

· 化学与分析 ·

2015年版《中国药典》中王不留行黄酮苷化学结构修正

周国洪^{1,2}, 许梦莹^{1,3}, 张晓^{1,3}, 郭日新¹, 于现阔¹, 唐力英^{1*}, 王祝举^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 广东食品药品职业学院, 广州 510520;
3. 河南中医药大学, 郑州 450008)

[摘要] 目的:对2015年版《中国药典》收录的中药王不留行的对照品王不留行黄酮苷的化学结构进行修正。方法:采用大孔吸附树脂及硅胶柱色谱对王不留行药材进行化学成分分离,得到化合物1,运用化学方法、高效液相色谱法及紫外光谱、红外光谱、核磁共振波谱、质谱等波谱方法进行结构鉴定。并且将该化合物与王不留行黄酮苷对照品(购于中国食品药品检定研究院)进行薄层、高效液相、核磁(一维及二维)和红外等方法进行数据比对分析,结果两者均一致。结果:原王不留行黄酮苷的黄酮母核4'位上连接的葡萄糖,正确连接位置应该在7位上,王不留行黄酮苷的化学结构应该是芹菜素-6-C-[α -L-阿拉伯糖-(1" \rightarrow 2")- β -D-葡萄糖]-7-O- β -D-葡萄糖苷。结论:王不留行黄酮苷的化学结构应修改为芹菜素-6-C-[α -L-阿拉伯糖-(1" \rightarrow 2")- β -D-葡萄糖]-7-O- β -D-葡萄糖苷。该化合物鉴定的关键是4'-OH的信号,在核磁共振氢谱和HMBC谱中是较难得到的,如果要得到明显信号,需要在实验中选择较低的样品浓度,并且以DMSO-*d*₆为溶剂。根据2015年版《中国药典》,王不留行黄酮苷是王不留行药材质量标准的定量成分,所以它的化学结构准确性对于国家法典的权威性而言有较大意义。

[关键词] 王不留行黄酮苷;《中国药典》;王不留行;结构修正

[中图分类号] R284.2;R282.6;R22;R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0051-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180712

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180111.1017.017.html>

[网络出版时间] 2018-01-12 11:21

Correction of Chemical Structure of Vaccarin According to 2015 Edition of Chinese Pharmacopoeia

ZHOU Guo-hong^{1,2}, XU Meng-ying^{1,3}, ZHANG Xiao^{1,3}, GUO Ri-xin¹, YU Xian-kuo¹,
TANG Li-ying^{1*}, WANG Zhu-ju^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;
3. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;)

[Abstract] **Objective:** Correct the chemical structure of vaccarin, which has content limit in *Vaccaria segetalis* according to the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. **Method:** A serial of methods was utilized, such as chemical methods, high performance liquid chromatography (HPLC), UV Radiation, Infrared Radiation (IR), nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectra (MS). **Result:** The glc linked to position 4' of apigenin originally should be linked to position 7, suggesting that the chemical of vaccarin should be apigenin 6-C-[α -L-arabinopyranosyl]- (1" \rightarrow 2") - β -D-glucopyranosyl] -7-O- β -D-glucopyranoside. **Conclusion:** The chemical structure of vaccarin should be revised as apigenin 6-C-[α -L-arabinopyranosyl]- (1" \rightarrow 2") - β -D-glucopyranosyl] -7-O- β -D-glucopyranoside. Vaccarin is the quantitative composition of *Vaccariae Semen* in the 2015 edition *Chinese Pharmacopoeia*, which highlights the great significance of the accuracy of its chemical structure.

[Key words] vaccarin; *Chinese Pharmacopoeia*; *Vaccariae Semen*; structure modification

[收稿日期] 20171016(016)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673602)

[第一作者] 周国洪,在读硕士,从事饮片化学成分及炮制原理研究,Tel:020-28854936,E-mail:zhough@gdyzy.edu.cn

[通信作者] *唐力英,副研究员,从事饮片化学成分及炮制原理研究,Tel:010-64087609,E-mail:bjtangliying@163.com;

*王祝举,研究员,从事饮片化学成分及炮制原理研究,Tel:010-64087609,E-mail:wangzhuju@sina.com

王不留行始载于《神农本草经》，味苦，性平，归肝、胃经，能活血通经，下乳消肿，利尿通淋，临床上可以用来治疗经闭，痛经，乳汁不下，乳痈肿痛，淋证涩痛等^[1]。据报道，王不留行主要的化学成分有三萜皂苷、黄酮苷、环肽和生物碱等^[2-5]。其中，王不留行黄酮苷(vaccarin)是2015年版《中国药典》王不留行项下质量标准的定量成分，限量不得少于0.40%^[1]，另有报道其有保护血管内皮细胞的作用^[6]。而王不留行的黄酮苷类成分，可能是王不留行通乳作用的有效成分之一^[7]。

1974年，王不留行黄酮苷的化学结构首次被报道^[8]，为芹菜素-6-C-[α -L-阿拉伯糖-(1''' \rightarrow 2'')- β -D-葡萄糖]-4'-O- β -D-葡萄糖苷(图1)，但是该文献没有报道核磁共振数据。后来，王不留行黄酮苷的一维核磁共振数据被先后报道^[9-10]，但均为一维核磁

共振谱数据，没有二维核磁共振的证据，且羟基氢信号都未报道。笔者在对王不留行化学成分的研究过程中，得到了化合物1。化合物1是一个黄酮苷成分，通过波谱技术鉴定为芹菜素-6-C-[α -L-阿拉伯糖-(1''' \rightarrow 2'')- β -D-葡萄糖]-7-O- β -D-葡萄糖苷(图1)。它与王不留行黄酮苷结构区别在于葡萄糖连接在芹菜素母核的7位，而不是连接在4'位。但是，经过比较了化合物1和王不留行黄酮苷的核磁共振波谱数据后发现，二者的数据是一致的。而且，两者薄层色谱和HPLC检测的实验结果，均显示两者完全一致重合。所以，笔者推测，王不留行黄酮苷的化学结构鉴定有可能不正确，其化学结构可能就是化合物1的结构。对此，为了证实推测，购买了王不留行黄酮苷对照品，对其结构进行进一步的探究。

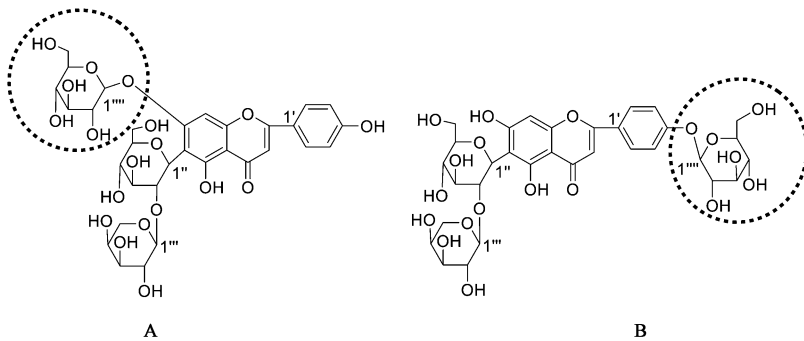


图1 化合物1(A)和原王不留行黄酮苷(B)的化学结构

Fig.1 Chemical structure of compound 1 (A) and original vaccarin (B)

1 材料

G-6540 Q-TOF HR 型质谱仪和 GC 7890A 型气相色谱仪(安捷伦科技有限公司), Ascend-600 MHz 型核磁共振波谱仪和 Avance III 400 MHz 型核磁共振波谱仪(德国布鲁克科技有限公司), U-3000 型高效液相色谱仪(戴安中国有限公司), Spectrum 100 型红外光谱仪(珀金埃尔默股份有限公司), AutopolVplus 型旋光仪(美国鲁道夫仪器公司), SGWX-4 型显微熔点仪(上海精密科学仪器有限公司), N-1100 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

王不留行黄酮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111853-201303), AB-8 型大孔吸附树脂(南开大学化工厂), LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶(美国通用电气公司), 柱色谱硅胶和薄层色谱硅胶板(青岛海洋化工厂), 用于提取的乙醇为工业级, 其余试剂为分析纯(北京化工厂)或者色谱纯(赛默飞世尔公司)。

王不留行药材 2015 年购于河北安国药材市场,

经河南中医药大学陈随清教授鉴定为石竹科植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* 的干燥成熟种子。

2 提取分离

取王不留行 20 kg, 粉碎, 95% 乙醇回流提取, 减压浓缩, 得到浸膏 1 kg, 用水分散, 分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次萃取, 得到石油醚浸膏 1 L, 乙酸乙酯浸膏 42 g, 正丁醇浸膏 440 g。

用大孔树脂柱色谱法分离正丁醇部位, 依次用水, 30%, 50%, 95% 乙醇洗脱, 得到 30% 乙醇部位 83 g, 50% 乙醇部位 62 g 和 95% 乙醇 161 g。对 30% 乙醇和 50% 乙醇部位进行薄层色谱检识, 发现二者成分相似, 合并, 然后经硅胶(100~200目)柱色谱, 用三氯甲烷-甲醇混合溶液梯度洗脱, 薄层色谱检识后, 将相似组分合并。其中一个洗脱收集部分经检识, 发现所含化合物纯度较高, 重结晶后得到化合物 1(4 g)。

3 化合物 1 的酸水解^[11]

取化合物 1 样品 2 mg 用 2 mol·L⁻¹ HCl 溶液溶

解,水浴加热至 90 ℃,保持 4 h,用 Ag₂CO₃ 中和后,过滤,收集滤液。氮气吹干滤液后,用 0.3 mL 无水吡啶溶解,加 L-半胱氨酸甲酯盐酸盐(L-cysteine methyl ester hydrochloride) 3.0 mg,密封,60 ℃ 反应 2 h,用氮气吹干,加硅醚化试剂 HMDS-TMCS-Pyridine (3:1:9) 0.5 mL,密封,60 ℃ 反应 1.5 h,氮气吹干,用光谱纯正己烷溶解,水洗涤,分液,正己烷层移至量瓶中,密封,待气相色谱分析。HP-5 色谱柱(320 μm × 30 m, 0.25 μm),载气 N₂,柱温箱温度 230 ℃ 保持 30 min,后进样口温度 250 ℃,前检测器(FID)温度 250 ℃,色谱柱流量 1.000 mL·min⁻¹。取 D 型和 L 型葡萄糖对照品, D 型和 L 型阿拉伯糖对照品,从上述“用 0.3 mL 无水吡啶溶解”开始依法操作。

化合物 1 的酸水解产物在 t_{R1} = 6.877 min 和 t_{R2} = 11.875 min 有色谱峰,而 D 型和 L 型葡萄糖对照品, D 型和 L 型阿拉伯糖对照品的出峰时间分别为 11.717, 12.391, 7.643, 6.898 min。所以,化合物 1 的酸水解产物为 D 型葡萄糖和 L 型阿拉伯糖。

4 鉴定

化合物 1 黄色晶体(乙醇), AlCl₃ 反应显黄色荧光,熔点为 bp 214 ~ 215 ℃,旋光 [α]_D²⁰ - 41.637°, IR 3 368, 2 888, 1 651, 1 608, 1 569, 1 511, 1 485, 1 453, 1 348, 1 073, 915, 837, 778 cm⁻¹。UV 最大吸收是 271 nm 和 336 nm,推测为化合物 1 是黄酮类化合物。Molish 反应阳性,推测其为黄酮苷,水解后得到了 L-阿拉伯糖和 D-葡萄糖。根据高分辨质谱,准分子离子峰为 [M + H]⁺ m/z 727.206 7 (C₃₂H₃₉O₁₉, 计算值为 727.208 6),得到化合物 1 分子式 C₃₂H₃₈O₁₉。

化合物 1 的核磁共振常温谱中出现了信号裂分,当温度升到 80 ℃ 时,谱图的信号不出现裂分。在氢谱(80 ℃)中,芳香区出现两组双峰信号, δ 7.93 (2H, d, J = 8.8 Hz) 和 6.97 (2H, d, J = 8.8 Hz), 是黄酮母核 B 环的 AA'BB' 耦合系统信号。芳香区还有 2 个单峰信号 δ 6.91 和 6.79, 结合 HSQC 和 HMBC 谱,确定是母核 8 位和 3 位的氢信号。另外,在氢谱(25 ℃)中,有 2 个十分明显的活泼氢信号,结合 HMBC 谱,确定为 5 位和 4' 位的羟基氢信号(图 2)。因此,化合物 1 可能是 6,7 位有取代,5,4' 位有羟基的黄酮苷类化合物。

文献[12]对一系列 6-C-黄酮类碳苷化合物的构象研究发现,这类化合物存在旋转异构体导致了核磁共振信号出现裂分,而 5,7 位上的取代基对 6 位上碳苷键的自由旋转会造成空间位阻,可能是该类化合物存在旋转异构体的主要原因。所以,化合

物 1 可能是黄酮碳苷类化合物。根据化合物 1 的碳谱中糖相关碳的个数推断,化合物 1 可能含有 1 个五碳糖和 2 个六碳糖,结合酸水解实验结果,推测为 1 个阿拉伯糖和 2 个葡萄糖。在氢谱上,3 个糖的端基氢信号分别为 δ 5.02 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.89 (1H, d, J = 9.9 Hz) 和 4.30 (1H, d, J = 5.6 Hz)。根据端基氢的耦合常数和酸水解结果,确定了糖的绝对构型。利用 HSQC 谱,端基碳的信号被确定。端基碳信号 δ 71.4 出现在高场的位置证明了碳苷键的存在,其他 2 个糖苷键则为氧苷键。根据 C-2'' 的苷化位移和端基氢在 HMBC 谱中的信号,可明确糖的连接位置。在 HMBC 谱, δ 4.89 (1H, d, J = 9.9 Hz) 与 110.63 (C-6) 相关, 4.30 (1H, d, J = 5.6 Hz) 与 81.49 (C-2'') 相关, 5.02 (1H, d, J = 6.8 Hz) 与 163.18 (C-7) 相关。因此,3 个糖分别是 6-C-β-D-葡萄糖, 7-O-β-D-葡萄糖和 2''-O-α-L-阿拉伯糖。

此外,将化合物 1 与肥皂草苷(芹菜素-6-C-β-D-葡萄糖-7-O-β-D-葡萄糖苷)的 NMR 数据^[13] 对比,多出一组五碳糖的信号,即化合物 1 的 L-阿拉伯糖信号。因此,文献比对的结果也证实了上述的推断。

综上,化合物 1 鉴定为芹菜素-6-C-[α-L-阿拉伯糖-(1'''→2'')-β-D-葡萄糖]-7-O-β-D-葡萄糖苷,化学结构见图 2。借助 HSQC, HMBC 对其¹H-NMR 和¹³C-NMR 数据进行归属,见表 1。

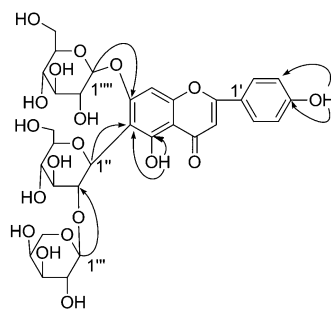


图 2 化合物 1 的化学结构及主要 HMBC 相关

Fig. 2 Chemical structure of compound 1 and its key HMBC relation

从化学结构上看,化合物 1 和原王不留行黄酮苷十分相似,区别在于化合物 1 的 1 个葡萄糖连接在 7 位,而原王不留行黄酮苷连接在 4' 位。通过比较 TLC 和 HPLC 的比移值和保留时间,在多种流动相情况下,王不留行黄酮苷对照品(购于中国食品药品检定研究院)和化合物 1 的出峰时间保持一致。另外,对比二者的 NMR 和 IR 数据,也得到了同样的结果。并且,有文献报道了王不留行黄酮苷在常温下, NMR 信号也出现裂分的现象^[10]。所以,推

表 1 化合物 1 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 $^1\text{H-NMR}$ 数据 ($\text{DMSO-}d_6$)

Table 1 $^{13}\text{C-NMR}$ and $^1\text{H-NMR}$ data of compound 1 ($\text{DMSO-}d_6$)

位置	δ_{C} (25 °C, 150 MHz)	δ_{C} (80 °C, 100 MHz)	δ_{H} (25 °C, 600 MHz)	δ_{H} (80 °C, 400 MHz)
2	164.54, 164.40	164.7		
3	103.61, 103.50	103.8	6.90 (s), 6.87 (s)	6.79 (s)
4	182.83, 182.54	182.5		
5-OH	161.66, 160.18	160.4	13.65 (s), 13.53 (s)	13.46 (s)
6	110.63, 110.25	110.7		
7	163.18, 162.27	163.2		
8	94.36, 94.05	94.3	6.91 (s), 6.90 (s)	6.91 (s)
9	157.07, 156.81	157.2		
10	105.69, 105.61	105.6		
1'	121.42, 121.39	121.7		
2', 6'	129.07, 129.04	129.0	7.98 (d, 8.7), 7.97 (d, 8.6)	7.93 (d, 8.8)
3', 5'	116.48	116.6	6.95 (d, 8.6)	6.97 (d, 8.8)
4'-OH	161.86, 161.83	161.9	10.44 (s)	10.13 (s)
Glc 1''	71.41, 71.32	71.7	4.89 (d, 9.9), 4.74 (d, 9.6)	4.82 (d, 9.4)
2''	81.49, 79.65	81.3	4.44 (dd, 9.4, 9.5), 4.19 (dd, 9.4, 9.3)	4.35 (m)
3''	78.63, 78.59	78.9	3.53 (m), 3.45 (m)	3.0 ~ 3.6
4''	71.17, 70.18	70.6	3.28 (m), 3.22 (m)	3.0 ~ 3.6
5''	81.70, 80.71	81.5	3.27 (m), 3.20 (m)	3.0 ~ 3.6
6''a	62.07, 61.06	61.7	3.70 (dd, 3.7, 11.6), 3.65 (dd, 3.7, 11.6)	3.70 (d, 10.4)
6''b			3.39 (m)	3.0 ~ 3.6
Ara 1'''	105.45, 105.32	105.2	4.30 (d, 5.6), 4.10 (d, 6.2)	4.06 (br s)
2'''	67.46, 67.41	67.3	3.38 (m), 3.38 (m)	3.0 ~ 3.6
3'''	72.83, 72.74	72.8	3.28 (m), 3.23 (m)	3.0 ~ 3.6
4'''	72.02, 71.83	72.0	3.23 (m), 3.17 (m)	3.0 ~ 3.6
5'''a	65.05, 64.85	64.8	3.00 (dd, 3.8, 12.6), 2.97 (dd, 3.5, 12.7)	3.03 (m)
5'''b			2.91 (d, 11.5), 2.91 (d, 11.5)	2.92 (d, 11.4)
Glc 1''''	101.30, 101.25	101.7	5.02 (d, 6.8)	5.03 (d, 7.2)
2''''	74.28, 73.78	74.4	3.33 (m), 3.33 (m)	3.0 ~ 3.6
3''''	77.80, 77.64	77.9	3.52 (m), 3.45 (m)	3.0 ~ 3.6
4''''	70.02, 69.95	70.5	3.49 (m), 3.44 (m)	3.0 ~ 3.6
5''''	76.78, 76.45	76.7	3.32 (m), 3.22 (m)	3.0 ~ 3.6
6''''a	61.35, 60.89	61.3	3.79 (dd, 3.2, 10.7), 3.74 (dd, 3.4, 11.4)	3.0 ~ 3.6
6''''b			3.53 (m)	3.81 (d, 10.7)

测原王不留行黄酮苷的化学结构鉴定可能出现错误。王不留行黄酮苷与化合物 1 很可能就是同一个化合物。

为证实推测,将王不留行黄酮苷对照品做了一维和二维核磁共振谱。其一维谱和化合物 1 相同。根据 NOESY 谱(图 3)和 HMBC 谱(图 4),原王不留行黄酮苷连接在 4' 位上的葡萄糖,修正后应连接于 7 位(图 5)。根据 NOESY 谱, H-8 δ 6.89 (1H, s) 与

7-O- β -D-葡萄糖的端基氢 δ 5.02 (1H, d, $J = 7.1$ Hz) 相关;结合 HMBC 谱, 4' 位羟基氢 δ 10.415 和 10.408 (旋转异构导致信号裂分) 与 4' 位的碳 δ 161.9 和 161.8 以及 3' 位的碳 116.5 (旋转异构导致信号裂分) 有远程相关关系。所以,王不留行黄酮苷的化学结构应修正为芹菜素-6-C-[α -L-阿拉伯糖-(1''' \rightarrow 2'')- β -D-葡萄糖]-7-O- β -D-葡萄糖苷,即化合物 1。

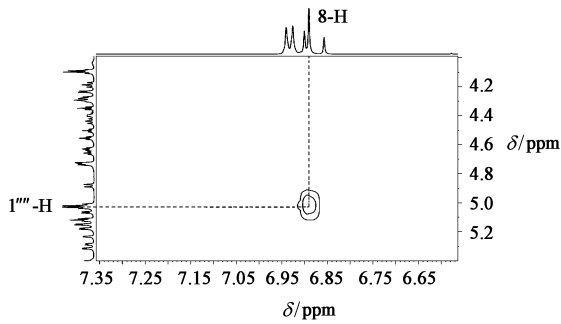


图 3 王不留行黄酮苷对照品 NOE 放大
Fig. 3 Key regions in NOE spectra of standard vaccarin

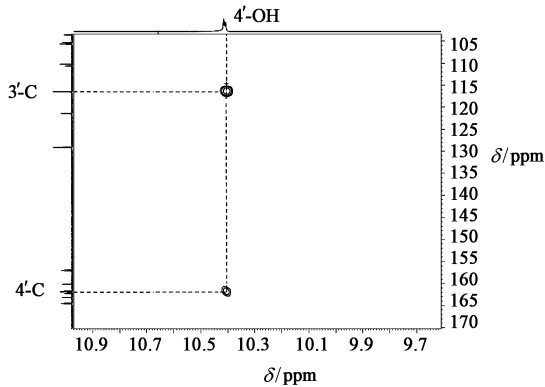


图 4 王不留行黄酮苷对照品 HMBC 放大
Fig. 4 Key regions in HMBC spectra of standard vaccarin

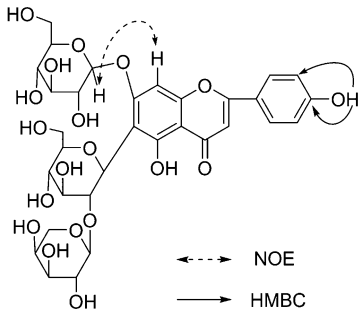


图 5 王不留行黄酮苷更正后的结构及关键的 NOE 和 HMBC 相关
Fig. 5 Corrected structure of vaccarin and its key NOE and HMBC relations

5 讨论

发现原王不留行黄酮苷化学结构鉴定有误, NMR 谱中 4'-OH 的信号是关键。若该活泼氢信号没有出现,对原王不留行黄酮苷化学结构提出质疑是比较困难的。原因是 C-7 和 C-4' 的化学位移非常相近,仅仅凭借葡萄糖端基氢的 HMBC 谱无法确定葡萄糖的连接位置。核磁共振氢谱和 HMBC 谱中 4'-OH 的信号是较难得到的。如果要得到明显信号,需要在实验中选择较低的样品浓度,并且以 DMSO- d_6 为溶剂。

2015 年版《中国药典》将王不留行黄酮苷作为王不留行药材质量标准的定量成分,因此其化学结构准确性对于国家法典的权威性显得非常重要。对此,笔者提出,王不留行黄酮苷的化学结构应修正为芹菜素-6-C-[α -L-阿拉伯糖-(1''' \rightarrow 2'')- β -D-葡萄糖]-7-O- β -D-葡萄糖苷。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 53.
- [2] SANG S M, XIA Z H, LAO A, et al. Studies on the constituents of the seeds of *Vaccaria segetalis* [J]. *Cheminform*, 2003, 34(23): 811-821.
- [3] 冯旭, 王丽丽, 邓家刚, 等. 王不留行挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. *广西中医药*, 2010, 33(3): 56-57, 61.
- [4] 李娜, 马长华, 刘冬, 等. 炒王不留行的化学成分分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(10): 73-75.
- [5] ZHOU G, TANG L, WANG T, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert: a review [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15(15): 813-827.
- [6] XIE F, CAI W, LIU Y, et al. Vaccarin attenuates the human EA. hy926 endothelial cell oxidative stress injury through inhibition of Notch signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(1): 135-142.
- [7] 秦君, 李庆章, 高学军. 王不留行主要成分对小鼠乳腺上皮细胞增殖及 β -酪蛋白表达的影响 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(8): 2442-2447.
- [8] Baeva R T, Karryev M O, Litvinenko V I, et al. Glycosides of *Vaccaria segetalis*. V. Vaccarine (Russian) [J]. *Chem Nat Compd*, 1974, 10(2): 171-176.
- [9] 桑圣民, 夏增华, 毛士龙, 等. 中药王不留行中黄酮苷类成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2000, 25(4): 29-30.
- [10] 孟贺, 陈玉平, 秦文杰, 等. 王不留行中王不留行黄酮苷的分离与鉴定 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 874-876.
- [11] XU Y, TANG L Y, ZHOU X D, et al. Five new anthraquinones from the seed of *Cassia obtusifolia* [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(6): 1054-1058.
- [12] CHENG G, BAI Y, ZHAO Y, et al. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(45): 8915-8920.
- [13] 徐伟强, 王威, 刘小红, 等. 玉竹叶化学成分 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(21): 112-116.

[责任编辑 顾雪竹]