

免疫复方的酚酸类成分研究

许柟^{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 caffeoate(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), galloylpaeoniflorin(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、小茴、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] * 许柟 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,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-4'), 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-4), 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-4"), 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-4), 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-4'), 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-4''), 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 A 甲酯。

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-4') , 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, d, 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) , 29.8(C-2) , 29.8(C-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)。 ^{13}C -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-4''), 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来可能源于老头草,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】