

当归中 1 个新香豆素类化合物及其细胞毒活性

周 堃, 王月德, 董 伟, 刘贵有, 李丽梅, 娄 洁, 胡秋芬, 叶艳青, 周 敏*

云南民族大学 民族药资源化学国家民委教育部重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 研究当归 *Angelica sinensis* 干燥根的化学成分。方法 运用硅胶、凝胶、MCI-Gel 树脂及 RP-HPLC 等多种色谱技术分离纯化, 并根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构。结果 从当归干燥根 95%乙醇提取物中分离得到了 1 个新香豆素类化合物, 鉴定为 6-羟基-3-(4-羟基苯)-7-甲基-香豆素 (1); 化合物 1 对 A549 和 MCF-7 细胞株 IC_{50} 值分别为 3.2 和 2.8 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 化合物 1 为 1 个新的香豆素类化合物, 命名为云归香豆素 A; 其对 A549 和 MCF-7 细胞株表现了明显的体外细胞毒活性。

关键词: 当归; 香豆素; 细胞毒活性; 6-羟基-3-(4-羟基苯)-7-甲基-香豆素; 云归香豆素 A

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670 (2015)18 - 2680 - 03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.003

A new coumarin from roots of *Angelica sinensis* and its cytotoxicity

ZHOU Kun, WANG Yue-de, DONG Wei, LIU Gui-you, LI Li-mei, LOU Jie, HU Qiu-fen, YE Yan-qing, ZHOU Min
Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, Yunnan
Minzu University, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the roots of *Angelica sinensis*. **Methods** The chemical constituents in the roots of *A. sinensis* were separated and purified through various kinds of chromatographic methods, including silica gel, MCI-Gel, Sephadex LH-20, and RP-HPLC. Their structures were elucidated by spectral data and physical-chemical properties. **Results** 6-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-methyl-coumarin (1) was isolated from the 95% ethanol extracts of this plant. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, named Angelica coumarin A. And it displays the cytotoxicity against A549 and MCF7 cells with IC_{50} values of 3.2 and 2.8 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; coumarin; cytotoxicity; 6-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-methyl-coumarin; Angelica coumarin A

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。其性温, 味甘、辛, 具有补血活血、调经止血、润肠滑肠之功效, 是常用中药材, 医家素有“十方九归”之称, 除中医处方配方用药外, 含当归的中成药就多达 80 余种。研究表明, 当归属植物主要含有多糖、有机酸、黄酮、萜内酯和香豆素等多种类型的化合物^[1-3]。大量的现代药理研究表明, 当归及其主要化学成分表现出广泛的生物活性, 对造血系统、循环系统、神经系统、免疫系统等均有药理作用^[1-3]。研究还表明, 从当归丙酮提取物^[4]以及从中得到的一些重要活性成分^[1], 其体内、外实验研究均显示一定的抗肿瘤活性。值得一提的

是, 产自云南鹤庆马厂的当归以个大、肉肥和挥发油量高而居全国当归之冠。为深入了解该地区当归的化学成分, 本实验对其开展了系统研究, 从其干燥根 95%乙醇提取物中分离得到 1 个新的香豆素类化合物 6-羟基-3-(4-羟基苯)-7-甲基-香豆素 [6-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-methyl-coumarin, 1], 命名为云归香豆素 A。体外细胞毒活性检测结果表明该化合物对 A549 和 MCF-7 细胞表现出较强的体外细胞毒活性。

1 仪器与材料

UV-2401A 紫外光谱仪 (日本岛津公司); Jasco J-810 圆二色光谱仪 (日本分光公司); Bio-Rad

收稿日期: 2015-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21362044, 21032085); 云南省高校科技创新团队资助项目 (IRTSTYN 2014-11)

作者简介: 周 堃 (1990—), 男, 云南大理人, 硕士在读, 从事中药及天然药物活性成分研究。

*通信作者 周 敏, 男, 讲师, 硕士生导师。Tel: (086)68329045 E-mail: zhominynun@163.com

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, 5 μm)。柱色谱硅胶, GF₂₅₄ (100 mm×100 mm) 硅胶板, 均为青岛海洋化工厂产品; 反相填充材料 RP-18 (40~63 μm), Merck 公司; MCI 填充材料为 MCI-gel CHP-20P (75~150 μm); 凝胶为 Sephadex LH-20; 提取用工业三氯甲烷、甲醇、醋酸乙酯、石油醚; 超纯水。

当归样品购于云南省昆明市中药材批发市场, 产地为云南鹤庆马厂, 经云南民族大学民族药资源化学国家民委教育部重点实验室杨青松教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels。样品粉碎到 40 目, 备用。

2 提取与分离

取粉碎后的当归样品 1.6 kg, 粉碎, 95%乙醇超声浸泡提取 4 次, 每次用 2.0 L 95%乙醇室温浸泡后超声(每次 30 min), 然后滤过, 减压浓缩得浸膏, 合并得到浸膏 85.3 g。浸膏经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇(20:1、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5)梯度洗脱, 分成 6 个部分。将氯仿-甲醇 8:2 洗脱部分再次用氯仿-丙酮梯度洗脱, 分成 8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、纯丙酮 6 个部分, 选取氯仿-丙酮 6:4 部分进行 HPLC 的进一步分离。用 Agilent 公司的 Zorbax PrepHT GF (21.2 mm×25 cm) 反相柱, 以 38%甲醇为流动相, 体积流量为 15 mL/min, 纯化得到化合物 1 (12.2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 橙黄色胶状物, HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 267.066 3 [M-H]⁻ (C₁₆H₁₁O₄, 计算值 267.065 7), 结合 ¹H-NMR 和 DEPT 谱确定其分子式为 C₁₆H₁₂O₄。其红外光谱 3 448, 1 715, 1 600, 1 543, 1 482 cm⁻¹ 显示了强的吸收, 提示了化合物中存在羟基、羰基和芳环的共振吸收; 紫外光谱在 282、231 和 210 nm 有最大吸收也证实化合物中存在芳环结构。从 ¹H-和 ¹³C-NMR 谱(表 1)中可以明显观测到 1 组 3,6,7-三取代香豆素母核的信号(C-2~C-10; H-4、H-5 和 H-8)^[5]、1 组对羟基苯基信号(C-1'~C-6'; H-2', 6'、H-3', 5')^[6]、1 个甲基信号(C-1"和 H-1")、2 个酚羟基信号(δ_H 10.81, 11.09)。化合物 1 中各取代基的位置进一步通过 HMBC 确定。在 HMBC 谱中, 观测到了 H-2', 6'与

C-3、H-4 与 C-1'的相关(图 1), 从而证实了对羟基苯基取代在母核的 C-3 位上。进一步根据甲基氢 H-1"与 C-6、C-7、C-8 的 HMBC 相关以及酚羟基氢 6-OH 与 C-5、C-6、C-7 的 HMBC 相关确定了甲基和酚羟基分别取代在香豆素母核的 C-7 和 C-6 位上。因此, 化合物的结构确定为 6-羟基-3-(4-羟基苯)-7-甲基-香豆素。经文献检索, 该化合物为新化合物, 命名为云归香豆素 A。

表 1 化合物 1 的 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 HMBC 数据 (500/125 MHz, C₅D₅N)

Table 1 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and HMBC data of compound 1 (500/125 MHz, C₅D₅N)

碳位	δ _C (DEPT)	δ _H	HMBC (H→C)
2	163.0 s		
3	122.8 s		
4	140.6 d	7.97 (s)	C-2, 3, 9, 10, 1', 2'', 6''
5	112.5 d	6.97 (s)	C-9, 10
6	152.1 s		
7	124.9 s		
8	119.4 d	6.80 (s)	C-6, 7, 10
9	146.2 s		
10	117.5 s		
1'	129.0 s		
2', 6'	131.1 d	7.69 (d, J=8.6 Hz)	C-3, 1''
3', 5'	116.8 d	6.89 (d, J=8.6 Hz)	C-1', 4'
4'	157.9 s		
1''	16.5 q	2.37 (s)	C-6, 7, 8
Ar-OH-4'		11.09 (s)	C-3'', 4'', 5''
Ar-OH-6		10.81 (s)	C-5, 6, 7

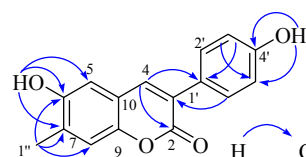


图 1 化合物 1 的主要 HMBC 相关

Fig. 1 Key HMBC correlations of compound 1

4 化合物的细胞毒性

由于有文献报道当归提取物^[4]及其所含化合物^[11]具有明显的抗肿瘤活性, 因此对化合物 1 进行了细胞毒性筛选; 细胞毒性检测参照文献采用改良的 MTT 测定法^[7], 以紫杉醇为阳性对照, 所测试细胞株为 NB4、A549、SHSY5Y、PC3 和 MCF-7 (表 2)。

表 2 化合物 1 的细胞毒活性
Table 2 Cytotoxic activity of compound 1

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)				
	NB49	A549	SHSY5Y	PC3	MCF-7
紫杉醇	0.03	0.02	0.1	0.1	0.05
化合物 1	<10	3.2	<10	<10	2.8

结果表明, 化合物 1 对所选的 5 株肿瘤细胞的 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 3.2 和 2.8 μmol/L。

参考文献

- [1] 李 曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [2] 严 辉, 段金焱, 钱大玮, 等. 我国不同产地当归药材质量的分析与评价 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1988-1992.
- [3] 陈慧珍. 当归的研究进展 [J]. 海峡药学, 2008, 20(8): 83-85.
- [4] Cheng Y L, Chang W L, Lee S C, *et al.* Acetone extract of *Angelica sinensis* inhibits proliferation of human cancer cells via inducing cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Life Sci*, 2004, 75(13): 1579-1594.
- [5] Li Y K, Zhou B, Wu X X, *et al.* Phenolic compounds from *Cassia siamea* and their anti-tobacco mosaic virus activity [J]. *Chem Nat Comp*, 2015, 51(1): 50-53.
- [6] Lei C, Xu W, Wu J, *et al.* Coumarins from the Roots and Stems of *Nicotiana tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activity [J]. *Chem Nat Comp*, 2015, 51(1): 43-46.
- [7] Zhou M, Miao M M, Du G, *et al.* Aspergillines A-E, highly oxygenated hexacyclic indole-tetrahydrofuran-tetramic acid derivatives from *Aspergillus versicolor* [J]. *Org Lett*, 2014, 16(19): 5016-5019.