

瓜蒌的抗血小板聚集活性成分研究

刘岱琳¹, 曲戈霞¹, 王乃利¹, 姚新生¹, 北中进^{2*}

(1 沈阳药科大学中药学院 植化教研室, 辽宁 沈阳 110016; 2 日本大学 生药学研究室)

摘 要: 目的研究瓜蒌的抗血小板聚集活性成分。方法 利用抗血小板聚集的活性追踪方法, 采用 Sephadex LH-20 柱色谱、反复硅胶柱色谱分离, 通过 IR、¹H-NMR、¹³C-NMR、MS 等波谱分析手段研究化学结构。结果 分离得到 7 个化合物, 分别鉴定为棕榈酸(I), 5, 5'-双氧甲基呋喃醛(II), N-苯基苯二甲酰亚胺(III), 4-羟基-2-甲氧基苯甲酸(IV), 4-羟基-烟酸(V), 香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷(VI), 腺苷(VII)。结论化合物 IV、VI、VII 均具有很强的抗血小板聚集作用, 化合物 III 为首次从植物中分离得到的天然产物, 化合物 V~VII 为首次从该属植物中分离获得, 化合物 II、IV 为首次从该种植物中分离得到。

关键词: 瓜蒌; 血小板聚集; 活性成分

中图分类号: R 284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)12-1334-03

Antiplatelet aggregation constituents from *Trichosanthes kirilowii*

LIU Dai-lin¹, QU Ge-xia¹, WANG Nai-li¹, YAO Xin-sheng¹, KITANAKA Susumu²

(1 Department of Phytochemistry, College of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2 College of Pharmacy, Nihon University, 7-7 Narashinodai, Funabashi, Chiba 274-8555, Japan)

Key words: *Trichosanthes kirilowii* Maxim.; platelet aggregation; bioactive constituents

瓜蒌为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥成熟果实, 始载于《神农本草经》, 列为中品。《中药志》述及, 瓜蒌味甘、苦、性寒, 有宽胸散结, 清化热痰, 润肺滑肠, 通乳消肿之功效, 用于热痰咳嗽, 心胸闷痛^[1]。现代药理学研究表明全瓜蒌能增加冠脉血流量, 增加心肌收缩力, 对垂体后叶素引起的大白鼠急性心肌缺血有明显的保护作用, 能够降低血脂, 对心绞痛、冠心病有很好的疗效。目前已经从瓜蒌中分离出类脂, 酯碱, 甾体和三萜类成分^[2]。

为进一步搞清瓜蒌中的活性成分, 笔者利用体外抗血小板聚集的活性测试体系为指标, 对瓜蒌的活性成分进行追踪分离。从活性部位中分离得到 7 个化合物, 并根据其化学性质与光谱数据进行了鉴定, 分别为棕榈酸(I), 5, 5'-双氧甲基呋喃醛(II), N-苯基苯二甲酰亚胺(III), 4-羟基-2-甲氧基苯甲酸(IV), 4-羟基-烟酸(V), 香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷(VI), 腺苷(VII)。化合物 IV、VI、VII 均具有很强的抗血小板聚集作用, 化合物 III 为首次从植物中分离得到的天然产物, 化合物 V~VII 为首次从该属植物中分离获得, 化合物 II、IV 为首次从该种植物中分离得到。

1 仪器与材料

熔点用 Yanaco 熔点测定仪测定(未校正); 红外用 Bruker IFS-55 型红外光谱仪测定(KBr); EI-MS 用 JEOL JM-DX302 型质谱仪测定, NMR 用 JEOL JNM-GX400 型核磁共振波谱仪测定。血小板聚集的活性测试使用上海通用机电技术研究所的 TYXN-91 型智能血液凝集仪测定。瓜蒌购自山东省肥城药材公司, 经沈阳药科大学生药教研室江泽荣教授鉴定为 *T. kirilowii* Maxim.。层析用硅胶为青岛海洋化工厂的产品, Sephadex LH-20 为瑞士 Pharmacia Fine Chemicals 的产品。试验用 ADP 购自 Sigma 公司。

2 提取分离

将药材粉碎, 用 60% 乙醇回流提取 2 次, 减压回收乙醇得浸膏, 将浸膏用水分散, 正丁醇萃取, 经 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 70% 甲醇洗脱部分再经硅胶柱层析, 氯仿-甲醇(100:1)洗脱得到化合物 I, 氯仿-甲醇(10:1, 5:1)洗脱得到化合物 II~VII。

3 结构鉴定

化合物 I: 白色粉末, mp 59~60 °C, 溴甲酚绿显黄色。I 和棕榈酸标准品的混合熔点不下降, 薄层 R_f 值, EI-MS, IR 以及 ¹³C-NMR、¹H-NMR 均与棕榈

* 收稿日期: 2004-05-12

作者简介: 刘岱琳(1973), 女, 山东省泰安人, 天津武警医学院生药学教研室讲师, 现为沈阳药科大学天然药物化学专业博士研究生, 主要从事天然产物的活性成分研究。 Tel: (022)60578194 E-mail: dailinlch@163.com

酸相一致^[3,4]。

化合物Ⅰ:白色针状结晶(甲醇),mp 115~116℃。IR、EI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR数据与文献所报道的5,5'-双氧甲基呋喃醛相一致^[5,6]。

化合物Ⅱ:白色片状结晶(氯仿-甲醇),mp 208~209℃。改良碘化铋钾试剂反应阳性,示可能为含氮化合物。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1 710, 1 599, 1 498, 1 382, 1 112。EI-MS 中 m/z : 223[M⁺], 179[M-CO₂]。HR-EI-MS 给出分子式 C₁₄H₉NO₂。根据¹³C-NMR (100 MHz, in C₅D₅N) 和 DEPT 推断 123.7、127.4、129.3、134.6、167.5 的碳信号均为两个化学环境十分相似的碳信号重迭而成,示该化合物中含有高度对称的结构。¹H-NMR (400 MHz, in C₅D₅N): 7.93 (2H, dd, $J=5.5, 2.9$ Hz), 的氢信号与 7.68 (2H, dd, $J=5.5, 2.9$ Hz), 氢信号相磁, 示为一个邻二取代苯环上的四个氢信号; 7.4 (2H, d, $J=8.5$ Hz), 7.51 (2H, dd, $J=7.6, 8.5$ Hz), 和 7.31 (1H, t, $J=7.6$ Hz), 这三组氢信号为另一个单取代苯环上的五个氢信号。在 HMBC 谱中可以观察到 7.93 (2H, dd, $J=5.5, 2.9$ Hz) 的氢信号与 167.5 的羰基碳信号相关。综合上述数据,并与文献相对照,确定化合物Ⅱ为 *N*-苯基苯二甲酰亚胺^[7]。该化合物为首次从植物中分离得到的天然产物。

化合物Ⅲ:白色针状结晶(甲醇),mp 206~207℃。和4-羟基-2-甲氧基苯甲酸标准品的混合熔点不下降,薄层 R_f 值, EI-MS, IR 以及¹³C-NMR、¹H-NMR 均为4-羟基-2-甲氧基苯甲酸相一致。

化合物Ⅳ:白色粉末,mp 228~229℃。IR、EI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR数据与文献报道的4-羟基烟酸相符合^[8,9]。

化合物Ⅴ:黄色针状结晶(甲醇),mp 260~262℃。盐酸镁粉反应阳性,示可能为黄酮类化合物。IR、EI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR光谱数据与文献报道的香叶木素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷相一致^[10]。

化合物Ⅵ:白色粉末,mp 231~233℃。茚三酮反应阳性,示为含氮化合物。该化合物和腺苷标准品的混合熔点不下降,且薄层 R_f 值,以及¹³C-NMR、¹H-NMR 均与腺苷相一致^[11]。

4 抗 ADP 诱导人血小板聚集的活性测试

根据 Born 比浊法^[11],采集健康人体血液,制成抗凝血浆(血:3.8%柠檬酸钠=9:1)。经1 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液为富血小板血浆 (PRP),剩余部分再经4 000 r/min 离心 10 min,取

上清液为贫血小板血浆 (PPP)。计数 PRP 中的血小板数,用 PPP 将 PRP 中血小板调至 2.0×10^3 /L。分别取 PRP、PPP 各 200 μL 置 Φ=6 mm 比色杯中,37℃恒温槽中预热 5 min 后,将 PPP 杯置于比色槽中,调节仪器透光率为 100%,再将 PRP 杯置于比色槽中,调节透光率为 0,加入样品(化合物用 20% 甲醇配成 2 mg/mL 的供试品溶液)20 μL 作用 1 min,再加入 10 μL ADP 诱导,记录聚集曲线。并以 20% 甲醇溶液为空白对照,阿司匹林溶液 (2 mg/mL) 为阳性对照。

聚集抑制率%=(空白透光率-样品透光率)/空白透光率×100%

表 1 化合物体外抗 ADP 诱导血小板聚集试验结果

Table 1 Result of antiplatelet aggregation induced by ADP *in vitro* by compounds

样 品	终浓度/ (mmol · L ⁻¹)	聚集抑制率/ %($n=6$)	IC ₅₀ / (mmol · L ⁻¹)
I	1.03	6.22±3.35	
Ⅰ	0.38	6.34±3.28	
Ⅱ	1.25	1.36±4.68	
Ⅳ	0.65	14.62±8.79	
V	0.68	1.97±5.21	
Ⅵ	0.74	28.52±7.08	
Ⅶ	0.78	66.25±7.38	0.269
aspirin	1.09	15.82±7.43	
20% MeOH		—	

5 结论

本实验利用体外抗血小板聚集的活性测试体系对于分离得到的化合物进行测定,结果表明化合物Ⅳ的活性与同剂量阿司匹林的活性相当,化合物Ⅵ的活性是同剂量阿司匹林活性的 2 倍,化合物Ⅶ的活性最强,IC₅₀ 为 0.269 mmol/L。化合物Ⅶ即腺苷在 1989 年就被美国 FDA 批准为治疗心律不齐的药物,因此腺苷一定是瓜蒌中抗血小板聚集的活性成分之一,此外含氮化合物和黄酮类化合物也可能是其活性成分之一。

本实验只是利用体外的测试体系对瓜蒌的抗血小板聚集活性成分进行了研究。但是对于瓜蒌能够治疗心血管系统疾病的物质基础仍有待于从多方面深入研究。

References:

- [1] Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. *Record of Chinese Materia Medica* (中药志) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1980.
- [2] Cao Z M. Advances in studies on *Trichosanthes* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1990, 15(12): 49-51.
- [3] *Standard Infrared Grating Spectra 8007 K* [S]. Vol 21. 1984.
- [4] *Standard ¹H-NMR Spectra 14716 M* [S]. Vol 1. 1983.
- [5] Kong L Y, Shao C J. Chemical constituents of the root of

- Acanthopanax esiliflorus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1988, 11(11): 2-5.
- [6] Amano T, Mizukami S. Studied on the determination methods with polyaldehydes I. Colorimetric determination of tryptophan with 3, 5'-methylenedi-(2-furaldehyde) [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1965, 85(11): 981-985.
- [7] *Standard ¹H-NMR Spectra 12777 M* [S]. Vol II. 1983.
- [8] *Standard ¹H-NMR Spectra 569 M* [S]. Vol II. 1983.
- [9] Gong Y Z. *Application of MS in Natural Organic Chemistry* (质谱在天然有机化学中的应用) [M]. Beijing: Science Press. 1985.
- [10] Wang Y Q, Lü L, Jiang Y, et al. Chemical constituents of woolly lespedeza (*Lepedeza tomentosa*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(2): 63-65.
- [11] Peng J P. Chemical constituents in *Allium macrostemon* Bunge and *Allium chinense* G. Don and their inhibitory effects on human platelet aggregation [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Shenyang College of Pharmacy* (沈阳药学院博士学位论文) [D]. Shenyang: Shenyang College of Pharmacy, 1993.

臭常山喹啉生物碱成分

冯 煦, 董云发, 王 鸣, 赵友谊*

(江苏省中国科学院植物研究所, 南京中山植物园 江苏省药用植物研究中心, 江苏 南京 210014)

臭常山 *Orixa japonica* Thunb. 为芸香科常绿灌木, 中国民间用于治咳嗽和止痛; 另外可作农药, 水煮液能杀灭牲畜虱子。有关臭常山生物碱成分的研究, 到目前为止, 已经从臭常山中分离得到 10 多种喹啉类生物碱: 由茎中分离出前和常山碱 (pre-orixine)^[1]、和常山碱 (orixine)^[2,3]、O-甲基巴妥木季胺盐 (O-methylbalfourodinium salt) 和和常山酮碱 (orixinone)^[4]; 由根皮中分离出和常山碱^[3]、去甲和常山碱 (nororixine)^[5]、吴茱萸春碱 (evolitorine)^[6]、香草木碱 (kokusagine)^[2] 和茵芋碱 (skimmianine)^[5]; 由叶中分离得到 evoxine^[6] 和臭山羊碱 (japonine)^[7]; 由果实中分离出香草木碱和茵荏碱^[8]。本实验报道由臭常山的茎和根中分离出 4 种喹啉生物碱: 月芸香酮碱 (lunidonine, I), 异阔果芸香碱 (isoplatydesmine, II), 前茵芋碱 (preskimmianine, III) 和加锡果宁 (edulinine, IV), 这 4 种喹啉生物碱是首次从该植物中分离得到。

1 仪器和材料

熔点 PEICHERT WIEN 显微熔点测定仪, Kofler 温度计未校正; IR-435 型红外光谱仪; 岛津 UV-210A 紫外光谱仪; JEOL D-300 型质谱仪; ACF-300 型核磁共振仪; 层析氧化铝, 上海五四化学试剂厂生产; 臭常山根和茎采自四川峨嵋山, 经江苏省中国科学院植物研究所岳俊三先生鉴定。

2 提取和分离

臭常山根和茎干粉 5 kg, 氯仿回流提取 3 次, 提取液减压浓缩得氯仿提取物 (350 g); 残渣再用甲

醇浸提 3 次, 合并提取液, 减压浓缩至膏状, 得甲醇浸膏 (520 g)。氯仿提取物用氧化铝色谱柱分离, 以氯仿-甲醇梯度洗脱, 得到化合物 I ~ III; 甲醇浸膏用 2% 硫酸溶液溶解, 滤过, 酸液用浓氨水调至 pH 11, 然后用乙醚萃取, 萃取液加无水碳酸钠干燥后, 滤过, 回收乙醚, 得到粗结晶, 再用无水乙醇重结晶, 得化合物 IV。

3 结构鉴定

化合物 I: 无色针状结晶, mp 112~114 °C, 质谱及元素分析确定分子式为 C₁₇H₁₉NO₅, EI-MS *m/z*: 318 (M + 1), 274 (M - CHMe₂), 246 (M - COCHMe₂, 基峰), 232 (M + 1 - COCHMe₂ - CH₃); 元素分析值: C 65.32%, H 6.33%, N 4.23%; 计算值: C 64.34%, H 6.04%, N 4.41%; UV λ_{max}^{EtOH} nm: 227 (4.41), 235 sh (4.39), 260 (4.32), 266 (4.35), 310 (3.95)。IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1 700, 1 644, 1 590 (2-喹啉酮), 1 600 (芳环), 1 360, 1 350, 1 064; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) 见表 1, ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 见表 2, 由以上数据鉴定化合物 I 为月芸香酮碱^[9,10]。

化合物 II: 无色细晶, mp 204~206 °C, UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε): 215 (4.43), 235 (4.40), 250 sh (4.15), 298 inf (3.95), 307 (4.05), 318 (4.00); IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3 400, 2 950, 1 620, 1 575, 1 540, 1 520 sh, 1 514, 1 500 sh; MS *m/z*: 259 (M⁺), 244 (M - Me), 242 (M - OH), 226 (M - Me, H₂O), 216 (M - Me, CO), 202 (M - CO, NMe), 200 (M - C₃H₇O),

* 收稿日期: 2004-03-20

作者简介: 冯 煦 (1962-), 江苏人, 研究员, 主要从事天然药物化学和植物资源学方面的研究工作, 先后主持与承担国家及省部级科研项目 10 余项。 Tel: (025) 84347084 Fax: (025) 84432074 E-mail: fengxu@mail.chbg