

藏药波棱瓜子中酚性成分的研究

戴宇轩¹, 胡 沙¹, 蒋合众¹, 谭 睿^{1,2,*}¹西南交通大学生命科学与工程学院; ²西南交通大学医学院, 成都 610031

摘要:通过采用多种柱层析和重结晶的方法分离纯化波棱瓜子乙酸乙酯部位, 研究藏药波棱瓜子 *Herpetospermum caudigerum* (Wall.) 种子中的化学成分。同时结合理化性质、TLC、¹H NMR 和 MS 等分析测试方法鉴定化合物的结构。从藏药波棱瓜子乙酸乙酯部位分离并鉴定了 7 个酚性成分, 分别为 Herpetol (1)、Herpetolide A (2)、(9R)-9-hydroxylariciresinol (3)、Evofolin-B (4)、Kaempferol 3,7-O- α -L-dirhamnoside (5)、Herpetin (6)、Herpetrione (7)。其中, 化合物 3、4、5 为首次从该植物中分离得到。选用白色念珠菌、耻垢分枝杆菌、新型隐球酵母和枯草芽孢杆菌对以上单体化合物进行了抗菌活性测试, 化合物 6、7 对白色念珠菌具有一定的抑制活性, MIC 分别为 10.5、9.2 μ m。

关键词:波棱瓜子; 乙酸乙酯部位; 酚性成分; 分离纯化; 抗菌活性。

中图分类号: R284.2; R965

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)2-0280-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.2.016

Study on phenolic constituents from *Herpetospermum caudigerum*DAI Yu-xuan¹, HU Sha¹, JIANG He-zhong¹, TAN Rui^{1,2,*}¹School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University;²College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: To investigate the chemical constituents from the seed of *Herpetospermum caudigerum* (Wall.), the chemical constituents were separated and purified by using a combination of various chromatographic techniques including column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, and recrystallization. Their structures were elucidated by physical and chemical properties, Thin-Layer Chromatography (TLC), spectrum analysis like ¹H NMR, MS and so on. Seven phenolic compounds were identified as Herpetol (1), Herpetolide A (2), (9R)-9-hydroxylariciresinol (3), Evofolin-B (4), Kaempferol 3,7-O- α -L-dirhamnoside (5), Herpetin (6), Herpetrione (7). Among the other compounds, compound 3, 4 and 5 were obtained from this plant for the first time. In addition, antibacterial activity of these compounds was tested by using the *Candida albicans* ATCC 14053, *M. smegmatic* CGMCC 1.562, *Cryptococcus neoformans* ACCC 20337, and *Bacillus subtilis* CICC 10285.

Key words: *Herpetospermum caudigerum* (Wall.); ethyl acetate fraction; phenolic constituents; separation and purification; antibacterial activity.

藏药波棱瓜子, 又名色吉美多, 系葫芦科植物波棱瓜 *Herpetospermum caudigerum* (Wall.) 的成熟干燥种子。主要产于中国西南 (四川、云南、西藏) 及印度等地区, 常生长在海拔 2 300 ~ 3 500 m 的山坡灌丛、林缘及路旁^[1]。为藏医常用药, 性寒, 味苦, 具泻肝火、胆热、解毒的功效, 用于治疗“赤巴”引起的黄疸、肝炎、消化不良及肝胆疾病的配方^[2]。近年

来, 国内外有关波棱瓜子的化学成分报道表明其含有脂肪酸类、木脂素类、氨基酸和多糖类成分^[3]。本课题组通过前期的研究成果表明, 波棱瓜子乙酸乙酯部位对乙肝病毒有明显的抑制作用^[4]。为了进一步揭示其中的活性成分, 本文对波棱瓜子乙酸乙酯部位酚性成分进行了分离研究, 并对分离得到的单体化合物进行了抗菌活性测试, 为后期进一步的药理实验提供重要参考。

1 仪器与试剂

Bruker DRX 400 核磁共振仪; 电子天平; EYE-LA 旋转蒸发仪; 冷却循环装置; Agilent 6210 TOF LC-MS 质谱仪。TH-3560 立式高压灭菌锅、Leica 多

收稿日期: 2017-12-19 接受日期: 2018-03-13

基金项目: 国家自然科学基金 (81473337, 81573563, 81674168); 南京大学医药生物技术国家重点实验室开放基金 (01KF-201404); 2017 年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目” (财社 [2017] 66 号)

* 通信作者 Tel: 86-28-87634667; E-mail: tanrui@home.swjtu.edu.cn

功能显微镜、接种环、电子天平、移液枪、超净工作台、恒温摇床、恒温培养箱、恒温培养室、96孔微孔稀释板等。柱层析所用硅胶(200~300目、300~400目)由青岛海洋化工厂生产;Sephadex LH-20 购买自瑞典 Pharmacia Biotech;TLC 层析板(0.15~0.2 mm)为烟台市芝罘黄务硅胶开发公司生产。其余试剂为分析纯。

波棱瓜子药材购买于四川省泸定县,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定为波棱瓜 *Herpetospermum caudigerum* (Wall.) 的干燥种子,标本部分留样保存于西南交通大学生命科学与工程学院 3704 实验室。

2 提取与分离

取 10 kg 波棱瓜子的干燥种子粉碎成粗粉,用 95% 乙醇对粗粉进行渗漉提取,合并滤液,减压回收溶剂,将总浸膏用水分散,依次加入石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取 3 到 4 次,分别减压浓缩得到石油醚部位浸膏重约 217 g,乙酸乙酯部位浸膏重约 208 g,正丁醇部位重约 107 g。

乙酸乙酯部位进行除糖除脂处理后,取 146 g 浸膏进行硅胶柱层析,以三氯甲烷-甲醇(100:1~1:1)体系洗脱,并以 TLC 检测判断合并,最终粗分为 9 个组分(Fr. 1~Fr. 9)。

取 Fr. 4(32 g)进行硅胶柱层析,以石油醚-丙酮(40:1~1:1)的系统进行梯度洗脱,依据 TLC 检测,合并成 8 个组分(Fr. 4-1~Fr. 4-8)。选取 Fr. 4-1(7.3 g),继续硅胶柱层析,最后反复进行 Sephadex LH-20 凝胶柱层析,洗脱剂分别采用三氯甲烷-甲醇(1:1)、纯甲醇,最终分离得到化合物 1(12.8 mg)。

选取 Fr. 4-7(6.6 g)进行硅胶柱层析,以石油醚-丙酮(40:1~0:1)梯度洗脱。TLC 鉴别合并后,选取 Fr. 4-7-1(1.2 g),采用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析进一步纯化(洗脱剂:纯甲醇),之后反复进行硅胶柱层析,最终得到化合物 2(17.4 mg)。将 Fr. 4-7-3(1.8 g)进行硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯(50:1~0:1)梯度洗脱,经 TLC 检测合并后得到 6 个组分(Fr. 4-7-3-1~Fr. 4-7-3-6)。选取 Fr. 4-7-3-2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析,洗脱系统为三氯甲烷-甲醇(1:1),得到化合物 6(10.8 mg)。再将 Fr. 4-7-3-4 反复经凝胶柱分离纯化,洗脱系统依次为三氯甲烷-甲醇(1:1),纯甲醇,最终得到化合物 7(9.6 mg)。另取 Fr. 4-7-5(2.3 g)凝胶柱层析,三氯甲烷-甲醇(1:1)为洗脱剂分离合并后取 Fr. 4-7-5-4(45

mg),再次采用凝胶柱层析(纯甲醇)分离得到白色粉末状固体,即为化合物 3(11.5 mg)。

取 Fr. 4-8(4.9 g)以石油醚-乙酸乙酯(20:1~0:1)梯度洗脱,分离得到 5 个组分。其中 Fr. 4-8-3 反复经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析,洗脱系统依次为:三氯甲烷-甲醇(1:1),纯甲醇,最终得到化合物 4(20.2 mg)。将 Fr. 4-8-1 经凝胶柱层析(洗脱剂:纯甲醇)得到单体化合物 5(10.7 mg)。

3 结构的鉴定

化合物 1 无色油状物($C_{20}H_{20}O_6$);HR-ESI-MS m/z 379.1174 $[M + Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 7.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.42 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 7.33 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 7.03 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6), 6.99 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.69 (1H, dt, $J = 15.8, 1.4$ Hz, H-7), 6.41 (1H, dt, $J = 15.8, 5.4$ Hz, H-8), 4.87 (2H, d, $J = 5.4$ Hz, H-9'), 4.25 (2H, dd, $J = 5.4, 1.1$ Hz, H-9), 4.04 (3H, s, -OMe), 3.94 (3H, s, -OMe)。通过对比已知化合物的物理数据以及波谱数据,与文献^[5]对比一致,故确定其为木脂素二聚体(herpetol)。

化合物 2 白色无定形粉末($C_{16}H_{14}O_6$);HR-ESI-MS m/z 325.0674 $[M + Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ : 8.12 (1H, s, H-1'), 7.89 (1H, s, H-4'), 6.93 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-6), 6.88 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-8), 5.83 (1H, s, -CH₂OH), 5.01 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, -CH₂-), 4.09 (3H, s, 2'-OMe), 3.87 (3H, s, 7-OMe)。通过对比已知化合物的物理数据以及波谱数据,以上数据与文献^[6]对比基本一致,故确定其为波棱内酯 A(herpetolide A)。

化合物 3 无色油状物($C_{20}H_{24}O_7$);HR-ESI-MS m/z 399.1417 $[M + Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 7.56 (1H, s, -OH), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.00 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 6.84 (1H, dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, H-6'), 6.83 (1H, d, $J = 8.1, 1.8$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 4.47 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-7'), 4.44 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-9), 3.85 (3H, s, -OMe), 3.84 (3H, s, -OMe), 3.67 (2H, dd, $J = 9.0, 7.1$ Hz, H-9'), 3.62 (1H, m, H-8), 3.51 (1H, t, $J = 8.6$ Hz, H-8'), 2.59 (1H, m, H-7), 2.24 (1H, m, H-7)。通过对比已知化合物的物理数据以及波谱数据,与文献^[7]对比一致,故确定其为(9R)-

9-羟基落叶松脂醇[(9R)-9-hydroxylariciresinol]。

化合物 4 淡黄色油状物 ($C_{17}H_{18}O_6$) ;HR-ESI-MS m/z 341.0962 [$M + Na$]⁺ ;¹H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 7.66 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6), 7.59 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.99 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.80 (1H, dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, H-6'), 6.74 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 4.82 (1H, dd, $J = 8.6, 5.2$ Hz, H-8), 4.24 (1H, dd, $J = 10.4, 8.8$ Hz, H-9), 3.87 (3H, s, -OMe), 3.81 (3H, s, -OMe), 3.70 (1H, dd, $J = 10.5, 5.2$ Hz, H-9)。通过对比已知化合物的物理数据以及波谱数据,与文献^[8]对比一致,故确定其为棘叶吴茛素 B (evofolin-B)。

化合物 5 淡黄色油状物 ($C_{27}H_{30}O_{14}$) ;HR-ESI-MS m/z 601.1526 [$M + Na$]⁺ ;¹H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 12.69 (1H, s, -OH), 7.89 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'), 7.89 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6'), 7.03 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 7.03 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.47 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.64 (1H, d, $J = 1.4$ Hz), 5.54 (1H, d, $J = 1.4$ Hz), 4.22 (1H, br s), 4.05 (1H, br s), 3.84 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 3.70 (1H, m), 3.60 (1H, m), 3.50 (1H, m), 3.34 (1H, m), 1.22 (3H, d, $J = 6.1$ Hz), 0.90 (3H, d, $J = 5.7$ Hz)。

通过对比已知化合物的物理数据以及波谱数据,与文献^[9,10]对比一致,故确定其为山奈昔 (kaempferol 3,7- O - α -L-dirhamnoside)。

化合物 6 白色无定型粉末 ($C_{30}H_{34}O_9$) ;HR-ESI-MS m/z 561.2116 [$M + Na$]⁺ ;¹H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 7.63 (1H, s, 4-OH), 7.46 (1H, s, 3''-OH), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.94 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2''), 6.89 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6), 6.80 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.76 ~ 6.78 (3H, m, H-6', 5'', 6''), 6.74 (1H, br s, H-2'), 5.52 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-7), 4.78 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-7''), 4.12 (1H, m, H-9'), 3.97 (1H, dd, $J = 8.6, 6.2$ Hz, H-9''), 3.85 (2H, m, H-9''), 3.83 (3H, s, 3-OMe), 3.81 (6H, s, 3', 4''-OMe), 3.68 (1H, dd, $J = 8.0, 6.8$ Hz, H-9), 3.52 (1H, dd, $J = 12.6, 6.5$ Hz, H-8''), 2.97 (1H, m, H-7'), 2.71 (1H, m, H-8), 2.55 (1H, m, H-7'), 2.31 (1H, m, H-8')。根据以上波谱数据与文献^[12]的对照,信息基本一致,故确定其为波棱素 (herpetin)。

化合物 7 无色油状物 $C_{30}H_{32}O_{10}$;HR-ESI-MS m/z 575.1858 [$M + Na$]⁺ ;¹H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ : 7.60 (1H, dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, H-6), 7.58 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.87 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.87 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2''), 6.81

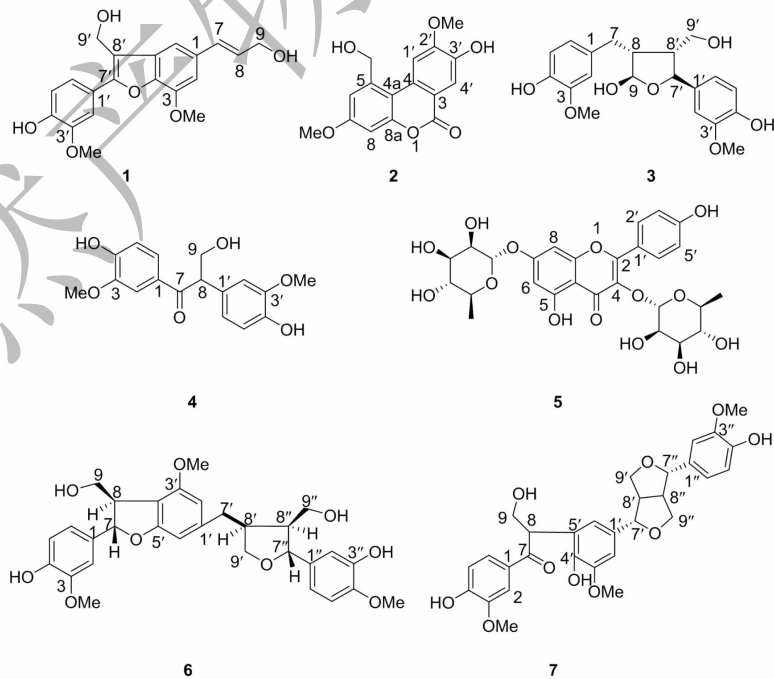


图 1 化合物 1~7 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-7

(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 6.77 ~ 6.79 (2H, m, H-2', 6''), 6.60 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-6'), 5.20 (1H, dd, $J = 8.1, 4.6$ Hz, -CH₂OH), 4.68 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-7'), 4.59 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-7''), 4.13 ~ 4.24 (3H, m, H-9, 9', 9''), 3.89 (6H, s, 3, 3'-OMe), 3.87 (3H, s, 3''-OMe), 3.77 ~ 3.86 (3H, m, H-8, 9', 9''), 2.93 ~ 3.07 (2H, m, H-8', 8'')。与文献^[13]对比基本一致,故确定其为木脂素三聚体(herpetri-one)。

4 活性测试

4.1 抗菌活性研究

使用镊子夹取牙签(已灭菌)挑取平板上的单菌落,并置于已灭菌的液体 Mueller-Hinton 培养基中,在 35 °C 摇床中培养过夜,随后将 80 ~ 500 μ L 菌液转接至新液体培养基中,用同样的方法培养 2 ~ 6 h;将菌液稀释至麦氏标准 0.5,并用无菌水稀释 20 倍,用排枪在 96 孔板中每个孔加 20 μ L,随后将化合物先后溶解于 50 μ L DMSO、无菌水中,配成 10

μ M 浓度的药液,并在微孔中加入 50 μ L 的无菌水,采用二倍稀释法稀释成一定梯度浓度。在 96 孔板中加入梯度浓度的药液,待微孔稀释板振荡混合后,在 35 °C 摇床中培养 16 ~ 20 h;最后,于有黑色背景光源处观察实验结果,有菌生长的孔底部有扣子样沉淀或呈现出弥漫型浑浊,无菌生长的孔所含的最低样品浓度即为该样品的最小抑菌浓度 MIC^[14,15]。

4.2 活性测试结果

对所分离得到的 7 个单体化合物进行了抗菌活性实验,以链霉素为阳性对照,结果如下(见表 1):在 10 μ M 的浓度下,除化合物 6 和 7 对白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 14053)具有一定的抑制活性外,其余大部分单体化合物对白色念珠菌,新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans* ACCC 20337),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* CICC 10285)和耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* CGMCC 1.562)并没有表现出良好的抑制活性。

表 1 部分化合物的抗菌活性测试结果

Table 1 The test results of antibacterial activity of some compounds

供试菌株 Tested strain	化合物 6 Compound 6		化合物 7 Compound 7	
	最低抑制浓度 MIC (μ M)	抑菌活性 Inhibitory activity	最低抑制浓度 MIC (μ M)	抑菌活性 Inhibitory activity
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i> ATCC 14053	10.5	+	9.2	+
耻垢分枝杆菌 <i>M. smegmatis</i> CGMCC 1.562	> 10	-	> 10	-
新型隐球酵母 <i>Cryptococcus neoformans</i> ACCC 20337	> 10	-	> 10	-
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> CICC 10285	> 10	-	> 10	-

注:MIC 代表最低抑制浓度;“+”表示具有较好的抑制活性;“-”表示测试浓度(10 μ M)下没有显著的抑制活性。

Note: MIC represents minimum inhibition concentration; “+” shows good inhibitory activity; “-” shows no significant inhibitory activity (Concentration: 10 μ M).

5 讨论

作为藏药常用药,波棱瓜子具有较好的药理活性和疗效^{[3][11]},但其药理活性的报道主要还是以其粗提物或不同的极性部位为主,其单体化合物药理活性的研究报道较少,因此从波棱瓜子中获得单体化合物,丰富天然产物的类型,并进行活性研究是阐明其药用价值的关键。本实验从波棱瓜子乙酸乙酯部位分离得到 7 个酚性成分,其中包括 6 个木脂素类、1 个黄酮苷类化合物,抗菌活性实验结果表明,波棱瓜子中木脂素类成分 Herpetin(6) 和 Herpetri-one(7)有可能是波棱瓜子具有抗白色念珠菌活性的药效物质基础之一,但这些化合物抗白色念珠菌活性的作用机制还需要做进一步探讨。同时,波棱

瓜子乙酸乙酯部位可能还有更多木脂素类和黄酮苷类化学成分未被发现或报道,存在一定的研究价值,能够为波棱瓜子化学成分和药理活性的深入研究提供重要参考,从而进一步促进其研究与开发。

致谢: 南京大学医药生物技术国家重点实验室功能生物分子研究所测试所有波谱数据,同时,特别感谢南京大学生命科学学院硕士研究生张雯景和邓欣召在活性测试方面给予的帮助。

参考文献

- Li LY, DEJI LM, Wei YF, et al. Literature data investigation in semem of *Herpetospermum pedunculatum* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30: 893-895.