

中药青黛中几种微量成分的研究

I. 吲哚并[2,1b]喹唑啉-6,12-二酮和青黛酮 的分离、结构鉴定及合成

邹继纯 黄量

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 从青黛的亲脂部分除去两个主要成分靛兰(I)及靛玉红(II)后, 分得8个微量成分(III~X, 含量 $3.3 \times 10^{-5} \sim 4.2 \times 10^{-4}\%$)。经物理常数的测定、光谱分析及化学合成鉴定了成分 III 为吲哚并[2,1b]喹唑啉-6,12-二酮(tryptanthrin)、成分 IV 的结构为 6-吲羟-吲哚并[2,1b]喹唑啉酮-12。IV 是首次从天然物中分离出来和确定结构的, 命名为青黛酮(qingdainone)。成分 V~X 的结构尚在证实中。

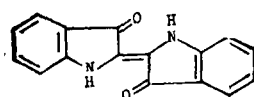
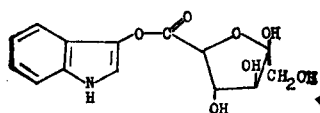
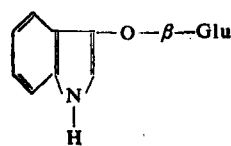
经初步筛选, 发现 III 及 IV 均对黑色素瘤 B₁₆ 有抑制作用, IV 对小鼠 Lewis 肺癌有抑制作用。

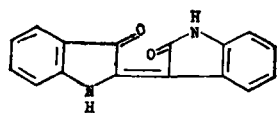
关键词 青黛; 抗肿瘤活性成分; 吲哚并[2,1b]喹唑啉-6,12-二酮; 6-吲羟-吲哚并[2,1b]喹唑啉酮-12; 青黛酮; N,O-二乙酰吲哚酚

青黛为内服或外敷的常用中药, 有清热、解毒、凉血和消斑等作用⁽¹⁾。一般是以含有靛甙、大青素 B 或吲哚-3-乙醛等吲哚酚衍生物的植物的茎叶 [诸如爵床科马兰属植物马兰 (*Baphicacanthu cusia* (Nees) Bremek), 十字花科大青属植物菘兰 (*Isatis tinctoria* L.)、草大青 (*Isatis indigotira* Fort.)、芸台属植物甘兰 (*Brassica Oleracea* L.)、芜青 (*Brassica campestris* L.)、蓼科蓼属植物蓼兰 (*Polygonum tinctorium* Ait.)], 经水浸发酵, 加入石灰使之在空气中氧化, 取表面兰紫色泡沫晒干制得^(1,2)。已知青黛中的主要成分有靛兰(I)、靛玉红(II)⁽³⁾、蛋白质及无机盐等^(1,2)。

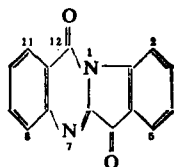
中国医学科学院血液研究所^(4,5)等曾报道青黛及其成分靛玉红⁽⁶⁾均对慢性粒细胞白血病有治疗作用。为了研究青黛中有无其它成分和各成分的药理活性, 我们取市售的河北省安国县以蓼兰为原料生产的青黛进行了系统分离。取热水不溶的部分, 除去其主要成分 I 及 II 后, 经多次柱层及板层, 分离出 8 个微量成分 (III~X, 含量在 0.3~4 ppm 左右, 表 1)

水溶部分及其粗分后的部分经动物试验不显抗肿瘤活性, 故未进一步分离。

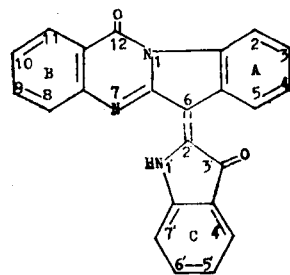




II 靛玉红 (indirubin)



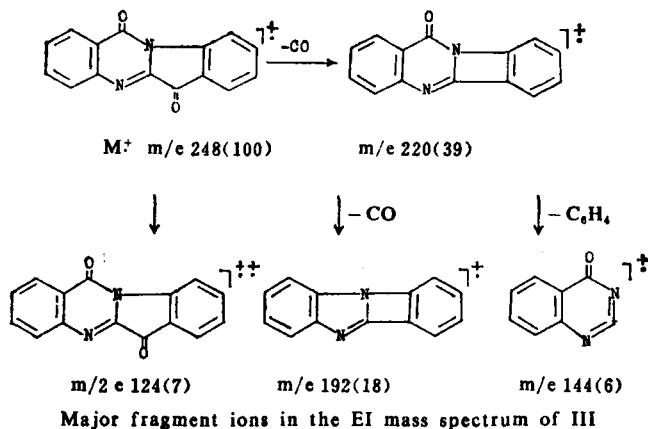
III (tryptanthrin)



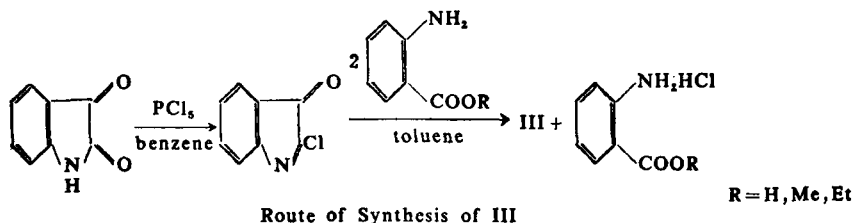
IV 青黛酮 (qingdainone)

Structures of four constituents and related compounds from Qing Dai

成分 III 为黄色针状结晶, mp 269~271°C, 根据高分辨质谱其分子式为 $C_{15}H_8N_2O_2$ (M^+ 248.0608, 计算值 248.0586)。红外光谱存在二个羰基 ($1730, 1685\text{ cm}^{-1}$) 和苯环 ($1600, 1460, 755\text{ cm}^{-1}$) 峰。核磁共振谱只有 7.45~8.65 芳香质子的峰。高分辨质谱主要碎片峰有 $C_{14}H_8N_2O$ ($M-CO$) $^+$: 220.0627 (计算值 220.0637), $C_{13}H_8N_2$ ($M-CO-CO$) $^+$: 192.0691 (计算值 192.0688), $C_8H_4N_2O$ ($M-CO-C_6H_4$) $^+$: 144.0342 (计算值 144.0324)。以上数据及紫外光谱均符合熔点为 266~267°C^(8b) 的已知化合物吲哚并 [2, 1 b] 喹唑啉-6, 12-二酮的结构⁽⁹⁾。其质谱碎片可解释如下:



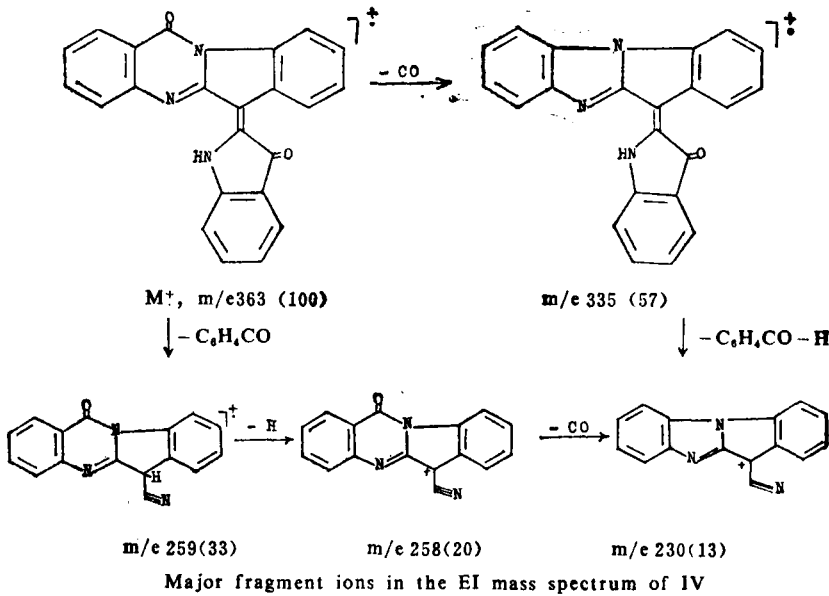
为了提供抗肿瘤药理筛选用样品, 按照 Friedländer^(7,8a) 的方法合成了 III, 合成品与天然品的 R_f 值、熔点、质谱、核磁共振谱、红外光谱和紫外光谱均完全符合。



Schindler⁽⁹⁾, Bergman⁽¹⁰⁾ 及 Handa⁽¹¹⁾ 等自酶代谢物和植物中分离出 III, III 有抗菌及抗真菌的作用^(9,11)。战洪生的试验表明 III 对黑色素瘤细胞株 B₁₆ 有抑制作用。

成分 IV 为暗紫色细针状结晶, mp 278~280°C, 根据高分辨质谱分子式为 $C_{23}H_{13}N_3O_2$, 分子量 363.0978 (计算值 363.1009), 红外光谱存在芳香酮 (1685 cm^{-1}) 及一较低频 (1620

cm^{-1}) 的羰基峰和苯环 ($1600, 1460, 755 \text{ cm}^{-1}$) 峰; 核磁共振谱存在 12 个芳香氢 $\delta 9.29$ (1 H, ddd, $J_o=7, J_m=3, J_p=1 \text{ Hz}$), $\delta 8.71$ (1 H, ddd, $J=7, 3, 1 \text{ Hz}$), $\delta 8.47$ (1 H, ddd, $J=7, 2, 1 \text{ Hz}$), $\delta 7.39\sim 8.10$ (8 H, m), 7.11 (1 H, ddd, $J=9, 2, 1 \text{ Hz}$) 及一个经重水交换消失的单宽峰 $\delta 1.61$, 表示分子中可能存在一个芳香二级胺。高分辨质谱主要碎片峰有 $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ ($\text{M}-\text{CO}$) $^+$ 335.1040, (计算值 335.1060), $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$ ($\text{M}-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$) $^+$ 259.0781 (计算值 259.0741), $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{N}_3$ ($\text{M}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}-\text{H}$) $^+$ 230.0798 (计算值 230.0719), 表明分子中有可断裂产生 $\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$ 的结构部分, 由此推测成分 IV 可能是一分子 III 与一分子吲哚酚的缩合物 IV。其质谱碎片可解释如下:

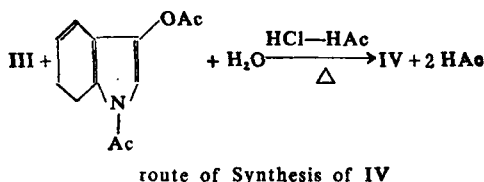


核磁共振谱各质子的归属可解释如下: 依据 Jarrah⁽¹²⁾对 III 的核磁共振谱的指定 [$\delta 7.44\sim 8.10$ (6 H, m) 为 $\text{C}_3, \text{C}_4, \text{C}_5$ 及 $\text{C}_8, \text{C}_9, \text{C}_{10}-\text{H}$ 的峰, $\delta 8.44$ (1 H, d, $J=7 \text{ Hz}$) 及 $\delta 8.65$ (1 H, d, $J=7 \text{ Hz}$) 分别为 C_{11} 及 C_2-H 的峰], 可知 $\delta 7.39\sim 8.10$ (8 H, m) 属于 A 环上 $\text{C}_3, \text{C}_4-\text{H}$, B 环上 $\text{C}_8, \text{C}_9, \text{C}_{10}-\text{H}$ 及 C 环上 $\text{C}_{4'}, \text{C}_{5'}, \text{C}_{6'}-\text{H}$ 的峰; $\delta 8.47$ (1 H, ddd, $J=7, 3, 1 \text{ Hz}$) 及 $\delta 8.71$ (1 H, ddd, $J=7, 3, 1 \text{ Hz}$) 分别属于 C_{11} 及 C_2-H 的峰。 C_5-H 受 C_3 羰基及邻位 $\text{C}_2'=\text{C}_6'$ 的去屏蔽作用, δ 值处较低场, 故 $\delta 9.29$ (1 H, ddd, $J=7, 3, 1 \text{ Hz}$) 为 C_5-H 的峰, $\text{C}_{7'}-\text{H}$ 的邻位有 $-\text{N}-\text{H}$ 取代基, 间位有 $\text{C}=\text{O}$ 取代, 而处较高场, $\delta 7.11$ (1 H, ddd, $J=9, 2, 1 \text{ Hz}$) 为 $\text{C}_{7'}-\text{H}$ 的峰是合理的。

为验证所推测的结构及提供药理试验样品, 合成了 IV。以 III 及 N,O-二乙酰吲哚酚在醋酸-盐酸溶液中进行水解缩合一步反应, 所得产物经柱层析纯化后, 其外观、熔点、Rf 值、质谱、红外光谱、紫外光谱及核磁共振谱均与成分 IV 的数据完全符合, 从而证实了成分 IV 的结构为 IV。

上述反应得到的产物在硅胶薄层及柱层析中均呈现 Rf 值不同、紫色略异的二个谱带,

其中 Rf 值低者 (Rf=0.4, 溶剂系统 1, 紫红色点) 在展开或洗脱过程中转化为 Rf 值高者 (Rf=0.7, 深紫色点), 后者的 Rf 值、mp 以及光谱数据与天然品成分 IV 一致, 推测合成产物中可能存在顺式(Z)及反式(E)异构体而其中 Rf 高者为顺式结构 IV, 对此在进一步研究中。



Martinet 和 Grosjean⁽¹³⁾ 于 1923 年报道 III 可与吡啶酚在醋酸中缩合得到 mp 267°C 的紫色染料, 但并未有其他数据及分子结构。现将首次分离并确定结构的成分 IV 命名为青黛酮(qingdainone)。

藉秀娟等所做的体内及体外抗肿瘤试验结果表明, IV 对小鼠 Lewis 肺癌及黑色素瘤细胞株 B₁₆ 均有抑制作用。

实 验 部 分

熔点以 Kofler 熔点测定仪测定, 温度计读数未加校正。红外光谱以 Perkin-Elmer 21 仪测定。紫外光谱以 Shimadzu UV-300 型仪测定。质谱以 ZAB-2 F 型仪测定。核磁共振谱以 JEOL FX 900 型仪 (90 MHz, TMS 为内标) 测定。薄层层析以青岛海洋化工厂硅胶 G, 柱层析以 Sephadex LH-20 及青岛海洋化工厂硅胶 (200~300 目) 及硅胶 H 为载体。

青黛亲脂部分的提取和粗分离

15 kg 河北安国县生产的青黛用 60 kg 自来水在 40°C 左右搅拌浸溶, 过滤, 得水溶部分 A。滤饼加水成糊状, 加稀盐酸至 pH 5~6, 过滤, 滤饼水洗至中性, 风干后, 在 80°C 左右烘烤得兰灰色粉末 B 9.55 kg。将 9.55 kg B 以二氯甲烷—乙酸乙酯 (1:1) 20 L 在 40° 回流搅拌抽提三次, 至抽出液不再含 I 及 II 以外的成分。合并抽出液, 减压浓缩至 2 L, 室温放置, 过滤除去析出部分 C 33 g (板层分析主要为 I 及 II), 母液减压浓缩得红棕色膏状物 D 38.5 g。

微量成分的分离和纯化

取 D 4.0 g 以硅胶 H 200 g 为载体, 以环己烷—二氯甲烷—乙酸乙酯=6:2.5:1, 再以二氯甲烷—乙酸乙酯=1:1 为洗脱剂进行快速柱层析, 收集五个部分, 分别减压浓缩得 E-1 (淡黄色油膏 0.75 g), E-2 (亮桔色膏 0.22 g), E-3 (红紫色固体 0.85 g), E-4 (桔红色固体 0.54 g) 及 E-5 (黑红色固体 1.61 g)。将 E-2, E-3 和 E-4 分别通过 130 g Sephadex LH-20, 环己烷—二氯甲烷—乙酸乙酯=6:2.5:1 柱层析。所得各部分再经厚度 2 mm 的硅胶 G 园盘离心层析及制备薄层层析进行各成分的富集及纯化, 展开剂为溶剂系统 1 或溶剂系统 2。从 38.5 g D 分离得到成分 III~X, 分别为 5~60 mg (表 1)。

成分 III MS m/e 248(100), 220(39), 192(18), 164(5), 144(6), 124(7), 102(13), 90(8), 76(18), 63(8), 50(13), 39(8), 28(12)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 1730, 1685, 1600, 1460, 1350, 1320, 755。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log e) 245(4.56), 251(4.64), 270(3.86), 280 (3.83), 300~320(3.88), 335(3.86), 352(3.80), 400(3.80)。¹HNMR (CDCl₃), δ 8.65(IH, d,

Tab 1. Physical properties of minor components III~X isolated from Qing Dai

| No. | Appearance | Mp °C | Rf value ^(a) | | Yield mg | Content % in qingdai |
|------|--------------------------------|---------|---------------------------------|---------------------------------|----------|----------------------|
| | | | Solvent system 1 ^(b) | Solvent system 2 ^(c) | | |
| III | Yellow needle cryst | 269~71 | 0.38 | | 20 | 1.4×10^{-4} |
| IV | Dark violet silky needle cryst | 278~80 | 0.70 | | 60 | 4.2×10^{-4} |
| V | brick cryst | 290~95 | 0.43 | 0.80 | 15 | 1.0×10^{-4} |
| VI | Orange red granular powder | >360 | 0.43 | 0.68 | 5 | 3.3×10^{-5} |
| VII | Orange red cryst | | 0.52 | 0.80 | 5 | 3.3×10^{-5} |
| VIII | Colorless cryst | 38~90 | 0.63 | | 29 | 2.1×10^{-4} |
| IX | White amorphous powder | 59~60.5 | 0.90 | | 5 | 3.3×10^{-5} |
| X | Dark green solid | | | 0.70 | 5 | 3.3×10^{-5} |

a. Silica gel G plate: temp 21°C, relative humidity 70%

b. Solvent system 1: cyclohexane—methylene chloride—ethyl acetate 6:2.5:1

c. Solvent system 2: hexane—methylene chloride—ethyl acetate 2.5:5:1

J=7 Hz), 8.45 (1H, dd, I=7, 2 Hz), 7.45~8.11 (6 H, m).

成分 IV MS m/e 363(100), 335(57), 259(33), 258(20), 230(13), 204(7), 182(7) 104(5), 102(5), 76(22), 50(13), 28(5)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 1685, 1620, 1600, 1460, 1320, 755。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log e) 250 (4.42), 280 (4.31), 310 (3.92), 340 (3.91), 430 (3.48), 460 (3.44), 535 (肩, 4.08), 572 (4.21), ¹HNMR (CDCl₃), δ 9.29 (1H, ddd, J=7, 3, 1Hz), 8.71 (1H, ddd, J=7, 3, 1Hz), 8.47 (1H, ddd, J=7, 3, 1Hz), 7.39~8.10 (8 H, m), 7.11 (1H, ddd, J=9, 2, 1Hz), 1.61 (1H, s, br, 重水交换消失)。

吲哚并[2, 1b]噻唑啉-6, 12-二酮的合成

1. 按 Baeyer⁽⁷⁾的方法, 合成了 2-氯代吲哚酮-3, mp. 180°C (dec), 收率 70~72% (mp 180°C(dec), 收率 73%⁽⁷⁾)。

2. 按 Friedländer^(8a)法以邻氨基苯甲酸乙酯及 2-氯代吲哚酮-3 在苯溶液中进行闭环脱水反应, 得到 III, mp 269~271°C, 收率 60~67% (mp 262°C^(8a), 266~7°C^(8b))。元素分析 C₁₅H₈N₂O₂, C 72.50, H 3.24, N 11.10 (计算值: C 72.58, H 3.25, N 11.29)。MS m/e 248(100), 220(64), 192(22), 164(10), 144(11), 124(10), 102(23), 90(12), 76(24), 63(13), 50(22), 39(11), 28(5)。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log e) 245 (4.59), 251 (4.68), 270 (3.93), 280 (3.92), 300~320(3.96), 335(3.92), 352(3.86), 400(3.87)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 1730, 1685, 1595, 1460, 1350, 1315, 755。¹HNMR (CDCl₃) δ 8.64 (1H, dd, J=7, 2 Hz), 8.44 (1H, dd, J=7, 2 Hz), 7.44~8.10 (6 H, m)。

6-吲哚-吲哚并[2, 1b]噻唑啉酮-12的合成

1. N, O-二乙酰吲哚酚的合成 简化 Raileanu⁽¹⁴⁾报道的改进的二步法为一步, 将邻羧基苯甘氨酸在碳酸钾存在下与醋酐加热反应, 得到纯度及收率与报道相近的产物。

在搅拌下将碳酸钾 25 g 溶于 100 ml 醋酐中, 再将邻羧基苯甘氨酸 20 g (0.1 mol, mp 214~217°C, 四级) 加入其中, 缓缓加热至 70°C, 反应约 1 小时。减压蒸馏除去大部分醋酐, 残液倒入 800 ml 冷水中, 将固体捣碎, 过滤, 水洗, 干燥后得粗品 17.2 g, 以 95% 热酒精溶解, 滤去少量不溶物 0.2 g 趁热滤去在热溶液中析出的土黄色小结晶 0.5 g (mp 240~300°C), 溶液冷却后滤集微黄色结晶 9.1 g (mp 81~82°C), 母液中又得到淡土黄色结

晶 5.0 g (mp 78~82°C), 二者合并收率为63~65% (mp 81~82°C, 二步总收率为72%)⁽¹⁴⁾。

2. 6-吲哚-吲哚并[2,1b]喹唑啉酮-12的合成 参考Martinet⁽¹³⁾和类似化合物的合成方法⁽¹⁵⁾, 改为直接以 N, O-二乙酰吲哚酚 (mp 81~82°C) 711 mg (3 mmol) 及 III (mp 270~271°C) 716 mg (3 mmol) 加入 15 ml 冰醋酸搅拌加热溶解后, 滴加浓盐酸 20 滴, 回流反应约 1 小时 (TLC 跟踪), 放置过夜。过滤, 以少许酒精洗, 得黑紫色结晶粉末 637 mg (mp 265~273°C), 以硅胶柱, 溶剂系统 1 层析进行纯化, 再以苯重结晶得到 IV 480 mg, mp 275~280°C, 收率 44%。MS m/e 363(100), 335 (54), 259(26), 258 (20), 230 (11), 204 (5), 182 (7), 104 (4), 102 (3), 76 (11), 50 (5), 28 (18)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 1865, 1620, 1600, 1460, 1320, 755。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log e) 250 (4.42), 280 (4.27), 310 (3.91), 340 (3.89), 430 (3.45), 460 (3.39), 535 (s 4.02), 572 (4.15)。¹HNMR (CDCl₃) δ 9.26 (1H, ddd, J=7, 3, 1Hz), 8.69 (1H, ddd, J=7, 3, 1Hz), 8.4 6 (1H, dd, J=7, 3 Hz), 7.38~8.08 (8 H, m), 7.11 (1H, ddd, J=9, 2, 1Hz), 1.74 (1H, s, br, 重水交换消失)。

致谢 光谱及元素分析由分析室测定; 药理室进行药理作用筛选; 本所药厂张觉同志与合成室孙兰同志分别参加了放大提取和部分分离工作。

参 考 文 献

1. a. 陈存仁. 中国药学大辞典. 第一版. 上册. 世界书局, 1956:806.
b. 江苏新医学院. 中药大辞典. 第一版. 上册. 上海人民出版社, 1977:1230.
2. «全国中草药汇编»编写组. 全国中草药汇编. 第一版. 上册. 人民卫生出版社, 1975:483.
3. 吴莲明等. 青黛治疗慢性粒细胞白血病有效成分的研究 I. 中草药通讯 1978;9:6.
4. 中国医学科学院分院附属医院血液内科等. 当归芦荟丸治疗慢性粒细胞白血病的临床研究. 中华内科杂志 1976; 15:86.
5. 中国医学科学院白血病协作组. 中药青黛治疗慢性粒细胞白血病疗效原理的初步探讨. 输血及血液学 1977;1:11.
6. 中国医学科学院血液学研究所. 靛玉红治疗慢性粒细胞白血病的临床与实验研究. 中华内科杂志 1979;18:83.
7. Baeyer A. Über die Einwirkung des PCl_5 auf Isatin und auf verwandte Substanzen. Ber 1879;12:456.
8. a. Friedländer P und Roschdestwensky N. über ein Oxydationsprodukt des Indigblaus. Ibid 1915;48:1841.
b. Brufani M, et al. The structure of Tryptanthrin. *Experientia* 1971;15:1249.
9. Schindler F und Zahner H. Tryptanthrin, ein von Tryptophan abzuleitendes Antibioticum aus *Candida lipolytica*. *Arch Mikrobiol* 1971;79:181.
10. Bergman J, et al. The structure of some indolic constituents in *Couroupita guaianensis* Abul. *Tetrahedron Lett.* 1977;30:2625.
11. Honda G and Tabata M. Isolation of antifungal principle Tryptanthrin from *Strobilanthes cusia* O. Kuntze. *Planta Med* 1979;36:85.
12. Jarrah MY, et al. 300 MHz proton NMR spectra of indolo [2,1b] quinazoline-6,12-dione, Tryptanthrin, and its 2- and 8-chloro derivatives. *J Chem Research (S)* 1980;186.
13. Martinet J und Grosjean M. Über das Anhydroanthranilidisatin. *Rev gen des Matieres colorantes* 28 (313):3; *Chem Zentralbl* 1923; 94 I:1087.
14. Raileanu D, et al. Improved preparatory method for N,O-diacetylxindoxyl and N-acetylxindoxyl. *Rev Roum Chim* 1967; 12:105.
15. 吴克美等. 抗白血病药物——靛玉红衍生物和类似物的合成及其活性与结构关系的探讨 II. 药化学报 待发表

MINOR CONSTITUENTS OF QING DAI, A TRADITIONAL CHINESE MEDICINE

I. ISOLATION, STRUCTURAL DETERMINATION AND SYNTHESIS OF TRYPTANTHRIN AND QINGDAINONE

ZOU Ji-Chun and HUANG Liang

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT The study of Qing Dai, a traditional Chinese medicine, has resulted in the isolation of eight minor constituents III~X ($3.3 \times 10^{-5} \sim 4.2 \times 10^{-4}\%$) after removing of the two major constituents I (indigotin) and II (indirubin). Constituent III ($C_{15}H_8N_2O_2$) was found to be identical to the known compound indolo [2,1b]-quinazoline-6,12-dione (tryptanthrin). Constituent IV ($C_{23}H_{13}N_3O_2$) was assigned on the basis of spectrometric data to have structure IV and confirmed by condensation of III with diacetyloxy. It was first found from plant origin and designated qingdainone. III and IV were synthesized and found to be both active in test on melanoma B₁₆ and IV also showed inhibitory action against Lewis lung carcinoma in mice.

Structure determination of constituents V~X is in progress.

Key words Qing Dai; Antitumor agent; Qingdainone; Tryptanthrin; Indolo[2,1b]quinazoline 6,12-dione; 6-Indoxyl indolo [2,1b] quinazolone-12; N,O-Diacetyl indoxyl