

苦石莲的抗肿瘤化学成分研究

刘慧灵, 马国需, 杨峻山, 许旭东*

中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

摘要: 目的 研究苦石莲的抗肿瘤活性成分。方法 采用柱色谱技术对苦石莲的提取物进行分离纯化, 采用波谱技术结合化学方法进行结构鉴定。结果 从苦石莲提取物中分离得到了12个化合物, 包括8个卡山烷型二萜类化合物, 分别鉴定为 neocaesalpin A (1)、neocaesalpin B (2)、neocaesalpin L (3)、caesalpinin MD (4)、neocaesalpin MA (5)、neocaesalpin H (6)、neocaesalpin P (7)、chagreslactone (8)、 β -香树素 (9)、 β -谷甾醇 (10)、胡萝卜苷 (11) 和没食子酸 (12)。结论 化合物 8 为首次从云实属植物中分离得到, 化合物 4~7 为首次从该植物中分离得到, 化合物 1 和 4 具有一定的抑制肿瘤细胞增殖作用。

关键词: 苦石莲; 卡山烷型二萜; neocaesalpin A; chagreslactone; β -香树素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1901-04

Antitumor constituents from seeds of *Caesalpinia minax*

LIU Hui-ling, MA Guo-xu, YANG Jun-shan, XU Xu-dong

Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicines, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To study the antitumor constituents in the seeds of *Caesalpinia minax*. **Methods** The constituents were isolated and purified by repeated silica gel column chromatography and the structures were identified by spectral analyses and chemical methods. **Results** Twelve compounds including eight cassane-type diterpenes were isolated from the seeds of *C. minax* and their structures were identified as neocaesalpin A (1), neocaesalpin B (2), neocaesalpin L (3), caesalpinin MD (4), neocaesalpin MA (5), neocaesalpin H (6), neocaesalpin P (7), chagreslactone (8), β -amyirin (9), β -sitosterol (10), daucosterol (11), and gallic acid (12). **Conclusion** Compound 8 is first obtained from the plants in *Caesalpinia* L. Compounds 4—7 are first obtained from *C. minax* and compounds 1 and 4 show moderate cytotoxic activities in inhibition of tumor proliferation.

Key words: seeds of *Caesalpinia minax* Hance; cassane-type diterpenes; neocaesalpin A; chagreslactone; β -amyirin

苦石莲为豆科云实属植物喙荚云实(南蛇勒) *Caesalpinia minax* Hance 的种子, 又名石莲子、老鸭枕头、土石莲子等。生于低海拔的旷野草丛或缓坡林缘, 分布于广西、云南等地。性凉, 味苦, 具有清热化湿、活血散瘀、止痛之功效, 主治风热感冒、痢疾、淋浊、痈肿、皮肤瘙痒、疮癣、跌打损伤、毒蛇咬伤等。在民间用于治疗流感和肝炎等疾病, 被《广西中药材标准》、《贵阳中药材标准》、《四川中药材标准》等收载, 是宝贵的传统壮药^[1]。目前, 研究发现, 苦石莲中含有丰富的卡山烷型二萜^[2-4], 其具有显著的抗肿瘤活性^[5]。因此, 本实验对其化学成分进行了深入的研究, 从其甲醇提取物中分离

得到12个化合物, 包括8个卡山烷型二萜类化合物, 分别鉴定为 neocaesalpin A (1)、neocaesalpin B (2)、neocaesalpin L (3)、caesalpinin MD (4)、neocaesalpin MA (5)、neocaesalpin H (6)、neocaesalpin P (7)、chagreslactone (8)、 β -香树素 (β -amyirin, 9)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, 10)、胡萝卜苷 (daucosterol, 11) 和没食子酸 (gallic acid, 12)。其中化合物 8 为首次从云实属植物中分离得到, 化合物 4~7 为首次从该植物中分离得到。

1 仪器与材料

Bruker Avance II 600 型核磁共振波谱仪, 赛默飞世 LTQ-Obitrap XL 液质联用仪, Bylabuv-II 紫

收稿日期: 2012-05-25

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项“十一五”计划(综合性新药研究开发技术大平台)(2009ZX09301-003); 国家自然科学基金资助项目(30973626)

作者简介: 刘慧灵(1970—), 女, 北京人, 中国医学科学院药用植物研究所, 研究方向为天然药物化学。

*通讯作者 许旭东 Tel: (010)57833296 E-mail: xdxu@implad.ac.cn

外灯(北京炳洋科技有限公司),柱色谱用硅胶(青岛海洋化工有限公司),薄层色谱用硅胶 G、H、GF-254 和柱色谱用硅胶(青岛海洋化工有限公司),Sephadex LH-20 凝胶为 Pharmacia 公司产品, MCI 为日本三菱化学公司产品,常规试剂均为分析纯。

苦石莲购于广西南宁市,经广西药用植物园资源分类室余丽莹主任鉴定为喙荚云实 *Caesalpinia minax* Hance 的干燥种子。

2 提取与分离

干燥苦石莲粉末 8 kg,甲醇回流提取 2 次,每次 2 h,减压回收溶剂,浓缩后得总浸膏 2 020 g。苦石莲总浸膏用氯仿-甲醇溶解后,100~200 目硅胶拌样,依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、丙酮及甲醇洗脱,洗脱液减压浓缩。最终得到石油醚部分 130 g、氯仿部分 325 g、醋酸乙酯部分 160 g、丙酮部分 305 g、甲醇部分 1 100 g。

取氯仿层浸膏 325 g 经硅胶柱色谱分离,石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱。其中石油醚-醋酸乙酯(40:1)洗脱部分经醋酸乙酯重结晶得到化合物 **10**(130 mg);石油醚-醋酸乙酯(30:1)洗脱部分经反复硅胶柱色谱得到化合物 **1**(8 mg)、**11**(14 mg);石油醚-醋酸乙酯(6:1)洗脱部分经硅胶柱色谱、MCI 反相填料、Sephadex LH-20 及重结晶等方法分离纯化,得到化合物 **3**(9 mg)、**4**(12 mg)、**12**(6 mg)、**9**(15 mg);石油醚-醋酸乙酯(4:1)洗脱部分经反复硅胶柱色谱及高效液相色谱分离纯化得到化合物 **2**(11 mg)、**5**(5 mg);石油醚-醋酸乙酯(2:1)洗脱部分经反复硅胶柱色谱及高效液相色谱分离纯化得到化合物 **6**(3 mg)、**7**(7 mg)、**8**(5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色针晶(石油醚-醋酸乙酯),易溶于甲醇,10%浓硫酸乙醇溶液喷洒加热显粉红色。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 467 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 1.09 (3H, s, H-18), 1.13 (3H, s, H-20), 1.17 (3H, s, H-19), 1.39 (3H, s, H-17), 1.93 (3H, s, 1- $OCOCH_3$), 2.18 (3H, s, 2- $OCOCH_3$), 5.19 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-1), 5.29 (1H, dt, J = 13.8, 1.8 Hz, H-2), 5.81 (1H, s, H-15) 提示为卡山烷型骨架信息; ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 75.4 (C-1), 69.1 (C-2), 36.9 (C-3), 46.4 (C-4), 77.8 (C-5), 26.7 (C-6), 20.4 (C-7), 48.3 (C-8), 35.9 (C-9), 41.3 (C-10), 39.0 (C-11), 107.3 (C-12), 178.8 (C-13), 75.5 (C-14), 113.3 (C-15), 172.2 (C-16), 20.9 (C-17),

28.8 (C-18), 6.1 (C-19), 17.6 (C-20), 172.4 (1- $OCOCH_3$), 21.1 (1- $OCOCH_3$), 172.5 (2- $OCOCH_3$), 21.2 (2- $OCOCH_3$)。以上数据与文献报道一致^[6],故鉴定化合物 **1** 为 neocaesalpin A。

化合物 **2**: 白色针晶(己烷-氯仿),10%浓硫酸乙醇溶液显紫红色。ESI-MS 给出分子离子峰 m/z : 450 $[M]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 1.08 (3H, s, H-18), 1.12 (3H, s, H-20), 1.16 (3H, s, H-19), 1.38 (3H, s, H-17), 1.93 (3H, s, 1- $OCOCH_3$), 2.16 (3H, s, 2- $OCOCH_3$), 5.18 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-1), 5.28 (1H, dt, J = 13.0, 2.3 Hz, H-2), 5.80 (1H, s, H-15) 特征峰与化合物 **1** 非常相似,确定其为卡山烷型骨架; ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 75.8 (C-1), 69.4 (C-2), 37.2 (C-3), 46.7 (C-4), 78.1 (C-5), 21.4 (C-6), 31.2 (C-7), 27.2 (C-8), 36.3 (C-9), 41.5 (C-10), 39.4 (C-11), 107.6 (C-12), 172.4 (C-13), 48.5 (C-14), 113.6 (C-15), 179.2 (C-16), 20.7 (C-17), 29.1 (C-18), 26.4 (C-19), 18.1 (C-20), 21.2 (1- $OCOCH_3$), 172.2 (1- $OCOCH_3$), 21.4 (2- $OCOCH_3$), 172.7 (2- $OCOCH_3$)。以上数据与文献报道一致^[7],故鉴定化合物 **2** 为 neocaesalpin B。

化合物 **3**: 白色针晶(甲醇),10%浓硫酸乙醇溶液显黄色。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 523 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 1.11 (3H, s, H-18), 1.12 (3H, s, H-19), 1.16 (3H, s, H-20), 1.93 (3H, s, 6- $OCOCH_3$), 2.02 (3H, s, 1- $OCOCH_3$), 2.13 (3H, s, 7- $OCOCH_3$), 4.84 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6), 5.69 (1H, s, H-7), 5.80 (1H, s, H-15) 特征峰与化合物 **1** 非常相似,确定其为卡山烷型骨架; ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 76.6 (C-1), 23.9 (C-2), 33.8 (C-3), 39.9 (C-4), 80.5 (C-5), 77.3 (C-6), 73.5 (C-7), 52.1 (C-8), 35.6 (C-9), 49.0 (C-10), 39.1 (C-11), 107.1 (C-12), 172.1 (C-13), 76.3 (C-14), 114.7 (C-15), 178.8 (C-16), 21.1 (C-17), 31.4 (C-18), 25.3 (C-19), 17.8 (C-20), 21.7 (1- $OCOCH_3$), 172.4 (1- $OCOCH_3$), 22.1 (6- $OCOCH_3$), 172.6 (6- $OCOCH_3$), 22.0 (7- $OCOCH_3$), 172.6 (7- $OCOCH_3$)。与文献报道对照^[7],鉴定化合物 **3** 为 neocaesalpin L。

化合物 **4**: 无色粉末(氯仿),10%浓硫酸乙醇溶液显紫红色,ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 473 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.26 (3H, s, H-19), 1.39 (3H, s, H-18), 1.52 (3H, s, H-20), 1.97

(3H, s, 1-OCOCH₃), 2.05 (3H, s, 2-OCOCH₃), 2.20 (3H, s, 6-OCOCH₃), 2.36 (1H, s, H-17), 5.43 (1H, ddd, $J = 13.1, 4.5, 2.0$ Hz, H-2), 5.70 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-6), 5.97 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 6.72 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-15), 7.10 (1H, s, H-11), 7.54 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-16); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 74.7 (C-1), 67.7 (C-2), 38.0 (C-3), 40.5 (C-4), 76.6 (C-5), 72.7 (C-6), 32.0 (C-7), 126.8 (C-8), 137.9 (C-9), 46.5 (C-10), 104.4 (C-11), 154.0 (C-12), 126.5 (C-13), 126.3 (C-14), 105.0 (C-15), 145.0 (C-16), 16.1 (C-17), 30.8 (C-18), 25.7 (C-19), 30.4 (C-20), 21.1 (1-OCOCH₃), 169.5 (1-OCOCH₃), 21.2 (2-OCOCH₃), 170.5 (2-OCOCH₃), 22.0 (6-OCOCH₃), 170.6 (7-OCOCH₃)。根据文献报道^[8], 鉴定化合物 **4** 为 caesalpinin MD。

化合物 **5**: 无色粉末 (氯仿), 10%浓硫酸乙醇溶液显红色。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 419 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 1.17 (3H, s, H-18), 1.21 (3H, s, H-19), 1.43 (3H, s, H-20), 2.00 (3H, s, 1-OCOCH₃), 2.02 (3H, s, 3-OCOCH₃), 2.46 (3H, s, H-17), 5.45 (1H, ddd, $J = 13.1, 4.6, 2.4$ Hz, H-3), 5.91 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1), 6.55 (1H, s, H-11), 10.38 (1H, s, H-15), 11.74 (1H, s, 12-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 74.2 (C-1), 67.7 (C-2), 35.9 (C-3), 40.1 (C-4), 75.4 (C-5), 23.8 (C-6), 23.6 (C-7), 125.9 (C-8), 153.8 (C-9), 48.9 (C-10), 111.1 (C-11), 161.5 (C-12), 117.4 (C-13), 140.4 (C-14), 195.3 (C-15), 13.6 (C-17), 27.9 (C-18), 25.8 (C-19), 29.3 (C-20), 21.1 (1-OCOCH₃), 169.2 (1-OCOCH₃), 21.2 (2-OCOCH₃), 170.5 (2-OCOCH₃)。根据文献报道^[8], 鉴定化合物 **5** 为 neocaesalpin MA。

化合物 **6**: 无色粉末 (氯仿), 10%浓硫酸乙醇溶液显淡红色。ESI-MS m/z : 371 [M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 0.82 (3H, s, H-20), 1.16 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-17), 1.41 (3H, s, H-19), 5.87 (1H, s, H-15); ¹³C-NMR (150 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 38.8 (C-1), 18.4 (C-2), 37.5 (C-3), 47.4 (C-4), 49.6 (C-5), 24.5 (C-6), 30.7 (C-7), 41.1 (C-8), 45.9 (C-9), 36.7 (C-10), 38.8 (C-11), 106.9 (C-12), 174.5 (C-13), 37.0 (C-14), 113.2 (C-15), 171.4 (C-16), 13.2 (C-17), 181.2 (C-18), 17.6 (C-19), 14.6 (C-20)。根据文献报道^[9], 鉴定化合物 **6** 为 neocaesalpin H。

化合物 **7**: 无色粉末 (氯仿), 10%浓硫酸乙醇

溶液显紫红色。ESI-MS m/z : 641 [M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 1.12 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-17), 1.15 (3H, s, H-20), 1.28 (3H, s, H-18), 3.20 (3H, s, 12-OCH₃), 5.79 (1H, dd, $J = 12.4, 2.4$ Hz, H-7), 5.83 (1H, s, H-15), 6.02 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 7.32 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-4', 6'), 7.41 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-4'', 6''), 7.53 (1H, m, H-5'), 7.76 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-3', 7'); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 34.1 (C-1), 18.6 (C-2), 33.4 (C-3), 48.8 (C-4), 77.9 (C-5), 69.1 (C-6), 70.7 (C-7), 40.0 (C-8), 36.8 (C-9), 41.4 (C-10), 37.4 (C-11), 107.6 (C-12), 169.8 (C-13), 32.4 (C-14), 116.4 (C-15), 169.9 (C-16), 11.5 (C-17), 17.0 (C-18), 180.1 (C-19), 24.1 (C-20), 50.4 (12-OCH₃), 165.5 (C-1'), 129.5 (C-2'), 129.6 (C-3', 7'), 128.3 (C-4', 6'), 132.9 (C-5'), 166.0 (C-1''), 130.2 (C-2''), 129.7 (C-3'', 7''), 128.5 (C-4'', 6''), 133.1 (C-5'')。根据文献报道^[10], 鉴定化合物 **7** 为 neocaesalpin P。

化合物 **8**: 无色粉末 (氯仿), 10%浓硫酸乙醇溶液显红色。ESI-MS m/z : 487 [M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 1.03 (3H, s, H-20), 1.12 (3H, s, H-19), 1.21 (3H, d, $J = 2.4$ Hz, H-17), 2.09 (3H, s, 18-OCOCH₃), 2.11 (3H, s, 6-OCOCH₃), 3.20 (3H, s, 12-OCH₃), 3.66 (1H, m, H-7), 3.74, 3.93 (2H, d, $J = 10.8$ Hz, H-18), 5.57 (1H, m, H-6), 5.86 (1H, s, H-15); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 41.5 (C-1), 18.2 (C-2), 37.5 (C-3), 37.8 (C-4), 48.0 (C-5), 72.8 (C-6), 72.3 (C-7), 42.2 (C-8), 43.6 (C-9), 37.6 (C-10), 37.2 (C-11), 107.8 (C-12), 170.8 (C-13), 32.2 (C-14), 116.3 (C-15), 170.1 (C-16), 11.3 (C-17), 72.3 (C-18), 19.6 (C-19), 17.9 (C-20), 51.0 (12-OCH₃), 172.6 (6-OCOCH₃), 21.1 (6-OCOCH₃), 171.0 (18-OCOCH₃), 21.7 (6-OCOCH₃)。参考文献数据^[11], 鉴定化合物 **8** 为 chagreslactone。

化合物 **9**: 白色针晶 (石油醚-醋酸乙酯), 10%浓硫酸乙醇溶液喷洒, 加热显淡红色。与对照品共薄层, R_f 值一致, 测定混合后熔点不下降, 鉴定该化合物为 β -香树素。

化合物 **10**: 无色针晶, 10%硫酸乙醇溶液喷洒显红色, 与对照品共薄层, R_f 值一致, 测定混合后熔点不下降, 鉴定化合物 **10** 为 β -谷甾醇。

化合物 **11**: 白色粉末, 10%硫酸乙醇溶液喷洒显粉红色, 与对照品共薄层, R_f 值一致, 且混合后熔点不下降, 鉴定化合物 **11** 为胡萝卜苷。

化合物 **12**: 淡黄色柱状结晶, 溶于甲醇, 10% 浓硫酸乙醇溶液喷洒加热显淡红色。ESI-MS m/z : 177 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.06 (2H, s); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 170.8 (C-1), 122.4 (C-2), 110.5 (C-3), 146.6 (C-4), 139.7 (C-5), 146.6 (C-6), 110.6 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **12** 为没食子酸。

4 抗肿瘤活性筛选

采用 MTT 比色法, 对化合物 **1**、**4**、**5** 进行抗肿瘤活性筛选。选取人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MCF-7, DMEM 培养基稀释后, 以 $6 \times 10^4/mL$ 的密度接种于 96 孔板, 培养 24 h 后给药, 继续培养 48 h 后加入 MTT, 于 4 h 后检测, 并计算其 IC_{50} 值 (表 1)。由结果可知, 化合物 **1** 和 **4** 具有一定的抑制肿瘤细胞增殖作用。

表 1 化合物 **1**、**4**、**5** 的体外抗肿瘤活性

Table 1 *In vivo* antitumor activities of compounds **1**, **4**, and **5**

化合物	$IC_{50} / (\mu g \cdot mL^{-1})$	
	MCF-7	HepG-2
1	22.7	16.8
4	12.0	22.6
5	>50	>50
顺铂	31.9	10.2

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [2] Jiang R W, Ma S C, But P P H, *et al.* New antiviral cassane furanoditerpenes from *Caesalpinia minax* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(10): 1266-1272.
- [3] Roach J S, Mclean S, Reynolds W F, *et al.* Cassane diterpenoids of *Caesalpinia pulcherrima* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(10): 1378-1381.
- [4] Mendoz A D T, Gonzalez L D U, Barria E O, *et al.* Five new cassane diterpenes from *Myrospermum frutescens* with activity against *Trypanosoma cruzi* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(7): 928-932.
- [5] Matsuno Y, Deguchi J, Hosoya T, *et al.* Sucutiniranes C—F, cassane-type diterpenes from *Bowdichia nitida* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(5): 976-979.
- [6] Kinoshita T, Kaneko M, Noguchi H, *et al.* New cassane diterpenes from *Caesalpinia Bonduc* (Fabaceae) [J]. *Heterocycles*, 1996, 43(2): 409-414.
- [7] Li D M, Ma L, Liu G M, *et al.* Cassane diterpene-lactones from the seed of *Caesalpinia minax* Hance [J]. *Chem Biodiv*, 2006, 3(11): 1260-1265.
- [8] Kalauni S K, Awale S, Tezuka Y, *et al.* Cassane- and norcassane-type diterpenes of *caesalpinia crista* from Myanmar [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(11): 1859-1863.
- [9] Kinoshita T, Haga Y, Narimatsu S, *et al.* The isolation and structure elucidation of new cassane diterpene-acids from *Caesalpinia crista* L. (Fabaceae), and review on the nomenclature of some *Caesalpinia* species [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(6): 717-720.
- [10] Cheng J, Roach J S, Mclean S, *et al.* Three new cassane diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima* [J]. *Nat Prod Commun*, 2008, 11(3): 1751-1754.
- [11] Mendoza D T, Gonzalez L D U, Barria E O, *et al.* Novel cassane and cleistanthane diterpenes from *Myrospermum frutescens*: absolute stereochemistry of the cassane diterpene series [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(10): 1711-1715.
- [12] 唐祖年, 谢丽霞, 苏小建, 等. 蓖麻根化学成分的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 15-19.