

截叶铁扫帚中黄酮类成分研究

周 健^{1,2}, 李创军¹, 陈芳有³, 吴练秋¹, 马 洁¹, 杨敬芝¹, 张东明^{1*}

- (1. 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;
2. 南昌大学第一附属医院药学部, 江西 南昌 330006; 3. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004)

摘要: 运用硅胶柱色谱、中压液相色谱、制备液相色谱等多种色谱技术, 对截叶铁扫帚 70% 乙醇提取物进行了分离纯化。从中分离得到了 5 个黄酮类化合物, 根据理化性质和波谱数据鉴定为 7-*O*-glucosyllaburnetin (**1**)、山柰酚-3-*O*- β -D-半乳糖苷 (**2**)、山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (**3**)、牡荆素 (**4**) 和异牡荆素 (**5**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 和 **3** 均为首次从截叶铁扫帚中分离得到。采用体外靶向 *xbp1* 高通量双荧光素酶报告基因药物筛选模型, 对截叶铁扫帚所含主要成分进行了 *xbp1* 转录激活作用评价, 结果发现化合物 **1** 具有一定的 *xbp1* 转录激活作用, 其作用强度为空载体对照组的 1.80 倍。

关键词: 截叶铁扫帚; 黄酮类成分; x-盒结合蛋白-1; 转录激活

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)11-2055-04

Flavonoids from the aerial parts of *Lespedeza cuneata*

ZHOU Jian^{1,2}, LI Chuang-jun¹, CHEN Fang-you³, WU Lian-qi¹, MA Jie¹, YANG Jing-zhi¹,
ZHANG Dong-ming^{1*}

(1. 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; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 3. School of pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicines, Nanchang 330004, China)

Abstract: The chemical constituents of the aerial parts of *Lespedeza cuneata* (Dum. Cour.) G. Don were investigated using chromatographic techniques, such as silica gel, reversed phase MPLC and preparative HPLC. Five compounds were isolated and their structures were elucidated by spectroscopic data and physicochemical properties, which were identified as 7-*O*-glucosyllaburnetin (**1**), kaempferol-3-*O*- β -D-galactopyranoside (**2**), kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnoside (**3**), vitexin (**4**), and isovitexin (**5**). Among those, compound **1** is a new compound, compounds **2–3** were isolated from this plant for the first time. Compounds **1–5** were tested for their anti-ulcerative colitis activity by dual luciferase report gene assay targeting *xbp1*. Compared with control group, compound **1** showed a certain activity on activating the transcription of *xbp1*, with its relative activating ratio being 1.80 times.

Key words: *Lespedeza cuneata*; flavonoid; x-box-binding protein 1; transcriptional activation

截叶铁扫帚 [*Lespedeza cuneata* (Dum. Cour.) G.

Don] 为豆科 (Leguminosae) 胡枝子属一年生草本植物, 又名夜关门, 全草入药, 在我国分布于东北、山东、江苏、浙江、江西、湖北、湖南、四川、云南、福建、广东、广西等地, 资源丰富。截叶铁扫帚味微苦, 性平, 具有补肝肾, 益肺阴, 散瘀消肿的功效^[1]。目前, 从截叶铁扫帚中分离得到的化合物主要为黄酮类、酚酸类、木脂素类等化合物。现代药理研究表明, 截叶铁扫帚具有

收稿日期: 2019-07-25; 修回日期: 2019-08-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560632); 江西省卫生计生委科技计划项目 (20175135); 江西省卫计委中医药科技计划项目 (2017A299).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165702, E-mail: zhangdm@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0599

抗炎、抗氧化、抗菌、保肝、兴奋离体子宫等药理活性^[2-6]。前期本课题组从截叶铁扫帚 70% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位分离到了一系列的木脂素、苯丙素类化合物, 并对其进行了药理活性筛选, 结果显示部分化合物具有良好的抗溃疡性结肠炎、保肝等活性^[7-9]。为了拓展截叶铁扫帚化学物质基础范围, 补充和完善其生物活性研究内容, 进一步为截叶铁扫帚的开发利用提供科学依据。本实验采用硅胶柱色谱、中压液相色谱及制备高效液相色谱等多种方法从截叶铁扫帚 70% 乙醇提取物中分离得到 5 个黄酮类化合物, 利用 MS、IR、UV、1D 和 2D NMR 等波谱技术对其结构进行鉴定, 分别为 7-*O*-glucosyllaburnetin (**1**)、山柰酚-3-*O*- β -D-半乳糖苷 (**2**)、山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (**3**)、牡荆素 (**4**) 和异牡荆素 (**5**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 和 **3** 为首次从截叶铁扫帚中分离得到, 结构见图 1。采用特异的体外靶向 *xbp1* 高通量双荧光素酶报告基因药物筛选模型对化合物 **1**~**5** 进行了 *xbp1* 转录激活作用评价, 发现化合物 **1** 具有一定的 *xbp1* 转录激活作用, 其作用强度为空载体对照组的 1.80 倍。

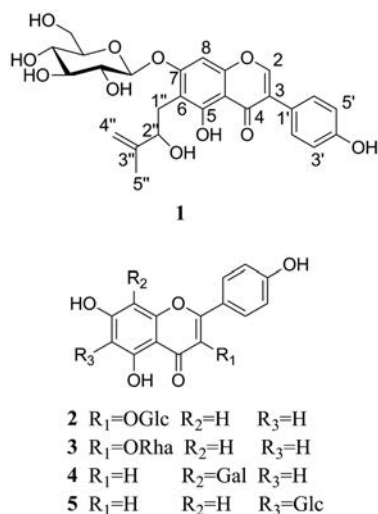


Figure 1 Structures of compounds 1–5

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 **1** 黄色粉末, $[\alpha]_D^{20} -172.5$ (c 0.10, CH_3OH), IR 光谱显示有羟基 ($3\ 310\ cm^{-1}$), 苯环 ($1\ 614$ 和 $1\ 516\ cm^{-1}$) 的特征吸收峰, UV 显示该化合物在 MeOH 溶液中的最大吸收为 204、267 nm。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 539.153 1 $[M+Na]^+$ (calcd. for $C_{26}H_{28}NaO_{11}$, 539.152 4), 同时结合 1H NMR 和 ^{13}C NMR 图谱数据推测化合物 **1** 的分子式为 $C_{26}H_{28}O_{11}$, 不饱和度为 13。化合物 **1** 的 1D NMR (表 1) 中 δ_H 7.40 (2H, d, $J = 9.0$ Hz,

Table 1 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) and ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) spectral data of compound **1** (J in Hz)

No.	δ_H	δ_C
2	8.43 s	154.3
3		121.1
4		180.6
5		158.8
6		111.0
7		161.7
8	6.82 s	93.1
9		155.5
10		105.9
1'		122.5
2',6'	7.40 d (9.0)	130.2
3',5'	6.83 d (9.0)	115.1
4'		157.5
1''	2.88 dd (13.5, 5.0), 2.76 dd (13.0, 5.0)	28.7
2''	4.22 m	73.6
3''	6.77 d (8.5)	148.3
4''	4.76 brs, 4.67 brs	109.8
5''	1.77 s	17.3
Glc-1	4.96 d (7.0)	101.0
Glc-2	3.35 m	73.5
Glc-3	3.34 m	76.4
Glc-4	3.18 m	69.7
Glc-5	3.47 m	77.4
Glc-6	3.75 m, 4.47 m	60.7

H-2',6')、6.83 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3',5') 为 AA'BB' 偶合系统的特征信号; δ_H 6.82 (1H, s, H-8) 为芳环质子信号; 上述信息表明 **1** 结构中含有两个苯环: 一个为 1,4-对位取代, 另一个为 1,2,3,4,5-五取代。结合 UV 信息, δ_H 8.43 (1H, s, H-2) 表明 **1** 可能为异黄酮类化合物。 δ_H 4.76 (1H, brs, H-4''a)、4.67 (1H, brs, H-4''b)、4.22 (1H, m, H-2''), 2.88 (1H, dd, $J = 5.0, 13.5$ Hz, H-1''a)、2.76 (1H, dd, $J = 4.0, 13.0$ Hz, H-1''b)、1.77 (3H, s, H-5'') 为 2-羟基-3-甲基-3-丁烯基的信号。 ^{13}C NMR 中 δ_C 101.0、73.5、76.4、69.7、77.4、60.7 为葡萄糖片段的碳信号; δ_H 4.96 (1H, d, $J = 7.0$ Hz) 表明该糖的端基氢为 β 型。参照文献^[10], 利用酸水解的方法获得单体葡萄糖, 结合 GC 分析, 确定分子中的葡萄糖为 *D*-葡萄糖构型。基于上述信息和相关文献推断, 化合物 **1** 与已知化合物 laburnetin (5, 7, 4'-trihydroxy-6-(2''-hydroxy-3''-methyl-3''-butenyl) isoflavone) 结构相似^[11], 区别在于化合物 **1** 的 C-7 位连接有一个葡萄糖片段。

化合物 **1** 结构中取代基位置通过 2D NMR 谱图来确定的。在 HMBC 谱 (图 2) 中, H-2 (δ_H 8.43, 1H, s) 与 C4 (δ_C 180.6)、C5 (δ_C 158.8) 远程相关, 进一步证明 **1** 为异黄酮类化合物; 葡萄糖的 H-1 (δ_H 4.96) 与 C-7 (δ_C 161.7) 远程相关, 证明 β -D-葡萄糖连接在异黄酮母核的 C-7 位; 2-羟基-3-甲基-3-丁烯基团的 H-1'' (δ_H 2.88, 2.76) 与 C-5 (δ_C 158.8)、C-7, H-2'' (δ_H 4.22) 与 C-6 (δ_C

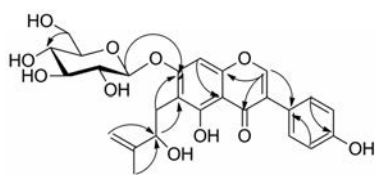


Figure 2 Key HMBC correlations of compound 1

111.0) 远程相关, 证明 2-羟基-3-甲基-3-丁烯连接在 C-6 位; 因此, 该化合物的结构确定为 7-O-glucosyllaburnetin。

2 活性评价

采用特异的体外靶向 *xbp1* 高通量药物筛选模型对已分离鉴定的化合物进行了体外 *xbp1* 激活作用评价。研究表明, 化合物 1 对 *xbp1* 基因启动子具有一定的转录激活效应, 其作用强度为空载体对照组的 1.80 倍。然而, 本实验所分离的其他化合物对 *xbp1* 的转录未显示激活效应。

实验部分

JASCO V650 型紫外分光光度计, JASCO P2000 型旋光仪 (日本 JASCO 公司); Nicolet impact 5700 型傅里叶变换红外光谱仪 (美国 Thermo Electron Corporation 公司); Mercury-400 核磁共振仪 (美国 Varian 公司); BRUKER AV500-III 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Agilent 1100 系列 LC/MSD Trap-SL 型质谱仪, Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); Shimadzu LC-6AD 型半制备液相色谱仪 (日本岛津公司); YMC ODS-A C18 制备柱 (250 mm×20 mm, 5 μm, 日本 YMC 公司); Büchi 中压液相制备色谱仪 (瑞士布琪有限公司); 354 型酶标仪 (美国 Thermo 公司)。柱色谱硅胶 (200~300 目) 和薄层色谱硅胶 (GF254) 均为青岛海洋化工厂产品。常规试剂均为分析纯。

截叶铁扫帚于 2012 年 9 月采自江西省九江市 (经度 115°89'87.13", 纬度 29°58'51.73", 海拔 65.6 米), 经江西省九江森林植物标本馆谭策铭研究员鉴定为豆科胡枝子属植物截叶铁扫帚 [*Lespedeza cuneata* (Dum.Cour.) G. Don] 的地上部分。标本现存于江西省九江森林植物标本馆, 标本号为 12675。

1 提取分离

截叶铁扫帚地上部分 20 kg, 粉碎后用 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 过滤, 合并提取液, 减压浓缩回收溶剂后, 得 70% 乙醇提取物 3.7 kg。将 70% 乙醇提取物用硅藻土拌样, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、95% 乙醇和 70% 乙醇依次洗脱, 得到各个部位。其中乙酸乙酯洗脱部位 (120 g) 经正相硅胶柱色谱分离,

CHCl₃-MeOH-H₂O (4:1:0.1) 系统洗脱, 经薄层色谱检视, 合并相近的组分, 得 7 个组分 (Fr.1~Fr.7)。Fr.4 (6.8 g) 通过中压柱色谱柱色谱, 梯度洗脱 [甲醇-水 (25:75→70:30, v/v)], 得到 Fr.4-1~Fr.4-20; Fr.4-10 (0.65 g) 经制备液相 [乙腈-水 (15:85, v/v)] 分离纯化得到化合物 1 (17 mg)、3 (18 mg) 和 5 (23 mg)。Fr.6 (14.5 g) 通过中压柱色谱柱色谱, 梯度洗脱 [甲醇-水 (20:80→75:25, v/v)], 得到 Fr.6-1~Fr.6-22。Fr.6-12 (0.70 g) 经半制备液相 [乙腈-水 (17:83, v/v)] 分离纯化得到化合物 2 (26 mg) 和 4 (12 mg)。

2 结果鉴定

化合物 1 黄色粉末; [α]_D²⁰-172.5 (c 0.10, CH₃OH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 204 (4.56)、267 (4.58) nm; IR (microscope) ν_{max}: 3 310、2 917、1 649、1 614、1 516、1 450、1 372、1 262、1 019、953、841 cm⁻¹; HR-ESI-MS *m/z* 539.153 1 [M+Na]⁺ (calcd. for C₂₆H₂₈NaO₁₁, 539.152 4)。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) 和 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) 数据见表 1。

化合物 2 黄色粉末; ESI-MS *m/z* 471 [M+Na]⁺, 919 [2M+Na]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_H: 8.05 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.85 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.35 (1H, brs, H-8), 6.13 (1H, brs, H-6), 5.37 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1")。 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ_C: 156.5 (C-2), 133.1 (C-3), 177.2 (C-4), 160.0 (C-5), 99.2 (C-6), 161.1 (C-7), 93.9 (C-8), 156.0 (C-9), 103.2 (C-10), 120.9 (C-1'), 130.9 (C-2'), 115.0 (C-3'), 160.0 (C-4'), 115.0 (C-5'), 130.9 (C-6'), 101.9 (C-1"), 71.2 (C-2"), 73.1 (C-3"), 67.9 (C-4"), 75.7 (C-5"), 60.1 (C-6")。以上数据与文献报道的山柰酚-3-*O*-β-*D*-半乳糖苷^[12]的数据一致。

化合物 3 黄色粉末; ESI-MS *m/z* 455 [M+Na]⁺, 471 [M+K]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_H: 7.78 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, brs, H-8), 6.18 (1H, brs, H-6), 5.29 (1H, brs, H-1")。 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ_C: 157.0 (C-2), 134.1 (C-3), 177.6 (C-4), 161.2 (C-5), 98.9 (C-6), 165.1 (C-7), 93.8 (C-8), 156.6 (C-9), 103.8 (C-10), 120.5 (C-1'), 130.6 (C-2'), 115.4 (C-3'), 160.0 (C-4'), 115.4 (C-5'), 130.6 (C-6'), 101.8 (C-1"), 70.3 (C-2"), 70.6 (C-3"), 71.1 (C-4"), 70.1 (C-5"), 17.5 (C-6")。以上数据与文献报道的山柰酚-3-*O*-α-*L*-鼠李糖苷^[13,14]的数据一致。

化合物 4 黄色粉末; ESI-MS *m/z* 433 [M+H]⁺, 455 [M+Na]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_H: 8.03 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.77 (1H, s, H-3), 6.27 (1H, s, H-6), 4.69 (1H, d, *J* = 9.5 Hz,

H-1'')。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} : 163.9 (C-2), 102.4 (C-3), 182.1 (C-4), 161.2 (C-5), 98.2 (C-6), 162.8 (C-7), 104.6 (C-8), 156.0 (C-9), 104.0 (C-10), 121.6 (C-1'), 129.0 (C-2'), 115.8 (C-3'), 160.4 (C-4'), 115.8 (C-5'), 129.0 (C-6'), 73.4 (C-1''), 70.9 (C-2''), 78.7 (C-3''), 70.6 (C-4''), 81.8 (C-5''), 61.3 (C-6'')。以上数据与文献报道的牡荆素^[15]的数据一致。

化合物 5 黄色粉末; ESI-MS m/z 455 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 431 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} : 7.90 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2',6'), 6.91 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3',5'), 6.73 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, s, H-8), 4.60 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-1'')。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} : 163.2 (C-2), 102.8 (C-3), 181.7 (C-4), 161.3 (C-5), 109.0 (C-6), 163.2 (C-7), 93.8 (C-8), 156.5 (C-9), 103.4 (C-10), 121.0 (C-1'), 128.4 (C-2'), 116.0 (C-3'), 160.7 (C-4'), 116.0 (C-5'), 128.4 (C-6'), 73.2 (C-1''), 70.6 (C-2''), 79.0 (C-3''), 70.2 (C-4''), 81.5 (C-5''), 61.5 (C-6'')。以上数据与文献报道的异牡荆素^[15]的数据一致。

3 活性筛选

将处于对数生长期的 IEC-6 细胞接种于 48 孔板中, 每孔细胞数为 5×10^4 , 使细胞在孔内均匀分散, 放置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱培养。待细胞生长汇和至 70%~80%, 对细胞进行相应质粒的转染 (每孔 0.6 μg), 4 h 后加入 1×10^{-5} mol·L $^{-1}$ 各化合物与转染细胞共孵育 ($n = 3$)。于共培养 48 h 后收样, 利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega, USA) 对实验样品进行报告基因荧光素酶活性检测。

References

- [1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Herbal Medicines (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publisher, 1986: 1444.
- [2] Zhou J, Zhang CF, Lyu YN, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lespedeza cuneata* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 228-234.
- [3] Yoo G, Park SJ, Lee TH. Flavonoids isolated from *Lespedeza cuneata* G. Don and their inhibitory effects on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia cells [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11: 651-656.
- [4] Deng F, Chang J, Zhang JS. New flavonoids and other constituents from *Lespedeza cuneata* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2007, 9: 655-658.
- [5] Kim SM, Kang K, Jho EH, et al. Hepatoprotective effect of flavonoid glycosides from *Lespedeza cuneata* against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide [J]. Phytother Res, 2011, 25: 1011-1017.
- [6] Lee HJ, Lim GN, Park MA, et al. Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. Don extracts [J]. Korean J Microbiol Biotechnol, 2011, 39: 63-69.
- [7] Zhou J, Li CJ, Yang JZ, et al. Phenylpropanoid and lignan glycosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata* [J]. Phytochemistry, 2016, 121: 58-64.
- [8] Zhang CF, Zhou J, Yang JZ, et al. Two new phenylpropanoid glycosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata* [J]. Acta Pharm Sin B, 2016, 6: 564-567.
- [9] Zhang CF, Zhou J, Yang JZ, et al. Three new lignanosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18: 913-920.
- [10] Sato H, Tahara S, Ingham JL, et al. Isoflavones from pods of *Laburnum anagyroides* [J]. Phytochemistry, 1995, 39: 673-676.
- [11] Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. Phytochemistry, 1992, 31: 3307-3330.
- [12] Tomczyk M, Gudej J. Polyphenolic compounds from *Rubus saxatilis* [J]. Chem Nat Compd, 2005, 41: 349-351.
- [13] Fukunaga T, Nishiya K, Kajikawa I, et al. Chemical studies on the constituents of *Hyphear Tanakae* Hosokawa from different host trees [J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36: 1180-1184.
- [14] Jia L, Bi YF, Jing LL, et al. Study on chemical constituents of *Urena procumbens* L. [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2010, 45: 1054-1056.
- [15] Lin YL, Kuo YH, Shiao MS, et al. Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L. [J]. J Chin Chem Soc, 2000, 47: 253-256.