

文章编号: 1006-2858(2006)10-0633-04

凉粉草中抗缺氧化学成分

秦立红¹, 郭晓宇¹, 范明², 爰石², 王乃利¹, 姚新生¹

(1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 军事医学科学院 基础医学研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 研究凉粉草 (*Mesona chinensis* Benth) 中的抗缺氧化学成分。方法 用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、ODS 柱色谱及制备 HPLC 色谱分离纯化化合物; 通过化合物的理化常数、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 波谱数据, 鉴定化合物结构; 通过大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆化细胞株 (PC12) 实验, 对各单体化合物进行活性评价。结果 从凉粉草体积分数为 65% 的乙醇提取物的氯仿层和乙酸乙酯层分离得到 8 个化合物: 咖啡酸 (1)、3-(4-乙氧基-3-羟基-苯基) 烯丙酸 (2)、咖啡酸乙酯 (3)、山奈酚 (4)、高山黄芩素 (5)、2-十六烷基-十八烷酸 (6)、熊果酸 (7) 和豆甾醇 (8); 应用 PC12 细胞缺氧模型在 DMSO 溶液中测得化合物 1、4、5、6、7、8 在不同质量浓度下具有不同的抗缺氧活性。结论 首次从凉粉草属中分离得到化合物 2、3、5、6; 化合物 1、4、5、6、7、8 有一定的抗缺氧活性, 化合物 4、5、7、8 有较好的抗缺氧活性。

关键词: 凉粉草; 化学成分; PC12 细胞; 抗缺氧

中图分类号: R 914 **文献标识码:** A

凉粉草 (*Mesona chinensis* Benth.) 为唇形科 (Labiatae) 凉粉草属 (*Mesona* Bl.) 植物。全球有凉粉草属植物约 8~10 种, 星散分布于印度东北部至东南亚及我国东南各省广大地区。我国产 2 种, 见于台湾、浙江、广东、广西西部及云南西部^[1]。凉粉草具有消暑、解渴、除热毒的功效, 用于治疗中暑、消渴、高血压、肌肉疼痛、关节疼痛^[2]。有文献报道从同属植物 *Mesona procumbens* Hemsl. 中分离得到的酚类成分有抗氧化活性, 但关于凉粉草的化学成分和活性报道较少。为此作者对采自广西的凉粉草进行系统的化学研究, 从中分离得到 8 个化合物。并通过大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆化细胞株 (PC12) 抗缺氧模型实验, 对各单体化合物进行活性测试, 发现凉粉草有很好的抗缺氧活性。

1 仪器与材料

Yanigimoto 熔点测定仪 (温度未校正, 日本 Eyerla 公司), UV2401PC 紫外光谱仪 (日本岛津公司), Jaso P-1020 旋光光谱仪 (日本岛津公司), Esquire 2000 质谱仪 (瑞士 Bruker 公司), Avance-400 超导核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司)。

收稿日期: 2005-12-05

作者简介: 秦立红 (1979-), 女 (汉族), 湖南沅江人, 硕士研究生, E-mail qllh0822@tom.com; 王乃利 (1950-), 男 (汉族), 辽宁营口人, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物化研究, Tel. 0755-26957685, E-mail wangnl@mail.sz.tsinghua.edu.cn。

硅胶 (青岛海洋化工厂, 100~140、200~300 μm), Rp-18 柱色谱填料 (德国 Merck 公司), 羟丙基葡聚糖凝胶 (SephadexTM LH-20, 日本 Amersham Biosciences AB 公司)。

色谱化学试剂 (中国天津永大试剂厂和天津协和公司)。

凉粉草采自广西南宁, 由广西食品药品检验检疫所周瑛教授提供并鉴定, 标本保存于深圳中药及天然药物研究中心。

2 提取分离

取凉粉草 4.6 kg 用 10 倍量体积分数为 65% 的乙醇加热回流提取 3 次, 减压浓缩得到浸膏 1100.5 g。将浸膏悬浮于 10 L 水中, 用氯仿和乙酸乙酯依次萃取, 得氯仿萃取物 32.0 g, 乙酸乙酯萃取物 38.7 g。将氯仿萃取物经 200~300 μm 的硅胶柱色谱, 用环己烷-乙酸乙酯梯度洗脱, 各流分再经 Sephadex LH-20 柱色谱、ODS 柱色谱、HPLC 色谱等色谱方法分离纯化得到化合物 6~8。将乙酸乙酯萃取物用氯仿-甲醇梯度洗脱, 所得各流分再经 Sephadex LH-20 柱色谱、ODS 柱色谱、HPLC 色谱等色谱方法分离纯化得到化合

物 1~ 5。化合物 1~ 5 的结构见图 1。

3 结构鉴定

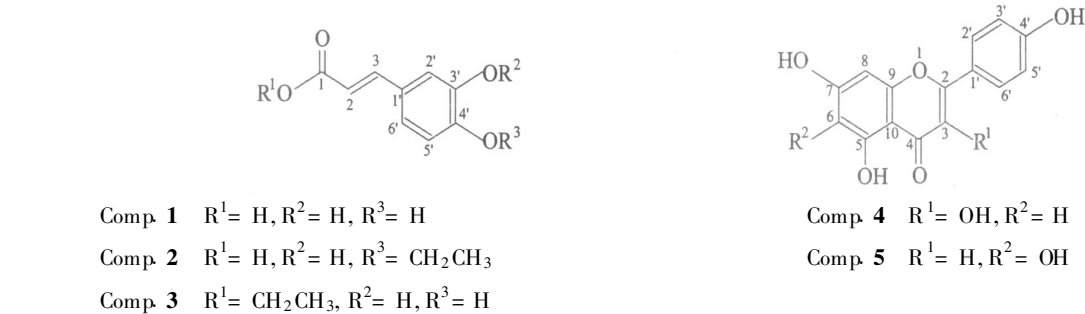


Fig. 1 Structures of compounds 1– 5

化合物 1: 褐色粉末。FeCl₃ 反应显紫褐色, 氨性氯化锍反应产生黑色沉淀, 提示有邻二酚羟基。ESI-MS *m/z*: 178. 9 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 180。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR(表 1) 数据, 确定分子式为 C₉H₈O₄。 ¹H-NMR(CD₃OD) 中: δ 7. 53(1H, d, *J*= 15. 9 Hz) 与 δ 6. 21(1H, d, *J*= 15. 9 Hz) 提示有反式烯烃; δ 7. 03(1H, d, *J*= 2. 1 Hz)、6. 92(1H, dd, *J*= 2. 1 Hz, 8. 2 Hz) 与 δ 6. 77(1H, d, *J*= 8. 2 Hz) 提示有苯环上的 ABX 偶合系统。结合理化性质、光谱数据与文献[3] 对照确定为咖啡酸。

化合物 2: 褐色粉末。FeCl₃ 反应显淡紫色, 氨性氯化锍显色反应阴性, 提示无邻二酚羟基。ESI-MS *m/z*: 207. 9 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 208。结合 NMR(表 1) 数据, 确定分子式为 C₁₁H₁₂O₄。 ¹H-NMR(CD₃OD) 中: δ 7. 52(1H, d, *J*= 15. 9 Hz) 与 δ 6. 23(1H, d, *J*= 15. 9 Hz) 提示有反式烯烃; δ 7. 02(1H, d, *J*= 1. 6 Hz)、6. 93

(1H, dd, *J*= 1. 6 Hz, 8. 1 Hz) 与 δ 6. 77(1H, d, *J*= 8. 1 Hz) 提示有苯环上的 ABX 偶合系统; δ 4. 20(2H, q, *J*= 7. 1 Hz) 与 δ 1. 30(3H, t, *J*= 7. 1 Hz) 提示有一 CH₂CH₃ 偶合系统。与咖啡酸的数据比对, 化合物 2 为咖啡酸的酯, 再与文献[4] 比对确定为 3-(4-乙氧基-3-羟基-苯基) 烯丙酸。

化合物 3: 褐色粉末。FeCl₃ 反应显紫褐色, 氨性氯化锍反应产生黑色沉淀, 提示有邻二酚羟基。ESI-MS *m/z*: 207. 9 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 208, 为化合物 2 的同分异构体。 ¹H-NMR(CD₃OD) 中: δ 7. 52(1H, d, *J*= 15. 9 Hz) 与 δ 6. 24(1H, d, *J*= 15. 9 Hz) 提示有反式烯烃; δ 7. 02(1H, d, *J*= 1. 9 Hz)、6. 93(1H, dd, *J*= 1. 9 Hz, 8. 2 Hz) 与 δ 6. 77(1H, d, *J*= 8. 2 Hz) 提示有苯环上的 ABX 偶合系统; δ 4. 20(2H, q, *J*= 7. 1 Hz) 与 δ 1. 30(3H, t, *J*= 7. 1 Hz) 提示有一 CH₂CH₃ 偶合系统。与咖啡酸的数据比对, 化合物 3 为咖啡酸的酯, 再结合文献[5] 确定为咖啡酸乙酯。

Table 1 ¹³C-NMR and ¹H-NMR data of compounds 1– 3(CD₃OD, TMS, 400 MHz)

Position	Comp. 1		Comp. 2		Comp. 3	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
1	171. 1	–	170. 8	–	169. 3	–
2	115. 1	6. 21(1H, d, <i>J</i> = 15. 9 Hz)	115. 1	6. 23(1H, d, <i>J</i> = 15. 9 Hz)	115. 1	6. 24(1H, d, <i>J</i> = 15. 9 Hz)
3	115. 5	7. 53(1H, d, <i>J</i> = 15. 9 Hz)	115. 3	7. 52(1H, d, <i>J</i> = 15. 9 Hz)	115. 3	7. 52(1H, d, <i>J</i> = 15. 9 Hz)
1'	146. 7	–	146. 7	–	146. 7	–
2'	127. 8	7. 03(1H, d, <i>J</i> = 2. 1 Hz)	127. 7	7. 02(1H, d, <i>J</i> = 1. 6 Hz)	127. 7	7. 02(1H, d, <i>J</i> = 1. 9 Hz)
3'	147. 0	–	144. 8	–	146. 8	–
4'	149. 4	–	151. 2	–	149. 5	–
5'	122. 9	6. 77(1H, d, <i>J</i> = 8. 2 Hz)	120. 9	6. 77(1H, d, <i>J</i> = 8. 1 Hz)	122. 9	6. 77(1H, d, <i>J</i> = 8. 2 Hz)
6'	116. 5	6. 92(1H, dd, <i>J</i> = 2. 1, 8. 2 Hz)	116. 5	6. 93(1H, dd, <i>J</i> = 1. 6, 8. 1 Hz)	116. 5	6. 93(1H, dd, <i>J</i> = 1. 9, 8. 2 Hz)
OCH ₂	–	–	61. 4	4. 20(2H, q, <i>J</i> = 7. 1 Hz)	61. 4	4. 20(2H, q, <i>J</i> = 7. 1 Hz)
CH ₃	–	–	14. 6	1. 30(3H, t, <i>J</i> = 7. 1 Hz)	14. 6	1. 30(3H, t, <i>J</i> = 7. 1 Hz)

– Not exist

化合物 4: 黄色粉末。FeCl₃ 反应显紫红色, 盐酸-镁粉反应显紫红色, 提示为黄酮化合物。ESI-MS m/z : 296. 8 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 298, 结合¹H-NMR和¹³C-NMR(表 2) 数据, 确定分子式为 C₁₅H₇O₆。 ¹H-NMR(CD₃OD) 中: δ 12. 47(1H, br. s), 提示为5-OH; δ 8. 04(2H, d, J= 8. 9 Hz) 与 δ 6. 92(2H, d, J= 8. 9 Hz) 提示为 B 环上的 AA' BB' 偶合系统; δ 6. 43(1H, d, J= 2. 0 Hz) 与 δ 6. 18(1H, d, J= 2. 0 Hz) 提示为 A 环上的间位取代氢。结合文献[6] 确定为山奈酚。

Table 2 ¹³C-NMR and ¹H-NMR data of compound 4 and 5(CD₃OD, TMS, 400 MHz)

Position	Comp. 4		Comp. 5	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
1	—	—	—	—
2	146. 7	—	165. 8	—
3	131. 9	—	94. 5	6. 38(1H, s)
4	175. 8	—	177. 4	—
5	160. 6	—	148. 0	—
5- OH	—	12. 47(1H, br. s)	—	—
6	98. 1	6. 18(1H, d, J= 2. 0 Hz)	137. 1	—
7	163. 9	—	158. 3	—
8	93. 4	6. 43(1H, d, J= 2. 0 Hz)	99. 4	6. 17(1H, s)
9	156. 1	—	160. 5	—
10	102. 9	—	104. 5	—
1	121. 6	—	123. 7	—
2	129. 4	8. 04(1H, d, J= 8. 9 Hz)	130. 7	8. 07(1H, d, J= 8. 7 Hz)
3	115. 5	6. 92(1H, d, J= 8. 9 Hz)	116. 3	6. 89(1H, d, J= 8. 7 Hz)
4	159. 1	—	162. 5	—
5	115. 3	6. 92(1H, d, J= 8. 9 Hz)	116. 3	6. 89(1H, d, J= 8. 7 Hz)
6	129. 4	8. 04(1H, d, J= 8. 9 Hz)	130. 7	8. 07(1H, d, J= 8. 7 Hz)

— —Not exist

化合物 6: 白色片状结晶(甲醇), mp 83~ 85 ℃。其 TLC 与2-十六烷基-十八烷酸对照品一致。

化合物 7: 白色粉末。其 TLC 与熊果酸对照品一致, ESI-MS、¹³C-NMR光谱数据与文献[8] 报道的熊果酸一致。

化合物 8: 白色片状结晶(甲醇), mp 138~ 140 ℃。其 TLC 与豆甾醇对照品一致, ESI-MS 和¹H-NMR光谱数据与文献[9] 报道的豆甾醇一致。

4 活性测试

PC12细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆化细胞株, 常用于测试供试品的抗缺氧活性。取培养 8 d 的 PC12 细胞, 按实验分为对照组(DMSO)

化合物 5: 黄色粉末。FeCl₃ 反应显紫红色, 盐酸-镁粉反应显紫红色, 提示为黄酮化合物。ESI-MS m/z : 296. 8 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 298, 结合¹H-NMR和¹³C-NMR(表 2) 数据确定分子式为 C₁₅H₇O₆, 为化合物 4 的同分异构体。¹H-NMR(CD₃OD) 中: δ 8. 07(2H, d, J= 8. 7 Hz) 与 δ 6. 89(2H, d, J= 8. 7 Hz) 提示为 B 环上的 AA' BB' 偶合系统; δ 6. 38(1H, s) 与 δ 6. 17(1H, s) 提示连氢碳的邻、间位被取代。与山奈酚比对, 并结合文献[7] 确定为高山黄芩素。

和供试品各组(供试品质量浓度分别为 25、50、100 mg•L⁻¹)。在缺氧前 24 h 分别加入不同供试品。然后将细胞移置恒温(37 ℃) 密闭缺氧容器内, 连续充以体积分数为 90% 的 N₂ 和 10% 的 CO₂ 的无氧气体, 在缺氧条件下继续培养 12 h 后取出, 在倒置相差显微镜(400 倍) 下每皿按“Z”字顺序随机观察并计数 10 个相邻视野的活细胞和死细胞数, 计算 PC12 细胞存活百分率。活性结果见表 3。

PC12细胞缺氧模型显示, 在 DMSO 溶液中化合物 1、4、5、6、7、8 不同质量浓度下有不同的抗缺氧活性, 其中化合物 4、5、7、8 抗缺氧活性较好。

Table 3 Survival rates of anoxic PC12 cells treated by compound at different concentration in DMSO solvent

Compound	$\rho(\text{compound})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$		
	25	50	100
DMSO	19.08±6.76	17.83±5.33	15.71±6.12
1	21.13±4.99	16.31±4.11	20.49±4.46 ^a
2	20.11±5.61	14.89±3.04	18.52±5.34
3	20.47±6.35	15.01±3.36	19.97±4.14
4	22.71±4.50	29.37±5.98 ^b	25.12±5.16 ^b
5	23.84±5.67	30.25±6.87 ^b	27.67±6.47 ^b
6	25.22±3.29 ^a	24.84±4.98 ^b	21.78±6.17
7	27.02±4.95 ^a	27.36±5.56 ^b	28.24±7.36 ^b
8	25.74±9.26 ^a	22.49±6.67 ^a	26.32±6.28 ^b

a— $P<0.05$, b— $P<0.01$, vs. control

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 1849.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1986. 1915.

[3] 凌云, 鲍燕燕. 蒲公英化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 1997, 32(10): 584– 586.

[4] 陶曙红, 吴凤镔. 半枝莲化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16: 7.

[5] 陈立娜, 李萍. 牵牛子化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(3): 146– 148.

[6] Iwona W, Agnieszka Z. ¹³C-NMR studies of flavonoids, magnetic resonance in chemistry [J]. Magn Reson Chem, 2001, 39: 374– 380.

[7] Komissarenko N F, Derkach A I, Sheremet I P, et al. Flavonoids of *Stachys inflata* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 1979, 14: 445– 446.

[8] Werner S, Nebojsa S. Spectral assignments and reference data, magnetic resonance in chemistry [J]. Magn Reson Chem, 2003, 41: 636– 638.

[9] Wright J L C, McInnes A G. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Can J Chem, 1978, 56: 1898– 1903.

Anti-anoxic constituents from *Mesona chinensis* Benth.

QIN Lirong¹, GUO Xiaoyu¹, Fan Ming², Ding Aishi², WANG Naili¹, YAO Xirsheng¹
(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Basic Physic Graduate School of Military Medicine Academy, Beijing 100850, China)

Abstract: **Objective** To study the anti-anoxic constituents from *Mesona chinensis* Benth. **Methods** Guided by the PC 12 anoxic cell assay, compounds 1– 8 were isolated and purified by the combination of silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, ODS column chromatography and preparative HPLC chromatography, and identified by spectral data and physicochemical properties. Then the activities of each compound were determined by PC12 cell assay, respectively. **Results** Eight known compounds were isolated from *Mesona chinensis* Benth. Their structures were identified as: caffeic acid(1), 3-(4-ethoxy-3-hydroxy-phenyl)-acrylic acid(2), caffeic acid ethyl ester(3), kaempferol(4), scutalpin(5), 2-hexadecyl-octadecanoic acid(6), ursonic acid(7), stigmasterol(8). Compounds 1, 4, 5, 6, 7 and 8 showed different activities at different concentrations in PC12 cell assay. **Conclusions** The compounds 2, 3, 5 and 6 are first isolated from *Mesona chinensis* Benth. . The compounds 1, 4, 5, 6, 7 and 8 have substantial anti-anoxic activities, wherein the compounds 4, 5, 6 and 8 have better anti-anoxic activities.

Key words: *Mesona chinensis* Benth.; chemical constituents; PC12 cell; anti-anoxic