

桂枝茯苓胶囊化学成分研究(III)

杨鹏飞¹, 王振中², 王洪庆¹, 李家春², 陈若芸^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 对桂枝茯苓胶囊内容物正丁醇和水萃取部位化学成分进行研究。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20、D-101 型大孔树脂和反相 RP-18 柱色谱等方法进行分离纯化, 利用 MS 和 NMR 等波谱学方法鉴定化合物的结构。结果 分离鉴定了 16 个化合物, 分别为氧化芍药苷(1)、半乳糖醇(2)、咖啡酸(3)、牡丹皮苷 F(4)、去氢土莫酸(5)、猪苓酸 C(6)、3-表去氢茯苓酸(7)、3-表去氢土莫酸(8)、海藻糖(9)、鸟苷(10)、腺苷(11)、丙氨酸(12)、亮氨酸(13)、脯氨酸(14)、精氨酸(15)、 α -D-葡萄糖(16)。结论 化合物 1~16 均为首次从该复方中分离得到。

关键词: 桂枝茯苓胶囊; 氧化芍药苷; 咖啡酸; 去氢土莫酸; 3-表去氢茯苓酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0463-04

Studies on chemical constituents of Guizhi Fuling Capsule (III)

YANG Peng-fei¹, WANG Zhen-zhong², WANG Hong-qing¹, LI Jia-chun², CHEN Ruo-yun¹

1. State Key Laboratory for Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

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

Key words: Guizhi Fuling Capsule; oxypaeoniflorin; caffeic acid; dehydrotumulosic acid; 3-*epi*-dehydropachymic acid

桂枝茯苓胶囊是东汉张仲景的经典名方桂枝茯苓丸的现代剂型, 由桂枝、茯苓、牡丹皮、赤芍、桃仁 5 味中药组成, 具有活血、化瘀、消癥散结之功。临床上常用于卵巢囊肿、子宫内膜异位症、子宫肌瘤、慢性盆腔炎、痛经等妇科血瘀证的治疗^[1]。目前对桂枝茯苓方的研究主要集中于制剂工艺、药物配伍、药理作用及临床应用等方面^[2]。本课题组曾对桂枝茯苓胶囊化学成分进行了系统研究^[3-4], 本实验从该方 50%乙醇提取物的正丁醇萃取部分得到 8 个化合物, 分别鉴定为氧化芍药苷(oxypaeoniflorin, 1)、半乳糖醇(galactitol, 2)、咖啡酸(caffeic acid, 3)、牡丹皮苷 F(mudanpioside F, 4)、去氢土莫酸(dehydrotumulosic acid, 5)、猪苓酸 C(polyporenic acid C, 6)、3-表去氢茯苓酸(3-*epi*-dehydropachymic acid, 7)、3-表去氢土莫酸(3-*epi*-dehydrotumulosic acid, 8); 从该方 50%乙醇提取物的水萃取部分得到化合物 9~16, 分别为海

藻糖(trehalose, 9)、鸟苷(guanosine, 10)、腺苷(adenosine, 11)、丙氨酸(alanine, 12)、亮氨酸(leucine, 13)、脯氨酸(proline, 14)、精氨酸(arginine, 15)、 α -D-葡萄糖(α -D-glucose, 16)。

1 仪器与材料

Boetius 显微熔点仪; Mercury—300/400 型核磁共振谱仪; Agilent 1100LC/MSD Trap SL 型质谱仪; 柱色谱以及薄层色谱用硅胶为青岛海洋化工厂产品; Sephadex LH-20 为 Pharmacia 产品; 反相填料为 ODS(YMC 公司产品); D-101 大孔吸附树脂(南开大学化工厂), Luntech 制备型 HPLC 以及 YMC-Pack ODS-A 反相制备柱(250 mm×20 mm, 5 μ m)。桂枝茯苓胶囊(批号 100301)内容物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), 用 50%乙醇回流提取 4 次, 每次 2 h。提取液减压浓缩成浸膏,

收稿日期: 2011-07-25

基金项目: 国家科技重大专项(2009ZX09504-004); 科技部科技基础性工作专项重点项目(2007FY130100)

作者简介: 杨鹏飞, 男, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。

*通讯作者 陈若芸 Tel/Fax: (010)83161622 E-mail: rych@imm.ac.cn

制成水悬液依次用石油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取,各 4 次,合并各部分萃取液,蒸干备用。取正丁醇部分浸膏 300 g,经 D-101 型大孔树脂柱色谱,用水及 15%、30%、50%、70%、95%乙醇依次洗脱。15%乙醇洗脱液减压浓缩,经硅胶柱色谱,氯仿-甲醇(9:1、8:2、7:3、6:4、1:1、0:1)梯度洗脱。氯仿-甲醇(9:1)洗脱液减压浓缩,反复硅胶柱色谱分离得到化合物 **5** (6.4 mg)、**6** (7.1 mg)、**7** (5.7 mg)、**8** (6.5 mg),氯仿-甲醇(8:2)和(7:3)洗脱部分经反复硅胶柱色谱, Sephadex LH-20 柱色谱,反相柱色谱,制备 HPLC 分离得到化合物 **1** (8.9 mg)、**2** (5.8 mg)、**3** (3.6 mg)、**4** (9.5 mg)。水部分浸膏 300 g,经 D-101 型大孔树脂柱色谱,用水及 10%、30%、60%、95%乙醇依次洗脱,水洗脱部分反复硅胶柱色谱(以氯仿-甲醇洗脱), Sephadex LH-20 以及反相柱色谱分离得到化合物 **9** (26 mg)、**12** (3.5 mg)、**13** (3.1 mg)、**14** (4.2 mg)、**15** (6.1 mg)、**16** (15 mg); 30%乙醇洗脱部分经反复反相柱色谱,甲醇-水洗脱,制备 HPLC 分离得到化合物 **10** (5.2 mg)、**11** (4.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 棕色油状物。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.23 (3H, s, H-10), 1.60 (1H, d, J = 12.3 Hz, H-3a), 1.75 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-7a), 1.96 (1H, d, J = 12.3 Hz, H-3b), 2.29 (1H, dd, J = 12.3, 6.3 Hz, H-7b), 2.93 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-5), 4.34 (1H, d, J = 7.5 Hz, Glc-1'), 4.70 (1H, s, H-8), 5.25 (1H, s, H-9), 6.82 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-3'', 5''), 7.79 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-2'', 6''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 19.1 (C-10), 22.0 (C-7), 42.3 (C-5), 43.6 (C-3), 59.8 (C-8), 61.2 (Glc-6'), 70.0 (Glc-4'), 70.2 (C-6), 73.4 (Glc-2'), 76.9 (Glc-3'), 76.9 (Glc-5'), 84.9 (C-2), 87.5 (C-1), 98.6 (Glc-1'), 100.0 (C-9), 104.7 (C-4), 115.3 (C-Ben-3'', 5''), 131.5 (C-Ben-2'', 6''), 120.1 (C-Ben-1''), 162.2 (C-Ben-4''), 165.5 (C-Ben-7'')。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 **1** 为氧化芍药苷。

化合物 **2**: 白色粉末(丙酮)。mp 187~188 °C。ESI-MS m/z : 205 [M+Na]⁺。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.12 (6H, brs, 6×-OH), 3.70~3.66 (3H, m), 3.39~3.36 (5H, m); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 70.3 (C-2, 5), 69.4 (C-3, 4), 63.3 (C-1, 6)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **2** 为半乳糖醇。

化合物 **3**: 白色粉末(甲醇)。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.32 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 7.26 (1H, dd, J = 1.8, 8.1 Hz, H-6), 6.74 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **3** 为咖啡酸。

化合物 **4**: 白色油状物。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.98 (1H, s, H-9), 1.98 (3H, d, J = 1.2 Hz, H-10), 2.39 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-6 α), 2.58 (1H, dd, J = 6.9, 2.4 Hz, H-5), 3.02 (1H, dd, J = 9.0, 6.9 Hz, H-6 β), 3.16 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-8 α), 3.60 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-8 β), 4.40 (1H, d, J = 7.8 Hz, Glc-1'), 5.62 (1H, s, H-3); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 15.6 (C-9), 19.5 (C-10), 42.6 (C-6), 46.6 (C-5), 60.9 (Glc-6'), 62.8 (C-7), 64.1 (C-8), 70.0 (Glc-4'), 73.3 (Glc-2'), 76.7 (Glc-3'), 76.8 (Glc-5'), 82.9 (C-1), 98.3 (Glc-1'), 120.2 (C-3), 173.2 (C-2), 201.0 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[8-9], 故鉴定化合物 **4** 为牡丹皮苷 F。

化合物 **5**: 白色粉末(吡啶)。mp 270~272 °C。ESI-MS m/z : 485 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 5.63 (1H, d, J = 5.0 Hz, H-7), 5.38 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-11), 4.97 (1H, s, H-31a), 4.84 (1H, s, H-31b), 4.53 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-16), 3.45 (1H, m, H-3), 1.50 (3H, s, H-30), 1.20 (3H, s, H-18), 1.12 (3H, s, H-19), 1.07 (6H, s, H-28, 29), 0.98 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-26), 0.97 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-27); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 156.1 (C-24), 146.4 (C-9), 142.7 (C-8), 121.3 (C-7), 116.6 (C-11), 107.0 (C-31), 78.0 (C-3), 76.4 (C-16), 57.6 (C-17), 49.8 (C-5), 49.4 (C-14), 48.6 (C-20), 45.1 (C-13), 44.4 (C-15), 39.3 (C-4), 37.9 (C-10), 36.3 (C-1), 36.3 (C-12), 34.1 (C-25), 33.2 (C-23), 31.5 (C-22), 28.8 (C-2), 28.7 (C-28), 26.6 (C-30), 23.5 (C-6), 23.0 (C-19), 22.0 (C-26), 21.9 (C-27), 17.6 (C-18), 16.6 (C-28)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为去氢土莫酸。

化合物 **6**: 白色粉末(吡啶), mp 263~265 °C。ESI-MS m/z : 505 [M+Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 5.58 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-7), 5.35 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-11), 4.97 (1H, s, H-31a), 4.84 (1H, s, H-31b), 4.53 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-16), 1.45 (3H, s, H-30), 1.23 (3H, s, H-29), 1.12 (3H, s, H-19), 1.06 (6H, s, H-18, 28), 1.01 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-26), 0.99 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-27); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 215.1 (C-3), 156.1 (C-24), 144.7 (C-9),

142.8 (C-8), 120.7 (C-7), 117.7 (C-11), 107.0 (C-31), 76.4 (C-16), 57.6 (C-17), 51.0 (C-5), 49.3 (C-14), 48.6 (C-20), 47.5 (C-4), 45.0 (C-13), 44.3 (C-15), 37.5 (C-10), 36.8 (C-1), 36.3 (C-12), 34.9 (C-2), 34.1 (C-25), 33.2 (C-23), 31.4 (C-22), 26.3 (C-29), 25.6 (C-28), 23.8 (C-6), 22.3 (C-19), 22.0 (C-26), 22.0 (C-28), 21.9 (C-27), 17.6 (C-18)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **6** 为猪苓酸 C。

化合物 **7**: 白色粉末 (吡啶), mp 275~278 °C。ESI-MS m/z : 549 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 5.57 (1H, m, H-7), 5.41 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-11), 4.97 (1H, s, H-31a), 4.84 (1H, s, H-31b), 4.71 (1H, m, H-3), 4.57 (1H, m, H-16), 2.03 (3H, s, -COCH₃), 1.48 (3H, s, H-30), 1.08 (3H, s, H-18), 1.03 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-26), 0.98 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-27), 0.89 (3H, s, H-29), 0.88 (3H, s, H-28); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 178.8 (-COOH), 170.3 (-COCH₃), 156.1 (C-24), 146.3 (C-9), 142.8 (C-8), 121.3 (C-7), 116.4 (C-11), 107.0 (C-31), 77.9 (C-3), 76.6 (C-16), 57.4 (C-17), 49.6 (C-14), 48.6 (C-20), 45.0 (C-13), 44.7 (C-5), 44.4 (C-15), 37.7 (C-10), 36.7 (C-4), 36.2 (C-12), 34.1 (C-25), 33.2 (C-23), 31.5 (C-22), 30.9 (C-1), 28.2 (C-28), 26.4 (C-30), 23.4 (C-2), 23.1 (C-6), 22.6 (C-19), 22.4 (C-29), 22.0 (C-26), 21.9 (C-27), 21.1 (-COCH₃), 17.7 (C-18)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **7** 为 3-表去氢茯苓酸。

化合物 **8**: 白色粉末 (吡啶)。mp 236~237 °C。ESI-MS m/z : 507 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 5.62 (1H, brs, H-7), 5.46 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-11), 4.97 (1H, s, H-31a), 4.83 (1H, s, H-31b), 4.51 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-16), 3.62 (1H, brs, H-3), 1.42 (3H, s, H-30), 1.18 (3H, s, H-28), 1.09 (3H, s, H-19), 1.08 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-26), 0.97 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-27), 0.96 (3H, s, H-29); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 156.1 (C-24), 146.6 (C-9), 142.8 (C-8), 121.3 (C-7), 116.1 (C-11), 107.0 (C-31), 75.1 (C-3), 76.4 (C-16), 57.6 (C-17), 49.5 (C-14), 48.6 (C-20), 45.1 (C-13), 44.4 (C-15), 43.7 (C-5), 37.9 (C-4), 37.9 (C-10), 36.2 (C-12), 34.1 (C-25), 33.2 (C-23), 31.5 (C-22), 30.6 (C-1), 29.2 (C-28), 26.7 (C-30), 26.6 (C-2), 23.4 (C-6), 23.1 (C-29), 23.0 (C-19), 22.0 (C-26), 21.9 (C-27), 17.6

(C-18)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **8** 为 3-表去氢土莫酸。

化合物 **9**: 白色块状结晶 (甲醇-水)。¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ : 5.20 (2H, d, J = 3.6 Hz, H-1, 1'), 3.90~3.70 (6H, m, H-3, 3', 5, 5', 6, 6'), 3.67 (2H, dd, J = 3.6, 10.0 Hz, H-2, 2'), 3.47 (2H, t, J = 10.0 Hz, H-4, 4')。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **9** 为海藻糖。

化合物 **10**: 白色针状结晶 (甲醇), 微溶于甲醇, 不溶于氯仿, 紫外灯 254 nm 下有暗斑。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.12 (1H, s, H-6), 5.67 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1')。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **10** 为鸟嘌呤核苷。

化合物 **11**: 白色针状结晶 (甲醇), mp 234~236 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.33 (1H, s, H-2), 8.12 (1H, s, H-6), 5.86 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-1')。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **11** 为腺嘌呤。

化合物 **12**: 白色粉末 (水), 紫外 (254 nm) 灯下无暗斑, 茚三酮显紫红色, 提示为氨基酸类化合物。与氨基酸对照品共薄层, 茚三酮显色, 其 R_f 值与丙氨酸相同, 故鉴定化合物 **12** 为丙氨酸。

化合物 **13**: 白色粉末 (水), ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ : 0.97 (6H, d, J = 1.8 Hz, H-4, 5), 1.30 (1H, m, H-3), 1.73 (2H, t, J = 5.7 Hz, H-2), 3.74 (1H, t, J = 5.7 Hz, H-1), 以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **13** 为亮氨酸。

化合物 **14**: 白色粉末 (水), EI-MS m/z : 115 $[M]^+$, ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ : 1.96~2.42 (4H, m, H-3, 4), 3.40 (2H, m, H-5), 4.14 (1H, m, H-2); ¹³C-NMR (75 MHz, D₂O) δ : 26.6 (C-4), 31.8 (C-3), 48.9 (C-5), 64.1 (C-2), 177.5 (C-1)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **14** 为脯氨酸。

化合物 **15**: 白色粉末 (水), 紫外 (254 nm) 灯下无暗斑, 茚三酮显紫红色, 提示为氨基酸类化合物。与氨基酸对照品共薄层, 茚三酮显色, 其 R_f 值与精氨酸相同, 故鉴定化合物 **15** 为精氨酸。

化合物 **16**: 白色晶体 (甲醇-水)。mp 145~147 °C。 $[\alpha]_D^{20} + 112 \rightarrow 52$ (c = 1, H₂O, 0~24 h)。ESI-MS m/z : 203 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.17 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-1), 4.88 (1H, t, J = 9.0 Hz, -OH), 4.73 (1H, d, J = 5.1 Hz, -OH), 4.59 (1H, d, J = 8.0 Hz, -OH), 4.42 (1H, d, J = 11.5 Hz, -OH), 4.33

(1H, t, $J = 5.7$ Hz, -OH), 3.59~3.50 (2H, m), 3.45~3.36 (3H, m), 3.11~2.99 (3H, m); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 92.3 (C-1), 73.2 (C-3), 72.5 (C-2), 72.0 (C-5), 70.7 (C-4), 61.3 (C-6)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **16** 为 α -D-葡萄糖。

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] 廖正根, 梁新丽, 平其能, 等. 桂枝茯苓双层缓释片处方设计和优化研究 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 553-557.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 王彦志, 石任兵, 刘 斌. 赤芍化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(4): 267-269.
- [6] Angyal S J. The ^{13}C -NMR spectra of alditols [J]. *Carbohydr Res*, 1980, 84: 201-209.
- [7] 左文健, 陈惠琴, 李晓东, 等. 苦丁茶叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 18-20.
- [8] Lin H C, Ding H Y, Wu T S, *et al.* Monoterpene glycosides from *Paeonia suffruticosa* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 237-242.
- [9] Ding H Y, Wu Y C, Lin H C, *et al.* Glycosides from *Paeonia suffruticosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47(5): 652-655.
- [10] Zhou L, Zhang Y C, Gapter L A, *et al.* Cytotoxic and anti-oxidant activities of Lanostane-type triterpenes D isolated from *Poria cocos* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(10): 1459-1462.
- [11] Horton D, Walaszek Z. Tautomeric equilibria of some sugars by partially relaxed, ^{13}C pulse fourier transform, nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Carbohydr Res*, 1982, 105: 145-153.
- [12] Kang J, Wang H Q, Chen R Y. Studies on the constituents of the mycelia produced from fermented culture of *Flammulina velutipes* (W. Curt.: Fr.) Singer (Agaricomycetidae) [J]. *Int J Med Mushr*, 2003, 5(4): 391-396.
- [13] 王洪庆, 晏仁义, 刘 超, 等. 白树有效成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 413-415.