

猪屎豆的化学成分研究

姜佩佩¹, 王吉鸿¹, 纪明慧¹, 舒火明^{1,2*}, 陈光英¹, 张园¹, 王菁¹

1. 海南师范大学 省部共建热带药用植物化学教育部重点实验室, 海南 海口 571158

2. 海南经贸职业技术学院, 海南 海口 571127

摘要: 目的 研究猪屎豆 *Crotalaria mucronata* 全草的化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 和 HPLC 等色谱方法分离成分, 波谱学方法鉴定结构。结果 从中分离得到 13 个化合物, 分别鉴定为染料木素(1)、1-(3-hydroxyfuro [2', 3', 9, 10] pterocarpan-5'-yl) ethanone (2)、尿嘧啶苷(3)、 β -sitostenone (4)、(24R)-24-ethylcholest-4-en-3, 6-dione (5)、12-oleanene-3 β , 22 β , 24-triol (6)、正三十三烷醇(7)、香草醛(8)、4-羟基-3, 5-二甲氧基苯甲醛(9)、邻苯二甲酸二丁酯(10)、blumenol A (11)、 β -谷甾醇(12)、胡萝卜苷(13)。结论 化合物 3 为首次从该属植物中分离得到, 除化合物 2、12 外, 其他化合物均为首次从该植物中分离得到。

关键词: 猪屎豆; 野百合属; 抗肿瘤活性; 尿嘧啶苷; 4-羟基-3, 5-二甲氧基苯甲醛

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-1925-04

Chemical constituents of *Crotalaria mucronata*

JIANG Pei-pei¹, WANG Ji-hong¹, JI Ming-hui¹, SHU Huo-ming^{1,2}, CHEN Guang-ying¹, ZHANG Yuan¹, WANG Jing¹

1. Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Ministry of Education, Hainan Normal University, Haikou 571158, China

2. Hainan College of Economics and Business, Haikou 571127, China

Key words: *Crotalaria mucronata* Desv.; *Crotalaria* Linn.; antitumor activity; uracil glycoside; 4-hydroxy-3, 5-dimethoxy-benzaldehyde

猪屎豆 *Crotalaria mucronata* Desv. 为蝶形花科 (Papilionoideae) 野百合属 (*Crotalaria* Linn.) 植物, 分布于亚洲、非洲、美洲热带^[1]。国内外学者对多种野百合属植物进行了研究, 发现该属植物主要含有生物碱^[2]、黄酮及其苷^[3-4]等成分。猪屎豆有较好的生物活性, 全草有散结、清湿热等作用, 民间还用来治疗手癣、足癣等。猪屎豆抗肿瘤效果也较好, 主要对鳞状上皮癌、基底细胞癌有疗效^[5]。为此, 本课题组对猪屎豆进行了抗肿瘤活性筛选, 结果发现猪屎豆全草乙醇提取物的石油醚部位和氯仿部位对肿瘤细胞 K562 的体外增殖有良好的抑制效果。为了进一步研究猪屎豆的抗肿瘤活性成分, 本实验对这两个部位进行了系统研究, 通过反复硅胶、C₁₈ 反相硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱, 从中分离得到 13 个化合物, 分别鉴定为染料木素 (genistein, 1)、1-(3-hydroxyfuro [2', 3', 9, 10] pterocarpan-5'-yl) ethanone (2)、尿嘧啶苷 (uracil

glycoside, 3)、 β -sitostenone (4)、(24R)-24-ethylcholest-4-en-3, 6-dione (5)、12-oleanene-3 β , 22 β , 24-triol (6)、正三十三烷醇 (*n*-tritriacontanol, 7)、香草醛 (vanillin, 8)、4-羟基-3, 5-二甲氧基苯甲醛 (4-hydroxy-3, 5-dimethoxy-benzaldehyde, 9)、邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate, 10)、blumenol A (11)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, 12)、胡萝卜苷 (daucosterol, 13)。化合物 3 为首次从该属植物中分离得到, 除化合物 2、12 外, 均为首次从该植物中得到。

1 仪器与材料

Bruck AV-400 型核磁共振仪; Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司生产); 薄层硅胶 GF254, 柱色谱硅胶 200~300 目 (青岛海洋化工厂生产); C₁₈ 反相硅胶 (YMC 公司)。色谱试剂均为分析纯。猪屎豆采于海南万宁, 经海南师范大学生命科学学院钟琼蕊副教授鉴定为猪屎豆 *Crotalaria mucronata* Desv.。

收稿日期: 2011-01-08

基金项目: 海南省教育厅科研项目 (Hj2010-19)

作者简介: 姜佩佩 (1986—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事天然产物化学方面的研究。Tel: 13518048715 E-mail: jiangpei86@126.com

*通讯作者 舒火明 Tel: (0898)65915003 E-mail: shuhm2000@sina.com

标本保存于海南师范大学省部共建热带药用植物化学教育部重点实验室。

2 提取与分离

将猪屎豆全草自然风干后,称取 25 kg 粉碎,用 70%乙醇加热至微沸回流提取 3 次,每次 3 h,合并提取液并减压浓缩,将所得浸膏依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取,合并石油醚和氯仿萃取液,浓缩分别得到粗提取物 550 g、128 g。利用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、制备薄层色谱、中压制备液相色谱等分离得到化合物 **1**~**13**。

3 结构鉴定

化合物 **1**: $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 , 400 MHz) δ : 13.02 (1H, s, 5-OH), 8.15 (1H, s, H-2), 7.45 (2H, dd, $J=8.4, 2.8$ Hz, H-2, 6'), 6.89 (2H, dd, $J=8.4$ Hz, 2.0, H-3', 5'), 6.40 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.28 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 , 100 MHz) δ : 154.1 (C-2), 122.9 (C-3), 181.5 (C-4), 163.8 (C-5), 99.8 (C-6), 165.2 (C-7), 94.4 (C-8), 105.9 (C-4 α), 159.0 (C-8 α), 123.0 (C-1'), 131.9 (C-2'), 115.9 (C-3'), 158.3 (C-4'), 115.9 (C-5'), 131.1 (C-6')。数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **1** 为染料木素。

化合物 **2**: 黄色针晶。 $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 , 400 MHz) δ : 2.56 (3H, s, Me-16), 3.75 (1H, dd, $J=6.8, 15.6$ Hz, H β -6), 3.85 (1H, ddd, $J=4.8, 6.8, 9.6$ Hz, H α -6a), 4.37 (1H, dd, $J=4.8, 6.8$ Hz, H α -6), 5.81 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-11a), 6.37 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-4), 6.6 (1H, dd, $J=2.4, 8.4$ Hz, H-2), 7.16 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-8), 7.41 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-1), 7.54 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7), 7.63 (1H, s, H-12); $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 , 100 MHz) δ : 133.2 (C-1), 112.5 (C-1 α), 110.5 (C-2), 160.0 (C-3), 104.1 (C-4), 15.0 (C-5), 67.3 (C-6), 40.9 (C-6a), 125.3 (C-7), 122.0 (C-7 α), 104.7 (C-8), 155.1 (C-9), 113.8 (C-10), 158.3 (C-10 α), 81.2 (C-11a), 110.8 (C-12), 153.5 (C-13), 187.9 (C-14), 26.5 (C-15)。数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **2** 为 1-(3-hydroxyfuro [2', 3', 9, 10] pterocarpan-5'-yl) ethanone。

化合物 **3**: 无色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 5.71 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 7.99 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6), 5.90 (1H, d, $J=4.4$ Hz, H-1'), 4.14~4.20 (2H, m, H-2', 3'), 4.01 (1H, m, H-4'), 3.84 (1H, dd, H-5'b), 3.73 (1H, dd, H-5'a); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 152.6 (C-2), 166.3 (C-4),

102.7 (C-5), 142.8 (C-6), 90.8 (C-1'), 71.3 (C-2'), 75.8 (C-3'), 86.4 (C-4'), 62.3 (C-5')。数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为尿嘧啶苷。

化合物 **4**: 白色片状晶体。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, H-18), 0.80~1.01 (m, H-21, 26, 27, 29), 1.18 (3H, s, H-19), 5.71 (1H, s, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 35.7 (C-1), 34.0 (C-2), 199.6 (C-3), 123.7 (C-4), 171.7 (C-5), 33.0 (C-6), 32.0 (C-7), 35.6 (C-8), 53.8 (C-9), 38.6 (C-10), 19.8 (C-11), 39.6 (C-12), 42.4 (C-13), 55.9 (C-14), 24.2 (C-15), 28.2 (C-16), 56.0 (C-17), 11.9 (C-18), 17.4 (C-19), 36.1 (C-20), 20.0 (C-21), 33.9 (C-22), 26.1 (C-23), 45.9 (C-24), 29.2 (C-25), 21.1 (C-26), 19.0 (C-27), 23.0 (C-28), 12.0 (C-29)。数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **4** 为 β -sitostenone。

化合物 **5**: 淡黄色晶体, mp 172~174 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.72 (3H, s, CH_3 -18), 0.81 (3H, d, $J=2.8$ Hz, CH_3 -26 or 27), 0.82 (3H, d, $J=2.0$ Hz, CH_3 -26 or 27), 0.85 (3H, t, $J=2.8$ Hz, CH_3 -29), 0.94 (3H, d, $J=6.4$ Hz, CH_3 -21), 1.16 (3H, s, CH_3 -19), 2.13~2.17 (1H, m, H-2 α), 2.46~2.58 (2H, m, H-7 β , 2 β), 2.69 (1H, dd, $J=4.0, 16.0$ Hz, H-7 α), 6.17 (1H, s, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 35.6 (C-1), 34.0 (C-2), 202.2 (C-3), 125.4 (C-4), 166.1 (C-5), 199.4 (C-6), 46.8 (C-7), 34.2 (C-8), 51.0 (C-9), 39.8 (C-10), 20.9 (C-11), 39.2 (C-12), 42.6 (C-13), 56.6 (C-14), 24.0 (C-15), 28.0 (C-16), 55.9 (C-17), 12.0 (C-18), 17.5 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.9 (C-22), 26.1 (C-23), 45.8 (C-24), 29.2 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.1 (C-28), 11.9 (C-29)。数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为 (24*R*)-24-ethylcholest-4-en-3, 6-dione。

化合物 **6**: 白色针晶, mp 260~262 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.25 (1H, br s, H-12), 4.21 (1H, d, $J=11.2$ Hz), 3.43 (3H, m), 1.25, 1.11, 1.04, 0.94, 0.91, 0.89, 0.87 (各 3H, s, Me-23, 25, 26, 27, 28, 29, 30); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 38.4 (C-1), 25.9 (C-2), 80.9 (C-3), 42.1 (C-4), 55.9 (C-5), 18.5 (C-6), 33.1 (C-7), 39.7 (C-8), 47.7 (C-9), 37.4 (C-10), 23.8 (C-11), 122.3 (C-12), 143.9 (C-13), 42.8 (C-14), 28.2 (C-15), 27.7 (C-16), 36.7 (C-17), 44.8 (C-18), 46.2 (C-19), 30.5 (C-20), 41.5 (C-21), 76.7 (C-22), 22.4 (C-

23), 64.5 (C-24), 16.1 (C-25), 16.9 (C-26), 25.4 (C-27), 28.2 (C-28), 32.8 (C-29)。数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **6** 为 12-oleanene-3 β , 22 β , 24-triol。

化合物 **7**: 白色粉末, 溶于氯仿, mp 83.9~85.5 °C。IR 谱图中有 3 300 cm⁻¹ (OH-2) 及 2 920, 2 850, 1 460, 1 063, 723 cm⁻¹ 等长链烷烃的特征吸收峰。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 3.64 (2H, t, CH₂-OH), 1.53~1.60 (6H, m), 1.25 (56 H, s), 0.88 (3H, t); ¹³C-NMR (CD₃Cl, 100 MHz) δ : 63.1 (C-1), 32.8 (C-2), 25.8 (C-3), 31.9 (C-31), 29.7 (C-4~30), 22.7 (C-32), 14.1 (C-33)。数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为正三十三烷醇。

化合物 **8**: 白色针晶, mp 81~83 °C。三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 表明存在酚羟基。¹H-NMR (CD₃Cl, 400 MHz) δ : 9.85 (1H, s, CHO-1), 6.27 (1H, s, OH-4), 3.96 (3H, s, OCH₃-3) 以及 1 组 ABX 偶合系统的特征信号 δ : 7.41 (1H, dd, J = 8.4, 1.6 Hz, H-6), 7.42 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2), 7.04 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5)。数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为香草醛。

化合物 **9**: 白色粉末。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 9.81 (1H, s, CHO-1), 7.14 (2H, s, H-2, 6), 6.13 (1H, s, OH-4), 3.96 (6H, s, OCH₃-3)。数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为 4-羟基 3, 5-二甲氧基苯甲醛。

化合物 **10**: 黄色油状物。¹H-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 7.75 (2H, dd, J = 3.2, 5.6 Hz, H-3, 6), 7.65 (2H, dd, J = 3.2, 5.6 Hz, H-4, 5), 4.28 (4H, t, J = 6.4 Hz, H-3'), 1.71 (4H, m, H-2'), 1.44 (4H, m, H-3'), 0.96 (6H, t, J = 7.6 Hz, H-4')。数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **10** 为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 **11**: 白色无定形粉末。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 5.87 (1H, br s, H-2), 5.80 (1H, dd, J = 4.8, 16.4 Hz, H-8), 5.76 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 4.31 (1H, m, H-9), 2.47 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-2a),

2.15 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-2b), 1.91 (3H, s, Me-13), 1.23 (3H, d, J = 6.4 Hz, Me-10), 1.03 (3H, s, Me-12), 1.01 (3H, s, Me-11); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 42.5 (C-1), 50.8 (C-2), 201.3 (C-3), 127.2 (C-4), 167.5 (C-5), 80.0 (C-6), 137.0 (C-7), 130.0 (C-8), 68.7 (C-9), 24.5 (C-10), 23.5 (C-11), 23.9 (C-12), 19.6 (C-13)。数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **11** 为 blumenol A。

化合物 **12**: 白色针晶, mp 140~142 °C, 5% 硫酸-乙醇溶液显紫红色, TLC 上多种溶剂系统展开时化合物与对照品 β -谷甾醇的 R_f 值相同, 混和熔点不下降, 故鉴定化合物 **12** 为 β -谷甾醇。

化合物 **13**: 白色无定形粉末, mp 282~283 °C, 5% 硫酸-乙醇溶液显紫红色, TLC 上多种溶剂系统展开时与对照品 β -胡萝卜苷的 R_f 值相同, 混和熔点不下降, 故鉴定化合物 **13** 为胡萝卜苷。

4 抗肿瘤活性测试

采用 MTT 比色法^[17-18]。人胃癌细胞 (GSC-7901)、人肝癌细胞 (BEL-7402) 和人白血病细胞 (K562) 分别以 2×10^4 、 7×10^4 、 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔体积 180 μ L, 在 CO₂ 培养箱内培养 8~12 h。同时设置空白组 (仅加入不含细胞的培养液) 和对照组 (以培养液替代药物)。待细胞贴壁后, 加入不同浓度药液 (板内终质量浓度为 1、10、100 μ g/mL) 20 μ L。细胞加药培养 44 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (1 mg/mL) 50 μ L, 继续在培养箱内孵育 4 h, 倾去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min 后, 以空白组调零, 使用酶标仪于 570 nm 下测定各孔的吸光度值, 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}}$$

活性测试结果表明 (表 1), 部分单体化合物表现出较强的抑制肿瘤细胞增殖活性。化合物 **4**、**5**、**6** 对 GSC-7901、BEL-7402 和 K562 细胞均有较好的抑制活性。可以看出, 化合物 **5** 对人白血病细胞 (K562) 的抑制效果非常好, IC₅₀ 值仅为 15.75 μ g/mL。

表 1 化合物 4~6 的抗肿瘤活性测试结果
Table 1 Antitumor activity of compounds 4—6

化合物	IC ₅₀ /(μ g·mL ⁻¹)		
	BEL-7402	GSC-7901	K562
β -sitosterone	54.58	34.31	34.66
(24 <i>R</i>)-24-ethylcholest-4-en-3,6-dione	27.47	25.47	15.75
12-oleanene-3 β , 22 β , 24-triol	60.75	64.99	48.52

参考文献

- [1] 广东省植物研究所. 海南植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [2] 韩桂秋, 徐世明, 刘甫琴, 等. 野百合属 (*Crotalaria*) 生物碱的研究 I. 吊群草 (*Crotalaria retusa* L.) 中生物碱的分离与鉴定 [J]. 北京医学院学报, 1981, 13(1): 15-18.
- [3] Ko H H. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica* [J]. *Bioor Med Chem Lett*, 2004, 14: 1011-1014.
- [4] Wanjala C C W, Majinda R R T. Flavonoid glycosides from *Crotalaria podocarpa* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51: 705-707.
- [5] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [6] 李宝强, 宋启示. 大叶千斤拔根的化学成分 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 179-182.
- [7] Weng J R, Yen M H, Lin C N. New pterocarpanoids of *Crotalaria pallida* and *Crotalaria assamica* [J]. *Helv Chem Acta*, 2002, 82: 847-851.
- [8] 王波, 刘屏, 沈月毛. 回心草化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 895-897.
- [9] Georges P, Sylvestre M, Ruegger H, *et al.* Ketosteroids and hydroxyketosteroids minor metabolites of sugarcane wax [J]. *Steroids*, 2006, 71: 647-652.
- [10] Kovganko N V, Chernov Y G. ^{13}C -NMR spectra of 6-hydroximinosteroids of the stigmastane series [J]. *Chem Nat Compd*, 2001, 37(4): 351-355.
- [11] Ding P L, Hou A J, Chen D F. Three new isoprenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* [J]. *J Asian Nat Prodt Res*, 2005, 7(3): 237-243.
- [12] 皮慧芳, 杨希雄, 阮汉利, 等. 九头狮子草化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 269-270.
- [13] 左文健, 陈惠琴, 李晓东, 等. 苦丁茶叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 18-20.
- [14] Bao K, Fan A X, Dai Y. Selective demethylation and debenzoylation of aryl ethers by magnesium iodide under solvent-free conditions and its application to the total synthesis of natural products [J]. *Org Biomol Chem*, 2009, 7: 5084-5090.
- [15] 张军民, 石晓峰, 马趣环. 雪松松针化学成分研究 (II) [J]. 中药材, 2010, 33(7): 1084-1086.
- [16] 牛雪梅, 黎胜红, 纳智, 等. 疏花毛萼香茶菜的化学成分研究 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 300-303.
- [17] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.
- [18] 吴舟锋. 肿瘤化疗药物敏感性试验 [J]. 国外医学: 外科学分册, 1988, 25(3): 153-155.