

桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (VI)

谢 雪^{1,2,3}, 张宏达^{1,2,3}, 温建辉^{1,2,3}, 宋亚玲^{1,2,3}, 王雪晶^{1,2,3}, 赵祎武^{1,2,3}, 黄文哲^{1,2,3},
王振中^{1,2,3}, 萧 伟^{1,2,3*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222000

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222000

3. 中药提取精制新技术重点研究室, 江苏 连云港 222000

摘 要: 目的 对桂枝茯苓胶囊内容物正丁醇和醋酸乙酯萃取部位进行化学成分研究。方法 采用多种色谱方法对桂枝茯苓胶囊内容物的正丁醇和醋酸乙酯萃取部位进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据鉴定其结构。结果 从醋酸乙酯和正丁醇层分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为对羟基苯甲酸 (1)、反式邻甲氧基桂皮酸 (2)、反式桂皮酸 (3)、对香豆酸 (4)、2,5-dihydroxy-4-methylacetophenone (5)、没食子酸乙酯 (6); 从正丁醇层分离得到 4 个化合物, 分别为香草酸 (7)、原儿茶酸 (8)、affinoside (9)、benzyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (10)。结论 化合物 1~10 均为首次从该复方中分离得到。

关键词: 桂枝茯苓胶囊; 对香豆酸; 2,5-dihydroxy-4-methylacetophenone; 原儿茶酸; affinoside; benzyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)21-3795-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.21.007

Studies on chemical constituents in Guizhi Fuling Capsule (VI)

XIE Xue^{1,2,3}, ZHANG Hong-da^{1,2,3}, WEN Jian-hui^{1,2,3}, SONG Ya-ling^{1,2,3}, WANG Xue-jing^{1,2,3}, ZHAO Yi-wu^{1,2,3},
HUANG Wen-zhe^{1,2,3}, WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222000 China

3. The Key Laboratory for the New Technique Research of TCM Extraction and Purification, Lianyungang 222000, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the ethyl acetate and *n*-butanol extract of Guizhi Fuling Capsule.

Methods The chemical constituents were isolated and purified by multiple chromatographic methods. Their structures were identified on the basis of the spectral data and physicochemical properties. **Results** Ten compounds were identified as 4-hydroxybenzoic acid (1), *trans*-O-methoxy cinnamic acid (2), *trans*-cinnamic acid (3), 4-hydroxycinnamic acid (4), 2,5-dihydroxy-4-methylacetophenone (5), ethyl gallate (6), vanillic acid (7), protocatechuic acid (8), affinoside (9), and benzyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (10). **Conclusion** Compounds 1—10 are isolated from this plant for the first time.

Key words: Guizhi Fuling Capsule; 4-hydroxycinnamic acid; 2,5-dihydroxy-4-methylacetophenone; protocatechuic acid; affinoside; benzyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside

桂枝茯苓胶囊由桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁和赤芍 5 味中药组成, 是东汉张仲景的经典名方桂枝茯苓汤的现代剂型, 具有化瘀、消癥、活血等功效。临床上主要用于治疗卵巢囊肿、子宫肌瘤、痛经、慢性盆腔炎、子宫内膜异位等妇科疾病^[1], 米内网数据显示其在妇科其他类产品中市场占有率达 14.8%。目前桂枝茯苓胶囊在化学成分研究方面已

取得较大成果, 累计从制剂中分离得到化合物 80 余个^[2-6], 为了进一步阐明该复方的药效物质基础, 支持桂枝茯苓胶囊标准化建设工作, 本研究将桂枝茯苓胶囊复方作为一个有机整体, 采用现代中药化学方法对其中化学成分进行分离纯化、结构鉴定, 探索其药效物质基础及药物配伍后是否有新的化学成分产生。在前期研究的基础上, 本实验对桂枝茯苓

收稿日期: 2016-06-13

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX090402203)

作者简介: 谢 雪, 女, 研究员, 主要从事中药化学成分研究工作。Tel: (0518)81152323 E-mail: 0115jenny@163.com

*通信作者 萧 伟, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: kanionlunwen@163.com

胶囊进行了进一步的化学成分研究,从醋酸乙酯和正丁醇层分离得到 10 个化合物,分别鉴定为对羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid, **1**)、反式邻甲氧基桂皮酸(*trans*-*O*-methoxy cinnamic acid, **2**)、反式桂皮酸(*trans*-cinnamic acid, **3**)、对香豆酸(4-hydroxycinnamic acid, **4**)、2,5-dihydroxy-4-methylacetophenone (**5**)、没食子酸乙酯(ethyl gallate, **6**);从正丁醇层分离得到 4 个化合物,分别鉴定为香草酸(vanillic acid, **7**)、原儿茶酸(protocatechuic acid, **8**)、affinoside (**9**)、benzyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (**10**)。化合物 **1**~**10** 为首次从该复方中分离得到。

1 仪器与材料

Bruker-AV-400 型核磁共振光谱仪(Bruker 公司);Agilent 1260 制备型高效液相色谱仪(Agilent 公司);Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司);柱色谱及薄层硅胶(青岛海洋化工厂);Fuji C₁₈ (250 nm $\times$ 50 nm, 5 μ m);色谱纯乙腈(Oceanpak 公司);分析纯试剂(南京化学试剂有限公司)。桂枝茯苓胶囊(批号 130201)由江苏康缘药业股份有限公司提供。

2 提取与分离

桂枝茯苓胶囊内容物 15.0 kg,以 95%乙醇回流提取 4 次,每次 2 h,提取液经减压浓缩至浸膏,制成水混悬液后依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯和正丁醇萃取,各 4 次,合并萃取液后蒸干备用。取醋酸乙酯萃取部位浸膏(300 g),经硅胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(30:1 $\rightarrow$ 1:1)梯度洗脱,得 9 个流分 Fr. A1~A9。其中 Fr. A1 经 Sephadex LH-20 柱色谱,二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱后,再经制备型 HPLC,以 35%乙腈为流动相洗脱,得到化合物 **1**(27 mg)、**2**(16 mg)、**3**(15 mg)、**4**(35 mg)、**5**(7 mg)和 **6**(100 mg)。

取正丁醇萃取部位浸膏(500 g),经硅胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(20:1 $\rightarrow$ 0:1)梯度洗脱,得 7 个流分 Fr. B1~B7。将 Fr. B3 经 Sephadex LH-20 柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,经制备型 HPLC 分离,以 15%乙腈反复纯化后,得到化合物 **7**(100 mg)、**8**(20 mg)。Fr. B6 经 Sephadex LH-20 柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,经制备型 HPLC 分离,以 10%乙腈反复纯化后,得到化合物 **9**(30 mg)、**10**(40 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末,ESI-MS m/z : 137 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.88 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (100

MHz, CD₃OD) δ : 170.1 (COOH), 163.4 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 122.8 (C-1), 116.1 (C-3, 5)。以上数据与文献报道^[7]一致,故鉴定化合物 **1** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **2**: 白色粉末,ESI-MS m/z : 177 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.97 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-7), 7.56 (1H, dd, J = 7.7, 1.4 Hz, H-6), 7.37 (2H, td, J = 7.7, 1.4 Hz, H-4, 6), 7.03 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-3), 6.96 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-5), 6.51 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-8), 3.89 (3H, s, OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 169.8 (C=O), 158.3 (C-2), 140.0 (C-7), 131.4 (C-4), 128.2 (C-6), 123.0 (C-1), 120.4 (C-8), 118.3 (C-5), 111.0 (C-3), 54.7 (OCH₃)。以上数据与文献报道^[8]一致,故鉴定化合物 **2** 为反式邻甲氧基桂皮酸。

化合物 **3**: 无色针晶(甲醇),ESI-MS m/z : 147 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.68 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.57 (2H, m, H-3, 5), 7.39 (3H, m, H-2, 4, 6), 6.48 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 169.0 (C-9), 145.0 (C-8), 134.4 (C-1), 130.0 (C-4), 128.6 (C-2, 6), 127.8 (C-3, 5), 118.0 (C-7)。以上数据与文献报道^[9]一致,故鉴定化合物 **3** 为反式桂皮酸。

化合物 **4**: 无色针晶(甲醇),ESI-MS m/z : 163 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.60 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- α), 7.45 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2, 6), 6.81 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3, 5), 6.28 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- β); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 171.1 (C-9), 161.2 (C-4), 146.7 (C-7), 131.1 (C-2), 127.3 (C-1), 116.9 (C-3, 5), 115.7 (C-8)。以上数据与文献报道^[10]一致,故鉴定化合物 **4** 为对香豆酸。

化合物 **5**: 白色粉末,ESI-MS m/z : 165 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.12 (1H, s, H-6), 6.66 (1H, s, H-3), 2.53 (3H, s, COCH₃), 2.20 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 202.3 (C-7), 153.8 (C-5), 146.0 (C-2), 134.8 (C-4), 117.3 (C-3), 115.7 (C-1), 112.3 (C-6), 23.7 (C-8), 14.0 (C-9)。以上数据与文献报道^[11]一致,故鉴定化合物 **5** 为 2,5-dihydroxy-4-methylacetophenone。

化合物 **6**: 无色针晶(甲醇),ESI-MS m/z : 197 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.05 (2H, s, H-2, 6), 4.27 (2H, q, J = 7.0 Hz, H-8), 1.34 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-9); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 167.2 (C-7), 145.1 (C-3, 5), 138.3 (C-4), 120.4 (C-1), 108.6 (C-2, 6), 60.3 (C-8), 13.2 (C-9)。以上数据与文

献报道^[12]一致, 故鉴定化合物 **6** 为没食子酸乙酯。

化合物 **7**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 167 $[M-H]^-$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.56 (2H, m, H-2, 6), 6.84 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 3.89 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 170.0 (COOH), 152.5 (C-4), 148.5 (C-3), 125.1 (C-6), 123.0 (C-1), 115.7 (C-5), 113.7 (C-2), 56.2 (OCH₃)。以上数据与文献报道^[7]一致, 故鉴定化合物 **7** 为香草酸。

化合物 **8**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 153 $[M-H]^-$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.42 (2H, m, H-2, 6), 6.79 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 170.3 (C-7), 151.4 (C-4), 145.9 (C-3), 123.8 (C-5), 123.3 (C-1), 117.6 (C-2), 115.6 (C-6)。以上数据与文献报道^[10]一致, 故鉴定化合物 **8** 为原儿茶酸。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 459 $[M-H]^-$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.75 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 6.85 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3), 6.67 (1H, dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, H-5), 5.06 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.26 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1''), 4.12 (1H, dd, $J = 11.3, 1.9$ Hz, H-6'b), 3.88 (3H, s, OCH₃), 3.83 (1H, dd, $J = 12.4, 5.1$ Hz, H-5''b), 3.78 (1H, dd, $J = 11.6, 6.6$ Hz, H-6'a), 3.70 (2H, m, H-2', 5'), 3.57~3.38 (5H, m, H-3', 4', 2'', 3'', 5''a), 2.64 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 199.1 (C=O), 164.9 (C-4), 159.1 (C-2), 131.6 (C-6), 121.4 (C-1), 107.9 (C-5), 103.8 (C-1''), 101.6 (C-3), 101.0 (C-1'), 76.7 (C-3'), 76.0 (C-3''), 73.5 (C-5'), 72.8 (C-2''), 71.0 (C-2'), 69.9 (C-4'), 68.4 (C-4''), 68.1 (C-6'), 65.4 (C-5''), 55.1 (OCH₃), 30.7 (CH₃)。以上数据与文献报道^[13]一致, 故鉴定化合物 **9** 为 affinoside。

化合物 **10**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 433 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.43~7.26 (5H, m, H-2~6), 4.92 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-7), 4.66 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-7), 4.42 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.37 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1''), 4.17 (1H, dd, $J = 11.6, 1.9$ Hz, H-6'), 3.87 (1H, dd, $J = 11.9, 1.8$ Hz, H-6''), 3.81 (1H, dd, $J = 11.6, 5.8$ Hz, H-6'), 3.67 (1H, dd, $J = 11.9, 5.3$ Hz, H-6''), 3.47 (1H, m, H-4'), 3.39~3.21 (7H, m, H-2', 3', 5', 2'', 3'', 4'', 5''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 139.1 (C-1), 129.3 (C-2, 6), 129.3 (C-3, 5), 128.7 (C-4), 104.9 (C-1''), 103.5 (C-1'), 78.1 (C-3'), 78.0 (C-5''), 77.2 (C-5'), 75.2 (C-2''), 75.1 (C-2'), 72.0 (C-7), 71.6 (C-4''), 71.5 (C-4'), 69.8 (C-6'), 62.8 (C-6'')。以上数据与文献报道^[14]一致, 故鉴定化合物 **10** 为 benzyl-

β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside。

4 讨论

桂枝茯苓胶囊是江苏康缘药业股份有限公司在桂枝茯苓丸的基础上研发而成。目前报道的关于桂枝茯苓胶囊的相关研究较为深入, 研究内容包括药材及成品化学成分、药理、药代、质量标准、生产工艺等方面, 显现出了系统化的研究思路, 即以药理药代研究指认的功效成分为基础, 开展产品功效相关的质量标准、自动化控制体系建设研究, 形成了“以桂枝茯苓胶囊为示范的现代中药功效相关质量标准体系”, 获得 2015 年度国家科技进步二等奖。本研究进一步明确了桂枝茯苓胶囊成分基础, 为产品的质量标准提升、过程控制体系完善以及桂枝茯苓方系列产品的标准化建设、指标成分筛选等方面提供了参考。

参考文献

- [1] 林 芬. 桂枝茯苓丸在妇产科的临床应用进展 [J]. 实用医技杂志, 2007, 14(14): 1870.
- [2] 王振中, 李 成, 李家春, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2011, 42(5): 856-858.
- [3] 朱克近, 王振中, 李 成, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1087-1089.
- [4] 王洪庆, 刘 超, 方莲花, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (IV) [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1386-1390.
- [5] 杨鹏飞, 王振中, 王洪庆, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (III) [J]. 中草药, 2012, 43(3): 463-466.
- [6] 王雪晶, 谢 雪, 罗 鑫, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (V) [J]. 中草药, 2015, 46(6): 812-816.
- [7] 傅志勤, 黄泽豪, 林 婧, 等. 蛇附子化学成分及抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1583-1588.
- [8] 杨 琳, 赵庆春, 谭菁菁, 等. 桂枝的化学成分研究 [J]. 实用药物与临床, 2010, 13(3): 183-185.
- [9] 徐 庆, 覃永俊, 苏小建, 等. 掌叶大黄化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 533-536.
- [10] 张 楠, 储小琴, 蒋建勤. 锦灯笼醋酸乙酯部位化学成分的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1120-1124.
- [11] Sato K, Yoshimura T, Shindo M, et al. Synthesis of *O*-methyl epi-heliannuol E [J]. *J Org Chem*, 2001, 66(1): 309-314.
- [12] 苑 祥, 张 莉, 张建强, 等. 短管兔耳草化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1437-1440.
- [13] Kuwajima H, Shibano N, Baba T, et al. An acetophenone glycoside from *Exacum affine* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 289-292.
- [14] De Rosa S, De Giulio A, Tommonaro G. Aliphatic and aromatic glycosides from the cell cultures of *Lycopersicon* [J]. *Phytochemistry*, 42(4): 1031-1034.