

文章编号: 1006-2858(2008)02-0108-04

皂角刺抗肿瘤活性成分的分离鉴定与活性测定

徐 哲¹, 赵晓颀², 王漪檬¹, 陈晓辉², 毕开顺²

(1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 分离鉴定皂角刺中抗肿瘤活性成分。方法 用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法,结合硅胶、葡聚糖凝胶等色谱方法追踪分离皂角刺抗肿瘤活性成分,根据理化性质和波谱数据鉴定化学结构,用半数抑制浓度(IC₅₀)评价其抗肿瘤活性。结果 从皂角刺中分离得到 8 个化合物,分别为黄颜木素(1)、槲皮素(2)、3 β -acetoxylean-12-en-28-oic acid(3)、木栓酮(4)、棕榈酸(5)、白桦醇(6)、 β -谷甾醇(7)、胡萝卜苷(8)。化合物 1、3 对 7 种体外培养的肿瘤细胞抑制作用较好,在测定浓度范围内剂量依赖关系良好;化合物 3 对 Bel-7402、HeLa、HT1080、KB、A549、SGC-7901、Heps 等 7 种肿瘤细胞株生长增殖均具有良好的抑制作用,IC₅₀ 为 11.61 ~ 18.73 mg L^{-1} ;化合物 1 对除 A549 之外的 6 种肿瘤细胞株抑制作用良好,IC₅₀ 为 11.34 ~ 19.32 mg L^{-1} 。结论 化合物 2 ~ 6 和 8 为首次从皂角刺中分离;化合物 1、3 的抗肿瘤活性为皂角刺中首次发现。

关键词: 皂角刺; 抗肿瘤活性; 提取; 分离

中图分类号: R 914

文献标志码: A

皂角刺为豆科植物皂荚 (*Gleditsia sinensis* Lam.) 的干燥棘刺,又称皂荚刺、天丁等。主产江苏、湖北及华北地区。味辛,性温,归肝、胃经。具有消肿托毒、排脓、杀虫、抗癌等功效,是中医治疗乳腺癌、肺癌、食管癌、肠癌和宫颈癌等多种癌症的常用药之一^[1]。迄今从皂角刺中分离得到的化学成分较少,主要为黄酮、酚类和氨基酸^[2]。为了阐明皂角刺抗肿瘤活性成分,作者以 7 种体外培养的肿瘤细胞为模型,以半数抑制浓度(IC₅₀)为指标,以四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法作为抗肿瘤活性测定方法,利用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱等分离手段对皂角刺的抗肿瘤活性成分进行追踪分离,并初步检测了分离出的 8 个化合物对体外培养的 7 种肿瘤细胞的抗肿瘤活性。

1 仪器与材料

Bruker-ARX-300 or 600 核磁共振光谱仪(瑞士 Bruker Bio Spin 公司),Fluke 51 熔点测定仪(美国 Fluke 公司),Tecan Spectra 酶标仪(奥地利 Tecan 公司),Dmerb 倒置式生物显微镜(德国 Leica 公司),NU-4750 二氧化碳培养箱(美国 Nuair 公司),CJ-1F

医用超净台(苏州金燕净化设备有限公司),LD4-2A 低速离心机(北京医用离心机厂)。

柱色谱硅胶和薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂),体积分数为 95 % 的乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、正丁醇、甲醇(分析纯,市售),溴化 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑盐(MTT,美国 Sigma 公司),RPMI-1640 培养基(美国 Hyclon 公司),胎牛血清(北京元亨圣马生物技术研究所以,批号 020902)。

皂角刺药材购于沈阳天益堂大药房,由沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定为豆科植物皂荚 (*Gleditsia sinensis* Lam.) 的棘刺。

人肝癌细胞株 Bel-7402、人宫颈癌细胞株 HeLa、人纤维肉瘤细胞株 HT1080、人口腔表皮样癌细胞株 KB、人肺癌细胞株 A549、人胃腺癌细胞株 SGC-7901、小鼠肝癌细胞株 Heps(上海细胞生物研究所)。

2 提取分离

取皂角刺药材 9 kg,用 8 倍量体积分数为 70 % 的乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h。滤集乙

收稿日期: 2007-03-26

作者简介: 徐哲(1981-)女,(汉族),吉林省吉林市人,硕士研究生, E-mail xuzhe314@126.com; 毕开顺(1956-),男(汉族),河北丰南人,教授,主要从事中药质量标准化、中药药效物质基础研究, Tel. 024-23986296, E-mail ksbi@mail.sy.ln.cn。

醇提取液,放置过夜后,滤除胶状物,合并后减压回收至干,得皂角刺乙醇提取物(浸膏)848 g。经活性测定,该浸膏对多种肿瘤细胞增殖有明显抑制作用。

将皂角刺乙醇提取物用适量水稀释,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、水饱和和正丁醇萃取,浓缩干燥得各萃取部位浸膏。经活性测定,乙酸乙酯萃取部位对多种肿瘤细胞的增殖具有较好的抑制作用,所以对乙酸乙酯萃取部位进行活性追踪分离。

取乙酸乙酯萃取部位 125 g 进行硅胶柱色谱,用氯仿-甲醇(体积比 100:0~0:100)梯度洗脱,薄层色谱指导合并得 7 个组分,经活性测试,组分 1、2、3 活性较好。组分 1 以石油醚-丙酮(体积比 100:0~0:100)为洗脱溶剂进行反复硅胶柱色谱分离和重结晶得化合物 3~7;组分 2 以氯仿-甲醇(体积比 100:0~0:100)为洗脱溶剂经硅胶柱色谱和葡聚糖凝胶柱色谱分离结合的方法得化合物 1、2、8,分离纯化过程见图 1。

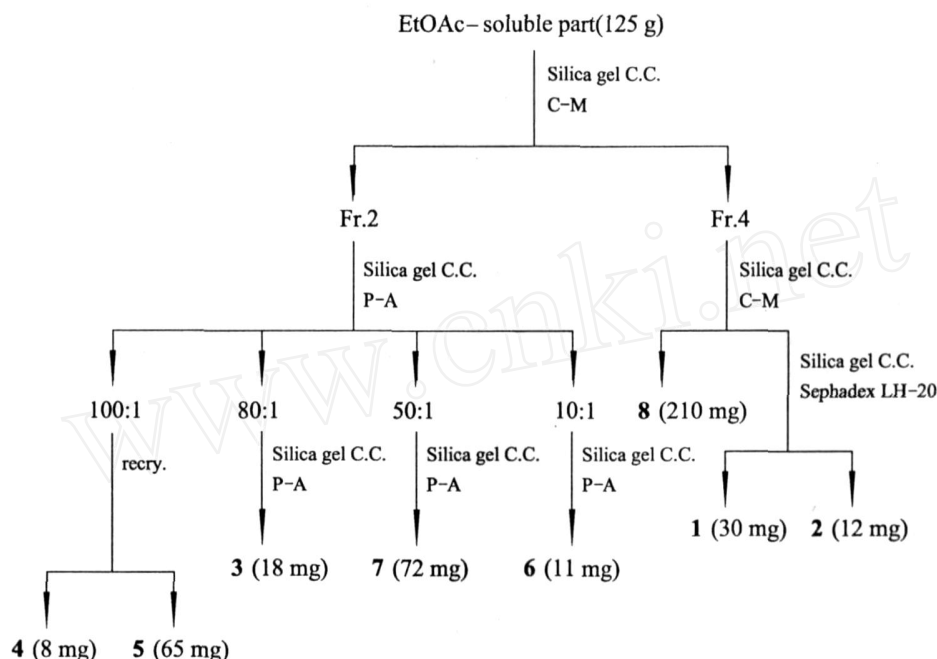


Fig. 1 Isolation of active components of EtOAc fraction

3 结构鉴定

化合物 1:黄色针晶(甲醇),mp 350^o。紫外灯(365 nm)下显黄色荧光,薄层展开喷 AlCl_3 显色剂荧光增强,提示为黄酮类化合物。ESI-MS m/z : 287 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 7.92 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-5)、6.90 (1H, br. d, $J=9.0$ Hz, H-6)、6.90 (1H, br. s, H-8)、7.69 (1H, br. s, H-2)、6.87 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5)、7.54 (1H, br. d, $J=8.4$ Hz, H-6)。 $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ : 145.1 (C-2)、137.2 (C-3)、172.0 (C-4)、114.3 (C-4a)、126.5 (C-5)、114.7 (C-6)、162.3 (C-7)、101.9 (C-8)、156.3 (C-8a)、122.6 (C-1)、115.0 (C-2)、147.3 (C-3)、147.3 (C-4)、115.6 (C-5)、119.7 (C-6)。以上数据与文献[3]报道的黄颜木素(fisetin)数据对照基本一致,故鉴定化合物 1 为黄颜木素。

化合物 2:黄色粉末(甲醇),mp 310~312^o。紫外灯(365 nm)下显黄色荧光,ESI-MS m/z : 303 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 12.50 (1H, s, 5-OH)、10.79 (1H, s, 7-OH)、9.60 (1H, s, 4'-OH)、9.34 (2H, s, 3,3'-OH)、7.67 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2)、7.54 (1H, dd, $J=2.1, 8.4$ Hz, H-6)、6.88 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5)、6.41 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8)、6.18 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6)。以上数据与文献[4]报道的槲皮素(quercetin)数据对照基本一致,且与槲皮素对照品薄层色谱行为一致,故鉴定化合物 2 为槲皮素。

化合物 3:白色针晶(甲醇),mp 267~269^o。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) 中有 7 个角甲基质子信号: δ 1.13 (3H, s, CH_3)、0.94 (3H, s, CH_3)、0.93 (3H, s, CH_3)、0.91 (3H, s, CH_3)、0.86 (3H, s, CH_3)、0.85 (3H, s, CH_3)、0.75 (3H, s, CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) 中, δ 21.3 (CH_3 -acetate) 和 δ 171.0 (C=O acetate) 提示分子结构中

乙酰基($\text{CH}_3-\text{CO}-$)的存在。此外, ^{13}C -NMR谱中还显示有 30 个碳信号,其中 $\delta 122.6$ (C-12)、 143.6 (C-13) 的烯碳信号和 $\delta 183.1$ (C-28) 的羧基碳信号,推测该化合物可能为乙酰化的齐墩果酸。 ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 150 MHz) 其他 δ 数据为 38.1 (C-1)、 23.5 (C-2)、 80.9 (C-3)、 37.7 (C-4)、 55.3 (C-5)、 18.2 (C-6)、 32.5 (C-7)、 39.3 (C-8)、 47.5 (C-9)、 37.0 (C-10)、 22.9 (C-11)、 41.6 (C-14)、 27.7 (C-15)、 23.4 (C-16)、 45.8 (C-17)、 41.0 (C-18)、 46.5 (C-19)、 30.7 (C-20)、 33.8 (C-21)、 32.4 (C-22)、 28.0 (C-23)、 16.7 (C-24)、 15.4 (C-25)、 17.1 (C-26)、 25.9 (C-27)、 23.6 (C-29)、 33.0 (C-30)。以上数据与文献[5]报道的 3β -acetoxysaccharic acid 数据对照基本一致,故鉴定化合物 3 为 3β -acetoxysaccharic acid。

化合物 4: 无色针晶(石油醚-丙酮), mp 265、266。 ^1H -NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.88 (3H, d, $J = 6.36$ Hz, CH_3)、 0.73 (3H, s, CH_3)、 0.87 (3H, s, CH_3)、 1.01 (3H, s, CH_3)、 1.05 (3H, s, CH_3)、 1.18 (3H, s, CH_3)、 0.95 (3H, s, CH_3)、 1.00 (3H, s, CH_3) 显示化合物 4 分子中存在 8 个甲基,其中 7 个甲基与季碳相连,1 个甲基与叔碳相连。 ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 150 MHz) δ : 22.3 (C-1)、 41.5 (C-2)、 213.3 (C-3)、 58.2 (C-4)、 42.2 (C-5)、 41.3 (C-6)、 18.2 (C-7)、 53.1 (C-8)、 37.4 (C-9)、 59.5 (C-10)、 35.6 (C-11)、 30.5 (C-12)、 39.7 (C-13)、 38.3 (C-14)、 32.4 (C-15)、 36.0 (C-16)、 30.0 (C-17)、 42.8 (C-18)、 35.3 (C-19)、 28.2 (C-20)、 32.8 (C-21)、 39.3 (C-22)、 6.8 (C-23)、 14.7 (C-24)、 18.0 (C-25)、 20.3 (C-26)、 18.7 (C-27)、 32.1 (C-28)、 35.0 (C-29)、 31.8 (C-30)。以上数据与文献[6-8]报道的木栓酮(friedelin)数据对照基本一致,故鉴定化合物 4 为木栓酮。

化合物 5: 白色粉末(丙酮), mp 53。薄层展开喷溴甲酚绿显色剂显黄色,提示为羧酸类化合物。 ^1H -NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.27 显示有相当于 12 个亚甲基的 1 个长链, $\delta 0.87$ (3H, t, $J = 6.0$ Hz) 为 1 个末端甲基氢信号, $\delta 2.34$ (2H, t, $J = 6.0$ Hz) 和 $\delta 1.63$ (2H, m) 为与羧基相连的 α -亚甲基和 β -亚甲基氢信号。在高场区没有不饱和和氢信号,提示该化合物为长链脂肪酸。以上数据与文献[9-10]报道的棕榈酸(palmitic acid)数据对照基本一致,故鉴定化合物 5 为棕榈酸。

化合物 6: 白色针晶(氯仿-甲醇), mp 264、

265。 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR显示这是 1 个三萜苷元类化合物,其中 $\delta 150.5$ (C-20)、 109.7 (C-29)、 19.1 (C-30) 的一组碳信号提示这是羽扇豆烷型的三萜苷元。 ^1H -NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.19 (1H, dd, $J = 5.0$ Hz, H-3 α)、 2.40 (1H, m, H-19)、 0.93 (3H, s, H-23)、 0.76 (3H, s, H-24)、 0.80 (3H, s, H-25)、 0.97 (3H, s, H-26)、 1.02 (3H, s, H-27)、 3.19 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, H-28a)、 3.80 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, H-28b)、 4.60 (1H, br. s, H-29a)、 4.68 (1H, br. s, H-29b)、 1.69 (3 H, s, H-30)。 ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 150 MHz) δ : 38.8 (C-1)、 27.4 (C-2)、 79.0 (C-3)、 38.7 (C-4)、 55.3 (C-5)、 18.3 (C-6)、 34.2 (C-7)、 41.0 (C-8)、 50.4 (C-9)、 37.3 (C-10)、 20.9 (C-11)、 25.2 (C-12)、 37.1 (C-13)、 42.7 (C-14)、 27.0 (C-15)、 29.2 (C-16)、 47.8 (C-17)、 47.8 (C-18)、 48.8 (C-19)、 150.5 (C-20)、 29.7 (C-21)、 34.0 (C-22)、 28.0 (C-23)、 15.4 (C-24)、 16.1 (C-25)、 16.0 (C-26)、 14.8 (C-27)、 60.6 (C-28)、 109.7 (C-29)、 19.1 (C-30)。以上数据与文献[11-13]报道的白桦醇(betulin)数据对照基本一致,故鉴定化合物 6 为白桦醇。

化合物 7: 无色针晶(石油醚-丙酮), mp 136、137。Liebermann-Burchard 反应呈阳性。与 β -谷甾醇标准品共薄层,在 3 种溶剂系统中,薄层色谱行为与 β -谷甾醇(β -sitosterol)相同,且混合熔点不下降,故鉴定化合物 7 为 β -谷甾醇。

化合物 8: 白色粉末(甲醇), mp 287~289。Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应呈阳性。与胡萝卜苷对照品共薄层,在 3 种溶剂系统中,薄层色谱行为与胡萝卜苷(daucosterol)相同,且混合熔点不下降,故鉴定化合物 8 为胡萝卜苷。

4 化合物活性测定

精密称取分离得到的各化合物适量,用二甲基亚砜(DMSO)溶解(DMSO 的最大体积分数不超过 3%),并用含体积分数为 10%灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将供试品稀释成一定初质量浓度,用 $0.22 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的微孔滤器在超净台中过滤除菌,而后用培养液稀释成 2.5、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的终质量浓度。

采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法进行体外抗肿瘤活性测定。Be-7402、HT1080、A549、SGC-7901、KB 和 Heps 细胞用培养液稀释为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, HeLa 细胞用培养液稀释为 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,分别接种于

96 孔培养板中,每孔100 μL。8 ~ 12 h 后,除去培养液,每孔加不同质量浓度的药液及空白培养液 100 μL,每组设 3 复孔。37 ℃、5 % CO₂、饱湿条件下培养 48 h 后,每孔加入 5 g L⁻¹ MTT 10 μL,继续培养 4 h 后,加二甲亚砜 150 μL 终止反应,用酶标仪在波长 492 nm 下测定吸光度(OD)值,按式(1)计算抑制率。

抑制率(%) = (1 - 用药组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) × 100。

(1)

Table 1 IC₅₀ (50 % Inhibitory concentration) of components from the stings of *Gleditsia sinensis* Lam. on seven different tumor cell lines

Tumor cell lines	IC ₅₀ (compound 1) / (mg L ⁻¹) ^a	IC ₅₀ (compound 3) / (mg L ⁻¹)
Bel - 7402	15. 24	15. 26
Hela	15. 40	18. 73
HT1080	13. 23	11. 61
KB	13. 42	12. 22
A549	> 20	17. 30
SGC - 7901	11. 34	17. 89
Heps	19. 32	15. 33

a —IC₅₀ is defined as the concentration which resulted in a 50 % decrease in cell number. The values represent the mean of three independent experiments.

5 结论与讨论

a. 作者首次采用体外抗肿瘤活性测定与提取分离相结合的方法从皂角刺的质量分数为 70 % 的乙醇提取物中追踪分离,鉴定了 8 个化合物,其中包括 2 个黄酮类化合物、3 个三萜类化合物、1 个甾体类化合物、1 个皂苷类化合物和 1 个脂肪酸类化合物。

b. 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定 8 个化合物的体外抗肿瘤活性,其中化合物 1、3 对体外培养的肿瘤细胞生长增殖具有较好的抑制活性,并且在测定质量浓度范围内具有良好的剂量依赖关系。上述结果也表明,不同的肿瘤细胞对不同供试品的敏感性不尽相同:Bel-7402 细胞、HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞对化合物 1 最为敏感;HT1080 细胞、KB 细胞、A549 细胞和 Heps 细胞则对化合物 3 敏感性最好。

参考文献:

[1] 陈国平. 中国抗癌中草药[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984:27.
[2] 冉先德. 中华药海:上册 [M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,1993:1196.
[3] 刘建群,张朝凤,张勉,等. 宽舌囊吾的化学成分

结果表明,化合物 1、3 对 7 种体外培养的肿瘤细胞抑制作用较好,而且在测定质量浓度范围内剂量依赖关系良好。其中化合物 3 对Bel-7402、HeLa、HT1080、KB、A549、SGC-7901 和 Heps 等7 种肿瘤细胞株生长增殖均具有良好的抑制作用,IC₅₀ 为 11. 61 ~ 18. 73 mg L⁻¹。化合物 1 对除 A549 之外的 6 种肿瘤细胞株抑制作用良好,IC₅₀ 为 11. 34 ~ 19. 32 mg L⁻¹(结果见表 1)。化合物 1、3 的抗肿瘤活性为皂角刺中首次发现。

研究[J]. 中国药科大学学报,2005,36(2):114 - 117.
[4] 殷志琦,叶文才,赵守训. 国产贯叶连翘化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2002,33(4):277 - 279.
[5] LUIS M C,SEITA J. A new oleanolic acid derivative from *Securinega tinctoria* [J]. *Planta Med*,1993,59:369 - 372.
[6] TOSHIHIRO A,KAZUHIRO Y,TOSHITAKE T,et al. Triterpenoid ketones from *Lingnania chungii* McClure: Arborinone, friedelin and glutinone [J]. *Chem Pharm Bull*,1992,40(3):789 - 791.
[7] 南海函,张勉,吴军. 许树化学成分研究[J]. 中草药,2005,36(4):492 - 494.
[8] 赵燕燕,崔承斌,蔡兵,等. 洋紫荆中化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志,2004,14(5):294 - 297.
[9] 李兰芳,王涛,张文彦,等. 白羊草化学成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报,2000,17(4):269 - 270.
[10] 吴惠妃,梅全喜,刁远明,等. 三角草化学成分研究[J]. 中药材,2004,27(4):259 - 260.
[11] AMARENDRA P,SWAPAN K C. Betulin-3-caffeate from quercus suber. 13C-NMR spectra of some lupenes [J]. *Journal of Natural Products*,1988,51(2):217 - 220.
[12] 杨序娟,王乃利,黄文秀,等. 接骨木中的三萜类化合物及其对类成骨细胞 UMR106 的作用[J]. 沈阳药科大学学报,2005,22(6):449 - 452.
[13] SALIMUZZAMN S,FARRU KH H,SABIRA B,et al. Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* [J]. *Journal of Natural Products*,1988,51(2):229 - 233.

(下转至第 162 页)

New research progress in pharmacological activities of baicalin

WEN Min , LI Xue , FU Shourting

(School of Life Science and Biopharmaceutics , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China)

Abstract : Objective To review the new research progress in some pharmacological activities of baicalin. **Methods** Reviews were done based on relative references about baicalin. **Results** Except for traditional effects of baicalin on sedation ,hypotension ,clearance of free radical and antiarrhythmia ,baicalin was proved to possess the therapeutic effects on arteriosclerosis caused by chlamydia pneumoniae ,protective effects on ischemia reperfusion injury of brain ,heart and hepatic injury induced by different causes ,human periodontal ligament fibroblasts ;baicalin could significantly inhibit trichomonas vaginalis *in vitro*. **Conclusions** This review provides a reference for the research and development of baicalin.

Key words : baicalin ; *Scutellaria baicalensis* Georgi ; pharmacological activity

(上接第 111 页)

Identification and anti-tumor activity determination about anti-tumor components of *Gleditsia sinensis* Lam. stings

XU Zhe¹ , ZHAO Xiao-di² , WANG Yi-meng¹ , CHEN Xiao-hui² , BI Kai-shun²

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China ; 2. School of Pharmacy , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China)

Abstract : Objective To study the anti-tumor components of the *Gleditsia sinensis* Lam. stings. **Methods** Bioassay-directed fractionation of the *Gleditsia sinensis* Lam. stings led to isolation of compounds with silica gel ,Sephadex LH-20 etc. They were elucidated on the basis of physico-chemical properties and spectral methods and their anti-tumor activity were evaluated by MTT. **Results** Eight compounds were separated from the *Gleditsia sinensis* Lam. stings and identified as fisetin (1) ,quercetin (2) ,3 β -acetoxyolean-12-en-28-oic acid (3) ,friedelin (4) ,palmitic acid (5) ,betulin (6) , β -sitosterol (7) ,daucosterol (8) . **Conclusions** Among them ,compounds 2 - 6 and 8 are isolated from the plant for the first time. The antiproliferative activities of 8 isolated compounds against seven tumor cell lines are evaluated by MTT. The results demonstrate that compounds 1 and 3 exhibit strong antiproliferative activity ,and their anti-tumor activities are reported from the plant for the first time.

Key words : *Gleditsia sinensis* Lam. stings ;anti-tumor activity ;extractions ;separation