

苦味叶下珠的化学成分研究

孙 伟

上海市奉贤区中心医院, 上海 201400

摘要: 目的 对苦味叶下珠 *Phyllanthus amarus* 的化学成分进行研究。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex-20 柱色谱、重结晶及制备高效液相色谱等技术提取分离苦味叶下珠的化学成分, 采用 UV、IR、EI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR、HMQC 及 HMBC 等光谱方法鉴定化合物结构。结果 从苦味叶下珠乙醇提取物的石油醚部位分离得到化合物 1~3, 分别鉴定为棕榈酸 (1)、对羟基苯甲醛 (2)、齐墩果酸 (3); 从二氯甲烷部位分离得到化合物 4~9, 分别鉴定为 stigmast-5-en-3-ol, oleate (4)、4-羟基-3-甲氧基苯甲酸 (5)、胡萝卜苷 (6)、芹菜素 (7)、木犀草素 (8)、叶下珠新苷 (9)。结论 化合物 9 是新化合物, 命名为叶下珠新苷, 化合物 4~8 为首次从苦味叶下珠中分离得到。

关键词: 苦味叶下珠; 叶下珠新苷; 齐墩果酸; 4-羟基-3-甲氧基苯甲酸; 芹菜素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0023-04

Chemical constituents of *Phyllanthus amarus*

SUN Wei

The Central Hospital of Fengxian District, Shanghai 201400, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of *Phyllanthus amarus*. **Methods** Chromatography on silica gel column, Sephadex LH-20 column, recrystallization, and preparative HPLC technique were used to isolate and purify the compounds. Spectroscopic methods including UV, IR, EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC, and HMBC were used to elucidate the structures of compounds. **Results** Nine compounds were obtained and identified as palmitic acid (1), 4-hydrobenzaldehyde (2), oleanolic acid (3), stigmast-5-en-3-ol, oleate (4), 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid (5), daucosterol (6), apigenin (7), luteolin (8), and phyllanoside (9). **Conclusion** Compound 9 is a new compound, named phyllanoside. Compounds 4~8 are isolated from the plant for the first time.

Key words: *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.; phyllanoside; oleanolic acid; 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid; apigenin

苦味叶下珠 *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. 为大戟科叶下珠属植物, 为一年生草本, 在我国主要分布于云南、海南、广东、广西等亚热带地区, 生长在村旁、路边、河流两岸、荒滩等地。苦味叶下珠是傣族民间草药, 其味微苦, 性凉, 归肝、脾、肾经。功能为清热解暑、利水消肿、明目消积。主治痢疾、泄泻、黄疸、水肿、热淋、石淋、目赤、夜盲、痞积、痈肿、毒蛇咬伤等征^[1-5]。研究表明, 苦味叶下珠具有体外抗乙肝病毒 (HBV) 作用^[6], 并对血栓具有抑制作用^[7]。本课题组对苦味叶下珠的化学成分进行研究, 从其全草乙醇提取物的石油醚萃取物中分离并鉴定了棕榈酸 (1)、对羟基苯甲醛 (2)、齐墩果酸 (3); 从二氯甲烷萃取物中分离得到 6 个化合物, 其中, 叶下珠新苷 (9) 是新化合物, 化合物 4~8 为首次从苦味叶下珠中分离得到。

1 仪器与材料

ZMD83—1 型电热熔点测定仪 (上海精密仪器仪表公司); R205 型旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); Bruker DEX—400 型核磁共振仪 (TMS 为内标, 德国布鲁克公司); Varian MAT—212 质谱仪 (美国瓦里安公司); Sephadex LH—20 (上海安玛西亚技术有限公司); 薄层色谱以及柱色谱所用硅胶均为青岛海洋化工集团公司产品; 所用试剂均为分析纯 (上海国药化学试剂有限公司)。

苦味叶下珠于 2010 年 9 月采自云南昆明, 经山东中医药大学药学院周长征副教授鉴定为大戟科叶下珠属植物苦味叶下珠 *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.。

2 提取与分离

取苦味叶下珠干燥全草 30 kg, 75%乙醇渗漉提

收稿日期: 2011-10-26

作者简介: 孙 伟, 男, 讲师, 主要从事治疗小儿新药开发。Tel: (021)57420711 E-mail: skeyan@yahoo.cn

网络出版时间: 2011-12-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20111223.1143.001.html>

取 6 次, 每次 2 h, 合并渗漉液, 减压浓缩至无醇味。得到的混悬液依次用石油醚、二氯甲烷萃取, 合并萃取液, 减压浓缩, 分别得到石油醚部分 101 g, 二氯甲烷部分 280 g。石油醚部分 (101 g) 经反复硅胶柱色谱, 得到化合物 **1** (59 mg)、**2** (45 mg)、**3** (61 mg); 二氯甲烷部分 (220 g) 经反复硅胶柱色谱, 再经 Sephadex LH-20 及制备高效液相分离纯化, 得到化合物 **4** (42 mg)、**5** (71 mg)、**6** (47 mg)、**7** (55 mg)、**8** (62 mg)、**9** (73 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色颗粒状结晶 (石油醚-醋酸乙酯), 易溶于氯仿。mp 61~62 °C。EI-MS m/z : 256 $[M]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 2.35 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 1.63 (2H, m), 1.25 (24H, brs), 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 180.7 (C-16), 34.1 (C-15), 31.9 (C-14), 29.6 (C-13), 29.4 (C-12), 29.3 (C-11), 29.2 (C-10), 29.0 (C-9), 24.6 (C-8), 22.7 (C-7), 14.1 (C-6)。与文献报道数据基本一致^[8], 故鉴定化合物 **1** 为棕榈酸。

化合物 **2**: 白色针状结晶, mp 115~118 °C。EI-MS m/z : 121 $[M-H]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.80 (1H, s, -CHO), 7.76 (2H, d, $J = 6.4$ Hz, H-2, 6), 6.93 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 191.4 (-CHO), 163.1 (C-4), 132.4 (C-2, 6), 128.8 (C-1), 115.8 (C-3, 5)。与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **2** 为对羟基苯甲醛。

化合物 **3**: 白色针晶 (氯仿-甲醇), mp 308~311 °C。TLC 喷雾 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-MeOH}$ 显紫色。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 412, 2 922, 2 851, 1 703, 1 468, 1 385, 1 377, 1 360, 1 322, 1 270。EI-MS m/z : 457 $[M+H]^+$, 456 $[M]$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 在高场区有 7 个角甲基 δ 0.75, 0.77, 0.90, 0.91, 0.92, 0.98, 1.13 (each 3H, s, -CH₃)、双键氢 δ 5.28 (1H, brs, H-12), 3.24 (1H, dd, $J = 10.2, 6.2$ Hz, H-3 α); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 180.5 (C-28), 145.6 (C-13), 122.9 (C-12), 79.0 (C-3), 56.0 (C-5), 48.5 (C-9), 46.7 (C-17), 46.5 (C-19), 42.3 (C-14, 18), 39.8 (C-4, 8), 39.5 (C-1), 34.5 (C-21), 33.6 (C-29), 33.4 (C-22), 32.9 (C-7), 31.3 (C-20), 29.2 (C-2), 28.9 (C-23), 28.5 (C-15), 26.3 (C-27), 23.8 (C-16), 23.5 (C-30), 18.9 (C-6), 17.6 (C-26), 16.9 (C-24), 15.7 (C-25)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为齐墩果酸。

化合物 **4**: 白色粉末, mp 156~159 °C, EI-MS

m/z : 414 $[M]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 谱具有 β -谷甾醇的特征, δ 0.70~2.40 为甾体骨架上众多的亚甲基和次甲基信号相互重叠产生。 δ 0.66 和 1.01 的两个甲基峰是 C₁₈ 和 C₁₉ 上质子信号, δ 5.33 为 H-6 典型的烯氢信号, 3.99 (1H, m, H-3), 5.46 (2H, m, H-9', 10'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 39.4 (C-1), 29.4 (C-2), 79.7 (C-3), 38.5 (C-4), 其余碳信号与 β -谷甾醇一致, δ : 175.1 (C-1'), 130.6 (C-9', 10'), 35.4 (C-2'), 34.7 (C-16'), 33.8 (C-7', 12'), 33.5 (C-6', 13', 14'), 33.1 (C-5'), 33.0 (C-15'), 29.5 (C-4'), 28.2 (C-8'), 26.1 (C-3'), 23.9 (C-17'), 14.1 (C-18')。与文献报道一致^[9], 鉴定化合物 **4** 为 satigmast-5-en-3-ol, oleate。

化合物 **5**: 白色针状结晶, mp 81~83 °C。EI-MS m/z : 151 $[M-H]^-$, 303 $[2M-H]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.83 (1H, s, -CHO), 7.04 (1H, d, H-6), 7.42 (2H, t, H-2, 5), 3.97 (3H, s, -OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 190.9 (-CHO), 151.7 (C-3), 147.2 (C-4), 129.9 (C-1), 127.5 (C-6), 114.4 (C-5), 108.8 (C-2), 56.1 (-OCH₃)。经图谱综合解析, 鉴定化合物 **5** 为 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛。

化合物 **6**: 白色粉末 (氯仿-甲醇), mp 286~287 °C, Libermann-Burchard 反应呈阳性, Molish 反应呈阳性。IR 中出现 3 400 cm^{-1} 的羟基吸收峰及 1 000~1 200 cm^{-1} 的苷键吸收峰, 与文献报道胡萝卜苷 IR 数据一致^[8], TLC 中与胡萝卜苷对照品显色一致。故鉴定化合物 **6** 为胡萝卜苷。

化合物 **7**: 浅褐色粉末 (丙酮), mp 340~342 °C, 盐酸镁粉反应呈阳性。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 266, 297, 337。EI-MS m/z : 271 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.20 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-6), 6.49 (1H, s, H-8), 6.78 (1H, s, H-3), 6.93 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 7.93 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 10.61 (2H, brs, OH-4, 7), 12.98 (1 H, s, OH-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 164.2 (C-2), 102.8 (C-3), 181.7 (C-4), 161.4 (C-5), 98.8 (C-6), 163.7 (C-7), 93.9 (C-8), 157.3 (C-9), 103.6 (C-10), 121.1 (C-1'), 161.2 (C-4'), 115.9 (C-3', 5'), 128.4 (C-2', 6')。波谱数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **7** 为芹菜素。

化合物 **8**: 淡黄色粉末 (醋酸乙酯), mp 283~286 °C, 薄层色谱 (硅胶 H-CMC 板) 自然光下呈黄色斑点, NH_3 熏后更加亮黄醒目。在石油醚-醋酸乙酯 (1:2) 和苯-醋酸乙酯-甲酸 (8:8:0.1) 两个展开系统中的 R_f 值均与木犀草素对照品一致。

UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 268, 346 nm。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 413, 1 653, 1 609, 1 512, 1 443, 1 373, 1 265, 1 164, 1 119, 1 030, 838。EI-MS m/z : 287 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.18 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.45 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.64 (1H, s, H-3), 6.88 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 7.39 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 7.40 (1H, dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, H-6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 164.3 (C-2), 102.8 (C-3), 181.6 (C-4), 161.4 (C-5), 98.8 (C-6), 163.9 (C-7), 93.8 (C-8), 157.2 (C-9), 103.6 (C-10), 118.9 (C-1'), 113.3 (C-2'), 149.8 (C-3'), 145.8 (C-4'), 116.0 (C-5'), 121.4 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 8 为木犀草素。

化合物 9: 白色粉末, mp 252~253 °C; 紫外光谱显示化合物无明显紫外吸收。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}):

3 338, 2 948, 2 863, 1 608, 1 094, 1 040, 1 727, 1 691; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -26.11$ (c 3.0, MeOH); HR-FAB-MS m/z : 1 126.189 7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 确定化合物的分子式为 $\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{O}_{23}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 数据见表 1。

$^1\text{H-NMR}$ 中, 显示该化合物有 8 个甲基取代, 其中 6 个为单峰 δ 1.03, 1.07, 1.25, 1.49, 1.68, 2.09 (s, $6 \times -\text{CH}_3$), 在 HMQC 图谱中 (图 1), 与之相关的碳信号分别为 δ 23.5 (C-35), 33.1 (C-29), 17.7 (C-26), 27.5 (C-27), 18.3 (C-25), 65.3 (C-24); 两个为双重峰 δ 1.73, 1.79 (d, $2 \times -\text{CH}_3$), 在 HMQC 图谱中与之相关的碳信号为两个鼠李糖的末端碳信号, 分别为 δ 19.5, 18.2; δ 5.55 (s, 1H) 推测可能是双键上的氢, 根据 HMQC 图谱与之相关的碳信号为 δ 125.3, 确定该氢信号是母核 C-12 上的氢信号; 在

表 1 化合物 9 的 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 数据
Table 1 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz and 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) data of compound 9

位置	δ_{H}	δ_{C}	位置	δ_{H}	δ_{C}
1		38.9	28		172.3
2		26.3	29	1.07 (s)	33.1
3	4.42 (m)	80.8	30	1.03 (s)	23.5
4		43.4	28-O-Glc-1	6.32 (d, $J = 8.4$ Hz)	95.4
5		47.6	2	4.18 (m)	73.5
6		17.9	3	4.56 (t, $J = 9.8$ Hz)	78.6
7		33.2	4	4.25 (m)	70.5
8		40.6	5	4.31 (m)	77.8
9		46.3	6	4.76 (s)	69.1
10		37.5	Glc'-1	5.08 (d, $J = 8.0$ Hz)	104.5
11		24.3	2	4.03 (m)	75.2
12	5.55 (s)	125.3	3	4.29 (overlap)	76.3
13		140.9	4	4.44 (m)	78.0
14		48.5	5	3.75 (d, $J = 10.0$ Hz)	76.7
15	2.04 (d, $J = 14.2$ Hz)	46.3	6	4.28 (overlap)	61.0
16		208.7	Rha-1	5.95 (s)	102.4
17		59.7	2	4.64 (m)	72.4
18		47.3	3	4.76 (m)	72.3
19		46.3	4	4.40 (overlap)	73.6
20		30.9	5	4.88 (m)	70.2
21		35.2	6	1.79 (d, $J = 6.0$ Hz)	18.2
22		27.1	3-O-Rha'-1	6.67 (s)	102.6
23		63.5	2	5.04 (s)	72.4
24	2.09 (s)	65.3	3	4.91 (m)	72.8
25	1.68 (s)	18.3	4	4.66 (m)	74.2
26	1.25 (s)	17.7	5	5.05 (m)	71.0
27	1.49 (s)	27.5	6	1.73 (d, $J = 6.0$ Hz)	19.5

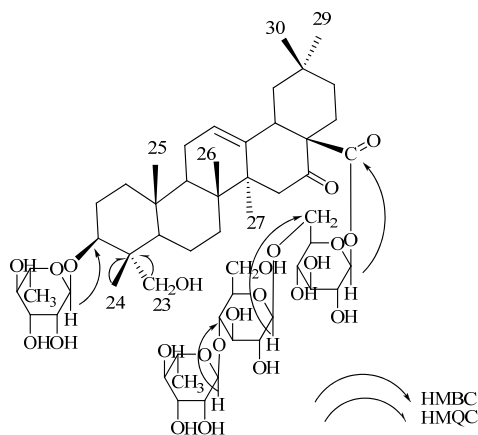


图1 化合物9的HMBC和HMQC关键相关

Fig. 1 Key HMBC and HMQC correlations of compound 9

HMBC图谱上氢信号 δ 5.08 (d, $J = 8.0$ Hz), 5.95 (s), 6.32 (d, $J = 8.4$ Hz) 和 6.67 (d, $J = 6.0$ Hz) 分别与 δ 104.5, 102.4, 95.4, 102.6 相关, 推测可能是糖上的端基氢信号; δ 3.50~5.10 的氢可能是糖上的氢信号。通过 ^{13}C -NMR谱和DEPT谱, 结合其相对分子质量可确定该化合物的分子式为 $\text{C}_{55}\text{H}_{92}\text{O}_{21}$ 。该化合物用三氟乙酸水解后, 衍生得糖腈乙酸酯衍生物, 采用GC-MS分析, 经与标准糖腈乙酸酯衍生物对照, 结构显示化合物9中存在D-葡萄糖和L-鼠李糖, 组成比例为1:1。

综上信息, 推断该化合物为五环三萜皂苷类, 其苷元为齐墩果烷型, 且连有4个糖, 两个类型。在HMBC谱中(图1), 糖的端基氢(δ 6.67)与 δ 80.8的碳相关, 所以表明化合物中的鼠李糖是连接在苷元的3位上; 同时, 其中一葡萄糖的端基氢(δ 6.32)与 δ 172.3的碳相关, 说明另一糖链是链接在苷元的28位上; 另一葡萄糖端基氢(δ 5.08)与 δ 69.1的碳相关, 鼠李糖的端基氢(δ 6.67)与 δ 78.0的碳相关, 所以28位上的糖链链接顺序是28-O-[β -D-吡喃葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-吡喃鼠李糖基], 结合相关谱图, 对化

合物9的碳氢作进一步的归属, 分析出化学结构式, 为一新化合物, 命名为叶下珠新苷。

4 讨论

我国苦味叶下珠资源非常丰富, 且能人工栽培。目前, 在苦味叶下珠的药理作用研究和临床应用研究方面已经做了大量的工作, 取得了一定的成绩, 也有很多苦味叶下珠制剂在临床应用。但是, 对苦味叶下珠有效部位及有效成分方面的研究较少。本研究从苦味叶下珠的乙醇提取物中分离到9个化合物, 为苦味叶下珠的质量评价指标的建立提供参考。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第4卷) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1998.
- [2] 张兰珍, 郭亚健, 涂光忠, 等. 叶下珠中新多酚化合物的分离与鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(12): 724.
- [3] 张兰珍, 郭亚健, 涂光忠, 等. 叶下珠新鞣花鞣质的分离与鉴定 [J]. 药学学报, 2004, 39(2): 119.
- [4] 万振先, 喻庆禄. 叶下珠化学成分的研究 (II) [J]. 中草药, 1997, 28(3): 134-135.
- [5] 秦民坚, 余永邦, 黄文哲. 江苏栽培太子参的化学成分研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(1): 38-40.
- [6] 韩林, 梁睿敏, 刘斌. 苦味叶下珠不同制剂对鸭体内乙肝病毒的抑制作用 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 910-912.
- [7] 米志宝. 中草药抗鸭乙型肝炎病毒的效果 [J]. 中西医结合肝病杂志, 1994, 4(4): 24.
- [8] 董振生, 程天印, 李丹. 山莓叶化学成分分析及其生物碱的抗菌作用 [J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(6): 25-30.
- [9] Wu J, Li M Y, Xiao Z H, et al. Butyrospermol fatty acid esters from the fruit of a Chinese mangrove *Xylocarpus granatum* [J]. Z Naturforsch B, 2006, 61: 1447-1449.
- [10] 杨雁, 王于方, 赵雷, 等. 羊耳菊花的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1083-1086.
- [11] 郭峰, 梁侨丽, 闵知大. 地胆草中黄酮成分的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(4): 303-304.