

刮筋板乙酸乙酯部位化学成分

李云志^{1,2}, 马超², 黄静^{2*}

(1. 安徽农业大学 茶叶生物化学与生物技术教育部重点实验室, 安徽 合肥 230036;
2. 四川大学 华西药学院, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的: 研究刮筋板 *Excoecaria acerifolia* 的化学成分和生物活性。方法: 采用色谱技术分离纯化, 根据化学成分理化性质和波谱数据确定化学结构; MTT 法测定化合物对人肝癌细胞系 (human hepatocarcinoma cell line) HepG2 的体外抑制作用, 用半数抑制浓度 (IC_{50}) 评价其抗肿瘤活性。结果: 分离鉴定了 8 个化合物, 分别为 6 甲氧基-7 羟基香豆素 (1), 6, 7-二甲氧基-8 羟基香豆素 (2), 山奈酚 (3), 山奈酚 3-O-吡喃葡萄糖苷 (4), 槲皮素-3-O- β -D 葡萄糖糖苷 (5), 山奈酚-3-O- β -D 葡萄糖糖苷-2 没食子酸酯 (6), β -谷甾醇 (7), 胡萝卜苷 (8)。生物活性研究显示化合物 5 和 6 对人肝癌细胞系 HepG2 的 IC_{50} 分别为 7.13, 65.42 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论: 所有化合物均为首次从该植物中分得。化合物 5 具有较好的体外抑制 HepG2 作用。

[关键词] 刮筋板; 化学成分; 生物活性

大戟科海漆属 *Excoecaria* Linn. 植物, 约 40 种, 分布于亚洲、非洲和大洋洲热带地区。我国有 6 种和 1 变种, 产于西南部经南部至台湾^[1]。近年来从该属植物中分离得到对小鼠肿瘤细胞体外具有细胞毒活性的新二萜^[2]; 此外在该属植物中还报道有生物碱^[3]及黄酮类化合物^[4]等成分。

刮筋板是大戟科海漆属植物草沉香 *E. acerifolia* F. Didr. 的幼嫩全株。分布于四川、云南等地。有祛风散寒, 健脾利湿, 解毒等功效^[5]。前文报道了其乙醇提取物中分离得到 6 个化合物^[6], 经过进一步的分离鉴定, 笔者又从中得到 8 个化合物, 所有化合物均为首次从该植物中分离得到。化合物 5 对人肿瘤细胞株 HepG2 的 IC_{50} 为 7.13 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 显示具有一定的选择性毒性。

1 材料

Fisher-Johns 型显微熔点仪 (温度计未校正), Varian^{UNIFY} NOVA 400/54 核磁共振仪; API 3000 LC/MS/MS (三级四极杆液相色谱质谱联用仪); 硅胶 G、色谱硅胶 H、硅胶 (100 ~ 200 目和 200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂)。5500 酶标仪 (美国 BD-rad 公司); ZW-A 定时微量振荡器 (富华仪器有限公司); XD-101 倒置显微镜 (南京江南光电有限公

司); BI-220A 生物显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); HepG2 细胞株购自 ATCC; DMEM 与胎牛血清购自 Gibco; 四甲基偶氮唑蓝盐 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma 产品)。

刮筋板于 2006 年 10 月购自成都市五块石中药材市场, 由成都中医药大学卢先明教授鉴定为 *E. acerifolia* 的幼嫩全株, 标本保存于四川大学华西药学院天然药物化学系。

2 提取和分离

取干燥的刮筋板 10 kg 粉碎, 95% 乙醇回流提取 3 次 (每次 2 h), 合并提取液, 减压浓缩。浓缩液挥去乙醇后加入一定量的水分散, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得石油醚部分 108 g, 乙酸乙酯部分 175 g, 正丁醇部分 129 g。取 100 g 乙酸乙酯部分硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇系统梯度洗脱分为 8 个部分 (GY1-GY8)。GY3 部分用硅胶柱色谱氯仿-甲醇 (10:1) 洗脱, 再通过 Sephadex LH-20 甲醇纯化得到化合物 1 (7 mg), 2 (5 mg), 3 (19 mg); GY4 部分用硅胶柱色谱氯仿-甲醇 (9:1) 洗脱, 再通过 Sephadex LH-20 甲醇纯化得到化合物 4 (30 mg), 5 (51 mg), 6 (550 mg); GY2 部分用硅胶柱色谱, 环己烷-乙酸乙酯 (10:1) 洗脱得到化合物 7 (7 mg); GY1 部分用硅胶柱色谱, 石油醚-乙酸乙酯 (10:1) 洗脱得到化合物 8 (35 mg)。

3 结构鉴定

[稿件编号] 20090910003

[通信作者] * 黄静, Tel: 15155518613, E-mail: yun126126@126.com



化合物 1 无色方晶 (石油醚-丙酮)。mp 201 ~ 203 。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 6.21 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, 3-H), 7.91 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, 4-H), 7.23 (1H, s, 5-H), 6.78 (1H, s, 8-H), 3.81 (3H, s, OCH₃), 10.31 (1H, br s, OH)。¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 160.6 (C-2), 151.3 (C-7), 149.7 (C-9), 145.4 (C-6), 144.6 (C-4), 111.8 (C-10), 110.7 (C-5), 109.8 (C-3), 102.9 (C-8), 56.2 (OMe)。NMR 数据与文献 [7-8] 报道基本一致,故鉴定为 6-甲氧基-7-羟基香豆素。

化合物 2 浅黄色针状结晶 (石油醚-丙酮), mp 172 ~ 174 。ES/MS *m/z* 222 [M - H]⁻。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 6.25 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-3), 7.92 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-4), 7.04 (s, H-5), 3.82 (6H, s, OCH₃)。数据与文献 [9] 基本一致,故推定化合物 2 为 6,7-二甲氧基-8-羟基香豆素。

化合物 3 黄色粉末,三氯化铝反应显黄色,mp 275 ~ 276 。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 6.18 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-6), 6.44 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-8), 6.92 (2H, dd, *J* = 8.4 Hz, H-3', 5'), 8.03 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2', 6'), 12.48 (1H, br s, 5-OH)。数据与文献 [10] 报道一致,故该化合物鉴定为山柰酚 (kaempferol)。

化合物 4 黄色粉末。ES/MS *m/z* 472 [M + Na]⁺。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 8.05 (2H, dd, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, dd, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.46 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1'), 3.15 ~ 3.70 (5H, m, H-2'' ~ 6'')。¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 177.6 (C-4), 164.3 (C-7), 161.4 (C-5), 160.1 (C-4'), 156.5 (C-9), 156.4 (C-2), 133.3 (C-3), 131.0 (C-2', 6'), 121.0 (C-1), 115.2 (C-3', 5'), 104.2 (C-10), 101.0 (C-1'), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8), 77.6 (C-5'), 76.6 (C-3'), 74.4 (C-2'), 70.0 (C-4'), 61.0 (C-6')。NMR 数据与文献 [7] 报道的一致,故鉴定为山柰酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 5 黄色结晶 (甲醇)。mp 176 ~ 178 ,与三氯化铝反应显黄色, Molish 反应阳性。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 5.45 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1'), 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.40 (1H, d,

J = 2.0 Hz, H-8), 6.83 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, H-6'), 7.56 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5'), 7.57 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 9.26 (1H, br s, 3'-OH), 9.75 (1H, br s, 4'-OH), 10.88 (1H, br s, 7-OH), 12.64 (1H, br s, 5-OH)。¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 156.5 (C-2), 133.5 (C-3), 177.6 (C-4), 161.4 (C-5), 98.9 (C-6), 164.4 (C-7), 93.7 (C-8), 156.5 (C-9), 104.1 (C-10), 121.8 (C-1), 116.4 (C-2'), 145.0 (C-3'), 148.9 (C-4'), 115.4 (C-5'), 121.4 (C-6'), 101.1 (C-1'), 74.3 (C-2'), 76.7 (C-3'), 70.1 (C-4'), 77.8 (C-5'), 61.2 (C-6')。数据与文献 [11] 一致,故鉴定该化合物为槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷。

化合物 6 黄色粉末 (氯仿-甲醇), 盐酸-镁粉反应阳性, mp 198 ~ 200 ;¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.55 (1H, s, 5-OH), 10.87 (1H, s, 7-OH), 10.25 (1H, s, 4'-OH), 9.27 (2H, s, 3''', 5''' OH), 9.25 (1H, s, 3'-OH), 8.95 (1H, s, 4'-OH), 8.07 (2H, dd, *J* = 8.4 Hz, 1.8 Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H-3', 5'), 7.03 (2H, s, H-2''', 6'''), 6.18 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.41 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 5.80 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1')。¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 177.3 (C-4), 165.4 (C-7), 164.4 (C-7'''), 161.4 (C-5), 160.3 (C-4'), 156.5 (C-9), 156.4 (C-2), 145.7 (C-3''', 5'''), 138.8 (C-4'''), 132.8 (C-3), 131.1 (C-2', 6'), 120.9 (C-1), 119.8 (C-1'''), 115.4 (C-3', 5'), 109.1 (C-2''', 6'''), 104.2 (C-10), 98.9 (C-1'), 98.4 (C-6), 93.9 (C-8), 78.0 (C-5'), 74.5 (C-2', 3'), 70.4 (C-4'), 60.9 (C-6')。以上数据与文献 [12] 一致,故该化合物鉴定为山柰酚-3-O-β-D-葡萄糖苷-2-没食子酸酯。

化合物 7 白色针晶 (氯仿)。IR 与已知化合物 β-谷甾醇的红外光谱基本一致,与 β-谷甾醇标准品共薄层用 3 种不同展开系统展开, R_f 值一致,且混合熔点不下降,故鉴定为 β-谷甾醇。

化合物 8 白色无定型粉末 (氯仿-甲醇)。mp 283 ~ 286 。香草醛-浓硫酸反应显紫色。与胡萝卜苷标准品 TLC 的 R_f 值一致,且混合熔点不下降,推断为胡萝卜苷。

4 活性测定

HepG2 细胞使用 DMEM (10% 胎牛血清, 1%

抗生素 (1 万 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素, 1 万 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素) 培养基在含 5% CO_2 的 37 孵箱中于 37 培养。细胞生长至 80% 时传代, 使细胞保持在对数生长期。取化合物 5, 6 单体分别用 DMSO 配制成 10 ~ 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液作为储备液。MTT 用 PBS (phosphate-buffer saline) 溶液配成 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液, 于 4 避光保存。受试药物加入 96 孔板 (终浓度分别为 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 放置于上述同样条件 (饱和湿度, 37, 5% CO_2) 下的培养箱中再培养 48 h。在 96 孔培养板的每 1 个孔中加入 200 μL 生长良好的 HepG2 (约含有 1 万个细胞), 培养过夜后加入不同浓度的供试样品, 每组平行设 4 个复孔, 同时设空白对照 (加等体积 DMSO), 在 37, 5% CO_2 条件下继续培养 48 h。然后, 每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液 (5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 继续培养 4 h。离心弃去培养液, 染色的细胞用 DMSO (150 μL / 孔) 溶解, 待结晶完全溶解后, 用酶标仪于 570 nm 处测吸光度 (A 值)。

实验显示, 化合物 5, 6 对 HepG2 的体外细胞 IC_{50} 分别为 7.13, 65.42 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 且在测定质量浓度范围内剂量依赖关系良好。实验结果表明化合物 5 对 HepG2 有较强的细胞毒活性, 而化合物 6 没有明显活性。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 44 卷. 第 3 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 6.
- [2] Konoshima T, Konishi T, Takasaki M. et al. Anti-tumor-promoting activity of diterpenes from *Excoecaria agallocha*. [J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24 (12): 1440.
- [3] 付丽娜, 卢昕, 刘承伟, 等. 鸡尾木中两个生物碱化合物 [J]. 广西植物, 2006, 26 (2): 221.
- [4] 李子燕, 杨靖华, 汪云松, 等. 红背桂花化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37 (6): 826.
- [5] 国家医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 第 12 卷 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 814.
- [6] 李云志, 马超, 黄静. 刮筋板的化学成分和抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44 (17): 1294.
- [7] 张维库, 杨国恩, 李茜, 等. 对叶大戟化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (20): 1694.
- [8] 孔令义, 闵知大, 史剑侠. 麻疯树根的化学成分研究 [J]. 植物学报, 1996, 38 (2): 161.
- [9] 刘丽梅, 王瑞海, 陈琳, 等. 秦皮化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34 (10): 889.
- [10] 邹秋萍, 王祝举, 付梅红, 等. 番泻叶的化学成分研究 [J]. 中药材, 2007, 30 (10): 1250.
- [11] 李燕, 郭顺星, 王春兰, 等. 新疆雪莲黄酮类化学成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42 (8): 575.
- [12] Takahiko I, Nobuo I, Yukinao N. Minor flavonoids of *polygonum nodosum* [J]. Phytochemistry, 1980, 19 (8): 1877.

Chemical constituents from *Excoecaria acerifolia* and their bioactivities

LI Yunzhi^{1,2}, MA Chao², HUANG Jing^{2*}

(1. Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2 West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the chemical constituents of *Excoecaria acerifolia* and their antitumor activities. **Method:** The constituents were isolated and purified by column chromatography. Their structures were identified by their physicochemical properties and spectral features. Cytotoxicities of the purified compounds were evaluated by MTT method against human cancer cell lines HepG2. **Result:** Eight compounds were isolated and identified as: 7-hydroxy-6-methoxy-coumarin (1), 8-hydroxy-6,7-methoxy-coumarin (2), kaempferol (3), kaempferol-3-O- β -D-glucoside (4), quercetin-3-O- β -D-galactoside (5), kaempferol-3-O- β -D-glucoside-2-gallate (6), β -sitosterol (7), daucosterol (8). **Conclusion:** All compounds were isolated from this plant for the first time. Compounds 5 showed inhibitory activity towards HepG2 with IC_{50} values of 7.13 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

[Key words] *Excoecaria acerifolia*; chemical constituents; bioactivity

doi: 10.4268/cjmm20100913

[责任编辑 王亚君]

· 1147 ·