

环草石斛化学成分研究*

李春燕, 陆羽, 陈焯, 郑嘉雯, 王军
(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 环草石斛是中医临床上广泛应用的石斛药材。为了进一步研究环草石斛的药效成分, 采用硅胶、LH-20 凝胶及 C-18 反相硅胶等柱色谱技术对其甲醇提取液进行了系统分离, 结果得到 7 个化合物, 分别是: 石斛宁 (1), 2, 4, 7-三羟基-9, 10-二氢菲 (2), 2, 5-二羟基-4-甲氧基菲 (3), loddigesiinols C (4), 构唇石斛酚 (5), 石斛酚 (6), 3, 4', 5-三羟基-3'-甲氧基联苕 (7)。这些化合物的结构由质谱、核磁共振波谱数据确定, 其中化合物 2、7 首次在环草石斛中分离得到。

关键词: 环草石斛; 分离; 结构测定; 药效成分

中图分类号: O625 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2013) 03-0073-04

Chemical Components of *Dendrobium loddigesii*

LI Chunyan, LU Yu, CHEN Ye, ZHENG Jiawen, WANG Jun

(School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Dendrobium loddigesii* is used in clinical applications widely. In order to further investigate its effective constituent, seven compounds including shihunine (1), 9, 10-dihydrophenanthrene-2, 4, 7-triol (2), moscatin (3), loddigesiinols C (4), moscatilin (5), gigantol (6) and tristin (7) were isolated by silica gel, Sephadex LH-20 and ODS-18 column chromatography from the methanol extract of *Dendrobium loddigesii*. Their structures were analyzed by MS and NMR spectroscopy. The compounds 2 and 7 were obtained from *Dendrobium loddigesii* for the first time.

Key words: *Dendrobium loddigesii*; isolation; structure identification; effective constituents

兰科石斛属 *Dendrobium* SW. 植物全世界约有 1 100 种, 我国境内有 76 种, 其中有近 40 种被作为药用^[1], 用于治疗胃阴不足, 病后虚热不退, 目暗不明等症^[2]。在治疗糖尿病及老年性疾病的方剂中, 石斛常是主要成分^[3-5]。由于石斛的药效及广泛用途, 成为药用植物的研究热点, 得到国内外学者的关注^[6]。

环草石斛也叫小环钗石斛、美花石斛、粉花石斛, 主要分布于贵州、广西、云南和广东等省, 被 2000 版中国药典收载。因金钗石斛, 铁皮石斛等价格昂贵, 中医临床所使用的石斛多是环草石斛或黄草石斛。关于环草石斛的化学成分研究较少, 李满飞等^[7]从环草石斛的 HCl ($\varphi = 1\%$) 浸提液中

分离到了有抑制大鼠肾脏微粒体活性的石斛宁生物碱; 秦海林等^[8]部分归属了环草石斛特征性标准提取物 (SCE) 乙醚萃取部位的¹H NMR 指纹图谱; Ito 等^[9]研究了环草石斛 $\varphi = 80\%$ 醇提液的化学组成, 找到了具清除自由基活性及 NO 生成抑制活性的新结构芪类。

我们在研究中药药效成分的工作中发现, 约有 50% 的环草石斛醇提取物分配在大极性的正丁醇萃取部位, 而已报道的关于环草石斛化学成分的研究大都集中在石油醚、乙酸乙酯等中小极性萃取部位。为了阐明环草石斛的药效物质基础, 本研究对环草石斛甲醇提取液进行了系统的化学成分研究, 利用现代色谱技术和波谱技术分离鉴定了 7 个化合物,

* 收稿日期: 2013-01-09

基金项目: 广东省部产学研资助项目 (2010B090400533)

作者简介: 李春燕 (1987 年生), 女, 硕士; 通讯作者: 王军; E-mail: wjun@mail.sysu.edu.cn

分别是: 石斛宁 (1), 2, 4, 7-三羟基-9, 10-二氢菲 (2), moscatin (3), loddigesinols C (4), 杓唇石斛酚 (5), 石斛酚 (6), tristin (7), 其结构见图 1。其中化合物 2 和 7 为首次在环草石斛中分离得到, 对环草石斛的药效成分进行了初步探讨。

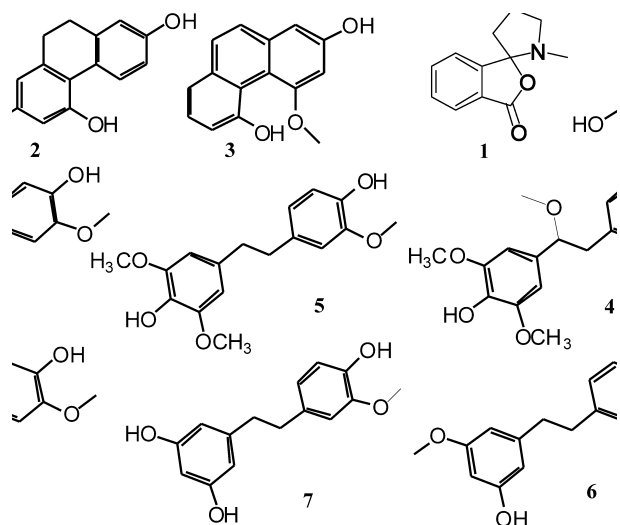


图 1 分自环草石斛的化合物分子结构

Fig. 1 Structures of compounds from *Dendrobium loddigesii*

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器

实验试剂: 石油醚、乙酸乙酯、甲醇、二氯甲烷、丙酮等为分析纯试剂, 氘代试剂为美国 CIL 产品; TLC 硅胶 (GF₂₅₄) 和柱层析硅胶 (200 ~ 300 目) 均为青岛海洋化工有限公司产品, Sephadex LH-20 凝胶为美国 GE Healthcare 产品, 反相硅胶 ODS-A 为日本 Daiso 公司产品。环草石斛 (茎) *D. loddigesii* Rolfe 于 2011 年 9 月购自广州采芝林药店, 该药材产自云南, 广州市药材公司中药饮片厂监制, 由中山大学药学院蒋林研究员鉴定。

实验仪器: 日本岛津 LC-20AT 中压液相制备色谱, Bruker AvanceIII 400 MHz 核磁共振谱仪, LCQ DECA XP 型液相色谱-质谱联用仪, 美国 Perkin Eimer TM 公司 Perkin Eimer 341 型比旋光测定仪。

1.2 提取与分离

环草石斛 (茎) 4 kg, 甲醇冷浸 (35 L × 2), 减压浓缩提取液得浸膏 100 g。将浸膏悬浮于水中, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯及正丁醇萃取 (3 L × 3), 减压浓缩萃取液, 分别得石油醚萃取浸膏

13 g, 氯仿萃取浸膏 25 g, 乙酸乙酯萃取浸膏 10 g, 正丁醇萃取浸膏 47 g, 水溶层浸膏 16 g。

氯仿萃取浸膏经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 甲醇洗脱, 脱去叶绿素后, 用硅胶 (200 ~ 300 目) 柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (体积比为 100:0、90:1、80:20、70:30、50:50、40:60、10:90 和 0:100) 混合溶剂梯度洗脱, 得到 8 个馏分 (Fr. L1 ~ 8)。Fr. L5 ~ 6 合并 (6 g), 经中压液相色谱系统分离, 固定相为 ODS 反相键合硅胶, 水-甲醇混合溶剂梯度洗脱, 分段收集, 在 $V(\text{水}):V(\text{甲醇}) = 50:50$ 段得化合物 5, $V(\text{水}):V(\text{甲醇}) = 45:55$ 段分别得化合物 6、化合物 4, $V(\text{水}):V(\text{甲醇}) = 40:60$ 段得化合物 3, 各馏份分别进一步经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱纯化, 甲醇洗脱, 得到相应的纯化合物。Fr. L7 与乙酸乙酯萃取部位合并, 用硅胶 (200 ~ 300 目) 柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (体积比为 100:0、90:1、80:20、70:30、50:50、30:70、20:80 和 0:100) 混合溶剂梯度洗脱, 得到 8 个馏分 (Fr. Y1 ~ 8)。Fr. Y6 ~ 7 合并 (3 g), 经中压液相色谱系统纯化, 固定相为 ODS 反相键合硅胶, 以水-甲醇混合溶剂梯度洗脱, 收集 $V(\text{水}):V(\text{甲醇}) = 70:30$ 段馏份, 得化合物 2, 继续收集 $V(\text{水}):V(\text{甲醇}) = 60:40$ 段馏份得化合物 7, 各段馏份分别再经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱多次纯化, 甲醇洗脱, 得相应的纯化合物。正丁醇萃取浸膏, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱除糖, 甲醇洗脱, 再经正相硅胶柱色谱分离, $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇}) = 25:1$ 混合溶剂等度洗脱, 得到化合物 1。

2 结构鉴定

化合物 1, 淡黄色油状液体, 易溶于乙酸乙酯、甲醇等。ESI-MS m/z : 204.3 [M + H], 分子式 $C_{12}H_{13}NO_2$, 不饱和度为 7。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.87 (1H, d, 7.2 Hz), 7.71 (1H, t, 7.2 Hz), 7.57 (1H, t, 7.2 Hz), 7.47 (1H, d, 7.2 Hz), 3.39 (1H, m), 3.07 (1H, m), 2.46 (1H, m), 2.38 (1H, m), 2.14 (2H, m), 2.13 (3H, s), 与文献 [10] 对照, 鉴定化合物 1 为石斛宁。

化合物 2, 白色片状结晶, 易溶于丙酮。ESI-MS m/z : 227.3 [M - H], 分子式 $C_{14}H_{12}O_3$, 不饱和度为 9。¹H NMR (400 MHz, $acetone-d_6$) δ : 8.25 (1H, d, 8 Hz), 6.74 (1H, dd, 1.2, 8 Hz),

6.73 (1H, d, 1.2 Hz), 6.44 (1H, d, 1.2 Hz), 6.34 (1H, d, 1.2 Hz), 2.63 (4H, s), 与文献 [11] 对照, 鉴定化合物 **2** 为 2, 4, 7-三羟基-9, 10-二氢菲。

化合物 **3**, 白色粉末状结晶, 易溶于丙酮。ESI-MS m/z : 239.2 [M - H], 分子式 $C_{15}H_{12}O_3$, 不饱和度为 10。 1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 7.63 (1H, d, 8.8 Hz), 7.50 (1H, d, 8.8 Hz), 7.44 (1H, t, 8.8 Hz), 7.40 (1H, dd, 8.8, 1.6 Hz), 7.14 (1H, dd, 8.8, 1.6 Hz), 7.10 (1H, d, 1.6 Hz), 7.02 (1H, d, 1.6 Hz), 4.15 (3H, s)。与文献 [12] 对照, 鉴定化合物 **3** 为 moscatin。

化合物 **4**, 无定形白色固体, 易溶于氯仿、丙酮、甲醇等。ESI-MS m/z : 333.1 [M - H], 分子式 $C_{18}H_{22}O_6$, 不饱和度为 8。 $[\alpha]_D^{27} - 0.6^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.78 (1H, d, 7.8 Hz), 6.59 (1H, dd, 7.8, 1.5 Hz), 6.49 (1H, d, 1.5 Hz), 6.41 (2H, s), 4.17 (1H, t, 6.6 Hz), 3.82 (6H, s), 3.76 (3H, s), 3.20 (3H, s), 3.02 (1H, dd, 6.9, 13.3 Hz), 2.76 (1H, dd, 6, 13.6 Hz)。与文献 [9] 对照, 鉴定化合物 **4** 为 loddigesiinols C。

化合物 **5**, 白色针状结晶, 易溶于氯仿、丙酮、甲醇等。ESI-MS m/z : 305.1 [M + H], 分子式 $C_{17}H_{20}O_5$, 不饱和度为 8。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.81 (1H, d, 8 Hz), 6.66 (1H, dd, 1.6, 8 Hz), 6.59 (1H, dd, 1.6 Hz), 6.34 (2H, s), 3.82 (6H, s), 3.81 (3H, s), 2.79 (4H, s)。与文献 [8] 对照, 鉴定化合物 **5** 为构唇石斛酚。

化合物 **6**, 淡黄色油状物, 易溶于氯仿、丙酮、甲醇等。ESI-MS m/z : 273.2 [M - H], 分子式 $C_{16}H_{18}O_4$, 不饱和度为 8。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.81 (1H, d, 8 Hz), 6.65 (1H, dd, 8, 1.6 Hz), 6.60 (1H, d, 1.6 Hz), 6.29 (1H, d, 1.6 Hz), 6.23 (2H, d, 1.6 Hz), 3.82 (3H, s), 3.72 (3H, s), 2.78 (4H, s)。与文献 [8] 对照, 鉴定化合物 **6** 为 gigantol。

化合物 **7**, 无色针状结晶, 易溶于丙酮。ESI-MS m/z : 259.2 [M - H], 分子式 $C_{15}H_{16}O_4$, 不饱和度为 8。 1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 6.79 (1H, d, 1.6 Hz), 6.70 (1H, d, 8 Hz), 6.61 (1H, dd, 1.6, 8 Hz), 6.21 (2H, d, 1.6 Hz), 6.19 (1H, d, 1.6 Hz), 3.79 (3H, s), 2.75 (4H, m)。与文献 [13] 对照, 鉴定化合物 **7** 为 tristin。

3 结果与讨论

研究对环草石斛的甲醇提取物进行了较系统的分离, 单离到 6 个多酚和 1 个生物碱 (化合物结构式见图 1), 化合物 **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** ($w/\%$) 分别为 0.062, 0.010, 0.001, 0.001, 0.025, 0.001, 0.003, 其中化合物 **2** 和 **7** 为首次在环草石斛中发现的芪类化合物。

本研究从环草石斛的正丁醇萃取部位单离到大量的石斛宁生物碱, 从 4 kg 药材中分到 2.5 g 多纯品 (纯度为 99%); 进一步用 1H NMR 技术研究环草石斛正丁醇萃取物, 结果显示, 低场 δ 8.5~7.5 有强的石斛宁及类似结构化合物的共振信号 (见图 2), 可推出石斛宁或类似结构的生物碱为环草石斛的主要化学成分, 故环草石斛属含生物碱较多的优质石斛药材^[14]; 环草石斛中等极性部位的化学成份主要是联苜、9, 10-二氢菲、菲等多酚类物质, **5** 在其中含量最多, 其次是化合物 **2**。

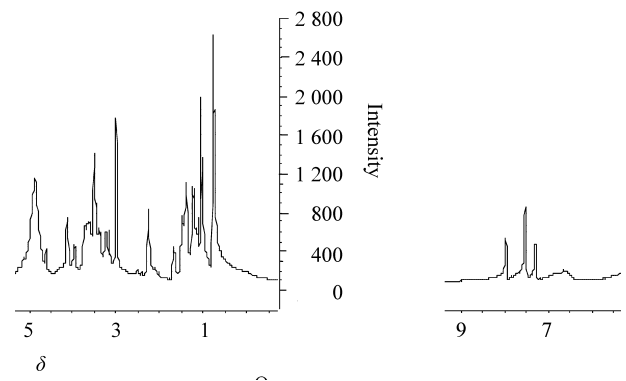


图2 环草石斛正丁醇萃取部位 1H NMR谱 (400 MHz, Methanol- d_4)

Fig. 2 1H NMR spectrum of the extract from *Dendrobium loddigesii* with *n*-BuOH

石斛宁目前只在兰科植物中发现, 对兰科植物的化学分类学有重要意义^[15]。已有研究报道石斛宁能抑制大鼠肾脏微粒体 Na-K-ATP 酶^[8], 这一药理活性与石斛在中医临床上滋阴清热的功效是相吻合的, 因此石斛宁可被认为是石斛滋阴清热的药效成分之一。芪类化合物具有广泛的抗血小板聚集、抗炎、抗肿瘤、抗畸变、抗氧化、细胞凋亡等活性^[16-18], 这些结构多样性的芪类化合物, 与中医认为石斛具有抗衰老功效相吻合。

4 结 论

本研究得出环草石斛中生物碱和芪类化合物的含量非常丰富,且有较多的结构多样性。深入研究环草石斛的活性成分,可为阐明其成份-药效的关系提供科学依据,也可为石斛所制成的中成药质量控制提供依据。

参考文献:

- [1] 武荣,栗燕. 石斛资源保护研究进展[J]. 河南农业科学,2009,12:9-15.
- [2] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社. 2010.
- [3] 林雅,余文珍,郑燕芳,等. 石斛合剂对糖尿病大鼠模型血糖血脂代谢的影响[J]. 福建中医药大学,2012,22(3):22-25.
- [4] 李长征,余文珍,蒋艺燕,等. 石斛合剂对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. 福建中医药大学学报,2012,22(3):18-23.
- [5] 黄江丽. 石斛夜光丸复合方血栓通胶囊治疗中心性浆液性脉络膜视网膜病变[J]. 光明中医,2008,23(12):1934-1937.
- [6] 明兴加,伍淳操,钟国跃,等. 中国石斛属植物文献计量研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):221-226.
- [7] 李满飞,甘平,田羲正. 粉花石斛化学成分研究[J]. 药学学报,1991,26(4):307-310.
- [8] 秦海林,张建新,郝小江,等. 环草石斛的¹H-NMR 指纹图谱解析[J]. 中国中药杂志,2002,27(12):919-924.
- [9] ITO M, MATSUZAKI K, WANG J, et al. New phenanthrenes and stilbenes from *Dendrobium loddigesii* [J]. Chem Pharm Bull, 2010, 58(5): 628-633.
- [10] KAWANISHI K, UHARA Y, HASHIMOTO Y. Shihunine and dihydroshihunine from *Banisteriopsis caapi* [J]. J Nat Prod, 1982, 45(5): 637-639.
- [11] 张朝凤,邵莉,黄卫华,等. 兜唇石斛酚类化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(24):2922-2925.
- [12] 李玉鹏,蒋金和,刘莹,等. 金钗石斛化学成分的研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(1):39-42.
- [13] 张婷,张朝凤,王峥涛,等. 翅梗石斛的化学成分研究[J]. 中国天然药物,2005,3(1):28-32.
- [14] 魏小勇. 石斛属植物生物碱研究进展[J]. 中国药事,2005,19(7):445-447.
- [15] BASTIDA J, SELLES M, CODINA C, et al. Alkaloids from *Behria tenuiflora* [J]. Planta Medica, 1996, 62(6): 575-577.
- [16] TSAI A C, PAN S L, LIAO C H, et al. Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth in vitro and in vivo[J]. Cancer Letters, 2010, 292:163-170.
- [17] MIYAZAWA M, SHIMAMURA H, NAKAMURA S, et al. Moscatilin from *Dendrobium nobile*, a naturally occurring bibenzyl compound with potential antimutagenic activity[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47:2163-2167.
- [18] CHEN T H, PAN S L, GUH J H, et al. Moscatilin induces apoptosis in human colorectal cancer cells: A crucial role of c-Jun NH2-terminal protein kinase activation caused by tubulin depolymerization and DNA damage[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14:4250-4258.