

免疫复方的酚酸类成分研究

许枬^{1*}, 曹跃¹, 周翎², 谢雪¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2. 大连海港医院, 辽宁 大连 116101)

[摘要] 目的: 对免疫复方的化学成分进行系统研究。方法: 利用大孔吸附树脂色谱、硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和中低压制备色谱等手段进行分离, 依据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构。结果: 从免疫复方的大孔吸附树脂 90% 乙醇洗脱部分得 10 个化合物, 分别鉴定为咖啡酸乙酯(1)、芹菜素(2)、丹酚酸 A 甲酯(3)、丹酚酸 N(4)、迷迭香酸(5)、丹酚酸 A(6)、紫草酸 B 甲酯(7)、丹酚酸 B(8)、没食子酰芍药苷(9)、丁二酸(10)。结论: 以上化合物均为首次从免疫复方中分得, 其中化合物 1~7 来源于丹参, 化合物 8 来源于牡丹皮, 化合物 9 和 10 来源于老头草。

[关键词] 免疫复方; 化学成分; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)23-0085-04

Studies on Chemical Constituents of Immunity Composite Decoction

XU Nan^{1*}, CAO Yue¹, ZHOU Ling², XIE Xue¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Dalian Harbor Hospital, Dalian 116101, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of immunity composite decoction. **Method:** The constituents were separated and purified by column chromatography on microporous resin, silica gel, RP-silica gel and sephadex LH20. Their structures were elucidated on the basis of spectra data. **Result:** Ten compound were isolated and identified as ethyl caffeate(1), pelargidenon(2), methyl salvianolate A(3), salvianolic acid N(4), rosmarinic acid(5), salvianolic acid A(6), methyl litospermate B(7), salvianolic acid B(8), galloylpaconiflorin(9), succinic acid(10). **Conclusion:** All of compounds were isolated from immunity composite decoction for the first time, among them compound 1-7 were from *Salvia miltiorrhiza*, compound 8 was from *Paeonia suffruticosa*, compound 9 and compound 10 were from *Leonto podium leonto podioid*.

[Key words] immunity composite decoction; chemical constituents; structure elucidation

免疫复方由黄芪、丹参、小蓟、白花蛇舌草、仙鹤草等 8 味药组成, 具有益气、化瘀、解毒的功效, 为临床经验方(辽宁中医药大学附属医院院内制剂), 治疗儿童紫癜性肾炎疗效较好, 愈显率达 82.5%^[1-3]。前期的药效学研究表明, 该方具有免疫调节的活

性^[1]。在深入研究其药效作用、作用途径和机制的同时, 为阐明其活性组分, 作者对其化学成分进行了系统研究。从免疫复方水煎液的大孔吸附树脂 90% 乙醇洗脱部分得 10 个化合物, 即咖啡酸乙酯(1)、芹菜素(2)、丹酚酸 A 甲酯(3)、丹酚酸 N(4)、迷迭香酸(5)、丹酚酸 A(6)、紫草酸 B 甲酯(7)、丹酚酸 B(8)、没食子酰芍药苷(9)、丁二酸(10)。

1 材料

日本岛津液相色谱仪, Agilent 1100 高效液相色谱-质谱联用色谱仪(1946D 型电喷雾四级杆质谱检测器), Bruker AV600 型核磁共振仪(TMS 为内标), 柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂), Sephadex

[收稿日期] 220110728(010)

[基金项目] 十一五“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX09103-394)

[通讯作者] * 许枬, 副教授, 博士, 研究方向: 中药有效成分及其活性, Tel: 0411-87586014, E-mail: xudanbs@163.com

LH-20(Pharmacia 公司)。

2 提取与分离

免疫复方水煎液正丁醇萃取后剩余的水层经大孔吸附树脂色谱,以水、30%乙醇、90%乙醇分别洗脱,大孔吸附树脂 90%乙醇洗脱部分经减压回收溶剂,得浸膏 350 g。取上述浸膏 300 g,湿法拌样,挥干溶剂后,加入湿法添装的硅胶柱上,以氯仿-甲醇梯度洗脱,以薄层色谱检查,合并相同斑点的洗脱部分,共得到 8 个流份。氯仿-甲醇(50:1)洗脱部分得流份 FrA,氯仿-甲醇(30:1)洗脱部分得流份 FrB,氯仿-甲醇(20:1)洗脱部分得流份 FrC,氯仿-甲醇(10:1)得流份 FrD,氯仿-甲醇(5:1)洗脱部分得流份 FrE,氯仿-甲醇(4:1)洗脱部分得流份 FrF,氯仿-甲醇(2:1)洗脱部分得流份 FrG,氯仿-甲醇(1:1)洗脱部分得流份 FrH。

流份 FrE 经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱,以氯仿-甲醇(1:1)洗脱,每 10 mL 收集 1 个流份,经薄层色谱检查,合并相同斑点的流份,得化合物 1~3;流份 FrG 利用 Sephadex LH-20 凝胶柱除去杂质后,经硅胶柱分离,以氯仿-甲醇(10:1)洗脱,薄层色谱中具有相同斑点的洗脱部分用 HPLC 制备,以甲醇-水(20:1)为流动相,收集保留时间不同的吸收峰,得到化合物 4~7;流份 FrH 经反复硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(1:1)洗脱,收集薄层色谱中具有相同斑点的洗脱部分,用 HPLC 制备,以甲醇-水(10:1)洗脱,收集不同保留时间的吸收峰,得化合物 8~10。

3 结构鉴定

化合物 1 无色粉末,三氯化铁显蓝色。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ: 7.15(1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 6.22(1H, d, J = 15.6 Hz, H-8), 7.03(1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.91(1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.77(1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz, H-6) δ: 4.18(2H, q, J = 7.0 Hz, -CH₂), 1.27(3H, t, J = 7.0 Hz, -CH₃)。 ¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ: 168.0(C-9), 148.1(C-4), 145.3(C-3, C-7), 126.4(C-1), 121.5(C-6), 115.1(C-8), 113.9(C-2), 113.8(C-5), 60.1(CH₂), 13.3(CH₃)。该化合物的光谱数据与文献[4]对照,基本一致,故鉴定该化合物为咖啡酸乙酯。

化合物 2 黄色粉末,盐酸-镁粉反应阳性。¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.9(1H, s, -OH), 7.92(2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.92(2H, d,

J = 8.4 Hz, H-3', 5') 6.48(1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.19(1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.77(1H, s, H-3)。 ¹³C-NMR(150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 182.2(C-4), 164.6(C-2), 164.2(C-5), 161.9(C-7), 161.6(C-4'), 157.8(C-9), 128.9(C-2', C-6'), 121.6(C-1'), 116.4(C-3', C-5'), 104.1(C-10), 103.3(C-3), 99.3(C-6), 94.4(C-8)。该化合物的光谱数据与文献[5]对照,基本一致,故鉴定该化合物为芹菜素。

化合物 3 淡黄色粉末,三氯化铁显蓝色。ESI-MS 给出 509 [M + H]⁺, 531 [M + Na]⁺ 的准分子离子峰。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ: 8.01(1H, d, J = 16.1 Hz, H-7), 7.08(1H, d, J = 16.2 Hz, H-8''), 6.23(1H, d, J = 16.1 Hz, H-8), 6.60(1H, d, J = 16.2 Hz, H-7''), 6.71(1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.44(1H, d, J = 7.8 Hz, H-6'), 5.11(1H, m, H-8') 2.93(1H, dd, J = 13.2, 3.3 Hz, H-7'), 2.90(1H, dd, J = 13.2, 8.8, H-7'), 6.71~7.08(6H, m) 3.63(3H, s, OCH₃)。 ¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ: 126.0(C-1), 128.5(C-2), 144.4(C-3), 148.3(C-4), 114.8(C-5), 120.3(C-6), 147.6(C-7), 115.2(C-8), 168.5(C-9), 128.7(C-1'), 117.4(C-2'), 146.2(C-3'), 145.3(C-4'), 116.3(C-5'), 121.9(C-6'), 38.0(C-7'), 74.5(C-8'), 172.3(C-9'), 131.2(C-1''), 114.0(C-2''), 146.5(C-3''), 146.8(C-4''), 116.4(C-5''), 120.4(C-6''), 137.8(C-7''), 120.7(C-8''), 52.7(OCH₃)。该化合物的光谱数据与文献[5]对照,基本一致,故鉴定该化合物为丹酚酸 A 甲酯。

化合物 4 黄色粉末,三氯化铁显蓝色,溴甲酚蓝显黄色(蓝色背景)。质谱给出 475 [M-H]⁻ 的准分子离子峰。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ: 5.13(1H, m), 2.99(2H, m), 7.88(1H, d, J = 15.3 Hz, H-7), 6.22(1H, d, J = 15.3 Hz, H-8), 7.28(1H, d, J = 15.3 Hz, H-8''), 6.42~6.87(10H, m); ¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ: 132.5(C-1), 124.8(C-2), 144.0(C-3), 152.2(C-4), 123.4(C-5), 132.8(C-6), 143.7(C-7), 168.2(C-9), 129.2(C-1'), 117.7(C-2'), 146.2(C-3'), 145.7(C-4'), 116.2(C-5'), 121.9(C-6'), 37.9(C-7'), 79.3(C-8'), 173.5(C-9'), 125.0(C-1''), 109.7(C-2''), 147.3(C-3''), 148.3(C-4''), 115.6(C-5''), 152.3(C-6''), 117.5(C-7''), 125.3(C-8'')。该化合物的光谱

数据与文献[5]对照,基本一致,故鉴定该化合物为丹酚酸 N。

化合物 5 无色粉末,三氯化铁显蓝色。质谱给出 $359 [M-H]^-$ 的准分子离子峰。 ^1H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.28 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8), 7.56 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7), 6.63 (1H, dd, $J=8.4, 1.5$ Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 6.98 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-2'), 7.06 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2), 6.72 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.99 (1H, dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, H-6), 5.21 (H, dd, $J=7.8, 4.8$ Hz, H-8'), 3.11 (1H, dd, $J=14.4, 7.8$ Hz, H-7'), 3.13 (1H, dd, $J=14.4, 4.8$ Hz, H-7'); $^{13}C-NMR$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 127.6 (C-1), 115.4 (C-2), 146.7 (C-3), 149.8 (C-4), 116.4 (C-5), 123.3 (C-6), 147.9 (C-7), 114.3 (C-8), 168.5 (C-9), 128.8 (C-1'), 117.7 (C-2'), 146.3 (C-3'), 145.4 (C-4'), 116.6 (C-5'), 121.9 (C-6'), 37.8 (C-7'), 74.6 (C-8'), 173.5 (C-9')。该化合物的光谱数据与文献[6]对照,基本一致,故鉴定该化合物为迷迭香酸。

化合物 6 该化合物为黄色粉末,有强荧光,溴甲酚蓝显黄色(蓝色背景),说明该化合物结构中有羧基。质谱给出 $495 [M+H]^+$, $517 [M+Na]^+$ 的准分子离子峰。 ^1H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.64 (1H, d, $J=16.2$ Hz, H-7), 6.71 (1H, d, $J=16.1$ Hz, H-7''), 6.21 (1H, d, $J=16.1$ Hz, H-8''), 5.98 (1H, d, $J=16.2$ Hz, H-8), 6.32 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5''), 6.22 (1H, br. d, $J=7.8$ Hz, H-5'), 6.25 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-6''), 6.30 (1H, s, H-2'), 6.63 (1H, s, H-2''), 6.73 (3H, m), 4.74 (1H, m, H-8'), 2.53 (2H, m, H-7'); $^{13}C-NMR$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 126.1 (C-1), 128.6 (C-2), 144.5 (C-3), 148.4 (C-4), 114.9 (C-5), 120.2 (C-6), 147.7 (C-7), 115.3 (C-8), 168.6 (C-9), 128.8 (C-1'), 117.4 (C-2'), 146.2 (C-3'), 145.4 (C-4'), 116.4 (C-5'), 122.0 (C-6'), 37.9 (C-7'), 74.6 (C-8'), 172.3 (C-9'), 131.4 (C-1''), 114.0 (C-2''), 146.6 (C-3''), 146.9 (C-4''), 116.5 (C-5''), 120.5 (C-6''), 138.0 (C-7''), 120.9 (C-8'')。该化合物的光谱数据与文献[5]对照,基本一致,故鉴定该化合物为丹酚酸 A。

化合物 7 无色粉末。三氯化铁显蓝色,溴甲

酚蓝显黄色(蓝色背景)。质谱给出 $731 [M-H]^-$ 的分子离子峰。氢谱信号与丹酚酸 B 及其相似,最大的差别是多了 1 个 δ : 3.72 (3H, s) 的质子信号。由此推测该化合物为紫草酸 B 甲酯。该化合物的波谱数据与文献[7]对照,基本一致,故鉴定该化合物为紫草酸 B 甲酯。

化合物 8 无色粉末,三氯化铁显蓝色。质谱给出 $717 [M-H]^-$ 的准分子离子峰。 ^1H-NMR (600 MHz, D_2O) δ : 5.28 (1H, dd, $J=8.8, 3.3$ Hz, H-8'), 4.30 (1H, d, $J=5.0$ Hz, H-8''), 3.14 (1H, br. d, $J=12.0$ Hz), 3.04 (2H, m), 2.72 (1H, dd, $J=13.2, 10.8$ Hz, H-8'''), 5.91 (1H, d, $J=5.0$ Hz, H-7''), 3.94 (1H, d, $J=5.0$ Hz), 6.93 (1H, s, H-2''), 6.98 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5''), 6.80 (5H, m), 6.94 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.66 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5'''), 6.54 (1H, s), 6.22 (1H, brd, $J=7.8$ Hz, H-6'''), 7.29 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7), 6.08 (1H, $J=16.0$ Hz, H-8); $^{13}C-NMR$ (150 MHz, D_2O) δ : 125.9 (C-1), 127.4 (C-2), 149.6 (C-4), 146.6 (C-3), 118.7 (C-5), 124.8 (C-6), 144.9 (C-7), 117.7 (C-8), 170.7 (C-9), 131.3 (C-1'), 119.8 (C-2'), 147.1 (C-3'), 145.6 (C-4'), 119.2 (C-5'), 124.7 (C-6'), 38.7 (C-7'), 76.6 (C-8'), 176.9 (C-9'), 134.7 (C-1''), 116.0 (C-2''), 146.8 (C-3''), 145.2 (C-4''), 120.1 (C-5''), 120.3 (C-6''), 89.4 (C-7''), 58.7 (C-8''), 174.6 (C-9''), 130.9 (C-1'''), 119.2 (C-2'''), 146.2 (C-3'''), 145.3 (C-4'''), 118.8 (C-5'''), 123.9 (C-6'''), 38.2 (C-7'''), 77.2 (C-8'''), 175.6 (C-9''')。该化合物的光谱数据与文献[5]对照基本一致,故鉴定该化合物为丹酚酸 B。

化合物 9 无色粉末。溴甲酚蓝显黄色(蓝色背景)。 ^1H-NMR (600 MHz, CD_3OD-d_4) δ : 2.56 (4H, s, H-2, 3)。 $^{13}C-NMR$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 176.1 (C-1, 4), 29.8 (C-2, 3)。该化合物的波谱数据与文献[8]对照基本一致,故鉴定该化合物为丁二酸。

化合物 10 无色粉末,硫酸香草醛显蓝紫色。质谱给出 $632 [M]^+$ 的分子离子峰。 ^1H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 1.24 (3H, s, 10-H), 1.68 (1H, d, $J=12.54$ Hz, 3 α -H), 1.74 (1H, d, $J=10.8$ Hz, 7 α -H), 1.90 (1H, d, $J=12.4$ Hz, 3 β -H), 2.44 (1H, dd, $J=10.8, 6.6$ Hz, 7 β -H), 2.51 (1H, d, $J=6.6$ Hz, 5-H), 4.52 (1H, d, $J=7.5$ Hz, Glc-1' H), 4.50

(1H, dd, $J = 11.7, 2.0$ Hz, Glc-6'-H), 4.43(1H, dd, $J = 12.0, 1.7, 7.0$ Hz, Glc-6'-H), 3.59(1H, t, $J = 7.0$ Hz, Glc-5'-H), 3.25-3.38(3H, m, Glu-2'3'4'-H), 4.69(2H, s, 8-H), 5.37(1H, s, 9-H), 8.01(2H, d, $J = 7.5$ Hz, 2''6''-H), 7.59(1H, t, $J = 7.5$ Hz, 4''-H), 7.46(2H, t, $J = 7.5$ Hz, 3''5''-H), 7.05(2H, s, galloyl-H)。¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 89.3(C-1), 87.2(C-2), 44.4(C-3), 106.2(C-4), 43.8(C-5), 72.0(C-6), 22.9(C-7), 61.6(C-8), 102.2(C-9), 19.6(C-10), 100.0(C-1'), 74.92.0(C-2'), 75.2(C-3'), 71.9(C-4'), 77.9(C-5'), 64.6(C-6'), 131.2(C-1''), 130.6(C-2''), 129.6(C-3''), 134.4(C-4''), 129.6(C-5''), 130.6(C-6''), 168.0(COO), 121.4(C-1'''), 110.2(C-2'''), 146.6(C-3'''), 139.9(C-4'''), 146.6(C-5'''), 110.2(C-6'''), 168.0(COO)。该化合物的波谱数据与文献[9]对照基本一致,故鉴定该化合物为没食子酰芍药苷。

4 讨论

本研究运用多种分离纯化手段,从免疫复方的大孔吸附树脂 90% 乙醇洗脱部分分得 10 个化合物,并对其进行结构鉴定,为免疫复方的药效物质基础的初步研究提供了依据。经与文献对照,推测化合物 1~7 可能来源于丹参,化合物 8 可能来源于牡丹皮,化合物 9,10 可能来源于老头草,但还有待 HPLC-MS 和 HPLC-MS-MS 法对复方成分和单味药

的成分进行深入的对比分析,进一步确认复方中化学成分的来源。

[参考文献]

- [1] 张君,王莉,郑学民. 消斑愈肾颗粒剂对实验性 IgA 肾病大鼠治疗作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(6): 112.
- [2] 张君,姜欣,王莉,等. 消斑愈肾颗粒剂对大鼠 IgA 肾病免疫调节的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(4): 37.
- [3] 张君,郭振武,董娜,等. 消斑愈肾剂治疗小儿紫癜性肾炎的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(5): 29.
- [4] 任玉琳,杨峻山. 西藏雪莲花化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(9): 590.
- [5] 程启候,杨中林. 狗脊化学成分的研究[J]. 药学进展, 2003, 27(2): 298.
- [6] 张正付. 滇丹参抗 HIV 有效成分研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [7] 张正付,陈鸿珊,李健蕊,等. 滇丹参中酚酸类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1886.
- [8] Takeshi Deyama. The constituents of eucommia ulmoides OLIV. I. Isolation of (+)-medioresinol di- O - β -D-glucopyranoside [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(9): 2993.
- [9] 张晓燕,王金辉,李锐. 白芍的化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(1): 30.

[责任编辑 邹晓翠]