

甘遂的化学成分及其活性研究

邵霞¹, 林家红², 张丽^{1*}

1. 南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046

2. 南京恒通医药开发有限公司, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 对甘遂 *Euphorbia kansui* 毒性部位的化学成分进行提取分离和鉴定; 并对化合物进行细胞毒活性筛选。方法 通过硅胶柱色谱、制备型高效液相色谱等方法进行分离纯化, 根据波谱数据分析 (MS、¹H-NMR、¹³C-NMR) 鉴定化合物结构; 通过 MTT 法对单体化合物进行细胞毒活性测试。结果 从甘遂乙醇提取物的醋酸乙酯部位分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为甘遂萜脂 B (1)、3-O-(2, 3-二甲基丁酰基)-13-O-十二烷酰基-巨大戟二萜醇 (2)、5-O-苯甲酰-20-去氧巨大戟二萜醇 (3)、大戟醇 (4)、异东莨菪素 (5)、腺苷 (6)、羟基酪醇 (7)、2', 4', 7-三羟基异黄酮 (8)、大黄素 (9)。其中化合物 1 为假白榄烷型二萜类化合物, 2、3 为巨大戟烷型二萜类化合物, 4 为三萜类化合物。结论 化合物 6~8 为首次从该植物中分离得到的化合物, 3 和 9 对肠上皮细胞 ICE-6 具有较好的抑制作用。

关键词: 甘遂; 甘遂萜脂 B; 5-O-苯甲酰-20-去氧巨大戟二萜醇; 大戟醇; 腺苷; 2', 4', 7-三羟基异黄酮

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)23-3383-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.005

Chemical constituents in root tubers of *Euphorbia kansui* and their activities

SHAO Xia¹, LIN Jia-hong², ZHANG Li¹

1. Jiangsu Provincial Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Nanjing Jiangsu Hengtong Pharmaceutical Development Co., LTD, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To study the isolation and identification of the chemical constituents in the root tubers of *Euphorbia kansui* and screen the cytotoxic activity of monomer compounds. **Methods** The silica gel column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) methodx were used. The structures were identified by the spectrum data analysis (MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR); The cytotoxic activity of monomer compounds was determined by MTT method. **Results** Nine compounds were identified from the ethyl acetate part, respectively. They were kansuinin B (1), 3-O-(2, 3-dimethylbutanoyl)-13-O-dodecanoyl-ingenol (2), 5-O-benzoyl-20-deoxyingenol (3), euphol (4), isoscopletin (5), adenosine (6), hydroxytyrosol (7), 2', 4', 7-trihydroxy isoflavone (8), and emodin (9). Among them compound 1 is jatrophone-type diterpene, compounds 2 and 3 are the ingenane-type diterpenes, compound 4 is triterpene compound. **Conclusion** Compounds 6—8 are isolated from this plant for the first time. Compounds 1 and 9 have the good inhibition on intestinal epithelial cells ICE-6.

Key words: *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang; kansuinin B; 5-O-benzoyl-20-deoxyingenol; euphol; adenosine; 2', 4', 7-trihydroxy isoflavone

甘遂为大戟科大戟属植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的块根, 主产于山西、陕西、河南等地。甘遂性寒, 味苦, 有毒, 归肺、肾、大肠经, 具有泻水逐饮的功能, 在临床上多用于肝硬化腹水、胸腔积液、水肿、咳喘、肿瘤等病

症。主要化学成分为二萜、三萜及甾体类化合物, 其他成分包括香豆素、脂肪酸、蔗糖、鞣质、树脂等^[1], 其中二萜类成分是其主要毒效成分^[2-3]。由斑马鱼毒性评价试验结合文献研究^[4-5]表明甘遂醋酸乙酯部位毒性最强, 上述萜类化学成分主要集中在

收稿日期: 2014-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30973940, 81373972); 江苏政府留学奖学金资助 (JS-2009-061); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (YSXK-2010)

作者简介: 邵霞, 实验师, 研究方向为中药炮制。Tel: 13913030149 E-mail: shaoxia_1999@163.com

*通信作者 张丽 (1971—), 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药炮制与质量控制。Tel: (025)85811519 E-mail: zhangli@njutcm.edu.cn

甘遂醋酸乙酯部位,本研究对甘遂的醋酸乙酯部分进行提取分离,共得到9个化合物,分别鉴定为甘遂萜脂B(kansuinin B, **1**)、3-*O*-(2,3-二甲基丁酰基)-13-*O*-十二烷酰基-巨大戟二萜醇[3-*O*-(2,3-dimethylbutanoyl)-13-*O*-dodecanoyl-inganol, **2**]、5-*O*-苯甲酰-20-去氧巨大戟二萜醇(5-benzoyl-20-deoxyinganol, **3**)、大戟醇(euphol, **4**)、异东莨菪素(isoscopletin, **5**)、腺苷(adenosine, **6**)、羟基酪醇(hydroxytyrosol, **7**)、2',4',7-三羟基异黄酮(2',4',7-trihydroxy isoflavone, **8**)、大黄素(emodin, **9**)。其中化合物**1**为假白榄烷型二萜类化合物,**2**、**3**为巨大戟烷型二萜类化合物,**4**为三萜类化合物,化合物**6**~**8**为首次从该植物中分离得到的化合物。通过MTT法研究化合物**1**~**4**、**9**对肠上皮细胞ICE-6细胞增殖的影响,结果表明化合物**1**、**9**对肠上皮细胞ICE-6增殖表现出了较好的抑制作用。

1 仪器与材料

Bruker ARX500 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司),制备型高效液相色谱仪(Waters 600),NU3000 紫外检测器(江苏汉邦科技有限公司),柱色谱硅胶(100~200目)和薄层色谱硅胶G(60型)均为青岛海洋化工厂产品;所用溶剂均为分析纯或色谱纯。

IEC-6 细胞购自 ATCC 公司。甘遂药材购自陕西宝鸡赤沙乡,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根。

2 提取与分离

取生甘遂药材20 kg打粗粉,加入95%乙醇,50℃温浸。每天吸取上清液,减压浓缩,回收得甘遂乙醇提取物浓缩液,加适量硅藻土拌样、过筛,用醋酸乙酯反复萃取,得醋酸乙酯提取物浸膏1.032 kg。取醋酸乙酯浸膏进行硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(1:0~0:2)梯度洗脱,石油醚-醋酸乙酯(100:1)洗脱流分得混合物,经高效液相制备色谱(甲醇-水80:20),得化合物**1**(7 mg)、**5**(5 mg)、**6**(6 mg)、**7**(4 mg);石油醚-醋酸乙酯(100:2)洗脱流分得黄色混合物,经高效液相制备色谱(乙腈-水95:5)得化合物**2**(5 mg)、**3**(8 mg)、**4**(48 mg);石油醚-醋酸乙酯(100:3)洗脱流分得棕色混合物,经高效液相制备(甲醇-水60:40)得化合物**8**(5 mg)、**9**(36 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**:白色粉末(氯仿)。¹H-NMR(500 MHz,

CDCl₃) δ: 4.52 (1H, s, H-1), 5.43 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-3), 3.70 (1H, dd, *J* = 9.6, 3.6 Hz, H-4), 5.88 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-5), 5.33 (1H, m, H-7), 5.85 (1H, dd, *J* = 9.5, 16.0 Hz, H-8), 3.39 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-11), 2.95 (1H, s, H-12), 3.95 (1H, m, H-13), 1.30 (3H, s, H-16), 6.04 (1H, s, H-17a), 6.01 (1H, s, H-17b), 1.35 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 1.39 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-20), 2.46 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 2-OH), 3.36 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, 8-OH), 4.26 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 15-OH), 1.97 (3H, s, 3-COMe), 2.22 (3H, s, 15-COMe); C5 上取代苯环: 7.64 (4H, m, H-2, 6), 7.11 (2H, m, H-3, 5), 7.32 (1H, m, H-4); C7 上取代苯环: 7.64 (4H, m, H-2, 6), 7.19 (1H, m, H-4), 7.01 (2H, m, H-3, 5); ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ: 87.1 (C-1), 78.1 (C-2), 76.7 (C-3), 45.1 (C-4), 73.8 (C-5), 135.8 (C-6), 64.6 (C-7), 72.7 (C-8), 209.5 (C-9), 48.1 (C-10), 60.8 (C-11), 59.0 (C-12), 42.6 (C-13), 204.9 (C-14), 96.1 (C-15), 20.2 (C-16), 128.3 (C-17), 21.6 (C-18), 19.0 (C-19), 17.0 (C-20), 172.4 (1-CO), 21.3 (1-COMe), 168.8 (3-CO), 20.4 (3-COMe), 164.9 (5-CO), 166 (7-CO)。以上数据与文献报道一致^[6],故鉴定化合物**1**为甘遂萜脂B。

化合物**2**:白色蜡状物(氯仿)。¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ: 6.03 (1H, m, H-7), 6.01 (1H, m, H-1), 5.44 (1H, s, H-3), 4.15 (2H, s, H-20), 4.09 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.5 Hz, H-8), 4.06 (1H, s, H-5), 2.72 (1H, dd, *J* = 16.8, 2.8 Hz, H-12a), 2.61 (1H, m, H-11), 2.20 (1H, m, H-12b), 1.78 (3H, s, H-19), 1.19 (3H, s, H-17), 1.06 (3H, s, H-16), 0.97 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-18), 3 位取代基: 2.31 (1H, m, H-2'), 1.91 (1H, m, H-3'), 0.95 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-4'), 0.92 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 3'-CH₃), 1.14 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 2'-CH₃), 13 位取代基: 2.20 (2H, m, H-2''), 1.55 (2H, m, H-3''), 1.25 (16H, s, H-4''~9''), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-10'')。以上数据与文献报道一致^[6],故鉴定化合物**2**为3-*O*-(2,3-二甲基丁酰基)-13-*O*-十二烷酰基巨大戟二萜醇。

化合物**3**:无色蜡状固体(氯仿)。¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ: 5.99 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-1), 5.89 (1H, m, H-7), 5.40 (1H, s, H-5), 4.25 (1H, dd, *J* = 4.5, 14.1 Hz, H-8), 3.6 (1H, s, H-3), 2.43 (1H, m, H-11), 2.34 (1H, ddd, *J* = 4.8, 6.3, 15.9 Hz, H-12a), 1.82 (3H, d, *J* = 1.5 Hz, H-19), 1.76 (1H, ddd, *J* = 4.8, 6.3, 15.9 Hz, H-12b), 1.60 (3H, s, H-20), 1.17 (3H, s, H-17),

1.07 (3H, s, H-16), 0.98 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-18), 0.95 (1H, m, H-14), 0.69 (1H, m, H-13), C-Ph-5 依次为 8.10 (2H, m), 7.59 (2H, m), 7.45 (1H, m)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **3** 为 5-*O*-苯甲酰-20-去氧巨大戟二萜醇。

化合物 **4**: 白色针晶(氯仿)。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.09 (1H, m, H-24), 3.23 (1H, dd, $J = 11.4, 4.5$ Hz, H-3), 1.68 (3H, s, H-26), 1.60 (3H, brs, H-27), 1.00 (3H, s, H-29), 0.95 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-28), 0.84 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.80 (3H, s, H-18), 0.75 (3H, s, H-30); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 35.3 (C-1), 28.0 (C-2), 79.1 (C-3), 39.0 (C-4), 51.0 (C-5), 19.0 (C-6), 27.8 (C-7), 134.1 (C-8), 133.6 (C-9), 37.4 (C-10), 21.7 (C-11), 28.2 (C-12), 44.2 (C-13), 50.1 (C-14), 29.9 (C-15), 28.3 (C-16), 49.7 (C-17), 15.7 (C-18), 20.3 (C-19), 36.0 (C-20), 19.0 (C-21), 35.5 (C-22), 24.8 (C-23), 125.3 (C-24), 131.0 (C-25), 17.8 (C-26), 25.9 (C-27), 24.6 (C-28), 28.2 (C-29), 15.7 (C-30)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **4** 为大戟醇。

化合物 **5**: 无色针晶(氯仿)。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.59 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-4), 6.27 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3), 6.92 (1H, s, H-5), 6.85 (1H, s, H-8), 6.1 (1H, brs, OH), 3.95 (3H, s, -OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **5** 为异东莨菪素。

化合物 **6**: 无色粉末(氯仿)。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.41 (1H, s, H-8), 8.25 (1H, s, H-2), 6.01 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 4.70 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, H-2'), 4.33 (1H, dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, H-3'), 4.16 (1H, dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, H-4'), 3.88 (1H, dd, $J = 12.0, 2.5$ Hz, H-5'), 3.75 (1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, H-5'); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 156.4 (C-6), 151.6 (C-8), 150.2 (C-5), 142.7 (C-2), 121.1 (C-4), 91.3 (C-1'), 88.2 (C-4'), 75.9 (C-2'), 72.6 (C-3'), 63.4 (C-5')。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **6** 为腺苷。

化合物 **7**: 无色粉末(氯仿)。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.65 (1H, s, -OH), 8.55 (1H, s, -OH), 6.60 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5), 6.57 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.42 (1H, dd, $J = 2.0, 7.5$ Hz, H-6), 4.51 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, -OH), 3.50 (2H, m, H-8), 2.53 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 144.8 (C-3), 143.2 (C-4), 130.1 (C-1), 119.3 (C-6), 116.2

(C-5), 115.3 (C-2), 62.5 (C-8), 38.4 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **7** 为羟基酯醇。

化合物 **8**: 淡黄色粉末(DMSO)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.13 (1H, s, H-2), 7.92 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5), 6.97 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 6.91 (1H, dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, H-6), 6.83 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8), 6.34 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'), 6.26 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-5')。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **8** 为 2', 4', 7-三羟基异黄酮。

化合物 **9**: 黄色粉末(氯仿)。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 12.3 (1H, s, -OH), 12.1 (1H, s, -OH), 7.63 (1H, brs, H-5), 7.28 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-4), 7.10 (1H, brs, H-7), 6.67 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-2), 5.75 (1H, brs, 3-OH), 2.45 (3H, s, CH₃)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **9** 为大黄素。

4 活性筛选

采用 MTT 法测定细胞相对抑制率, 取对数生长期 IEC-6 细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 调整细胞密度为 1×10^4 个/mL, 以每孔 100 μ L 的体积将细胞接种于 96 孔板中, 设给药组、阴性对照组、空白组, 各组均设 6 个复孔, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁, 然后加入每孔 100 L 不同浓度的 **1~4**、**9** 的供试品溶液, 使得各供试品的终浓度为 3.125、6.25、12.5、25、50 μ g/mL。阴性对照组加入等体积细胞培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液(浓度为 5 mg/mL), 继续培养 4 h, 轻轻吸弃上清, 每孔加二甲基亚砜(DMSO) 150 μ L, 水平摇床混匀, 使结晶物充分溶解。置酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度(A)值。按下式计算给药前后 IEC-6 的生长抑制率(IR), 求算 IC₅₀ 值。测定结果见表 1。

$$IR = 1 - A_{\text{给药组}} / A_{\text{阴性对照组}}$$

表 1 化合物 **1~4**、**9** 对大鼠小肠隐窝上皮细胞株 IEC-6 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of compounds **1~4** and **9** from root tubers of *E. kansui* on proliferation of IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

化合物	IC ₅₀ / (μ mol·L ⁻¹)
1	>100
2	54.936
3	16.605
4	65.680
9	25.245

由实验结果看出, 巨大戟烷型二萜类成分化合物 **3** 的 IC_{50} 值较小, 具有较强的肠细胞毒性, 且随浓度的增加, 细胞增殖抑制率增大, 具有一定的量-毒关系。假白榄烷型二萜类化合物 **1** 和三萜类化合物 **4** 未显示出较好的细胞毒性作用。据文献资料显示, 大黄素具有致泻的作用^[13], 并且具有抑制细胞增殖的作用^[14], 实验结果得出大黄素 (**9**) 对肠上皮细胞 ICE-6 具有较好的抑制作用。

参考文献

- [1] Uemura D, Ohwaki H, Hirata Y. Isolation and structures of 20-deoxyingenol new diterpene, derivatives and ingenol derivative obtained from “kansui” [J]. *Tetrahedron Lett*, 1974, 29: 2527-2528.
- [2] 师彦平, 贾忠建. 我国大戟二萜酯及其生理活性研究新进展 [J]. 高等学校化学学报, 1997, 18(7): 1109-1112.
- [3] 师彦平, 贺志军, 贾忠建. 大戟二萜结构及其生理活性研究进展 (I)—曼西醇及其相关碳骨架二萜醇类 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5): 85-89.
- [4] 黄海燕, 束晓云, 丁安伟, 等. 甘遂和醋甘遂醇提物及其不同极性部位的药效和毒性研究 [J]. 中国药业, 2008, 17(17): 3-4.
- [5] 耿 婷, 黄海燕, 丁安伟, 等. 甘遂炮制前后各部位刺激性和泻下作用研究 [J]. 中南药学, 2008, 6(4): 385-388.
- [6] 王立岩. 甘遂的化学成分及其生物活性的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [7] 吴晓磊, 潘 勤. 甘遂化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 877-881.
- [8] 丁林芬, 马银海, 吴兴德, 等. 珍珠菜的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(6): 704-7081.
- [9] 吴少华, 陈有为, 杨丽源, 等. 印度块菌的化学成分研究 [J]. 医学教育探索, 2009, 40(8): 1211-1214.
- [10] 冯卫生, 苏芳谊, 郑晓珂, 等. 华北耧斗菜的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(7): 496-499.
- [11] Yoo H S, Lee J S, Kim C Y, *et al.* Flavonoids of *Crotalaria sessiliflora* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(5): 544-546.
- [12] 李路军, 杜 鹏, 张 鹏, 等. 榕叶冬青叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 519-523.
- [13] 周成华, 武玉清, 许正新, 等. 大黄素对小肠运动的影响及其机制 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(12): 1421-1424.
- [14] 李 杰, 张陆勇, 江振洲. 大黄素的药理学研究近况 [J]. 药学进展, 2005, 29(12): 540-544.