

兰科药用植物见血青乙酸乙酯部位化学成分研究

赵颖^{1*}, 胡少南¹, 王昌华², 郑一敏¹, 胥秀英¹

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

[摘要] 目的: 研究见血青乙酸乙酯部位化学成分。方法: 利用硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离手段, 根据波谱数据和理化性质进行结构鉴定。结果: 从见血青 75% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位中分离鉴定了 7 个化合物, 分别为 2,2-二甲基-8-(3-羟基异戊烷) 苯并二氢吡喃-6-羧酸(1), 亚油酸(2), α -菠甾醇葡萄糖苷(3), 单棕榈酸甘油酯(4), 芫花素(5), 芹菜素(6), 琥珀酸(7)。结论: 化合物 1 为新的天然产物, 化合物 2~7 均为首次从见血青中分离得到。

[关键词] 见血青; 化学成分; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0111-03

[doi] 10.11653/syjf2013220111

Study on Chemical Constituents from Ethyl Acetate Extract of *Liparis nervosa*

ZHAO Ying^{1*}, HU Shao-nan¹, WANG Chang-hua², ZHENG Yi-min¹, XU Xiu-ying¹

(1. School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of the ethyl acetate extract of *Liparis nervosa*.

Method: Chemical constituents were isolated by Column chromatography on Silica gel and Sephadex LH-20, their structures were identified by physicochemical characters and spectroscopic analysis or comparison with standard compounds. **Result:** Seven compounds were isolated and identified as 2, 2-dimethyl-8-(3-hydroxyisoamyl) chroman-6-carboxylic acid (1), linoleic acid (2), α -spinasterol glucoside (3), glycerol monopalmitate (4), genkwanin (5), apigenin (6), butane diacid (7). **Conclusion:** Compounds 1 was a new natural product, 2-7 were isolated from *L. nervosa* for the first time.

[Key words] *Liparis nervosa*; chemical constituents; identification

见血青为兰科羊耳蒜属植物脉羊耳兰全草, 又名毛慈姑、矮胖儿, 广泛分布于西南地区及广东、广西福建、台湾等地, 是民间常用的一种草药, 功效凉血止血、清热解毒, 主要用于清血、凉血、止血、创伤出血、咯血吐血等各种出血性疾病及毒蛇咬伤、疮疡肿毒、跌打损伤等症^[1]。迄今为止, 针对该属的化学成分报道较少, 已发现的仅有脉羊耳兰碱等生物碱类化合物^[2-4]。

为确保见血青合理有效的应用, 探索其药用价值, 作者对见血青的化学成分进行了研究, 从见血青

75% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位中分离鉴定了 7 个化合物: 2,2-二甲基-8-(3-羟基异戊烷) 苯并二氢吡喃-6-羧酸(1), 亚油酸(2), α -菠甾醇葡萄糖苷(3), 单棕榈酸甘油酯(4), 芫花素(5), 芹菜素(6), 琥珀酸(7)。其中, 化合物 1 为新天然产物, 化合物 2~7 均为首次从见血青中分离得到。

1 材料

见血青 2010 年 9 月购自成都市中药材市场, 经重庆市中药研究院王昌华副研究员鉴定为兰科植物脉羊耳兰 *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. [*Ophrys nervosa* Thunb.] 的干燥全草, 凭证标本存放于重庆市中药研究院中药标本馆。

Bruker AM-400 核磁共振仪 (TMS 为内标), ESI-MS (Agilent 1200 液质联用系统), X-4 型显微熔点仪 (温度未校正; 北京泰克公司)。

柱层析硅胶 (100~200 目, 200~300 目)、薄层

[收稿日期] 20130729(021)

[基金项目] 重庆市教委科学技术研究项目 (KJ110802); 重庆理工大学科研启动基金项目 (2010ZD07)

[通讯作者] * 赵颖, 博士, 副教授, 从事中药新药研究, Tel: 13996490562, E-mail: zhy@cqut.edu.cn

板(山东烟台江友硅胶开发有限公司);Sephadex LH-20(Pharmacia 公司);乙醇、石油醚、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、甲醇(分析纯,成都科龙化工试剂厂);水为蒸馏水。

2 提取与分离

见血青干燥全草 10 kg,50 ℃ 干燥 6 h,粉碎后依次以 7,7,6 倍量 75% 医用乙醇在 80 ℃ 提取 3,2,2 h,减压回收溶剂,得粗提取物 1.4 kg;将此提取物混悬于水中,依次用等体积石油醚、乙酸乙酯萃取各 5 次,减压回收溶剂,得到乙酸乙酯萃取物浸膏 138 g。

取乙酸乙酯萃取物浸膏进行硅胶柱色谱分离,用二氯甲烷-甲醇(100:0~1:1)梯度洗脱,共收集 80 个流分(Frs. 1~80),每流分约 500 mL。Frs. 35~40 经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇梯度洗脱(50:1~1:1)纯化得化合物 2(35 mg);Frs. 42~47 经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇梯度洗脱(30:1~1:1)纯化得化合物 3(60 mg)、化合物 4(48 mg);Frs. 55~60 经硅胶柱色谱氯仿-甲醇梯度洗脱(20:1~1:1)和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱氯仿-甲醇(1:1)分离纯化得到化合物 1(75 mg);Frs. 68~73 经硅胶柱色谱氯仿-甲醇(15:1~1:1)梯度洗脱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱甲醇分离纯化得到化合物 5(36 mg)、化合物 6(40 mg);Frs. 74~76 经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(15:1)洗脱,再经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱甲醇分离纯化得化合物 7(19 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 无色针状晶体(甲醇),mp 170~171 ℃,HR-ESI-MS m/z : 315.1587 [M + Na]⁺ (calc. 315.1572),给出分子式为 C₁₇H₂₄O₄。红外光谱显示该化合物结构中含有羟基(3309 cm⁻¹),羰基(1672 cm⁻¹)。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据见表 1。¹H-NMR(CD₃OD,400 MHz)中 δ:2.83(2H,t,J=6.4 Hz),δ:1.85(2H,t,J=6.4 Hz),δ:7.64(2H,br.s)为吡喃环的信号;δ:7.64(br.s)为苯环上未取代质子信号;δ:1.37(6H,s),1.28(6H,s)4 个甲基信号;此外,还有 δ:2.64(m),1.71(m)2 个亚甲基信号。¹³C-NMR(CD₃OD,100 MHz)显示有 17 个碳信号,δ:170.3 为羰基信号,δ:71.5 为羟基碳信号,δ:121.6~157.3 的为苯环的 6 个碳信号。碳氢信号进一步通过 HSQC 谱进行归属。HMBC 谱中 C-3 位上的质子信号 δ:1.85 与 C-2,C-4,C-10,C-11,C-12 存在远程相关;C-4 位上的质子信号 δ:2.84 与 C-2,C-3,C-5,C-10 存在远程相关;C-11 和 C-12 上的甲基信号 δ:1.37 与 C-2,C-3 存在远程相关;C-1' 位上

的质子信号 δ:2.64 与 C-7,C-8,C-9,C-2',C-3' 存在远程相关;C-4' 和 C-5' 上的甲基信号 δ 1.28 与 C-2',C-3' 存在远程相关等,进一步确认了化合物 1 的结构。化合物 1 的结构式及主要 HMBC 相关见图 1。以上数据与文献[2-3]比对发现该化合物是 Nishikawa 确认脉羊耳兰碱结构时酸水解产物,故确定该化合物结构为 2,2-二甲基-8-(3-羟基异戊烷)苯并二氢吡喃-6-羧酸[2,2-dimethyl-8-(3-hydroxyisoamyl)chroman-6-carboxylic acid]。经检索,该化合物为新的天然产物。

表 1 化合物 1 的 ¹H-NMR,¹³C-NMR 数据和 HMBC 相关(CD₃OD)

碳位	δ (H)	δ (C)	HMBC
C (2)		76.3	
CH ₂ (3)	1.85 (t, J=6.8)	33.4	C2, C4, C10, C11, C12
CH ₂ (4)	2.84 (t, J=6.8)	23.4	C2, C3, C5, C10
CH (5)	7.64 (br. s)	130.7	C4, C6, C7, C9, C13
C (6)		122.3	C6, C9, C13, C1'
CH (7)	7.64 (br. s)	130.1	
C (8)		131.9	
C (9)		157.3	
C (10)		121.6	
CH ₃ (11)	1.37 (s)	27.2	C2, C3, C12
CH ₃ (12)	1.37 (s)	27.2	C2, C3, C11
COOH (13)		170.3	
CH ₂ (1')	2.64 (m)	26.5	C7, C8, C9, C2', C3'
CH ₂ (2')	1.71 (m)	44.9	C8, C1', C3', C4', C5'
C (3')		71.5	
CH ₃ (4')	1.28 (s)	29.0	C2', C3', C5'
CH ₃ (5')	1.28 (s)	29.0	C2', C3', C4'

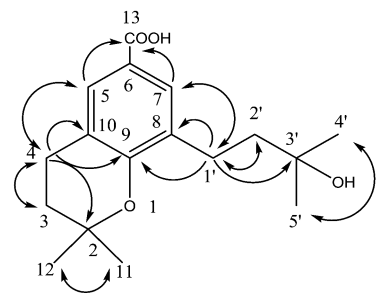


图 1 化合物 1 的主要 HMBC 相关

化合物 2 浅黄色油状物,ESI-MS: 281 [M + 1]⁺,¹H-NMR(CDCl₃400 MHz) δ:5.44(4H,m,H-9,10,12,13),2.83(2H,m,H-11),2.350(2H,m,H-2),2.04(4H,m,J=7.2 Hz,H-8,14),0.89(3H,s,H-18);¹³C-NMR(CDCl₃100 MHz) δ:175.0(C-1),35.0(C-2),25.1(C-3),29.3(C-4),29.4(C-5),31.9(C-6),29.6(C-7),27.5(C-8),130.7(C-9),131.3(C-10),25.7(C-11),131.3(C-12),129.6(C-

13), 27.3 (C-14), 29.7 (C-15), 31.9 (C-16), 22.7 (C-17), 14.0 (C-18)。以上数据与文献[5]基本一致, 鉴定该化合物为亚油酸(linoleic acid)。

化合物 3 白色片状晶体(氯仿-甲醇), Liebermann-Burchard 反应阳性, mp 291 ~ 292 °C。¹H-NMR (CDCl₃ 400 MHz) δ: 0.55 (3H, s, 18-CH₃), 0.80 (3H, s, 19-CH₃), 0.82 ~ 0.86 (9H, m, 26-CH₃, 27-CH₃, 29-CH₃), 1.04 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 21-CH₃), 3.53 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 5.01 (1H, dd, *J* = 15.1, 8.6 Hz, H-23), 5.14 (1H, m, H-7), 5.16 (1H, dd, *J* = 15.1, 8.6 Hz, H-22); ¹³C-NMR (CDCl₃ 100 MHz) δ: 38.0 (C-1), 31.5 (C-2), 77.4 (C-3), 37.2 (C-4), 40.3 (C-5), 29.7 (C-6), 117.5 (C-7), 139.5 (C-8), 49.5 (C-9), 34.3 (C-10), 21.6 (C-11), 39.5 (C-12), 43.3 (C-13), 55.2 (C-14), 23.0 (C-15), 28.5 (C-16), 55.9 (C-17), 12.1 (C-18), 13.1 (C-19), 40.8 (C-20), 21.1 (C-21), 138.2 (C-22), 129.5 (C-23), 51.3 (C-24), 31.9 (C-25), 19.0 (C-26), 21.4 (C-27), 25.4 (C-28), 12.3 (C-29), 101.2 (C-1'), 76.5 (C-2'), 73.4 (C-3'), 79.1 (C-4'), 76.2 (C-5'), 63.6 (C-6')。以上数据与文献[6]基本一致, 鉴定该化合物为 α-菠甾醇葡萄糖苷(α-spinasterol glucoside)。

化合物 4 白色无定性粉末(氯仿-甲醇), mp 66 ~ 68 °C。¹H-NMR (CDCl₃ 400 MHz) δ: 4.14, 4.08 (2H, dd, *J* = 9.9, 4.6 Hz, H-1'), 3.86 (1H, m, H-2'), 3.65 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.0 Hz, H-3'a), 3.54 (1H, dd, *J* = 11.4, 5.8 Hz, H-3'b), 2.28 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.55 (2H, m, H-3), 1.25 (24H, H4-H15), 0.85 (3H, t, *J* = 6.4 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃ 100 MHz) δ: 174.3 (C-1), 34.2 (C-2), 24.9 (C-3), 31.9-29.1 (C-4 ~ C-14), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16), 65.2 (C-1'), 70.3 (C-2'), 63.4 (C-3')。以上数据与文献[7]基本一致, 鉴定该化合物为单棕榈酸甘油酯(glycerol monopalmitate)。

化合物 5 浅黄色针状晶体(甲醇), mp 286 ~ 289 °C。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 8.25 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 7.26 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.73 (1H, s, H-3), 6.71 (1H, s, H-8), 6.28 (1H, s, H-6), 3.86 (3H, s, 7-OMe); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 163.8 (C-2), 102.7 (C-3), 182.8 (C-4), 158.3 (C-5), 97.5 (C-6), 164.8 (C-7), 92.3 (C-8), 156.2 (C-9), 104.3 (C-10), 122.3 (C-1'), 130.4 (C-2'), 116.9 (C-3', C-5'), 162.5 (C-4'), 130.4 (C-

6'), 55.0 (-OMe)。以上数据与文献[8]基本一致, 鉴定该化合物为芫花素(genkwanin)。

化合物 6 浅黄色针状晶体(甲醇), mp 347 ~ 348 °C。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 8.21 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 7.23 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.74 (1H, s, H-3), 6.42 (1H, s, H-8), 6.16 (1H, s, H-6), 4.96 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-1 of 8-C-Ara); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) δ: 162.6 (C-2), 102.9 (C-3), 183.0 (C-4), 158.6 (C-5), 97.5 (C-6), 164.7 (C-7), 92.5 (C-8), 156.8 (C-9), 103.1 (C-10), 122.5 (C-1'), 130.3 (C-2'), 116.9 (C-3', C-5'), 162.7 (C-4') 130.3 (C-6')。以上数据与文献[9-11]基本一致, 鉴定该化合物为芹菜素(apigenin)。

化合物 7 白色片状晶体(甲醇), mp 185 ~ 187 °C。水溶液呈酸性, pH 为 2。与琥珀酸对照品薄层行为一致, 且与琥珀酸对照品混合熔点不下降, 鉴定此化合物为琥珀酸(butane diacid)。

[参考文献]

- [1] 王旭红, 余国奠. 中国兰科药用植物[J]. 中国野生植物资源, 1993(4): 15.
- [2] Kunisuke N, Yoshimasa H. Chemotaxonomical alkaloid studies I. structure of nervosine [J]. Tetrahedron Letters, 1967, 27(8): 2591.
- [3] Kunisuke N, Yoshimasa H. Chemotaxonomical alkaloid studies II. structure of kuramerine and kumokirine [J]. Tetrahedron Letters, 1967, 27(8): 2597.
- [4] Kunisuke N, Mieko M, Yoshimasa H. Chemotaxonomical alkaloid studies structures of liparis alkaloids [J]. Tetrahedron Letters, 1969, 25(13): 2723.
- [5] 刘大有, 王晓颖, 夏忠庭, 等. 两头尖化学成分研究[J]. 长春中医药大学学报, 2003, 19(3): 71.
- [6] 陈业高, 朱焰, 魏均娴, 等. 云参化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(10): 611.
- [7] 于江泳, 张思巨, 刘丽. 肖菝葜化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(1): 19.
- [8] 牛宝静, 马柱坤, 廖志新, 等. 异叶青兰的化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(2): 147.
- [9] 冯建勇, 陈虹, 孙燕, 等. 鹅绒藤地上部位化学成分研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(3): 274.
- [10] 卢文杰, 牙启康, 陈家源, 等. 黑草的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(6): 1079.
- [11] 姚仲青, 郭青. 海州常山叶的化学成分研究(I) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 103.

[责任编辑 邹晓翠]