



亮叶围涎树根的化学成分及其肿瘤细胞毒活性研究

马双刚, 吕海宁, 丁治, 庾石山*, 陈晓光

(中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所, 天然药物活性物质与
功能国家重点实验室, 北京 100050)

[摘要] 目的: 研究亮叶围涎树根的化学成分及其抗肿瘤活性。方法: 应用硅胶, Sephadex LH-20 HPLC 等各种色谱技术进行分离纯化, 用 NMR 等谱学方法分析确定化合物结构。采用 MTT 法对分离得到的化合物进行抗肿瘤活性评价。结果: 从亮叶围涎树根的 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物中分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为: julibroside A₂ (1), 3-[(2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl) oxy]-16α-hydroxyolean-12-en-28-oic acid (2), 没食子酸 (3), 没食子酸乙酯 (4), (+)-儿茶素 (5), (-)-没食子儿茶素没食子酸酯 (6)。化合物 2 对人源肿瘤细胞 A2780 具有较强的细胞毒活性 (IC₅₀ 1.72 μmol·L⁻¹)。结论: 化合物 1~6 均为首次从该植物中分离获得。化合物 2 对人源肿瘤细胞 A2780 具有明显的细胞毒活性。

[关键词] 猴耳环属; 亮叶围涎树; 三萜皂苷; 黄烷; 细胞毒活性

亮叶围涎树 *Pithecellobium lucidum* Benth 又称亮叶猴耳环、钻地龙, 为豆科猴耳环属植物, 分布于我国浙江、福建、台湾、广东、四川、云南等地。枝叶入药, 有小毒, 主治烫伤、风湿痛、跌打损伤^[1]。猴耳环属 *Pithecellobium* Mart 植物属于含羞草亚科, 全世界约 100 种, 分布于热带亚洲和美洲, 我国有 4 种, 分别是猴耳环 *P. clypearia*, 牛蹄豆 *P. dulce*, 亮叶猴耳环 *P. lucidum*, 亮叶牛蹄豆 *P. biganinum*^[2]。对猴耳环属植物的化学研究表明, 该属植物中含有多种化学成分, 其生理活性广泛, 具有细胞毒、抑菌、抗炎、镇痛、抗病毒等作用^[4-6]。前期研究工作中已从其根的 95% 乙醇提取物的正丁醇部位分离得到 3 个新的具有肿瘤细胞毒活性的结构复杂的三萜皂苷^[7]。本研究报道从其根的 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位分离得到 6 个化合物。分别鉴定为 julibroside A₂ (1), 3-[(2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl) oxy]-16α-hydroxyolean-12-en-28-oic acid (2), 没食子酸 (3), 没食子酸乙酯 (4), (+)-儿茶素 (5), (-)-没食子儿茶素没食子酸酯 (6)。以上化合物均为首次从该植物中分离获得, 其中化合物 2 对人源肿瘤细胞 A2780 具有明显的细胞毒活性

(IC₅₀ 1.72 μmol·L⁻¹)。

1 仪器与材料

Mercury-400 核磁共振仪, 溶剂峰为内标; Agilent 1100 Series LC-MSD Trap-SL 型质谱仪测定 ESI-MS; LC-6AD 岛津液相色谱仪, 制备型反相 YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (20 mm × 250 mm, 5 μm); Sephadex LH-20 为瑞典 Amersham Pharmacia 公司生产; 柱色谱硅胶 (160~200 目, 200~300 目) 和薄层色谱硅胶 GF254 均为青岛海洋化工厂产品。

实验药材于 2004 年 9 月采自广西, 由广西中医学院韦松基教授鉴定为亮叶围涎树 *P. lucidum* 的根, 标本保存于中国医学科学院药物研究所标本室 (标本号 No. 90211)。

2 提取分离

取干燥的亮叶围涎树根 4.5 kg 粉碎, 用 95% 乙醇浸泡 3 h 后, 加热回流提取 3 次, 提取液减压浓缩得到 490 g 浸膏, 将其分散于水中, 依次用乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取。各萃取液分别减压浓缩, 得乙酸乙酯萃取物 105 g 正丁醇萃取物 310 g。取乙酸乙酯萃取物 100 g 经聚酰胺柱色谱, 以 90% 乙醇洗脱, 得到乙酸乙酯部位粗品 45 g。取该粗品 44 g 经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇 (20:1~1:1) 梯度洗脱, 得到 9 个组分 (Fr. 1~9)。Fr. 1 再经硅胶柱色谱分离得到化合物 3 (10 mg) 和 4 (12 mg); Fr. 2 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇洗脱) 得到化合物 5 (240 mg); Fr. 4 同样经 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇洗脱) 得到化合物 2 (80 mg) 和 6 (7 mg); Fr. 7 先

[稿件编号] 20110315005

[基金项目] 国家杰出青年基金项目 (30625040); 科技部重大新药创制项目 (2009ZX09311-004)

[通信作者] * 庾石山, Tel (010) 63165326 Fax (010) 63017757, E-mail yushishan@imm.ac.cn



反复经 Sephadex IH-20 柱色谱纯化, 再以制备液相色谱 (乙腈-水 30%) 得到化合物 **1** (15 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末, Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均为阳性。¹H-NMR (pyridine-*d*₅, 400 MHz) δ 0.80 (3H, s, tertmethyl), 0.84 (3H, s, tertmethyl), 1.02 (3H, s, tertmethyl), 1.03 (3H, s, tertmethyl), 1.35 (3H, s, tertmethyl), 1.41 (3H, s, tertmethyl), 1.48 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, Fuc-6), 4.93 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, Glc-1), 5.02 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Fuc-1), 5.06 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, xyf-1); ¹³C-NMR (pyridine-*d*₅, 100 MHz) δ 38.7 (C-1), 26.8 (C-2), 87.9 (C-3), 39.6 (C-4), 55.9 (C-5), 18.4 (C-6), 32.5 (C-7), 40.4 (C-8), 47.3 (C-9), 36.9 (C-10), 23.8 (C-11), 124.5 (C-12), 140.1 (C-13), 43.3 (C-14), 38.2 (C-15), 66.7 (C-16), 50.0 (C-17), 41.7 (C-18), 42.8 (C-19), 34.1 (C-20), 83.4 (C-21), 27.1 (C-22), 28.5 (C-23), 15.8 (C-24), 16.3 (C-25), 17.0 (C-26), 28.1 (C-27), 181.3 (C-28), 28.9 (C-29), 24.2 (C-30), 106.7 (Glc C-1'), 75.8 (C-2'), 78.4 (C-3'), 71.7 (C-4'), 76.9 (C-5'), 70.0 (C-6'), 103.4 (Fuc C-1''), 82.3 (C-2''), 75.2 (C-3''), 72.2 (C-4''), 71.7 (C-5''), 17.2 (C-6''), 107.0 (Xyf-1'''), 75.9 (C-2'''), 77.5 (C-3'''), 70.8 (C-4'''), 67.2 (C-5''')。以上数据与文献 [8] 报道的数据一致, 故鉴定化合物 **1** 为 julibroside A₃。

化合物 **2** 白色晶性粉末 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均为阳性。¹H-NMR (pyridine-*d*₅, 400 MHz) δ 0.80 (3H, s, tertmethyl), 0.97 (3H, s, tertmethyl), 1.04 (3H, s, tertmethyl), 1.16 (3H, s, tertmethyl), 1.83 (3H, s, tertmethyl), 2.13 (3H, s, NHAc), 5.03 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, 氨基葡萄糖糖端基质子信号), 5.23 (1H, br s, H-12), 8.87 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, NHAc); ¹³C-NMR (pyridine-*d*₅, 100 MHz) δ 38.6 (C-1), 26.3 (C-2), 89.1 (C-3), 39.2 (C-4), 55.8 (C-5), 18.5 (C-6), 33.3 (C-7), 39.8 (C-8), 47.3 (C-9), 37.0 (C-10), 23.8 (C-11), 122.3 (C-12), 145.1 (C-13), 42.0 (C-14), 36.1 (C-15), 74.7 (C-16), 48.9 (C-17), 41.4 (C-18), 47.1 (C-19), 31.0 (C-20), 36.2 (C-21), 32.8 (C-22), 28.1 (C-23), 17.0 (C-24), 15.5 (C-25), 17.4 (C-26), 27.2 (C-27), 180.0 (C-28), 33.3 (C-29), 24.7 (C-30), 104.9 (Glc C-1'), 58.0 (C-2'), 76.1 (C-3'), 72.6 (C-4'), 78.2 (C-5'), 63.0 (C-6'); 氨

基葡萄糖糖 C-2' 取代的乙酰基碳信号 δ 170.2 (NHAc C=O) 23.7 (NHAc CH₃)。以上数据与文献 [9] 报道的化合物 3-[(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl) oxy]-16 α -hydroxyolean-12-en-28-oic acid 的数据一致。

化合物 **3** 白色粉末, 在薄层板上以溴酚蓝显色, 斑点为黄色, 示结构中存在羧基。与 FeCl₃ 显色试剂反应呈深蓝色阳性反应, 示有酚羟基。ESI/MS 出现准离子峰 m/z 169 [M - H]⁻。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ 7.15 (2H, s, H-2, 6)。¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ 121.9 (C-1), 110.1 (C-2, C-6), 145.9 (C-3, C-5), 138.7 (C-5), 167.9 (C-7)。以上数据与文献 [10] 报道的数据一致, 故鉴定化合物 **3** 为没食子酸 (gallic acid)。

化合物 **4** 淡黄色粉末, 在薄层板上与 FeCl₃ 显色试剂反应呈阳性, 示有酚羟基。ESI/MS 出现准离子峰 m/z 197 [M - H]⁻。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 6.99 (2H, s, H-2, 6), 4.21 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, -OCH₂CH₃), 1.28 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, -OCH₂CH₃)。¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 121.8 (C-1), 110.0 (C-2, C-6), 146.5 (C-3, C-5), 139.7 (C-5), 168.6 (C-7), 61.7 (-OCH₂CH₃), 14.6 (-OCH₂CH₃)。以上数据与文献 [10] 报道的数据一致, 故鉴定化合物 **4** 为没食子酸乙酯 (ethyl gallate)。

化合物 **5** 白色粉末。ESI/MS 出现准离子峰 m/z 291 [M + H]⁺, 289 [M - H]⁻; [α]_D²⁰ + 4.7° (c 0.60 M cOH), CD (M cOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 201 (9.04), 224 (-2.91), 265 (-0.76), 296 (-1.72) nm; ¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ 4.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-2), 3.88 (2H, m, H-3), 2.52 (1H, dd, $J = 16.0, 8.0$ Hz, H-4a), 2.90 (1H, dd, $J = 16.0, 5.2$ Hz, H-4b), 5.87 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 6.01 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.88 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-6')。¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ 82.6 (C-2), 68.3 (C-3), 28.7 (C-4), 157.1 (C-5), 96.1 (C-6), 157.6 (C-7), 95.4 (C-8), 156.9 (C-9/8a), 100.6 (C-10/4a), 132.1 (C-1'), 115.7 (C-2'), 145.58 (C-3'), 145.64 (C-4c), 115.12 (C-5c), 120.10 (C-26c)。以上数据与文献 [11] 报道的数据一致, 故鉴定化合物 **5** 为 (+) 2l 茶素 [(+) 2catechin]。



化合物 6 黄褐色粉末。ESI/MS 出现准离子峰 m/z 459[M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ 5115 (1H, d, J = 512 Hz, H 22), 5142 (1H, dt, J = 512, 414 Hz, H 23), 2179 (1H, d, J = 414 Hz, H 24a), 2181 (1H, d, J = 414 Hz, H 24b), 6100 (1H, d, J = 210 Hz, H 26), 6107 (1H, d, J = 210 Hz, H 28), 6149 (2H, s, H 2c, H 26c), 7106 (2H, s, H 2d, H 26d); ¹³C 2 NMR (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ 7814 (C 22), 7012 (C 23), 2314 (C 24), 15711 (C 25), 9612 (C 26), 15718 (C 27), 9514 (C 28), 15610 (C 29/8a), 9910 (C 210/4a), 13018 (C 21c), 10611 (C 22c, C 26c), 14518 (C 23c, C 25c), 13312 (C 24c), 12116 (galloyl C 21d), 10919 (C 22d, C 26d), 14614 (C 23d, C 25d), 16611 (C 24d), (Galloyl C = O)。以上数据与文献 [12] 报道的数据一致, 故鉴定化合物 6 为 (-)-没食子儿茶素没食子酸酯 [(-)-2galloocatechin gallate]。

4 生物活性

采用 MTT 法, 对皂苷类化合物 1 和 2 进行了肿瘤细胞毒活性评价, 实验结果发现氨基糖苷化合物 2 对所筛选的 5 种人源肿瘤细胞株 (HCT8, BeL 7402, BGC223, A549 和 A2780) 中 A2780 细胞具有明显的选择性抑制活性, 其 IC₅₀ 1172 Lmol# L⁻¹。而化合物 1 对所筛选的 5 种细胞株均无明显的细胞毒活性 (IC₅₀ > 10 Lmol# L⁻¹)。

[致谢] 核磁数据由中国医学科学院北京协和医学院药物研究所分析测试中心测试。

[参考文献]

[1] 陈冀胜, 郑硕. 中国有毒植物 [M]. 1 北京: 科学出版社, 1987: 1891

[2] 朱相云. 中国豆科植物分类系统概览 [J]. 1 植物研究, 2004, 24(1): 11

[3] Gunasekera S P, Cordell G A, Farnsworth N R. Constituents of *Pithecellobium multiflorum* [J]. 1 J Nat Prod, 1982, 45(5): 6511

[4] Bhargava K P, Gupta B M, Mitra C R. Antinflammatory activity of saponins and other natural products [J]. 1 Indian J Med Res, 1970, 58(6): 7241

[5] Saxena V K, Singha I M. Bioactive flavonoidal constituents from *Pithecellobium dulce* (leaves) [J]. 1 J Inst Chem Calcutta, 1998, 70(5): 1681

[6] 李药兰, 李克明, 苏妙贤, 等. 1 猴耳环抗病毒有效成分研究 [J]. 1 中国中药杂志, 2006, 31(5): 3971

[7] Ma S G, Hu Y C, Yu S S, et al. Cytotoxic triterpenoid saponins acylated with monoterpene acid from *Pithecellobium lucidum* [J]. 1 J Nat Prod, 2008, 71(1): 411

[8] Ikeda T, Fujivara S, Arai K. Cytotoxic glycosides from *Albizia julibrissin* [J]. 1 J Nat Prod, 1997, 60(2): 1021

[9] 粟婀娜, 庾石山, 裴月湖. 1 海红豆化学成分研究 [J]. 1 中国中药杂志, 2007, 32(20): 21351

[10] 尚小雅, 李帅, 王映红, 等. 1 红绒山羊蹄甲的化学成分研究 [J]. 1 中国中药杂志, 2006, 31(23): 19531

[11] Seto R, Nakamura H, Nanjo F, et al. Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment [J]. 1 Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(9): 14341

[12] Jeon S Y, Bae K H, Seong Y H, et al. Green tea catechins as a BACE1 (2secretase) inhibition [J]. 1 Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13: 39051

Chemical constituents from the roots of *Pithecellobium lucidum* and their cytotoxic activity

MA Shuanggang, LV Haining, DING Guanghui, YU Shishan*, CHEN Xiaoguang
(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Beijing 100050, China)

[Abstract] Six compounds were isolated from the roots of *Pithecellobium lucidum* by various chromatographic techniques such as column chromatography on silica gel and Sephadex LH20, and preparative HPLC, and their structures were elucidated as julboside A₂ (1), 32[(2-acetamidooxy-2,3-dihydroxy-2-glycopyranosyl)oxy]-216A₂hydroxyolean-21,22-en-28,29-dioic acid (2), galloyl acid (3), ethyl gallate (4), (+)-catechin (5), (-)-2galloocatechin gallate (6) on the basis of spectroscopic data analysis. Compounds 1-6 were isolated from *Pithecellobium lucidum* for the first time. Compound 2 showed selective cytotoxic activity against the human cell lines A2780 with an IC₅₀ value of 1.72 Lmol# L⁻¹.

[Keywords] *Pithecellobium*; *Pithecellobium lucidum*; triterpenoid saponin; flavane; cytotoxic activity

doi 10.4268/cjmm20111316

[责任编辑 丁广治]

1771#