

通经草的化学成分研究

赵迎春¹, 于 鹏², 赵云丽³, 栗 晖³, 于治国^{3*}

(1. 大连市药品检验所, 辽宁 大连 116021; 2 天津药物研究院, 天津 300193;

3 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:目的 研究通经草 *Aleuritopteris argentea* 的化学成分。方法 采用硅胶和 Sephadex LH-20 柱色谱等方法进行分离纯化, 通过理化性质和光谱数据确定化合物的结构。结果 分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为 β -谷甾醇(iv)、鼠李柠檬素(Ⅶ)、对映-3-羟基-8(17), 13E-半日花二烯-15-羧酸(Ⅳ)、鼠尾草素(Ⅴ)、3, 5, 4'-三羟基-7, 8-二甲氧基黄酮(Ⅸ)、槲皮素(v)、滨藜黄素(x)、槲皮素-3-O- β -D-吡喃半乳糖苷(Ⅺ)。结论 化合物 iv、Ⅶ、Ⅸ、v 和 Ⅺ均为首次从该植物中分离得到。

关键词:通经草; 鼠李柠檬素; 鼠尾草素; 滨藜黄素

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)07-1043-03

通经草为中国蕨科植物银粉背蕨 *Aleuritopteris argentea* (Gm l) F e 的全株, 广泛分布于我国各个省份。其性平, 味淡, 苦, 具有活血调经, 止咳, 利湿, 解毒消肿等功效, 在民间常用于月经不调、肺结核咯血等症的治疗^[1], 临床应用历史悠久, 疗效可靠。为了阐明通经草的药效物质基础, 进一步研究开发新药资源, 本实验对其化学成分进行了系统研究, 采用硅胶和 Sephadex LH-20 等色谱方法从中分离得到 8 个化合物, 结合理化性质、色谱数据及化学反应等确定各化合物的结构, 分别为 β -谷甾醇(iv)、鼠李柠檬素(Ⅶ)、对映-3-羟基-8(17), 13E-半日花二烯-15-羧酸(Ⅳ)、鼠尾草素(Ⅴ)、3, 5, 4'-三羟基-7, 8-二甲氧基黄酮(Ⅸ)、槲皮素(v)、滨藜黄素(x)、槲皮素-3-O- β -D-吡喃半乳糖苷(Ⅺ)。其中化合物 iv、Ⅶ、Ⅸ、v 和 Ⅺ为首次从该植物中分离得到。

1 材料与仪器

通经草购自河北省安国药材市场, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为中国蕨科植物银粉背蕨 *A. argentea* (Gm l) F e 的全株。

Fluke 51 ⑦型显微熔点测定仪; Hitachi 200—20 型紫外分光光度计; Bruker ARX—300 型核磁共振仪(TMS 为内标, DMSO-*d*₆ 为溶剂); Shimadzu LG-MS 2010 EV 型质谱仪; 柱色谱用硅胶(100~140 目, 200~300 目)及薄层色谱用硅胶 G 均为青岛海洋化工厂产品; Sephadex LH-20(Pharmacia)。所用化学试剂均为国产分析纯。

2 提取与分离

取通经草干品(4 kg), 切段, 加入 10 倍量的

75% 乙醇回流 2 h, 提取 2 次, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩。浸膏加水分散后依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯和正丁醇萃取。取氯仿萃取液, 减压回收溶剂得粗提物约 90 g, 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯系统梯度洗脱。石油醚-醋酸乙酯(10:1)部分得到化合物 iv。石油醚-醋酸乙酯(5:1)洗脱, 合并相同流份, 得到 1~3 号合并液。1、3 号经过甲醇重结晶分别得到化合物 Ⅶ和 Ⅳ2 号再经硅胶柱色谱分离, 用氯仿-甲醇洗脱, 分别将(25:1)和(10:1)部分的洗脱液经过 Sephadex LH-20 纯化得到化合物 Ⅴ和 Ⅸ。石油醚-醋酸乙酯(4:1)部分的洗脱液采用甲醇重结晶得到化合物 v, 然后将其母液经硅胶柱色谱分离, 收集氯仿-甲醇(10:1)洗脱得到的流份反复通过 Sephadex LH-20 纯化, 最终得到化合物 x。醋酸乙酯部分得到化合物 Ⅺ。

3 结构鉴定

化合物 iv: 白色针晶, mp 140~142 °C, 与 β -谷甾醇对照品混合测定熔点温度不下降。Lieberman-Burchard 反应阳性, 与 β -谷甾醇对照品多系统共薄层色谱展开 R_f 值相同。

化合物 Ⅶ 鲜黄色针晶(甲醇), mp 222~223 °C。盐酸-镁粉反应阳性; FeCl₃ 反应阳性。UV λ_{max}^{MeOH} nm: 256, 365; ¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.47(1H, s, OH-5), 10.12(1H, s, OH-4'), 9.54(1H, s, OH-3), 8.08(2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-2', 6'), 6.93(2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3', 5'), 6.74(1H, d, *J* =

* 收稿日期: 2009-01-30

作者简介: 赵迎春(1981—), 女, 内蒙古通辽人, 硕士研究生, 药师, 主要从事药品检验及质量控制方法的研究。

Tel: (0411) 84255303 E-mail: feihu@mail.tom.com

* 通讯作者 于治国 Tel: (024) 23986295 E-mail: yuzhiguo@hotmail.com

2.1 Hz, H-8), 6.34 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 3.85 (1H, s, OCH₃-7); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 176.1 (G-4), 165.0 (G-7), 160.5 (G-9), 159.4 (G-5), 156.2 (G-4'), 147.3 (G-2), 136.1 (G-3), 129.7 (G-2', 6'), 121.7 (G-1'), 115.5 (G-3', 5'), 104.1 (G-10), 97.6 (G-6), 92.1 (G-8), 56.1 (OCH₃-7)。以上数据与相关文献报道^[2]一致, 从而鉴定该化合物为山柰素-7-甲醚, 即鼠李柠檬素。

化合物 ㉔ 无色柱状结晶 (甲醇), mp 164~166 °C。难溶于石油醚, 易溶于氯仿、甲醇。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 215; APCI-MS m/z : 319 [M-H]⁻, 639 [2M-H]⁻; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.63 (3H, s, CH₃-10), 0.67, 0.97 (各 3H, s, 2CH₃-4), 2.07 (3H, s, CH₃-13), 3.03 (1H, m, H-3), 4.35 (1H, dd, OH-3), 4.50, 4.84 (各 1H, s, 2H-17), 5.54 (1H, s, H-14), 11.86 (1H, s, COOH-15); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 171.2 (G-15), 163.9 (G-13), 147.6 (G-8), 114.7 (G-14), 106.9 (G-17), 78.8 (G-3), 55.8 (G-9), 54.5 (G-5), 39.9 (G-12), 39.4 (G-4), 39.1 (G-10), 38.1 (G-7), 37.0 (G-1), 28.3 (G-18), 27.9 (G-2), 24.0 (G-6), 21.6 (G-11), 19.2 (G-16), 15.4 (G-19), 14.5 (G-20)。根据以上数据并参照文献报道^[3], 鉴定该化合物为对映-3-羟基-8(17), 13-*E*-半日花二烯-15-羧酸。

化合物 ㉕ 无色针晶 (甲醇), mp 188~189 °C。不溶于石油醚, 易溶于氯仿, 微溶于甲醇。EIMS m/z : 328 [M]⁺, 313 [M-CH₃]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.90 (1H, s, OH-5), 8.01 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', 6'), 7.14 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', 5'), 6.99 (1H, s, H-8), 6.97 (1H, s, H-3), 3.93 (3H, s, OCH₃-7), 3.87 (3H, s, OCH₃-6), 3.74 (3H, s, OCH₃-4'); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 182.4 (G-4), 163.7 (G-2), 162.5 (G-4'), 158.8 (G-7), 152.8 (G-5), 152.1 (G-9), 132.0 (G-6), 128.5 (G-2', 6'), 122.8 (G-1'), 114.7 (G-3', 5'), 105.2 (G-10), 103.5 (G-3), 91.8 (G-8), 60.1 (OCH₃-6), 56.6 (OCH₃-7), 55.7 (OCH₃-4')。以上数据与相关文献报道^[4]一致, 从而鉴定该化合物为鼠尾草素。

化合物 ㉖ 淡黄色簇晶 (甲醇), mp 244~246 °C。盐酸-镁粉反应阳性; FeCl₃ 反应阳性。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 224, 272, 329, 380; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.31 (1H, s, OH-5), 10.18 (1H, s, OH-4'), 9.55 (1H, s, OH-3), 8.08 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.96 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5'),

6.59 (1H, s, H-6), 3.92 (3H, s, OCH₃-7), 3.82 (3H, s, OCH₃-8); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 176.4 (G-4), 159.5 (G-4'), 157.9 (G-7), 156.0 (G-5), 147.8 (G-9), 147.3 (G-2), 135.8 (G-3), 129.6 (G-2', 6'), 128.4 (G-8), 121.8 (G-1'), 115.7 (G-3', 5'), 103.5 (G-10), 95.4 (G-6), 61.1 (OCH₃-8), 56.6 (OCH₃-7)。根据以上数据并参照文献报道^[5,6], 推断该化合物为 3, 5, 4'-三羟基-7, 8-二甲氧基黄酮。

化合物 v: 黄色粉末 (甲醇), mp > 300 °C。盐酸-镁粉反应阳性。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 256, 372; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.50 (1H, s, OH-5), 10.80 (1H, s, OH-7), 9.62 (1H, s, OH), 9.39 (1H, s, OH), 9.33 (1H, s, OH), 7.68 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6'), 6.84 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175.9 (G-4), 164.0 (G-7), 160.8 (G-9), 156.2 (G-5), 147.8 (G-4'), 146.9 (G-2), 145.2 (G-3'), 135.8 (G-3), 122.0 (G-1'), 120.1 (G-6'), 115.7 (G-5'), 115.1 (G-2'), 103.1 (G-10), 98.3 (G-6), 93.5 (G-8)。以上数据与相关文献报道^[7]一致, 从而鉴定该化合物为槲皮素。

化合物 x: 淡黄色针晶 (甲醇), mp 264~266 °C。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 220, 276, 334; EIMS m/z : 314 [M]⁺, 299 [M-CH₃]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.94 (1H, s, OH-5), 10.40 (1H, s, OH-4'), 7.98 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 6.95 (1H, s, H-8), 6.87 (1H, s, H-3), 3.93 (3H, s, OCH₃-7), 3.73 (3H, s, OCH₃-6); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 182.3 (G-4), 164.1 (G-2), 161.4 (G-4'), 158.7 (G-7), 152.7 (G-5), 152.1 (G-9), 132.0 (G-6), 128.6 (G-2', 6'), 121.2 (G-1'), 116.0 (G-3', 5'), 105.1 (G-10), 102.7 (G-3), 91.7 (G-8), 60.1 (OCH₃-6), 56.5 (OCH₃-7)。以上¹H-NMR和¹³C-NMR数据与相关文献报道^[8]一致, 从而鉴定该化合物为滨藜黄素。

化合物 (II) 黄色粉末 (甲醇), mp 227~229 °C。盐酸-镁粉反应呈阳性; 与 AlCl₃ 反应呈黄绿色荧光。APCI-MS m/z : 463 [M-H]⁻, 301 [M-Gal-H]⁻; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 205, 257, 297, 360; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.64 (1H, s, OH-5), 10.86 (1H, s, OH-7), 9.73 (1H, s, OH), 9.16 (1H, s, OH), 7.67 (1H, dd, $J = 7.5, 2.2$ Hz, H-6'), 7.52 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, $J = 7.5$

H_z, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.38 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.6 (G-4), 164.2 (G-7), 161.3 (G-5), 156.3 (G-2), 156.3 (G-9), 148.5 (G-4'), 144.9 (G-3'), 133.5 (G-3), 122.1 (G-6'), 121.2 (G-1'), 116.0 (G-5'), 115.3 (G-2'), 104.0 (G-10), 101.8 (G-1''), 98.7 (G-6), 93.6 (G-8), 75.9 (G-5''), 73.3 (G-3''), 71.3 (G-2''), 68.0 (G-4''), 60.2 (G-6''). 以上数据与相关文献报道^[9]一致,从而确定该化合物为槲皮素-3- α - β -D-吡喃半乳糖苷。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 第 2 册. 第 4 卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1998
- [2] 张健, 何晓伟, 高竟春, 等. 滑叶山姜的化学成分研究

- [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(7): 502-503
- [3] Wollenweber B, Peter R, David S S, *et al*. Diterpenes of *Cheilanthes argentea*, a fern from Asia [J]. *Z Naturforsch*, C: Biosci, 1982, 37(11-12): 1283-1285
- [4] 赵爱华, 赵勤实, 李蓉涛, 等. 肾茶的化学成分 [J]. 云南植物学报, 2004, 26(5): 563-568
- [5] Tokunaru H, Masao T, Yasuhiko K, *et al*. 3, 5-Dihydroxy-7, 8-dimethoxyflavones and revised structures for some natural flavones [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(5): 1491-1495
- [6] Tokunaru H, Yoshizumi O, Kenichi S, *et al*. ¹³C-NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(5): 865-874
- [7] 邹建华, 杨俊山. 短瓣金莲花的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(10): 733-736
- [8] Zhang Y Y, Guo Y Z, Hiroyuki A, *et al*. Studies on the constituents of aerial parts of *Scutellaria planipes* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1998, 7(2): 100-102
- [9] 向燕, 王皓, 温远影. 鹿角蕨化学成分的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(1): 69-73

紫杉醇完全抗原的合成鉴定及免疫原性分析

马丽玲¹, 晁志^{2*}, 田中宏幸³

(1 广州医学院护理学院, 广东 广州 510450; 2 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515;

3 九州大学大学院药学研究院, 日本 福岡 812-8582)

摘要:目的 制备红豆杉属植物中抗癌成分紫杉醇 (paclitaxel, TAX) 的人工抗原及抗血清, 为获取分泌抗紫杉醇抗体的单克隆细胞系及分离单链抗体基因、进而以之提高植物中紫杉醇的量, 及建立快速检测 TAX 的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法提供技术基础。方法 将 7-木糖基紫杉醇 (7-xylo-taxol, 7-xy-TAX) 经 NaIO₄ 氧化打开糖环, 与载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 反应偶联, 制得半抗原-载体蛋白复合物后, 用基质辅助激光解吸飞行时间质谱测定其中结合的半抗原数目; 以此抗原免疫 BALB/c 小鼠, 制备抗血清, 并通过 ELISA 法检测其抗体效价和特异性。结果 合成的人工抗原 TAX-BSA 中 TAX 与 BSA 的结合比约为 4~5:1; 免疫小鼠到特异针对 TAX 的抗血清, TAX 抗体的效价为 1:3200。结论 成功地合成了 TAX 的人工抗原, 且该抗原有较好的免疫原性。

关键词: 紫杉醇; 半抗原-载体蛋白复合物; 免疫原性; 基质辅助激光解吸飞行时间质谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)08-1045-04

紫杉醇 (paclitaxel, Taxol[®], 以下简称 TAX) 是一种结构复杂的二萜生物碱, 1971 年从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 的树皮中提取而得^[1], 可以通过独特的微管聚合促进作用而抑制癌细胞的生长^[2], 相继被证明对卵巢癌、子宫癌、乳腺癌等 10 余种癌症具有很好的疗效, 1992 年经美国 FDA 批准上市, 是目前治疗乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌的临床一线用药, 需要量逐年递增^[3,4]。

紫杉醇主要来源于红豆杉属植物, 但其量甚微, 即使是含量最高的树皮部位, 亦仅为 0.01% 左右。据计算, 处理一个卵巢癌患者需要 6 棵树龄 60~

100 年的红豆杉, 每年 200 kg 紫杉醇的消耗量意味着要砍伐红豆杉 100 万株。而红豆杉属植物资源稀少, 生长缓慢, 自然更新困难, 单纯依靠自然资源必然造成物种的濒危甚至灭绝。因而, 紫杉醇的生产远不能满足临床需求, 售价高居不下^[5]。如何解决日益尖锐的紫杉醇来源问题, 自其上市之日起, 即成为世界范围内药理学、植物学等领域研究者面临的重大课题。研究发现, 往植物中转入针对其生物活性成分的单链抗体 (scFv) 基因, 可以诱导其产生更多的该成分。据此, 笔者提出了向红豆杉植物细胞中转入抗紫杉醇单链抗体基因, 提高红豆杉植物中紫

* 收稿日期: 2009-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500652); 教育部留学回国人员科研基金资助项目; 广东省中医药局科研计划项目 (1060131)

作者简介: 马丽玲, 女, 高级讲师。

* 通讯作者 晁志 Tel: (020) 61648256 E-mail: chaozhi1971@yahoo.com.cn