

龙血竭的化学成分及降血糖活性研究

杨周颖^{1,3}, 罗梅芳², 陈雪林^{1,3}, 张玉梅^{1*}

¹中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室, 昆明 650223;

²普洱学院, 普洱 6650003; ³中国科学院大学, 北京 100049

摘要:对龙血竭乙醇提取物的正丁醇萃取物的化学成分及降糖活性进行研究。通过硅胶、Sephadex LH-20、Rp-C₁₈和高效液相色谱反复层析纯化,从龙血竭乙醇提取物的正丁醇萃取物中分离得到6个化合物,运用现代波谱技术将它们的结构分别鉴定为3-methyl resveratrol(1)、dracaenin A(2)、7-hydroxy-3-(4'-methoxybenzyl)-4-chromanone(3)、diosgenin-3-*O*- α -L-pyranorhamnosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside(4)、(22*E*)-3 β -acetoxystigmasta-5,22-diene(5)和nonadecyl alcohol(6)。其中,化合物4为首次从龙血竭中分离得到。对龙血竭乙醇提取物的正丁醇萃取物各分段部位和单体化合物进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性检测,发现化合物1和2具有明显的抑制活性,其IC₅₀值分别为14.62 \pm 0.083和16.03 \pm 0.076 μ M,且化合物2的 α -葡萄糖苷酶抑制活性为首次报道。

关键词:龙血竭;化学成分;降血糖活性; α -葡萄糖苷酶

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0010-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.002

Study on the chemical constituents and hypoglycemic activity of Resina Draconis

YANG Zhou-ying^{1,3}, LUO Mei-fang², CHEN Xue-lin^{1,3}, ZHANG Yu-mei^{1*}

¹Key Laboratory of Tropical Plant Resource and Sustainable Use Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; ²Puer University, Puer 665000, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract:To investigate the chemical components of Resina Draconis and evaluate their hypoglycemic activities, six compounds, 3-methyl resveratrol (1), dracaenin A (2), 7-hydroxy-3-(4'-methoxybenzyl)-4-chromanone (3), diosgenin-3-*O*- α -L-pyranorhamnosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (4), (22*E*)-3 β -acetoxystigmasta-5,22-diene (5) and nonadecyl alcohol (6) were isolated from the *n*-butanol fraction of Resina Draconis by chromatographic techniques including column chromatography of silica gel, Sephadex LH-20, Rp-C₁₈ and HPLC. Their structures were mainly elucidated by NMR and MS spectroscopic techniques. Compound 4 was isolated from the Resina Draconis for the first time. Four subfractions of the *n*-butanol fraction of Resina Draconis and 6 compounds were tested for their inhibitory activities against α -glucosidase, compounds 1 and 2 exhibited potent inhibitory activities with IC₅₀ values of 14.62 \pm 0.083 and 16.03 \pm 0.076 μ M, respectively. The inhibitory activity of compound 2 on α -glucosidase was reported for the first time.

Key words: Resina Draconis; chemical constituents; hypoglycemic activities; α -glucosidase

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性慢性疾病,如果血糖控制不稳定,会产生严重的并发症,降低患者的生活质量,增加患者的护理成本^[1]。目

前,患者通过服用降血糖药物进行治疗,长期服用这些药物,可能会产生一些毒副作用或者不能达到理想的治疗效果,因此寻找降血糖效果好且可以治疗或防止并发症的药物已是研究的热点。

龙血竭是百合科龙血树属剑叶龙血树(*Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen)含脂木材提取而得到的树脂,主要分布在我国云南、广西等地^[2],具有止血^[3]、心肌保护^[4]、抗炎抗菌^[5-7]、降糖降脂^[8]等药理作用。Chen等^[9]研究龙血竭不同提取

收稿日期:2020-01-15 接受日期:2020-04-27

基金项目:中国科学院个性化药物战略性先导科技专项(XDA12040219);国家新药创制重大专项(2019ZX09201001-001-007);中国科学院药物创新研究院自主部署科研项目(CASIMM0520181002);云南省中青年学术技术带头人后备人才项目(2010CI048)

*通信作者 Tel:86-871-65112766;E-mail:zylmei@xtbg.ac.cn

部位对链脲佐菌素性高血糖模型小鼠血糖水平的影响,结果表明龙血竭氯仿部位和乙酸乙酯部位具有降血糖功效。Sha 等^[8]研究表明,龙血素 B 可以促进大鼠胰岛细胞分泌胰岛素,其作用效果明显强于空白对照和阳性对照组格列美脲。Zhou 等^[10]研究表明龙血竭胶囊内粉末能有效促进糖尿病并发症大鼠的溃疡创面修复。这些研究都表明龙血竭具有降血糖及治疗并发症的作用,但是对其降血糖化学活性成分和作用机制研究却较少^[11]。因此,本研究对龙血竭乙醇提取物的正丁醇萃取物进行了化学成分与降血糖活性研究,发现化合物 3-methyl resveratro (1) 和 dracaenin A (2) 具有明显的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,且化合物 2 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性为首次报道。

1 仪器与材料

1.1 仪器和试剂

核磁共振谱用 AVANCE III-600 超导核磁共振仪测定, TMS 为内标; ESI-MS 用 Water AutoSpec Premier 双聚焦三扇形磁质谱仪测定; R-1001VN 型旋转蒸发仪(郑州长城科工有限公司); DLSB-5L/25 型低温冷却液循环泵(巩义市予华仪器有限公司); YP5001N 型电子天平(2-5000 g)(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); AL104 型电子天平(0.000 0 ~ 110 g)(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); SK52008 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限

公司); UV-1 型三用紫外仪(上海顾村光电仪器); 柱层析硅胶(80 ~ 100 目, 200 ~ 300 目)及薄板层析硅胶(GF-254)均为青岛海洋化工厂生产; Sephadex LH-20(美国 Pharmacia 公司); Rp-C₁₈(德国 Merck 公司); 高效液相色谱仪(汉邦科技公司); 所用化学试剂均为工业重蒸试剂或分析纯。

1.2 材料

龙血竭乙醇提取物购于西双版纳雨林制药有限公司; α -葡萄糖苷酶、底物 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside 和阳性对照 quercetin 都购买自 Sigma 公司。

2 实验内容

2.1 提取与分离

将乙醇提取物 1 kg 用水完全溶解后依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取, 各萃取 4 次(每次萃取 2 h), 合并萃取液, 减压浓缩得到乙酸乙酯萃取物 176.5 g, 正丁醇萃取物 124.1 g 以及水相 669.4 g。正丁醇萃取物经正相硅胶柱层析粗分, 用氯仿/甲醇溶剂系统($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲}} = 10:0, 9:1, 6:1, 3:1, 0:1$)梯度洗脱, 得到 A1-A8 组分。A1 经反复硅胶柱层析, Sephadex LH-20 及 Rp-C₁₈ 纯化, 得到化合物 6(4.6 mg)。A2 经反复硅胶柱层析, Sephadex LH-20 及 Rp-C₁₈ 纯化, 得到化合物 1(37.0 mg)、2(5.0 mg)、3(6.8 mg)、5(11.2 mg)。A4 经反复硅胶柱层析, Sephadex LH-20 及 Rp-C₁₈ 纯化, 得到化合物 4(23.2 mg)。化合物 1~6 的化学结构见图 1。

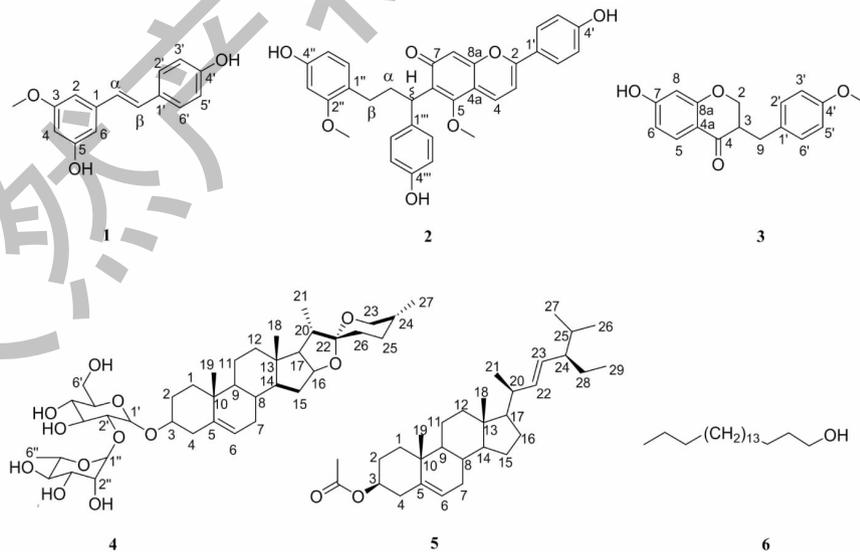


图 1 化合物 1~6 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-6

2.2 体外 α -葡萄糖苷酶活性筛选

将待测样品(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与酶溶液(终浓度 0.025 U/mL)、缓冲液、底物(终浓度 1 mM)顺序依次加入 96 孔酶标板,充分混匀,设置两孔重复。同时设置不含药物的空白对照和 quercetin(终浓度 10 μM)阳性对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min,酶标仪测定 405 nm 处的 OD 值,计算得出 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率。

具有抑制率超 50% 的待测样品进入复筛,在测试浓度基础上向下稀释 5 个浓度,测定 OD 值,计算抑制率,求出相应的半数抑制浓度 IC_{50} 。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{实验孔 OD}_{405 \text{ nm}} / \text{空白孔 OD}_{405 \text{ nm}}) \times 100\%$$

IC_{50} (50% concentration of inhibition) 按 Reed&Muench 法计算。

3 实验结果

3.1 结构鉴定

化合物 1 黄色粉末(甲醇);化学式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$,ESI-MS: m/z 241 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.37(2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2', 6'), 7.00(1H, d, $J = 18.0$ Hz, H- β), 6.98(1H, d, $J = 18.0$ Hz, H- α), 6.84(2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3', 5'), 6.78(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2), 6.60(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 6.25(1H, dd, $J = 6.0, 1.2$ Hz, H-4), 3.76(3H, s, -OCH₃); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ : 55.8 (-OCH₃), 101.5 (C-4), 104.6 (C-6), 106.8 (C-2), 116.6 (C-3', 5'), 127.0 (C- α), 129.0 (C-2', 6'), 129.8 (C- β), 130.5 (C-1), 141.6 (C-1'), 158.5 (C-4'), 159.8 (C-3), 162.6 (C-5)。以上数据与文献^[12]报道基本一致,因此确定该化合物为 3-methyl resveratrol。

化合物 2 红色粉末(甲醇);化学式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{O}_7$,ESI-MS: m/z 523 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.04 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-4), 7.60 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2', 6'), 7.21(2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2''', 6'''), 6.97(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3), 6.84(2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3', 5'), 6.72(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''), 6.65(2H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3''', 5'''), 6.20(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3''), 6.17(1H, s, H-8), 6.12(1H, dd, $J = 6.0, 6.0$ Hz, H-

5''), 3.86(3H, s, -OCH₃), 3.46(3H, s, -OCH₃), 2.53(2H, m, H- α), 2.43(2H, m, H- β), 2.42(1H, m, -CH); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 30.9 (C- β), 33.1 (C- α), 39.2 (-CH), 55.5 (-OCH₃), 56.7 (-OCH₃), 99.6 (C-3''), 102.9 (C-3), 105.5 (C-8), 107.5 (C-5''), 115.9 (C-3''', 5'''), 116.5 (C-4a), 117.4 (C-3', 5'), 122.8 (C-6), 122.8 (C-1'''), 123.1 (C-1'), 129.7 (C-2''', 6'''), 130.2 (C-2', 6'), 131.3 (C-6''), 137.0 (C-1'''), 138.2 (C-4), 156.4 (C-4'''), 157.1 (C-4''), 157.7 (C-5), 158.9 (C-2''), 159.7 (C-8a), 163.7 (C-4'), 164.4 (C-2), 185.5 (C-7)。以上数据与文献^[13]报道基本上一致,因此确定该化合物为 dracaenin A。

化合物 3 浅黄色粉末(甲醇);化学式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$,ESI-MS: m/z 283 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.82(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-5), 7.15(2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2', 6'), 6.92(2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3', 5'), 6.51(1H, dd, $J = 1.2, 6.0$ Hz, H-6), 6.38(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-8), 4.29(1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-2a), 4.09(1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-2b), 3.89(3H, s, -OCH₃), 3.53(1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-9a), 2.75(1H, m, H-3), 2.58(1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-9b); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ : 33.1 (C-9), 49.0 (C-3), 56.5 (-OCH₃), 70.8 (C-2), 104.1 (C-8), 111.9 (C-6), 114.6 (C-4a), 116.3 (C-3', 5'), 130.2 (C-1'), 130.6 (C-5), 131.1 (C-2', 6'), 156.9 (C-4'), 165.1 (C-8a), 167.2 (C-7), 195.0 (C-4)。以上数据与文献^[14]基本上一致,因此确定该化合物为 7-hydroxy-3-(4'-methoxybenzyl)-4-chromanone。

化合物 4 白色粉末(DMSO);化学式为 $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{O}_{12}$,ESI-MS: m/z 723 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.40(1H, s, Rha-1), 5.32(1H, brs, H-6), 5.06(1H, d, $J = 6.0$ Hz, Glc-1), 1.89(3H, d, $J = 6.0$ Hz, Rha-6), 1.46(3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 1.07(3H, s, H-19), 0.89(3H, s, H-18), 0.72(3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-27); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 14.7 (C-21), 16.1 (C-18), 17.2 (C-27), 20.5 (C-19), 29.0 (C-24), 29.9 (C-2), 30.7 (C-25), 31.0 (C-15), 31.1 (C-7), 31.6 (C-8), 32.3

(C-23), 36.9 (C-1), 37.5 (C-10), 39.5 (C-4), 40.3 (C-13), 41.2 (C-12), 42.5 (C-20), 49.7 (C-9), 55.9 (C-14), 63.0 (C-17), 76.1 (C-3), 80.3 (C-16), 108.9 (C-22), 121.4 (C-6), 140.4 (C-5), Glc-1'-6': 98.1, 77.8, 76.2, 70.2, 78.2, 61.9, Rha-1''-6'': 100.7, 70.5, 70.6, 72.0, 65.9, 17.8。以上数据与文献^[15]基本上一致,因此确定该化合物为 diosgenin-3-O- α -L-pyranorhamnosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside。

化合物 5 白色粉末(DMSO);化学式为 C₃₁H₅₀O₂, ESI-MS: m/z 455 [M + H]⁺。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.28 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-6), 5.06 (1H, dd, J = 6.0, 12.0 Hz, H-22), 4.97 (1H, dd, J = 6.0, 12.0 Hz, H-23), 4.89 (1H, m, H-3), 1.01 (6H, m, overlapped, H-19, 21), 0.82 (3H, m, overlapped, H-18), 0.80 (9H, m, overlapped, H-26, 27, 29); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.1 (C-18), 12.3 (C-29), 19.0 (C-26), 19.3 (C-19), 21.1 (C-11), 21.2 (C-27), 21.3 (C-21), 21.5 (C-30), 24.3 (C-15), 25.4 (C-28), 27.6 (C-2), 28.9 (C-16), 31.6 (C-8), 31.8 (C-25), 31.9 (C-7), 36.8 (C-1), 37.3 (C-10), 37.3 (C-4), 39.8 (C-12), 40.5 (C-20), 42.3

(C-13), 50.1 (C-9), 55.9 (C-17), 56.1 (C-24), 56.8 (C-14), 72.8 (C-3), 122.4 (C-6), 129.3 (C-23), 138.3 (C-22), 139.6 (C-5), 170.3 (C-31)。以上数据与文献^[14]基本上一致,因此确定该化合物为 (22*E*)-3 β -acetoxystigmasta-5,22-diene。

化合物 6 白色粉末(氯仿);化学式为 C₁₉H₄₀O, ESI-MS: m/z 283 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 3.64 (2H, t, J = 6.0 Hz, H-1), 1.68 ~ 1.12 (34H, H-3 ~ 17), 0.87 (3H, t, J = 6.0 Hz, H-19); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 14.3 (C-19), 22.9 (C-18), 29.6 ~ 29.8 (C-3 ~ C-17), 32.4 (C-2), 63.3 (C-1)。以上数据与文献^[16]基本上一致,因此确定该化合物为 nonadecyl alcohol。

3.2 体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选

对龙血竭乙醇提取物的正丁醇萃取物中氯仿/甲醇(C:M)洗脱划段的 9:1、6:1、3:1 及 0:1 (V/V) 等 4 个分段部位及分离鉴定出的 5 个化合物进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究。由表 1 可知,化合物 1 和 2 对 α -葡萄糖苷酶具有明显抑制活性,其 IC₅₀ 值分别为 14.62 \pm 0.083 和 16.03 \pm 0.076 μ M,而其它分段部位及化合物无明显的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

表 1 龙血竭各分段部位和单体化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性 (mean \pm SD, $n = 2$)

Table 1 Inhibitory activities of subfractions and compounds on α -glucosidase (mean \pm SD, $n = 2$)

样品 Sample	初筛 Preliminary screening		复筛 Secondary screening
	抑制率 Inhibition ratio (%)	浓度 Concentration (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
槲皮素 Quercetin	76.36 \pm 0.37	10.00	6.87 \pm 0.16
1	97.59 \pm 0.48	206.61	14.62 \pm 0.083
2	91.54 \pm 3.16	95.42	16.03 \pm 0.076
3	23.66 \pm 0.72	176.06	-
4	-0.89 \pm 2.61	69.25	-
6	34.50 \pm 4.96	176.06	-
C:M = 9:1	51.22 \pm 11.77	-	-
C:M = 6:1	21.97 \pm 0.05	-	-
C:M = 3:1	4.33 \pm 10.20	-	-
C:M = 0:1	47.71 \pm 5.33	-	-

注:槲皮素为阳性对照。

Note: Quercetin is positive control.

4 结论

本研究从龙血竭正丁醇萃取物中分离得到 6 个

化合物,其中化合物 4 为首次从龙血竭中分离得到。体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选结果显示,化合物

1 和 **2** 具有明显抑制活性(其 IC_{50} 值分别为 14.62 ± 0.083 和 $16.03 \pm 0.076 \mu\text{M}$), 其抑制活性远强于临床 α -葡萄糖苷酶抑制剂药物阿卡波糖 ($IC_{50} = 264 \pm 3.27 \mu\text{M}$)^[17], 且化合物 **2** 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性为首次报道, 具有一定的降血糖药物开发潜力。本研究通过对龙血竭化学成分的分离, 使得研究人员对龙血竭的降血糖活性药效物质基础有了进一步的认识, 为龙血竭在降血糖方面的开发利用提供了一定的理论依据。

参考文献

- Ríos JL, Francini F, Schinella GR. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. *Planta Med*, 2015, 88(12-13):975-994.
- Wan Q, Wang WQ, Fang JG, et al. Determination of five active components in draconis resina by QAMS method[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48:4541-4545.
- Xin N, Yang FJ, Li Y, et al. Dragon's blood dropping pills have protective effects on focal cerebral ischemia rats model[J]. *Phytomedicine*, 2013, 21(1):68.
- Yang TR, Zhang RP, Mu NH. Effect of dracaenae cochinchinensis resina on experimental tree shrews' myocardial ischemia reperfusion model *in vitro*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(4):137-142.
- Chen S, Wu SC, Zeng Y, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of total flavone extracted from dragon's blood and its analgesic mechanism exploration[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2013, 24:1030-1032.
- Wang L. Study on experiment of resina draconis combining with herba houttuyniae to treat UC rat models [D]. Nanchong: North Sichuan Medical College(川北医学院), 2017.
- Wang H, Luo Y, Dai HF, et al. Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of phenolic constituents isolated from dragon's blood[J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8:337-338.
- Sha YJ, Zhang YL, Cao J, et al. Loureirin B promotes insulin secretion through inhibition of KATP channel and influx of intracellular calcium[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 119:2012-2021.
- Chen HT, Liu YH, Qin XQ, et al. Study on the influence of dragon's blood different extraction parts on blood glucose level of diabetic mice[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2014, 25:2077-2078.
- Zhou LL, Huang CK, Lin XJ, et al. Mechanism of dragon's blood on promoting the repair of diabetic ulcer wound rats[J]. *Chin J Clin Pharm*(中国临床药理学杂志), 2019, 35:2157-2160.
- Zhang L, Wang XP, Huang XW, et al. Advance of the chemical components and pharmacological effects of Draconis Sanguis and Resina Draconis[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2019, 36:2605-2611.
- Liu X, Wang B, Gao Y, et al. Phenolic constituents from chinese dragon's blood and its ultraviolet spectrum characteristic[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:1060-1066.
- Zheng QG, Xu M, Yang CR, et al. A new red pigment from chinese dragon's blood, the red resin of *Dracaena cochinchinensis* [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2012, 33:4204-4206.
- Wang FF. Studies on chemical constituents of *Dracaena cochinchinensis* and their bioactivities [D]. Kunming: Yunnan Minzu University(云南民族大学), 2015.
- Huang XX. Studies on the chemical constituents and their anti-tumor activity in *Paris polyphylla* var. *puberula*, *Paris verticillata* M. Bieb & *Paris axialis* H. Li [D]. Tianjin: Tianjin University(天津大学), 2010.
- Li B, Zhang DM, Luo YM. A new sesquiterpene lactone from the roots of *Lasianthus acuminatissimus*[J]. *Acta Pharm Sin*, 2006, 41:426-430.
- Zhao X, Tao J, Zhang T, et al. Resveratrolside alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice by competitively inhibiting α -glucosidase [J]. *J Agr Food Chem*, 2019, 67:2886-2893.