



The Hong Kong University of Science and Technology
Shenzhen Centre for Chinese Medicine R & D
Tel: 0755-86715683

角豆树果荚中天然小分子化合物角豆树素 A 和活性评价
研究



Project held by:

Center for Chinese Medicine R & D

The Hong Kong University of Science and Technology

香港科技大学中药研发中心

Jul.23, 2020





1 实验目的

以 LC-MS/MS 为导向对角豆树果荚中的天然小分子化学成分进行系统分离、波普解析和结构鉴别；对分离得到的新化合物进行体外活性评价，筛选出具有特定活性的新化合物。

2 材料与仪器

2.1 材料

药材：豆科长豆角属植物角豆树（拉丁学名：Ceratonia siliqua Linn.）干燥的果荚。角豆树果荚 2018 年 8 月采自欧洲，存放于香港科技大学深圳研究院中药研发中心。

2.2 仪器

AVANCE III 600 MHZ 超导核磁共振波谱仪（瑞士 Bruker 公司）；maXis impact 高分辨电喷雾四级杆-飞行时间质谱仪（美国 Bruker Daltonics 公司）；汉邦科技半制备液相（NP7005C 液相输液泵，NU3000C 紫外可变波长检测器，EasyChrom-1000 工作站，中国汉邦科技有限公司）；Waters 2695 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Nexus470 傅立叶红外光谱仪（美国热电尼高力公司）；UV-2401PC 紫外可见分光光度仪（日本岛津公司）；ZF-1 型三用紫外分析仪（江苏海门市其林贝耳仪器制造有限公司）；电热套；Adam SAB225i 半微量分析天平（Max 220 g, d = 0.01 mg, 英国 Adam 公司）；Merck Direct-Q 超纯水系统（德国 Merck Millipore 公司）；DLSB-5/20 低温冷却液循环泵（郑州长城科工贸有限公司）；旋转蒸发器（瑞士 BUCHI 公司）；DZF-6020 真空干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

2.3 试剂

石油醚（广东光华科技有限公司，Lot.No.20180905）、二氯甲烷（西陇科学股份有限公司，Lot.No.190411）、乙酸乙酯（天津市永大化学试剂有限公司，Lot.No.20170309）、乙醇（西陇科学股份有限公司，Lot.No.191109）、甲醇（西陇科学股份有限公司，Lot.No.191109）等均为分析纯；HPLC 级甲醇（德国 Merck 公司）；超纯水（Merck Direct-Q 超纯水系统）。



3 角豆树素分离纯化

称取角豆树果荚粗粉 20.0kg, 加入 7 倍重量份的 95%乙醇回流提取 2 次(每次 1.5h), 再用 7 倍重量份的 70%乙醇回流提取 1 次(1.5h), 合并后回收溶剂得到浸膏 12.4kg。将浸膏用 1-10 倍重量份的水分散后, 经大孔吸附树脂 D101 进行吸附, 用蒸馏水洗脱三个柱体积除去糖类等杂质, 再用 95%乙醇洗脱 3 个柱体积, 回收溶剂后得到非糖类小分子部位 462.7g。将得到的非糖类小分子部位用 1.0L50%甲醇分散, 依次使用石油醚、乙酸乙酯分别萃取 5 次, 回收溶剂后分别得到石油醚部位 28.4g、乙酸乙酯部位 139.4g 和水部位 290.2g。

称取乙酸乙酯部位 135.0g, 经硅胶(200~300 目)柱色谱分离, 采用石油醚(P)-乙酸乙酯(E)、二氯甲烷(C)-甲醇(M)两个洗脱系统, 得到 108 个流分, 通过 TLC 薄层检识, 合并成分相似流分, 得到 10 个流分(Fr.A~J)。流分 Fr.F(8.5g)经 ODS 柱色谱, 甲醇-水(15: 85→100: 0)梯度洗脱, 将得到流分经 TLC 检识后合并, 得到 6 个流分(Fr.F1~F6)。Fr.F4(4.2g)经 SephadexLH-20 柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇(1: 1)洗脱, 得到 5 个流分(Fr.F4a~F4e)。Fr.F4c(1.1g)经半制备液相(柱 I, 甲醇: 水=40: 60, 吸收波长 217nm)分离, 得到 3 个流分(Fr.F4c1~Fr.F4c3)。Fr.F4c2 经半制备液相(柱 II, 甲醇: 水=36: 64, 吸收波长 217nm)纯化, 得到角豆树素 A(23.8mg, tR=37.14min)。

4 角豆树素 A 结构解析

该化合物为黄色粉末, 负离子模式 HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 507.1180 [M - H]⁻, 推断该化合物的分子式 C₂₃H₂₄O₁₃, 计算不饱和度为 12。红外数据显示(图 1), 分子结构中含有羟基(3378.33 cm⁻¹)、芳香环(1603.89, 1515.90 cm⁻¹)和酯键(1699.52, 1214.57 cm⁻¹)等官能团。在 ¹H NMR 中(图 2), 观察到一组反式烯烃质子信号[δ H 7.62 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 6.39 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8)], 一组苯环 ABX 系统信号[δ H 7.18 (1H, s, H-2), 7.06 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5)], 一组 1,3,4,5-取代苯环氢信号[δ H 7.14 (2H, s, H-2', 6')], 一个甲氧基信号[δ H 3.88 (3H, s, OCH₃-3)], 一组葡萄糖残基氢信号[δ H 5.68 (1H, d, J = 5.4 Hz, H-1''), 4.52 (1H, d, J = 11.4 Hz, H-6 α ''), 4.31 (1H, m, H-6 β ''), 3.70 (1H, m, H-5''), 3.51 (2H, m, H-2'', 3''), 3.46 (1H, m, H-4'')]



在 ^{13}C NMR 中 (图 3) 观察到 23 个碳信号, 包括 2 个酯羰基碳信号 (δC 169.1, 166.9), 14 个芳香碳或烯碳信号 (δC 150.6, 149.3, 147.2, 146.5 $\times 2$, 140.4, 127.7, 124.2, 120.6, 116.4, 115.2, 111.6, 110.6 $\times 2$), 1 个甲氧基碳信号 (δC 56.4), 1 组葡萄糖残基碳信号 (δC 95.9, 78.0, 76.3, 74.1, 71.3, 64.4)。综合以上分析及文献对比, 推断该化合物由 1 个葡萄糖残基、1 个阿魏酸和 1 个没食子酸结构单元组合而成。

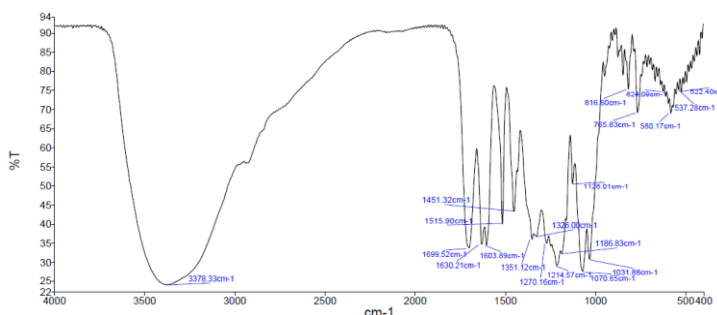


图 1 角豆树素 A 的 IR 谱图

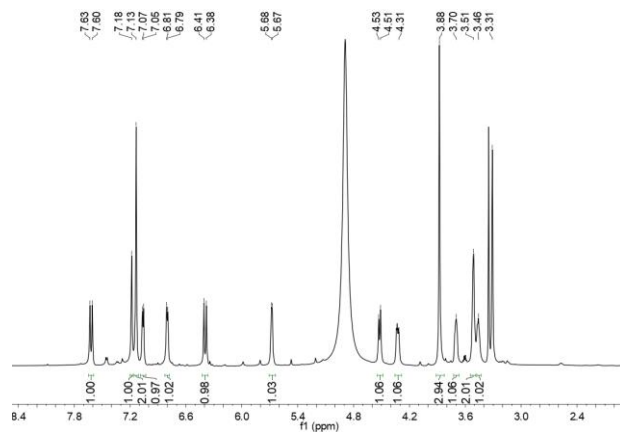


图 2 角豆树素 A 的 ^1H NMR 谱图 (CD_3OD , 600 MHz)

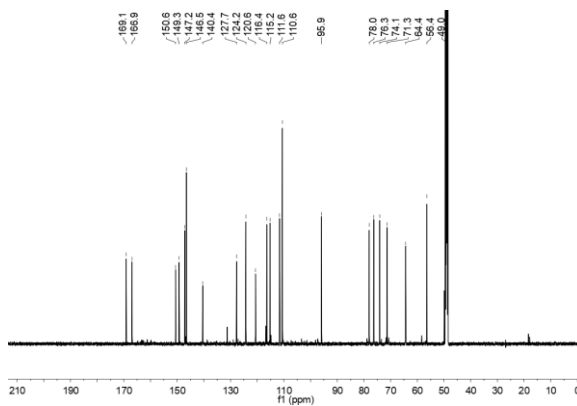


图 3 角豆树素 A 的 ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)



在 HMBC 谱中 (图 4-8), 观察到 H-2 和 C-4/C-6, H-5 和 C-1/C-3, H-6 和 C-4, H-7 和 C-2/C-6/C-9, H-8 和 C-1, OCH₃-3 和 C-3 有远程相关信号, 证明该化合物的结构中存在阿魏酸结构单元的推断; 此外, H-2', 6' 和 C-4' /C-3' /C-5' /C-7' 的远程相关信号也证明该化合物的结构中存在没食子酸结构单元的推断。在 HMBC 谱中还观察到 H-6'' 和 C-9 有远程相关信号, 表明阿魏酸通过酯键与葡萄糖残基的 C-6'' 相连接, 而 H-1'' 和 C-7' 的远程相关信号表明没食子酸通过酯键与葡萄糖残基的端基碳相连接。葡萄糖端基质子的偶合常数为 5.4 Hz, 表明葡萄糖的端基相对构型为 α 型。因此, 鉴定该化合物的结构如图 9 所示, 命名角豆树素 A。

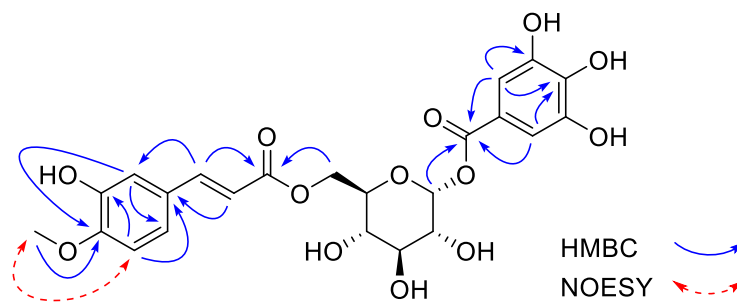


图 4 角豆树素 A 主要 HMBC 和 NOESY 相关图

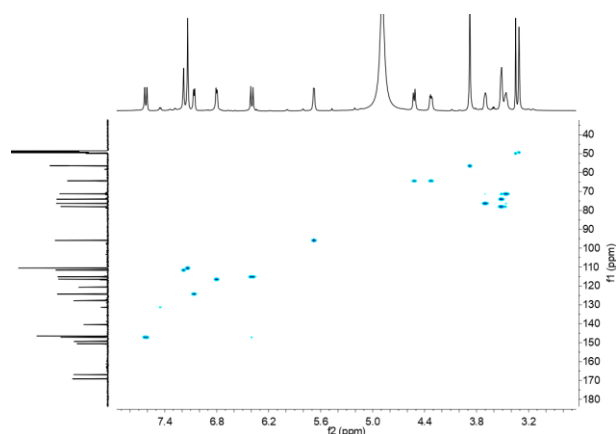


图 5 角豆树素 A 的 HSQC 谱图

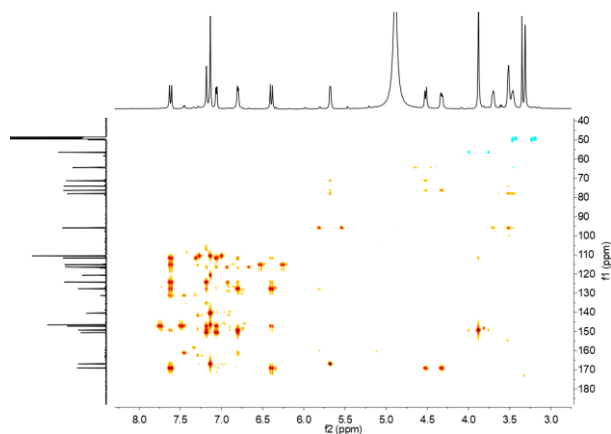


图 6 角豆树素 A 的 HMBC 谱图

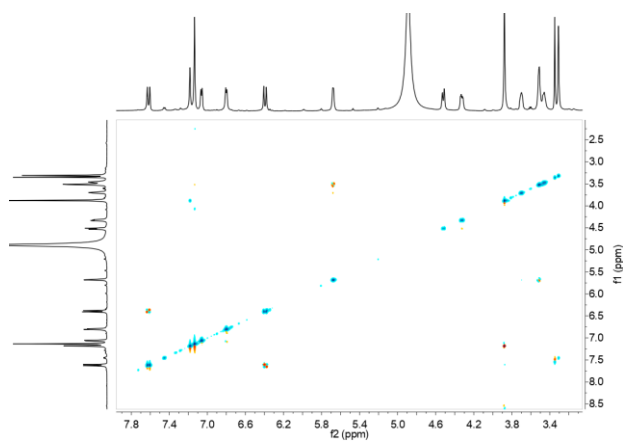


图 7 角豆树素 A 的 NOESY 谱图

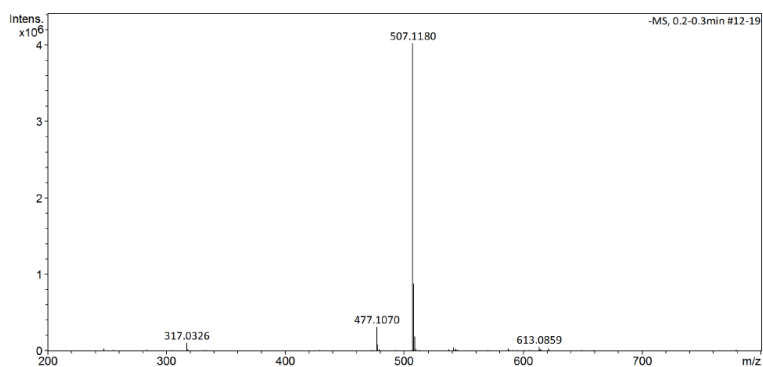


图 8 角豆树素 A 高分辨质谱图

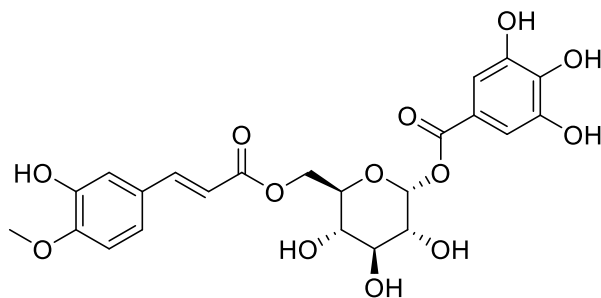


图9 角豆树素 A 的结构图

5 角豆树素 A 对 NF-κB 炎症因子影响的测试

对 NF-κB 炎症因子影响的实验包括以下步骤:

(1) 培养 RAW264.7 细胞: 在 37℃, 5%CO² 及饱和湿度条件下, 将细胞置于 DMEM 培养基 (含 10% 热灭活的胎牛血清, 100U/mL 青霉素及 100μm/mL 链霉素)。

(2) 将 RAW264.7 细胞以 5×10⁴/mL 接种于 24 孔板中, 待细胞培养至约 60% 汇合后, 使用 JetPrime 转染试剂盒进行 NF-κB 质粒转染, 以培养基为空白对照, 地塞米松 (20μM) 为阳性对照; 样品为不同浓度的角豆树素 A。对照和样品分别加入 NF-κB 质粒转染的 RAW264.7 细胞中, 进行预处理 3 小时, 再加入脂多糖 (1μg/mL) 诱导炎症发生。每组 3 个复孔培养, 实验重复 3 次。

(3) 24 小时后提取细胞蛋白, 用荧光酶报告基因检测法对比荧光蛋白及总蛋白的比例。

结果如图 10 示, 不同浓度角豆树素 A 均具有抑制 NF-κB 炎症因子的作用。当角豆树素 A 在 10μM 时, 抑制 NF-κB 炎症因子的活性最好。

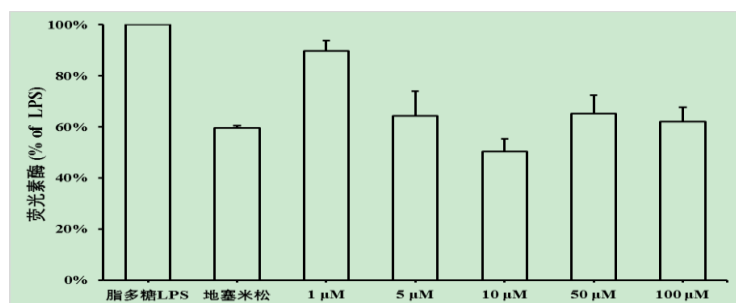


图 10 不同浓度角豆树素 A 对由脂多糖 LPS 诱导的炎症因子 NF-κB 抑制活性

6 角豆树素 A 对胶原蛋白因子 COL1A1 基因表达影响的测试

角豆树素 A 对胶原蛋白因子 COL1A1 基因表达影响的实验包括以下步骤:



(1) 培养 HaCaT (细胞人永生化表皮细胞): 在 37°C, 5% CO² 及饱和湿度条件下, 将细胞置于 DMEM 培养基 (含 10% 热灭活的胎牛血清, 100 U/mL 青霉素及 100 μm/mL 链霉素)。

(2) 将 HaCaT 细胞 (人永生化表皮细胞) 制成细胞浓度为 5×10⁵ 个/mL 的悬浮液并接种在 6 孔板中。放入 CO₂ 培养箱 (5% CO²、37°C) 中培养 24 小时, 然后分别加入不同浓度的角豆树素 A。继续培养 24 小时后, 收集细胞提取 mRNA。

(3) 提取 RNA: 24 小时后, 先把培养液抽走, 再利用 RNAzol RNA 抽提试剂, 把细胞的 RNA 提取出, 之后用 Nanodrop 量度 RNA 的浓度。然后, 再利用 Oligo (dT)、dNTP、5X first strand buffer、重组核糖核酸酶抑制剂 (RNaseOUT inhibitor)、二硫苏糖醇 (DTT) 及鼠白血病逆转录酶 (M-MLV), 把 RNA 反转录为 cDNA, 以进行实时聚合酶链锁反应 (rt-PCR, Real-time Polymerase Chain Reaction)。

(4) 实时聚合酶链锁反应: 利用荧光染剂侦测, 从而量化样本中目标基因 (COL1A1 基因) 数量的技术, 而此技术容许技术人员使用不同容量的孔板, 以同一时间侦测多个反应。在每个反应中, 加入 cDNA 样本、上游引物、下游引物及 SybrGreen 荧光染剂, 引物序列如下: COL1A1 F-引物 5' -TCT GCG ACA ACG GCA AGG TG-3' , COL1A1R-引物 5' -GAC GCC GGT GGT TTC TTG GT-3' , 再利用 LightCycler®480 侦测细胞在不同药物下, 细胞基因表达的变化。

结果见图 11 不同浓度的角豆树素 A 可以促进 COL1A1 基因表达, 其中当角豆树素 A 在 10μM 时, 促进胶原蛋白 COL1A1 基因表达活性最好。

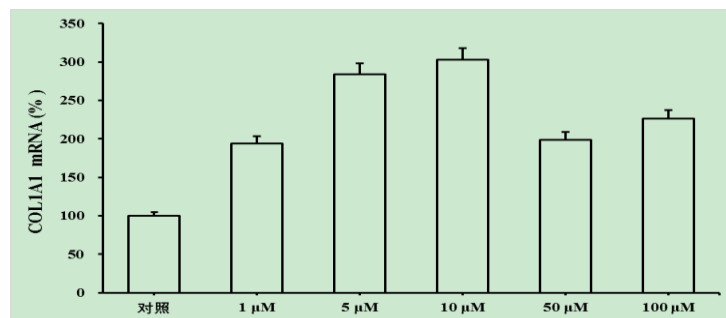


图 11 不同浓度角豆树素 A 对 COL1A1 基因表达的影响