

## 甘草废渣中黄酮成分的研究

杨琳<sup>1</sup>, 车庆明<sup>2\*</sup>, 毕诚<sup>2</sup>, 孙启时<sup>1</sup>

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 北京大学医学部药学院, 北京 100083)

甘草是一味重要的传统中药, 具有补脾益气、祛痰止咳、清热解毒、缓急止痛、调和诸药之功效, 素有“国佬”之称。自1964年Revers<sup>[1]</sup>发现甘草提取物可以治疗胃溃疡以来, 甘草的药用价值受到人们的广泛关注。近年来化学和药理学研究表明, 甘草的主要有效成分是三萜皂苷和黄酮类成分, 其中黄酮类成分具有显著的抗溃疡、抗肿瘤、抗氧化、抑菌、抗炎等药理活性<sup>[2]</sup>。但长期以来, 工业化生产只把甘草中的甘草甜素(glycyrrhizin, 又名甘草酸)作为主要有效成分进行提取, 而提取甘草酸后的甘草药渣则被当作废渣遗弃, 造成了环境污染和资源浪费。有关甘草废渣的综合开发利用及其药理活性研究, 已有文献报道<sup>[3,4]</sup>, 但对于甘草废渣中化学成分的系統研究尚未见报道。为了更加合理地利用有限的甘草资源, 使甘草最大限度地发挥其药用价值, 本实验对工业上提取甘草酸后的甘草废渣进行了化学成分的研究, 首次从甘草废渣中分离并鉴定了6个黄酮类成分, 分别为甘草查耳酮A(licochalcone A, I)、甘草查耳酮B(licochalcone B, II)、刺甘草查耳酮(echinatin, III)、甘草黄酮(licoflavone, IV)、4', 7-二羟基黄酮(V)和4', 5, 7-三羟基-8-异戊烯基黄酮(VI)。

## 1 仪器与试剂

UV-Ⅱ型三用紫外灯(北京智源通生物技术研究); JEOL JNM-AL 300型核磁共振仪; TRACE MS质谱仪。

石油醚(AR), 氯仿(AR), 醋酸乙酯(AR), 丙酮(AR), 乙醇(工业级), 甲醇(AR), 硅胶G(青岛海洋化工厂); 硅胶GF<sub>254</sub>板(MACHERY NAGEL); 葡聚糖凝胶Sephadex LH-20。

## 2 提取与分离

新疆甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 废渣 1.5 kg, 加10倍量95%工业乙醇室温浸泡提取24 h, 提取液浓缩, 浸膏加水混悬, 氯仿萃取, 回收氯仿, 得浸膏约50 g。取氯仿浸膏经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇梯

度洗脱, 洗脱液经硅胶TLC检识, 合并成9个流份。流份1(约12 g)经硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮梯度洗脱, 得到化合物I(约3 g)。流份2经过反复硅胶柱色谱, 氯仿-醋酸乙酯梯度洗脱, 得到淡黄色结晶, 再经凝胶Sephadex LH-20柱色谱, 甲醇洗脱, 得到化合物II(15 mg)和III(10 mg)。流份3经过反复硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯(4:1)洗脱, 再经凝胶Sephadex LH-20柱色谱甲醇洗脱, 得到化合物IV(20 mg)和V(30 mg)。流份4经凝胶Sephadex LH-20柱色谱, 甲醇洗脱, 得到化合物V(20 mg)。

## 3 结构鉴定

化合物I: 橙黄色针状结晶(甲醇), 紫外光下呈亮黄色荧光。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.03(1H, d, J=15.6 Hz, H-β), 7.97(2H, d, J=8.1 Hz, H-2', 6'), 7.60(1H, d, J=15.9 Hz, H-α), 7.43(1H, s, H-6), 6.99(2H, d, J=7.8 Hz, H-3', 5'), 6.58(1H, 宽峰), 6.42(1H, s, H-3), 6.17(1H, dd, J=18, 10.5 Hz, H-2''), 5.32(1H, d, J=17.4 Hz, H-3''), 5.28(1H, d, J=9 Hz, H-3''), 3.76(3H, s, -OMe), 1.42(6H, s, Me-4'', 5'')。 <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ: 191.2(C=O), 161.3(C-4'), 159.6(C-4), 158.6(C-2), 147.6(C-2''), 141.8(C-β), 131.3(C-2', 6'), 130.5(C-1'), 128.9(C-6), 124.8(C-5), 119.8(C-α), 116.2(C-1), 115.7(C-3', 5'), 113.7(C-3''), 101.0(C-3), 55.6(-OMe), 39.7(C-1''), 29.6(C-4''), 27.0(C-5'')。EI-MS m/z: 338(M<sup>+</sup>, 11), 323(M<sup>+</sup>-Me, 3.5), 307(M<sup>+</sup>-OMe, 100), 121(83)。其数据与文献中甘草查耳酮A一致<sup>[5]</sup>。

化合物II: 黄色结晶(甲醇), 紫外灯下呈亮黄色荧光。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.00(2H, d, J=8.7 Hz, H-2', 6'), 7.84(1H, d, J=15.6 Hz, H-β), 7.67(1H, d, J=15.6 Hz, H-α), 7.33(1H, d, J=8.4 Hz, H-6), 6.88(2H, d, J=8.4 Hz, H-3', 5'), 6.63(1H, d, J=8.7 Hz, H-5), 3.76(3H, s, -OCH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C-NMR

收稿日期: 2006-10-08

作者简介: 杨琳(1978—), 女, 山西运城人, 沈阳药科大学药理学博士研究生, 研究方向为中药复方的现代药学研究。

E-mail: ylhnl6@126.com

\* 通讯作者 车庆明 Tel: (010)82802468 E-mail: cheqingming2003@sina.com

(DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 187.2 (C=O), 161.9 (C-4'), 149.6 (C-4), 148.6 (C-2), 138.3 (C- $\beta$ ), 138.2 (C-3), 130.9 (C-2', 6'), 129.6 (C-1'), 119.6 (C-1), 119.1 (C- $\alpha$ ), 118.5 (C-6), 115.4 (C-3', 5'), 111.7 (C-5), 60.8 (-OMe)。EI-MS  $m/z$ : 286 ( $M^+$ , 6), 271 ( $M^+$  - Me, 2.4), 255 ( $M^+$  - OMe, 100), 197 (7.9), 193 (3), 150 (11), 121 (51), 93 (25.3), 65 (36.3)。其数据与文献中甘草查耳酮 B 一致<sup>[5]</sup>。

化合物 III: 黄色结晶(甲醇), 紫外灯下呈黄绿色荧光。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 8.05 (1H, d,  $J$ =15.6 Hz, H- $\beta$ ), 8.02 (2H, d,  $J$ =8.7 Hz, H-2', 6'), 7.68 (1H, d,  $J$ =15.6 Hz, H- $\alpha$ ), 7.68 (1H, d,  $J$ =8.7 Hz, H-6), 6.94 (2H, d,  $J$ =8.7 Hz, H-3', 5'), 6.54 (1H, d,  $J$ =2.1 Hz, H-3), 6.51 (1H, dd,  $J$ =8.7, 2.1 Hz, H-5), 3.87 (3H, s, -OMe)。<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 188.7 (C=O), 162.5 (C-4), 162.3 (C-4'), 161.3 (C-2), 139.5 (C- $\beta$ ), 131.6 (C-2', 6'), 131.3 (C-6), 131.0 (C-1'), 119.2 (C- $\alpha$ ), 116.3 (C-1), 115.9 (C-3', 5'), 108.8 (C-5), 99.7 (C-3), 55.8 (-OMe)。EI-MS  $m/z$ : 270 ( $M^+$ , 10), 239 ( $M^+$  - OMe, 100), 177 (8), 121 (38.4), 93 (16.2), 65 (25.3)。其数据与文献中刺甘草查耳酮一致<sup>[5]</sup>。

化合物 IV: 淡黄色结晶(甲醇), 紫外 365 nm 下呈亮蓝色荧光。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 7.88 (2H, d,  $J$ =9 Hz, H-2', 6'), 7.65 (1H, s, H-5), 6.96 (1H, s, H-8), 6.90 (2H, d,  $J$ =8.7 Hz, H-3', 5'), 6.69 (1H, s, H-3), 5.31 (1H, t,  $J$ =7.5 Hz, H-2''), 3.28 (2H, d,  $J$ =7.5 Hz, H-1''), 1.72 (3H, s, Me-4''), 1.67 (3H, s, Me-5''), 10.84 (1H, s), 10.22 (1H, s)。<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 176.3 (C-4), 162.2 (C-2), 160.6 (C-7), 160.4 (C-4'), 155.6 (C-9), 132.4 (C-3''), 128.0 (C-2', 6'), 127.3 (C-5), 124.6 (C-10), 121.9 (C-2''), 121.8 (C-1'), 115.9 (C-3', 5'), 115.8 (C-6), 104.5 (C-3), 101.8 (C-8), 27.5 (C-4''), 25.6 (C-1''), 17.6 (C-5'')。EI-MS  $m/z$ : 322 ( $M^+$ , 90), 307 ( $M^+$  - OMe, 86), 293 (47), 279 (49.5), 267 (100), 238 (17.9), 189 (23), 149 (83.4), 121 (38), 118 (38.3), 69 (57.1)。其数据与文献中甘草黄酮一致<sup>[6]</sup>。

化合物 V: 淡黄色结晶(甲醇), 紫外 365 nm 下呈亮蓝色荧光。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 10.54 (1H, -OH), 7.90 (2H, d,  $J$ =9 Hz, H-2', 6'), 7.84 (1H, d,  $J$ =8.4 Hz, H-5), 6.95 (1H, d,  $J$ =2.1 Hz, H-8), 6.91 (2H, d,  $J$ =8.7 Hz, H-3', 5'), 6.88 (1H, dd,  $J$ =8.7, 2.1 Hz, H-6), 6.71 (1H, s, H-3)。<sup>13</sup>C-NMR

(DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 176.3 (C-4), 162.7 (C-2), 162.4 (C-7), 160.7 (C-4'), 157.4 (C-9), 128.1 (C-2', 6'), 126.5 (C-5), 121.8 (C-1'), 116.0 (C-10), 115.9 (C-3', 5'), 114.8 (C-6), 104.4 (C-3), 102.5 (C-8)。EI-MS  $m/z$ : 254 ( $M^+$ , 81.2), 253 (54), 226 (66), 197 (10.2), 137 (100), 118 (54.8)。其数据与文献中 4', 7-二羟基黄酮一致<sup>[6,7]</sup>。

化合物 VI: 淡黄色结晶(甲醇), 紫外 365 nm 下呈黄色荧光。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 12.89 (1H, s, -OH), 10~11 (1H, br), 7.89 (2H, d,  $J$ =8.7 Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d,  $J$ =8.7 Hz, H-3', 5'), 6.76 (1H, s, H-3), 6.26 (1H, s, H-6), 5.18 (1H, t,  $J$ =6.9 Hz, H-2''), 3.43 (2H, d,  $J$ =6.9 Hz, H-1''), 1.75 (3H, s, Me-4''), 1.62 (3H, s, Me-5'')。<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 182.0 (C-4), 163.6 (C-2), 161.9 (C-5), 161.2 (C-7), 161.2 (C-4'), 159.1 (C-9), 130.9 (C-3''), 128.3 (C-2', 6'), 122.5 (C-2''), 121.5 (C-1'), 116.0 (C-3', 5'), 106.1 (C-10), 103.5 (C-8), 102.6 (C-2), 98.4 (C-6), 25.5 (C-4''), 21.4 (C-1''), 17.8 (C-5'')。EI-MS  $m/z$ : 338 ( $M^+$ , 8.7), 323 ( $M^+$  - Me, 94.6), 283 (50.2), 270 (100), 205 (37.8), 165 (53), 121 (35), 118 (28.2), 69 (42)。其数据与文献中 4', 5, 7-三羟基-8-异戊烯基黄酮一致<sup>[8]</sup>。

#### 4 小结

甘草废渣是工业上提取甘草酸后的废弃物, 其中含有大量的黄酮类化学成分。通过对甘草废渣化学成分的研究, 分离得到了 6 个黄酮类化合物, 其中甘草查耳酮 A 和甘草查耳酮 B 具有较强的抗氧化、抑菌等药理活性, 广泛应用于食品及化妆品行业<sup>[9]</sup>。我国甘草资源丰富, 但是由于近年来的过度采挖, 野生资源已经很少, 甘草废渣的开发利用不仅有利于缓解现存的甘草资源匮乏的危机, 而且有利于保护生态环境。甘草废渣在制药领域中的综合利用值得重视。

#### References:

- [1] Qiao Z H, Hu Z R. Studies on the comprehensive utilization of licorice (Recovery of flavonoids from licorice waster) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(9): 522-524.
- [2] Zhou J H, Wu W P, Sun W J. Evolvement in chemical research of licorice flavonoid [J]. *Drug Stand China* (中国药品标准), 2004, 5(1): 10-13.
- [3] Yang X H. Identification of the organic components of licorice residue [J]. *Gansu Environ Stud Monit* (甘肃环境研究与监测), 1996, 9(3): 30-32.
- [4] Gao F K, Zhang S W, Yang X H, et al. Development and utilization technique of licorice residue [J]. *Gansu Environ Stud Monit* (甘肃环境研究与监测), 2002, 15(1): 27-28.
- [5] Kajiyama K, Demizu S, Hiraga Y, et al. Two prenylated

- retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(9): 3229-3232.
- [6] Yang S L, Liu Y L. Chemical constituents of *Glycyrrhiza inflata* Bat [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1988, 30(2): 176-182.
- [7] Tu P F, Tao J, Hu Y Q, et al. Flavones from the wood *Draena conchinchinensis* [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2003, 1(1): 27-29.
- [8] Xuan C S, Zhao X H, Feng F S, et al. The study of chemical components of *Glycyrrhiza* in Shanxi [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(2): 18-25.
- [9] Wu Z E, Lin H, Liang R Y. Separation and identification of the inoxidizable and anti-aspergillus flavus components from licorice [J]. *Food Sci* (食品科学), 1996, 17(4): 46-50.

## 粗吻海龙抗肿瘤活性部位研究

王梦月<sup>1</sup>, 秦孙星<sup>1</sup>, 张朝晖<sup>2</sup>, 何云瑾<sup>1</sup>, 李晓波<sup>1\*</sup>

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200030; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212001)

海龙为补益类名贵海洋中药, 具有温肾壮阳、散结消肿之功效。《中国药典》2005年版收载海龙为刁海龙 *Solenognathus hardwickii* (Gray)、拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* (Bloch)或尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus 的干燥体。我国海龙资源丰富, 除《中国药典》收载品种外, 同科的粗吻海龙 *Trachyrhamphus serratus* (Temminck et Schlegel)在我国分布广、产量大, 在辽宁、山东、广东、福建、海南等地, 为海龙的主流品种之一<sup>[1]</sup>。前期研究证明粗吻海龙具性激素样作用, 其作用与尖海龙等《中国药典》收载的品种作用相当<sup>[2]</sup>; 同时还首次发现粗吻海龙醇提物具有明显的抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。为进一步研究粗吻海龙的抗肿瘤活性成分, 对粗吻海龙抗肿瘤的活性部位进行了筛选, 并对活性部位进行了GC-MS分析, 为海龙科药用动物的抗肿瘤新药开发提供依据。

### 1 实验部分

1.1 药品与试剂: 粗吻海龙药材 2003年11月购自海南省海口市, 经李晓波教授鉴定为粗吻海龙 *T. serratus* (Temminck et Schlegel)的干燥全体, 凭证标本保存于上海交通大学药学院中药基因组学实验室。RPMI 1640 购自 Gibco 公司; 四氮唑盐(MTT)、磺酰罗单明 B(SRB)、Tris、SDS 购自 Sigma 公司; 95%乙醇、石油醚、醋酸乙酯、异丁醇、三氯醋酸、乙酸均为国产分析纯。

1.2 主要仪器: Autosystem (XL) GC-MS(美国 Perkin Elmer 公司); Multiskan MK3 酶标仪(Thermo Labsystems); CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Forma)、RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);

DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 细胞株: 人白血病细胞株 HL-60、人肝癌细胞株 BEL-7402、人肺癌细胞株 A-549 和小鼠白血病细胞株 P388 均由中国科学院上海药物研究所提供。

1.4 样品的制备: 粗吻海龙粉末 200 g, 95%乙醇超声提取 2 h, 滤过, 低温回收溶剂至干, 得粗吻海龙提取物(A); 同时另取 200 g 粗吻海龙粉末, 水超声提取 2 h, 滤过, 所得滤液用醋酸乙酯反复萃取后, 低温收尽溶剂, 得粗吻海龙的不含脂溶性成分的提取物(B); -20℃储存。筛选到的活性组分 A 悬浮于水中, 分别用石油醚、醋酸乙酯萃取, 低温收尽溶剂得组分 A<sub>1</sub>、组分 A<sub>2</sub>, 萃余母液低温收干溶剂得组分 A<sub>3</sub>。

1.5 活性测试: MTT 法<sup>[4]</sup>检测组分对 HL-60、P388 肿瘤细胞的生长抑制作用; SRB 法<sup>[4]</sup>检测组分对 BEL-7402、A-549 肿瘤细胞的生长抑制作用。

1.6 GC-MS 分析: 气相色谱条件: 色谱柱为 DB-5ht (30 mm×0.25 mm, 0.25 μm), 柱温为 80℃(1 min), 以 5℃/min 的程序升至 310℃, 进样室温度为 310℃, 不分流。载气为氦气(99.999%), 压力为 68.948×10<sup>3</sup> Pa, 流量为 1.0 mL/min。质谱条件: 离子源温度为 200℃, 接口温度为 300℃, 质谱离子源为 EI 源, 电子能量为 70 eV, 扫描范围为 20~550 m/z。所得质谱图经计算机数据处理和 NIST-98 标准质谱图库检索分析各组分, 按峰面积归一化法计算化学成分的质量分数。

### 2 实验结果

2.1 不同提取物的抗肿瘤活性: 粗吻海龙的 95%

收稿日期: 2006-10-18

基金项目: 上海-SK 研究发展基金资助项目(2003012-t); 国家自然科学基金项目(30672620)

作者简介: 王梦月(1973-), 男, 汉族, 博士, 从事中药学研究。

\* 通讯作者 李晓波(1963-), 女, 回族, 博士、教授、博士生导师。 Tel: (021)34204806 E-mail: xbli@sytu.edu.cn