

• 化学成分 •

黑紫獐牙菜叶片化学成分研究

蒋 薇, 左马怡, 杨青松, 曾 亮, 杨 淬, 李干鹏*

云南民族大学化学与生物技术学院 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650031

摘要: 目的 研究黑紫獐牙菜 *Swertia atrovioleacea* 叶片的化学成分。方法 采用硅胶柱色谱、Zorbax PrepHT GF 反相柱色谱及 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等现代分离技术进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据鉴定化合物结构, 采用 MTT 法测定化合物 **1** 对 5 株人体癌细胞株 NB4、A549、SHSY5Y、PC3 和 MCF-7 的体外细胞毒活性。结果 从黑紫獐牙菜叶片 95% 乙醇提取物中分离得到 5 个化合物, 分别鉴定为 3-(3-甲基-2-氧代-丁-3-烯基)-6-乙酰基-1,5-二甲氧基呋喃 (**1**)、1,2,3,4-四氢-1,4,6,8-四羟基呋喃 (**2**)、1,3-二甲氧基-8-羟基呋喃 (**3**)、1,2,6,8-四羟基呋喃 (**4**)、熊果酸 (**5**)。化合物 **1** 对 NB4、A549、SHSY5Y、PC3、MCF-7 细胞的 IC₅₀ 值均小于 10 μmol/L, 其中对 A549 和 MCF-7 细胞具有较高的细胞毒活性, 其 IC₅₀ 值分别为 5.2 和 3.8 μmol/L。结论 化合物 **1** 为新化合物, 命名为黑紫獐牙菜素 A, 此化合物具有显著的细胞毒活性。

关键词: 獐牙菜属; 黑紫獐牙菜; 黑紫獐牙菜素 A; 呋喃; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)17-2509-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.002

Chemical constituents from leaves of *Swertia atrovioleacea*

JIANG Wei, ZUO Ma-yi, YANG Qing-song, ZENG Liang, YANG Cui, LI Gan-peng

Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, Yunnan Minzu University, Kunming 650031, China.

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the leaves of *Swertia atrovioleacea* and five compounds were obtained. In addition, the cytotoxic activity of compound **1** was tested. **Methods** Compounds **1**—**5** were isolated and purified by silica gel column chromatography, Zorbax PrepHT GF (250 mm × 21.2 mm) reversed phase and Sephadex LH-20 gel column chromatography, and other modern separation technology. Their structures were elucidated by physicochemical properties and spectroscopic methods. Compound **1** was evaluated for its *in vitro* cytotoxicity against human tumor NB4, A549, SHSY5Y, PC3, and MCF-7 cell line, using the MTT method. **Results** Five compounds were obtained from the 95% ethanol extract from the leaves of *S. atrovioleacea*, and identified as 3-(3-methyl-2-oxobut-3-enyl)-6-acetyl-1,5-dimethoxy-xanthone (**1**), 1,2,3,4-tetrahydro-1,4,6,8-tetrahydroxyxanthone (**2**), 1,3-dimethoxy-8-hydroxy-xanthone (**3**), 1,2,6,8-tetrahydroxy-xanthone (**4**), and ursolic acid (**5**). The IC₅₀ values of compound **1** on NB4, A549, SHSY5Y, PC3, and MCF-7 were all below 10 μmol/L. Compound **1** had higher cytotoxic activity on A549 and MCF-7, and the IC₅₀ values were 5.2 and 3.8 μmol/L. **Conclusion** Compound **1**, named atrovioleacone A, is a new compound, and exhibits significant cytotoxic activity.

Key words: *Swertia* L.; *Swertia atrovioleacea* H. Smith; atrovioleacone A; xanthenes; cytotoxic activity

黑紫獐牙菜 *Swertia atrovioleacea* H. Smith 为龙胆科 (Gentianaceae) 獐牙菜属 *Swertia* L. 多年生草本植物, 生于海拔 3 400~4 575 m 的山坡草地、多石山顶或岩石缝中, 是云南省迪庆藏族自治州特有品种^[1]。獐牙菜属植物全球约有 170 种, 中国有 80 种, 主要分布于云南、四川等地, 云南有 38 种。在我国该属植物入药历史悠久, 药用有 35 种, 具有清热利

胆、除湿解毒等功效, 常用于治疗急性黄疸型肝炎、骨髓炎等疾病^[2]。该属植物中的化学成分丰富, 主要有呋喃、黄酮、环烯醚萜、三萜及其苷类和生物碱等化合物^[3]。近期研究发现獐牙菜属植物提取物在抑制由性传播的病毒 (包括 HIV)、抗皮肤癌、抗 HBV、神经保护作用等方面也具有较好的活性^[4-5]。在前期工作中, 本课题组对獐牙菜属植物开展了化

收稿日期: 2015-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21262048); 云南省高校科技创新团队项目 (IRTSTYN 2014-11)

作者简介: 蒋 薇 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。

*通信作者 李干鹏, 男, 教授。Tel: (0871)65918669 E-mail: ganpeng_li@sina.com

学成分及生物活性研究,从该属植物中发现了吡喃及其苷类、环烯醚萜及其苷类等化合物,并对这些成分进行了生物活性鉴定,发现其具有抗菌消炎、抗烟草花叶病毒(TMV)、降血糖和抗肿瘤等功效^[6-8]。

为了进一步研究獐牙菜属植物的活性成分及药用价值,本实验对云南迪庆藏族自治州的黑紫獐牙菜进行研究,从该植物 95%乙醇提取物中分离得到 5 个化合物,分别鉴定为 3-(3-甲基-2-氧代-丁-3-烯基)-6-乙酰基-1,5-二甲氧基吡喃[3-(3-methyl-2-oxobut-3-enyl)-6-acetyl-1,5-dimethoxy-xanthone, **1**]、1,2,3,4-四氢-1,4,6,8-四羟基吡喃(1,2,3,4-tetrahydro-1,4,6,8-tetrahydroxy-xanthone, **2**)、1,3-二甲氧基-8-羟基吡喃(1,3-dimethoxy-8-hydroxy-xanthone, **3**)、1,2,6,8-四羟基吡喃(1,2,6,8-tetrahydroxy-xanthone, **4**)、熊果酸(ursolic acid, **5**)。其中,化合物 **1** 为新的吡喃类化合物,命名为黑紫獐牙菜素 A。对该化合物进行了细胞毒活性测定,发现其对急性早幼粒细胞白血病细胞(NB4)、人肺腺癌细胞(A549)、人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)、人前列腺癌细胞(PC3)、人乳腺癌细胞(MCF-7)的 IC₅₀ 值均小于 10 μmol/L,其中对 A549 和 MCF-7 细胞具有较高的细胞毒活性,其 IC₅₀ 值分别为 5.2 和 3.8 μmol/L。

1 材料与方法

UV-2401A 紫外光谱仪(日本岛津公司);JBio-Rad FTS-185 傅里叶变换红外光谱仪(美国伯乐 BIO-RAD 公司);DRX-500 核磁共振仪(瑞士布鲁克公司);半制备 HPLC 分析仪器为岛津 LC-8A 型高效液相色谱仪,色谱柱为安捷伦公司 Zorbax PrepHT GF(250 mm×21.2 mm, 7 μm)和安捷伦 Zorbax C₁₈(250 mm×9.4 mm, 5 μm)色谱柱。柱色谱硅胶、GF₂₅₄(100 mm×100 mm)硅胶板,均为青岛海洋化工厂产品;MCI 填充材料为 MCI-gel CHP-20P(75~150 μm,日本三棱公司生产);凝胶为 Sephadex LH-20,美国 GE 公司产品;提取及柱色谱使用重蒸工业纯三氯甲烷、甲醇、醋酸乙酯、石油醚;色谱纯乙腈、四氢呋喃;超纯水。

植物样品于 2012 年 11 月采自云南省迪庆藏族自治州,经云南民族大学杨青松博士鉴定为黑紫獐牙菜 *Swertia atrovioacea* H. Smith,标本(1301006)存于民族药资源化学国家民委—教育部重点实验室(云南民族大学)标本室。

2 提取与分离

取样品 2.5 kg 晒干,粉碎到 30 目,然后用 95%

乙醇提取 4 次,每次用量为 3.5 L,室温浸泡、超声 4 次,每次 30 min,滤过,减压浓缩得浸膏,合并得到浸膏 86 g。浸膏用 MCI 脱色,再经硅胶柱色谱,氯仿-丙酮(20:1、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5)梯度洗脱,分成 6 个部分。选取 9:1 洗脱部分进一步经 HPLC 分离,以 68%甲醇-水溶液为流动相,体积流量 15 mL/min,分别收集 8.2、13.5、17.8、26.7、32.3 min 的色谱峰,可得化合物粗品。粗品分别再用甲醇溶解,经葡聚糖凝胶柱纯化(甲醇)得化合物 **1**(18.2 mg)、**2**(8.3 mg)、**3**(10.2 mg)、**4**(15.0 mg)、**5**(13.1 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 浅黄色粉末,HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 403.115 2 [M+Na]⁺,结合 ¹H-和 ¹³C-NMR 谱(表 1)确定分子式为 C₂₂H₂₀O₆。其红外光谱显示羟基(3 405 cm⁻¹)、羰基(1 708, 1 684, 1 652 cm⁻¹)。表 1 化合物 **1** 的 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 和 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 数据

Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound **1** (500/125 MHz, CDCl₃)

碳位	δ _C	δ _H
1	161.4 s	
2	108.1 d	6.81 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)
3	140.2 s	
4	104.8 d	6.70 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)
5	153.9 s	
6	124.6 s	
7	125.8 d	7.62 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz)
8	121.5 d	7.48 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz)
9	178.1 s	
4a	156.4 s	
8a	124.0 s	
9a	116.7 s	
10a	149.3 s	
1'	37.7 t	4.66 (s)
2'	201.1 s	
3'	144.2 s	
4'	123.9 t	5.90 (s)
5'	18.7 q	1.94 (s)
6'	198.2 s	
7'	30.4 q	2.52 (s)
1-OMe	56.0 q	3.84 (s)
5-OMe	61.0 q	3.87 (s)

cm^{-1}) 和芳环 (1 612, 1 569, 1 448 cm^{-1}) 信号, 紫外光谱在 336、258、210 nm 有最大吸收也证实化合物中存在芳环结构。化合物的 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱显示其含有 22 个碳和 20 个氢, 包括 1 个 1,3,5,6-四取代的吡喃酮 [δ_{C} 161.4 s, 108.1 d, 140.2 s, 104.8 d, 153.9 s, 124.6 s, 125.8 d, 121.5 d, 178.1 s, 156.4 s, 124.0 s, 116.7 s, 149.3 s; δ_{H} 6.81 (d, $J = 1.8$ Hz), 6.70 (d, $J = 1.8$ Hz), 7.62 (d, $J = 8.2$ Hz), 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz)], 1 个乙酰基 [δ_{C} 198.2 s, 30.4 q; δ_{H} 2.52 (s)], 1 个 3-甲基-2-氧代-丁-3-烯基团 [δ_{C} 37.7 t, 201.1 s, 144.2 s, 123.9 t, 18.7 q; δ_{H} 4.66 (s), 5.90 (s), 1.94 s]^[9]、2 个甲氧基 [δ_{C} 56.0 q, 61.0 q; δ_{H} 3.84 (s), 3.87 (s)] 和 1 个羰基 (C-9)。除去取代基团 (1 个乙酰基、1 个 3-甲基-2-氧代-丁-3-烯基团、2 个甲氧基), 根据 2 个苯环、羰基的核磁共振数据, 结合不饱和度可推测该化合物 **1** 为吡喃酮类化合物。

根据 H-1' (δ_{H} 4.66) 和 C-2 (δ_{C} 108.1), C-3 (δ_{C} 140.2), C-4 (δ_{C} 104.8) 有 HMBC 相关 (图 1), 以及 H-2 (δ_{H} 6.81) 和 C-1' (δ_{C} 37.7) 有 HMBC 相关, 可证实 3-甲基-2-氧代-丁-3-烯基团连接在 C-3 位。根据乙酰甲基 C-7' (δ_{C} 30.4) 和 C-6 (δ_{C} 124.6) 有 HMBC 相关, 以及 H-7 (δ_{H} 7.62) 和 C-6' (δ_{C} 198.2) 有 HMBC 相关, 可证实乙酰基取代在 C-6 位。2 个甲氧基取代在 C-1 (δ_{C} 161.4) 和 C-5 (δ_{C} 153.9) 位可由 2 个甲氧基氢 (δ_{H} 3.84, 3.87) 分别和 C-1 (δ_{C} 161.4)、C-5 (δ_{C} 153.9) 的 HMBC 相关得到确定。化合物中典型的吡喃酮氢谱信号 (H-2、H-4、H-7 和 H-8) 也可进一步证实该色酮为 1,3,5,6 取代^[10]。因此, 鉴定化合物 **1** 为 3-(3-甲基-2-氧代-丁-3-烯基)-6-乙酰基-1,5-二甲氧基吡喃酮, 命名为黑紫獐牙菜素 A。

化合物 **2**: 淡黄色粉末, 分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。ESI-MS m/z : 265 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.19 (1H, s, H-5), 6.03 (1H, s, H-7), 4.84 (1H,

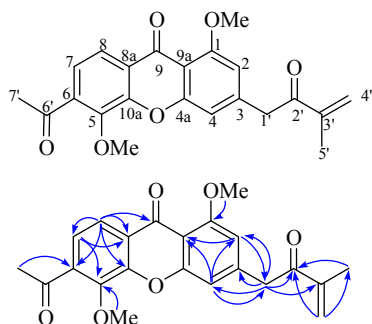


图 1 化合物 **1** 的结构和主要 HMBC 相关

Fig. 1 Structure and key HMBC correlations of compound **1**

t, $J = 6.8$ Hz, H-4), 4.40 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1), 2.07 (2H, m, H-3), 1.85 (1H, dd, $J = 6.4$, 16.0 Hz, H-2a), 1.73 (1H, dd, $J = 6.4$, 12.3 Hz, H-2b); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 82.1 (C-1), 28.8 (C-2), 26.8 (C-3), 64.3 (C-4), 160.3 (C-4a), 165.7 (C-4b), 94.6 (C-5), 167.0 (C-6), 100.4 (C-7), 163.1 (C-8), 105.4 (C-8a), 183.3 (C-9), 118.7 (C-9a)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **2** 为 1,2,3,4-四氢-1,4,6,8-三羟基吡喃酮。

化合物 **3**: 淡黄色粉末, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。ESI-MS m/z : 273 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 13.1 (1H, s, 8-OH), 7.72 (1H, dd, $J = 1.6$, 8.2 Hz, H-7), 7.32 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6), 7.27 (1H, dd, $J = 1.4$, 8.2 Hz, H-5), 6.52 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 6.30 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-4), 3.99 (3H, s, 1-OCH₃), 3.92 (3H, s, 3-OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 181.2 (C=O), 166.3 (C-3), 162.2 (C-1), 157.1 (C-4a), 148.8 (C-8), 144.8 (C-4b), 124.5 (C-6), 121.6 (C-8a), 114.6 (C-7), 115.9 (C-5), 103.2 (C-8b), 97.7 (C-2), 94.3 (C-4), 56.1 (1-OCH₃), 55.9 (3-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **3** 为 1,3-二甲氧基-8-羟基吡喃酮。

化合物 **4**: 黄色粉末, 分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_6$ 。ESI-MS m/z : 237 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.27 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-5), 6.37 (1H, s, H-7), 6.60 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3), 7.35 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 146.1 (C-1), 138.5 (C-2), 126.6 (C-3), 111.4 (C-4), 154.7 (C-4a), 157.3 (C-4b), 93.5 (C-5), 166.2 (C-6), 99.8 (C-7), 162.3 (C-8), 101.8 (C-8a), 107.7 (C-8b), 185.7 (C-9)。以上数据与文献对照一致^[13], 故鉴定化合物 **4** 为 1,2,6,8-四羟基吡喃酮。

化合物 **5**: 白色晶体, 分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ 。ESI-MS m/z : 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.29 (1H, s, COOH), 5.04 (1H, m, $J = 3.6$ Hz, H-12), 3.79 (1H, m, H-3), 2.69 (1H, m, H-18), 2.39 (2H, m, H-15), 2.12 (2H, q, $J = 12.0$ Hz, H-16), 2.00 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-22), 1.97 (1H, m, H-19), 1.94 (2H, s, H-11), 1.82 (2H, m, H-21), 1.63 (2H, m, H-6), 1.42 (2H, m, H-1), 1.31 (1H, m, H-5), 1.21 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, H-30), 1.07 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 0.86 (3H, s, H-27), 0.82 (3H, s, H-26); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 178.9

(C-28), 139.7 (C-13), 124.7 (C-12), 76.2 (C-3), 54.9 (C-5), 53.8 (C-18), 47.1 (C-9), 42.4 (C-17), 39.8 (C-14), 39.1 (C-19), 38.8 (C-20), 38.5 (C-8), 37.5 (C-22), 37.3 (C-4), 33.6 (C-10), 31.5 (C-1), 30.1 (C-7), 28.9 (C-11), 28.4 (C-2), 28.2 (C-21), 25.0 (C-15), 24.0 (C-16), 23.7 (C-23, C-24), 20.5 (C-6), 18.8 (C-27), 15.6 (C-25), 17.5 (C-26), 16.8 (C-29), 15.7 (C-30)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 5 为熊果酸。

4 化合物 1 的细胞毒活性研究

参照文献报道^[15], 采用 MTT 法测定化合物 1 的细胞毒活性, 以紫杉醇为阳性对照, 测试细胞株为 NB4、A549、SHSY5Y、PC3 和 MCF7, 均购于上海拜力生物科技有限公司。结果表明: 化合物 1 对 5 株细胞的 IC₅₀ 值均小于 10 $\mu\text{mol/L}$, 其中对 A549 和 MCF-7 细胞具有较高的细胞毒活性, 其 IC₅₀ 值分别为 5.2 和 3.8 $\mu\text{mol/L}$ 。表明其对 A549 和 MCF-7 细胞有显著的细胞毒活性。

参考文献

- [1] 杨竞生, 初称江措. 迪庆藏药 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 1987.
- [2] 陈家春, 万定荣, 难波恒雄. 獐牙菜属民族民间药物的整理 [J]. 中国民族民间医药杂志, 1999(37): 98-101.
- [3] 文荣荣, 董秀华, 段沅杏. 獐芽菜化学成分研究 [J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2010, 149(2): 93-92.
- [4] Zhu B K, Zhe W, Duan Y Q, *et al.* Two new xanthenes from *Swertia angustifolia*. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(2): 154-158.
- [5] Negi J S, Singh P, Rawat B. Chemical constituents and biological importance of *Swertia*: a review [J]. *Curr Res Chem*, 2011, 3(1): 1-15.
- [6] Lu G, Zhou Y F, Yang H Y, *et al.* Two new xanthone glucosides from *Swertia mussotii* Franch. [J]. *Heterocycles*, 2011, 83(8): 1897-1902.
- [7] Zhang J S, Wang X M, Gao Y T, *et al.* Studies on antioxidant activities of chemical constituents of *Swertia mussotii* Franch. [J]. *Asian J Chem*, 2011, 23(5): 1966-1968.
- [8] 赵升达, 普杰, 陈永对, 等. 大籽獐牙菜的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(18): 2493-2497.
- [9] Zhou M, Zhou K, Zhao Y L, *et al.* New xanthenes from *Comastoma pulmonarium* and their anti-tobacco mosaic virus activity. [J]. *Heterocycles*, 2015, 91(3): 604-609.
- [10] Hu Q F, Niu D Y, Yang S, *et al.* Xanthone derivatives from the fermentation products of an endophytic fungus of *Phomopsis amygdale*. [J]. *Heterocycles*, 2013, 87(10): 2103-2108.
- [11] 陈家春, 白雪, 方进波, 等. 紫红獐牙菜呋喃酮及环烯醚萜类化合物的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(6): 979-983.
- [12] Yang X D, Xu L Z, Yang S L. Xanthenes from the stems of *securidaca inappendiculata* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(8): 1245-1249.
- [13] Nguyen L H, Venkatraman G, Sim K Y, *et al.* Xanthenes and benzapbenones from *garcinia griffithii* and *garcinia mangostana* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(14): 1718-1723.
- [14] Begum S, Hassan S I, Siddiqui B S, *et al.* Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(4): 399-403.
- [15] Gao X M, Wang R R, Niu D Y, *et al.* Bioactive dibenzocyclooctadiene lignans from the stems of *Schisandra neglecta* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(6): 1052-1057.