

红算盘子中三萜类化学成分及其细胞毒活性研究

肖海涛¹, 王跃虎², 郝小燕^{1*}, 杨小生³, 郝小江²

(1. 贵阳医学院药学院, 贵州 贵阳 550004;

2 中国科学院昆明植物研究所·植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204;

3. 贵州省中科院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 目的 研究红算盘子的化学成分及其细胞毒活性。方法 采用多种色谱方法分离纯化, 根据理化性质和各种波谱技术进行结构鉴定; 用 MTT法评价其细胞毒活性。结果 从醋酸乙酯部位分离得到6个三萜类化合物, 鉴定为算盘子二醇, 羽扇豆-20(29)-烯-3, 23-二醇, 算盘子酮, 表-羽扇豆醇, 3, 19, 23-三羟基-12-烯-28-齐墩果酸, 2, 3, 23-三羟基-12-烯-28-齐墩果酸。结论 以上化合物均为首次从红算盘子中分离得到; 其中化合物1~4对人肝癌 BEL-7402细胞, 化合物5, 6对非小细胞肺癌 A-549细胞具有一定程度的细胞毒作用。

关键词: 红算盘子; 三萜; 细胞毒

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2008)08-1931-02

Terpenes from *Glochidion coccineum* and their Cytotoxicity in Vitro

XIAO Hai-tao¹, WANG Yue-hu², HAO Xiao-yan^{1*}, YANG Xiao-sheng³, HAO Xiao-jiang²

(1. School of Pharmacology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China; 2 State Key Laboratory Phytochemistry and Plant Resource in West China, Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 3. Key Lab of Chemistry for Natural Products and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract Objective To study the chemical constituents of *Glochidion coccineum* and their cytotoxicity *in vitro*. **Methods** Various column chromatographic technologies were applied for isolation and purification and the structures were elucidated by spectral evidence. MTT method was applied to investigate their cytotoxic activities. **Results** Six compounds were isolated from the part of ethyl acetate and identified as Glochidiol, Lup-20(29)-ene-1, 23-diol, Glochidone, Epi-lupeol, 3, 19, 23-trihydroxy-12-oleanen-28-oic acid, 2, 3, 23-trihydroxy-12-oleanen-28-oic acid. **Conclusion** The above compounds were obtained from this plant for the first time; compounds 1~4 showed cytotoxic activities to human hepatoma (BEL-7402), as well as compounds 5 and 6 to lung adenocarcinoma (A-549) cell lines.

Key words *Glochidion coccineum*; Triterpene; Cytotoxicity

红算盘子 *Glochidion coccineum* (Buch - Ham.) Muell Arg 为大戟科算盘子属植物, 又名算盘珠、野南瓜、馒头果等, 产于广西、贵州和云南等省区, 生于海拔450~1000 m山地疏林或山坡、山谷灌木丛。根、茎、叶和果实均可药用, 有清热利湿、活血散淤、消肿解毒之功效, 民间常用来治疗感冒发热、痢疾、疟疾、急性胃肠炎、消化不良、风湿性关节炎、跌打损伤等症^[1], 其化学成分和生物活性研究尚未见报道, 而现代药理研究表明算盘子属植物中的羽扇豆烷型三萜具有潜在的抗肿瘤、抗病毒作用, 引起人们极大的关注^[2,3]。为了充分开发和利用算盘子属植物资源, 我们对该属植物中的红算盘子进行了化学成分分析和研究, 共分离得到二十多种化学成分, 其结构类型涉及三萜、倍半萜、木脂素、黄酮等。进一步的药理实验表明, 这些化学成分具有不同程度的抗肿瘤和抗氧化活性。本论文报道其中的三萜类化学成分。

1 材料与仪器

红算盘子 (采自贵州贵阳, 经贵阳中医院陈德媛研究员鉴定, 为大戟科算盘子属植物红算盘子)。实验所用硅胶 (200~300目) 和高效薄层层析板 (GF254) 为青岛海洋化工厂生产; Sephadex LH-20 为 Amersham Pharmacia Biotech公司生产; 核磁共振谱由 Bruker AM-400、DRX-500型核磁共振仪测定, TMS

收稿日期: 2007-08-28; 修订日期: 2007-12-28

基金项目: 贵州省中药现代化专项项目 (黔科合农字 20065041)

作者简介: 肖海涛 (1981-), 男 (汉族), 湖北广水人, 现任贵阳医学院讲师, 硕士学位, 主要从事天然产物活性成分研究工作。

*通讯作者简介: 郝小燕 (1955-), 女 (满族), 山西沁源人, 现任贵阳医学院教授, 学士学位, 主要从事天然产物活性成分研究工作。

为内标; 质谱由 VG Auto-Spec3000或 HP 5973质谱仪测定, 电离条件为 70eV。

2 方法与结果

2.1 提取和分离 红算盘子干燥根茎 12.0 kg, 经粉碎成粗品后, 用 90% 的乙醇回流提取 3次 (3 h/次), 合并提取液, 回收乙醇得浓稠浸膏。用适量水分散, 用醋酸乙酯反复萃取得醋酸乙酯萃取物。醋酸乙酯萃取物 (201 g) 以粗硅胶 (80~100目) 拼样 (比例为 1:1), 上硅胶柱 (200目), 用石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱, 分为 7段。其中第 2段经反复硅胶柱层析 (石油醚-氯仿梯度洗脱) 和制备薄层纯化, 共分离鉴定得到化合物 1 (6 mg)、2 (221 mg)、3 (232 mg)、4 (26 mg)。第 3段经反复硅胶柱层析 (石油醚-氯仿, 石油醚-丙酮洗脱)、Sephadex LH-20 [CHCl₃-MeOH (1:1)] 层析、制备薄层纯化共分离鉴定得到化合物 5 (29 mg) 和 6 (17 mg)。

2.2 结构鉴定

2.2.1 化合物 1 白色粉末; Liebermann-burchard反应呈阳性。ESMS m/z (%) 907 [2M + Na]⁺ (8), 425 (17), 408 (13), 400 (24), 378 (42), 348 (43), 318 (28), 302 (45), 285 (100); ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) : δ 0.65, 0.67, 0.75, 0.76, 0.83, 0.91 (3H, s, 6 × CH₃), 1.52 (3H, s, 30 - CH₃), 3.31 (1H, s, H-1), 3.56 (1H, dd, J=10.7, 4.6 Hz, H-3), 3.95 (2H, s, OH), 4.40, 4.53 (2H, brs, H-29); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 数据 (见表 1)。波谱数据与文献报道^[4]的一致, 故鉴定为算盘子二醇。

2.2.2 化合物 2 白色粉末; Liebermann-burchard反应呈阳性。ESMS m/z (%) 443 [M + H]⁺ (36), 441 (46), 439 (88), 425 (100), 408 (28), 407 (73), 395 (17), 347 (83); ¹H-NMR (500

MHz, CDCl_3) : 0.77, 0.81, 0.89, 0.96, 1.03 (3H, s, $\delta \times \text{CH}_3$), 1.66 (3H, s, 30 - CH_3), 3.48 (1H, brs, H - 3), 4.54, 4.66 (2H, brs, H - 29); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。波谱数据与文献报道^[4]的一致。故鉴定为羽扇豆 - 20(29) - 烯 - 3, 23 - 二醇。

2.2.3 化合物 3 白色粉末; Liebermann - burchard 反应呈阳性。EMS m/z (%) 845 [2M + H]⁺ (100), 423 [M + H]⁺ (34), 391 (4), 363 (3), 285 (14); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) : 0.89, 1.04, 1.15, 1.17, 1.20, 1.22, 1.24 (3H, s, $\delta \times \text{CH}_3$), 1.77 (3H, s, 30 - CH_3), 4.67, 4.78 (2H, s, H - 29), 5.87 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H - 3), 7.20 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H - 2), 7.36 (1H, s, H - 1); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。波谱数据与文献报道^[4]的一致。故鉴定为算盘子酮。

2.2.4 化合物 4 白色粉末; Liebermann - burchard 反应呈阳性。EMS m/z (%) 875 [2M + H]⁺ (3), 409 (26), 379 (2), 373 (4), 313 (5), 285 (100), 203 (2); ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : 0.74, 0.77, 0.81, 0.82, 0.84, 0.87 (3H, s, $\delta \times \text{CH}_3$), 1.66 (3H, s, 30 - CH_3), 2.35 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H - 2), 3.45 (1H, brs, H - 3), 4.55, 4.67 (2H, brs, H - 29); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。波谱数据与文献报道^[5]的一致, 故鉴定为表 - 羽扇豆醇。

2.2.5 化合物 5 白色粉末; Liebermann - burchard 反应呈阳性。EMS m/z (%) 488 [M]⁺ (9), 484 (29), 414 (36), 396 (92), 285 (100), 254 (2), 173 (2); ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : 0.68, 0.69, 0.80, 0.81, 0.82, 0.83 (3H, s, $\delta \times \text{CH}_3$), 3.53 (1H, d, $J = 14.6$ Hz, H - 3), 4.14 (1H, m, H - 2), 5.39 (1H, brs, H - 12); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。波谱数据与文献报道^[6,7]的一致, 故鉴定为 3, 19, 23 - 三羟基 - 12 - 烯 - 28 - 齐墩果酸。

2.2.6 化合物 6 白色粉末; Liebermann - burchard 反应呈阳性。EMS m/z (%) 488 [M]⁺ (9), 487 (29), 480 (3), 415 (36), 413 (35), 396 (92), 286 (19), 285 (100), 254 (3), 173 (3), 159 (4); ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : 0.69, 0.81, 0.82, 0.84, 0.87, 0.89 (3H, s, $\delta \times \text{CH}_3$), 3.83 (1H, m, H - 3), 4.16 (1H, m, H - 2), 5.58 (1H, m, H - 12); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。波谱数据与文献报道^[6,7]的一致, 故鉴定为 2, 3, 23 - 三羟基 - 12 - 烯 - 28 - 齐墩果酸。

2.3 活性筛选 采用 MTT 法, 以羟基喜树碱为阳性对照, 对化合物 1~6 进行了人肝癌 BEL - 7402 细胞株和非小细胞肺癌 A - 549 细胞株细胞毒活性筛选, 结果发现羽扇豆烷型三萜对人肝癌 BEL - 7402 细胞株具有不同程度的抑制作用, 其作用顺序为表 - 羽扇豆醇 > 算盘子二醇 > 羽扇豆 - 20(29) - 烯 - 3, 23 - 二醇 > 算盘子酮, 其中以表 - 羽扇豆醇的毒性最强, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $34.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而齐墩果烷型三萜 3, 19, 23 - 三羟基 - 12 - 烯 - 28 - 齐墩果酸和 2, 3, 23 - 三羟基 - 12 - 烯 - 28 - 齐墩果酸对非小细胞肺癌 A - 549 均表现出一定的细胞毒活性, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 $35.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $38.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

算盘子属植物在我国资源丰富, 作为药用植物在世界许多地区长期应用, 其化学及生理活性成分的研究也历时悠久, 但主要是集中在国外, 国内研究则相对较少, 且不够深入, 这或许与该属植物前期研究工作所获知的化学成分有一定的关联。目前从该属植物中发现的化合物类型包括萜类、甾体、生物碱、黄酮、酚酸、木脂素、环丁烯内酯、有机酸、糖类等。我们选取贵州产红算盘子作为研究对象, 对其化学成分及其生物活性进行研究, 从中首次分离了一系列新奇的没药烷型降倍半萜类化合物^[8,9]。通过活性筛选发现从该植物中分离得到的倍半萜类、三萜、木脂素、黄酮等化学单体具有不同程度的抗肿瘤和抗氧化活性, 其中三萜是红

算盘子抗肿瘤的主要活性成分。该工作为红算盘子植物的开发与应用奠定了较好的物质基础。

表 1 化合物 1~6 的 ^{13}C -NMR 数据

序号	1	2	3	4	5	6
1	77.6	33.0	159.6	33.1	40.3	42.8
2	37.2	27.4	125.1	25.3	28.9	70.6
3	77.0	76.7	205.3	76.1	74.5	73.8
4	38.9	41.0	44.5	37.4	40.2	40.6
5	52.6	43.0	53.5	48.9	57.5	56.9
6	19.8	18.0	19.0	18.2	19.6	20.0
7	35.8	33.8	33.8	34.0	33.7	32.8
8	43.4	40.4	39.5	40.9	40.6	40.2
9	51.4	50.3	44.5	50.1	46.7	45.9
10	45.5	37.0	41.7	37.2	39.2	39.4
11	25.3	20.9	21.4	20.7	23.5	22.7
12	25.4	25.1	25.1	25.0	123.4	123.6
13	38.4	38.0	38.2	37.9	145.6	145.9
14	44.6	42.9	43.1	42.9	43.1	42.8
15	28.5	26.5	27.4	27.3	28.7	27.8
16	36.9	35.6	35.5	35.5	24.9	24.7
17	44.9	42.9	43.1	42.8	49.7	48.1
18	49.0	48.0	48.2	48.1	42.7	42.6
19	49.0	48.3	47.9	47.9	73.4	48.1
20	152.0	151.0	150.6	150.8	31.5	31.4
21	30.8	29.9	29.8	29.7	35.2	35.2
22	41.4	40.0	39.9	39.9	29.1	29.3
23	28.8	71.4	27.8	28.2	63.4	63.9
24	22.6	19.3	21.2	22.1	17.8	17.9
25	12.6	16.2	19.3	15.9	17.1	17.3
26	17.1	16.0	16.4	15.8	18.4	18.5
27	15.4	14.7	14.4	14.6	26.3	26.3
28	19.5	17.8	18.0	17.9	181.2	181.4
29	108.7	109.3	109.5	109.3	33.5	33.6
30	19.2	18.1	19.1	19.2	23.9	23.8

参考文献:

- [1] 《贵州植物志》编辑委员会. 贵州植物志 [M]. 成都: 四川民族出版社, 1989, 6: 68.
- [2] Tanaka R., Kinouchi Y., Wada S., et al. Potential anti-tumor promoting activity of lupine-type triterpenoids from the stem bark of *Glochidion zeylanicum* and *Phyllanthus flexuosus* [J]. *Planta Med*, 2004, 70(12): 1234.
- [3] Puapaijor P., Naengchomnong W., Kijjoa A., et al. Cytotoxic Activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriacarpum* two of which induce apoptosis [J]. *Planta Med*, 2005, 71(3): 208.
- [4] Carpenter R. C., Sotheeswaran S., Sultanbawa M. U. S., Temai B., ^{13}C NMR studies of some lupane and taraxerane triterpenes [J]. *Organic Magnetic Resonance*, 1980, 14(6): 462.
- [5] Carvalho L., Seita J., Triterpene from *Securinega tinctoria* [J]. *Fitoterapia*, 1995, 66(3): 273.
- [6] Fang, S. Y.; He, Z. S.; Gao, J. F., Triterpenoids from *Adina rubella* [J]. *J. Nat. Prod.*, 1996; 59, 304.
- [7] 成丽, 刘燕, 陈凌亚, 等. 枇杷花三萜皂甙成分的研究 [J]. 华西医科大学学报, 2001, 32(2): 283.
- [8] Xiao H. T., Hao X. Y., Yang X. W., Wang Y. H., Lu Y., Zhang Y., Gao S., He H. P., Hao X. J., Bisabolane-type Sesquiterpenoids from the Rhizomes of *Glochidion coccineum* [J]. *Helv. Chim. Acta* 2007, 1, 164.
- [9] Xiao H. T., He H. P., Peng J., Wang Y. H., Yang X. W., Hu X. J., Hao X. Y., Hao X. J., Two New Norbisabolane Sesquiterpenoid Glycosides from *Glochidion coccineum* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2008, 10(1): 1.