

石草鞋化学成分分离鉴定

王治阳*, 安华

(河南省中医药研究院, 郑州 450003)

[摘要] **目的:**研究石草鞋乙醇提取物的化学成分,对石草鞋全草进行分离鉴定。**方法:**取石草鞋全草,用90%乙醇回流提取,经低压浓缩后得石草鞋浸膏。将上述浸膏加水超声溶解后依次用石油醚、二氯甲烷和正丁醇萃取。将所得正丁醇部分萃取物过硅胶色谱柱,以石油醚-丙酮-甲醇(80:20:0~0:20:80)系统梯度洗脱,经过结晶、重结晶、离心分离、过硅胶和LH-20羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)纯化。将二氯甲烷萃取物以石油醚-丙酮-甲醇(50:50:0)系统梯度洗脱,合并相同组分,再经过离心分离、硅胶和葡聚糖 Sephadex LH-20 等反复分离、纯化。根据 ESI-MS, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 等波谱数据分析鉴定结构。**结果:**从石草鞋乙醇提取物正丁醇部分中鉴定了7化合物,二氯甲烷部分中鉴定了8化合物。分别鉴定为对羟基苯甲醛(**1**),3,5-二甲氧基4-羟基苯甲酸(**2**),苯甲酸(**3**),桂皮酸(**4**),丹皮酚(**5**),槲皮素(**6**),6,7-二羟基香豆素(**7**),阿魏酸(**8**),对羟基苯甲酸(**9**),2,3-二羟基苯甲酸(**10**),3,4-二羟基苯甲酸(**11**),齐墩果酸(**12**),金丝桃苷(**13**),没食子酸(**14**),β-谷甾醇(**15**)。 **结论:**所有化合物均为首次从该植物中分离得到。

[关键词] 石草鞋; 化学成分; 对羟基苯甲醛; 3,5-二甲氧基4-羟基苯甲酸; 槲皮素; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0082-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140082

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.1130.072.html>

[网络出版时间] 2017-04-20 11:30

Isolate and Identify Chemical Constituents of Hoyalyi Levl

WANG Zhi-yang*, AN Hua

(Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of Hoyalyi Levl, isolate and identify its components. **Method:** Hoyalyi Levl was extracted with 90% ethanol reflux, and Hoyalyi Levl concrete was obtained after low pressure concentration. The above concrete was dissolved with water by ultrasonic method, and then extracted in turn with petroleum ether, dichloromethane and *n*-butyl alcohol. The *n*-butanol extract was used for silica gel chromatography column, with petroleum ether-acetone-methanol (80:20:0-0:20:80) as the mobile phase for gradient elution, and then was purified with silica gel column and Sephadex LH-20 after crystallization, recrystallization and centrifugal separation. The dichloromethane extract was eluted with petroleum ether-acetone-methanol (50:50:0) gradient elution system, and then their same components were merged; the constituents were isolated and purified by silica gel and Sephadex LH-20 column chromatographic techniques. ESI-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR were used to identify the structure of the isolated constituents. **Result:** Seven compounds were isolated from *n*-butyl alcohol fraction and 8 compounds were isolated from dichloromethane fraction, and their chemical structures were identified as *p*-hydroxybenzaldehyde (**1**), syringic acid (**2**), benzoic acid (**3**), tramcinnamic acid (**4**), paeonol (**5**), quercetin (**6**), esculetin (**7**), femlie acid (**8**), *p*-hydroxybenzal acid (**9**), 2,3-dihydroxy-benzoic acid (**10**), 3,4-dihydroxybenzoic acid (**11**); oleanolic acid (**12**); hyperoside (**13**), gallic acid (**14**) and β-sitosterol (**15**). **Conclusion:** All the compounds are isolated and identified from the Hoyalyi Levl for the first time.

[收稿日期] 20170420(005)

[通讯作者] *王治阳,主管中药师,从事中药炮制, Tel:0371-66331318, E-mail:213682537@qq.com

[Key words] Hoyalvi Levl; chemical constituents; *p*-hydroxyben-zaldehyde; syringic acid; quercetin; structure identification

石草鞋又称铁草鞋,铁足板,为双子叶植物药萝藦科植物香花球兰的全草^[1-2]。味辛、性温;归肝、脾经。生长于海拔 1 000 ~ 2 300 m 的山地丛林^[3]。其主要含有色素、黄酮类、酚类和甾醇类化合物^[4]。具有除风湿,消食积,散瘀血等功效,用于治疗脚强痛、胸前饱胀、跌打损伤等。现代药理发现其具有抗肿瘤、抗癫痫、抗氧化和抗炎等多种药理作用^[5]。笔者查阅国内外相关文献未发现关于石草鞋的单体化合物的报道。为了阐明石草鞋的药材中所含的有效成分,促进其资源的开发和利用,为开发出疗效确切的抗肿瘤新药。笔者对石草鞋乙醇提取物的化学成分进行了分离、纯化、鉴定出 15 个化合物,分别为对羟基苯甲醛(1),3,5-二甲氧基 4-羟基苯甲酸(2),苯甲酸(3),桂皮酸(4),丹皮酚(5),槲皮素(6),6,7-二羟基香豆素(7);阿魏酸(8);对羟基苯甲酸(9),2,3-二羟基苯甲酸(10),3,4-二羟基苯甲酸(11),齐墩果酸(12),金丝桃苷(13),没食子酸(14), β -谷甾醇(15)。所有化合物均为首次从该植物中分离得到。

1 材料

ZND83-1 型电热熔点测定仪(上海精析仪器制造有限公司),AC-300P 型核磁共振谱(德国 Bruker 公司,TMS 内标),Trap VL 型质谱仪(美国 Agilent 公司),R-200 型旋转蒸发器(瑞士 Büchi 公司),柱色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂产品,LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶(美国 Pharmacia 公司,Sephadex LH-20),石油醚、甲酸为分析纯(淄博市临淄东方红化工厂),丙酮为分析纯(济南世纪通达化工有限公司)。

实验药材石草鞋于 2015 年 8 月采自河南省南阳市,由河南中医药大学雷敬教授鉴定为萝藦科植物香花球兰 *Hoyalvi yuennanensis* 的全草,标本(201508002)存放于河南省中医药研究院分析实验中心。

2 提取与分离

取石草鞋全草 17.6 kg,用 90% 乙醇回流提取 3 次(2,1.5,1 h),经过低压浓缩后得石草鞋浸膏 1.8 kg。将上述浸膏加水超声溶解后依次用石油醚(60 ~ 90 °C,下同),依次用二氯甲烷和正丁醇萃取,得石油醚液态萃取物 196.3 g,二氯甲烷萃取物 143.7 g,正丁醇萃取物 137.6 g。将所得正丁醇部

分过硅胶色谱柱,以石油醚-丙酮-甲醇(80:20:0 ~ 0:20:80)系统梯度洗脱,过薄层硅胶色谱,合并相同组分,反复经结晶、重结晶、离心分离、过硅胶和凝胶柱纯化。在石油醚-丙酮-甲醇(20:80:0)部分得到化合物 2(16 mg),10(12 mg)和 11(36 mg);(60:40)部分得到化合物 3(8 mg),4(23 mg),8(12 mg)和 9(32 mg)。将二氯甲烷萃取物以石油醚-丙酮-甲醇(50:50:0)系统梯度洗脱,合并相同组分,再经过硅胶和 Sephadex LH-20 等反复分离、纯化。在石油醚-丙酮-甲醇(0:20:80)部分得到化合物 1(17 mg),5(22 mg),12(42 mg)和 13(15 mg);(60:40)系统得到化合物 6(18 mg),7(9 mg),14(18 mg)和 15(13 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 无色粉末(甲醇),mp 111 ~ 113 °C。薄层检识,紫外灯 254 nm 下无荧光,10% 硫酸乙醇反应显紫红色,三氯化铁-铁氰化钾反应阳性,示有酚羟基存在。ESI-MS m/z 120.9 [M - H]⁻。¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 9.76 (1H, s, CHO), 7.79 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2,6), 6.75 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3,5), 6.26 (1H, s, OH)。以上数据与文献[6]对羟基苯甲醛(*p*-hydroxybenzaldehyde)报道数值相符。

化合物 2 无色针晶(甲醇)。¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.369 (2H, s, H-2,6), 3.96 (6H, s, 3,4-OCH₃)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 128.8 (1-C), 115.4 (C-2,6), 144.5 (C-4), 147.3 (C-3,5), 157.2 (COOH), 52.1 (OCH₃ × 2)。以上数据与文献[7] 3,5-二甲氧基 4-羟基苯甲酸(syringic acid)数值相符。

化合物 3 无色片晶(丙酮)。¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.24 (2H, t, J = 7.8 Hz, 3,5-H), 7.68 (1H, t, J = 7.8 Hz, 4-H), 7.93 (2H, d, J = 7.8 Hz, 2,6-H)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 128.3 (3,5-C), 129.6 (1-C), 133.7 (2,6-C), 134.6 (4-C), 176.1 (COOH)。以上数据与文献[8]报道的苯甲酸(benzoic acid)数值相符。

化合物 4 白色针晶(丙酮),mp 135 ~ 136 °C。E1-MS m/z 149 [M + H]⁺, ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 6.32 (1H, d, J = 16 Hz, H-2), 7.53 (3H, m, H-5,7,9), 7.76 (1H, d, J = 16 Hz, H-3), 7.83 (2H, m, H-6,8), 12.96 (1H, br s, -OH)。 ¹³C-NMR

(CD_3OD , 100 MHz) δ : 120.76 (C-2), 130.56 (C-5, 9), 128.64 (C-6, 8), 132.86 (C-7), 135.86 (C-4), 172.86 (C-3), 154.47 (C=O)。以上数据与文献[10]桂皮酸(*trans*-cinnamic acid)数值相符。

化合物5 白色无定形粉末(丙酮), E1-MS m/z 151 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。紫外灯 254 nm 下有浅棕色荧光。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 3.62 (3H, s, 4-OCH₃), 6.32 (1H, d, $J=4.2$ Hz, H-3), 6.37 (1H, dd, $J=4.2, 15.4$ Hz, H-5), 7.62 (1H, d, $J=12.7$ Hz, H-6), 11.64 (1H, s, 2-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 121.6 (C-1), 153.1 (C-2), 101.2 (C-3), 159.3 (C-4), 112.6 (C-5), 127.3 (C-6), 197.3 (C=O), 47.8 (4-CH₃), 19.8 (CH₃)。以上数据与文献[11]报道丹皮酚(*paeonol*)数值相符。

化合物6 黄色针晶, 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 表示有酚羟基。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CH_3OH) δ : 11.97 (1H, s, 5-OH), 6.92 (1H, s, H-2'), 7.82 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 6.98 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.49 (1H, br s, H-8), 6.16 (1H, br s, H-6)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OH , 100 MHz) δ : 183.2 (C-4), 159.3 (C-7), 152.7 (C-5), 149.6 (C-9), 142.5 (C-4'), 141.3 (C-2), 139.2 (C-3'), 127.3 (C-3), 118.4 (C-1'), 114.2 (C-6'), 110.2 (C-2'), 107.3 (C-5'), 98.2 (C-10), 92.5 (C-6), 87.6 (C-8)。以上数据与文献[12]槲皮素(*quercetin*)数值相符。

化合物7 黄色针晶(丙酮), mp 266 ~ 268 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 163.2 (C-2), 118.3 (C-3), 149.2 (C-4), 126.5 (C-5), 153.7 (C-6), 156.2 (C-7), 112.5 (C-8), 138.2 (C-9), 114.5 (C-10)。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 6.35 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 7.85 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4), 7.26 (1H, s, H-5), 7.58 (1H, s, H-8)。以上数据与文献[13]报道的6,7-二羟基香豆素(*esculetin*)数值相符。

化合物8 白色针晶(甲醇), mp 166 ~ 168 $^{\circ}\text{C}$ 。薄层检识, 紫外灯 254 nm 下白色荧光, 10% 硫酸乙醇反应显紫红色, 三氯化铁-铁氰化钾反应蓝色, 表示有酚羟基。ESI-MS m/z 192.8 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CH_3OH) δ : 7.68 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-3), 7.48 (1H, dd, $J=8.1, 1.8$ Hz, H-9), 7.26 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-5), 6.86 (1H, d, $J=8.1, 1.8$ Hz), 6.27 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-2), 3.68 (3H, s, OCH₃)。以上数据与文献[14]报道的化合物阿魏酸(*femlic acid*)基本一致。

化合物9 白色晶体(甲醇), mp 210 ~ 212 $^{\circ}\text{C}$ 。薄层检识, 紫外灯 254 nm 下无荧光, 10% 硫酸乙醇反应显紫红色, 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 表示有酚羟基。ESI-MS m/z 137.2 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CH_3OH) δ : 9.31 (1H, br s, OH), 7.76 (2H, d, $J=8.2$ Hz, H-2, 6), 6.78 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3, 5)。以上数据与文献[15]报道的化合物对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzal acid)基本一致。

化合物10 黄色针晶(甲醇), mp 229 ~ 230 $^{\circ}\text{C}$ 。紫外灯下 254, 365 nm 下显示为白色荧光。三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 表示有酚羟基存在。ESI-MS m/z 192 $[\text{M}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CH_3OH) δ : 7.3 (1H, s, H-6), 7.37 (1H, d, $J=9.34$ Hz, H-3), 6.53 (1H, s, H-9), 6.26 (1H, d, $J=9.34$ Hz, H-4), 3.69 (3H, s, OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CH_3OH) δ : 162.3 (C-2), 114.6 (C-3), 146.3 (C-4), 103.4 (C-5), 148.9 (C-6), 154.2 (C-7), 109.3 (C-8), 157.3 (C-9), 117.5 (C-10), 56.3 (OCH₃)。以上数据与文献[16]2,3-二羟基苯甲酸(2,3-dihydroxybenzoic acid)数值基本一致。

化合物11 黄色粉末(甲醇), mp 198 ~ 200 $^{\circ}\text{C}$ 。易溶于丙酮、甲醇, 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 表示有酚羟基存在。ESI-MS m/z 154 $[\text{M}]^+$, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CH_3OH) δ : 6.53 (2H, d), 7.46 (2H, d), 7.48 (1H, s)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CH_3OH) δ : 119.6 (C-1), 120.6 (C-2), 148.3 (C-3), 154.5 (C-4), 113.1 (C-5), 164.6 (C-6), 165.6 (C-COOH)。以上数据与文献[17]3,4-二羟基苯甲酸(3,4-dihydroxybenzoic acid)数值相符。

化合物12 白色针晶(甲醇), 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 表示有酚羟基存在。mp 260 ~ 263 $^{\circ}\text{C}$, ESI-MS m/z 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CH_3OH) δ : 5.24 (1H, s, H-12), 3.56 (1H, m, H-3), 2.25 (1H, dd, $J=3.0, 10.8$ Hz, H-18), 1.13, 0.97, 0.83, 0.78, 0.76, 0.72, 0.63 (21H, 7 \times CH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CH_3OH) δ : 37.2 (C-1), 28.2 (C-2), 78.2 (C-3), 39.5 (C-4), 56.7 (C-5), 19.1 (C-6), 33.6 (C-7), 39.2 (C-8), 46.2 (C-9), 38.8 (C-10), 24.3 (C-11), 126.5 (C-12), 147.3 (C-13), 45.8 (C-14), 25.6 (C-15), 28.9 (C-16), 43.2 (C-17), 43.2 (C-18), 34.6 (C-19), 33.6 (C-20), 31.9 (C-21), 29.6 (C-22), 21.9 (C-23), 12.5 (C-24), 14.7 (C-25), 18.4 (C-26), 26.7 (C-27), 176.3 (C-28), 32.1 (C-29) 和 21.9 (C-30) 以上数据与文

献[18]齐墩果酸(oleanolic acid)数值相符。

化合物13 黄色针晶(甲醇),三氯化铁-铁氰化钾反应阳性,表示有酚羟基。¹H-NMR(300 MHz, CH₃OH) δ: 5.27(1H, d, J = 6.0 Hz, H-1''), 6.16(1H, br s, H-6), 6.27(1H, br s, H-8), 7.16(1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 7.35(1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 7.92(1H, s, H-2')。 ¹³C-NMR(CD₃OH, 100 MHz) δ: 180.3(C-4), 162.3(C-7), 158.6(C-5), 149.7(C-2), 152.4(C-9), 151.7(C-4'), 136.4(C-3'), 146.8(C-3), 120.3(C-1'), 131.5(C-6'), 118.6(C-2'), 121.5(C-5'), 112.7(C-10), 101.4(C-1''), 97.3(C-6), 92.4(C-8), 81.4(C-5''), 72.5(C-3''), 71.2(C-2''), 68.4(C-4''), 52.1(C-6'')。以上数据与文献[19]金丝桃苷(hyperoside)数值相符。

化合物14 无色针晶(甲醇), mp 241~243℃。紫外灯下254 nm下显示为蓝色荧光,三氯化铁-铁氰化钾反应阳性,表示有酚羟基存在。ESI-MS *m/z* 169[M-H]⁻。¹H-NMR(300 MHz, CH₃OH) δ: 7.24(2H, s, H-2, 6)。¹³C-NMR(150 MHz, CH₃OH) δ: 135.4(C-1), 109.4(C-2, 6), 148.7(C-3, 5), 138.5(C-4), 169.0(COOH)。以上波谱数据与文献[20]没食子酸(gallic acid)数值相符。

化合物15 白色针晶(甲醇), mp 140~142℃。三氯化铁-铁氰化钾反应阳性,表示有酚羟基。¹H-NMR(300 MHz, CH₃OH) δ: 0.18(3H, s, CH₃-18), 0.21(3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃-21, CH₃-27, CH₃-29), 0.23(3H, d, J = 6.4 Hz, s, CH₃-19, CH₃-26), 3.19(1H, m, H-3α), 5.35(1H, br d, J = 5.2 Hz, H-6)。¹³C-NMR(150 MHz, CH₃OH) δ: 35.7(C-1), 30.2(C-2, C-24), 70.3(C-3), 141.3(C-5), 118.2(C-6), 33.9(C-7, C-22), 31.8(C-8), 50.6(C-9), 37.2(C-10), 21.8(C-11), 39.7(C-12), 23.9(C-15), 27.4(C-16), 54.8(C-17), 10.3(C-18), 19.3(C-19), 36.3(C-20), 16.7(C-21), 28.7(C-25), 17.6(C-26), 22.6(C-28), 11.9(C-29)。以上数据与文献[21]β-谷甾醇(β-sitosterol)数值相符。

【参考文献】

[1] 刘祯,张欢.对萝科植物药理作用的探讨[J].黑龙江科技信息,2009(35):341.
[2] 张国华,张如松.萝科植物的药理作用研究[J].浙江

中医药大学学报,2009,33(3):445-446.

[3] Ernst E. Toxic heavymetals and undeclared drugsin Asian herbalmedicines [J]. Trends Pharmacol Sci, 2002,23(3):136-139.
[4] 陈霞.石草鞋化学成分初探[J].南北桥,2015(6):10.
[5] 国家中医药管理局.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:490-502.
[6] 付明,王登宇,胡兴,等.徐长卿化学成分研究[J].中药材,2015,38(1):97-100.
[7] 郎素梅,朱丹妮,余伯阳,等.中药鬼箭羽降糖有效部位的药效学和化学研究[J].中国药科大学学报,2003,34(2):128-131.
[8] 尹伟,宋祖荣,刘金旗,等.香橼化学成分研究[J].中药材,2015,38(10):2091-2094.
[9] 尹伟,宋祖荣,刘金旗,等.桂花的化学成分研究[J].中国中药杂志,2015,38(3):521-523.
[10] 张艳丽,冯志毅,郑晓珂,等.地黄叶的化学成分研究[J].中国药理学杂志,2014,49(1):15-19
[11] 欧阳文,朱晓艾,何桂霞,等.番石榴叶乙酸乙酯萃取物化学成分研究(II)[J].中药材,2015,38(8):1649-1652.
[12] 柳航,胡薇,方云,等.紫花地丁乙酸乙酯部位的化学成分研究[J].安徽医药,2015,19(6):1068-1072.
[13] 袁谱龙,王雪萍,陈凯先,等.水茄茎化学成分的研究[J].中成药,2016,35(3):404-406.
[14] 徐芳辉,丁宇翔,王强.黄海棠乙酸乙酯部位的化学成分研究[J].中药材,2016,38(8):1656-1660.
[15] 彭燕,曹文浩,林秀萍,等.澳洲马尾藻化学成分研究[J].中药材,2014,37(12):2210-2212.
[16] 杨鸣华,孔令义.露珠杜鹃的化学成分[J].药学与临床研究,2007,15(3):199-201.
[17] 杨嘉永,万春鹏,邱彦.东方肉穗草中酚酸类化学成分研究[J].中药材,2010,33(4):542-544.
[18] 王国凯,刘劲松,张聪偲,等.马兰化学成分研究[J].中药材,2015,38(1):542-54
[19] 诸燕,张爱莲,何伯伟,等.铁皮石斛总生物碱含量变异规律[J].中国中药杂志,2010,12(18):124-126.
[20] 李兵,黄贵庆,卢汝梅,等.余甘子化学成分研究[J].中药材,2015,38(2):81-84.
[21] 刘量,张婉菁,殷启蒙,等.斑叶兰化学成分研究[J].中药材,2015,38(12):2547-2549.

【责任编辑 顾雪竹】