

黄荆子抗肿瘤有效部位化学成分研究

申 瑾,曾光尧,谭健兵,李妍岚,谭桂山,周应军*

(中南大学药学院,湖南 长沙 410013)

摘要:目的 研究黄荆子 *Vitex negundo* 抗肿瘤的有效部位及化学成分。方法 采用 MTT 法进行体外抗肿瘤活性筛选;采用裸鼠移植瘤实验进行体内抗肿瘤活性验证;采用多种色谱技术进行分离纯化,经理化性质及波谱数据分析进行结构鉴定。结果 从有效部位中分离并鉴定了 8 个化合物:对羟基苯甲酸()、3,4-二羟基苯甲酸()、芥子醛()、阿魏醛()、丁香酸()、6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-(3*R*,4*S*)-2-醛基萘()、6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-5-甲氧基-3,4-二氢-(3*R*,4*S*)-2-醛基萘()、3-甲氧基-4-羟基苯甲酸()。结论 黄荆子醋酸乙酯萃取部位为抗肿瘤的有效部位,化合物 、 为首次从该属植物中分离得到。

关键词:黄荆子;抗肿瘤;有效部位;酚类成分

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0033-04

黄荆 *Vitex negundo* L. 为被子植物马鞭草科的植物,主要分布在我国的西南和东南地区。黄荆的果实为药用部位,其味苦、辛,性温。具有止咳平喘,健脾止泻的功效。现代药理实验表明,黄荆子具有抗菌及抗氧化作用。黄荆子的化学成分研究主要集中在黄酮类化合物、二萜类化合物和木脂素类化合物。笔者首次对黄荆子抗肿瘤的有效部位进行筛选,并进行有效部位化学成分的研究,从中得到 8 种成分,利用 NMR、MS 等光谱技术鉴定了其结构,且芥子醛()、阿魏醛() 为首次从该植物中分离得到。

1 仪器与材料

SHAN 游标卡尺(桂林量具刀具厂,测量精度符合 GB1214-85 标准,测量范围 0~125 mm,读数值:0.02 mm 86 量制桂字 03000110 号)。HANG-PINCJA1003 型皿式分析电子天平(上海天平仪器厂,准确度等级:分度值 1 mg,最大称量值 100 g,许可证号码:00000156)。Bonso^R TCS-200A 型动物电子称(武汉自动化仪表厂,准确度等级:分度值 1 g,最大称量 200 g,量制鄂字 01000127)。

AVATAR 360FT-IR 红外光谱测定仪(KBr 压片);岛津 UV 2450 型紫外扫描仪;Varian-INOVA-400FT 型核磁共振仪(TMS 为内标),其中 ¹H-NMR 在 400 MHz 下测定,¹³C-NMR 在 100 MHz 下测定;柱色谱硅胶(100~200 目,300~400 目)和薄层色谱硅胶(GF254)(青岛海洋化工厂生产);葡聚糖凝胶 L H-20(Sigma 公司);聚酰胺(30~

60 目,60~80 目)(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂)。

肿瘤细胞株:人乳腺癌(MCF-7)细胞购自中国典型培养物保藏中心。

药材由中南大学药学院谭桂山教授鉴定为 *Vitex negundo* L.。

2 实验方法

2.1 提取与分离:称取黄荆子 10 kg 用 40%乙醇回流提取 3 次,提取液减压浓缩,向浓缩液中加入 10% HCl 溶液调 pH 值为 3.5,静置过夜,倾出上清液,沉淀用 30~60 目的聚酰胺拌样,与上清液一起上 60~80 目的聚酰胺柱,依次用水,40%、60%、95%乙醇溶液洗脱,分别减压回收溶剂至干,共得到 4 个部位。40%乙醇洗脱部位用 30~60 目的聚酰胺拌样,上 60~80 目的聚酰胺柱,依次用水饱和的醋酸乙酯和甲醇洗脱,分别减压回收溶剂至干,共得到 2 个部位。醋酸乙酯部位进行 Sephadex L H-20 凝胶柱色谱,甲醇-水梯度洗脱,得到 3 个部分;10%甲醇洗脱部分 A(21 g)、40%甲醇部分 B(43 g)、甲醇部分(6 g)。

A 部分经大孔树脂 HPD-100 柱分离,洗脱剂依次为水,10%、20%、30%、40%、50%和 60%乙醇。TLC 检测合并,共得到 7 个组分(A1~7)。将 A-2 部分减压回收至无醇味,用醋酸乙酯萃取。将醋酸乙酯层浓缩后经 Sephadex L H-20 纯化得到化合物(90 mg);将 A-4 部分减压回收至无醇味,析晶,滤过后用甲醇重结晶得到化合物(360 mg);将 A-

5 部分减压回收至无醇味,用石油醚-醋酸乙酯(1:1)混合溶剂萃取,有机层用 100~200 目的硅胶拌样,干法上 300~400 目的硅胶柱,石油醚-醋酸乙酯(4:1)为洗脱剂,合并流份 64~68 得到化合物 (7 mg);将 A-7 部分减压回收至无醇味,用醋酸乙酯萃取,将醋酸乙酯层浓缩至小体积,通过制备 TLC 得到化合物 (12 mg) 和 (22 mg)。

B 部分经 HW-C40 凝胶柱,依次用水,30%、40%、60% 甲醇和甲醇洗脱。水洗部分经 MDS-5 反相柱色谱,20% 甲醇水溶液洗脱,合并相同组分并浓缩,析晶得到化合物 (26 mg);40% 甲醇洗脱部分浓缩后放置过夜,析出固体,滤过后,用甲醇重结晶固体得到化合物 (11.3 g),滤液用 80~100 目聚酰胺拌样,经 80~100 目聚酰胺柱色谱,氯仿-甲醇(60:1)洗脱,得化合物 (804 mg)。

2.2 抗肿瘤活性筛选:MCF-7 细胞培养于含 10% 小牛血清,1 × 10⁵ U/L 青霉素及 1 × 10⁵ U/L 链霉素的 RPMF1640 完全培养基中,在 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下,于培养箱内培养传代,取对数生长期细胞用于实验。取少量细胞悬液,在计数板盖玻片的一侧加微量细胞悬液,在显微镜下,用放大倍数为 10 的物镜观察计数四角大方格中的细胞数。计算细胞数:

$$\text{细胞数/毫升原液} = (\text{4 大格细胞数之和} / 4) \times 10^4$$

用 0.25% 胰蛋白酶消化 MCF-7 细胞,用完全培养基制成单细胞悬液,以每孔 1 × 10⁴ 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔加入细胞悬液 180 μL。每孔加入 20 μL 不同浓度的黄荆子化学成分,溶媒对照组加入相同体积含终浓度为 0.1% DMSO 的完全培养基,每组设 4 个复孔。处理 48 h 后,在 96 孔培养板中每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL,置培养箱中继续培养 4 h 后,轻轻吸去培养基,然后每孔加入 DMSO 100 μL,震荡 10 min,使紫色沉淀充分溶解。用酶标仪在 570 nm 波长测吸光度(A)值。细胞增殖抑制率(IR)按如下公式计算。

$$\text{IR}(\%) = (1 - \text{药物处理组 A 均值} / \text{溶媒对照组 A 均值}) \times 100\%$$

半数抑制浓度(IC₅₀)用孙氏改良寇氏综合算法,IC₅₀ = lg⁻¹{[xmri{p-(3-pm-pn)/4}]}(xm 为最高药物浓度的对数值;i 为浓度比的对数;p 为抑制率;pm 为最大抑制浓度;pn 为最小抑制浓度)

2.3 有效部位体内抗肿瘤活性验证:取 Balb/c-nu 裸鼠,4 周龄,体质量 14~16 g。饲养于屏障环境(100 级无菌室)中,饲料、饮水、垫料、笼具均经高压

蒸汽灭菌后使用,所有操作均严格执行 SPF 级实验动物操作规程。用无菌 PBS 调整 HeLa 细胞、Hep G2 细胞、SGC-7901 细胞、MCF-7 细胞浓度为 3 × 10⁷/mL,在 Balb/c-nu 小鼠背部皮下分别接种 HeLa 细胞、Hep G2 细胞、SGC-7901 细胞、MCF-7 细胞 0.2 mL/只,接种观察待出现肉眼可见移植瘤后,用游标卡尺测量移植瘤最长径(L)和最短径(W),按公式 V = L × W² × 0.52 计算瘤体积,待移植瘤体积达 100 mm³ 左右时按瘤体积和荷瘤鼠体质量均衡原则分组。即荷瘤 Balb/c-nu 对照组(生理盐水);阳性药物对照组;低、中、高剂量药物组。以上各组均隔 7 日瘤内注射给药 1 次,共计 2 次,给药期间每 4 日测量鼠体重及移植瘤体积,绘制移植瘤生长曲线。末次给药 48 h 后脱臼处死小鼠,切除移植瘤,称取瘤质量,计算瘤质量抑制率。实验数据采用 SPSS 12.0 统计分析软件,以 One-way ANOVA 及 Student t 检验方法进行检验,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 实验结果

3.1 抗肿瘤有效部位筛选:黄荆子不同部位以质量浓度为 1.0、3.0、10.0、30.0、100.0 μg/mL 分别处理 MCF-7 细胞 48 h,均对 MCF-7 细胞有抑制增殖作用,并呈浓度依赖性,其中以醋酸乙酯干浸膏部位抑制活性最强,其 IC₅₀ 为 66.4 μg/mL(表 1)。

表 1 黄荆子各部位体外细胞生长抑制活性

Table 1 In vitro inhibition of fractions from *V. negundo* on cell growth

组别	MCF-7 细胞 IC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)
水提组	139.47
40%乙醇组	75.22
60%乙醇组	225.81
95%乙醇组	284.64
醋酸乙酯组	66.43
甲醇组	86.69

3.2 抗肿瘤有效部位的体内活性:建立了人乳腺癌(MCF-7)细胞裸鼠异种移植瘤模型,实验期间裸鼠无死亡,其体质量较正常组无明显差异,这表明醋酸乙酯部位的药物毒性较小。在瘤质量、瘤体积及瘤质量抑制率上实验组与对照组相比有显著性差异(P < 0.05)。醋酸乙酯部位对人乳腺癌(MCF-7)细胞裸鼠异种移植瘤呈现出剂量依赖性,其中剂量组(10 mg/kg)对 MCF-7 细胞移植瘤的抑制率与阳性药物组他莫西芬(10 mg/kg)的抑制率相当(表 2)。

3.3 结构鉴定

化合物:无色针状结晶(甲醇),FeCl₃ 试剂反应(+),UV_{max}^{MeOH}(nm):202,251;IR_{max}^{KBr}(cm⁻¹):

表 2 醋酸乙酯部位处理后的裸鼠移植瘤质量及抑制率
($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Tumor weight and inhibitory rate of transplantation tumor in nude mice after treatment of ethyl acetate fraction ($\bar{x} \pm s, n=4$)

细胞系	组别	剂量 (mg · kg ⁻¹)	瘤质量/mg	抑制率 /%
MCF-7	阴性对照	—	145 ± 20	—
	他莫西芬	10	62 ± 9	57
	紫杉醇对照	10	50 ± 2	66
	醋酸乙酯	5	66 ± 5	54
		10	65 ± 29	55
		20	76 ± 9	63

3 391(-OH), 1 676(C=O), 1 595, 1 510, 1 422, 1 244, 1 168; ¹H-NMR(DMSO-*d*₆): 12.41(1H, brs, 7-COOH), 10.21(1H, s, 4-OH), 7.8(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.83(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆): 167.1(C-7), 161.6(C-4), 131.5(C-2, 6), 121.4(C-1), 115.1(C-3, 5), 其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道的数据一致^[1], 确定此化合物为对羟基苯甲酸。

化合物: 棕色针状结晶(甲醇), FeCl₃ 试剂反应(+)。UV^{MeOH}_{max}(nm): 207, 257, 294; IR^{KBr}_{max}(cm⁻¹): 3 443(-OH), 1 670(C=O), 1 605, 1 385, 1 292, 1 126, 1 097; ¹H-NMR(DMSO-*d*₆): 12.53(1H, brs, 7-COOH), 9.72(2H, brs, 3, 4-OH), 7.33(1H, d, *J* = 2 Hz, H-2), 7.28(1H, dd, *J* = 2, 8 Hz, H-5), 6.78(1H, d, *J* = 8 Hz, H-6)。 ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆): 167.3(C-7), 150.0(C-4), 144.9(C-3), 121.9(C-6), 121.7(C-1), 116.6(C-2), 115.1(C-5), 其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道的数据一致^[2], 确定此化合物为 3,4-二羟基苯甲酸。

化合物: 黄色针状结晶(丙酮), 10% 硫酸-甲醇试剂反应(+)。UV^{MeOH}_{max}(nm): 221, 240, 338; IR^{KBr}_{max}(cm⁻¹): 3 434(-OH), 1 620(C=O), 1 516, 1 460, 1 116; ¹H-NMR(Acetone-*d*₆): 9.62(1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-9), 7.53(1H, d, *J* = 16 Hz, H-7), 6.8(1H, dd, *J* = 7.6, 16 Hz, H-8), 7.08(2H, H-2, 6), 3.90(6H, s, 3, 5-OCH₃)。其 ¹H-NMR 数据与文献报道的数据一致^[3], 确定此化合物为芥子醛。

化合物: 黄色针状结晶(丙酮), 10% 硫酸-甲醇试剂反应(+)。UV^{MeOH}_{max}(nm): 211, 285, 324; IR^{KBr}_{max}(cm⁻¹): 3 446(-OH), 1 647(C=O), 1 596(C=C), 1 512, 1 429, 1 287; ES-MS *m/z*: 179.38 [M+1]⁺ 确定分子式为 C₁₀H₁₀O₃; ¹H-NMR(Acetone-*d*₆): 9.63(1H, d, *J* = 8 Hz, H-9), 7.56(1H,

d, *J* = 16 Hz, H-7), 7.37(1H, d, *J* = 2 Hz, H-2), 7.20(1H, dd, *J* = 2, 8 Hz, H-6), 6.91(1H, d, *J* = 8 Hz, H-5), 6.65(1H, dd, *J* = 8, 16 Hz, H-8), 3.93(3H, s, 3-OCH₃)。其 ¹H-NMR 数据与文献报道的数据一致^[2], 确定此化合物为阿魏醛。

化合物: 淡黄色针状结晶(丙酮), 溴甲酚绿试剂反应(+), FeCl₃ 试剂反应(+)。ES-MS *m/z*: 198M⁺ 确定分子式为 C₉H₁₀O₅; ¹H-NMR(Acetone-*d*₆): 8.02(1H, brs, -COOH), 7.34(2H, s, H-3, 7), 3.89(6H, s, -OCH₃ × 2), ¹³C-NMR(Acetone-*d*₆): 167.2(C-1), 147.9(C-4, 6), 141.1(C-5), 120.9(C-2), 107.7(C-3, 7), 56.2(-OCH₃ × 2)。其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道的数据一致^[4], 确定此化合物为丁香酸。

化合物: 黄色粉末, 易溶于甲醇、丙酮。10% 硫酸-甲醇试剂反应显桔红色。紫外灯下发黄绿荧光, UV 图谱在 218、256、357 nm 有最大吸收, 表明分子中可能有比较大的共轭系统存在。IR^{KBr}_{max}(cm⁻¹): 3 393(-OH), 3 201, 1 652(C=O), 1 558, 1 398, 1 312, 1 278, 1 150, 表明分子中有缩合羰基以及羟基。通过 ES-MS 得到该化合物的分子式为 C₂₀H₂₀O₆。从 HMQC 谱中得到 191.83 的碳对应 9.49 的氢, 证明该化合物中含有一个醛基。在 ¹H-NMR 中, 7.13(1H, s) 和 6.75(1H, s); 6.68(1H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.58(1H, d, *J* = 8.4 Hz) 和 6.29(1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz) 可知该化合物中含有两个苯环系统, 一个苯环为四取代, 两个氢处于对位。而另一个苯环为三取代, 有一组邻位氢和间位氢。3.88(3H, s) 和 3.70(3H, s) 得知化合物中有两组甲氧基信号。3.44(1H, dd, *J* = 4.4, 10.4 Hz) 和 3.10(1H, t, *J* = 10.4 Hz) 可知化合物中含有 -CH₂OH 片段。4.41(1H, s, H-4) 信号与其他氢无偶合, 说明 4 位 H 与 3 位 H 的夹角为 90°, 所以为 (3*R*, 4*S*)。在 HMBC 中, 9.49 的醛基氢与 134.85, 146.50 的碳有远程偶合, 说明醛基和一双键相连。双键上的氢 7.48 与 112.25 的碳有远程偶合, 表明了双键与含有对位氢的苯环相连。42.34(C-4) 与 6.68(H-2) 和 6.29(H-6) 有远程偶合, 并且 116.92(C-5) 与 4.41(H-4) 有偶合关系, 说明两个苯环通过 C-4 相连接。在 NOESY 谱中, 3.88(3H, s, -OCH₃) 与 7.13(1H, s, H-8) 相关, 说明该甲氧基连在 7 位上。而 3.70(3H, s, -OCH₃) 与 6.68(1H, d, H-2) 相关, 说明另一个甲氧基连在 3 位上。4.41 和 3.17 的两个氢有相关,

说明与分别这两个氢相连的碳连在一起,即 C-3 和 C-4。确定化合物 为 6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢(3*R*,4*S*)-2-醛基萘。

化合物 :黄色粉末,易溶于甲醇、丙酮。10% 硫酸-甲醇试剂反应显黄色(+)。紫外灯下发蓝色荧光,UV 图谱在 203、288、341 nm 有最大吸收,表明分子中可能有比较大的共轭系统存在。IR^{KBr}_{max} (cm⁻¹): 3 420(-OH), 3 185, 1 646(C=O), 1 401, 1 152, 1 085, 表明分子中有缔合羰基以及羟基。该化合物的¹³C-NMR和¹H-NMR与化合物 非常相似,说明化合物 与化合物 有相同的母核结构。其不同点在¹H-NMR中 7. 21(1H, d, *J* = 8. 4 Hz)和 6. 92(1H, d, *J* = 8. 0 Hz)说明苯环含有邻位氢。在 HMBC 谱中, 146. 70(C-1)与 7. 21 的氢相关,证明了该氢信号为 8 位上的氢。所以邻位氢应为萘环 7,8 位上的 H。另外可知 3. 55 的甲氧基与 146. 70 的芳基碳相关, 8. 87 的羟基氢与 153. 89, 146. 70, 115. 58 的 3 个碳相关,所以 5 位连有甲氧基,6 位连有羟基;同理, 3. 73 的甲氧基与 147. 56 的芳基碳相关, 7. 50 的羟基氢与 147. 56, 145. 35, 114. 84 的 3 个碳相关,所以 3 位连有甲氧基,4 位连有羟基。确定化合物 为 6-羟基-

4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-5-甲氧基-3,4-二氢(3*R*,4*S*)-2-醛基萘。

化合物 :白色针晶。易溶于甲醇;三氯化铁试剂显黄色,说明可能为酚类化合物。UV 图谱在 207、217、260、290 nm 有最大吸收,表明分子中可能有苯环存在。IR^{KBr}_{max} (cm⁻¹): 3 488(-OH), 3 096, 2 986, 1 682(C=O), 1 598, 1 523, 1 435, 1 300, 1 239, 1 205, 1 114, 1 030, 表明分子中有羰基以及羟基。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) : 12. 50(1H, brs)提示为羧基氢质子;9. 84(1H, brs)提示有一个酚羟基质子;7. 43(1H, m), 7. 45(1H, m), 6. 83(1H, d, *J* = 8. 4 Hz)可以推断苯环为三取代模式。3. 80(3H, s)提示化合物中有一个甲氧基。根据以上数据确定此化合物为 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸。

参考文献:

- [1] Chandramu C, Manohar R D, Krupadanam D G, et al. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(2): 129-134.
- [2] Ei-hassan A, Ei-sayed M, Hamed A I, et al. Bioactive constituents of *Leptadenia arborea* [J]. *Fitoterapia*, 2003, 74(1-2): 184-187.
- [3] Lin J, Hao X J, Liang G Y, et al. Chemical constituents from *Michelia sphaerantha* C. Y. W [J]. *Acta Pharm Sin*, 1999, 34(3): 203-206.
- [4] 徐丽萍, 刘建生, 敏 德, 等. 金龙胆草的化学成分研究() [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(5): 293-296.

盾叶薯蓣中甾体皂苷的研究

王 辉¹, 胡长鹰², 庞自洁³, 徐德平^{1*}

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 暨南大学 食品科学与工程系, 广州 暨南 510520; 3. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:目的 研究盾叶薯蓣中甾体皂苷的组成。方法 用溶剂法提取, 色谱法分离盾叶薯蓣中的甾体皂苷, 用核磁共振法鉴定其结构。结果 从盾叶薯蓣的正丁醇萃取相中分离到 8 个甾体皂苷, 经¹H-NMR、¹³C-NMR、¹³⁵DEPT 测定分析, 其结构分别为原薯蓣皂苷元-3-*O*-*D*-吡喃葡萄糖基(1 3)-*D*-吡喃葡萄糖基(1 4)-[*-L*-吡喃鼠李糖基(1 2)]-*D*-吡喃葡萄糖基()、原薯蓣皂苷元-3-*O*-*D*-吡喃葡萄糖基(1 4)-[*-L*-吡喃鼠李糖基(1 2)]-*D*-吡喃葡萄糖基()、原薯蓣皂苷元-3-*O*-*L*-吡喃鼠李糖基(1 2)-*D*-吡喃葡萄糖基()、22-甲氧基-原薯蓣皂苷元-3-*O*-*D*-吡喃葡萄糖基(1 4)-[*-L*-吡喃鼠李糖基(1 2)]-*D*-吡喃葡萄糖基()、3-*O*-*D*-吡喃葡萄糖基(1 3)-*D*-吡喃葡萄糖基(1 4)-[*-L*-吡喃鼠李糖基(1 2)]-*D*-吡喃葡萄糖基-薯蓣皂苷元()、3-*O*-*D*-吡喃葡萄糖基(1 4)-[*-L*-吡喃鼠李糖基(1 2)]-*D*-吡喃葡萄糖基-薯蓣皂苷元()、3-*O*-*L*-吡喃鼠李糖基(1 4)-[*-L*-吡喃鼠李糖基(1 2)]-*D*-吡喃葡萄糖基-薯蓣皂苷元()。结论 盾叶薯蓣的正丁醇萃取相部分主要含有两类甾体皂苷, 其苷元分别为原薯蓣皂苷元和薯蓣皂苷元。

关键词:盾叶薯蓣;甾体皂苷;薯蓣皂苷;原薯蓣皂苷

收稿日期:2008-04-28

作者简介:王 辉(1983-)男,在读硕士研究生,研究方向为天然药食科学。

*通讯作者 徐德平 E-mail:xdp1219@sina.com