

构棘果中 2 个苯并吡喃异黄酮的分离及其抗肿瘤活性筛选

刘志平^{1,2}, 周敏¹, 刘盛¹, 甘春芳², 韦万兴^{1*}

1. 广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004

2. 广西师范学院化学与生命科学学院, 广西 南宁 530001

摘要: 目的 研究构棘 *Cudrania cochinchinensis* 果实的化学成分。方法 采用 95%乙醇浸泡提取、硅胶柱色谱分离, 各种谱学方法和单晶衍射确定化合物结构, 用 MTT 法进行化合物抗肿瘤活性的筛选。结果 从构棘果中分离得到 2 个苯并吡喃异黄酮, 分别鉴定为 4'-*O*-methylalpinmumisoflavone (1) 和 isoderrone (2); 晶体结构显示化合物 1 和 2 均属单斜晶系, 空间群为 *P*2 (1)/*c*, 晶体以分子间氢键、分子内氢键、 π - π 堆积作用和范德华力构成三维超分子建筑结构。化合物 2 对肝癌 BEL-7404 细胞和胃癌 SGC-7901 细胞具有较好的抑制作用。结论 化合物 2 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 1 为首次从该植物中得到。X-单晶衍射测试确定了化合物 1 和 2 的平面晶体结构, 并首次报道其 3D 立体堆积结构。

关键词: 构棘果; 苯并吡喃异黄酮; X-单晶衍射; 单斜晶系; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)13-1734-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.007

Isolation of two benzopyran isoflavones from fruits of *Cudrania cochinchinensis* and their antitumor activities

LIU Zhi-ping^{1,2}, ZHOU Min¹, LIU Sheng¹, GAN Chun-fang², WEI Wan-xing¹

1. College of Chemistry and Chemical Engineer of Guangxi University, Nanning 530004, China

2. College of Chemistry and Life Science, Guangxi Teachers Education University, Nanning 530001, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the fruits of *Cudrania cochinchinensis*. **Methods** The ethanol extract from the fruits of *C. cochinchinensis* was separated by silica column chromatography, and the structures were elucidated based on spectroscopy and X-ray diffraction. **Results** Two known benzopyran isoflavones were isolated and elucidated as 4'-*O*-methylalpinmumisoflavone (1) and isoderrone (2). The crystal structures showed compounds 1 and 2 belonged to monoclinic system, the space group was *P*2 (1)/*c*, and the 3D-supramolecular structures were accumulated by hydrogen bond in intra- and inter-molecule, π - π deposition, and Van der Waals force. The *in vitro* inhibition on BEL-7404 and SGC-7901 carcinoma cell lines was investigated and the results showed compound 2 had a distinct antiproliferative activity. **Conclusion** Compound 1 is isolated from this plant and compound 2 from the plants in this genus for the first time. The plane crystal structures of compounds 1 and 2 are determined by X-ray crystal diffraction, and the 3D stack structures are also reported for the first time.

Key words: fruits of *Cudrania cochinchinensis*; benzopyran isoflavones; X-ray diffraction; monoclinic system; antitumor activity

构棘 *Cudrania cochinchinensis* (Lour.) Yakuro Kudo & Masam. 为桑科柘属植物, 其根部长作为传统中药穿破石使用, 具有止咳化痰、祛风利湿、散瘀止痛之功效^[1]。据《中华本草》记载, 构棘果又名山荔枝果, 具有调气、利水、消食等功效, 可用于治疗治膀胱疝气、食积腹胀、小便不利等^[1]。已有文献报道了构棘根中含有异戊烯取代二苯酮、

异戊烯取代咕吨酮、异黄酮、黄酮醇、黄酮醇与金属的络合盐等活性成分^[2-3], 但国内外尚未见有关构棘果化学成分的报道。广西具有丰富的构棘资源, 其果实从未加以开发利用, 本课题组对构棘果的化学成分进行研究, 旨在探究其中的活性成分, 并与根部成分加以对比, 开发其潜在的应用价值。本实验从构棘果 95%乙醇提取物中分离得到 2 个苯并吡

收稿日期: 2012-12-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81060261); 广西自然科学基金项目 (2012GXNSFAA053021); 广西科学研究与技术开发项目 (111107009-3-5); 广西师范学院功能有机分子 ([2012]9)

作者简介: 刘志平 (1979—), 副教授, 在读博士, 从事天然产物的分离与改性合成。E-mail: liuzhiping828@126.com

*通信作者 韦万兴 E-mail: wxwei@yahoo.com

喃异黄酮, 分别鉴定为 4'-*O*-methylalpinmum isoflavone (**1**) 和 isoderrone (**2**), 其平面结构得到 X-单晶衍射的证实。化合物 **1** 和 **2** 的平面晶体结构曾有报道^[4-5], 但未见报道其立体堆积结构。本实验对化合物 **1**、**2** 进行了 X-单晶衍射测试, 并首次补充了 3D 立体堆积结构。此外, 还对化合物 **1**、**2** 进行了体外抗肿瘤活性测试, 结果显示化合物 **2** 具有较好的抑制肿瘤细胞增殖活性。

1 仪器与材料

Bruker—300—Avance III 核磁共振仪、Bruker Smart CCD X-单晶衍射仪(瑞士 Bruker 公司); X—4 显微熔点测定仪(北京泰克公司); 美国 Finnigan LCQ^{DECA} 型质谱仪(美国 Thermo 公司); Miltiskan MK3 酶标仪(Thermo Scientific 公司)。柱色谱硅胶(300~400 目)为青岛化工厂产品; 其他试剂均为分析纯。

构棘果于 2010 年 10 月采集自广西隆安县, 由广西中医药大学中药鉴定教研室梁子宁副教授鉴定为桑科拓属植物构棘 *Cudrania cochinchinensis* (Lour.) Yakuro Kudo & Masam. 的果实。

2 提取与分离

新鲜构棘果 2 kg 用 95%乙醇浸泡 3 d, 提取液减压浓缩并加入适量水静置, 析出大量叶绿素, 滤过, 重复多次去除叶绿素。将剩余母液浓缩到适当浓度, 静置 1 d, 瓶底析出固体沉淀物, 滤过收集得 32.4 g 粗浸膏。粗浸膏用 50%乙醇分散洗涤 2 次, 去除深色色素得 12.4 g 棕黄色固体。将该固体进行硅胶柱色谱分离纯化, 石油醚-丙酮(20:1~1:1)梯度洗脱得 10 个组分。其中石油醚-丙酮(8:1)组分经石油醚-丙酮 2 次色谱得化合物 **1** (260 mg), 取 200 mg 溶解于石油醚-醋酸乙酯体系并在试管中缓慢结晶得化合物 **1** 单晶; 石油醚-丙酮(4:1)组分经石油醚-丙酮 2 次色谱得化合物 **2** (518 mg), 取 200 mg 溶解于 95%乙醇中并在试管中缓慢结晶得化合物 **2** 单晶。化合物 **1**、**2** 的平面结构见图 1。

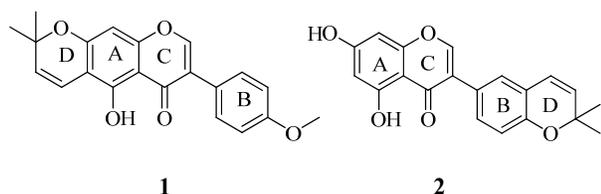


图 1 化合物 **1** 和 **2** 的平面结构

Fig. 1 Plane structures of compounds **1** and **2**

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色晶体(丙酮), mp 135~136 °C, ESI-MS m/z : 351.4 $[M+H]^+$. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 13.19 (1H, s, 5-OH), 7.84 (1H, s, H-2), 7.47 (2H, dd, $J = 2.1, 8.7$ Hz, H-2', 6'), 6.99 (2H, dd, $J = 2.1, 8.7$ Hz, H-3', 5'), 6.75 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-11), 6.35 (1H, s, H-8), 5.64 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-12), 3.86 (3H, s, 4'-OCH₃), 1.49 (6H, s, 14, 15-CH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 152.5 (C-2), 123.5 (C-3), 180.9 (C-4), 106.1 (C-4a), 156.9 (C-5), 105.6 (C-6), 159.8 (C-7), 94.9 (C-8), 157.3 (C-8a), 123.0 (C-1'), 130.1 (C-2', 6'), 159.5 (C-4'), 114.1 (C-3', 5'), 115.5 (C-11), 128.2 (C-12), 78.0 (C-13), 28.3 (C-14), 28.3 (C-15), 55.4 (4'-OCH₃). 以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **1** 为 4'-*O*-methylalpinmumisoflavone。

化合物 **2**: 淡黄色晶体(丙酮), mp 228~230 °C, ESI-MS m/z : 336.4 $[M+H]^+$. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 12.91 (1H, s, 5-OH), 8.36 (1H, s, H-2), 7.29 (2H, dd, $J = 2.1, 8.1$ Hz, H-6'), 7.27 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.80 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.43 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-11), 6.39 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.78 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-12), 1.40 (6H, s, 14, 15-CH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 154.7 (C-2), 122.1 (C-3), 180.5 (C-4), 104.9 (C-4a), 162.4 (C-5), 99.5 (C-6), 164.8 (C-7), 94.3 (C-8), 158.0 (C-8a), 123.6 (C-1'), 130.2 (C-2'), 122.4 (C-3'), 152.9 (C-4') 116.1 (C-5'), 127.4 (C-6'), 121.1 (C-11), 131.8 (C-12), 76.8 (C-13), 28.2 (C-14), 28.2 (C-15). 以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **2** 为 isoderrone。

4 晶体结构解析

图 2 为化合物 **1** 的晶胞结构图, 该化合物属于单斜晶系, 其中空间群为 $P2(1)/c$, 晶胞尺寸 $a = 0.8473(13)$ nm, $b = 0.8649(13)$ nm, $c = 2.3850(3)$ nm, a 和 c 夹角 $\beta = 91.95(2)^\circ$; 晶胞体积 $V = 1.747(5)$ nm³, 晶胞密度 $D_{\text{calcd}} = 1.332$ mg/mm³; 1 个晶胞中含 4 个分子, 所有键长和键角都在正常范围。化合物分子中的碳-碳键的长度介于正常 C-C 单键 (0.154 nm) 和 C=C 双键 (0.134 nm) 之间, 碳-氧键的长度介于正常 C-O 单键 (0.143 nm) 和 C=O 双键 (0.120 nm) 之间, 具有一定双键性质; 化合物 **1** 的六元环均近似为平面结构 [如 B 环 (C-15~C-20)、C 环 (C-9~C-14, O4)、A 环 (C-6~C-11)、D 环 (C-3~C-7, O1)], 异黄酮 A 环 C6~C11 与吡喃

环(C-3~C-7, O1)的夹角为 2.2° ,表明分子结构具有良好的共轭平面性质。从化合物1的b轴晶胞图可看出,连接在O2原子上的H2a与O3之间通过典型氢键O2-H2a...O3相互连接,此外,C-14和C-16上的H还分别与O3形成分子间和分子内氢键,化合物最终通过这种氢键作用力、 π - π 堆积作用和范德华力构成三维超分子建筑结构。

化合物2(图3)属于单斜晶系,空间群为 $P2(1)/c$,晶胞尺寸 $a=0.7947(6)$ nm, $b=1.2404(5)$ nm, $c=1.6313(3)$ nm, a 和 c 夹角 $\beta=91.95(2)^\circ$;晶胞体积 $V=1.597(3)$ nm³,晶胞密度 $D_{\text{calcd}}=1.399$

mg/mm³;1个晶胞中含4个分子,所有键长和键角都在正常范围。分子中C-C键和C-O键都处于正常的键长和键角范围之内,分子中环A、B环与C环之间的二面角均为 41.5° ,环D为半椅式构型。从化合物2晶胞结构可看出,连接在O5上的H5b与另1分子的O2原子之间通过氢键O5-H5b...O2相互连接形成链状结构;连接在O4原子上的H3a和连接在C-11上的H11a均与O2之间存在分子内氢键O4-H3a...O2以及C11-H11a...O2。化合物2最终通过分子间以及分子内氢键相互作用以及范德华力构成三维超分子建筑结构。

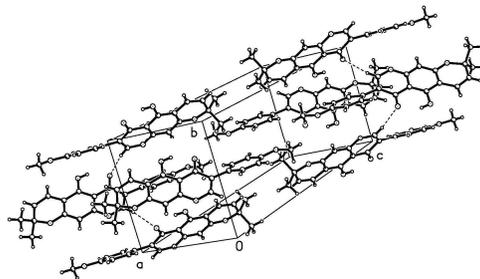
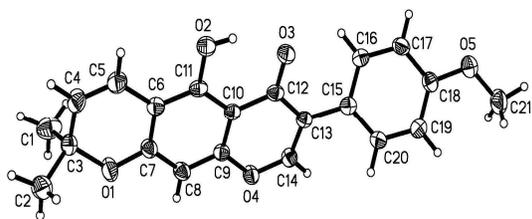


图2 化合物1的晶胞结构

Fig. 2 Crystal cell structure of compound 1

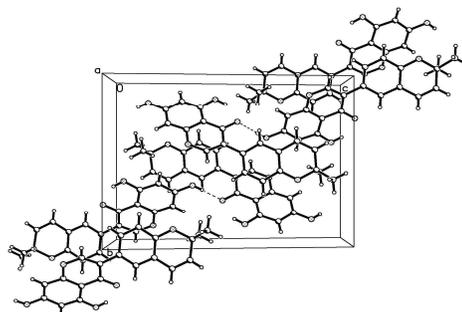
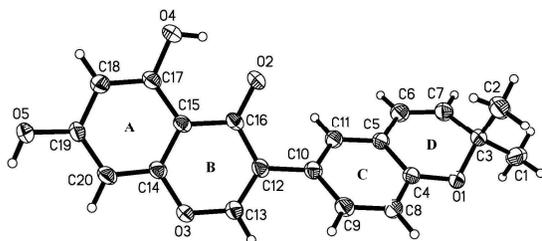


图3 化合物2的晶胞结构

Fig. 3 Crystal cell structure of compound 2

5 抗肿瘤活性筛选

采用MTT法,分别考察了化合物1和2对肝癌细胞株BEL-7404和胃癌细胞株SGC-7901的体外抗肿瘤细胞生长增殖活性,以顺铂为阳性对照,其IC₅₀值见表1。化合物2较化合物1有较好的抗BEL-

7404和SGC-7901增殖活性,这可能与异黄酮A环7-位羟基的存在与否有关;B环苯并吡喃结构比A环苯并吡喃结构具有较好的抗肝癌和胃癌细胞株活性。对其他肿瘤细胞的抑制活性有待进一步测试。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] Fukai T, Yonekawa M, Hou A J, et al. Antifungal agents from the roots of *Cudrania cochinchinensis* against *Candida Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 1118-1120.
- [3] Zhang P C, Feng Z M, Wang Y H, et al. Flavonoids, including an unusual flavonoid-Mg²⁺ salt, from roots of

表1 化合物1、2体外抑制肿瘤细胞增殖活性IC₅₀值

Table 1 IC₅₀ values of compounds 1 and 2 *in vitro* in inhibition on proliferation of tumor

化合物	IC ₅₀ / (μmol·L ⁻¹)	
	BEL-7404	SGC-7901
1	>120	>120
2	69.3	50.3
顺铂	23.2	6.7

- Cudrania cochinchinensis* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66: 2759-2965.
- [4] Robert K A, Birger D, Christian B H, *et al.* Invariom structure refinement, electrostaic potential and toxicity of 4-*O*-methylapinuisoflavone, *O*, *O*-dimethylalpinumisoflavone and 5-*O*-methyl-4-*O*-(3-methylbut-2-en-1-yl) alpinumisoflavone [J]. *Acta Cryst*, 2006, B62: 843-849.
- [5] Kezatas J B, Lenta B N, Ngouela S, *et al.* Isoderrone [J]. *Acta Cryst*, 2007, E63: 523-525.
- [6] Han X H, Hong S S, Hwang J S, *et al.* Monoamine oxidase inhibitory consituents from the fruits of *Cudrania tricuspidata* [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(12): 1324-1327.
- [7] Fu M Q, Deng D, Feng S X, *et al.* Chemical constituents from roots of *Flemingia philippinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(1): 8-11.