

王不留行中王不留行黄酮苷的分离与鉴定

孟 贺, 陈玉平, 秦文杰*, 叶祖光*

中药复方新药开发国家工程研究中心 北京中研同仁堂医药研发有限公司, 北京 100079

摘 要: 目的 分离鉴定王不留行药材中的特征成分。方法 利用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱进行分离, 通过理化常数、核磁共振、变温核磁共振和质谱等多种技术鉴定化合物。结果 分离得到一个化合物, 鉴定为王不留行黄酮苷。结论 王不留行黄酮苷在王不留行中的量较高, 可以作为王不留行及其炮制品质量控制的指标性成分; 首次报道了王不留行黄酮苷的¹³C-NMR 数据及其旋转异构现象。

关键词: 王不留行; 王不留行黄酮苷; ¹³C-NMR 数据; 旋转异构体; 指标性成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0874-03

Isolation and identification of vaccarin from *Vaccariae Semen*

MENG He, CHEN Yu-ping, QIN Wen-jie, YE Zu-guang

National Engineering Research Center for R & D of TCM Multi-ingredient Drugs, Beijing Zhongyan Tongrentang Chinese Medicine R & D Co., Ltd., Beijing 100079, China

Key words: *Vaccariae Semen*; vaccarin; ¹³C-NMR data; rotamers; index component

王不留行为石竹科植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的干燥成熟种子。具有活血通经、下乳消肿等功效, 用于乳汁不下、经闭、痛经、乳痈肿痛等^[1]。文献报道王不留行中主要含有三萜皂苷、黄酮苷、环肽、类脂和脂肪酸、单糖等成分^[2-3]。为了建立其质量标准, 本课题组对其进行了化学成分的研究, 从中分离并鉴定了王不留行黄酮苷。采用核磁共振技术研究表明, 王不留行黄酮苷在常温下存在旋转异构现象, 当温度升高时该现象减弱甚至消失; 并首次报道了王不留行黄酮苷的¹³C-NMR 数据。

1 材料与试剂

VNS—600M 核磁共振仪 (美国 Inova 公司), QTRAP LC-MS-MS SYSTEM 型质谱仪 (美国 Applied Biosystem 公司), 柱色谱用硅胶和薄层硅胶板 (青岛海洋化工厂), 聚酰胺薄膜 (浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂), Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司)。

王不留行药材购自北京同仁堂药店, 经中国药品生物制品检定所标本馆馆长张继鉴定为石竹科植

物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的干燥成熟种子, 为《中国药典》2010 版收载的正品王不留行。

2 提取分离

药材粗粉 2 kg, 用 8 倍量 70%乙醇加热回流 2 次, 每次 2 h, 合并提取液。减压浓缩得 70%乙醇提取物, 待挥至无醇味后, 混悬于水中, 依次用醋酸乙酯和正丁醇萃取, 分别回收溶剂后得醋酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物。

取正丁醇萃取物, 进行硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇-水 (13:7:1) 等度洗脱, 接收液经 TLC 检识后合并为 Fr. 1、2、3。TLC 检识 Fr. 2 以黄酮为主。将 Fr. 2 进行反复硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇、80%甲醇-水洗脱), 接收液经聚酰胺薄膜检识后合并, 得王不留行黄酮苷 (vaccarin)。

3 结构鉴定

本品为淡黄色颗粒状结晶。易溶于甲醇、甲醇-水、乙醇、乙醇-水等, 难溶于氯仿、醋酸乙酯、石油醚等。与 AlCl₃ 试剂作用显示亮黄色荧光, Mg-HCl 反应和 Molish 反应均呈阳性, 提示为黄酮苷。ESI-

收稿日期: 2010-06-12

基金项目: 国家药典委员会课题, 《中国药典》2010 版一部标准研究 (YD-158, 159)

*通讯作者 秦文杰 Tel: (010)87632624 E-mail: zzwenjiejie@yahoo.com.cn

叶祖光 Tel: (010)87632601 E-mail: yezuguang@sina.com

MS 给出正准分子离子峰 $727.6 [M+H]^+$, 负准分子离子峰 $725.7 [M-H]^-$, 推断相对分子质量为 726, 结合核磁共振氢谱和碳谱, 推测分子式为 $C_{32}H_{38}O_{19}$, 应为黄酮三糖苷。ESI-MS⁺ 还给出了 $565.6 [M-162+H]^+$ 和 $433.6 [M-162-132+H]^+$ 的峰, 分别为脱去 1 个六碳糖、进而再脱去 1 个五碳糖的离子峰, 说明分子中存在 2 个六碳糖和 1 个五碳糖。薄层酸水解检测到葡萄糖和阿拉伯糖。

常温 (25℃) 下, ¹H-NMR 图谱中 8 位 H (δ 6.89) 裂分为 d 峰, 2'、6' 位 H (δ 7.91) 裂分为 dd 峰; 升温至 80℃ 时, 8 位 H 变为宽单峰, 2'、6' 位 H 变为 d 峰。将 25℃ 和 80℃ 下的 ¹H-NMR 图谱结合分析, 给出 6 个芳氢信号, δ 6.77 (1H, s, 3-H), δ 6.89 (1H, s, 8-H), δ 6.94 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, 3', 5'-H), δ 7.91 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, 2', 6'-H), 提示黄酮母核的 5、6、7、4' 位有取代; 以及 3 个端基氢信号, δ 4.12 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.88 (1H, d, *J* = 9.6 Hz) 和 5.01 (1H, d, *J* = 6.6 Hz)。

常温 (25℃) 下, ¹³C-NMR 图谱中出现多组成对出现且高度不等的信号, δ 182.3 和 182.0, δ 164.1 和 163.9, δ 156.6 和 156.3, δ 110.2 和 109.8 以及 δ 93.9 和 93.6。升温至 60、80、100℃ 时, 成对出现的信号中较矮的信号逐渐减弱甚至消失, 推测该化合物在常温时存在 2 种比较稳定的旋转异构体, 升高至一定温度时这种旋转异构现象消失。将各温度下的 ¹³C-NMR 图谱结合分析, 给出 32 个碳信号, 其中 15 个为黄酮母核的碳信号, 余下 17 个碳信号: δ 104.8、100.8、80.8、80.8、78.1、77.2、75.9、73.7、72.1、71.3、70.8、69.8、69.5、66.7、64.2、60.9、60.4 为糖碳信号。与异肥皂草苷的碳谱数据^[4]对照, 多出一组五碳糖信号, 即为阿拉伯糖的信号; 黄酮母核的碳信号没有明显变化, 因此推断阿拉伯糖连接在葡萄糖上而不是黄酮母核上, 同时 C-葡萄糖的 C-2'' 的信号向低场位移了 8 个单位, 由此推断碳苷葡萄糖的 2'' 位被取代。由此确定该化合物为王不留行黄酮苷 (vaccarin): 5,7,4'-三羟基-6-C-α-L-阿拉伯糖 (1→2) β-D-葡萄糖-4'-β-D-葡萄糖苷 (图 1)。其核磁数据归属见表 1。

4 讨论

文献报道^[5], 黄酮 5-OH、7-OCH₃、6-C-单糖苷和黄酮 5-OH、7-OCH₃、6-C-1,2 连接双糖苷存在旋转异构现象, 而黄酮 5-OH、7-OH、6-C-单糖苷或者黄酮 5-OH、7-OH、6-C-1,2 连接双糖苷则不存在

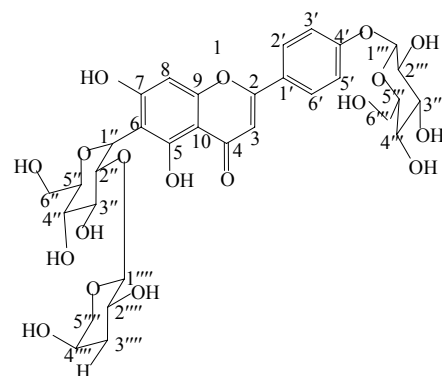


图 1 王不留行黄酮苷的结构

Fig. 1 Structure of vaccarin

表 1 王不留行黄酮苷的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据 (DMSO-*d*₆)

Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of vaccarin (in DMSO-*d*₆)

编号	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
2	—	162.5
3	6.77 (1H, s)	103.0
4	—	181.8
5	—	159.6
6	—	109.8
7	—	164.0
8	6.89 (1H, s)	93.5
9	—	156.4
10	—	104.5
1'	—	120.8
2'	7.91 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	128.3
3'	6.94 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	115.9
4'	—	161.3
5'	6.94 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	115.9
6'	7.91 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	128.3
1''	4.88 (1H, d, <i>J</i> = 9.6 Hz)	73.7
2''	3.10~4.80*	80.9
3''	3.10~4.80*	78.1
4''	3.10~4.80*	71.3
5''	3.10~4.80*	80.9
6''	3.10~4.80*	60.4
1'''	5.01 (1H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	100.8
2'''	3.10~4.80*	72.1
3'''	3.10~4.80*	77.2
4'''	3.10~4.80*	70.8
5'''	3.10~4.80*	75.9
6'''	3.10~4.80*	60.9
1''''	4.12 (1H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz)	104.8
2''''	3.10~4.80*	66.7
3''''	3.10~4.80*	69.5
4''''	3.10~4.80*	69.8
5''''	3.10~4.80*	64.2

*-信号重叠; --无信号

*- overlap signal; -- no signal

旋转异构现象, 因此旋转异构现象存在的主要原因为 7-OCH₃ 的空间位阻作用阻碍了碳苷键的自由旋转。此外, 还有文献报道吡喃碳苷也存在旋转异构现象^[6], 发现吡喃 1-OH、3-OH、2-C-1,2 连接的双糖苷存在旋转异构现象, 而吡喃 1-OH、3-OH、2-C-单糖苷或者吡喃 1-OH、3-OH、2-C-1,6 连接双糖苷不存在旋转异构现象, 因此笔者认为 C-2 位糖链的长度以及糖之间的连接位置将影响吡喃碳苷旋转异构现象的存在与否。本课题组分离得到的王不留行黄酮苷为黄酮 5-OH、7-OH、6-C-1,2 连接双糖苷, 也存在旋转异构现象。分析认为王不留行黄酮苷母核上 5 和 7 位均为羟基取代, 并且 6 位所连糖链为 1,2 位连接的双糖, 4'位羟基与葡萄糖成氧苷, 这些空间位阻作用使得碳苷键在常温时不能自由旋转, 出现两种比较稳定的旋转异构体。升高温度, 克服了旋转异构体自由旋转的阻力, 碳苷键得以自由旋转, 在核磁共振图谱上出现一组信号。

黄酮 5-OH、7-OH、6-C-1,2 连接双糖苷的旋转异构现象, 为首次报道, 丰富了存在旋转异构现象

的化合物种类, 为进一步研究旋转异构现象的规律提供了依据。

致谢: 中国医学科学院药物研究所分析测试中心代测 NMR、ESI-MS 谱, 中国药品生物制品检定所标本馆馆长张继老师帮助鉴定药材。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [2] 李 帆, 梁敬钰. 王不留行的研究进展 [J]. 海峡药学, 2007, 19(3): 1-5.
- [3] 桑圣民, 劳爱娜, 王洪诚, 等. 中药王不留行化学成分的研究 (II) [J]. 中草药, 2000, 31(3): 169-171.
- [4] Delazar A, Gibbons S, Kosari A, *et al.* Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis* [J]. *DARU*, 2006, 14(3): 109-114.
- [5] Cheng G, Bai Y J, Zhao Y Y. *et al.* Flavonoids from *Ziziphus jujube* Mill var. *spinosa* [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(45): 8915-8920.
- [6] Jiang Y, Zhang W, Tu P F, *et al.* Xanthone glycosides from *Polygala tenuifolia* and their conformational analyses [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68: 875-879.

版权合作声明

中国药学会于 2009 年与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社签订数字出版独家合作协议, 在协议期间, 中国药学会主办的 19 本科技期刊(包括天津中草药杂志社出版的 3 本期刊《中草药》、《现代药物与临床》、《药物评价研究》杂志)的网络版由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社(其出版和信息服务网站为“中国知网”)独家出版发行, 读者可登陆“中国知网”(www.cnki.net)查阅浏览全文。

天津中草药杂志社