

# 冬凌草的化学成分研究

刘建群\*, 高俊博, 刘小红(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4724-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.41

**摘要** 目的:研究香茶菜属植物冬凌草的化学成分。方法:采用硅胶、MCI GEL-CHP 20P、Sephadex LH-20柱和重结晶技术对冬凌草的化学成分进行分离纯化,根据理化性质和波谱数据分析鉴定化合物的结构。结果:从冬凌草中分离得到8个化合物,分别鉴定为24 $\zeta$ -甲基-5 $\alpha$ -羊毛甾烷-25-酮(1)、Maoyecrystal F(2)、癭花香茶菜甲素(3)、 $\beta$ -谷甾醇(4)、胡萝卜苷(5)、二十七酸(6)、冬凌草甲素(7)、冬凌草乙素(8)。结论:化合物1为首次从香茶菜属植物分离得到,化合物3和化合物6为首次从冬凌草中分离得到;本研究为冬凌草质量评价奠定了一定基础。

**关键词** 冬凌草; 24 $\zeta$ -甲基-5 $\alpha$ -羊毛甾烷-25-酮; 癭花香茶菜甲素; 二十七酸; 化学成分; 重结晶

## Study on the Chemical Constituents of *Rabdosia rubescens*

LIU Jian-qun, GAO Jun-bo, LIU Xiao-hong (Key Laboratory of Modern TCM Preparation of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the chemical constituents of *Rabdosia rubescens*. METHODS: The chemical constituents of *R. rubescens* were isolated and purified by silica gel, MCI GEL-CHP 20P, Sephadex LH-20 column and recrystallization, and their structure was identified on the base of spectral analysis and physicochemical properties. RESULTS: 8 compounds were isolated in *R. rubescens* and identified as 24 $\zeta$ -methyl-5 $\alpha$ -lanosta-25-ketone (1), maoyecrystal F (2), rosthorin A (3),  $\beta$ -sitosterol (4), daucosterol (5), heptacosanoic acid (6), oridonin (7) and ponicedin (8). CONCLUSIONS: Compound 1 is isolated from *R. genera* for the first time and compound 3, 6 are isolated from this plant for the first time. The research lays a certain foundation for the quality evaluation of *R. rubescens*.

**KEYWORDS** *Rabdosia rubescens*; 24 $\zeta$ -methyl-5 $\alpha$ -lanosta-25-ketone; Rosthorin A; Heptacosanoic acid; Chemical constituent; Recrystallization

冬凌草系唇形科香茶菜属植物碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的地上部分,广泛分布于黄河流域及其以南的广大地区,河南省为其主产区。冬凌草收载于1977年和2010年版《中国药典》,其味甘苦、性微寒,具有清热解毒、消炎止痛等功效。临床多用于咽喉肿痛、扁桃腺炎、蛇虫咬伤等症的治疗,并对食管癌、贲门癌、原发性肝癌、肺癌、前列腺癌和膀胱癌等有一定疗效<sup>[1]</sup>。冬凌草中的主要化学成分包括二萜类、三萜类、甾体类、黄酮类、酚酸类、生物碱、挥发油、氨基酸和有机酸类等<sup>[2]</sup>,其中二萜类成分尤其是冬凌草甲素和冬凌草乙素等对映-贝壳杉烯二萜类化合物具有明显的抗癌活性<sup>[3-4]</sup>。为进一步探讨冬凌草的药效物质基础,笔者对冬凌草中的化学成分进行了深入研究,从其石油醚和乙酸乙酯部位中分离得到8个化合物,化合物1为首次从香茶菜属植物中分离得到,化合物3、6为首次从冬凌草中分离。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Bruker AV-500型核磁共振波谱仪,包括UV2550型紫外-可见分光光度计(瑞士Bruker公司);1200型高效液相色谱(HPLC)仪,包括二级管阵列检测器(美国Agilent公司)。

### 1.2 试剂

冬凌草甲素对照品(南京泽朗医药科技有限公司,批号:20121218,纯度 $\geq 98\%$ );冬凌草乙素对照品(河南济源济世药业有限公司,批号:ky20120821,纯度 $\geq 98\%$ );硅胶G薄层板、

硅胶(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20柱(瑞典法玛西亚公司);MCI GEL-CHP 20P树脂(日本三菱株式会社);乙腈、甲醇为色谱纯,甲醇、乙醇、正丁醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、石油醚、丙酮均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 药材

冬凌草药材购于河南省辉县市太行药材购销站,经笔者鉴定为真品。

## 2 提取与分离

取冬凌草药材约17.6 kg,适当粉碎后,用8倍体积95%乙醇在室温下浸泡12 h,回流提取3次(1.5、1.5、1 h),合并提取液,滤过,滤液于60℃减压浓缩至无醇味,得冬凌草总浸膏1 018.4 g。将浸膏用水分散呈混悬液,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,减压回收溶剂,得冬凌草石油醚部位243 g和乙酸乙酯部位364 g。

取乙酸乙酯部位浸膏300 g,用硅胶(100~200目,4.2 kg)柱层析分离,以不同比例的石油醚-乙酸乙酯(V/V)梯度洗脱,每份约500 ml,分别回收溶剂后经薄层色谱(TLC)鉴定合并,共得到5个不同梯度70个洗脱流份:当石油醚-乙酸乙酯体积比为1:0时得Fr.A(Fr.A-1~Fr.A-3);当石油醚-乙酸乙酯体积比为5:1时得Fr.B(Fr.B-1~Fr.B-27);当石油醚-乙酸乙酯体积比为1:1时得Fr.C(Fr.C-1~Fr.C-18);当石油醚-乙酸乙酯体积比为1:5时得Fr.D(Fr.D-1~Fr.D-10);当石油醚-乙酸乙酯体积比为0:1时得Fr.E(Fr.E-1~Fr.E-12)。

取冬凌草石油醚部位浸膏186 g,经硅胶(200~300目,2 kg)柱层析分离,以不同比例的石油醚-乙酸乙酯(V/V)梯度洗

\* 教授,博士。研究方向:中药活性成分与质量评价。电话:0791-87119027。E-mail:liu5308@sina.com

脱, 每份约 250 ml, 采用薄层色谱鉴别合并, 共得到 6 个不同梯度 93 个洗脱流份: 当石油醚-乙酸乙酯体积比为 1:0 时得 Fr.F (Fr.F-1~Fr.F-16); 当石油醚-乙酸乙酯体积比为 10:1 时得 Fr.G (Fr.G-1~Fr.G-15); 当石油醚-乙酸乙酯体积比为 5:1 时得 Fr.H (Fr.H-1~Fr.H-13); 当石油醚-乙酸乙酯体积比为 1:1 时得 Fr.I (Fr.I-1~Fr.I-15); 当石油醚-乙酸乙酯为 1:5 时得 Fr.J (Fr.J-1~Fr.J-19); 当石油醚-乙酸乙酯体积比为 0:1 时得 Fr.K (Fr.K-1~Fr.K-15)。

Fr.B-12 流份析出沉淀, 经反复重结晶得化合物 6; Fr.C-13 流份经 MCI GEL-CHP 20P (75~150  $\mu\text{m}$ ) 柱分离, 以甲醇-水 (10%~100%) 梯度洗脱, 收集 60%~80% 流份段, 浓缩至固体, 适量甲醇溶解后, 再经过 Sephadex LH-20 柱 (甲醇洗脱) 分离和反复重结晶得化合物 2、8; Fr.D-8 流份经硅胶柱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (1:5, *V/V*) 洗脱, 得化合物 7; Fr.E-6 和 Fr.E-9 流份经硅胶柱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (1:5, *V/V*) 洗脱, 并经 Sephadex LH-20 柱 (甲醇洗脱) 分离纯化和反复重结晶得化合物 3、5; Fr.G-5 和 Fr.H-4 流份析出沉淀, 经 Sephadex LH-20 柱 (甲醇洗脱) 分离和重结晶纯化得化合物 1、4。

### 3 结构鉴定

化合物 1: 白色固体粉末, mp 250~252  $^{\circ}\text{C}$ , ESI-MS  $m/z$ : 429[M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O。 <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$ : 2.24 (1H, m, H-24), 1.18 (3H, s, H-26), 1.05 (3H, s, H-19), 1.01 (6H, s, H-27 和 H-28), 0.96 (3H, s, H-29), 0.88 (6H, *J*=6.4 Hz, H-21 和 H-24'), 0.73 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 39.27 (C-1), 18.26 (C-2), 41.34 (C-3), 38.32 (C-4), 59.55 (C-5), 22.29 (C-6), 32.46 (C-7), 42.86 (C-8), 53.14 (C-9), 37.49 (C-10), 32.83 (C-11), 41.54 (C-12), 42.14 (C-13), 39.73 (C-14), 35.66 (C-15), 30.53 (C-16), 53.14 (C-17), 14.66 (C-18), 18.65 (C-19), 59.55 (C-20), 17.95 (C-21), 35.38 (C-22), 36.05 (C-23), 58.27 (C-24), 212.45 (C-25), 32.11 (C-26), 31.79 (C-27), 20.26 (C-28), 35.38 (C-29), 6.8 (C-24')。以上数据与文献<sup>[5]</sup>报道一致, 故确定化合物 1 为 24 $\zeta$ -甲基-5 $\alpha$ -羊毛甾烷-25-酮。

化合物 2: 无色针状结晶, mp 216~218  $^{\circ}\text{C}$ , ESI-MS  $m/z$  为 409[M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub>。 <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.76 (1H, brs, OH), 5.07 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-6), 4.97 (H, s, H-17), 4.92 (H, s, H-17), 4.24 (1H, s, H-15), 4.09 (1H, d, *J*=9.9 Hz, H-20 $\alpha$ ), 3.90 (1H, d, *J*=9.9 Hz, H-20 $\beta$ ), 3.69 (1H, t, *J*=8.0 Hz, H-11), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.06 (2H, overlap, H-2), 1.07 (3H, s, H-19), 0.77 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta_{\text{C}}$ : 72.15 (C-1), 27.09 (C-2), 38.94 (C-3), 33.32 (C-4), 53.78 (C-5), 74.07 (C-6), 94.23 (C-7), 52.02 (C-8), 48.22 (C-9), 40.21 (C-10), 61.91 (C-11), 41.18 (C-12), 35.71 (C-13), 26.50 (C-14), 73.07 (C-15), 160.53 (C-16), 106.40 (C-17), 31.25 (C-18), 22.01 (C-19), 62.97 (C-20), 21.12 (CH<sub>3</sub>CO), 168.83 (COCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道一致, 故确定化合物 2 为 Maoyecrystal F。

化合物 3: 无色针状结晶, mp 254~256  $^{\circ}\text{C}$ , ESI-MS  $m/z$  为 365[M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>。 <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.17 (1H, s, H-17), 5.63 (1H, s, H-17), 4.76 (1H, s, overlap, H-14), 4.15 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-20 $\alpha$ ), 3.90 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-20 $\beta$ ), 4.09 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-11), 3.70 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-6), 3.05 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-13), 2.90 (1H, ddd, *J*=9.0, 9.0, 14.0 Hz, H-12), 2.19 (1H, d, *J*=8.9 Hz, H-9), 1.12 (3H, s,

H-18), 1.08 (3H, s, H-19); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{\text{C}}$ : 31.19 (C-1), 19.55 (C-2), 41.98 (C-3), 34.88 (C-4), 59.87 (C-5), 74.40 (C-6), 98.39 (C-7), 63.12 (C-8), 61.73 (C-9), 38.70 (C-10), 62.20 (C-11), 42.27 (C-12), 45.30 (C-13), 74.23 (C-14), 209.72 (C-15), 152.28 (C-16), 120.96 (C-17), 33.54 (C-18), 22.55 (C-19), 67.92 (C-20)。以上数据与文献<sup>[7]</sup>一致, 故确定化合物 3 为瘦花香茶菜甲素。

化合物 4: 白色针状结晶, mp 139~141  $^{\circ}\text{C}$ , ESI-MS  $m/z$  为 415[M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O。 <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.38 (1H, d, *J*=4.6 Hz, H-6), 3.55 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, d, *J*=6.4 Hz, H-21), 0.72 (3H, d, *J*=5.3 Hz, H-26), 0.85 (3H, m, H-29); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 36.71 (C-1), 31.13 (C-2), 71.24 (C-3), 41.77 (C-4), 140.7 (C-5), 121.12 (C-6), 31.36 (C-8), 49.62 (C-9), 35.95 (C-10), 20.52 (C-11), 39.24 (C-12), 41.77 (C-13), 56.32 (C-14), 23.79 (C-15), 27.66 (C-16), 55.54 (C-17), 11.63 (C-18), 18.48 (C-19), 35.58 (C-20), 18.21 (C-21), 33.42 (C-22), 25.61 (C-23), 45.32 (C-24), 28.65 (C-25), 19.22 (C-26), 18.41 (C-27), 22.54 (C-28), 11.47 (C-29)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>基本一致, 确定化合物 4 为  $\beta$ -谷甾醇。

化合物 5: 白色固体粉末, mp 286~288  $^{\circ}\text{C}$ , ESI-MS  $m/z$  为 577[M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>。 <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.08 (4H, brs, -OH), 5.35 (1H, brs, H-6), 5.18 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-1'), 4.61, 4.01 (6H, m, H-糖基 CH'), 0.98 (3H, d, *J*=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>-29), 0.93 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, *J*=6.6 Hz, H-21), 0.66 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta_{\text{C}}$ : 37.55 (C-1), 32.14 (C-2), 71.80 (C-3), 39.41 (C-4), 141.00 (C-5), 121.93 (C-6), 36.99 (C-7), 32.23 (C-8), 50.44 (C-9), 36.43 (C-10), 21.34 (C-11), 40.03 (C-12), 42.55 (C-13), 56.91 (C-14), 24.56 (C-15), 28.57 (C-16), 56.34 (C-17), 12.20 (C-18), 19.46 (C-19), 36.40 (C-20), 19.07 (C-21), 34.30 (C-22), 26.54 (C-23), 46.14 (C-24), 29.58 (C-25), 20.00 (C-26), 19.28 (C-27), 23.48 (C-28), 12.03 (C-29), 102.65 (C-1'), 78.21 (C-2'), 78.47 (C-3'), 75.37 (C-4'), 78.64 (C-5'), 62.94 (C-6')。以上数据与文献<sup>[9]</sup>基本一致, 确定化合物 5 为胡萝卜苷。

化合物 6: 白色粉末, mp 86~88  $^{\circ}\text{C}$ , ESI-MS  $m/z$  为 409[M-H]<sup>-</sup>, 分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>54</sub>O<sub>2</sub>。 <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta_{\text{H}}$ : 2.51 (2H, t, *J*=7.4 Hz, H-2), 1.79 (2H, t, *J*=7.3 Hz, H-3), 0.84 (3H, m, H-27); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta_{\text{C}}$ : 175.94 (C-1), 34.91 (C-2), 32.14 (C-3), 30.01 (C-4), 29.64-29.94 (C-5~C-24), 25.68 (C-25), 22.94 (C-26), 14.27 (C-27)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>基本一致, 确定化合物 6 为二十七酸。

化合物 7: 白色针晶, 经薄层色谱法对照分析, 比移值 ( $R_f$ ) 与冬凌草甲素对照品一致, 并进一步采用 HPLC 法确定为冬凌草甲素。

化合物 8: 白色粉末, 经薄层色谱法对照分析,  $R_f$  与冬凌草乙素对照品一致, 并进一步采用 HPLC 法确定为冬凌草乙素。

### 4 讨论

本研究采用硅胶、MCI GEL-CHP 20P 和 Sephadex LH-20 柱和重结晶技术对冬凌草的化学成分进行分离纯化, 根据波谱数据和理化性质进行结构鉴定。从冬凌草中分离得到 8 个化合物, 其中对映-贝壳杉烯二萜类化合物 4 个, 分别为 Maoyecrystal F、瘦花香茶菜甲素、冬凌草甲素和冬凌草乙素。化合物 1 为首次从香茶菜属植物中分离得到, 化合物 3、6 为首

# HPLC法同时测定复方丹参口服液中羟基红花黄色素A和丹酚酸B的含量

彭官良<sup>1\*</sup>,梅昭<sup>1</sup>,孔令提<sup>1,2</sup>(1.三峡大学人民医院/宜昌市第一人民医院药学部,湖北宜昌 443000;2.蚌埠医学院第一附属医院药剂科,安徽蚌埠 233004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4726-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.42

**摘要** 目的:建立同时测定复方丹参口服液中羟基红花黄色素A和丹酚酸B含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为SHIMADZU ODS-C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-0.5%磷酸(35:65, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为403 nm(羟基红花黄色素A)、286 nm(丹酚酸B),柱温为35℃,进样量为20 μl。结果:羟基红花黄色素A、丹酚酸B检测质量浓度线性范围分别为2.01~20.10、39.80~398.00 μg/ml( $r$ 均为0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为98.26%~101.25%、98.70%~101.35%,RSD分别为0.94%、0.71%( $n=9$ )。结论:该方法简便可行、重复性好,可用于复方丹参口服液中羟基红花黄色素A和丹酚酸B的含量测定。

**关键词** 复方丹参口服液;羟基红花黄色素A;丹酚酸B;高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of Hydroxysafflor Yellow A and Salvianolic Acid B in Compound Danshen Oral Solution by HPLC

PENG Guan-liang<sup>1</sup>, MEI Zhao<sup>1</sup>, KONG Ling-ti<sup>1,2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, People's Hospital of Three Gorges University / the First People's Hospital of Yichang, Hubei Yichang 443000, China; 2.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui Bengbu 233004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination the contents determination of hydroxysafflor yellow A and salvianolic acid B in Compound danshen oral solution. METHODS: HPLC was performed on the column of SHIMADZU ODS-C<sub>18</sub> with mobile phase of methanol -0.5% phosphoric acid (35:65, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 403 nm for hydroxysafflor yellow A and 286 nm for salvianolic acid B and column temperature was 35℃, the volume injection was 20 μl. RESULTS: The linear range was 2.01-20.10 μg/ml for hydroxysafflor yellow A ( $r=0.999\ 9$ ) and 39.80-398.00 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ) for salvianolic acid B. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 98.26%-101.25% (RSD=0.94%,  $n=9$ ) and 98.70%-101.35% (RSD=0.71%,  $n=9$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is feasible and reproducible, and can be used for the contents determination of hydroxysafflor yellow A and salvianolic acid B in Compound danshen oral solution.

**KEYWORDS** Compound danshen oral solution; Hydroxysafflor yellow A; Salvianolic acid B; HPLC

次从冬凌草中分离。对映-贝壳杉烯二萜是一类有显著抗癌活性的天然化合物,具有很好的开发应用前景。本研究为冬凌草质量评价奠定了一定基础。

### 参考文献

- [1] 刘军楼,金妙文.冬凌草甲素抗消化系肿瘤的研究进展[J].中国民族民间医药,2015,24(6):26.
- [2] 郭萍,李玉山,郭远强.冬凌草化学成分和药理活性研究进展[J].药物评价研究,2010,33(2):144.
- [3] 朱楠.冬凌草甲素抗肿瘤机制的研究进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2012,33(13):1785.
- [4] 刘晓丹,刘文达,徐妍,等.冬凌草乙素对白血病K562细胞的诱导凋亡作用及机制研究[J].中国中药杂志,2010,35(16):2161.

- [5] 赵湘湘,郑承剑,秦路平.黄荆子的化学成分研究[J].中草药,2012(12):2346.
- [6] Zhang JX, Han QB, Zhao AH. Diterpenoids from *Isodon japonica*[J]. *Fitoterapia*, 2003, 74(5):435.
- [7] 李广义,王玉兰.瘦花香茶菜二萜成分的研究[J].药学学报,1984,19(8):590.
- [8] 申向荣,张德志.枳椇子石油醚部位的化学成分研究[J].广东药学院学报,2006,22(6):594.
- [9] Zhang XP, Pei YH, Liu MS. Chemical constituents from the leaves of *Cerbera manghas*[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2010, 3(2):109.
- [10] 张晓琦,戚进,叶文才,等.苍耳茎化学成分的化学研究[J].中国药科大学学报,2004, 35(5):404.

(收稿日期:2014-12-05 修回日期:2015-06-24)

(编辑:张静)

\* 副主任药师。研究方向:临床药学及不良反应监测。电话:0717-6238336。E-mail:ycadrzx@126.com