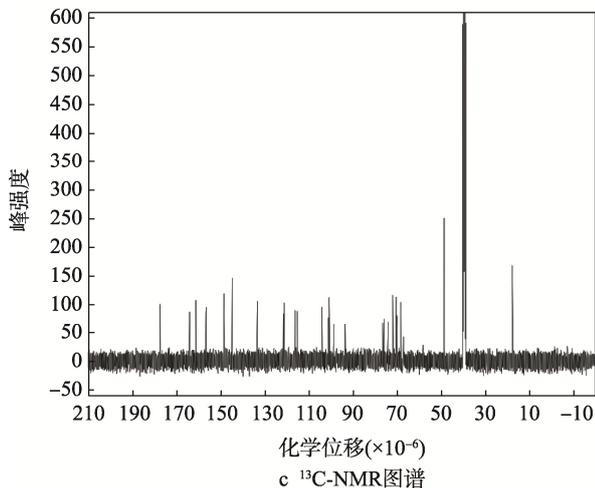
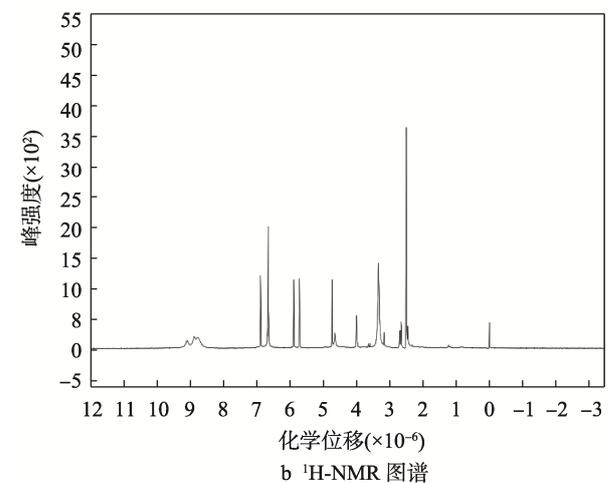
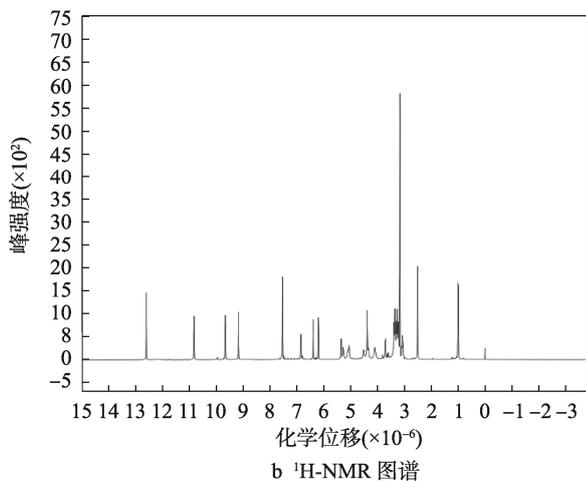
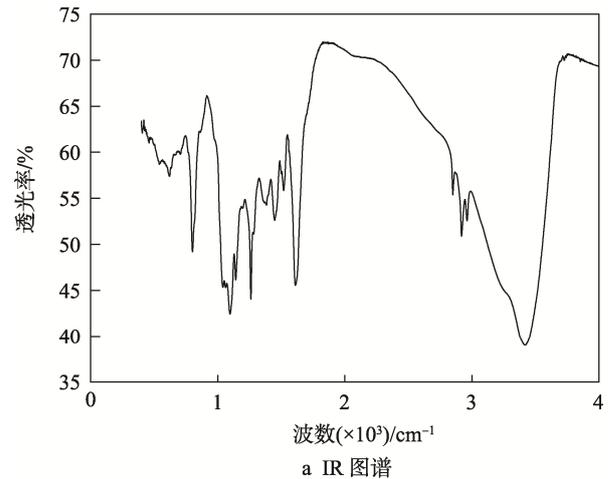
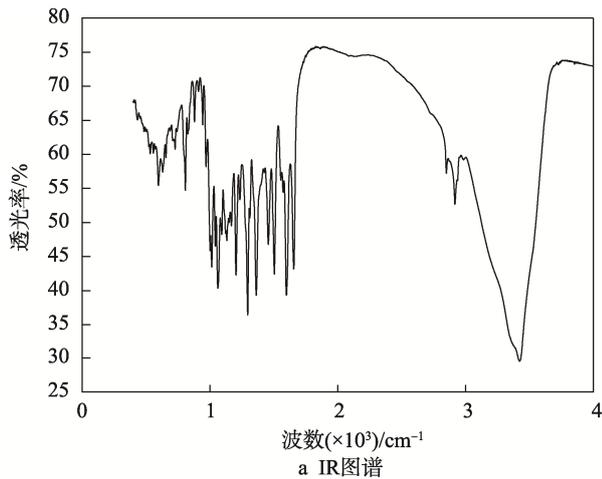


图 2 化合物 I 的波谱分析
Fig.2 Spectral analysis of compound I

图 3 化合物 II 的波谱分析
Fig.3 Spectral analysis of compound II

2.2.4 化合物 IV 的结构鉴定

化合物 IV 为淡黄色粉末，其波谱分析见图 5。
¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 6.20(1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 6.41(1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.84(1H, d, J=9.2 Hz, H-5'), 7.56(1H, dd, J=2.1, 8.7 Hz, H-6'), 7.57(1H, d, J=2.1 Hz, H-2'), 9.71(1H, s, 4-OH), 10.84(1H, s, 7-OH), 12.63(1H, s, 5-OH), 5.47(1H, d, J=7.2 Hz, Glc, H-1');
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 93.5 (C-8), 98.7

(C-6), 104.0(C-10), 115.2(C-2'), 116.2(C-5'), 121.6(C-6'), 121.2 (C-1'), 133.4 (C-3), 145.2 (C-3'), 148.9(C-4'), 156.6(C-9), 156.7 (C-2), 161.7 (C-5), 164.5(C-7), 177.9(C-4), 100.8(Glc-1''), 74.1(Glc-2''), 76.5(Glc-3''), 69.9(Glc-4''), 77.6(Glc-5''), 61.0(Glc-6'')。以上数据与 Cristina Vieira Da Silva I [15] 等的报道一致，确定化合物 IV 为异槲皮素。

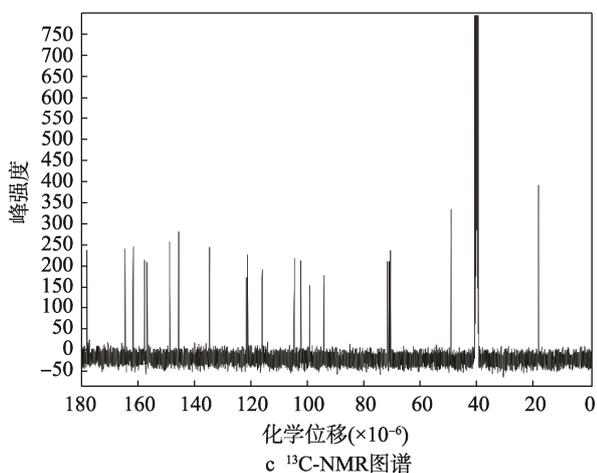
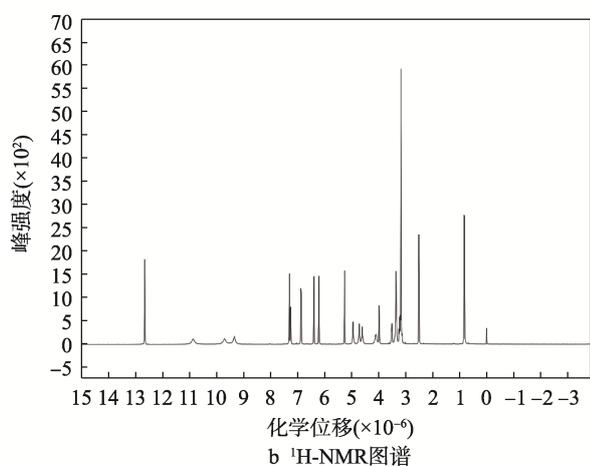
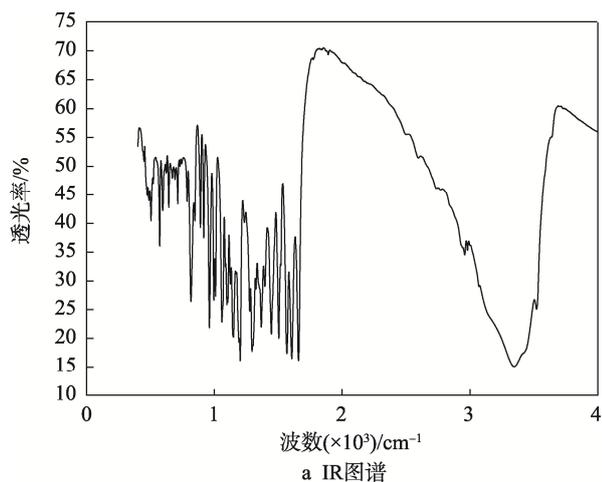


图4 化合物 III 的波谱分析
Fig.4 Spectral analysis of compound III

2.2.5 化合物 V 的结构鉴定

化合物 V 为淡黄色粉末, 其波谱分析见图 6。

¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz)δ:12.65(1H, s, 5-OH), 7.52-7.66(2H, m, H-2', H-6'), 6.82(1H, d, J=8.4 Hz, H-5'), 6.41(1H, d, J=1.6 Hz, H-8), 6.20(1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 5.28(1H, d, J=5.2 Hz, H-1''), 3.79-3.29(6H, m, H-2''-5''). ¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz) δ:93.6(c-8), 98.3(C-6), 101.5(C-1''), 103.4(C-10), 115.3(C-2'), 115.9 (C-5'), 121.5(C-1'), 122.8 (C-6'), 133.8(C-3), 145.7(C-3'), 149.1(C-4'), 156.2(C-2), 156.7(C-9), 161.4(C-5), 164.8(C-7), 177.9(C-4), 70.6(C-2''),

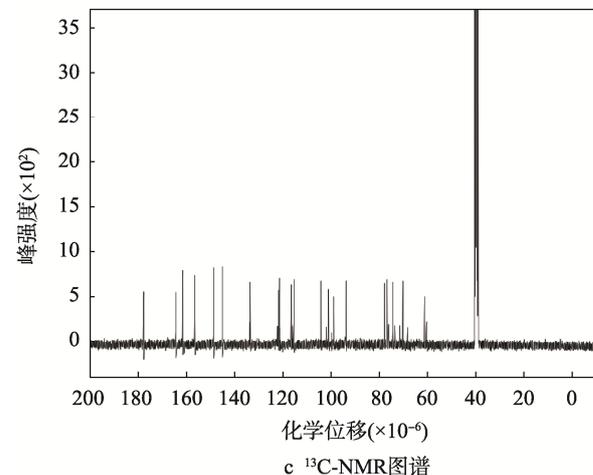
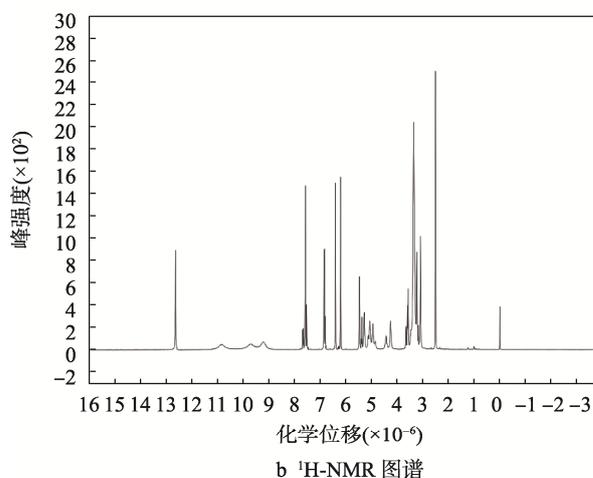
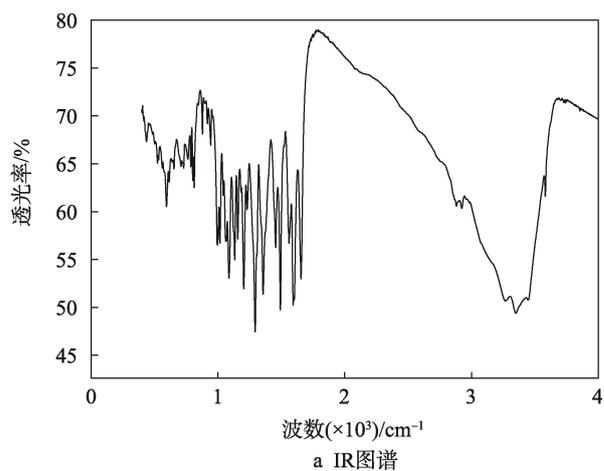


图5 化合物 IV 的波谱分析
Fig.5 Spectral analysis of compound IV

71.1(C-3''), 66.5(C-4''), 64.6(C-5'')。以上数据与 Prabu G R^[16]等的报道一致, 确定化合物 V 为番石榴苷。

2.3 香椿叶提取物中皂苷的定性分析结果

2.3.1 氯仿-浓硫酸反应结果

将得到的香椿皂苷精提物的粉末溶于氯仿, 并加入硫酸后, 氯仿层出现红色, 硫酸层在紫外灯下照射(365 nm), 出现绿色的荧光。根据实验现象可证明, 香椿提取液中有皂苷的存在。

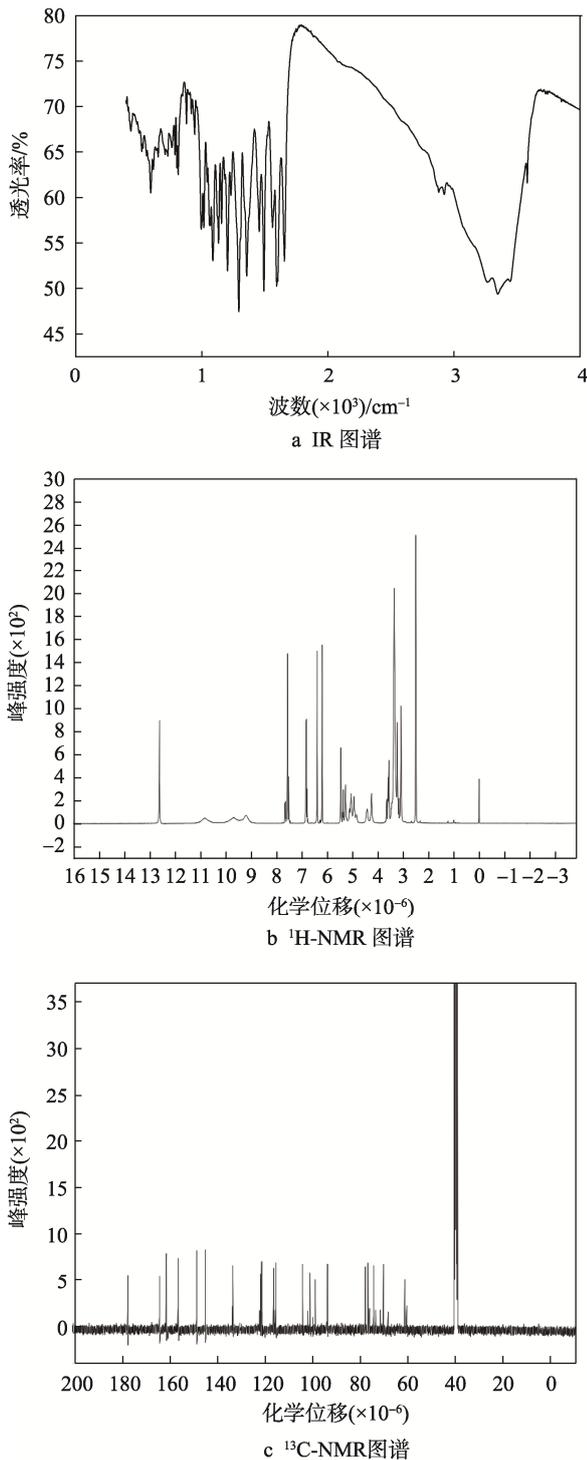


图6 化合物V的波谱分析
Fig.6 Spectral analysis of compound V

2.3.2 硫酸-乙醇反应结果

取待测样品,用毛细管点样在薄层板上,用酸性乙醇溶液喷洒上色,温度达到100℃以上时薄层板上出现红色斑点,并且逐渐变为紫色。通过这些现象初步断定,香椿皂苷精提取物中存在三萜皂苷。如果出现蓝色斑点,则证明有甾体皂苷存在。根据皂苷的颜色反应,初步断定香椿总皂苷中存在三萜皂苷及甾体皂苷,具体的结构和种类需要进一步研究才能确定。

3 结语

文中首次利用大孔树脂、硅胶柱、凝胶柱等多种方法相结合的方法,对黄酮及皂苷进行分离。研究发现,香椿老叶中含有芦丁、表儿茶素、槲皮素、异槲皮素、番石榴苷等多种黄酮成分。氯仿浓硫酸反应结果显示,皂苷中含有三萜类皂苷。硫酸乙醇反应结果显示,总皂苷中含有甾体类皂苷。

文中分离出了一小部分黄酮单体,还有大量活性成分有待继续分离及活性研究。在对皂苷分离时未得到单体化合物,只提高了纯度,也需要进一步的分离工作。

文中研究为香椿老叶产品的开发提供了一定的理论基础。香椿老叶中存在的多酚类物质、黄酮类、黄酮衍生物及萜类、多糖类物质,已有研究表明其具有良好的抗肿瘤、抗菌等功能,在医药及食品保健方面具有良好的开发研究价值。同时香椿老叶提取物具有较强的抗氧化能力,为研发食品贮藏添加剂提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 郝继伟. 浅谈香椿的资源价值与利用[J]. 江苏农业科学, 2003(5): 102—103.
HAO Ji-wei. Resource Value and Utilization of *Toona Sinensis*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2003(5): 102—103.
- [2] 陈铁山, 罗忠萍, 崔宏安, 等. 香椿化学成分的初步研究[J]. 陕西林业科技, 2000(2): 1—2.
CHEN Tie-shan, LUO Zhong-ping, CUI Hong-an, et al. Preliminary Study on Chemical Constituents of *Toona Sinensis*[J]. Shaanxi Forestry Technology, 2000(2): 1—2.
- [3] 程富胜, 胡庭俊, 张霞, 等. 椿树活性成分及药理作用研究与应用[J]. 中国动物保健, 2004(1): 39—40.
CHENG Fu-sheng, HU Ting-jun, ZHANG Xia, et al. Study and Application of Active Ingredients and Pharmacological Action of *Toona Sinensis*[J]. Animal Health In China, 2004(1): 39—40.
- [4] 张仲平, 赵惠英. 香椿叶中黄酮成分及其含量的季节性变化研究[J]. 山东中医药大学学报, 2001(2): 141—142.
ZHANG Zhong-ping, ZHAO Hui-ying. Seasonal Variation of Flavonoids in *Toona Sinensis* Leaves[J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2001(2): 141—142.
- [5] 罗晓东, 吴少华, 马云保, 等. 椿叶的化学成分研究[J]. 中草药, 2001(5): 8—9.
LUO Xiao-dong, WU Shao-hua, MA Yun-bao, et al. Study on the Chemical Constituents of *Toona Sinensis* Leaves[J]. Chinese Herbal Medicine, 2001(5): 8—9.
- [6] 贺正阳, 林丽. 香椿子化学成分与药理作用研究进展[J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(4): 64—66.

- HE Zheng-yang, LIN Li. Advances in Studies on Chemical Constituents and Pharmacological Effects of *Toona Sinensis* Seeds[J]. *Journal of Gansu College of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 30(4): 64—66.
- [7] 杨阳, 杨京霞, 王荣, 等. 太和香椿总黄酮的提取及含量测定[J]. *生物学杂志*, 2011, 28(1): 91—93.
YANG Yang, YANG Jing-xia, WANG Rong, et al. Extraction and Determination of Total Flavonoids in *Taihe-toonasinensis*[J]. *Journal of Biology*, 2011, 28(1): 91—93.
- [8] 张典, 姜凤良, 黄黎, 等. 香椿叶总黄酮对糖尿病小鼠血糖的影响[J]. *西北药学杂志*, 2011, 26(4): 270—271.
ZHANG Dian, JIANG Feng-liang, HUANG Li, et al. Effects of Total Flavonoids from *Toona Sinensis* Leaves on Blood Glucose in Diabetic Mice[J]. *Northwestern Journal of Pharmacy*, 2011, 26(4): 270—271.
- [9] 赵艳霞, 刘常金, 宛红颖. 香椿老叶中黄酮与皂苷的含量测定[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(21): 137—141.
ZHAO Yan-xia, LIU Chang-jin, WAN Hong-ying. Determination of Flavonoids and Saponins in *Toona Sinensis* Leaves[J]. *Food Research and Development*, 2016, 37(21): 137—141.
- [10] 马晓江, 王进, 汤峰, 等. 无患子总皂苷减压提取工艺优化及其除草活性研究[J]. *林产化学与工业*, 2019, 39(1): 137—141.
MA Xiao-jiang, WANG Jin, TANG Feng, et al. Study on Extraction Process Optimization and Herbicidal Activity of Total Saponins from *Sapindus Mukorossi* Gaertn[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2019, 39(1): 137—141.
- [11] 孔令义. 天然药物化学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 356.
KONG Ling-yi. *Chemistry of Natural Medicine*[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 356.
- [12] LIN L, HUANG X, LV Z. Isolation and Identification of Flavonoids Components from *Pteris Vittata* L[J]. *Springer Plus*, 2016, 5: 1649
- [13] LEE D F, SWINNY E E, JONES G P. NMR Identification of Ethyl-linked Anthocyanin-flavanol Pigments Formed in Model Wine Ferments[J]. *Tetrahedron Letters*, 2004, 45(8): 1671—1674.
- [14] KOOLEN H H, SOARES E R, Da S F, et al. MauriticAcid: a New Dammarane Triterpene from the Roots of *Mauritia Flexuosalf* (Arecaceae)[J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(22): 2118—2125.
- [15] CRISTINA VIEIRA DA SILVA I, MARQUES CASANOVA L, MAGALHAES FREITAS G, et al. Gallic Acid as the Main in Vitro Antileukemia Compound from *Kalanchoe Thyrsiflora* Leaf Extract[J]. *Current Traditional Medicine*, 2015, 1(3): 203—216.
- [16] PRABU G R, GANMANNI A, SADULLA S. Guajaverin—a Plant Flavonoid as Potential Antiplatelet Agent against *Streptococcus Mutans*[J]. 2006, 101(2): 487—495.