

文章编号: 1000-5862(2012)01-0008-04

迷迭香熊果酸的提取与结构鉴定

李开泉^{1,2}, 陶华蕾², 龚艳芳³

(1. 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000; 2. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000; 3. 宜春学院外国语学院, 江西 宜春 336000)

摘要: 采用“醇提凝析法”提取迷迭香中主要成分, 并通过理化性质及红外、质谱和核磁共振光谱研究确证迷迭香的主要成分为熊果酸。设计了一条从迷迭香中提取熊果酸的工艺路线, 该工艺路线方法简单易行, 合理实用, 产品纯度高, 安全性好, 为其规模化生产提供了技术条件。

关键词: 迷迭香; 熊果酸; 结构鉴定

中图分类号: R 284.1

文献标志码: A

0 引言

迷迭香(*Rosmarinus officinalis* L.)为唇形科多年生宿根草本、大型丛生常绿灌木植物, 具有强烈的芳香气味, 是目前公认的具有较高抗氧化作用的植物。迷迭香原产地中海, 中国科学院植物研究所于 1981 年成功地引种了迷迭香, 现我国南方已有大面积栽培, 资源丰富。迷迭香性温味辛无毒, 具有健胃、发汗、安神等功效, 能治各种头痛^[1]。

熊果酸是存在于天然植物中的一种五环三萜类化合物。现代药理学研究表明, 熊果酸具有镇静、抗炎、抗菌、抗糖尿病、抗溃疡、降血脂等多种功效, 还有明显的抗氧化功能, 被广泛用作医药和化妆品原料。熊果酸对人结肠癌细胞系 HT-29、人白血病细胞系 HL-60、人肺癌细胞系 A549、人表皮样癌细胞系 A431 等多种肿瘤细胞有较强的抑制作用^[2-5], 已成为国内外普遍关注、研究活跃的天然药物。为了促进国产迷迭香资源的开发利用, 并为熊果酸的规模化生产提供技术基础, 本文以迷迭香为原料, 提取分离熊果酸, 并通过选用酶制剂及除杂剂, 得到一条高效分离的工艺路线。

1 实验部分

1.1 原料与试剂

原料购于北京远馨芬芳科技有限公司, 产地新

疆, 经江西省天然药物活性成分研究重点实验室叶文峰教授鉴定为唇形科植物迷迭香(*Rosmarinus officinalis* L.)。食用乙醇(95%, 广西糖厂); 纤维素酶(枣庄市杰诺生物酶有限公司); 活性炭(粉状, 分析纯, 上海); 熊果酸标准品(宜春学院国家有证标准样品 GSB11-2259); 自制“YCX-1 号”除杂剂; HCl(分析纯, 南昌试剂公司)。

1.2 仪器与设备

X-4/X-5 显微熔点测定仪(北京); WZZ-1S 自动旋光仪(上海); P-E 傅里叶变换红外光谱仪(美国); Autospec-Ultima ETOF EI 及 Magnet BPI 型质谱仪(美国); INOVA-500 型 ¹H 及 ¹³C 核磁共振光谱仪(美国); Waters-515 型双泵高效液相色谱仪(美国)。

2 提取工艺

2.1 流程

工作流程见图 1。

2.2 操作要点

采用“醇提凝析法”提取分离^[6-7]。取干燥的迷迭香叶粉 10 kg, 用温水湿润后, 加入适量复合酶制剂, 于 28℃左右发酵处理 48 h。滤除水分后晒干, 加 8 倍量质量分数为 95%的乙醇加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h。合并 2 次提取液, 减压回收溶剂得浸膏。浸膏加水充分搅拌, 令其自然沉降后过滤, 用自制的“YCX-1 号”除杂剂洗涤 2 次, 沉淀加乙醇加热

收稿日期: 2011-11-08

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划(2002AA2Z3217)资助项目。

作者简介: 李开泉(1954-), 男, 江西丰城人, 研究员, 主要从事天然药物化学与新药开发研究。

溶解, 用活性炭脱色 30 min, 过滤, 减压回收乙醇, 析晶, 过滤, 于 80 °C 下烘干 24 h 得无色针状结晶熊果酸.

3 产品检测

样品外观为无色针状结晶, 不溶于水和石油醚, 易溶于甲醇、乙醇、乙醚、乙酸乙酯等中等极性溶

剂, Liebermann-Burchard 和 Salkowski 反应阳性. $[\alpha]_D^{20} + 65^\circ (C\ 9.5, EtOH)$, 熔点为 285~287 °C.

3.1 质谱

熊果酸的质谱图见图 2. EI-MS, m/z : 456(M^+), 441($M-CH_3$), 438($M-H_2O$), 423($M-CH_3-H_2O$), 411($M-COOH$), 410($M-HCOOH$); D、E 环离子 a: 248(a.100), 203(a- $COOH$), 189(a- CH_2COOH), 133; A、B 环离子 b: 208(b), 207(b-H), 190(b- H_2O)和 189(b- H_2O-H).

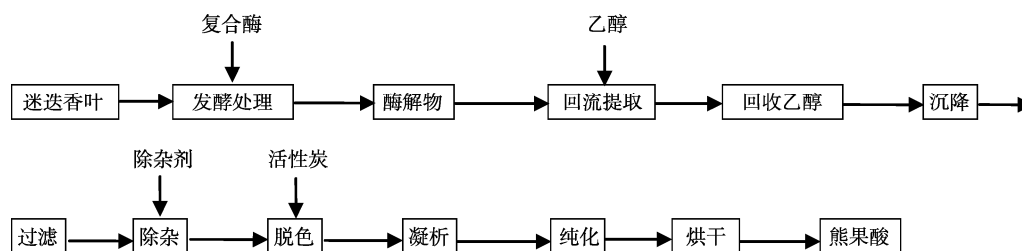


图 1 工作流程

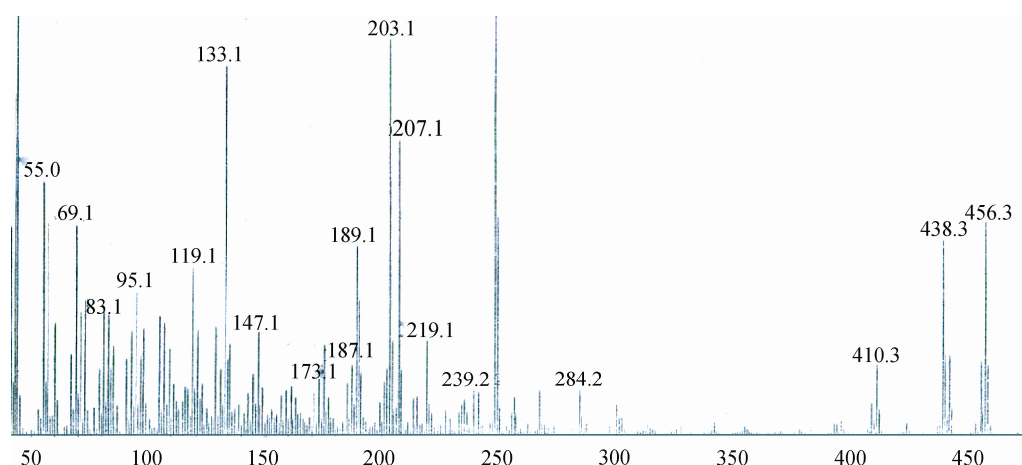


图 2 熊果酸的质谱图

3.2 红外光谱

熊果酸的红外光谱图见图 3. IR(KBr), ν_{max}/cm^{-1} : 3 429($-OH$), 2 968, 2 927, 2 871($C-H$), 1 695 ($C=O$), 1 456, 1 388, 1 377(CMM), 1 236, 1 186($C-M_2-C$), 1 030($C-O$).

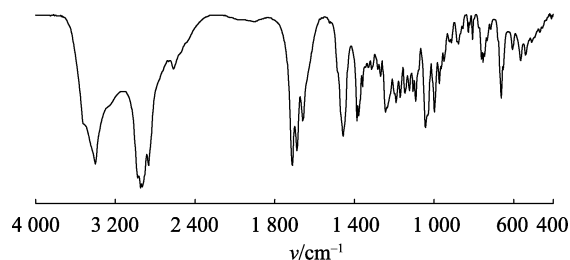
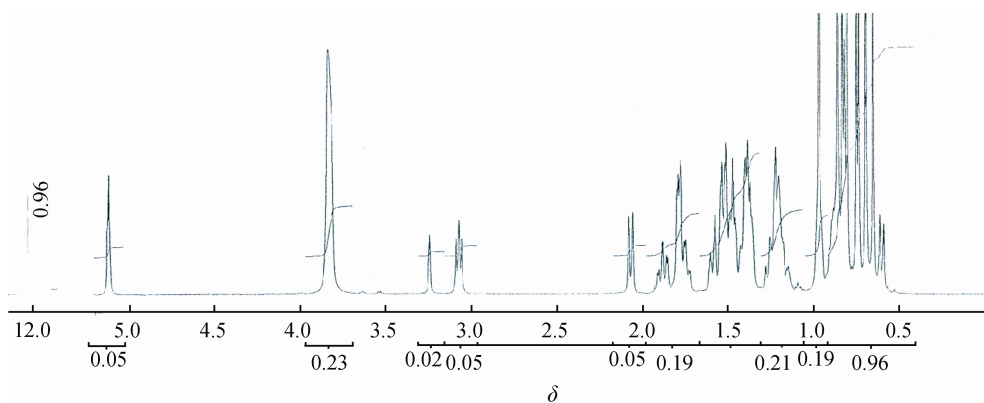
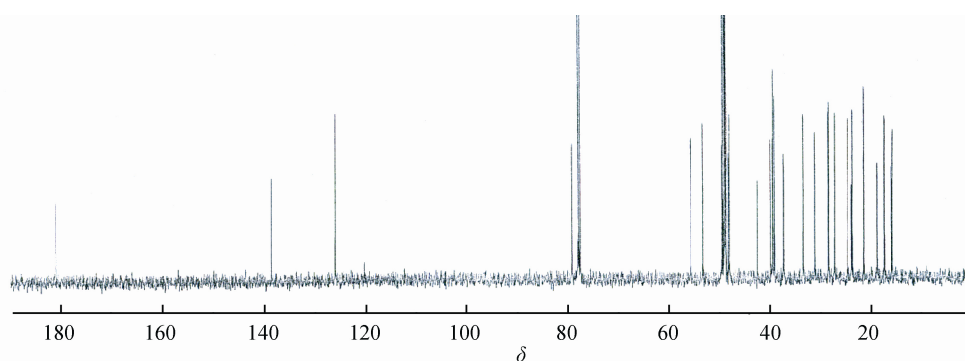


图 3 熊果酸的红外光谱图

3.3 核磁共振谱

熊果酸的 1H NMR 谱见图 4, ^{13}C NMR 谱见图 5. 1H NMR 显示 5 个季碳甲基(0.65、0.70、0.80、0.86、0.97, 各 3H, s), 单峰; 2 个叔碳甲基(0.74、0.83, 各 3H), 双峰; $C_3\alpha-H$ (3.07, 1H, t, $J=8$ Hz); $C_{12}-H$ (5.12, 1H, brs), 单峰; $C_{18}-H$ (2.07, 1H, d, $J=11$ Hz)、 $C_{29}-H$ (0.83, 3H, d, $J=6$ Hz), 双峰; $C_{30}-H$ (0.74, 3H, d, $J=6$ Hz), 单峰.

^{13}C -NMR 显示 7 个伯碳, δ : 28.28(C_{23}), 15.66(C_{24}), 15.88 (C_{25}), 17.16 (C_{26}), 23.60(C_{27}), 23.79(C_{29}), 21.34 (C_{30}); 9 个仲碳, δ : 39.04(C_1), 27.06(C_2), 18.67(C_6), 33.42(C_7), 17.24(C_{11}), 28.36(C_{15}), 24.56(C_{16}), 31.01 (C_{21}), 37.10(C_{22}); 7 个叔碳, δ : 79.08(C_3), 55.69(C_5),

图4 熊果酸的 ^1H NMR 谱图5 熊果酸的 ^{13}C 谱

47.95(C_9)、125.89(C_{12})、53.24(C_{18})、39.47(C_{19})、39.09(C_{20}); 6 个季碳, δ : 39.31(C_4)、39.83(C_8)、37.28(C_{10})、138.50(C_{13})、42.42(C_{14})、48.16(C_{17}).

以上光谱数据与文献值^[8-10]一致, 据此确证样品为熊果酸.

4 讨论

本研究采用纤维素酶制剂对原料进行预发酵处理, 加速熊果酸与植物细胞壁脱离释放, 同时使熊果酸苷水解为苷元; 并将某些脂类、类脂类等杂质水解转化为水溶性物质, 溶解于水而被除去.

本工艺的关键是控制溶液的 pH 值. 经反复试验, 证明 pH 值对脱色除杂、凝析分离、产品质量及产率至关重要.

临床研究证明, 迷迭香具有活化脑细胞、减轻头痛眩晕、消除胃肠胀气、改善睡眠、防治脱发之

功效, 已成为世界普遍重视的药物资源之一. 本研究表明, 迷迭香叶中含有丰富的熊果酸, 可作为提取熊果酸的首选原料.

5 参考文献

- [1] Jiangsu new medical college. Dictionary of chinese medicine [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977: 1738-1739.
- [2] Sun Quan, Cui Changxu, Quan Jishu, et al. Antitumor efficacy of extract of Rosmarinus officinalis [J]. Food Science and Technology, 2008 (4): 156-158.
- [3] 李爱霞, 赵玉林, 张军辉. 熊果酸诱导人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞凋亡的作用 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2010, 17(9): 491-492.
- [4] Ho Shih Ching, Liu Juehao, WuReY Yih. Establishment of the mimetic aging effect inmice caused by D-galactos [J]. Biogeront-

- tology, 2003; (4): 15-17.
- [5] Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, et al. l Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide(LPS)-induced liver injury in *D*-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002; 33(6): 798-806
- [6] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging [J]. *Nature*, 2000; 408: 239-247
- [7] Li Kaiquan, Chen Wu, Xiong X J. Research progression on chemical, pharmacology and clinical apply of ursolic acid [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2003, 25(5): 356-358.
- [8] Li Kaiquan, Zou Shengqin, Chen Wu, et al. Orthogonal optimization of extract technology for ursolic acid from *Sambucus chinensi* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drug*, 2003, 34(9): 791-792.
- [9] Peng S Q. Interpretation of drug spectroscopy [M]. Beijing: Beijing University of Medical Science and Peking Union Medical College United Press, 1998.
- [10] Cong P Z. Application of mass spectroscopy in organic chemistry of natural products [M]. Beijing: Science Press, 1987.

The Extraction and Structure Identification of Ursine Acid in Rosemary

LI Kai-quan^{1, 2}, TAO Hua-lei², GONG Yan-fang³

(1. Key Laboratory of Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun Jiangxi 336000, China;

2. Department of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun Jiangxi 336000, China;

3. Department of Foreign Language, Yichun University, Yichun Jiangxi 336000, China)

Abstract: The main ingredient in rosemary were extracted use of “Alcohol extract condensate law”, and by physical and chemical properties and infrared spectroscopy, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy study of confirmatory rosemary main ingredient for ursine acid. An extract ursine acid process route was designed. The method is simple, reasonable and practical, high product purity, safety, technical conditions for large-scale production.

Key words: rosemary; ursine acid; structure identification

(责任编辑: 刘显亮)