

文章编号:1673-1689(2008)03-0033-04

黄精中乌苏酸型皂苷的分离与结构鉴定

王彩霞, 徐德平*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用乙醇提取方法,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,大孔树脂 AB-8 柱色谱及 ODS、MCI 柱色谱等方法从黄精中分离到 2 种乌苏酸型三萜皂苷,并通过核磁共振法鉴定结构为 $2\beta, 3\beta(\text{OH})_2-(28\rightarrow 1)\text{葡萄糖}-(6\rightarrow 1)\text{葡萄糖}-(4\rightarrow 1)\text{鼠李糖}-\text{乌苏酸}$ (积雪草苷)和 $2\beta, 3\beta, 6\beta(\text{OH})_3-(28\rightarrow 1)\text{葡萄糖}-(6\rightarrow 1)\text{葡萄糖}-(4\rightarrow 1)\text{鼠李糖}-\text{乌苏酸}$ (羟基积雪草苷)。

关键词: 黄精;乌苏酸型三萜皂苷;积雪草苷;羟基积雪草苷

中图分类号:Q 54

文献标识码: A

Isolation and Structure Determination of Ursane Type Saponin from *Rhizoma polygonati*

WANG Cai-xia, XU De-ping*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Two ursane type triterpene saponins were isolated from *Rhizoma polygonati* by means of solvent extraction, column chromatography on macroporous resin AB-8, ODS and MCI. Their structures were determined by means of NMR spectroscopic analyses. Their structures were elucidated as $2\beta, 3\beta(\text{OH})_2-(28\rightarrow 1)\text{Glucoside}-(6\rightarrow 1)\text{Glucoside}-(4\rightarrow 1)\text{Rhamnoside}-\text{ursanal}$ (asiaticoside) and $2\beta, 3\beta, 6\beta(\text{OH})_3-(28\rightarrow 1)\text{Glucoside}-(6\rightarrow 1)\text{Glucoside}-(4\rightarrow 1)\text{Rhamnoside}-\text{ursanal}$ (madecassoside).

Key words: *Rhizoma polygonati*; ursane type saponins; asiaticoside; madecassoside

黄精(*Rhizoma polygonati*),俗称土灵芝、太阳草、鸡头参,为百合科黄精属多年生草本植物,以根茎入药。《中华人民共和国药典》收录了滇黄精、黄精和多花黄精 3 种植物。在民间,同属其他一些植物根茎也被当作黄精使用^[1]。我国黄精属植物记载的有 42 种,其资源蕴藏量极为丰富^[2]。黄精中含有皂苷、多糖、生物碱等多种化合物^[3]。近年来,人们对黄精的研究逐渐增多,药理研究不断深入,

现已证明,黄精中的皂苷具有增加免疫功能、抗衰老、抗肿瘤、提高和改善记忆、降血糖、降血脂等作用,具有很好的开发与应用价值^[3-5]。

在对黄精的研究中发现,黄精还具有明显的抗菌作用,并且通过检测发现黄精中含有大量的乌苏酸型三萜皂苷。有关资料显示,积雪草苷具有良好的抗菌活性^[6],推测黄精的抗菌活性归结于积雪草苷的抗菌活性,因此有必要对黄精中积雪草苷进行

收稿日期:2007-05-03.

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2006BAD27B03).

作者简介:王彩霞(1982-),女,山西大同人,食品科学硕士研究生.

* 通讯作者:徐德平(1965-),男,安徽宣城人,工学博士,副教授,从事天然药食科学的研究. Email: xdp1219@sina.com

研究。在综合前人研究的基础上,对黄精中的乌苏酸型皂苷进行分离提取,得到两个乌苏酸型皂苷,并对其结构进行鉴定,确定其结构为积雪草苷和羟基积雪草苷。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

黄精购于西安药材市场,经鉴定确为黄精。

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;其它试剂皆为分析纯。

GF254 型硅胶板由山东烟台芝罘化工厂生产;大孔吸附树脂 AB-8 由南开大学化工厂生产;Sephadex LH-20、ODS、MCI 柱填料为进口分装。WFJ8-20 型中药粉碎机由江阴市灵杏药化设备有限公司生产;RE52CS 旋转蒸发器由上海亚荣生化仪器厂生产;循环水多用真空泵(SHB-III)由郑州长城科贸有限公司生产;Bruker Avance 500 MHz 核磁共振仪由中科院上海有机化学研究所研制。

1.2 黄精成分的提取

取黄精干燥根茎 20 kg 粉碎,过 20 目筛,用 7 倍量的体积分数为 70% 的乙醇回流提取,重复 3 次,合并提取液,减压浓缩得浸膏,加水混悬,用石油醚萃取脱除油及脂溶性色素,得到棕褐色浸膏,分散至水中,再用乙酸乙酯萃取,反复多次,直到乙酸乙酯相无色为止。分为乙酸乙酯相和水相。水相继续用正丁醇萃取多次,直至正丁醇相无色为止。浓缩正丁醇相,得正丁醇提取物。

1.3 黄精中皂苷的分离纯化

将正丁醇提取物加入适量去离子水,上 AB-8 大孔吸附树脂柱,体积流量为 20 mL/min,依次用去离子水,以及体积分数为 20%、30%、40%、50%、75%、95% 的乙醇洗脱,分步收集,薄层层析法(TLC)检测, R_f 相同的组分合并,分成 A、B、C、D、E 5 个部分。将 C 和 D 部分分别减压浓缩后上 Sephadex LH-20 柱,依次用去离子水和不同体积分数的乙醇梯度洗脱,分步收集,薄板检测,相近组分合并得两个部分。将这两个部分减压浓缩至一定体积后再用 ODS 柱和 MCI 柱反复纯化,共得两个化合物 I、II。

1.4 纯度鉴定

黄精正丁醇提取物经分离纯化后得到两个化合物,通过薄层层析法(TLC)进行纯度鉴定。采用 GF254 硅胶板,以正丁醇-水-冰醋酸(体积比 5:4:1)溶液体系为展开剂,显色剂为硫酸-茴香醛溶

液。

1.5 结构鉴定

将所得两个化合物用氘代吡啶(pyridine- d_5)溶解后在核磁共振仪上测氢谱(^1H -NMR)、全去偶碳谱(^{13}C -NMR)、不失真极化转移增强谱(DEPT-NMR)和二维 HMQC-NMR 谱, HMBC-NMR 谱和 TOCSY 谱,并以四甲基硅烷(TMS)为内标物。

2 结果与讨论

2.1 纯度鉴定

黄精提取物经分离纯化后得到两个化合物,经薄板检测均为单一斑点,见图 1,可判定这两个化合物为纯的化合物。



图 1 化合物 I、II 的薄层色谱图

Fig. 1 TLC of compound I and II

2.2 结构鉴定

2.2.1 化合物 I 白色无定形粉末,可溶解于甲醇、乙醇。

从该化合物的 ^1H -NMR 图谱可见,有 5 个单峰甲基, δ 分别为 1.25、1.20、1.16、1.14、0.95。2 个双峰甲基, δ 分别为 1.77(1H, $J = 4.5$)和 0.98(1H, $J = 4.3$),以及 1 个双键氢 δ 5.45,表明该化合物为一个三萜类化合物。还可见到 3 个糖的端基 H,分别为 δ 5.91(1H), δ 5.02(1H, $J = 7.6$), δ 4.62(1H, $J = 7.4$),表明该化合物含有 3 个糖基。从 J 值来看其中两个糖以 β -糖苷键相连,另一个可能为 α -连接。

从该化合物的 ^{13}C -NMR 图谱可见,该化合物共有 48 个碳,除 18 个糖上的碳信号外,母环上有 30 个碳,其中有 1 个羰基碳、2 个双键碳和 7 个甲基碳,由此可初步认定为一个三萜类皂苷物质。从双键的化学位移值(δ 138.7, 126.2)和羰基(δ 176.5)来看应为乌苏酸类皂苷。 δ 105.1 为一个葡萄糖的端基碳信号, δ 102.8 为一个鼠李糖的端基碳信号, δ 95.8 为一个葡萄糖的端基形成糖酯键碳信号,说明该糖形成糖酯,表明糖连接在乌苏酸的羰基上。

从¹³⁵DEPT 可见, δ 69.6 有一个 CH₂ 的碳信号, 证明糖上有 1 $\rightarrow$ 6 糖苷键的形成。 δ 66.7 有一个 CH₂ 的碳信号, 应为 CH₃ 被羟基取代而形成。 δ 61.5 有一个 CH₂ 的碳信号, 应为糖上 C-6 信号。在 δ 小于 50 的母环区有 8 个 CH₂ 的碳信号, 而乌苏酸型皂苷应有 9 个 CH₂ 的碳信号, 说明有 CH₂ 被羟基取代成 CH-OH。 δ 19.5、33.3、24.0 的 CH₂ 碳信号分别为 C-6、C-7、C-11 的信号, δ 31.0、37.0 的 CH₂ 碳信号分别为 C-21、C-22 的信号, δ 28.9、24.8 的 CH₂ 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, 是由于羧基形成糖苷键造成的。 δ 48.2 的 CH₂ 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 48.5, 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 CH₂ 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 176.5 的碳与 δ 95.8 糖的端基 H(δ 4.62, $J = 7.4$) 相关; δ 105.1 糖的端基 H(δ 5.02, $J = 7.6$) 与 δ 69.6 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 5.91) 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。

各碳的化学位移值及归属见表 1。

综上所述上述化合物 I 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。经文献检索确定化合物 I 为积雪草苷, 与相关文献^[7,8]报道一致。该化合物在黄精中为首次报导。

表 1 化合物 I、II 的¹³C-NMR 化学位移

Tab. 1 ¹³C NMR chemical shift assignments of compound I and II (pyridine-d₅)

C 位	I	II	C 位	I	II
1	48.2	50.7	27	23.9	24.0
2	75.5	75.5	28	176.5	176.6
3	78.4	78.5	29	17.5	17.6
4	42.7	43.4	30	21.4	21.5
5	48.5	48.9	糖 1	葡萄糖	葡萄糖
6	19.5	67.8	C1	95.8	96.0
7	33.3	41.5	C2	74.0	74.0

续表 1

C 位	I	II	C 位	I	II
8	44.9	44.7	C3	78.1	78.1
9	48.1	48.9	C4	71.2	71.3
10	38.5	38.3	C5	78.4	78.6
11	24.0	24.2	C6	69.6	69.7
12	126.2	126.7	糖 2	葡萄糖	葡萄糖
13	138.7	138.1	C1	105.1	105.1
14	43.8	39.9	C2	74.1	74.2
15	28.9	29.0	C3	77.3	77.3
16	24.8	25.0	C4	78.9	78.7
17	48.3	48.7	C5	76.7	76.7
18	53.4	53.6	C6	61.5	61.6
19	39.5	39.7	糖 3	鼠李糖	鼠李糖
20	39.3	39.4	C1	102.8	102.9
21	31.0	31.1	C2	70.5	70.5
22	37.0	37.1	C3	72.7	72.7
23	66.7	66.4	C4	72.9	73.0
24	14.5	16.2	C5	69.1	69.3
25	18.0	19.5	C6	18.6	18.7
26	17.8	19.3			

2.2.2 化合物 II 白色无定形粉末, 可溶解于甲醇、乙醇。

从该化合物的¹H-NMR 图谱中, 可见有 5 个单峰甲基, δ 分别为 1.89、1.81、1.79、1.19、0.96 和 2 个双峰甲基。分别为 δ 1.77(1H, $J = 6.1$) 和 δ 1.02(1H, $J = 6.2$), 以及 1 个双键氢 δ 5.04, 表明该化合物为一个三萜类化合物。还可见 3 个糖的端基 H, 分别为 δ 5.91(1H), δ 5.02(1H, $J = 7.6$), δ 4.62(1H, $J = 7.4$), 表明该化合物含有 3 个糖基, 从 J 值来看其中两个糖以 β -糖苷键相连, 另一个可能为 α -连接。

从该化合物的¹³C-NMR 图谱可见, 该化合物共有 48 个碳, 除 18 个糖上碳信号外, 母环上有 30 个碳, 其中有 1 个羰基碳、2 个双键碳和 7 个甲基碳, 由此可初步认定为一个三萜类皂苷物质。从双键的化学位移值(δ 138.1, 126.7)和羰基(δ 176.6)来看, 这个化合物应为乌苏酸型皂苷。 δ 105.1 为一个葡萄糖的端基碳信号, δ 102.9 为一个鼠李糖的端基碳信号, δ 96.0 为一个葡萄糖的端基形成糖酯键碳信号, 说明该糖形成糖酯, 表明糖连接在乌苏酸的羰基上。

从¹³⁵DEPT 图谱可见, 在 δ 小于 50 的母环区有 7 个 CH₂ 的碳信号, 而乌苏酸型皂苷应有 9 个 CH₂ 的碳信号, 说明有 2 个 CH₂ 被羟基取代成 CH-OH。 δ 69.7 有一个 CH₂ 的碳信号, 证明糖上有 1 $\rightarrow$

6糖苷键的形成。 δ 66.4有一个 CH_2 的碳信号,应为 CH_3 被羟基取代而形成。 δ 61.6有一个 CH_2 的碳信号,应为糖上C-6信号。在 δ 41.5处有一个 CH_2 碳信号,而在 δ 19.0左右本应有一个 CH_2 碳信号却没有了, δ 41.5为C-7信号,表明C-7向低场移动,说明有羟基取代在C-6处。

通过对图谱的分析可知,两个化合物的母环结构和糖的连接顺序基本相同,化合物II仅在母环C-6位上多了一个羟基,对于其他部位结构的分析可参照化合物I。

各碳的化学位移值及归属见表1。

综上所述上述化合物II为 $2\beta, 3\beta, 6\beta(\text{OH})_3$ -(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II为羟基积雪草苷,与相关文献^[7,8]报道基本一致。该化合物在黄精中为首次报导。

3 结 语

采用乙醇提取后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,大孔树脂柱色谱及ODS、MCI柱色谱等方法,从黄精中分离得到两种乌苏酸型三萜皂苷。

通过核磁共振法对图谱数据进行分析,并与文献标准对照,鉴定其结构分别为积雪草苷和羟基积雪草苷,在黄精中为首次发现。它们的结构见图2。

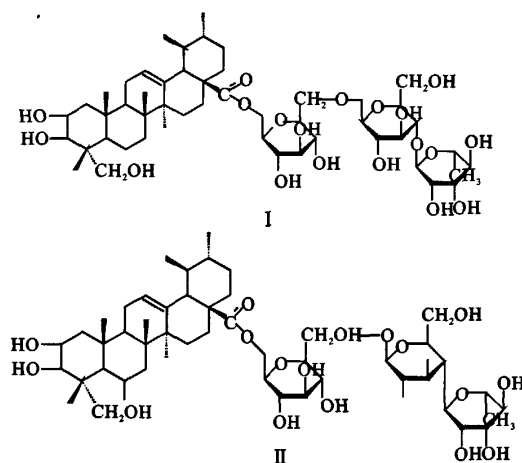


图2 化合物I、II的结构式

Fig. 2 Chemical structure of compound I and II

这两种乌苏酸型三萜皂苷的分离纯化及结构鉴定,为今后进一步研究黄精的抗菌作用奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 64—252.
- [2] 丁永辉, 赵汝能. 西北地区黄精属药用植物的调查[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(4): 202—204.
DING Yong-hui, ZHAO Ru-neng. An investigation of medicinal polygonatum in northwest China[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1991, 16(4): 202—204. (in Chinese)
- [3] 庞玉新, 赵致, 袁媛. 黄精的化学成分及药理作用[J]. 山地农业生物学报, 2003, 22(6): 547—550.
PANG Yu-xin, ZHAO Zhi, YUAN Yuan. The advances of chemical compositions and pharmacology effect on polygonatum [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2003, 22(6): 547—550. (in Chinese)
- [4] 王冬梅, 朱玮, 张存莉. 黄精化学成分及其生物活性[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(2): 142—145.
WANG Dong-mei, ZHU Wei, ZHANG Cun-li. Research advances in chemical constituents and biological activity of ploygonatum sibiricum[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006, 21(2): 142—145. (in Chinese)
- [5] 陈兴荣, 王成军, 李龙星. 滇黄精的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(9): 560—561.
CHEN Xing-rong, WANG Cheng-jun, LI Long-xing. The study advances of pharmacology and chemical compositions on polygonatum. kingianum[J]. *Lishizhen Medicine and Materiamedica Research*, 2002, 13(9): 560—561. (in Chinese)
- [6] 张胜华, 余兰香, 甄瑞贤. 积雪草苷的抗菌作用及对小鼠实验性泌尿系统感染的治疗作用[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(20): 1746—1749.
ZHANG Sheng-hua, YU Lan-xiang, ZHEN Rui-xian. Suppression of bacterial urinary infection in mice with asiaticoside [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2006, 15(20): 1746—1749. (in Chinese)
- [7] Ono M, Shoyama K, Nohara T. The constituents of Chinese polyfonati 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, skin tuberculosis and lupus[J]. *Therapic*, 1950, 11, 125—149.

(责任编辑: 杨 萌)