

青龙衣中细胞毒活性成分的研究

董梅^{1,2*} 袁日¹ 齐凤琴² 李廷利²¹哈尔滨医科大学附属第三医院 哈尔滨 150081; ²黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040

摘要: 利用各种化学及色谱技术从青龙衣中分离得到 11 个化合物, 通过理化性质和波谱学手段分别鉴定为 2-羟基-1,4-萘醌(2-hydroxy-1,4-naphthoquinone **1**)、5-羟基-1,4-萘醌(5-hydroxy-1,4-naphthoquinone **2**)、2,5-二羟基-1,4-萘醌(2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone **3**)、3,5-二羟基-1,4-萘醌(2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone **4**)、5,8-二羟基-1,4-萘醌(2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone **5**)、5-甲氧基-1,4-萘醌(5-methoxy-1,4-naphthoquinone **6**)、5,7-二羟基色原酮(5,7-dihydroxychromone **7**)、异香草酸(isovanillic acid **8**)、没食子酸(gallic acid **9**)、 β -谷甾醇(β -sitosterol **10**)和 β -胡萝卜苷(β -daucosterol **11**)。化合物**3**、**4**、**6**~**8**为首次从该属植物中分离得到, 化合物**1**为首次从该植物中分离得到。细胞毒活性测试结果表明, 化合物**3**和**4**对 HepG2 细胞表现出强的抑制作用, IC_{50} 值分别为 $5.0 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$ 和 $7.0 \pm 0.5 \mu\text{mol/L}$; **2**和**5**能显著抑制 HL-60 细胞的增殖, IC_{50} 值分别为 $9.3 \pm 1.2 \mu\text{mol/L}$ 和 $2.3 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$ 。

关键词: 青龙衣; 化学成分; 萘醌类; 结构鉴定; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

Chemical Constituents of Pericarpium Juglantis

DONG Mei^{1,2*}, YUAN Ri¹, QI Feng-qin², LI Ting-li²¹The Affiliated Third Hospital of Harbin Medical University Harbin 150081, China;²Heilongjiang University of Chinese Medicine Harbin 150040, China

Abstract: Eleven compounds were isolated from Pericarpium Juglantis and their structures were identified as 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**1**), 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**2**), 2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone (**3**), 2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone (**4**), 2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone (**5**), 5-methoxy-1,4-naphthoquinone (**6**), 5,7-dihydroxychromone (**7**), isovanillic acid (**8**), gallic acid (**9**), β -sitosterol (**10**), and β -daucosterol (**11**), by means of their physico-chemical properties and spectroscopic ways. In the cytotoxic assay **3** and **4** exhibited significant inhibitory effects against HepG2 cancer cell lines with IC_{50} value of $5.0 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$ and $7.0 \pm 0.5 \mu\text{mol/L}$, respectively. And **2** and **5** showed significant inhibitory effects against HL-60 cancer cell lines with IC_{50} value of $9.3 \pm 1.2 \mu\text{mol/L}$ and $2.3 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$, respectively.

Key words: *Juglans mandshurica*; chemical constituents; structural identification; cytotoxic activity

核桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim.) 是胡桃科(Juglandaceae) 胡桃属落叶乔木, 又名胡桃楸、楸子或山核桃。核桃楸的树皮、茎枝、种仁及青果等部位均可入药^[1]。青龙衣为核桃楸未成熟外果皮, 在东北各地, 民间广泛将其用于胃癌、肝癌、肺癌等常见癌症的治疗, 且疗效显著。目前, 国内外对核桃楸茎皮和根的化学及生物活性研究报道较多, 许多研究集中在细胞毒活性方面。核桃楸中主要含有萘醌类

化合物, 还含有少量黄酮类及简单的酚类化合物, 部分化合物具有较好的细胞毒活性^[2-6]。

核桃楸未成熟果皮又被称为青龙衣, 其主要成分亦为萘醌及黄酮类等^[7,8]。有关研究主要集中在青龙衣提取物或萃取部位的细胞毒活性等方面。青龙衣提取物具有较显著的体内抗癌及体外抑制癌细胞增殖活性。青龙衣乙醇提取物的氯仿萃取物及乙酸乙酯萃取物对 S_{180} 实体瘤小鼠和 H22 腹水型肿瘤小鼠有一定的抑制作用^[9], 能够抑制人白血病细胞株 HL-60、人胃癌细胞株 BGC823 和人宫颈癌细胞株 HeLa 的增殖具有显著的抑制作用^[10]。

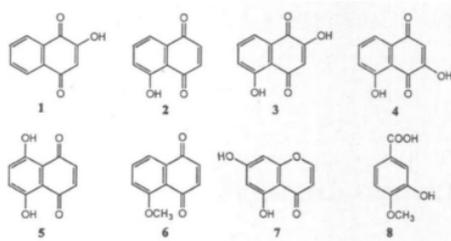
为了进一步探索青龙衣的活性成分, 我们对其

收稿日期: 2011-01-12 接受日期: 2011-06-23

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11541162)

* 通讯作者 Tel: 86-451-86298568; E-mail: mdhappy2006@hotmail.com

进行了化学成分的研究,从中分得了11个化合物,根据理化常数和波谱数据,分别鉴定为2-羟基-1,4-萘醌(2-hydroxy-1,4-naphthoquinone **1**)、5-羟基-1,4-萘醌(5-hydroxy-1,4-naphthoquinone **2**)、2,5-二羟基-1,4-萘醌(2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone **3**)、3,5-二羟基-1,4-萘醌(2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone **4**)、5,8-二羟基-1,4-萘醌(2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone **5**)、5-甲氧基-1,4-萘醌(5-methoxy-1,4-naphthoquinone **6**)、5,7-二羟基色原酮(5,7-dihydroxychromone **7**)、异香草酸(isovanillic acid **8**)、没食子酸(gallic acid **9**)、 β -谷甾醇(β -sitosterol **10**)和 β -胡萝卜素(β -claucoesterol **11**)。



1 仪器和材料

核磁共振光谱仪为 Bruker AV-400 型;质谱仪为 Bruker Esquire 2000 型。半制备 HPLC 采用岛津 LC-6A 高效液相色谱仪,配备 Shimadzu SPD-6AV 型检测器。RE 52AA 型旋转蒸发器为上海亚荣生化仪器厂产品。Sephadex LH-20、ODS 为 Pharmacia 公司产品。D-401 大孔吸附树脂为西安蓝晓科技有限公司产品。柱色谱硅胶(100~200目,200~300目)和薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工厂生产。其它试剂均为分析纯。

ALB-124 电子天平(Acculab Sartius Group);低速离心机(湖南仪器仪表总厂离心机厂);CHS-213 生物倒置显微镜(日本 Olympus 公司);超净工作台(苏州实验仪器厂);TC2323 型二氧化碳培养箱(美国 SHELLAB 公司);全自动立式高压消毒锅(上海博迅仪器厂);微量加样器(Gilson 公司产品)。

人肝癌细胞株 HepG2、人白血病细胞株(HL-60 及 Mata)购自武汉大学细胞保藏中心;高糖 DMEM 培养粉(Sigma 公司产品);胎牛血清(杭州四季青公司产品);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司产品);二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司产品)。

青龙衣为2009年8月份采自于黑龙江省阿城市亚沟镇,经黑龙江中医药大学中药鉴定教研室鉴

定为 Pericarpium Juglantis。

2 提取与分离

青龙衣 5 kg,用体积分数 70% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩得浸膏。将浸膏分散于适量蒸馏水中,依次以氯仿和水饱和的正丁醇萃取,萃取液减压浓缩,得到萃取部分。其中氯仿部分(37.9 g)经硅胶柱色谱,以环己烷-乙酸乙酯梯度洗脱,共得到 16 个部分。第 3 部分和第 5 部分经重结晶分别得到化合物 **1**(13.0 mg)、**10**(25.3 mg)和 **2**(18.5 mg);第 7 部分经反复硅胶柱色谱得到化合物 **5**(41.2 mg);第 8 部分经硅胶柱层析以环己烷-乙酸乙酯(10:1)洗脱,得到化合物 **3**(7.1 mg)和 **4**(12.3 mg);第 12 部分经反复硅胶柱色谱以氯仿-甲醇(10:1)洗脱,得到化合物 **6**(9.3 mg)、**7**(18.2 mg)和 **9**(10.7 mg);第 14 部分经硅胶柱纯化,以氯仿-甲醇(15:1)洗脱,得到化合物 **8**(6.9 mg)和 **11**(23.7 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 浅黄色粉末,¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.12(2H, d, J = 7.3 Hz, H-5, β), 7.80(1H, m, H-6), 7.73(1H, m, H-7), 7.36(1H, s, H-3)。¹³C NMR(CDCl₃, 100 MHz) δ : 185.0(s, C-4), 182.0(s, C-1), 156.3(s, C-2), 135.3(d, C-5), 133.2(d, C-8), 132.9(s, C-9), 129.4(s, C-10), 126.7(d, C-6), 126.5(d, C-7), 110.7(d, C-3)。结合文献^[11]可以确定化合物 **1** 为 2-羟基-1,4-萘醌。

化合物 **2** 浅黄色粉末,¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 11.88(1H, s, 5-OH), 7.60(1H, d, J = 7.2 Hz, H-2), 7.51(1H, d, J = 7.2 Hz, H-3), 7.40(1H, br. d, J = 7.1 Hz, H-8), 7.32(1H, t, J = 7.1 Hz, H-7), 6.90(1H, br. d, J = 7.1 Hz, H-6)。¹³C NMR(CDCl₃, 100 MHz) δ : 190.5(s, C-1), 184.4(s, C-4), 161.6(s, C-5), 139.8(d, C-3), 138.8(d, C-2), 136.8(s, C-8), 131.9(s, C-9), 124.7(d, C-7), 119.3(d, C-6), 115.1(d, C-10)。结合文献^[11]可以确定化合物 **2** 为 5-羟基-1,4-萘醌。

化合物 **3** 浅黄色粉末,¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 12.1(1H, s, 5-OH), 7.56(1H, m, H-7), 7.42(1H, d, J = 7.6 Hz, H-8), 7.21(1H, d, J = 8.0 Hz, H-6), 6.10(1H, s, H-3)。¹³C NMR(CDCl₃, 100 MHz) δ : 191.5(s, C-4), 180.2(s, C-1), 160.1(s, C-

2) ,159.0 (s, C-5) ,135.2 (d, C-7) ,130.2 (s, C-9) ,124.3 (d, C-6) ,118.0 (d, C-8) ,113.8 (s, C-10) ,110.2 (d, C-3) 。结合文献^[12]可以确定化合物 **3** 为 2,5-二羟基-4-萘醌。

化合物 **4** 浅黄色粉末, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 12.0 (1H, s, 5-OH) ,7.68 (1H, t, J = 7.8 Hz, H-7) ,7.40 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-8) ,7.25 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-6) ,6.13 (1H, s, H-2) 。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 185.0 (s, C-4) ,183.1 (s, C-1) ,160.1 (s, C-5) ,159.6 (s, C-3) ,136.0 (d, C-7) ,132.4 (s, C-9) ,122.6 (d, C-6) ,117.10 (d, C-8) ,114.0 (s, C-10) ,111.3 (d, C-3) 。结合文献^[12]可以确定化合物 **4** 为 3,5-二羟基-4-萘醌。

化合物 **5** 浅黄色粉末, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.14 (4H, s, H-2, 3, 6, 7) 。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 173.1 (s, C-1, 4, 5, 8) ,134.6 (d, C-2, 3, 6, 7) ,112.1 (s, C-9, 10) 。结合文献^[13]可以确定化合物 **5** 为 5,8-二羟基-4-萘醌。

化合物 **6** 浅黄色粉末, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 11.80 (1H, s, 5-OH) ,7.56 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-2) ,7.47 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-3) ,7.41 (1H, br. d, J = 7.6 Hz, H-8) ,7.36 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-7) ,6.72 (1H, br. d, J = 7.6 Hz, H-6) ,3.80 (3H, s, 5-OCH₃) 。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 190.6 (s, C-1) ,186.2 (s, C-4) ,161.0 (s, C-5) ,139.3 (d, C-3) ,138.2 (d, C-2) ,136.0 (s, C-8) ,131.2 (s, C-9) ,124.3 (d, C-7) ,119.0 (d, C-6) ,114.1 (d, C-10) ,55.2 (q, 5-OCH₃) 。结合文献^[13]可以确定化合物 **6** 为 5-甲氧基-4-萘醌。

化合物 **7** 黄色粉末, ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.50 (1H, s) ,8.10 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-2) ,6.18 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-3) ,6.10 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6) ,6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8) 。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 181.0 (s, C-4) ,165.4 (s, C-7) ,161.8 (s, C-5) ,158.1 (s, C-9) ,157.1 (d, C-2) ,110.3 (d, C-3) ,104.2 (s, C-10) ,99.6 (d, C-6) ,94.0 (d, C-8) 。结合文献^[14]可以确定化合物 **7** 为 5,7-二羟基色原酮。

化合物 **8** 白色晶体, ¹H NMR (Acetone-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.41 (1H, s, -COOH) ,7.52 ~ 7.60 (1H, dd, J = 1.9, 8.1 Hz, H-6) ,7.51 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2) ,6.90 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5) ,3.80 (3H, s, OCH₃) 。¹³C NMR (Acetone-*d*₆, 100 MHz) δ: 166.2 (s,

C-7) ,150.7 (s, C-4) ,147.0 (s, C-3) ,124.4 (d, C-6) ,122.5 (s, C-1) ,114.1 (d, C-2) ,112.1 (d, C-5) ,55.8 (OCH₃) 。结合文献^[15]可以确定化合物 **8** 为异香草酸。

化合物 **9** 白色粉末, 经与标准品共薄层分析, 鉴定为没食子酸。

化合物 **10** 和 **11** 经与标准品共薄层分析, 分别鉴定为 β-谷甾醇和 β-胡萝卜素。

4 活性测试结果

采用 MTT 法测定所得萘醌类化合物 (**1** ~ **6**) 的细胞毒活性, 以顺铂为阳性对照。实验方法和步骤按照文献^[16]进行, 活性测试结果见表 1。

表 1 青龙衣中单体化合物的细胞毒活性
Table 1 IC₅₀ values of cytotoxic activity of the compounds isolated from *Juglans mandshurica*

化合物 Compound	IC ₅₀ / μmol/L		
	HepG2	HL-60	Mata
1	25.1 ± 2.4	11.0 ± 2.6	31.0 ± 2.3
2	76.0 ± 10.1	9.3 ± 1.2	62.1 ± 5.6
3	5.0 ± 0.6	63.2 ± 4.1	>100
4	7.0 ± 0.5	>100	67.1 ± 6.0
5	22.1 ± 4.1	2.3 ± 0.2	55.8 ± 7.3
6	>100	85.4 ± 7.6	35.1 ± 6.3
Cisplatin	4.5 ± 0.6	1.9 ± 0.1	7.4 ± 0.6

部分化合物表现出较强的抑制肿瘤细胞增殖活性。其中 **3** 和 **4** 对 HepG2 细胞的抑制作用较强, **2** 和 **5** 能显著抑制 HL-60 细胞的增殖。

参考文献

- 1 Dictionary of Chinese Medicine (中药大辞典). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press (上海科学技术出版社), 1986, 1544.
- 2 Lee SW, Lee KS, Son JK. New naphthalenyl glycosides from the roots of *Juglans mandshurica*. *Plant Med* 2000; 66: 184-186.
- 3 Kim SH, Lee KS, Son JK, et al. Cytotoxic compounds from the roots of *Juglans mandshurica*. *J Nat Prod* 1998; 61: 643-645.
- 4 Hirakawa K, Ogiue E, Motoyoshiya J, et al. Naphthoquinones from Juglandaceae. *Phytochemistry* 1986; 25: 1494-1495.
- 5 Min BS, Lee SY, Kim JH, et al. Anti-complement activity of constituents from the stem-bark of *Juglans mandshurica*. *Biol*

- Pharm Bull* 2003 26: 1042-1044.
- 6 Lee KS, Li G, Kim SH *et al.* Cytotoxic diarylheptanoids from the roots of *Juglans mandshurica*. *J Nat Prod*, 2002, 65: 1707-1708.
 - 7 Machida K, Matsuoka E, Kasahara T, *et al.* Studies on the constituents of *Juglans* species. I. Structural determination of (4S)- and (4R)-4-hydroxy- α -tetralone derivatives from the fruit of *Juglans mandshurica* Maxim. var. *sieboldiana* Makino. *Chem Pharm Bull* 2005 53: 934-937.
 - 8 Liu LJ, Li W, Koike K, *et al.* New α -tetralonyl glucosides from the fruit of *Juglans mandshurica*. *Chem Pharm Bull*, 2004 52: 566-569.
 - 9 Liu W(刘薇), Ji YB(季宇彬). Study on acute toxicity experiment of mice and anti-tumor function in vivo of Chinese traditional medicine Qinglongyi. *J Harbin Univ Comm* (哈尔滨商业大学学报) 2004 20: 4-10.
 - 10 Liu W(刘薇), Lin WH(林文翰), Ji YB(季宇彬). Study on the acute toxicity experiment of mice and anti-tumor function in vitro of qinglongyi. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2004 29: 887-890.
 - 11 Papageorgiou VP. Carbon-13 NMR spectra of some naturally occurring hydroxynaphthaquinones. *Planta Med*, 1980, 40: 305-307.
 - 12 Barre G, Hocquaux M, Jacquet B, *et al.* Differentiation entre les dihydroxy-2,5 et -3,5 naphthoquinones-1,4 par resonance magnetique nucleaire du ^{13}C et ^1H et heteronucleaire a deux dimensions. *Tetrahedron Lett*, 1986 27: 6197-6200.
 - 13 Kobayashi M, Terui Y, Tori K, *et al.* Carbon-13 NMR spectra of juglone, naphthazarin and their derivatives. *Tetrahedron Lett*, 1976, 17: 619-620.
 - 14 Yang YJ(杨燕军). Studies on the chemical constituents of *Viscum liquidambarcolum*. *J Chin Med Mater* (中药材), 1998 21(1): 22-23.
 - 15 Ouyang DW(欧阳丹薇), Yang PM(杨培明), Kong DY(孔德云). Chemical constituents from *Pteris multifida* Poir. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志) 2008 39: 898-900.
 - 16 Dong M, He XJ, Liu RH. Phytochemicals of black bean seed coats: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *J Agric Food Chem* 2007 55: 6044-6051.