

东北岩高兰中查耳酮类化学成分研究

赵明, 黄淑蕾, 王丹, 李军, 王金兰, 白丽明, 张树军*

齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: 目的 研究东北岩高兰 *Empetrum nigrum* var. *japonicum* 全草的查耳酮类化学成分。方法 采用硅胶柱色谱和高效液相色谱等方法进行化学成分分离, 并经波谱数据分析鉴定化合物的结构。用 MTT 法测试单体化合物对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制活性。**结果** 从东北岩高兰甲醇浸泡液正己烷萃取物中分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为 2',5'-二羟基-3'-甲氧基-4',6'-二甲基二氢查耳酮 (1)、4',5'-二羟基-2'-甲氧基-3',6'-二甲基二氢查耳酮 (2)、2',4'-二羟基二氢查耳酮 (3)、2',4'-二羟基查耳酮 (4)、2'-甲氧基-4'-羟基二氢查耳酮 (5)、2',4', β -三羟基二氢查耳酮 (6)。**结论** 化合物 1、2 为新化合物, 命名为岩高兰素 A 和 B, 化合物 5、6 为首次从该植物中分离得到。化合物 6 具有一定的抗肿瘤活性。

关键词: 东北岩高兰; 查耳酮; 二氢查耳酮; HeLa 细胞; 岩高兰素; 2',5'-二羟基-3'-甲氧基-4',6'-二甲基二氢查耳酮; 4',5'-二羟基-2'-甲氧基-3',6'-二甲基二氢查耳酮

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)24-4318-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.003

Chalcones from *Empetrum nigrum* var. *japonicum*

ZHAO Ming, HUANG Shu-lei, WANG Dan, LI Jun, WANG Jin-lan, BAI Li-ming, ZHANG Shu-jun

Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from *Empetrum nigrum* var. *japonicum*. **Methods** Compounds were isolated from *n*-hexane fraction in the industrial methanol extract from *E. nigrum* var. *japonicum* by silica gel column chromatography and HPLC. The structures of the chemical constituents were identified by analysis on their spectral data. All the isolated compounds were evaluated using relevant *in vitro* antitumor assay against HeLa cell lines. **Results** Six compounds were isolated from *n*-hexane fraction in the ethanol extract from *E. nigrum* var. *japonicum* and identified as 2',5'-dihydroxy-3'-methoxy-4',6'-dimethyl-dihydrochalcone (1), 4',5'-dihydroxy-2'-methoxy-3',6'-dimethyl-dihydrochalcone (2), 2',4'-dihydroxy-dihydrochalcone (3), 2',4'-dihydroxy-chalcone (4), 2'-methoxy-4'-hydroxy-dihydrochalcone (5), and 2',4', β -trihydroxy-dihydrochalcone (6). **Conclusion** Compounds 1 and 2 are new compounds, compounds 5 and 6 are obtained from the plants for the first time. Compound 6 exhibits the inhibitory activity.

Key words: *Empetrum nigrum* L. var. *japonicum* K. Koch; chalcone; dihydrochalcone; HeLa cell; empetrumnin; 2',5'-dihydroxy-3'-methoxy-4',6'-dimethyl-dihydrochalcone; 4',5'-dihydroxy-2'-methoxy-3',6'-dimethyl-dihydrochalcone

东北岩高兰 *Empetrum nigrum* L. var. *japonicum* K. Koch 又名黑果子、夜明豆, 为岩高兰科 (Empetraceae) 岩高兰属 *Empetrum* L. 常绿匍匐状小灌木, 属药用珍稀植物, 是岩高兰科在中国仅有的一个变种^[1], 全株可入药, 具有补脾胃、滋阴保肝、明目等功能, 用于治疗肚腹胀满和消化不良等症, 还可作茶饮, 具有助消化、提精神的养生功效^[2-3]。为进一步发掘研究岩高兰的药用价值, 对东北岩高兰全

草甲醇提取液正己烷萃取物的化学成分进行了研究, 从中分离得到 6 个查耳酮类化合物, 分别鉴定为 2',5'-二羟基-3'-甲氧基-4',6'-二甲基二氢查耳酮 (2',5'-dihydroxy-3'-methoxy-4',6'-dimethyl-dihydrochalcone, 1)、2'-甲氧基-4',5'-二羟基-3',6'-二甲基二氢查耳酮 (4',5'-dihydroxy-2'-methoxy-3',6'-dimethyl-dihydrochalcone, 2)、2',4'-二羟基二氢查耳酮 (2',4'-dihydroxy-dihydrochalcone, 3)、2',4'-二羟基查耳酮

收稿日期: 2016-06-26

基金项目: 黑龙江省自然科学基金面上项目 (B201209)

作者简介: 赵明, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: qqhrzhaoming@163.com

*通信作者 张树军, 男, 教授。E-mail: shjzhang2005@126.com

(2',4'-dihydroxy-chalcone, **4**)、2'-甲氧基-4'-羟基二氢查耳酮 (2'-methoxy-4'-hydroxy-dihydrochalcone, **5**)、2',4', β -三羟基二氢查耳酮 (2',4', β -trihydroxy-dihydrochalcone, **6**)。其中, 化合物 **1**、**2** 为新化合物, 命名为岩高兰素 A 和 B; 化合物 **5**、**6** 为首次从该植物中分离得到。

1 仪器与材料

X-6 显微熔点测定仪 (温度未校正, 北京泰克仪器有限公司); 傅里叶变换红外光谱仪、紫外-可见吸收光谱仪 (美国 PE 公司); Waters Xevo QTOF 质谱仪 (美国沃特斯公司); Bruker-600 MHz 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); HITACHI L-7100 高压液相色谱仪 (日本日立公司); HITACHI L-3350 示差检测器 (GL SCIRNCES Inc.); Inertsil PREP-ODS (250 mm \times 10 mm, 5 μ m) 和 PREP-Sil (250 mm \times 10 mm, 5 μ m) 不锈钢色谱柱; 柱色谱用硅胶 (200~300 目) 为青岛海洋化工厂产品; 薄层色谱硅胶板为烟台化工厂生产。

药材于 2013 年 8 月购买于内蒙古自治区根河市, 经齐齐哈尔大学裴世春教授鉴定为东北岩高兰 *Empetrum nigrum* L. var. *japonicum* K. Koch, 标本 (YGL-201308) 保存于齐齐哈尔大学天然产物研究室。

2 提取与分离

干燥的东北岩高兰全草 7.5 kg 粉碎后用甲醇室温浸泡提取 4 次, 每次 3 d, 合并浸提液, 浓缩, 加水混悬, 依次用正己烷、醋酸乙酯和正丁醇萃取 4 次, 合并相同溶剂萃取液减压浓缩至恒定质量, 得到正己烷萃取物 384.2 g、醋酸乙酯萃取物 598.5 g、正丁醇萃取物 304.2 g。

取 80.0 g 正己烷萃取物, 用硅胶柱色谱分离, 依次用正己烷-醋酸乙酯 8:2 (8.0 L)、5:5 (8.5 L)、0:1 (6.0 L) 梯度洗脱, 得到 13 个组分 Fr.1~13。Fr. 3 (15.8 g) 经硅胶柱色谱分离, 正己烷-醋酸乙酯 (9:1、8:2、0:1) 梯度洗脱, 得到 9 个组分 Fr. 3-1~3-9。Fr. 3-4 共 3.7 g, 取 198.5 mg, 经 HPLC-SIL 分离纯化得化合物 **1** (43.2 mg)、**2** (9.8 mg)。Fr. 5 (3.0 g) 经硅胶柱色谱分离, 正己烷-醋酸乙酯 (8:2、7:3、0:1) 梯度洗脱, 得到 8 个组分 Fr. 5-1~5-8。其中 Fr. 5-3 (562.1 mg) 和 Fr. 5-4 (302.2 mg) 重结晶后分别得到化合物 **3** (126.1 mg)、**4** (123.3 mg)。Fr. 7 (9.2 g) 经硅胶柱色谱分离, 正己烷-醋酸乙酯 (8:2、7:3、0:1) 梯度洗脱, 得到 9 个组分 Fr. 7-1~7-9。Fr. 7-7 (430.9 mg) 重

结晶后得到化合物 **5** (90.2 mg)。Fr. 7-5 (482.7 mg) 经 HPLC-ODS 分离纯化后得到化合物 **6** (8.7 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色粉末 (正己烷-醋酸乙酯), 三氯化铁反应呈暗绿色悬浊液。mp 75.5~76.7 $^{\circ}$ C。HR-ESI-MS m/z : 301.145 5 [M + H]⁺ (计算值 301.144 0), 确定分子式为 C₁₈H₂₀O₄。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 210, 290; IR ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 428, 3 026, 1 706, 1 613, 1 372。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) 中 δ 7.29 (2H, t, J = 7.2 Hz), 7.24 (2H, d, J = 7.2 Hz), 7.19 (1H, t, J = 7.2 Hz) 处显示 1 组单取代苯的质子信号, δ 3.40 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.03 (2H, t, J = 7.8 Hz) 处给出 2 个亚甲基信号峰, δ 3.67 (3H, s) 处给出 1 个 -OCH₃, δ 2.12 (3H, s), 2.10 (3H, s) 给出 2 个与不饱和碳相连的甲基, δ 13.46 (1H, s), 5.34 (1H, s) 给出 2 个羟基质子峰。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) 及 DEPT 数据显示有 18 个碳信号, 其中有 1 个羰基碳信号, 12 个不饱和碳信号, 1 个甲氧基碳信号, 2 个甲基碳信号和 2 个亚甲基碳信号。初步推测该化合物为查耳酮骨架。根据 HMBC 中 δ 13.46 (1H, s) 处羟基质子与 C-1', 2', 3' 相关可推断 2'-位有羟基存在; δ 3.67 (3H, s) 处单峰甲基与 C-3' 相关可推断出甲氧基位于 C-3' 位; 由 δ 2.12 (3H, s), 2.10 (3H, s) 处 2 个单峰甲基分别与 C-3', 4', 5' 及 C-1', 5', 6' 相关, 以及 δ 5.34 (1H, s) 处羟基质子与 C-4', 6' 相关可推断出 C-4', 6' 位有甲基取代, C-5' 位有羟基取代。另外, 根据 H- α 与 C=O, H- β 与 C- α , 1, 2 之间存在相关性, 确定了化合物 **1** 的结构为 2',5'-二羟基-3'-甲氧基-4,6'-二甲基二氢查耳酮 (图 1)。经 Scifinder 数据库检索, 确定为新化合物, 命名为岩高兰素 A, 其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据见表 1。

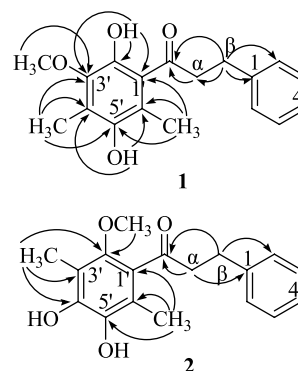


图 1 化合物 1、2 的主要 HMBC 相关图

Fig. 1 Key HMBC correlations of compounds 1 and 2

表 1 化合物 1 和 2 的 NMR 数据
Table 1 NMR data of compounds 1 and 2

碳位	1		2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	—	141.5 (s)	—	141.6 (s)
2,6	7.24 (2H, d, $J=7.2$ Hz)	128.5 (d)	7.25 (2H, d, $J=7.2$ Hz)	128.5 (d)
3,5	7.29 (2H, t, $J=7.2$ Hz)	128.5 (d)	7.29 (2H, t, $J=7.2$ Hz)	128.5 (d)
4	7.19 (1H, t, $J=7.2$ Hz)	126.0 (d)	7.20 (1H, t, $J=7.2$ Hz)	126.0 (d)
1'	—	108.8 (s)	—	107.0 (s)
2'	—	161.4 (s)	—	162.7 (s)
3'	—	159.0 (s)	—	108.6 (s)
4'	—	108.5 (s)	—	158.2 (s)
5'	—	159.0 (s)	—	158.2 (s)
6'	—	106.5 (s)	—	108.6 (s)
C=O	—	205.2 (s)	—	205.7 (s)
α	3.40 (2H, t, $J=7.8$ Hz)	44.4 (t)	3.45 (2H, t, $J=7.8$ Hz)	46.2 (t)
β	3.02 (2H, t, $J=7.8$ Hz)	30.8 (t)	3.03 (2H, t, $J=7.8$ Hz)	30.6 (t)
2'-R	R = OH, 13.46 (1H, s)		R = OCH ₃ , 3.71 (3H, s)	60.4 (q)
3'-R	R = OCH ₃ , 3.67 (3H, s)	61.9 (q)	R = CH ₃ , 2.11 (3H, s)	8.2 (q)
4'-R	R = CH ₃ , 2.10 (3H, s)	8.6 (q)	R = OH, 9.40 (1H, brs)	
5'-R	R = OH, 5.34 (1H, s)		R = OH, 9.40 (1H, brs)	
6'-R	R = CH ₃ , 2.12 (3H, s)	7.5 (q)	R = CH ₃ , 2.11 (3H, s)	8.2 (q)

化合物 2: 黄色片状结晶 (甲醇), 三氯化铁反应呈深绿色。mp 61.0~63.4 °C。HR-ESI-MS m/z : 301.144 6 [M+H]⁺ (计算值 301.144 0), 确定分子式为 C₁₈H₂₀O₄。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 204, 281; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 441, 3 022, 1 706, 1 596, 1 374。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) 中 δ 7.29 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 7.25 (2H, d, $J=7.2$ Hz), 7.20 (1H, t, $J=7.2$ Hz) 处显示 1 组单取代苯的质子信号, δ 3.45 (2H, t, $J=7.8$ Hz), 3.03 (2H, t, $J=7.8$ Hz) 处显示 2 个亚甲基信号峰, δ 3.71 (3H, s) 处给出 1 个-OCH₃, δ 2.11 (6H, s) 给出 2 个与不饱和碳相连的甲基, δ 9.40 (2H, brs) 处显示 2 个酚羟基质子信号。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) 及 DEPT 数据显示有 18 个碳信号, 包括 1 个羰基碳信号, 12 个烯碳信号, 2 个甲基碳信号, 1 个甲氧基碳信号, 2 个亚甲基碳信号。化合物 2 与化合物 1 的波谱数据相似, 推测也为二氢查耳酮骨架。HMBC 中 3'-CH₃ 与 C-2', 3', 4', 以及 6'-CH₃ 与 C-1', 5', 6' 的相关性可推断出 3'、6' 位有甲基取代; 由 δ 3.71 处单峰甲基与 C-2' 相关可推断出甲氧基位于 2' 位。根据 H- α 与 C=O、C-1, H- β 与 C=O、C- α 、C-2 之

间存在相关性推断化合物 2 的结构为 4',5'-二羟基-2'-甲氧基-3',6'-二甲基二氢查耳酮 (图 1)。经 Scifinder 数据库检索, 确定为新化合物, 命名为岩高兰素 B。其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据见表 1。

化合物 3: 黄色粉末 (甲醇), mp 68.7~70.4 °C。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 12.73 (1H, s, 2'-OH), 7.64 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-6'), 7.31 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-3, 5), 7.24 (2H, d, $J=7.2$ Hz, H-2, 6), 7.22 (1H, t, $J=7.2$ Hz, H-4), 6.38 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 6.36 (1H, dd, $J=8.7, 2.4$ Hz, H-5'), 3.22 (2H, t, $J=9.6$ Hz, H- α), 3.04 (2H, t, $J=9.6$ Hz, H- β); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 140.8 (C-1), 128.4 (C-2), 128.6 (C-3), 126.3 (C-4), 128.6 (C-5), 128.4 (C-6), 39.7 (C- α), 30.3 (C- β), 203.7 (C=O), 113.9 (C-1'), 162.5 (C-2'), 103.6 (C-3'), 165.2 (C-4'), 107.7 (C-5'), 132.2 (C-6')。以上数据与文献报道^[4]基本一致, 故鉴定化合物 3 为 2',4'-二羟基二氢查耳酮。

化合物 4: 黄色粉末 (甲醇), mp 151.4~152.1 °C。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 13.36 (1H, s, 2'-OH), 7.89 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H- β), 7.85 (1H, d,

$J = 8.5$ Hz, H-6'), 7.66 (2H, m, H-3, 5), 7.59 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H- α), 7.43 (3H, m, H-2, 4, 6), 6.46 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, H-5'), 6.44 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3'); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 134.7 (C-1), 129.0 (C-2), 128.6 (C-3), 130.8 (C-4), 128.6 (C-5), 129.0 (C-6), 120.3 (C- α), 144.7 (C- β), 192.0 (C=O), 114.6 (C-1'), 166.5 (C-2'), 103.8 (C-3'), 162.7 (C-4'), 107.8 (C-5'), 132.1 (C-6')。以上数据与文献报道^[5]基本一致, 故鉴定化合物 4 为 2',4'-二羟基查耳酮。

化合物 5: 黄色粉末 (甲醇), mp 131.4~133.7 °C。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.74 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-6'), 7.28 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-3, 5), 7.23 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2, 6), 7.17 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4), 6.45 (1H, dd, $J = 9.2, 2.2$ Hz, H-5'), 6.44 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3'), 3.83 (3H, s, 2'-OMe), 3.28 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H- α), 3.00 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H- β); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 141.8 (C-1), 128.5 (C-2), 128.4 (C-3), 125.9 (C-4), 128.4 (C-5), 128.5 (C-6), 30.7 (C- α), 45.3 (C- β), 200.3 (C=O), 120.5 (C-1'), 161.5 (C-2'), 99.0 (C-3'), 161.3 (C-4'), 108.0 (C-5'), 133.0 (C-6'), 55.4 (2'-OMe)。以上数据与文献报道^[5]基本一致, 故鉴定化合物 5 为 2'-甲氧基-4'-羟基二氢查耳酮。

化合物 6: 无色粉末 (甲醇), mp 165.5~167.0 °C。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.87 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 7.47 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2, 6), 7.43 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-3, 5), 7.39 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4), 6.54 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-5'), 6.47 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 5.47 (1H, dd, $J = 13.2, 3.0$ Hz, H- β),

3.04 (1H, t, $J = 16.8, 13.2$ Hz, H- α), 2.84 (1H, dd, $J = 16.8, 3.0$ Hz, H- α); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 138.7 (C-1), 128.9 (C-2), 128.8 (C-3), 126.2 (C-4), 128.8 (C-5), 128.9 (C-6), 44.3 (C- α), 79.9 (C- β), 190.8 (C=O), 115.2 (C-1'), 162.7 (C-2'), 103.5 (C-3'), 163.6 (C-4'), 110.6 (C-5'), 129.4 (C-6')。根据其 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及 HMBC 等波谱数据鉴定化合物 6 为 2',4', β -三羟基二氢查耳酮。经查阅文献, 只报道了该化合物的结构^[6], 未报道其波谱数据。

4 体外抗肿瘤活性

为研究东北岩高兰中查耳酮类化合物的抗肿瘤活性, 采用 MTT 法, 测试了 6 种查耳酮类单体化合物对人宫颈癌细胞 HeLa 体外增殖抑制作用, 结果显示, 化合物 6 有一定抑制作用, IC_{50} 值为 49.8 $\mu\text{g/mL}$, 其余化合物无明显抑制作用。

参考文献

- [1] 陈 辉. 东北岩高兰的分布及保护利用价值 [J]. 内蒙古林业调查设计, 2011, 34(6): 120-121.
- [2] 尹 君, 崔克城, 刘景贵, 等. 亚洲岩高兰的利用价值 [J]. 特种经济动植物, 2002, (1): 23.
- [3] 李瑞明, 王振月, 康毅华, 等. 岩高兰生药学研究 [J]. 中南药学, 2005, 3(3): 175-177.
- [4] 吕 芳, 徐筱杰. 藏药镰形棘豆中黄酮类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 318-320.
- [5] 张玉莲, 梅任强, 刘 熙, 等. 东北岩高兰化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2293-2298.
- [6] Jiang H, Hu J R, Zhan W Q, *et al.* Screening for fractions of *Oxytropis falcata* Bunge with antibacterial activity [J]. *Nat Prod Res*, 2009, 23(10): 953-959.