

## 宽叶金粟兰中1对具有神经保护活性的倍半萜对映体

陈芳有, 李宏焘, 陈杰, 双鹏程, 罗永明\*

(江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004)

**摘要:** 运用硅胶柱色谱、MCI柱色谱、Sephadex LH-20凝胶柱色谱、制备液相色谱等多种色谱技术对金粟兰科植物宽叶金粟兰乙醇提取物进行分离纯化。从中分离得到5个倍半萜类化合物, 并应用波谱学方法(MS、IR、NMR)和单晶X射线衍射对分离得到的化合物结构进行了鉴定, 分别鉴定为:(1*S*,6*S*,8*R*)-8-ethoxychloromultin C (**1a**)、(1*R*,6*R*,8*S*)-8-ethoxychloromultin C (**1b**)、(+)-phaeocaulin D (**2**)、白术内酯 I (**3**) 和 8- $\beta$ -ethoxyasterolid (**4**)。其中化合物**1a**和**1b**为1对新的倍半萜对映体, 化合物**2~4**为首次从宽叶金粟兰中分离得到。在10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 化合物**1a**、**1b**、**2**和**3**使H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤的PC12细胞的细胞存活率从(43.41  $\pm$  1.59) %分别提高到(61.71  $\pm$  7.56) %、(66.05  $\pm$  5.61) %、(74.34  $\pm$  3.32) %和(69.58  $\pm$  5.02) %。

**关键词:** 宽叶金粟兰; 倍半萜对映体; 神经保护活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2020)08-1855-04

## A pair of enantiomeric sesquiterpenoids with neuroprotective effects from *Chloranthus henryi*

CHEN Fang-you, LI Hong-tao, CHEN Jie, SHUANG Peng-cheng, LUO Yong-ming\*

(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**Abstract:** An ethanol extract of *Chloranthus henryi* (Chloranthaceae) was subjected to various chromatographic procedures including silica gel column chromatography, MCI column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and preparative HPLC. Five purified sesquiterpenes analyzed by spectroscopic analyses (MS, IR, NMR) and single crystal X-ray diffraction were elucidated as (1*S*,6*S*,8*R*)-8-ethoxychloromultin C (**1a**), (1*R*,6*R*,8*S*)-8-ethoxychloromultin C (**1b**), (+)-phaeocaulin D (**2**), atractylenolide I (**3**), and 8- $\beta$ -ethoxyasterolid (**4**). Compounds **1a** and **1b** were a new pair of sesquiterpene enantiomers and compounds **2~4** were isolated from this plant for the first time. Compounds **1a**, **1b**, **2** and **3** increased cell viability in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated PC12 cells from (43.41  $\pm$  1.59) % to (61.71  $\pm$  7.56) %, (66.05  $\pm$  5.61) %, (74.34  $\pm$  3.32) % and (69.58  $\pm$  5.02) % at 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively.

**Key words:** *Chloranthus henryi*; sesquiterpene enantiomers; neuroprotective effects

宽叶金粟兰 (*Chloranthus henryi* Hemsl.) 为金粟兰科金粟兰属植物, 民间多以全草入药, 广泛用于治疗跌打损伤、瘀血肿痛、风湿性关节炎等疾病<sup>[1]</sup>。宽叶金粟兰在江西有着广泛的分布, 药用植物资源种类丰富、蕴藏量大, 被《全国中草药汇编》和《江西省中药材材

准》(1996年版、2014年版) 收录, 作为多种中药制剂的原料药应用<sup>[2]</sup>, 如江西省中药企业生产的“钻山风糖浆”、“钻山风合剂”处方中, 宽叶金粟兰为其主要药味。然而目前对宽叶金粟兰的药效物质基础研究不够深入<sup>[3]</sup>, 严重影响了这一具有江西特色中药材的应用开发。本课题组在前期工作中, 从宽叶金粟兰分离得到了一系列倍半萜、倍半萜二聚体和二萜类化合物, 通过药理研究显示部分化合物具有较好的神经保护和抗乳腺癌转移等活性<sup>[4-7]</sup>。为了拓展宽叶金粟兰化学物质

收稿日期: 2020-04-07; 修回日期: 2020-04-21.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21262019); 江西中医药大学博士科研启动基金项目 (2018BBSZR003).

\*通讯作者 Tel: 86-791-87118850, E-mail: loym999@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0491

基础范围, 补充和完善其生物活性研究内容, 为创新药物的研发提供先导化合物和江西特色中药资源的开发提供科学资料。本实验运用硅胶柱色谱、MCI柱色谱、Sephadex LH-20凝胶柱色谱、制备液相和手性拆分等多种色谱技术对宽叶金粟兰乙醇提取物进行分离纯化。从中分离得到5个倍半萜类化合物, 并应用波谱学方法(MS、IR、NMR)和单晶X射线衍射对分离得到的化合物结构进行了鉴定, 分别鉴定为: (1*S*,6*S*,8*R*)-8-ethoxychlomultin C (**1a**)、(1*R*,6*R*,8*S*)-8-ethoxychlomultin C (**1b**)、(+)-phaeoaulin D (**2**)、白术内酯 I (**3**) 和 8- $\beta$ -ethoxyasterolid (**4**) (图1)。其中化合物**1a**和**1b**为1对新的倍半萜对映体, 化合物**2**~**4**为首次从宽叶金粟兰中分离得到。在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下, 化合物**1a**、**1b**、**2**和**3**使  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤的 PC12 细胞的细胞存活率从  $(43.41 \pm 1.59)\%$  分别提高到  $(61.71 \pm 7.56)\%$ 、 $(66.05 \pm 5.61)\%$ 、 $(74.34 \pm 3.32)\%$  和  $(69.58 \pm 5.02)\%$ 。

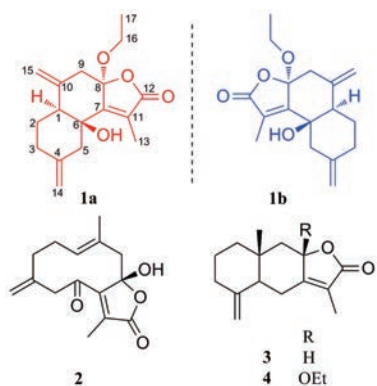


Figure 1 Sesquiterpene lactones from the roots of *Chloranthus henryi*

## 结果与讨论

### 1 结构鉴定

化合物**1** 白色针状结晶(甲醇),  $[\alpha] \approx 0$  ( $c$  0.1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ), HR-TOF-MS 给出准分子离子峰  $m/z$  291.160 2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_4$ , 291.159 6), 结合  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 推测化合物**1**的分子式是  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4$ 。通过 IR 图谱中  $3\ 527$ 、 $3\ 089$ 、 $1\ 765$  和  $1\ 386\ \text{cm}^{-1}$  等信号推断化合物中存在着羟基、双键、羰基和甲基等官能团。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 显示有 2 个甲基信号  $\delta$  1.22 (3H, t,  $J = 6.6$  Hz, 17- $\text{CH}_3$ )、2.06 (3H, s, 13- $\text{CH}_3$ )。有 4 个烯氢信号  $\delta$  5.00 (1H, s, H-15a)、4.90 (1H, s, H-15b)、4.98 (1H, s, H-14a)、4.84 (1H, s, H-14b) (表1)。 $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 显示 17 个碳信号, 其中有 2 个甲基碳信号  $\delta$  9.8 (C-13)、15.4 (C-17)。同时可以看到有 1 个酯羰基碳信号 171.7 (C-12), 6 个烯碳信号 143.0 (C-4)、112.1 (C-14)、159.7 (C-7)、129.7 (C-11)、141.4 (C-10)、

113.8 (C-15), 1 个缩酮碳信号 105.8 (C-8) 和 1 个连氧取代碳信号 71.6 (C-6)。结合碳信号  $\delta$  159.7 (C-7)、105.8 (C-8)、129.7 (C-11)、171.7 (C-12)、9.8 (C-13) 的出现推断化合物中可能存在 13-甲基-8,12- $\alpha,\beta$ -五元不饱和内酯环片段。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱(图2)中显示了 H-16 ( $\delta_{\text{H}}$  3.53~3.32) 与 H-17 ( $\delta_{\text{H}}$  1.22) 之间的相关, 说明结构中有一个乙氧基的存在。同时显示了 H-1/H-2/H-3 之间的相关。

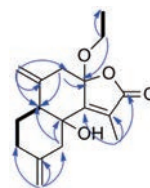


Figure 2  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and key HMBC correlations of compound **1**

HMBC 谱中, 通过 H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  4.98, 4.84) 与 33.8 (C-3)、143.0 (C-4)、44.4 (C-5) 之间的相关和 H-15 ( $\delta_{\text{H}}$  5.00, 4.90) 与 41.7 (C-9)、45.4 (C-1)、141.4 (C-10) 之间的相关确定了两个末端双键的连接位置。通过 H-13 ( $\delta_{\text{H}}$  2.06) 与 159.7 (C-7)、129.7 (C-11)、171.7 (C-12)、71.6 (C-6)、105.8 (C-8) 之间的相关进一步确证了  $\alpha,\beta$ -五元不饱和内酯环的存在。通过 H-16 ( $\delta_{\text{H}}$  3.53~3.32) 与 105.8 (C-8) 之间的相关推断乙氧基连接在 C-8。基于以上信息并结合文献推断化合物**1**为 8 位连有乙氧基的杜松烷型倍半萜内酯类, 与 chlomultin C 类似<sup>[8]</sup>。

Table 1  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data of compound **1** ( $J$  in Hz)

| No. | $\delta_{\text{H}}$               | $\delta_{\text{C}}$ | No. | $\delta_{\text{H}}$ | $\delta_{\text{C}}$ |
|-----|-----------------------------------|---------------------|-----|---------------------|---------------------|
| 1   | 3.01 (d, 12.0)                    | 45.4                | 10  |                     | 141.4               |
| 2   | 1.78–1.67 (m)                     | 23.5                | 11  |                     | 129.7               |
| 3   | 2.51–2.17 (m)                     | 33.8                | 12  |                     | 171.7               |
| 4   |                                   | 143.0               | 13  | 2.06 (s)            | 9.8                 |
| 5   | 2.70 (d, 13.2),<br>2.39 (d, 13.2) | 44.4                | 14  | 4.98 (s), 4.84 (s)  | 112.1               |
| 6   |                                   | 71.6                | 15  | 5.00 (s), 4.90 (s)  | 113.8               |
| 7   |                                   | 159.7               | 16  | 3.53–3.32 (m)       | 59.2                |
| 8   |                                   | 105.8               | 17  | 1.22 (t, 6.6)       | 15.4                |
| 9   | 3.25 (d, 17.4),<br>2.64 (d, 17.4) | 41.7                |     |                     |                     |

但是该化合物的比旋光度值比较小, 而且 ECD 图谱中 Cotton 效应较弱, 推测化合物**1**可能为消旋体。通过手性柱 HPLC 分析, 显示峰面积接近 1:1 的两个峰, 这确证了该化合物为外消旋体。用半制备手性柱 HPLC 进行拆分, 分别得到 **1a**:  $[\alpha] +62.0$  ( $c$  0.1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ), ECD 图谱在 225 nm 处 ( $\Delta\epsilon = -0.40$ ) 呈现负的 Cotton 效应, 在 249 nm 处 ( $\Delta\epsilon = +5.63$ ) 呈现正的 Cotton 效应; **1b**:  $[\alpha] -82.0$  ( $c$  0.1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ECD 图谱在 224 nm 处 ( $\Delta\epsilon =$

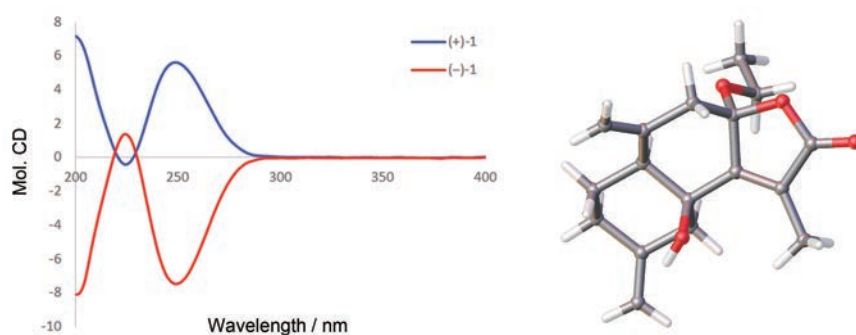


Figure 3 ECD spectra of **1a/1b** (left) and crystal structure of **1a** (right)

+1.39) 显示正的 Cotton 效应, 在 249 nm 处 ( $\Delta\epsilon = -7.45$ ) 显示负的 Cotton 效应。二者的 ECD 图谱呈镜像关系 (图 3), 说明为一对对映异构体。通过 X 单晶衍射的方法对其绝对构型进行了确证 (CCDC: 1994887), **1a** 的结构为 (1*S*,6*S*,8*R*)-8-ethoxychloromultin C, 而 **1b** 的结构为 (1*R*,6*R*,8*S*)-8-ethoxychloromultin C。

化合物 **2~4** 为已知化合物, 经核磁共振谱分析与文献数据进行比较, 鉴定为 (+)-phaeocaulin D (**2**)<sup>[9]</sup>、白术内酯 I (**3**)<sup>[10]</sup> 和 8- $\beta$ -ethoxyasterolid (**4**)<sup>[11]</sup>。

## 2 活性评价

采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞模型对分离鉴定的化合物进行了神经保护活性评价。在 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下, 化合物 **1a**、**1b**、**2~4** 使细胞存活率从 (43.41  $\pm$  1.59) % 分别提高到 (61.71  $\pm$  7.56) %、(66.05  $\pm$  5.61) %、(74.34  $\pm$  3.32) % 和 (69.58  $\pm$  5.02) %, 阳性对照药儿茶素在 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下的细胞生存率为 (76.18  $\pm$  9.80) % (图 4)。结果表明所分离鉴定的倍半萜内酯类化合物均表现出一定的神经保护活性。

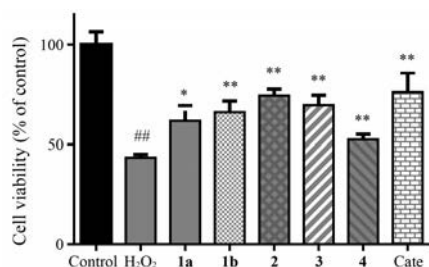


Figure 4 Neuroprotective effects of compounds **1-4** (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damaged PC12 cells. Catechin hydrate (Cate, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were used as the positive controls. Results were obtained from three independent experiments and were expressed as the mean  $\pm$  SD. ## $P < 0.01$  vs control; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model

## 实验部分

JASCO P2000 型旋光仪 (日本 JASCO 公司); JASCO J-815 型圆二色谱仪; Nicolet impact 5700 型傅

里叶变换红外光谱仪 (美国 Thermo Electron Corporation 公司); Agilent 1100 系列 LC/MSD 离子阱质谱仪; Bruker AVANCE III HD 600 MHz 型核磁共振波谱仪; 薄层色谱硅胶 GF254 和柱色谱用硅胶 (100~200 目, 200~300 目) 均为青岛海洋化工厂产品; 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; Buchi R-200 型旋转蒸发仪; Waters 2695-2998 型高效液相; Waters 515 型制备液相; YMC-Pack ODS-A C18 (20 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 分析型反相色谱柱; Kromasil 100A C18 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 手性半制备柱: Daicel Chiralpak AD-H (10 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 所用试剂均为分析纯或色谱纯。

药材于 2014 年 10 月采自江西井冈山市, 由江西中医药大学邓可众教授鉴定为金粟兰科金粟兰属植物宽叶金粟兰 *Chloranthus henryi* Hemsl., 凭证标本保存于江西中医药大学中药化学教研室 (20141012)。

### 1 提取分离

干燥的宽叶金粟兰根 (13 kg) 切碎后用 95% 乙醇冷浸提取 3 次, 每次浸泡 7 天。合并提取液减压回收后得浸膏 404 g, 经过硅胶 (100~200 目) 柱色谱, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇洗脱, 减压回收溶剂后得到石油醚部位 2 g、氯仿部位 80 g、乙酸乙酯部位 88 g、丙酮部位 62 g、甲醇部位 161 g。氯仿部位 80 g 经硅胶柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯, 20:1~0:1) 为洗脱剂梯度洗脱, 得到 6 个组分 A~F。组分 A (31 g) 经硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮, 40:1~1:1), TLC 分析合样, 得到 5 个组分 A1~A5。组分 A3 (6 g) 经凝胶柱色谱和制备液相分离, 得到化合物 **3** (15 mg)。组分 A4 (6 g) 经 MCI 柱色谱和制备液相分离, 得到化合物 **1** (8 mg)、**2** (13 mg) 和 **4** (22 mg)。化合物 **1** 经手性半制备柱 (正己烷-异丙醇, 40:1, 流速 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>) 分离得到 (+)-**1** ( $t_R$ =17.27 min) 和 (-)-**1** ( $t_R$ =19.70 min)。

### 2 结构鉴定

化合物 **1** 无色针状结晶 (CH<sub>3</sub>OH); mp 168~

169 °C; IR (microscope)  $\nu_{\max}$  3 528, 3 090, 2 980, 2 949, 1 766, 1 647, 1 435, 1 386, 1 303, 1 243, 1 196, 1 113  $\text{cm}^{-1}$ ; HR-TOF-MS  $m/z$  291.160 2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值 291.159 6);  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据见表 1。1a:  $[\alpha] +62.0$  ( $c$  0.1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ECD (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 225 (-0.40), 249 (+5.63)。1b:  $[\alpha] -82.0$  ( $c$  0.1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ECD (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 224 (+1.39), 249 (-7.45)。

化合物 1 为无色针状结晶 (甲醇), 分子式为  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4$ ,  $M = 290.35$ , 单斜晶系, 晶胞参数为  $a = 12.827\ 2$  (3) Å,  $b = 9.330\ 0$  (2) Å,  $c = 12.841\ 4$  (3) Å,  $\beta = 101.947$  (2)°,  $U = 1\ 503.54$  (6) Å<sup>3</sup>,  $T = 108.0$  (10), 空间群为  $\text{P}2_1/c$  (no. 14),  $Z = 4$ ,  $\mu$  (Cu  $K\alpha$ ) = 0.734, 收集衍射点数为 7 114, 独立衍射点数 2 862 ( $R_{\text{int}} = 0.028\ 7$ ),  $wR(F_2)$  为 0.116 8。

### 3 神经保护活性研究

取对数生长期的 PC12 细胞以每毫升  $1 \times 10^4$  个细胞的浓度接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞混悬液, 每组设 3 个以上复孔。设空白组、对照组、 $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组、给药组和阳性药对照组, 给药组每孔加入 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度的化合物, 各加 10  $\mu\text{L}$ , 其他组加入等体积的培养基。阳性药组加入等量的儿茶素 (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 其他组加入等体积的培养基。同时  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组、给药组和阳性药对照组每孔加入终浓度为 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 共孵育 24 h, 之后加入 5  $\mu\text{L}$  浓 CCK8 继续培养 2 h, 酶标仪测 450 nm 处 OD 值。根据吸光值计算细胞存活率, 公式为: 细胞存活率 =  $(\text{OD}_{\text{给药}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) \times 100\%$  [12-14]。

**作者贡献:** 陈芳有负责完成实验的设计、实验的実施和文章的撰写; 李宏焘参与实施实验和数据分析; 陈杰负责数据的分析和审阅文章; 双鹏程主要负责实验数据的采集、分析; 罗永明为实验提供指导、设计方案并对文章进行了审阅。

**利益冲突:** 所有作者申明无任何利益冲突。

### References

- [1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Traditional Chinese Medicine (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technique Publishing House, 1977: 652.
- [2] Liu Y, Zhang Q, Peng YJ, et al. Pharmacognostical study on four origin plants of folk medicine Sikuaiwa [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 4177-4181.
- [3] Zhang ML, Liu D, Fan GQ, et al. Constituents from Chloranthaceae plants and their biological activities [J]. Heterocycl Commun, 2016, 22: 175-220.
- [4] Li CJ, Zhang DM, Luo YM. Studies on the chemical constituents from the roots of *Chloranthus henryi* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 525-528.
- [5] Chen FY, Li HT, Li CJ, et al. Neuroprotective racemic germacranolides from the roots of *Chloranthus henryi* [J]. Fitoterapia, 2020, 141: 104472.
- [6] Zhang SS, Fu JJ, Chen HY, et al. Sesquiterpenes with anti-metastasis breast cancer activity from *Chloranthus henryi* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2017, 42: 3938-3944.
- [7] Li CJ, Zhang DM, Luo YM, et al. Bis-sesquiterpenes and diterpenes from *Chloranthus henryi* [J]. Phytochemistry, 2008, 69: 2867-2874.
- [8] Zhang S, Su ZS, Yang SP, et al. Four sesquiterpenoids from *Chloranthus multistachys* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12: 522-528.
- [9] Xia GY, Sun DJ, Ma JH, et al. (+)/(-)-Phaeocaulin A-D, four pairs of new enantiomeric germacran-type sesquiterpenes from *Curcuma phaeocaulis* as natural nitric oxide inhibitors [J]. Sci Rep, 2017, 7: 43576.
- [10] Dong HY, He LC, Huang M, et al. Anti-inflammatory components isolated from *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. Nat Prod Res, 2008, 22: 1418-1427.
- [11] Chen ZL. The acetylenes from *Atractylodes macrocephala* [J]. Plant Med, 1987, 53: 493-494.
- [12] Chen FY, Li CJ, Ma J, et al. Neuroprotective dihydroagarofuran sesquiterpene derivatives from the leaves of *Tripterygium wilfordii* [J]. J Nat Prod, 2018, 81: 270-278.
- [13] Chen BY, Yue RC, Yang YG, et al. Protective effects of (*E*)-2-(1-hydroxyl-4-oxocyclohexyl) ethyl caffeine against hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells [J]. Neurochem Res, 2015, 40: 531-541.
- [14] Zhang W, Song JK, Zhu XY, et al. Isorhamnetin activates Sirt1/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway to inhibit MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cell injury [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1976-1981.