

广东桑根心材的化学成分研究

何细新^{1*}, 巢晓娟², 杨璐¹, 张翠仙¹, 皮荣标², 曾海祥¹, 李国西¹, 徐玉娟¹, 林燕燕¹

¹广州中医药大学中药学院; ²中山大学药学院, 广州 510006

摘要:采用多种层析方法从广东桑根心材的醇提取物中分离了 8 个已知化合物, 经波谱分析手段结合文献分析方法将其分别鉴定为: 桑辛素 C(1), 桑辛素 M(2), 二氢桑色素(3), 氧化白藜芦醇(4), 2,4-二羟基苯甲醛(5), 伞形花内酯(6), 胡萝卜苷(7)和 3-羟基-2-哌啶酮(8)。化合物 1, 3~6 和 8 首次从广东桑 *Morus atropurpurea* 中分离, 化合物 8 亦首次从桑属植物中分离。综合采用 DPPH, MTT 法测试了多酚类化合物 1~4 的抗氧化和神经保护作用, 结果表明化合物 1~4 均能清除 DPPH 自由基, 抑制 L-谷氨酸钠诱导海马神经元细胞 HT22 毒性, 具有抗氧化和神经保护作用。在 20 μ M 浓度下, 化合物 2 的活性显著。

关键词:广东桑; 心材; 化学成分; 神经保护; 抗氧化

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

The Research on Chemical Ingredients of the Heartwood of Root of *Morus atropurpurea*

HE Xi-xin^{1*}, CHAO Xiao-juan², YANG Lu¹, ZHANG Cui-xian¹,
PI Rong-biao², ZENG Hai-xiang¹, LI Guo-xi¹, XU Yu-juan¹, LIN Yan-yan¹

¹College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine;

²School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Eight known compounds, including Moracin C(1), Moracin M(2), Dihydromorin(3), Oxyresveratrol(4), 2,4-Dihydroxybenzaldehyde(5), 7-Hydroxycoumarin(6), Daucosterol(7) and 3-Hydroxy-2-piperidinone(8) have been isolated from EtOH extract of heartwood of root of *Morus atropurpurea*. Compounds 1, 3-6 and 8 were isolated from *Morus atropurpurea* for the first time. Compound 8 was also isolated from *Morus* plant for the first time. Their antioxidant and neuroprotective activity were test by DPPH, MTT methods. Polyphenolic compounds 1-4 exhibited antioxidative and neuroprotective activities. Compound 2 showed significant neuroprotective activity at 20 μ M.

Key words: *Morus atropurpurea*; heartwood; chemical ingredients; neuroprotection; antioxidation

桑属植物具有广泛的药用价值。如桑(*Morus abla* L.)的枝、叶、果、根皮均可入药, 其中桑叶具有疏散风热, 清肺润燥, 清肝明目功效; 桑椹能滋阴补血, 生津润燥; 桑枝祛风湿, 利关节; 桑白皮则泻肺平喘, 利水消肿^[1]。化学成分研究显示, 桑属植物富含黄酮类化合物, 苯骈呋喃衍生物, 生物碱, 香豆素, 甾体, 挥发油等多种成分^[2], 具有降血压、抑菌、消炎镇痛, 抗癌, 抗病毒等多种药理作用^[3]。

广东桑 *Morus atropurpurea* 主要在广东、广西地区广泛栽培。近年来, 广东桑的不同部位, 如种子^[4], 桑枝^[5], 根皮^[6]的化学成分已有报道。本文对广东桑根心材部分的化学成分进行研究, 从中分

离得到 8 个已知化合物, 并对其多酚类化合物进行了抗氧化和神经保护作用研究, 为广东桑的资源利用提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Brucker 400 MHz 型核磁共振仪; Thermo LCQ DECA XP 质谱分析仪; 层析硅胶(200~300目), 青岛海洋化工厂产; Sephadex LH-20, Merck 公司产品; D101 型阳离子交换树脂, 购置于南开大学化工厂; 其他所用溶剂均为分析纯; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH), 美国 Sigma 公司; 酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; 分光光度计, 美国 Varian 公司。

1.2 生物材料

广东桑根于2010年8月采自广东湛江,种属由广州中医药大学药用植物教研室鉴定。样品编号为MA2010-ZJ。储藏于广州中医药大学中药学院中药化学实验室,研究所用材料为其心材部分。

1.3 提取与分离

将广东桑根的心材(干重1.3 kg)粉碎后用95%乙醇回流提取3次,减压浓缩提取液,得棕褐色浓缩物,将浓缩物用200毫升水悬浮,然后分别以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取3次,乙酸乙酯萃取液浓缩后得浸膏14 g。将此浸膏经硅胶(200~300目)层析分离,以石油醚/乙酸乙酯洗脱。石油醚/乙酸乙酯(体积比6:4)洗脱部分经Sephadex LH-20,甲醇洗脱得化合物**1**(15 mg),**2**(10 mg),**3**(15 mg),**4**(100 mg);石油醚/乙酸乙酯(体积比4:6)洗脱部分,经Sephadex LH-20进一步分离,甲醇洗脱得化合物**5**(5 mg),**6**(5 mg);乙酸乙酯洗脱部分,经甲醇重结晶得化合物**7**(10 mg)。正丁醇部分约8 g,经D101型阳离子交换树脂层析,先以水洗2个保留体积,然后0.2M氨水洗脱。氨水洗脱部分,依次经Sephadex LH-20(甲醇洗脱),硅胶柱层析(200~300目),从甲醇:氯仿(体积比4:6)流份中得化合物**8**(60 mg)。

2 结果与分析

2.1 结构解析

化合物 1 白色固体,ESI-MS m/z : 311 $[M + H]^+$; 1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ 7.32(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 6.88(1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-7), 6.83(1H, d, $J = 0.8$ Hz, H-3), 6.78(2H, s, H-2', 6'), 6.72(1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-5), 5.37-5.05(1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8'), 3.33(2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7'), 1.78(3H, s, -CH₃), 1.67(3H, s, -CH₃); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ 157.5(C-3', 5'), 157.1(C-6), 156.6(C-8), 156.5(C-2), 131.3(C-9'), 130.2(C-1'), 124.3(C-8'), 123.2(C-9), 121.8(C-4), 116.9(C-4'), 113.1(C-5), 103.8(C-2', 6'), 101.3(C-3), 98.4(C-7), 26.0(-CH₃), 23.3(C-7'), 17.9(-CH₃)。以上数据与文献^[7]报道的Moracin C的数据一致,将化合物**1**鉴定为Moracin C。

化合物 2 淡灰色固体,ESI-MS m/z : 243 $[M + H]^+$; 1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ 7.34(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 6.91(1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.90

(1H, s, H-3), 6.78(2H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2', 6'), 6.74(1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-5), 6.27(1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-4'); ^{13}C NMR(CD_3OD , 100 MHz) δ 160.5(C-3', 5'), 157.7(C-7a), 157.3(C-6), 156.6(C-2), 134.3(C-1'), 123.5(C-3a), 122.5(C-4), 113.7(C-5), 104.5(C-2', 6'), 104.1(C-4'), 102.7(C-3), 98.9(C-7)。以上数据与文献^[8]报道的Moracin M的数据一致,鉴定化合物**2**为Moracin M。

化合物 3 无色针状结晶,ESI-MS: m/z 305 $[M + H]^+$; 1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ 7.24(1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'), 6.42-6.34(2H, m, H-3', 5'), 5.94(1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.90(1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.41(1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-2), 4.79(1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ 199.02(C-4), 168.68(C-5), 165.42(C-9), 165.10(C-7), 160.27(C-4'), 158.70(C-2'), 130.97(C-6'), 115.72(C-1'), 108.08(C-5'), 103.90(C-3'), 102.06(C-10), 97.30(C-8), 96.37(C-6), 80.17(C-2), 72.68(C-3)。以上数据与文献^[9]报道的二氢桑色素的数据一致,将化合物**3**定为二氢桑色素。

化合物 4 淡黄色结晶,ESI-MS: m/z 245 $[M + H]^+$; 1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ 7.33(1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-6), 7.27(1H, d, $J = 16.5$ Hz, H- α), 6.82(1H, d, $J = 16.4$ Hz, H- β), 6.46(2H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2', 6'), 6.34-6.31(2H, m, H-3, 5), 6.15(1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-4); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ 158.2(C-3', 5'), 157.8(C-2), 155.9(C-4), 140.77(C-1'), 127.0(C- α), 125.0(C- β), 123.0(C-6), 116.0(C-1), 106.9(C-5), 104.2(C-2, 6), 102.0(C-3), 100.8(C-4')。以上数据与文献^[10]报道的氧化白藜芦醇的数据一致,鉴定化合物**4**为氧化白藜芦醇。

化合物 5 淡黄色针状结晶,ESI-MS m/z : 163 $[M + H]^+$; 1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ 7.86(1H, d, $J = 9.4$ Hz), 7.47(1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.81(1H, dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz), 6.73(1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.20(1H, d, $J = 9.4$ Hz); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ : 163.7(C-2), 163.1(C-9), 157.3(C-7), 146.0(C-4), 130.7(C-5), 114.5(C-3), 113.2(C-10), 112.4(C-6), 103.4(C-8)。以上数据与文献^[11]报道的伞形花内酯的数据一致,鉴定化合物**5**为伞形花内酯。

化合物 6 灰白色固体,空气中长期放置变黄

色粉末结晶。ESI-MS m/z : 139 $[M + H]^+$; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 9.72 (1H, s, CHO), 7.51 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-6), 6.46 (1H, dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, H-5), 6.29 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3)。以上数据与文献^[12]基本一致, 鉴定该化合物为 2,4-二羟基苯甲醛。

化合物 7 白色粉末, TLC 分析与胡萝卜苷标准品 R_f 值一致, 与胡萝卜苷混合熔点不下降, 鉴定该化合物为胡萝卜苷^[13]。

化合物 8 无色油状物, ESI-MS m/z : 116 $[M + H]^+$; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4.03 (1H, dd, $J = 8.5, 6.3$ Hz, H-3), 3.41 (1H, dt, $J = 11.5, 6.9$ Hz, H-4), 3.28 (1H, dt, $J = 11.4, 7.3$ Hz, H-4), 2.32 (1H, td, $J = 15.7, 7.4$ Hz, H-6), 2.13 (1H, td, $J = 13.3, 6.4$ Hz, H-6), 2.06-1.94 (2H, m, H-5)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 174.14 (C-2), 62.47 (C-3), 46.85 (C-6), 30.26 (C-4), 24.99 (C-5)。以上数据与文献一致^[14], 鉴定化合物为 3-羟基-2-哌啶酮 (3-Hydroxy-2-piperidinone)。该化合物首次从桑属植物中得到。

2.2 DPPH 自由基清除率测试

利用 DPPH 溶液的特征紫红色团的吸收峰, 以分光光度法测定加抗氧化剂后, 在 517 nm 处吸光度减少值, 表示其对有机自由基消除能力^[15]。在反应管中加入 1 mL 0.2 mM DPPH 的甲醇溶液, 再加入 1 mL 的化合物 1~4 和白藜芦醇终浓度为 (2.0, 4.0, 8.0, 16.0 和 32.0 μM), 混合均匀, 室温避光反应 60 min 后在 517 nm 处读取吸光度。设 1 mL DPPH + 1 mL 化合物溶液为实验组, 同时以 1 mL DPPH + 1 mL 甲醇混合后的吸光度为对照组。计算清除率 (%) = $[(\text{对照组 } A_{517} - \text{实验组 } A_{517}) / \text{对照组 } A_{517}] \times 100\%$ 。计算使 DPPH 溶液吸光度降低 50% 的化合物浓度 (IC_{50})。将 IC_{50} 定义为清除 50% DPPH 有机自由基的化合物浓度。结果见表 1。由结果显示, 化合物 1~4 都具有自由基清除能力。其中化合物 1 和 4 对 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 低于白藜芦醇的 IC_{50} , 提示它们的清除自由基能力强于白藜芦醇。

表 1 化合物抗氧化活性 (IC_{50} , μM)

Table 1 The antioxidant activity of compounds (IC_{50} , μM)

化合物 Compound	清除 DPPH 自由基活性 Removal of DPPH free radical activity (IC_{50} , μM)
1	20.32

2	45.74
3	63.91
4	18.30
白藜芦醇 (Resveratrol)	40.12

2.3 HT22 神经元细胞保护活性测试

在 96 孔板中种入 HT22 细胞 (每孔 1×10^4 个), 然后加入空白和设定浓度的化合物预处理 30 min, 再加入空白和 L-谷氨酸钠 (5 mM) 孵化 24 h。细胞存活率采用 MTT 法测试, 活性结果见图 1。由结果显示, 化合物 1, 2, 3, 4 在 5 μM 和 20 μM 两个浓度下均有一定的神经保护作用。未加 L-谷氨酸钠情况下, 20 μM 化合物 1, 2, 3, 4 降低 HT22 细胞活力。L-谷氨酸钠能够造成 HT22 细胞死亡, 化合物 1~4 的加入均能减少 L-谷氨酸钠诱导的细胞毒性, 增加存活率。其中化合物 2 在高浓度 (20 μM) 下活性显著。

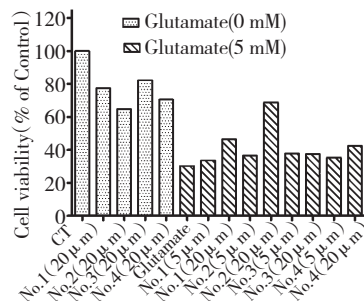


图 1 化合物 1, 2, 3, 4 对 L-谷氨酸钠诱导 HT22 细胞毒性的影响

Fig. 1 Effects of compound 1, 2, 3, 4 on L-Glutamate induced cytotoxicity. Cells were grown on 96-well plates (1×10^4 cells per well) and pretreated with or without compounds as indicated concentrations for 30 min, and then incubated with or without L-Glutamate (5 mM) for 24 h. Cell viability was measured using the MTT assay.

3 结论与讨论

本研究从广东桑根的心材中分离了 8 个已知化合物, 经分析将其分别鉴定为桑辛素 C (1), 桑辛素 M (2), 二氢桑色素 (3), 氧化白藜芦醇 (4), 2,4-二羟基苯甲醛 (5), 伞形花内酯 (6), 胡萝卜苷 (7) 和 3-羟基-2-哌啶酮 (8)。其中化合物 1, 3~6 和 8 为首次从广东桑 *Morus atropurpurea* 中分离得到。化合物 8 亦首次从桑属植物中分离到。活性研究显示

多酚类化合物 **1**~**4** 均具有清除 DPPH 自由基,其中化合物 **1** 和 **4** 的清除能力高于白藜芦醇;均能抑制 L-谷氨酸钠诱导海马神经元细胞 HT22 毒性,具有神经保护,其中化合物 **2** 在 20 μM 浓度下活性显著。

桑属植物具有多种药理活性,包括对心血管系统有降血压作用、提取物在体外有抑菌作用、消炎镇痛作用,还有抗癌抗病毒等药理活性作用。此外,有研究报道^[16] 桑色素可以诱导肿瘤细胞在 S 期中阻滞,从而抑制细胞增殖。本研究采用的永生系小鼠海马神经细胞 HT22 是一种可增殖的细胞,化合物 **1**~**4** 处理 24 h 后,HT22 细胞的活力有所降低,可能是由于化合物对细胞产生抑制增殖作用,而不是毒性作用。其抑制细胞增殖的作用机制有待进一步研究。另外,有报道桑色素具有神经保护作用^[17],手术前 3 d 给予桑色素(4 mg/kg)可以减少脑缺血再灌注大鼠模型的梗死面积,减少炎性细胞浸润,促进神经功能恢复。本研究发现从广东桑根的心材中分离得到的化合物 **1**、**2**、**3** 和 **4** 均可清除自由基,减少由氧化应激引起的神经细胞损伤,这对于广东桑提取物作为抗氧化剂和神经保护剂,应用于神经系统疾病提供了一定的实验依据。但仅是体外实验研究,尚有待更进一步的开展动物水平实验。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I.
- 2 Li QH(黎琼红), Zhang GG(张国刚), Dong SH(董淑华). The advancement in the chemical constituents and pharmacological activity study of *Morus*. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20: 386-389.
- 3 Xiao NS(肖年生), Gu GY(顾关云), Jiang Y(蒋昱). Advances in studies on pharmacological effects of plants in *Morus L.*. *Drugs & Clinic* (现代药物与临床), 2012, 27: 70-74.
- 4 Ya J(轧霁), Zhang XQ(张晓琦), Ye WC(叶文才), et al. Chemical constituents from the seeds of *Morus atropurpurea*. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2006, 37: 301-303.
- 5 Xu YL(许延兰), Li XE(李续娥), Zou YX(邹宇晓), et al. Studies on chemical constituents from twigs of *Morus atropurpurea*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008,

- 33: 2499-2502.
- 6 Wu DL(吴东玲), Zhang XQ(张晓琦), Huang XJ(黄晓君), et al. Chemical constituents from root barks of *Morus atropurpurea*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 1978-1982.
- 7 Takasugi M, Nagao S, Ueno S, et al. Moracin C and D, new phytoalexins from diseased mulberry. *Chemistry Letters*, 1978, 7: 1239-1240.
- 8 Jing Y(景莹), Zhang XQ(张晓琦), Han LW(韩伟立), et al. Chemical constituents from the leaves of *Morus mongolica*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 181-184.
- 9 Zheng ZP, Cheng KW, To JT, et al. Isolation of tyrosinase inhibitors from *Artocarpus heterophyllus* and use of its extract as antibrowning agent. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52: 1530-1538.
- 10 Dong ZY(佟志远), Yan XP(颜新培), Li SX(李顺祥), et al. Isolation and identification of oxyresveratrol in mulberry branch. *Science of Sericulture* (蚕业科学), 2011, 37: 948-951.
- 11 Jiang WW(姜薇薇), Zhang XQ(张晓琦), Li Q(李茜), et al. Chemical constituents of the root of *Ficus stenophylla*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 588-590.
- 12 Zhang DW(张德武), Dai SJ(戴胜军), Li GH(李贵海), et al. Chemical constituents in cane of *Pueraria lobata*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 649-651.
- 13 Li ZC(李兆春), Chen Z(陈重), Li XR(李笑然), et al. Chemical constituents in roots and stems of *Physalis alkekengi* var. *franchetii*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43: 1910-1912.
- 14 Alam N, Choi IS, Song KS, et al. A new alkaloid from two coccinellid beetles *Harmonia axyridis* and *Aiolocaria hexaspilota*. *Bull Korean Chem Soc*, 2002, 23: 497-499.
- 15 Larrauri JA, Sánchez-Moreno C, Rupérez P, et al. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 1603-1606.
- 16 Zhi TD(植天道), Huang QH(黄齐慧). The research development on the bioactivities of morin. *Chin Med Modern Distance Edu China* (中国中医药现代远程教育), 2009, 7: 112-115.
- 17 Wang Y(王莹), Ding L(丁利), Li WY(李文媛), et al. Effects of morin on expression of poly adenosine diphosphate ribose polymerase and nuclear factor- κB in rats undergone cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Anhui Tradit Chin Med Colle* (安徽中医学院学报), 2012, 31: 43-46.