

赤雹根中 Dubioside F 的分离纯化及含量测定

毛晓霞, 苗光新, 赵春颖, 佟继铭, 刘永平*

(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的:**分离纯化赤雹根中的 dubioside F, 鉴定结构并测定不同产地赤雹根中 dubioside F 的含量。**方法:**通过硅胶柱色谱分离纯化, 以 CHCl_3 -MeOH- H_2O (14:7:1) 为洗脱剂, 得到单体化合物, 根据其理化性质和波谱数据, 鉴定该单体化合物为 dubioside F; 再以分离得到的 dubioside F 为对照品, 测定不同产地赤雹根药材中 dubioside F 的含量。采用 Discovery- C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (24:76), 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 200 nm。**结果:**dubioside F 在 0.98 ~ 24.5 μg 线性关系良好 ($r=1$), 平均回收率 96.96%, RSD 1.1%。**结论:**首次对赤雹根中单体皂苷类成分 (dubioside F) 进行含量测定, 测定方法简便、快速、可靠。不同产地种植、野生的赤雹根药材 dubioside F 的含量, 分别以吉林省和龙市、河北省宽城县出产的为最高。可为进一步的赤雹根药材质量控制的研究提供依据。

[关键词] 赤雹根; dubioside F; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 24-0043-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240043

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1501.022.html>

[网络出版时间] 2014-11-06 15:01

Purification and Determination of Dubioside F in Tuber of *Thladiantha dubia*

MAO Xiao-xia, MIAO Guang-xin, ZHAO Chun-ying, TONG Ji-ming, LIU Yong-ping*
(Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine,
Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to purify and determine the content of dubioside F in the tuber of *Thladiantha dubia* from different habitats by HPLC **Method:** Dubioside F was purified by column chromatograph with silica gel (CHCl_3 -MeOH- H_2O 14:7:1) and identified through physicochemical properties and spectral analysis. To determine the content of dubioside F in the tuber of *T. dubia* from different habitats by HPLC: A Discovery- C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase of acetonitrile-water (24:76). The DAD detector was set at 200 nm. **Result:** Dubioside F showed good linearity ($r=1$) within test ranges (0.98-24.5 μg). The average recovery was 96.96%, with RSD of 1.1%. **Conclusion:** This method was well validated in good precision, repeatability and sensitivity. The most abundant dubioside F in the tuber of *T. dubia* in different cultivated habitats was from Helong of Jilin rovince; while the most abundant dubioside F in the tuber of *T. dubia* in different natural habitats is from Kuancheng of Hebei province. This method was successfully applied to quantify dubioside F in the tuber of *T. dubia*.

[Key words] tuber of *Thladiantha dubia*; dubioside F; HPLC; determination

[收稿日期] 20140122(013)

[基金项目] 河北省科技计划项目(14272502D); 河北省高等学校自然科学研究青年基金项目(2010101); 河北省重点学科建设项目

[第一作者] 毛晓霞, 硕士, 讲师, 从事天然药物的化学成分研究, Tel:13403249193, E-mail:mao0505@163.com

[通讯作者] * 刘永平, 教授, 从事生化药理学研究, Tel:18803148666, E-mail:lyp@cdmc.edu.cn

赤雹根在满族民间沿用已久,主要用于治疗腰腿痛、痛经、软组织扭伤等多种疼痛,也可用于乳汁不下、乳房胀痛等。现代药理学研究表明赤雹根总皂苷对实验性佐剂型关节炎具有显著的镇痛作用^[1],其水提取物对人白血病细胞 K562 的有抑制作用^[2]。其乙醇提取物有抗乳腺增生作用^[3]。关于赤雹根化学成分的报道较少, Nagao 等^[4-5]从中分离得到 6 个三萜皂苷 dubioside A ~ F。赵波等^[6-7]采用 RP-HPLC 测定了赤雹果中齐墩果酸、熊果酸的含量,程东岩等^[8]测定了赤雹不同药用部位中总黄酮的含量。本文对赤雹根中的抗炎镇痛的有效部位(即赤雹根总皂苷)中的成分(dubioside F)进行了含量测定,采用硅胶柱色谱方法分离纯化出赤雹根中的 dubioside F,并以 dubioside F 为对照品,测定不同产地赤雹根中 dubioside F 的含量。这一研究为控制赤雹根药材的质量奠定基础。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(包括 G1315D 二极管阵列检测器,1200 色谱工作站,美国安捷伦)。乙腈(色谱纯,美国 Fisher 试剂公司),水为娃哈哈纯净水,硅胶(青岛海洋化工厂),dubioside F(纯度 98.1%)为实验室自制。其余化学试剂均为分析纯,购自科密欧化学试剂有限公司。

赤雹根采集于吉林省的和龙、四平、吉林,河北省的承德、隆化、宽城、围场、秦皇岛、丰宁,经承德医学院赵春颖教授鉴定均为葫芦科植物赤雹 *Thladiantha dubia* 的干燥块根。

2 分离纯化

2.1 分离纯化 取赤雹根药材 5 kg,70% 乙醇回流提取 3 次,合并提取液减压浓缩得粗浸膏。粗浸膏加水使成混悬液,依次用石油醚、三氯甲烷、水饱和正丁醇萃取,得石油醚萃取物(57 g)、三氯甲烷萃取物(24 g)、水饱和正丁醇萃取物(150 g)。其中水饱和正丁醇萃取物过 AB-8 大孔树脂柱,并依次用 10%,30%,70% 乙醇洗脱,得 10% 乙醇洗脱物 32 g,30% 乙醇洗脱物 36 g,70% 乙醇洗脱物 37 g。70% 乙醇洗脱物采用硅胶柱色谱分离,以 CHCl_3 -MeOH- H_2O (14:7:1) 洗脱,共收集 179 份。配合 TLC (nBuOH -MeOH- H_2O ,6:1.2:5,上层) 检识,10% 硫酸乙醇显色,合并样品共计得到 16 部分,第 4 部分经反复硅胶柱层析得化合物 **1**(500 mg)。

2.2 结构鉴定 化合物 **1** 为白色粉末,易溶于吡啶、二甲基亚砜(DMSO),可溶于甲醇。取少量样品,以甲醇溶解,点于高效薄层板上,置浓盐酸蒸气中 12 h,

挥干浓盐酸,点标准糖,用三氯甲烷-甲醇-水(7:3:0.5)展开,用邻苯二甲酸苯胺显色,Rf 值分别与葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖对照品相一致。可确定检出葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖。ESI-MS m/z 1 537 $[\text{M} + \text{Na}^+]$ 为正分子离子峰,1 405 $[\text{M} + \text{Na}^+ - 132]$ 为脱去 1 个戊糖的正离子峰,1 127 $[\text{M} + \text{Na}^+ - 132 - 132 - 146]$ 为脱去 2 个戊糖和 1 个脱氧己糖的正离子峰;1 213 $[\text{M} + \text{Na}^+ - 162 - 162]$, 1 051 $[\text{M} + \text{Na}^+ - 162 - 162 - 162]$ 为分别脱去 2 个己糖及 3 个己糖的正离子峰。¹H-NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 1.33(3H, s), 1.1(3H, $J = 6$ Hz), 0.92(3H, s), 0.9(3H, s), 0.84(3H, s), 0.64(3H, s) 分别为苷元上 27,24,30,25,29,26 位甲基质子信号; δ : 5.57(1H, s), 4.74(1H, s), 4.61(1H, d, $J = 6$ Hz), 4.48(1H, d, $J = 4.8$ Hz), 4.42(1H, d, $J = 7.6$ Hz), 4.42(1H, d, $J = 7.6$ Hz), 4.20(1H, d, $J = 7.6$ Hz) 分别为 7 个糖端基质子信号,5.25(1H, br, s) 为 12 位双键碳质子信号,9.48(1H, s) 为 23 位 CHO 的质子信号。结合¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC 等谱图信息,化合物 **1** 的波谱数据归属见表 1。经与文献[9] 比对,化合物 **1** 的苷元部分波谱数据与皂树酸基本一致,确定化合物 **1** 的苷元是皂树酸。且苷元的 3 和 28 位连有糖链。

化合物 **1** 的¹H-NMR 显示 7 个糖的端基质子信号 5.57(1H, s), 4.74(1H, s), 4.61(1H, d, $J = 6$ Hz), 4.48(1H, d, $J = 4.8$ Hz), 4.42(1H, d, $J = 7.6$ Hz), 4.42(1H, d, $J = 7.6$ Hz), 4.20(1H, d, $J = 7.6$ Hz); ¹³C-NMR 谱也显示相应的 7 个糖的端基碳信号 δ : 91.7, 99.2, 102.3, 104.3, 102.9, 104.2, 102.0。与标准糖的甲基糖基信号比较可知,化合物 **1** 的 2 条糖链中的鼠李糖、阿拉伯糖为 α 构型,葡萄糖、木糖和半乳糖为 β 构型。

化合物 **1** 中糖的连接位置和连接顺序根据 HMBC 谱确定。在 HMBC 谱中,葡萄糖的端基质子 δ 4.20(Glc-H₁) 与苷元的 4 位碳信号(δ 83.4) 相关,说明葡萄糖与苷元的 3 位碳相连, δ 4.42(Glc'-H₁) 与 Glc 的 3 位碳信号(δ 87.0) 相关, δ 4.61(Gal-H₁) 与 Glc 的 2 位碳信号(δ 77.0) 相关。上述相关明确指出化合物 **1** 的 3 位碳上的糖链为:葡萄糖基(1→3) [半乳糖基(1→2)] 葡萄糖基(1→1) 苷元。 δ 5.57(Ara-H₁) 与苷元的 28 位碳信号(δ 174.5) 相关,说明阿拉伯糖与苷元的 28 位碳相连, δ 4.74(Rha-H₁) 与 Ara 的 2 位碳信号(δ 73.8) 相关, δ 4.42(Xyl-H₁) 与 Rha 的 4 位碳信号(δ 81.1) 相关, δ 4.48

(Xyl'-H₁)与 Xyl 的 3 位碳信号(δ 85.2)相关。上述相关明确指出化合物 **1** 的 28 位碳上的糖链的连接顺序和连接位置为:木糖基(1→3)木糖基(1→3)鼠李糖基(1→2)阿拉伯糖基(1→1)苷元。综合上述确定化合物 **1** 的结构为 3-*O*- β -*D*-葡萄糖吡喃糖基(1→3)[β -*D*-吡喃半乳糖基(1→2)]- β -*D*-吡喃葡萄糖基-皂树酸-28-*O*- β -*D*-吡喃木糖基(1→3)- β -*D*-木吡喃糖基(1→3) α -*L*-吡喃鼠李糖基(1→2) α -*L*-吡喃阿拉伯糖基苷,即 dubioside F。结构式见图 1。

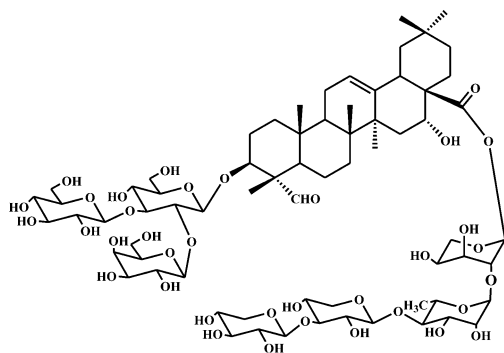


图 1 dubioside F 的结构式

表 1 ¹³C-NMR 数据(DMSO-*d*₆, 400 MHz)

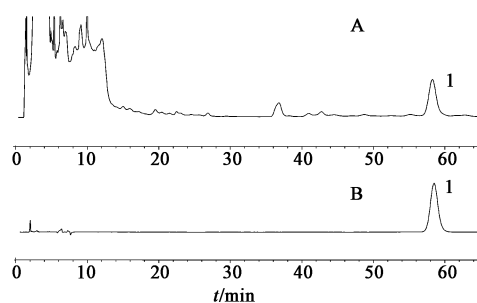
编号	化学位移	编号	化学位移	编号	化学位移
1	37.5	25	15.4	6	59.8
2	24.3	26	16.6	28- <i>O</i> -sugars	
3	83.4	27	26.4	Ara 1	91.6
4	54.0	28	174.5	2	73.8
5	47.4	29	32.8	3	70.0
6	19.7	30	24.2	4	67.3
7	31.8	3- <i>O</i> -sugars		5	63.9
8	40.9	Glc 1	102.0	Rha 1	99.2
9	45.9	2	77.0	2	70.5
10	35.5	3	87.0	3	69.3
11	22.8	4	68.3	4	81.1
12	121.2	5	76.2	5	67.7
13	143.4	6	60.9	6	17.6
14	41.0	Glc 1	102.9	Xyl 1	104.2
15	34.7	2	73.6	2	73.6
16	72.3	3	76.6	3	85.2
17	47.9	4	70.0	4	67.1
18	41.0	5	76.9	5	65.5
19	46.1	6	60.9	Xyl 1	104.3
20	30.2	Gal 1	102.3	2	73.7
21	34.8	2	71.6	3	76.1
22	31.0	3	73.7	4	69.3
23	210.2	4	68.1	5	65.7
24	10.3	5	74.7		

3 含量测定

3.1 色谱条件 Discovery-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(24:75), 检测波长 200 nm, 柱温 35 °C。见图 2。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取 dubioside F 对照品适量, 置 5 mL 量瓶, 用 25% 乙腈水溶液溶解并稀释至刻度, 制成 0.46 g·L⁻¹ 对照品溶液。

3.3 供试品溶液的制备 精密称取赤霉根粗粉



A. 样品; B. 对照品; 1. dubioside F

图 2 赤霉根 HPLC

1.0 g, 加入 50% 甲醇 30 mL, 超声 20 min, 提取 3 次, 合并提取液, 回收溶液至干, 用 25% 乙腈水溶解并定容至 5 mL, 备用。

3.4 标准曲线的制备 精密量取 dubioside F 对照品溶液 2, 10, 20, 30, 50 μL, 照上述色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 以对照品进样量为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 281.33X - 1.88$ ($r = 1$)。dubioside F 在 0.98 ~ 24.5 μg 线性关系良好。

3.5 精密度试验 取 10 μL 对照品溶液, 重复进样 6 次, 测定 dubioside F 的峰面积。结果 RSD 0.46%, 表明该方法精密度良好。

3.6 重复性试验 取同一批号样品(河北宽城野生), 按 3.3 项下方法分别制得 6 份供试品溶液, 进样 10 μL 测定, 结果 RSD 0.78%, 表明该方法重复性良好。

3.7 稳定性试验 将上述供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样 10 μL 测定, 记录 dubioside F 的峰面积, 结果 RSD 1.90%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.8 加样回收试验 精密称取已知含量(0.244%)的赤霉根 6 份, 每份 0.5 g, 分别精密加入 dubioside F 对照品适量, 按 3.3 项下方法分别制得供试品溶液, 按 3.1 项下色谱条件, 进样 10 μL, 测

定 dubioside F 的含量,计算回收率。结果平均加样回收率为 96.96%,RSD 1.1%,表明该方法回收率良好,见表 2。

表 2 赤雹根中 dubioside F 加样回收率试验

样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.22	2.44	96.82	96.96	1.1
1.23	2.43	95.24		
1.23	2.46	97.62		
1.23	2.47	98.41		
1.22	2.44	96.83		
1.23	2.45	96.83		

注:加入量均为 1.26 mg。

3.9 样品的含量测定 按 3.3 项下方法分别制备供试品溶液,按 3.1 项下色谱条件,进样 10 μL,测定,计算 dubioside F 的含量,结果见表 3。

表 3 不同产地赤雹根中 dubioside F 含量

采集地点	采集时间	种植方式	dubioside F/%
河北省承德	2012-10	种植	0.195 1
河北省承德	2013-10	种植	0.171 5
吉林省和龙	2012-10	种植	0.315 6
吉林省和龙	2013-10	种植	0.244 2
吉林省四平	2012-10	种植	0.211 6
吉林省四平	2013-10	种植	0.176 8
河北省秦皇岛	2013-10	种植	0.062 5
吉林省吉林	2013-10	种植	0.245 6
河北省承德	2013-09	野生	0.634 4
吉林省和龙	2013-10	野生	0.909 8
吉林省四平	2012-10	野生	0.127 7
吉林省四平	2013-10	野生	0.042 4
吉林省吉林	2013-10	野生	0.322 9
吉林省蛟河	2013-10	野生	0.300 7
河北省宽城	2013-09	野生	1.233 2
河北省隆化	2013-09	野生	1.166 3
河北省秦皇岛	2013-10	野生	0.013 1

4 讨论

本文对赤雹根中皂苷类成分(即赤雹根中抗炎镇痛类成分)进行含量测定,建立了 HPLC 测定赤雹根中 dubioside F 含量的方法,该方法操作简便,重复性好,可用于不同产地赤雹根药材中 dubioside F 的含量分析。色谱条件研究过程中,分别考察了 200,205,230,254 nm 等 4 个波长,由于 200 nm 波长时色谱峰强度最好,故确定 200 nm 为检测波长;分

别采用 24% 乙腈,26% 乙腈,55% 甲醇,乙腈-0.1% 甲酸水(26:74),乙腈-0.3% 四氢呋喃水(26:74)等溶剂系统作为流动相进行预试验,结果显示,24% 乙腈分离效果最佳,为本试验首选的流动相。

测定结果表明,种植的赤雹根药材,dubioside F 的含量以吉林省和龙市出产的为最高;而野生赤雹根药材,dubioside F 的含量以河北省宽城县出产的为最高。当年采收的赤雹根较保存一年左右的药材,dubioside F 的含量略有降低,这可能是每一年气候不同的结果,或是赤雹根随采收后储存放置时间延长,dubioside F 的含量有所提高,相关研究有待进一步深入。

[参考文献]

[1] 刘永平,陈建双,赵波,等.赤雹根总皂苷对实验性佐剂型关节炎镇痛作用的研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(8):1659.

[2] 张玉玲,赵波,刘永平,等.赤雹根水提取物对人白血病细胞 K562 的抑制作用[J].时珍国医国药,2010,21(2):397.

[3] Wang L S, Zhao D Q, Di L, et al. The anti-hyperplasia of mammary gland effect of *Thladiantha dubia* root ethanol extract in rats reduced by estrogen and progestogen[J]. Ethnopharmacology, 2011, 134(1):136.

[4] Nagao T, Okabe H, Mihashi K, et al. Studies on the constituents of *Thladiantha dubia* Bunge. I. The structures of dubiosides A, B, and C, the quillaic acidglucuronide saponins isolated from the tuber [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(4):925.

[5] Nagao T, Tanaka R, Okabe H, et al. Studies on the constituents of *Thladiantha dubia* Bunge. II. Structures of dubiosides D, E and F, neutral saponins of quillaic acidisolated from the tuber [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38(2):378.

[6] 赵波,张玉玲,赵春颖,等.RP-HPLC 测定赤雹果中齐墩果酸含量[J].承德医学院学报,2010,27(3):241.

[7] 赵波,张玉玲,赵春颖,等.RP-HPLC 测定赤雹果中熊果酸含量[J].承德医学院学报,2009,26(4):362.

[8] 程东岩,王隶书,王海生,等.赤雹不同药用部位中总黄酮含量的测定[J].时珍国医国药,2010,21(12):3108.

[9] Ghezala Gaidi, Tomofumi Miyamoto, Abdolhossein Rustaiyan, et al. Three New Acylated Triterpene Saponins from *Acaophyllum squarrosum*[J]. Nat Prod, 2001,64:920.

[责任编辑 顾雪竹]