

红棕杜鹃(原变种)叶中一个新的杜鹃色烯杂萜及其抗凝血活性评价

杨勇勋^{1*}, 颜瑜², 黄海燕³

¹西昌学院动物科学学院; ²西昌学院图书馆; ³西昌学院理学院, 西昌 615000

摘要:采用硅胶、MCI Gel、Sephadex LH-20、ODS 等柱色谱, 结合半制备液相色谱, 从红棕杜鹃(原变种)叶乙醇提取物的石油醚部位分离纯化得到一对双键位置异构的杜鹃色烯杂萜化合物: isoconfluentin (**1**) 和 (+)-confluentin (**2**), 其中化合物 **1** 为新化合物。运用现代波谱学方法(1D 和 2D NMR、UV、IR、MS 等)对所分离得到的化合物进行了结构鉴定, 而且采用色烷/色烯螺旋规则(chromane/chromene helicity rule)鉴定它们的绝对构型均为 2S 构型。测定化合物 **1** 和 **2** 的体外凝血酶原时间, 发现它们均具有有效的抗凝血作用。

关键词:红棕杜鹃(原变种); 杜鹃色烯杂萜; 抗凝血作用

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)4-0607-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.4.007

A new *Rhododendron* chromene meroterpenoid from leaves of *Rhododendron rubiginosum* Franch. var. *rubiginosum* and its anticoagulant activity

YANG Yong-xun^{1*}, YAN Yu², HUANG Hai-yan³

¹School of Animal Sciences, Xichang University; ²Xichang University Library;

³School of Sciences, Xichang University, Xichang 615000, China

Abstract: Two *Rhododendron* chromene meroterpenoids, isoconfluentin (**1**) and (+)-confluentin (**2**), were isolated from the petroleum ether extract of ethanol fraction of the leaves of *Rhododendron rubiginosum* Franch. var. *rubiginosum* by using various chromatographic methods, including MCI Gel, sephadex LH-20, ODS, silica gel and semi-preparative HPLC. Their planar structures were identified by spectrographic methods, such as NMR, UV, IR, MS, and the absolute configuration of C-2 of **1** and **2** was determined to be the S configuration by the chromane/chromene helicity rule. Compound **1** is a new compound, and compounds **1** and **2** showed effective anticoagulant effect via prothrombin time assays *in vitro*.

Key words: *Rhododendron rubiginosum* Franch. var. *Rubiginosum*; *rhododendron* chromene meroterpenoids; anticoagulant effect

红棕杜鹃(原变种) *Rhododendron rubiginosum* Franch. var. *rubiginosum* 叶为一味凉山特色彝药, 现已开发成为制剂《金鹃咳喘停合剂》应用于临床, 用于止咳、平喘^[1]。前期, 课题组已对该植物的基原及其叶与花的药效物质基础进行了研究, 发现了多种类型的化学成分^[1-3], 尤其是从其花中发现了一系列新颖的、细胞毒性小的杜鹃色烯/色烯杂萜化合

物^[2]。从聚酮核心片段的结构上看, 杜鹃色烯/色烯杂萜化合物属于植物大麻素类(phytocannabinoids)成分中的 5-甲基间苯二酚(orcinol)型, 而从 5-甲基对位侧链的萜类片段的环合结构来看, 它们又分属于大麻色烯(cannabichromene, CBC)和大麻环醇(cannabicyclol, CBL)型^[4,5]。至今, 从杜鹃属植物中已分离得数十个本类成分, 而且揭示它们具有多种生物活性, 如抗凝血、抗 HIV、抗组织胺释放、抗糖尿病等生物活性^[6,7]。同时, 鉴于哺乳动物的大脑内具有植物大麻素类化合物受体, 具有调节多种生理功能, 包括记忆、心情、大脑奖励系统等^[4], 这

收稿日期: 2022-11-07 接受日期: 2023-03-02

基金项目: 国家自然科学基金(81860758); 凉山州科学与技术带头人培养资金项目(2022)

* 通信作者 Tel: 86-834-2580034; E-mail: xcc03100032@xcc.edu.cn

似乎与杜鹃属植物具有的止痛、催眠镇静、神经作用等的民族应用有关^[8,9],因此,值得更深入的研究。本研究在前期的研究基础之上,从红棕杜鹃(原变种)叶中发现了一对双键位置异构的杜鹃色烯杂萜同分异构体,而且通过抗凝血的活性研究,发现它们均具有有效的抗凝血活性,此为进一步阐明本品的活血化瘀药效物质奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

赛谱锐思 LC-52 型半制备液相色谱仪(赛谱锐思北京科技有限公司);Bruker AM-500 MHz 核磁共振谱用超导核磁共振仪(TMS 做内标,德国 Bruker 公司);Rudolph VI 型旋光仪(美国 Rudolph);SHIMADZU UV-2401PC 紫外分光光度计、Bruker VER-TEX 70 红外光谱仪;离心机(TDZ5-WS,长沙维尔康湘鹰离心机有限公司);半自动凝血仪(URIT-600A,桂林优利特电子有限公司)。Sephadex LH-20 柱色谱材料(Parmacia Biotech 公司);ODS 反相柱色谱材料;正相硅胶色谱填料(青岛海洋化工厂);YMC Pack ODS-A 半制备柱(250 mm × 20 mm, 10 μm)。凝血酶原时间(prothrombin time, PT)试剂盒(冻干型,上海太阳生物技术有限公司);乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

红棕杜鹃(原变种)药材自采于四川省昭觉县七里坝,经中科院昆明植物研究所张长芹研究员鉴定为红棕杜鹃(原变种) *Rhododendron rubiginosum* Franch. var. *rubiginosum* 植物叶,植物标本现存于西昌学院动物科学学院。

1.2 实验方法

1.2.1 提取分离

取红棕杜鹃(原变种)叶 5 kg,粗碎后用 95% 乙醇室温冷浸提取(每次 10 倍溶剂用量,提取 3 次,每次一周)。合并提取液,减压回收溶剂后得到半固体浸膏,加适量水使浸膏分散,然后以石油醚萃取,得石油醚部位浸膏 150g。石油醚部位用硅胶柱色谱进行分离,以石油醚-乙酸乙酯(1:0→0:1, V/V)梯度洗脱。TLC 分析,合并流分,得 6 个流分 Fr. 1 ~ Fr. 6。Fr. 6 用硅胶柱分离,以石油醚-乙酸乙酯(100:1→10:3, V/V)为流动相进行梯度洗脱。TLC 分析,合并石油醚-乙酸乙酯(100:1→100:5, V/V)的流分。该流分再用硅胶柱色谱分离,流动相为石油醚:乙酸乙酯(500:1→100:1, V/V),梯度洗脱,共得 50 个流分。TLC 分析后,合并 13 ~ 35 号流分,再经

sephadex LH20 凝胶柱色谱分离,得一化合物。该化合物用三种不同展开剂 TLC 检测,均为单一斑点。但用 HPLC 检测,却发现该化合物中还有一个小峰,其峰面积约为主峰的 1/20。采用半制备液相色谱分离,流动相为乙腈:水(82:18),得化合物 1($t_R = 20.0$ min, 5.1 mg)、2($t_R = 18.8$ min, 72.5 mg)。

1.2.2 抗凝血活性测试

采用半自动凝血分析仪对化合物 1、2 的抗凝血活性进行分析。心脏取血法采集健康家兔的新鲜血 30 mL,置于含柠檬酸钠抗凝剂的 3 支采血管内。离心机离心(3 000 r/min, 20 min)得上层的血清,用于活性测试。化合物 1、2 用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶解,配制成高(1.0 mg/mL)、中(0.5 mg/mL)、低(0.25 mg/mL)浓度,以阿司匹林(1.0 mg/mL)作为阳性对照,按试剂盒操作流程操作,每个浓度测试三次。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 浅棕色油状物;硅胶 GF₂₅₄ 板上,在 254 nm 下显荧光熄灭暗斑,10% 浓硫酸乙醇溶液显色为红色。 $[\alpha]_D^{25} + 68.23$ (c 0.299 g/100mL, MeOH), UV(MeOH) λ_{max} (log ϵ): 203.0 (19.74), 229.5 (20.84), 281.5 (7.01) nm; EI-MS: m/z : 326 [M]⁺ (10), 175 (100); IR (KBr) ν_{max} 3 410、1 692、1 626、1 578 cm^{-1} ; HR-EI-MS: m/z 326.224 0 [M]⁺ (calcd for C₂₂H₃₀O₂, 326.224 0)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.61 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4), 5.48 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3) 显示出两个相互耦合的环内顺式烯键质子信号(见表 1); 6.23 (1H, br s, H-8) 和 6.10 (1H, s, H-6) 提示存在两个芳香氢信号(间位偶合),推测存在一个四取代苯环结构;在高场区存在 5 个甲基单峰信号: δ_H 2.20 (3H, s, H-21), 1.68 (3H, s, H-17), 1.66 (3H, s, H-19), 1.60 (3H, s, H-18) 和 1.37 (3H, s, H-20)。¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) 与 DEPT 谱中显示 22 个碳信号,其中 4 个亚甲基、6 个次甲基信号、5 个甲基及 7 个季碳。再根据杜鹃色烷/色烯杂萜分子中特征的 C-2 连氧季碳信号 δ_C 78.3,揭示本化合物为杜鹃色烯杂萜化合物。进一步通过 2D NMR 确定了本化合物的平面结构(见图 1),即在 HMBC 谱中可观察到以下关键的 HMBC 相关,即: δ_H 6.61 (H-4) 与 δ_C 154.1 (C-8a), 151.0 (C-5), 106.7 (C-4a), 78.1 (C-2), 6.2 (C-9) 相关; δ_H 5.48 (H-3) 与 δ_C 154.1 (C-8a), 106.7 (C-4a), 8.1 (C-2), 1.5 (C-

9), 及 26.2 (C-20) 相关; δ_{H} 2.20 (H-21) 与 δ_{C} 108.4 (C-8) 和 110.0 (C-6) 相关; δ_{H} 1.65 (H-19) 与 δ_{C} 32.0 (C-11), 35.5 (C-12) 和 125.0 (C-13) 相关;

δ_{H} 1.68 (H-17) 和 1.60 (H-18) 与 δ_{C} 131.7 (C-16) 和 124.5 (C-15) 相关; 在 ^1H - ^1H COSY 谱中可观察到 H-9/H-10/H-11, 以及 H-13/H-14/H-15 的两个连氢片段。

表 1 化合物 1 的 ^1H (500 MHz) 和 ^{13}C (125 MHz) NMR 数据 (CDCl_3)

Table 1 ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) data of compound 1 in CDCl_3

编号 No.	δ_{C}	δ_{H}	编号 No.	δ_{C}	δ_{H}
2	78.3	—	11	32.0	2.01 (m, overlapped)
3	127.3	5.48 (d, $J = 10.0$ Hz)	12	135.5	—
4	116.9	6.61 (d, $J = 10.0$ Hz)	13	125.0	5.11 (m, overlapped)
4a	106.9	—	14	26.7	2.00 (m, overlapped)
5	154.3	—	15	124.5	5.11 (m, overlapped)
6	108.4	6.11 (br s)	16	131.7	—
7	139.7	—	17	25.9	1.68 (s)
8	110.0	6.23 (br s)	18	17.8	1.60 (s)
8a	151.2	—	19	23.5	1.66 (s)
9	41.5	1.64 (m); 1.70 (m)	20	26.4	1.37 (s)
10	22.6	2.10 (m)	21	21.6	2.20 (s)

分子中的 $\Delta^{12(13)}$ 双键的构型通过 ROESY 谱确定为反式构型 (见图 1), 即在 ROESY 谱中, 可观察到 H-13 与 H-11 相关, 以及 H-19 与 H-14 相关。而分子中的 C-2 绝对构型, 通过色烷/色烯螺旋规则^[10,11] 确定为 *S*-构型, 即在 CD 谱中, 在 280 nm 左

右显示正 Cotton 效应 (见图 2), 以及它的右旋旋光活性也证实它的 *2S*-构型^[11,12]。本化合物为一新化合物, 故将其命名为 isoconfluentin。化合物 1 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 (www.trew.ac.cn)。

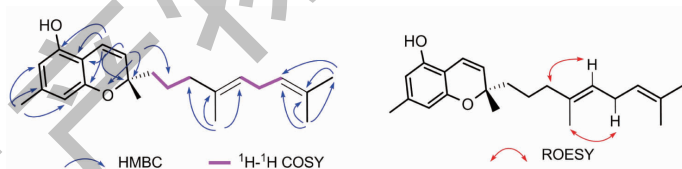


图 1 化合物 1 关键的 HMBC、 ^1H - ^1H COSY 和 ROESY 相关

Fig. 1 Key HMBC, ^1H - ^1H COSY and ROESY correlations of compound 1

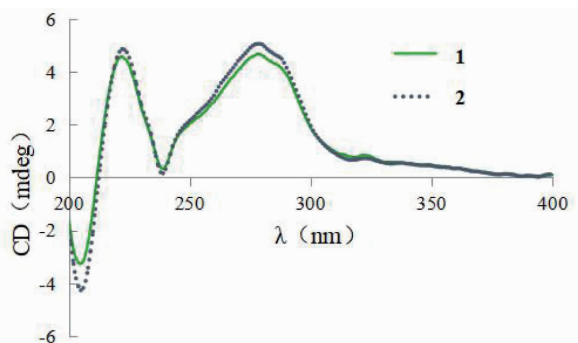


图 2 化合物 1 和 2 的 CD 谱

Fig. 2 CD spectra of compounds 1 and 2

化合物 **2** 浅棕色油状物;本化合物的碳氢信号与化合物 **1** 极其相似,其明显区别主要是在¹H NMR 谱中,H-19 的化学位移从 δ_{H} 1.66 位移至 1.60;在¹³C NMR 谱中,C-19 的化学位移从 δ_{C} 23.5 位移至 16.1。进而采用 2D NMR 鉴定本化合物的平面结构与化合物 confluentin 相同^[13],化合物的 CD 谱中存在一个 280 nm 左右处的正性 Cotton 效应,且 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$

+77.85 (c 1.613 g/100 mL, MeOH),因此,确定本化合物的 C-2 绝对构型为 *S*-构型,从而鉴定本化合物为 (+)-2*S*-confluentin,即此化合物不同于从本属兴安杜鹃 *R. dauricum* 植物中分离的左旋体 (-)-2*R*-confluentin^[13]和从真菌 *Albatrellus* spp. 中分离得的消旋体 (\pm)-confluentin^[14]。

化合物 **1** 和 **2** 的结构见图 3。

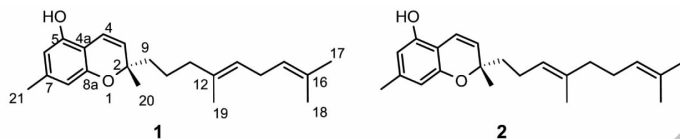


图 3 化合物 **1** 和 **2** 的结构

Fig. 3 Structures of compounds **1** and **2**

2.2 抗凝血活性测试结果

通过凝血四项中的凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 测定,对化合物 **1**、**2** 的抗凝血作用进行了研究,结果见表 2。研究发现,两化合物均能增加 PT,显示出抗凝血作用,而且随浓度越高,抗凝血作用越强。另外,比较化合物 **1** 和 **2** 的抗凝血作用,发现化合物 **2** 的作用强于化合物 **1**,但它们在高浓度 (1 mg/mL) 下,抗凝血作用无显著差异。

表 2 化合物 **1** 和 **2** 的 PT 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 PT values of compounds **1** and **2** ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品 Sample	PT(s)
空白对照 Negative control	11.22 \pm 0.37
阳性对照 Positive control	14.41 \pm 0.55
1 (0.25 mg/mL)	14.77 \pm 0.38
1 (0.5 mg/mL)	15.01 \pm 0.53
1 (1.0 mg/mL)	15.93 \pm 0.48
2 (0.25 mg/mL)	14.89 \pm 0.47
2 (0.5 mg/mL)	16.24 \pm 0.52
2 (1.0 mg/mL)	16.98 \pm 0.27

3 结论

在前期红棕杜鹃 (原变种) 花的杜鹃色烷/色烯杂萜的研究经验指导下,首次从本种叶中发现一对位置异构的杜鹃色烯杂萜类化合物, isoconfluentin (**1**) 和 (+)-confluentin (**2**), 其中化合物 **1** 为新化合物。另外,化合物 **2** 为光学纯的右旋的 (+)-2*S*-confluentin 化合物,其不同于从同属兴安杜鹃 *R. dauricum* 植物中分离的左旋体 (-)-2*R*-confluentin^[13]

和从真菌 *Albatrellus* spp. 中分离得的消旋体 (\pm)-confluentin^[14]。但如若仅从构型来看,现从本种花与叶中发现的本类成分全为 2*S*-构型,此又与从烈香杜鹃 *R. anthopogonoides* 中发现的本类成分的构型一致^[12]。众所周知,化合物的立体构型与其生物活性有非常重要的关系,因此,杜鹃不同种,以及真菌中的不同立体构型的杜鹃色烷/色烯的生物活性、生源合成途径、及其植物进化研究值得在后续的研究中继续关注。最后,通过化合物 **1** 和 **2** 的体外抗凝血活性研究,发现它们均具有有效的抗凝血作用,此为本凉山彝药的活血化痰药效物质基础研究奠定了基础。

参考文献

- 1 Yang YX, Yan YM, Tao M, et al. Chemical constituents from leaves of *Rhododendron rubiginosum* var. *rubiginosum* [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 839-843.
- 2 Yang YX, Wang, JX, Wang, Q, et al. New chromane and chromene meroterpenoids from flowers of *Rhododendron rubiginosum* Franch. var. *rubiginosum* [J]. Fitoterapia, 2018, 127: 396-401.
- 3 Yang YX. Studies on phenolic acids from leaves of *Rhododendron rubiginosum* Franch var. *rubiginosum* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2016, 27: 2148-2150.
- 4 Gülck T, Møller BL. Phytocannabinoids: origins and biosynthesis [J]. Trends Plant Sci, 2020, 25: 985-1004.
- 5 Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, et al. Phytocannabinoids: a unified critical inventory [J]. Nat Prod Rep, 2016, 33: 1357-

- 1392.
- 6 Yang YX. Advances in *Rhododendron* chromene/chromane meroterpenoids[J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药),2016,12:45-48.
 - 7 Liang C, Kjaerulff L, Hansen PR, et al. Dual high-resolution α glucosidase and PTP1B inhibition profiling combined with HPLC-PDA-HRMS-SPE NMR analysis for the identification of potentially antidiabetic chromene meroterpenoids from *Rhododendron capitatum* [J]. J Nat Prod, 2021, 84: 454-2467.
 - 8 Popescu R, Kopp B. The genus *Rhododendron*: an ethnopharmacological and toxicological review[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147: 42-62.
 - 9 Li X F, Jin H Z, Chen G, et al. Study advances on chemical constituents and pharmacological activities of the Tibetan medicine Dali[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2008,20:1125-1128.
 - 10 Wata N, Kitanaka S. Tetracyclic chromane derivatives from *Rhododendron anthopogonoides* [J]. J Nat Prod, 2010, 73: 1203-1206.
 - 11 Górecki M, Suszczyńska A, Woznica M, et al. Chromane helicity rule-scope and challenges based on an ECD study of various trolox derivatives [J]. Org Biomol Chem, 2014, 12: 2235-2254.
 - 12 Iwata N, Kitanaka S. New cannabinoid-like chromane and chromene derivatives from *Rhododendron anthopogonoides* [J]. Chem Pharm Bull, 2011, 59: 1409-1412.
 - 13 Iwata N, Wang NL, Yao XS, et al. Structures and histamine release inhibitory effects of prenylated orcinol derivatives from *Rhododendron dauricum* [J]. J Nat Prod, 2004, 67: 1106-1109.
 - 14 Hellwig V, Nopper R, Mauler F, et al. Activities of prenylphenol derivatives from fruitbodies of *Albatrellus* spp. on the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1) and characterisation of the novel natural product, confluentin [J]. Arch Pharm Pharm Med Chem, 2003, 2: 119-126.