

民族药小槐花质量标志物候选成分的研究

谯明鸣¹, 袁丰², 陶慕珂¹, 孙伊维³, 周广鑫², 孟大利², 张毅^{1*} (1. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 3. 沈阳药大雷允上药业有限责任公司, 本溪 117004)

摘要 目的: 开展对豆科山蚂蝗属药用植物小槐花 (*Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.) 叶的化学成分研究, 为小槐花质量标准体系的建立提供物质基础。方法: 将小槐花叶经70%乙醇提取后, 综合运用大孔吸附树脂柱色谱、硅胶柱色谱、制备型高效液相色谱等方法分离和纯化小槐花叶的化学成分, 根据所得单体理化性质及波谱数据鉴定各化合物结构。结果: 从小槐花叶中分离鉴定了13个化合物: 清甾酚(1)、柠檬酚(2)、8-异戊烯基山柰酚(3)、二氢山柰酚(4)、neophellamuretin(5)、异柠檬酚(6)、槲皮素(7)、山柰酚(8)、牡荆素(9)、当药黄素(10)、大豆皂醇 B(11)、黄槿酮 A(12)、黄槿酮 D(13), 其中化合物7、8、12和13为小槐花中各药用部位均含有的成分。结论: 化合物7、8、12和13可作为小槐花的候选质控成分。

关键词: 小槐花; 化学成分; 槲皮素; 山柰酚; 黄槿酮

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)04-0452-006

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.04.010

Study on Candidate Constituents of Quality Markers about Ethnic Drug *Desmodium caudatum*

Qiao Mingming¹, Yuan Feng², Tao Muke¹, Sun Yiwei³, Zhou Guangxin², Meng Dali², Zhang Yi^{1*} (1. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Shenyang Lei Yunshang Pharmaceutical Co., Ltd, Benxi 117004, China)

Abstract Objective: To study the chemical constituents of the leaves of *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC., a medicinal plant of legume, in order to provide material basis for the establishment of quality standard system for *D. caudatum*. **Methods:** After the leaves of *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC. were extracted by 70% ethanol, the chemical constituents of the leaves of *D. caudatum* were separated and purified by macroporous adsorption resin column chromatography, silica gel column chromatography, and preparative high performance liquid chromatography (HPLC), and their structures of the compounds were identified according to the physicochemical properties and spectral data of the monomers obtained. **Results:** Thirteen compounds were isolated from the leaves of *D. caudatum*, these compounds were identified and identified from the leaves of *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.: desmodol (1), citrusinol (2), 8-prenylquercetin (3), dihydrokaempferol (4), neophellamuretin (5), yukovanol (6), quercetin (7), kaempferol (8), vitexin (9), swertisin (10), soyasapogenin B (11), hibiscone A

(12) and hibiscone D (13). Among them, compounds 7, 8, 12 and 13 were the constituents contained in various medicinal parts of *D. caudatum*. **Conclusion:** Compounds 7, 8, 12 and 13 can be used as candidate quality control constituents of *D. caudatum*.

Keywords: *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.; chemical constituents; quercetin; kaempferol; hibiscone

小槐花 (*Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.) 为豆科山蚂蝗属植物, 主产长江以南各省, 在国外亦有分布^[1]; 全株(根、茎、叶)均可入药, 味甘、苦, 性微寒, 归心、肺、脾经, 具有清热解毒、祛风透疹、消积止痛^[2]的功效, 为壮、畲、瑶族等民族特色药材, 主治胃部疾病、关节炎、乳腺炎、伤风感冒等; 同时, 因其具有抗感染等功效, 故外敷亦可治疗毒虫咬伤、痈疮肿毒^[3-4]等。小槐花先后被广西、四川、浙江等省区的地方药材标准收载^[5-7]。然而在这些地方药材标准中, 仅有关于药材性状的描述以及显微鉴别等, 缺少专属性更强的理化鉴别、薄层鉴别, 以及含量测定等质量标准内容。其主要原因在于, 目前国内外学者对小槐花的化学成分和相关药用研究较少, 因此在相应的法定标准中, 无法对其化学成分进行控制, 不能形成完善的质量控制体系。为了更好地阐明其药效物质基础, 寻找其质控成分, 并为日后提升小槐花质量标准打下基础, 拟对小槐花药用部位之一的叶进行化学成分研究, 通过用多种色谱及波谱技术, 从小槐花叶中分离并鉴定了13个化合物, 包括10个黄酮类化合物、3个萜类化合物。

1 仪器与材料

SHIMADZU LC-20AR制备型高效液相色谱仪(岛津公司); YMC-Pack ODS-A色谱柱(YMC Co. Ltd., Kyoto)和COSMOSIL C₁₈(250 mm × 20 mm)制备柱; Bruker-AV-600核磁共振波谱仪(Bruker公司), TMS为内标测定; Agilent 6200 Series Q-TOF高分辨质谱仪(安捷伦科技有限公司)。

葡聚糖凝胶 LH-20(25~100 μm, 北京绿百草科技发展有限公司); 大孔吸附树脂D101(0.30~1.25 mm, 青岛海洋化工有限公司); ODS填料(青岛海洋化工有限公司); 薄层用硅胶及柱层析硅胶(SiO₂, 200~300目, 青岛海洋化工有限公司); 分析级甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、水、丙酮(莱博科贸有限公

司); 色谱级甲醇和乙腈(国药集团化学试剂有限公司); 氘代试剂(默克股份有限公司)。

小槐花全草于2013年6月采集自湖南省怀化市, 经由沈阳药科大学中药学院路金才教授鉴定, 确定其为豆科山蚂蝗属小槐花(*Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.)。

2 提取分离

将10 kg干燥小槐花叶粉碎成1 cm左右碎片, 用约30 L的70%乙醇浸泡过夜; 加热回流提取4次, 每次3 h, 滤过后合并滤液, 浓缩至浸膏。经大孔吸附树脂梯度洗脱, 共得到40%乙醇洗脱物150 g、65%乙醇洗脱物50 g和95%乙醇洗脱物65 g。95%乙醇洗脱物进一步采用正相硅胶柱色谱分离纯化, 以二氯甲烷-甲醇(体积比100:1~100:10)为流动相进行梯度洗脱。回收洗脱液, 经薄层色谱检视, 相同者合并, 共得到8个馏分Fr.1~Fr.8。

Fr.1经正相硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮系统梯度洗脱后, 再经葡聚糖凝胶 LH-20柱色谱, 以甲醇溶剂洗脱, 所得部分经制备型HPLC, 体积分数50%甲醇-水系统洗脱, 流速为3.0 mL · min⁻¹, 得到化合物7($t_R = 45$ min, 3.0 mg);

Fr.2经正相硅胶吸附柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯系统梯度洗脱后, 再经葡聚糖凝胶 LH-20柱色谱, 以甲醇溶剂洗脱, 所得部分经制备型HPLC, 体积分数50%乙腈-水系统洗脱, 流速为3.0 mL · min⁻¹, 得到化合物1($t_R = 13$ min, 4.6 mg)、2($t_R = 28$ min, 7.7 mg)、8($t_R = 39$ min, 12 mg)和11($t_R = 46$ min, 4.7 mg);

Fr.3经ODS柱色谱, 以甲醇-水系统梯度洗脱后, 再经正相硅胶吸附柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇系统梯度洗脱, 所得部分经制备型HPLC, 体积分数60%甲醇-水系统洗脱, 流速为3.5 mL · min⁻¹, 得到化合物3($t_R = 8$ min, 3.5 mg)、4($t_R = 15$ min, 3.7 mg)、5($t_R = 19$ min, 6.8 mg)、6($t_R = 25$ min, 5.3 mg)、12($t_R = 30$ min, 8.6 mg)和13($t_R = 35$ min, 11.2 mg);

Fr.4经ODS柱色谱,以甲醇-水系统梯度洗脱后,所得部分经制备型HPLC,体积分数45%甲醇-水系统洗脱,流速为 $3.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,得到化合物9 ($t_{\text{R}}=28\text{ min}$, 5.2 mg);

Fr.5经ODS柱色谱,以甲醇-水系统梯度洗脱后,再经葡聚糖凝胶 LH-20柱色谱,以甲醇溶剂洗脱,所得部分经制备型HPLC,体积分数40%乙腈-水系统洗脱,流速为 $3.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,得到化合物10 ($t_{\text{R}}=32\text{ min}$, 7.2 mg)。

3 结构鉴定

化合物1:黄色粉末,难溶于甲醇。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)中, δ 13.37 (1H, s)为黄酮5位缔合羟基信号; δ 7.46 (1H, m)、7.44 (1H, d, $J=1.8\text{ Hz}$)、6.90 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$)为黄酮B环ABX偶合系统2'、5'、6'位氢信号; δ 6.73 (1H, s)为3位氢信号; δ 6.84 (1H, d, $J=9.9\text{ Hz}$)、5.82 (1H, d, $J=9.9\text{ Hz}$)、1.46 (6H, s)为吡喃型环合异戊烯基氢信号。以上波谱数据与文献^[8]数据基本一致,故鉴定该化合物为清缸酒酚(图1-1)。

化合物2:亮黄色羽毛状针晶(甲醇)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)中, δ 8.08、6.76 (each, 2H, d, $J=8.8\text{ Hz}$)为黄酮B环上AA' BB'偶合系统特征氢信号; δ 6.20 (1H, s)为6位氢信号; δ 6.83 (1H, d, $J=10.1\text{ Hz}$)、5.75 (1H, d, $J=10.1\text{ Hz}$)、1.43 (6H, s)为一组吡喃型环合异戊烯基氢信号。以上波谱数据与文献^[9]数据基本一致,故鉴定该化合物为柠檬酚(图1-2)。

化合物3:黄色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)中, δ 7.71 (1H, d, $J=2.1\text{ Hz}$)、7.54 (1H, dd, $J=8.4, 2.1\text{ Hz}$)、6.88 (1H, d, $J=8.4\text{ Hz}$)为黄酮B环ABX偶合系统特征氢信号; δ 6.28 (1H, s)为6位氢信号; δ 5.19 (1H, t, $J=6.2\text{ Hz}$)、3.44 (2H, d, $J=6.2\text{ Hz}$)、1.75 (3H, s)、1.63 (3H, s)为一组异戊烯基氢信号。以上波谱数据与文献^[9]数据基本一致,故鉴定该化合物为8-异戊烯基山柰酚(图1-3)。

化合物4:白色粉末。旋光值 $[\alpha]_{\text{D}20} = +3.9$ (c 0.1, MeOH)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)中, δ 5.02 (1H, d, $J=11.4\text{ Hz}$)、4.56 (1H, d, $J=11.4\text{ Hz}$)为二氢黄酮醇,结合偶合常数推断2、3位为反式构型; δ 7.31、6.78 (each, 2H, d, $J=8.5\text{ Hz}$)

为一组AA' BB'偶合系统氢信号; δ 5.85 (1H, s)、5.80 (1H, s)分别为A环8位和6位氢信号。该化合物在340 nm和292 nm处呈现(+) Cotton和(-) Cotton效应,确定该化合物的绝对构型2R。以上波谱数据与文献^[10]数据基本一致,鉴定该化合物为二氢山柰酚(图1-4)。

化合物5:黄色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)中, δ 11.95 (1H, s)为黄酮5位缔合的羟基信号; δ 4.96 (1H, d, $J=11.2\text{ Hz}$)、4.47 (1H, dd, $J=11.2, 4.2\text{ Hz}$)为二氢黄酮醇2、3位氢信号,结合偶合常数推测其2、3位为反式构型; δ 5.97 (1H, s)为8位氢信号; δ 7.30、6.78 (each, 2H, d, $J=8.5\text{ Hz}$)为黄酮B环AA' BB'偶合系统氢信号。其ECD谱在318 nm处呈现(+)-Cotton效应,确定该化合物的绝对构型2R。以上波谱数据与文献^[11]数据基本一致,鉴定该化合物为neophellamuretin(图1-5)。

化合物6:黄色针晶(甲醇)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)中, δ 11.98 (1H, s)为黄酮5位缔合羟基信号; δ 5.15 (1H, d, $J=11.4\text{ Hz}$)、4.64 (1H, dd, $J=11.4, 3.0\text{ Hz}$)为二氢黄酮醇2、3位氢信号,结合偶合常数推测其2、3位为反式构型; δ 7.34、6.81 (each, 2H, d, $J=8.5\text{ Hz}$)为黄酮B环AA' BB'偶合系统氢信号; δ 5.96 (1H, s)为A环8位氢信号; δ 5.60 (1H, d, $J=10.1\text{ Hz}$)、5.15 (1H, d, $J=10.1\text{ Hz}$)、1.39 (3H, s)、1.36 (3H, s)为吡喃型环合异戊烯基氢信号。其ECD谱在322 nm处呈现(+)-Cotton效应,确定该化合物的绝对构型2R。以上波谱数据与文献^[8]数据基本一致,鉴定该化合物为异柠檬酚(图1-6)。

化合物7:黄色粉末(甲醇)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)中, δ 6.14、6.37 (each 1H, d, $J=1.2\text{ Hz}$)为黄酮6和8位氢信号; δ 7.65 (1H, d, $J=1.7\text{ Hz}$)、7.52 (1H, dd, $J=8.5, 1.7\text{ Hz}$)、6.85 (1H, d, $J=8.5\text{ Hz}$)分别为B环2'、6'和5'位氢信号。以上波谱数据与文献^[12]数据完全一致,鉴定该化合物为槲皮素(图1-7)。

化合物8:黄色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)中, δ 12.48 (1H, s)为黄酮5位缔合羟基信号, δ 6.18、6.43 (each, 1H, s)为黄酮6位和8位氢信号; δ 8.05、6.92 (each, 2H, d, $J=8.8\text{ Hz}$)为黄酮B环AA' BB'偶合系统氢信号。以上

波谱数据与文献^[13]数据基本一致, 鉴定该化合物为山柰酚(图1-8)。

化合物9: 黄色粉末。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 中, δ 12.17 (1H, s) 为黄酮5位缩合羟基信号; δ 8.03、6.89 (each, 2H, d, *J*=8.4 Hz) 为黄酮B环AA' BB' 偶合系统特征氢信号; δ 6.28、6.81 (1H, s) 分别为6位和3位氢信号; 4.70 (1H, d, *J*=9.6 Hz) 为 β 型葡萄糖端基氢信号。以上波谱数据与文献^[14]数据基本一致, 鉴定该化合物为牡荆素(图1-9)。

化合物10: 黄色粉末。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.49 (1H, s) 为黄酮5位缩合羟基信号; 4.85 (1H, d, *J*=7.6 Hz) 为 β 型葡萄糖端基氢信号。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中给出一组黄酮母核上的15个碳信号、一组葡萄糖上的6个碳信号和1个甲氧基碳信号。以上波谱数据与文献^[15]数据比较, 结果基本一致, 故确定该化合物为当药黄素(图1-10)。

化合物11: 白色针晶(丙酮), 10%硫酸-乙醇显紫红色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.25、1.11、1.03、0.95、0.92、0.90、0.87 (each, 3H, s) 为7组甲基氢信号; δ 4.24 (1H, d, *J*=10.3 Hz) 为一个连氧碳上氢信号; δ 5.24 (1H, br s) 为五环三萜中12位特征烯氢信号。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中共给出30个碳信号, 结合 δ 143.7、122.3的双键碳信号, 表明其为齐墩果烯型五环三萜类化合物。具体为 δ 38.8 (C-1)、26.2 (C-2)、81.2 (C-3)、42.5 (C-4)、56.1 (C-5)、18.7 (C-6)、33.5 (C-7)、39.9 (C-8)、48.1 (C-9)、

37.8 (C-10)、23.9 (C-11)、122.3 (C-12)、143.7 (C-13)、43.1 (C-14)、28.6 (C-15)、28.1 (C-16)、36.9 (C-17)、45.2 (C-18)、46.3 (C-19)、30.8 (C-20)、41.6 (C-21)、77.0 (C-22)、22.8 (C-23)、64.8 (C-24)、16.4 (C-25)、17.2 (C-26)、25.6 (C-27)、28.4 (C-28)、33.1 (C-29)、20.3 (C-30)。以上数据与文献^[16]数据比较, 结果基本一致, 故鉴定该化合物为大豆皂醇B(图1-11)。

化合物12: 黄色针状结晶, 10%硫酸-乙醇溶液显黄色, 放置一段时间后变紫。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中, 其母核信号与化合物11相似, 表明结构中存在1个五环三萜片段; 剩余氢信号 δ 7.04 (1H, d, *J*=2.0 Hz)、6.97 (1H, dd, *J*=8.1, 2.0 Hz)、6.77 (1H, d, *J*=8.1 Hz) 为一组ABX系统; δ 7.48、6.25 (each, 1H, d, *J*=15.8 Hz) 为一组反式烯氢信号。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中给出五环三萜片段的30个碳信号、8个苯乙烯碳信号和1个酯基碳信号。以上数据与文献^[18]数据对比, 基本一致, 故鉴定为黄槿酮A(图1-12)。

化合物13: 黄色针状结晶, 10%硫酸-乙醇溶液显黄色, 放置一段时间后变紫。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中信号与化合物12基本一致, 不同处为3位氢信号的化学位移向低场移动1.40, 表明其连接了1个吸电基团。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中给出齐墩果烷型三萜母核的30个碳信号、1个酯基碳信号和1组苯乙烯基碳信号。以上数据与文献^[18]数据进行比对, 结果基本一致, 故鉴定该化合物为黄槿酮D(图1-13)。

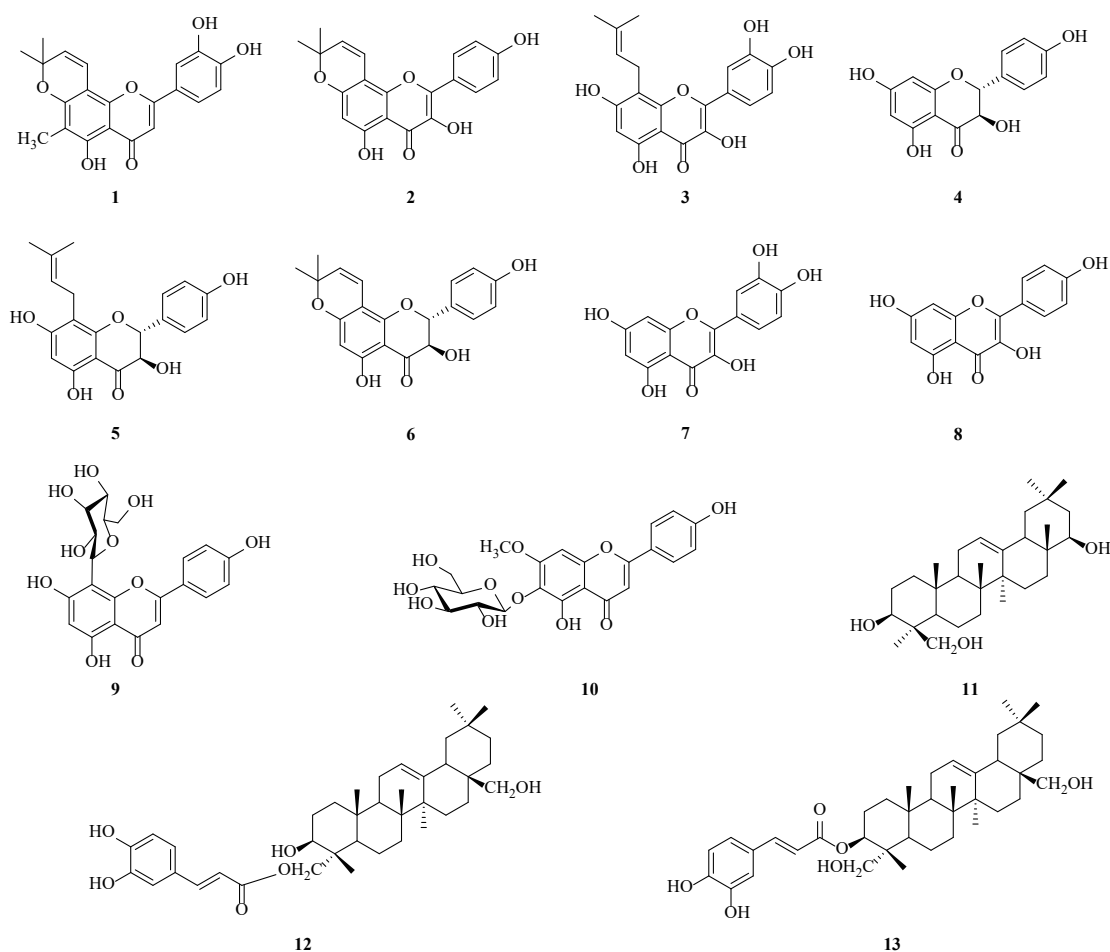


图1 小槐花叶中分离得到的化合物结构

4 讨论

本实验从小槐花叶中分离鉴定得到13个单体化合物,并根据其理化性质、核磁共振波谱分析并结合文献报道,鉴定了其化学结构。经查阅文献,发现山柰酚、槲皮素、黄槿酮A和黄槿酮D 4个化合物在小槐花根、茎等药用部位也曾分离得到^[17],分别为黄酮和三萜类成分,在结构上具有典型性和代表性。综上,本研究丰富了对民族药材小槐花的认知,为阐明其药效物质基础提供了重要依据,并寻找和确定了4个具有代表性的不同结构类型的候选质控成分,为建立和完善该药材的质量标准打下了基础。

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41卷[M]. 北京: 科学出版社, 1995(41): 19.
- [2] 《中华本草》编写委员会. 中华本草. 第十一卷[M]. 上

海: 上海科学技术出版社, 1999: 451.

- [3] 廖月葵, 靳维荣, 黄茂春. 舞草生药学研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 175-177.
- [4] 刘超, 吴颖, 张前军, 等. 山蚂蝗属植物化学成分和生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4006-4014.
- [5] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药材质量标准汇编. 第一卷[S]. 2008: 49.
- [6] 四川省食品药品监督管理局编. 四川省中药材标准 2010年版[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2011: 35-37.
- [7] 浙江省食品药品监督管理局编. 浙江省中药炮制规范 2005年版[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2006: 562.
- [8] 吴瑶, 罗强, 孙翠玲, 等. 小槐花的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 47(12): 1788-1792.
- [9] 吴瑶. 小槐花抗肿瘤活性成分研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2012.

- [10] Rosana A, Pacciaroni A, Penaloza L, et al. Phenolic Compounds from *Pterocaulonalopecuroides*[J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2010, 38 (5) : 1059-1064.
- [11] Slade D, Ferreira D, Marais Jannie PJ. Circular Dichroism, a Powerful Tool for the Assessment of Absolute Configuration of Flavonoids[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66: 2177-2215.
- [12] 王祝举, 赵玉英, 涂光忠, 等. 夏枯草化学成分的研究[J]. *药学报*, 1999 (9) : 679-682.
- [13] 易军鹏, 朱文学, 马海乐, 等. 牡丹籽的化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2009 (4) : 604-607.
- [14] Krafczyk N, Glomb MA. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos tea[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (9) : 3368-3376.
- [15] 郑伟, 岳跃栋, 龚亚君, 等. 双斑獐牙菜的化学成分研究[J]. *中草药*, 2016 (9) : 1468-1476.
- [16] Robert LB, Keith RP, Fenwick RG. Sapogenin Structure: Analysis of the ^{13}C - and ^1H -NMR Spectra of SoyasapogenolB[J]. *Journal of Natural Products*, 1990, 53 (2) : 298-302.
- [17] 张毅, 华琼琼, 孙依维, 等. 小槐花茎的化学成分的分离与鉴定[J]. *沈阳药科大学学报*, 2020, 37 (10) : 884-889.

(收稿日期 2023年10月14日 编辑 郑丽娥)