

· 基础研究 ·

NMR 确定鸡血藤中 1 个新的降倍半萜类化合物 布卢门醇 A-6-O-反式-对羟基肉桂酸酯[△]

杨秀伟*, 刘晓艳, 崔泽旭

北京大学 药学院 天然药物学系/天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

[摘要] 目的: 研究鸡血藤水提取物中的化学成分。方法: 采用硅胶、高效液相等柱色谱方法进行分离纯化, 通过化合物的核磁共振(NMR)数据鉴定其结构。结果: 从鸡血藤水提取物中分离出 1 个降倍半萜类化合物, 根据其 NMR 数据鉴定其化学结构为布卢门醇 A-6-O-反式-对羟基肉桂酸酯。结论: 布卢门醇 A-6-O-反式-对羟基肉桂酸酯为 1 个新的化合物。

[关键词] 鸡血藤; 豆科; 降倍半萜; 布卢门醇 A-6-O-反式-对羟基肉桂酸酯

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)03-0432-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200823001

Blumenol A-6-O-*trans*-*p*-Hydroxycinnamate as a New Norsesquiterpenoid Determined by NMR Method from *Spatholobi Caulis*

YANG Xiu-wei*, LIU Xiao-yan, CUI Ze-xu

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Natural Medicines,
School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of aqueous extract of *Spatholobi Caulis*. **Methods:** The compound was separated and purified by repeated column chromatography on silica gel and high performance liquid chromatography, and the chemical structure was determined by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic data analyses. **Results:** A norsesquiterpenoid compound was obtained. Its chemical structure was identified as blumenol A-6-O-*trans*-*p*-hydroxycinnamate. **Conclusion:** Blumenol A-6-O-*trans*-*p*-hydroxycinnamate is a new compound.

[Keywords] *Spatholobi Caulis*; Leguminosae; norsesquiterpenoid; blumenol A-6-O-*trans*-*p*-hydroxycinnamate

鸡血藤 *Spatholobi Caulis* 为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎^[1], 主产于中国云南、广西等地, 在缅甸、印度尼西亚等热带地区也有分布。在传统功效上, 鸡血藤可补血活血、舒筋活络, 治疗月经不调、腰膝酸软、风湿痹痛等症, 凡妇人血瘀及血虚之月经病证均可应用, 且多为配伍应用。中药物质基础研究是中药继承、发展和创新的关键科学问题^[2]。本课题组报道了鸡血藤部分化学成分的研究和抗炎活性^[3-5], 从鸡血藤中分离得到 1 个新的降倍半萜类化合物。本研究应用核磁共振(NMR)确定这个新化合物的化学结构为布卢

门醇 A-6-O-反式-对羟基肉桂酸酯(blumenol A-6-O-*trans*-*p*-hydroxycinnamate)。

1 材料

1.1 试药

鸡血藤药材采自中国云南省普洱市, 由株洲千金药业有限公司提供。经北京大学药学院杨秀伟教授鉴定为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎。凭证标本(标本号: Y008-1608010)保存于北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室。

[△] [基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-HUN-21)

* [通信作者] 杨秀伟, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药有效物质基础和药物代谢; Tel: (010) 82801569, E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

分析纯甲醇(MeOH)、乙酸乙酯(EtOAc)、三氯甲烷(CHCl_3)、正丁醇($n\text{-BuOH}$)等为北京化工厂产品;色谱纯甲醇和乙腈(ACN)为美国 Fisher Chemical 产品;实验用去离子水由 Milli-pore Milli-Q 型超纯水系统制备纯化而得。

1.2 仪器

AV 400 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司),三甲基硅烷(TMS)作为内标;LC 3000 型反相制备高效液相色谱(HPLC)系统(北京创新通恒科技有限公司),配置 P3050 型二元泵、CXTH-3000 型色谱工作站;色谱柱为 Phenomenex Prodigy ODS (250 mm $\times$ 21.2 mm, 10 μm , 美国 Phenomenex 公司);GF₂₅₄ 薄层色谱(TLC)硅胶板为青岛海洋化工厂和德国 Merck 公司产品;200~300 目柱色谱用硅胶为青岛海洋化工厂产品。

2 提取与分离

称取干燥鸡血藤药材 70 kg,加 5 倍量水回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩,75 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 7 h,得鸡血藤干浸膏 6 kg(收率为 8.57%),留存 1 kg,其余 5 kg 用 6 L 去离子水溶解,依次用适量 EtOAc、 $n\text{-BuOH}$ 各萃取 8 次,分别合并各萃取液,减压浓缩蒸干,得 EtOAc 萃取物 320 g(按投料生药计算收率为 0.46%,下同)、 $n\text{-BuOH}$ 萃取物 500 g(收率 0.86%)和残存水层。

EtOAc 萃取物(270 g)进行硅胶柱色谱分离,用 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ 体系(80:1、50:1、30:1、20:1、10:1、5:1、1:1)依次梯度洗脱,得组分 Fr. 1~Fr. 7。Fr. 3 (5.68 g)经 TLC 检识,硅胶柱色谱分离, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (20:1、15:1、10:1、5:1)梯度洗脱,TLC 检测合并相同组分,得组分 Fr. 3-1~Fr. 3-4。Fr. 3-2 经硅胶柱色谱分离, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (10:1 $\rightarrow$ 2:1)梯度洗脱,得组分 Fr. 3-2-1~Fr. 3-2-3。Fr. 3-2-1 经反相硅胶制备高效液相色谱(ACN- H_2O , 12:88, 8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)制备分离、纯化,得化合物 **1** (20.0 mg, t_{R} 为 32.1 min)。

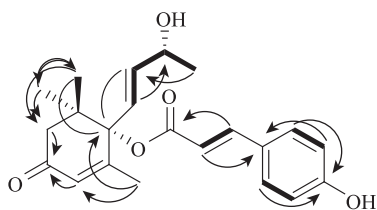
3 化合物结构的 NMR 分析

化合物 **1** 为淡黄色粉末(EtOAc)。分析其 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz)和 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz)波谱,显示出 6, 9-二氧代大柱香波龙烷-4, 7-二烯-3-酮(6, 9-dioxygenated megastigmane-4, 7-diene-3-one)骨架^[6]。用 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ ($^1\text{H-}^1\text{H}$ correlation

spectroscopy)、HSQC (heteronuclear single quantum coherence) 和 HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation) 相关谱确认了骨架。在化合物 **1** 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 谱中,观察到 4 个甲基信号(表 1): δ_{H} 0.91(3H, s, H-12), 0.94(3H, s, H-11), 1.12(3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 1.81(3H, d, $J = 1.1$ Hz, H-13); 从其 HSQC 谱确定相应碳的化学位移分别为 δ_{C} 24.2q (C-11)、23.3q (C-12)、24.3q (C-10)、19.3q (C-13); 1 个亚甲基信号, δ_{H} 2.36(1H, d, $J = 16.7$ Hz, Ha-2) 和 2.06(1H, d, $J = 16.7$ Hz, Hb-2), 从其 HSQC 谱确定相应碳的化学位移为 δ_{C} 49.7t (C-2); 3 个烯质子, 分别为 δ_{H} 5.65(1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7)、5.71(1H, dd, $J = 15.7, 4.5$ Hz, H-8) 和 5.78(1H, d, $J = 1.1$ Hz, H-4), 从其 HSQC 谱确定相应碳的化学位移分别为 δ_{C} 128.2d (C-7)、136.1d (C-8) 和 125.8d (C-4); 从 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 谱观察到 δ_{H} 5.65 $\rightarrow\delta_{\text{H}}$ 5.71 $\rightarrow\delta_{\text{H}}$ 4.19 (1H, dt, $J = 6.4, 4.5$ Hz, H-9) $\rightarrow\delta_{\text{H}}$ 1.12(3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10) 处于 1 个自旋耦合体系中(图 1), 且从 $^1\text{H-NMR}$ 谱观察到 δ_{H} 5.65(1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7) 与 δ_{H} 5.71(1H, dd, $J = 15.7, 4.5$ Hz, H-8) 有较大的耦合常数, 为反式双键的质子信号^[7]; 烯质子信号 δ_{H} 5.78 具有小的耦合常数(1H, d, $J = 1.1$ Hz), 判断与烯键连接的甲基质子处于 W 型远程耦合, 即 H-4 与 C-5 甲基质子处于同一个平面, 且 2 个质子构成伸展的 W 型, 在空间上很接近, 发生远程耦合^[8-9]; 结合 HMBC 实验(图 1), δ_{H} 0.94 与 δ_{C} 23.3q、41.2s、49.7t、78.1s, δ_{H} 0.91 与 δ_{C} 24.2q、41.2s、49.7t、78.1s 呈 HMBC 相关性, 因此, $\text{CH}_3\text{-11}$ 和 $\text{CH}_3\text{-12}$ 同时与 C-1 (δ_{C} 41.2) 相连, 又由于在 HSQC 实验中 δ_{H} 2.36 (Ha-2) 和 2.06 (Hb-2) 与 δ_{C} 49.7t 直接相连, 因此, δ_{C} 78.1s 应该归属为 C-6; 由于在 HMBC 实验中观察到 δ_{H} 2.36 (Ha-2) 和 2.06 (Hb-2) 与 δ_{C} 197.6s 有相关性, 证明其必定是 C-3 的化学位移值; 同时观察到 δ_{H} 5.78(1H, d, $J = 1.1$ Hz) 与 δ_{C} 197.6s 有 HMBC 相关性, 亦与 δ_{C} 19.3q 有 HMBC 相关, 结合在 HSQC 实验中 δ_{H} 5.78 直接与 δ_{C} 125.8d 相连, δ_{H} 1.81 (3H, $\text{H}_3\text{-3}$) 直接与 δ_{C} 164.7s 相连, 证明 δ_{C} 125.8d 和 δ_{C} 164.7s 应分别归属为 C-4 和 C-5; 又由于在 HMBC 实验中 δ_{H} 5.78 与 δ_{C} 78.1s 呈 HMBC 相关性, 合理地解释了 δ_{C} 78.1s 必定归属为 C-6, 亦提示 C-6 可能与电负性较强的氧元素相连。

表 1 化合物 1 的 ^1H -(400 MHz) 和 ^{13}C -(100 MHz) NMR 数据 (DMSO- d_6)

碳位	δ_{H} , J (Hz)	δ_{C} (HSQC)	^1H - ^1H COSY	HMBC
1		41.2s		
2	2.36(1H, d, 16.7) 2.06(1H, d, 16.7)	49.7t	2	1, 3, 11, 12 1, 3, 4, 6, 11, 12
3		197.6s		
4	5.78(1H, d, 1.1)	125.8d	13	2, 6, 13
5		164.7s		
6		78.1s		
7	5.65(1H, d, 15.7)	128.2d	8	1, 5, 6, 8, 9
8	5.71(1H, dd, 15.7, 4.5)	136.1d	7, 9	6, 7, 9, 10
9	4.19(1H, dt, 6.4, 4.5)	66.4d	8, 10	7, 8, 10
10	1.12(3H, d, 6.4)	24.3q	9	8, 9
11	0.94(3H, s)	24.2q		1, 2, 3, 6, 12
12	0.91(3H, s)	23.3q		1, 2, 3, 6, 11
13	1.81(3H, d, 1.1)	19.3q	4	3, 4, 5, 6
1'		125.6s		
2'	7.48(1H, d, 8.5)	130.3d	3'	1', 3', 4', 6', 7'
3'	6.79(1H, d, 8.5)	116.0d	2'	1', 2', 4', 5'
4'		159.9s		
5'	6.79(1H, d, 8.5)	116.0d	6'	1', 2', 4', 6'
6'	7.48(1H, d, 8.5)	130.3d	5'	1', 2', 4', 5', 7'
7'	7.49(1H, d, 16.0)	144.2d	8'	1', 2', 6', 8', 9'
8'	6.29(1H, d, 16.0)	116.0d	7'	1', 7', 9'
9'		168.4s		
9-OH	10.10(1H, brs)			
4'-OH	10.10(1H, brs)			

注: s. C; d. CH; t. CH_2 ; q. CH_3 。图 1 化合物 1 主要的 ^1H - ^1H COSY(-) 和 HMBC(→) 相关

如前所述, δ_{H} 5.65 $\rightarrow$ δ_{H} 5.71 $\rightarrow$ δ_{H} 4.19 $\rightarrow$ δ_{H} 1.12 处于 1 个自旋耦合体系中, 在 HSQC 实验中观察到 δ_{H} 5.65 (H-7)/ δ_{C} 128.2d (C-7)、 δ_{H} 5.71 (H-8)/ δ_{C} 136.1d (C-8)、 δ_{H} 4.19 (H-9)/ δ_{C} 66.4d (C-9)、 δ_{H} 1.12 (H-10)/ δ_{C} 24.3q (C-10) 的关系, 推论出 C-6 结合 (1*E*, 3*R*)-3-羟基-1-丁烯基 [(1*E*, 3*R*)-3-hydroxy-1-butenyl] [^1H -NMR: δ_{H} 5.65(1H, d, J = 15.7 Hz,

H-7), 5.71(1H, dd, $J=15.7, 4.5$ Hz, H-8), 4.19(1H, dt, $J=6.4, 4.5$ Hz, H-9), 1.12(3H, d, $J=6.4$ Hz, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$: δ_{C} 128.2d(C-7), 136.1d(C-8), 66.4d(C-9), 24.3q(C-10)], 除C-6的化学位移外,与合成和天然的(6*S*, 9*R*)-催吐萝芙木醇[(6*S*, 9*R*)-vomifoliol],即布卢门醇A(blumenol A)数据基本一致^[10-11]。

另一方面,在化合物**1**的1D-NMR和2D-NMR谱中,多出1组典型的反式-对羟基肉桂酰基(*trans-p*-hydroxycinnamyl)信号^[5,12] [$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} 7.48(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.79(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', 5'), 7.49(1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7'), 6.29(1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8'), 10.10(1H, brs, 4'-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ_{C}

125.6s(C-1'), 130.3d(C-2', 6'), 116.0d(C-3', 5'), 159.9s(C-4'), 144.2d(C-7'), 116.0d(C-8'), 168.4s(C-9')].与(6*S*, 9*R*)-催吐萝芙木醇或布卢门醇A^[11]的 $^{13}\text{C-NMR}$ 化学位移值比较,C-9几乎没有变化,C-6发生了变化。因此,化合物**1**是布卢门醇A(**2**)的C-6羟基与反式-对羟基肉桂酸(**3**)的羧基发生酯化的产物(图2),化学结构为布卢门醇A-6-*O*-反式-对羟基肉桂酸酯(blumenol A-6-*O-trans-p*-hydroxycinnamate)或(6*S*, 9*R*)-催吐萝芙木醇-6-*O*-反式-对羟基肉桂酸酯[(6*S*, 9*R*)-vomifoliol-6-*O-trans-p*-hydroxycinnamate]。该化合物为新化合物,化学结构见图2,根据其 ^1H - ^1H COSY、HSQC和HMBC实验进行了质子和碳信号的全归属,见表1。

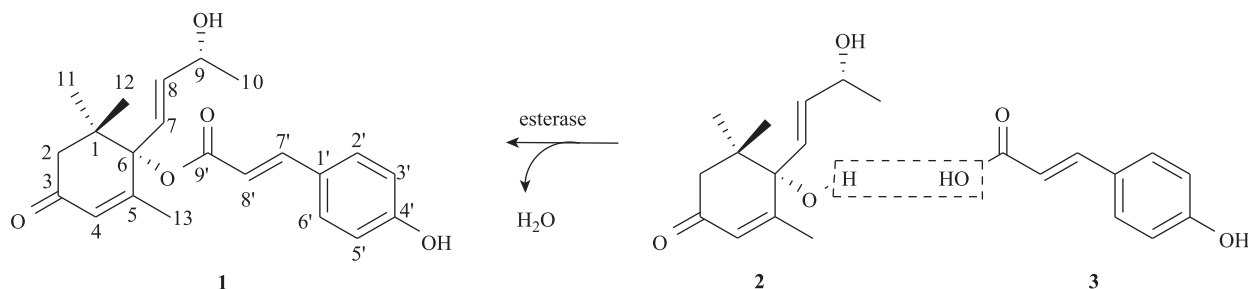


图2 化合物**1**可能的来源途径及化学结构

4 讨论

鸡血藤的物质基础化学结构类型具有多样性^[3-5],仅在黄酮类化合物中就有二氢黄酮、异黄酮、二氢异黄酮、查耳酮等,尤其是特征性成分异黄酮类化合物,是其重要的生物活性物质^[3]。本研究又分离鉴定出1个新的降倍半萜类化合物,根据2D-NMR确定了这个新化合物的化学结构为布卢门醇A-6-*O*-反式-对羟基肉桂酸酯,进一步丰富了鸡血藤物质基础化学结构类型的多样性。根据文献类似结构化合物生物活性的报道^[8],预测化合物**1**可能具有抗炎活性。

早在2012年,从鸡血藤中就分离鉴定出了降倍半萜类的布卢门醇A^[13],其后又分离鉴定出了更多的该类化合物^[14]。最近,从鸡血藤中分离鉴定出反式-对羟基肉桂酸^[5],从而推断新化合物**1**可能是布卢门醇A的C-6上的羟基与反式-对羟基肉桂酸的羧基在酯酶作用下脱水形成的酯。中药通常为口服给药,且酯类化合物经过肠内时被丰富的酯酶所水解^[15],因

此,布卢门醇A-6-*O*-反式-对羟基肉桂酸酯经肠可能释放出布卢门醇A而被吸收进入体内,发挥生物学效用。文献报道布卢门醇A对人肺癌A549、人乳腺癌MCF-7、人结肠癌HT-29、人肾癌A498、人前列腺癌PC-3、人胰腺癌PACA-2等细胞株的增殖具有一定的细胞毒活性,半数有效浓度分别为11.3、12.3、14.5、16.6、24.3、19.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[16];具有抗氧化和抗乙酰胆碱酯酶活性^[17]。因此,布卢门醇A-6-*O*-反式-对羟基肉桂酸酯也许是鸡血藤潜在的生物活性成分之一,需要进一步验证。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:202.
- [2] 杨秀伟. 中药物质基础研究是中药继承、发展、创新的关键科学问题[J]. 中国中药杂志,2015,40(17):3429-3434.
- [3] LIU X Y, ZHANG Y B, YANG X W, et al. Anti-inflammatory activity of some characteristic constituents from the vine stems of *Spatholobus suberectus* [J]. Molecules, 2019, 24(20):3750.

- [4] 刘晓艳,徐崑,杨秀伟,等. 鸡血藤黄酮类化学成分的分
离与鉴定[J]. 中国中药杂志,2020,45(6):1384-1392.
- [5] 刘晓艳,徐崑,杨秀伟,等. 鸡血藤非黄酮类化学成分的分
离与鉴定[J]. 中国中药杂志,2020,45(5):1120-1127.
- [6] NGUYEN T H, KIM TUYEN PHAM N, PUDHOM K, et al. Structure elucidation of four new megastigmanes from *Sonneratia ovata* Backer [J]. Magn Reson Chem, 2014, 52(12):795-802.
- [7] 杨秀伟. 应用2D NMR技术研究羌活苷的结构[J]. 波谱学杂志,2006,23(4):429-442.
- [8] JO M S, LEE S, YU J S, et al. Megastigmane derivatives from the cladodes of *Opuntia humifusa* and their nitric oxide inhibitory activities in macrophages [J]. J Nat Prod, 2020, 83(3):684-692.
- [9] 杨秀伟,吴琦,邹磊,等. 芙蓉菊中艾菊素和草蒿素结构的 NMR 信号表征[J]. 波谱学杂志,2008,25(1):117-127.
- [10] YAMANO Y, ITO M. Synthesis of optically active vomifoliol and roseoside stereoisomers [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53(5):541-546.
- [11] 张丙云,何蕾,郭涛,等. 红花化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志,2016,26(5):409-412.
- [12] HAN M H, YANG X W, JIN Y P. Novel triterpenoid acyl esters and alkaloids from *Anoectochilus roxburghii* [J]. Phytochem Anal, 2008, 19:438-443.
- [13] TANG R N, QU X B, GUAN S H, et al. Chemical constituents of *Spatholobus suberectus* [J]. Chin J Nat Med, 2012, 10(1):32-35.
- [14] 张祎,邓岫,李晓霞,等. 鸡血藤化学成分的分离与结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(3):174-178, 187.
- [15] 杨秀伟. 中药成分的吸收、分布、代谢、排泄、毒性与药效[M]. 北京:中国医药科技出版社,2006.
- [16] LIU X X, TIAN F F, ZHANG H B, et al. Biologically active blumenol A from the leaves of *Annona glabra* [J]. Nat Prod Lett, 1999, 14(1):77-81.
- [17] BENDJEDOU H, BARBONI L, MAGGI F, et al. Alkaloids and sesquiterpenes from roots and leaves of *Lycium europaeum* L. (Solanaceae) with antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities [J/OL]. Nat Prod Res, 2019, doi:10.1080/14786419.2019.1666386.

(收稿日期:2020-08-23 编辑:田苗)

(上接第431页)

- [18] YAN W, QING C, TAO C, et al. Phylogenetic insights into Chinese *Rubus* (*Rosaceae*) from multiple chloroplast and nuclear DNAs [J]. Front Plant Sci, 2016, 7(968):1-13.
- [19] 郝云庆,罗晓波,王晓玲. 濒危植物五小叶槭(*Acer pentaphyllum* Diels)天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2019, 56(1):161-166.
- [20] HE J, WANG H, LI D Z, et al. Genetic diversity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, a traditional Chinese medicinal herb, detected by ISSR markers [J]. Planta Med, 2007, 73(12):1316-1321.
- [21] LV J, QI J, SHI Q, et al. Genetic diversity and population structure of cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. PLoS ONE, 2012, 7(10):e46919.
- [22] 闫伯前,王艇,胡理乐. 药用植物华中五味子的种群遗传多样性及遗传结构[J]. 生态学杂志, 2009, 28(5):811-819.
- [23] 文亚峰,韩文军,吴顺. 植物遗传多样性及其影响因素[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(12):80-87.
- [24] NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Mol Ecol, 2004, 13(5):1143-1155.
- [25] GRAHAM J, HACKETT C A, SMITH K, et al. Genetic and environmental regulation of plant architectural traits and opportunities for pest control in raspberry [J]. Ann Appl Biol, 2014, 165(3):318-328.
- [26] JARVIS D, MULUMBA J, PENG H, et al. A risk-minimizing argument for traditional crop varietal diversity use to reduce pest and disease damage in agricultural ecosystems [J]. Crop Prot, 2014, 61(4):70-86.

(收稿日期:2020-03-21 编辑:戴玮)