

不同生长日龄罗汉果甙类成分变化研究

李典鹏, 陈月圆, 潘争红, 张厚瑞

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 采集不同生长日龄的罗汉果, 对果实中的甙类成分进行选择性提取, 采用薄层色谱法对其甙类成分进行比较研究, 初步找出了罗汉果甙类成分在生长过程中的积累规律, 为罗汉果采收提供科学依据。

关键词: 罗汉果; 薄层色谱; 生长日龄; 甙类成分

中图分类号: Q946.83 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)06-0546-04

Study on variation of mogrol glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* in different growing ages

LI Dian-peng, CHEN Yue-yuan, PAN Zhen-hong, ZHANG Hou-rui

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and Academia Sinica, Guilin 541006, China)

Abstract: Collecting the fruits of *Siraitia grosvenorii* in different growing ages, mogrol glycosides was selectively extracted from the fruits. Thin layer chromatogram (TLC) was used to study the variation of mogrol glycosides. We primarily found out the accumulated rule of mogrol glycosides in different growing ages. This conclusion can provide scientific bases for the fruit picking of *Siraitia grosvenorii*.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; TLC; different growing ages; mogrol glycosides

罗汉果 (*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey) 为葫芦科罗汉果属多年生宿根茎性的藤本植物, 是我国特有的经济、药用植物, 为广西桂北地区传统特产。罗汉果有清热润肺、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、感冒、便秘、胃肠小疾等方面疗效显著 (中华人民共和国卫生部药典委员会, 1977; 1985; 1990)。罗汉果的甜味物质为葫芦烷型三萜甙类成分, 甜度约为蔗糖的 250~300 倍, 热量仅为蔗糖的五分之一, 是十分理想的天然甜味剂 (竹本常松等, 1983)。目前, 由罗汉果提取制成的天然甜味剂——罗汉果甜甙已投入工业化生产。

不同生长时期罗汉果果实甙类成分不一致, 成

熟罗汉果富含罗汉果甜甙, 主要为罗汉果甙 IV、V (mogroside IV、V) (竹本常松等, 1983), 味极甜; 未成熟的罗汉果主要含有罗汉果苦甙 A (mogroside II E) (徐位坤等, 1992), 味苦。有关罗汉果鲜果及市售干果的甙类成分前人已有详细报道 (斯建勇等, 1996; Matsumoto 等, 1990; Kasai 等, 1989; 王亚平等, 1992), 但罗汉果果实在生长发育过程中的甙类成分变化及其积累规律尚未见有研究。本文采用薄层色谱 (TLC) 比较研究了不同生长日龄罗汉果中的甙类成分变化, 并通过酸水解检测了其甙类成分水解后的甙元和糖部分的薄层色谱, 为阐明罗汉果甜甙的形成机理和积累规律打下初步理论基础, 为科学确定优质罗汉果的采收日期提供依据。

收稿日期: 2003-11-11 修订日期: 2004-03-22

基金项目: 广西科学基金资助项目 (桂科基 0236052); 中国科学院“西部之光”人才培养计划入选项目 (科发人教字 [2002] 101 号)。

作者简介: 李典鹏 (1968-), 男, 广西资源人, 副研究员, 从事植物资源的开发利用研究。E-mail: phytoldp@163.net

1 材料和仪器

材料:罗汉果样品采集于广西永福县龙江乡龙山村,同一果园,同一品种,在7月中旬1周内,选择同一天开花的子房,及同一周内开花并授粉后分别生长5、10、20、40、55、70、85 d的果实适量,切成约1 cm的碎片,按每100 g果样加入95%乙醇150 mL浸泡20 d以上。罗汉果甙ⅡE、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ等对照品为广西植物研究所植物化学研究室自制。葡萄糖纯度为99%,购自汕头市光华化学厂。

仪器:R-114型旋转蒸发器,瑞士Buchi公司生产;高压液相色谱仪,美国Waters公司产;Bruker AM-400型和DRX-500型核磁共振仪。

试剂:DM130大孔吸附树脂,330、732离子交换树脂,购自于山东鲁抗树脂分厂;高效硅胶H板,青岛海洋化工厂生产;反相C-18材料,Macherey Nagel公司产。

2 实验部分

2.1 罗汉果主要甙类成分对照品的提取分离

生长日龄75 d以上的鲜罗汉果5 kg,粉碎后加入95%乙醇5 000 mL,水浴加热回流提取3 h,过滤,滤渣再加入乙醇4 000 mL,重复提取1次,合并滤液,减压回收乙醇至浸膏状。浸膏用蒸馏水充分溶解,水溶液高速离心分离(转速大于4 000转),上清液经过DM130的大孔树脂柱,先水洗除糖分、水溶性杂质等,再用70%的乙醇洗脱,洗脱液减压回收乙醇,残液再用蒸馏水溶解,先通过330弱碱阴离子树脂,流出液再经过732强酸阳离子柱脱色,流出水溶液减压浓缩至干,得到浅色罗汉果总皂甙。罗汉果总甙用甲醇溶解,拌入硅胶,干法上硅胶柱用 CHCl_3 - CH_3OH (10:1~1:1)梯度洗脱,洗脱液经TLC检验,相同斑点合并,再经反相 C_{18} 柱(50% CH_3OH 洗脱)反复精制,分别得到化合物Ⅰ(120 mg),化合物Ⅱ(90 mg),化合物Ⅲ(120 mg),化合物Ⅳ(250 mg),经 ^1H NMR, ^{13}C NMR谱鉴定,对照文献(Matsumoto等,1990)确证化合物Ⅰ为罗汉果甙Ⅱ,化合物Ⅱ为罗汉果甙Ⅲ,化合物Ⅲ为罗汉果甙Ⅳ,化合物Ⅳ为罗汉果甙Ⅴ,经HPLC相对峰面积纯度测试,纯度分别为99%、98%、94%、95%(色谱条件:Waters高压液相色谱仪采用反相 C_{18} 分离柱,

示差检测器,甲醇-水(33:67)为流动相)。

2.2 不同生长日龄罗汉果甙类成分的提取

取不同生长日龄罗汉果样品乙醇浸泡液50 mL,过滤,滤液回收乙醇至浸膏状。浸膏加水悬浮,上清液用氯仿萃取3次,每次用氯仿15 mL,氯仿萃取后的水层再用正丁醇萃取3次,每次15 mL,合并正丁醇萃取液,用旋转蒸发器减压回收正丁醇,低温真空干燥成粉,即得不同生长日龄罗汉果粗总甙,供下述TLC点样和水解用。

2.3 不同生长日龄罗汉果甙类成分的水解及水解液的提取分离

分别取上述2.2项下的不同生长日龄罗汉果总甙1 g,加入含5% H_2SO_4 的50%乙醇溶液40 mL,加热回流水解4 h,减压回收乙醇,残液分别用20 mL CHCl_3 萃取3次,分别得到 CHCl_3 层和水层,水层经过732强酸性阳离子柱去除 H^+ ,过柱的溶液可进行纸层析或TLC测糖试验, CHCl_3 层用水洗多次,至水洗液基本呈中性,减压回收 CHCl_3 ,残渣可溶解点样进行TLC测定甙元。同时取罗汉果甙Ⅴ50 mg按上述试验,并在同一薄层析进行点样分析。

2.4 TLC试验条件

(1)不同生长日龄罗汉果甙类成分:取少量2.2项下不同生长日龄罗汉果总甙及2.1项下分离得到罗汉果甙Ⅴ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ对照品,用少量甲醇溶解,用微量毛细管点样于100 mm×100 mm的高效硅胶H板上,距薄层板底边15 mm处,相互间隔10 mm。分别试验了 CHCl_3 - CH_3OH - H_2O (7:3:0.5)、(8:2:1); $\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$: HAC : H_2O (4:1:1)等展开系统,最后选择 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{CH}_2$: HAC : H_2O (4:1:1)作为展开剂,分离效果较理想。显色剂:喷10% H_2SO_4 水溶液,在110℃下加热8 min显色。

(2)不同生长日龄罗汉果甙类成分水解后甙元:取少量2.3项下得到 CHCl_3 萃取物,加入少量 CHCl_3 溶解,用微量毛细管点样于100 mm×200 mm的高效H板上,距薄层板底边15 mm处,相互间隔10 mm。分别试验了苯-丙酮(7:1)、(7:2)、(7:1.5);展开体系,最后确定苯-丙酮(7:1.5)系统分离效果较好。显色剂:喷10% H_2SO_4 水溶液,在110℃加热8 min显色。

(3)不同生长日龄罗汉果甙类成分水解后糖部分:取少量2.3项下得到的过阳离子柱水溶液,用微量毛细管点样于100 mm×200 mm的高效H板上,距薄层板底边15 mm处,相互间隔10 mm。点样用

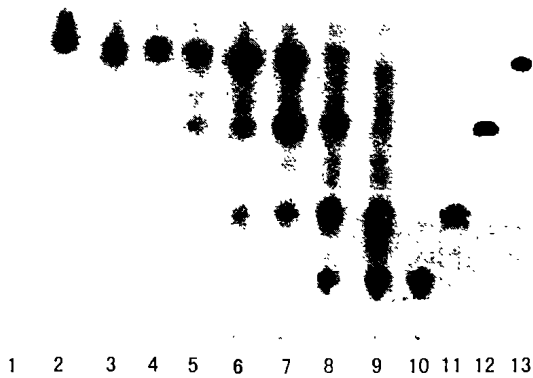


图 1 不同生长日龄罗汉果甙类成分的薄层色谱
Fig. 1 TLC of mogrol glycosides in different growing ages

1. 子房(German); 2. 5 d 果(5 days fruit); 3. 10 d 果(10 days fruit); 4. 20 d 果(20 days fruit); 5. 30 d 果(30 days fruit); 6. 40 天果(40 days fruit); 7. 55 天果(55 days fruit); 8. 70 天果(70 days fruit); 9. 85 天果(85 days fruit); 10. 甙 V (mogroside V); 11. 甙 IV (mogroside IV); 12. 甙 III (mogroside III); 13. 甙 II (mogroside II)。

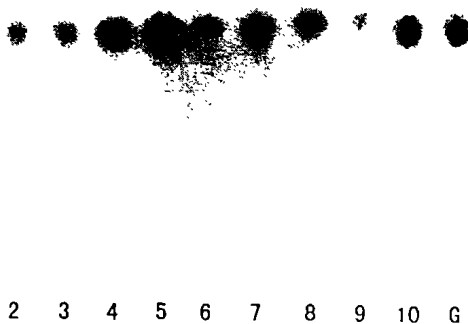


图 2 不同生长日龄罗汉果甙类成分水解后甙元薄层色谱
Fig. 2 TLC of mogrol after hydrolysis of mogrol glycosides in different growing ages

2. 5 d 果(5 days fruit); 3. 10 d 果(10 days fruit); 4. 20 d 果(20 days fruit); 5. 30 d 果(30 days fruit); 6. 40 天果(40 days fruit); 7. 55 天果(55 days fruit); 8. 70 天果(70 days fruit); 9. 85 天果(85 days fruit); 10. 甙 V (mogroside V)。

电风吹干。分别试验了正丁醇-乙酸-乙醚-水(10:8:3:1)和正丁醇-吡啶-水(6:4:3),最后确定选用正丁醇-吡啶-水(6:4:3)为展开剂,分离效果较好。显色剂:分别试验了茴香醛-硫酸-醋酸(0.1:1:50)和苯胺-二苯胺-磷酸试剂(二苯胺 4 g,苯胺 4 mL 及 85%磷酸 20 mL 溶于 200 mL 丙酮),喷雾于薄层板上,110 °C 烘 8 min,结果发现苯胺-二苯胺-磷酸作为显色剂,效果较优。



图 3 不同生长日龄罗汉果甙类成分水解后糖部分的薄层色谱

Fig. 3 TLC of glucopyl after hydrolysis of mogrol glycosides in different growing ages

2. 5 d 果(5 days fruit); 3. 10 d 果(10 days fruit); 4. 20 d 果(20 days fruit); 5. 30 d 果(30 days fruit); 6. 40 天果(40 days fruit); 7. 55 天果(55 days fruit); 8. 70 天果(70 days fruit); 9. 85 天果(85 days fruit); 10. 甙 V (mogroside V); G. 葡萄糖 (Glucose)。

3 结果与讨论

从图 1 可看出,罗汉果果实从授粉后 5 d 开始即有甙类成分出现,生长日龄在 30 d 以前的嫩果主要含有苦味的二糖甙即罗汉果甙 II E,30 d 后开始有罗汉果甙 III 出现,到 55 d 罗汉果甙 III 含量达到高峰,并有罗汉果甙 IV 生成,70 d 左右,罗汉果甙 IV 含量达到最高,并有罗汉果甙 V 生成,85 d 以后,罗汉果甙 V 为罗汉果的主要甜味成分,果实的外观开始黄熟。图 2 显示,罗汉果甙类水解后其甙元 TLC 图谱基本一致,从已知的甙类成分结构获知,其甙类元均为葫芦烷型四环三萜,即罗汉果醇(Mogrol)。其甙类成分结构差异仅在于甙元连接葡萄糖数目的多少和连接位置的不同。从图 3 可知,罗汉果甙类成分水解后其糖仅仅为葡萄糖。

从上述结果可得出以下结论:

(1)罗汉果中主要甙类成分其甙元相似,均为葫芦烷型四环三萜皂甙,其甙元所连接的糖均为葡萄糖,甙类成分结构差异仅在于葡萄糖连接甙元的位置和连接糖的数目多少。

(2)罗汉果在授粉 5 d 后即有罗汉果二糖甙出现,随着座果生长日龄增加,二糖甙逐渐减少,而相应三糖甙,四糖甙,五糖甙逐渐增加,成熟罗汉果以五糖甙为主,这种现象提示,罗汉果五糖甙(甜甙)可

能是以幼果中的二糖甙作为前体, 经历一个复杂的生源途径形成的。其中包含了在植物体内的糖基转移酶(Glycyltransferase)作用下, 葡萄糖残基逐步地转移, 依次形成呈强甜味的四糖甙、五糖甙过程。

(3) 授粉后 70 d 的果实, 外观仍呈绿色, 虽已积累有五糖甙, 但甜味强度较低的二糖甙、三糖甙仍是主要成分, 甚至还含部分呈苦味的二糖甙。罗汉果授粉后 85 d, 五糖甙积累达到高峰, 果实外观开始黄熟, 甜味最强。传统罗汉果主要烘烤加工成干果出售, 以授粉后 65~70 d 作为罗汉果的采收期, 此时的罗汉果在烘烤过程中不易出现破裂现象, 使成品果保持较好的外观品质。目前大量用于加工提取甜味剂的罗汉果鲜果, 其采收期仍与加工干果的采收期相同, 根据本研究, 其果龄应在 85 d 以上, 不应是目前沿用的 65~70 d。因此在开展罗汉果规范种植同时, 必须制定严格科学的采收标准, 以保证罗汉果的质量。

(4) 根据上述罗汉果甙类成分的变化规律, 值得进一步探索利用果实内本身存在的酶系, 将葡萄糖残基数较少, 甜度较低的二糖甙类成分(如二糖甙、三糖甙), 充分转化生成高甜度的罗汉果五糖甙的罗汉果采后处理技术, 这对有效提高罗汉果及其提取物的品质及商品价值意义重大。

参考文献:

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 1977, 1985, 1990. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 348, 181, 184.
- 竹本常松, 在原重信, 中岛正, 等. 1983. 罗汉果成分研究(I)[J]. 药学杂志(日), 103: 151.
- Kasai R, Nie Ruiliu, Nashi K, *et al.* 1989. Sweet cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia siamensis* (chi-zi Luo-han-guo) a Chinese folk medicine[J]. *Agric Biol Chem*, 53(12): 3374.
- Matsumoto K, Kasai R, Ohtani k, *et al.* 1990. Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii*(Cucurbitanaceae)[J]. *Chem Pharm Bull*, 38(7): 2030.
- Si JY(斯建勇), Chen DH(陈迪华), Chang Q(常琪), *et al.* 1996. Isolation and determination of cucurbitane-glycosides from fresh fruits of *Siraitia grosvenorii*(罗汉果中三萜甙的分离和结构测定)[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 38(6): 489-494.
- Wang YP(王亚平), Chen JY(陈建裕). 1992. Studies on chemical constituents of *Siraitia grosvenorii*(罗汉果化学成分的研究)[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 23(2): 61-62.
- Xu WK(徐位坤), Mong LSH(孟丽珊), Li ZY(李仲瑶). 1992. Isolation and identification of a bitter constituent from Luo-han-guo, sunripe fruits(罗汉果嫩果中一个苦味成分的分离和鉴定)[J]. *Guihaia*(广西植物), 12(2): 136-138.

(上接第 557 页 Continue from page 557)

- in the leaves[J]. *Plant Physiol*, 13: 1033-1039.
- Ma JF, Zheng SJ, Hiradate S, *et al.* 1997a. Oxalic acid secretion by buckwheat roots and ²⁷Al-NMR of Al-oxalate complex[J]. *Nature*, 390: 569-570.
- Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H. 1997b. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in cassia tora L[J]. *Plant Cell Physiol*, 38(9): 1019-1025.
- Ma JF, Taketa S, Yang ZM. 2000. Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in Trticale[J]. *Plant Physiol*, 122: 687-694.
- Ma Zhong, Miyasaka SC. 1998. Oxalate exudation by taro in response to Al[J]. *Plant Physiol*, 118: 861-865.
- Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK, *et al.* 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbean, root exudation of citric acid[J]. *Plant Physiol*, 96: 737-743.
- Pellet DM, Grunes DL, Kochian GL. 1995. Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize(*Zea mays* L.)[J]. *Planta*, 196: 788-795.
- Taylor GJ. 1991. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance[J]. *Curr Top Plant Biochem Physiol*, 10: 57-93.
- Yang ZM, Sivaguru M, Horst WJ, *et al.* 2000. Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max* L Merr)[J]. *Physiol Plant*, 110: 72-77.
- Yu L(俞乐), Peng XX(彭新湘), Yang C(杨崇), *et al.* 2002. Determination of oxalic acid in plant tissue and root exudates by reversed phase high performance liquid chromatography(反相高效液相色谱法测定植物组织及根分泌物中草酸)[J]. *Chin J of Anal Chem*, 30(9): 1119-1122 (in Chinese).
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. 1998a. High aluminum resistance in buckwheat. I Aluminum-induced specific secretion of oxalic acid from root tips[J]. *Plant Physiol*, 117: 745-751.
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. 1998b. Continuous secretion of organic acid is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress[J]. *Physiol plant*, 103: 209-214.