

## 黄皮中的新呋喃香豆素

孙兴妍, 马 洁, 李创军, 黄积武, 王 楠, 沈苍颀, 张东明\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 利用 HPD-100 大孔树脂柱色谱、硅胶柱色谱、ODS 柱色谱等分离纯化方法, 从黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] 中分离得到 3 个呋喃香豆素化合物, 并综合运用波谱学分析方法对化合物进行结构测定。确定其结构分别为: 8-[(2*S*,3*S*,6*E*)-2,3-epoxy-3,7-dimethyl-oct-6-enyloxy] psoralen (**1**)、8-(7',8'-epoxygeranyloxy) psoralen (**2**) 和 8-[(2*E*)-6-oxo-3,7-dimethyloct-2-enyloxy] psoralen (**3**)。其中, 化合物 **1** 为新的呋喃香豆素。对化合物 **1**~**3** 进行肿瘤细胞毒活性测试, 结果显示, 化合物 **2** 对人大细胞肺癌细胞 (H460) 具有抑制活性 ( $IC_{50} = 43.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 化合物 **3** 对宫颈癌细胞 (HeLa) 具有抑制活性 ( $IC_{50} = 33.76 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

**关键词:** 黄皮; 化学成分; 呋喃香豆素; 细胞毒活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)12-2282-04

## A new furocoumarin from the stems of *Clausena lansium*

SUN Xing-yan, MA Jie, LI Chuang-jun, HUANG Ji-wu, WANG Nan, SHEN Cang-jie,  
ZHANG Dong-ming\*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** One undescribed and two known furocoumarins were isolated from the stems of the *Clausena lansium* through a series of isolation and purification approaches including HPD-100 macroporous resin column, silica gel, reverse phase  $C_{18}$  and so on. Their structures were determined to be 8-[(2*S*,3*S*,6*E*)-2,3-epoxy-3,7-dimethyl-oct-6-enyloxy] psoralen (**1**), 8-(7',8'-epoxygeranyloxy) psoralen (**2**) and 8-[(2*E*)-6-oxo-3,7-dimethyloct-2-enyloxy] psoralen (**3**) by spectroscopic methods. Compound **1** is a new furocoumarin. Compound **2** showed cytotoxicity to H460 ( $IC_{50} = 43.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and compound **3** showed cytotoxicity to HeLa ( $33.76 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) through the cytotoxic tests against five human cancer cell lines (H460, H7402, HCT-8, HeLa and MCF-7) for all compounds.

**Key words:** *Clausena lansium*; chemical constituents; furocoumarin; cytotoxicity

黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] 为芸香科 (Rutaceae) 黄皮属 (*Clausena*) 小乔木, 主要分布在热带、亚热带地区。其果、叶、根均有药用价值。现代研究表明, 黄皮中的主要化学成分为香豆素、生物碱、萜类、挥发油等, 其活性成分具有抗癌、抗炎、保肝、神经保护等活性<sup>[1-4]</sup>。本课题组已从黄皮中分离得到生物

碱、香豆素、萜类等成分, 部分化合物具有良好生物活性<sup>[3-5]</sup>, 为了进一步寻找黄皮中更多的生物活性成分, 对黄皮的枝条进行化学成分研究, 分离得到 3 个化合物, 鉴定其结构分别为 8-[(2*S*,3*S*,6*E*)-2,3-epoxy-3,7-dimethyl-oct-6-enyloxy] psoralen (**1**)、8-(7',8'-epoxygeranyloxy) psoralen (**2**) 和 8-[(2*E*)-6-oxo-3,7-dimethyloct-2-enyloxy] psoralen (**3**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 结构如图 1 所示。化合物 **2** 为首次从该属植物中分离得到的化合物, 化合物 **3** 为首次从该植物中分离得到的化合物。化合物 **1**~**3** 均进行了对五株肿瘤细胞系 (H460、H7402、

收稿日期: 2019-07-10; 修回日期: 2019-09-06.

基金项目: 北京市自然科学基金青年项目 (7194299); 国家自然科学基金资助项目 (NNSFC 81730093).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165227, E-mail: zhangdm@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0545

HCT-8、HeLa、MCF-7) 的细胞毒活性筛选实验, 结果显示, 化合物 **2** 对 H460 (人大细胞肺癌细胞) 具有抑制作用 ( $IC_{50} = 43.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 化合物 **3** 对 HeLa (人宫颈癌细胞) 具有抑制作用 ( $IC_{50} = 33.76 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

## 结果与讨论

### 1 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末。HR-ESI-MS  $m/z$ : 355.154 0  $[M+H]^+$  (计算值: 355.154 4), 确定分子式为  $C_{21}H_{22}O_5$ , 不饱和度为 11。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) 谱中显示化合物 **1** 具有典型的呋喃香豆素母核,  $\delta_{\text{H}}$  6.46 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-3) 与  $\delta_{\text{H}}$  8.17 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-4) 为香豆素特征的 3,4 位氢信号;  $\delta_{\text{H}}$  7.74 (1H, s, H-5) 为苯环质子信号;  $\delta_{\text{H}}$  7.12 (1H, s, H-2'),  $\delta_{\text{H}}$  8.14 (1H, s, H-3') 为呋喃环质子信号。此外,  $\delta_{\text{H}}$  5.05 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-6''),  $\delta_{\text{H}}$  1.57 (1H, m, H-5a''),  $\delta_{\text{H}}$  1.37 (1H, m, H-5b'') 以及两甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  1.54 (3H, s, H-8''),  $\delta_{\text{H}}$  1.61 (3H, s, H-10'') 提示结构中可能存在异戊烯基片段。 $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) 谱显示共有 21 个碳信号, 结合 HSQC 谱数据分析, 完成了碳氢信号的归属。 $\delta_{\text{H}}$  5.05 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-6'') 与  $\delta_{\text{C}}$  123.6 (C-6'') 直接相关, 说明其为双键信号;  $\delta_{\text{H}}$  4.60 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.6$  Hz, H-1''a) 和  $\delta_{\text{H}}$  4.47 (1H, dd,  $J = 11.5, 6.0$  Hz, H-1''b) 均与  $\delta_{\text{C}}$  72.1 (C-1'') 直接相关, 说明其为亚甲氧基信号;  $\delta_{\text{H}}$  3.19 (1H, m, H-2'') 与  $\delta_{\text{C}}$  59.8 (C-2'') 直接相关, 说明结构中不存在次甲氧基;  $\delta_{\text{C}}$  59.9 (C-3'') 为连氧季碳信号, 结合分子式推测 C-2'' 和 C-3'' 与同一个氧原子相连, 成三元氧环。 $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY 谱显示,  $\delta_{\text{H}}$  4.60 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.6$  Hz, H-1''a) 和  $\delta_{\text{H}}$  4.47 (1H, dd,  $J = 11.5, 6.0$  Hz, H-1''b) 均与  $\delta_{\text{H}}$  3.19 (1H, m, H-2'') 直接相关, 说明亚甲氧基与次甲氧基相连; H-4'' 与 H-5'' 直接相关, 说明亚甲基与异戊烯基相连。HMBC 谱显示, H-1'' 和 C-8 存在远程相关, 说明亚甲氧基连接在 8 位上; 此外, H-9'' 与 C-2'' 和 C-4'' 均存在远程相关, 说明 C-9'' 与 C-3'' 相连。一维 NOE 谱显示, 照射 H-1'' 的两个氢, 均出现 H-9'' 的增益, 说明二者位于同侧, 因此最终确定化合物 **1** 的平面结构如图 1 所示。

化合物 **1** 没有 Cotton 效应, 后经手性柱 HPLC 进行分析, 显示为单峰。因此, 其绝对构型只能通过与文献数据比对来确定。化合物 **1** 的结构与 3-methyl-3-(4-methylpent-3-en-1-yl) oxiran-2-yl) methanol 相似, 查阅文献<sup>[6]</sup>得知, 后者绝对构型为 (2*R*,3*R*) 时, 旋光值为正数  $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} +4.5 (c 3.00, \text{CHCl}_3)\}$ ; 绝对构型为 (2*S*,3*S*) 时, 旋光值为负数  $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} -4.2 (c 3.00, \text{CHCl}_3)\}$ 。相同条件下, 化合物 **1** 的旋光值为  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -2.2 (c 0.10, \text{CHCl}_3)$ 。因此,

通过对比文献, 化合物 **1** 的绝对构型确定为 (2''*S*,3''*S*)。化合物 **1** 系统命名为 8-[(2*S*,3*S*,6*E*)-2,3-epoxy-3,7-dimethyl-oct-6-enyloxy] psoralen。

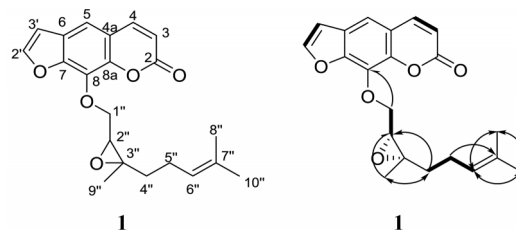


Figure 1 Structure of compound **1** and key HMBC and  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY correlations of compound **1**

Table 1  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) data in  $\text{DMSO}-d_6$  of compound **1**

Position	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		159.7
3	6.46, d (9.6)	114.3
4	8.17, d (9.6)	145.3
4a		116.5
5	7.74, s	114.7
6		125.8
7		147.5
8		130.5
8a		143.0
2'	7.12, s	107.2
3'	8.14, s	148.0
1''	4.47, dd (11.5, 6.0)	72.1
	4.60, dd (11.5, 4.6)	
2''	3.19, m	59.8
3''		59.9
4''	1.94, dd, (15.6, 7.8)	23.2
5''	1.57, m	37.8
	1.37, m	
6''	5.05, t (7.2)	123.6
7''		131.2
8''	1.61, s	25.5
9''	1.16, s	16.5
10''	1.54, s	17.5

## 2 细胞毒活性评价

化合物 **1**~**3** 进行了 5 种肿瘤细胞毒活性筛选实验, 仅化合物 **2** 和 **3** 表现出抑制作用, 具体数据见表 2。

Table 2 Cytotoxicity effects of compounds **2** and **3**

Compound	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	H460	HeLa
<b>2</b>	$43.94 \pm 2.17$	—
<b>3</b>	—	$33.76 \pm 7.17$

## 实验部分

紫外可见分光光度仪 (JASCO V-650 型); 旋光测定仪 (JASCO P-2000 型, 日本); 高效液相色谱仪 (Agilent 1100 安捷伦科技有限公司); 核磁共振仪 (WNMR-I 500、Bruker AVIIIHD 600、VNS-600); 中压制备液相色谱系

统 (Büchi Gradient Former B-687, RP C<sub>18</sub>), 制备液相色谱仪 (LC-6AD, 日本岛津公司); 反相填料 (YMC-ODS C<sub>18</sub> 50 μm, 日本 YMC 公司); Sephadex LH-20 (美国 GE 公司); 制备色谱柱 (YMC-pack, ODS-A C<sub>18</sub>, 250 mm × 20 mm); 薄层色谱用硅胶 GF<sub>254</sub> 和柱色谱用硅胶 (100~200、200~300、300~400 目, 青岛海洋化工有限公司); HPD-100 型大孔树脂 (天津海光化工厂有限公司)。色谱纯试剂 (美国 Fisher 公司); 分析纯试剂 (北京化工厂)。

药材于 2016 年 10 月采自广西省柳州市, 由柳州林业局工程师龙光日鉴定为芸香科 (Rutaceae) 黄皮属 (*Clausena*) 植物黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] 的枝条部分。

### 1 提取分离

干燥的黄皮枝条 175 kg, 粉碎后用 95% 乙醇 (4 倍量) 加热回流提取两次, 每次 2 h。提取液经减压浓缩得到 5.9 kg 浸膏, 采用 HPD-100 吸附树脂柱色谱分离, 依次经过纯水、30% 乙醇、60% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇洗脱, 弃去水部分, 另外 4 个部分经减压浓缩, 分别得到 30% 乙醇部分 (2.83 kg)、60% 乙醇 (1.18 kg)、80% 乙醇 (1.4 kg)、95% 乙醇 (0.5 kg)。80% 乙醇部分 (1.4 kg) 经硅胶柱色谱 (100~200 目) 分离, 依次经过石油醚、石油醚-二氯甲烷 (1:1)、二氯甲烷、乙酸乙酯、95% 乙醇洗脱, 得到了 6 个部分: 石油醚部分 (Fr1, 16.4 g)、石油醚-二氯甲烷 (1:1) 部分 [Fr2, 138 g; Fr3, 740 g (依据保留体积和薄层色谱结果而区分)], 二氯甲烷部分 (Fr4, 162 g)、乙酸乙酯部分 (Fr5, 210 g)、95% 乙醇部分 (Fr6, 290 g)。Fr3 (740 g) 经过石油醚-乙酸乙酯 (5:1~3:1) 梯度洗脱, 每梯度洗脱 4 个保留体积 (9 L/保留体积), 得到 12 个组分 (Fr3.1~3.12)。Fr3.2~Fr3.4 均析出大量结晶, 根据薄层色谱分析, 合并 Fr2~Fr4 的母液 (FrA, 105 g)。将组分 (FrA, 105 g) 使用硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 经过石油醚-丙酮 (10:1、7:1~1:1)、丙酮梯度洗脱, 每梯度洗脱 3~4 个保留体积 (4 L/保留体积)。得到 18 个组分 (FrA.1~A.18), FrA.7 (13 g) 通过中压制备液相色谱分离, 以甲醇-水溶液 (60%~70%) 梯度洗脱, 再经过一系列制备及半制备液相色谱分离得到了化合物 1~3。

### 2 结构鉴定

**化合物 1** 白色粉末。[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -2.2 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>), UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (logε): 203 (3.38)、217 (3.43)、248 (3.43)、298 (3.12) nm; IR (microscope) ν<sub>max</sub>: 2 970、2 912、1 762、1 588 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 和 <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 数据参见表 1。

**化合物 2** 白色粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 355.154 0 [M+H]<sup>+</sup> (计算值: 355.153 8), 确定分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>,

不饱和度为 11。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.15 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-4), 8.12 (1H, s, H-2'), 7.69 (1H, s, H-5), 7.09 (1H, s, H-3'), 6.43 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-3), 5.52 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2''), 4.94 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''), 2.52 (1H, overlapped, H-6''), 2.06 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-4''), 1.61 (3H, s, H-8''), 1.44 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-5''), 1.16 (3H, s, H-9''), 1.14 (3H, s, H-10'')。 <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.8 (C-2), 114.1 (C-3), 145.3 (C-4), 116.3 (C-4a), 114.3 (C-5), 125.6 (C-6), 147.8 (C-7), 130.3 (C-8), 143.4 (C-8a), 107.1 (C-2'), 147.9 (C-3'), 69.1 (C-1''), 119.6 (C-2''), 142.1 (C-3''), 35.6 (C-4''), 26.7 (C-5''), 62.5 (C-6''), 57.6 (C-7''), 16.1 (C-8''), 24.7 (C-9''), 18.5 (C-10'')。以上数据与文献<sup>[7]</sup>对照数据一致, 确定该化合物为 8-(7',8'-epoxygeranyloxy) psoralen。

**化合物 3** 白色粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 355.154 0 [M+H]<sup>+</sup> (计算值: 355.153 7), 确定分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>, 不饱和度为 11。 <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.77 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.69 (1H, s, H-2'), 7.37 (1H, s, H-5), 6.82 (1H, s, H-3'), 6.37 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 5.60 (1H, s, H-2''), 5.01 (2H, d, *J* = 5.5 Hz, H-1''), 2.56 (1H, overlapped, H-6''), 2.27 (2H, m, H-5''), 1.09 (3H, s, H-9''), 1.07 (3H, s, H-10'')。 <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 160.5 (C-2), 114.7 (C-3), 144.4 (C-4), 116.5 (C-4a), 113.3 (C-5), 125.9 (C-6), 148.7 (C-7), 131.5 (C-8), 143.9 (C-8a), 106.8 (C-2'), 146.6 (C-3'), 70.0 (C-1''), 119.7 (C-2''), 142.0 (C-3''), 33.1 (C-4''), 38.4 (C-5''), 214.0 (C-6''), 40.9 (C-7''), 16.8 (C-8''), 18.3 (C-9''), 18.3 (C-10'')。以上数据与文献<sup>[8]</sup>对照数据一致, 确定该化合物为 8-[(2*E*)-6-oxo-3,7-dimethyloct-2-enyloxy] psoralen。

### 3 细胞毒实验

采用 MTT 比色法对化合物 1~3 进行细胞毒活性测试, 所用肿瘤细胞株如下: 人大细胞肺癌细胞 H460、人肝癌细胞 H7402、人结肠癌细胞 HCT-8、人宫颈癌细胞 HeLa 以及人乳腺癌细胞 MCF-7。具体实验方法参见文献<sup>[9]</sup>。

### References

- [1] Huang L, Feng ZL, Wang YT, et al. Anticancer carbazole alkaloids and coumarins from *Clausena* plants: a review [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15: 881-888.
- [2] Shen DY, Kuo PC, Huang SC, et al. Constituents from the leaves of *Clausena lansium* and their anti-inflammatory activity [J]. *J Nat Med*, 2017, 71: 96-104.
- [3] Du YQ, Liu H, Li CJ, et al. Bioactive carbazole alkaloids from the stems of *Clausena lansium* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 103: 122-

- 128.
- [4] Liu H, Li CJ, Yang JZ, et al. Carbazole alkaloids from the stems of *Clausena lansium* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75: 677-682.
- [5] Liu J, Du YQ, Li CJ, et al. Alkaloids from the stems of *Clausena lansium* and their neuroprotective activity [J]. *RSC Adv*, 2017, 7: 35417-35425.
- [6] Li SN, Fang LL, Zhong JC, et al. Catalytic asymmetric synthesis of the Colorado potato beetle pheromone and its enantiomer [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2014, 25: 591-595.
- [7] Ziegler H, Spiteller G. Coumarins and psoralens from sicilian lemon oil (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) [J]. *Flavour Fragr J*, 1992, 7: 129-139.
- [8] Kitajima J, Okamura C, Ishikawa T, et al. New glycosides and furocoumarin from the *Glenhina littoralis* root and rhizoma [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46: 1939-1940.
- [9] Wang XY, Li CJ, Ma J, et al. Cytotoxic 9,19-cycloartane type triterpenoid glycosides from the roots of *Actaea dahurica* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 160: 48-55.