

孔雀柏化学成分研究

蔡旭^{1,2}, 宋启示², 杨剑坤³, 卢志远², 陈科力¹, 张玉梅^{2*}

1. 湖北中医药大学, 教育部中药资源与中药复方重点实验室, 湖北 武汉 430065;
2. 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, 云南 昆明 650223;
3. 云南省环境科学研究院, 云南 昆明 650034)

摘要:目的:研究孔雀柏(*Chamaecyparis obtusa* cv. Tetragon)的化学及活性成分。方法:综合运用工业甲醇提取、碱溶酸沉,通过硅胶柱、Sephadex LH-20、C₁₈反相硅胶以及制备液相等色谱方法分离纯化,并采用MS和NMR等波谱学方法鉴定化合物结构,测试各化合物的细胞毒活性。结果:分离并鉴定了8个化合物,分别为catechin(1)、taxifolin-3-O-β-D-xylopyranoside(2)、icariside E4(3)、(-) arctigenin(4)、savinin(5)、horsfieldin(6)、dihydrosesamin(7)和skimmin(8)。结论:此8个化合物均为在该植物中首次分离得到。体外细胞毒活性筛选表明,孔雀柏的甲醇提取物及其总生物碱部位在体外对人肿瘤细胞株A549、BGC-823、K562均具有一定的细胞毒活性。此8个化合物均无明显细胞毒活性,进一步活性测试和化学研究尚在进行中。

关键词:孔雀柏;化学成分;细胞毒活性

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1673-2197(2015)12-0029-02

DOI:10.11954/ytctyy.201512012

孔雀柏(*Chamaecyparis obtusa* cv. Tetragon)是扁柏属植物日本扁柏的一个栽培变种,主要分布于北美、日本及我国台湾,我国有1种及其1变种^[1]。该属植物有凉血、止血之功效,用于治疗吐血、鼻衄、便血、尿血、慢性气管炎、失眠及便秘等证,具有广阔的药用价值^[2]。其含有的化合物大多结构新颖,生物活性多样,很多具有抗肿瘤和抗病毒等活性^[3-5]。有关孔雀柏的化学及活性成分的研究报道较少,目前仅有本研究组前期从中分离得到一个新骨架的二萜生物碱chamobtusin A^[6]。为进一步寻找孔雀柏中的抗肿瘤活性成分,笔者对孔雀柏的枝叶进行了较深入的化学与抗肿瘤细胞毒活性研究。首次从其甲醇提取物中分离鉴定出8个化合物,体外活性筛选表明其对人肿瘤细胞株A549、BGC-823和K562上尚无明显细胞毒活性。

1 仪器与材料

MS采用液相离子阱质谱联用仪Bruker HCT/ES-QUIRE测定;NMR采用BrukerAM-400和Bruker DRX-500超导核磁共振仪测定;分离纯化采用安捷伦1100、岛津LC-20A高效液相色谱仪;Sephadex LH-20(瑞士Pharmacia公司);硅胶(青岛化工厂);RP-C18柱色谱材料(Merck公司);TLC硅胶H预制薄层板(青岛工厂),显色方法为254、365nm荧光,10%硫酸乙醇溶液显色。

收稿日期:2015-02-26

作者简介:蔡旭,湖北中医药大学硕士研究生,研究方向为中药资源与中药复方。

通讯作者:张玉梅,博士,中国科学院西双版纳热带植物园副研究员,研究方向为民族药。

孔雀柏枝叶2013年5月采集于云南昆明,原植物经中国科学院昆明植物研究所孙卫邦研究员鉴定为孔雀柏*Chamaecyparis obtusa* cv. Tetragon。

2 提取与分离

取孔雀柏干燥枝叶22kg,粉碎后用工业甲醇冷浸提取3次,减压回收甲醇得1.45kg总浸膏。总浸膏用热水分散后,以稀HCl酸化(pH2.0),用乙酸乙酯萃取四次,得乙酸乙酯浸膏630g。所得水部分用NaOH碱化(pH10.0),用氯仿萃取4次,回收氯仿得到总碱部分12.5g。剩余水部分用稀HCl调节pH7.0,再分别以氯仿和正丁醇萃取,得到正丁醇部位浸膏456g。乙酸乙酯部位经硅胶色谱分离,用石油醚-丙酮(10:1→0:1)系统梯度洗脱,得6个流分(Fr.7~12)。Fr.8经反复硅胶色谱(石油醚-乙酸乙酯8:1→2:1)、凝胶色谱(LH-20、氯仿-甲醇1:1)分离纯化得到化合物5(13mg)和化合物7(18mg)。Fr.11经反复硅胶色谱(石油醚-乙酸乙酯8:1→2:1)、凝胶色谱(LH-20,氯仿-甲醇1:1)分离纯化得到化合物4(15mg)、化合物6(17mg)、化合物1(30mg)。正丁醇部位经硅胶色谱用氯仿-甲醇(9:1→1:1)系统梯度洗脱,得6个流分(Fr.1~6)。Fr.1和Fr.3经反复凝胶色谱(LH-20、氯仿-甲醇1:1)、RP-C18(甲醇-水0:100→30:70)、HPLC(甲醇-水5

: 95→20 : 80) 分离得到化合物 8 (16mg)、化合物 2 (15mg)、化合物 3 (56mg) 和化合物 7 (20mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色针状结晶, 分子式 $C_{15}H_{14}O_6$, ESI-MS m/z : 289 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 500MHz): δ 4.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-2), 3.99 (1H, m, H-3), 2.83 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H_a-4), 2.59 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H_b-4), 2.59 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-4), 5.93 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.85 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.83 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.70 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6'); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125MHz): δ 82.8 (C-2), 68.7 (C-3), 28.5 (C-4), 157.5 (C-5), 96.4 (C-6), 156.8 (C-7), 95.6 (C-8), 157.7 (C-9), 100.9 (C-10), 132.2 (C-1'), 115.3 (C-2'), 146.2 (C-3'), 146.2 (C-4'), 115.3 (C-5'), 120.1 (C-6')。通过波谱数据分析并与文献^[7]比较, 鉴定化合物 1 为 catechin。

化合物 2: 黄色结晶, 分子式 $C_{20}H_{20}O_{11}$, EI^+ -MS m/z : 435 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 400MHz): δ 5.06 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2), 4.73 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3), 5.88 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.89 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.95 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.80 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5'), 6.80 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6'), 3.82 (1H, d, $J = 6.1$ Hz, H-1) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100MHz): δ 83.6 (C-2), 77.4 (C-3), 195.7 (C-4), 165.4 (C-5), 96.4 (C-6), 168.9 (C-7), 97.4 (C-8), 164.1 (C-9), 102.4 (C-10), 129.0 (C-1'), 115.3 (C-2'), 146.2 (C-3'), 146.2 (C-4'), 116.2 (C-5'), 120.9 (C-6'), 103.1 (C-1''), 73.4 (C-2''), 75.8 (C-3''), 70.8 (C-4''), 66.0 (C-5'')。通过波谱数据分析并与文献^[8]比较, 鉴定化合物 2 为 taxifolin-3-O- β -D-xylopyranoside。

化合物 3: 白色粉末, 分子式 $C_{26}H_{34}O_{10}$, EI^+ -MS m/z : 506 $[M]^+$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 400MHz): δ 6.71 (1H, s, H-2), 7.06 (1H, s, H-6), 2.60 (2H, t, H-7), 1.80 (2H, m, H-8), 3.55 (2H, m, H-9), 7.01 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.09 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.89 (1H, dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, H-6'), 5.53 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-7'), 3.44 (1H, m, H-8'), 3.80 (2H, m, H-9'), 5.33 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-1), 3.76 (3H, s, 3-OCH₃), 3.84 (3H, s, 3'-OCH₃); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100MHz): δ 137.1 (C-1), 114.0 (C-2), 145.2 (C-3), 147.4 (C-4), 129.6 (C-5), 117.9 (C-6), 32.9 (C-7), 35.8 (C-8), 65.2 (C-9), 138.8 (C-1'), 111.2 (C-2'), 152.1 (C-3'), 146.5 (C-4'), 119.6 (C-5'), 119.1 (C-6'), 88.6 (C-7'), 55.6 (C-8'), 65.1 (C-9'), 101.3 (C-1''), 72.1 (C-2''), 72.0 (C-3''), 73.8 (C-4''), 70.8 (C-5''), 18.0 (C-6''), 56.4 (3-OCH₃), 56.7 (3'-OCH₃)。通过波谱数据分析并与文献^[9]比较, 鉴定化合物 3 为 icariside E4。

化合物 4: 无色油状, 分子式 $C_{21}H_{24}O_6$, ESI-MS m/z : 371 $[M-H]^-$ 。其 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 图谱与本实验室对照品 (-)arctigenin 图谱一致, TLC 上的斑点位置及显色与 (-)arctigenin 标准品相同。通过波谱数据分析并与文献^[10]比较, 鉴定化合物 4 为 (-)arctigenin。

化合物 5: 白色结晶, 分子式 $C_{20}H_{16}O_6$, EI^+ -MS m/z : 352 $[M]^+$ 。其 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 图谱与本实验室对照品 savinin 图谱一致, TLC 上的斑点位置及显色与 savinin 标准品相同。通过波谱数据分析并与文献^[10]比较, 鉴定化合物 5 为 savinin。

化合物 6: 白色针状结晶, 分子式 $C_{20}H_{20}O_6$, EI^+ -MS m/z : 356 $[M]^+$ 。其 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 图谱与本实验室对照品 horsfieldin 图谱一致, TLC 上的斑点位置及显色与 horsfieldin 标准品相同。通过波谱数据分析并与文献^[10]比较, 鉴定化合物 6 为 horsfieldin。

化合物 7: 无色结晶, 分子式 $C_{20}H_{20}O_6$, ESI-MS m/z : 339 $[M-OH]^-$ 。其 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 图谱与本实验室对照品 dihydroresamin 图谱一致, TLC 上的斑点位置及显色与 dihydroresamin 标准品相同。通过波谱数据分析并与文献^[10]比较, 鉴定化合物 7 为 dihydroresamin。

化合物 8: 白色粉末, 分子式 $C_{20}H_{16}O_6$, 其 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 图谱与本实验室对照品 skimmin 图谱一致, TLC 上的斑点位置及显色与 skimmin 标准品相同。通过波谱数据分析并与文献^[11]比较, 鉴定化合物 8 为 skimmin。

4 结论

本研究从采自云南昆明的孔雀柏中首次分离鉴定了 catechin (1)、taxifolin-3-O- β -D-xylopyranoside (2)、icariside E4 (3)、(-) arctigenin (4)、savinin (5)、horsfieldin (6)、dihydroresamin (7) 和 skimmin (8) 等 8 个化合物。体外活性测试结果显示, 孔雀柏甲醇总提物在 A549、BGC-823、K562 肿瘤细胞株上均具有一定细胞毒活性 ($IC_{50} = 2.47, 3.88, 32.48 \mu g/mL$), 孔雀柏总生物碱部分在 K562 肿瘤细胞株上具有一定细胞毒活性 ($IC_{50} = 5.29 \mu g/mL$)。本文中所分离得到的 8 个单体化合物对 A549、BGC-823 和 K562 肿瘤细胞株均无明显细胞毒活性, 提示该植物中可能还有其他细胞毒活性小分子化合物, 为其活性成分的进一步开发研究及临床应用奠定了试验基础。

参考文献:

- [1] 郑万钧, 傅立国. 中国植物志[M]. 第7卷. 北京: 科学出版社, 1978: 344.
- [2] RUI TIAN. Studies on Chemical Constituents of Chamaecyp obtusa [D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [3] LIU R, ZHOU C, OU YANG M. Progress in chemical constituents of Chamaecyparis obtusevar. Formosana [J]. Nat Prod Res Dev, 2006(18): 187.
- [4] HSIEH CC, KUO YH, KUO CC, et al. Chamaecyparone C, a novel skeleton microtubule inhibitor, with anticancer activity by trigger caspase 8-Fas/FasL dependent apoptotic pathway in human cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2010(79): 1261.
- [5] JIANG JH, LI XC, GAO TH, et al. Volatile constituents from the cupressaceae plants and their antitumor activities [J]. Fujian Forest Sci Technol, 2006(33): 524.
- [6] ZHANG YM, TAN NH, LU Y, et al. Chamobutinin A, a novel skeleton diterpenoid alkaloid [J]. Organic Letters, 2007, 9(22): 4579.

消食导滞散的制备及临床应用

李海波, 谢立

(云梦县中医院, 湖北 孝感 432500)

摘要:目的:制备消食导滞散并观察其临床疗效。方法:采用粉碎混合法制备内服散剂消食导滞散,采用薄层色谱法对其有效成分山楂进行定性分析,并观察其消食导滞的效果。结果:该制备工艺简便易操作、稳定可行,所制得的消食导滞散对小儿厌食症的总有效率为84.76%,对小儿积滞的总有效率为88.62%。结论:采用传统工艺制备消食导滞散质量可控,疗效确切,适合于大规模生产,满足医院临床用药的需求。

关键词:消食导滞散;制备;薄层色谱鉴别法;临床应用

中图分类号:R283

文献标识码:A

文章编号:1673-2197(2015)12-0031-02

DOI:10.11954/ytctyy.201512013

Preparation and Clinical Application of Xiaoshi Daozhi Powder

Li Haibo, Xie Li

(Yunmeng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiaogan 432500, China)

Abstract; Objective: To prepare Xiaoshi Daozhi powder and observe its clinical therapeutic effect. **Methods:** Using pure powder prepared by mixing oral powder; qualitative analysis of hawthorn with thin layer chromatography; and make clinical observation. **Results:** The preparation technology is simple and practical, stable quality, efficiency of 84.76% on infant ileanorexia; children retention efficiency of 88.62%. **Conclusion:** Using traditional techniques for preparing oral powder, controllable quality, curative effect, is suitable for mechanization production scale, meet the clinical drug use in hospital.

Keywords: Xiaoshi Daozhi Powder; Preparation; TLC; Clinical Application

消食导滞散(制剂批准文号为鄂药制字 Z20112551)系我院享受国务院政府津贴的名老中医妇儿科专家谢伯豪老先生通过长期临床实践总结的经验方,其疗效显著,安全稳定,为我院儿科参评“湖北省中医疫病医疗中心”发挥了积极作用,成为我院制剂室品牌产品。目前,该制剂已被《湖北省医疗机构制剂规范》2011年版上篇刊载^[1]。30多年的临床实践证明其对小儿厌食、积滞疗效可靠,受到广大患

儿家属的欢迎,现将其制备工艺及临床应用介绍如下。

1 设备与材料

XD-12型热风循环烘箱(湖南衡阳雁翔制药设备厂); SF250组合式高速粉碎机(上海中药机械厂);消食导滞散处方药材(购自安徽亳州市千草药业有限公司);熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院);其他试剂均为分析纯。

- [7] ADRIENNE LD, YA CA, DAVIES AP, et al. ¹H and ¹³C-NMR Assignments of some green tea polyphenols [J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 1996(34): 887.
- [8] ZEECK A, DUBELER A, VOLTMER G, et al. Phenols from *Fagus Sylvatica* and their role in defence against *cryptococcus fagisuga* [J]. Phytochemistry, 1997(45): 51.
- [9] KOUNO I, HASHIMOTO M, ENJOJI S, et al. Isolation of Neoanisatin derivatives from the pericarps of *Illicium majus* with other constituents [J]. Chem. Pharm Bull, 1991, 39(7): 1773.

- [10] XU J, ZHANG YM, TAN NH, et al. A New Lignan Glycoside from *Chamaecyparis obtusa* var. *breviramea* f. *crippsii* [J]. Natural Product Communications, 2014, 9(2): 215.
- [11] XU J, ZHANG YM, TAN NH, et al. A new monoterpene glucoside from the twigs of *Chamaecyparis obtusa* var. *breviramea* f. *Crippsii* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47(9): 1179.

(责任编辑:尹晨茹)

收稿日期:2015-02-26

作者简介:李海波(1969—),男,湖北省云梦县中医院主管中药师,研究方向为儿科临床药学。