

4 结论

研究表明,碱提山茱萸多糖 PFCCI 是由木糖和葡萄糖以 18.8: 81.2 的摩尔比聚合而成的杂多糖,其水溶性较好。对油脂抗氧化性能实验表明,该多糖具有较好的抗氧化能力,是一种较好的天然抗氧化剂:对猪油的抗氧化能力接近于 VC,稍弱于 TBHQ;对植物油的抗氧化能力与 VC 及 TBHQ 接近。以 $^{\circ}\text{OH}$ 清除剂苯甲酸和甘露醇为对照,用 Fenton 反应检测 PFCCI 对 $^{\circ}\text{OH}$ 的清除作用,三者对 $^{\circ}\text{OH}$ 的清除率达 50% 所需浓度为 18,330, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,说明该多糖对 Fenton 体系产生的羟基自由基有较强的清除作用;PFCCI 对邻苯三酚体系产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有一定的清除作用,但清除率低于相同条件下 VC 对超氧阴离子自由基的清除率,二者达 50% 清除率所需浓度分别为 35.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 22.7 $\mu\text{g}/$

mL

References

- [1] Pan Y, Wang T S. Review of research on constituents of *Fructus Corni* [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1998, 14(1): 61-62.
- [2] Wang Y M, Yang Y, Liu C P. Clinical application and pharmacological action of *Fructus Corni* [J]. *Henan J Tradit Chin Med* (河南中医杂志), 1999, 14(1): 61-62.
- [3] Zhu M Y, Huang Z M, Yang T B, et al. Development on healthcare beverage of *fructus Corni* [J]. *J Zhengzhou Institute Light Ind* (郑州轻工学院学报), 1998, 13(2): 66-70.
- [4] Dong Q, Zheng L Y, Fang J N. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo- and polysaccharides [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 31(9): 550-553.
- [5] Qin D A, Su D, Wang X L. Scavenging action to hydroxyl free radical of hesperidin [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 3(1): 396-398.
- [6] Ren D, Wang Y F, Yao Y X, et al. Influence of *Aloe* on superoxide anion chain reaction [J]. *Chin J Mod Med* (中国现代医学杂志), 1999, 9(6): 22-24.

长柄梭罗细胞毒活性部位的化学成分研究

朱 慧¹, 屠鹏飞^{1*}, 陈 琪², 徐安龙^{2*}

(1. 北京大学药学院中医药现代研究中心, 北京 100083; 2. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要:目的 对长柄梭罗 *Reevesia longipetiolata* 树皮具细胞毒活性的醋酸乙酯部分化学成分进行研究。方法 采用常压、加压硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相色谱进行分离和纯化,通过理化和波谱分析方法鉴定化合物结构。结果 从其醋酸乙酯部分分离得到 5 个化合物,分别鉴定为 β -谷甾醇(β -sitosterol, I)、胡萝卜苷(daucosterol, II)、白桦脂酸(betulinic acid, III)、羽扇豆醇(lupeol, IV)和(+)-儿茶素[(+)-catechin, V]。结论 5 个化合物均为首次从该属植物中分得,并分别讨论了它们的细胞毒活性。

关键词:长柄梭罗;细胞毒;化学成分

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0976-03

Studies on chemical constituents of cytotoxicity portion in bark of *Reevesia longipetiolata*

ZHU Hui¹, TU Peng-fei¹, CHEN Qi², XU An-long²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Modern Research Center of TCM, Peking University, Beijing 100083, China;

2. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract **Object** To study the chemical constituents of cytotoxicity portion in the bark of *Reevesia longipetiolata* Merr. et Chun. **Methods** The constituents were isolated and purified by various chromatographic methods, such as gel column chromatography under normal pressure and increased pressure, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC, and the structures were identified by physicochemical properties and spectral analysis. **Results** Five compounds were obtained in the ethyl acetate fractions and identified as β -sitosterol (I), daucosterol (II), betulinic acid (III), lupeol (IV) and (+)-catechin (V). **Conclusion** All above compounds are obtained from the plants of *Reevesia* Lindl. for the first time, and their cytotoxicity is discussed.

Key words *Reevesia longipetiolata* Merr. et Chun; cytotoxicity; chemical constituent

* 收稿日期: 2002-10-24

* 通讯作者 Tel (010) 82802750 E-mail pengfeitu@bim.u.edu.cn

长柄梭罗 *Reevesia longipetiolata* Merr. et Chun为梧桐科梭罗树属植物,分布于海南、广东、广西,生密林中^[1]。该属共有 14种 2变种,化学成分研究皆未见报道。海南民间曾有中医将长柄梭罗树皮用于癌症治疗。笔者对其树皮 70%乙醇提取物的石油醚、醋酸乙酯、正丁醇及水部分进行了体外抗肿瘤实验初筛。肿瘤细胞采用 96孔板培养噻唑蓝(MTT)染色法,酶联免疫检测仪测定 490 nm吸光度值,计算肿瘤细胞生长的半抑制浓度(IC₅₀)值。结果发现醋酸乙酯部分对人肝癌 Hep-G2细胞株 IC₅₀值为 50 μg/mL;正丁醇部分对人胃癌 Mgc细胞株 IC₅₀值为 40 μg/mL,对人肝癌 Hep-G2细胞株 IC₅₀值为 85 μg/mL。鉴于上述结果,本实验对其树皮 70%乙醇提取物的醋酸乙酯部分进行了化学成分研究,分离得到 5个化合物,分别为 β-谷甾醇(β-sitosterol, I)、胡萝卜苷(daucosterol, II)、白桦脂酸(betulinic acid, III)、羽扇豆醇(lupeol, IV)和(+)-儿茶素[(+)-catechin, V]。以上化合物均为首次从该属植物中分得。

1 仪器、试剂与材料

ELX800酶联免疫检测仪。熔点用 XT-4A型显微熔点仪(未校正)测定。AA-10R自动旋光仪。¹H-NMR和¹³C-NMR用 JEOL JEM-AL300(¹H-NMR, 300 MHz; ¹³C-NMR, 75 MHz)型核磁共振仪, TMS为内标。EI-MS为 AEI-MS-50质谱仪。美国 Waters公司高效液相色谱仪, Waters 2487紫外检测器,检测波长为 213 nm, Waters 600工作站。高效液相制备柱用美国 Prep Nova-pak[®] HR C₁₈柱(7.8 mm×300 mm)。流动相为甲醇-水(35:65),流速为 2.5 mL/min。二次制备时流动相为甲醇-水(25:75),流速为 3 mL/min。

长柄梭罗树皮采自海南省尖峰岭,经北京大学天然药物学系屠鹏飞教授鉴定为长柄梭罗 *R. longipetiolata* Merr. et Chun的树皮,标本存放在北京大学中医药现代研究中心标本室。

2 体外肿瘤细胞活性实验

2.1 样品制备:长柄梭罗树皮粗粉 100 g,用 8倍量 70%乙醇回流提取,每次 2 h,共提取 3次,合并提取液,减压浓缩至无醇味,悬于水中,依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取。分别将石油醚、醋酸乙酯、正丁醇及水部分浸膏干粉配制成 5 mg/mL的浓溶液。

2.2 方法:将肿瘤细胞株复苏,传代。取对数生长期细胞,稀释至约 1×10^5 个/mL,接种于 96孔板上,每

孔 100 μL, 37℃, 5% CO₂条件下培养 24 h。加入不同浓度样品液,每个浓度平行 3孔,并作阴性对照和空白对照。样品终浓度为 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/mL。培养 48 h后,加入 MTT(5 mg/mL), 20 μL/孔,培养 4 h后,用 DMSO溶解沉淀,于 490 nm波长下用酶联免疫检测仪检测吸光度值,并计算细胞存活率。以细胞存活率对样品浓度作图,求出 IC₅₀值。

3 提取与分离

长柄梭罗树皮粗粉 4.6 kg,用 8倍量 70%乙醇回流提取,每次 2 h,共提取 3次。合并提取液,减压浓缩至无醇味,悬浮于水中,依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取。醋酸乙酯萃取物 33.5 g经常压硅胶柱色谱,石油醚-丙酮(20:1→1:1)梯度洗脱,500 mL为 1流份,共收集 188流份。合并 29~37流份,浓缩,重结晶,得化合物 III 333.4 mg。合并 149~170流份,浓缩,重结晶,得化合物 II 63.0 mg。合并 8~26流份,再经反复硅胶柱色谱,石油醚-丙酮(50:1→0:1)梯度洗脱,得化合物 I 52.7 mg 和 V 10 mg。合并 139~143流份,再经 Sephadex LH-20多次纯化后,用 HPLC制备分离,并二次纯化得化合物 IV 9.1 mg。

4 鉴定

化合物 I:在石油醚-丙酮(1:1)中为白色针晶, mp 142℃~143℃。Liebermann-Burchard反应呈阳性。与 β-谷甾醇对照品共薄层, R_f值一致,混合熔点不下降。此化合物鉴定为 β-谷甾醇。

化合物 II:在丙酮中为白色粉末, mp 305℃(分解)。Liebermann-Burchard反应和 Molish 反应均为阳性。其¹H-NMR, ¹³C-NMR数据与文献报道^[2]的胡萝卜苷基本一致。确定此化合物为胡萝卜苷。

化合物 III:在氯仿-甲醇(2:1)中为白色片状晶体, mp 282℃~285℃。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 12.05(1H, brs, OH), 4.69(1H, brs, H-3α), 4.56(1H, brs, H-3β), 3.35(1H, H-3), 0.65, 0.76, 0.87, 0.93, 0.98, 1.64(6×CH₃)。 ¹³C-NMR δ 177.2(C-28), 150.3(C-20), 109.7(C-30), 76.8(C-3), 55.4(C-17), 54.9(C-5), 49.9(C-9), 48.5(C-19), 46.6(C-18), 42.0(C-14), 40.3(C-8), 39.2(C-1), 39.5(C-4), 38.5(C-13), 37.6(C-10), 36.7(C-22), 34.0(C-7), 31.7(C-16), 30.1(C-15), 29.2(C-21), 28.1(C-23), 27.2(C-2), 25.1(C-12), 20.5(C-11), 19.0(C-29), 18.0(C-6), 16.0(C-25), 15.9(C-

26), 15. 8(C-24), 14. 4(C-27)。 EI-MS(*m/z*): 456 [M⁺], 248, 207, 203, 189 以上氢谱、碳谱、质谱数据与文献报道^[3]的白桦脂酸基本一致。

化合物IV: 白色粉末, mp 217℃~ 219℃。 以上质谱、氢谱、碳谱数据与文献报道^[3]的羽扇豆醇基本一致

化合物V: 棕色粉末, mp 172℃~ 174℃。
[α]_D²⁴= + 15°(CH₃OH, c, 0. 13)。 ¹³C-NMR(DMSO-d₆) δ 156. 6(C-9), 156. 3(C-5), 155. 8(C-7), 144. 5(C-3'), 144. 5(C-4'), 130. 6(C-1'), 118. 1(C-2'), 115. 0(C-5'), 114. 5(C-6'), 98. 5(C-10), 95. 1(C-6), 94. 1(C-8), 78. 1(C-2), 65. 0(C-3), 28. 2(C-4) 以上碳谱数据与文献报道^[4]的(+)-儿茶素基本一致

5 讨论

Ratnayake等报道β胡萝卜素对肺癌 A-549 乳腺癌 MCF-7 结肠癌 HT-29的 LC₅₀值为 4. 73, 44. 39, 0. 44μg/mL^[5]。 另有文献^[6, 7]报道, 羽扇豆醇对鼠淋巴白血病 P-388和 Walker 256肿瘤体系有细胞毒作用, Shun-ichi等研究认为羽扇豆醇的抗癌活性与其选择性抑制拓扑异构酶II 的催化活性, 从而阻止 DNA解旋有关^[8]。 尤其值得关注的是白桦脂酸 1995年 Centofanti报道其特异性抗黑素瘤有效; Fulda近年来的研究表明白桦脂酸可能成为对神经外胚层肿瘤(包括神经母细胞瘤、成神经管细胞瘤、成胶质细胞瘤、尤因瘤)和黑素瘤的有效新制剂, 并研究了其作用机制^[9]; Setzer等实验得到白桦脂酸对 Hep-G2和 MDA-MB-231肿瘤细胞株的 LC₅₀值分别为 34. 0, 9. 61μmol/L^[10]。 结合已有资料及初

筛结果, 认为白桦脂酸可能为细胞毒活性主要成分。 长柄梭罗体外细胞毒活性具体由何种成分引起, 抑或各成分间的协同作用, 尚待进一步证实

References

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edit. *Flora Reipulicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus. 2(1). Beijing: Science Press, 1984.
- [2] Hisashi K, Noriko S, Akiko H, *et al.* Sterol glucoside from *Prunella vulgaris* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(7): 2351-2355.
- [3] Sholichin M, Yamasaki K, Kasai R, *et al.* ¹³C-NMR nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulin and betulinic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(3): 1006-1008.
- [4] Jeannette M, Anna R B, Ivano M. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri* [J]. *Pharm Acta Helv*, 1995, 70(3): 223-226.
- [5] Ratnayake S, Fang X P, Anderson J E, *et al.* Bioactive constituents from the twigs of *Asimina Parviflora* [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(10): 1462-1467.
- [6] Miles D H, Kokpol U. Tumor inhibitors. 2 Constituents and antitumor activity of *Sarracenia flava* [J]. *J Pharm Sci*, 1976, 65(2): 284-285.
- [7] Sheth K, Bianchi E, Wiedhopf R, *et al.* Antitumor agents from *Alnus oregona* (Betulaceae) [J]. *J Pharm Sci*, 1973, 62(1): 139-140.
- [8] Wada S, Iida A, Tanaka R. Screening of triterpenoids isolated from *Phyllanthus flexuosus* for DNA topoisomerase inhibitory activity [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(12): 1545-1547.
- [9] Fulda S, Debaton, K M. Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors [J]. *Med Pediatr Oncol*, 2000, 35(6): 616-618.
- [10] Setzer W N, Setzer M C, Bates R B, *et al.* Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from Paluma, north Queensland, Australia [J]. *Planta Med*, 2000, 66(2): 176-177.

黄花败酱化学成分

姜泓¹, 初正云¹, 王虹霞², 李琳^{1*}, 刘云峰^{1*}

(1. 辽宁中医学院, 辽宁 沈阳 110032 2 营口中药厂, 辽宁 营口 115003)

摘要: 目的 自黄花败酱 *Patrinia scabiosaeifolia* Fisch.的全草中分离得到一个新化合物。 方法 利用各种色谱技术进行分离纯化, 通过理化方法及光谱分析 (UV, IR, HRMS, ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FGCSY, DEPT, FGHMQC, FGHMBC)鉴定化学结构。 结果 鉴定为齐墩果酸-3-Oβ-D-葡萄糖吡喃糖基-(1→3)-α-L-阿拉伯吡喃糖苷 (3-Oβ-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl oleanolic acid) 结论 该化合物是一新的皂苷类化合物。

关键词: 黄花败酱; 皂苷

中图分类号: R284. 1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253- 2670(2003) 11- 0978- 03

收稿日期: 2003-03-13

基金项目: 辽宁省教委课题 (226002)

作者简介: 姜泓, 女, 讲师, 辽宁中医学院生药学在读博士。

* 辽宁中医学院中药系 96级学生

Tel (024) 86237958-52051