

• 化学成分 •

黄花白及中 1 个新的苄酯苷类化合物及促凝血活性

梁光焰^{1,2}, 郭秀美³, 胡江苗⁴, 李金玉^{1,2*}

1. 贵州医科大学药学院/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014

2. 贵州省天然产物研究中心, 贵州 贵阳 550014

3. 贵阳康养职业大学, 贵州 贵阳 550081

4. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 对黄花白及 *Bletilla ochracea* 块茎的化学成分进行研究。方法 利用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、ODS 反相柱色谱及 HPLC 等色谱方法进行分离和纯化, 并通过理化性质和波谱数据分析鉴定其结构。采用体外凝血活性评价高含量化合物 **2** 和 **7** 对活化部分凝血酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)和凝血酶原时间(prothrombin time, PT)的影响。结果 从黄花白及干燥块茎的 85%乙醇提取物正丁醇萃取部位中共分离得到了 8 个苄酯苷类化合物, 分别鉴定为 1-[4'- β -D-(葡萄糖氧)苄基]-4-{4''-[β -D-葡萄糖氧-(1-2)- β -D-葡萄糖氧]}苄基]-2-异丁基苹果酸酯(**1**)、1,4-二-[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(**2**)、2-O-葡萄糖基白及苷(**3**)、手参苷 III(**4**)、4-葡萄糖氧基-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯(**5**)、bleformin J(**6**)、天麻素(**7**)、4-羟基苄基- β -D-吡喃葡萄糖苷(**8**)。化合物 **2** 能显著缩短 APTT 和 PT 值。结论 其中化合物 **1** 为新化合物, 命名为黄花白及苷 A; 化合物 **3**~**6** 和 **8** 为首次从该植物分离得到。化合物 **2** 具有促凝血活性。

关键词: 黄花白及; 苄酯苷类; 促凝血活性; 黄花白及苷 A; 2-O-葡萄糖基白及苷; 手参苷 III

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)20-6580-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.002

A new glucosyloxybenzyl derivative from *Bletilla ochracea* and their procoagulant activityLIANG Guang-yan^{1,2}, GUO Xiu-mei³, HU Jiang-miao⁴, LI Jin-yu^{1,2}

1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China

2. Natural Products Research Center of Guizhou Province, Guiyang 550014, China

3. Guiyang Healthcare Vocational University, Guiyang 550081, China

4. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents of the rhizomes of *Bletilla ochracea*. **Methods** A total of eight compounds were isolated and purified from the n-butyl alcohol portion of 85% ethanol extract of its rhizomes by various column chromatography involving silica gel, Sephadex LH-20, ODS and preparative HPLC. The effects of high concentrations of compounds **2** and **7** on activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) were evaluated by *in vitro* coagulation activity. **Results** Their structures were identified, on the basis of physicochemical properties and spectroscopic evidences, as 1-(4'- β -D-glucopyranosyloxybenzyl)-4-{4''-O-[β -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranosyl]benzyl}-(2R)-2-isobutylmalate (**1**), militarine (**2**), dactylorhin A (**3**), gymnoside III (**4**), shancigusin I (**5**), bleformin J (**6**), gastrodin (**7**), 4-hydroxybenzyl- β -D-glucopyranoside (**8**). Compound **2** significantly shortened APTT and PT values. **Conclusion** Among them, compound **1** is a new compound named bleochrside A, compounds **3**—**6** and **8** are first isolated from this plant. In addition,

收稿日期: 2023-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160102); 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室开放课题资助项目(FAMP202103K); 贵州省科技项目(ZK[2021]一般 558, ZK[2021]一般 512, [2022]一般 125, [2022]重点 019)

作者简介: 梁光焰(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 1004390045@qq.com

*通信作者: 李金玉, 博士, 副研究员, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: lijinyu20080@126.com

compound 2 showed procoagulant activity.

Key words: *Bletilla ochracea* Schltr.; glucosyloxybenzyl; procoagulant activity; bleochrside A; dactylorhin A; gymnoside III

黄花白及 *Bletilla ochracea* Schltr 为兰科 (Orchidaceae) 白及属多年生草本植物, 白及属全球有 6 个种, 主要分布于缅甸北部经中国至日本。我国有 4 个种, 分别为白及 *B. striata* Rchb. f.、黄花白及 *B. ochracea* Schltr、小白及 *B. formosana* (Hayata) Schltr 和华白及 *B. sinensis* (Rolfe) Schltr., 主要分布于北起江苏、河南, 南至台湾, 东起浙江, 西至西藏东南部^[1]。白及在我国传统中药已有上千年的药用历史, 其块茎入药, 具有收敛止血, 消肿生肌等功效, 常用于治疗肺部咯血、吐血等疾病^[2]。现代药理活性表明, 白及具有促进伤口愈合、止血、抗炎、抗溃疡、免疫、抗菌、细胞毒、抗衰老和抗纤维化等生物活性^[3-7]。近年来随着白及应用范围不断扩大, 市场用量迅速增加, 使得白及野生资源遭到了严重破坏。白及的近缘种黄花白及和小白及, 在功能主治上与白及类似, 且在西南地区有广泛栽培, 一直作为白及的地方习用品或代用品使用。然而, 关于黄花白及的化学成分研究较少^[8-9], 为更好地开发利用该植物, 前期我们对黄花白及的醋酸乙酯部位进行了系统的化学成分和活性研究, 初步阐明了其小极性部分的化学成分为联苄与菲类^[10]; 为进一步探索黄花白及大极性部位的结构是否与白及类似, 本研究对黄花白及块茎 85% 乙醇提取物正丁醇萃取部位进行探究, 从中分离鉴定了 8 个化合物, 分别为 1-[4'-β-D-(葡萄糖氧)苄基]-4-{4''-[β-D-葡萄糖氧-(1-2)-β-D-葡萄糖氧]]苄基}-2-异丁基苹果酸酯 (1-(4'-β-D-glucopyranosyloxybenzyl)-4-{4''-[β-D-glucopyranosyl-(1-2)-β-D-glucopyranosyl]benzyl}-(2R)-2-isobutylmalate, **1**)、1,4-二-[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯 (*militarine*, **2**)、2-O-葡萄糖基白及苷 (*dactylorhin A*, **3**)、手参苷 III (*gymnoside III*, **4**)、4-葡萄糖氧基-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯 (*shancigusin I*, **5**)、*bleformin J* (**6**)、天麻素 (*gastrodin*, **7**)、4-羟基苄基-β-D-吡喃葡萄糖苷 (4-hydroxybenzyl-β-D-glucopyranoside, **8**), 其中化合物 **1** 为新化合物, 命名为黄花白及苷 A; 化合物 **3**~**6** 和 **8** 为首次从该植物分离得到。并对高含量化合物 **2** 和 **7** 体外凝血活性进行研究, 结果发现化合物 **2** 能显著缩短活化部分凝血酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 和凝血酶原时间

(prothrombin time, PT), 发挥促凝血功效。该研究进一步丰富了黄花白及的化学研究, 为黄花白及的开发利用提供了科学依据。

1 仪器与材料

Shimadzu UV 2401PC 型紫外光谱仪 (日本岛津公司); Bruker Tensor-27 傅里叶变换中红外光谱仪 (瑞士 Bruker 公司); JASCO model P-1020 数字旋光仪 (日本 JASCO 公司); Agilent 5973N 气相色谱/四极杆质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); API QSTAR 飞行时间质谱仪 (美国 SCIEX 公司)。Bruker AV III 500 型超导核磁共振仪; Agilent 1100 液相色谱、Agilent 1260 液相色谱, 分析色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 半制备色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×9.4 mm, 5 μm); 所有 HPLC 的检测器均为二极管阵列检测器 (DAD); 反向材料 Lichroprep RP-18 (40~63 μm, 德国 Merck 公司), YMC*-GEL ODS-A (12 nm, S-50 μm, 日本 YMC 公司); 正向柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂); 聚山梨酯 80 为国药集团生产, 薄层色谱硅胶 (GF₂₅₄, 青岛海洋化工厂, 青岛美高集团有限公司), 凝胶 Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司)。人凝血质控血浆 (批号 047B-E1371A)、APTT 试液 (批号 11265637)、PT 试液 (批号 10000823)、CaCl₂ (批号 11239717) 为德国 TECO 公司生产; Tris-HCl (批号 20160118) 为美国 Amresco 公司生产, 依诺肝素 (批号 4SH69) 为葛兰素史克公司生产, 肝素 (HEP, Sigma 公司, 批号 119K1581)。德国美创 MC-4000 血凝仪。

实验用的黄花白及药材于 2015 年 11 月采自云南省昭通市, 由中国科学院昆明植物研究所吴之坤研究员鉴定为白及属黄花白及 *B. ochracea* Schltr 的块茎, 药材标本 (BO201511) 保存中国科学院昆明植物研究所标本馆。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥的黄花白及块茎部分 (干质量 8 kg) 粉碎后用 80% 的乙醇在室温下浸提 3 次 (每次用溶剂 25 L)。滤过后减压浓缩, 再依次用醋酸乙酯 (4 L×4)、正丁醇萃取 (4 L×4), 得到醋酸乙酯部位 (270 g) 和正丁醇部位 (500 g)。正丁醇部分 (500 g) 经硅

胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇 (10:1~1:1) 梯度洗脱, TLC 检测合并粗分得到 7 馏份 A~G。D (186.2 g) 过中压 RP-18 柱 (30%~100% 甲醇梯度洗脱), 得到 4 段 D1~D4。D2 (100.5 g) 经硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 4:1 等度洗脱), 后过 ODS 中压柱 (30%~70% 甲醇梯度洗脱) 得到化合物 **2** (68.2 g)。D3 (10.5 g) 经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 色谱柱 (甲醇-水 90:10) 洗脱划分为 4 段 D3-1~D3-4。D3-2 (446.2 mg) 过硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 5:1 等度洗脱), 再使用半制备 HPLC (40% 甲醇) 纯化得到化合物 **5** (25.6 mg, $t_R=24.3$ min) 和 **6** (18.2 mg, $t_R=27.6$ min)。D3-3 (760.5 mg) 过硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 4:1 等度洗脱) 后经半制备 HPLC (43% 甲醇) 纯化得到化合物 **7** (187.5 mg, $t_R=19.5$ min) 和 **8** (36.5 mg, $t_R=22.1$ min)。E (80.2 g) 经硅胶色谱分离, 氯仿-甲醇 (8:1~1:1) 梯度洗脱划分为 5 段 E1~E5。E2 (25.2 g) 过硅胶柱, 使用氯仿-甲醇 (5:1~1:1) 洗脱后分为 6 个部分 E2-1~E2-6。E2-4 (725.6 mg) 经反复 Sephadex LH-20 凝胶 (90% 甲醇) 和硅胶柱色谱洗脱后, 再经半制备 HPLC (35% 甲醇) 得到化合物 **1** (27.2 mg, $t_R=22.4$ min)、**3** (45.2 mg, $t_R=25.3$ min) 和 **4** (24.2 mg, $t_R=17.6$ min)。

2.2 化合物 1 酸水解以及碱水解反应

2.2.1 酸水解 称取 4 mg 化合物 **1** 溶解于 0.5 mL 甲醇, 加入 1 mL 的 2 mol/L 的三氟乙酸, 90 °C 水解 2 h, 醋酸乙酯萃取, 得到水层部分, TLC 分析与 D-葡萄糖对比, 展开剂为氯仿-甲醇-水 (2:1:0.1); 10% 浓硫酸-乙醇为显色剂, D-葡萄糖的分配系数 R_f 为 0.3^[11]。

2.2.2 碱水解 称取 10 mg 化合物 **1** 溶解于 0.5 mL 甲醇, 加入 2 mol/L 的 NaOH, 室温反应 2 h, 用 1 mol/L HCl 调 pH 至 4, 加入醋酸乙酯萃取, 减压蒸干得到醋酸乙酯部位。

2.3 APTT 筛选

化合物 **2** 和 **7** 用 DMSO 配制成 100 mmol/L 溶液, 然后用含 5% 聚山梨酯 80 的 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 稀释成浓度为 10 mmol/L 的溶液。阳性对照为依诺肝素; 对照为样品溶剂 (0.02 mol/L Tris-HCl, 含 5% 聚山梨酯 8 和 10% DMSO)。在 37 °C 预温比色杯中加入 5 μ L 待测样品溶液或对照品溶液, 然后加入 45 μ L 人凝血质控血浆, 37 °C 下预热 2 min, 加入 50 μ L APTT 试剂, 37 °C 下孵育 3

min 后, 加入 50 μ L 0.02 mol/L CaCl_2 (37 °C 预温), 记录凝血时间。

2.4 PT 筛选

样品溶液配制同“2.3”项。按试剂盒说明书进行, 在 37 °C 预温比色杯中加入待测样品溶液或对照品溶液后加入人质控血浆, 37 °C 下预热 2 min, 然后加入 PT (37 °C 预温) 试剂, 记录凝血时间。

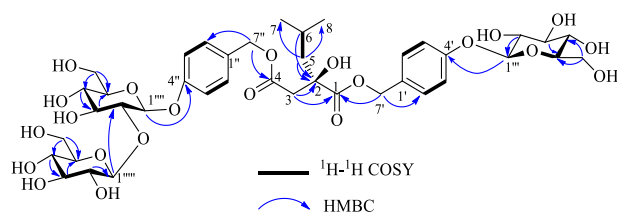
3 结果

3.1 化合物的结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状物。 $[\alpha]_D^{25} -91.3$ (c 0.11, MeOH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 269 (3.47), 222 (4.49), 197 (4.53), 244 (3.09), 207 (4.28); ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 887 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 由高分辨质谱 ($-$)HR-ESI-MS (m/z 887.321 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 计算值 887.319 0), 推断分子式为 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_{22}$, 不饱和度为 13。其红外光谱显示含有羟基 (3432 cm^{-1})、酯羰基 (1733 cm^{-1}) 和芳香环 (1633 和 1513 cm^{-1})。 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (表 1) 显示 δ_{H} 0.93, 0.81 (6H, d, $J=6.6$ Hz, H-7, 8), 1.71 (1H, m, H-6), 2.95, 2.66 (1H, d, $J=15.7$ Hz, H-5a, 5b), 提示存在 1 个异丁基; δ_{H} 7.09 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.28 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3', 5'), 5.00 (2H, overlapped, H-7'), 7.09 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2'', 6''), 7.28 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3'', 5''), 5.01 (2H, overlapped, H-7'') 提示该化合物含有 2 个对羟基苯基。结合 HSQC 谱图 (δ_{H} 4.98, d, $J=7.5$ Hz, δ_{C} 102.3; δ_{H} 4.92, d, $J=7.5$ Hz, δ_{C} 101.8; δ_{H} 4.64, d, $J=7.8$ Hz, δ_{C} 105.2), 再结合 HSQC-TOCSY 以及 HMBC 对化合物 **1** 的数据进行全归属, 可以推测结构中存在 3 个葡萄糖取代 (Glc', Glc'', Glc''')。根据葡萄糖端基质子 H-1''', 1''', 1'''' 的偶合常数分别为 7.5, 7.5, 7.8 Hz, 可知其糖以 β 键与苷元连接, 通过酸水解与标准 D-葡萄糖 TLC 以及比旋光度 (+51) 比对, 确定葡萄糖为 D 构型。分析上述数据, 可以得到化合物 **1** 是 bis(4-glycosyloxybenzyl)-2-isobutylmalate 的衍生物, 与已知化合物 dactylorhin A (**3**)^[12] 的结构类似, 其区别在于 1 个葡萄糖的连接位置不同, 通过分析 HMBC 谱图 (图 1), H-1''' 与 C-4' 相关, H-1'''' 与 C-4'' 相关, H-1''''' 与 C-2''' 相关, 可以推测出 Glc', Glc'', Glc''' 分别于 C-4', C-4'', C-2''' 相连。为了进一步确定 **1** 的绝对构型, 对该化合物进行碱水解, 得到 2R-2-羟基-2-异丁基酒石酸通过比较其旋光度与文献报道相同^[13], 并结合生物合成途径, **1** 中 2-

表 1 化合物 1 的核磁数据 (500/125 MHz, CD₃OD)Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data of compound 1 (500/125 MHz, CD₃OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
1		176.0 (s)	1'''	4.89 (d, $J = 7.5$ Hz)	102.3 (d)
2		76.6 (s)	2'''	3.48 (m)	74.2 (d)
3	2.95, 2.66 (d, $J = 15.6$ Hz)	46.2 (t)	3'''	3.44~3.49 (overlapped)	78.1 (d)
4		171.6 (s)	4'''	3.42 (m)	71.3 (d)
5	1.59 (m)	49.3 (t)	5'''	3.44~3.49 (overlapped)	77.8 (d)
6	1.71 (m)	24.8 (d)	6'''	3.92, 3.72 (m)	62.4 (t)
7	0.93 (d, $J = 6.6$ Hz)	25.1 (q)	1''''	4.96 (d, $J = 7.5$ Hz)	101.8 (d)
8	0.81 (d, $J = 6.6$ Hz)	24.0 (q)	2''''	3.69 (m)	87.6 (d)
1'		130.8 (s)	3''''	3.32 (m)	75.5 (d)
2', 6'	7.09 (d, $J = 8.0$ Hz)	131.1 (d)	4''''	3.53 (m)	69.8 (d)
3', 5'	7.28 (d, $J = 8.0$ Hz)	117.7 (d)	5''''	3.44~3.49 (overlapped)	77.9 (d)
4'		159.0 (s)	6''''	3.92, 3.72 (m)	62.5 (t)
7'	5.00 (overlapped)	67.2 (t)	1'''''	4.64 (d, $J = 7.8$ Hz)	105.2 (d)
1''		130.9 (s)	2'''''	3.31 (m)	74.9 (d)
2'', 6''	7.09 (d, $J = 8.0$ Hz)	131.2 (d)	3'''''	3.49 (m)	78.1 (d)
3'', 5''	7.28 (d, $J = 8.0$ Hz)	117.8 (d)	4'''''	3.32 (m)	71.6 (d)
4''		159.1 (s)	5'''''	3.44~3.49 (overlapped)	77.7 (d)
7''	5.01 (overlapped)	68.0 (t)	6'''''	3.92, 3.72 (m)	62.6 (t)

图 1 新化合物 1 的 ¹H-¹H COSY 和关键 HMBC 相关Fig. 1 ¹H-¹H COSY and key HMBC correlations of compound 1

isobutylmalate 的结构片段 C-2 的绝对构型与化合物 militarine (2) 和 dactylorhin A (3) [12,14] 是一致的, 为 *R* 构型。故化合物 1 的结构鉴定为 1-[4'-β-D-(葡萄糖氧)苄基]-4-{4''-[β-D-葡萄糖氧-(1-2)-β-D-葡萄糖氧]苄基}-2-异丁基苹果酸酯, 为 1 个新化合物, 命名为黄花白及苷 A (bleochrside A)。

化合物 2: 无色油状物; ESI-MS m/z : 725 [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.30 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 7.29 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', 6''), 7.13 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 7.12 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'', 5''), 5.04 (4H, d, $J = 3.4$ Hz, H-7', 7''), 4.96 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''', 1'''), 3.93, 3.76 (4H, m, H-6''', 6'''), 3.55 (2H, m, H-2''', 2'''), 3.50 (4H, m,

H-3''', 5''' 3''', 5'''), 3.37 (2H, m, H-4''', 4'''), 2.98, 2.69 (4H, d, $J = 15.7$ Hz, H-3), 1.73 (1H, m, H-6), 1.63 (1H, m, H-5), 0.95 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-7), 0.83 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-8); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 175.9 (C-1), 171.6 (C-4), 159.0 (C-4'), 158.9 (C-4''), 131.1 (C-2', 6', 2'', 6''), 131.0 (C-1'), 130.6 (C-1''), 117.7 (C-3', 5', 3'', 5''), 102.0 (C-1''', 1'''), 77.8 (C-3''', 3'''), 77.7 (C-5''', 5'''), 76.5 (C-2), 74.7 (C-2'', 2'''), 71.1 (C-4''', 4'''), 67.9 (C-7'), 67.2 (C-7''), 62.3 (C-6''', 6'''), 49.1 (C-5) 46.1 (C-3), 24.9 (C-6), 24.7 (C-7), 23.9 (C-8)。以上数据与文献报道一致[14], 故鉴定化合物 2 为 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯。

化合物 3: 无色油状物; ESI-MS m/z : 887 [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.26 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.26 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', 6''), 7.08 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 7.06 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'', 5''), 5.08 (4H, d, $J = 12.8$ Hz, H-7'), 5.04 (4H, d, $J = 12.8$ Hz, H-7''), 4.93 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''', 1'''), 4.85 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''''), 3.87, 3.70 (6H, m, H-6''', 6''', 6'''), 3.55 (3H, m, H-2''', 2''', 2'''), 3.50~3.39 (6H, m, H-3''', 5''', 3''', 5''', 3''', 5'''),

5'''), 3.37 (2H, m, H-4''', 4'''), 3.23 (1H, m, H-4'''), 2.98, 2.69 (4H, d, $J = 15.7$ Hz, H-3), 1.75 (1H, m, H-6), 1.63 (1H, m, H-5), 0.88 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7), 0.79 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 174.9 (C-1), 172.0 (C-4), 159.3 (C-4'), 159.2 (C-4'), 131.5 (C-2', 6', 2'', 6''), 131.0 (C-1'), 130.5 (C-1''), 117.9 (C-3', 5', 3'', 5''), 102.0 (C-1''', 1'''), 100.1 (C-1''''), 81.5 (C-2), 78.3 (C-3''''), 78.1 (C-3''', 3'''), 77.9 (C-5''', 5'''), 77.6 (C-5''''), 75.5 (C-2''''), 74.8 (C-2''', 2'''), 71.1 (C-4''', 4'''), 70.8 (C-4''''), 68.4 (C-7''), 67.5 (C-7'), 62.5 (C-6''', 6'''), 62.3 (C-6''''), 49.4 (C-5) 43.7 (C-3), 24.9 (C-6), 24.8 (C-7), 24.2 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[12,14], 故鉴定化合物 **3** 为 2-*O*-葡萄糖基白及苷。

化合物 **4**: 无色油状物; ESI-MS m/z : 929 $[\text{M}-\text{H}]^-$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.26 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.24 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', 6''), 7.08 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 7.06 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'', 5''), 5.08 (4H, d, $J = 12.8$ Hz, H-7'), 5.04 (4H, d, $J = 12.8$ Hz, H-7''), 4.95 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''', H-1'''), 4.75 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''''), 4.14, 4.05 (2H, m, H-6''''), 3.87, 3.68 (4H, m, H-6''', 6'''), 3.52 (3H, m, H-2''', 2''', 2'''), 3.50~3.39 (6H, m, H-3''', 5''', 3''', 5''', 3''', 5'''), 3.37 (2H, m, H-4''', 4'''), 3.23 (1H, m, H-4''''), 2.98, 2.69 (4H, d, $J = 15.7$ Hz, H-3), 1.94 (3H, s, COCH_3), 1.75 (1H, m, H-6), 1.62 (1H, m, H-5), 0.88 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7), 0.79 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 174.7 (C-1), 172.8 (C-4), 171.7 (COCH_3), 159.3 (C-4', 4'), 131.6 (C-2'', 6''), 131.4 (C-2', 6'), 131.0 (C-1'), 130.5 (C-1''), 117.9 (C-3'', 5''), 117.8 (C-3', 5'), 102.2 (C-1''', 1'''), 100.0 (C-1''''), 81.8 (C-2), 78.1 (C-3''''), 78.0 (C-3''', 3'''), 77.9 (C-5''', 5'''), 77.8 (C-5''''), 75.3 (C-2''''), 74.9 (C-2''', 2'''), 71.3 (C-4''', 4'''), 71.1 (C-4''''), 68.3 (C-7''), 67.4 (C-7'), 64.4 (C-6''''), 62.5 (C-6''', 6'''), 49.2 (C-5), 43.2 (C-3), 24.9 (C-6), 24.7 (C-7), 24.1 (C-8), 20.8 (COCH_3)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **4** 为手参苷 III。

化合物 **5**: 无色油状物; ESI-MS m/z : 593 $[\text{M}-\text{H}]^-$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.61 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.52 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6), 7.32 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.09 (2H, d, $J = 8.8$ Hz,

H-3, 5), 7.00 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.39 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-8), 4.95 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'', 1''), 3.87, 3.68 (4H, m, H-6'', 6''), 3.52~3.42 (4H, m, H-3'', 5'', 3''', 5'''), 3.44 (2H, m, H-2'', 2''), 3.31 (2H, m, H-4'', 4''); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.8 (C-9), 160.9 (C-4), 159.0 (C-4'), 146.1 (C-7), 131.6 (C-1'), 131.2 (C-2, 6), 131.0 (C-2', 6'), 129.8 (C-1), 118.0 (C-3', 5'), 117.8 (C-3, 5), 116.9 (C-8), 102.2 (C-1'''), 101.8 (C-1''), 78.2 (C-3'''), 78.1 (C-3''), 77.9 (C-5''', 5''), 74.9 (C-2'''), 74.8 (C-2''), 71.3 (C-4''', 4''), 67.1 (C-7'), 62.5 (C-6''', 6'')。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **5** 为 4-葡萄糖氧基-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯。

化合物 **6**: 无色油状物; ESI-MS m/z : 593 $[\text{M}-\text{H}]^-$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.57 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6), 7.29 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.13 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 7.02 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.93 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-7), 5.90 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-8), 4.96 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'', 1''), 3.92, 3.73 (4H, m, H-6'', 6''), 3.52~3.42 (4H, m, H-3'', 5'', 3''', 5'''), 3.44 (2H, m, H-2'', 2''), 3.34 (2H, m, H-4'', 4''); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.0 (C-9), 159.7 (C-4), 159.0 (C-4'), 143.8 (C-7), 132.7 (C-2, 6), 131.2 (C-1'), 131.1 (C-2', 6'), 130.3 (C-1), 118.6 (C-8), 117.7 (C-3', 5'), 117.0 (C-3, 5), 102.2 (C-1'''), 102.1 (C-1''), 78.1 (C-3''', 3''), 77.9 (C-5'''), 77.8 (C-5''), 74.8 (C-2''', 2''), 71.3 (C-4'''), 71.2 (C-4''), 66.8 (C-7'), 62.4 (C-6''', 6'')。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **6** 为 bleformin J。

化合物 **7**: 无色油状物; ESI-MS m/z : 285 $[\text{M}-\text{H}]^-$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.26 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 7.06 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 4.86 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 4.86 (2H, s, H-7), 3.86, 3.68 (2H, m, H-6'), 3.45~3.38 (2H, m, H-3', 5'), 3.41 (1H, m, H-2'), 3.29 (1H, m, H-4'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 158.5 (C-1), 136.6 (C-4), 129.4 (C-3, C-5), 117.6 (C-2, 6), 102.4 (C-1'), 78.1 (C-3'), 78.0 (C-5'), 74.9 (C-2'), 71.3 (C-4'), 64.8 (C-7), 62.5 (C-6')。以上波谱数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **7** 为天麻素。

化合物 **8**: 无色油状物; ESI-MS m/z : 285 $[\text{M}-\text{H}]^-$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.23 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.74 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 4.81

(1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 4.55 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-7a), 4.30 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-7b), 3.89, 3.68 (2H, m, H-6'), 3.42~3.28 (2H, m, H-3', 5'), 3.38 (1H, m, H-2'), 3.26 (1H, m, H-4'); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 158.3 (C-4), 129.6 (C-4), 131.2 (C-3, 5), 116.0 (C-2, 6), 102.8 (C-1'), 78.1 (C-3'), 78.0 (C-5'), 75.1 (C-2'), 71.7 (C-4'), 71.6 (C-7), 62.8 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **8** 为 4-羟基苜蓿基- β -D-吡喃葡萄糖苷。

3.2 凝血活性实验结果

白及在临床常用于治疗吐血、外伤出血和肺结核咳血等病症, 为验证黄花白及是否有相同的功效, 选取了 2 个含量较大的化合物 **2** 和 **7**, 评价其体外凝血活性。结果显示 (表 2、3), 与对照组相比化合物 **2** 对 APTT 有一定作用 ($P < 0.01$), 同时能显著缩短 PT ($P < 0.001$)。

表 2 化合物 2 和 7 对 APTT 活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effects of compounds 2 and 7 on activated partial thromboplastin time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	样品血浆浓度	APTT/s
对照	—	36.7 ± 0.60
肝素	$3.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$142.3 \pm 12.25^{***}$
2	$10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$34.3 \pm 0.31^{**}$
7	$10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	37.8 ± 0.90

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

表 3 化合物 2 和 7 对 PT 活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effects of compounds 2 and 7 on prothrombin time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	样品血浆浓度	PT/s
对照	—	17.3 ± 0.12
肝素	$16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$27.4 \pm 0.25^{***}$
2	$10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$14.5 \pm 0.12^{***}$
7	$10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	17.0 ± 1.10

4 讨论

本研究对黄花白及块茎 85%乙醇提取物的正丁醇部位进行化学成分研究, 从中分离得到 8 个苜蓿苷类化合物, 其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **3**~**6** 和 **8** 为首次从黄花白及植物中分离得到。苜蓿苷类化合物广泛存在于白及中是其主要成分, 文献报道该类化合物具有止血、保肝活性^[19], 这类化合物可能是白及的药效成分; 为此, 本研究通过测试体

外促凝血活性, 结果显示, 化合物 **2** 明显缩短 PT 作用, 结合文献推测其可能是通过外源性凝血酶途径发挥促凝血作用。本研究在一定程度上揭示了黄花白及的化学成分, 说明黄花白及的化学成分与白及成分类似, 又在功能上验证其主要成分具有止血活性, 为黄花白及作为白及的地方习用品或代用品提供了科学依据, 也为后续的资源利用及相关产品开发等提供了研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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 (第六卷) 第一分册-蕨类植物门 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 50.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 106.
- [3] He X R, Wang X X, Fang J C, et al. *Bletilla striata*: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 20-38.
- [4] Song Y, Zeng R, Hu L L, et al. *In vivo* wound healing and *in vitro* antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 451-461.
- [5] 陆波, 徐亚敏, 张汉明, 等. 白及不同提取部位对家兔血小板聚集的影响 [J]. 解放军药学报, 2005, 21(5): 330-332.
- [6] Qian C D, Jiang F S, Yu H S, et al. Antibacterial biphenanthrenes from the fibrous roots of *Bletilla striata* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(4): 939-943.
- [7] Wang W, Meng H. Cytotoxic, anti-inflammatory and hemostatic spirostane-steroidal saponins from the ethanol extract of the roots of *Bletilla striata* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 101: 12-18.
- [8] Yang X Z, Tang C P, Zhao P, et al. Antimicrobial constituents from the tubers of *Bletilla ochracea* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(6): 606-610.
- [9] Cai J Y, Zhao L, Zhang D Z. Chemical constituents from *Bletilla ochracea* Schltr [J]. *Chem Res Chin Univ*, 2007, 23(6): 705-707.
- [10] Li J Y, Yang L, Hou B, et al. Poly p-hydroxybenzyl substituted bibenzyls and phenanthrenes from *Bletilla ochracea* Schltr with anti-inflammatory and cytotoxic activity [J]. *Fitoterapia*, 2018, 129: 241-248.
- [11] Kaennakam S, Aree T, Yahuaifai J, et al. Erythrosaponins A-J, triterpene saponins from the roots and stem bark of *Gardenia erythroclada* [J]. *Phytochemistry*, 2018, 152: 36-44.
- [12] Sakuno E, Kamo T, Takemura T, et al. Contribution of militarine and dactylorhin A to the plant growth-

- inhibitory activity of a weed-suppressing orchid, *Bletilla striata* [J]. *Weed Biol Manag*, 2010, 10(3): 202-207.
- [13] Yin R J, Huang X F, Kong L Y. Constituents from the heartwoods of *Osmanthus armatus* [J]. *Nat Prod Res*, 2010, 24(10): 948-952.
- [14] Morikawa T, Xie H H, Matsuda H, *et al.* Glucosyloxybenzyl 2-isobutylmalates from the tubers of *Gymnadenia conopsea* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(6): 881-886.
- [15] Dong H L, Liang H Q, Wang C L, *et al.* Shancigusins E-I, five new glucosides from the tubers of *Pleione yunnanensis* [J]. *Magn Reson Chem*, 2013, 51(6): 371-377.
- [16] Lin C W, Hwang T L, Chen F A, *et al.* Chemical constituents of the rhizomes of *Bletilla formosana* and their potential anti-inflammatory activity [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(8): 1911-1921.
- [17] Zi J C, Li S, Liu M T, *et al.* Glycosidic constituents of the tubers of *Gymnadenia conopsea* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(5): 799-805.
- [18] Godevac D, Stanković J, Novaković M, *et al.* Phenolic compounds from *Atriplex littoralis* and their radiation-mitigating activity [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(9): 2198-2204.
- [19] Han S, Wang C, Cui B, *et al.* Hepatoprotective activity of glucosyloxybenzyl succinate derivatives from the pseudobulbs of *Pleione bulbocodioides* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 157: 71-81.

[责任编辑 王文倩]