

· 基础研究 ·

广东紫珠茎和叶乙醇水提取物的乙酸乙酯 溶性部位化学成分研究(II)[△]

陈冈¹, 付辉政^{2*}, 戴冕², 冯童童², 王栋^{2*}

(1. 江西省人民医院, 江西 南昌 330006;

2. 江西省药品检验检测研究院 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 江西 南昌 330046)

[摘要] 目的: 研究广东紫珠 *Callicarpa kwangtungensis* Chun 茎和叶的 70% 乙醇水提取物的乙酸乙酯萃取部位的化学成分。方法: 利用硅胶、ODS、Sephadex LH-20、MPLC 等柱色谱方法进行化合物的分离纯化, 根据化合物的薄层色谱和波谱分析方法及文献资料查询来进行结构鉴定。结果: 从广东紫珠乙酸乙酯溶性部位分离得到 8 个化合物, 分别为: 乌药倍半萜内酯 D(1), 丁香酸(2), 黑麦草内酯(3), 荆芥内酯(4), 4-羟基苯甲酸(5), 4-羟基苯甲醛(6), 日本金粟兰内酯 A(7), 1R, 8-二羟基薄荷醇(8)。结论: 化合物 1、3~8 为首次从该植物中分离得到。

[关键词] 广东紫珠; 马鞭草科; 化学成分

Chemical Constituents of Ethyl Acetate-soluble Parts in Aqueous Ethanolic Extract of Stems and Leaf of *Callicarpa kwangtungensis* Chun (II)

CHEN Gang¹, FU Huizheng^{2*}, DAI Mian², FENG Tongtong², WANG Dong^{2*}

(1. Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China;

2. Jiangxi Provincial Institute for Drug Control, Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of ethyl acetate-soluble parts in the 70% aqueous ethanolic extract of the stems and leaf of *Callicarpa kwangtungensis* Chun. **Methods:** The chemical constituents were isolated and purified by chromatographic column on silica gel, ODS, Sephadex LH-20 and MPLC. Their structures were elucidated by thin layer chromatographic analysis, spectroscopic evidence and compared with those in literatures. **Results:** Eight compounds were isolated from ethyl acetate soluble part of the 70% aqueous ethanolic extract, whose structures were elucidated as linderagalactone D(1), syringic acid(2), loliolide(3), schizonepetin(4), 4-hydroxybenzoic acid(5), 4-hydroxybenzaldehyde(6), chlojaponilactone A(7), 1R, 8-dihydroxymenthol(8). **Conclusion:** Compounds 1, 3-8 were isolated from this plant for the first time.

[Keywords] *Callicarpa kwangtungensis* Chun; Verbenaceae; chemical constituents

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.8.013

广东紫珠 *Callicarpa kwangtungensis* Chun 为马鞭草科(Verbenaceae)紫珠属(*Callicarpa* L.)植物, 别名万年青、珍珠风、臭常山、老鸦饭等。灌木, 高约 2 m, 主要分布于浙江、江西、福建、湖北、湖南、贵州、福建、广东等地, 生于海拔 300~1600 m 的山坡林中或灌木丛中^[1]。广东紫珠在民间习称

“紫珠草”, 在江西萍乡地区民间沿用已久, 是 20 世纪 70 年代中草药运动发掘出来的药物^[2]。广东紫珠具有清热解毒、凉血止血、消炎生肌等功效, 主治偏头风痛、吐血、跌打肿痛、外伤出血等^[3]。该植物在民间主要用于止血疗伤, 多数以茎叶水煎内服或研末外敷。目前, 国内外学者报道了广东紫珠主

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(81460589)

* [通信作者] 付辉政, 助理研究员, 研究方向: 中药活性成分及质量标准研究, E-mail: fhzhz620@sohu.com; 王栋, 主任中药师, 研究方向: 中药活性成分及质量标准研究, Tel: (0791)86258662, E-mail: jxdcwd@126.com

要含有黄酮苷^[2,4-6]、苯丙素糖苷^[2]、三萜^[2,5-7]、酚酸^[2,4-5]等类化合物。在前期研究基础上,继续对其化学成分进行研究。利用各种色谱技术从广东紫珠茎和叶的70%乙醇水提物的乙酸乙酯溶性部位分离鉴定了8个单体化合物,分别为:乌药倍半萜内酯D(1),丁香酸(2),黑麦草内酯(3),荆芥内酯(4),4-羟基苯甲酸(5),4-羟基苯甲醛(6),日本金粟兰内酯A(7),1R,8-二羟基薄荷醇(8)。化合物1、3~8均为首次从该植物中分离得到。

1 仪器与材料

Varian UNITY INOVA 600 超导核磁共振仪(美国 Varian 公司); MicromassZabSpec 质谱仪(美国 Micromass 公司); 岛津 2010 系列高效液相色谱仪(日本岛津公司); Buchi 中压液相制备色谱仪(瑞士步琪公司); 岛津 20-AD 型制备高效液相色谱仪; C₁₈ 反相填料为日本 YMC 产品; Sephadex LH-20(瑞典 Amersham Biosciences 公司); Sartorius BP211D 型电子天平(德国赛托利斯集团); UV-260 分光光度计(日本岛津公司); 柱色谱硅胶(200~300目)、薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂); 水为娃哈哈纯净水,氘代试剂 DMSO-*d*₆(美国剑桥公司 CIL); 其他试剂均为分析纯。

广东紫珠原药材采自江西萍乡,经江西省药品检验检测研究院周国平主任中药师鉴定为马鞭草科植物广东紫珠 *Callicarpak wangtungensis* Chun 的干燥枝及叶。标本保存在江西省药品检验检测研究院中药标本室。

2 提取与分离

广东紫珠的茎和叶干药材 150 kg,粉碎,用6倍量70%乙醇水浸泡4h,加热回流提取3次,每次2h,浓缩至浸膏40L,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取。萃取液分别减压浓缩至干,得石油醚溶性部分(23.2g)、乙酸乙酯溶性部分(312g)和正丁醇溶性部分(521g)。将乙酸乙酯溶性部分用适量甲醇溶解后,用1:1.5的硅胶拌样,经正相硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(8:1)为洗脱剂,依次接下14份500mL洗脱液及8份切得干柱组分Fr.1~Fr.22。Fr.8(7.2g)以三氯甲烷-甲醇(30:1~2:1)为洗脱剂进行正相硅胶柱色谱,经薄层色谱检视,合并相近的组分,得6个组分(Fr.8-1~Fr.8-6)。Fr.8-5(2.1g)经中压制备液相色谱,以甲醇-水

(20:80~80:20)梯度洗脱,经高效液相色谱检测后,合并为7个部分(Fr.8-5-1~Fr.8-5-7),Fr.8-5-3(15.1mg)经反相高效制备液相色谱,以甲醇-水(30:70)(7mL·min⁻¹)为流动相,得到化合物1(7.4mg)。Fr.8-5-4(120mg)经反相高效制备液相色谱,以乙腈-0.1%三氟乙酸(21:79)(7mL·min⁻¹)为流动相,得到化合物2(12.5mg)、3(10.6mg)和4(6.3mg)。Fr.14(7.6g)以三氯甲烷-甲醇(25:1~2:1)为流动相进行正相硅胶柱色谱,经薄层色谱检视,合并相近的组分,得8个组分(Fr.14-1~14-8)。Fr.14-6(2.5g)经中压制备液相色谱,以甲醇-水(20:80~80:20)梯度洗脱,经高效液相色谱检测后,合并为7个部分(Fr.14-6-1~14-6-7),Fr.14-6-4(10.3mg)经反相高效制备液相色谱,以甲醇-水(26:74)(7mL·min⁻¹)为流动相,得到化合物5(6.6mg),Fr.14-6-5(121mg)经反相高效制备液相色谱,以乙腈-0.1%三氟乙酸(19:81)(7mL·min⁻¹)为流动相,得到化合物6(9.2mg)和7(15.6mg)。Fr.14-6-6(221mg)经 SephadexLH-20 柱色谱,以95%的甲醇水洗脱,得到5个部分(Fr.14-6-6-1~14-6-6-5),Fr.14-6-6-3(70.8mg)经反相高效制备液相色谱,以乙腈-0.1%三氟乙酸(17:83)(7mL·min⁻¹)为流动相,得到化合物8(12.2mg)。

3 结构鉴定

化合物1:黄色无定形粉末(甲醇),HR-ESI-MS *m/z*: 285.11 [M+Na]⁺; ¹H-NMR(600MHz, DMSO-*d*₆)δ: 1.31(3H, s, CH₃-14), 1.77(3H, s, CH₃-13), 1.94(3H, d, *J* = 6.0 Hz, CH₃-15), 2.17(1H, d, *J* = 12.0 Hz, H_α-9), 2.56(2H, m, H-2), 3.19(1H, d, *J* = 12.0 Hz, H_β-9), 3.89(1H, m, H-1), 5.82(1H, brs, H-3), 6.63(1H, s, H-6), 9.14(1H, s, 8-OH); ¹³C-NMR(150MHz, DMSO-*d*₆)δ: 74.7(C-1), 33.6(C-2), 130.7(C-3), 132.1(C-4), 153.0(C-5), 113.2(C-6), 156.1(C-7), 103.1(C-8), 44.3(C-9), 43.1(C-10), 118.6(C-11), 173.6(C-12), 8.6(C-13), 17.4(C-14), 20.0(C-15)。以上数据与文献数据基本一致^[8],故鉴定化合物1为乌药倍半萜内酯D,为首次从该植物中分离得到。

化合物2:白色无定形粉末(甲醇),ESI-MS *m/z*: 199 [M+H]⁺, 221 [M+Na]⁺; ¹H-NMR(600MHz,

DMSO- d_6) δ : 3.80 (6H, s, 7-OCH₃, 8-OCH₃), 7.20 (2H, s, H-2, 6), 9.16 (1H, s, 4-OH), 12.55 (1H, s, 9-COOH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.2 (C-7), 147.4 (C-3, 5), 140.2 (C-4), 120.4 (C-1), 106.9 (C-2, 6), 56 (7, 8-OCH₃)。以上数据与文献数据基本一致^[9], 故鉴定化合物 **2** 为丁香酸。

化合物 **3**: 白色粉末(甲醇), ESI-MS m/z : 219 [M + Na]⁺, 195 [M-H]⁻; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.19 (3H, s, CH₃-12), 1.38 (3H, s, CH₃-11), 1.63 (1H, dd, $J = 13.3, 4.0$ Hz, H α -2), 1.42 (1H, dd, $J = 14.1, 3.7$ Hz, H β -2), 1.67 (3H, s, 9-CH₃), 2.29 (1H, dt, $J = 13.3, 2.6$ Hz, H α -4), 1.87 (1H, dt, $J = 14.1, 2.6$ Hz, H β -4), 4.08 (1H, m, H-3), 4.98 (1H, s, 3-OH), 5.78 (1H, s, H-6); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 183.5 (C-8), 171.5 (C-6), 112.6 (C-7), 87.0 (C-5), 65.3 (C-3), 47.1 (C-2), 45.8 (C-4), 36.1 (C-1), 30.9 (C-11), 27.3 (C-9), 26.7 (C-12)。以上数据与文献数据基本一致^[10], 故鉴定化合物 **3** 为黑麦草内酯, 为首次从该植物中分离得到。

化合物 **4**: 浅黄色油状物, ESI-MS m/z : 205 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.90 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 10-CH₃), 0.94 (1H, dd, $J = 12.7, 4.0$ Hz, H α -5), 1.10 (1H, m, H-6), 1.70 (3H, s, 9-CH₃), 1.85 (2H, m, H-1), 2.21 (2H, m, H-2), 2.67 (1H, dd, $J = 13.6, 2.2$ Hz, H β -5), 3.34 (s, 11-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 35.1 (C-1), 24.4 (C-2), 161.5 (C-3), 104.1 (C-4), 46.3 (C-5), 29.3 (C-6), 120.1 (C-7), 172.3 (C-8), 8.4 (C-9), 21.4 (C-10)。以上数据与文献数据基本一致^[11], 故鉴定化合物 **4** 为荆芥内酯, 为首次从该植物中分离得到。

化合物 **5**: 白色无定形粉末(甲醇), ESI-MS m/z : 139 [M + H]⁺, 161 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.82 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 7.78 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 10.25 (1H, brs, 4-OH), 12.41 (1H, brs, 7-COOH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.0 (C-7), 163.2 (C-4), 132.9 (C-2, 6), 122.6 (C-1), 115.6 (C-3, 5)。以上数据与文献数据基本一致^[9], 故鉴定化合物 **5** 为4-对羟基苯甲酸, 为首次从该植物中分离得到。

化合物 **6**: 白色无定形粉末(甲醇), ESI-MS m/z : 123 [M + H]⁺, 121 [M-H]⁻; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.93 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 7.76 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 9.79 (1H, brs, 7-CHO), 10.61 (1H, brs, 4-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 191.5 (C-7), 163.8 (C-4), 132.6 (C-2, 6), 128.9 (C-1), 116.3 (C-3, 5)。以上数据与文献数据基本一致^[9], 故鉴定化合物 **6** 为4-对羟基苯甲醛, 为首次从该植物中分离得到。

化合物 **7**: 白色无定形粉末(甲醇), ESI-MS m/z : 249 [M + H]⁺, 271 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.08 (3H, s, 14-CH₃), 1.43 (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H β -9), 1.47 (3H, s, 15-CH₃), 1.51 (3H, s, 13-CH₃), 2.24 (1H, m, H-2), 2.30 (1H, m, H-2), 2.35 (1H, brt, $J = 11.7$ Hz, H β -6), 2.64 (1H, dd, $J = 10.5, 10.9$ Hz, H α -6), 2.84 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H α -9), 2.86 (1H, brd, $J = 12.1$ Hz, H-5), 3.36 (1H, dd, $J = 7.7, 7.0$ Hz, H-1), 4.70 (1H, brs, H-3), 7.9 (1H, s, 8-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 74.0 (C-1), 32.3 (C-2), 121.1 (C-3), 133.0 (C-4), 48.2 (C-5), 23.5 (C-6), 161.2 (C-7), 104.1 (C-8), 46.7 (C-9), 38.3 (C-10), 120.7 (C-11), 171.7 (C-12), 7.9 (C-13), 9.8 (C-14), 20.7 (C-15)。以上数据与文献数据基本一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为日本金粟兰内酯 A, 为首次从该植物中分离得到。

化合物 **8**: 白色无定形粉末(甲醇), EI-MS m/z : 211 [M + Na]⁺, 187 [M-H]⁻; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.82 (3H, s, 10-CH₃), 0.83 (3H, s, 9-CH₃), 1.10 (3H, s, 7-CH₃), 1.26 (2H, m, H₂-6), 1.39 (1H, m, H-4), 1.46 (1H, m, H-5), 1.65 (1H, dt, $J = 12.8, 3.9$ Hz, H-3), 1.77 (2H, m, H₂-2); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 73.6 (C-1), 49.1 (C-2), 70.3 (C-3), 55.8 (C-4), 17.3 (C-5), 39.5 (C-6), 17.4 (C-7), 74.3 (C-8), 30.1 (C-9), 29.7 (C-10)。以上数据与文献数据基本一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为1R, 8-二羟基薄荷醇, 为首次从该植物中分离得到。

参考文献

- [1] 中国科学院, 中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第65卷[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 74-75.

(下转第1125页)

阶段样品中共分离得到7种细菌、7种酵母菌、3种丝状真菌,并结合微生物菌落形态特征、显微形态及16S rDNA/18S rDNA分子序列比对对其进行初步鉴定。剔除同种菌株后,样品中所分离到微生物中,细菌包括枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、地衣形芽孢杆菌、芽孢杆菌属菌、巨大芽孢杆菌菌株、同温层芽孢杆菌、芽孢杆菌属菌;酵母菌包括伯顿丝孢毕赤酵母、克鲁维酵母菌株、克鲁维酵母菌株、弗比恩酵母菌、奥默柯达菌、异常威克汉姆酵母菌、异常毕赤酵母菌;丝状真菌包括青霉菌属真菌、卷枝毛霉菌、黑曲霉菌属真菌。样品中所分离到的细菌均具有产蛋白酶活性。

本实验采用含有单宁酸的固体平板初步筛选具产单宁酶特性的菌株。分离得到的5株细菌(枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、地衣形芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、同温层芽孢杆菌),5株酵母菌(伯顿丝孢毕赤酵母、克鲁维酵母菌株、奥默柯达酵母菌、异常威克汉姆酵母菌、异常毕赤酵母菌);3株丝状真菌(青霉菌、黑曲霉、卷枝毛霉菌)均有鞣质降解特性。目前关于真菌类的曲霉属、青霉属菌株产单宁酶的研究报道较多,而细菌和酵母菌的相关报道较少^[6-7]。与霉菌相比,细菌和酵母菌具有细胞结构简单、易于改造、生长繁殖快、适应能力强等优势,应用细菌及酵母菌的鞣质水解工艺研究更加方便,

可进一步考察初筛得到的菌株降解鞣质能力的强弱。利用微生物发酵五倍子能有效避免鞣质在胃肠道内的竞争性消耗,有效地减少了大分子沉淀物的形成对胃黏膜的刺激。本研究不仅为实现百药煎的现代炮制工艺提供了菌种基础,通过初筛得到的具单宁降解特性的4株细菌和5株酵母菌株,也为细菌和酵母菌产单宁酶的研究提供了一定的参考。

参考文献

- [1] 朱震亨.丹溪心法[M].上海:上海科学技术出版社,1963:96.
- [2] 叶定江.中药炮制学辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2005:497.
- [3] 朴春梅.五倍子的研究近况[J].中国民间疗法,2005,13(2):63-65.
- [4] 李弈,万德光.试论传统中药的发酵炮制[J].成都医学院学报,2006,1(2):99-101.
- [5] Bradoo S, Gupta R, Saxena R K, et al. Screening of extracellular tannase producing fungi; Development of a rapid and simple plate assay[J]. J Gen Appl Microbiol, 1996, 42(4):325-329.
- [6] Belur P D, mugeraya G. Microbial Production of Tannase: State of the Art [J]. Research Journal of Microbiology, 2011, 6(1):25-40.
- [7] Aguilar C N, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, et al. Microbial tannase; advances and perspectives[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(1):47-59.

(收稿日期 2016-11-07)

(上接第1119页)

- [2] 刘灿黄,崔蕾,谢丽娟,等.广东紫珠的研究进展[C]//第三届中国中药商品学术年会暨首届中药葛根国际产业发展研讨会论文集.长沙:中国商品学会中药商品专业委员会,2012:369-377.
- [3] 国家中医药管理局,《中华本草》编委会.中华本草:第6卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:5926.
- [4] 周伯庭,李新中,徐平声,等.广东紫珠地上部位化学成分研究(II)[J].湖南中医药大学学报,2005,25(1):20-22.
- [5] 陈艳华,冯锋,任冬春,等.广东紫珠地上部分的化学成分[J].中国天然药物,2008,6(2):120-122.
- [6] 洪燕龙.妇炎康泡腾片的制剂工艺、质量标准 and 广东紫珠化学成分的研究[D].北京:北京中医药大学,2004.
- [7] 周伯庭,李新中,徐平声,等.广东紫珠地上部位化学成分研究(I)[J].中南药学,2004,2(4):238-239.
- [8] Gan L S, Zheng Y L, Mo J X, et al. Sesquiterpenelactones from the root tubers of *Lindera aggregata* [J]. Nat Prod, 2009, 72(8):1497-1501.
- [9] Hong S S, Choi C W, Choi Y H, et al. Coixlachryside A: A new lignan glycoside from the roots of *Coixlachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf [J]. Phytochemistry Letters, 2016, 17: 152-157.
- [10] Sun Y Y, Wang H, Guo G L, et al. Isolation, purification, and identification of antialgal substances in greenalga *Ulvaprolifera* for antialgal activity against the common harmful red tide microalgae [J]. Environ Sci Pollut Res, 2016, 23:1449-1459.
- [11] Liu D L, Shan M Q, Chen P D, et al. Qualitative and quantitative studies on impurities in schizonepetin, a novel antiviral agent, using HPLC, NMR and MS [J]. Chromatographia, 2013, 76:491-498.
- [12] El-Gamal A A. Sesquiterpenelactones from *Smyrniump lus-trum* [J]. Phytochemistry, 2001, 57:1197-1200.
- [13] Musharraf S G, Ahmed M A, Ali R A, et al. Hydroxylation of (+)-menthol by *Macrophominaphaseolina* [J]. Informa healthcare, 2011, 29:77-82.

(收稿日期 2016-12-05)