挥发油工艺的镇痛效果要强于水蒸气蒸馏提取挥发油工艺。总起来说，SFE-CO_2 萃取法优于水蒸气蒸馏法，此外，超临界萃取法还具有提取时间短、有机残留少等优点。这些研究为该方法用于痛经宝颗粒及其相关制剂的挥发油质量控制提供了初步依据，也为中药复方采用现代化共性关键技术提取工艺提供了参考。

试验结果表明，应用 HPLC 法测定肉桂、木香 CO_2 超临界萃取物中桂皮醛、木香烃内酯和去氢木香内酯的含量，稳定性、重现性、灵敏度均符合定量要求，方法简便易行，可做为该萃取物的质量控制指标之一。

参考文献：

[1] 中国药典[S]. 一部，2005：92.
[2] 中国药典[S]. 一部，2005：42.
[3] 冼寒梅，黄海滨，陈燕军. 肉桂泡汁和煎液中桂皮醛含量的气相色谱分析[J]. 广西植物，1996，16(2)：188.
[4] 王永兵，王 强，毛福林，等. 木香的药效学研究[J]. 中国药科大学学报，2001，32(2)：146.
[5] 黄纪念，屠鹏坛，蔡同一. 超临界 CO_2 流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的工艺研究[J]. 中草药，2004，35(2)：150.
[6] Taylor L. Trends in supertical fluid chromatography[J]. *J Chromatogr Sci*, 1997, 35：374.

马兰三萜类化学成分研究

刘劲松[1]， 王 刚[1]， 王国凯[1]， 余 波[2]， 王 飞[3]， 刘吉开[3]
(1. 安徽中医学院药学院，现代中药安徽省重点实验室，安徽 合肥 230031；2. 上海市闵行区中心医院药剂科，上海 201100；3. 中国科学院昆明植物研究所，植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室，云南 昆明 650204)

关键词：马兰；分离鉴定；三萜化合物；肝保护

摘要：目的：研究马兰的活性成分。方法：采用硅胶柱色谱和凝胶柱色谱 Sephadex LH-20 进行分离纯化，通过理化方法和波谱数据分析进行结构鉴定。结果：从 80% 乙醇提取物中分离并鉴定了 5 个三萜类化合物，分别为 gult-5-en-3β-ol(Ⅰ)、3β-乙酰基-20(21)，24-二烯达玛烷(Ⅱ)、木栓酮(Ⅲ)、3β-乙酰基-20(21)，23-二烯-25-达玛醇(Ⅳ)、2α，3β，19α，23-四羟基-齐墩果烷-12-烯-28-酸(Ⅴ)。结论：除化合物Ⅱ、Ⅲ，其余化合物均为首次从该属植物中分得，化合物Ⅴ对 CCl_4 诱导的肝损伤有一定的保护作用。

中图分类号：R284.1 文献标识码：A 文章编号：1001-1528(2010)03-0462-03

马兰为菊科马兰属植物马兰(*Kalimeris indica*(L.) Sch-Bip)的全草，为一民间用草药，资源丰富、价格低廉，也常作为野菜食用，用马兰或以马兰为君药的复方有效治疗乙肝病的各类临床研究多有报道[1-4]，且疗效显著。而马兰化学成分研究报道[5,6]并不充分。为此本研究对马兰进行了系统的研究。通过硅胶及凝胶柱色谱分离，从其中 80% 乙醇提取物中分离并鉴定了 5 个三萜化合物，分别为 gult-5-en-3β-ol(Ⅰ)、3β-乙酰基-20(21)，24-二烯达玛(3β-acetyl-dammar-20(21)，24-diene，Ⅱ)、木栓酮(friedelin，Ⅲ)、3β-乙酰基-20(21)，23-二烯-25-达玛醇(3β-acetyl-25-Hydroxydammara-20(21)，23-diene，Ⅳ)、2α，3β，19α，23-四羟基-齐墩果烷-12-烯-28-酸(argungenin，Ⅴ)。除化合物Ⅱ、Ⅲ，其余化合物均为首次从该属植物中分得。

1 仪器和材料

NMR 用 Bruker AM-400 和 Bruker DRX-500，以 TMS 为内标；MS 用 VG Autospec-3000；熔点仪为 XRC-1 型显微镜熔点仪，温度计未校正，四川大学科仪厂出品；薄层硅胶及柱色谱硅胶均由青岛海洋化工厂生产；其余试剂均为分析纯。

马兰全草采自安徽合肥，并经安徽中医学院中药教研室方成武副教授鉴定为菊科马兰属植物马兰(*Kalimeris indica*(L.) Sch-Bip)的全草。

收稿日期：2009-03-16
作者简介：刘劲松(1969 -)，男，副教授，从事天然药物化学的教学、科研工作。Tel：(0551)5169227 E-mail：jinsongliu108@sina.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 提取和分离

马兰全草 15 kg，用 80% 乙醇回流提取 3 次（180L×3），每次 2 h，滤过，合并滤液。减压回收溶剂，至稠浸膏。加水使之成混悬液，依次用石油醚（60～90℃）、水饱和正丁醇萃取液，浓缩浸膏。

石油醚部分 150 g 硅胶柱色谱，石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱。经反复硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱纯化，石油醚-乙酸乙酯（100∶1）部分得到化合物Ⅰ（4.5 mg）、化合物Ⅱ（73.5 mg）。石油醚-乙酸乙酯（100∶2）部分得到化合物Ⅲ（6.7 mg）。石油醚-乙酸乙酯（100∶5）部分得到化合物Ⅳ（12.6 mg）。石油醚-乙酸乙酯（1∶1）部分得到化合物Ⅳ（48.0 mg）。

3 结构鉴定

化合物Ⅰ 白色结晶；分子式为 $C_{30}H_{50}O$；mp210～211℃；易溶于石油醚、氯仿等有机溶剂，难溶于丙酮、甲醇等溶剂；Molish 反应呈阴性，Liebermann-Burchard 反应呈阳性。EI-MS *m/z*（%）：426［M^+，4］，274（97），259（100），245（13），205（31），191（15），173（20），152（22），134（48），121（32），109（35），95（46），81（27）。^{1}H-NMR（$CDCl_3$，400 MHz）δ：0.84，0.94，0.98，0.99，1.03，1.08，1.13，1.15（s，CH_3×8），3.46（1H，m，H-3），5.63（1H，m，H-6）。以上数据与参考文献[7]一致，确定该化合物为 gult-5-en-3β-ol。

化合物Ⅱ 白色晶体；分子式为 $C_{32}H_{52}O_2$；mp266～267℃；Liebermann-Burchard 呈阳性。EI-MS *m/z*（%）：468［M^+，19］，453（2），425（3），408（9），357（5），218（17），204（34），190（45），189（100），135（42），109（66），93（49），81（33），69（54）。^{1}H-NMR（$CDCl_3$，400 MHz）δ：0.82～0.96（18H，s，H-18，19，26，27，28，29），1.61（6H，s），2.03（3H，s，OAc），4.47（1H，m，H-3），5.12（1H，t，*J*=8.8 Hz，H-24），4.73（2H，d，*J*=11.0 Hz，H-21）。^{13}C-NMR（$CDCl_3$，100 MHz）δ：37.8（C-1），23.6（C-2），80.9（C-3），37.0（C-4），55.8（C-5），18.1（C-6），35.2（C-7），38.7（C-8），50.7（C-9），38.7（C-10），21.3（C-11），27.0（C-12），47.7（C-13），50.7（C-14），31.3（C-15），28.8（C-16），45.1（C-17），16.2（C-18），16.4（C-19），152.6（C-20），107.4（C-21），34.0（C-22），24.8（C-23），124.4（C-24），131.3（C-25），25.7（C-26），16.4（C-27），27.9（C-28），15.5（C-29），15.8（C-30），170.9（OAc）。以上数据与参考文献[5,8]一致，确定该化合物为 3β-乙酰基-20（21），24-二烯达玛烷（3β-acetyl-dammar-20（21），24-diene）。

化合物Ⅲ 无色针状结晶；分子式为 $C_{30}H_{50}O$；mp261～262℃；Liebermann-Burchard 呈阳性。EI-MS *m/z*（%）：426［M^+，14］，411（7），341（4），302（15），273（37），218（35），205（40），69（93）。^{1}H-NMR（$CDCl_3$，400 MHz）δ：2.31（1H，ddd，*J*=12.8，5.4，2.0 Hz，H-2a），2.31（1H，dd，*J*=12.8，5.4 Hz，H-2b），2.19（1H，q，*J*=6.8 Hz，H-4），2.17（1H，m，H-1a），1.67（1H，m，H-1b），1.48～1.42（8H，m，H-16a，18，10，21a，22a，7a，15a，11a），1.22～1.33（10H，m，H-8，19，7b，16b，12，21b，6b，15b，11b），1.11（3H，s，H-28），0.98（3H，s，H-27），0.94（3H，s，H-26），0.89（3H，s，H-29），0.82（3H，s，H-30），0.80（3H，d，*J*=6.8 Hz，H-23），0.80（3H，s，H-25），0.66（3H，s，H-24）。^{13}C-NMR（$CDCl_3$，100 MHz）δ：22.3（C-1），41.5（C-2），213.3（C-3），58.2（C-4），42.1（C-5），41.3（C-6），18.2（C-7），53.1（C-8），37.4（C-9），59.4（C-10），35.6（C-11），30.5（C-12），39.7（C-13），38.3（C-14），32.7（C-15），36.0（C-16），30.0（C-17），42.8（C-18），35.3（C-19），28.2（C-20），32.4（C-21），39.2（C-22），6.8（C-23），14.6（C-24），17.9（C-25），20.3（C-26），18.7（C-27），32.1（C-28），31.8（C-29），35.0（C-30）。以上数据与参考文献[9]一致，用已知对照品木栓酮 TLC 比较，R_f 值与显色均一致。确定该化合物为木栓酮（friedelin）。

化合物Ⅳ 无色无定型粉末；分子式为 $C_{32}H_{52}O_3$；Liebermann-Burchard 呈阳性。EI-MS *m/z*（%）：484［M^+，8］，466（25），451（7），410（7），391（9），289（35），249（22），229（45），203（40），189（100），161（24），147（38），135（58），119（32），95（22），81（21），69（16）。^{1}H-NMR（$CDCl_3$，500 MHz）δ：4.46（1H，dd，*J*=11.0，6.0 Hz，H-3），4.76（1H，s，21a），4.68（1H，s，21b），2.02（3H，s，OAc），0.96（3H，s，CH_3-18），0.85（3H，s，CH_3-19），1.30（3H，s，CH_3-26），1.30（3H，s，CH_3-27），0.84（3H，s，CH_3-28），0.84（3H，s，CH_3-29），0.84（3H，s，CH_3-30）。^{13}C-NMR（$CDCl_3$，100 MHz）δ：171.0（CH_3CO），38.7（C-1），23.7（C-2），80.9（C-3），37.9（C-4），55.9（C-5），18.1（C-6），35.3（C-7），40.5（C-8），50.8（C-9），37.1（C-10），21.3（C-11），24.9（C-12），47.6（C-13），49.4（C-14），31.3（C-15），28.8（C-16），45.1（C-17），16.3（C-18），15.6（C-19），151.4（C-20），

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

109.1(C-21),37.0(C-22),125.5(C-23),139.4(C-24),70.7(C-25),29.8(C-26),29.8(C-27),16.5(C-28),28.0(C-29),15.8(C-30)。以上数据与参考文献[10]一致,确定该化合物为 3β-乙酰基-20(21),23-二烯-25-达玛醇(3β-acetyl-25-hydroxydammara-20(21),23-diene)。

化合物Ⅴ　无色针状结晶;分子式为 $C_{30}H_{48}O_6$;mp293 ~ 294C;难溶于石油醚、氯仿等有机溶剂,易溶于丙酮、甲醇等有机溶剂;Liebermann-Burchard 呈阳性。EI-MS m/z(%):504 [M^+,2],486(3),264(93),246(84),231(68),201(100),185(24)。^{1}H-NMR(CD_3OD,500 MHz)δ:0.69 ~ 1.30(18H,s,H-23,25,26,27,29,30),5.32(1H,t,J = 3.3 Hz,H-12),3.71(1H,m,H-2),3.69(1H,d,J = 9 Hz,H-3),3.30、3.51(各 1H,d,J = 10.6 Hz,H-23);^{13}C-NMR(CD_3OD,125 MHz)δ:47.7(t,C-1),70.0(d,C-2),78.3(d,C-3),45.2(d,C-4),49.4(d,C-5),19.3(t,C-6),34.0(t,C-7),40.7(s,C-8),49.2(d,C-9),39.2(s,C-10),24.9(t,C-11),124.7(d,C-12),144.7(s,C-13),44.1(d,C-14),29.4(t,C-15),29.4(t,C-16),45.2(s,C-17),44.1(d,C-18),82.5(d,C-19),29.4(s,C-20),29.4(t,C-21),34.0(t,C-22),66.4(q,C-23),13.8(t,C-24),17.4(q,C-25),17.8(q,C-26),25.2(q,C-27),182.4(COOH),28.7(q,C-29),25.2(q,C-30)。以上数据与参考文献[11,12]一致,确定该化合物为 2α,3β,19α,23-四羟基-齐墩果烷-12-烯-28-酸(argungenin)。

4　CCK-8 法检测[13-15]

收集生长良好的肝细胞用生长培养液(含 15% 牛胎血清的 DMEM/F12 培养基)重悬细胞,将纯化的细胞放入 5% CO_2 孵箱以 37℃ 培养,待细胞贴壁后隔日换液,细胞长至 80% ~ 90% 的密度,用 0.25% 胰酶消化传代,每 5 天传代一次。以红细胞计数板计数并以台盼蓝检测分离细胞的活性,测出细胞存活率达到 95%,调整细胞密度至 1.5×10^5 个/mL,接种到培养皿或 96 孔板中,每孔 2 mL,待细胞贴壁后 24 h 给细胞换液加药进行试验。

分为正常对照组(不加 CCl_4 损伤)、模型对照组(0、1、20 mmol/L),2α,3β,19α,23-四羟基-齐墩果烷-12-烯-28-酸组(0、50、70、150 μg/mL),在 4 h 细胞贴壁后换液时,按上述各剂量组分别加入四氯化碳,使四氯化碳的终浓度为 1、2、3 μg/mL 给药,6 复孔,细胞置 37℃,5% CO_2 培养箱中培养 24 h,参照 CCK-8 试剂盒说明书进行细胞活力测试,用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度,计算存活百分率。

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验($^*P < 0.05$,$^*P < 0.01$)。

由于药物的溶解性较差,最高的浓度只能配到 150 μg/mL,因此选择 50、70 和 150 μg/mL 进行三个浓度梯度的实验。CCK-8 试剂盒检测结果可知剂量在 50 μg/mL 时即对 CCl_4 诱导的肝损伤有一定的保护作用,且保护作用呈现明显的剂量依赖性。

5　讨论

Chwan-Fwu Lin[6] 等 2007 年从马兰(*Kalimeris indica*(L.) Sch-Bip)乙醇提取物中提取分离了 31 个化合物,并以喜树碱为阳性对照,对化合物进行肝瘤细胞和表皮癌细胞毒活性筛选,其中部分化合物具有一定的抗肿瘤作用。本研究组从马兰(*Kalimeris indica*(L.) Sch-Bip)中分得的 argungenin 经 CCK-8 法测定,对 CCl_4 诱导的肝损伤有一定的保护作用,从而进一步揭示了马兰治疗乙肝病的物质基础。

参考文献:

[1] 周海虹. 中药马兰临床运用举隅[J]. 四川中医,2003,21(4):23-24.
[2] 周海虹. 妙用马兰治肝病[J]. 浙江中医,1994,5:233.
[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会,中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社. 七卷. 2006,886-889.
[4] 杜照全. 马兰鼠曲汤治疗乙肝 64 例[J]. 河南中医药学刊,1996,11(5):30-31.
[5] 林　材,曹佩雪,梁光义. 马兰化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,2006,41(4):251-253.
[6] Lin Chwan-Fwu, Shen Chien-Chang, Chen Chien-Chih, *et al*. Phenolic derivatives from *Aster indicus*[J]. *Phytochemistry*,2007,68(19):2450-2454.
[7] Matsunaga S, Tanaka R, Akagi M. Triterpenoids from *Euphorbiamaculate*[J]. *Phytochemistry*,1988,27(2):535-537.
[8] Sharma S C, Tandon J S. A dammarane triterpene from *commelina undulate*[J]. *Phytochemistry*, 1982,21(9):2420-2421.
[9] Joy K, Winston F T. Friedelane triterpenoids from *pepritessa compta*:complete ^{1}H and ^{13}C assigenments by 2DNMR spectroscopy[J]. *J Nat Prod*,1992,55(11):1626-1630.
[10] Thomas J, Schmidt M R, Hildebrand, *et al*. New dihydrobenzofurans and triterpenoids from roots of *Microglossa pyrifolia*[J]. *Planta Med*, 2003,69:258-264.
[11] Tadashi H, Tatsushi M, Takahiko T, *et al*. The structure of arjungenin. a new sapogenin from *Terminalia arjuna*[J]. *Chem Pharm Bull*, 1976,24(1):178-180.
[12] 单玉培,孔令义. 毛喉鞘蕊花的萜类成分[J]. 中国天然药物,2006,4(4):271-274.
[13] Berry M N, Friend D S. High-yield preparation of isolated parenchymal cells: a biochemical and fine structural study[J]. *J Cell Biol*,1969, 43:506-520.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[4] Orrenius S, Thor H, Rajs J, *et al*. Isolated rat hepatocytes as an experimental tool in the study of cell injury [J]. *Effect Anoxia. Forensic Sci*, 1976, 8 (3): 255-263.

[5] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells [J]. *Methods Cell Biol*, 1976, 13: 29-83.

尖叶长柄山蚂蝗化学成分研究

吴 颖[1], 张前军[2*], 陈 青[2], 谭艾娟[1]
(1. 贵州大学生命科学学院,贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学化学化工学院,贵州 贵阳 550025)

关键词:长柄山蚂蝗属; 尖叶长柄山蚂蝗; 化学成分

摘要:目的:研究尖叶长柄山蚂蝗化学成分。方法:以 75% 乙醇提取,硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱等方法进行分离,根据化合物的理化性质和光谱数据进行结构鉴定。结果:分离鉴定了 5 个化合物,分别为 β-谷甾醇(Ⅰ),正三十烷醇(Ⅱ),木栓酮(Ⅲ),齐墩果酸(Ⅳ),脱镁叶绿素甲酯(Ⅴ)。结论:以上化合物均为首次从该属植物中分离得到。

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1528(2010)03-0465-02

尖叶长柄山蚂蝗(*Podocarpium podocarpum* (DC.) Yang et Huang var. oxyphyllum (DC.) Yang et Huang)为豆科长柄山蚂蝗属植物,亦称逢人打、野豌豆、山马蝗等,主要分布于贵州、四川、广西、广东、陕西、云南、福建、安徽等地。据文献记载,具有祛风除湿、活血解毒的功效。民间主要用于治疗风湿痹痛、崩中、带下、咽喉炎、乳痈、跌打损伤、毒蛇咬伤等症。此外,据《植物名实图考》和《福建药物志》记载,尖叶长柄山蚂蝗还具有治疗哮喘和肝炎的功效[1]。

贵州省尖叶长柄山蚂蝗植物资源丰富,根据文献查阅,目前尚无该植物的化学成分及药理活性报道,为了深入研究尖叶长柄山蚂蝗的药用基础,阐明其有效成分,对尖叶长柄山蚂蝗乙醇提取物的化学成分进行研究,共分离鉴定 5 个化合物:β-谷甾醇(Ⅰ),正三十烷醇(Ⅱ),木栓酮(Ⅲ),齐墩果酸(Ⅳ),脱镁叶绿素甲酯(Ⅴ),所有化合物均首次从该属植物中分离得到。

1 材料和仪器

X-4 数字显示显微熔点测定仪(温度计未校正,北京泰克仪器有限公司);JOEL-ECX500 型 500 MHz 核磁共振仪(TMS 为内标);HPMS5973 质谱仪。柱色谱用硅胶及高效薄层硅胶板均为青岛海洋化工厂出品。Sephadex LH-20 为 GE 公司生产。

尖叶长柄山蚂蝗采自贵州省贵阳市,经贵阳中医学院陈德媛教授鉴定为豆科长柄山蚂蝗属植物尖叶长柄山蚂蝗(*Podocarpium podocarpum* (DC.) Yang et Huang var. oxyphyllum (DC.) Yang et Huang)的全草,标本存于贵州大学化学与化工学院。

2 提取与分离

干燥尖叶长柄山蚂蝗 10 kg 粉碎,用 75% 乙醇冷浸提取 3 次(每次 7 ~ 10 d),减压回收乙醇,得浸膏,加水分散,分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取。减压回收溶剂得到石油醚部位提取物 200 g、乙酸乙酯部位提取物 110 g 和正丁醇部位提取物 500 g。将石油醚部位提取物通过反复硅胶柱层析,用石油醚-乙酸乙酯(100∶1 ~ 1∶1)进行梯度洗脱,从石油醚-乙酸乙酯 10∶1、5∶1 中得到化合物Ⅱ(100 mg),Ⅰ(500 mg)。乙酸乙酯部位提取物经硅胶柱色谱,用石油醚-乙酸乙酯(30∶1 ~ 1∶1)进行梯度洗脱,得到流份 1 ~ 3。流份 1 再经硅胶柱层析,石油醚-乙酸乙酯 20∶1 洗脱得到化合物Ⅲ(10 mg)。流份 2 再经硅胶柱层析,石油醚-乙酸乙酯 5∶1 洗脱得到化合物Ⅳ(9 mg)。流份 3 再经硅胶柱层析,石油醚-乙酸乙酯 3∶1 洗脱得到化合物Ⅴ(30 mg)。

3 结构鉴定

化合物Ⅰ:白色针晶(氯仿)。mp:137 ~ 138 ℃;EI-MS(m/z):414 $[M]^+$,396,381,329,303,255,

收稿日期:2009-05-08
基金项目:贵州省自然科学基金(黔科合丁字[2008]2144)
作者简介:吴 颖(1985 -),女,硕士研究生,研究方向:天然药物化学。Tel:13885115954 E-mail: wuying_531@hotmail.com
* 通讯作者:张前军(1965 -),女,教授,Tel:13007880021 E-mail: qianjunzhang@126.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net