

龙胆草中 6-去甲氧基-7-甲基茵陈色原酮分离和波谱表征

王世盛*, 张敬莹, 赵伟杰, 宋其玲, 孟庆伟, 王天富

(大连理工大学 精细化工国家重点实验室, 辽宁 大连 116012)

摘要: 为研究龙胆草地上部分的化学成分, 利用硅胶柱色谱对其乙醇提取物进行了分离纯化, 根据理化性质和波谱方法鉴定化合物的结构, 分离得到 6-去甲氧基-7-甲基茵陈色原酮(VI)和其他 5 种已知化合物: β -香树脂醇(I)、 β -谷甾醇(II)、 β -香树脂醇乙酸酯(III)、乌苏醇(IV)、齐墩果酸(V). 其中化合物 VI 属首次从龙胆科植物中分离得到的具有 2-苯氧基色原酮骨架的天然酚类成分, 对其 1D 和 2D NMR 谱的特征及 EI 质谱主要碎片的可能裂解方式进行了讨论, 并利用单晶 X 射线衍射方法对其晶体结构进行了分析. 结果表明化合物 VI 属正交晶系, Pbc_a 空间群, 晶胞参数 $a=1.291\ 83(19)\ \text{nm}$, $b=0.721\ 19(15)\ \text{nm}$, $c=2.923\ 7(5)\ \text{nm}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$, $V=2.723\ 9(8)\ \text{nm}^3$, $Z=8$, $D_c=1.464\ \text{g}/\text{m}^3$, $\mu=0.114\ \text{mm}^{-1}$, $F(000)=1\ 248$. B 环平面与 A/C 环平面的两面角为 99.6° , 分子间存在 π - π 堆积作用.

关键词: 龙胆; 波谱表征; 晶体结构; 6-去甲氧基-7-甲基茵陈色原酮
中图分类号: R914 **文献标志码:** A

0 引言

龙胆(*Gentiana scabra* Bunge) 又称糙龙胆, 为龙胆科(*Gentianaceae*) 龙胆属植物, 主要分布于东北、内蒙古、陕西、湖北、四川等地. 其根茎入药历史悠久, 有泻肝胆实火、除下焦湿热的功效^[1]. 临床上主要用于治疗急慢性肝炎、乙型脑炎、甲状腺机能亢进、胆囊炎、胃病等^[2]. 龙胆的根和根茎为中药传统药用部位, 主要含环烯醚萜苷和三萜类成分, 而地上部分则往往作为废弃部分被丢弃. 近年来的研究表明, 龙胆地上部分也具有一定的药用价值, 如抗炎、抗菌、降血糖等^[3,4], 而迄今为止其中的化学成分还不清楚. 为充分发掘龙胆资源的药用价值, 本文对龙胆地上部分的乙醇提取物进行研究, 分离鉴定出 6 种化合物. 其中化合物 VI 具有 2-苯氧基色原酮骨架, 属于结构罕见的一类天然酚类成分, 迄今为止仅从植物中分离出该类化合物十余种. 该类成分具有抗氧化、利胆、抗肿瘤等许多独特的生理活性^[5]. 本文着重介

绍化合物 VI 的分离和结构表征, 详细讨论其 1D 和 2D NMR 谱的特征, 对其 EI 质谱中主要碎片的可能裂解方式进行推测, 并利用单晶 X 射线衍射方法对其晶体结构进行分析, 以期该类天然产物的结构表征提供重要依据.

1 实验部分

1.1 药材、仪器与试剂

药材: 龙胆地上部分于 2005 年 10 月采自辽宁清源辽东中药材种植基地.

仪器: INOVA 型 400 MHz 核磁共振仪(美国 Varian 公司); GCT 型气相色谱/飞行时间高分辨质谱仪(英国 Micromass 公司); HP1100LC-MSD 型液相色谱质谱联用仪(美国 Agilent 公司); Smart APEXII CCD 型 X 射线单晶衍射仪(德国 Bruker 公司).

试剂: GF₂₅₄ 型薄层层析用硅胶(青岛海洋化工厂、Merck 公司); 柱层析硅胶(青岛海洋化工厂); 去离子水. 常规试剂均为分析纯.

1.2 提取与分离

5 kg 龙胆地上部分粉碎, 95% 乙醇(50 L)回流提取 3 次, 70% 乙醇(15 L)回流提取 1 次, 合并提取液, 减压浓缩, 得沉淀 290 g, 滤液浓缩得浸膏 660 g. 沉淀部分依次用石油醚和氯仿超声溶解, 分别得到石油醚部分和氯仿部分. 石油醚部分通过硅胶柱层析, 以石油醚-乙酸乙酯(20:1~5:1)梯度洗脱, 分别得到化合物 I 240 mg、化合物 II 140 mg. 氯仿部分以石油醚-丙酮(20:1~1:9)梯度洗脱, 得到化合物 III 20 mg、化合物 IV 40 mg. 浸膏部分以乙酸乙酯超声加热提取, 得乙酸乙酯浸膏 180 g, 进行硅胶真空柱层析, 以 4:1 氯仿-丙酮~丙酮梯度洗脱, 分别得到 5 个部位 Fr1~Fr5. Fr1 浸膏以丙酮溶解, 得丙酮不溶部分和丙酮溶解部分. 丙酮不溶部分经硅胶柱层析, 石油醚-丙酮(6:1~4:1)梯度洗脱得化合物 V 2.1 g. 丙酮溶解部分经硅胶柱层析, 石油醚-丙酮 4:1 洗脱, 得化合物 VI 50 mg. 化合物 I~VI 分别鉴定为 β -香树脂醇、 β -谷甾醇、 β -香树脂醇乙酸酯、乌苏醇、齐墩果酸和 6-去甲氧基-7-甲基茵陈色原酮.

1.3 化合物 VI 单晶培养

取化合物 VI 细针状结晶 5 mg 于洁净玻璃小瓶中, 缓慢加入丙酮使其溶解. 放入烧杯中, 并在烧杯中加入氯仿, 将烧杯盖好, 静置 3 d, 析出无色柱状单晶.

1.4 化合物 VI 晶体结构测定

取大小为 0.30 mm $\times$ 0.20 mm $\times$ 0.20 mm 的晶体, 使用 CAD-4 型 X 射线衍射仪(波长 0.071 073 nm)进行晶胞单元测定和数据收集, 收集数据的条件为 273(2) K. 采用 $\omega/2\theta$ 扫描技术, 收集范围 θ : 2.1°~25°, h : -15~15, k : -7~6, l : -34~33. 共收集 7 817 个衍射点, 对其中 2 099 个独立点($R_{\text{int}} = 0.030 5$)进行分析. 全部强度数据均经 LP 因子及经验吸收校正, 晶体结构由直接法解出, 采用全矩阵最小二乘法进行精修. 结构计算的数据与参数比 2 099/203, 最终的偏离因子 $R = 0.032 9$, $wR = 0.082 0$. 最终差值电子云密度的最高峰为 139 e/nm³, 最低峰为 -135 e/nm³. 全部计算均用 Shelxtl 程序完成.

2 结果与讨论

2.1 化合物 VI 的核磁共振波谱表征

化合物 VI, 无色针状结晶, 易溶于丙酮, 可溶于甲醇, 其分子结构如图 1 所示. HREI-MS 显示分子离子峰为 300.061 4(计算值 300.063 4), 确定其分子式为 C₁₆H₁₂O₆. ¹H NMR(DMSO-*d*₆)谱显示 10 个质子信号, 包括 2 个酚羟基、4 个芳香氢、1 个烯氢和 1 个甲氧基. 其中 δ 12.85(1H, s) 是产生分子内氢键缔合的 5-OH 特征信号; δ 6.89(2H, d, $J = 12.8$ Hz) 和 δ 7.19(2H, d, $J = 12.4$ Hz) 的一对邻位偶合峰表明 B 环为 4' 位取代; δ 6.40(1H, d, $J = 2.0$ Hz) 和 δ 6.63(1H, d, $J = 2.0$ Hz) 的信号表明 A 环为间位取代, 即 5, 7-二取代; δ 5.09(1H, s) 为 2-苯氧基色原酮 H-3 的特征信号, 与黄酮骨架的 H-3 特征信号(δ 6.30 左右)明显不同.

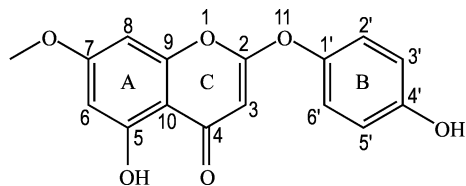


图 1 化合物 VI 的分子结构

Fig. 1 Structure of Compound VI

¹³C NMR(DMSO-*d*₆) 共给出 14 个碳信号. APT 谱显示 5 个次甲基信号、1 个甲基信号和 8 个季碳信号. δ 183.2 为产生分子内氢键缔合的羰基(C-4)特征信号; δ 116.5 和 δ 121.8 的次甲基信号在 HSQC 谱中分别与 δ 6.89(2H, d, $J = 12.8$ Hz) 和 δ 7.19(2H, d, $J = 12.4$ Hz) 的质子相关, 应为 B 环上未被取代的两对相邻碳; δ 98.3 和 δ 92.8 的次甲基信号应为 A 环未被取代的 6 位和 8 位碳. 化合物 VI 的碳谱中明显不同于黄酮类化合物的一个特征信号是 δ 87.2 的次甲基信号, 在 HSQC 谱中与 δ 5.09(1H, s) 的质子信号相关, 是 2-苯氧基色原酮的 C-3 特征信号, 而黄酮类化合物的 C-3 特征信号一般在 δ 105 左右.

通过 HSQC 和 HMBC 谱进一步确定了取代基的位置和 C、H 信号的准确归属. 在 HMBC 谱中, δ 9.78 和 δ 156.2(C-4')、 δ 116.5(C-3', C-5')

相关,表明 4' 位有羟基取代; δ 3. 85 与 δ 164. 9 (C-7)相关,表明 7 位有甲氧基取代. H-3 的信号归属通过 δ 5. 09 与 δ 168. 1(C-2)、 δ 183. 2(C-4) 和 δ 102. 9(C-10)的 HMBC 相关信号得到确证.

以上分析确定化合物 VI 的结构为 6-去甲氧基-7-甲基茵陈色原酮,其 1D 和 2D NMR 波谱数据见表 1. 其结构通过 EI-MS 和单晶 X 射线衍射分析得到进一步确证.

表 1 化合物 VI 的¹H NMR 和¹³C NMR 数据(400 MHz, DMSO-*d*₆)
Tab. 1 ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data of Compound VI (400 MHz, DMSO-*d*₆)

No.	¹ H NMR	¹³ C NMR	APT	HMBC
2		168.1	C	
3	5. 09 (1H, s)	87. 2	CH	C-4, C-2, C-10
4		183. 2	C	
5		161. 2	C	
6	6. 40 (1H, d, <i>J</i> =2. 0 Hz)	98. 3	CH	C-7, C-5, C-10, C-8
7		164. 9	C	
8	6. 63 (1H, d, <i>J</i> =2. 0 Hz)	92. 8	CH	C-7, C-9, C-10, C-6
9		154. 8	C	
10		102. 9	C	
1'		143. 1	C	
2',6'	7. 19 (2H, d, <i>J</i> =12. 4 Hz)	121. 8	CH	C-4', C-1', C-2', C-6'
3',5'	6. 89 (2H, d, <i>J</i> =12. 8 Hz)	116. 5	CH	C-4', C-1', C-3', C-5'
4'		156. 2	C	
7-OCH ₃	3. 85 (3H, s)	56. 1	CH ₃	C-7
5-OH	12. 85 (1H, s)			C-5, C-6, C-10
4'-OH	9. 78 (1H, s)			C-4', C-3', C-5'

2. 2 化合物 VI 的 HR EI-MS 质谱解析

HR EI-MS 显示化合物 VI 的分子离子峰为 300. 061 4 (100), 主要碎片离子的质量数及其原子组成为 271. 061 5 (31, C₁₅ H₁₁ O₅), 179. 034 2 (8, C₉ H₇ O₄), 167. 034 3 (19, C₈ H₇ O₄),

134. 036 8 (5, C₈ H₆ O₂). 化合物 VI 的色原酮骨架同黄酮类结构相近,故其 C 环的逆 Diels-Alder 裂解方式也同黄酮类物质基本相同. 此外化合物 VI 的质谱还有脱醛基和失去 B 环产生的碎片峰. 推测化合物 VI 的 EI 质谱裂解途径如图 2 所示.

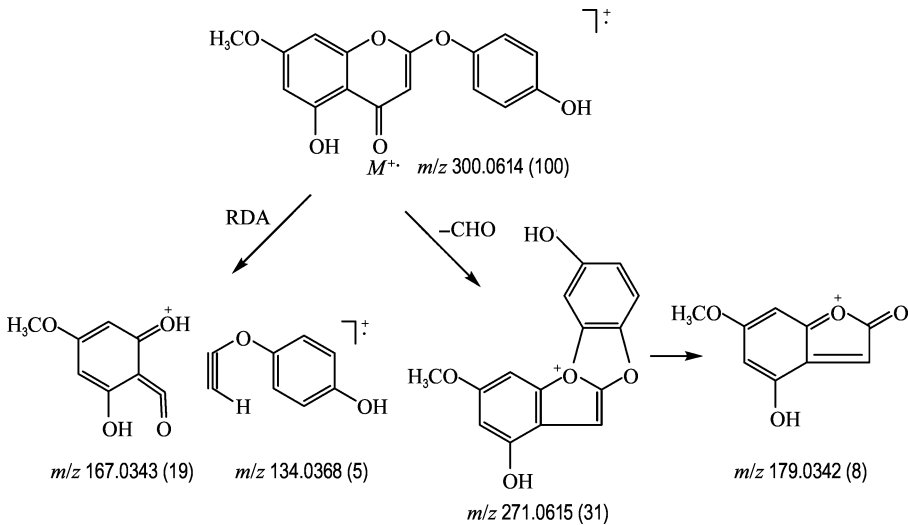


图 2 化合物 VI 的 EI 质谱裂解途径
Fig. 2 EI-MS fragmentation pathway of Compound VI

2.3 化合物Ⅵ的 X 射线单晶结构分析

化合物Ⅵ的晶体结构见图 3。晶体属正交晶系,空间群 Pbca。晶胞参数 $a=1.291\ 83\ (19)\ \text{nm}$, $b=0.721\ 19\ (15)\ \text{nm}$, $c=2.923\ 7\ (5)\ \text{nm}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$, 晶胞体积 $V=2.723\ 9\ (8)\ \text{nm}^3$, 晶胞内分子数 $Z=8$, $D_c=1.464\ \text{g}/\text{m}^3$, $\mu=0.114\ \text{mm}^{-1}$, $F(000)=1\ 248$ 。化合物Ⅵ分子中有 3 个环, 由于存在分子内氢键作用, A 环、C 环两面角为 1.4° , 接近共平面。而 B 环平面与 A/C 环平面的两面角为 99.6° , 近乎呈垂直, 与文献[6]报道的黄酮类化合物的三环共平面不同, 与文献[7]报道的茵陈色原酮成 61.57° 的两面角也有差别。晶胞堆积图(图 4)显示分子之间存在 π - π 堆

积作用, 一分子中的 A 环和 C 环分别与相邻分子中的 C 环和 A 环堆积。非氢原子坐标及等当热参数、部分键长值、部分键角值分别见表 2、3、4。

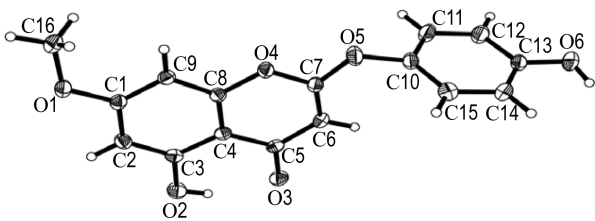


图 3 化合物Ⅵ的三维结构

Fig. 3 3D structure of Compound VI

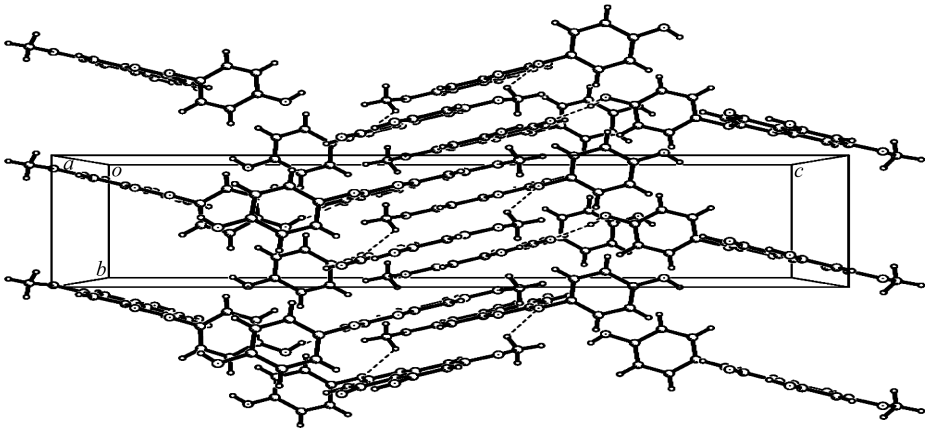


图 4 化合物Ⅵ的晶胞堆积图

Fig. 4 A view of the crystal packing diagram for Compound VI

表 2 非氢原子坐标及等当热参数

Tab. 2 Non-hydrogen atomic coordinates and equivalent thermal parameters

No.	$x/10^4$	$y/10^4$	$z/10^4$	$U_{\text{eq}}/10^5\ \text{nm}^2$	No.	$x/10^4$	$y/10^4$	$z/10^4$	$U_{\text{eq}}/10^5\ \text{nm}^2$
C(1)	7 292(1)	1 084(3)	5 191(1)	42(1)	C(12)	11 329(2)	5 944(3)	2 934(1)	63(1)
C(2)	6 370(1)	1 411(3)	4 959(1)	47(1)	C(13)	11 400(1)	4 777(3)	2 563(1)	52(1)
C(3)	6 389(1)	2 055(3)	4 518(1)	43(1)	C(14)	11 040(2)	2 998(3)	2 598(1)	62(1)
C(4)	7 339(1)	2 359(2)	4 290(1)	37(1)	C(15)	10 620(1)	2 361(3)	3 004(1)	64(1)
C(5)	7 414(1)	3 073(2)	3 830(1)	40(1)	C(16)	8 104(2)	238(3)	5 891(1)	66(1)
C(6)	8 426(1)	3 306(3)	3 650(1)	44(1)	O(1)	7 188(1)	486(2)	5 628(1)	55(1)
C(7)	9 245(1)	2 848(3)	3 907(1)	46(1)	O(2)	5 490(1)	2 406(2)	4 298(1)	63(1)
C(8)	8 232(1)	1 984(2)	4 538(1)	38(1)	O(3)	6 609(1)	3 450(2)	3 602(1)	55(1)
C(9)	8 241(1)	1 362(2)	4 982(1)	41(1)	O(4)	9 192(1)	2 221(2)	4 339(1)	47(1)
C(10)	10 563(1)	3 547(3)	3 368(1)	54(1)	O(5)	10 244(1)	2 873(2)	3 801(1)	69(1)
C(11)	10 910(2)	5 319(4)	3 340(1)	63(1)	O(6)	11 838(1)	5 463(2)	2 175(1)	71(1)

表 3 化合物 VI 的主要键长
Tab. 3 Selected bond lengths of Compound VI

键名	键长/0.1 nm	键名	键长/0.1 nm
C(1)—O(1)	1.355 5(19)	C(7)—O(4)	1.341 7(19)
C(1)—C(9)	1.383(2)	C(8)—C(9)	1.376(2)
C(1)—C(2)	1.390(2)	C(8)—O(4)	1.379 6(18)
C(2)—C(3)	1.372(2)	C(10)—C(11)	1.358(3)
C(3)—O(2)	1.352 1(18)	C(10)—C(15)	1.368(3)
C(3)—C(4)	1.413(2)	C(10)—O(5)	1.416(2)
C(4)—C(8)	1.389(2)	C(11)—C(12)	1.379(3)
C(4)—C(5)	1.444(2)	C(12)—C(13)	1.377(3)
C(5)—O(3)	1.264 2(18)	C(13)—O(6)	1.360(2)
C(5)—C(6)	1.419(2)	C(13)—C(14)	1.369(3)
C(6)—C(7)	1.340(2)	C(14)—C(15)	1.384(3)
C(7)—O(5)	1.326 4(19)	C(16)—O(1)	1.424(2)

表 4 化合物 VI 的主要键角
Tab. 4 Selected bond angles of Compound VI

键角名	角度/(°)	键角名	角度/(°)
O(1)—C(1)—C(9)	123.31(15)	C(9)—C(8)—O(4)	115.55(13)
O(1)—C(1)—C(2)	115.28(14)	C(9)—C(8)—C(4)	124.26(14)
C(9)—C(1)—C(2)	121.42(15)	O(4)—C(8)—C(4)	120.19(14)
C(3)—C(2)—C(1)	119.94(14)	C(8)—C(9)—C(1)	117.13(14)
O(2)—C(3)—C(2)	119.68(14)	C(11)—C(10)—C(15)	121.53(18)
O(2)—C(3)—C(4)	119.53(15)	C(11)—C(10)—O(5)	118.32(18)
C(2)—C(3)—C(4)	120.79(14)	C(15)—C(10)—O(5)	119.8(2)
C(8)—C(4)—C(3)	116.45(14)	C(10)—C(11)—C(12)	119.33(19)
C(8)—C(4)—C(5)	119.99(14)	C(13)—C(12)—C(11)	120.3(2)
C(3)—C(4)—C(5)	123.53(14)	O(6)—C(13)—C(14)	123.01(17)
O(3)—C(5)—C(6)	122.53(15)	O(6)—C(13)—C(12)	117.59(19)
O(3)—C(5)—C(4)	120.83(15)	C(14)—C(13)—C(12)	119.40(17)
C(6)—C(5)—C(4)	116.64(14)	C(13)—C(14)—C(15)	120.57(19)
C(7)—C(6)—C(5)	119.41(15)	C(10)—C(15)—C(14)	118.8(2)
O(5)—C(7)—C(6)	129.26(15)	C(1)—O(1)—C(16)	117.86(13)
O(5)—C(7)—O(4)	105.98(13)	C(7)—O(4)—C(8)	118.96(12)
C(6)—C(7)—O(4)	124.76(15)	C(7)—O(5)—C(10)	119.81(13)

3 结 论

本文首次从龙胆草地上部分中分离出 6-去甲氧基-7-甲基茵陈色原酮(VI). 结构分析结果表明, 化合物 VI 分子骨架虽与黄酮类化合物相似, 但其波谱特征和晶体结构与黄酮类化合物有明显不

同. 作者利用猪晶状体醛糖还原酶(AR)体外模型初步筛选化合物 VI 的抑制活性, 发现化合物 VI 在浓度 4.6 mg/L 时对 AR 的抑制率达到 90%, 显示出在治疗糖尿病并发症方面的潜在作用, 为进一步开发利用龙胆草地上资源提供了依据.

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:化学工业出版社, 2005
- [2] 陈长勋, 刘占文, 孙峥嵘, 等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J]. 中草药, 2003, **34**(9):814-816
- [3] 江蔚新, 安胜利, 郭立萍, 等. 龙胆地上、地下部分药理作用的比较分析[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2003, **19**(1):14-16
- [4] EKREM S, MUSTAFA A, ERDEM Y, *et al.* Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques [J]. **Life Sciences**, 2005, **76**(11):1223-1238
- [5] YASUSHI I, HIROAKI K, TOSHIHORO O, *et al.* Synthesis of a capillarisin sulfur-analogue possessing aldose reductase inhibitory activity by selective isopropylation [J]. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 2005, **53**(9):1088-1091
- [6] 张尊听, 陈莉莉. 白杨素衍生物的合成和晶体结构及与 DNA 的作用[J]. 药学学报, 2007, **42**(5):492-496
- [7] ISAO F, NORIAKI H. Structure of capillarisin [J]. **X-Ray Structure Analysis Online**, 2003, **19**(4):X63-X64

Isolation and spectra characterization of 6-demethoxy-7-methylcapillarisin from *Gentiana scabra* Bunge

WANG Shi-sheng*, ZHANG Jing-ying, ZHAO Wei-jie,
SONG Qi-ling, MENG Qing-wei, WANG Tian-fu

(State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China)

Abstract: To study the chemical constituents of aerial part of *Gentiana scabra* Bunge, the plant material was extracted with ethanol, and the constituents were separated and purified from the ethanol extraction by silica gel column chromatography. Their structures were identified as 6-demethoxy-7-methylcapillarisin (Ⅵ) and five other compounds, β -Amyrin (Ⅰ), β -Sitosterol (Ⅱ), β -Amyrin acetate (Ⅲ), Uvaol (Ⅳ) and Oleanolic acid (Ⅴ) on the basis of physicochemical properties and spectral methods. Among them, Compound Ⅵ was isolated from Gentianaceae family for the first time. Its characterization of 1D and 2D NMR spectra and possible fragmentation pathway in EI-MS were discussed. The crystal structure of Compound Ⅵ was determined to be orthorhombic and Pbca space group by X-ray crystallographic analysis. Crystal data are as follows: $a = 1.291\ 83(19)\ \text{nm}$, $b = 0.721\ 19(15)\ \text{nm}$, $c = 2.923\ 7(5)\ \text{nm}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 2.723\ 9(8)\ \text{nm}^3$, $Z = 8$, $D_c = 1.464\ \text{g}/\text{m}^3$, $\mu = 0.114\ \text{mm}^{-1}$, $F(000) = 1\ 248$. The dihedral angle between B ring and A/C ring is 99.6° . There are π - π stacking interactions between molecules.

Key words: *Gentiana scabra* Bunge; spectra characterization; crystal structure; 6-demethoxy-7-methylcapillarisin