

二至丸处方提取物化学成分的研究

陈腾飞^{1,3}, 萧伟^{2,3*}, 李成^{2,3}, 尚强^{2,3}, 王振中^{2,3}, 祝倩倩¹, 李云¹

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室(筹), 江苏 连云港 222001

摘要:目的 对二至丸处方提取物的醋酸乙酯萃取部位和水饱和正丁醇萃取部位进行化学成分研究。方法 采用柱色谱法进行分离和纯化, 经过波谱分析进行结构鉴定。结果 从二至丸处方提取物的醋酸乙酯和水饱和正丁醇部位共分离得到 11 个单体化合物, 分别鉴定为齐墩果酸(1)、熊果酸(2)、木犀草素(3)、芹菜素(4)、槲皮素(5)、特女贞苷(6)、蟛蜞菊内酯(7)、去甲蟛蜞菊内酯(8)、甘露醇(9)、女贞苷 G13(10)和木犀榄苷二甲酯(oleoside dimethyl ester, 11)。结论 化合物 1~11 均为首次从该复方中得到。

关键词: 二至丸; 特女贞苷; 女贞苷 G13; 蟛蜞菊内酯; 去甲蟛蜞菊内酯

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0447-03

Chemical constituents in extract of Erzhi Pills

CHEN Teng-fei^{1,3}, XIAO Wei^{2,3}, LI Cheng^{2,3}, SHANG Qiang^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, ZHU Qian-qian¹, LI Yun¹

1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of Pharmaceutical New-tech for Chinese Materia Medica, Lianyungang 222001, China

Key words: Erzhi Pills; specnuezhenide; nuezhenoside G13; wedelolactone; demethylwedelolactone

二至丸(Erzhi Pills)出自明·王三才的《医便》,由女贞子、墨旱莲两味药等量组成,是平补肝肾之阴的代表方剂,临床用于治疗肝肾阴虚所致的口苦咽干、头目眩晕、失眠多梦、腰膝酸软、下肢萎软、遗精等症状^[1]。二至丸的临床应用及相关的药理研究已有报道,其物质基础都是以处方药材单独进行研究,而其全方的物质基础研究尚未见报道。为了阐明传统药物治疗疾病的物质基础,本实验以二至丸处方为研究对象,对两味药材合提的醇提取物和水提取物的醋酸乙酯、水饱和正丁醇萃取部位的化学成分进行研究,从中分离得到了 11 个化合物,分别为齐墩果酸(oleanolic acid, 1)、熊果酸(ursolic acid, 2)、木犀草素(luteolin, 3)、芹菜素(apigenin, 4)、槲皮素(queracetin, 5)、特女贞苷(specnuezhenide, 6)、蟛蜞菊内酯(wedelolactone, 7)、去

甲蟛蜞菊内酯(demethylwedelolactone, 8)、甘露醇(D-mannitol, 9)、女贞苷 G13(nuezhenoside G13, 10)和木犀榄苷二甲酯(oleoside dimethyl ester, 11)。

1 仪器与材料

女贞子、墨旱莲药材购于安徽亳州药材市场,经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主管药师鉴定。

Agilent 1200 高效液相色谱仪;核磁共振仪 Bruker AM-500, DRX-500(内标 TMS);显微熔点仪 SGWX-4;Finnigan Trace DSQ 四极杆质谱仪;硅胶(80~100 目, 200~300 目)、薄层硅胶板(100 mm×50 mm)均为青岛海洋化工厂生产, Sephadex LH-20(Pharmacia 公司), YMC gel ODS-A(75 μm, 日本), D101 大孔吸附树脂(山东鲁抗医药股份有限公司生产)。

2 提取与分离

收稿日期: 2010-10-23

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目(2009ZX09313-032)

作者简介: 陈腾飞(1986—)男, 河北省邯郸市人, 南京中医药大学 2008 级硕士研究生, 研究方向为中药新制剂的研发。

Tel: 15861230317 E-mail: flychen04@126.com

*通讯作者 萧伟 E-mail: xw@kanion.com

干燥的女贞子粗粉与墨旱莲小段各 10 kg, 混合均匀后, 95%乙醇加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 减压回收溶剂, 得醇提流浸膏 7.0 kg, 药渣加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 减压回收溶剂, 得水提流浸膏 17.7 kg。合并醇提流浸膏和水提流浸膏, 加水混悬均匀后, 依次用石油醚、醋酸乙酯、水饱和正丁醇进行萃取, 各萃取部位回收溶剂后备用。取醋酸乙酯部位 103.0 g 经硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇 (98:2) 梯度洗脱, 得到的流份再经硅胶柱色谱反复洗脱, 分离出化合物 **1**、**2**、**7**; 以氯仿-甲醇 (95:5) 梯度洗脱得到的流份经硅胶柱和 Saphadex LH-20 凝胶柱反复洗脱, 得到化合物 **3**~**6**。取水饱和正丁醇部位 120.0 g, 经硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇 (70:30) 梯度洗脱, 得到的流份段经硅胶柱色谱反复洗脱, 得到化合物 **7**~**9**; 氯仿-甲醇 (90:10→70:30) 梯度洗脱得到的流份段合并, 回收洗脱剂后, 用 D101 大孔吸附树脂柱进行分离, 依次用水和 30%、60%、95%乙醇进行洗脱, 分别收集洗脱液, 其中 60%乙醇洗脱液回收乙醇后, 再反复经过硅胶柱色谱和 ODS-A (甲醇-水) 分离, 得到化合物 **10** 和 **11**。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, Liebermann-Burchard 反应呈阳性; TLC 的 R_f 值、显色行为及 HPLC 的保留时间均与齐墩果酸对照品一致, 且混合熔点不下降, 故鉴定化合物 **1** 为齐墩果酸。

化合物 **2**: 白色粉末, mp 285~287 °C, Liebermann-Burchard 反应呈阳性; TLC 的 R_f 值、显色行为及 HPLC 的保留时间均与熊果酸对照品一致, 且混合熔点不下降, 故鉴定化合物 **2** 为熊果酸。

化合物 **3**: 黄色粉末, 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应呈阴性, 说明化合物 **3** 为黄酮类化合物, TLC 的 R_f 值、显色行为及 HPLC 的保留时间均与木犀草素对照品一致, 混合熔点不下降, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[2], 故鉴定化合物 **3** 为木犀草素。

化合物 **4**: 黄色粉末, 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应呈阴性, 说明化合物 **4** 为黄酮类化合物, TLC 的 R_f 值、显色行为及 HPLC 的保留时间均与槲皮素对照品一致, 混合熔点不下降, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[3], 故鉴定化合物 **4** 为芹菜素。

化合物 **5**: 黄色粉末, 盐酸-镁粉反应阳性,

Molish 反应呈阴性, 说明化合物 **5** 为黄酮类化合物, TLC 的 R_f 值、显色行为及 HPLC 的保留时间均与槲皮素对照品一致, 混合熔点不下降, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **5** 为槲皮素。

化合物 **6**: 白色粉末, mp 152~155 °C。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.68 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-10), 3.61 (3H, s, -COOCH₃), 4.04, 4.28 (各 1H, m, H-6''), 4.22 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1''), 4.66 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 5.87 (1H, s, H-1), 5.96 (1H, m, H-8), 6.66 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3'', 5''), 7.02 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2'', 6'')。 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 92.85 (C-1), 153.27 (C-3), 129.17 (C-4), 29.95 (C-5), 39.40 (C-6), 170.53 (C-7), 123.04 (C-8), 107.69 (C-9), 12.95 (C-10), 166.09 (C-11), 98.90 (C-1'), 73.18 (C-2'), 73.46 (C-3'), 69.86 (C-4'), 76.37 (C-5'), 61.01 (C-6'), 102.72 (C-1''), 73.18 (C-2''), 77.25 (C-3''), 70.02 (C-4''), 76.43 (C-5''), 63.98 (C-6''), 128.55 (C-1'''), 114.92 (C-2'''), 129.61 (C-3'''), 155.50 (C-4'''), 129.62 (C-5'''), 114.93 (C-6'''), 51.12 (-OCH₃), 70.02 (α-CH₂), 34.79 (β-CH₂)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物 **6** 为特女贞昔。

化合物 **7**: 淡黄色粉末。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.96 (1H, s, 5-OH), 7.22 (1H, s, H-13), 7.30 (1H, s, H-10), 6.46 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.40 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 3.81 (3H, s, OCH₃)。 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 157.92 (C-1), 100.61 (C-2), 154.15 (C-3), 95.82 (C-4), 153.76 (C-5), 92.18 (C-6), 161.03 (C-7), 97.11 (C-8), 156.92 (C-9), 103.47 (C-10), 144.28 (C-11), 143.39 (C-12), 97.83 (C-13), 112.75 (C-14), 147.86 (C-15), 54.68 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **7** 为蟛蜞菊内酯。

化合物 **8**: 白色粉末。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.38 (1H, s, 5-OH), 9.35 (1H, br s, 11-OH), 9.30 (1H, br s, 12-OH), 7.21 (1H, s, H-13), 7.13 (1H, s, H-10), 6.39 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.35 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6)。 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 157.62 (C-1), 100.43 (C-2), 153.81 (C-3), 95.56 (C-4), 153.53 (C-5), 91.89 (C-6), 160.74 (C-7), 96.77 (C-8), 156.73 (C-9), 103.19 (C-10), 144.08 (C-11), 143.04 (C-12), 97.61 (C-13), 112.40 (C-14), 147.45 (C-15)。以上数据与文献报道基本一

致^[6], 故鉴定化合物 **8** 为去甲蟛蜞菊内酯。

化合物 **9**: 白色针晶, mp 168~169 °C, TLC 的 R_f 值、显色行为及 HPLC 的保留时间均与甘露醇对照品一致, 混合熔点不下降, 故鉴定化合物 **9** 为甘露醇。

化合物 **10**: 白色粉末, mp 126~127 °C。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 6.02, 5.91 (各 1H, br s, H-1), 7.56, 7.51 (各 1H, s, H-3), 2.92, 2.75, 2.72, 2.49 (各 2H, m, H-6), 6.17, 6.08 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-8), 1.72, 1.71 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-10), 3.72, 3.67 (1H, s, -OCH₃), 6.02, 5.91 (2H, br s, H-1'), 4.82 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1''), 4.20 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, H-6''a), 4.32 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H-6''b), 4.00 (2H, m, H-α), 2.95 (2H, m, H-β), 7.28 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2, 6'''), 6.98 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3''', 5'')。 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 95.91, 95.74 (C-1), 155.80, 155.71 (C-3), 109.95, 109.87 (C-4), 32.31, 32.29 (C-5), 41.77, 41.61 (C-6), 173.53, 172.17 (C-7), 125.67, 125.48 (C-8), 131.16, 131.07 (C-9), 14.31, 14.24 (C-10), 169.20, 169.18 (C-11), 52.50 (-OCH₃), 101.56, 101.41 (C-1'), 75.50, 75.28 (C-2'), 78.91, 78.90 (C-3'), 72.03, 72.02 (C-4'), 78.46, 78.44 (C-5'), 63.26, 63.19 (C-6'), 104.96 (C-1''), 75.71 (C-2''), 78.45 (C-3''), 72.10 (C-4''), 75.80 (C-5''), 65.53 (C-6''), 71.96 (α-CH₂), 37.11 (β-CH₂), 138.49 (C-1'''), 131.51 (C-2''', 6'''), 123.00 (C-3''', 5'''), 151.0 (C-4''')。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **10** 为女贞苷 G13。

化合物 **11**: 白色粉末。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.91 (1H, s, H-1), 7.51 (1H, s, H-3), 3.99 (1H, dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, H-5), 2.73 (1H, dd, *J* = 14.0, 4.5 Hz, H-6a), 2.44 (1H, dd, *J* = 14.0, 9.0 Hz, H-6b), 3.63 (1H, s, H-7a), 6.09 (1H, q, *J* = 7.0 Hz, H-8), 1.72

(3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-10), 3.70 (1H, s, H-11a), 4.80 (1H, m, H-1'), 3.28~3.40 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.67 3.65 (2H, d, *J* = 12.0 Hz, H-6')。 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 95.70 (C-1), 155.63 (C-3), 109.92 (C-4), 32.36 (C-5), 41.53 (C-6), 174.07 (C-7), 52.65 (C-7a), 125.33 (C-8), 131.06 (C-9), 14.00 (C-10), 169.15 (C-11), 52.37 (C-11a), 101.45 (C-1'), 75.29 (C-2'), 78.94 (C-3'), 71.99 (C-4'), 78.48 (C-5'), 62.23 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **11** 为木犀榄苷二甲酯。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 刘伟, 白素平, 梁会娟, 等. 小叶忍冬藤的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1065-1068.
- [3] 李教社, 赵玉英, 王 邈, 等. 密蒙花黄酮类化合物的分离和结构鉴定 [J]. 药学学报, 1996, 31(11): 849-854.
- [4] 金哲雄, 曲中原. 山茶叶化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1068-1072.
- [5] 石力夫, 曹颖瑛, 陈海生, 等. 中药女贞子中水溶性成分二种新裂环烯醚萜甙的分离和鉴定 [J]. 药理学报, 1997, 32(6): 442-446.
- [6] Kosuge T, Ishida H, Satoh T. Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. IV. on antihemorrhagic principles in *Hypericum erectum* Thunb. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(1): 202-205.
- [7] Fukuyama Y, Koshino K, Hasegawa T, *et al.* New secoiridoid glucosides from *Ligustrum japonicum* [J]. *Planta Med*, 1987, 53(5): 427-431.
- [8] Chien C T, Kuohuang L L, Shen Y C, *et al.* Storage behavior of *Chionanthus retusus* seed and asynchronous development of the radicle and shoot apex during germination in relation to germination inhibitors, including abscisic acid and four phenolic glucosides [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(9): 1158-1167.