

皂角刺中黄酮类成分及其抗肿瘤活性研究

李 岗¹, 王召平¹, 仙云霞², 周洪雷², 王 晓^{1,2}, 刘 伟¹, 于金倩^{1*}

1. 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250014

摘要: 目的 研究皂角刺 *Gleditsiae Spina* 中黄酮类化学成分及其抗肿瘤活性。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱及半制备 HPLC 等方法对皂角刺中黄酮类化学成分进行分离纯化, 并根据理化性质和波谱学数据分析鉴定化合物结构; 采用 SRB 法测定化合物 7~16 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞毒活性。结果 从皂角刺醋酸乙酯部位中分离得到 16 个黄酮类化合物, 分别鉴定为 tricin (1)、甘草素 (2)、7,4'-二羟基-5,3'-二甲氧基黄酮醇 (3)、鹰嘴豆醇 (4)、7,3',5'-三羟基二氢黄酮 (5)、7,4'-二羟基黄酮醇 (6)、双氢山柰素 (7)、紫柳查耳酮 (8)、(2S)-5,7,3',5'-四羟基二氢黄酮 (9)、7,3',5'-三羟基-5-甲氧基黄酮醇 (10)、槲皮素 (11)、黄颜木素 (12)、fisetin (13)、leucorobinetinidin (14)、thevetiaflavon (15)、异牡荆素 (16); 其中化合物 8 对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 值为 28.53 μmol/L。结论 化合物 1~6、8~10、14、15 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 8 对 MCF-7 细胞具有明显细胞毒活性。

关键词: 皂角刺; 黄酮类; 7,4'-二羟基-5,3'-二甲氧基黄酮醇; 紫柳查耳酮; 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基黄酮醇; 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)16-2812-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.005

Flavonoids from *Gleditsiae Spina* and their antitumor activities

LI Gang¹, WANG Zhao-ping¹, XIAN Yun-xia², ZHOU Hong-lei², WANG Xiao^{1,2}, LIU Wei¹, YU Jin-qian¹

1. Shandong Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China

2. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To investigate the flavonoids from *Gleditsiae Spina* (thorns of *Gleditsia sinensis*) and their antitumor activities.

Methods The chemical constituents in the EtOAc fraction from *Gleditsiae Spina* were isolated and purified by the chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 columns, and semi-preparative HPLC. Their structures were identified by various spectroscopic analyses, and the cytotoxicity of compounds 7—16 were evaluated *in vitro* against MCF-7 cell lines by SRB method. **Results** Sixteen compounds were isolated from the extracts of *Gleditsiae Spina* and identified as tricin (1), liquiritigenin (2), 7,4'-dihydroxy-5,3'-dimethoxyflavanonol (3), garbanzol (4), 7,3',5'-trihydroxyflavanone (5), 7,4'-dihydroxyflavanol (6), dihydrokaempferol (7), butein (8), (2S)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (9), 7,3',5'-trihydroxy-5-methoxyflavanonol (10), quercetin (11), fustin (12), fisetin (13), leucorobinetinidin (14), thevetiaflavon (15), and isovitexin (16). Compound 8 showed the inhibitory effect against MCF-7 cells with IC₅₀ value of 28.53 μmol/L. **Conclusion** Compounds 1—6, 8—10, 14 and 15 are isolated from the plants of *Gleditsia* L. for the first time, compound 8 shows the significant cytotoxic activity against MCF-7 cells.

Key words: *Gleditsiae Spina*; flavonoids; 7,4'-dihydroxy-5,3'-dimethoxyflavanonol; butein; 7,3',5'-trihydroxy-5-methoxyflavanonol; antitumor activity

皂角刺 *Gleditsiae Spina* 又名皂荚刺、皂角针、天丁等, 为豆科 (Leguminosae) 皂荚属 *Gleditsia* L. 植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺, 在我国分布广泛, 以江苏和湖北为主要产地。全年均可采收, 以 9 月至次年 3 月间为宜。其味辛、性温,

归肝、胃经, 具有消肿托毒、排脓、杀虫等功效^[1]。现代研究表明, 皂角刺中主要含有黄酮类、酚酸类、萜类、甾体类等多种化学成分, 具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、免疫调节等作用^[2]。其中, 皂角刺总黄酮对结肠癌^[3]、肺癌^[4]、肝癌^[5]等癌细胞具有一定的抑制

收稿日期: 2016-03-10

基金项目: 山东省科学院科学技术发展计划项目 (2014QN02); 山东省科学院—枣庄产学研联合基金资助项目

作者简介: 李 岗 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药及复方活性成分与质量控制研究。E-mail: ligang2010@126.com

*通信作者 于金倩, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为天然产物化学。E-mail: yujinqian87528@126.com

作用。为深入探究皂角刺抗肿瘤的药效物质基础,本实验对其化学成分进行系统研究,从皂角刺醋酸乙酯部位分离得到 16 个黄酮类化合物,分别鉴定为 tricin (1)、甘草素 (liquiritigenin, 2)、7,4'-二羟基-5,3'-二甲氧基黄酮醇 (7,4'-dihydroxy-5,3'-dimethoxyflavanonol, 3)、鹰嘴豆醇 (garbanzol, 4)、7,3',5'-三羟基二氢黄酮 (7,3',5'-trihydroxyflavanone, 5)、7,4'-二羟基黄酮醇 (7,4'-dihydroxyflavanol, 6)、双氢山柰素 (dihydrokaempferol, 7)、紫柳查耳酮 (butein, 8)、(2S)-5,7,3',5'-四羟基-二氢黄酮 [(2S)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone, 9]、7,3',5'-三羟基-5-甲氧基黄酮醇 (7,3',5'-trihydroxy-5-methoxyflavanonol, 10)、槲皮素 (quercetin, 11)、黄颜木素 (fustin, 12)、fisetin (13)、leucorobinetinidin (14)、thevetiaflavon (15)、异牡荆素 (isovitexin, 16)。化合物 1~6、8~10、14~15 为首次从该属植物中分离得到,其中化合物 8 对 MCF-7 细胞具有明显的细胞毒活性。

1 仪器与材料

Bruker AVIIIHD-600 核磁共振波谱仪、Bruker-400 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); Waters 2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); EYELA N-1200A 型旋转蒸发器 (日本东京理化); 半制备 HPLC 分析仪器为岛津 LC-20A (日本岛津公司); 薄层硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); HPLC 用甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Tedia 公司), 娃哈哈纯净水; 其余试剂均为分析纯; 人乳腺癌细胞 MCF-7 (中国科学院上海生命科学院细胞库)。

皂角刺 *Gleditsiae Spina* 药材采购于安徽亳州市场, 经山东中医药大学周洪雷教授鉴定为豆科皂荚属植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺。样品标本 (20130820) 保存于山东省分析测试中心山东省中药质量控制技术重点实验室。

2 提取与分离

干燥皂角刺 8 kg 粉碎, 过 40 目筛。用 95% 乙醇 64 L 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并、浓缩提取液。依次用等体积石油醚、醋酸乙酯萃取 3 次, 浓缩得醋酸乙酯部位浸膏约 230 g。醋酸乙酯部位经硅胶柱色谱分离, 采用二氯甲烷-甲醇 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 经 TLC 检识合并得到 15 个馏份 Fr. 1~15。

Fr. 6 经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20、HPLC 制备液相色谱分离得到化合物 1 (8.5 mg); Fr. 7 经

硅胶柱色谱结合 HPLC 制备液相色谱分离得到化合物 2 (8.0 mg)、3 (14.5 mg); Fr. 8 经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20, 结合 HPLC 制备液相色谱、重结晶等手段得到化合物 4 (31.4 mg)、6 (5.2 mg)、7 (26.2 mg)、9 (4.0 mg); Fr. 9 经硅胶柱色谱结合 Sephadex LH-20、HPLC 制备液相色谱分离得到化合物 5 (33.4 mg)、6 (5.2 mg)、8 (8.0 mg)、9 (6.0 mg); Fr. 10 经硅胶柱色谱结合 Sephadex LH-20 分离得到化合物 10 (8.2 mg)、11 (8.5 mg); Fr. 12 经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20、制备液相色谱分离得到化合物 10 (7.6 mg)、11 (7.4 mg)、12 (27 mg)、13 (32.9 mg)、14 (9.6 mg)、15 (9.2 mg); Fr. 14 经硅胶柱色谱结合 RP-C₁₈ 中压柱色谱、制备液相色谱分离得到化合物 16 (6.2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色针晶 (CH₃OH), ESI-MS m/z : 331.0 $[M+H]^+$ (C₁₇H₁₄O₇); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 7.33 (2H, s, H-2', 6'), 6.99 (1H, s, H-3), 6.57 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-6), 3.89 (6H, s, 3', 5'-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 182.2 (C-4), 164.6 (C-7), 164.1 (C-2), 161.8 (C-5), 157.8 (C-9), 148.6 (C-3', 5'), 140.3 (C-4'), 120.8 (C-1'), 109.9 (C-2', 6'), 104.8 (C-10), 104.2 (C-3), 104.0 (C-6), 94.6 (C-8), 56.8 (3', 5'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 1 为 tricin。

化合物 2: 黄色结晶 (CH₃OH), ESI-MS m/z : 256.8 $[M+H]^+$ (C₁₅H₁₂O₄); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.56 (1H, s, 7-OH), 9.58 (1H, s, 4'-OH), 7.65 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 7.32 (2H, dd, J = 2.4, 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.79 (2H, dd, J = 2.0, 8.4 Hz, H-3', 5'), 6.51 (1H, dd, J = 2.4, 8.8 Hz, H-6), 6.33 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-8), 5.44 (1H, dd, J = 2.8, 12.8 Hz, H-2), 3.16 (1H, dd, J = 3.6, 16.8 Hz, H-3a), 2.62 (1H, dd, J = 2.8, 16.8 Hz, H-3b); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 190.5 (C-4), 165.1 (C-7), 163.6 (C-9), 158.1 (C-4'), 129.8 (C-1'), 128.9 (C-5), 128.7 (C-2', 6'), 115.6 (C-3', 5'), 114.0 (C-10), 110.9 (C-6), 103.0 (C-8), 79.4 (C-2), 43.6 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 2 为甘草素。

化合物 3: 黄色针晶 (CH₃OH), ESI-MS m/z : 333 $[M+H]^+$; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.06 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.88 (1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.04 (1H, d,

$J = 1.6$ Hz, H-6), 5.88 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 4.91 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-2), 4.35 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-3), 3.77 (6H, s, 5, 3'-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 190.2 (C-4), 165.2 (C-7), 164.2 (C-9), 162.6 (C-5), 147.8 (C-3'), 147.4 (C-4'), 130.1 (C-1'), 121.4 (C-6'), 115.4 (C-5'), 112.6 (C-2'), 102.1 (C-10), 96.1 (C-8), 94.1 (C-6), 83.0 (C-2), 72.8 (C-3), 56.1 (5, 3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为 7,4'-二羟基-5,3'-二甲氧基黄酮醇。

化合物 **4**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 273 [M+H]⁺ (C₁₅H₁₂O₅); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.64 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.32 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.79 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.53 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-6), 6.29 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.03 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-2), 4.49 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-3); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 192.9 (C-4), 165.5 (C-7), 163.3 (C-9), 158.1 (C-4'), 130.0 (C-2', 6'), 129.1 (C-5), 128.4 (C-1'), 115.3 (C-3', 5'), 112.5 (C-10), 111.4 (C-6), 102.9 (C-8), 83.8 (C-2), 72.9 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **4** 为鹰嘴豆醇。

化合物 **5**: 黄色结晶 (CH₃OH), ESI-MS m/z : 273 [M+H]⁺ (C₁₅H₁₂O₅); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.63 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.89 (1H, brs, H-4'), 6.75 (2H, brs, H-2', 6'), 6.49 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-6), 6.33 (1H, brs, H-8), 5.38 (1H, dd, $J = 2.0, 12.4$ Hz, H-2a), 3.05 (1H, dd, $J = 12.7, 16.7$ Hz, H-3a), 2.63 (1H, dd, $J = 2.2, 16.7$ Hz, H-3e); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 190.5 (C-4), 165.5 (C-9), 163.6 (C-7), 146.1 (C-5'), 145.7 (C-3'), 130.4 (C-1'), 128.8 (C-5), 118.3 (C-2'), 115.8 (C-6'), 114.7 (C-10), 113.8 (C-4'), 111.1 (C-6), 103.1 (C-8), 79.4 (C-2), 43.7 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为 7,3',5'-三羟基二氢黄酮。

化合物 **6**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 271 [M+H]⁺ (C₁₅H₁₀O₅); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.08 (1H, s, 4'-OH), 9.09 (1H, s, 7-OH), 7.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 8.51 (1H, s, 3-OH), 8.05 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.92 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-8), 6.88 (1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 172.5 (C-4), 162.8 (C-7), 159.3 (C-4'), 156.8 (C-9), 145.5 (C-2), 137.6 (C-3), 129.7 (C-2', 6'), 126.9 (C-5), 122.7 (C-1'),

115.8 (C-3', 5'), 115.2 (C-6), 114.7 (C-10), 102.4 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **6** 为 7,4'-二羟基黄酮醇。

化合物 **7**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 289 [M+H]⁺ (C₁₅H₁₂O₆); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.93 (1H, s, 5-OH), 7.31 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.78 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 5.88 (1H, brs, H-8), 5.83 (1H, brs, H-6), 5.03 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-2), 4.57 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 198.1 (C-4), 168.0 (C-7), 163.8 (C-5), 163.0 (C-9), 158.2 (C-4'), 129.9 (C-2', 6'), 128.1 (C-1'), 115.4 (C-3', 5'), 100.7 (C-10), 96.6 (C-6), 95.6 (C-8), 83.3 (C-2), 71.9 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为双氢山柰素。

化合物 **8**: 桔红色粉末, ESI-MS m/z : 273.2 [M+H]⁺ (C₁₅H₁₂O₅); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.12 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6'), 7.66 (2H, brs, H- α , β), 7.28 (1H, brs, H-2), 7.20 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.39 (1H, brd, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.27 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 191.8 (C = O), 166.2 (C-2'), 165.6 (C-4'), 149.5 (C-4), 146.2 (C-3), 145.2 (C- β), 133.2 (C-6'), 126.6 (C-1), 122.9 (C-6), 117.7 (C- α), 116.2 (C-2, 5), 113.4 (C-1'), 108.7 (C-5'), 103.1 (C-3')。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为紫铆查耳酮。

化合物 **9**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 289.5 [M+H]⁺ (C₁₅H₁₂O₆); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.15 (1H, s, 5-OH), 9.11 (2H, s, 3', 5'-OH), 6.87 (1H, s, H-4'), 6.74 (2H, s, H-2', 6'), 5.85 (2H, s, H-6, 8), 5.35 (1H, dd, $J = 3.2, 12.4$ Hz, H-2), 3.17 (1H, dd, $J = 11.2, 18.4$ Hz, H-3b), 2.67 (1H, dd, $J = 3.2, 18.4$ Hz, H-3a); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 196.6 (C-4), 167.6 (C-7), 163.9 (C-5), 163.3 (C-9), 146.2 (C-3'), 145.7 (C-5'), 130.0 (C-1'), 118.4 (C-4'), 115.8 (C-6'), 114.8 (C-2'), 102.1 (C-10), 96.3 (C-6), 95.5 (C-8), 78.9 (C-2), 42.6 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为 (2S)-5,7,3',5'-四羟基-二氢黄酮。

化合物 **10**: 黄色结晶 (CH₃OH), ESI-MS m/z : 319.3 [M+H]⁺ (C₁₆H₁₄O₇); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.85 (1H, s, H-4'), 6.73 (2H, s, H-2', 6'), 6.08 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 5.92 (1H, s, H-8), 5.19 (1H, brs, 3-OH), 4.87 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-2), 4.22 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-3), 3.77 (3H, s, 5-OCH₃);

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 190.4 (C-4), 165.2 (C-7), 164.2 (C-9), 162.6 (C-5), 146.1 (C-3'), 145.4 (C-5'), 128.8 (C-1'), 119.8 (C-4'), 115.7 (C-2'), 115.6 (C-6'), 102.9 (C-10), 95.9 (C-8), 93.8 (C-6), 82.9 (C-2), 73.1 (C-3), 56.2 (5-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **10** 为 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基黄酮醇。

化合物 **11**: 黄色结晶 (CH_3OH), ESI-MS m/z : 303.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$); ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.50 (1H, s, 5-OH), 10.70 (1H, s, 7-OH), 9.40 (3H, brs, 3, 3', 5'-OH), 7.68 (1H, s, H-2'), 7.55 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, s, H-8), 6.19 (1H, s, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 176.3 (C-4), 164.4 (C-7), 161.2 (C-9), 156.6 (C-2), 148.2 (C-5), 147.3 (C-4'), 145.5 (C-3'), 136.2 (C-3), 122.4 (C-1'), 120.4 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.5 (C-2'), 103.5 (C-10), 98.7 (C-6), 93.8 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **11** 为槲皮素。

化合物 **12**: 黄色粉末, ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.63 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.89 (1H, s, H-6'), 6.75 (2H, m, H-2', 5'), 6.52 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-6), 6.29 (1H, s, H-8), 4.96 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-2), 4.40 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 192.8 (C-4), 165.7 (C-7), 163.3 (C-9), 146.1 (C-3'), 145.4 (C-4'), 129.1 (C-1'), 128.9 (C-5), 119.8 (C-6'), 115.8 (C-2'), 115.6 (C-5'), 112.4 (C-10), 111.5 (C-6), 102.9 (C-8), 84.0 (C-2), 73.1 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **12** 为黄颜木素。

化合物 **13**: 黄色粉末, ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.93 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-5), 7.70 (1H, s, H-2'), 7.55 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.90 (3H, brs, H-2', 5', 6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 172.4 (C-4), 162.8 (C-7), 156.8 (C-9), 147.7 (C-4'), 145.5 (C-3'), 137.6 (C-3), 126.9 (C-1'), 123.0 (C-5), 120.1 (C-6'), 116.0 (C-5'), 115.4 (C-2'), 115.2 (C-10), 114.6 (C-6), 102.3 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **13** 为 fisetin。

化合物 **14**: 黄色粉末, ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.09 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.63 (1H, s, H-6), 6.30 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-8), 6.09 (2H, s, H-2', 6'), 4.90 (1H, s, H-2), 4.73 (1H, s, H-3), 4.06

(1H, s, H-4); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 159.4 (C-7), 154.1 (C-9), 148.2 (C-5'), 145.7 (C-3'), 140.0 (C-4'), 133.2 (C-1'), 117.2 (C-5), 111.3 (C-2', 6'), 108.7 (C-10), 103.3 (C-6), 102.5 (C-8), 71.6 (C-2), 70.0 (C-3), 62.7 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **14** 为 leucorobinetinidin。

化合物 **15**: 黄色粉末, ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.83 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.53 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-3), 6.51 (1H, s, H-8), 6.37 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6), 3.79 (3H, s, 5-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 175.6 (C-4), 162.3 (C-7), 160.6 (C-4'), 160.4 (C-2), 159.8 (C-5), 159.0 (C-9), 127.7 (C-2', 6'), 121.5 (C-1'), 115.8 (C-3', 5'), 107.1 (C-3), 105.9 (C-10), 96.5 (C-6), 95.2 (C-8), 55.8 (5-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **15** 为 thevetiaflavon。

化合物 **16**: 黄色粉末, ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.56 (1H, s, 5-OH), 10.42 (1H, brs, 7-OH), 7.93 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.78 (1H, s, H-3), 6.52 (1H, s, H-8), 4.59 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-1''); ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ : 181.9 (C-4), 163.5 (C-7), 163.3 (C-2), 161.2 (C-4'), 160.6 (C-5), 156.2 (C-9), 128.4 (C-2', 6'), 121.1 (C-1'), 116.0 (C-3', 5'), 108.9 (C-6), 103.4 (C-10), 102.8 (C-3), 93.6 (C-8), 81.5 (C-5''), 78.9 (C-3''), 73.1 (C-1''), 70.6 (C-2''), 70.2 (C-4''), 61.5 (C-6'')。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **16** 为异牡荊素。

4 细胞毒活性研究

采用 SRB 法测定细胞毒活性^[20]。首先将 MCF-7 细胞接种于 96 孔板中培养 24 h, 然后同时加入不同浓度的受试药物 (溶解在含 0.3% DMSO 的培养基中) 200 μL /孔, 使其终质量浓度分别为 0.1 (C1)、1 (C2)、10 (C3)、25 (C4)、50 (C5) 和 100 $\mu\text{mol/L}$ (C6)。正常对照组加入等量含 0.3% DMSO 的培养基 (C0), 同时设顺铂阳性对照组 (DDP), 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 48 h。细胞在室温条件下经 SRB 溶液染色 15 min, 然后加入 200 μL 的 Tris 溶液, 震荡至进入细胞的 SRB 试剂完全溶解后, 用酶标仪在波长 540 nm 处测定各化合物的吸光度 (A) 值, 重复测定 3 次, 计算相应的抑制率和 IC_{50} 值, 见表 1。

表1 化合物7~16对MCF-7细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Effect of compounds 7—16 against MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

化合物	抑制率/%						IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
7	6.96	10.27	12.45	14.70	18.54	35.95	—
8	0.93	-1.61	16.29	52.46	69.09	76.90	28.53
9	1.84	0.65	3.27	2.23	7.61	18.29	—
10	0.85	0.56	1.40	1.79	2.44	7.78	—
11	11.19	12.46	16.27	23.19	47.86	48.47	—
12	0.19	-0.38	1.45	5.55	10.29	25.82	—
13	8.13	9.62	10.57	13.58	32.48	42.79	—
14	2.89	-1.13	1.41	2.53	4.26	6.95	—
15	9.01	6.43	12.21	6.02	11.08	11.33	—
16	6.14	3.91	11.85	10.28	23.25	24.78	—
DDP	1.79	17.76	63.07	73.16	79.29	83.52	7.23

从表1可以看出, 化合物8对MCF-7细胞具有较高的细胞毒活性, 其IC₅₀值为28.53 $\mu\text{mol/L}$ 。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 杨晓峪, 李振麟, 濮社班, 等. 皂角刺化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(3): 38-41.
- [3] 刘明华, 姚健, 李荣, 等. 皂角刺总黄酮诱导结肠癌 HCT116 细胞凋亡的作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(6): 643-646.
- [4] 刘伟杰, 杜钢军, 李佳桓, 等. 皂角刺总黄酮对肺癌的防治作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2878-2883.
- [5] 何光志, 邓树轩, 何前松, 等. 皂角刺总黄酮对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡和侵袭能力影响的实验研究 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2012, 35(1): 77-81.
- [6] Jung Y J, Park J H, Cho J G, *et al.* Lignan and flavonoids from the stems of *Zea mays* and their anti-inflammatory and neuroprotective activities [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(2): 178-185.
- [7] 冷晶, 朱云祥, 陈璐琳, 等. 甘草中 2 个新三萜皂苷 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1576-1582.
- [8] Chaipukdee N, Kanokmedhakul S, Lekphrom R, *et al.* Two new flavanoneols from the bark of *Akschindlium godefroyanum* [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(3): 191-195.
- [9] 张德武, 戴胜军, 李贵海, 等. 野葛藤的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 649-651.
- [10] 施蛟, 陈博, 孙智华, 等. 中间锦鸡儿黄酮类成分的研究 [J]. 药学报, 2003, 38(8): 599-602.
- [11] Kim H, Moon B H, Ahn J H, *et al.* Complete NMR signal assignments of flavonol derivatives [J]. *Magn Reson Chem*, 2006, 44(2): 188-190.
- [12] 王金兰, 张淑霞, 李铁军, 等. 山核桃树皮化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 490-493.
- [13] Liu R H, Wen X C, Shao F, *et al.* Flaconoids from heartwoods of *Dalbergia cochinchinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(1): 89-93.
- [14] 邵鹏, 张雪, 李畅, 等. 东方荚果蕨的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1481-1484.
- [15] 张忠立, 左月明, 徐璐, 等. 三白草黄酮类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1490-1493.
- [16] Kim J S, Kwon Y S, Chun W J, *et al.* *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, anti-microbial and α -glucosidase inhibitory effect [J]. *Food Chem*, 2010, 120(2): 539-543.
- [17] Coetzee J, Steynberg J P, Steynberg P J, *et al.* Oligomeric flavanoids. Part 18. Dimeric prorobinetinidins from *Robinia pseudacacia* [J]. *Tetrahedron*, 1995, 51(8): 2339-2352.
- [18] 马瑞婧, 杨巡纭, 王吉华, 等. 喙荚云实酚性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 1014-1017.
- [19] Pedras M S, Chumala P B, Suchy M. Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*: structures, syntheses and antifungal activity [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(5): 949-956.
- [20] 林芳, 钱之玉, 薛红卫, 等. 青蒿素和青蒿琥酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抑制作用比较研究 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 347-349.