

(8H, overlap, $4 \times -\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NO}_2$), 4.81 (8H, overlapped, $4 \times -\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NO}_2$)。氢谱与文献报道^[5]比较, 鉴定化合物V为2,3,4,6-四-氧-(3-硝基丙酰基)- α -D-葡萄糖吡喃糖。

化合物VI: 白色针晶(丙酮), 与同属植物苏木蓝根^[3]中获得的化合物 coronarian 理化性质相似, 共薄层色谱时其显色行为和Rf值均一致, 故鉴定为 coronarian, 即2,6-二-氧-(3-硝基丙酰基)- α -D-葡萄糖吡喃糖。

化合物VII: 白色针晶(丙酮), 与同属植物苏木蓝根中获得的化合物 corollin^[3]理化性质相似, 共薄层色谱时其显色行为和Rf值均一致, 故鉴定为 corollin, 即2,3,6-三-氧-(3-硝基丙酰基)- α -D-葡萄糖吡喃糖。

化合物VIII: 白色长针状结晶(氯仿), 与同属植物苏木蓝根中获得的化合物3-硝基丙酸^[3]理化性质相似, 共薄层色谱时Rf值一致, 用溴酚蓝乙醇溶液显色均呈亮黄色, 故鉴定为3-硝基丙酸。

化合物IX和X: 白色颗粒状固体(甲醇), $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 5.34 (br s, H-6), 5.21 (dd, $J=15.0, 8.5$ Hz, 烯氢), 5.07 (d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.58 (dd, $J=12.0, 2.0$ Hz, H-6'a), 4.43 (dd, $J=12.0, 5.0$ Hz, H-6'b), 3.93~4.33 (H-3及葡萄糖上其他质子)。其溶解性、薄层色谱显色行为、Rf值和氢谱数据与同属植物苏木蓝根中获得的豆甾醇-3-氧-葡萄糖苷和胡萝卜苷混合物^[3]均一致, 故鉴定为豆甾醇-3-氧-葡萄糖苷与胡萝卜苷约1:2的混合物。

化合物XI: 白色晶体(丙酮), 与同属植物苏木蓝根中获得的 β -谷甾醇对照品共薄层色谱, 其显色行为和Rf值均一致, 故鉴定为 β -谷甾醇。

化合物XII: 白色针晶, 与同属植物苏木蓝根中

获得的羽扇豆醇共薄层色谱时, 其显色行为和Rf值均一致^[3], 故鉴定为羽扇豆醇。

化合物XIII: 白色半透明状固体(丙酮), 与同属植物苏木蓝根中获得的白桦脂酸共薄层色谱时, 其显色行为和Rf值均一致^[3], 故鉴定为白桦脂酸。

4 讨论

花木蓝根中含有大量的3-硝基丙酮、3-硝基丙酸乙酯以及corollin, cibarian, coronarian, 6-氧-丙烯酰基-2,3-二-氧-(3-硝基丙酰基)- α -D-葡萄糖吡喃糖、2,3,4,6-四-氧-(3-硝基丙酰基)- α -D-葡萄糖吡喃糖等3-硝基丙酰基葡萄糖类化合物, 该类化合物在人或动物的胃中极易水解生成3-硝基丙酸, 从而导致人和动物中毒^[3,4]。因此, 花木蓝根中含有大量3-硝基丙酸及其葡萄糖酯类化合物可能是引起毒性的主要成分。另外, 对花木蓝茎和叶的化学研究表明, 其地上部分虽然也含有此类化合物, 但量很低^[5], 提示3-硝基丙酸以及3-硝基丙酰基葡萄糖类化合物主要集中在花木蓝的根中。

参考文献:

- [1] 方云亿, 郑朝宗. 国产木蓝属的系统研究 [J]. 植物分类学报, 1989, 27(3): 161-177.
- [2] 徐国钧, 徐璐珊. 常用中药材品种整理和质量研究 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994.
- [3] 苏艳芳, 张新鑫, 杨静, 等. 苏木蓝化学成分的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(6): 608-611.
- [4] Su Y F, Li C Z, Gao Y, et al. Acryloylated glucose 3-nitropropanoates from *Indigofera kirilowii* [J]. J Nat Prod, 2005, 68(12): 1785-1786.
- [5] 苏艳芳, 杨媛, 范伟, 等. 花木蓝茎和叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1775-1777.
- [6] Pfeffer P E, Valentine K M. Assessment of ^{13}C -shift parameters in di- and tri-*O*-(3-nitropropanoyl)-*D*-glucopyranoses [J]. Carbohydr Res, 1979, 73(1): 1-8.
- [7] Rehman A, Malik A, Riaz N, et al. Lipoxigenase inhibiting flavonoids from *Indigofera tetrantha* [J]. Heterocycles, 2004, 63(2): 359-366.

循环制备 HPLC 分离纯化朝鲜白头翁中三萜皂苷

关颖丽^{1,2}, 尹虹¹, 刘建宇¹, 许永男^{1*}

(1. 沈阳药科大学 SK Chemicals 药物研究室, 辽宁 沈阳 110016; 2. 通化师范学院 制药与食品科学系, 吉林 通化 134002)

摘要: 目的 研究分离纯化朝鲜白头翁中三萜皂苷的新方法。方法 利用溶剂提取法、柱色谱法及循环制备 HPLC 进行分离纯化。结果 从朝鲜白头翁中分离得到4个化合物, 分别鉴定为: 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) [β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-

收稿日期: 2008-04-16

作者简介: 关颖丽(1974-), 女, 吉林通化人, 讲师, 硕士, 主要从事生药有效成分的分离鉴定及生物活性研究。

Tel: (0435)3209377 E-mail: guanyingli7151@126.com

* 通讯作者 许永男 Tel: (024)23986445 E-mail: ynxucn@yahoo.com.cn

glucopyranosyl (1→6)- β -D-glucopyranoside (I), cernuosides A (I), cernuosides B (II), oleanolic acid 28-O- α -L-rhamnopyranosyl (1→4)- β -D-glucopyranosyl (1→6)- β -D-glucopyranoside (N)。结论 化合物N为首次从该属植物中分离得到,此外循环制备HPLC可作为天然产物、合成医药研究的有效手段。

关键词:朝鲜白头翁;三萜皂苷;循环制备HPLC

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1628-04

朝鲜白头翁 *Pulsatilla cernua* (Thunb.) Bercht. et Opiz 为毛茛科白头翁属植物,主要分布于我国吉林、辽宁、黑龙江等地区,具有清热解毒、凉血止痢的功效^[1]。主要含三萜皂苷类成分^[2,3],具有很强的生物活性。本实验利用循环制备HPLC对朝鲜白头翁化学成分进行系统地分离^[4],从中分离得到4个化合物,经波谱鉴定分别为:3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1→2) [β -D-glucopyranosyl (1→4)]- α -L-arabinopyranosyl hederagenin 28-O- α -L-rhamnopyranosyl (1→4)- β -D-glucopyranosyl (1→6)- β -D-glucopyranoside (I)、朝鲜白头翁苷A (cernuoside A, I)、朝鲜白头翁苷B (cernuoside B, II)、oleanolic acid 28-O- α -L-rhamnopyranosyl (1→4)- β -D-glucopyranosyl (1→6)- β -D-glucopyranoside (N)。其中化合物N为首次从该属植物中分离得到。

1 仪器与材料

LC-9103型循环制备高效液相色谱仪(日本分析工业株式会社),UV-3702B型检测器,RI-7型检测器,MultiChro 2000色谱工作站,Bruker AV-600核磁共振仪(瑞士Bruker公司),Waters Quattro micro API三重四极杆串联质谱仪(ESI源)(美国Waters公司)。

朝鲜白头翁 *P. cernua* (Thunb.) Bercht. et Opiz 采自辽宁省抚顺清原地区,由沈阳药科大学孙启时教授鉴定。D-101型大孔吸附树脂(天津制药厂),薄层色谱用硅胶G和柱色谱用硅胶(200~300目)(青岛海洋化工厂),所用试剂为分析纯或色谱纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备:取朝鲜白头翁干燥根350 g,用50%乙醇回流提取3次,每次4 h,合并滤液,浓缩,水混悬后依次用石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇萃取。取正丁醇萃取物经D-101大孔吸附树脂,以乙醇-水梯度洗脱,将所得的50%乙醇洗脱液经硅胶柱色谱分离,以氯仿-甲醇-水梯度洗脱,分别取流份(100:30:4)、(100:60:10),利用循环制备HPLC分离。

2.2 色谱条件:色谱柱为JAIGEL ODS AP L柱

(500 mm×20 mm,15 μ m),JAIGEL GS310柱(500 mm×21.5 mm);流动相:乙腈-甲醇(3:2),甲醇-正己烷(5:3);体积流量:5 mL/min;柱温:室温;检测波长:210 nm;进样量:6 mL。

2.3 色谱分离:以流份(100:60:10)样品为例,利用循环制备HPLC分离。将其溶于流动相乙腈-甲醇(3:2),ODS色谱柱分离,分别为UV检测器及RI检测器检测峰信号(图1)。样品首次通过色谱柱时检测到4个峰信号,保留时间为50~85 min。经条件摸索,在保留时间为50 min时启动仪器的循环系统,不收集组分,这样可以把前面的杂质峰除去,只保留样品峰,从而单独使样品在整个系统中循环一次,相当于样品两次通过色谱柱,进行两次分离。在保留时间为100 min时,根据峰信号开始收集各组分。

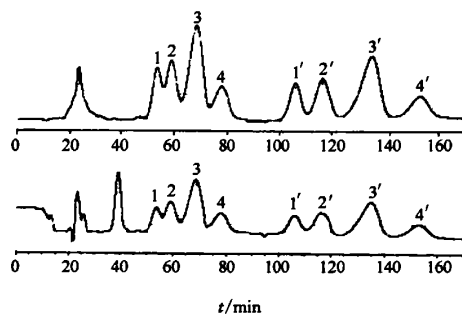


图1 样品的循环制备HPLC谱图

Fig. 1 Recycling preparative HPLC of sample

以所收集的组分 signal 2' 为例,再次利用循环制备HPLC分离。将其浓缩后溶于流动相乙腈-甲醇(3:2),GS色谱柱分离(图2)。UV检测器只检测出1个主峰,而通用型RI检测器出现明显的2个峰。经条件摸索,在保留时间为20 min时启动仪器的循环系统,设置样品在整个系统中循环两次后,样品进行3次分离。再依据RI检测器的峰信号收集主峰,则 signal 2' 即得化合物I。同样方法从 signal 1' 和 signal 3' 分别得到化合物I和II。

同样利用此法从流份(100:30:4)中分离得到化合物N。

2.4 结构鉴定

化合物I:白色粉末(甲醇),Liebermann-Burchard反应和Molish反应均为阳性。ESI-MS

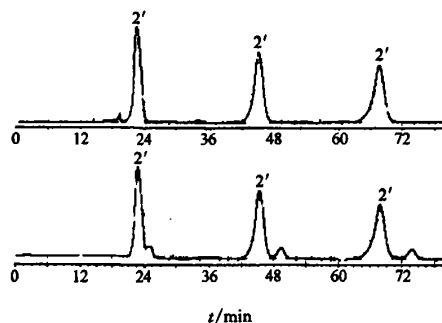


图2 Signal 2'的循环制备HPLC谱图

Fig. 2 Recycling preparative HPLC of Signal 2'

m/z : 1 382.1 $[M-H]^-$, 1 405.9 $[M+Na]^+$, 与分子式 $C_{65}H_{106}O_{31}$ 一致。其 1H -NMR 及 ^{13}C -NMR 数据 (表 1) 与文献对照^[5,6]一致, 据此推断化合物 I 为 3-O- α -

L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) [β -*D*-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- α -*L*-arabinopyranosyl hederagenin 28-O- α -*L*-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- β -*D*-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -*D*-glucopyranoside。

化合物 I: 白色粉末 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均为阳性。ESI-MS m/z : 1 527.8 $[M-H]^-$, 1 552.5 $[M+Na]^+$, 与分子式 $C_{71}H_{116}O_{35}$ 一致。其 1H -NMR 及 ^{13}C -NMR 数据 (表 1) 与文献对照^[7]一致, 据此推断化合物 I 为 cernuosides A。

化合物 II: 白色粉末 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均为阳性。ESI-MS m/z : 1 544.1 $[M-H]^-$, 1 569.0 $[M+Na]^+$, 与分子式 $C_{71}H_{116}O_{36}$ 一致。其 1H -NMR 及 ^{13}C -NMR 数据 (表

表1 化合物 I~IV 的碳谱数据 (600 MHz, C_6D_6N , δ)

Table 1 ^{13}C -NMR Data of compounds I-IV (600 MHz, C_6D_6N , δ)

C 位	I	II	III	IV	C 位	I	II	III	IV
1	39.1	39.0	39.0	39.0	glc	1	106.8	105.1	105.1
2	26.1	26.8	26.4	28.1		2	75.5	74.7	75.1
3	81.0	88.7	81.8	78.8		3	78.9	78.6	78.5
4	43.5	39.7	43.6	39.4		4	71.2	71.6	71.5
5	48.2	56.0	47.6	55.8		5	78.8	78.3	78.2
6	18.1	18.6	18.5	18.9		6	62.5	62.5	62.4
7	32.6	33.1	32.7	33.1	rha	1	101.7	101.6	101.6
8	39.9	40.0	39.9	39.9		2	72.5	71.8	71.9
9	47.8	48.2	48.2	48.1		3	72.6	83.4	83.5
10	36.9	37.1	36.9	37.4	4	74.2	72.8	73.1	
11	23.9	23.8	23.9	23.7	5	69.7	69.8	69.9	
12	123.0	122.9	122.9	122.9	6	18.6	18.6	18.6	
13	144.1	144.2	144.1	144.8	glc"	1		106.8	106.8
14	42.2	42.2	42.1	42.2		2		75.5	75.5
15	28.3	28.3	28.3	28.3		3		76.6	76.8
16	23.4	23.4	23.4	23.4		4		69.5	69.7
17	47.0	47.1	47.0	47.4		5		76.8	76.8
18	41.7	41.7	41.6	41.7		6		61.9	61.8
19	46.2	46.3	46.2	46.3	C-28 glc'	1	95.7	95.7	95.7
20	30.8	30.9	30.8	30.8		2	73.9	74.1	73.9
21	34.0	34.1	34.0	34.0		3	78.6	78.8	78.8
22	32.8	32.6	32.5	32.5		4	70.9	70.8	70.8
23	63.9	28.4	64.0	28.8		5	78.1	78.1	78.1
24	14.1	17.3	14.3	16.6		6	69.2	69.2	69.2
25	16.2	15.8	16.2	15.7	glc"	1	104.9	104.9	104.9
26	17.6	17.6	17.5	17.6		2	75.2	74.9	74.8
27	26.3	26.2	26.1	26.1		3	76.3	76.8	76.5
28	176.6	176.7	176.5	176.6		4	78.2	78.3	78.2
29	33.1	33.2	33.1	33.3		5	77.2	77.2	77.2
30	23.7	23.9	23.7	23.8		6	61.3	61.3	61.3
C-3 ara	1	104.4	105.4	104.9	rha'	1	102.8	102.8	102.8
	2	76.5	75.4	75.4		2	72.3	72.6	72.6
	3	75.4	74.0	75.4		3	72.8	73.0	72.8
	4	80.5	81.2	81.1		4	74.1	74.0	74.1
	5	65.9	65.9	66.6		5	70.3	70.4	70.3
	6					6	18.7	18.6	18.6

1)与文献对照^[7]一致,据此推断化合物Ⅲ为 cernuosides B。

化合物Ⅳ:白色粉末(甲醇),Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均为阳性。ESI-MS m/z : 925.8 $[M-H]^-$, 949.7 $[M+Na]^+$, 与分子式 $C_{48}H_{78}O_{17}$ 一致。其 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 0.89, 0.90, 0.94, 1.03, 1.12, 1.22, 1.23 (7 $\times$ 3H, s, -CH₃), 5.43 (1H, brs, H-12), 1.69 (3H, d, $J=6.2$ Hz, -CH₃ of rha), 6.23 (1H, d, $J=8.0$ Hz, glc'-1-H), 4.98 (1H, d, $J=7.8$ Hz, glc''-1-H), 5.83 (1H, brs, rha'-1-H)。 ^{13}C -NMR (600 MHz, C_5D_5N) 数据 (表1)与文献对照^[8]一致,据此推断化合物Ⅳ为 oleanolic acid 28-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside, 为首次从该属植物中分离得到。

3 讨论

从以上实验结果可以看出,当样品第一次通过色谱柱时,各组分之间的峰有所重叠,4个组分化学结构极为相似,各峰之间未达到基线分离,分离度较低。而采用循环系统,通过设置程序,可以使样品进行多次循环,反复经过色谱柱进行分离,最终的分离

结果是每次分离效果的累加。具有分辨率高、检验方便、收集产物准确、质量分数高等优点。这样在一般的高效液相色谱上很难或不能分离的样品可以利用循环功能,达到满意的分离效果,因此循环制备 HPLC 可成为天然产物、合成医药研究的有效手段。

致谢:沈阳药科大学孙启时教授在本课题的药材鉴定中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [2] Bang S C, Kim Y, Lee J H, et al. Triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla koreana* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(2): 268-272.
- [3] 张庆文, 叶文才, 车镇涛, 等. 朝鲜白头翁的三萜皂苷成分研究 [J]. *药学学报*, 2000, 35(10): 756-759.
- [4] 许永男, 关颖丽, 刘建宇, 等. 朝鲜白头翁的化学成分研究 [A]. 第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集 [C]. 南昌: 中国药学会, 2007.
- [5] Glebko K N P, Strigina L I, et al. Triterpene glycosides from *Pulsatilla chinensis* [J]. *Russ Chem Bull*, 2002, 51(10): 1945-1950.
- [6] 石宝骏, 李 茜, 张晓琦, 等. 中药白头翁地上部分的三萜皂苷成分 [J]. *药学学报*, 2007, 42(8): 862-866.
- [7] Zhang Q W, Ye W C, Yan X Z, et al. Cernuosides A and B, two sucrose inhibitors from *Pulsatilla cernua* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(2): 276-278.
- [8] 张庆文, 叶文才, 车镇涛, 等. 安徽银莲花的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2001, 26(9): 612-614.

苦参方有效部位成分分析及配伍机制研究

彭 程, 胡晋红*, 朱全刚, 刘继勇, 章 卓, 高丽红, 王 晶

(第二军医大学长海医院 药学部, 上海 200433)

摘 要:目的 对苦参方有效部位成分进行定性定量分析, 研究方剂配伍对有效成分的影响。方法 采用 LC-MS、GC-MS 联用技术确定苦参方的有效成分; 采用 HPLC 色谱法对苦参方生物碱进行定量分析, 考察方剂配伍后的成分变化。结果 苦参方挥发油中的主要成分有薄荷酮、薄荷醇等, 苦参方所含苦参生物碱主要有苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱; 苦参方的方剂配伍后有效成分发生了转化, 氧化苦参碱部分转化成苦参碱, 氧化槐果碱部位转化为槐果碱, 挥发油在配伍后成分及量也有所变化。结论 确定了苦参方的有效成分及各成分的量, 明确了该方剂配伍后的成分改变。

关键词:苦参方; 苦参; 荆芥; 苦参碱; 氧化苦参碱; 槐果碱; 氧化槐果碱; 配伍

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)11-1631-05

苦参方由苦参、荆芥组成, 始见于《太平惠民和剂局方》, 为治疗疥癣、湿疹和皮肤瘙痒的有效方剂。苦参中苦参生物碱和荆芥中荆芥挥发油均具有良好的调节免疫和抗过敏作用^[1,2]。但长期以来, 该方剂

有效部位成分及量未能明确。本研究采用多种分析手段, 确定了该方剂有效部位的具体成分及量, 并证实了方剂中挥发油和生物碱在苦参与荆芥配伍后发生了成分的改变和转化, 使这一中药传统方剂的含

收稿日期: 2007-12-08

基金项目: 上海市科委中药现代化重大专项基金 (04DZ19846); 上海市卫生局科研课题基金 (054099); 上海市科委基础研究重点项目 (05JC14046)

作者简介: 彭 程 (1971-), 女, 主管药师, 在读博士, 从事临床药学工作。

* 通讯作者 胡晋红

Tel: (021) 25070674 E-mail: topengcheng@126.com