

化合物 VI: 白色固体, 易溶于氯仿, ESI-TOFMS m/z : 333 $[M+H]^+$, 355 $[M+Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 3.61 (1H, m, H-3), 3.66 (1H, m, H-12), 6.98 (1H, brs, H-16), 0.88 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 2.39 (3H, s, H-21)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 36.7 (t, C-1), 31.5 (t, C-2), 71.2 (t, C-3), 38.0 (t, C-4), 44.9 (d, C-5), 28.5 (t, C-6), 31.3 (t, C-7), 32.6 (d, C-8), 53.2 (d, C-9), 35.6 (s, C-10), 29.3 (t, C-11), 73.7 (d, C-12), 52.1 (s, C-13), 54.1 (d, C-14), 32.2 (t, C-15); 149.8 (d, C-16), 155.5 (s, C-17), 11.7 (q, C-18), 12.1 (q, C-19), 199.0 (s, C-20), 26.7 (q, C-21)。根据 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 2D-NMR 以及参考文献数据^[16], 推断化合物 VI 为 3 β , 12 β -二羟基-孕烷-16-烯-20-酮。

化合物 VII: 白色固体, 易溶于氯仿, ESI-TOFMS m/z : 333 $[M+H]^+$, 355 $[M+Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 4.08 (1H, m, H-3), 3.67 (1H, m, H-12), 6.99 (1H, brs, H-16), 0.88 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 2.39 (3H, s, H-21)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 35.7 (t, C-1), 29.1 (t, C-2), 66.5 (d, C-3), 31.9 (t, C-4), 39.2 (d, C-5), 28.3 (t, C-6), 31.3 (t, C-7), 32.6 (d, C-8), 53.2 (d, C-9), 36.2 (s, C-10), 29.4 (t, C-11), 73.7 (d, C-12), 52.1 (s, C-13), 54.1 (d, C-14), 32.1 (t, C-15), 149.9 (d, C-16), 155.5 (s, C-17), 11.0 (q, C-18), 11.7 (q, C-19), 199.1 (s, C-20), 26.7 (q, C-21)。与化合物 VI 对照, ^{13}C -NMR 谱 C-3 信号从 δ 71.2 位移至 δ 66.5, 其他数据基本一致, 所以确定化合物 VII 为 3 α , 12 β -二羟基-孕烷-16-烯-20-酮。

References:

- [1] Cheenoracha S, Karalai C, Pat-a-pa Y, *et al.* New cytotoxic cardenolide glycoside from the seeds of *Cerbera manghtsa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(8): 1023-1025.
- [2] Chang L C, Gills J J, Bhat K P L, *et al.* Activity-guided isolation of constituents of *Cerbera manghas* with antiproliferative and antiestrogenic activities [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10(21): 2431-2434.
- [3] Yamauchi T, Abe F, Wan Alfred S C. Cardenolide monoglycosides from the leaves of *Cerbera odollam* and *Cerbera manghas* (*Cerbera* Ⅱ) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(7): 2744-2749.
- [4] Yamauchi T, Abe F, Wan Alfred S C. Studies on *Cerbera* N. Polar cardenolide glycosides from the leaves of *Cerbera odollam* and *Cerbera manghas* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(12): 4813-4818.
- [5] Yamauchi T, Abe F, Wan Alfred S C. Studies on *Cerbera* V. Minor glycosides of 17-digitoxigenin from the stems of genus *Cerbera* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(12): 4993-4995.
- [6] Abe F, Yamauchi T, Wan Alfred S C. *Cerbera* N. Lignans related to olivil from genus *Cerbera* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(2): 795-799.
- [7] Abe F, Yamauchi T, Wan Alfred S C. Studies on *Cerbera* VII. Normonoterpenoids and their allopuranosides from the leaves of *Cerbera* species [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(10): 2639-2642.
- [8] Abe F, Yamauchi T. 10-Carboxyloganin, normonoterpenoid glucosides and dinormonoterpenoid glucosides from the leaves of *Cerbera manghas* (studies on *Cerbera* 10) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44(10): 1797-1800.
- [9] Abe F, Yamauchi T, Wan Alfred S C. *Cerbera* Part 7. Sesqui-, sester- and triligans from stems of *Cerbera manghas* and *C. odollam* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(11): 3627-3631.
- [10] Abe F, Yamauchi T, Wan Alfred S C. *Cerbera* Part 9. Cereberalignans J-N, oligolignans from *Cerbera manghas* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(12): 3473-3476.
- [11] Yamauchi T, Abe F, Wan Alfred S C. *Cerbera* Part 10. 10-O-Benzoyltheveside and 10-dehydro-geniposide from the leaves of *Cerbera manghas* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(7): 2327-2328.
- [12] Takeda Y, Okada Y, Masuda T, *et al.* New megastigmane and tetraketid from the leaves of *Euscaphis japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(5): 752-754.
- [13] Yamano Y, Masayoshi I T O. Synthesis of optically active vomifolol and roseoside stereoisomers [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(5): 541-546.
- [14] Calis I, Kuruuzun U A, Piergiorgio A, *et al.* (6S)-Hydroxy-3-oxo-a-ionol-glucosides from *Capparis spinosa* fruits [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(4): 451-457.
- [15] Cordell S Y, Geofferey A. Cytotoxic steroids of *Gelsemium sempervirens* [J]. *J Nat Prod*, 1987, 50(2): 195-198.
- [16] Yu D Q, Yang J S. *Analytical Chemistry Notebook* (分析化学手册) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1999.

苦瓜子蛋白分离纯化及其理化性质鉴定

李 璟, 温博贵*, 陈爱云, 陈玮莹, 吴健宜, 李冠武

(汕头大学医学院 病理系肿瘤分子生物学研究室, 广东 汕头 515041)

摘要: 目的 建立苦瓜子蛋白分离纯化的方法。方法 应用阳离子交换色谱和凝胶过滤色谱 Hiprep 16/10

收稿日期: 2006-03-30

基金项目: 广东省教育厅自然科学研究项目 (Z02041)

作者简介: 李 璟 (1972-), 山西人, 博士, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

* 通讯作者 温博贵 Tel: (0754) 8900473 E-mail: bgwen@stu.edu.cn

SOURCE 30S 和 HiLoad 26/60 Superdex 75 预装柱从苦瓜种仁中分离纯化苦瓜子蛋白。结果 分离纯化出 14 个组分的苦瓜子蛋白,它们均为碱性蛋白质,相对分子质量在 $(1.3 \sim 2.9) \times 10^4$,等电点在 9.3~9.6。结论 应用本法能获得供生物活性研究用苦瓜子蛋白组分。

关键词: 苦瓜; 蛋白组分; 纯化

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)10-1450-05

Separation and purification of proteins in seeds of *Momordica charantia* and identification of their physicochemical characters

LI Jing, WEN Bo-gui, CHEN Ai-yun, CHEN Wei-ying, WU Jian-yi, LI Guan-wu

(Laboratory for Molecular Biology of Tumor, Department of Pathology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China)

Abstract: Objective A method was developed for the isolation and purification of proteins in the seeds of *Momordica charantia*. **Methods** The proteins were isolated and purified from the seeds of *M. charantia* by a procedure involving extracting with acetones and a series of chromatographies on Hiprep 16/10 SOURCE 30S and HiLoad 26/60 Superdex 75. **Results** Fourteen protein fractions were purified from the seeds of *M. charantia*. They are all basic proteins with the molecule weight range $(1.3 \sim 2.9) \times 10^4$ and isoelectric point range 9.3~9.6. **Conclusion** The bioactive proteins can be purified from the seeds of *M. charantia* by a procedure involving extracting with acetone and a series of chromatographies on Hiprep 16/10 SOURCE 30S and HiLoad 26/60 Superdex 75.

Key words: *Momordica charantia* L.; protein fractions; purification

苦瓜 *Momordica charantia* L. 为葫芦科苦瓜属一年生草质藤本植物,性味苦寒,具有清热解暑、滋养强壮等功效,成熟果实常作蔬菜食用,在我国、东南亚、土耳其等地均有广泛的栽种和药用历史。土耳其人自古以来应用苦瓜疗伤和治疗消化性溃疡^[1],印第安人也有应用苦瓜治疗疟疾等传染性疾病的病史^[2]。国内外大量研究证实,苦瓜具有抗感染^[2~4]、降血糖^[5~7]、抗肿瘤^[8~10]和抗 HIV 病毒^[11,12]的功效。苦瓜因其潜在的药用价值日益引起国内外学者的关注,人们期望从苦瓜中提取有效的生物活性物质以用于治疗肿瘤、糖尿病和艾滋病。

本实验应用阳离子交换和凝胶过滤色谱对苦瓜子蛋白的丙酮粗提物进行纯化,并对其基本理化性质进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂:新鲜苦瓜产自潮汕地区,葫芦科苦瓜属一年生草质藤本植物。蛋白质标准品(相对分子质量 $1.9 \times 10^4 \sim 1.19 \times 10^5$)为 MBI 公司产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺为 BBI 公司产品;甘氨酸、SDS、Tris、过硫酸铵、TEMED 为 Amresco 公司产品;两性电解质(Ampholytes, pH3~10)和考马斯亮蓝 R250 为 Sigma 公司产品;考马斯亮蓝 G250 购自华美生物工程公司;牛血清白蛋白(BSA)为 B. M 公司产品;NP-40 为 Fluka 公司产品。

1.2 仪器设备:AKTA 蛋白质纯化仪购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;Hiprep 16/10 SOURCE 30S 预装柱和 HiLoad 26/60 Superdex 75 预装柱购自 Pharmacia Biotech 公司;MAXI 冻干机购自 Bio-Rad 公司;GL-20B 调整冷冻离心机为上海安亭科学仪器厂产品;Bio-Rad Mini-protein Ⅲ cell 电泳槽;Bio-RAD Model Power/PAC 3000 电泳仪;DY 600 型中压电泳仪为汕头市广播仪器厂产品;岛津 UV-120-02 紫外分光光度计;Bio-Rad Universal HOOD SN 75S 凝胶成像系统。

1.3 苦瓜子蛋白的分离纯化

1.3.1 丙酮沉淀苦瓜子蛋白:新鲜苦瓜子去壳取仁后,称取湿重为 250 g 的苦瓜子仁以预冷的 500 mL 0.85% NaCl (含 2 mmol/L 巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF)浸泡并机械捣烂,4 ℃放置过夜。离心(6 000 r/min, 10 min),上清液以 0.8 倍体积的冷丙酮沉淀,离心(6 000 r/min, 10 min)后取上清液再以 1.2 倍体积的冷丙酮沉淀,离心(6 000 r/min, 30 min)后沉淀部分以双蒸水溶解,置于透析袋中 4 ℃对双蒸水透析 24 h,再对 0.05 mol/L Na_2PO_4 (pH 5.0)缓冲液透析 24 h。

1.3.2 阳离子交换色谱:取上述透析过的苦瓜子蛋白丙酮粗提物上样于 Hiprep 16/10 SOURCE 30S 阳离子交换色谱柱,以 0.05 mol/L NaH_2PO_4 (pH

5.0)和 0.05 mol/L Na_2HPO_4 (pH 9.0, 含 0.3 mol/L NaCl) B 液)做步进梯度洗脱,即 0%~10% B 液 1 个柱体积(CV),10%~30% B 液 10 CV,30%~100% B 液 6 CV,体积流量 2 mL/min。应用 SDS-PAGE 电泳检测各洗脱组分,将相同的组分合并,聚乙二醇浓缩,Bradford 法测定蛋白质的量。

1.3.3 凝胶过滤:将上述阳离子交换柱洗脱的苦瓜子蛋白组分上样于 HiLoad 26/60 Superdex 75 色谱柱进行凝胶过滤,经 0.05 mol/L 磷酸缓冲液[含 0.1 mol/L NaCl (pH 6.8)]洗脱,体积流量 2 mL/min。分别收集洗脱峰蛋白组分,SDS-PAGE 电泳检测各洗脱组分,将相同的组分合并,冷冻干燥。

1.4 SDS-PAGE 测定苦瓜子蛋白质相对分子质量:取苦瓜子蛋白丙酮粗提物、纯化各阶段的苦瓜子蛋白样品和最后的纯化产物 20 μL (大约 20 μg 蛋白)在 15%分离胶上电泳,电压 40 V,电泳 4 h。凝胶硝酸银染色,后经凝胶成像系统扫描储存,并计算苦瓜子蛋白的表观相对分子质量。

1.5 等电聚焦法(IEF)测定苦瓜子蛋白的等电点(pI)^[13]:上样量为每管 200 μg 蛋白。

1.6 苦瓜子蛋白的双向凝胶电泳:按文献方法^[13],电泳条件为 40 V,4 h。

2 结果

苦瓜子蛋白丙酮粗提物经 Hiprep 16/10 SOURCE 30S 阳离子交换柱洗脱后,得到 6 个主要的色谱峰(图 1),经 SDS-PAGE 显示,均为不均一的蛋白质混合物。将上述阳离子交换柱洗脱蛋白质组分分别在 HiLoad Superdex 75 柱上进行凝胶过滤:(1)HP1 经凝胶过滤后得到 3 个色谱峰。经 SDS-PAGE 鉴定,峰 HP1-751 为不均一的蛋白质混合物,含两个主要蛋白质成分,表观相对分子质量(下同)分别为 2.8×10^4 、 1.5×10^4 ,峰 HP1-753 显示为均一蛋白质,相对分子质量为 1.4×10^4 。(2)HP2 经凝胶过滤后得到 2 个色谱峰,经 SDS-PAGE 鉴定,峰 HP2-751 有两个主要蛋白质成分,相对分子质量分别为 2.9×10^4 、 1.5×10^4 ,其中 2.9×10^4 蛋白质质量远高于 1.5×10^4 蛋白质。峰 HP2-752 显示为均一蛋白质,相对分子质量为 1.5×10^4 。(3)HP3 经凝胶过滤后得到 3 个色谱峰,峰 HP3-751 在 SDS-PAGE 图谱中显示主要的 3 个蛋白质条带,其中量最多的蛋白质成分相对分子质量为 2.8×10^4 ,峰 HP3-752 含有相对分子质量分别为 2.9×10^4 和 1.4×10^4 的两个蛋白组分,峰 HP3-753 显示为均一蛋白质条带,相对分子质量为 1.5×10^4 。(4)HP4 经凝胶过滤

后得到 1 个色谱峰,经 SDS-PAGE 电泳,凝胶银染在 1.3×10^4 处显示为一负染条带,考马斯亮蓝染色则显示均一蛋白质条带,相对分子质量 1.3×10^4 ,可见此蛋白质为不嗜银的蛋白。(5)HP5 经凝胶过滤后得到 3 个色谱峰,在 SDS-PAGE 图谱中均显示为均一蛋白质条带,相对分子质量分别为 1.9×10^4 、 2.2×10^4 和 1.4×10^4 。(6)HP6 经凝胶过滤后也得到 3 个色谱峰,经 SDS-PAGE 鉴定,含有两个蛋白质条带,相对分子质量分别为 2.2×10^4 和 1.8×10^4 ,HP6-752 在 SDS-PAGE 图谱中显示为均一蛋白质条带,相对分子质量为 2.2×10^4 ,HP6-753 显示为两个蛋白质条带,相对分子质量分别为 2.1×10^4 和 1.3×10^4 。

苦瓜子蛋白 HP2-751 和 HP3-751 在双向电泳图谱中显示为单个斑点。应用等电聚焦(IEP)测定了苦瓜子蛋白纯化所得 9 个组分的等电点(pI),见表 1。

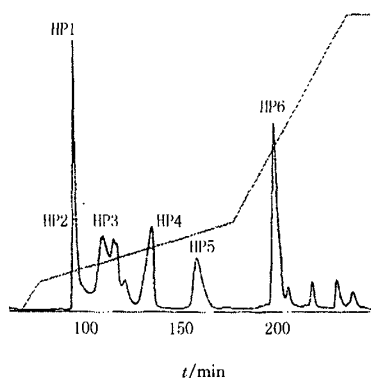


图 1 Hiprep 16/10 SOURCE 30S 阳离子交换色谱图

Fig. 1 Hiprep 16/10 SOURCE 30S Chromatogram of extract from *M. charantia* seeds by acetone

表 1 苦瓜子蛋白组分的等电点

Table 1 Isoelectric point of protein fractions from *M. charantia* seeds

名称	PI
HP2-751	9.4
HP2-752	9.0
HP3-751	9.4
HP3-752	9.4
HP3-753	9.4
HP4-751	9.3
HP5-751	9.3
HP5-753	9.3
HP6-752	9.6

3 讨论

直到目前为止,从苦瓜中分离的所有具有抗肿瘤活性的蛋白质都属于 I 型核糖体失活蛋白,包括

MAP30、 α -momorcharin、 β -momorcharin、momordin-I、momordin-III、 γ -momorcharin 均为单链碱性蛋白质。纯化的方法多用丙酮分级沉淀、CM-Sephadex 离子交换色谱以及 Sepharose 6B-CL 和 Sephadex G-100 凝胶过滤色谱。叶国杰等^[14]应用丙酮分级沉淀、CM-Sephadex C-50 离子交换色谱和 Sephadex G-75 凝胶过滤色谱法,从苦瓜子中分离纯化了 α -momorcharin 和 β -momorcharin,测得它们的相对分子质量分别为 28 625 和 29 076,等电点分别为 9.10 和 9.32。齐文波等^[15]应用 Sepharose 6B 亲和色谱、CM-23 离子交换色谱和 Sephadex G-75 凝胶过滤色谱亦得均一成分的 α -momorcharin 和 β -momorcharin,他们测得的 α -momorcharin 和 β -momorcharin 的等电点分别为 8.9 和 9.1。Valbonesi 等^[16]应用 S-Sepharose 柱、Sephadex G-50 柱、CM-Sepharose 柱和 Red Sepharose 柱成功分离 momordin I 和 momordin II。这些分离纯化苦瓜蛋白的方法均应用了 CM-Sepharose 或 CM-Sephadex C-50,为弱阳离子交换剂,虽然可以很好地分离苦瓜蛋白,但是柱体积随着离子强度和 pH 的变化而有很大的改变,每次纯化完毕后必须将柱重装才能保证良好的柱效,这给实验带来了一定的困难。

本实验选用 Hiprep 16/10 SOURCE 30S 预装柱,既具有很高的柱效,柱体积又不随离子强度和 pH 值而发生变化,无须很高的离子强度(小于 0.3 mol/L NaCl)即可使苦瓜子蛋白的丙酮粗提物得到很好的分离。文献报道应用阳离子交换色谱分离苦瓜蛋白均采用线性离子梯度洗脱^[14~16],发现在离子强度低于 30% B 液(0.3 mol/L NaCl)时,大部分苦瓜子蛋白被洗脱下来,但是彼此重叠,因此引入了步进梯度洗脱,使苦瓜子蛋白得到很好的分离。经 Hiprep 16/10 SOURCE 30S 阳离子交换色谱,得到 6 个主要的色谱峰:HP1、HP2、HP3、HP4、HP5 和 HP6。经 SDS-PAGE 鉴定,它们均为不均一的蛋白质混合物。进一步将阳离子交换色谱得到的 6 个色谱峰分别在 HiLoad 26/60 Superdex 75 柱(分离蛋白质相对分子质量范围 3 000~70 000)上进行凝胶过滤色谱,最终得到了 14 个蛋白质组分。其中 HP1-753、HP2-752、HP3-753、HP4、HP5-751、HP5-752、HP5-753 和 HPL6-752 均显示为单一蛋白条带,相对分子质量分别为: 1.4×10^4 、 1.5×10^4 、 1.5×10^4 、 1.3×10^4 、 1.9×10^4 、 2.2×10^4 、 1.4×10^4 和 2.2×10^4 ,测得它们的等电点分别为:9.1(HP2-752);9.4(HP3-753);

9.3(HP4-751);9.3(HP5-751);9.3(HP5-753);9.6(HP6-752)。这些蛋白质的相对分子质量与等电点与文献报道^[14~19]有所不同,但它们均为碱性蛋白质。HP2-751 含有两个主要的蛋白质成分,相对分子质量分别为 2.9×10^4 和 1.5×10^4 ,但是以 2.9×10^4 蛋白为主。HP3-751 以 2.8×10^4 蛋白质量最多。等电聚集测得其 PI 均为 9.4,相对分子质量与文献报道^[14,15,17~20]的苦瓜蛋白 α -momorcharin 和 β -momorcharin 类似,但是等电点略有不同,他们是否为已知的苦瓜蛋白质尚需进一步纯化后,进行氨基酸序列测定方可得知。本工作所纯化的苦瓜子蛋白,其抗肿瘤活性组分的研究将另文发表。

References:

- [1] Gurbuz I, Akyuz C, Yesilada E, et al. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 71: 77-82.
- [2] Munoz V, Sauvain M, Bourdy G, et al. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part I. Antimalarial activity of some plant used by Mosekene Indians [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 69: 139-155.
- [3] Omeregbe R E, Ikuebe O M, Ihimire I G. Antimicrobial activity of some medicinal plants extracts on *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, and *Shigella dysenteriae* [J]. *Afr J Med Sci*, 1996, 25: 373-375.
- [4] Cowan M M. Plant products and antimicrobial agents [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1999(12): 564-582.
- [5] Ahmad N, Hassan M R, Halder H, et al. Effect of *Momordica charantia* (Karolla) extracts fasting and postprandial serum glucose levels in NIDDM patients [J]. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 1999, 25: 11-13.
- [6] Raza H, Ahmed I, John A, et al. Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic fed with *Momordica charantia* fruit extract [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2000, 14: 131-139.
- [7] Matsuda H, Murakami T, Shimada H, et al. Inhibitory mechanism of oleanolic 3-O-monodesmosides on glucose absorption in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20: 717-719.
- [8] Lee-Huang S, Huang P L, Sun Y, et al. Inhibition of MAD-MB-231 human breast tumor xenografts and HER2 expression by anti-tumor agents GAP30 and MAP30 [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20: 653-659.
- [9] Singh A, Singh S P, Bamezai R. *Momordica charantia* (Bitter Gourd) peel, pulp, seed and whole fruit extract inhibits mouse skin papillomagenesis [J]. *Toxicol Lett*, 1998, 94: 37-46.
- [10] Lee D K, Kim B, Lee S G, et al. Momordins inhibit both AP-1 function and cell proliferation [J]. *Anticancer Res*, 1998, 18: 119-124.
- [11] Zheng Y T, Ben K L, Jin S W. Alpha-momorcharin inhibits HIV-1 replication in acutely but not chronically infected T-lymphocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, 20: 239-243.
- [12] Lee-Huang S, Huang P L, Huang P L, et al. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP30 [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1995, 92: 8818-8822.
- [13] Ausubel F M, Robert E K, Seidman J G, et al. Short protocols in Molecular Biology [M]. USA: John Wiley & Sons Inc, 1995.
- [14] Ye G J, Qian R Q, Lu B Y, et al. Isolation and characteriza-

- tion of momorcharins [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 1998, 56: 1135-1144.
- [15] Qi W B, Xu Z P, Xu Y T, *et al.* A study on isolation, purification and antitumour activity of momorcharin [J]. *Ion Exch Adsorpt* (离子交换和吸附), 1999, 15: 59-63.
- [16] Valbonesi P, Barbieri L, Bolognesi A, *et al.* Preparation of highly purified Momordin I without ribonuclease activity [J]. *Life Sci*, 1999, 65: 1485-1491.
- [17] Lee-Huang S, Huang P L, Nara P L, *et al.* MAP30, a new inhibitor of HIV-1 infection replication [J]. *FEBS Lett*, 1990, 272: 12-18.
- [18] Ho W K K, Liu S C, Shaw P C, *et al.* Cloning of the cDNA of alpha-momorcharin: a ribosome inactivating protein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1088: 311-314.
- [19] Ortigan M, Better M. Momordin I, a ribosome inactivating protein from *Momordica balsamina*, is homologous to other plant proteins [J]. *Nucleic Acid Res*, 1992, 20: 4662-4662.
- [20] Pu Z, Lu B Y, Liu W Y, *et al.* Characterization of the enzymatic mechanism of gamma-momorcharin, a novel ribosome-inactivating protein with lower molecular weight of 11 500 purified from the seeds of bitter gour (*Momordica charantia*) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229: 287-294.

东北红豆杉针叶中两个双重排紫杉烷内酯化化合物的结构鉴定

李力更¹, 涂光忠², 金怡珠², 曹聪梅¹, 张媛丽¹, 史清文^{1*}

(1. 河北医科大学药学院 天然药物化学教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 北京微量化学研究所, 北京 100091)

摘要:目的 研究东北红豆杉 *Taxus cuspidata* 针叶中的化学成分。方法 采用硅胶柱色谱及制备薄层色谱分离、纯化化学成分, 用一维和二维核磁共振技术鉴定化合物结构。结果 从东北红豆杉针叶的甲醇提取物中分离出两个罕见的双重排紫杉烷内酯类化合物 wallifoliol (I) 和 tasumatrol H (II)。结论 此两种化合物为首次从东北红豆杉中分离得到, 在氘代氯仿溶液中化合物 I 在室温下可以转化成 5 α -乙酰基-2 α -苯甲酰氧基-4 α , 7 β , 9 α , 13 α , 20-五羟基-11(15 $\rightarrow$ 1), 11(10 $\rightarrow$ 9)双重排紫杉烷-11-烯-10, 15-内酯(II)。

关键词: 东北红豆杉; 紫杉科; 双重排紫杉烷内酯

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)10-1454-05

Structural identification of two bisabeotaxane lactones from needles of *Taxus cuspidata*

LI Li-geng¹, TU Guang-zhong², JIN Yi-zhu², CAO Cong-mei¹, ZHANG Man-li¹, SHI Qing-wen¹

(1. Department of Medicinal Natural Product Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Beijing Institute of Microchemistry, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To study chemical constituents from the needles of *Taxus cuspidata*. **Methods**

Chemical constituents were isolated by column chromatography and preparative TLC. The structures were identified on the basis of 1D- and 2DNMR spectral analyses. **Results** Two rare bisabeotaxane lactones were isolated from the methanol extract of *T. cuspidata* needles. The structures were established as 4 β -acetoxy-2 α -benzoyloxy-7 β , 9 α , 13 α -trihydroxy-5, 20-epoxy-11 (15 $\rightarrow$ 1), 11 (10 $\rightarrow$ 9) bisabeotaxa-11-en-10, 15-lactone (wallifoliol) (I) and 5 α -acetoxy-2 α -benzoyloxy-4 α , 7 β , 9 α , 13 α , 20-pentahydroxy-11 (15 $\rightarrow$ 1), 11 (10 $\rightarrow$ 9) bisabeotaxa-11-en-10, 15-lactone (tasumatrol H) (II). **Conclusion** Both of them are isolated from this plant for the first time. Compound I can be converted into 20-acetoxy-2 α -benzoyloxy-4 α , 5 α , 7 β , 9 α , 13 α -pentahydroxy-11 (15 $\rightarrow$ 1), 11(10 $\rightarrow$ 9) bisabeotaxa-11-en-10, 15-lactone (II) in CDCl₃ solution, but it is stable in acetone-d₆ solution at ambient temperature.

Key words: *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.; Taxaceae; bisabeotaxane lactones

由于紫杉醇对乳腺癌和卵巢癌的神奇疗效、独特的抗癌机制、新颖的结构及有限的资源,引起全世界的研究者对紫杉类化合物的强烈关注。尽管已有

超过 400 个紫杉烷类化合物报道^[1],但是紫杉醇的生物合成途径目前仍未搞清楚,而且不断有新的紫杉烷类化合物被分离得到^[2,3]。东北红豆杉 *Taxus*

收稿日期: 2006-03-26

基金项目: 教育部国家留学回国人员科委基金项目 (2003AA2Z352)

作者简介: 李力更 (1963-), 男, 河北唐山人, 副教授, 南开大学化学系毕业, 长期从事天然药物化学的教学、科研工作。

* 通讯作者 史清文 Tel: (0311)86265634 E-mail: qing_wen@hotmail.com