芫花醋酸乙酯部位的化学成分研究

邵泽艳 1,2, 赵娜夏 1, 夏广萍 1, 白秀秀 1,2, 董虹玲 1,2, 韩英梅 1*

- 1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193
- 2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘 要:目的 研究芫花中醋酸乙酯部位化学成分。方法 分别采用聚酰胺柱色谱、硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱等分离技术对芫花醋酸乙酯部位进行分离纯化,根据波谱数据和理化性质确定化合物的结构。结果 从芫花醋酸乙酯部位分离得到 11 个化合物,分别鉴定为松脂醇(1)、(一)-异落叶松脂素(2)、落叶松脂醇(3)、对羟基苯甲酸(4)、3,4-二羟基苯甲酸(5)、山柰酚-3-β-D-(6-O-反-p-香豆酰)葡萄糖苷(6)、山柰酚-3-β-D-(6-O-顺-p-香豆酰)葡萄糖苷(7)、芫花素(8)、3′-羟基芫花素(9)、芹菜素(10)、木犀草素(11)。结论 化合物 2、5、7 为首次从该植物中分离得到。

关键词: 芫花; (-)-异落叶松脂素; 3,4-二羟基苯甲酸; 山柰酚-3-β-D-(6-O-順-p-香豆酰)葡萄糖苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2013)03 - 0278 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.004

Chemical constituents in ethyl acetate fraction from Daphne genkwa

SHAO Ze-yan^{1, 2}, ZHAO Na-xia¹, XIA Guang-ping¹, BAI Xiu-xiu^{1, 2}, DONG Hong-ling^{1, 2}, HAN Ying-mei¹

- 1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
- 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in the ethyl acetate fraction from *Daphne genkwa*. **Methods** The chemical constituents in the ethyl acetate fraction from *D. genkwa* were isolated and purified by chromatography on polyamide, silica gel, Sephadex LH-20 columns, and their structures were identified by their physicochemical characteristics and spectral features. **Results** Eleven compounds were isolated and identified as pinoresinol (1), (–)-isolariciresinol (2), lariciresinol (3), 4-hydroxybenzonic acid (4), 3,4-diohydroxybenzoic acid (5), kaempferol-3-β-*D*-(6-*O-cis-p*-coumaroyl) glucopyranoside (6), kaempferol-3-β-*D*-(6-*O-cis-p*-coumaroyl) glucopyranoside (7), genkwanin (8), 3'-hydroxygenkwanin (9), apigenin (10) and luteolin (11). **Conclusion** Compounds 2, 5 and 7 are all isolated from this plant for the first time.

Key words: *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.; (¬)-isolariciresinol; 3,4-diohydroxybenzoic acid; kaempferol-3-β-*D*-(6-*O-cis*-p-coumaroyl) glucopyranoside

芫花为瑞香科植物芫花 Daphne genkwa Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾,分布于长江流域以南及山东、河南、陕西等省^[1]。传统上芫花作为泻水逐饮药,用于水肿胀满、胸腹积水、痰饮喘咳、二便不利,外治疥癣秃疮、冻疮等症^[2]。现代研究证明芫花所含化学成分结构多样,已发现黄酮类、香豆素类、木脂素类、二萜原酸酯类以及酚苷类成分^[3-4],本课题组首对芫花中瑞香烷型二萜原酸酯类化合物及其抗肿瘤细胞毒活性进行了研究^[5]。

为进一步探明芫花的物质基础,为其药材的质量控制提供对照物质,本实验对芫花醋酸乙酯部位进行了分离纯化,从中分离得到 11 个单体化合物,分别确认结构为松脂醇 (1)、(-)-异落叶松脂素 (2)、落叶松脂醇 (3)、对羟基苯甲酸 (4)、3,4-二羟基苯甲酸 (5)、山柰酚-3-β-D-(6-O-反-p-香豆酰)葡萄糖苷 (6)、山柰酚-3-β-D-(6-O-顺-p-香豆酰)葡萄糖苷 (7)、芫花素 (8)、3′-羟基芫花素 (9)、芹菜素 (10)、木犀草素 (11),其中化合物 2、5、7 为首次

收稿日期: 2013-04-01

基金项目: 国家重大新药创新专项(2011ZX09401-009)

作者简介: 邵泽艳 (1987—), 女,硕士,药物分析专业。Tel: 13920791093 E-mail: shaozeyan-1987-2@163.com

*通信作者 韩英梅,硕士生导师,从事天然药物化学研究。Tel: (022)23006959 E-mail: hanyingmei@163.com

从该植物中分离得到。

1 仪器与材料

Bruker AV 400 MHz 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Waters Model 510 型制备型高效液相色谱仪 (Waters 公司); SP100 型紫外检测器 (SP 公司); Kromasil ODS C_{18} 半制备色谱柱 (200 mm×20 mm, 5 μ m, 大连依利特公司); ZAB—HS 有机磁式质谱仪 (英国 VG 公司); 聚酰胺 (30~60 目,上海警备区后勤部综合厂); 色谱用硅胶(200~300 目、60~100 目,青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 柱(GE Healthcare 公司); TU—1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); 反相 C_{18} 填料 (YWG- C_{18} , 20~30 μ m, 天津博瑞键合色谱技术有限公司); 试剂均为市售化学纯。

芫花花蕾购自河北安国药材市场,产地河南,经天津药物研究院韩英梅研究员鉴定为瑞香科植物 芫花 *Daphne genkwa* Sieb.et. Zucc.的干燥花蕾。标本(YH01)存放于天津药物研究院新药设计与发现重点实验室。

2 提取与分离

取芫花干燥花蕾 9 kg,用 70%乙醇室温下冷浸提取 2 次 (6 d/次)。合并 2 次提取液,60 ℃下减压浓缩,所得总浸膏用适量水混悬,依次用石油醚(60~90 ℃)、醋酸乙酯、正丁醇反复萃取,减压浓缩得到石油醚部位 114.1 g,醋酸乙酯部位 167.0 g,正丁醇部位 317.9 g。

醋酸乙酯部位 (167.0 g) 经聚酰胺 (30~60 目) 柱,依次用乙醇-水(0:1~95:5)梯度洗脱,流 分经 TLC 检测合并, 共得 6 个组分。组分 Ⅱ (12.8 g) 经硅胶柱色谱二氯甲烷-甲醇梯度洗脱、多次 Sephadex LH-20 柱色谱二氯甲烷 - 甲醇梯度洗脱、 反复重结晶和半制备型 HPLC 乙睛 - 水 - 甲酸 (23:77:0.1%)洗脱纯化,得化合物 1 (89.6 mg), 2 (150 mg), 3 (13.8 mg), 4 (280.6 mg), 5 (26.8 mg)。组分III(14.6g)经硅胶柱色谱二氯甲烷-甲 醇梯度洗脱、Sephadex LH-20 柱色谱二氯甲烷 - 甲 醇梯度洗脱和半制备型 HPLC 乙睛 - 水 - 甲酸 (27:73:0.1%) 洗脱纯化,得化合物 6 (163 mg), 7 (78 mg); 组分VI (15.0g) 经硅胶柱色谱二氯甲 烷-甲醇梯度洗脱、反相 C₁₈ 柱色谱甲醇-水-0.1%甲酸梯度洗脱、多次 Sephadex LH-20 柱色谱二 氯甲烷-甲醇梯度洗脱及反复重结晶,得化合物8(9.6 mg), 9 (109.7 mg), 10 (102.9 mg), 11 (75.6 mg).

3 结构鉴定

化合物 1: 无色针晶(甲醇),三氯化铁 - 铁氰化钾反应阳性;EI-MS m/z: 358.2 [M]⁺, $C_{20}H_{22}O_{6}$; 1 H-NMR(400 MHz,DMSO- d_{6}) δ : 6.88(2H,d,J=8.0 Hz,H-5、5'),6.74(2H,d,J=8.0 Hz,H-6、6'),6.59(2H,s,H-2、2'),4.60(2H,d,J=3.6 Hz,H-7、7'),4.14(2H,m,H-9 α 、9' α),3.75(2H,m,H-9 β 、9' β),3.73(6H,s,2OCH₃),3.03(2H,brt,J=4.0 Hz,H-8、8'); 13 C-NMR(100 MHz,DMSO- d_{6}) δ : 147.9(C-3、3'),145.9(C-4、4'),132.2(C-1、1'),118.6(C-6、6'),115.1(C-5、5'),110.4(C-2、2'),85.1(C-7、7'),70.9(C-9、9'),55.6(2OCH₃),53.6(C-8、8')。以上数据与文献报道 16 一致,故确认化合物 1 为松脂醇(pinoresinol)。

化合物 2: 白色粉末,三氯化铁-铁氰化钾反应 阳性; UV-vis (CH₃OH) 285 nm (10 880); -24.9° $(c=0.177, CH_3OH); EI-MS m/z: 360.2 [M]^+,$ $C_{20}H_{24}O_6$; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.73 (1H, d, J=8.0 Hz, H-5), 6.67 (1H, brs, H-2), 6.64 (1H, brs, H-5'), 6.60 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-6), 6.18 (1H, brs, H-2'), 3.79 (3H, s, OCH₃-3), 3.76 (3H, s, OCH₃-3'), 3.68 (2H, m, H-9'), 3.67 (1H, m, H-9a), 3.40 (1H, dd, *J*=4.0, 11.2 Hz, H-9b), 2.76 (2H, d, *J*=7.6 Hz, H-7'), 1.99 (1H, m, H-8'), 1.77 (1H, m, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 149.0 (C-3'), 147.2 (C-3), 145.9 (C-4'), 145.3(C-4), 138.6(C-6'), 134.2(C-1), 129.0(C-1'), 123.2(C-6), 117.3(C-5'), 116.0(C-5), 113.8(C-2), 112.4(C-2'), 66.0(C-9'), 62.3(C-9), 56.4(OCH₃-3),56.4 (OCH₃-3'), 48.0 (C-7, 8), 40.0 (C-8'), 33.6 (C-7')。以上数据与文献报道^[7]一致,故确认化合物 2 为(-)-异落叶松脂素[(-)-isolariciresinol]。

化合物 **3**: 白色粉末,三氯化铁 - 铁氰化钾反应阳性; EI-MS m/z: 360.2 [M]⁺, $C_{20}H_{24}O_{6}$; ¹H-NMR (400 MHz,DMSO- d_{6}) δ : 6.81 (1H,brs,H-2),6.72 (1H,brs,H-5),6.67 (3H,brt,J=7.2 Hz,H-5'、6、6'),6.55 (1H,m,H-2')4.64 (1H,d,J=6.4 Hz,H-7),3.86 (1H,brt,J=6.8 Hz,H-9'b),3.73 (6H,s,2OCH₃-3),3.65 (1H,m,H-9b),3.45 (1H,dd,J=6.8、8.4 Hz,H-9'a),3.38 (1H,m,H-9a),2.82 (1H,dd,J=4.4、13.2 Hz,H-7'b),2.57 (1H,m,H-8'),2.40 (1H,brt,J=12.8 Hz,H-7'a),2.18 (1H,m,H-8); 13 C-NMR (100 MHz,

DMSO- d_6) δ : 147.4(C-4),147.3(C-4¹),145.5 (C-3),144.6(C-3¹),134.6(C-1),131.7(C-1¹),120.6(C-6¹),118.2(C-6),115.4(C-5¹),115.0(C-5),112.7(C-2¹),110.0(C-2),81.7(C-7),71.8(C-9¹),58.6(C-9),55.6(3'-OCH₃),55.5(3-OCH₃),52.4(C-8),42.0(C-8¹),32.1(C-7¹)。以上数据与文献报 道^[8]一致,确认化合物 **3** 为落叶松脂醇(lariciresinol)。

化合物 4: 白色粉末,三氯化铁 - 铁氰化钾反应阳性; EI-MS m/z: 138.0 [M] $^+$, $C_7H_6O_3$; 1 H-NMR (400 MHz,DMSO- d_6) δ : 7.78 (2H,d,J=8.8 Hz,H-2、H-6),6.83 (2H,d,J=8.8 Hz,H-3、H-5); 13 C-NMR (100 MHz,DMSO- d_6) δ : 167.2 (C-1'),161.6 (C-4),131.5 (C-2、C-6),121.4 (C-1),115.1 (C-3、C-5)。以上数据与文献报道^[9]一致,确认化合物 4 为对羟基苯甲酸(4-hydroxybenzonic acid)。

化合物 **5**: 白色粉末,三氯化铁 - 铁氰化钾反应阳性; EI-MS m/z: 154.0 [M] $^+$, $C_7H_6O_4$; 1 H-NMR (400 MHz,DMSO- d_6) δ : 7.34 (1H,d,J=2.0 Hz,H-2),7.29 (1H,dd,J=2.0、8.0 Hz,H-6),6.78 (1H,d,J=8.0Hz,H-5); 13 C-NMR(100 MHz,DMSO- d_6) δ : 167.5 (C-1'),150.1 (C-4),145.0 (C-3),122.0 (C-1),121.9 (C-6),116.7 (C-5),115.2 (C-2)。以上数据与文献报道 $^{[10]}$ 一致,故确认化合物 **5** 为 3,4-二羟基苯甲酸(3,4-diohydroxybenzoic acid)。

化合物 6: 淡黄色粉末,三氯化铁-铁氰化钾 反应阳性; UV-vis (CH₃OH) 268.5 nm (21730); -61.5° (c=0.159, CH₃OH); HR-EI-MS m/z: $595.144\ 3\ [M+H]^{+}(C_{30}H_{26}O_{13});\ ^{1}H-NMR(400\ MHz,$ DMSO- d_6) δ : 12.59 (1H, s, 5-OH), 7.98 (2H, d, *J*=8.8Hz, H-2', 6'), 7.36 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-5", 9"), 7.34 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-3"), 6.85 (2H, d, J=8.8Hz, H-3', 5'), 6.79 (2H, d, J=8.0)Hz, H-6", 8"), 6.37 (1H, d, J=1.8Hz, H-8), 6.13 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-6), 6.11 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-2""), 5.44 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1"), 4.28 (1H, dd, *J*=1.3、11.6 Hz, Hb-6"), 4.03 (1H, dd, *J*=6.4、11.6 Hz, Ha-6"), 3.16-3.41 (4H, m, H-2", 3", 4", 5"); 13 C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.3 (C-4), 166.2 (C-1"'), 164.6 (C-7), 161.1 (C-5), 160.0 (C-4'), 159.8 (C-7"'), 156.4 (C-2), 156.4 (C-9), 144.6 (C-3"), 133.1 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 130.1 (C-5"', 9"'), 124.9 (C-4"'), 120.7 (C-1'), 115.8 (C-6"', 8"'), 115.1 (C-3', 5'), 113.6 (C-2""), 103.7 (C-10), 101.0 (C-1"), 98.9 (C-6), 93.7 (C-8), 76.2 (C-2"), 74.2 (C-3"), 74.1 (C-5"), 70.0 (C-4"), 63.0 (C-6")。以上数据与文献报道^[11]一致,故确认化合物 **6** 为山柰酚-3-β-D-(6-O-反-p-香豆酰)葡萄糖苷[kaempferol-3-β-D- (6-O-trans-p-coumaroyl)glucopy ranoside]。

化合物 7: 淡黄色粉末,三氯化铁-铁氰化钾 反应阳性; UV-vis (CH₃OH) 268.5 nm (31 037); -38.1° (c=0.137, CH₃OH); HR-EI-MS m/z: 595.144 5 $[M+H]^+$, $C_{30}H_{26}O_{13}$; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.52 (1H, s, 5-OH), 7.94 (2H, d, *J*=8.4Hz, H-2', 6'), 7.54 (2H, d, *J*=8.4Hz, H-5"', 9"'), 6.84 (2H, d, *J*=8.4Hz, H-3', 5'), 6.70 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-6"', 8"'), 6.65 (1H, d, *J*=14.4 Hz, H-3"'), 6.36 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, s, H-6), 5.46 (1H, d, *J*=12.8 Hz, H-2"'), 5.40 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1"), 4.17 (1H, dd, J=1.3, 11.6, Hz, Hb-6"), 4.09 (1H, dd, *J*=5.6, 11.6 Hz, Ha-6"), $3.12\sim3.38$ (4H, m, H-2", 3", 4", 5"); 13 C-NMR $(100 \text{ MHz}, \text{DMSO-}d_6)\delta: 177.3(\text{C-4}), 165.4(\text{C-1'''}),$ 164.6(C-7), 161.2(C-5), 160.1(C-4'), 158.9(C-7"'), 156.5 (C-2), 156.4 (C-9), 143.7 (C-3"), 133.0 (C-3), 132.6 (C-5"', 9"'), 130.8 (C-2', 6'), 125.3 (C-4"), 120.7 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 114.8 (C-6", 8""), 114.6 (C-2""), 103.8 (C-10), 101.1 (C-1"), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8), 76.3 (C-2"), 74.1 (C-3"), 74.0 (C-5"), 70.0 (C-4"), 62.7 (C-6")。以上数据 与文献报道^[12]一致,故确认化合物7为山柰酚-3-β-D-(6-O- 顺-p- 香豆酰)葡萄糖苷[kaempferol-3-β-D-(6-*O-cis-p-*coumaroyl) glucopyranoside].

化合物 **8**: 黄色无定型粉末,三氯化铁 - 铁氰化钾反应阳性;EI-MS m/z: 284.0 [M]⁺,C₁₆H₁₂O₅; ¹H-NMR(400 MHz,DMSO- d_6) δ : 12.95(1H,s,OH-5),10.35(1H,s,OH-4¹),7.95(2H,d,J=8.8 Hz,H-2¹、H-6¹),6.93(2H,d,J=8.8 Hz,H-3¹、H-5¹),6.83(1H,s,H-3),6.75(1H,brs,H-8),6.36(1H,d,J=1.6 Hz,H-6),3.86(3H,s,OCH₃-7); ¹³C-NMR(100 MHz,DMSO- d_6) δ : 181.9(C-4),165.1(C-7),164.0(C-2),161.3(C-4¹),161.2(C-5),157.2(C-9),128.5(C-2¹、C-6¹),121.0(C-1¹),115.9(C-3¹、C-5¹),104.6(C-10),103.0(C-3),97.9(C-6),92.6(C-8),56.0(OCH₃-7)。以上数据与文献报道^[13]一致,故确认化合物 **8** 为芫花素(genkwanin)。

化合物 **9**: 黄色粉末,三氯化铁 - 铁氰化钾反应阳性; EI-MS m/z: 300.1 [M]⁺, C₁₆H₁₂O₆; ¹H-NMR (400 MHz,DMSO- d_6) δ : 7.42 (2H,s,H-2'、 δ '),6.89 (1H,d,J=8.0 Hz,H-5'),6.71 (2H,s,H-3、8),6.36 (1H,s,H-6),3.86 (3H,s,OCH₃-7); ¹³C-NMR (100 MHz,DMSO- d_6) δ : 181.8 (C-4),165.1 (C-7),164.3 (C-2),161.2 (C-5),157.2 (C-9),149.9 (C-4'),145.8 (C-3'),121.4 (C-1'),119.1 (C-6'),116.0 (C-5'),113.5 (C-2'),104.7 (C-10),103.0 (C-3),97.9 (C-6),92.6 (C-8),56.0 (OCH₃-7)。以上数据与文献报道^[13]一致,故确认化合物**9**为 3'-羟基芫花素(3'-hydroxygenkwanin)。

化合物 **11**: 黄色粉末,三氯化铁 - 铁氰化钾反应阳性; EI-MS m/z: 286.0 [M]⁺, $C_{15}H_{10}O_6$; ¹H-NMR (400 MHz,DMSO- d_6) δ : 7.40 (1H,dd,J=8.0、2.0 Hz,H-6'),7.38 (1H,d,J=2.0 Hz,H-2'),6.87 (1H,d,J=8.0 Hz,H-5'),6.64 (1H,s,H-3),6.42 (1H,d,J=1.2 Hz,H-8),6.17 (1H,d,J=1.2 Hz,H-6); ¹³C-NMR (100 MHz,DMSO- d_6) δ : 181.6 (C-4),164.5 (C-7),163.8 (C-2),161.4 (C-5),

157.3(C-9),149.9(C-4'),145.8(C-3'),121.3 (C-1'),118.9(C-6'),116.0(C-5'),113.3(C-2'), 103.5(C-10),102.7(C-3),98.9(C-6),93.8(C-8)。 以上数据与文献报道^[9]一致,故确认化合物 **11** 为木 犀草素(luteolin)。

参考文献

- [1] 张明伟, 张锦文, 杨颖达, 等. 紫芫花化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(22): 1704-1706.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 148.
- [3] 李玲芝, 高品一, 李菲菲, 等. 芫花花蕾化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(9):699-703.
- [4] 李天景,徐贝贝,白 景,等. 芫花枝条化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1702-1705.
- [5] 邵泽艳, 商 倩, 赵娜夏, 等. 芫花中瑞香烷型二萜原酸酯类化合物及其肿瘤细胞毒活性 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 128-132.
- [6] 张本印, 王 环, 罗晓东, 等. 阴山大戟根化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11):2193-2196.
- [7] Urones J G, Teresa J D P, Marcos S I, et al. Entisolariciresinol in Reseda Suffruticosa [J]. Phytochemistry, 1987, 26(5):1540-1541.
- [8] 赵 明, 韩 晶, 吕嵩岩, 等. 紫丁香树枝化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 251-254.
- [9] 和 蕾, 史琪荣, 柳润辉, 等. 芫花条中抗炎活性成分 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(10):1221-1226.
- [10] 李 可, 李晓明, 王斌贵. 狭叶米口袋化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14):1711-1713.
- [11] 曾毅梅, 肖 洁, 李 铣, 等. 芫花醋炙品中黄酮类成分的 分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(5): 353-356.
- [12] Tsukamoto S, Tomise K, Aburatani M, et al. Isolation of cytochrome P450 inhibitors from strawberry fruit, Fragaria ananassa [J]. J Nat Prod, 2004, 67(11): 1839-1841.
- [13] 宋丽丽, 李绪文, 颜佩芳, 等. 芫花化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 536-538.