

树豆内酯 A 粗品皂化产物的化学结构鉴定

胡阳亮, 沈小玲, 陈梅果, 胡英杰*

(广州中医药大学热带医学研究所中药新药发现实验室, 广州 510405)

摘要: 对天然产物树豆内酯 A 进行皂化反应以期获得具有降血糖、降血脂活性的天然药物先导物树豆酮酸 A。利用含有树豆内酯 A 和球松素各约 50% 的粗品, 经 0.65% KOH 含水乙醇回流 3.5 h 皂化, 产物经柱层析分离纯化获得皂化产物; 通过理化和波谱学分析鉴定产物的化学结构。分离并鉴定了全部 5 个皂化产物, 除了预期产物树豆酮酸 A 以外, 其余 4 个低得率的副产物结构分别为 1-(2,6-二羟基-4-甲氧基苯基)乙酮 (2)、球松素查尔酮 (3)、cajanotone (4) 和 1 个新化合物 (1), 化合物 1 鉴定为 CAA 的异构体, 命名为树豆酮酸 B (Cajanonic acid B)。这为进一步研究开发树豆 (*Cajanus cajan*) 叶生物活性成分提供了新的实验依据。

关键词: 树豆内酯 A; 皂化; 树豆酮酸 A; 树豆酮酸 B

doi: 10.11926/jtsb.3617

Structural Identification on the Saponification Products of Raw Cajanolactone A

HU Yang-liang, SHEN Xiao-ling, CHEN Mei-guo, HU Ying-jie*

(Laboratory of Herbal Drug Discovery, Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: The aim of this work was to obtain a natural hypoglycemic and hypolipidemic drug lead cajanonic acid A (CAA) by saponification of a natural product cajanolactone A (CLA). A mixture containing about both 50% amount of CAA and pinostrobin was treated with 0.65% KOH in aqueous ethanol for 3.5 h under reflux, the mixed products were isolated through column chromatography and identified by physico-chemical and spectroscopic analysis. Besides the expected product CAA, four minor saponificative products were obtained, and identified as 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-ethanone (2), pinostrobin chalcone (3), cajanotone (4), and compound 1. Compound 1, a structural isomer of CAA, was found to be a new compound and named as cajanonic acid B. These would provide a new experimental basis for the further research and development bioactive component of *Cajanus cajan* leaves.

Key words: Cajanonic acid A; Saponification; Cajanolactone A; Cajanonic acid B

随着生活方式的变化, 2 型糖尿病以及 2 型糖尿病伴高血脂症已发展成为当前危害人们健康的一种重大疾病, 而胰岛素抵抗被认为是 2 型糖尿病的重要原因, 而且与心血管疾病的发生发展有紧密联系^[1-2], 寻找新的能够改善胰岛素抵抗治疗 2 型糖尿病及血脂紊乱的药物具有重要意义。本课题组

从豆科植物树豆 [*Cajanus cajan* (Linn.) Millsp.] (又名木豆) 的叶子中, 发现了一种新的萜类化合物树豆酮酸 A (Cajanonic acid A, 简称 CAA), 通过药理学研究证实其为一种基于抑制蛋白酪氨酸激酶 1B (PTP1B) 负调节胰岛素通路、抑制过氧化物酶体增殖子活化受体 γ (PPAR γ) 从而改善脂代谢的胰岛素

收稿日期: 2016-04-13 接受日期: 2016-04-29

基金项目: 广东省高等学校创新强校工程创新中药研发团队项目 (E1-KFD015141K05) 资助

This work was financially supported by the Innovative Research Team Program of Guangdong Higher Education (Grant No. E1-KFD015141K05).

作者简介: 胡阳亮 (1991~), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: 18027498137@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yingjiehu@gzucm.edu.cn

增敏剂, 由于作用机制与以罗格列酮为代表的噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂完全不同, 有可能避免 PPAR γ 激活剂带来的毒副作用^[3-5]。

鉴于树豆叶中 CAA 含量很低^[4], 为了获得更多的数量的 CAA 用于开展药理、毒理研究, 我们从含量较高的另一成分树豆内酯 A (Cajanolactone A, 简称 CLA) 通过化学转化的方法制备 CAA^[6-7]。提取的 CLA 和另一成分球松素 (Pinostrobin) 极性相似, 用硅胶柱分离时二者易形成 1:1 的混合物。为了避免进一步的分离造成 CLA 的损失, 我们采用含 CLA 约 50% 及几乎等量球松素的 CLA 粗品, 参考文献 [6-7] 的方法进行了皂化反应。有趣的是, 得到的皂化产物经柱层析分离和波谱分析, 发现除了目标产物 CAA 之外, 还出现了 4 种含量较低的副产物。本文报道对这 4 种副产物的分离和结构鉴定。

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂和耗材

德国 Bruker 公司 DRX-400 核磁共振仪, EQUINOX55 型红外光谱仪; 北京普析通用仪器有限公司 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计; 美国 AB SCIEX 公司 C506-Triple TOF 5600 系统; 北京创新通恒有限公司 LC6000 型高效制备液相色谱仪; LC3000 型高效制备液相色谱仪; 高效液相色谱仪 (UV D-170U, Chromeleon 色谱工作站, 美国 Dionex 公司); 日本 SHIMADZU 公司 SHIM-PACK 色谱柱; 巩义市予华仪器有限公司 DLSB 低温冷却液循环泵; 上海申生科技有限公司 R-100 旋转蒸发器; 青岛海洋化工厂分厂硅胶 (200~300 目), 硅胶 TLC 薄层预制板; 美国 GE Healthcare 公司 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶; 色谱级化学试剂甲醇为 Merck 公司产品; 实验用分析纯溶剂和化学试剂均为国产。TLC 显色剂为 3% 香兰素-12% 高氯酸乙醇溶液 (1:1, V/V)。

1.2 皂化产物的制备与分离

10 g 树豆内酯 A (CLA) 粗品溶于 1000 mL 无水乙醇, 加入 5% KOH 水溶液 150 mL (此时 KOH 浓度为 0.65%), 加热回流 3.5 h, 冷却至室温, 加 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ 调 pH 值为 7, 减压蒸除乙醇, 加乙酸乙酯萃取, 取乙酸乙酯液, 减压蒸干, 得 9.7 g 皂化产物。

9.7 g 皂化产物以石油醚-丙酮 (9:1) 以及石油醚-丙酮-冰醋酸 (7:3:0.1) 为流动相, 经正相硅胶

柱 (200~300 目) 分离, 通过 TLC 检测合并, 得到 8 个组分 (Fr.1~Fr.8); 其中 Fr.4 (1.03 g) 以甲醇-水 (7:3) 为流动相, 经 ODS-C18 柱, HPLC 制备, 得到化合物 2 (13.4 mg), 化合物 3 (12.4 mg) 和化合物 4 (11.6 mg); Fr.6 (2.50 g) 重结晶后得到粒状结晶 1.16 g (与对照品 CAA 一致); 母液以甲醇-水-冰醋酸 (75:25:0.1) 为流动相, 经 ODS-C18 柱制备 HPLC 分离, 得到 CAA (38.2 mg) 和化合物 1 (24.9 mg)。

1.3 结构鉴定

化合物 1 无色针晶, 高分辨质谱 TOF-MS 显示准分子离子峰为 m/z : 353.1392 [M-H]⁻, 推断分子式为 C₂₁H₂₂O₅, 与 CAA 的分子式相同。UV 数据 221.4 (4.46) nm 显示有苯环, 302.2 (3.62) nm、360.8 (2.20) nm 显示有羰基; IR 数据 2920 cm⁻¹、1450 cm⁻¹ 显示有苯环, 1678 cm⁻¹、1618 cm⁻¹ 显示有羰基。通过 NMR 数据 (表 1) 比对, 显示化合物 1 与 CAA 的大部分数据相一致, 但与 CAA 相比在 A 环上的单峰质子信号 (δ_{H} 6.57) 偏低场移动 0.07 ppm, 异戊烯基上亚甲基信号 (δ_{H} 6.57) 偏低场移动 0.1 ppm, 次甲基信号 (δ_{H} 4.82) 偏低场移动 0.34 ppm, 两个甲基信号 (δ_{H} 1.73) 和 (δ_{H} 1.63) 偏低场分别移动了 0.07 和 0.14 ppm; 同时, A 环上唯一的 1 个次甲基碳信号 (CAA 的 C-3, δ_{C} 98.1) 向低场偏移了 9.5 ppm (化合物 1 的 C-5, δ_{C} 107.6)。因此推测化合物 1 是 CAA 的同分异构体, 化合物 1 的异戊烯基是在 C-6 的对位而不是邻位。在 HMBC 谱中, δ_{H} 3.37 (H-1'') 与 δ_{C} 160.6 (C-2)、 δ_{C} 114.3 (C-3) 和 δ_{C} 161.6 (C-4) 相关; δ_{H} 5.16 (H-2'') 与 δ_{C} 114.3 (C-3) 相关, 证实化合物 1 的异戊烯基连接于 C-3 位 (图 1)。化合物 1 为新化合物, 命名为树豆酮酸 B。

化合物 1 的理化与波谱数据: 无色针晶 (丙酮), mp 184°C~185°C, UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 221.4 (4.46) nm, 302.2 (3.62) nm, 360.8 (2.20) nm; IR (KBr) ν_{max} 2920, 1678, 1618, 1450, 1277, 1111, 916, 746, 716 cm⁻¹。高分辨质谱 TOF-MS m/z : 353.1392 [M-H]⁻ (calcd. for 353.1389), NMR 数据见表 1。

化合物 2 白色针晶 (MeOH), mp 196°C~197°C; ESI-MS m/z (pos.): 183.1 [M+H]⁺, 204.9 [M+Na]⁺, 221.2 [M+K]⁺, (neg.): 181.3 [M-H]⁻; 确定分子量为 182; 结合 NMR 谱推测分子式为 C₉H₁₀O₄。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.93 (2H, s, H-3, H-5), 3.79 (3H, s, -OCH₃), 2.69 (3H, s, -COCH₃); ¹³C NMR

表 1 CAA 与化合物 1 的核磁数据(溶剂为 DMSO- d_6)Table 1 NMR data of CAA and compound 1 (in DMSO- d_6)

C/H	CAA ^[3]		1		
	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1		103.3		106.0, C	
2		162.1		160.6, C	
3	6.50 (s)	98.1		114.3, C	
4		163.5		161.6, C	
5		121.4	6.57 (s)	107.6, CH	C-1, 3, 6, 7
6		136.7		138.2, C	
7	4.66 (s)	41.1	4.68 (s)	46.7, CH ₂	C-8
8		196.6		197.4, C	
1'		137.1		136.9, C	
2', 6'	8.05 (d, 7.2 Hz)	127.7	8.01 (br s)	127.8, CH	C-8, 3', 4', 5'
3', 5'	7.57 (t, 7.2 Hz)	128.6	7.55 (t, 7.4 Hz)	128.8, CH	C-1'
4'	7.66 (t, 7.2 Hz)	133	7.64 (t, 7.4 Hz)	133.0, CH	C-3', 5'
1''	3.15 (s)	24.3	3.25 (d, 7.0 Hz)	21.6, CH ₂	C-2, 3, 4, 2''
2''	4.82 (m)	122.9	5.16 (t, 7.2 Hz)	122.3, CH	C-3, 1'', 4'', 5''
3''		130.8		130.7, C	
4''	1.66 (s)	17.6	1.73 (s)	17.7, CH ₃	C-2'', 3''
5''	1.49 (s)	25.3	1.63 (s)	25.6, CH ₃	C-2'', 3''
OME	3.83 (s)	56	3.82 (s)	56.2, CH ₃	C-5
-COOH	11.98 (s)	172.5	13.60 (s)	173.5, C	
2-OH	11.42 (s)		12.60 (s)		

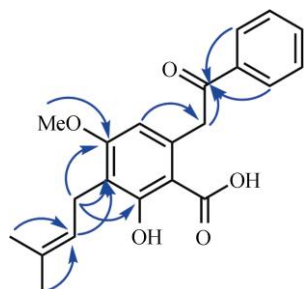


图 1 化合物 1 主要的 HMBC()相关

Fig. 1 Key HMBC() correlations of compound 1

(100 MHz, CDCl₃): δ 105.23 (C-1), 165.8 (C-2, C-6), 94.0 (C-3, C-5), 55.42 (-OCH₃), 203.4 (-CO-), 32.7 (-COCH₃)。与文献[8]的 1-(2,6-二羟基-4-甲氧基苯基)乙酮数据一致。

化合物 3 橙色粉末, 1H NMR (400 MHz, Aceton- d_6): δ 12.13 (1H, s, 2'-OH), 8.30 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H- β), 7.79 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H- α), 7.70 (2H, dd, $J = 7.5, 1.8$ Hz, H-2, H-6), 7.58 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-3, H-4, H-5), 6.03 (2H, s, H-3', H-5'), 3.81 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, Aceton- d_6): δ 136.5 (C-1), 129.2 (C-2, C-6), 129.8 (C-3, C-5), 129.5 (C-4), 127.3 (C- α), 142.8 (C- β), 193.4 (-CO-), 106.1 (C-1'), 163.9 (C-2', C-6'), 94.5 (C-3', C-5'), 168.9

(C-4'), 55.8 (3-OCH₃)。与文献[9]球松素查尔酮数据一致。

化合物 4 白色粉末, ESI-MS m/z (pos.): 333.1 [M + Na]⁺, 349.1 [M + K]⁺; (neg.): 309.2 [M - H]⁻; 分子量为 310.2; 结合 NMR 谱图推测分子式为 C₂₀H₂₂O₃。 1H NMR (400 MHz, Aceton- d_6): δ 8.02 (2H, m, H-2', H-6'), 7.62 (1H, m, H-4'), 7.51 (2H, dd, $J = 10.4, 4.7$ Hz, H-3', H-5'), 6.37 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 6.25 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-4), 4.98 (1H, m, H-2''), 4.27 (2H, s, H-7), 3.76 (3H, s, -OCH₃), 3.23 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1''), 1.58 (3H, s, H-4''), 1.56 (3H, s, H-5''); ^{13}C NMR (100 MHz, Aceton- d_6): δ 136.4 (C-1), 120.3 (C-2), 159.4 (C-3), 98.5 (C-4), 157.0 (C-5), 110.3 (C-6), 43.6 (C-7), 198.0 (C-8), 138.0 (C-1'), 129.0 (C-2', C-6'), 129.2 (C-3', C-5'), 133.7 (C-4'), 25.2 (C-1''), 124.8 (C-2''), 130.7 (C-3''), 17.8 (C-4''), 25.7 (C-5''), 55.8 (3-OCH₃)。与文献[10]报道的 cajanolone 数据一致。

2 结果和讨论

我们研究表明, 含有约 50% 树豆内酯 A (CLA) 和几乎等量球松素的混合物 (CLA 粗品), 经 0.65% KOH 含水乙醇回流反应, 在获得主产物 CAA[2]的

同时, 还得到了几种低含量的有机物, 鉴定为 1-(2,6-二羟基-4-甲氧基苯基)乙酮(2)、球松素查尔酮(3)、Cajanotone (4)和 1 个新化合物树豆酮酸 B (Cajanonic acid B) (1)。在皂化过程中产生的 CAA

的同分异构体 1, 推测其可能是异戊烯基重排所形成; 化合物 4 应为 CAA 脱羧形成(图 2)。此外, 在碱性和加热条件下, 二氢黄酮化合物球松素有可能转化成为球松素查尔酮 (3)。

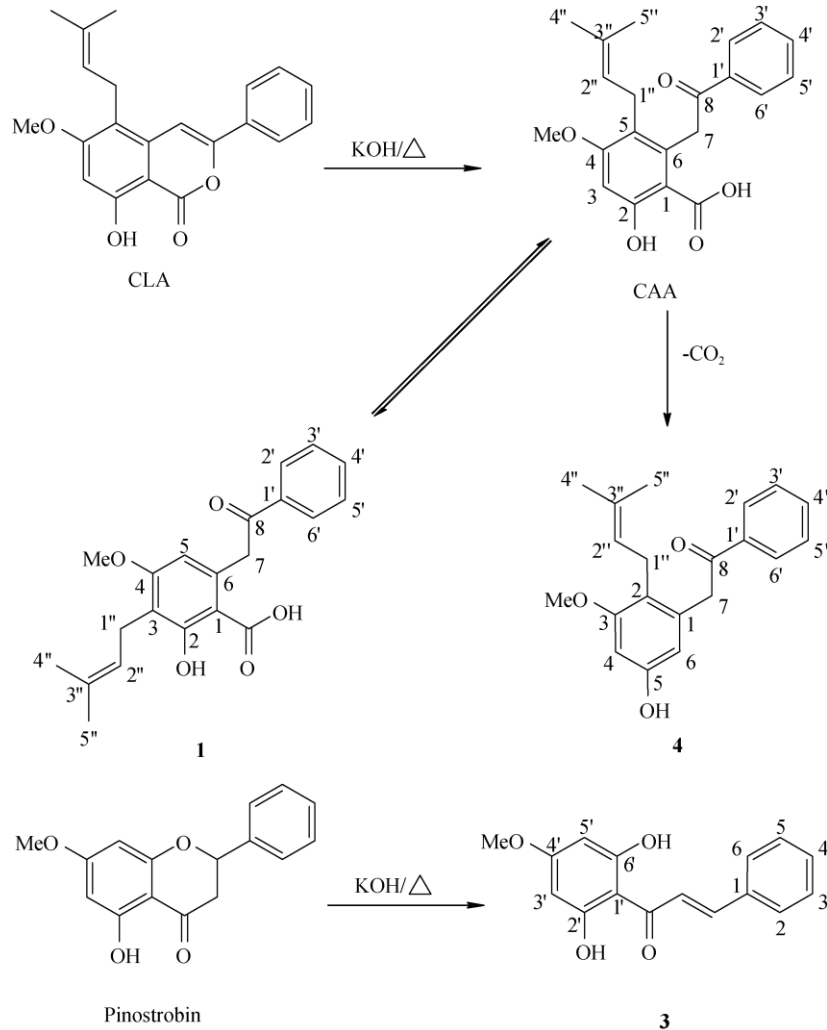


图 2 化学反应图

Fig. 2 Chemical reaction scheme

在几个相关化合物中, CLA是一个具有降血脂与改善骨质疏松症作用的天然产物^[11], 从化学角度分析, CLA在树豆叶中也可能是CAA的前体物质。化合物2又名4-O-甲基根皮乙酰苯(4-O-methylphloracetophenone), 可从欧洲李(*Prunus domestica*)^[8]或兴安杜鹃(*Rhododendron dauricum*)^[12]中分离得到, 具有一定抗真菌活性^[13]; 化合物3存在于树豆(*Cajanus cajan*)叶^[8]、山核桃(*Carya cathayensis*)叶^[14]以及树胡椒(*Piper aduncum*)中, 具有抗氧化^[14]、抗利什曼原虫^[15]活性; 而化合物4此前曾从树豆叶中

分离得到, 体外对肺癌、肝癌与乳腺癌等人类肿瘤细胞的增殖有一定抑制作用^[10]。树豆酮酸B是CAA的同分异构体, 其对胰岛素抵抗的影响以及对血糖、血脂是否具有调节作用尚不明确。本研究的结果为更加深入地研究开发树豆叶生物活性成分提供了新的实验依据。

参考文献

- [1] GRUNDY S M, BENJAMIN I J, BURKE G L, et al. Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professional from

- the American Heart Association [J]. *Circulation*, 1999, 100(10): 1134–1146. doi: 10.1161/01.CIR.100.10.1134.
- [2] KANEKO T, WANG P Y, WANG Y, et al. The long-term effect of low-carbohydrate/high-fat diet on the development of diabetes mellitus in spontaneously diabetic rats [J]. *Diabetes Metab*, 2000, 26(6): 459–464.
- [3] QIU S X, SHEN X L. A hypoglycemic and slimming stilbenoidal natural medicine: China, CN200810199012.6 [P]. 2011–11–09.
邱声祥, 沈小玲. 一种具有降血糖和减肥作用的蒽类天然药物: 中国, CN200810199012.6 [P]. 2011–11–09.
- [4] WANG L. Effect and mechanism of cajanonic acid A on regulating blood glucose and serum lipid [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2012.
王璐. 树豆酮酸 A 调节血糖血脂的作用和机理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [5] SHEN X L, WANG L, HU Y J, et al. Use of cajanonic acid A in drug preparation for treatment of hyperglycemia with hyperlipidemia: China, CN201210119665.5 [P]. 2014–04–02.
沈小玲, 王璐, 胡英杰, 等. 树豆酮酸 A 在制备糖尿病伴随症及高血脂症药物中的应用: 中国, CN201210119665.5 [P]. 2014–04–02.
- [6] WANG Y N, GE P, HU Y J, et al. A synthetic method for stilbenoidal compound cajanonic acid A: China, CN201410033051.4 [P]. 2014–01–23.
王亚农, 戈平, 胡英杰, 等. 一种蒽类化合物树豆酮酸 A 的合成方法: 中国, CN201410033051.4 [P]. 2014–01–23.
- [7] CHEN W Z, FAN L L, XIAO H T, et al. First total synthesis of natural products cajanolactone A and cajanonic acid A [J]. *Chin Chem Lett*, 2014, 25(5): 749–751. doi: 10.1016/j.ccl.2014.03.027.
- [8] NAGARAJAN G R, PARMAR V S. Phloracetophenone derivatives in *Prunus domestica* [J]. *Phytochemistry*, 1977, 16(5): 614–615. doi: 10.1016/0031-9422(77)80035-6.
- [9] COOKSEY C J, DAHIVA J S, GARRATT P J, et al. Two novel stilbene-2-carboxylic acid phytoalexins from *Cajanus cajan* [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(12): 2935–2938. doi: 10.1016/0031-9422(80)85072-2.
- [10] ZHANG N L, ZHU Y H, HUANG R M, et al. Two new stilbenoids from *Cajanus cajan* [J]. *Z Naturforsch B*, 2012, 67(12), 1314–1318. doi: 10.5560/ZNB.2012-0184.
- [11] SHEN X L, HU Y J, CAI J Z, et al. Use of cajalactone A in drug preparation for treatment of osteoporosis: China, CN201310264427.8 [P]. 2015–01–14.
沈小玲, 胡英杰, 蔡佳仲, 等. 树豆内酯 A 在制备治疗骨质疏松症药物中的应用: 中国, CN201310264427.8 [P]. 2015–01–14.
- [12] QIANG Y, ZHOU B S, GAO K. Chemical constituents of plants from the genus *Rhododendron* [J]. *Chem Biodivers*, 2011, 8(5): 792–815. doi: 10.1002/cbdv.201000046.
- [13] ANERAI M, HASEGAWA S, KANESHIMA H. Antifungal constituent from leaves of *Rhododendron dauricum* L. [J]. *Nat Med*, 1995, 49(2): 217.
- [14] XU M, SHEN Y, ZHANG K, et al. Antioxidant activity of total flavonoid aglycones and the main compound pinostrobin chalcone separated from leaves of *Carya cathayensis* [J]. *Chin J Exp Trad Med Formul*, 2013, 19(22): 204–208. doi: 10.11653/syfy2013220204.
徐敏, 沈勇, 张坤, 等. 山核桃叶总黄酮苷元及其主要单体成分球素查尔酮的抗氧化活性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(22): 204–208. doi: 10.11653/syfy2013220204.
- [15] TORRES-SANTOS E C, MOREIRA D L, KAPLAN M A, et al. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5): 1234–1241.