

黄精中三萜皂苷的提取分离与结构鉴定

徐德平¹, 孙婧², 齐斌¹, 崔斌¹, 王珍¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 广东化工制药职业技术学院, 广东 广州 510520)

黄精 *Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute 为百合科黄精属多年生草本植物, 以根茎入药。《中国药典》收录滇黄精、黄精和多花黄精 3 种植物为黄精的“原生药”。药理研究表明: 黄精具有降低血糖、血脂的功效, 在保护心血管、增强免疫系统功能、延缓衰老、抗炎、抗病毒、抗真菌及解毒等方面具有较好的活性^[1,2]。黄精的化学成分主要有皂苷和多糖, 另含有少量的蒽醌、生物碱等化合物。《中国药典》2000 年版收录黄精的两种皂苷成分: 呋喃甾烷类皂苷(黄精皂苷 A, *sibiricosides A*)和螺旋甾烷类皂苷(黄精皂苷 B, *sibiricosides B*)^[1]。中国科学院昆明植物研究所对点花黄精、滇黄精成分进行的研究表明: 黄精中的皂苷, 主要以薯蓣皂苷元为主, 并发现 4 种新的甾体皂苷^[3~7]。

在对黄精的化学成分的研究中发现除甾体皂苷外, 还含有多种三萜类皂苷, 本研究着重报道 2 个乌苏酸型和 4 个齐墩果烷型三萜皂苷的分离与鉴定。经 ¹H-NMR、¹³C-NMR、¹³⁵DEPT、HMQC、HMBC、TOCSY 测定分析, 鉴定出 6 个化合物分别为 2 β , 3 β , (OH)₂-(28 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(6 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(4 $\rightarrow$ 1)鼠李糖-乌苏酸(积雪草苷, I)、3 β (OH)-(3 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(4 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(4 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-齐墩果烷(II)、2 β , 3 β , 6 β , (OH)₃-(28 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(6 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(4 $\rightarrow$ 1)鼠李糖-乌苏酸(羟基积雪草苷, III)、3 β (OH)-(3 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(2 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-齐墩果酸(IV)、3 β (OH)-(3 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(4 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(28 $\rightarrow$ 1)阿拉伯糖-(2 $\rightarrow$ 1)阿拉伯糖-齐墩果酸(V)、3 β , 30 β (OH)₂-(3 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(2 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-齐墩果烷(VI)。化合物 I、III、V 在黄精中为首次报道。

1 实验材料

1.1 材料: 黄精 *P. sibiricum* Delar ex Redoute 购于西安药材市场。无水乙醇、丙酮、硫酸、茴香醛、冰醋酸、甲醇、石油醚(30~60℃)、正丁醇皆为 AR 级, 上海化学试剂采购供应站出品, 其他试剂皆为分析纯。GF₂₅₄ 硅胶板由山东烟台芝罘化工厂生产。AB-8 大孔吸附树脂由南开大学化工厂生产,

Sephadex LH-20、ODS 柱填料为进口分装。

1.2 仪器: WFJ 8-20 中药粉碎机, 江阴市灵杏药化设备有限公司; Buker Avance 500 MHz 核磁共振仪, 中国科学院上海有机化学研究所。

2 实验方法

2.1 黄精皂苷的提取: 称取 25 kg 黄精, 用粉碎机粉碎成粉末状, 过 20 目, 用 70% 乙醇(料液比 1:7)室温浸渍, 然后滤出液体, 重复 3 次, 滤液合并, 减压蒸馏至无乙醇为止, 将乙醇提取物用石油醚萃取脱脂, 直至石油醚层无色为止。将脱脂后的物质用 3 倍体积的醋酸乙酯萃取, 反复多次, 直到醋酸乙酯相无色为止。将醋酸乙酯提取后的剩余物用水饱和和正丁醇提取多次, 直到正丁醇相无色时止。合并正丁醇相, 回收正丁醇, 得正丁醇提取物。

2.2 正丁醇提取物的粗分: 将正丁醇提取物加适量水稀释后过 AB-8 大孔吸附树脂柱(1500 mm $\times$ 80 mm), 调节色谱柱体积流量约 20 mL/min, 依次用去离子水、不同体积分数乙醇梯度洗脱, 500 mL 收集一次, 共收集 60 瓶, 经 TLC 鉴定, R_f 相同的洗脱液合并, 分别标记 A 部分(1~13 瓶), B 部分(14~26 瓶), C 部分(27~38 瓶), D 部分(39~44 瓶), E 部分(45~60 瓶), 各部分单独收集浓缩。

2.3 黄精皂苷的分离: 将 C 和 D 部分加适量的水稀释, 上 Sephadex LH-20 柱(600 mm $\times$ 60 mm), 上样体积流量 20 mL/min, 上样结束后加入 1500 mL 去离子洗脱, 再分别用不同浓度的乙醇梯度洗脱, 每梯度洗脱 500 mL, 洗脱体积流量 1.0 mL/min, 20 mL 收集一管, 经 TLC 鉴定和硫酸茴香醛显色, 将 R_f 值和显色相同的洗脱液合并, 共得 A~F 6 个组分。

将 6 个组分浓缩至一定体积后再分别反复上 ODS 柱(450 mm $\times$ 30 mm), 分别用体积分数 30%~60% 乙醇梯度洗脱, 每梯度洗脱 300 mL, 洗脱体积流量 1.0 mL/min, 20 mL 收集一管, 经 TLC 鉴定纯度。共得 6 个纯化合物 I~VI。

2.4 结构鉴定: 将所得 6 个化合物用氘代吡啶

(pyridine- d_5) 溶解后进行 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^{135}\text{Dept}$ 、HMQC、HMBC、TOCSY 测定分析。

3 结果与分析

化合物 I: 白色无定形粉末, 可溶解于甲醇、乙醇。在 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中, 可见 3 个糖的端基 H (δ 6.27, $J=8.1$ Hz; δ 5.09, $J=8.8$ Hz; δ 5.92), 从 J 值来看其中 2 个糖以 β -糖苷键相连, 另一个可能为 α -连接。有 5 个单峰甲基, δ 分别为 1.23, 1.20, 1.16, 1.15, 0.94。还有 2 个双峰甲基, δ 分别为 1.98, 0.99。 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表 1, 该化合物共有 48 个碳, 其中有 1 个羰基, 2 个双键碳, 3 个糖的端基碳和 7 个甲基碳, 初步认定为 1 个三萜类皂苷物质。从双键的化学位移值 (δ 138.6, 126.2) 和羰基来看应为乌苏酸类皂苷, 3 个糖的端基碳中有一个化学位移值为 95.8, 说明有糖酯键的存在, 表明糖连接在乌苏酸的羰基上。从 $^{135}\text{DEPT}$ 可见 δ 69.6 有一个 CH_2 的碳信号, 证明糖上有 1 $\rightarrow$ 6 糖苷键的形成。 δ 66.7 有一个 CH_2 的碳信号, 应为 CH_3 被羟基取代而形成。在 δ 小于 50 的母环区有 8 个 CH_2 的碳信号, 而乌苏酸型皂苷应有 9 个 CH_2 的碳信号, 说明有 CH_2 被羟基取代成 CH-OH 。 δ 18.7, 33.3, 24.0 的 CH_2 碳信号分别为 C-6, C-7, C-11 的信号, δ 30.9, 37.0 的 CH_2 碳信号分别为 C-21, C-22 的信号, δ 28.9, 24.7 的 CH_2 碳信号分别为 C-15, C-16 的信号, C-16 的碳信号向高场移动约 2, 是由于羧基的存在而造成。 δ 48.2 的 CH_2 碳信号应为 C-1 或 C-2 的信号, 若 C-1 被羟基取代, C-2 的 δ 应在 40 左右, 若 C-2 被羟基取代, C-1 的 δ 应在 48 左右, 说明羟基取代在 C-2 处, 这一点从 HMBC 也可进一步证明, δ 48.2 的碳与 C-25 甲基 H (δ 1.20) 相关, 表明 δ 48.2 的碳信号应为 C-1。 δ 53.4 的 CH 碳信号应为 C-18 的信号, 那么 C-5 的 δ 为 48.3, 说明 C-5 的 γ -位有羟基存在而导致信号向高场移动, 也表明 C-23 的甲基被羟基取代而形成一个 CH_2 的碳信号。关于糖的连接方式, 端基为 δ 95.8 的糖与羧基相连, 这一点从 HMBC 可以证明, δ 176.4 的碳与 δ 95.8 糖的端基 H (δ 6.27, $J=8.1$ Hz) 相关, δ 105.1 的端基 H (δ 5.09, $J=8.8$ Hz) 与 δ 69.7 的碳相关, 说明端基 δ 105.1 的糖连接在端基为 δ 95.8 的糖的 C-6 上, δ 102.8 的端基 H (δ 5.92) 与 δ 78.9 的碳相关, 说明端基 δ 102.8 的糖连接在端基为 δ 105.1 的糖的 C-4 上。糖上的碳信号归属以 HMQC、HMBC、TOCSY 谱为依据。综合以上数据, 化合物 I 为 2β , 3β , $(\text{OH})_2$ -(28 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(6 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(4 $\rightarrow$ 1)鼠

李糖-乌苏酸, 经文献检索确定化合物为积雪草苷, 与相关文献报道一致^[6~8]。该化合物在黄精中为首次报道。

化合物 II: 白色无定形粉末, 可溶解于甲醇、乙醇。从 $^1\text{H-NMR}$ 可知: 该化合物有 1 个双键 H, 2 个糖上端基质子, 除糖区外, 其余 H 的 $\delta < 3$, 共有 8 个甲基, 表明该化合物为三萜类皂苷类化合物。由 $^{13}\text{C-NMR}$ 可见: 该化合物有 2 个糖的端基碳信号, 2 个双键碳, 从双键碳的化学位移 δ 145.0, 122.5 可判断, 该化合物为齐墩果烷型皂苷。通过以上分析并参照文献, 确定化合物 II 的结构为 $3\beta(\text{OH})$ -(3 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(4 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-齐墩果烷^[6~8]。

化合物 III: 白色无定形粉末, 可溶解于甲醇、乙醇。在 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中, 可见 3 个糖的端基 H (δ 6.23, $J=8.1$ Hz)、(δ 5.04, $J=8.8$ Hz)、(δ 5.91), 从 J 值来看其中二个糖以 β -糖苷键相连, 另一个可能为 α -连接。有 5 个单峰甲基, δ 分别为 1.88, 1.81, 1.79, 1.19, 0.95。还有 2 个双峰甲基, δ 分别为 1.77, 1.02。 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表 1, 该化合物共有 48 个碳, 其中有 1 个羰基, 2 个双键碳, 3 个糖的端基碳和 7 个甲基碳, 初步认定为一个三萜类皂苷物质。在 δ 小于 50 的母环区有 7 个 CH_2 的碳信号, 而乌苏酸型皂苷应有 9 个 CH_2 的碳信号, 说明有二个 CH_2 被羟基取代成 CH-OH 。与化合物 I 相比 δ 18.7 的 CH_2 碳信号没有了 (这一信号为 C-6 信号), 说明 C-6 或 C-7 被羟基取代, 若 C-6 被羟基取代, C-7 的 δ 应在 40 左右, 若 C-7 被羟基取代, C-6 的 δ 应在 28 左右, 在 δ 41.5 处有一个 CH_2 碳信号, 说明羟基取代在 C-6 处。综合以上数据, 化合物 III 为 2β , 3β , 6β , $(\text{OH})_3$ -(28 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(6 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-(4 $\rightarrow$ 1)鼠李糖-乌苏酸。经文献检索确定化合物 III 为羟基积雪草苷, 与相关文献报道基本一致^[6~8]。该化合物在黄精中为首次报道。

化合物 IV: 白色无定形粉末, 可溶于甲醇、乙醇。从 $^1\text{H-NMR}$ 可知: 该化合物有 1 个双键 H, 7 个 CH_3 , 除糖信号外, 其余大部分信号 $\delta < 3$ 。表明该化合物为三萜皂苷类化合物。从 $^{13}\text{C-NMR}$ 可见: 该化合物有 2 个双键碳, δ 144.9, 124.8 和 176.4 的信号表明该化合物为齐墩果酸皂苷类化合物。有 2 个糖上端基碳, δ 93.7 处的信号表明糖连在 C-3 位, 从碳的信号判断, 2 个糖为 glc, 且一个 glc 连在另一个的 C-2 位上, 根据 HMBC 可见端基为 104.2 的糖连在另一个 glc 的 C-2 位上。通过以上分析参照文献确定化合物 IV 的结构式为 $3\beta(\text{OH})$ -(3 $\rightarrow$ 1)葡萄糖-

表 1 化合物 I、Ⅱ和 V 的¹³C-NMR 化学位移
Table 1 ¹³C-NMR Chemical shift of compounds
I, II, and V

碳位	I	Ⅱ	V	碳位	I	Ⅱ	V
1	48.2	50.7	38.8	Sugar I	glucose	glucose	glucose
2	75.5	75.5	26.9	C1	95.8	95.9	108.7
3	78.4	78.5	90.8	C2	73.9	73.9	75.9
4	42.7	43.3	39.4	C3	78.1	78.0	85.1
5	48.3	48.9	56.3	C4	71.2	71.3	71.1
6	18.7	67.8	18.8	C5	78.4	78.5	75.5
7	33.3	41.5	33.0	C6	69.6	69.7	63.7
8	42.7	44.7	40.3	Sugar I'	glucose	glucose	glucose
9	48.1	48.8	47.9	C1	105.1	105.1	106.9
10	38.5	39.8	37.0	C2	74.1	74.1	72.9
11	24.0	24.2	24.3	C3	77.3	77.3	78.3
12	126.2	126.6	122.8	C4	78.9	78.7	69.6
13	138.6	138.0	144.4	C5	76.7	76.7	77.3
14	43.8	39.8	42.0	C6	61.7	61.5	62.9
15	28.9	28.9	28.0	Sugar I''	rhamnose	rhamnose	arabinose
16	24.7	24.9	26.8	C1	102.8	102.9	93.0
17	48.2	48.6	47.1	C2	70.4	70.5	78.3
18	53.4	53.5	44.6	C3	72.7	72.7	73.5
19	39.5	39.6	47.4	C4	72.9	72.9	69.5
20	39.2	39.3	31.2	C5	69.1	69.2	67.3
21	30.9	31.0	38.8	C6	18.6	18.7	
22	37.0	37.0	39.0	Sugar I'''			arabinose
23	66.7	67.7	37.0	C1			105.4
24	14.5	16.1	16.9	C2			71.3
25	17.9	19.5	15.9	C3			73.8
26	17.8	19.1	21.5	C4			71.1
27	23.9	23.9	23.0	C5			67.6
28	176.4	176.6	177.0				
29	17.5	17.5	31.7				
30	21.4	21.4	23.3				

(2→1)葡萄糖-齐墩果酸^[6~8]。

化合物 V：白色无定形粉末，可溶解于甲醇、乙醇。从¹H-NMR 可知：该化合物有 1 个双键 H，4 个糖上端基质子和 7 个 CH₃，除糖信号外，其余大部分氢信号 δ<3，表明该化合物为三萜皂苷类化合物。在¹³C-NMR 可见：除糖信号外，母环上有 30 个碳和 7 个甲基，δ 177.0 为羰基，δ 144.4 和 122.8 的信号表明该化合物为齐墩果酸型皂苷类化合物。利用 TOCSY、HMQC、HMBC 可得，4 个糖分别为 2 个 glc 和 2 个 Ara，其中端基 δ 93.0 的 Ara 与-COO 相连，另一个 Ara 连在其 C-2 位上，母环中 δ 90.8 的

信号表明其母环 C-3 位成苷，端基 108.7 的 glc 连在其上，另一个 glc 连在端基 δ 108.7 的 C-3 位上。各信号的化学位移值及归属见表 1。化合物 V 的结构为 3β(OH)-(3→1)葡萄糖-(4→1)葡萄糖-(28→1)阿拉伯糖-(2→1)阿拉伯糖-齐墩果酸，经文献检索，该化合物在黄精中首次报道。

化合物 VI：从¹H-NMR 可知，该化合物有 1 个双键 H，7 个 CH₃，除糖信号外，其余大部分信号 δ<3，表明该化合物为三萜皂苷类化合物。在¹³C-NMR 可见：该化合物有 2 个双键碳，δ 144.9 和 124.8 的信号表明该化合物为齐墩果酸型皂苷类化合物。从¹³⁵DEPT 谱可得，在 δ 62.0, 62.9, 64.9 处为-CH₂，而仅有 2 个 glc，因此判断 64.9 处的信号为-CH₂-OH，根据信号归属于 C-30 位的-CH₂-OH。有 2 个糖上端基碳，从碳的信号判断，2 个糖为 glc，根据 HMBC 可见端基为 104.2 的糖连在另一个 glc 的 C-2 位上，93.0 处的信号表明母环上 C-3 位成苷键。通过以上分析并参照文献，确定化合物 VI 的结构 3β, 30β(OH)₂-(3→1)葡萄糖-(2→1)葡萄糖-齐墩果酸^[6~8]。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Chen H B, Feng R Z, Guo Y. Toxicity studies of *Rhizoma Polygonati odorati* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 74: 221-224.
- [3] Kun H S, Jae C H, Sam S K. Steroidal saponins from the rhizomes of *Polygonatum sibiricu* [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53 (2): 333.
- [4] Li X C, Yang C R, Ichikawa M, et al. Steroidal saponins from *Polygonatum kingianum* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31 (10): 3559.
- [5] Li X C, Yang C R, Matsura H, et al. Steroidal glycosides from *Polygonatum prattii* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 33 (2): 465.
- [6] Ono M, Shoyama K, Nohara T. The constituents of Chinese *Polygonati officinalis* rhizoma and *Polygonati rhizoma* [J]. *Shoyakugaku Zasshi*, 1988, 42(2): 135.
- [7] Ono M, Shoyama K, Nohara T. The constituents of Chinese *Polygonati officinalis* rhizoma and *Polygonati rhizoma* [J]. *Shoyakugaku Zasshi*, 1988, 42(2): 135.
- [8] Boiteau P, Batsimamanga A R. Asiaticoside extracted from *Centella asiatica*, Its therapeutic uses in the healing of experimental refractory wounds, leprosy, shin tuberculosis and lupus [J]. *Therapie*, 1950, 11: 125-149.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本，包括：1974-1975 年、1976 年、1979 年、1985-1994 年(80 元/年)、1995-1997 年(110 元/年)、1998 年(120 元/年)、1999 年(135 元/年)、2000 年(180 元/年)、2001-2003 年(200 元/年)、2004 年(220 元/年)。1996 年增刊(50 元)、1997 年增刊(45 元)、1998 年增刊(55 元)、1999 年增刊(70 元)、2000 年增刊(70 元)、2001 年增刊(70 元)、2002 年增刊(65 元)、2003 年增刊(65 元)、2004 年增刊(65 元)、2005 年增刊(65 元)。欢迎订购。订阅者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话：(022) 27474913 23006821

传真：(022) 23006821

E-mail: zcyzjb@tjipr.com