

青花椒根皮中 1 个新的香豆素类化合物

张东博, 王 征, 梁艳妮, 于金高, 张 珍, 李 铂, 刘世军, 蔡兴航, 宋忠兴, 任 丽, 侯 青, 谢 培*, 唐志书*

陕西中医药大学/陕西省中药资源产业化协同创新中心/陕西省中药基础与新药研究重点实验室/陕西省风湿与肿瘤类中药制剂工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712083

摘要:目的 对青花椒 *Zanthoxylum schinifolium* 根皮中抗炎活性成分进行跟踪分离研究。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20、MCI 以及半制备 HPLC 等色谱方法进行分离纯化, 根据理化性质和现代谱学技术鉴定化合物的结构, 以脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型进行抗炎活性评价。结果 从青花椒根皮的醋酸乙酯部位中共分离得到 4 个香豆素类化合物, 分别鉴定为青花椒素 A (1)、7-甲氧基香豆素 (2)、异东莨菪内酯 (3) 和秦皮乙素 (4)。在 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生一氧化氮 (NO) 的模型中, 化合物 1~4 均对 NO 的产生具有抑制作用, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 (0.21 ± 0.03) 、 (0.92 ± 0.16) 、 (0.15 ± 0.02) 和 (0.26 ± 0.04) $\mu\text{mol/L}$ 。结论 化合物 1 为新化合物, 是 1 个罕见的香豆素类化合物, 命名为青花椒素 A。化合物 3 为首次从该属植物中分离得到, 所有化合物均具有较强的抗 NO 生成活性。

关键词: 芸香科; 青花椒; 青花椒素 A; 香豆素; 抗炎活性; 7-甲氧基香豆素; 异东莨菪内酯; 秦皮乙素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)12-2798-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.008

A new coumarin isolated from root barks of *Zanthoxylum schinifolium*

ZHANG Dong-bo, WANG Zheng, LIANG Yan-ni, YU Jin-gao, ZHANG Zhen, LI Bo, LIU Shi-jun, CAI Xing-hang, SONG Zhong-xing, REN Li, HOU Qing, XIE Pei, TANG Zhi-shu

Shaanxi Province Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research/Shaanxi Rheumatism and Tumor Center of TCM Engineering Technology Research, Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resource Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory components from the root barks of *Zanthoxylum schinifolium*. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel, MCI, Sephadex LH-20 column chromatographies, and semi-preparative HPLC, and their structures were elucidated by physical and spectroscopic analysis. The anti-inflammatory activity was evaluated by the levels of NO in LPS-induced RAW264.7 tested by Griess reagent. **Results** Four coumarins, namely zantholin A (1), 7-methoxycoumarin (2), isoscoupletin (3), and esculetin (4), were isolated from the root barks of *Z. schinifolium*. Compounds 1—4 exhibited anti-inflammatory activities on inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production in RAW 264.7 macrophages with IC_{50} values of (0.21 ± 0.03) , (0.92 ± 0.16) , (0.15 ± 0.02) , and (0.26 ± 0.04) $\mu\text{mol/L}$, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, a rare terpenylated coumarin named zantholin A, and compound 3 is obtained from this plant for the first time. All compounds exhibited anti-inflammatory activities.

Key words: Rutaceae; *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc.; zantholin A; coumarin; anti-inflammatory activity; 7-methoxycoumarin; isoscoupletin; esculetin

青花椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 果实均可入药, 味辛、性温, 归脾、胃、肾经, 具有发汗、散寒、止咳、除胀、消食之功效, 用于脘

收稿日期: 2019-02-19

基金项目: 陕西省重点研发计划 (2017SF-365); 陕西省重点研发计划 (2017SF-327); 陕西省教育厅自然科学专项项目 (16JK1196)

作者简介: 张东博 (1982—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药及天然产物中新颖生物活性成分发现。E-mail: symensu@163.com

*通信作者 唐志书 (1972—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药高新制备技术应用研究, 中药资源开发与综合利用研究。

E-mail: tzs6565@163.com

谢 培 (1984—), 男, 硕士, 实验师, 研究方向为方剂配伍规律与中药新药研究。E-mail: xie6620@163.com

腹冷痛、呕吐泄泻、虫积腹痛、湿疹、阴痒等疾病的治疗^[1-2]。现代药理学研究表明青花椒具有抗菌、抗癌、抗病毒、抗氧化、镇痛、提高机体免疫力、保护心血管、抑制脂质细胞分化等多种生物活性。青花椒富含结构多样的化学成分,主要有生物碱、香豆素、酰胺、木脂素、黄酮、甾醇、挥发油和烃类等^[3]。其中青花椒香豆素是该植物主要的化学成分之一,已经被报道具有抗炎、抗病毒、抑制单胺氧化酶活性、抑制葡萄糖苷酶活性、细胞毒活性以及抑制血小板凝集等多种生物活性,一直以来是研究的热点^[4-7]。

为进一步挖掘青花椒中天然活性化合物,本实验采用多种色谱学分离技术对该植物抗炎活性显著的醋酸乙酯部位进行活性跟踪分离研究,得到4个香豆素类化合物(结构见图1),分别鉴定为青花椒素A(zantholin A, **1**)、7-甲氧基香豆素(7-methoxycoumarin, **2**)、异东莨菪内酯(isoscapoletin, **3**)和秦皮乙素(esculetin, **4**)。其中化合物**1**是1个新的6,7,8-三取代香豆素,其C-7位含有1个罕见的香叶基降三碳并在C-3'与C-6'之间形成五元氧环的结构单元,化合物**3**为首次从该植物中分离得到。在脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞炎症模型中,所有化合物均显示了抗炎活性。

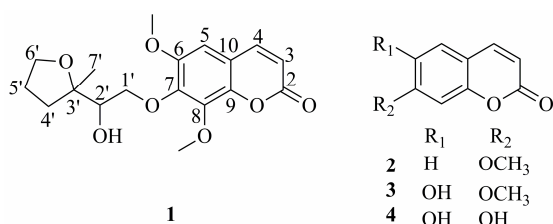


图1 化合物1~4的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—4

1 材料与仪器

Varian Mercury plus-400 和 Varian Mercury plus-500 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司); Waters 高效液相色谱仪 1525EF(美国 Waters 公司); HP5988A GCMS spectrometer 型质谱仪(美国 Hewlett Packard 公司); Multiskan GO 酶标仪和 311 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); DSZ2000 倒置显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司); HPLC 半制备柱(250 mm×10 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶(300~400 目, 中国青岛海洋化工有限公司); MCI 树脂(日本 Mitsubishi 公司); Sephadex LH-20 凝胶

(美国 Amersham Biosciences 公司); 地塞米松(DXMS, 批号 Y07D6C7163, 上海源叶生物科技有限公司); 脂多糖(LPS, 批号 067M4036V, Sigma 公司); DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司); NO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); RAW264.7 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所; 其余试剂均为分析或色谱纯。

青花椒的根皮于 2017 年 8 月采自四川省金阳县, 植物样品由陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为青花椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 的根皮, 植物标本(20170806)保存于陕西省中药资源产业化协同创新中心标本室。

2 提取与分离

干燥青花椒根皮 1.0 kg, 粉碎后用工业 70% 甲醇水于室温下冷浸提取 3 次, 每次冷浸 7 d。提取液减压浓缩得浸膏 120 g。将甲醇提取物分散于蒸馏水中, 依次用等体积的石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 减压浓缩得到各部位萃取浸膏。将醋酸乙酯部位浸膏(17.7 g)通过 HP-20 型大孔树脂, 用水-甲醇(0、30%、50%、85%、100%)梯度洗脱, 得到 5 个流分 Fr. A~E。流分 Fr. D(9.5 g)通过 MCI 凝胶柱, 用水-甲醇(1:0→0:1)梯度洗脱, 共得到 6 个流分 Fr. D1~D6。Fr. D5(1.8 g)经硅胶(300~400)柱色谱, 石油醚-丙酮(10:1、5:1、2.5:1、1:1)梯度洗脱得到化合物 **1**(2.9 mg)、**2**(5.2 mg)和流分 Fr. D5a~D5c; Fr. D5b 经半制备高效液相色谱以乙腈-水(45:55)为流动相洗脱, 得到化合物 **3**(9.1 mg, *t_R*=11.1 min)。Fr. D4(1.1 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱分离纯化, 三氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 共得到 4 个流分 Fr. D4a~D4d; Fr. D4c 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-丙酮(2:1)洗脱得到化合物 **4**(7.4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 浅黄色油状物(MeOH), 易溶于三氯甲烷、甲醇; HR-ESI-MS *m/z*: 373.125 4 [*M*+Na]⁺(计算值 373.126 3); [*α*]_D²⁵ +11° (*c* 1.0, MeOH); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 207, 226, 294, 331; IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 442, 2 958, 2 929, 2 855, 1 720, 1 565, 1 488, 1 459, 1 409, 1 347, 1 291, 1 266, 1 153, 1 124, 1 089, 1 041。

结合化合物 **1** 的 HR-ESI-MS 和 ¹³C-NMR 可知其分子式为 C₁₈H₂₂O₇, 不饱和度为 8。IR 光谱显示该化合物结构中含有游离羟基(3 442 cm⁻¹)、甲基(2 985、2 929 cm⁻¹)、次甲基(2 855 cm⁻¹)、羰基

($1\,720\text{ cm}^{-1}$) 和苯环 ($1\,605$ 、 $1\,565$ 、 $1\,488\text{ cm}^{-1}$)。化合物 **1** 的 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , CDCl_3) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz , CDCl_3) (表 1) 清晰地显示其含有 1 个 6,7,8-三取代香豆素骨架结构 (图 1) [δ_{H} 6.36 (1H, d, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-3), 7.61 (1H, d, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-4), 6.68 (1H, s, H-5), 3.89 (1H, s, 6-OCH₃) 和 4.05 (1H, s, 8-OCH₃); δ_{C} 160.4 (s, C-2), 115.6 (d, C-3), 143.6 (d, C-4), 103.9 (d, C-5), 150.1 (s, C-6), 145.2 (s, C-7), 141.4 (s, C-8), 143.1 (s, C-9), 114.9 (s, C-10), 56.5 (6-OCH₃) 和 62.1 (8-OCH₃)]^[8]; HMBC 谱图中质子信号 δ_{H} 3.89 (3H, s) 与 δ_{H} 4.05 (3H, s) 分别与 C-6 (δ_{C} 150.1) 和 C-8 (δ_{C} 141.4) 相关, 说明 2 个甲氧基依次连接在 C-6 和 C-8 位 (图 2), 上述 6,8-二甲氧基-7-取代香豆素骨架包含了 2 个甲氧基信号、3 个烯烃质子信号和 11 个碳信号。除此之外, 化合物 **1** 的 ^1H -和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图还显示了 1 个单峰甲基信号

表 1 化合物 **1** 的 ^1H -和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据 ($400/100\text{ MHz}$, CDCl_3)

碳位	δ_{C}	δ_{H}
2	160.4 (s)	
3	115.6 (d)	6.36 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$)
4	143.6 (d)	7.61 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$)
5	103.9 (d)	6.68 (s)
6	150.1 (s)	
7	145.2 (s)	
8	141.4 (s)	
9	143.1 (s)	
10	114.9 (s)	
1'a	76.7 (t)	4.52 (dd, $J = 10.0, 2.0\text{ Hz}$)
1'b		3.91 (m)
2'	75.2 (d)	3.81 (m)
3'	83.3 (s)	
4'a	34.9 (t)	2.12 (m)
4'b		1.66 (m)
5'a	26.1 (t)	1.92 (m)
5'b		1.92 (m)
6'a	68.3 (t)	3.85 (m)
6'b		3.85 (m)
7'	22.0 (q)	1.17 (s)
OCH ₃ -6	56.5 (q)	3.89 (s)
OCH ₃ -8	62.1 (q)	4.05 (s)

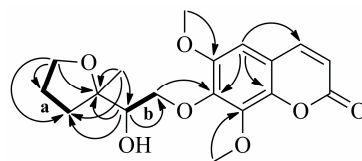


图 2 化合物 **1** 的关键 HMBC (↷) 和 ^1H - ^1H COSY (—) 相关

Fig. 2 Key HMBC (↷) and ^1H - ^1H COSY (—) correlations of compound **1**

和剩余的 7 个碳信号, 包括 1 个甲基、4 个亚甲基 [其中 2 个与氧相连, 信号分别在 δ_{C} 76.7 (C-1') 和 68.3 (C-6')], 1 个连氧次甲基 (δ_{C} 75.2, C-2') 和 1 个连氧的叔碳 (δ_{C} 83.3, C-3')。化合物 **1** 的 DEPT-135 谱图表明其含有 21 个氢原子, 然而它的分子式 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7$) 显示了 22 个氢原子, 这提示 **1** 的结构式中含有 1 个活泼氢, 这个活泼氢被归属为 -OH 上的质子, IR 光谱在 $3\,442\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰进一步支持了上述 -OH 官能团的存在。化合物 **1** 的不饱和度为 8, 上述 ^1H 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 信息归属了 8 个不饱和度中的 7 个, 这说明 **1** 的结构中还存在 1 个环系结构单元。结合 **1** 的 ^1H 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 信息, 对 ^1H - ^1H COSY 谱图进行分析可知其含有 a [-CH₂ (4')-CH₂ (5')-CH₂ (6')-O-] 和 b [-O-CH₂ (1')-CH₂ (2')-] 2 个亚结构片段 (图 2)。HMBC 谱图中 H-2' (δ_{H} 3.81) 与 C-3' (δ_{C} 83.3) 和 C-4' (δ_{C} 34.9) 相关, 说明片段 a 的 C-4' 端与片段 b 的 C-2' 端经由 C-3' 相连; H-7' (δ_{H} 1.17) 与 C-3' (δ_{C} 83.3)、C-2' (75.2) 和 C-4' (δ_{C} 34.9) 相关, 说明 C-7' 甲基也连接在 C-3' 上; H-6' (δ_{H} 3.85) 与 C-3' 的 HMBC 相关以及 C-3' (δ_{C} 83.3) 与 C-6' (68.3) 的化学位移值, 说明 C-3' 与 C-6' 均通过 1 个氧原子相连接, 即化合物 **1** 中剩余的 1 个环系结构是 C-3' 和 C-6' 之间形成的五元氧环; 此外, C-2' 位上的羟基是通过 HMBC 谱中 H-2' (δ_{H} 3.81) 与 C-1' (δ_{C} 76.7)、C-7' (δ_{C} 22.0)、C-3' (δ_{C} 83.3) 和 C-4' (δ_{C} 34.9) 的相关得以证实; 最后, H-1' 和 H-5 与 C-7 (δ_{C} 145.2) 的 HMBC 相关说明片段 b 的 C-1' 端通过氧原子与 C-7 相连。至此, 所有的 NMR 信号被归属, 总共 8 个不饱和度得以解释。进一步, 多种方法被用于尝试确定化合物 **1** 的构型, 包括 NOESY 实验、单晶的培养、乙酰化反应、ECD 和比旋光值的计算。然而, 遗憾的是依然无法证实 C-2' 和 C-3' 的构型, 这个问题有待进一步研究。最终, 化合物 **1** 的平面结构被确定, 如图 1 所示, 经 SciFinder 检索为新化合物, 命名为青花椒素 A。

化合物 **2**: 白色无定形粉末 (氯仿); 分子式 $C_{10}H_8O_3$, EI-MS m/z : 176 $[M]^+$; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 207, 230, 256, 297, 350; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 1 710, 1 616, 1 505, 1 460, 1 400, 1 346, 1 282, 1 233, 1 202, 1 126, 1 020; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.99 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-4), 7.63 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 6.95 (1H, dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, H-6), 6.99 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 6.29 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-3), 3.86 (3H, s, 7-OMe); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.4 (C-2), 111.6 (C-3), 145.2 (C-4), 127.7 (C-5), 113.7 (C-6), 161.1 (C-7), 103.7 (C-8), 156.1 (C-9), 111.5 (C-10), 56.6 (7-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故化合物 **2** 鉴定为 7-甲氧基香豆素。

化合物 **3**: 白色无定形粉末 (氯仿); 分子式 $C_{10}H_8O_4$, EI-MS m/z : 192 $[M]^+$; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 209, 230, 254, 295, 347; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 397, 1 691, 1 621, 1 561, 1 509, 1 439, 1 388, 1 291, 1 140, 1 010; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.38 (1H, brs, 6-OH), 7.90 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.02 (1H, s, H-5), 7.01 (1H, s, H-8), 6.24 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 3.87 (3H, s, 7-OMe); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD₃OD) δ : 164.0 (C-2), 109.8 (C-3), 146.1 (C-4), 103.9 (C-5), 153.7 (C-6), 147.1 (C-7), 113.0 (C-8), 151.5 (C-9), 112.3 (C-10), 56.7 (7-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故化合物 **3** 鉴定为异东茛菪内酯。

化合物 **4**: 白色无定形粉末 (MeOH); $C_9H_6O_4$, EI-MS m/z : 178 $[M]^+$; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 206, 229, 256, 300, 352; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 334, 3 199, 1 668, 1 617, 1 567, 1 402, 1 363, 1 287, 1 150; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.19 (1H, brs, 7-OH), 9.38 (1H, brs, 6-OH), 7.86 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-4), 7.0 (1H, s, H-5), 6.74 (1H, s, H-8), 6.16 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.1 (C-2), 112.8 (C-3), 146.0 (C-4), 113.1 (C-5), 144.4 (C-6), 152.0 (C-7), 103.6 (C-8), 150.5 (C-9), 112.5 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为秦皮乙素。

4 抗炎活性实验

采用 MTT 法测试化合物对 RAW264.7 细胞的毒性作用, 通过 Griess 法测定化合物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生 NO 的含量以地塞米松为阳性对照^[11]。结果表明化合物 **1~4** 均对 NO 的产生具有抑制作用, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 (0.21 ± 0.03)、(0.92 ± 0.16)、(0.15 ± 0.02) 和 (0.26 ± 0.04) $\mu\text{mol/L}$, 地塞米松的 IC_{50} 为 (0.14 ± 0.02) $\mu\text{mol/L}$ 。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 刘锁兰, 魏璐雪, 王 动, 等. 青花椒化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1991, 26(11): 836-840.
- [4] Nguyen P H, Zhao B T, Kim O, *et al.* Anti-inflammatory terpenylated coumarins from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium* with α -glucosidase inhibitory activity [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(2): 276-281.
- [5] Min B K, Hyun D G, Jeong S Y, *et al.* A new cytotoxic coumarin, 7-[(*E*)-3',7'-dimethyl-6'-oxo-2',7'-octadienyl] oxycoumarin, from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium* [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(5): 723-726.
- [6] Jo Y S, Huong D T L, Bae K H, *et al.* Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(1): 84-85.
- [7] Tsai I L, Lin W Y, Teng C M, *et al.* Coumarins and antiplatelet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium* [J]. *Planta Med*, 2000, 66(7): 618-623.
- [8] Dao T T, Tran T L, Kim J, *et al.* Terpenylated coumarins as SIRT1 activators isolated from *Ailanthus altissima* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(7): 1332-1338.
- [9] 王 倩, 王 丰, 薛 松, 等. 茵陈中 7-甲氧基香豆素的分离与含量测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(1): 12-14.
- [10] 王清吉, 王友绍, 何 磊, 等. 厚藤 *Ipomoea Pes-Caprae* (L.) Sweet 的化学成分研究 (I) [J]. 中国海洋药物, 2006, 25(3): 15-17.
- [11] 许洪波, 杨 康, 刘澳昕, 等. 11 种中药提取物对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞生成一氧化氮的影响 [J]. 中南药学, 2018, 16(1): 72-75.