

• 化学 •

大叶茜草中环肽类成分的研究

邝彬^{1,2}, 范君婷¹, 赵思蒙^{1,2}, 谭宁华^{1*}

(1. 中国科学院 昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201;
2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

【摘要】 目的: 对大叶茜草 *Rubia schumanniana* 根茎中环肽类化合物进行分离和鉴定。方法: 大叶茜草根茎的 70% 甲醇回流提取物经硅胶、RP-18、Sephadex LH-20 和 HPLC 等色谱技术分离纯化, 根据波谱数据鉴定化合物的结构。结果: 分离得到 9 个环肽类化合物, 分别鉴定为 RA-VII(1)、RA-V(2)、RA-XII(3)、rubi-yunnanin C(4)、RA-X(5)、RY-II(6)、RA-I(7)、RA-XIII(8)、RA-XIII-OMe(9)。结论: 9 个环肽化合物均为首次从大叶茜草中分离得到。

【关键词】 大叶茜草; 环肽

大叶茜草 *Rubia schumanniana* Pritzel 又名川黔茜草、光茎茜草, 为草本; 生于海拔 1 300 ~ 3 000 米处的山谷、山坡、路边的林中或灌丛。云南等地将该植物的根茎作茜草 *R. cordifolia* 入药, 用于活血化瘀及妇科血崩、闭经等症。研究表明茜草化学成分主要包括环肽、蒽醌和三萜等^[1], 其中茜草科类型环肽(RAs) 因其新颖的结构和显著的体内外抗肿瘤活性而备受关注^[2-3]。本课题组前期对小红参 *R. yunnanensis* 的化学成分^[4-6] 及环肽构效^[7] 做了深入研究, 阐明了 RA-V 抑制血管生成的机制^[8], 并发表了茜草科类型环肽综述^[9]。大叶茜草化学成分的研究报道极少, 只有刘永澹^[10-11] 等从中分得大叶茜草素(rubi-maillin) 等 8 个非环肽类化合物。为深入开发利用该药材, 本研究对大叶茜草根茎的环肽化合物进行研究, 利用各种色谱方法从中分离了 9 个环肽化合物, 分别鉴定为 RA-VII(1)、RA-V(2)、RA-XII(3)、rubi-yunnanin C(4)、RA-X(5)、RY-II(6)、RA-I(7)、RA-XIII(8)、RA-XIII-OMe(9)。9 个环肽化合物均为首次从该植物中分离得到。

1 仪器材料

Bruker DRX-500 型核磁共振波谱仪; API QSTAR Pulsar 质谱仪; VG Autospec-3000 质谱仪; Agilent 1100 高效液相色谱仪, Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(9.4 mm × 250 mm, Agilent); 柱色谱硅胶(200 ~ 300 目), 硅胶 H 和薄层色谱硅胶板均为青岛裕民源硅胶试剂厂产品; 反相材料 Lichroprep RP-18(40 ~ 63 μm) 为默克公司产品; Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司产品; 所用试剂均为化学纯或分析纯。

大叶茜草根茎(50 kg) 2009 年 8 月购于云南省昆明市菊花村药材市场绿生药业有限公司, 经中国科学院昆明植物研究所标本馆李锡文研究员鉴定为茜草科茜草属植物大叶茜草 *R. schumanniana*。

2 提取与分离

干燥的大叶茜草根茎 50 kg 粉碎后, 用 40 L 70% 工业甲醇回流提取 3 次, 减压浓缩后, 加温水混悬, 依次用乙酸乙酯和正丁醇各萃取 3 次, 减压浓缩干燥得乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物。将乙酸乙酯提取物(3.7 kg) 经过硅胶柱色谱(氯仿-甲醇, 100:0 95:5 9:1 8:2 7:3 0:100) 梯度洗脱, 合并含环肽部位得到 3 个组分。组分 1 再进行硅胶柱色谱(石油醚-丙酮 50:1 ~ 0:100) 梯度洗脱, 所得含环肽部位再经过反相 RP-18 柱色谱处理(20% ~ 100% 甲醇) 得到化合物 1(200 mg)、2(1.1 g)、4(17 mg); 对组分 2 进行硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 60:1 ~ 10:1) 洗脱得到化合物 7(57 mg), 剩余含环肽部位用高效液相(37% 乙

【稿件编号】 20120209005

【基金项目】 国家自然科学基金项目(91013002、30725048); 国家自然科学基金-云南联合基金项目(U1032602); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09307-002-02); 国家重点基础研究发展计划(937) 项目(2009CB522300); 中国科学院项目(KSCX2-EW-R-15)

【通信作者】 * 谭宁华, 研究员, 主要从事植物环肽化学与化学生物学研究, Tel: (0871) 5223800, E-mail: nhtan@mail.kib.ac.cn

【作者简介】 邝彬, 硕士研究生, E-mail: kuangb2@126.com

腈) 纯化得到化合物 5(26 mg) 和 6(7 mg); 组分 3 依次进行硅胶柱色谱(乙酯-甲醇, 50:1~0:1), 凝胶 Sephadex LH-20(氯仿-甲醇, 1:1) 纯化得到化合物 3(450 mg), 剩余含环肽部位用反相 RP-18 柱色谱(5%~30% 甲醇) 处理后, 利用高效液相(20%~40% 乙腈) 纯化得到化合物 8(370 mg) 和 9(27 mg)。化合物结构见图 1。

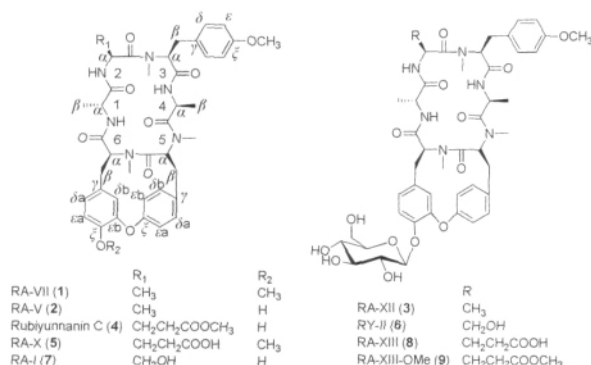


图 1 环肽化合物 1~9 的结构

Fig. 1 Structures of cyclopeptides 1-9

3 结构鉴定

化合物 1 白色粉末; 酸水解后茚三酮显色为橙红色^[12]; ESI-MS m/z 771 $[M+H]^+$, 1H , ^{13}C -NMR 数据见表 1, 确定其分子式为 $C_{41}H_{50}N_6O_9$; ^{13}C -NMR 给出以下信号: 3 个甲基 (δ_c 16.5, 18.5, 20.7), 3 个 N -甲基 (δ_c 29.3, 30.5, 39.8), 2 个甲氧基 (δ_c 55.2, 56.1), 3 个亚甲基 (δ_c 32.6, 35.4, 36.9), 6 个氨基酸 α -H 的次甲基 (δ_c 44.5, 46.4, 47.8, 54.2, 57.3, 68.3), 2 个 1,4-二取代苯环, 1 个 1,2,4-三取代苯环, 6 个酰胺羰基 (δ_c 168.1, 169.3, 170.7, 171.7, 172.2, 172.6); 以上信号可以推出 3 个丙氨酸和 3 个 N -甲基酪氨酸残基, 与常见茜草科类型环肽 RAs 具有相似的结构特征。将该化合物的波谱数据与文献[13]对照, 鉴定为 RA-VII。

化合物 2 白色粉末; 酸水解后茚三酮显色为橙红色^[12]; FAB-MS m/z 757 $[M+H]^+$, 1H , ^{13}C -NMR 数据见表 1, 推出其分子式为 $C_{40}H_{48}N_6O_9$; 与化合物 1 相比, 缺少一个甲氧基信号, 显示出相似的骨架结构。对照文献[14-15], 鉴定为 RA-V (deoxybouvardin)。RA-V 与 RA-VII 皆在 $CDCl_3$ 溶液中测定, 但这 2 篇文献报道的 ala^1 - α 的碳谱数据差异较大, 通过与其他环肽的比较, 作者认为 δ_c 47.7 作

为 ala^1 - α 碳的化学位移更为合理。

化合物 3 白色针晶(甲醇); 酸水解后茚三酮显色为橙红色^[12]; FAB-MS m/z 919 $[M+H]^+$, 推出其分子式为 $C_{46}H_{58}N_6O_{14}$ 。 1H , ^{13}C -NMR 数据见表 1, 显示出典型的 RAs 骨架的波谱特征及一组吡喃葡萄糖基团。将该化合物波谱数据与文献[16]对照, 鉴定为 RA-XII (RY-III)。

化合物 4 白色针晶(甲醇); 酸水解后茚三酮显色为橙红色^[12]; FAB-MS m/z 829 $[M+H]^+$, 结合 1H , ^{13}C -NMR 数据见表 2, 确定其分子式为 $C_{43}H_{52}N_6O_{11}$; 1H , ^{13}C -NMR 数据显示出 2 个丙氨酸和 3 个 N -甲基酪氨酸残基, 还显示出 2 个额外的亚甲基, 1 个酯甲基和 1 个额外的羰基信号, 推出该化合物中还含有 1 个谷氨酸甲酯残基。与文献[5]对照, 鉴定为 rubiyunnanin C。

化合物 5 白色粉末; 酸水解后茚三酮显色为橙红色^[12]; FAB-MS m/z 829 $[M+H]^+$, 推出其分子式为 $C_{43}H_{52}N_6O_{11}$, 与化合物 4 为同分异构体; 1H , ^{13}C -NMR 数据见表 2, 与化合物 4 比较, 发现缺失了 1 个酯氧基, 出现了 1 个新的甲氧基信号 (δ_H/δ_c 3.83/56.4) 及 1 个羧基信号 (δ_c 175.4), 仅在 aa^2 与 tyr^6 片段上有化学位移变化; 从而推出化合物 5 的 aa^2 应为 glu^2 , tyr^6 的对位羟基甲氧基化, 参照文献[17]确定化合物 5 为 RA-X。该文献报道为 $CDCl_3$ 测谱, 但作者实际测试发现, 由于溶解度小, $CDCl_3$ 条件下很难获得较为清晰的谱图。

化合物 6 白色粉末; 酸水解后茚三酮显色为橙红色^[12]; FAB-MS m/z 935 $[M+H]^+$, 1H , ^{13}C -NMR 数据见表 3, 确定其分子式为 $C_{46}H_{58}N_6O_{15}$; 与化合物 3 相比, 该化合物 1H , ^{13}C -NMR 数据显示出 1 个甲基信号的缺失, 出现 1 个羟甲基信号 (δ_c 62.3); 整体比较仅在 AA^2 上有化学位移变化, 对照文献[16]鉴定为 RY-II。

化合物 7 白色粉末; 酸水解后茚三酮显色为橙红色^[12]; FAB-MS m/z 773 $[M+H]^+$, 1H , ^{13}C -NMR 数据见表 3, 确定其分子式为 $C_{40}H_{48}N_6O_{10}$; 将 1H , ^{13}C -NMR 数据与化合物 6 比较, 缺失 1 组糖信号, 且仅在 tyr^6 片段上有化学位移变化, 推测该化合物为化合物 6 的苷元。将该化合物的波谱数据与文献[13]对照, 鉴定为 RA-I。

化合物 8 白色粉末; 酸水解后茚三酮显色为

表 1 化合物 1~3 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据

Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compounds 1-3

No.	RA-VII (1) ¹⁾		RA-V (2) ¹⁾		RA-XII (3) ²⁾	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
<i>D</i> -ala ¹	α 4.67 (1H, m)	47.8	4.75 (1H, m)	47.7	5.07 (1H, m)	48.1
	β 1.27 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	20.7	1.35 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	20.7	1.52 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	21.5
	C=O	172.2		172.3		172.6
	NH					
ala ²	α 4.30 (1H, m)	44.5	4.39 (1H, m)	44.5	5.11 (1H, m)	44.6
	β 1.22 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	16.5	1.29 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	16.4	1.44 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	16.9
	C=O	172.6		172.7		173.4
	NH					
tyr ³	α 3.50 (1H, dd, $J=10.5, 5.0$ Hz)	68.3	3.59 (1H, dd, $J=10.5, 5.0$ Hz)	68.3	4.08 (1H, dd, $J=10.5, 4.5$ Hz)	68.6
	βa 3.28 (2H, m)	32.6	3.34 (2H, m)	32.6	3.78 (1H, dd, $J=13.5, 4.5$ Hz)	32.5
	βb				3.91 (1H, dd, $J=13.5, 10.5$ Hz)	
	γ	130.6		130.5		131.8
	$\delta \times 2$ 6.96 (2H, d, $J=8.0$ Hz)	130.2	7.03 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	130.2	7.25 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	130.8
	$\varepsilon \times 2$ 6.75 (2H, d, $J=8.0$ Hz)	114.0	6.82 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	114.0	6.99 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	114.4
	ζ	158.3		158.3		158.8
	C=O	170.7		170.6		168.9
	NMe	39.8	2.85 (3H, s)	39.8	3.14 (3H, s)	39.9
	OMe	55.2	3.78 (3H, s)	55.2	3.69 (3H, s)	55.2
ala ⁴	α 4.75 (1H, m)	46.4	4.81 (1H, m)	46.4	5.13 (1H, m)	46.9
	β 1.02 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	18.5	1.08 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	18.4	1.35 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	19.0
	C=O	171.7		171.7		172.1
	NH					
tyr ⁵	α 5.33 (1H, dd, $J=11.5, 2.5$ Hz)	54.2	5.40 (1H, dd, $J=11.5, 3.0$ Hz)	54.3	5.74 (1H, overlapped)	54.6
	βa 2.57 (1H, overlapped)	36.9	2.65 (1H, overlapped)	36.8	2.62 (1H, dd, $J=11.0, 2.0$ Hz)	36.7
	βb 3.59 (1H, t, $J=11.5$ Hz)		3.68 (1H, t, $J=11.5$ Hz)		3.64 (1H, t, $J=11.0$ Hz)	
	γ	135.1		135.6		136.2
	δa 7.34 (1H, dd, $J=8.0, 1.5$ Hz)	130.9	7.41 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	131.0	7.44 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz)	131.0
	δb 7.18 (1H, overlapped)	132.7	7.25 (1H, overlapped)	132.9	7.28 (1H, overlapped)	133.5
	εa 7.13 (1H, dd, $J=8.0, 1.5$ Hz)	125.9	7.18 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	125.9	6.97 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz)	126.5
	εb 6.80 (1H, overlapped)	124.2	6.80 (1H, overlapped)	124.1	6.89 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz)	124.6
	ζ	158.1		157.9		158.8
	C=O	169.3		169.1		169.9
	NMe	30.5	3.10 (3H, s)	30.5	3.00 (3H, s)	30.4
tyr ⁶	α 4.47 (1H, dd, $J=12.0, 3.0$ Hz)	57.3	4.54 (1H, dd, $J=12.0, 3.5$ Hz)	57.3	5.00 (1H, dd, $J=11.5, 3.0$ Hz)	57.7
	βa 3.01 (1H, overlapped)	35.4	3.02 (1H, dd, $J=18.0, 3.5$ Hz)	35.6	3.52 (1H, dd, $J=17.5, 3.0$ Hz)	36.2
	βb 2.83 (1H, d, $J=14.0$ Hz)		2.92 (1H, d, $J=18.0$ Hz)		3.30 (1H, dd, $J=17.5, 11.5$ Hz)	
	γ	128.0		127.5		130.6
	δa 6.40 (1H, d, $J=7.5$ Hz)	120.9	6.50 (1H, d, $J=7.0$ Hz)	121.6	6.75 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	121.8
	δb 4.24 (1H, br s)	112.1	4.36 (1H, br s)	113.0	4.68 (1H, br s)	115.2
	εa 6.65 (1H, d, $J=7.5$ Hz)	113.2	6.80 (1H, overlapped)	115.8	7.57 (1H, overlapped)	116.9
	εb	153.0		151.1		153.7
	ζ	146.4		142.9		145.2
	C=O	168.1		168.1		171.1
	NMe	29.3	2.68 (3H, s)	29.3	2.97 (3H, s)	29.8
	OMe	56.1				
glc	1'				5.75 (1H, overlapped)	102.2
	2'				4.41 (1H, overlapped)	74.9
	3'				4.40 (1H, overlapped)	78.6
	4'				4.39 (1H, overlapped)	71.3
	5'				4.15 (1H, m)	79.0
	6'				4.55 (1H, d, $J=12.0$ Hz)	62.4
					4.36 (1H, overlapped)	

注: ¹⁾ ^1H -NMR (CDCl₃, 500 MHz), ^{13}C -NMR (CDCl₃, 125 MHz); ²⁾ ^1H -NMR (pyridine-*d*₅, 500 MHz), ^{13}C -NMR (pyridine-*d*₅, 125 MHz)。

表 2 化合物 4 和 5 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据

Table 2 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compounds 4 and 5

No.		rubiunnanin C (4) ¹⁾		RA-X (5) ¹⁾	
		δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
<i>D</i> -ala ¹	α	5.17 (1H, m)	48.5	5.15 (1H, m)	48.4
	β	1.57 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	22.0	1.54 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	21.8
	C=O		173.3		172.9
	NH	8.80 (1H, d, $J=8.0$ Hz)		8.76 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	
aa ²	α	5.34 (1H, overlapped)	48.7	5.44 (1H, m)	48.8
	β	2.39 (2H, m)	27.2	2.46 (2H, m)	27.4
	γ	2.59 (2H, m)	30.6	2.72 (2H, m)	31.0
	δ		173.4		175.4
	C=O		172.8		173.1
	NH	9.92 (1H, d, $J=8.5$ Hz)		9.92 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	
	OMe	3.54 (3H, s)	51.8		
tyr ³	α	4.15 (1H, dd, $J=10.5, 5.0$ Hz)	69.1	4.11 (1H, dd, $J=10.5, 5.0$ Hz)	69.0
	βa	3.88 (1H, dd, $J=14.0, 5.0$ Hz)	34.1	3.85 (1H, dd, $J=14.0, 5.0$ Hz)	34.0
	βb	3.93 (1H, dd, $J=14.0, 10.5$ Hz)		3.92 (1H, dd, $J=14.0, 10.5$ Hz)	
	γ		132.1		132.0
	$\delta \times 2$	7.34 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	131.1	7.33 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	131.0
	$\epsilon \times 2$	7.02 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	114.8	7.00 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	114.7
	ζ		159.2		159.0
	C=O		168.9		168.8
	NMe	3.28 (3H, s)	40.4	3.26 (3H, s)	40.2
	OMe	3.69 (3H, s)	55.4	3.61 (3H, s)	55.2
	α	5.11 (1H, m)	47.1	5.07 (1H, m)	47.0
ala ⁴	β	1.37 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	19.4	1.35 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	19.2
	C=O		172.4		172.2
	NH	7.39 (1H, d, $J=7.5$ Hz)		7.36 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	
	α	5.78 (1H, dd, $J=11.0, 2.5$ Hz)	54.8	5.73 (1H, overlapped)	54.6
tyr ⁵	βa	2.64 (1H, dd, $J=11.0, 2.5$ Hz)	37.1	2.59 (1H, dd, $J=11.0, 2.5$ Hz)	36.9
	βb	3.67 (1H, overlapped)		3.63 (1H, overlapped)	
	γ		136.3		136.1
	δa	7.24 (1H, overlapped)	131.2	7.36 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	131.2
	δb	7.47 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	133.8	7.43 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz)	133.6
	ϵa	6.98 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	126.8	6.93 (1H, overlapped)	126.6
	ϵb	6.95 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	124.9	6.92 (1H, overlapped)	124.6
	ζ		159.2		158.8
	C=O		170.2		170.1
	NMe	3.03 (3H, s)	30.6	2.96 (3H, s)	30.5
	α	5.04 (1H, dd, $J=12.0, 2.5$ Hz)	58.2	4.98 (1H, dd, $J=12.0, 3.5$ Hz)	57.3
tyr ⁶	βa	3.59 (1H, overlapped)	36.5	3.56 (1H, m)	36.2
	βb	3.37 (1H, m)		3.31 (1H, dd, $J=18.0, 12.0$ Hz)	
	γ		128.4		130.1
	δa	6.78 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	122.4	6.74 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	121.7
	δb	4.67 (1H, br s)	115.3	4.56 (1H, br s)	113.7
	ϵa	7.24 (1H, overlapped)	118.1	7.21 (1H, overlapped)	115.0
	ϵb		153.0		153.8
	ζ		145.7		147.2
	C=O		171.6		171.3
	NMe	3.03 (3H, s)	30.0	2.93 (3H, s)	29.8
	OMe			3.83 (3H, s)	56.4

注: ¹⁾ ^1H -NMR(pyridine- d_5 500 MHz) , ^{13}C -NMR(pyridine- d_5 125 MHz) 表 3 ~ 4 同。

表 3 化合物 6 和 7 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据

Table 3 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compounds 6 and 7

No.		RY-II (6) ¹⁾		RA-I (7) ¹⁾	
		δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
<i>D</i> -ala ¹	α	5.18 (1H, m)	48.3	5.19 (1H, m)	48.3
	β	1.53 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	21.7	1.53 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	21.7
	C=O		172.8		172.8
	NH	8.70 (1H, overlapped)		8.75 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	
ser ²	α	5.54 (1H, m)	51.4	5.54 (1H, m)	51.4
	βa	4.20 (1H, dd, $J=10.0, 6.0$ Hz)	62.3	4.18 (1H, dd, $J=10.0, 6.0$ Hz)	62.3
	βb	4.48 (1H, t, $J=10.0$ Hz)		4.48 (1H, t, $J=10.0$ Hz)	
	C=O		173.0		173.1
tyr ³	NH	9.91 (1H, d, $J=8.5$ Hz)		9.94 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	
	α	4.05 (1H, dd, $J=10.5, 3.5$ Hz)	69.4	4.03 (1H, dd, $J=10.5, 3.5$ Hz)	69.4
	βa	3.87 (1H, dd, $J=13.5, 3.5$ Hz)	33.7	3.86 (1H, dd, $J=12.5, 3.5$ Hz)	33.7
	βb	3.94 (1H, t, $J=13.5$ Hz)		3.94 (1H, t, $J=12.5$ Hz)	
ala ⁴	γ		132.1		132.2
	$\delta \times 2$	7.46 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	131.2	7.45 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	131.2
	$\varepsilon \times 2$	6.96 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	114.4	6.94 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	114.4
	ζ		158.8		159.0
	C=O		168.8		168.8
	NMe	3.29 (3H, s)	40.2	3.01 (3H, s)	40.2
	OMe	3.62 (3H, s)	55.2	3.60 (3H, s)	55.1
	α	5.11 (1H, m)	46.9	5.10 (1H, m)	46.9
	β	1.39 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	19.2	1.37 (3H, d, $J=7.5$ Hz)	19.2
	C=O		172.2		172.2
	NH	7.42 (1H, d, $J=8.0$ Hz)		7.41 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	
	α	5.77 (1H, dd, $J=11.5, 3.0$ Hz)	54.6	5.76 (1H, dd, $J=11.5, 2.5$ Hz)	54.6
tyr ⁵	βa	2.62 (1H, dd, $J=11.5, 3.0$ Hz)	36.8	2.62 (1H, dd, $J=11.5, 2.5$ Hz)	36.9
	βb	3.64 (1H, m)		3.64 (1H, t, $J=11.5$ Hz)	
	γ		136.2		136.1
	δa	7.46 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	131.2	7.45 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	131.0
	δb	7.24 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	133.6	7.22 (1H, overlapped)	133.5
	εa	6.95 (1H, overlapped)	126.6	6.98 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	126.6
	εb	6.89 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	124.7	6.89 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz)	124.7
	ζ		158.8		158.8
	C=O		170.0		170.0
	NMe	3.02 (3H, s)	30.4	3.29 (3H, s)	30.4
	α	5.02 (1H, dd, $J=11.5, 2.5$ Hz)	57.9	5.02 (1H, dd, $J=12.0, 3.5$ Hz)	58.0
	βa	3.57 (1H, dd, $J=18.0, 2.5$ Hz)	36.2	3.57 (1H, dd, $J=18.0, 3.5$ Hz)	36.3
tyr ⁶	βb	3.27 (1H, overlapped)		3.32 (1H, overlapped)	
	γ		131.0		128.1
	δa	6.76 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	121.8	6.75 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	122.2
	δb	4.69 (1H, br s)	115.3	4.65 (1H, br s)	115.1
	εa	7.58 (1H, overlapped)	117.0	7.22 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	117.9
	εb		153.7		152.8
	ζ		145.2		145.5
	C=O		171.1		171.3
	NMe	2.97 (3H, s)	29.9	2.99 (3H, s)	29.8
glc	1'	5.80 (1H, d, $J=7.0$ Hz)	102.3		
	2'	4.41 (1H, overlapped)	74.9		
	3'	4.41 (1H, overlapped)	78.7		
	4'	4.39 (1H, overlapped)	71.4		
	5'	4.14 (1H, m)	79.0		
	6'	4.56 (1H, d, $J=10.0$ Hz)	62.4		
		4.37 (1H, overlapped)			

橙红色^[12]; FAB-MS m/z 977 $[M + H]^+$ 推出其分子式为 $C_{48}H_{60}N_6O_{16}$; 1H , ^{13}C -NMR 数据见表 4, 显示出典型的 RAs 环肽的骨架波谱特征及一组吡喃葡萄糖信号, 确定该化合物为 RAs 配糖体。分别与化合物 3 和 6 的 1H , ^{13}C -NMR 数据比较, 主要差别在于 aa² 片段的 β 侧链上; 与化合物 5 的 1H , ^{13}C -NMR 数据比较, 发现 aa² 片段的核磁数据基本一致; 推定化合物 8 的 AA² 为 1 个谷氨酸片段。参照文献[18] 鉴定为 RA-XIII。

化合物 9 白色粉末; 酸水解后茚三酮显色为

橙红色^[12]; FAB-MS m/z 991 $[M + H]^+$, 结合 1H , ^{13}C -NMR 数据, 确定其分子式为 $C_{49}H_{62}N_6O_{16}$; 与化合物 8 的 1H , ^{13}C -NMR 数据对比, 羧基信号缺失, 显示出 1 个酯甲基信号 (δ_H/δ_C 3.51/51.5) 和 1 个额外的酯羰基信号, 推断该化合物为化合物 8 的 glu² 位羧基甲酯化产物, 即 RA-XIII-OMe。文献[18] 报道了该化合物, 但未有核磁数据, 通过 2D-NMR 对其化学位移值进行了全归属, 首次给出 RA-XI-II-OMe 在 pyridine- d_5 中的核磁数据见表 4。

表 4 化合物 8 和 9 的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据

Table 4 1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compounds 8 and 9

No.		RA-XIII (8) ¹⁾		RA-XIII-OMe (9) ¹⁾	
		δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
<i>D</i> -ala ¹	α	5.11 (1H, overlapped)	48.4	5.08 (1H, m)	48.2
	β	1.55 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	21.8	1.52 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	21.7
	C=O		172.9		172.9
	NH	8.77 (1H, d, $J=8.5$ Hz)		8.78 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	
aa ²	α	5.20 (1H, overlapped)	48.7	5.14 (1H, m)	48.3
	β	2.52 (2H, m)	27.4	2.36 (2H, m)	26.9
	γ	2.77 (2H, m)	31.0	2.57 (2H, m)	30.3
	δ		175.4		172.5
	C=O		173.0		173.1
	NH	9.93 (1H, d, $J=8.0$ Hz)		9.89 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	
tyr ³	OMe			3.51 (3H, s)	51.5
	α	4.13 (1H, m)	69.0	4.13 (1H, dd, $J=10.5, 5.0$ Hz)	68.8
	β_a	3.89 (1H, m)	34.0	3.87 (1H, dd, $J=13.5, 5.0$ Hz)	33.8
	β_b	3.94 (1H, m)		3.94 (1H, dd, $J=13.5, 10.5$ Hz)	
	γ		132.0		131.8
	$\delta \times 2$	7.38 (2H, d, $J=7.5$ Hz)	131.0	7.32 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	130.8
	$\epsilon \times 2$	7.05 (2H, d, $J=7.5$ Hz)	114.7	7.01 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	114.5
	ζ		159.0		158.9
	C=O		168.9		168.6
	NMe	3.31 (3H, s)	40.2	3.26 (3H, s)	40.1
	OMe	3.66 (3H, s)	55.2	3.67 (3H, s)	55.2
	ala ⁴				
	α	5.17 (1H, overlapped)	47.0	5.33 (1H, m)	46.8
	β	1.40 (3H, d, $J=6.0$ Hz)	19.2	1.35 (3H, d, $J=6.5$ Hz)	19.1
	C=O		172.2		172.1
	NH	7.42 (1H, d, $J=8.0$ Hz)		7.36 (1H, d, $J=7.5$ Hz)	
tyr ⁵	α	5.75 (1H, dd, $J=11.0, 2.0$ Hz)	54.6	5.75 (1H, dd, $J=11.0, 3.0$ Hz)	54.5
	β_a	2.64 (1H, dd, $J=11.0, 2.0$ Hz)	36.9	2.58 (1H, overlapped)	36.8
	β_b	3.68 (1H, overlapped)		3.64 (1H, overlapped)	
	γ		136.2		136.1
	δ_a	7.46 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz)	131.1	7.43 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz)	131.0
	δ_b	7.32 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz)	133.6	7.27 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	133.5
	ϵ_a	6.95 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz)	126.6	6.90 (1H, overlapped)	126.5
	ϵ_b	6.92 (1H, overlapped)	124.8	6.88 (1H, overlapped)	124.6
	ζ		158.9		158.8
	C=O		170.1		170.0
	NMe	3.04 (3H, s)	30.5	3.01 (3H, s)	30.3
	tyr ⁶				
	α	5.04 (1H, overlapped)	57.9	5.01 (1H, dd, $J=12.0, 3.0$ Hz)	57.8

续表 4

No.	RA-XIII (8) ¹⁾		RA-III-OMe (9) ¹⁾	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
βa	3.58 (1H, dd, $J = 18.0, 3.0$ Hz)	36.3	3.57 (1H, dd, $J = 18.0, 3.0$ Hz)	36.2
βb	3.34 (1H, overlapped)		3.30 (1H, dd, $J = 18.0, 12.0$ Hz)	
γ		130.9		129.6
δa	6.78 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	121.9	6.76 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	121.8
δb	4.69 (1H, br s)	115.3	4.67 (1H, br s)	115.3
εa	7.59 (1H, overlapped)	117.1	7.59 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.9
εb		153.8		153.7
ζ		145.3		145.2
C = O		171.2		171.1
NMe	2.99 (3H, s)	29.9	2.97 (3H, s)	29.8
glc	1'	5.81 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	5.82 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	102.3
	2'	4.44 (1H, overlapped)	4.42 (1H, overlapped)	74.9
	3'	4.43 (1H, overlapped)	4.42 (1H, overlapped)	78.6
	4'	4.41 (1H, overlapped)	4.40 (1H, overlapped)	71.3
	5'	4.18 (1H, m)	4.16 (1H, m)	79.0
	6'	4.60 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)	4.57 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)	62.4
		4.39 (1H, overlapped)	4.38 (1H, overlapped)	

4 讨论

茜草属植物全球约有 70 余种,我国有 36 种 2 变种,全国各地均有分布,其中云南有 19 种,资源丰富。研究表明茜草科类型环肽、醌类以及乔木烷型三萜为该属植物的特征性成分,其中环肽具有显著的体内外抗肿瘤活性,醌类显示出很好的升白作用;根据茜草醌类成分目前已研发成功一个重要的升白新药(茜草双酯),临床上疗效显著。本文从大叶茜草中首次获到 9 个环肽类化合物,丰富了大叶茜草的化学成分研究,对该属植物的化学分类学研究提供了一定依据。2010 年版《中国药典》只收录了 2 个醌类成分(大叶茜草素和羟基茜草素)用以控制中药茜草的质量,而几种同属植物常作为茜草代用品使用,因此作者认为将茜草质量控制由醌类单一性指标向醌类、环肽类、三萜类综合性多指标发展,结合其药理活性结果甚至临床疗效,将能更好地保证中药茜草的安全性、有效性和可控性。

【参考文献】

- [1] Singh R, Geetanjali, Chauhan S M S. 9,10-Anthraquinones and other biologically active compounds from the genus *Rubia* [J]. Chem Biodivers, 2004, 1: 1241.
- [2] Itokawa H, Takeya K, Mori N, et al. Isolation and antitumor activity of cyclic hexapeptides isolated from *Rubiae Radix* [J]. Chem Pharm Bull, 1984, 32(1): 284.
- [3] Itokawa H, Takeya K, Mori N, et al. Studies on antitumor cyclic hexapeptides RA obtained from *Rubiae Radix*, Rubiaceae. III.

On derivatives of RA-V and their *in vivo* activities [J]. Chem Pharm Bull, 1984, 32(8): 3216.

- [4] Fan J T, Chen Y S, Xu W Y, et al. Rubiunnanins A and B, two novel cyclic hexapeptides from *Rubia yunnanensis* [J]. Tetrahedron Lett, 2010, 51(52): 6810.
- [5] Fan J T, Su J, Peng Y M, et al. Rubiunnanins C-H, cytotoxic cyclic hexapeptides from *Rubia yunnanensis* inhibiting nitric oxide production and NF- κ B activation [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18(23): 8226.
- [6] Fan J T, Kuang B, Zeng G Z, et al. Biologically active arborinane-type triterpenoids and anthraquinones from *Rubia yunnanensis* [J]. J Nat Prod, 2010, 74(10): 2069.
- [7] Yan H, Pan X L, Tan N H, et al. 2D- and 3D-QSAR studies on 54 anti-tumor Rubiaceae-type cyclopeptides [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(9): 3425.
- [8] Yue G G L, Fan J T, Lee J K M, et al. Cyclopeptide RA-V inhibits angiogenesis by down-regulating ERK1/2 phosphorylation in HUVEC and HMEC-1 endothelial cells [J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(7): 1883.
- [9] Zhao S M, Kuang B, Fan J T, et al. Antitumor cyclic hexapeptides from *Rubia* plants: history, chemistry, and mechanism (2005–2011) [J]. Chimia, 2011, 65(12): 952.
- [10] 刘永耀, 白亦莉. 大叶茜草化学成分的研究 [J]. 药学报, 1985, 20(1): 53.
- [11] Liu Y L, Chen B Z, Bai Y L, et al. Digiferruginol glycoside from the roots of *Rubia schumanniana* [J]. Phytochemistry, 1991, 30(3): 947.
- [12] Zhou J, Tan N H. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants [J]. Chin Sci Bull, 2000, 45

- (20): 1825.
- [13] Itokawa H, Takeya K, Mori N, et al. Studies on antitumor cyclic hexapeptides RA obtained from *Rubiae Radix*, Rubiaceae. VI. Minor antitumor constituents [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34 (9): 3762.
- [14] Itokawa H, Takeya K, Mihara K, et al. Studies on the antitumor cyclic hexapeptides obtained from *Rubiae Radix* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(4): 1424.
- [15] Bates R B, Cole J R, Hoffmann J J, et al. Solution forms of bouvardin and relatives from NMR studies. 6-*O*-methylbouvardin [J]. *J Am Chem Soc*, 1983, 105: 1343.
- [16] 沈晓羽, 吴厚铭, 何敏, 等. 环肽配糖体的二维核磁共振谱研究[J]. *化学学报*, 1996, 54(12): 1194.
- [17] Itokawa H, Yamamiya T, Morita H, et al. New antitumor bicyclic hexapeptides, RA-IX and -X from *Rubia cordifolia*. Part 3. Conformation-antitumor activity relationship [J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1992, 1: 455.
- [18] Morita H, Yamamiya T, Takeya K, et al. New antitumor bicyclic hexapeptides, RA-XI, -XII, -XIII, and -XIV from *Rubia cordifolia* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(5): 1352.

Cyclopeptides from *Rubia schumanniana*

KUANG Bin^{1,2}, FAN Jun-ting¹, ZHAO Si-meng^{1,2}, TAN Ning-hua^{1*}

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

[Abstract] **Objective:** To separate and identify cyclopeptides of tubers of *Rubia schumanniana*. **Method:** The 70% methanol extracts from tubers of *Rubia schumanniana* were separated and purified by silica gel, RP-18, Sephadex LH-20 and HPLC. Their structures were identified by spectral analysis. **Result:** Nine cyclopeptides were separated and identified as RA-II (1), RA-V (2), RA-VIII (3), rubiyunnanin C (4), RA-X (5), RY-II (6), RA-I (7), RA-XIII (8) and RA-XIII-OMe (9), respectively. **Conclusion:** All of nine cyclopeptides were separated from *R. schumanniana* for the first time.

[Key words] *Rubia schumanniana*; cyclopeptide

doi: 10.4268/cjcm20121712

[责任编辑 孔晶晶]