

番木瓜叶中生物碱的分离与结构鉴定

汪修意¹, 胡长鹰^{1,2,*}, 虞兵¹, 欧仕益¹, 王志伟²

(1.暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632)

(2.广东省普通高校产品包装与物流重点实验室, 广东珠海 519070)

摘要:干燥的番木瓜叶用含1% HCl的90%乙醇溶液于常温下提取5次, 浓缩、过滤、石油醚脱脂, NH₃·H₂O调pH至8.0~9.0, 三氯甲烷萃取, 得生物碱粗提物。采用硅胶柱层析对粗提物进一步进行分离纯化, 得到番木瓜碱, 并通过IR、MS和NMR对其进行了结构鉴定。

关键词:番木瓜叶, 生物碱, 番木瓜碱, 结构鉴定

Isolation and structural identification of alkaloids of papaya leaves

WANG Xiu-yi¹, HU Chang-ying^{1,2,*}, YU Bing¹, OU Shi-yi¹, WANG Zhi-wei²

(1.Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2.Key Laboratory of Product Packaging and Logistics of Guangdong Higher Education Institutes, Zhuhai 519070, China)

Abstract: Alkaloids were extracted five times from the dry papaya leaves by the solution of 90% ethanol contains 1% HCl. And then, the extract was concentrated, filtered, and degreased by petroleum ether. The acidity was adjusted to pH8.0~9.0 using concentrate NH₃·H₂O solution, and then extracted with excess chloroform. After purification of Silica gel column chromatography, alkaloids structural identification was performed with spectral methods (IR, MS, NMR). The carpaine was isolated and identified.

Key words: papaya leaves; alkaloids; carpaine; structure identification

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)06-0129-03

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 属于番木瓜科 (*Caricaceae*), 是一种多年生植物, 主要种植在斯里兰卡、印度、菲律宾、东赤道非洲、南美洲等热带、亚热带国家和地区, 这些地区一直将番木瓜作为传统药物用来治疗多种疾病, 甚至包括治疗癌症和传染性等疾病^[1-3]。番木瓜植物的几乎所有部位都是良好的食用和药用资源^[4-6]。已有研究证实番木瓜植物中含有多种化学活性成分, 如木瓜蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶抑制物、生育酚、抗坏血酸、黄酮类、乙基β-D-果糖苷、生氰糖苷和硫代葡萄糖苷等^[7-9]。生物碱类物质也是番木瓜植物中的重要活性成分之一。据报道, 番木瓜叶中含有4种生物碱, 分别为番木瓜碱 (carpaine)、伪番木瓜碱 (pseudocarpaine)、去氢番木瓜碱I (dehydrocarpaine I)、去氢番木瓜碱II (dehydrocarpaine II), 其中番木瓜碱的含量较高^[10-11]。Tuffley等^[12]研究认为, 番木瓜碱可以降低血压和肠道条状的心率运动, 也可明显使子宫松弛以及小支气管扩张。Ogan等^[13]研究认为, 番木瓜碱具有抗癌活性以及驱虫活性。Hornick等^[14]研究认为, 番木瓜碱剂量从0.5~2.0mg/kg可逐步降低小鼠心脏的收缩和舒张

压, 以及主动脉的血压, 并证实剂量为2mg/kg时可减少心输出量、心搏量、搏出能量以及心脏动力。目前, 对于番木瓜叶中生物碱的研究主要集中于其粗提物, 单一物质的研究鲜见报道, 国内还未见相关文献报道。本研究主要对番木瓜叶中的生物碱成分进行了提取和分离, 并鉴定出番木瓜碱单体, 为寻找番木瓜植物中药理活性成分以及其保健功能因子提供依据, 同时对进一步开发利用番木瓜植物有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

番木瓜叶 采自广州市增城民联番木瓜专业合作社; 95%的乙醇、石油醚、三氯甲烷、氨水、次硝酸铋钾、碘化钾、碘、浓盐酸等 均为分析纯; GF 254薄层色谱硅胶板 烟台江友硅胶开发有限公司; 硅胶柱填料200~300目柱层析硅胶 青岛海洋化工厂分厂; TLC展开剂 三氯甲烷: 甲醇体积比85:15, 充分混合后使用, 现配现用; 显色剂 碘化铋钾溶液。

中型提取罐 常州市特威电气自动化系统有限公司; RE-52 AAB旋转蒸发器 上海嘉鹏科技有限公司; BS2-100自动部分收集器、HL-1恒流泵 上海沪西分析仪器厂有限公司; UV-1800紫外/可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; SYBO6-10泵 天津市科器高新技术公司; Avance500核磁共振仪 德国Bruker公司; 4000Q TrapTM质谱仪 美国Applied Biosystems公司; EQUINOX55傅立叶红外光

收稿日期: 2013-07-22 * 通讯联系人

作者简介: 汪修意 (1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品、天然产物提取。

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (10151063201000021); 珠海市科技攻关项目 (PC20061044)。

谱仪 德国布鲁克光谱仪器公司;ABI4000 Q TRAP 液质联用仪 美国应用生物系统公司

1.2 实验方法

1.2.1 番木瓜叶生物碱的提取^[10-11] 将95kg番木瓜鲜叶,在50℃条件下恒温干燥48h,用粉碎机粉碎,过40目筛,得18kg的番木瓜叶干粉。取15kg干粉,用含1% HCl的90%乙醇溶液,按照料液比为1:2(kg:L),pH为4.0~5.0,在常温条件下提取24h,重复提取操作5次。然后,在50℃条件下对提取液进行减压浓缩,残余物过滤,用石油醚按照体积比为1:2(L:L)萃取脱脂,脱脂后用NH₃·H₂O调节水相pH至8.0~9.0,再用三氯甲烷按照体积比为1:1(L:L)萃取生物碱,在50℃条件下减压回收三氯甲烷,得番木瓜叶生物碱粗提物53.35g。

取上述部分生物碱粗提物溶于2%的HCl溶液中,制成生物碱盐溶液,取四份(每份约1mL),分别滴加碘-碘化钾试剂、碘化汞钾试剂、碘化铋钾试剂、硅钨酸试剂进行生物碱沉淀实验。

1.2.2 番木瓜叶生物碱的薄层层析以及液质检测 取上述部分生物碱粗提物溶于5mL的三氯甲烷溶液,薄层点样,展开剂为三氯甲烷:甲醇(85:15),显色剂为稀碘化铋钾试液。首先在254、365nm紫外灯下观察斑点,然后用显色剂显色后,再观察斑点,比较斑点的数量及位置。再将样品进行液质联用检测,流动相为乙腈和乙酸铵,按照0~5min 12%的乙腈,5~25min 12%~23%的乙腈,25~35min 23%~30%的乙腈,35~55min 30%的乙腈,55~70min 30%~100%的乙腈^[15]进行线性梯度检测。

1.2.3 番木瓜叶生物碱的分离 称取350g硅胶于90~100℃条件下干燥2h,干燥器中冷却,三氯甲烷润湿,装于5cm×60cm的层析柱内,用最初洗脱剂三氯甲烷:甲醇(95:5)进行洗柱,压实硅胶。取20g上述生物碱粗提物,溶于10~15mL的三氯甲烷,湿法上样于硅胶柱中,以三氯甲烷:甲醇(95:5)为洗脱剂进行洗脱,洗脱液以50mL每管进行收集,同时应用TLC跟踪检测。将Rf值为0.78,有且只有一条清晰可见的橘红色条带的洗脱液,合并浓缩回收溶剂,将浓缩物再溶于2%的HCl溶液中,滤纸抽滤,0.45μm滤纸过滤,重复过滤操作多次,直至溶液澄清透明为止,用NH₃·H₂O调节pH,随着NH₃·H₂O的不断加入,有淡黄色沉淀逐渐生成,加至再无沉淀生成为止,再用0.45μm滤纸过滤得沉淀物。

1.2.4 沉淀物的鉴定 将上述沉淀物溶于甲醇,以甲醇为空白对照,进行全波长扫描测定;将沉淀物与KBr混合均匀压片,进行红外吸收光谱鉴定;将沉淀物溶于甲醇,在离子源为ESI源条件下进行MS鉴定;将沉淀物溶于三氯甲烷氘代试剂,在500MHz条件下进行¹H-NRM、¹³C-NRM、¹³⁵DEPT和⁹⁰DEPT鉴定。

2 结果与分析

2.1 生物碱初步结果分析

在稀酸环境下,该粗提物能与碘-碘化钾试剂生成棕褐色沉淀,能与碘化汞钾试剂生成类白色沉淀,能与碘化铋钾试剂生成橘红色沉淀,能与硅钨酸试剂生成浅黄色沉淀,均有生物碱的沉淀反应,可初步

判断粗提物中含有生物碱类物质。

该粗提物经优化后的展开剂三氯甲烷:甲醇(85:15)展开,稀碘化铋钾溶液喷雾显色,斑点为橘红色,背景为浅黄色,清晰持久,经观察可能存在4种生物碱,Rf值分别为0.78、0.59、0.32、0.18。经液质联用检测,文献^[10-11]报道的4种生物碱的分子量在25.04、30.39、32.86、33.71min均被检测到,分别为474去氢番木瓜碱II、478伪番木瓜碱、476去氢番木瓜碱I、478番木瓜碱。

2.2 沉淀物的鉴定分析

将过滤得到的沉淀物于室温下干燥称重,得淡黄色粉末物质1.51g,然后对其进行全波长扫描、红外光谱、质谱、核磁共振鉴定。

2.2.1 沉淀物的全波长扫描 由图1可知,番木瓜叶分离得到的生物碱在304nm处有最大吸收,但整体对紫外的吸收强度都比较弱。

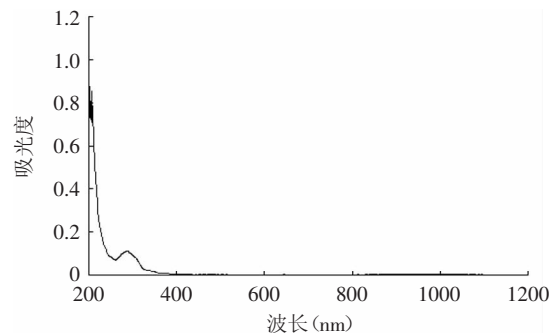


图1 化合物的全波长吸收光谱图

Fig.1 Full wavelength absorption spectra of compound

2.2.2 沉淀物的红外(IR)吸收光谱 由图2可知,沉淀物的红外特征吸收波数为3322cm⁻¹(>N-H),2927cm⁻¹(-CH₃),2856cm⁻¹(-CH₂-),1716cm⁻¹(>C=O),1232cm⁻¹(-O-),与杨秀伟等^[16]以及国家医药管理局^[17]公布的番木瓜碱的红外吸收相近。

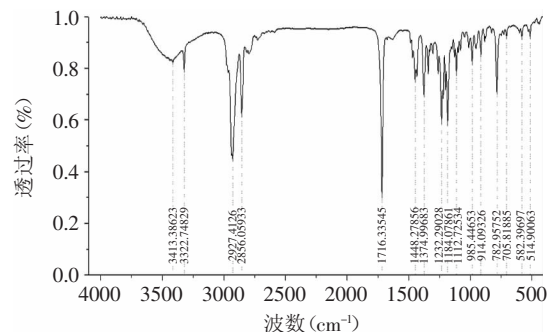


图2 化合物的红外吸收光谱图

Fig.2 The infrared absorption spectra of compound

2.2.3 沉淀物的质谱(MS) 由图3可知,ESI-MS中有m/z:479[M+H]⁺、495[M+NH₃]⁺、501[M+Na]⁺等离子峰,表明该沉淀物的相对分子质量为478。

2.2.4 沉淀物的核磁共振(NRM) 核磁数据经MestReNova软件解析得,¹HNMR(500MHz,CDCl₃):δ 4.82(d,J=26.1Hz,2H),2.89(dt,J=12.1,6.1Hz,2H),

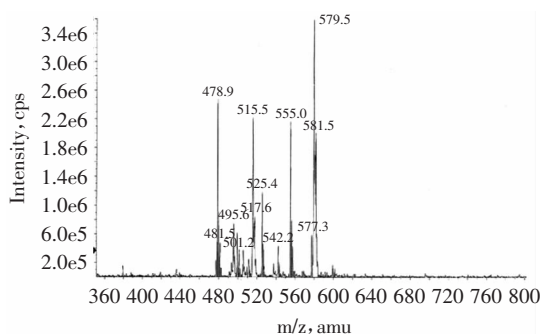


图3 化合物的质谱图

Fig.3 Mass spectra of compound

2.61 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.48–2.39 (m, 2H), 2.38–2.27 (m, 2H), 2.10–1.96 (m, 2H), 1.73–1.15 (m, 30H), 1.09 (t, $J=18.3\text{Hz}$, 6H)。 ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 173.51 (s), 70.36 (s), 56.04 (s), 53.62 (s), 37.43 (s), 34.61 (s), 29.78 (s), 29.14 (s), 28.76 (s), 28.72 (s), 26.42 (s), 25.51 (s), 25.39 (s), 18.71 (s), 与Sato等^[18]、Govindachari等^[19]以及Scifinder数据库中报道的一致。综上所述,此沉淀物为番木瓜碱,其结构如图4所示。

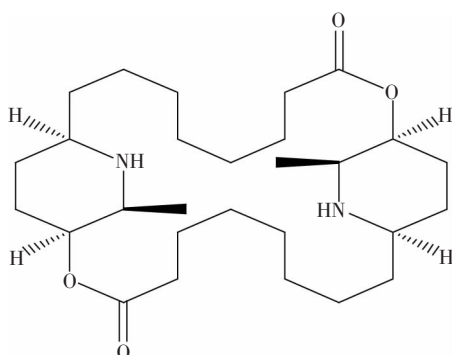


图4 番木瓜碱的结构

Fig.4 The structure of carpaine

由于番木瓜叶中的任一生物碱至今仍无标准品出售,也未见其检测方法的研究报道,番木瓜碱纯品的获得与鉴定,有助于番木瓜碱检测方法的建立,以及其生理功效的进一步研究,同时,也为番木瓜碱分离工艺和方法的探究创造条件。本实验首次应用硅胶柱层析以及化学沉淀法分离得到番木瓜碱纯品,方法简单快速,产品纯度高,为番木瓜叶中番木瓜碱的开发利用提供了更加快捷和简单的方法。

3 结论

本文通过生物碱沉淀法验证了番木瓜叶中含有生物碱类物质,并通过展开剂为三氯甲烷:甲醇(85:15),显色剂为碘化铋钾的薄层层析实验,以及液质联用检测实验,证实了番木瓜叶中存在4种生物碱,利用硅胶柱层析以及化学沉淀法分离得到了番木瓜碱,并鉴定验证了其结构,为其工艺探究创造条件,番木瓜叶中其余的生物碱还在进一步研究中。

参考文献

[1] Mello V J, Gomes M T R, Lemos F O, *et al.* The gastric ulcer

protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*[J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(4):237–244.

[2] Adebiyi A, Adaikan P G, Prasad R. Papaya (*Carica papaya*) consumption is unsafe in pregnancy: fact or fable? Scientific evaluation of a common belief in some parts of Asia using a rat model[J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 88(2):199–203.

[3] Munoz V, Sauvain M, Bourdy G, *et al.* The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia Part II Antimalarial activity of some plants used by Mosekene indians[J]. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 69(2):139–155.

[4] Romasi E F, Karina J K, Parhusip A J N. Antibacterial activity of papaya leaf extracts against pathogenic bacteria[J]. *MAKARA of Technology Series*, 2012, 15(2):173–177.

[5] Anibijuwon I I, Udeze A O. Antimicrobial activity of *Carica papaya* (pawpaw leaf) on some pathogenic organisms of clinical origin from South–Western Nigeria[J]. *Ethnobotanical Leaflets*, 2009(7):850–864.

[6] Dawkins G, Hewitt H, Wint Y, *et al.* Antibacterial effects of *Carica papaya* fruit on common wound organisms[J]. *The West Indian Medical Journal*, 2003, 52(4):290–292.

[7] Seigler D S, Pauli G F, Nahrstedt A, *et al.* Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(8):873–882.

[8] 黄娟娟, 胡长鹰, 潘慧芳. 番木瓜中糖类成分的纯化与鉴定[J]. *食品科学*, 2011, 32(13):89–93.

[9] 胡长鹰, 潘慧芳. 番木瓜中皂苷类成分的研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(7):114–116.

[10] Tang C. New macrocyclic, Δ^1 -piperideine alkaloids from papaya leaves: dehydrocarpaine I and II[J]. *Phytochemistry*, 1979, 18(4):651–652.

[11] Tang C. Macrocyclic piperidine and piperideine alkaloids in *Carica papaya*[J]. *Trop Foods Chem Nutr*, 1979(1):55–68.

[12] Tuffley B, Williams C H. The Pharmacology of Carpaine[J]. *Australian J Pharm*, 1951, 52:796–798.

[13] Ogan A U. The basic constituents of the leaves of *Carica papaya*[J]. *Phytochemistry*, 1971, 10(10):2544–2547.

[14] Hornick C A, Sanders L I, Lin Y C. Effect of carpaine, a papaya alkaloid, on the circulatory function in the rat[J]. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1978, 22(2):277.

[15] Jiao Z, Deng J, Li G, *et al.* Study on the compositional differences between transgenic and non-transgenic papaya (*Carica papaya* L.)[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, 23(6):640–647.

[16] 杨秀伟. 生物碱[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:322.

[17] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983:177.

[18] Sato T, Aoyagi S, Kibayashi C. Enantioselective total synthesis of (+)-azimine and (+)-carpaine[J]. *Organic Letters*, 2003, 5(21):3839–3842.

[19] Govindachari T R, Nagarajan K, Viswanathan N. Carpaine and pseudocarpaine[J]. *Tetrahedron Letters*, 1965, 6(24):1907–1916.