

皂角刺中 3 个香豆素类化合物及其细胞毒活性研究

尹卫平*, 刘华清, 高嘉屿, 曹冉冉

河南科技大学化工与制药学院, 河南 洛阳 471023

摘要: 目的 研究皂角刺 *Gleditsiae Spina* (皂荚干燥棘刺) 的化学成分。方法 利用硅胶、Sephadex LH-20 等柱色谱法反复进行分离纯化, 通过谱学分析和理化性质鉴定表征化合物的结构。细胞毒活性采用四甲偶氮唑盐 (MTT) 比色法, 测定化合物对肝癌 (HepG2)、肺癌 (A-549) 和食管癌 (EC109) 细胞株的细胞增殖抑制率。结果 从皂角刺 90%乙醇提取物的醋酸乙酯部位分离得到 3 个香豆素类化合物, 分别鉴定为滨蒿内酯 (1)、异东茛菪内酯 (2) 和 6-氨基-7-甲氧基香豆素 (3)。结论 化合物 3 为新的香豆素类化合物, 命名为皂角香豆素 A。化合物 1、2 为首次从该植物中分离得到。细胞毒活性研究显示化合物 2 对肺癌 A549 细胞有较强的增殖抑制活性, 其 IC₅₀ 值为 34.47 μg/mL。

关键词: 皂角刺; 皂角香豆素 A; 滨蒿内酯; 异东茛菪内酯; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)14-2424-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.005

Investigation of three coumarin components in thorns of *Gleditsia sinensis* and their cytotoxic activity to tumor cells

YIN Wei-ping, LIU Hua-qing, GAO Jia-yu, CAO Ran-ran

School of Chemical Engineering and Pharmaceutics, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from *Gleditsiae Spina* (the thorns of *Gleditsia sinensis*). **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20 column chromatographic techniques, and their chemical structures were confirmed on the basis of spectroscopic analysis by the physicochemical properties. Cytotoxic activity using the MTT colorimetry method was performed to measure the inhibitory effect of the compounds on cell proliferation of HepG2, A-549, and EC109. **Results** Three coumarins were obtained from the ethyl acetate soluble fraction of the 90% ethanolic extract and their structures were identified as scoparone (1), isoscopoletin (2), and 6-amino-7-methoxycoumarin (3). **Conclusion** Compound 3 is a novel coumarin named gledisinmarin A. Compounds 1 and 2 are isolated from this plant for the first time. Compound 2 displays the stronger cytotoxicity against A549 cell with an IC₅₀ value of 34.47 μg/mL, while cisplatin with an IC₅₀ value of 11.50 μg/mL as a positive control.

Key words: *Gleditsiae Spina*; gledisinmarin A; scoparone; isoscopoletin; antitumor activity

皂角刺 *Gleditsiae Spina* 为双子叶豆科 (Leguminosae) 皂荚属 *Gleditsiae* L. 植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺, 又名皂刺、皂荚刺、天丁、皂角针、皂针。该植物广泛分布于中国、日本和韩国以及东南亚地区, 我国主要产于江苏、湖北、河南、河北等地, 全年均可采收, 民间及临床应用历史悠久。据中医药文献记载, 皂角刺具有消肿排脓、解毒和杀虫的功效^[1-3], 临床用于痈疽肿毒均有较好的治疗效果。现代药理学研究证明, 皂角刺作为抗癌中药之一, 可用于多种肿瘤的治疗^[3-5]。

前期文献报道显示, 皂角刺中主要为三萜及皂苷^[4-7]、黄酮^[4,8]、酚酸^[9-10]、刺囊酸糖苷^[11-13]等药效成分。为进一步阐明皂角刺的抗肿瘤活性成分, 本课题组对皂角刺的脂溶性化学成分作了系统研究。通过理化常数及波谱分析对分离得到的化合物进行了结构鉴定。前期曾报道了皂角刺中二氢黄酮醇类化合物的研究^[14], 本实验继续对河南伏牛山产的皂角刺进行研究, 从其 90%乙醇提取物的醋酸乙酯部位分离得到 3 个香豆素类化合物 (结构见图 1), 分别鉴定为滨蒿内酯 (scoparone, 1)、异东茛菪内酯

收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (U1504830)

*通信作者 尹卫平, 女, 教授, 博士生导师。Tel: (0379)64231914 E-mail: yinwp@haust.edu.cn

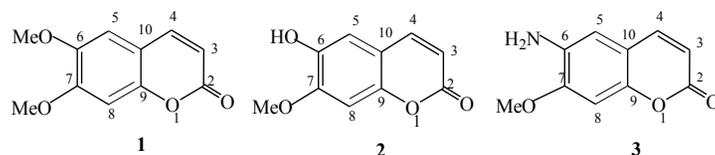


图1 化合物1~3的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1—3

(isoscopoletin, **2**) 和 6-氨基-7-甲氧基香豆素 (6-amino-7-methoxycoumarin, **3**)。其中, 化合物 **3** 为新的香豆素类化合物, 命名为皂角香豆素 A。化合物 **1**~**2** 为首次从该植物中分离得到。细胞毒活性研究显示化合物 **2** 对肺癌 A549 细胞有较强的增殖抑制活性。

1 仪器与材料

高效液相-离子阱-飞行时间质谱仪(日本岛津公司); Avance 400 MHz 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); UV-2401 紫外光谱仪(日本岛津公司); Thermo Flash EA1112 型元素分析仪(美国热电集团 Thermo Electron); 反相半制备高相液相色谱仪(semi-preparative RP-HPLC, 美国 Waters 600), LH-20 凝胶填料(日本三菱公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱用硅胶 80~100、200~300 目(青岛海洋化工厂生产); 其他试剂均为分析纯。

人肝癌(HepG2)、食管癌(EC109)、肺癌(A549) 3 种细胞株, 由本实验室保存; 新生牛血清, 上海洛神生物技术有限公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT) 和 DMSO, Amresco 公司; 顺铂, 江苏豪森药业股份有限公司。

皂角刺于2013年9月采自河南洛阳嵩县九店乡基地提供的出口原产地品种。原材料由河南科技大学农学院侯典云博士鉴定为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的棘刺。植物标本(ZJ-TCB-201309) 存放于河南科技大学伏牛山药用植物标本馆内。

2 提取与分离

干燥皂角刺 10.0 kg, 粉碎, 用 90%乙醇回流提取 3 次, 合并提取液, 室温下静置 48 h。提取液减压浓缩得皂角刺乙醇浸膏共 0.6 kg。浸膏中加水搅拌, 使浸膏溶解完全, 滤去不溶物后, 依次用石油醚和醋酸乙酯萃取。醋酸乙酯部位回收溶剂后, 得醋酸乙酯浸膏 143 g。醋酸乙酯浸膏用硅胶柱色谱分离, 经石油醚-醋酸乙酯(10:1、8:2、6:4、1:1、4:6、2:8) 洗脱, 收集馏份; 其中收集的 6:4 的馏份用环己烷-丙酮(10:1、8:2、6:4、1:

1、4:6、2:8) 梯度洗脱, 收集馏份; 其中收集的 8:2 的馏份经三氯甲烷-甲醇(9:1、7:1、7:3、5:4、1:1、4:5、3:7、1:7) 梯度洗脱, 收集合并为三氯甲烷-甲醇 9:1 的洗脱液馏份中, 有黄色固体析出, 固液分离后, 经丙酮重结晶得到淡黄色粒状物, 为化合物 **1** (32.0 mg)。固体析出后的母液部分被浓缩后, 经 Sephadex LH-20 进一步分离得到化合物 **2** (28.4 mg)。取三氯甲烷-甲醇的 7:1 的馏份, 进一步反复用高效液相制备色谱(RP-HPLC) 分离纯化, 采用 ODS C-18 反相色谱柱(YMC-PACK ODS-A, 250 mm×15 mm, 5 μm) 等度洗脱, 洗脱剂为甲醇-水(90:10), 体积流量为 10 mL/min, 示差检测器检测, 经多次重复分离得化合物 **3** (16.3 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色结晶(丙酮), mp 144~145 °C。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.85 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-3), 7.11 (1H, s, H-5), 6.77 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-4), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 3.66 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 162.1 (C-2), 153.0 (C-7), 151.6 (C-9), 146.6 (C-6), 143.6 (C-4), 112.7 (C-3), 112.1 (C-10), 109.3 (C-5), 102.4 (C-8), 56.0 (-OCH₃), 53.0 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **1** 为滨蒿内酯。

化合物 **2**: 白色针晶(甲醇), mp 206~208 °C。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.84 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-3), 7.10 (1H, s, H-5), 6.75 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-4), 3.90 (3H, s, -OCH₃), 6.90 (1H, br, -OH); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 164.0 (C-2), 152.9 (C-7), 151.4 (C-9), 147.1 (C-6), 146.2 (C-4), 112.5 (C-3), 112.7 (C-10), 109.0 (C-5), 104.0 (C-8), 56.8 (-OCH₃)。其核磁共振图谱与化合物 **1** 非常相似, 相比化合物 **1** 明显少了 1 个甲氧基信号在 δ_H 3.66 和 δ_C 53.0 (-OCH₃), 提示化合物 **2** 是化合物 **1** 的衍生物。ESI-MS *m/z*: [M-H]⁻ 191.16,

相对分子质量为 192, 分子式为 $C_{10}H_8O_4$ 。综合以上光谱数据, 结合文献报道^[16-17], 故鉴定化合物 **2** 为异东茛菪内酯。

化合物 **3**: 淡黄色胶状物。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 191.058 5 $[M]^+$ (计算值 191.058 2), 提示化合物中含有奇数个 N 原子。元素分析 (C: 62.80, H: 4.76, N: 7.34, O: 25.10) 显示该化合物中含有 10 个碳、9 个 H、1 个 N 和 3 个 O 原子, 结合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱, 确定化合物 **3** 的分子式为 $C_{10}H_9NO_3$ 。比较化合物 **3** 与化合物 **1** 的核磁共振图谱, 可以明显观察到有类似的 1 组 6,7-二取代香豆素母核的信号 (C-2~C-10; H-3、H-4、H-5 和 H-8)^[17]、和 1 个甲氧基信号 (C-1' 和 H-1') 及 1 个 $-NH_2$ 基活泼氢信号 δ_H 3.84 (2H, br) 等, 见表 1。化合物 **3** 中的 2 个取代基的位置进一步通过 HMBC 谱确定。在 HMBC 谱 (图 2) 中, 观测到了甲基氢 H-1' 与 C-6、C-7、C-8 相关以及氨基上的氢与 C-5、C-6、C-7 信号相关, 可确定化合物 **3** 中的甲氧基和氨基官能团分别取代在香豆素母核的 C-7 和 C-6 位

表 1 化合物 **3** 的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR (400/100 MHz, MeOD) 波谱数据归属

Table 1 1H -NMR and ^{13}C -NMR data assignment of compound **3** (400/100 MHz, MeOD)

碳位	δ_H	δ_C (DEPT)	HMBC
1			
2		162.9 (C)	
3	7.85 (1H, d, $J=9.4$ Hz)	116.6 (CH)	H-3/C-2, 4
4	6.19 (1H, d, $J=9.4$ Hz)	144.7 (CH)	H-4/C-2, 10
5	7.10 (1H, s)	112.5 (CH)	H-5/C-7, 10
6		144.1 (C)	
7		154.3 (C)	
8	6.77 (1H, s)	110.8 (CH)	H-8/C-9, 6
9		152.6 (C)	
10		113.7 (C)	
1'	3.90 (3H, s)	55.6 (-OCH ₃)	H-1'/C-6, 7, 8
-NH ₂	3.84 (2H, br)		H-/C-5, 6, 7

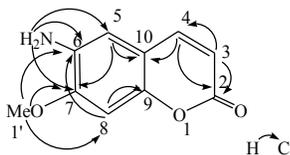


图 2 化合物 **3** 的 HMBC 相关

Fig. 2 HMBC correlation of compound **3**

上^[18-19]。综上谱学数据分析和文献对照^[17-19], 化合物 **3** 的结构确定为 6-氨基-7-甲氧基-香豆素。经文献检索, 化合物 **3** 是 1 个新化合物, 命名为皂角香豆素 A。

4 化合物的细胞毒活性

采用 MTT 法^[20]对化合物进行肝癌 (HepG2)、食管癌 (EC109)、肺癌 (A549) 3 种细胞株的体外细胞毒活性测定。结果发现, 化合物 **2** 对人肺癌 A-549 细胞有较强的增殖抑制活性, 其 IC_{50} 值为 34.47 $\mu g/mL$, 阳性对照顺铂的 IC_{50} 值为 11.50 $\mu g/mL$ 。

5 讨论

香豆素类化合物广泛分布于植物界中, 其生理药理活性具有多样性。尤其香豆素类化合物相对分子质量较小, 合成相对简单, 生物利用度高, 近年来的研究发现, 香豆素类化合物在啮齿类动物中存在着明显的毒性作用, 且具有种属和位点特异性, 因此由于香豆素及其衍生物结构的特殊性, 其药理及毒理作用成为国内外持续研究的热点。另据文献报道, 化合物 **1** 和化合物异茛菪内酯无论是他们自身的抗菌、抗病毒和抗癌等生物活性, 还是作为药物中间体和天然化合物对照品, 都有着广泛的应用^[19]。综上研究推断该类化合物可能同样为皂角刺细胞毒活性的主要成分之一。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 宋立仁. 中华本草纲要 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 陈国平. 中国抗癌中草药 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984.
- [4] 徐哲, 赵晓頔, 王漪檬. 皂角刺抗肿瘤活性成分的分离鉴定与活性测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(2): 108-110.
- [5] Zhang Z Z, Kazuo K, Jia Z H, et al. Triterpenoidal saponins from *Gleditsia sinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(4): 715-722.
- [6] Li W H, Zhang X M, Tian R R, et al. A new anti-HIV lupine acid from *Gleditsia sinensis* Lam. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(6): 551-555.
- [7] Lim J C, Park J H, Budesinsky M, et al. Antimutagenic constituents from the thorns of *Gleditsia sinensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(5): 561-564.
- [8] 李万华, 李琴, 王小刚, 等. 皂角刺中黄酮类化学成分分离鉴定 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2005, 35(6): 763-765.

- [9] Zhou L G, Li D, Gou J, *et al.* Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(4): 283-291.
- [10] Xian Y X, Zhou H L, Wang X, *et al.* Anti-liver cancer constituents from the thorns of *Gleditsia sinensis* [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 13: 343-347.
- [11] 李万华, 傅建熙, 范代娣. 皂角刺化学成分的研究皂甙成分的研究 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2000, 30(2): 137-138.
- [12] Zhou L G, Li D, Jian W B, *et al.* Two ellagic acid glycosides from *Gleditsia sinensis* Lam. with antifungal activity on *Magnaporthe grisea* [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(4): 303-309.
- [13] Wang J H, Tang J, Li D, *et al.* Chemical constituents and bioactivity of *Gleditsia* plants [J]. *Chin Wild Plant Res*, 2008, 27(6): 1-3.
- [14] 曹冉冉, 高嘉屿, 尹卫平, 等. 皂角刺中二氢黄酮醇类化合物及其细胞毒活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 707-711.
- [15] 刘应杰, 陈竹, 叶小利, 等. 紫薯中 6,7-二甲氧基香豆素和 5-羟甲基糠醛的分离鉴定 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 38(1): 85-89.
- [16] 吴文标, 盛德贤, 吕世安, 等. 马铃薯块茎中的 6-羟基-7-甲氧基香豆素的分离和鉴定 [J]. 中国马铃薯, 1999, 13(2): 79-80.
- [17] 梁晓天, 刘春雪, 姬政, 等. 蓑苣亭及异蓑苣亭的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 1983, 14(4): 6-7.
- [18] 龚运怀. 天然有机化合物的 ¹³C 核磁共振化学位移 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1986.
- [19] Mulwad V V, Dalvi M B, Mahaddalkar B S. Synthesis of some antimicrobial pyranocarbazomycin [J]. *Indian J Chem, Sec B: Org Chem Including Med Chem*, 2002, 41B(7): 1477-1479.
- [20] Hu Q F, Zhou B, Ye Y Q, *et al.* Cytotoxic deoxybenzoins and diphenylethylenes from *Arundina graminifolia* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(10): 1854-1859.