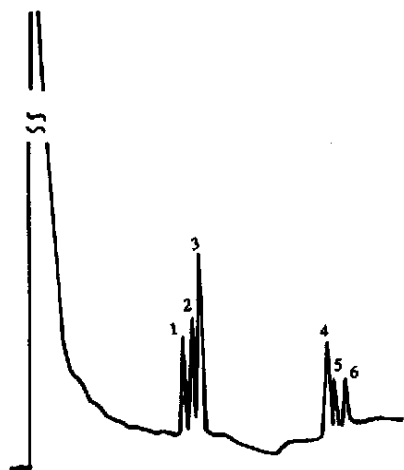


各 5 mg 加盐酸羟胺 20 mg 和吡啶 1.0 mL,在 90℃下反应 30 min,放冷,加入 1.5 mL 乙酸酐,再在 90℃下反应 30 min,反应产物冷却后,待用

2.3.3 组成分析:取各单糖对照品溶液 2 μ L 注入气相色谱仪,确定各单糖的保留时间。然后取样品溶液 2 μ L 注入气相色谱仪,记录色谱图,见图 1 由图可见南柴胡粗多糖主要由阿拉伯糖、核糖、木糖、甘



1-D-核糖 2-L-阿拉伯糖 3-D-木糖

4-D-半乳糖 5-D-甘露糖 6-D-葡萄糖

图 1 南柴胡多糖水解产物的糖腈乙酸酯衍生物的 GC 图

露糖、葡萄糖、半乳糖组成。

2.3.4 摩尔比测定:以正二十烷为内标物,测定 6 种单糖的定量校正因子 f (见表 1) 将样品得到的各个单糖色谱峰面积与内标物的峰面积比,乘以 f/m (m 为单糖的分子量) 所得值之比即为摩尔比。测得南柴胡叶粗多糖组成单糖的摩尔比为:阿拉伯糖:核糖:木糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖 = 0.106: 2.652: 4.070: 0.519: 0.930: 2.518

表 1 标准单糖定量校正因子测定

	阿拉伯糖	木糖	核糖	甘露糖	半乳糖	葡萄糖
重量比	1.023	1.008	1.293	0.945	1.138	1.001
峰面积比 1	0.583	0.494	0.541	0.353	0.312	0.335
峰面积比 2	0.650	0.511	0.541	0.494	0.548	0.423
平均峰面积比	0.594	0.502	0.541	0.424	0.430	0.379
定量校正因子 f	1.722	2.008	2.390	2.229	3.647	2.668

3 结果与讨论

本文实验结果与文献报道有不同。两者相同的单糖组成是阿拉伯糖、核糖、木糖、葡萄糖、半乳糖,不同的是南柴胡多糖中有甘露糖,而北柴胡多糖中有鼠李糖。另外,在气相色谱分析中还发现 4 个微量的单糖,由于缺少对照品,尚未对其它定性定量

(1999-08-02 收稿)

日本七叶树化学成分的研究[△]

II. 七叶树皂苷 IVc 和异七叶树皂苷 Ia Ib 的分离和鉴定

北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室 (北京 100083)

杨秀伟* 赵 静

日本国富山医科药科大学和汉药研究所

服部征雄

摘要 从日本七叶树 *Aesculus turbinata* Bl. 种子的 90% 乙醇提取物中分得 3 个二萜皂化合物,经光谱学分析鉴定了它们的结构分别为:七叶树皂苷 IVc 2 α -O-巴豆酰基-28-O-乙酰基原七叶树皂苷配基- β -O- β -D-吡喃葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸 (I),异七叶树皂苷 Ia 2 β -O-巴豆酰基-28-O-乙酰基原七叶树皂苷配基- β -O- β -D-吡喃葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸 (IV) 和异七叶树皂苷 Ib 2 β -O-当归酰基-28-O-乙酰基原七叶树皂苷配基- β -O- β -D-吡喃葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖醛酸 (V),均为首次从日本七叶树种子中分得。七叶树皂苷 Ia Ib IVc 和异七叶树皂苷 Ia Ib 在 100 μ mol/L 浓度的体外试验中对 HIV-1 蛋白酶活性具有一定的抑制作用。

关键词 日本七叶树 三萜皂苷 七叶树皂苷 IVc 异七叶树皂苷 Ia 异七叶树皂苷 Ib

Studies on the Chemical Constituents of Japanese Buckeye Seed

(*Aesculus turbinata*) Part II * Isolation and Identification of

Escin IVc and Isoescins Ia, Ib

National Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing University (Beijing 100083) Yang Xiuwei and Zhao Jing

* Address: Yang Xiuwei, National Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing University, Beijing

△国家自然科学基金资助项目 No. 29972004

Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan Hattori Masao

Abstract Three triterpenoid saponins were isolated from 90% ethanolic extract of the seeds of *Aesculus turbinata* Bl. Their structures were identified on the basis of spectral data as escin IVc 2 α -O-tigloyl-28-O-acetylprotoaescigenin- β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)] β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)] β -D-glucopyranosiduronic acid (I), isoescin Ia 2 β -O-tigloyl-28-O-acetylprotoaescigenin- β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)] β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)] β -D-glucopyranosiduronic acid (IV), and isoescin Ib 2 β -O-angeloyl-28-O-acetylprotoaescigenin- β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)] β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)] β -D-glucopyranosiduronic acid (V). Escin IVc and isoescins Ia, Ib were obtained for the first time from this plant. Escins Ia, Ib, IVc and isoescins Ia, Ib had inhibitory effect against recombinant HIV-1 protease at concentration of 100 μ mol/L *in vitro*.

Key words *Aesculus turbinata* Bl. triterpenes escin IVc isoescin Ia isoescin Ib

* For part I of this series, please see This Journal, 1999, 30(5): 327~ 32

前报^[1]报道了从日本七叶树 *Aesculus turbinata* Bl. 种子中分离得到七叶树皂苷 Ia(II) Ib(III)。本文报道七叶树皂苷 IVc(escin IVc, I) 异七叶树皂苷 Ia(isoescin Ia, IV) 和异七叶树皂苷 Ib(isoescin Ib, V) 的分离和结构鉴定。

日本七叶树种子的 90% 乙醇提取物的正丁醇可溶性部分经大孔树脂柱吸附, 依次用水, 20%、40%、95% 乙醇解吸, 将 40% 乙醇解吸物脱色后再经反向 HPLC 分离、纯化, 分别得到化合物 I ~ V。

化合物 I 为白色无定形粉末。在 TLC 板上展开后喷雾 10% H₂SO₄ 试剂呈紫色, 与 Liebermann-Burchard 试剂呈紫红色反应, 提示化合物 I 为三萜类化合物。IR 3 417 和 1 076 cm⁻¹ 示有糖苷键存在, 1 711 和 1 606 cm⁻¹ 为羰基和 α , β -不饱和酯的特征吸收。从其温和酸水解物中分离出原七叶树皂苷配基(protoaescigenin, I-1)^[1, 2] 和检出葡萄糖、葡萄糖醛酸。从 1% NaOMe-MeOH 碱水解产物中分离出去酰基七叶树皂苷 I (desacylescin^[3] = aesculuside B^[4], I-2)。因此, 化合物 I 的酯基结合在 C₁₆ C₂₃ C₂₈ 或 C₂₄。

化合物 I 的 MALDI-TOF-MS 显示准分子离子峰为 m/z 1 153 [M+ Na]⁺, 相当于其分子组成为 C₅₅H₈₆O₂₄ m/z 829 和 650 分别为失去 2 分子葡萄糖残基 [M+ Na- C₆H₁₀O₅- C₆H₁₀O₅] 和再失去 1 分子葡萄糖醛酸残基 [M+ Na- C₆H₁₀O₅- C₆H₈O₆- 2H] 的碎片峰, 与上述水解结果吻合。

将化合物 II 与我们曾从中华七叶树 *Aesculus chinensis* Bge. 种子中分离出的一系列七叶树皂苷类化合物数据^[5~7] 进行比较, 发现化合物 II 与七叶树皂苷 IVc 为同一物质^[5]。因此, 确定化合物 II 的结构为: 2 α -O-巴豆酰基-28-O-乙酰基原七叶树皂苷

配基- β -O-[β -D-吡喃葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 2)] β -D-吡喃葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 4)] β -D-吡喃葡萄糖醛酸 {2 α -O-tigloyl-28-O-acetylprotoaescigenin- β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)] β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)] β -D-glucopyranosiduronic acid}, 结构如图 1 所示。

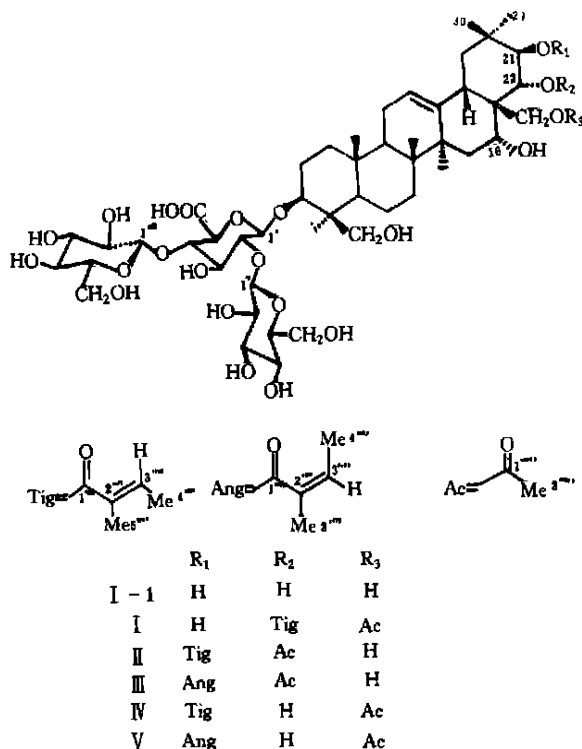


图 1 化合物 I ~ V 的化学结构式

本文是第一次报道从日本七叶树种子中分得七叶树皂苷 IVc 和异七叶树皂苷 Ia Ib。按我们曾报道的方法^[8] 进行生物学活性筛选的结果表明, 七叶树皂苷 Ia Ib, IVc 和异七叶树皂苷 Ia Ib 对 HIV-1 蛋白酶活性具有一定的抑制作用, 在 100 μ mol/L 浓度下的抑制率(%) 分别为: 100.0, 89.3, 35.2, 39.0 和 14.7。

1 仪器、试剂与材料

见文献^[1]。

2 提取与分离

日本七叶树种子粗粉 3.0 kg 用 3 倍量 90% 乙醇回流提取 2 h, 共提取 4 次。合并提取液, 减压浓缩至无醇味。然后, 将其溶于 1 000 mL 水中, 依次用 3 倍量乙酸乙酯和水饱和的正丁醇分别萃取 3 次, 合并乙酸乙酯和正丁醇萃取液, 减压浓缩至干, 分别得乙酸乙酯萃取物 (26.8 g, 收率 0.9%) 和正丁醇萃取物 (454.2 g, 15.1%)。将正丁醇萃取物 450 g 溶于 800 mL 水中, 加于预处理好的 D101 大孔树脂柱的顶端, 依次用水 (10 L), 40% 乙醇 (12 L) 和 95% 乙醇 (10 L) 解吸, 分别得解吸物 15.2 g (0.51%), 10.5 g (0.35%), 19.1 g (0.64%) 和 66.7 g (2.22%)。将 40% 乙醇解吸物脱色后溶于甲醇中, 使成 100 mg/mL 浓度, 进行 HPLC 制备分离、纯化, 分别得化合物 I (650 mg)、II (520 mg)、III (320 mg)、IV (600 mg) 和 V (380 mg)。

3 鉴定

七叶树皂苷 IVc(I): 白色粉末; IR MS¹H 和 ¹³CNMR 数据与我们从中华七叶树种子中得到的七叶树皂苷 IVc 一致^[5]。

七叶树皂苷 IVc 的温和酸水解: 称取七叶树皂苷 IVc 300 mg 溶于 100 mL 乙醇中, 加入 4 mol/L HCl 100 mL 回流水解 2 h。将水解液冷至室温后用适量的水稀释, 乙酸乙酯萃取。水层浓缩后与标准品糖共纸层析 (正丁醇-乙醇-水-浓氨水 = 45: 5: 49: 1) 检查, 检出葡萄糖 (R_f = 0.20) 和葡萄糖醛酸 (R_f = 0.07)。乙酸乙酯层经常压硅胶柱层析分离, HPLC (甲醇-水 = 9: 1) 精制, 得到原七叶树皂苷配基 (I -1), 与文献^[1,2]一致。

七叶树皂苷 IVc 的碱水解: 称取七叶树皂苷 IVc 200 mg 溶于 20 mL 1% NaOMe-MeOH 溶液中, 在室温下水解 8 h。将水解液冷至室温后用 Dowex 50 WX-8 (H⁺ 型) 中和, 蒸干溶媒, 残渣依次经常压硅胶柱层析和 HPLC (乙腈-1% 冰醋酸水溶液 = 7: 3) 精制, 得到去酰基七叶树皂苷 I (I -2)。

去酰基七叶树皂苷 I (I -2): 无色针晶 (MeOH), mp 260 °C ~ 262 °C; [α]_D - 33.9° (c, 1.15, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3 400, 2 940, 2 328, 1 725, 1 607, 1 413, 1 376, 1 260, 1 159, 1 074, 1 029, 904, 858, 798, 638 cm⁻¹; MALDI-MS m/z 1 029 [M+ Na]⁺, 1 045 [M+ K]⁺; ¹HNM R (500 MHz, pyridine-d₅) δ 0.60 (3H, s, Me-25), 0.69 (1H,

d, J = 12.5 Hz, H-5), 0.75 (1H, m, H-1a), 0.78 (3H, s, Me-26), 1.15 (2H, m, H-7ab), 1.25 (3H, s, Me-23), 1.26 (1H, m, H-1b), 1.27 (1H, m, H-2a), 1.28 (3H, s, Me-29), 1.34 (3H, s, Me-30), 1.36 (1H, dd, J = 6.5, 12.5 Hz, H-19a), 1.44 (2H, m, H-6ab), 1.59 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-9), 1.60 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-15a), 1.79 (3H, s, Me-27), 1.99 (1H, dd, J = 6.5, 12.0 Hz, H-15b), 2.22 (1H, m, H-2b), 2.75 (1H, d, J = 13.5 Hz, H-18), 2.98 (1H, dd, J = 14.0, 14.0 Hz, H-19b), 3.27 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-24a), 3.33 (1H, dd, J = 4.5, 11.5 Hz, H-3x), 3.66 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-28a), 3.95 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-28b), 4.22 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-24b), 4.52 (1H, br s, H-4'), 4.60 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-2β), 4.77 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-21α), 4.84 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1'), 4.97 (1H, br s, H-1φ), 5.17 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1'''), 5.33 (1H, br s, H-12), 5.58 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1''), ¹³CNMR 数据见表 1。

七叶树皂苷 Ia(II): 见前报^[1]。

七叶树皂苷 Ib(III): 见前报^[1]。

异七叶树皂苷 Ia(IV): 白色粉末, [α]_D - 24.6° (c, 1.30, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3 415, 2 927, 1 714, 1 641, 1 381, 1 276, 1 158, 1 074, 1 039, 601 cm⁻¹; Positive-mode TOF-MS m/z 1 153 [M+ Na]⁺, 1 130 [M]⁺; ¹HNM R (500 MHz, pyridine-d₅) δ 0.60 (3H, s, Me-25), 0.76 (1H, m, H-5), 0.88 (3H, s, Me-26), 1.06 (3H, s, Me-29), 1.22 (1H, m, H-7a), 1.24 (3H, s, Me-23), 1.28 (3H, s, Me-30), 1.39 (1H, d, J = 9 Hz, H-19a), 1.40 (2H, m, H-6ab), 1.55 (3H, d, J = 7.0 Hz, Me-4'''), 1.58 (1H, m, H-9), 1.77 (3H, s, Me-27), 1.81 (3H, s, Me-5'''), 1.99 (3H, OAc-Me), 2.85 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-18), 3.10 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-19b), 3.25 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-24b), 3.30 (1H, br s, H-3x), 4.26 (2H, m, H-28ab), 4.52 (1H, d, J = 10 Hz, H-2β), 4.71 (1H, br s, H-1φ), 4.76 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-1'), 5.16 (1H, br s, H-1'''), 5.42 (1H, br s, H-12), 5.51 (1H, d, J = 7 Hz, H-1''), 6.41 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-21α), 6.97 (1H, dq-like, H-3'''). ¹³CNMR 数据见表 1。

异七叶树皂苷 Ib(V): 白色粉末; [α]_D - 26.9° (c, 1.30, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3 414, 2 925, 1 710, 1 604, 1 381, 1 242, 1 158, 1 038, 600 cm⁻¹; Negative-mode TOF-MS m/z 1 152 [M+ Na]⁺,

表 1 化合物I、IV、V和I-1的¹³CNMR数据

C	δ					C	δ				
	I	-I ^[2]	I	IV	V		I	-I ^[2]	I	IV	V
1	38.9	38.3	38.4	38.4	38.1	29	30.6	30.4	30.1	29.5	29.4
2	28.4	26.4	26.4	26.2	26.1	30	19.4	19.3	19.3	19.8	19.9
3	80.1	90.9	91.0	90.9	90.7	1'''			168.2	168.5	168.3
4	43.2	43.5	43.6	43.5	43.2	2'''			129.8	129.5	129.1
5	56.4	55.9	56.1	55.9	55.7	3'''			136.6	136.2	135.1
6	19.1	18.4	18.5	18.3	18.1	4'''			13.9	14.0	15.2
7	33.6	33.0	32.9	33.0	32.8	5'''			12.3	12.1	20.7
8	40.1	39.8	39.9	39.7	39.5	1'''''			170.7	170.6	170.5
9	47.3	46.6	46.7	46.6	46.3	2'''''			20.7	20.5	20.4
10	37.0	36.3	36.3	36.2	35.8	1'		104.5	104.5	104.3	104.1
11	24.1	23.9	24.2	23.9	23.8	2'		79.5	79.8	79.5	79.2
12	122.9	122.7	123.0	123.2	123.2	3'		76.4	76.4	76.5	76.5
13	143.9	143.8	142.4	142.5	142.3	4'		81.9	82.3	82.3	82.3
14	42.0	41.8	41.7	41.5	41.4	5'		75.5	75.6	75.4	75.2
15	34.3	34.1	34.6	34.3	34.2	6'		172.9	170.7	170.6	170.5
16	67.8	67.7	67.9	67.5	67.3	1''		104.0	103.9	103.9	103.7
17	47.2	47.2	46.2	46.9	46.7	2''		75.5	75.6	75.4	75.2
18	41.2	41.0	39.9	40.3	40.2	3''		78.1	78.2	78.1	78.0
19	48.2	48.1	47.6	47.0	46.9	4''		69.6	69.8	69.7	69.4
20	36.4	36.2	36.8	36.0	35.9	5''		77.9	77.7	77.9	77.8
21	78.7	78.5	76.4	81.5	80.8	6''		61.4	61.4	61.4	61.2
22	77.3	77.0	77.7	71.2	71.0	1'''		104.5	104.5	104.3	104.1
23	23.5	22.2	22.5	22.3	22.1	2'''		74.8	74.9	74.7	74.6
24	64.6	63.2	63.3	63.1	62.9	3'''		78.3	78.2	78.1	78.0
25	16.9	15.4	15.6	15.4	15.6	4'''		71.3	71.3	71.2	71.0
26	16.3	16.5	16.7	16.6	16.5	5'''		77.8	77.7	77.8	77.8
27	27.4	27.2	27.4	27.1	27.0	6'''		62.2	62.2	62.0	61.7
28	68.4	68.0	68.4	66.3	66.1						

1 130[M]⁻; ¹HNM R(500 MHz, pyridine-*d*₅) δ 0.55 (3H, s, Me-25), 0.84(3H, s, Me-26), 1.04(3H, s, Me-29), 1.22(1H, s, Me-23), 1.24(3H, s, Me-30), 1.77(3H, s, Me-27), 1.90(3H, s, OAc-Me), 1.93(3H, s, Me-5'''), 1.98(1H, d, J= 7.0 Hz, Me-4'''), 2.78(1H, d-like, H-18), 3.02(1H, dd, J= 12.0, 12.0 Hz, H-19b), 3.22(1H, d-like, H-24b), 3.30(1H, d-like, H-3a), 4.41(1H, d, J= 9.5 Hz, H-23), 4.67(1H, br s, H-10), 4.73(1H, d-like, H-1'), 5.16(1H, d-like, H-1'''), 5.39(1H, br s, H-12), 5.48(1H, d-like, H-1''), 5.84(1H, dq-like, H-3'''), 6.39(1H, d, J= 9.0 Hz, H-2b) ¹³CNMR数据见表1

异七叶树皂苷 Ia和 Ib的温和酸水解: 分别称取异七叶树皂苷 Ia或 Ib10 mg溶于 3 mL乙醇中, 加入 4 mol/L HCl 3 mL回流水解 2 h 将水解液冷至室温后用水稀释, 乙酸乙酯萃取, 水层浓缩后与标准品糖共纸层析(正丁醇-乙醇-水-浓氨水= 45: 5: 49: 1)检查, 检出葡萄糖和葡萄糖醛酸。乙酸乙酯层经 HPLC(甲醇-水= 9: 1)分析, 检出原七叶树皂苷配基。

异七叶树皂苷 Ia和 Ib的碱水解: 分别称取异七叶树皂苷 Ia和 Ib 10 mg溶于 2 mL 1% NaOMe-MeOH溶液中, 在室温下水解 8 h 将水解液冷至室温后用 Dowex 50 WX-8(H型)中和, 蒸干溶媒, 残渣溶于甲醇中经 HPLC分析检出酰基七叶树皂苷I。

七叶树皂苷 Ia Ib IVc和异七叶树皂苷 Ia Ib对 HIV-1蛋白酶抑制作用的鉴定: 按我们报道的方法^[8]进行。

参考文献

1 赵 静, 杨秀伟. 中草药, 1999, 30(5): 327
2 杨秀伟, 赵 静. 波谱学杂志, 1999, 16(5):
3 Yoshikawa M, Murakami T, Matsuda H, *et al.* Chem Pharm Bull, 1996, 44(8): 1454
4 Singh B, Agrawal P K, and Thakur R S. J Nat Prod, 1987, 50(5): 781
5 Yang X W, Zhao J, Cui Y X, *et al.* J Nat Prod, 1999, 62(11): 1510
6 Zhao, J, Yang X W, Cui Y X, *et al.* Chin Chem Lett, 1999, 10(4): 291; (6): 473; (9): 767
7 Yang X W, Zhao, J, Cui Y X, *et al.* Chin Chem Lett, 1999, 10(11): 925
8 Yang X W, Gu Z M, Ma C M, *et al.* Chinese traditional and herbal drugs(中草药, 英文论文), 1998, 29(1): 5

(1999-10-27收稿)