

翻白草的化学成分研究

蔡蕊¹,于远洋²,谢宁³,王世盛^{3,4,*}¹大连理工大学分析测试中心,大连 116024;²大连市检验检测认证技术服务中心,大连 116081;³大连理工大学化工学院药理学系,大连 116024;⁴大连理工大学宁波研究院,宁波 315016

摘要:利用快速溶剂萃取、聚酰胺柱层析、减压硅胶柱层析、常压硅胶柱层析等分离纯化技术,结合质谱引导的 pHPLC 分离技术,从干燥翻白草 *Potentilla discolor* Bge. 全草中分离得到化合物 **1~6**,利用 MS、¹H MR、¹³C NMR、2D NMR 等光谱分析方法确定结构,分别鉴定为 kaempferol-3-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (**1**)、芹菜素 (**2**)、山楂酸 (**3**)、3'-甲氧基鞣花-4-O- β -D-葡萄糖苷 (**4**)、 β -胡萝卜苷 (**5**)、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (**6**)。其中,化合物 **4** 是首次从翻白草中分离得到。

关键词:翻白草;质谱引导分离;化学成分;中药;快速溶剂萃取

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022) Suppl-0046-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.007

Study on the chemical constituents of *Potentilla discolor* Bge.CAI Rui¹, YU Yuan-yang², XIE Ning³, WANG Shi-sheng^{3,4,*}¹Analytical Instrumentation Center, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;²Dalian Inspection and Certification Technical Service Center, Dalian 116081, China;³Department of Pharmaceutical Sciences, School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;⁴Ningbo Institute of Dalian University of Technology, Ningbo 315016, China

Abstract: Dried powder of whole herbal of *Potentilla discolor* Bge. was isolated and purified in this work. Accelerate solvent extraction, polyamide column chromatography, vacuum silica gel column chromatography and atmospheric pressure silica gel column chromatography and preparative high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry technology were utilized. The chemical structure of the separated compounds were identified by MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, 2D NMR and some other spectral analysis methods. Six compounds were isolated and identified as kaempferol-3-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (**1**), apigenin (**2**), maslinic acid (**3**), 3'-O-methylgallic acid-4-O- β -D-glucopyranoside (**4**), β -daucoesterol (**5**), apigenin-7-O- β -D-glucuronoside (**6**). Among them, compound **4** was isolated from *P. discolor* for the first time.

Key words: *Potentilla discolor* Bge.; preparative HPLC-MS (pHPLC-MS) isolation; chemical constituents; traditional Chinese medicine; accelerate solvent extraction

翻白草 (*Potentilla discolor* Bge.), 多年生草本, 委陵菜属代表植物。其干燥全草和根部都可作药用。在《救荒本草》书中称为鸡腿根, 在《野菜谱》书中称为天藕。翻白草主要分布在华北、东北、中南及四川、陕西等地^[1]。翻白草味甘、微苦, 无毒, 具有清热、消肿、止血的功效, 能够治疗肝炎、II 型糖尿病、感染还有痢疾等^[2]。已有文献报道其化学成分包括黄酮类、甾醇类、三萜类、鞣质等其他类型化合物^[3-6], 其中黄酮类物质被认为是抗 II 型糖尿病和抗

肿瘤的主要活性成分, 但是其具体的作用机理目前还未明确, 需要进一步研究探讨^[4,7]。翻白草是一味传统的中药材, 在中国使用了近千年。近年来, 由于其在降血糖方面有良好的功效, 使得药学研究者将目光集中于其化学成分和相关的药理活性研究。

由于天然产物中某些化学成分含量微量, 随着研究的发展, 发现新化学成分越来越困难, 高效液相色谱技术与其他高效分析技术联用也越来越受研究者重视。其中将高效液相色谱技术与质谱联用越来越多地应用于分析和分离制备天然产物中的活性成分^[8]。本实验利用质谱引导的 pHPLC 分离技术结

合速溶剂萃取、聚酰胺柱层析、减压硅胶柱层析、常压硅胶柱层析等分离纯化技术,对干燥的翻白草全草进行化学成分研究,为翻白草的开发和利用提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

翻白草药材于2012年10月15号由安徽本草国药饮片有限公司生产,产地为黑龙江省,采购于大连益春堂药房。经大连食品药品检验所鉴定为 *Potentilla discolor* Bunge 的干燥全草,样本存放于大连理工大学化工学院药理学系(样本号:WFBC1307)。

自动分离纯化系统(Waters,2767 样品管理器,2545 二元梯度泵,2489 紫外检测器,515 补偿泵,系统管路管理器,SQD2 质谱,MassLynx 和 FractionLynx 操作系统);EYELA N-3010、N-1000 旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社);Bruker Avance 400 MHz 核磁共振仪;快速溶剂萃取仪(ThermoFisher Scientific, ASE[®]-350);薄层层析硅胶及柱层析硅胶(青岛海洋化工有限公司)。HPLC 所用水为超纯水(由 Milli-Q Direct16 纯水/超纯水的一体化系统制备);色谱甲醇(色谱纯,Merck);其余试剂均为分析纯(西陇化工股份有限公司)。

1.2 提取与分离

将1 kg 翻白草置于烘箱中,80 °C 烘干4 h 然后粉碎(称重为930 g)。快速溶剂萃取法(ASE)萃取,选择100 mL 萃取池,每次每个萃取池中放约50 g 翻白草粉末,70% 乙醇水溶液(V/V)为提取溶剂,萃取温度为60 °C,压力低于 1×10^4 kPa,静态萃取5 min,循环次数2次,溶剂冲洗30 s,自动收集提取液合并,真空旋转蒸发仪浓缩,得到浸膏230.4 g,提取率24.8%。

将浸膏加8 L 水,50 °C 加热、搅拌、过滤,水溶部分用聚酰胺柱层析进行分离。水不溶部分干燥称重为27.2 g。称取460 g 聚酰胺(60~100目),用95% 乙醇浸泡24 h,依次用4倍柱体积的10%、30%、50%、70%、95% 乙醇洗脱,得到 Et. 10(11.4 g)、Et. 30(1.3 g)、Et. 50(3.9 g)、Et. 70(3.3 g)和 Et. 95(0.6 g)五个组分。提取物的浸膏用水复溶,水溶部分经聚酰胺色谱柱分离洗脱得到的组分 Et. 10 用 Molish 反应监测呈阳性,10% 乙醇洗脱除去的主要为糖类物质。95% 乙醇洗脱液浓缩后得到物质呈绿色,推测是一些色素类物质。聚酰胺树脂吸附了大量的鞣质和其他杂质,为后续分离解决了除杂

的问题。

Et. 50 组分减压柱层析分离,二氯甲烷/甲醇梯度洗脱,洗脱液根据 TLC 监测结果合并为8个组分,组分4中有白色固体析出,用甲醇和二氯甲烷反复清洗之后,得到化合物5(8.6 mg)。组分5放置后有黄色固体析出,用甲醇反复清洗转移上清液,得到化合物1(22.6 mg)。组分6中析出浅黄色固体,甲醇清洗固体至白色,得到化合物4(12.0 mg)。组分7中有黄色固体析出,用甲醇重结晶后得到化合物6(17.2 mg)。Et. 70 减压柱层析得到组分1~10,组分10用质谱引导的 Waters 自动分离纯化系统分离得到化合物2(13.5 mg)和3(7.8 mg)。

2 结果

化合物结构鉴定

化合物 1 黄色粉末;FeCl₃/EtOH 有显色;(+)ESI-MS: m/z 595 [M+H]⁺, (+)ESI-MS: m/z 617 [M+Na]⁺,分子式为C₃₀H₂₆O₁₃,¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ : 7.96(2H, d, J = 8.8 Hz, H-2'/6'), 7.38(1H, d, J = 16.0 Hz, H-3''), 7.28(2H, d, J = 8.4 Hz, H-5'''/9'''), 6.79(2H, d, J = 8.8 Hz, H-3'/5'), 6.77(2H, m, H-6'''/8'''), 6.28(1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.11(1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.05(1H, d, J = 16.0 Hz, H-2''), 5.22(1H, m, H-1''), 4.28(1H, dd, J = 11.6, 2.0 Hz, H-6''), 4.17(1H, dd, J = 11.6, 6.4 Hz, H-6''), 3.40~3.48(4H, m, H-2''/3''/4''/5'')。 ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD) δ : 178.0(C-4), 167.4(C-1'''), 164.5(C-7), 161.6(C-5), 160.1(C-4'), 159.7(C-7'''), 158.0(C-2), 157.0(C-9), 145.1(C-3'''), 133.8(C-3), 130.8(C-2'/6'), 129.8(C-5'''/9'''), 125.8(C-4'''), 121.3(C-6'), 115.4(C-3'/5'), 114.6(C-6'''/8'''), 113.3(C-2'''), 104.1(C-1''), 102.5(C-10), 98.6(C-6), 93.4(C-8), 76.6(C-3''), 74.4(C-5''), 74.3(C-2''), 70.3(C-4''), 62.9(C-6'')。以上数据与文献^[9]对照一致,鉴定化合物1为 kaempferol-3-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside(结构见图1)。

化合物 2 黄色粉末;FeCl₃/EtOH 有显色;(-)ESI-MS: m/z 269 [M-H]⁻,分子式为C₁₅H₁₀O₅,¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.96(1H, s, 5-OH), 10.85(1H, s, 7-OH), 10.37(1H, s, 4'-OH), 7.92(2H, d, J = 8.8 Hz, H-2'/6'), 6.92(2H, d, J = 8.8 Hz, H-3'/5'), 6.78(1H, s, H-3), 6.48(1H, s, J = 2.0 Hz, H-8), 6.19(1H, d, J = 2.0 Hz, H-6);¹³C

NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.0 (C-4), 164.2 (C-2), 163.9 (C-7), 161.3 (C-5), 161.1 (C-4'), 156.9 (C-9), 128.6 (C-2'/6'), 121.0 (C-1'), 116.0 (C-3'/5'), 105.3 (C-10), 103.1 (C-3), 99.9 (C-6), 94.8 (C-8)。以上数据与文献^[10]对照一致, 鉴定化合物 **2** 为芹菜素。

化合物 3 白色无定形粉末; 香草醛浓硫酸试剂反应阳性, 浓硫酸乙醇反应阳性; (-) ESI-MS: m/z 471 [M-H]⁻, (+) ESI-MS: m/z 495 [M + Na]⁺, 分子式为 C₃₀H₄₈O₄。¹H NMR ((CD₃)₂CO): δ : 5.45 (1H, br s), 4.09 (1H, ddd, $J = 11.0, 9.5, 4.5$ Hz, H-2 β), 3.38 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3 α), 3.28 (1H, dd, $J = 4.5, 14.5$ Hz), 1.26、1.25、1.06、1.00、0.98、0.97、0.92 (各 3H, s, H-30, H-29, H-23 ~ H-27); ¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 178.9 (C-4), 145.0 (C-13), 122.9 (C-12), 83.7 (C-3), 68.3 (C-2), 56.1 (C-5), 49.7 (C-9), 48.5 (C-1), 46.8 (C-19), 42.5 (C-18), 42.2 (C-14), 40.2 (C-4), 39.8 (C-8), 38.9 (C-10), 34.4 (C-21), 33.5 (C-7), 33.3 (C-22), 32.6 (C-1'), 31.3 (C-20), 29.2 (C-23), 28.4 (C-15), 26.3 (C-27), 24.2 (C-11), 23.9 (C-16), 23.9 (C-17), 23.7 (C-30), 19.1 (C-6), 17.6 (C-26), 17.4 (C-25), 17.0 (C-24)。以上数据与文献^[11,12]对照一致, 鉴定化合物 **3** 为山楂酸。

化合物 4 白色针状结晶; (-) ESI-MS: m/z 447 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₁H₁₈O₁₃。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.76 (1H, s, 5-H), 7.52 (1H, s, 5'-H), 4.97 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, 1''-H), 4.04 (3H, s, 3'-OMe), 3.16 ~ 3.51 (4H, m, H-2''/3''/4''/5''), 3.72 (1H, m, H-6''), 3.53 (1H, m, H-6'''), 6.78 (1H, s, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 158.7 (C-7), 158.6 (C-13), 152.7 (C-4'), 147.4 (C-4), 141.9 (C-2'), 140.1 (C-3'), 140.1 (C-3), 135.9 (C-2), 114.7 (C-6), 113.1 (C-1'), 112.0 (C-5), 111.4 (C-5'), 111.4 (C-6'), 107.8 (C-1), 102.5 (C-1''), 77.3 (C-5''), 75.7 (C-3''), 73.3 (C-2''), 69.6 (C-4''), 60.9 (3'-OMe), 60.6 (C-6'')。以上数据与文献^[13]对照一致, 鉴定化合物 **4** 为 3'-甲氧基鞣花酸 4-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 5 白色粉末; 难溶于甲醇, 溶于二氯甲烷/甲醇混合溶媒, 浓 H₂SO₄/EtOH 显色为紫红色斑点; (+) APCI-MS: m/z 577 [M + H]⁺; 分子式为 C₃₅H₆₀O₆。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1/1) δ :

4.41 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.86 (1H, dd, $J = 12.0, 2.6$ Hz, H-6'), 3.73 (1H, dd, $J = 12.0, 5.1$ Hz, H-6'), 3.22 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, H-20), 1.88 (1H, d, $J = 13$ Hz, H-1), 1.19 (1H, t, $J = 11.5$ Hz, H-12), 1.09 (1H, t, $J = 13$ Hz, H-1), 1.03 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.86 (3H, t, $J = 8.3$ Hz, H-29), 0.85 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 0.83 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26), 0.70 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 140.9 (C-5), 121.7 (C-6), 101.3 (C-1'), 77.4 (C-3), 77.2 (C-5'), 77.2 (C-3'), 73.9 (C-2'), 70.6 (C-4'), 61.6 (C-6'), 56.7 (C-14), 55.9 (C-17), 50.1 (C-9), 45.6 (C-24), 42.3 (C-13), 39.5 (C-12), 38.8 (C-4), 37.3 (C-1), 36.7 (C-10), 36.0 (C-20), 33.8 (C-22), 31.9 (C-8), 31.8 (C-7), 29.7 (C-2), 29.2 (C-25), 28.3 (C-16), 25.9 (C-23), 24.3 (C-15), 23.1 (C-28), 21.1 (C-11), 20.2 (C-26), 19.6 (C-19), 19.4 (C-27), 19.1 (C-21), 12.3 (C-18), 12.1 (C-29)。以上数据与文献^[14]对照一致, 鉴定化合物 **5** 为 β -胡萝卜素。

化合物 6 黄色无定型粉末; 浓 H₂SO₄/EtOH 显色为黄色斑点, FeCl₃/EtOH 显色为棕色; (-) ESI-MS: m/z 445 [M-H]⁻, 推测分子式: C₂₁H₁₈O₁₁。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.98 (1H, s, 5-OH), 7.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'/6'), 6.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'/5'), 6.85 (1H, s, H-3), 6.81 (1H, s, H-8), 6.43 (1H, s, H-6), 5.09 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-1''), 3.17 ~ 3.67 (4H, m, H-2''/3''/4''/5''); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.0 (C-7), 172.3 (C-13), 164.2 (C-4'), 162.9 (C-4), 161.5 (C-2'), 161.1 (C-3'), 156.9 (C-3), 128.5 (C-2), 120.9 (C-6), 116.0 (C-1'), 105.3 (C-5), 103.0 (C-5'), 99.5 (C-6'), 99.5 (C-1), 94.7 (C-1''), 76.4 (C-5''), 74.3 (C-3''), 72.9 (C-2''), 71.8 (C-4'')。以上数据与文献^[15]对照一致, 鉴定化合物 **6** 为芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷。

3 结论

本实验利用快速溶剂萃取技术结合质谱引导的 pHPLC 分离技术、聚酰胺柱层析、减压硅胶柱层析、常压硅胶柱层析等分离纯化技术, 对干燥的翻白草全草进行化学成分研究。共分离得到 6 个化合物, 其中化合物 **4** 是首次从翻白草中分离得到。翻白草中三萜类与黄酮类成分具有降糖和抗肿瘤活性^[6], 但化合物 **4** 缺少相关的活性评价。本实验建立的快

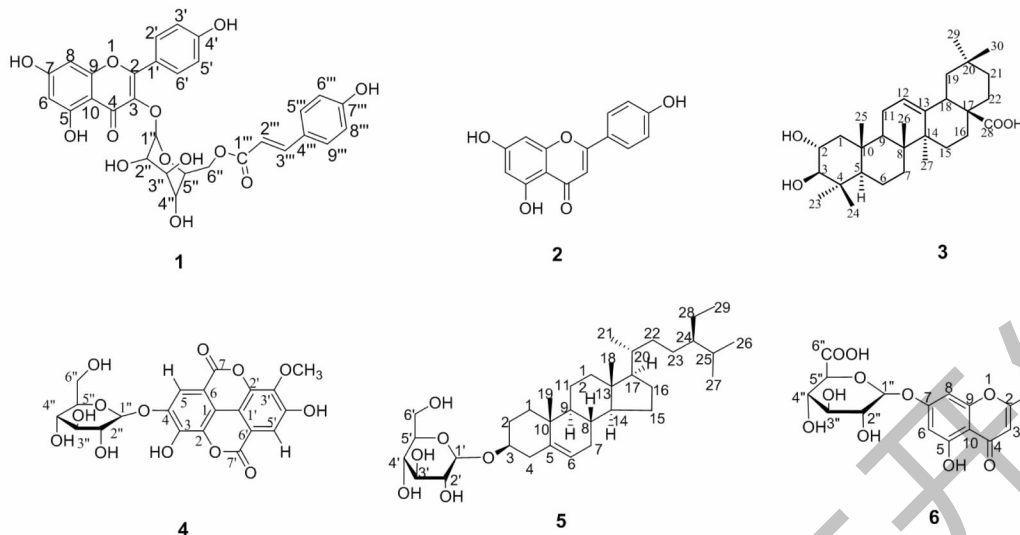


图1 化合物1~6的化学结构
Fig.1 Structure of compound 1~6

速溶剂萃取技术结合质谱引导的 pHPLC 分离技术适用于翻白草中化学成分的分纯化。分离并鉴定的化合物也为后续的翻白草相关活性跟踪评价及翻白草质量控制提供物质基础。

参考文献

- 1 Ma XJ. Studies on chemical constituents and α -glucosidase inhibitory effect of *Potentilla discolor* [D]. Tianjin: Tianjin University (天津大学), 2019.
- 2 Liu Y, Fu QH, Shi MN, et al. Mechanism of *Potentilla discolor* in treating UC by regulating mitochondrial autophagy [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 3907-3914.
- 3 Wang Q, Xu DC, Shi XH, et al. Flavones from *Potentilla discolor* Bunge [J]. Chin J Nat Med, 2009, 7: 361-364.
- 4 Qin HW, Sun H, Wang XD, et al. Chemical constituents of *Potentilla discolor* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2020, 43: 339-343.
- 5 Choudhary A, Mittal AK, Radhika M, et al. Two new stereoisomeric antioxidant triterpenes from *Potentilla fulgens* [J]. Fitoterapia, 2013, 91: 290-297.
- 6 Li YY, Sun H, Wang XD, et al. Study on chemical constituents of triterpenoids from *Potentilla discolor* [J]. J Chin Med Mat (中药材), 2013, 36: 1099-1101.
- 7 Gao B, Su YF, Zhang J, et al. α -Glucosidase inhibitory activities guided isolation of chemical constituents from *Potentilla discolor* [J]. Chin Tradit Herbal Drug (中草药), 2021, 52:

4473-4479.

- 8 Wu HF, Guo J, Chen SL, et al. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed, 2013, 72: 267-291.
- 9 Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, et al. Bioactive flavonoid glycosides from the seeds of *Rosa canina* [J]. Pharm Biol, 2003, 41: 237-242.
- 10 Jiang Y, Lu Y, Zhang YY, et al. Anti-complementary constituents of *Houttuynia cordata* and their targets in complement activation cascade [J]. Nat Prod Res, 2014, 28: 407-410.
- 11 Rudiyansyah, Garson MJ. Secondary metabolites from the wood bark of *Durio zibethinus* and *Durio kutejensis* [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 1218-1221.
- 12 Taniguchi S, Imayoshi Y, Kobayashi E, et al. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli [J]. Phytochemistry, 2002, 59: 315-323.
- 13 Yan XH, Guo YW. Two new ellagic acid glycosides from leaves of *Diplopanax stachyanthus* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2004, 6: 271-276.
- 14 Luo W, Zhao MM, Yang B, et al. Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities [J]. Food Chem, 2009, 114: 499-504.
- 15 Nakazawa T, Ohsawa K. Metabolites of orally administered *Perilla frutescens* extract in rats and humans [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23: 122-127.