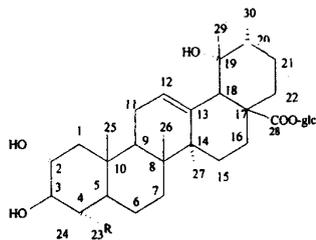


制备型 HPLC 法分离 2 个茅莓皂苷单体成分

都述虎^{1,2}, 刘文英^{1*}, 饶金华², 白 娟²

(1. 中国药科大学 药物分析教研室, 江苏 南京 210009; 2. 安徽省医学科学研究所, 安徽 合肥 230061)

茅莓 *Rubus parvifolius* L. 是蔷薇科悬钩子属植物^[1], 有清热凉血、活血止血等多种功能。民间用于妇科止血, 疗效显著, 其主要有效成分为三萜皂苷。目前由于缺少此类对照品, 无法有效开展相关质量指标检测工作。据文献报道^[2]从茅莓中分得 2 个三萜皂苷: 甜茶苷 R₁ (suavissimoside R₁) 和苦莓苷 F₁ (niga-ichigosides F₁), 主要采用柱色谱法, 操作步骤烦琐, 结构确证仅有碳谱和氢谱。因其结构中 23 位取代基分别是 -COOH 和 -CH₂H (图 1), 所以性质相近, 难以用常规的分离方法得到纯度较高的对照品。本研究以甜茶苷 R₁ 为目标分离产物, 将 70% 乙醇浸膏经大孔吸附树脂和硅胶前处理, 得到具有较高含量甜茶苷 R₁ 的混合物后, 使用制备型高效液相色谱同时分离出甜茶苷 R₁ 和苦莓苷 F₁ 2 个单体, 操作步骤简便, 并经 IR、MS 和 2D-NMR 综合解析确证 (另文报道), 满足了常规定量分析检测的需求。



suavissimoside R₁: R=COOH

niga-ichigoside F₁: R=CH₂OH

图 1 2 种茅莓皂苷结构

Fig. 1 Structures of suavissimoside R₁ and niga-ichigosides F₁ from *R. parvifolius*

1 仪器、材料与试剂

SSI 2000 制备型高效液相色谱仪 (天津 LabAlliance 公司); HP 1050 型高效液相色谱仪 (美国 HP 公司); Leitz Wetzlar 显微熔点仪 (德国); Magna FTIR 750 型傅里叶红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司); Agilent 1100 型 (LC-MSD System, ESI Mode) 质谱仪 (美国 Agilent 公司); Bruker AV

500 型核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司)。

茅莓药材经安徽中医学院王德群教授鉴定为蔷薇科悬钩子属植物茅莓 *R. parvifolius* L. 的干燥根; D₁₀₁ 型大孔吸附树脂 (天津农药股份有限公司树脂分公司); 柱色谱用硅胶 (100~200 目, 青岛海洋化工厂), 薄层色谱硅胶板 (10 cm×5 cm, 烟台化学工业研究所); 所用试剂均为分析纯。

2 条件和方法

2.1 色谱条件: 分析色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水 (46:54), 体积流量: 1.0 mL/min, 检测波长: 209 nm, 柱温: 室温, 进样量: 10 μL。

制备色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm×10 mm, 10 μm), 流动相: 甲醇-水 (40:60), 体积流量: 6.0 mL/min, 检测波长: 204 nm, 柱温: 室温, 进样量: 200 μL。

2.2 茅莓皂苷混合物样品的制备: 将茅莓根 10 kg 切片减压烘干至恒重, 70% 乙醇提取, 滤过, 回收乙醇得浸膏, 水浴蒸至无醇味, 加 2~3 倍量热水溶解, 放置冷却, 滤过。滤液上大孔吸附树脂柱, 依次用蒸馏水、40% 乙醇洗脱, 收集 40% 乙醇洗脱液^[3], 减压蒸干, 硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇-水 (50:10:1; 40:10:1; 30:10:1) 梯度洗脱, 收集氯仿-甲醇-水 (30:10:1) 流份, TLC 监测, 甲醇重结晶, 得白色针状结晶约 2 g (甜茶苷 R₁ 和苦莓苷 F₁ 的混合物), 得率约 0.02%。

取上述白色针状结晶适量, 用甲醇溶解, 微孔滤膜滤过, 进样, 分析谱图见图 2, 可知甜茶苷 R₁ 纯度约为 82.31%。

2.3 制备色谱分离: 将上述所得到白色针状结晶用甲醇溶解, 作为制备色谱用样品溶液, 每次进样 200 μL, 根据检测结果收集相应流出液, 减压旋转蒸发, 分别收集得到甜茶苷 R₁ 和苦莓苷 F₁。

3 鉴定

收稿日期: 2004-05-04

基金项目: “十五”安徽省重大科技专项资助课题 (01803014); 安徽省优秀青年科技基金资助皖科基 [2001]02-23)

作者简介: 都述虎, 男, 研究员, 博士生。 E-mail: shuhudul@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Tel: (025)83271251 E-mail: wycpu@tom.com

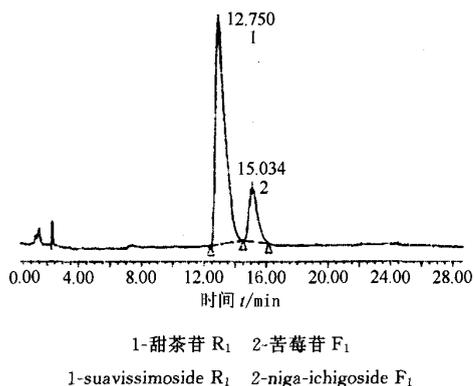


图 2 茅莓皂苷混合物样品的分析色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of suaivissimoside R₁ and niga-ichigoside F₁ mixture

甜茶苷 R₁(suaivissimoside R₁): C₃₆H₅₈O₁₂, 白色针状结晶(MeOH), mp 255~257 °C(分解), 易溶于吡啶, 可溶于甲醇、乙醇和水。L-B 试验和 Molish 试验均呈阳性。ESI-MS (*m/z*): 703(M+Na)⁺。IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3 420, 2 932, 1 720, 1 455, 1 074, 1 031。¹H-NMR (C₅D₅N) δ : 1.15, 1.19, 1.37, 1.61, 1.70 (各 3H, s, 5 × CH₃), 1.05 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, CH₃CH), 2.91 (1H, s, H-18), 4.17~4.47 (6H, H-2', 3', 4', 5', 6'), 5.53 (1H, brs, H-12), 6.26 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-1')。 ¹³C-NMR (C₅D₅N₅) δ : 48.28(C-1), 68.37(C-2), 80.73(C-3), 54.11(C-4), 52.01(C-5), 21.20(C-6), 33.00(C-7), 40.43(C-8), 47.89(C-9), 37.36(C-10), 24.20(C-11), 127.89(C-12), 138.98(C-13), 41.81(C-14), 28.85(C-15), 25.78(C-16), 47.97(C-17), 54.49(C-18), 72.36(C-19), 41.84(C-20), 26.39(C-21), 38.30(C-22), 179.74(C-23), 13.13(C-24), 17.17(C-25), 17.09(C-26), 24.53(C-27), 176.60(C-28), 26.69(C-29), 16.38(C-30), 95.53(C-1'), 73.75(C-2'), 78.64(C-3'), 71.00(C-4'), 78.90(C-5'), 62.10(C-6')。以上数据与文献一致^[4]。

苦莓苷 F₁(niga-ichigosides F₁): C₃₆H₅₈O₁₁, 白色针状结晶(MeOH), mp 229~231 °C(分解), 易溶于吡啶, 可溶于甲醇、乙醇和水。L-B 试验和 Molish 试验均呈阳性。ESI-MS (*m/z*): 689(M+Na)⁺。IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3 427, 2 930, 1 728, 1 630, 1 460, 1 071。¹H-NMR (C₅D₅N) δ : 0.94, 1.09, 1.24, 1.28, 1.63 (各 3H, s, 5 × CH₃), 0.92 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, CH₃CH), 2.38 (1H, s, H-18), 4.20~4.54 (6H, H-2', 3', 4', 5', 6'), 5.30 (1H, brs, H-12), 6.30 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-1')。 ¹³C-NMR (C₅D₅N₅) δ : 48.02(C-1),

69.02(C-2), 78.76(C-3), 43.67(C-4), 48.36(C-5), 18.92(C-6), 33.37(C-7), 40.84(C-8), 48.02(C-9), 38.57(C-10), 24.32(C-11), 127.18(C-12), 138.38(C-13), 42.35(C-14), 30.05(C-15), 26.30(C-16), 48.78(C-17), 54.56(C-18), 72.86(C-19), 42.22(C-20), 26.84(C-21), 37.79(C-22), 67.21(C-23), 14.29(C-24), 17.61(C-25), 17.71(C-26), 24.66(C-27), 175.71(C-28), 27.16(C-29), 16.74(C-30), 94.25(C-1'), 74.19(C-2'), 79.02(C-3'), 71.59(C-4'), 79.15(C-5'), 62.68(C-6')。以上数据与文献一致^[5]。

4 讨论

4.1 流动相比例和体流量的确定: 根据分析色谱流动相的组成来调节制备色谱流动相的组成。适当增加流动相中水的比例, 可提高色谱峰的分度, 但水量过多, 制备时间过长。综合考虑流动相比例和体流量的关系, 本实验选择流动相甲醇-水(40:60), 体流量 6.0 mL/min, 整个制备分离在 30 min 内完成。

4.2 被分离物质的收集: 在制备型分离工作中, 需使用大量的洗脱溶剂, 因此要采用适当的收集器。如有可能, 应将溶剂回收后再使用。在使用反相或聚合物吸附剂进行分离时, 有时从含水量大的溶液中回收样品较困难。如以甲醇-水为洗脱液, 可将收集的流份用甲醇稀释 5 倍, 然后减压旋转蒸干, 用甲醇将纯化合物溶解出来。另一方法是将收集的样品加到 Sephadex LH-20 柱上, 以水洗除 HPLC 洗脱液中含有的其他成分, 而后用甲醇将纯化合物洗下。

4.3 边缘切割和循环色谱分离: 由于甜茶苷 R₁ 和苦莓苷 F₁ 色谱峰相距很近, 色谱系统的选择性不足以将该混合物分开, 因此采用循环色谱分离。方法是在确定最佳分析型分离条件后进行制备型色谱分离, 通过切割相应色谱峰的前部和后部可获得纯甜茶苷 R₁ 和苦莓苷 F₁。利用此法, 对两者的混和物(循环组份)重新进行分离, 进一步获得了纯品。如果一次循环分离还未将两者部分完全分开, 则可重复进行循环色谱分离。

4.4 单体纯度测定: 由于至今国内尚无茅莓皂苷类成分的法定对照品, 本次实验采用制备型高效液相色谱分离出甜茶苷 R₁ 和苦莓苷 F₁, 经 HPLC 归一化法检测 2 个单体纯度均达到 98.0% 以上, 符合要求。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia

- Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.
- [2] Wang X R, Du A Q, Wang H P. Studies on the chemical constituents of *Rubus parvifolius* L. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1994, 19(8): 486-487.
- [3] Du S H, Rao J H. Study on purification process of total saponins of *Rubus parvifolius* L. with macroreticular resin [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25(3): 185-188.
- [4] Feng G, Feng H C, Tanaka T, et al. 19 α -Hydroxyursane-type triterpene glucosyl esters from the roots *Rubus suavissimus* S. Lee [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33: 37-40.
- [5] Takashi S, Takashi T, Osamu T, et al. β -Glucosyl esters of 19 α -hydroxyursolic acid derivatives in leaves of *Rubus* species [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(12): 2829-2834.

青蛇藤的化学成分研究(II)

郭红丽, 周金云*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

青蛇藤 *Periploca calophylla* (Wight) Falc. 是萝藦科(Asclepiadaceae)杠柳属植物。杠柳属植物全世界约有 12 种, 在我国有 4 种, 主要分布在西南地区。青蛇藤具有祛风散寒、活血化瘀之功效, 四川藏民用来泡酒, 预防及治疗风湿性关节炎。青蛇藤根茎的乙醇提取物及醋酸乙酯、正丁醇萃取部位显示较好的抗炎及抗肿瘤活性。前文^[1]报道了青蛇藤醋酸乙酯萃取部分 9 个化合物的分离和结构鉴定, 本文继续报道从中分离得到的另外 7 个化合物, 通过理化常数、光谱数据分析及化学方法鉴定了结构, 分别为: glycoside E (I), cleomiscosin A (II), 芥子酸(sinapic acid, III), 香草醛(vanillin, IV), 水杨酸(salicylic acid, V), (6'-O-palmitoyl)-sitosterol-3-O- β -D-glucoside (VI), 正三十醇(1-triacontanol, VII)。所有化合物均为首次从青蛇藤中分离得到。

1 仪器、试剂与材料

熔点用 XT₄-100 \times 显微熔点仪测定; 旋光用 Perkin-Elmer 241 型旋光仪测定; 质谱用 ZAB-2F 型质谱仪测定; 核磁共振用 Mercury 300 型和 INOVA-500 型核磁共振仪测定; 色谱及重结晶用溶剂均为分析纯; 色谱用硅胶(200~300 目)均为青岛海洋化工厂生产; Sephadex LH-20 (Pharmacia 进口) 为上海化学试剂厂分装生产; RA 型大孔树脂为北京化工七厂生产。青蛇藤根茎采自四川凉山金沙江边, 由本所宋万志研究员鉴定。

2 提取分离

青蛇藤根茎 24 kg, 粉碎, 95% 乙醇回流提取 3 次, 得棕黑色浸膏 2.5 kg, 适量水溶解后依次用石

油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得萃取物 400、200、540 g。醋酸乙酯萃取物 170 g 经大孔树脂以不同体积分数的醇洗脱, 分别得 30%、50%、80%、95% 醇洗脱物 8.9、40.1、52.5、30 g。50% 醇洗脱物经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 分离纯化得化合物 I~V, 95% 醇洗脱物经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇梯度洗脱得化合物 VI、VII。

3 结构鉴定

化合物 I: 无色针状结晶(CH₂Cl₂-MeOH), mp 239~240 °C, Xanthohydrol 和 Keller-Kiliani 反应均呈阳性。FAB-MS (m/z): 465 [M+H]⁺, 447 [M+H-H₂O]⁺, 316 [M-can]⁺, 299, 288, 185, 131, 113, 91。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 0.73 (3H, s), 1.01 (3H, s), 1.31 (3H, d, $J=6.5$ Hz), 1.34 (3H, d, $J=6.5$ Hz), 3.11 (1H, t, $J=9.0$ Hz, can-4), 3.29 (1H, dq, $J=9.0, 6.0$ Hz, can-5), 3.51-3.61 (2H, m, H-3, can-3), 3.75 (1H, q, $J=6.5$ Hz, H-20), 4.62 (1H, dd, $J=9.5, 1.5$ Hz, can-1), 5.35 (1H, m, H-6)。¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 125 MHz) δ : 14.5 (C-18), 18.4 (C-21), 19.8 (C-19), 21.3 (C-11), 24.2 (C-15), 31.8 (C-7), 32.5 (C-12), 32.8 (C-2), 32.8 (C-8), 37.3 (C-10), 38.3 (C-1), 38.0 (C-16), 43.4 (C-4), 46.1 (C-13), 51.0 (C-9), 51.9 (C-14), 72.2 (C-3), 82.6 (C-20), 85.7 (C-17), 121.6 (C-6), 142.3 (C-5), 102.1 (can-1), 40.7 (can-2), 72.6 (can-3), 78.5 (can-4), 71.7 (can-5), 17.8 (can-

收稿日期: 2004-05-16

基金项目: 北京市重点科技项目(9550214900)

作者简介: 郭红丽(1975-), 女, 吉林省通化市人, 中国医学科学院药物研究所 2000 级硕士。

* 通讯作者 Tel: (010)63165229 E-mail: jinyunzhou@imm.ac.cn