

# 短刺海马的化学成分研究

杨毅\*,王真,顾艳玲,徐其平,孔云(嘉兴学院附属第二医院,浙江嘉兴 314000)

中图分类号 R284.1;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1780-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.17

**摘要** 目的:研究短刺海马的化学成分。方法:采用乙醇提取和硅胶柱色谱、Sephadex LH-20柱色谱等手段对样品进行分离纯化,再通过波谱分析并结合文献对照,鉴定化合物的结构。结果:从短刺海马乙醇提取物中分离得到9个化合物,经鉴定为胆甾醇(1)、胆甾-4-烯-3-酮(2)、 $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -三羟基-(22E,24R)-麦角甾-7,22-二烯-6-酮(3)、24-甲基-5 $\alpha$ -胆甾-7,22-二烯-3 $\beta,5,6\beta$ -三醇(4)、3 $\beta$ -羟基-7-甲氧基-胆甾-5-烯(5)、3 $\beta$ -羟基-胆甾-5-烯-7-酮(6)、肌酸酐(7)、鸟嘌呤(8)、腺嘌呤(9)。结论:9个化合物均为首次从短刺海马中分离得到。该结果可为短刺海马的合理利用和进一步产品开发奠定物质基础。

**关键词** 短刺海马;化学成分;甾醇;波谱分析

## Study on Chemical Constituents of *Hippocampus erinaceus*

YANG Yi, WANG Zhen, GU Yan-ling, XU Qi-ping, KONG Yun (The Second Affiliated Hospital of Jiaxing University, Zhejiang Jiaxing 314000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the chemical constituents of *Hippocampus erinaceus*. METHODS: After extracted with ethanol, *H. erinaceus* was purified by silica gel column and Sephadex LH-20 column chromatography, etc. The structures of the isolated compounds were identified by spectral analysis and literature search. RESULTS: 9 compounds were isolated and identified from the ethanol extract of *H. erinaceus*: such as cholesterol (1), cholest-4-en-3-one (2),  $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihydroxy-(22E,24R)-ergosta-7,22-dien-6-one (3), 24-methyl-5 $\alpha$ -cholesta-7,22-diene-3 $\beta,5,6\beta$ -triol (4), 3 $\beta$ -hydroxy-7-methoxy-cholesta-5-en (5), 3 $\beta$ -hydroxycholesta-5-en-7-one (6), creatinine (7), uracil (8), and adenine (9). CONCLUSIONS: All of the compounds are isolated from *H. erinaceus* for the first time. The results can lay the material foundation for rational utilization and further development of the products of *H. erinaceus*.

**KEYWORDS** *Hippocampus erinaceus*; Chemical constituents; Sterol; Spectral analysis

海马是海龙科动物,性温,味甘,是传统补益中药,具有温肾壮阳、散结消肿的作用。2010年版《中国药典》规定其入药为海龙科动物线纹海马(*Hippocampus kelloggi* Jordan et Snyder)、刺海马(*H. histrix* Kaup)、大海马(*H. kuda* Bleeker)、三斑海马(*H. trimaculatus* Leach)和小海马(海蛆,*H. japonicus* Kaup)的干燥体<sup>[1]</sup>。海马药用历史悠久,《本草纲目》记载:“海马,主难产及血气痛;暖水脏,壮阳道;消癥块,治疗疮肿毒”。近年来的药理研究表明,海马不仅有激素样作用,可增强造血功能,还显示了抗癌、抗衰老、抗疲劳和Ca<sup>2+</sup>阻滞等作用<sup>[2]</sup>。海马的功效认知度较高,药食同源,来源比较广泛,但商品质量良莠不齐,以次充好的现象比较常见。目前,除了对海马的分类鉴定认识不够之外,对各种海马的物质基础特别是化学成分研究还相当薄弱。鉴于此,笔者对市场上常见的短刺海马(*H. erinaceus*,亦称蝟海马)进行化学成分研究,从其乙醇提取物中分离鉴定出9个化合物,可为短刺海马的合理利用和进一步产品开发奠定物质基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

XT-5型显微熔点测定仪(温度未校正,北京仪电科技有限公司);Avance500型核磁共振(NMR)仪(美国Bruker公司);1200 MM/MSI/APCI型电喷雾电离质谱(ESI-MS)仪(美国

Agilent公司)。

### 1.2 试剂

薄层色谱(TLC)用硅胶、柱色谱用硅胶(青岛海洋化工有限公司);Sephadex LH-20(美国Pharmacia公司);其他试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

海马药材购自浙江英特医药药材有限公司,经嘉兴学院附属第二医院王真主任药师鉴定为短刺海马(*H. erinaceus*)。

## 2 提取与分离

取短刺海马干药材685 g,粉碎,过80目筛,用75%乙醇冷浸提取3次,每次5 h,减压回收至无醇味,得浸膏45 g。浸膏用水混悬,用环己烷除去大部分脂肪酸等低极性物质后,分别用乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次,得乙酸乙酯部分和正丁醇部分。乙酸乙酯部分经过中压柱硅胶色谱(石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱),得fr.1~fr.6共6个组分。其中,fr.1组分以石油醚-丙酮梯度洗脱、TLC制备,得到化合物1(55 mg)、2(15 mg);fr.2组分经反复硅胶柱色谱、Sephadex LH-20柱色谱,得到化合物3(12 mg)、4(8.5 mg)、5(11 mg);fr.4组分经反复硅胶柱色谱(不同溶剂系统洗脱),得到化合物6(7.5 mg)。正丁醇部分经过中压柱硅胶色谱(氯仿-甲醇梯度洗脱),得fr.a~fr.e共5个组分。其中,fr.a组分经反复硅胶柱色谱、Sephadex LH-20柱色谱,得到化合物7(21 mg);fr.d组分经反复硅胶柱色谱,得到化合物8(8.5 mg)、9(20 mg)。

\* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:0573-82059617。E-mail:wasd911@126.com

### 3 结构鉴定

化合物1: 无色针晶, mp 142~148 °C。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 5.34(1H, m, H-6), 3.51(1H, m, H-3), 1.01(3H, s, H-19), 0.95(3H, d, J=6.5 Hz, H-21), 0.89(3H, d, J=6.6 Hz, H-26), 0.89(3H, d, J=6.6 Hz, H-27), 0.68(3H, s, H-18)。<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 37.2(C-1), 31.5(C-2), 71.7(C-3), 42.3(C-4), 140.8(C-5), 121.7(C-6), 31.8(C-7), 31.9(C-8), 50.3(C-9), 36.5(C-10), 21.0(C-11), 39.7(C-12), 42.4(C-13), 56.2(C-14), 24.1(C-15), 28.0(C-16), 56.1(C-17), 11.7(C-18), 19.3(C-19), 35.7(C-20), 18.7(C-21), 36.1(C-22), 23.9(C-23), 39.6(C-24), 28.0(C-25), 22.4(C-26), 22.8(C-27)。以上波谱数据与文献<sup>[8-9]</sup>对照基本一致,故鉴定化合物1为胆固醇(cholesterol)。

化合物2: 白色晶体, mp 80~81 °C。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 5.71(1H, s, H-4), 1.16(3H, s, H-19), 0.90(3H, d, J=6.4 Hz, H-21), 0.91(3H, d, J=6.5 Hz, H-26), 0.88(3H, d, J=6.6 Hz, H-27), 0.73(3H, s, H-18)。<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 35.7(C-1), 32.9(C-2), 199.6(C-3), 123.8(C-4), 171.6(C-5), 32.0(C-6), 32.1(C-7), 35.6(C-8), 53.4(C-9), 34.1(C-10), 21.0(C-11), 39.5(C-12), 42.4(C-13), 55.8(C-14), 24.1(C-15), 28.1(C-16), 56.2(C-17), 11.9(C-18), 17.4(C-19), 35.7(C-20), 18.7(C-21), 35.7(C-22), 23.9(C-23), 39.6(C-24), 28.1(C-25), 22.4(C-26), 22.8(C-27)。以上波谱数据与文献<sup>[9]</sup>对照基本一致,故鉴定化合物2为胆甾-4-烯-3-酮(cholest-4-en-3-one)。

化合物3: 白色粉末, mp 195~197 °C。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 5.62(1H, s, H-7), 5.19(2H, m, H-22), 4.06(1H, m, H-3), 1.03(3H, s, H-19), 1.01(3H, d, J=6.6 Hz, H-28), 0.91(3H, d, J=6.5 Hz, H-21), 0.85(3H, d, J=6.6 Hz, H-26), 0.81(3H, d, J=6.6 Hz, H-27), 0.61(3H, s, H-18)。<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 25.4(C-1), 30.0(C-2), 67.2(C-3), 37.1(C-4), 79.7(C-5), 197.7(C-6), 119.8(C-7), 164.4(C-8), 74.6(C-9), 41.8(C-10), 28.8(C-11), 34.9(C-12), 45.3(C-13), 51.8(C-14), 22.4(C-15), 28.1(C-16), 55.9(C-17), 12.2(C-18), 19.6(C-19), 40.3(C-20), 21.1(C-21), 132.9(C-22), 135.5(C-23), 43.0(C-24), 33.2(C-25), 18.9(C-26), 20.4(C-27), 18.0(C-28)。以上波谱数据与文献<sup>[6]</sup>对照基本一致,故鉴定化合物3为3β,5α,9α-三羟基-(22E,24R)-麦角甾-7,22-二烯-6-酮[3β,5α,9α-trihydroxy-(22E,24R)-ergosta-7,22-dien-6-one]。

化合物4: 无色晶体, mp 244~246 °C。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ: 5.35(1H, br d, J=5.5 Hz, H-7), 5.21(1H, dd, J=14.8, 7.6 Hz, H-23), 5.19(1H, dd, J=14.8, 7.6 Hz, H-22), 4.07(1H, m, H-3), 3.61(1H, br d, J=5.5 Hz, H-6), 1.08(3H, s, H-19), 1.00(3H, d, J=6.5 Hz, H-21), 0.92(3H, d, J=7.0 Hz, H-28), 0.81(3H, d, J=6.5 Hz, H-26), 0.78(3H, d, J=6.5 Hz, H-27), 0.52(3H, s, H-18)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 32.3(C-1), 31.1(C-2), 65.8(C-3), 40.1(C-4), 74.3(C-5), 72.0(C-6), 119.3(C-7), 139.6(C-8), 42.2(C-9), 31.0(C-10), 21.4(C-11), 39.1(C-12), 42.9(C-13), 54.0(C-14), 22.6(C-15), 27.8(C-16), 55.1(C-17), 11.1(C-18), 17.5(C-19), 42.3(C-20), 22.2(C-21), 135.9(C-22), 131.7(C-23), 42.8(C-24), 32.5(C-25), 19.9(C-26), 20.8(C-27), 17.8

(C-28)。以上波谱数据与文献<sup>[7]</sup>对照基本一致,故鉴定化合物4为24-甲基-5α-胆甾-7,22-二烯-3β,5,6β-三醇(24-methyl-5α-cholesta-7,22-diene-3β,5,6β-triol)。

化合物5: 白色固体, mp 174~175 °C。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 5.72(1H, d, H-6), 3.61(1H, m, H-3), 3.34(3H, s), 3.26(1H, m, H-7), 0.94(3H, s, H-19), 0.91(3H, d, J=6.5 Hz, H-21), 0.89(3H, d, J=6.6 Hz, H-26), 0.87(3H, d, J=6.6 Hz, H-27), 0.64(3H, s, H-18)。<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 36.7(C-1), 31.4(C-2), 71.2(C-3), 42.3(C-4), 146.0(C-5), 120.7(C-6), 73.0(C-7), 37.2(C-8), 49.1(C-9), 37.6(C-10), 20.8(C-11), 39.0(C-12), 42.6(C-13), 56.7(C-14), 24.3(C-15), 28.2(C-16), 55.8(C-17), 11.3(C-18), 18.3(C-19), 35.9(C-20), 18.7(C-21), 36.2(C-22), 23.7(C-23), 39.5(C-24), 28.1(C-25), 22.6(C-26), 22.8(C-27)。以上波谱数据与文献对照<sup>[9]</sup>基本一致,故鉴定化合物5为3β-羟基-7-甲氧基-胆甾-5-烯(3β-hydroxy-7-methoxy-cholesta-5-en)。

化合物6: 白色晶体, mp 170~171 °C。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 5.65(1H, H-6), 3.65(1H, m, H-3), 1.15(3H, s, H-19), 0.91(3H, d, J=6.5 Hz, H-21), 0.83(3H, d, J=6.5 Hz, H-26), 0.82(3H, d, J=6.6 Hz, H-27), 0.66(3H, s, H-18)。<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 36.3(C-1), 31.2(C-2), 70.3(C-3), 41.4(C-4), 165.6(C-5), 126.2(C-6), 202.4(C-7), 45.4(C-8), 50.0(C-9), 38.3(C-10), 21.2(C-11), 38.1(C-12), 41.2(C-13), 49.7(C-14), 26.3(C-15), 28.5(C-16), 54.8(C-17), 11.9(C-18), 17.3(C-19), 35.7(C-20), 18.8(C-21), 36.3(C-22), 23.8(C-23), 39.5(C-24), 28.0(C-25), 22.5(C-26), 22.8(C-27)。以上波谱数据与文献<sup>[9]</sup>对照基本一致,故鉴定化合物6为3β-羟基-胆甾-5-烯-7-酮(3β-hydroxycholesta-5-en-7-one)。

化合物7: 无色晶体, mp>300 °C。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ: 8.94(2H, s, NH<sub>2</sub>), 4.15(2H, s, H-5), 2.98(3H, s, CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 157.3(C-2), 170.8(C-4), 54.0(C-5), 31.1(CH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献<sup>[10]</sup>对照基本一致,故鉴定化合物7为肌酸酐(creatinine)。

化合物8: 白色粉末, 易溶于甲醇。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ: 11.00(1H, s, NH-1), 10.80(1H, s, NH<sub>3</sub>), 7.38(1H, d, J=7.6 Hz, H-4), 5.44(1H, d, J=7.6 Hz, H-5)。其<sup>1</sup>H-NMR数据与SDBS数据库中uracil的标准图谱(SDBS No.1062)一致,故鉴定化合物8为鸟嘌呤(uracil)。

化合物9: 淡黄色粉末, 微溶于丙酮、甲醇、DMSO, 碘中显黄色, 有弱荧光。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ: 12.84(1H, s, NH), 8.11(1H, s), 8.07(1H, s), 7.08(2H, s, NH<sub>2</sub>)。其<sup>1</sup>H-NMR数据与SDBS数据库中adenine的标准图谱(SDBS No.1085)一致,故鉴定化合物9为腺嘌呤(adenine)。

### 4 讨论

本研究采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20柱色谱等手段对短刺海马进行分离纯化,从其乙醇提取物中分离得到9个化合物,经鉴定分别为胆固醇(1)、胆甾-4-烯-3-酮(2)、3β,5α,9α-三羟基-(22E,24R)-麦角甾-7,22-二烯-6-酮(3)、24-甲基-5α-胆甾-7,22-二烯-3β,5,6β-三醇(4)、3β-羟基-7-甲氧基-胆甾-5-烯(5)、3β-羟基-胆甾-5-烯-7-酮(6)、肌酸酐(7)、鸟嘌呤(8)、腺嘌呤(9)。上述9个化合物均为首次从短刺海马中分离得到,可

# RP-HPLC法测定不同产地黄芩中5种黄酮苷元成分的含量

颜梅\*,徐菲拉,徐斌,何三民,梅新路\*(金华市中心医院,浙江金华 321000)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1782-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.18

**摘要** 目的:建立测定不同产地黄芩中5种黄酮苷元成分含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Extend-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),检测波长为276 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为35 ℃。结果:去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素A的进样量分别在0.018 0~0.108 0、0.378 0~2.268 0、0.094 5~0.567 0、0.022 5~0.135 0、0.035 4~0.212 4 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系( $r$ 分别为0.999 9、0.999 5、0.999 6、0.999 5、0.999 5);精密性、重复性、稳定性试验的RSD<3%;加样回收率分别为98.72%(RSD=2.5%, $n=6$ )、101.80%(RSD=2.0%, $n=6$ )、99.25%(RSD=2.3%, $n=6$ )、98.71%(RSD=1.5%, $n=6$ )、99.05%(RSD=1.2%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便、快速,结果准确,可用于黄芩中黄酮苷元成分的含量测定。

**关键词** 黄芩;黄酮苷元;含量测定;反相高效液相色谱法

## Content Determination of 5 Kinds of Flavonoid Aglycone in *Scutellaria baicalensis* from Different Sources by RP-HPLC

YAN Mei, XU Fei-la, XU Bin, HE San-min, MEI Xin-lu (Jinhua Central Hospital, Zhejiang Jinhua 321000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 5 kinds of flavonoid aglycone in *Scutellaria baicalensis* from different sources. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Extend-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 276 nm, and column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear ranges of norepinephrine wogonin, baicalein, wogonin, chrysin and oroxylin-A were 0.018 0-0.108 0 μg( $r=0.999 9$ ), 0.378 0-2.268 0 μg( $r=0.999 5$ ), 0.094 5-0.567 0 μg( $r=0.999 6$ ), 0.022 5-0.135 0 μg( $r=0.999 5$ ) and 0.035 4-0.212 4 μg( $r=0.999 5$ ). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 3%. The recovery rates were 98.72% for norepinephrine wogonin (RSD=2.5%, $n=6$ ), 101.80% for baicalein (RSD=2.0%, $n=6$ ), 99.25% for wogonin (RSD=2.3%, $n=6$ ), 98.71% for chrysin (RSD=1.5%, $n=6$ ) and 99.05% for oroxylin-A (RSD=1.2%, $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and it is feasible for content determination of flavonoid aglycone in *S. baicalensis*.

**KEYWORDS** *Scutellaria baicalensis*; Flavonoid aglycone; Content determination; RP-HPLC

为短刺海马的合理利用和进一步产品开发奠定物质基础。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 275.
- [2] 姜素芬, 吉爱国, 梁浩, 等. 我国海马的研究进展[J]. 中药材, 2007, 30(7):884.
- [3] 肖定军, 邓松之, 曾陇梅. 南海海绵 *Clathria fasciculata* 化学成分的研究: I [J]. 中国海洋药物, 2002, 21(2):1.
- [4] 孙东东, 李祥, 陈建伟, 等. 板蓝根醇提部位化学成分研究 [J]. 中国药房, 2007, 18(30):2 325.
- [5] Jiang X, Covey DF. Total synthesis of ent-cholesterol via a steroid C, D-ring side-chain synthon[J]. *J Org Chem*, 2002, 67(14):4 893.

\* 药师。研究方向:中药鉴定。E-mail:415656073@qq.com

# 通信作者:药师。研究方向:中药分析。E-mail:mei222331@163.com

- [6] Yaoita Y, Amemiya K, Ohnuma H, et al. Sterol constituents from five edible mushrooms[J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(6):944.
- [7] Piccialli V, Sica D. Four new trihydroxylated sterols from the sponge *Spongionella gracilis*[J]. *J Nat Prod*, 1987, 50(5):915.
- [8] Croll DH, Small DM, Hamilton JA. Temperature-dependent molecular motions of saturated acyl cholesteryl esters: A <sup>13</sup>C NMR study[J]. *J Chem Phys*, 1986, 85(12): 4 381.
- [9] Notaro G, Piccialli V, Sica D. New steroidal hydroxyketones and closely related diols from the marine sponge *Cliona copiosa*[J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(11):1 588.
- [10] 黄建设, 李庆欣, 吴军, 等. 粗吻海龙化学成分的研究[J]. 中草药, 2004, 35(5):485.

(收稿日期:2013-12-31 修回日期:2014-03-03)