

斑叶兰化学成分的分离鉴定

殷启蒙, 王润坤, 胡琛, 唐淳, 赵之琛, 刘量*

(扬州大学 医学院, 江苏 扬州 225001)

[摘要] 目的:对斑叶兰属植物斑叶兰 *Goodyera schlechtendaliana* 的化学成分进行分离纯化,从而丰富斑叶兰的化学成分,为斑叶兰后续深入研究奠定基础。方法:取斑叶兰干燥全草 10 kg,85 ℃下用 95% 乙醇回流提取 4 次,合并提取液,减压浓缩得到粗浸膏,再将粗浸膏混悬于蒸馏水中,依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得到石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取部位。采用硅胶,Sephadex LH-20,ODS 等多种色谱填料和半制备高效液相色谱技术以及化合物的理化性质并结合参考文献确定化合物的化学结构。结果:从斑叶兰乙酸乙酯部位和正丁醇部位分离得到 10 个化合物,分别是 2,5-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲(1),间苯三酚三甲醚(2),3,4-二羟基苯甲酸(3),4-羟基苯甲醛(4),4-羟基苯甲酸(5),槲皮素(6),香兰素(7),胡萝卜苷(8),腺嘌呤(9),腺嘌呤核苷(10)。结论:化合物 1~10 均为首次从斑叶兰属植物中分离得到。

[关键词] 斑叶兰; 化学成分; 分离纯化; 结构鉴定

[中图分类号] R284.2;R22;R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0181-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190111

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181016.1326.010.html>

[网络出版时间] 2018-10-19 9:46

Isolation and Identification of Chemical Constituents from *Goodyera schlechtendaliana*

YIN Qi-meng, WANG Run-kun, HU Chen, TANG Chun, ZHAO Zhi-chen, LIU Liang*

(Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify the chemical constituents from *Goodyera schlechtendaliana*, and lay a foundation for further research on the effective materials of the plant. **Method:** The dried grass of *G. schlechtendaliana* (10 kg) was heated by 95% EtOH for reflux extraction for 4 times at 85 ℃. The extract liquids were combined, decompressed and concentrated to obtain the crude extract. The crude extract was then suspended in distilled water and extracted with petroleum ether, EtOAc and *n*-BuOH in turn to obtain corresponding fractions. Silica gel, Sephadex LH-20, ODS and semi-preparation high performance liquid chromatography (HPLC) were used for the separation and purification of EtOAc and *n*-BuOH fractions. The structures of compounds obtained were identified by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, physicochemical properties and reference literature. **Result:** Ten compounds were isolated and identified as 2, 5-dihydroxy-4-methoxy-9, 10-dihydroxyphenanthrene (1), 1, 3, 5-trimethoxybenzene (2), protocatechuic acid (3), *p*-hydroxybenzaldehyde (4), *p*-hydroxybenzoic acid (5), quercetin (6), vanillin (7), daucosterol (8), adenine (9) and adenosine (10). **Conclusion:** Compounds 1-10 were obtained from the genus of *Goodyera* for the first time.

[Key words] *Goodyera schlechtendaliana*; chemical constituent; isolation and purification; structure identification

[收稿日期] 20180525(013)

[基金项目] 江苏省中医药管理局科技项目(YB2015182);扬州大学交叉学科建设项目(JCXXK201520);扬州大学大学生学术科技创新基金项目(x20180734,x20180738)

[第一作者] 殷启蒙,在读硕士,从事天然药物化学研究,Tel:0514-87992233,E-mail:596649661@qq.com

[通信作者] *刘量,博士,副教授,硕士生导师,从事天然产物化学成分与生物活性研究,Tel:0514-87992233,E-mail:enjoyyz@163.com

斑叶兰主要分布在长江以南各地及西藏地区,生于海拔 500~2 800 m 阴凉潮湿的常绿阔叶林下,是兰科斑叶兰属多年生草本植物,又名银线莲、小叶青等^[1]。民间以全草入药,性寒,有清肺止咳、解毒消肿、活血止痛、软坚散结等功效,常用于制作药膳,炖鸡可养肝,炖猪肉可用于治疗肺结核咳嗽^[2];在临幊上治疗肺结核、痰喘、老慢支,外用于毒蛇咬伤、痈疽疖疮等,具有很高的药用价值^[1]。朱平福等^[3]发现斑叶兰对二甲苯导致的小鼠耳廓肿胀有抑制作用,显示其具有较好的抗炎活性,王惠兴^[4]联用斑叶兰和半枝莲外敷治疗鼻疖,疗效显著。然而斑叶兰的药效物质基础尚不明确,目前斑叶兰中已报道的成分主要是黄酮类化合物^[5],本课题组前期从斑叶兰中还分离得到了一些其他类的化合物^[6],为了进一步对斑叶兰的化学成分进行深入的研究,以期发现新的活性成分,笔者采用硅胶,LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20),ODS 等多种柱色谱和半制备高效液相色谱对斑叶兰的乙酸乙酯部位和正丁醇部位进行了进一步的分离纯化,利用 NMR,MS 等现代波谱技术以及化合物的理化性质并结合参考文献鉴定了 10 个化合物,分别为 2,5-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲(2,5-dihydroxy-4-methoxy-9,10-dihydroxyphenanthrene,**1**),间苯三酚三甲醚(1,3,5-trimethoxybenzene,**2**),3,4-二羟基苯甲酸(protocatechuic acid,**3**),4-羟基苯甲醛(*p*-hydroxybenzaldehyde,**4**),4-羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid,**5**),槲皮素(quercetin,**6**),香兰素(vanillin,**7**),胡萝卜苷(daucosterol,**8**),腺嘌呤(adenine,**9**),腺嘌呤核苷(adenosine,**10**)。所有化合物均为首次从斑叶兰属植物中分离得到。

1 材料

HPLC 3000 型高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司);1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);RE-3000 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);SENCI R 系列旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);EYELA 型冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司);DTC-41 型隔膜真空泵(上海沪西分析仪器厂有限公司);KQ-500DE 型数控超声清洗仪器(昆山禾创超声仪器有限公司);ZF-C 型紫外分析仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);LCQ Deca XP max 型液质联用仪(Thermo 公司);AVANCE 600 型核磁共振仪(Bruker 公司);101-1BS 型电热鼓风干燥箱(天津宏诺仪器

有限公司);XB220A 型 1/1 万电子天平(普利赛斯国际贸易有限公司)。

斑叶兰干燥带根全草于 2014 年 2 月在浙江丽水采购,由扬州大学生技学院淮虎银教授鉴定为兰科斑叶兰属植物斑叶兰 *Goodyera schlechtendaliana*,药用部位为带根全草,凭证标本(标本号 JXQ20140218)保存于扬州大学医学院药学系中药标本馆。

Cosmosil 5C₁₈-MS-II 半制备色谱柱(Nacalai Tesque 公司,10 mm×250 mm,5 μm);Sephadex LH-20(Parmacia Bioteck 公司);柱色谱硅胶(100~200,200~300 目,青岛海洋化工厂);ODS(Merck 公司);色谱甲醇、乙腈(国药集团化学试剂有限公司);氘代试剂(宁波旋光医药科技有限公司);高效铝制硅胶板(Merck 公司);提取用 95% 乙醇为工业级;柱色谱所用试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

2 提取分离

斑叶兰干燥带根全草 10 kg,剪碎,加 8 倍量 95% 乙醇于 85 °C 回流提取 4 次,提取液减压浓缩,得总浸膏 617 g。将总浸膏用 10 倍量的蒸馏水分散,依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,减压浓缩回收溶剂得到石油醚部位(226 g),乙酸乙酯部位(190 g),正丁醇部位(174 g)和水部位。乙酸乙酯部位浸膏 190 g 经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-丙酮(20:1~0:100)梯度洗脱,得到 10 个流分 Fr. 1~Fr. 10,流分 Fr. 2 经硅胶柱色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯(20:1~0:100)洗脱,得到化合物**2**(5.1 mg),并分为 8 个流分 Fr. 2-1~Fr. 2-8,流分 Fr. 2-5 经 Sephadex LH-20 柱色谱分离,以三氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,再经半制备 HPLC 纯化,以 75% 甲醇洗脱,得化合物**1**(3.2 mg),流分 Fr. 3 经 Sephadex LH-20 柱色谱分离,以三氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,再经半制备 HPLC 纯化,以 50% 甲醇洗脱,得化合物**4**(4.6 mg),流分 Fr. 5 经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(30:1~0:100)洗脱,分为 12 个流分 Fr. 5-1~Fr. 5-12,流分 Fr. 5-4 经 Sephadex LH-20 色谱分离,以三氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,再经半制备 HPLC 纯化,以 20% 乙腈洗脱,得化合物**5**(3.1 mg),流分 Fr. 5-4 经 Sephadex LH-20 柱色谱分离,以三氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,再经半制备 HPLC 纯化,以 50% 甲醇洗脱,得化合物**3**(6.6 mg)和**6**(5.2 mg)。正丁醇部位 174 g 经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(60:1~0:100)梯度洗脱,得到 10 个

流分 Fr. 1 ~ Fr. 10, 流分 Fr. 2 经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇(30:1~0:100)洗脱, 得到白色结晶为化合物 7(10.5 mg); 流分 Fr. 6 有白色沉淀析出, 用甲醇洗涤得到化合物 8 (3.5 mg); 流分 Fr. 8 经 Sephadex

LH-20 柱色谱分离, 用甲醇洗脱, 再经 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水(1:1~100:0)洗脱, 接着用半制备 HPLC 纯化, 以 15% 甲醇洗脱, 得化合物 9(3.9 mg) 和 10(49.4 mg)。化合物 1~10 的结构见图 1。

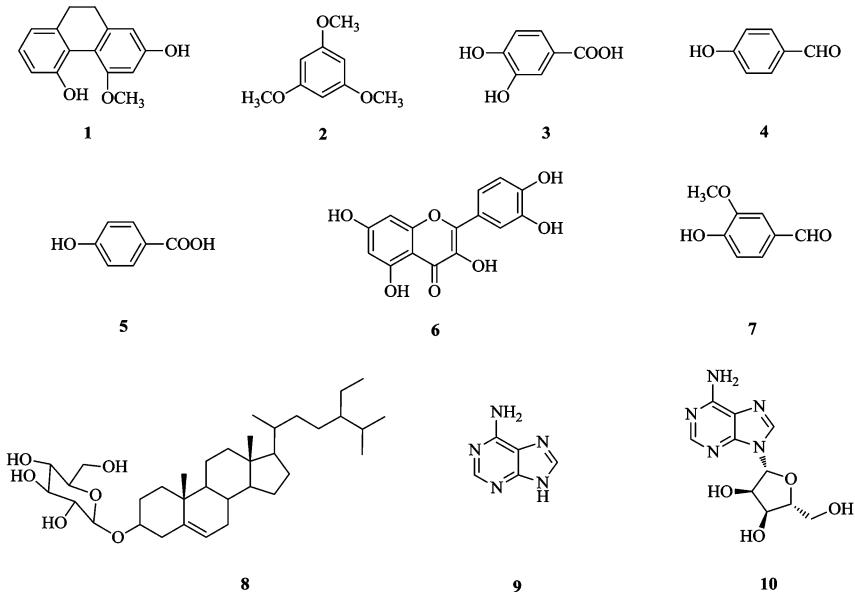


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-10

3 结构鉴定

化合物 1 白色粉末, 易溶于三氯甲烷和丙酮, 紫外灯(254 nm)下显暗斑, 硫酸乙醇显色为红棕色斑点。分子式为 $C_{15}H_{14}O_3$, ESI-MS m/z 243 [$M + H$]⁺。¹H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.87 (1H, s, 5-OH), 7.15 (1H, t, J = 7.8 Hz, H-7), 6.96 (1H, dd, J = 1.2, 7.8 Hz, H-6), 6.86 (1H, dd, J = 1.2, 7.8 Hz, H-8), 6.52 (2H, m, H-1, 3), 3.97 (3H, s, 4-OCH₃), 2.66 ~ 2.72 (4H, m, H-9, 10)。¹³C-NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 109.4 (C-1), 155.7 (C-2), 99.4 (C-3), 155.3 (C-4), 115.7 (C-4a), 120.8 (C-4b), 153.6 (C-5), 118.0 (C-6), 128.1 (C-7), 120.0 (C-8), 140.8 (C-8a), 31.0 (C-9), 31.4 (C-10), 144.1 (C-10a), 57.3 (4-OCH₃)。以上数据与文献[7]报道基本一致, 故鉴定为 2,5-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲。

化合物 2 白色固体, 紫外灯(254 nm)下显暗斑。分子式为 $C_9H_{12}O_3$, ESI-MS m/z 169 [$M + H$]⁺。¹H-NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.33 (3H, s, H-2, 4, 6), 3.88 (9H, s, 1, 3, 5-OCH₃)。¹³C-NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 149.0 (C-1, 3, 5), 108.5 (C-2,

4,6), 56.9 (1, 3, 5-OCH₃)。以上数据与文献[8]报道基本一致, 故鉴定为间苯三酚三甲醚。

化合物 3 白色固体, 易溶于甲醇, 紫外灯(254 nm)下显暗斑。分子式为 $C_7H_6O_4$, ESI-MS m/z 153 [$M - H$]⁻。¹H-NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.43 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 7.42 (1H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5)。¹³C-NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 123.2 (C-1), 117.7 (C-2), 146.0 (C-3), 151.5 (C-4), 115.8 (C-5), 123.9 (C-6), 170.3 (COOH)。以上数据与文献[9]报道基本一致, 故鉴定为 3,4-二羟基苯甲酸。

化合物 4 白色固体, 易溶于甲醇, 紫外灯(254 nm)下显暗斑。分子式为 $C_7H_6O_2$, ESI-MS m/z 121 [$M - H$]⁻。¹H-NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 9.77 (1H, s, CHO), 7.78 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.91 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5)。¹³C-NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 130.2 (C-1), 133.4 (C-2), 116.9 (C-3), 165.4 (C-4), 116.9 (C-5), 133.4 (C-6), 192.8 (CHO)。以上数据与文献[10]报道基本一致, 故鉴定为 4-羟基苯甲醛。

化合物 5 白色粉末, 易溶于甲醇, 紫外灯

(254 nm)下显暗斑。分子式为 $C_7H_6O_3$, ESI-MS m/z 137 [M - H]⁻。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.86 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5)。¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 122.7 (C-1), 133.0 (C-2), 116.1 (C-3), 163.4 (C-4), 116.1 (C-5), 133.0 (C-6), 170.2 (COOH)。以上数据与文献[9]报道基本一致,故鉴定为4-羟基苯甲酸。

化合物 6 黄色粉末,紫外灯(254 nm)下显暗斑,硫酸乙醇显色为黄色斑点。分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$, ESI-MS m/z 301 [M - H]⁻。¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ : 12.50 (1H, s, 5-OH), 10.78 (1H, s, 7-OH), 9.60 (1H, s, 3-OH), 9.37 (1H, s, 4'-OH), 9.31 (1H, s, 3'-OH), 7.68 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.40 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-6)。¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150 MHz) δ : 146.8 (C-2), 135.7 (C-3), 175.8 (C-4), 156.1 (C-5), 98.1 (C-6), 163.8 (C-7), 93.3 (C-8), 160.7 (C-9), 103.0 (C-10), 121.9 (C-1'), 115.0 (C-2'), 145.0 (C-3'), 147.7 (C-4'), 115.6 (C-5'), 120.0 (C-6')。以上数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定为槲皮素。

化合物 7 白色结晶,易溶于甲醇,紫外灯(254 nm)下显暗斑。分子式为 $C_8H_8O_3$, ESI-MS m/z 153 [M + H]⁺。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 9.83 (1H, s, CHO), 7.45 (1H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 7.44 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 7.07 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 3.94 (3H, s, 3-OCH₃)。¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 129.6 (C-1), 109.2 (C-5), 147.4 (C-3), 152.1 (C-4), 114.7 (C-2), 127.6 (C-6), 191.3 (CHO), 56.0 (3-OCH₃)。以上数据与文献[12]报道基本一致,故鉴定为香兰素。

化合物 8 白色粉末,紫外灯(254 nm)下无显示,硫酸乙醇显色为红色斑点。分子式为 $C_{35}H_{60}O_6$, ESI-MS m/z 599 [M + Na]⁺。¹H-NMR (C₅D₅N, 600 MHz) δ : 5.37 (1H, br s, H-6), 5.08 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 4.60 (1H, d, J = 11.4 Hz, H-6'), 4.45 (1H, dd, J = 4.8, 11.4 Hz, H-6'), 4.32 (2H, m, H-3', 4'), 4.09 (1H, t, J = 7.8 Hz, H-2'), 3.95 ~ 4.03 (2H, m, H-3, 5'), 1.00 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-21), 0.96 (3H, s, H-19), 0.88 ~ 0.93 (8H, m, H-9, 14, 26, 27), 0.68 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 150 MHz) δ : 37.9 (C-1), 28.9 (C-2), 78.9 (C-3), 40.3 (C-4), 141.3 (C-5), 122.3 (C-6), 32.4 (C-7),

32.6 (C-8), 50.7 (C-9), 37.3 (C-10), 21.7 (C-11), 39.8 (C-12), 42.9 (C-13), 57.2 (C-14), 24.9 (C-15), 30.7 (C-16), 56.6 (C-17), 12.5 (C-18), 19.8 (C-19), 36.8 (C-20), 19.4 (C-21), 34.6 (C-22), 26.8 (C-23), 46.4 (C-24), 29.8 (C-25), 20.4 (C-26), 19.6 (C-27), 23.8 (C-28), 12.4 (C-29), 103.0 (C-1'), 75.7 (C-2'), 79.0 (C-3'), 72.1 (C-4'), 78.5 (C-5'), 63.2 (C-6')。以上数据与文献[13]报道基本一致,故鉴定为胡萝卜昔。

化合物 9 白色结晶,紫外灯(254 nm)下显暗斑。分子式为 $C_5H_5N_5$, ESI-MS m/z 136 [M + H]⁺。¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ : 8.10 (1H, s, H-2), 8.08 (1H, s, H-8), 7.06 (2H, s, 6-NH₂)。¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150 MHz) δ : 152.2 (C-2), 151.8 (C-4), 117.2 (C-5), 155.1 (C-6), 139.7 (C-8)。以上数据与文献[14]报道基本一致,故鉴定为腺嘌呤。

化合物 10 白色结晶,紫外灯(254 nm)下显暗斑。分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$, ESI-MS m/z 268 [M + H]⁺。¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ : 8.34 (1H, s, H-2), 8.14 (1H, s, H-8), 7.32 (2H, s, NH₂), 5.88 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-1'), 5.42 (2H, m, 2', 5'-OH), 5.18 (1H, d, J = 1.8 Hz, 3'-OH), 4.61 (1H, q, H-2'), 4.15 (1H, m, H-3'), 3.97 (1H, m, H-4'), 3.61 (2H, m, H-5')。¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150 MHz) δ : 152.3 (C-2), 149.1 (C-4), 119.3 (C-5), 156.1 (C-6), 139.9 (C-8), 87.9 (C-1'), 73.4 (C-2'), 70.6 (C-3'), 85.9 (C-4'), 61.7 (C-5')。以上数据与文献[15]报道基本一致,故鉴定为腺嘌呤核苷。

4 讨论

前人研究发现斑叶兰属植物含有黄酮类、有机酸类等多种化学成分,其中以黄酮类成分为主。本实验对斑叶兰 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯和正丁醇萃取部位进行了分离纯化,从中分离得到 10 个化合物,均为属内首分。其中化合物 1 属于 9,10-二氢菲类化合物,菲类成分是兰科植物的特征性成分,具有多种生物活性^[16],然而菲类成分却尚未在斑叶兰属植物中报道,本实验研究结果丰富了兰科斑叶兰属植物的化学成分种类。本课题组将继续对斑叶兰不同萃取部位的其它流分进行分离与纯化,以期获得更多的单体化合物,为后续的药理活性研究以及植物资源的开发利用提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999, 725.
- [2] 倪素碧. 兰花药膳滋补强身[J]. 植物杂志, 1999, 3: 14-15.
- [3] 朱平福, 赵怡, 金晶. 斑叶兰抗炎作用的实验研究 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(4): 35-36.
- [4] 王惠兴. 半枝莲与斑叶兰外敷治疗鼻疖 36 例[J]. 中医外治杂志, 2001, 10(6): 52.
- [5] DU X M, SUN N Y, Shoyama Y. Flavonoids from *Goodyera schlechtendaliana* [J]. Phytochemistry, 2000, 53(8): 997-1000.
- [6] 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.
- [7] 谭桂山, 孙丽, 曹建国, 等. 麦斛细胞毒活性成分研究 [J]. 有机化学, 2006, 26(3): 372-374.
- [8] 谢乔, 王文婧, 李国强, 等. 仔榄树的化学成分[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2013, 34(1): 121-124.
- [9] 邓雪红, 郑承剑, 吴宇, 等. 爬岩红化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(10): 777-781.
- [10] 王淑英. 牡竹属竹叶化学成分研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.
- [11] 李梦云, 马养民, 乔珂, 等. 水蓼化学成分的研究[J]. 中成药, 2017, 39(4): 769-773.
- [12] 余邦良, 刘寿柏, 黄内利, 等. 眼树莲的化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 96-100.
- [13] 曾金祥, 许兵兵, 毕莹, 等. 车前子化学成分研究(Ⅱ) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 81-84.
- [14] 孙洁, 张蕾, 张晓珑, 等. 蒙古黄芪的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 138-143.
- [15] 杜文鹏, 徐彭, 刘波, 等. 毛竹笋化学成分研究(I) [J]. 中草药, 2015, 46(3): 334-338.
- [16] Adriana K, Andrea V, Judit H. Natural phenanthrenes and their biological activity [J]. Phytochemistry, 2007, 69(5): 1084-1110.

[责任编辑 顾雪竹]