

藏药镰形棘豆的化学成分及其抗肿瘤活性研究

顾青¹, 蔡银娜², 杨光明^{1, 2*}, 蔡宝昌^{1, 2*}, 潘扬²

(1. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210023;
2. 国家中医药管理局中药炮制标准重点实验室, 南京 210023)

[摘要] **目的:**研究藏药镰形棘豆 *Oxytropis falcata* 的化学组成及其抗肿瘤活性。**方法:**通过硅胶柱色谱、制备 TLC 分离纯化镰形棘豆的化学成分,通过 NMR 等波谱技术解析鉴定化合物结构,通过 MTT 法研究化合物 **1, 3, 5** 抑制人肝癌细胞 HepG2、小鼠黑色素瘤细胞 B16F10、人肝癌细胞 SMMC-7721、人肝癌细胞 HuH7 以及人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖影响。**结果:**从镰形棘豆乙醇提取物中分离得到了 5 个化合物,分别为 7-甲氧基二氢黄酮(7-methoxy flavanone, **1**), 7-羟基二氢黄酮(7-hydroxy flavanone, **2**), 2', 4'-二羟基查耳酮(2', 4'-dihydroxy chalcone, **3**), 2', 4'-二羟基-4'-甲氧基查耳酮(2', 4'-dihydroxy-4'-methoxy chalcone, **4**), *N*-(2-苯乙基)肉桂酰胺(*N*-2-phenylethyl cinnamamide, **5**)。四甲基偶氮唑盐比色(MTT)结果表明化合物 **3** 具有较好的抗肿瘤活性,其 IC₅₀ 分别为 68.60, 169.67, 105.88, 175.18, 172.37 μmol·L⁻¹。**结论:**其中化合物 **5** 为首次从该种属中分离得到,化合物 **3** 对 5 种肿瘤细胞的增殖具有明显的抑制作用。

[关键词] 镰形棘豆; 化学成分; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0072-04

[doi] 10.11653/syjf2013110072

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1410.011.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:10

Study on Chemical Constituents and Antitumor Activity of *Oxytropis falcata*

GU Qing¹, CAI Yin-na², YANG Guang-ming^{1, 2*}, CAI Bao-chang^{1, 2*}, PAN Yang²

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China;
2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the constituents from *Oxytropis falcata* and their antitumor activity.

Method: Constituent isolation and purification was carried by column chromatography and their structures were elucidated on the basis of spectral data analysis. Cytotoxicity of compounds **1, 3, 5** was assessed using MTT colorimetric method against HepG2, B16F10, SMMC-7721, HuH7 and MDA-MB-231 tumor cell lines. **Result:** Five compounds (**1-5**) were elucidated as 7-methoxy flavanone (**1**), 7-hydroxy flavanone (**2**), 2', 4'-dihydroxy chalcone (**3**), 2', 4'-dihydroxy-4'-methoxy chalcone (**4**) and *N*-2-phenylethylcinnamamide (**5**). The compounds **3** showed the strongest cytotoxic effect on these five cell lines with IC₅₀ values of 68.60, 169.67, 105.88, 175.18, 172.37 μmol·L⁻¹ respectively. **Conclusion:** Compound **5** was isolated from this genus for the first time. Compound **3** showed significant antitumor activity.

[Key words] *Oxytropis falcata*; chemical constituents; antitumor activity

[收稿日期] 20121213(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30902012);江苏省中医药局项目(LB09026)

[第一作者] 顾青, 硕士, 从事中药炮制研究, Tel: 025-86798281, E-mail: guqing0720@126.com

[通讯作者] * 杨光明, 博士, 副教授, 从事中药炮制与质量控制研究, E-mail: ygmm0901@hotmail.com

* 蔡宝昌, 博士, 教授, Tel: 025-86798281, E-mail: bccai@126.com

镰形棘豆系豆科棘豆属植物,在藏药中又称“菝达夏”,据《晶珠本草》等藏药药典记载其以全草入药,主产于西藏、青海、甘肃南部、四川西部等地^[1-2],具有清热解毒、涩脉止血、生肌愈疮、通利大便的功能,常用于治疗炭疽、麻风、流感及扁桃体炎等,是藏药奇正贴、二十五味菝达夏丸、藏红花油、消痛贴膏等多种藏药复方或藏成药的主要药味^[3-6]。药理研究表明,镰形棘豆具有抗炎镇痛、止血、退热、抗肿瘤等作用^[7-11]。

目前国内外对棘豆属植物的研究尚处于起步阶段,对其药理作用及其物质基础等方面还有待深入研究。本实验对镰形棘豆乙醇提取物进行了分离纯化,得到了5个化合物,其中4个为黄酮类化合物,1个为生物碱类化合物,并采用MTT法研究了化合物1,3,5对5种肿瘤细胞增殖的抑制作用;其中化合物5为首次从棘豆属中分离得到,化合物3对5种肿瘤细胞的增殖均有明显的抑制作用。

1 仪器与试剂

1.1 药物 镰形棘豆原植物来源于青海省共和县,2009年7月采收,经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为豆科蝶形花亚科棘豆属植物镰形棘豆 *Oxytropis falcata* Herb 的干燥全草。

1.2 仪器 X-4型数字显微熔点仪,Bruker-500型核磁共振波谱仪,Büchi公司Rotavapor R-205型旋转蒸发器,柱色谱用硅胶(100~200,200~300目,青岛海洋化工厂),薄层色谱硅胶G预制薄层板(德国Merck公司)。

2 方法和结果

2.1 提取与分离 取自然阴干的镰形棘豆9.5 kg,粉碎,用75%乙醇冷浸3次,每次1周,将提取液合并,减压浓缩得浸膏350 g。将浸膏依次用2 000 mL石油醚、氯仿反复萃取,至萃取液接近无色,分别得到石油醚部位、氯仿部位。减压干燥,得氯仿部位浸膏。

取氯仿部位浸膏30 g进行硅胶柱色谱,以环己烷-乙酸乙酯(16:1~1:1)梯度洗脱,按色带或每500 mL等体积收集,同时以薄层层析监测,合并相同成分,得4个组分I~IV。组分I通过硅胶柱色谱分离,以环己烷-乙酸乙酯(7:1)洗脱得到化合物1(15 mg),以环己烷-乙酸乙酯(6:1)洗脱得到化合物2(6 mg)。组分II以石油醚-丙酮进行重结晶,得到化合物3(33 mg)。组分III通过反复硅胶柱色谱分离,最终以环己烷-乙酸乙酯(6:1)洗脱,得到化合物4(6 mg)。组分IV通过反复硅胶柱色谱,最终通

过制备薄层色谱分离,以环己烷-乙酸乙酯(1:1)为展开剂得到化合物5(8 mg)。

2.2 结构鉴定

化合物1 无色晶体(MeOH), mp 106~108 °C。¹H-NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.87(1H, d, J=9.0 Hz, H-5), 7.48(2H, m, H-3', 5'), 7.43(2H, m, H-2', 6'), 7.39(1H, m, H-4'), 6.62(1H, dd, J=2.5, 9.0 Hz, H-6), 6.50(1H, d, J=2.5 Hz, H-8), 5.47(1H, dd, J=3.0, 13.0 Hz, H-2), 3.84(3H, s, OCH₃), 3.04(1H, dd, J=13.0, 16.5 Hz, H-3α), 2.84(1H, dd, J=3.0, 17.0 Hz, H-3β)。¹³C-NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ: 190.5(C-4), 166.2(C-7), 163.5(C-9), 138.8(C-1'), 128.8(C-3', 5'), 128.8(C-4'), 128.7(C-5), 126.2(C-2', 6'), 114.9(C-10), 110.3(C-6), 101.0(C-8), 80.0(C-2), 55.6(OCH₃), 44.3(C-3)。以上数据与文献[12]报道的7-甲氧基二氢黄酮(7-methoxy flavanone)一致。

化合物2 无色针晶(MeOH), mp 188~190 °C。¹H-NMR(DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 10.56(1H, s, OH), 7.64(1H, d, J=8.5 Hz, H-5), 7.52~7.40(5H, m, H-2'~6'), 6.53(1H, dd, J=2.5, 8.5 Hz, H-6), 6.38(1H, d, J=2.5 Hz, H-8), 5.58(1H, dd, J=3.0, 13.0 Hz, H-2), 3.12(1H, dd, J=12.8, 16.8 Hz, H-3α), 2.70(1H, dd, J=3.0, 16.8 Hz, H-3β)。¹³C-NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ: 78.8(C-2), 43.2(C-3), 189.9(C-4), 128.3(C-5, 4, 5'), 110.5(C-6), 164.6(C-7), 102.4(C-8), 162.9(C-9), 113.5(C-10), 138.9(C-1'), 126.5(C-2', 6'), 128.4(C-3')。以上数据与文献[13]报道的7-羟基二氢黄酮(7-hydroxy flavonone)的数据基本一致。

化合物3 黄色晶体(MeOH), mp 142~143 °C。¹H-NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.89(1H, d, J=9.0 Hz, H-6'), 7.84(1H, d, J=15.5 Hz, H-β), 7.65(2H, m, H-3, 5), 7.57(1H, d, J=15.5 Hz, H-α), 7.43(3H, m, H-2, 4, 6), 6.45(2H, m, H-5', 3'), 13.34(1H, s, OH)。¹³C-NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ: 192.02(C=O), 166.48(C-2'), 162.64(C-4'), 144.67(C-β), 134.78(C-1), 132.03(C-6'), 130.72(C-4), 129.01(C-2, 6), 128.55(C-3, 5), 120.31(C-α), 114.51(C-1'), 107.74(C-5'), 103.81(C-3')。以上数据与文献[14]报道的2', 4'-二羟基查耳酮(2', 4'-dihydroxy chalcone)一致。

化合物4 黄色晶体(MeOH), mp 168~169 °C。¹H-NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.84(1H, d,

$J = 15.0 \text{ Hz, H-}\beta$), 7.80 (1H, d, $J = 9.0 \text{ Hz, H-6}'$), 7.55 (2H, d, $J = 8.5 \text{ Hz, H-3, 5}$), 7.46 (1H, d, $J = 15.5 \text{ Hz, H-}\alpha$), 6.87 (2H, d, $J = 8.5 \text{ Hz, H-2, 6}$), 6.48 (1H, br s, H-3'), 6.40 (1H, dd, $J = 2.5, 9.0 \text{ Hz, H-5}'$), 3.86 (s, OCH₃)。 ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 192.13 (C = O), 125.51 (C-1), 131.24 (C-2, 6), 115.79 (C-3, 5), 160.32 (C-4), 117.91 (C-1'), 165.63 (C-2'), 100.88 (C-3'), 165.39 (C-4'), 107.13 (C-5'), 132.32 (C-6'), 117.34 (C- α), 144.61 (C- β), 55.62 (OCH₃)。以上数据与文献 [15] 报道 2', 4'-二羟基-4'-甲氧基查尔酮 (2', 4'-dihydroxy-4'-methoxy chalcone) 的数据基本一致。

化合物 5 白色晶体 (MeOH), mp 125-126 °C。 ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 7.62 (1H, d, $J = 15.6 \text{ Hz, H-7}'$), 7.48 (2H, dd, $J = 2.0, 6.5 \text{ Hz, H-2', 6}'$), 7.35 (3H, m, H-3', 4', 5'), 7.25 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 6.32 (1H, d, $J = 15.6 \text{ Hz, H-8}'$), 3.66 (2H, m, H-8), 2.90 (2H, m, H-7), 5.60 (1H, br s, NH)。 ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 165.72 (C = O), 140.99 (C-7'), 138.78 (C-1'), 134.74 (C-1), 129.55 (C-4'), 128.71 (C-2, 6, 3', 5'), 128.61 (C-2', 6'), 127.68 (C-3, 5), 126.48 (C-4), 120.50 (C-8'), 40.69 (C-8), 35.58 (C-7)。以上数据与文献 [16] 报道的 *N*-(2-苯乙基)肉桂酰胺 (*N*-2-phenylethyl cinnamamide) 一致。

2.3 化合物对 HepG2, B16F10, SMMC-7721, HuH7, MDA-MB-231 的抑制作用 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT 法) [17] 分别观察 3 个化合物对 HepG2, B16F10, SMMC-7721, HuH7, MDA-MB-231 5 种肿瘤细胞增殖的影响。取对数生长期的细胞, 将细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种在 96 孔板中, 每孔 100 μL 。培养 24 h 后, 加药组每孔加入 90 μL 培养液、10 μL 不同质量浓度的供试药, 每个质量浓度设 5 个复孔, 对照组加入培养液, 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。再加入质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 20 μL 后, 孵育 4 h。弃上清, 每孔加 100 μL DMSO 平面振荡混匀 10 min, 待其各孔中的紫色结晶完全溶解后, 置于 490 nm 波长下测定各孔中的吸光度 (A), 并计算抑制率, 细胞抑制率 = $(1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{阴性对照组}}) \times 100\%$ 。各化合物 IC₅₀ 见表 1。结果显示, 化合物 1, 5 对 HepG2, B16F10, SMMC-7721, HuH7, MDA-MB-231 的抑制作用很弱; 化合物 3 对 5 种细胞的增殖具有明显的抑制作用, 并在测定浓度内呈现明显的剂量依赖关系。其 IC₅₀ 分别为 68.60,

169.67, 105.88, 175.18, 172.37 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 各化合物对肿瘤细胞的体外抑制作用及 IC₅₀ ($n = 5$)

细胞	化合物 1	化合物 3	化合物 5
HepG2	> 10 ³	68.60	> 10 ³
B16F10	373.63	169.67	> 10 ³
SMMC-7721	> 10 ³	105.88	> 10 ³
HuH7	> 10 ³	175.18	> 10 ³
MDA-MB-231	> 10 ³	172.37	> 10 ³

3 讨论

本实验分离得到的化合物对肿瘤细胞具有一定的抑制作用, 特别是 2', 4'-二羟基查耳酮对实验的 5 种细胞株均有较强的抑制作用。本研究为开发藏药资源、寻找抗癌活性物质的研究提供了新的思路。

[参考文献]

[1] Chen W H, Wang R, Shi Y P. Flavonoids in the poisonous plant *Oxytropis falcata* [J]. J Nat Prod, 2010, 73 (8): 1398.

[2] 姜华, 郭敏, 沈敏娟. 藏药镰形棘豆中鼠李柠檬素对照品的制备 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (17): 124.

[3] Chen W H, Wu Q X, Wang R, et al. Oxytrofalcatins A-F, *N*-benzoylindole analogues from the roots of *Oxytropis falcata* (Leguminosae) [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 1002.

[4] Demeuov N B, Akhmedzhanova V I, Moldagulov M A, et al. Muricatisine-a new alkaloid from two species of *Oxytropis* [J]. Chem Nat Compd, 1998, 34 (4): 484.

[5] Akhmedzhanova V I, Moldagulov M A, Shakirov R, et al. Alkaloids of *Oxytropis puberula* [J]. Chem Nat Compd, 1993, 29 (1): 76.

[6] Akhmedzhanova V I, Batsuren D. *Oxytropis alkaloids* II. Structure of *Oxytriphine falcata* [J]. Chem Nat Compd, 1994, 29 (6): 778.

[7] 姚淑英, 马云保, 唐亚, 等. 镰形棘豆的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (12): 1418.

[8] Jiang H, Hu J R, Zhan W Q, et al. Screening for fractions of *Oxytropis falcata* Bunge with antibacterial activity [J]. Nat Prod Res, 2009, 23 (10): 954.

[9] Yang H, Wang D, Tong L, et al. Flavonoid aglycones of *Oxytropis falcata* Herb [J]. Chem Nat Compd, 2009, 45 (2): 239.

[10] Batsuren D, Tsetsegmaa S, Batbayar N, et al. Alkaloids of *Oxytropis falcata* I [J]. Chem Nat Compd, 1992, 28 (3): 340.

HPLC 测定糙枝金丝桃中绿原酸、芦丁、 金丝桃苷、槲皮素和山奈酚

郭炬亮*, 李新霞, 支玲

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱法同时测定糙枝金丝桃药材中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的分析方法。方法:用 Sunfire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱分离;乙腈-0.1% 磷酸进行梯度洗脱;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 360 nm。结果:绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚分别在 0.01 ~ 0.61 μg ($r = 0.9996$), 0.10 ~ 2.02 μg ($r = 0.9997$), 0.10 ~ 1.01 μg ($r = 0.9999$), 0.10 ~ 1.24 μg ($r = 0.9997$), 0.0057 ~ 0.17 μg ($r = 0.9997$) 线性关系良好;平均加样回收率分别为 98.87% (RSD 1.43%), 99.81% (RSD 0.86%), 99.98% (RSD 0.82%), 98.8% (RSD 1.73%), 99.85% (1.79%)。结论:该方法简便、准确,重复性好,可用于糙枝金丝桃药材的质量控制。

[关键词] 糙枝金丝桃; 绿原酸; 芦丁; 金丝桃苷; 槲皮素; 山奈酚; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0075-04

[doi] 10.11653/syfyj2013110075

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Rutin, Hyperoside, Quercetin and Kaempferol in *Hypericum scabrum* by HPLC

GUO Ju-liang*, LI Xin-xia, ZHI Ling

(Pharmacy College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin, hyperoside, quercetin and kaempferol in *Hypericum scabrum*. **Method:** A high-performance liquid chromatography equipped a Sunfire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with UV detector used. The mobile

[收稿日期] 20120920(019)

[基金项目] 新疆医科大学科研创新基金项目(XJC201114)

[通讯作者] * 郭炬亮, 硕士, 副教授, 从事新疆地产资源的开发应用研究, Tel:0991-4362470, 13709916797, E-mail: gjl7145@163.com

- [11] Akhmedzhanova V I, Batsurén D, Shakirov R S. *Oxytropis alkaloids* II. Structure of oxytriphine [J]. Khim Prir Soedin, 1993, 6 (4): 873.
- [12] Pelter A, Ward R, Gray T L. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds [J]. J S Perk I, 1976, 12: 2475.
- [13] Hsin K H, Tai H L, Jih P W, et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds [J]. Pharm Res, 1998, 15 (1): 39.
- [14] Wollenweber E, Seigler D S. Flavonoids from the exudate of *Acacia neovernicosa* [J]. Phytochemistry, 1982, 21 (5): 1063.
- [15] Achenbach H, Stoecher M, Constenla M A. Constituents of tropical medicinal plants. Part 31. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca* [J]. Phytochemistry, 1988, 27 (6): 1835.
- [16] Borges D, Vazquez P, Secundino M, et al. The *N*-2-phenylethylcinnamamide from *Spilanthes ocymifolia* [J]. Phytochemistry, 1984, 23 (11): 2672.
- [17] Vistica D T, Skehan P, Scudiero D, et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production [J]. Cancer Res, 1991, 51 (16): 2515.

[责任编辑 邹晓翠]