

中药地锦草芹菜素糖苷类化合物

田 瑛, 刘细桥, 董俊兴*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所药物化学研究室, 北京 100850)

摘要: 为了研究中草药地锦草抗 HBV 的活性物质基础, 采用大孔树脂、Sephadex LH-20、MCI GEL CHP 20P 等色谱方法, 从地锦草 70%乙醇提取物中分离得到 5 个芹菜素糖苷类化合物, 通过 MS、NMR、2D-NMR 等波谱分析手段鉴定了化合物的结构, 分别为: 芹菜素-7-O-(6"-O-没食子酰)- β -D-葡萄糖苷 (1), 芹菜素-7-O- β -D-芹糖 (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷 (2), 芹菜素-7-O- β -D-芦丁糖苷 (3), 芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷 (4), 芹菜素 (5)。化合物 1 为新化合物, 化合物 2、3 为首次从该植物中分得。

关键词: 地锦草; 芹菜素糖苷; 衍生物

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 05-0496-04

Apigenin glycosides from *Euphorbia humifusa* Wild.

TIAN Ying, LIU Xi-qiao, DONG Jun-xing*

(Department of Pharmaceutical Chemistry, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: The investigation on the herbal of *Euphorbia humifusa* Wild. was carried out in order to find its anti-HBV constituents. The isolation and purification were performed by chromatography such as Sephadex LH-20, MCI GEL CHP 20P, etc. Based on the spectral analysis, five apigenin glycosides were identified as apigenin-7-O-(6"-O-galloyl)- β -D-glucopyranoside (1), apigenin-7-O- β -D-apiofuranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (2), apigenin-7-O- β -D-lutinoside (3), apigenin-7-O- β -D-glucopyranside (4) and apigenin (5). Among them, compound 1 is a new compound, compound 2 and 3 were isolated from this plant for the first time.

Key words: *Euphorbia humifusa* Wild.; apigenin glycoside; derivatives

地锦草 (*Euphorbia humifusa* Wild.) 为大戟科大戟属植物, 具有清热解毒、活血、止血、利湿、通乳之功效, 在我国南方分布广, 资源十分丰富。

通过体外抗 HBV 活性筛选, 发现地锦草 70%乙醇提取物对 HBV e 抗原的分泌具有剂量依赖性的抑制作用, 最高抑制率为 73.2%, IC_{50} 为 $24.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。用大孔树脂富集其活性部位, 并进行了系统深入的化学成分研究。本文主要介绍从活性部位分离得到的 5 个以芹菜素为母核的糖苷或糖苷衍生物, 经波谱分

析鉴定为芹菜素-7-O-(6"-O-没食子酰)- β -D-葡萄糖苷 (1), 芹菜素-7-O- β -D-芹糖 (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷 (2), 芹菜素-7-O- β -D-芦丁糖苷 (3), 芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷 (4), 芹菜素 (5)。其中化合物 1 为新化合物, 化合物 2、3 为首次从该植物中分得。

化合物 1 黄色粉末, mp 205~206 °C, 盐酸-镁粉反应和 Molish 反应阳性, UV 光谱显示黄酮的特征吸收峰 268 nm 和 331 nm, 提示为黄酮苷类化合物。HR-ESI-MS m/z : 585.123 9 $[M+H]^+$ (计算值为 585.123 6), 确定该化合物的分子式为 $C_{28}H_{25}O_{14}$ 。

^1H NMR 在 δ 6.3~8.0 区域有 9 个氢信号, 从化学位移及相互偶合关系判断, 其中 7 个氢信号与芹菜素^[1]基本吻合, 分别为 δ 7.90 (2H, d, $J = 9.2$ Hz, H-2', 6'),

收稿日期: 2008-11-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600803).

*通讯作者 Tel: 86-10-66931314, Fax: 86-10-68164257,

E-mail: hq6106@yahoo.com.cn

6.91 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.85 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.46 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 故初步推断该化合物具有芹菜素的母核结构; 另 2 个氢信号 δ 6.95 (2H, s) 与没食子酰基^[2]的芳环质子信号完全符合, 故初步推断该化合物同时具有没食子酰结构; 在偏高场区, δ 5.18 (1H, d, $J = 7.2$ Hz) 为糖端基氢信号, δ 4.5~3.2 (6H, m) 为糖上氢信号, 推测化合物还含有一个六碳糖片段, 将化合物酸水解与标准糖共薄层, 示为葡萄糖, β 构型。

^{13}C NMR 上显示 28 个碳信号, 其中 δ 182.0 为黄酮母核上羰基碳, δ 165.7 为没食子酰基的羰基碳, δ 99.4 为糖端基碳。进一步佐证了上面对化合物结构片段的大致推断。

三个结构片段芹菜素、没食子酰基、葡萄糖的具体连接方式则通过碳氢相关谱得到确认。分析 HMBC 谱, 糖端基氢 δ 5.18 (1H, d, $J = 7.2$ Hz) 与碳信号 δ 162.7 有远程相关, 而该碳信号同时还与芹菜素 δ 6.82 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8) 及 6.46 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6) 相关, 故归属了 δ 162.7 为芹菜素 7 位碳信号, 且确定了芹菜素 7 位与葡萄糖 1 位成苷键相连。进一步通过与文献报道 2"-*O*-galloyl-isovtixin^[2]的波谱数据比较, 并结合 HMBC 谱, 该化合物的波谱信号可基本归属 (具体数据见表 1)。同时, 发现糖上 6 位碳 δ 62.9 和氢 δ 4.47 (1H, d, $J = 10.4$ Hz)、4.29 (1H, dd, $J = 12.4, 4.4$ Hz) 信号与芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷相比明显向低场位移, 说明没食子酰基与糖 6 位成酯键相连。

根据上述推断, 鉴定化合物为芹菜素-7-*O*-(6"-*O*-没食子酰)- β -D-葡萄糖苷 (apigenin-7-*O*-(6"-*O*-galloyl)- β -D-glucopyranoside), 经文献检索未见报道, 为一新化合物 (图 1)。

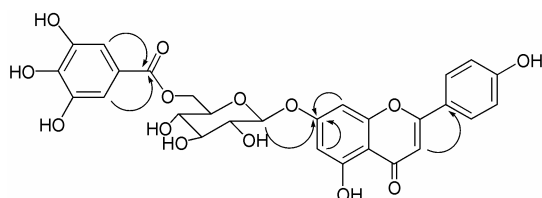


Figure 1 The structure and key HMBC correlations of compound 1

实验部分

1 仪器与材料

熔点用 X41 型显微熔点测定仪 (温度未校正) 测定; 紫外光谱用岛津 UV2501PC 紫外分光光度仪

Table 1 NMR data and major correlations from HMBC of compound 1 in DMSO- d_6 (δ , J in Hz)

Position	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
Apigenin			
2		164.4	H-3, 2', 6'
3	6.85 (1H, s)	103.1	
4		181.9	H-3
5		161.3	H-6
6	6.46 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	99.7	
7		162.7	H-6, 8, 1''
8	6.82 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	94.6	H-6
9		157.0	H-8
10		105.4	H-3, 6, 8
1'		121.0	H-3
2'	7.90 (1H, d, $J = 9.2$ Hz)	128.6	
3'	6.91 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	115.9	
4'		161.2	H-2', 3', 5', 6'
5'	6.91 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	115.9	
6'	7.90 (1H, d, $J = 9.2$ Hz)	128.6	
4'-OH	10.34 (1H, br s)		
5-OH	13.00 (1H, s)		
Glucose			
1''	5.18 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)	99.4	
2''	3.41 (1H, m)	73.0	
3''	3.37 (1H, m)	76.1	
4''	3.33 (1H, m)	69.2	
5''	3.67 (1H, m)	73.8	
6a''	4.47 (1H, d, $J = 10.4$ Hz)	62.9	
6b''	4.29 (1H, dd, $J = 12.4, 4.4$ Hz)		
Galloyl			
1'''		119.3	H-2''', 6'''
2'''	6.95 (1H, s)	108.6	
3'''		145.5	H-2''', 6'''
4'''		138.5	H-2''', 6'''
5'''		145.5	H-2''', 6'''
6'''	6.95 (1H, s)	108.6	
7'''		165.7	H-2''', 6'''
3''', 4''', 5'''-OH 9.08–9.26 (3H, br s)			

测定; 核磁共振谱用日本电子 JUM-ECA-400 超导核磁共振仪测定, TMS 为内标; ESI-MS 用 Thermo Advantage Max 型液相色谱-质谱联用仪测定。AB-8 大孔树脂为南开大学化工厂产品; Sephadex LH-20 为美国 Pharmacia 公司产品; SP825 大孔树脂、MCI GEL CHP 20P (75~150 μm) 为日本三菱化学公司产品。溶剂为分析纯, 北京化学试剂厂生产。

地锦草全草于 2007 年 5 月购于安徽亳州药材交易中心, 经军事医学科学院李彬教授鉴定为大戟科地

锦草 (*Euphorbia humifusa* Wild.) 全草。

2 提取与分离

地锦草全草 12 kg, 粉碎, 70%乙醇冷浸提取 3 次, 浓缩得浸膏 1.1 kg。将 1.1 kg 浸膏用氯仿萃取得水层提取物 774 g, 进一步用 AB-8 型大孔树脂对其初步分离, 醇-水洗脱, 得 50%乙醇洗脱物 94.4 g, 再次用 SP825 型大孔树脂分离该部位, 得不同比例的醇水洗脱物。其中经 SP825 分离得到 50%乙醇洗脱物 56.7 g, 取 32 g 用 Sephadex LH-20 (甲醇-水、乙醇-水、丙酮-水系统) 和 MCI GEL CHP 20P (甲醇-水系统) 反复交替分离, 得到化合物 **1** (30 mg)、化合物 **2** (14 mg)、化合物 **3** (33 mg)、化合物 **4** (40 mg)、化合物 **5** (21 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 黄色粉末; mp 205~206 °C; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm: 268, 331; HR-ESI-MS (m/z): 585.123 9 $[M+H]^+$; 1H NMR 和 ^{13}C NMR 见表 1。

化合物 **2** 白色粉末; mp 204~206 °C; ESI-MS (m/z): 563 $[M-H]^-$, 565 $[M+H]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 10.40 (1H, s, 4'-OH), 7.96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.87 (1H, s, H-3), 6.81 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-8), 6.43 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-6), 5.35 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-1'''), 5.17 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.92 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4b'''), 3.75 (1H, br d, $J = 5.2$ Hz, H-2'''), 3.71 (1H, dd, $J = 10.4, 5.6$ Hz, H-6b''), 3.66 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-4a'''), 3.52 (1H, m, H-2''), 3.49 (1H, m, H-3''), 3.47 (1H, m, H-5''), 3.46 (1H, m, H-6a''), 3.30 (2H, s, H-5'''), 3.20 (1H, m, H-4'')。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 182.0 (C-4), 164.3 (C-2), 162.7 (C-7), 161.4 (C-5), 161.1 (C-4'), 156.9 (C-9), 128.6 (C-2', 6'), 121.0 (C-1'), 116.0 (C-3', 5'), 108.7 (C-1'''), 105.4 (C-10), 103.1 (C-3), 99.3 (C-6), 98.1 (C-1''), 94.8 (C-8), 79.3 (C-3'''), 77.0 (C-5''), 76.8 (C-2'''), 76.0 (C-3''), 75.7 (C-2''), 74.0 (C-4'''), 69.8 (C-4''), 64.2 (C-5'''), 60.5 (C-6'')。以上波谱数据与文献^[3]报道的芹菜素-7-*O*- β -D-芹糖(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷数据吻合, 鉴定化合物 **2** 为芹菜素-7-*O*- β -D-芹糖(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷 (apigenin-7-*O*- β -D-apiofuranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside)。

化合物 **3** 淡黄色粉末; mp 272~274 °C; ESI-MS (m/z): 577 $[M-H]^-$, 579 $[M+H]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 10.40 (1H, s, 4'-OH), 7.96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.96 (2H, d, $J = 8.8$

Hz, H-3', 5'), 6.88 (1H, s, H-3), 6.78 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.46 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-6), 5.07 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 4.55 (1H, br s, H-1'''), 1.07 (3H, d, $J = 6$ Hz, H-6'''); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 182.0 (C-4), 164.4 (C-2), 162.9 (C-5), 161.3 (C-7), 161.2 (C-4'), 156.9 (C-9), 128.7 (C-2', 6'), 121.0 (C-1'), 116.1 (C-3', 5'), 105.4 (C-10), 103.1 (C-3), 100.5 (C-1''), 99.9 (C-1'''), 99.5 (C-6), 94.8 (C-8), 76.3 (C-5''), 75.6 (C-3''), 73.1 (C-4'''), 72.1 (C-2''), 70.7 (C-4''), 70.3 (C-3'''), 69.5 (C-2''), 68.3 (C-5'''), 66.0 (C-6''), 17.8 (C-6''')。以上波谱数据与文献^[4]报道的芹菜素-7-*O*- β -D-芦丁糖苷数据吻合, 鉴定化合物 **3** 为芹菜素-7-*O*- β -D-芦丁糖苷 (apigenin-7-*O*- β -D-lutinoside)。

化合物 **4** 黄白色粉末; mp 239~240 °C; ESI-MS (m/z): 431 $[M-H]^-$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 10.40 (1H, s, 4'-OH), 7.96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.87 (1H, s, H-3), 6.83 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-8), 6.45 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-6), 5.07 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.72~3.19 (6H, m, 糖基质子); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 182.0 (C-4), 164.3 (C-2), 163.0 (C-7), 161.4 (C-5), 161.1 (C-4'), 156.9 (C-9), 128.7 (C-2', 6'), 121.0 (C-1'), 116.0 (C-3', 5'), 105.3 (C-10), 103.1 (C-3), 99.9 (C-6), 99.5 (C-1''), 94.8 (C-8), 77.2 (C-3''), 76.4 (C-5''), 73.1 (C-2''), 69.5 (C-4''), 60.6 (C-6'')。以上波谱数据与文献^[5]报道的芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷数据吻合, 鉴定化合物 **4** 为芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷 (apigenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside)。

化合物 **5** 淡黄色粉末; mp >340 °C; ESI-MS (m/z): 269 $[M-H]^-$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 10.79 (1H, s, 7-OH), 10.47 (1H, s, 4'-OH), 7.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.79 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 181.7 (C-4), 164.1 (C-2), 163.7 (C-7), 161.4 (C-5), 161.1 (C-4'), 157.3 (C-9), 128.4 (C-2', 6'), 121.1 (C-1'), 115.9 (C-3', 5'), 103.7 (C-10), 102.8 (C-3), 98.8 (C-6), 93.9 (C-8)。以上波谱数据与文献^[1]报道的芹菜素数据吻合, 鉴定化合物 **5** 为芹菜素 (apigenin)。

4 体外抗 HBV 活性筛选

选取生长良好的 HepG2.2215 细胞, 用胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 细胞数为 1×10^5 /mL。细胞悬液接种于 96 孔培养板中, 待细胞完全贴壁后加入含有

不同浓度药物的培养液, 培养 4 d 后更换含相同药物浓度的培养液, 继续培养 4 d。收集第 8 天细胞上清液, 用试剂盒检测 HBsAg、HBeAg 及细胞存活率。采用 Origin 软件对实验数据进行统计。

References

- [1] Zou ZM, Yang JS, Ju JH. Study on chemical constituents of *Hemistepta lyrata* Bunge [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006, 37: 1303–1304.
- [2] Latte KP, Ferreira D, Venkatraman MS, et al. *O*-Galloyl-*C*-glycosylflavones from *Pelargonium reniforme* [J]. Phytochemistry, 2002, 59: 419–424.
- [3] Yoshikawa M, Uemura T, Shimoda H, et al. Medicinal foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the aerial part of *Petroselinum crispum* Mill. (Parsley) and structures of 6''-acetylapiin and a new monoterpene glycoside, petroside [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48: 1039–1044.
- [4] Ren YL, Yang JS. Study on chemical constituents of *Hemistepta lyrata* Bunge [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36: 746–749.
- [5] Zhao DB, Zhang W, Li MJ, et al. Studies on chemical constituents of *Acroptilon repens* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 1869–1872.

2009 中国药学会学术年会暨第九届中国药师周 10 月在广东省珠海市召开

经研究协商, 由中国药学会主办, 丽珠集团股份有限公司协办的 2009 中国药学会学术年会暨第九届中国药师周定于 2009 年 10 月 16 日~19 日在广东省珠海市举行, 届时将有千名以上药学及相关学科科技工作者参加本次大会。

本次大会是深入贯彻落实党的十七大和“两会”精神的一次会议, 大会主题: 药学科技创新与医药卫生体制改革。大会将回顾建国 60 年来, 特别是改革开放三十年来, 我国药学事业发展历程, 所取得的巨大成就, 对中药和天然药物、医院药学等十九个药学专业领域进行交流, 分析研讨药学各分支学科发展现状和前景, 展望我国药学科技辉煌未来, 为创新型国家建设和构建和谐社会贡献力量。