

·中药化学·

本文引用:欧阳文,罗懿帆,程思佳,张云坤,唐敏,唐纯玉,唐代凤,肖珊,贺玉婷,熊广华,李顺祥.湘产土牛膝中蜕皮甾酮类化合物分离与鉴定[J].湖南中医药大学学报,2018,38(10):1129-1132.

湘产土牛膝中蜕皮甾酮类化合物分离与鉴定

欧阳文^{1,2},罗懿帆^{1,2},程思佳^{1,2},张云坤^{2,3},唐敏^{1,2},唐纯玉^{4,5},唐代凤^{4,5},肖珊¹,贺玉婷¹,熊广华¹,李顺祥^{1,2*}
(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心,湖南长沙410208;
3.湖南食品药品职业学院,湖南长沙410208;4.湖南时代阳光药业股份有限公司,湖南永州410116;
5.湖南省抗感染中药工程技术研究中心,湖南永州410116)

[摘要] 目的 研究湘产特色药材土牛膝化学成分。**方法** 采用乙醇提取、溶剂萃取法初步分离,硅胶、反相硅胶柱层析与溶剂重结晶进行化合物分离纯化,通过波谱数据、理化性质及文献对照对分离得到的化合物进行结构鉴定。**结果** 从土牛膝乙醇提取物中获得7个蜕皮甾酮类化合物,分别为: β -蜕皮甾酮(**1**)、牛膝甾酮(**2**)、水龙骨甾酮B(**3**)、pterosterone(**4**)、24(28)-ecdysterone(**5**)、achyranthesterone A(**6**)、rubrosterone(**7**)。**结论** 化合物**4-7**均为首次从该种植物中分离得到。

[关键词] 土牛膝;化学成分;结构鉴定;蜕皮甾酮

[中图分类号]R284.2

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.10.008

Study on the Ecdysterone Constituents of *Achyranthes aspera* L.

OUYANG Wen^{1,2}, LUO Yifan^{1,2}, CHEN Sijia^{1,2}, ZHANG Yunkun^{2,3}, TANG Min^{1,2}, TANG Chunyu^{4,5},
TANG Daifeng^{4,5}, XIAO Shan¹, HE Yuting¹, XIONG Guanghua¹, LI Shunxiang^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Province
Engineering Research Center of Bioactive Substance Discovery of TCM, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Food and
Drug Vocational College, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Hunan Timesun Pharmaceutical Co. Ltd., Yongzhou, Hunan
410116, China; 5. Hunan Engineering Technology Research Center for Anti-infection Chinese Medicine, Yongzhou, Hunan
410116, China)

[Abstract] **Objective** To study the chemical constituents of *Achyranthes aspera* L. produced in Hunan. **Methods** The constituents were separated and purified by silica gel and ODS column chromatography and their structures were identified on the basis of physicochemical properties, spectral data and reference. **Results** Seven compounds were isolated and identified as β -ecdysterone(**1**), inokosterone (**2**), polypodine B (**3**), pterosterone (**4**), 24(28)-ecdysterone (**5**), achyranthesterone A (**6**), rubrosterone (**7**)。 **Conclusion** Compounds **4-7** were isolated from this plant for the first time.

[Keywords] *Achyranthes aspera* L.; chemical constituents; structure elucidation; ecdysterone.

土牛膝为民间药,别名倒钩草、倒梗草,来源较为复杂,包括苋科植物粗毛牛膝、柳叶牛膝及牛膝野生种的干燥根及根茎^[1]。2009版《湖南省中药材标准》收录土牛膝为苋科植物土牛膝 *Achyranthes*

aspera Linnacus 的干燥根及根茎,秋冬季地上部分枯萎或早春发苗时采挖^[2]。土牛膝主要产于湖南、安徽、浙江等地,在民间主要用于治疗白喉,且疗效显著。土牛膝具有显著的抗炎药用功能,研究表明土

[收稿日期]2018-03-12

[基金项目] 湖南省工程技术研究中心研究课题(湘科技字[2014]14号);2017年省级大学生研究性学习和创新性实验计划课题(湘教育厅-284);湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目(湘食药科R201806);湖南中医药大学研究生科研创新项目(2017CX27);湖南省“中医学”重点学科开放基金(湘教通[2011]76号)。

[作者简介]欧阳文,男,博士,副教授,研究方向:中药药效物质基础与机制研究。

[通讯作者]* 李顺祥,男,博士,二级教授,博士研究生导师,E-mail:lishunxiang@hotmail.com。

牛膝提取物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀、鸡蛋清引起的大鼠足跖肿胀以及急性炎症导致的腹腔毛细血管通透性均有不同程度的抑制作用^[3]。饶芳等建立家兔声带炎症模型,观察研究了土牛膝提取物对大白兔急性咽喉炎的治疗作用,结果表明土牛膝提取物可以显著抑制家兔急性咽喉炎的症状^[4]。

目前关于土牛膝的物质基础研究国内外报道较少,为充分利用土牛膝植物资源,进一步开发土牛膝的药用价值,本文拟对土牛膝的根及根茎主要化学成分进行研究。

1 仪器与材料

INOVA-600MHz, INOVA-500MHz 高分辨超导核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司); Waters Xevo G2-XS Q-Tof 质谱仪(美国 Waters 公司)。柱层析正相硅胶(80-100 目、200-300 目)(青岛谱科分离材料有限公司);反相硅胶 RP-18 ODS-A (50 μm)(日本 YMC Co. Ltd.), 正相硅胶薄层层析板(青岛海洋化工分厂);反相硅胶薄层层析板(德国默克公司);其他试剂均为分析纯试剂。

土牛膝根采自湖南永州市零陵地区,经湖南中医药大学王智老师鉴定为苋科植物土牛膝 *Achyranthes aspera* Linnacus. 的干燥根及根茎,标本保存在湖南中医药大学中药活性物质筛选工程技术研究中心。

2 提取与分离

取土牛膝粗粉 4.45 kg, 乙醇回流提取 3 次, 65 ℃减压回收溶剂, 加适当水分散, 水分散液分别用石油醚、乙酸乙酯充分萃取, 减压回收各萃取层溶剂, 其中得乙酸乙酯浸膏 45.9 g。乙酸乙酯层浸膏经硅胶常压柱层析, 石油醚-乙酸乙酯、乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱, 共获得 12 个组分(Fr. A-L)。

其中 Fr. K 部分过硅胶柱层析, 经乙酸乙酯-氯仿-甲醇-水梯度洗脱, 共得到 7 个组分 (Fr. K1-K7), 其中 Fr. K3 继续过硅胶柱层析, 经二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 再经过 ODS 柱层析(40%甲醇为流动相), 获得化合物 7(4.8 mg)。

Fr. L 部分经过 ODS 柱层析, 甲醇-水梯度(10%~100%), 共获得 6 个组分(Fr. L1-L6)。其中 Fr. L2 组分经过硅胶柱层析, 氯仿-甲醇梯度洗脱(1%~100%), 共获得 7 个组分。主要组分 Fr. L2-2 经过硅胶柱层析, 氯仿-甲醇(95:5)反复洗脱分离, 得到主要化合物 1(78.3 mg)和化合物 2(52.7 mg),

Fr. L2-3 过 ODS 柱层析, 40%甲醇反复洗脱得化合物 4 (6.3 mg)、50%甲醇洗脱部分获得化合物 5 (5.1 mg)。Fr. L2-4 过 ODS 柱层析, 甲醇-水梯度(10%~100%), 并经 35%甲醇反复洗脱分离, 依次获得化合物 3(7.3 mg)和化合物 6(4.7 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1:白色晶体,紫外光下显暗紫色荧光,香草醛-浓硫酸反应显蓝绿色。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD), δ: 5.87 (1H, d, J=2.4 Hz, H-7), 4.01 (1H, m, H-3), 3.90 (1H, dt, J=13.8, 4.2 Hz, H-2), 3.37 (1H, m, H-22), 3.21 (1H, m, H-9), 1.26 (3H, s, H-27), 1.26 (3H, s, H-21), 1.25 (3H, s, H-26), 1.02 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, s, H-18)。¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD), δ: 206.5 (C-6), 167.9 (C-8), 122.1 (C-7), 85.2(C-14), 78.3 (C-22), 77.9 (C-20), 71.2 (C-25), 68.7 (C-2), 68.5 (C-3), 51.7 (C-5), 50.5 (C-17), 48.5 (C-13), 42.3 (C-24), 39.2 (C-10), 37.3 (C-1), 35.0 (C-9), 32.8 (C-4), 32.4 (C-12), 31.8 (C-15), 29.6 (C-26), 29.0 (C-27), 27.3 (C-23), 24.4 (C-19), 21.5 (C-16), 21.4 (C-11), 21.0 (C-21), 18.0 (C-18)。光谱数据与文献[5]报道的 β-蜕皮甾酮一致,确定该化合物为 β-蜕皮甾酮。

化合物 2:无色针状结晶,紫外光下可见暗紫色荧光,该化合物的比移值与 β-蜕皮甾酮相似,香草醛-浓硫酸反应显示红色。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD), δ: 5.83 (1H, d, J=2.5 Hz, H-7), 3.97 (1H, m, H-3), 3.86 (1H, dt, J=11.5, 3.5Hz, H -2), 3.48 (1H, m, H-22), 3.38 (2H, m, H-26), 3.17 (1H, m, H-9), 1.19 (3H, s, H-21), 0.96 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-18)。¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD), δ: 206.5 (C-6), 167.9 (C-8), 122.1 (C-7), 85.2 (C-14), 78.2 (C-22), 77.8 (C-20), 68.6 (C-2), 68.5 (C-3), 68.1 (C-26), 51.7 (C-5), 50.4 (C-17), 48.5 (C-13), 39.2 (C-10), 37.3 (C-1), 36.8 (C-25), 35.0 (C-9), 32.5 (C-4), 32.0 (C-15), 31.7 (C-12), 31.7 (C-24), 30.1 (C-23), 24.4 (C-19), 21.4 (C-16), 21.4 (C-11), 21.0 (C-21), 18.0 (C-27), 17.5 (C-18)。与文献[6]数据比较基本一致,故确定该化合物为牛膝甾酮。

化合物 3:白色结晶性粉末,紫外光下可见暗紫色荧光。负离子模式 ESI-MS 给出准分子离子峰 531(M+2H₂O-H) 和 1027(2M+2H₂O-H), 确定该化合物分子量为 496。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD),

δ : 5.87 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-7), 4.00 (1H, m, H-3), 3.95 (1H, m, H-2), 3.21 (1H, m, H-9), 1.22 (3H, s, H-21), 1.21 (3H, s, H-26), 1.21 (3H, s, H-27), 0.94 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-18). ^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD), δ : 202.4 (C-6), 167.5 (C-8), 120.6 (C-7), 85.0 (C-14), 80.3 (C-5), 78.4 (C-22), 77.9 (C-20), 71.3 (C-25), 70.2 (C-2), 68.4 (C-3), 50.4 (C-17), 48.6 (C-13), 45.4 (C-10), 42.4 (C-24), 39.0 (C-9), 36.2 (C-1), 34.2 (C-4), 32.6 (C-12), 31.7 (C-15), 29.7 (C-26), 28.9 (C-27), 27.3 (C-23), 22.5 (C-11), 21.4 (C-16), 21.0 (C-21), 18.0 (C-18), 16.9 (C-19)。与文献[7]比较, 数据基本一致, 故确定该化合物为水龙骨甾酮 B。

化合物 4: 为无色针晶(甲醇), 紫外光下可见暗紫色荧光。负离子模式 ESI-MS 给出准分子离子峰 515(M+2H₂O-H) 和 995(2M+2H₂O-H), 确定该化合物分子量为 480。 ^1H -NMR (500 MHz, CD₃OD), δ : 5.83 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-7), 3.97 (1H, brs, H-3), 3.85 (1H, dt, $J=11.5$, 3.5 Hz, H-2), 3.60 (1H, m, H-24), 3.60 (1H, m, H-22), 3.17 (1H, m, H-9), 1.23 (3H, s, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-27), 0.92 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-26), 0.91 (3H, s, H-18). ^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD), δ : 206.4 (C-6), 167.9 (C-8), 122.1 (C-7), 85.2 (C-14), 77.7 (C-22), 77.6 (C-20), 77.5 (C-24), 68.8 (C-2), 68.5 (C-3), 51.8 (C-5), 50.5 (C-17), 48.7 (C-13), 39.3 (C-10), 37.4 (C-1), 35.8 (C-23), 35.1 (C-9), 34.2 (C-25), 32.9 (C-4), 32.5 (C-12), 31.8 (C-15), 24.4 (C-19), 21.5 (C-16), 21.5 (C-11), 20.9 (C-21), 19.3 (C-27), 18.0 (C-18), 17.0 (C-26)。以上数据与文献[8]的 pterosterone 数据吻合。在该化合物 HMBC 图中, δ_{H} 0.91 (3H, s, H-18) 与 δ_{C} 48.7(C-13) 相关, 表明 δ_{C} 48.7(C-13) 信号被溶剂峰掩盖。

化合物 5: 白色结晶性粉末, 紫外光下可见暗紫色荧光。负离子模式 ESI-MS 给出准分子离子峰 527(M+2H₂O-H) 和 1019(2M+2H₂O-H), 确定该化合物分子量为 492。 ^1H -NMR (500 MHz, CD₃OD), δ : 5.83 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-7), 5.15 (1H, brs, H-25), 4.97 (1H, brs, H-25), 3.97 (1H, m, H-3), 3.86 (1H, dt, $J=11.5$, 3.5 Hz, H-2), 3.61 (1H, dd, $J=10.5$, 2.0 Hz, H-22), 3.15 (1H, m, H-9), 1.39 (3H, s, H-26), 1.34 (3H, s, H-27), 1.25 (3H, s, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, s, H-18)。

^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD), δ : 206.5 (C-6), 167.9 (C-8), 155.3 (C-24), 122.1 (C-7), 110.4 (C-28), 85.3 (C-14), 78.0 (C-22), 77.8 (C-20), 73.6 (C-25), 68.7 (C-2), 68.5 (C-3), 51.8 (C-5), 50.4 (C-17), 48.4 (C-13), 39.3 (C-10), 37.4 (C-1), 35.0 (C-9), 34.6 (C-23), 32.8 (C-4), 32.5 (C-12), 31.7 (C-15), 30.2 (C-26), 29.7 (C-27), 24.4 (C-19), 21.5 (C-11), 21.5 (C-16), 21.0 (C-21), 18.0 (C-18)。与文献[9]比较, 数据基本一致, 故确定该化合物为 24(28)-ecdysterone。

化合物 6: 白色结晶性粉末, 紫外光下可见暗紫色荧光。 ^1H -NMR (500 MHz, CD₃OD), δ : 5.81 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-7), 3.95 (1H, brs, H-3), 3.81 (1H, m, H-2), 3.81 (2H, m, H-21), 3.42 (1H, m, H-22), 3.21 (1H, m, H-9), 1.21 (3H, s, H-27), 1.20 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-18). ^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD), δ : 206.4 (C-6), 167.9 (C-8), 122.1 (C-7), 85.3 (C-14), 79.2 (C-20), 78.7 (C-22), 71.3 (C-25), 68.6 (C-2), 68.5 (C-3), 67.0 (C-21), 51.7 (C-5), 48.3 (C-17), 48.2 (C-13), 42.5 (C-24), 39.2 (C-10), 37.3 (C-1), 35.0 (C-9), 32.8 (C-4), 31.7 (C-12), 31.6 (C-15), 29.6 (C-26), 29.0 (C-27), 27.8 (C-23), 24.3 (C-19), 21.5 (C-16), 21.4 (C-11), 18.0 (C-18)。与文献[10]比较, 数据基本一致, 故确定该化合物为 achyranthessterone A。

化合物 7: 白色结晶性粉末, 紫外光下可见暗紫色荧光, 香草醛硫酸显紫红色, ^1H -NMR (600 MHz, CD₃OD), δ : 5.89 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-7), 3.95 (1H, brs, H-3), 3.82 (1H, dt, $J=11.4$, 4.2 Hz, H-2), 3.18 (1H, m, H-9), 0.98 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-18). ^{13}C -NMR (150 MHz, CD₃OD), δ : 220.2 (C-17), 205.9 (C-6), 164.6 (C-8), 122.4 (C-7), 80.4 (C-14), 68.6 (C-2), 68.4 (C-3), 54.0 (C-13), 52.0 (C-5), 39.3 (C-10), 37.3 (C-1), 35.8 (C-9), 34.0 (C-16), 32.9 (C-4), 29.1 (C-15), 24.9 (C-12), 24.5 (C-19), 20.6 (C-11), 17.6 (C-18)。以上数据与文献[11]比较, 基本一致, 故确定该化合物为 rubrosterone。同时化合物结构进一步经过 HSQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY 二维核磁共振谱确证。如图 1 所示, HMBC 谱中可见: δ_{H} 5.89 (H-7) 与 δ_{C} 52.0 (C-5), 35.8 (C-9), 80.4 (C-14) 相关; δ_{H} 0.87 (H-18) 与 δ_{C} 220.2 (C-17), 80.4 (C-14), 24.9 (C-12) 相关; δ_{H} 0.98 (H-19) 与 δ_{C} 52.0 (C-5), 37.3 (C-1), 35.8 (C-9) 相关。

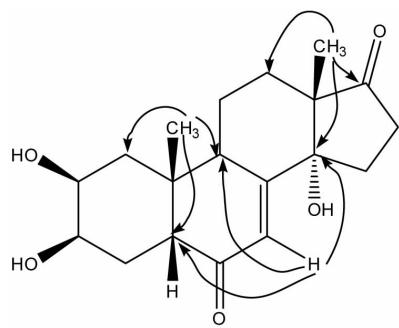


图1 化合物7的关键HMBC

4 讨论

本研究对湘产特色药材土牛膝化学成分进行了深入的研究,且重点围绕蜕皮甾酮类化学成分进行分离,结果共获得了7种单体化合物,分别为蜕皮甾酮(1)、牛膝甾酮(2)、水龙骨甾酮B(3)、pterosterone(4)、24(28)-ecdysterone(5)、achyranthesterone A(6)、rubrosterone(7)。化合物4~7均为首次从该种植物中分离得到,为土牛膝抗炎活性提供了丰富的物质基础。

牛膝按照来源和功效可分为牛膝(怀牛膝)、川牛膝和土牛膝。中医药理论认为,牛膝(怀牛膝)长于补肝肾强筋骨,川牛膝长于活血祛瘀,而土牛膝擅长于清热解毒^[12]。2015版《中华人民共和国药典》收录的牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* B1. 的干燥根,冬季茎叶枯萎时采挖。川牛膝为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan. 的干燥根,秋、冬二季采挖^[13]。前述土牛膝来源较为复杂,包括苋科植物粗毛牛膝、柳叶牛膝及牛膝野生种的干燥根及根茎。在广东民间的广东土牛膝,其植物来源为菊科植物华泽兰 *Eupatorium chinense*. 的根茎,与土牛膝存在显著差异^[14]。

除广东土牛膝外,其余三种牛膝均属于苋科植物,苋科植物主要成分类型是蜕皮甾酮和齐墩果酸

型三萜类化合物。本次研究得到了7种蜕皮甾酮类化合物,体现了土牛膝为苋科植物的特征性,另外这些化合物的活性如何,在3种牛膝之间的具体含量关系,以及是否还有相应的类似结构化合物等,我们将进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 李伟平,何良艳,马哲龙,等.土牛膝多糖抗炎镇痛作用的研究[J].中华中医药学刊,2012,30(4):747~749.
- [2] 湖南省食品药品监督管理局.湖南省中药材标准[S].长沙:湖南科学技术出版,2009:292.
- [3] 欧丽兰,余昕,朱烨,等.土牛膝在急性炎症动物模型中的抗炎作用[J].华西药学杂志,2012,27(6):644~646.
- [4] 饶芳,李荣群,傅华洲,等.土牛膝治疗急性咽喉炎的实验研究[J].现代中西医结合杂志,2009,8(33):4073~4074.
- [5] 董琴琴,颜健,郑梦斐,等.牛膝种子化学成分研究[J].热带亚热带植物学报,2010,18(5):569~572.
- [6] 朱婷婷,梁鸿,赵玉英,等.牛膝甾酮25位差向异构体的分离与鉴定[J].药学学报,2004,39(11):913~916.
- [7] 唐鑫,裴刚,周忠玉,等.牛膝根化学成分研究[J].热带亚热带植物学报,2013,21(1):57~62.
- [8] 梅文莉,曾艳波,丁中涛,等.红树植物卤蕨化学成分的分离与鉴定[J].中国药物化学杂志,2006,16(1):46~48,64.
- [9] 程永现,周俊,谭宁华,等.狗筋蔓中的植物蜕皮甾酮类化合物[J].植物学报,2001,43(3):316~318.
- [10] WANG P, LI S Y, OWNBY S, et al. Ecdysteroids and a sucrose phenylpropanoid ester from *Froelichia floridana* [J]. Phytochemistry, 2009, 70(3):430~436.
- [11] 杨柳,姜海,杨炳友,等.怀牛膝中化学成分的分离与鉴定[J].中医药信息,2012,29(1):22~24.
- [12] 何显玲.牛膝与川牛膝及土牛膝鉴别应用[J].实用中医药杂志,2013,29(2):136~137.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2015:38,72.
- [14] 廖彭莹,张颖君,王一飞,等.广东土牛膝的化学成分[J].2010,32(2):183~188.

(本文编辑 苏维)