

· 化学成分 ·

苍白秤钩风化学成分的研究

黄孝春¹, 郭跃伟¹, 王峰涛², 周文亮¹, 左建平¹

(1. 中国科学院上海生命科学院药物研究所 新药研究国家重点实验室, 上海 200031; 2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 200032)

摘要: 目的 为了进一步揭示中药苍白秤钩风 *Diploclisia glaucescens* 药理活性的物质基础, 研究并开发其活性成分, 对采自广西的苍白秤钩风藤茎的化学成分进行了系统研究。方法 经硅胶、反相硅胶和 Sephadex LH-20 反复柱层析分离纯化并通过波谱分析鉴定了 9 个化合物的结构。结果 9 个化合物分别被鉴定为: (2, 3) 反式-*N* 对羟基苯乙基阿魏酰胺 (I), 1, 5-二羟基-3-甲基-蒽醌 (II), 商陆酸-3-*O*-β-D-葡萄糖醛酸-28-*O*-β-D-葡萄糖苷 (III), 商陆酸-3-*O*-β-D-葡萄糖-28-*O*-β-D-葡萄糖苷 (IV), 商陆酸-3-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷 (V), 商陆酸-3-*O*-β-D-葡萄糖苷 (VI), 豆甾醇 (VII), 豆甾醇-3-*O*-β-D-葡萄糖苷 (VIII), 3-甲氧基-4-羟基-苯甲酸 (IX)。结论 化合物 I、II 为首次从本属植物中分离得到, 通过仔细解析 II 的二维相关谱 (¹H-¹H COSY, HMBC), 对化合物 II 的碳谱数据进行了重新归属。药理实验表明化合物 I 具有较好的免疫增强活性, 化合物 IV~VI 也具有一定的免疫增强活性。

关键词: 苍白秤钩风; 化学成分; 药理活性

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)02-0101-04

Studies on chemical constituents of *Diploclisia glaucescens*HUANG Xiao-chun¹, GUO Yue-wei¹, WANG Zheng-tao², ZHOU Wen-liang¹, ZUO Jian-ping¹

(1. State Key Laboratory of Drug Research, Institute of Materia Medica, Shanghai Institute for Life Science, CAS, Shanghai 200031, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

Abstract Object To carry out a systematic study on the chemical constituents in the stem of *Diploclisia glaucescens* (Bl.) Diels, which was got from Guangxi Province, aimed at finding new pharmacological active substances. **Methods** To obtain pure compounds by using repeated column chromatography (silica gel, RP-18 silica gel, Sephadex LH-20 etc.), while the structures of nine compounds were determined by detailed spectral analysis. **Results** The nine compounds were obtained and identified as (2, 3) *trans N*-(*p*-hydroxyphenethyl) ferulamides (I), 1, 5-dihydroxy-3-methyl-anthraquinone (II), 3-*O*-β-D-glucuronopyranosyl-28-*O*-β-D-glucopyranosylphytolaccagenic acid (III), 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-28-*O*-β-D-glucopyranosylphytolaccagenic acid (diploclisin, IV), 3-*O*-β-D-glucuronopyranosylphytolaccagenic acid (V), 3-*O*-β-D-glucopyranosylphytolaccagenic acid (VI), stigmastrol (VII), 3-*O*-β-D-glucopyranosylstigmastrol (VIII) and 3-methoxy-4-hydroxy-bezoic acid (IX). **Conclusion** Compound I, II were obtained from *Diploclisia* Miers for the first time. ¹³C NMR data of compound II were reassigned based on the new evidences found in ¹H-¹H COSY and HMBC experiments. Compound I could regulate immunologic activities by enhancing the production of T and B lymphocytes.

Key words *Diploclisia glaucescens* (Bl.) Diels; chemical constituents; pharmacological activities

苍白秤钩风 *Diploclisia glaucescens* (Bl.) Diels 国内有两种, 主要分布于我国南部和西南部地区^[1]。系防己科秤钩风属植物, 该属植物全世界共有 4 种, 文献记载该植物的藤茎及叶具有清热解毒、祛风除

收稿日期: 2002-05-05

基金项目: 国家杰出青年基金资助课题 (No. 30125044); 教育部、人事部、中国科学院及上海市人事局留学回国人员资金资助

作者简介: 郭跃伟 (1958-), 男, 山西太原人, 1988 年在中国药科大学获硕士学位, 1994-2000 年在意大利、日本留学 (博士、博士后), 2000 年入选中国科学院“百人计划”, 回国到中科院上海药物研究所工作 (研究员、博导)。2001 年度“国家杰出青年基金”获得者, 被国家人事部评为“优秀回国留学人员”。目前主持承担中国科学院重大项目、国家自然科学基金、国家杰出青年基金及国家海洋“863”基金多项课题。已在国内外著名学术刊物上发表论文 50 余篇。研究方向为海洋生物及药用植物中生物活性物质的化学研究。Tel (021) 64311833 E-mail ywgud@mail.sh.cn.ac.cn

湿的功效,民间常用于治疗风湿骨痛、尿路感染、毒蛇咬伤等症^[2]。国外学者曾对产自印度及巴基斯坦的苍白秤钩风的化学成分进行过研究,结果表明其藤茎含有多种化学成分如三萜、三萜皂苷、生物碱、蜕皮甾酮等^[3~8]。但产于我国的苍白秤钩风的化学成分及药理活性尚无相关文献报道。为了加深对该植物的研究以扩大药源并从中寻找和发现新药或新药先导化合物。我们对采自我国广西的苍白秤钩风藤茎的化学成分进行了深入研究。经硅胶、反相硅胶和 Sephadex LH-20反复柱层析分离纯化,并通过波谱分析,结合对照文献数据,鉴定了 9 个化合物的结构。本文报道化合物 I ~ IX 的提取分离、结构鉴定及生物活性研究。

1 实验部分

1.1 仪器和材料:核磁共振仪为 Bruker DRX 400 型,以 CDCl₃ 为溶液,以 TMS 为内标;质谱仪为 Finnigan-MAT-95 质谱仪。层析用硅胶为青岛海洋化工厂分厂生产;实验用药材采自广西,由广西中医药研究所赖茂祥教授鉴定。

1.2 提取和分离:取苍白秤钩风干燥藤茎 4.3 kg,用 95% 乙醇回流提取 3 次,合并提取液,减压浓缩,得浸膏 324 g。浸膏加水悬浮,依次用石油醚-氯仿-乙酸乙酯萃取,合并萃取液,减压浓缩,得石油醚部位 25.5 g,氯仿部位 I 4.7 g,乙酸乙酯部位 I 8.4 g。水不溶部分加入粗硅胶,拌匀晾干后置索氏提取器中,先用石油醚热回流,再用氯仿、乙酸乙酯分别

回流 3 次,合并回流液,减压浓缩得氯仿部位 II 11.2 g,乙酸乙酯部位 II 10.3 g。合并 I、II 得总氯仿部位 15.9 g,总乙酸乙酯部位 18.7 g。石油醚部位 25.5 g 上硅胶柱层析(200~300 目),以石油醚-乙酸乙酯(95:5, 90:10, 80:20, 60:40)洗脱, TLC 检查,相同组分合并得 A~E 5 个组份。组份 A (4.56 g)经反复硅胶柱层析,用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱得化合物 II (7.8 mg)。氯仿部位 (15.9 g)经硅胶柱层析(100~200 目),以石油醚-氯仿(6:4, 4:1, 3:1)→氯仿→氯仿-甲醇(99:1, 98:2, 95:5, 90:10)梯度洗脱,每个流份收集 500 mL。TLC 检查,合并相同组份得 A'~G' 7 个组份。组份 E'经反复硅胶柱层析,以石油醚-丙酮梯度洗脱得化合物 I (53.0 mg)。乙酸乙酯部位 (18.7 g)上硅胶柱层析(200~300 目),用石油醚-丙酮(9:1, 8:2, 7:3, 5:5)→甲醇梯度洗脱, TLC 检查,合并相同组份得 A''~N'' 14 个组份。组份 L''(1.70 g)上硅胶柱层析,用氯仿-甲醇-水系统梯度洗脱得化合物 V (8.4 mg)。组分 M''(0.98 g)上硅胶柱层析,反复用氯仿-甲醇洗脱得化合物 VI (9.8 mg)。组分 N''上硅胶柱层析,反复以氯仿-甲醇-水梯度洗脱得化合物 III (24.7 mg)、化合物 IV (13.2 mg)。另外在石油醚部位还得到化合物 VII (195.0 mg),在氯仿部位得到化合物 VIII (17.7 mg),在乙酸乙酯部位得到化合物 IX (23.0 mg)。化合物 I 和 II 的结构式见图 1。

1.3 结构鉴定

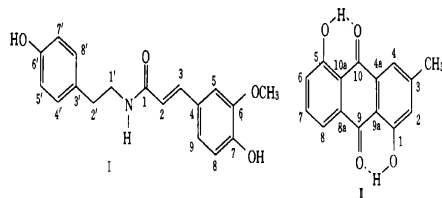


图 1 化合物 I 和 II 的化学结构式

Fig. 1 Structures of compounds I and II

化合物 I: 无色针晶,分子式为 C₁₈H₁₁O₄N; EI-MS (70 eV; inlet) *m/z*: 313 [M]⁺, 193, 177⁺。HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.58 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2'), 3.30 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 3.71 (3H, s, OMe), 6.24 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-5), 6.54 (1H, dd, *J* = 6.4, 2.1 Hz, H-5'), 6.63 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-8), 6.85 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, H-9), 6.89 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-4'), 6.94 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-2), 7.27 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-3)。¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃): δ 169.5 (C-1), 119.1 (C-2), 142.3

(C-3), 128.6 (C-4), 111.9 (C-5), 149.9 (C-6), 150.1 (C-7), 116.8 (C-8), 123.5 (C-9), 56.6 (C-6, OMe), 42.8 (C-1'), 36.3 (C-2'), 131.6 (C-3'), 130.0 (C-4'), 116.6 (C-5'), 157.2 (C-6')。以上数据与文献值一致^[9]。另外, NOESY 谱显示 H-3 与 H-5, H-5 与 6-OMe 的相关峰,从而确证了化合物 I 为 *trans-N*-(4-hydroxy-phenethyl) ferulamides。

化合物 II: 橙红色晶体,分子式为 C₁₅H₁₀O₄; EI-MS *m/z*: 254 [M]⁺, 226 [M - CO]⁺, 198 [M - 2CO]⁺。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.47 (3H, s,

3-Me), 7.09 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-2), 7.29 (1H, dd, $J = 7.5, 1.0$ Hz, H-6), 7.63 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-4), 7.67 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.82 (1H, dd, $J = 7.5, 1.0$ Hz, H-8), 12.00 (1H, s, OH-1), 12.11 (1H, s, OH-5); ^{13}C NMR (100 M Hz, CDCl_3): 见表 1

表 1 化合物II的 ^{13}C NMR化学位移重新归属及与文献报道数据的对照^[13]

Table 1 Reassignment of ^{13}C NMR chemical shift of II and comparison with reported data in literature^[13]

碳位	δ^a	δ^b	碳位	δ^a	δ^b
1	162.8	162.8	7	137.0	116.8
2	124.4	119.9	8	119.9	136.9
3	149.3	133.4	8a	133.7	116.0
4	121.3	121.4	9	192.6	181.9
4a	133.3	149.3	9a	113.8	113.8
5	162.5	162.5	10	182.0	192.8
6	124.6	124.4	10a	115.3	133.8
3-CH ₃	22.3	22.2			

^a实验值 (CDCl_3 , 100 M Hz) ^b文献值 (CDCl_3 , 75 M Hz)

^a Test data (CDCl_3 , 100 M Hz) ^b Reported data in literature (CDCl_3 , 75 M Hz)

化合物II作为天然产物,由 Sedat等^[10]首次从 *Digitalis schischkinii* 中分离得到并于 1974年报道了其化学结构。另外, Sedat等^[11]还从 *D. orientalis* 中, Lu等^[12]从 *Salvia przewalskii* 中也发现过II的存在。Medhdi等^[13]还从 *Cassia italica* 中分离得到II,并首次报道了其碳谱数据,但对于分子内各碳原子的归属方法未做详细报道。我们在对苍白秤钩风化学成分的研究中也得到了II,测定了其氢谱、碳谱,并首次测定了其 ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC等二维图谱。 ^1H - ^1H COSY谱显示 H-6与 H-7、H-8相关峰,说明分子内存在 CH(6)-CH(7)-CH(8)分子片段,还存在 H-2与 H-4的相关峰,说明分子内存在 CH(2)-C(3)-CH(4)分子片段。HMBC谱中出现 H-8 $\rightarrow$ C-9, C-10a, H-4 $\rightarrow$ C-10, C-9a, H-3(Me) $\rightarrow$ C-2, C-4, H-6 $\rightarrow$ C-10a, H-2 $\rightarrow$ C-9a, H-5(OH) $\rightarrow$ C-6, H-1(OH) $\rightarrow$ C-2等 β 碳氢远程相关峰,以及 H-8 $\rightarrow$ C-8a, H-6 $\rightarrow$ C-5, H-4 $\rightarrow$ C-3, H-2 $\rightarrow$ C-1等 β 相关峰。

说明II的各个分子片段的连接顺序应如图2所示。以上数据与文献值报道的 1, 5-dihydroxy-3-methyl-anthraquinone 的碳谱化学位移数据相差无几^[10],但对各碳原子的归属却相去甚远(表1)。鉴

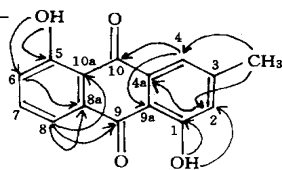


图 2 化合物II的主要 HMBC相关
Fig. 2 Key HMBC correlations of compound II (H $\rightarrow$ C)

于以上二维图谱及数据的支持,我们认为归属是正确的。故在此对文献报道的化合物II的碳原子归属予以更正。

化合物III: 无色针状结晶, ^1H NMR (400 M Hz, CD_3OD) δ 0.55, 0.63, 0.82, 1.00, 1.08 (each 3H, s, 5 $\times$ Me), 2.54 (1H, m, H-18), 3.46, 3.65 (each, 1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-23), 3.54 (3H, s, C-30Me), 4.30 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 5.16 (1H, m, H-12), 5.19 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1''), ^{13}C NMR (100 M Hz, CD_3OD) δ 10.1 (C-1), 26.8 (C-2), 82.8 (C-3), 43.4 (C-4), 48.9 (C-5), 19.4 (C-6), 31.8 (C-7), 41.1 (C-8), 49.5 (C-9), 38.2 (C-10), 24.6 (C-11), 24.8 (C-12), 145.0 (C-13), 44.4 (C-14), 29.4 (C-15), 25.1 (C-16), 47.9 (C-17), 44.4 (C-18), 43.4 (C-19), 45.5 (C-20), 31.8 (C-21), 34.9 (C-22), 65.3 (C-23), 14.0 (C-24), 17.1 (C-25), 18.2 (C-26), 26.8 (C-27), 178.1 (C-28), 29.4 (C-29), 179.3 (C-30), 52.9 (30-OMe), 105.1 (C-1'), 74.4 (C-2'), 78.7 (C-3'), 75.5 (C-4'), 78.2 (C-5'), 葡萄糖醛酸配基 6'位羧基未出信号, 96.2 (C-1''), 74.1 (C-2''), 74.4 (C-3''), 71.5 (C-4''), 79.2 (C-5''), 62.8 (C-6''); 以上数据与文献值一致^[5],故确定化合物III为 3-O β -D-glucopyranosyl-28-O β -D-glucopyranosyl-1 phytoalexagenic acid

化合物IV~VI的结构经对照文献报道^[5-7]的 ^1H NMR和 ^{13}C NMR值得到确定; VII~IX经与标准品的氢谱及 TLC对照分别确定为豆甾醇(VII)、豆甾醇-3-O β -D-葡萄糖苷(VIII)、3-甲氧基-4-羟基-苯甲酸(IX)。

2 药理活性

苍白秤钩风 *D. glaucescens* 的藤茎及叶民间常用于治疗风湿骨痛、尿路感染、毒蛇咬伤等症^[1]。为了揭示其临床疗效的化学物质基础,我们对部分化合物进行了免疫活性筛选。对小鼠 T 淋巴细胞增殖反应中影响作用的实验结果表明: 化合物I对 T 和 B 淋巴细胞的增殖反应有很强的促进作用; 化合物IV~VI对 T 和 B 淋巴细胞的增殖反应有明显的促进作用。以上化合物对 T 和 B 淋巴细胞增殖反应的促进作用,提示了它们有增强机体免疫反应的功能,这对原药材苍白秤钩风在临床上治疗感染性和风湿性疾病的疗效及作用机制的理解有一定的帮助,目前正在做进一步的药理活性的筛选和研究。

致谢: 核磁共振由本所核磁室及中国科学院上海有机化学研究所分析室测定。

References

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publisher, 1995.
- [2] Lian W Y. Investigation of Chinese medicinal plants of Menispermaceae [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1975, 13(1): 32-52.
- [3] Miller R W, Clardy J, Kozlowski J, *et al*. Phytoecdysteroids of *Diploclisia glauæscens* [J]. *Planta Med*, 1985(1): 40-42.
- [4] Virbala C S, Adolf S D, Noel J S. Chonemorphine, stigmasterol and ecdysterone steroids isolated through bioassay-directed plant screening programs [J]. *Steroids*, 1989, 53(3-5): 559-565.
- [5] Jayasinghe U L B, Wannigama G P, Macleod J K. Glucuronides of *Diploclisia glauæscens* [J]. *J Chem Soc Pakistan*, 1998, 20(2): 131-137.
- [6] Bandara B M R, Jayasinghe L, Karunaratne V, *et al*. Diploclisin, a bidesmosidic triterpenoid saponin from *Diploclisia glauæscens* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(10): 2783-2785.
- [7] Bandara B M R, Jayasinghe U L B, Karunaratne V, *et al*. Triterpenoidal constituents of *Diploclisia glauæscens* [J]. *Planta Med*, 1990, 56 290-292.
- [8] Bandara B M R, Jayasinghe L, Karunaratne V, *et al*. Ecdysterone from stem of *Diploclisia glauæscens* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(4): 1073-1075.
- [9] Munoz O, Hovano M, Garbarino J, *et al*. Tropane alkaloids from *Schizanthus litoralis* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 43(3): 709-713.
- [10] Imre S, Öztunc A, Üktimkin N B. Ziganein and ziganein-1-methyl ether: Zwei neue anthrachinone aus *Digitalis schischkinii* [J]. *Phytochemistry*, 1974, 13 681-682.
- [11] Imre S, Üktimkin N B. Zwei neue anthrachinone aus den weuzeln von *Digitalis orientalis* [J]. *Phytochemistry*, 1975, 14(11): 2310-2311.
- [12] Lu X Z, Hao W, Naoki H. Anthraquinones from *Salvia przewalskii* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(2): 708-709.
- [13] Kazmi M H, Malik A, Hameed S, *et al*. Ananthraquinone derivative from *Casia litalica* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(3): 761-763.

Three coumarins from seed of *Cnidium monnieri* and their multidrug resistance reversal effects

ZHANG Qing-lin, ZHAO Jing-hua, BI Jian-jin, CAO Ju-rong, SONG Jing, WU Zu-ze
(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract **Object** To isolate the active compounds on reversing multidrug resistance (MDR) of tumor cell from the ethanol extract in the seeds of *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. **Methods** The fractionation directed by bioactivity was carried out with silica gel chromatography and RP-HPLC. **Results** Three active coumarins were obtained: imperatorin (I), edultin (II) and 3'-isobutyryloxy-O-acetyl columbionetin (III). Their structures were identified by spectroscopic analysis. **Conclusion** These three compounds have a medium reversing MDR of KBV200 *in vitro*.

Key words *Cnidium monnieri* (L.) Cuss.; coumarin; multidrug resistance (MDR); KBV 200

蛇床子中 3种逆转肿瘤细胞多药耐药活性香豆素

张庆林, 赵精华, 毕建进, 曹菊荣, 宋京, 吴祖泽
(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 从蛇床子 *Cnidium monnieri* 中分离逆转肿瘤细胞多药耐药活性成分。方法 用生物活性跟踪法, 经硅胶柱层析、RP-HPLC等。结果 分离得到 3种活性成分, 分别为欧芹属素乙 (imperatorin)、爱得尔庭 (edultin)、9-异丁酰氧基-O-乙酰基哥伦比亚苷元 (3'-isobutyryloxy-O-acetyl columbionetin)。结论 体外实验表明 3种化合物对耐药的肿瘤细胞 KBV 200具有明显的逆转作用。

关键词: 蛇床子; 香豆素; 多药耐药; KBV 200

中图分类号: R283.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)02-0104-03

1 Introduction

One of the major problem of cancer chemo-

therapy is intrinsic or acquired multidrug resistance (MDR). Many kinds of compounds, such as calci-