

青天葵具抗肿瘤活性石油醚部位的成分研究

卢传礼¹, 王辉², 周光雄¹, 王恒山³, 叶文才¹, 姚新生¹

(暨南大学 1. 中药及天然药物研究所, 广东省普通高校重点实验室, 中药药效物质基础与创新药物研究重点实验室;
2. 医学院微生物教研室, 广东 广州 510632; 3. 广西师范大学化学化工学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 通过体外抑制肿瘤细胞生长活性筛选确定青天葵 95% 乙醇(体积分数)提取物及其石油醚萃取部位为抗肿瘤活性部位。综合利用多种色谱手段及重结晶方法从石油醚部位分离得到了 8 个化合物, 并运用理化性质和波谱技术分析确定了化合物结构。其结构分别为: 环桉烯醇(cycloeucalenol)(1); 豆甾醇(2); 谷甾醇(3); 熊果酸(4); auranitiamide acetate(5); (20S, 22E, 24R)-ergosta-7, 22-dien-3 β , 5 α , 6 β -triol(6); 6-methoxy-cervisterol(7); 和 β -胡萝卜素(8)。其中, 化合物 3、5、6、7 和 8 均为首次从该植物中分离得到。

[关键词] 青天葵; 抗肿瘤活性; 化学成分

[中图分类号] R284.1/R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2009)05-0556-04

Studies on chemical constituents of petroleum ether extract with anti-tumor activity from *Nerviliae fordii*

LU Chuan-li¹, WANG Hui², ZHOU Guang-xiong¹, WANG Heng-shan³, YE Wen-cai¹, YAO Xin-sheng¹

- (1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Key Laboratory of Guangdong Regular Higher Education Institutions, Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drug Research;
2. Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

[Abstract] The results of the *in vitro* antitumor activity screenings indicated that 95% ethanol extract and the petroleum ether fraction from the extract showed a significant inhibitory activities on growth of cancer cells. Eight compounds were isolated from this fraction by a combination of various chromatography methods and re-crystallization. The chemical structures were elucidated on the basis of physico-chemical properties and spectral data, and were identified as cycloeucalenol (1); stigmasterol (2); sitosterol (3); ursolic acid (4); auranitiamide acetate (5); (20S, 22E, 24R)-ergosta-7, 22-dien-3 β , 5 α , 6 β -triol (6); 6-methoxy-cervisterol (7); and β -daucosterol (8). Among these compounds, 3, 5, 6, 7 and 8 are obtained from the plant for the first time.

[Key words] *Nerviliae fordii* (Hance) Schltr; anti-tumor activity; chemical constituents

中药青天葵, 原植物为兰科植物毛唇芋兰 [*Nerviliae fordii* (Hance) Schltr], 又名独叶莲、独脚莲、提心吊胆、青莲、芋兰等, 主要分布于广西、广东、四川、云南等地, 其地上部分或全草药用^[1], 性平, 味

[收稿日期] 2008-12-26

[基金项目] 广西师范大学(省部共建教育部)重点实验室资助课题(桂科能 0630006-5D02)

[作者简介] 卢传礼(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学

通讯作者: 周光雄 Tel: 020-85221469; E-mail: guangzxh@sina.com

苦、甘,归心、肺、肝经,有清肺止咳、健脾消积、镇静止痛、清热解毒、散瘀消肿之功效,主治肺结核咳嗽咯血、支气管炎、小儿疳积、小儿肺炎、跌打损伤肿痛、口腔炎、急性喉炎、疮毒、疝气痛等症^[2]。近年来,青天葵的临床研究多以治疗肺部疾病为主,尤其对于治疗急性支气管炎、喘息型慢性支气管炎效果显著^[3],同时,也有文献报道青天葵提取物具有抑菌和抗肿瘤作用^[4-5]。目前对于青天葵的研究主要集中在临床研究和组织栽培方面,对其化学成分的研究报道非常少,且多数仅对其进行了定性分

析^[6-11]。

本研究采用多种分离纯化手段,从其非极性石油醚部位分离得到了8个化合物。经波谱数据分析,结合理化性质,并与文献对照,分别鉴定为:环桉烯醇(cycloeucalenol)(1),豆甾醇(2),谷甾醇(3),ursolic acid(4),aurantiamide acetate(5),(20S, 22E, 24R)-ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol(6),6-methoxy-cervisterol(7),和 β -胡萝卜素(8)。其中,化合物3、5、6、7、8均为首次从该植物中分离得到。部分化合物结构见图1。

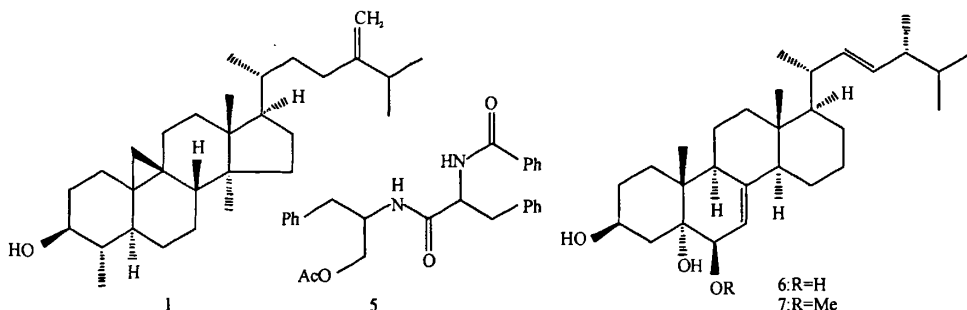


图1 化合物1、5、6和7的结构

1 仪器与试剂

BRUKER AV-400 FT 型核磁共振仪; Finnigan LCQ Advantage MAX 型质谱仪。硅胶为青岛海洋化工厂产品; 硅胶 GF₂₅₄ 薄层预制板为烟台化学工业研究所产品; Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司生产; 所用试剂均为分析纯。青天葵药材采购自广州市清平药材市场, 并经鉴定为兰科植物毛唇芋兰 [*Nervilia fordii* (Hance) Schltr] 地上全草, 样品留存于暨南大学药学院生药学教研室。

2 提取与分离

干燥青天葵全草 2.0 kg, 粉碎, 加 5 倍量体积分数 95% 的药用乙醇, 室温浸泡 24 h, 过滤, 收集滤液, 滤渣用同样的方法再分别浸提 2 次, 合并滤液。回收乙醇得浸膏 176.4 g, 收率 8.8%。浸膏混悬于 2 L 水中, 依次用石油醚、氯仿和乙酸乙酯萃取, 回收溶剂后得到 4 个极性部位。通过体外抑制肿瘤细胞增殖活性分析, 显示石油醚萃取部位在 100 μ g/mL 测试质量浓度下对肿瘤细胞株 HEPG-2、HEP-2、A549、HELA 和 H460 的抑制率分别为 89.2%、90.5%、91.9% 和 91.1%, 表明具有明显的抗肿瘤活性, 故对石油醚部位进行深入化学成分研究。

石油醚部位 (PE, 47.1 g), 经过硅胶柱层析, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱得到 PEA、PEB、PEC、PED、PEE、PEF 和 PEG 等 7 个馏分。PEB 经重结晶得到化合物 1。PED 经过 Sephadex-LH20 柱层析, 氯仿-甲醇等体积混合溶液洗脱, 得到 PED1 和 PED2 两个馏分, PED2 经过硅胶柱层析, 环己烷-氯仿梯度洗脱, 并结合重结晶得到化合物 2。PEE 经过 Sephadex-LH20 柱层析, 氯仿-甲醇等体积混合溶液洗脱, 得到 PEE1 和 PEE2 两个馏分, PEE2 经过重结晶得到化合物 3。PEF 经过多次 Sephadex-LH20 柱层析再结合 HPLC 制备液相分离和重结晶等手段纯化, 得到化合物 4 和 5。PEG 经过硅胶柱层析 (氯仿-甲醇梯度洗脱) 得到 4 个馏分: PEG1、PEG2、PEG3 和 PEG4。经过多次 Sephadex-LH20 柱层析后, 再通过十八烷基硅烷键合硅胶 (ODS) 开放柱层析和 HPLC 制备液相等手段分别从 PEG2 和 PEG3 中分离得到化合物 6 和 7。通过重结晶从 PEG4 中分离得到化合物 8。

3 结构鉴定

(1) 化合物 1 白色针晶 (石油醚-丙酮), ESI-MS m/z : 427.1 [$M + H$]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.72 (1H, s, H-24'), 4.66 (1H,

d, $J=1.2$ Hz, H-24'), 3.21 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-28), 0.14 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-19 α), 0.39 (1H, d, $J=3.8$ Hz, H-19 β), 0.97 (3H, s, H-18). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 30.8 (C-1), 34.8 (C-2), 76.6 (C-3), 44.6 (C-4), 43.4 (C-5), 24.7 (C-6), 25.2 (C-7), 46.9 (C-8), 23.6 (C-9), 29.6 (C-10), 27.0 (C-11), 32.9 (C-12), 45.4 (C-13), 49.0 (C-14), 35.4 (C-15), 28.1 (C-16), 52.3 (C-17), 17.8 (C-18), 27.2 (C-19), 36.2 (C-20), 18.3 (C-21), 35.0 (C-22), 31.3 (C-23), 157.0 (C-24, 末端双键的季碳), 33.8 (C-25), 21.9 (C-26), 22.0 (C-27), 14.4 (C-28), 19.1 (C-29), 106.0 (C-24', 末端双键的 CH_2). 以上数据与文献[12]报道的基本一致,故确定化合物1为 cycloeucalenol.

(2) 化合物2 白色针晶(石油醚-丙酮), mp: 168~170 $^{\circ}\text{C}$. 体积分数为10% 硫酸-乙醇显紫色. 与甾醇对照品多系统共薄层展开 R_f 值及显色情况均相同,故确定化合物2为甾醇(stigmasterol).

(3) 化合物3 白色针晶(石油醚-丙酮), mp: 139~141 $^{\circ}\text{C}$. 体积分数为10% 硫酸-乙醇显紫色. 与谷甾醇对照品多系统共薄层展开 R_f 值及显色情况均相同,故确定化合物3为谷甾醇(sitosterol).

(4) 化合物4 白色针晶(甲醇), mp: 272~274 $^{\circ}\text{C}$. 体积分数为10% 硫酸-乙醇溶液显紫红色. ESI-MS m/z : 480 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 936 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 455 $[\text{M-H}]^-$, 911 $[2\text{M-H}]^-$, 提示相对分子质量为456. $^1\text{H-NMR}$ (Pyr- d_5 , 400 MHz) δ : 5.46 (1H, brs, H-12), 3.46 (1H, m, H-3), 1.25 (3H, s, H-23), 1.03 (3H, s, H-24), 0.90 (3H, s, H-25), 1.06 (3H, s, H-26), 1.24 (3H, s, H-27), 0.97 (3H, d, $J=5.4$ Hz, H-29), 1.01 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-30). $^{13}\text{C-NMR}$ (Pyr- d_5 , 100 MHz) δ : 39.1 (C-1), 28.1 (C-2), 79.7 (C-3), 39.4 (C-4), 55.9 (C-5), 18.8 (C-6), 33.6 (C-7), 40.0 (C-8), 48.1 (C-9), 37.3 (C-10), 23.7 (C-11), 125.7 (C-12), 139.3 (C-13), 42.5 (C-14), 28.7 (C-15), 23.8 (C-16), 48.1 (C-17), 53.6 (C-18), 39.4 (C-19), 39.5 (C-20), 31.1 (C-21), 37.5 (C-22), 28.8 (C-23), 17.5 (C-24), 15.7 (C-25), 17.5 (C-26), 23.9 (C-27), 180.0 (C-28), 17.5 (C-29), 21.4 (C-30). 以上数据经与文献[13]比较,基本一致,故鉴定化合物4为熊果酸

(ursolic acid).

(5) 化合物5 白色针晶(甲醇), 体积分数为10% H_2SO_4 不显色, 茚三酮显紫色. ESI-MS m/z : 467 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 911 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 479 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$, 提示相对分子质量为444. HR-ESI-MS m/z : 444.20476 提示分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.02 (3H, s, H-1), 2.74 (2H, m, H-11), 3.07 (1H, dd, $J=13.5, 8.5$ Hz, H-10a), 3.21 (1H, dd, $J=13.5, 5.8$ Hz, H-10b), 3.83 (1H, dd, $J=11.4, 4.1$ Hz, H-3a), 3.92 (1H, dd, $J=11.4, 4.0$ Hz, H-3b), 4.35 (1H, m, H-4), 4.79 (1H, m, H-7), 6.12 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5), 6.85 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-8), 7.06~7.30 (10H, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 2''', 3''', 4''', 5''', 6'''), 7.43 (2H, t, $J=7.6$ Hz, H-3', 5'), 7.52 (1H, t, $J=7.3$ Hz, H-4'), 7.71 (2H, d, $J=7.4$ Hz, H-2', 6'). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 170.7 (C-2), 170.4 (C-6), 167.1 (C-9), 136.7 (C-1''), 136.6 (C-1'''), 133.6 (C-1'), 131.9 (C-4'), 129.3 (C-3'' and C-5''), 129.1 (C-3''' and C-5'''), 128.7 (C-2'' and C-5''), 128.6 (C-2' and C-6'), 128.5 (C-4''), 127.1 (C-2''' and C-6'''), 127.0 (C-3' and C-5'), 126.7 (C-4'''), 64.6 (C-3), 55.0 (C-7), 49.5 (C-4), 38.4 (C-10), 37.4 (C-11), 20.7 (C-1). 以上数据与文献[14]一致,故鉴定化合物5为 aurantiamide acetate.

(6) 化合物6 白色针晶(甲醇), mp: 251~253 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} = -60.2$ ($c=0.1$ mg/mL, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$). 喷体积分数10% H_2SO_4 后开始显红色, 加热很快变为青紫色. ESI-MS m/z : 883 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 1312 $[3\text{M} + \text{Na}]^+$, 464.2 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$, 860 $[2\text{M-H}]^-$. $^1\text{H-NMR}$ (pyr- d_5 , 400 MHz) δ : 5.73 (1H, brs, H-7), 5.22 (1H, dd, $J=7.2, 15.2$ Hz, H-22), 5.18 (1H, dd, $J=7.2, 15.2$ Hz, H-23), 4.83 (1H, m, H-3), 4.30 (1H, brs, H-6), 1.52 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.95 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-19), 0.85 (6H, d, $J=5.0$ Hz, H-26, 27), 0.66 (3H, s, H-18). $^{13}\text{C-NMR}$ (pyr- d_5 , 100 MHz) δ : 141.5 (C-8), 136.2 (C-22), 132.1 (C-23), 120.5 (C-7), 76.1 (C-5), 74.3 (C-6), 67.6 (C-3), 56.1 (C-17), 55.2 (C-14), 43.8 (C-13 and C-9 or C-24), 43.1 (C-24 or C-9), 42.0 (C-4), 40.8 (C-20), 39.9 (C-12), 38.1 (C-10),

33.8 (C-2), 33.3 (C-25), 32.6 (C-1), 28.5 (C-16), 23.5 (C-15), 22.4 (C-11), 21.4 (C-21), 20.1 (C-26 or C-27), 19.8 (C-27 or C-26), 18.8 (C-19), 17.8 (C-28), 12.5 (C-18). 以上数据与文献[15]基本一致,故鉴定化合物6为(20S, 22E, 24R)-ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol.

(7)化合物7 白色粉末(甲醇),mp:237~239℃, $[\alpha]_D^{20} = -98.8$ ($\rho = 0.1$ mg/mL, C₅H₅N). ESI-MS m/z : 482 [M + K]⁺, 912 [2M + Na]⁺, 1355 [3M + Na]⁺. 故确定相对分子质量为444. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.39 (1H, brs, H-7), 5.19 (2H, brs, H-22, 23), 4.05 (1H, m, H-3), 3.39 (3H, s, CH₃O-), 3.16 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-6), 1.02 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 1.00 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.83 (6H, m, H-26, 27), 0.59 (3H, s, H-18). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 32.8 (C-1), 30.9 (C-2), 67.8 (C-3), 39.6 (C-4), 76.4 (C-5), 82.4 (C-6), 115.0 (C-7), 143.6 (C-8), 42.8 (C-9), 37.3 (C-10), 22.9 (C-11), 39.4 (C-12), 43.8 (C-13), 55.0 (C-14), 22.1 (C-15), 27.9 (C-16), 56.0 (C-17), 12.3 (C-18), 18.3 (C-19), 40.4 (C-20), 21.1 (C-21), 135.4 (C-22), 132.1 (C-23), 58.2 (-OCH₃), 43.9 (C-24), 33.1 (C-25), 20.0 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28). 以上数据与文献[16]基本一致,故鉴定化合物7为6-methoxy-cerevissterol.

(8)化合物8 白色粉末(氯仿-甲醇),体积分数为10%硫酸-乙醇显紫红色.与胡萝卜苷多系统共薄层展开 R_f 值及显色情况均相同.故鉴定化合物8为胡萝卜苷(daucosterol).

4 讨论

(1)本论文研究分离得到的化合物与文献[17-18]报道的从青天葵该部位分离得到的化合物完全不同,经比较,文献报道的化合物以脂肪酸和弱极性的化合物为主,而本研究得到的化合物的极性相对较大.

(2)对所得8个化合物进行进一步的体外抑制肿瘤细胞生长活性研究,结果显示均不具有明显的抑制活性.因此,有必要对该部位的化学成分进行更深入研究.

致谢:所有核磁、质谱数据均在暨南大学中药及天然药物研究所测定,质谱由李晨阳博士生代测,

核磁由于洋和焦伟华博士生代测.

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1985: 1231.
- [2] 广西壮族自治区卫生局编. 广西本草选编(下册)[M]. 南宁:广西人民出版社, 1974: 1993.
- [3] 邱志楠, 潘俊辉, 喻清和. 天龙喘咳灵胶囊治疗喘息型慢性支气管炎 368 例[J]. 天津中医, 2000, 17(1): 16.
- [4] 缴稳苓. 中药对幽门螺杆菌抑制作用的研究[J]. 天津医药, 1997, 25(12): 740-741.
- [5] 甄汉深, 周燕园, 袁叶飞, 等. 青天葵活性部位的体内抗肿瘤作用研究[J]. 中药材, 2007, 30(9): 1095-1098.
- [6] 刘心纯. 两种青天葵的鉴定研究[J]. 中药材, 1996, 12: 612.
- [7] 胡廷松. 青天葵中氨基酸成分分析[J]. 广西植物, 1993, 13(1): 87.
- [8] 黄红兵, 朱品业, 何丽青. 青天葵的薄层色谱鉴别与总氨基酸含量测定[J]. 中国野生植物资源, 2000, 18(4): 40.
- [9] 杜 琴, 徐鸿华, 王振东. 青天葵挥发油化学成分分析[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(3): 225.
- [10] 甄汉深, 莫援恒, 周燕园, 等. 青天葵化学成分定性鉴别的试验研究[J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(1): 53-55.
- [11] 甄汉深, 周燕园, 袁叶飞, 等. 青天葵乙酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中药材, 2007, 30(8): 942-945.
- [12] 王玉波, 李颖玉, 王红兵, 等. 苕遂的化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 182-185.
- [13] 梁侨丽, 龚祝南, 闵知大. 地胆草三萜成分的研究. 中国药理学杂志, 2007, 42(7): 494-496.
- [14] 刘玉明, 梁光义, 徐必学. 苗族药马蹄金化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(1): 15-17.
- [15] 李国友, 李伯刚, 刘光晔, 等. 赭曲霉43的甾体成分研究[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(1): 67-70.
- [16] 杨小龙, 王 飞, 邵红军, 等. 褐薄小齿菌的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 605-609.
- [17] ZHU Hua, FU Peng, ZUO Deng-feng. Chemical constituents of petroleum ether extract from *Nervilia fordii* [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2006, 9(8): 1556-1558.
- [18] ZHAO Jin-yao. Identification of chemical constituents from *Nervilia fordii* [J]. International Journal of Applied Chemistry, 2006, 2(2-3): 201-208.

[责任编辑:黄建军]