

## 毛冬青中三萜皂苷类化合物的 NMR 归属\*

张翠仙<sup>1</sup>, 杨金燕<sup>1</sup>, 林朝展<sup>1</sup>, 赵钟祥<sup>1</sup>, 冯育林<sup>2</sup>, 曾陇梅<sup>3</sup>, 祝晨蓁<sup>1</sup>

- (1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006;  
2. 江西中医学院中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006;  
3. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 从岭南地区习用药毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. Et. Arn. 根中分离得到 2 个三萜皂苷类化合物, 经理化及波谱方法鉴定为 ilexsaponin B<sub>1</sub> 和 ilexsaponin B<sub>2</sub>。首次利用 2D NMR 技术对此 2 个化合物的<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C NMR 数据进行了全归属。药理活性研究表明, 毛冬青总皂苷具有明显降低血浆粘度的作用。

**关键词:** 毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. Et. Arn.; 三萜皂苷; NMR 全归属

**中图分类号:** O629.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 01-0042-04

### NMR Assignment for Triterpenoids Saponins from the Root of *Ilex pubescens*

ZHANG Cuixian<sup>1</sup>, YANG Jinyan<sup>1</sup>, LIN Chaozhan<sup>1</sup>, ZHAO Zhongxiang<sup>1</sup>, FENG Yulin<sup>2</sup>,  
ZENG Longmei<sup>3</sup>, ZHU Chenchen<sup>1</sup>

- (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Pharmacy, Guangzhou 510006, China;  
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, National Pharmaceutical Engineering Center (NPEC) for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China;  
3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Two pentacyclic ursane triterpenoids, ilexsaponin B<sub>1</sub> (1) and ilexsaponin B<sub>2</sub> (2), were isolated from the root of *Ilex pubescens*, a traditional Chinese medicine used for the treatment of cardiovascular diseases. They were elucidated by chemical, physical methods and spectroscopic analysis. The NMR spectra data of compounds were recorded and firstly completely assigned by 2D NMR experiments, including <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSBC and HSQC. Preliminary bioassays showed that the saponins from the root of *Ilex pubescens* exhibited potent degrading the plasma viscosity in rats.

**Key words:** *Ilex pubescens*; triterpenoid saponins; NMR assignments

毛冬青为冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属 (*Ilex* L.) 植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. Et. Arn. 的干燥根, 是我国岭南地区习用中药。具有活血通脉、消肿止痛、清热解毒之功效, 临床上广泛应用于治疗冠心病、心绞痛和脉管炎等疾病, 疗效确

切<sup>[1-2]</sup>。前期药理活性研究表明毛冬青总三萜皂苷具有明显降低血浆粘度的作用。在此指导下, 对其乙醇提取物乙酸乙酯萃取部位的化学成分进行深入研究, 经理化性质及波谱方法鉴定, 并与文献对照<sup>[3-4]</sup>, 确定其结构分别为 ilexsaponin B<sub>1</sub> (1) 和

\* 收稿日期: 2008-07-10

基金项目: 国家中医药管理局重大科技专项资助项目 (国中医药科 2001ZDZX005); 广东省中医药管理局基金资助项目 (2007336); 广州中医药大学创新基金资助项目 (2007C016)

作者简介: 张翠仙 (1975 年生), 女, 副教授; 通讯作者: 祝晨蓁; E-mail: zhuchenchen@vip.sina.com

ilixsaponin B<sub>2</sub> (2) (图 1)。本文首次采用 2D 二维 NMR 技术对分离得到两个三萜皂苷的 NMR 信号进行归属。

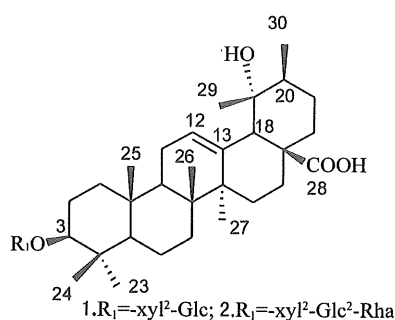


图 1 化合物 1 和 2 的结构图

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

## 1 结果与讨论

化合物 1, 白色针晶,  $\theta_{mp}$  246 ~ 247 °C。Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性。FAB-MS,  $m/z$  799  $[M + H]^+$ , 结合  $^1H$  NMR、 $^{13}C$  NMR 及 DEPT 谱 (表 1, 7 个甲基、11 个亚甲基、15 个次甲基和 8 个季碳) 确定分子式为  $C_{41}H_{66}O_{15}$ , 不饱和度为 9。NMR 显示 1 具有 1 个孤立羧基 [ $\delta_c$  180.7 (s)], 1 个双键 [ $\delta_c$  128.1 (d), 139.9 (s) 和  $\delta_H$  5.65 (br s, 1H)], 除此外无任何其他不饱和信息, 暗示 1 为五环三萜皂苷类化合物。NMR 还显示该化合物结构中具有 2 个连氧亚甲基 [ $\delta_c$  66.7 (t), 62.6 (t),  $\delta_H$  3.70 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.52 (m, 1H)] 8 个连氧次甲基 [ $\delta_c$  88.8 (d), 83.1 (d), 78.3 (d), 71.5 (d), 77.0 (d), 78.0 (d), 70.9 (d), 77.9 (d);  $\delta_H$  3.25 (dd, 2H, 11.2, 4.0), 4.50 (m,

1H) 3.93 (m, 1H) 4.37 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.29 (m, 1H)] 和 1 个连氧季碳 [ $\delta_c$  73.4 (s)]。HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> 给出  $m/z$  821  $[M + Na]^+$ , 659  $[M + Na - 162]^+$ , 527  $[M + Na - 162 - 132]^+$  暗示化合物 1 可能含有 1 个分子葡萄糖和 1 个分子木糖。同时  $^1H$  NMR 数据显示有两个端基质子信号  $\delta_H$  4.84 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz) 和  $\delta_H$  5.38 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz) (图 2), 表明 1 为二糖五环三萜皂苷。

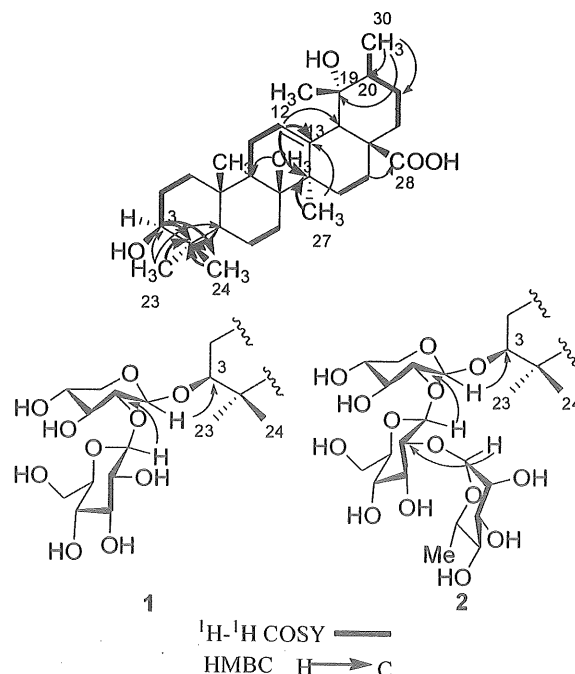


图 2 化合物 1, 2 的  $^1H$ - $^1H$  COSY 和主要 HMBC 相关  
Fig. 2 The  $^1H$ - $^1H$  COSY correlations and key HMBC correlations of compounds 1 and 2

将化合物 1 进行酸水解<sup>[4]</sup>, 糖的 GLC 分析结果表明 (表 2, 3), 两个糖分别为 D-木糖和 D-葡

表 1 化合物 1, 2 苷元的  $^{13}C$  NMR 数据

Table 1  $^{13}C$  NMR (100 MHz) data of the aglycones of 1 and 2

No.	1	2	No.	1	2	No.	1	2
1	38.7 (t)	38.8 (t)	11	24.8 (t)	24.7 (t)	21	23.9 (t)	24.0 (t)
2	27.0 (t)	27.1 (t)	12	127.2 (d)	127.3 (d)	22	32.4 (t)	32.5 (t)
3	88.8 (d)	89.6 (d)	13	139.4 (s)	139.5 (s)	23	28.1 (q)	28.4 (q)
4	39.5 (s)	39.7 (s)	14	42.1 (s)	42.3 (s)	24	15.5 (q)	15.5 (q)
5	55.9 (d)	56.0 (d)	15	29.2 (t)	29.3 (t)	25	16.1 (q)	16.1 (q)
6	18.6 (t)	18.7 (t)	16	26.7 (t)	26.6 (t)	26	17.2 (q)	17.3 (q)
7	33.5 (t)	33.5 (t)	17	47.9 (s)	47.9 (s)	27	24.4 (q)	24.4 (q)
8	40.2 (s)	40.3 (s)	18	47.4 (d)	47.5 (d)	28	180.7 (s)	180.7 (s)
9	47.7 (d)	47.7 (d)	19	73.4 (s)	73.4 (s)	29	29.8 (q)	29.9 (q)
10	37.0 (s)	37.0 (s)	20	43.0 (d)	43.0 (d)	30	16.7 (q)	16.8 (q)

葡萄糖。HMBC 中  $\delta_{\text{H}} 4.84$  (H-1') 与  $\delta_{\text{C}} 88.8$  (C-3),  $\delta_{\text{H}} 5.38$  (H"-1) 与  $\delta_{\text{C}} 83.1$  (C'-2) 之间的相关, 表明该糖链与苷元的 C-3 位相连, 二糖之间 1→2

(Glc 1→2 Xyl-) 连接。将 1 的  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据与文献 [3-4] 对照一致, 确定其为 ilex saponin B<sub>1</sub>。

表 2 化合物 1, 2 苷元的  $^1\text{H}$  NMR 数据 ( $\delta_{\text{H}}$ , J/Hz)<sup>1)</sup>

Table 2  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) data of compounds 1 and 2

No.	1	2	No.	1	2
1	0.94(m, 1H), 1.55(m, 1H)	0.98(m, 1H), 1.55(m, 1H)	16	2.10(m, 1H), 1.88(m, 1H)	2.10(m, 1H), 1.88(m, 1H)
2	2.11(m, 1H), 3.23(m, 1H)	2.10(m, 1H), 3.25(m, 1H)	18	3.30(s, 1H)	3.30(s, 1H)
3	3.25(dd, 2H, 11.2, 4.0)	3.02(dd, 2H, 11.2, 4.0)	20	2.01(m, 1H)	2.02(m, 1H)
5	0.80(m, 1H)	0.87(m, 1H)	21	2.02(m, 2H)	2.03(m, 2H)
6	1.32(m, 1H), 1.50(m, 1H)	1.34(m, 1H), 1.53(m, 1H)	22	1.96(m, 1H), 2.27(m, 1H)	1.98(m, 1H), 2.27(m, 1H)
7	1.38(m, 1H), 1.56(m, 1H)	1.40(m, 1H), 1.63(m, 1H)	23	1.10(s, 3H)	1.35(s, 3H)
9	1.81(m, 1H)	1.85(m, 1H)	24	0.88(s, 3H)	0.86(s, 3H)
11	1.34(m, 1H), 2.72(m, 1H)	1.34(m, 1H), 2.72(m, 1H)	25	1.08(s, 3H)	1.08(s, 3H)
12	5.56(br s, 1H)	5.56(br s, 1H)	26	1.33(s, 3H)	1.34(s, 3H)
15	1.24(m, 1H), 2.31(m, 1H)	1.28(m, 1H), 2.30(m, 1H)	27	1.75(s, 3H)	1.76(s, 3H)
			29	1.44(s, 3H)	1.44(s, 3H)
			30	1.14(68, d, 3H)	1.13(7.2, d, 3H)

1) NMR 的溶剂为  $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$ , 结合 HMQC, HMBC 和 DEPT 确定  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 的归属

表 3 化合物 1, 2 糖基部分 NMR 数据<sup>1)</sup>

Table 3 NMR spectral data of the sugar moieties of compounds 1 and 2

3-O-Sugar	1		2	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)
Xyl-1	105.7(d)	4.84(5.2, d, 1H)	105.8(d)	4.91(6.8, d, 1H)
Xyl-2	83.1(d)	4.50(m, 1H)	79.1(d)	4.47(m, 1H)
Xyl-3	78.3(d)	3.93(m, 1H)	77.9(d)	3.87(m, 1H)
Xyl-4	71.5(d)	4.37(m, 1H)	71.3(d)	4.09(m, 1H)
Xyl-5	66.7(t)	3.70(m, 1H), 4.31(m, 1H)	66.6(t)	3.72(m, 1H), 4.39(m, 1H)
Glc-1	106.0(d)	5.38(7.6, d, 1H)	102.4(d)	5.82(7.5, d, 1H)
Glc-2	77.0(d)	4.12(m, 1H)	79.5(d)	4.25(m, 1H)
Glc-3	78.0(d)	4.25(m, 1H)	79.2(d)	4.28(m, 1H)
Glc-4	70.9(d)	4.17(m, 1H)	71.9(d)	4.09(m, 1H)
Glc-5	77.9(d)	4.29(m, 1H)	78.6(d)	4.31(m, 1H)
Glc-6	62.6(t)	4.45(m, 1H), 4.52(m, 1H)	63.3(t)	4.31(m, 1H), 4.49(m, 1H)
Rha-1			102.1(d)	6.42(br s, 1H)
Rha-2			72.4(d)	4.78(m, 1H)
Rha-3			72.6(d)	4.70(m, 1H)
Rha-4			74.4(d)	4.34(m, 1H)
Rha-5			69.6(d)	5.02(m, 1H)
Rha-6			19.0(q)	1.80(6.0, d, 3H)

1) NMR 的溶剂为  $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$ ; 结合 HMQC, HMBC 和 DEPT 确定  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 的归属

化合物 2, 白色针晶,  $\theta_{\text{mp}}$  240 ~ 241 °C。Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性。FAB-MS,  $m/z$  945  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 结合  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 及 DEPT 谱 (8 个甲基、11 个亚甲基、20 个次甲基和 8 个季碳) 确定其分子式为  $\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$ , 不饱

和度为 10。 $^1\text{H}$  NMR 谱数据显示有三个端基质子信号  $\delta_{\text{H}} 4.91$  (d, 1H,  $J = 6.8$  Hz),  $5.82$  (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz),  $6.42$  (br s, 1H)。HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> 给出  $m/z$  967  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 821  $[\text{M} + \text{Na}-146]^+$ , 659  $[\text{M} + \text{Na}-146-162]^+$ , 527  $[\text{M} + \text{Na}-146-162-132]^+$ ,

表明该化合物为三糖五环三萜皂苷。比较 2 和 1 的 NMR 数据, 二者数据相似, 只是 2 又多了一个甲基五碳糖基信号 [ $\delta_{\text{H}}$  6.42 (br s, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 1.80 (6.0, d, 3H) 和  $\delta_{\text{C}}$  102.1 (d), 72.4 (d), 72.6 (d), 74.4 (d), 69.6 (d), 19.0 (q)]。

同样将 2 进行酸水解<sup>[4]</sup>, 糖的 GLC 分析结果表明 D-木糖、D-葡萄糖和 L-鼠李糖存在。HMBC 中  $\delta_{\text{H}}$  4.91 (H-1') 与  $\delta_{\text{C}}$  89.6 (C-3)、 $\delta_{\text{H}}$  5.82 (H''-1) 与  $\delta_{\text{C}}$  79.1 (C'-2) 及  $\delta_{\text{H}}$  6.42 (H-1''') 与  $\delta_{\text{C}}$  79.5 (C''-2) 之间的相关关系, 证实此三糖连接顺序为 1→2 (Rha 1→2 Glc 1→2 Xyl -) 连接, 并且位于苷元的 C-3 位。将 2 的波谱数据与文献 [4-5] 对照一致, 确定其为 ilexsaponin B<sub>2</sub>。

药理活性研究表明: 毛冬青总皂苷明显降低小鼠血浆黏度, 说明具有很好的心脑血管疾病的应用前景。同时体外生理活性试验研究表明, 三萜类化合物具有抗寄生虫活性和溶血活性。而且具有 28 位游离羧基的五环乌苏烷型三萜类化合物具有很好的抑制锥体虫活性<sup>[7]</sup>。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器、试剂及药材

北京泰克光学仪器厂 X-6 型熔点仪; 英国 VG 公司 ZAB-HS 双聚焦磁质谱仪; 美国 Finnigan 公司 LCQDECAXP 高效液相色谱—质谱联用仪; 瑞士 Bruker 公司 AVANCE AV 400 超导核磁共振仪。层析硅胶 (200~300 目) 为青岛海洋化工厂产品; 溶剂和试剂均为广州化学试剂厂分析纯。

实验药材购自广州致信中药饮片有限公司, 经祝晨葆研究员鉴定为冬青科植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. Et. Arn. 的干燥根, 样品保存于广州中医药大学中药学院中药质量分析研究室 (编号 MDQ2001-1)。

### 2.2 提取与分离

毛冬青根 (10 kg), 粉碎, 用 30 L  $\varphi = 30\%$  乙醇, 于室温下浸提 5 次。将提取液合并, 减压浓缩得棕褐色黏稠膏状物 (1.6 kg)。浸膏加水分散后依次用乙酸乙酯、正丁醇分配萃取, 萃取液减压浓缩, 乙酸乙酯部位得到棕褐色浸膏 (396 g)。将乙酸乙酯部位用硅胶 (200~300 目) 柱减压柱层析, 洗脱剂采用逐渐增大极性的石油醚-乙酸乙酯体系、乙酸乙酯-甲醇体系洗脱。石油醚-乙酸乙酯 (体积比为 0:100) 洗脱剂洗脱得化合物 1 (2.7 g); 乙酸乙酯-甲醇 (体积比为 80:20) 洗脱剂洗脱得化

合物 2 (1.8 g)。

### 2.3 化合物 1 和 2 的酸水解

化合物 (1 和 2 各 5 mg) 用  $\varphi = 9\%$  HCl 水溶液在 90 °C 条件下水解 5 h, 反应结束后冷却。反应液冷冻干燥, 用吡啶溶解, 添加氯化 L-半胱氨酸甲基酯, 在 60 °C 条件下硅醚化, 反应液离心后取上清液用 GLC 检测。

### 2.4 化合物的物理常数和波谱数据

ilexsaponin B<sub>1</sub> (1), 白色针晶,  $\theta_{\text{mp}}$  246 ~ 247 °C。FAB-MS,  $m/z$  799 [M + H]<sup>+</sup>, HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>  $m/z$  821 [M + Na]<sup>+</sup>, 659 [M + Na-glc]<sup>+</sup>, 527 [M + Na-glc-xyl]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR (D<sub>6</sub>-pyridine) 见表 1, 2 和 3。

ilexsaponin B<sub>2</sub> (2), 白色针晶,  $\theta_{\text{mp}}$  240 ~ 241 °C。FAB-MS  $m/z$  945 [M + H]<sup>+</sup>, 927 [M + H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>; HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>,  $m/z$  967 [M + Na]<sup>+</sup>, 821 [M + Na-rha]<sup>+</sup>, 659 [M + Na-rha-glc]<sup>+</sup>, 527 [M + Na-rha-glc-xyl]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR (D<sub>6</sub>-pyridine) 见表 1, 2 和 3。

### 参考文献:

- [1] LIU L, WANG J R, ZHOU H, et al. Saponins derived from *Ilex pubescens* and method of purifying the same [P]. 2008, CODEN: USXXCO US 2008119420 A1.
- [2] 蔡雄, 刘中秋, 祝晨葆, 等. 毛冬青化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 广东药学, 2001, 11: 4-6. CAI Xiong, LIU Zongqiu, ZHU Chenchen. Advance on pharmacologic action, clinical application, and chemical constituents from the *Ilex pubescens* [J]. J Guangdong Pharmacy, 2001, 11: 4-6.
- [3] HIDAKA K, ITO M, MATSUDA Y, et al. A triterpene and saponin from roots of *Ilex pubescens* [J]. Phytochemistry, 1987, 26: 2023-2027.
- [4] HIDAKA K, ITO M, MATSUDA Y, et al. New triterpene saponins from *Ilex pubescens* [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35: 524-529.
- [5] HARA S, OKABE H, MIHSDHI K. Separation of aldose enantiomers by gas-liquid chromatography [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34: 1843-1845.
- [6] WANG J R, ZHOU H, JIANG Z H, et al. Two new triterpene saponins from the anti-inflammatory saponin fraction of *Ilex pubescens* root [J]. Chemistry & Biodiversity, 2008, 5: 1369-1376.
- [7] TEKETA A T C, GNOATTO S C B, GOSMANN G, et al. Triterpenoids from brazilian *Ilex* species and their *in vitro* antitrypanosomal activity [J]. J Nat Prod, 2004, 67: 1697-1700.