

烟叶中一个新的氨基糖苷化合物

杨彩艳^{1,2*}, 元辉雄³, 潘乔丹^{1,2}, 黄元河^{1,2}, 杨文沛^{1,2}, 黄祖良^{1,2}

¹右江民族医学院药学院,百色,533000;²广西高校右江流域地道中药材(民族医药)研究重点实验室,百色 533000;³右江民族医学院附属医院,百色,533000

摘要:采用硅胶、Sephadex LH-20、MCI GEL CHP 20P、Sephadex LH-20 等柱色谱分离纯化技术,从烟叶中分离得到一个新的化合物。根据波谱数据分析确定新化合物的结构为 3-*O*-二十六酰基-1-*O*-(6-去氧-6-羟基氨基- α -D-葡萄糖基)-甘油(3-*O*-heptacosanoyl-1-*O*-(6-deoxy-6-hydroxyamino- α -D-glucosyl)-glycerol),命名为烟草羟基氨基糖苷(**1**)。化合物**1**为首个羟基氨基糖类天然产物。

关键词:烟草羟基氨基糖苷;分离方法;化学结构;烟草

中图分类号:S572;Q946

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)3-0455-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.3.014

One new aminoglucoside compound from the leaves of *Nicotiana tabacum*

YANG Cai-yan^{1,2*}, YUAN Hui-xiong³, PAN Qiao-dan^{1,2}, HUANG Yuan-he^{1,2},
YANG Wen-pei^{1,2}, HUANG Zu-liang^{1,2}

¹The Pharmaceutical school of Youjiang Medical university for nationalities, Baise 533000, China; ²The key laboratory of Guangxi colleges and universities in Youjiang river drainage area for studying traditional Chinese medicinal herbs (folk medicine), Baise 533000, China; ³The affiliated hospital of Youjiang medical university for nationalities, Baise 533000, China

Abstract: One new and naturally unusual aminoglucoside compound, 3-*O*-heptacosanoyl-1-*O*-(6-deoxy-6-hydroxyamino- α -D-glucosyl)-glycerol named nicotabaamino glucoside (**1**) was isolated from the leaves of *Nicotiana tabacum* by using various chromatography methods. Its structure was determined based on extensively spectral analyses such as UV, IR, MS, 1D and 2D NMR, etc.

Key words: Nicotabahydroxyaminoglucoside, Isolation Method, Chemical structure, *Nicotiana tabacum*

茄科烟草属植物包含普通烟草、黄花烟草和碧冬烟草三个亚属共约 67 个品种,其中除普通烟草(*Nicotiana tabacum* L.)和黄花烟草(*Nicotiana rustica* L.)可以直接栽培利用外其它均为野生种;野生烟形态各异、用途不一、无直接商业价值,但它们具备较为突出的抗病、抗虫、抗逆性基因,这些基因转移到栽培品种得到如 Kentucky 56、Burley 21、K358 等多种抗病毒、抗虫害烟草种;因此作为重要经济作物的烟草(*N. tabacum*)因其不同品种在育种过程中采用杂交、转移野生烟的品种和基因不同导致其香

味、化学成分、活性差别较大^[1-3]。前人对烟叶非挥发性化学成分研究发现包括黄酮、生物碱、萜类、香豆素、酚类化合物等大约两百个化合物,我们之前从云南采集的烟叶中分离到 6 个降倍半萜、2 个倍半萜和 1 个生物碱共 9 个新化合物^[4-10]。前人关于烟草及其化合物药理活性研究表明其具有如抗 AD(阿尔茨海默病)、抗癌、抗菌、降血糖和抗炎等多种生物活性^[5,9,11-13]。为研究环境、气候、地理位置等对植物化学成分及生物活性影响,为扩大烟草的利用价值提供科学理论和实验依据,我们对世界长寿之乡广西乐业县烟叶的化学成分及生物活性进行系统研究,结果发现一个新的、天然产物中结构不常见的化合物烟草羟基氨基糖苷(**1**)。通过广泛的核磁共振波谱数据分析确定化合物**1**的结构为 3-*O*-二十六酰基-1-*O*-(6-去氧-6-羟基氨基- α -D-葡萄糖基)-甘油

收稿日期:2018-01-25 接受日期:2018-05-08

基金项目:广西高校科学技术研究项目重点项目(KY2015ZD095);右江民族医学院博士引进科研启动课题(右医科学[2014]2号)

*通信作者 Tel:86-776-2820796;E-mail:yjsyangcayian@163.com

[3-*O*-heptacosanoyl-1-*O*-(6-deoxy-6-hydroxyamino- α -D-glucosyl)-glycerol]。在化合物 **1** 对胃癌 MGC-803 细胞的生物活性实验中, **1** 没有表现明显的生物活性。

1 实验

1.1 仪器和材料

旋光使用 Jasco model 1020 polarimeter 旋光仪 (Horiba, Tokyo, Japan) 测定。高分辨质谱 (HRES-IMS) 采用 LCMS-IT-TOF 质谱仪 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 测定; 红外光谱 (IR) 经 KBr 压片后用 Bio-Rad FTS-135 型红外光谱仪 (Bio-Rad, Hercules, California, USA) 测定; 核磁共振谱采用 Bruker DRX-500 和 Bruker Avance III-600 型超导核磁共振仪 (Bruker, Bremerhaven, Germany) 测定。柱色谱的材料为硅胶 (200~300 目, 青岛美高集团有限公司, 青岛, 中国)、 C_{18} (Merck, Darmstadt, Germany)、Sephadex LH-20 (Amersham Bioscience, Sweden) 和 MCI CHP 20P (Mitsubishi Chemical Institute, Tokyo, Japan)。HP90 CO_2 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司, 上海, 中国)、DMIL LED 倒置式生物显微镜 (Leica, Solms, Germany) 和 MK3 酶标仪 (上海塞默飞世尔仪器有限公司, 上海, 中国) 用于活性测试。

烟叶采自广西壮族自治区乐业县, 由右江民族医学院的黄元河副教授鉴定为 *N. tabacum* Linn。标本 (No. 2015-06-06) 存放于右江民族医学院药学院杨彩艳老师研究组。

1.2 提取和分离

干烟叶 (2.6 kg) 依次使用 EtOH- H_2O (90:10, 50:50, v/v) 浸提 3 次, 每次 3 天, 最后用沸水提取 0.5 h, 提取液混合浓缩后进一步使用 H_2O 和 EtOAc 萃取。把 EtOAc 层萃取液回收后获得 EtOAc 部分浸

膏 (498 g)。EtOAc 部分浸膏经过硅胶柱色谱 (3.0 kg, 20.0 \times 100 cm) 使用 $CHCl_3$ -MeOH- H_2O (100:0:0, 95:5:0, 90:10:0, 80:20:2) 作为流动相分离得到 Frs. 1-8。Fr. 7 (38 g) 使用 MCI CHP 20P 柱层析 (310 g, 4.0 \times 40 cm) 以 MeOH- H_2O (20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0) 洗脱产生 Frs. 7.1-7.5。Fr. 7.2 (12.9 g) 通过硅胶柱色谱 (300 g, 6.0 \times 50 cm) 以 EtOAc-MeOH- H_2O (80:20:2) 为流动相分离提供 Frs. 7.2.1~7.2.4。Fr. 7.2.4 (5.5 g) 经过硅胶柱色谱 CC (160 g, 5.0 \times 50 cm) 以 EtOAc-MeOH-HCOOH- H_2O (85:15:1.5:1.5) 为流动相洗脱获得 Frs. 7.2.4.1-7.2.4.6。Fr. 7.2.4.5 (0.94 g) 先使用硅胶柱层析 CC (30 g, 1.8 \times 50 cm) 以 $CHCl_3$ -MeOH-HCOOH (80:20:2) 为流动相分离, 进一步使用 Sephadex LH 20 (50 g, 1.4 \times 150 cm) 纯化获得化合物 **1** (5 mg)。

1.3 活性测试

化合物 **1** 在胃癌 MGC-803 细胞上的活性测试参考我们之前报道的方法进行^[14]。把细胞接种于 96-孔培养板并保持 5000 个细胞/mL 的密度于 37 $^{\circ}C$ 和 5% CO_2 条件下培养 1 天。在测试组和空白组中都以新鲜溶液代替培养液在 37 $^{\circ}C$ 、饱和湿度和 5% CO_2 条件下培养 2 天。然后在孔中加入 20 μL MTT 试剂 (5 mg/mL) 并在 37 $^{\circ}C$ 下培养 4 h。最后使用酶标仪读出各孔的光密度值。

2 结果和讨论

2.1 结构鉴定

烟草氨基糖苷 (**1**), (+) HR-ESI-MS m/z 648.4097 [$M+H$]⁺ 表明其分子式为 $C_{35}H_{69}O_9N$, 不饱和度为 2。IR 表明其含有羟基和羰基 (3417, 1737 cm^{-1}); 1H 和 ^{13}C NMR 数据 (表 1) 表明其含有一个正构长链酰基 [δ_H 2.32 (m), 1.62 (m), 1.34 (m),

表 1 化合物 **1** 在甲醇中的 1H 和 ^{13}C NMR 数据 (δ 为 ppm, J 为 Hz)

Table 1 1H and ^{13}C NMR data of compound **1** in methanol- d_4 (δ in ppm, J in Hz)

No.	δ_H	δ_C	No.	δ_H	δ_C
1	4.07, dd, 10.7, 5.3; 3.54, dd, 10.7, 6.3	67.1, t	6'	3.35, dd, 14.0, 2.3; 2.90, dd, 14.0, 9.3	54.5, t
2	5.28, m	71.6, d	1"		175.1, s
3	4.48, dd, 12.2, 2.7; 4.20, dd, 12.2, 6.8	64.0, t	2"	2.32, m	35.1, t
1'	4.74, d, 3.6	100.0, d	3"	1.62, m	26.0, t
2'	3.40, dd, 9.6, 3.6	73.4, d	4"-23"	1.28, m	30.1-31.2, t
3'	3.60, t, 9.6	75.1, d	25"	1.26, m	33.1, t
4'	3.08, t, 9.6	75.2, d	26"	1.34, m	23.8, t
5'	4.01, ddd, 9.6, 9.3, 2.3	70.2, d	27"	0.88, t, 7.0	14.6, q

1.28 (m), 1.26 (m) 和 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz); δ_C 175.1, 35.1, 33.1, 30.1-31.2, 26.0, 23.8 和 14.6], 糖基 [δ_H 4.74 (d, $J = 3.6$ Hz), 3.35 (dd, $J = 14.0, 2.3$ Hz), 2.90 (dd, $J = 14.0, 9.3$ Hz); δ_C 100.0, 73.4, 75.1, 75.2, 70.2 和 54.5] 和一个甘油基 [δ_H 4.07 (dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz), 3.54 (dd, $J = 10.7, 6.3$ Hz), 5.28 (m), 4.48 (dd, $J = 12.2, 2.7$ Hz) 和 4.20 (dd, $J = 12.2, 6.8$ Hz)]; δ_C 67.1, 71.6 和 64.0]。此外,糖基的 ^1H 和 ^{13}C NMR数据与methyl 6-deoxy-6-hydroxyamino- α -D-glucopyranoside 非常相似推测糖基为6-去氧-6-羟基氨基- α -D-葡萄糖基(6-deoxy-6-hydroxyamino- α -D-glucosyl)^[15]。糖基中 H-1' 和 H-2' 之间较小的 ^1H - ^1H 耦合常数(3.6 Hz), ^{13}C NMR 中 C-6' 化学位移从 α -D-葡萄糖基中 60.9 向高场移动到化合物 1 中 54.5, 以及 ROESY 中 H-1' (δ_H 4.74)/H-2' (3.40)/H-4' (3.08)/H-6' a (2.90) 和 H-3' (3.60)/H-5' (4.01) 关键的相关关系

(见图 2) 证实了以上的推测^[16]。HMBC 中 H-1 (4.07)/C-1' (100.0), H-3 (4.20)/C-1'' (175.1) 相关关系(见图 2)表明糖基和酰基分别连接在甘油基团的 C-1 和 C-3 上。最后根据分子式可推测正构长链酰基为二十六酰基。至此化合物 1 的结构鉴定为 3-O-二十六酰基-1-O-(6-去氧-6-羟基氨基- α -D-葡萄糖基)-甘油(3-O-heptacosanoyl -1-O-(6-deoxy-6-hydroxyamino- α -D-glucosyl)-glycerol), 为一新化合物, 命名为烟草羟基氨基糖苷。

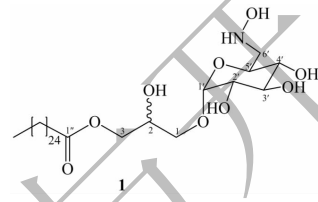


图 1 化合物 1 的结构

Fig. 1 The structure of compound 1

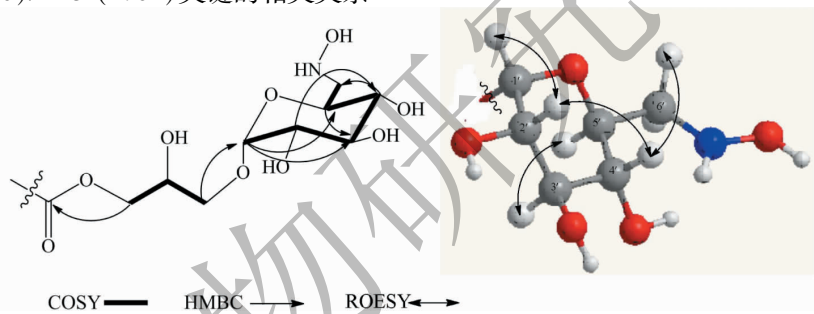


图 2 化合物 1 关键的 ^1H - ^1H COSY, HMBC 和 ROESY 关系

Fig. 2 The key ^1H - ^1H COSY, HMBC and ROESY correlations of compound 1

化合物 1 白色粉末。 $[\alpha]_{24}^D$: -8.5 (c 0.08, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3417, 1737, 1626, 1464, 1384, 1149, 1118 cm^{-1} ; ^1H (500 MHz) 和 ^{13}C (125 MHz) NMR 数据见表 1; HR-ESI-MS m/z 648.4097 (计算值为 $\text{C}_{35}\text{H}_{69}\text{O}_9\text{N}$, 648.5045)。

2.2 活性测试结果

化合物 1 在胃癌 MGC-803 细胞系上体外抗癌活性通过 MTT 法进行评价,但在浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时其对 MGC-803 细胞的抑制率为 18%,没有表现比较明显抗胃癌细胞增值活性。

3 结论

据我们所知,烟草羟基氨基糖苷是首次从天然资源中分离的一个新的、不常见的天然产物,它丰富了天然产物的结构和类型,这将为进一步研究天然资源尤其是烟草植物化学成分提供有价值的信息;

此外,氨基糖苷类是古老的抗微生物药物之一,具有抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、分枝杆菌及抗原虫等抗菌活性,是治疗革兰氏阴性菌和结核杆菌感染的首选药物之一^[17,18]。因此,今后进一步分离纯化烟草化学成分或对烟草羟基氨基糖类化合物进行合成或半合成可以为研究此类化合物生物活性研究提供物质基础,也可以解决本论文中尚未解决的 C-2 原子绝对构型问题。

参考文献

- Ren M, Wang ZD, Mu JM, et al. Overview of species and distribution of tobacco germplasm resources in China[J]. Chin J Tob Sci (中国烟草科学). 2009, 30: 8-14.
- The Editorial Committee of the Administration Bureau of Flora of China. Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Beijing Science & Technology Press, China, 2005.

- 3 Tong DR. Breeding science of tobacco(烟草育种学)[M]. Beijing:China Agriculture Press,China,1997,148-149.
- 4 Yang CY,Mo LJ,Sun PL,et al. Review on chemical constituents and bioactivities of *Nicotiana tabacum*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:1657-1663.
- 5 Yang YC,Huang XY,Ma YB,et al. Chemical structure and bioactivity of *cis*-5'-oxopropyl nicotine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2016,41:689-693.
- 6 Yang CY,Geng CA,Huang XY,et al. Noreudesmane sesquiterpenoids from the leave of *Nicotiana tabacum*[J]. Fitoterapia,2014,96:81-87.
- 7 Yang CY,Geng CA,Ma YB,et al. Two new sesquiterpenoid glycosides from *Nicotiana tabacum*[J]. J Asian Nat Prod Res. 2014,16:611-616.
- 8 Wahlberg I,Enzell CR. Tobacco isoprenoids[J]. Nat Prod Rep,1987,4:237-276.
- 9 Phillipson JD,Handa SS. Nicotine N-oxides[J]. Phytochemistry,1975,14:2683-2690.
- 10 Stedman RL. Chemical composition of tobacco and tobacco smoke[J]. Chem Rev,1968,68:153-207.
- 11 Li Y, Li Z,Guo PG,et al. Research progress on the bio-active components of *Nicotiana tabacum* L[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:2157-2163.
- 12 Eterovic' VA,Del Valle-Rodriguez A,Pérez D,et al. Protective activity of (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-cembreatriene-4,6-diol analogues against diisopropyl fluorophosphate neurotoxicity: preliminary structure-activity relationship and pharmacophore modeling[J]. Bioorg Med Chem,2013,21:4678-4686.
- 13 Tanaka H,Uegaki R,Fujimori T,et al. Antibacterial activity of sesquiterpenoids from tobacco leaves elicited by *Pseudomonas solanacearum* and tobacco mosaic virus[J]. Ann Phytopath Soc Japan,1983,49:501-507.
- 14 Yang CY,Lin Y,Li YF,et al. Investigate the antitumors of extracts of different parts from red-fleshed Kiwifruit[J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2017,38:178-181.
- 15 Tsuchiya T,Nakano M,Torii T,et al. Syntheses of methyl 6-deoxy-6-hydroxyamino- α -D-glucopyranoside, 6'-*N*-hydroxykanamycin A, and 6'-*N*-hydroxydibekacin [J]. Carbohydr Res,1985,136:195-206.
- 16 Wu JY, Bai YX, Sirigunqige. Study on flavanoids of *Rhaponticum uniflorum*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2014,26:1225-1228.
- 17 Gao Y. New opportunities of aminoglycoside antibiotics application[J]. Curr Biotechnol. (生物技术进展),2014,4:102-104.
- 18 Deng WJ. Re-evaluation of aminoglycoside drugs in clinical practice[J]. World notes on antibiotics,2010,31:219-223.
- (上接第 440 页)
- 11 Dou H,Fu TJ,Zhang F,et al. Chemical composition of Huangqi injection[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2002,14:14-17.
- 12 Yang FH,Kang C,LI SH,et al. The effects of astragalus flavonoids on the cellular immunity in mice[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2002,12:718-719.
- 13 Li SY,Zhao ZQ,Zhang QB,et al. Effect of total flavones in Huangqi Guizhi Wuwu decoction of mice on immune function *in vitro*[J]. Hebei J Tradit Chin Med(河北中医),2014,36:432-434.
- 14 Zhang LL,Zhou Q,Sun LL. Effect of honey bake on content of three saponins from *Astragali Radix* by HPLC-ELSD[J]. China Exp Formu(中国实验方剂学杂志),2014,2:39-41.
- 15 Zhai YY,Hu MX,Chen AJ,et al. Effects of sulphur fumigation on flavonoids and saponins in *Astragali Radix*[J]. Drugs and Clinic(现代药物与临床),2014,5:489-493.
- 16 Pan HL, Zhang T, Zhao YY. Effect of different extraction methods on determination of astragaloside IV in *Astragali Radix*[J]. J Chin Med Mater(中药材),2004,10:774-775.
- 17 Xiao JP, Guo HC. Main anthocyanins analysis of native pigmented potatoes "Jianchuanhong" and "Zhuanxinwu" of Yunnan province[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2012,24:503-506.
- 18 Wu ZW, Wu YC, Wang L, et al. Effect of different drying methods on six chemical components of *Paeoniae Radix Alba* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:1764-1770.
- 19 Liu M, Zhou J, Zhang QW, et al. Amic solution hydrolysis for improving content of astragaloside IV in extract of *Radix Astragali*[J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中药杂志),2008,6:635-638.