

甜草 *Oldenlandia cantonensis* How 的化学成分蓝文健^a 李厚金^{b*}(^a中山大学药学院 广州; ^b中山大学化学与化学工程学院 广州 510275)

摘 要 研究了民间草药甜草 *Oldenlandia cantonensis* How 的化学成分。从乙醇提取物的乙酸乙酯洗脱部分得到新的五环三萜 urs 12-en-29 α -oic acid 3 β -ol。该化合物结构通过 NMR、IR、MS 等波谱数据综合解析确定。研究了 urs 12-en-29 α -oic acid 3 β -ol 对重组人 DNA 拓扑异构酶 I、肝癌细胞 BEL 7402 和胃腺癌细胞 MCG-803 的抑制作用, 效果显著, IC₅₀ 值分别为 12.0×10^{-6} 、 6.5×10^{-6} 、 8.0×10^{-6} g/mL。由 *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=20:1 洗脱得到的低极性成分进行了气相色谱-质谱分析, 共鉴定 60 个化合物, 其中长链脂肪族化合物, 如烷烃、饱和及不饱和羧酸(酯)含量较丰富, 占 36.16%, 萜类和甾体类化合物分别占 6.42% 和 9.28%。

关键词 *Oldenlandia cantonensis* How, 化学成分, urs 12-en-29 α -oic acid 3 β -ol 生理活性

中图分类号: O 629

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2006)08-0871-04

甜草 *Oldenlandia cantonensis* How, 异名野甘草、山甘草、广州耳草, 为双子叶茜草科植物。目前, 尚未见甜草 *Oldenlandia cantonensis* How 化学成分的研究报道。本文从采集于江西的甜草 *Oldenlandia cantonensis* How 的地上全草的乙醇提取物中分离出一种新的五环三萜 urs 12-en-29 α -oic acid 3 β -ol 和 β -谷甾醇及正十六烷酸等系列已知化合物, 研究了 urs 12-en-29 α -oic acid 3 β -ol 对重组人 DNA 拓扑异构酶 I (human DNA topoisomerase I hTopo I)、肝癌细胞 BEL-7402 和胃腺癌细胞 MCG-803 的抑制作用, 抑制效果显著。对其低极性油状成分进行了气相色谱-质谱分析, 从中共鉴定了 60 个化合物。深入研究甜草 *Oldenlandia cantonensis* How 的化学组成, 将有可能进一步明确其药用成分和作用机理。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

甜草 *Oldenlandia cantonensis* How 为 2003 年 7 月采集于江西赣南, 取地上全草, 晒干, 剪碎。硅胶(H), 实验用石油醚、乙酸乙酯、甲醇均为分析纯试剂。95%乙醇为工业级。美国 Varian 公司 NOVA 500NB 型超导核磁共振谱仪; 英国 VG 公司 ZAB-HS 型双聚焦磁质谱仪; 德国 Bruker 公司 EQUINOX 55-A590 BF 型傅立叶变换红外光谱仪; 德国 Elementar 公司 vario EL CHNS-O 型元素分析仪; 德国 SCHMIDT+HAENSCH 公司 HNQW 5 型旋光仪; 美国 Agilent 公司 HP 6890/5973 型 GC-MS 联用仪。

1.2 提取与分离

取 2 kg 晒干甜草, 切碎, 室温下用 6 L 95%乙醇浸泡 12 h 共提取 3 次, 合并浸泡液, 40℃减压旋转蒸发浓缩至干, 得黑色黏稠膏状浓缩物 230 g。浓缩物再用 400 mL *V*(乙酸乙酯):*V*(水)=1:1 萃取 3 次, 乙酸乙酯层浓缩至 160 g 再用甲醇溶解。溶解液拌硅胶 H 上柱层析, 以石油醚-乙酸乙酯-甲醇为梯度洗脱剂。将 *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=20:1 的洗脱液共 1 000 mL 浓缩, 得到具有芳香味的液体油状物约 35 g。将 *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=3:1 洗脱部分进一步纯化得到谷甾醇 3.9 g。将 *V*(乙酸乙酯):*V*(甲醇)=10:1 洗脱部分进一步以 *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=1:3 重结晶纯化得到白色粉末状固体三萜 urs 12-en-29 α -oic acid 3 β -ol (4.8 g)。

1.3 Urs 12-en-29 α -oic acid 3 β -ol 的波谱数据

mp>250℃。[α]_D²⁰=+40°(MeOH, *c*=0.13)。FABMS: *m/z* 457[M+1]⁺, 439[M-H₂O+1]⁺, 411[M-COOH]⁺, 393 355 341, 327 289 279 248 203 189 133 119 69 55。元素分析结果: C 78.83

2005-09-14 收稿, 2006-02-14 修回

国家自然科学基金(20502036)、广东省自然科学基金(05300667)和中山大学青年教师科研启动基金(2004-36000-1131072)资助项目

通讯联系人: 李厚金, 男, 1974 年生, 博士, 副教授; E-mail: ces_hj@mail.sysu.edu.cn 研究方向: 天然产物和药物化学

H 10.90 N 0.000 IR(KBr), $\nu_{\max}$: 3 420 2 970 2 928 2 871 1 693 1 575 1 455 1 407 1 384 1 370 1 313 1 279 1 249 1 142 1 091 1 032 996 758 661 568 cm^{-1} 。NMR数据见表 1。

1.4 低极性油状物的 GC-MS分析

以 $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 20 : 1$ 为洗脱剂所收集的液体油状物用氯仿溶解, 进行 GC-MS分析。色谱条件: HP2MS 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm 弹性石英毛细管柱。程序升温: 初始柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$, 运行时间 50 min 进样口温度 230 $^{\circ}\text{C}$, He气为载气, 流速 0.5 mL/min 分流比 20 : 1 进样量 1 μL 。质谱条件: 离子源为 EI源, 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 质量范围 40 ~500 amu。

1.5 生理活性试验

人 DNA 拓扑异构酶 I 的表达与重组酶储备液的制备及重组人 DNA 拓扑异构酶 I 的抑制试验采用文献[1, 2]方法。抗肝癌细胞 BEL 7402和胃腺癌细胞 MCG-803的细胞毒试验采用 MTT法。

2 结果与讨论

2.1 Urs 12-en-29 α -oic acid-3 β -ol的结构确定

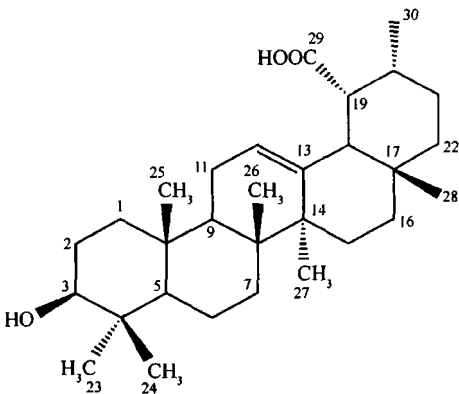
化合物经 Liebermann-Burchard试验呈阳性反应, 说明它可能为萜类化合物。从 ^{13}C NMR知道分子中含有 30个碳, 其中 7个季碳, 7个次甲基碳, 9个亚甲基碳和 7个甲基碳。综合 NMR(表 1)、MS和元素分析实验结果, 确定分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ 。分子中的 6个甲基氢谱为单峰, 另一个甲基 0.82(d 6.5)为双峰, IR(KBr), $\nu_{\max}$ 1 384 1 370 cm^{-1} 也说明分子中含有偕二甲基。FAB MS中失水峰 m/z 438 以及 R(KBr), $\nu_{\max}$ 3 420 cm^{-1} 宽峰, 提示分子中含有羟基。MS中 $411[\text{M}-\text{COOH}]^+$, IR中 1 693 cm^{-1} 以及 δ 178.1 δ 11.8 宽的单峰活泼氢信号进一步说明分子含有 1个羧基。CH(δ 76.8 δ 3.00 dd $J=10$ 5.5 Hz)以及 δ 4.15 的单峰活泼氢信号提示分子中还含有 1个羟基连在次甲基上。IR中 1 575 cm^{-1} 和 CH(δ 124.5 δ 5.13 t $J=3.5$ Hz)和 C(δ 138.1)提示分子中含有 1个三取代双键。由分子式确定化合物不饱和度为 7。由此可推断, 分子中还含有 5个环, HMB C谱也给出了丰富的碳-氢相关关系, 经综合解析确定其为新的五环三萜 urs 12-en-29 α -oic acid-3 β -ol 该化合物具有和乌苏烷(ursane)一致的骨架^[3], 与乌苏烷不同的是 urs 12-en-29 α -oic acid-3 β -ol在 3位连有羟基, 29位甲基变成了羧基。

表 1 Urs 12-en-29 α -oic acid-3 β -ol的 NMR数据 (DM SO- d_6 , TMS 500 MHz)
Table 1 NMR data for urs 12-en-29 α -oic acid-3 β -ol (DM SO- d_6 , TMS 500 MHz)

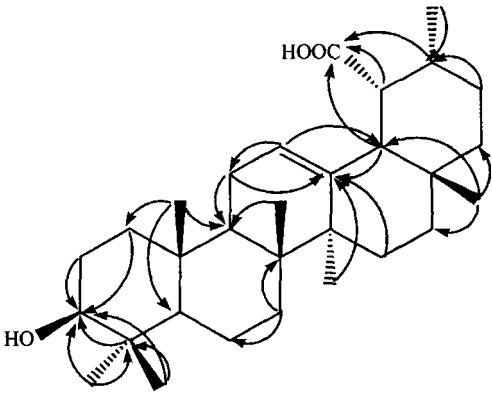
Position number	DEPT	δ_{C}	δ_{H}	Position number	DEPT	δ_{C}	δ_{H}
1	CH ₂	38.2	1.50(d 13.0 3.5), 1.91(d 13.0 4.5)	17	C	34.1	-
2	CH ₂	23.7	1.54(m)	18	CH	52.3	2.11(dd 12.0 1.0)
3	CH	76.8	3.00(dd 10.0 5.5)	19	CH	38.3	1.94(dd 12.0 3.0)
4	C	38.3	-	20	CH	38.4	1.85(m)
5	CH	54.7	0.66(dd 10.0 1.0)	21	CH ₂	36.2	1.51(m)
6	CH ₂	17.9	1.46(m)	22	CH ₂	41.6	1.25(m), 1.43(m)
7	CH ₂	32.6	1.57(m)	23	CH ₃	28.1	0.90(s)
8	C	40.7	-	24	CH ₃	15.9	0.68(s)
9	CH	46.9	1.45(m)	25	CH ₃	15.1	0.87(s)
10	C	36.2	-	26	CH ₃	16.9	0.76(s)
11	CH ₂	22.7	1.86(m)	27	CH ₃	23.2	1.04(s)
12	CH	124.5	5.13(dd 3.5 3.5)	28	CH ₃	20.9	0.92(s)
13	C	138.1	-	29	C	178.1	-
14	C	41.5	-	30	CH ₃	16.8	0.82(d 6.5)
15	CH ₂	27.5	1.80(m)	3-OH	-	-	4.15(brs)
16	CH ₂	26.9	1.46(m), 1.30(m)	29-COOH	-	-	11.8(brs)

Urs 12-en-29 α -oic acid-3 β -ol中 A、B、C 环的立体化学通过 NMR 数据与 α -香树脂(urs 12-en-3 β -ol)比较而确定。18、19 和 20 位的立体化学根据氢偶合常数确定, 18、19 位氢之间的偶合常数为 12.0 Hz 确定二者为反式直立键; 而 19 和 20 位氢之间的偶合常数为 3.0 Hz 比较小, 说明 2 个氢所处的位置 1 个在直立键上, 1 个在平伏键上。由此推断, 18、19 和 20 位氢分别处于 α 、 β 、 β 位^[4-5], 推断 urs 12-en-29 α -oic acid-3 β -ol 的立体结构如 Scheme 1。其主要 ^1H NMR 谱的相关分析示于 Scheme 2。1982 年

Razdan等^[6]曾从植物 *Plectranthus rugosus* 分离得到类似物 plectranthoic acid(urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol), 但有关它的碳、氢 NMR 数据归属及生理活性并未见报道。



Scheme 1 The structure of urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol



Scheme 2 The key HMBC correlations of urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol

2.2 Urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol 的药理活性

在体外以人 DNA 拓扑异构酶 I (hTopo I) 为靶位进行抗肿瘤活性的快速筛选, 使用毕赤酵母表达了 hTopo I。在微量反应体系中, 测定了 urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol 抑制 hTopo I 松弛活性的能力, 并用 MTT 试验进一步验证了 urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol 的抗肿瘤活性。结果表明, urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol 对重组人 DNA 拓扑异构酶 I、肝癌细胞 BEL-7402 和胃腺癌细胞 MCG-803 的 IC₅₀ 值分别为 12.0、6.5 和 8.0 μ g/mL。DNA 拓扑异构酶通过切割 DNA 链、链的转移 (或旋转) 和链的再连接来改变 DNA 的拓扑结构。它们可被分为 type I 和 type II 2 个家族。抗癌药物喜树碱 (camptothecin) 及其衍生物拓扑特肯 (topotecan)、依林诺特肯 (irinotecan) 就可通过 DNA 拓扑异构酶 I 或 II 引起 DNA 双螺旋的 1 条或 2 条链的断裂而导致肿瘤细胞的死亡。真核生物 DNA 拓扑异构酶 I 和 II 已被确定是多种抗肿瘤药物的有效靶位^[7-8]。因 urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol 在体外酶法和细胞试验的抑制效果明显, 有进一步开发为抗肿瘤药物的前景。但是, 甜草民间药用适应症的活性成分仍待深入研究。

2.3 低极性油状物的 GC/MS 分析结果

对低极性油状成分进行了气相色谱-质谱分析, 从中共鉴定了 60 个化合物 (见表 2)。在已鉴定的成分中, 长链烷烃、饱和及不饱和羧酸 (酯) 的含量丰富, 占 36.16%。萜类及萜类的衍生物的含量也比较丰富, 如: 单萜类: 3,3,6-三甲基-2,5-庚二酮, 9,9'-二甲基-2,7-二甲基-2-羟基-壬烷; 二萜类: 3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇, 6,10,14-三甲基-2-十五烷酮, Vitamin E; 三萜类: 28-Nor-17 α -(H)-hopane, 桉叶油醇, 软木三萜酮, 3-酮基香树脂; 它们占总含量的 6.42%。另外, 被鉴定的甾体类化合物有: 3-甲酰氧基-11-羟基-17-酮基-雄甾烷, 1-烯-3-酮-10-二甲氧基甲基-17-乙酰氧基-雄甾烷, 3,5,22-三烯-豆甾烷, 3,5-二烯-3,17-二-(三甲基硅氧基)-雄甾烷, 7-酮基-3-乙酰氧基-胆甾烷, 5,9-(11)-二烯-3 β -乙酰氧基-胆甾烷, 22,23-二氢豆甾醇, 5-雄甾烷烯-3 β , 17 β -二乙酰氧基, 它们共占 9.28%。

表 2 甜草 *Oldenlandia cantonensis* How 的低极性油状物的 GC/MS 分析

Table 2 The analysis of the low polarity fatty oil of *Oldenlandia cantonensis* How by GC/MS

Number	Compound	Area %	Quality	Number	Compound	Area %	Quality
1	3,3,6-trimethyl-2,5-heptanedione	0.10	73	31	9,9-dimethoxy-2,7-dimethyl-nonan-2-ol	0.73	89
2	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone	1.25	99	32	octacosanol	0.92	88
3	9-hexadecenoic acid methyl ester	0.21	99	33	2-heptacosanone	0.90	74
4	8(Z)-hexadecene	0.75	98	34	hexacosanoic acid methyl ester	0.80	86
5	hexadecanoic acid ethyl ester	1.64	81	35	tetradecanoic acid tetradecyl ester	0.99	79
6	1,1-dimethoxy dodecane	0.17	78	36	undecanal dimethyl acetal	0.81	72
7	8,11-octadecadienoic acid methyl ester	1.43	99	37	hexacosane	0.67	67
8	9-(Z)-octadecenoic acid methyl ester	2.14	99	38	2-methylpropanoic acid docosyl ester	0.90	83
9	octadecanoic acid methyl ester	0.78	99	39	28-nor-17 α -(H)-hopane	0.54	66

续表 2

Number	Compound	Area %	Quality	Number	Compound	Area %	Quality
10	1-heptadecene	0.13	65	40	1-en-3-one-10-dimethoxymethyl-17-acetyloxo-androstane	0.48	69
11	9,12-octadecadienoic acid ethylester	0.44	99	41	3,5,22-trien-stigmastane	0.57	85
12	ethyl oleate	0.51	99	42	2-nonacosanone	1.2	66
13	octadecanoic acid ethylester	0.42	99	43	heptacosanoic acid methyl ester	0.72	90
14	5(Z)-nonadecene	0.22	97	44	vitamin E	1.08	95
15	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene-1-ol	0.35	75	45	tetradecanoic acid hexadecyl ester	2.16	99
16	eicosanoic acid methyl ester	0.49	99	46	undecanal dimethyl acetal	0.93	69
17	tricosane	0.77	98	47	11-methylnonacosane	0.79	75
18	2,4-bis(1-methyl-1-phenyl)-ethylphenol	0.74	93	48	eudesmol	0.76	78
19	docosanoic acid methyl ester	1.15	99	49	butanoic acid cyclohexyl ester	1.51	77
20	din-octylphthalate	1.04	93	50	1,1-dimethoxy-9(Z)-octadecene	1.51	81
21	2-dodecyl-tetradecahydro-phenanthrene	0.47	78	51	friedelin	0.66	86
22	tricosanoic acid methyl ester	1.16	99	52	3,5-diene-3,17-bis(triethylsilyloxy)-androstane	1.63	67
23	pentacosane	1.25	97	53	hexadecyl oxirane	0.89	80
24	1-hexacosene	1.32	89	54	7-one-3-acetyloxy-cholestane	1.34	88
25	tetracosanoic acid methyl ester	1.32	96	55	1-amine-4-methylpiperazine	1.21	72
26	3-formoxy-11-ol-17-one-androstane	0.40	90	56	5,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-cholestane	1.39	79
27	11,13-dimethyl-12-tetradecen-1-ol-acetic ester	0.84	87	57	22,23-dihydro-stigmasterol	1.73	93
28	tert-hexadecanethiol	1.13	82	58	3-one-anynin	0.95	94
29	2-dodecen-1-succinic anhydride	0.39	86	59	3 β ,17 β -bis-acetyloxy-5-androsten	1.74	93
30	docosanoic acid methyl ester	0.71	94	60	9-hexadecenoic acid eicosyl ester	2.07	90

参 考 文 献

1 Hsaing Y H, Hertzberg R, Hecht S *et al*. *J Biol Chem* [J], 1985 **260**(27): 14 873

2 Chowdhury A R, Shama S, Mandal S *et al*. *Biochem J* [J], 2002 **366**: 653

3 Connolly J D, Hill R A. *Nat Prod Rep* [J], 2003 **20**(6): 640

4 Mahato S B, Kundu A P. *Phytochemistry* [J], 1994 **37**(6): 1 517

5 Knight S A. *Org Magnetic Resonance* [J], 1974 **6**(11): 603

6 Razdan T K, Kachroo V, Harkar S *et al*. *Phytochemistry* [J], 1982 **21**(2): 409

7 Liu L F. *Annu Rev Biochem* [J], 1989 **58**: 351

8 Wang J C. *Nat Rev Mol Cell Biol* [J], 2002 **3**(6): 430

Chemical Composition of *Olenlandia cantonensis* How

IAN Wen Jian^a, LI Hou Jin^{b*}

(^aSchool of Pharmaceutical Science, ^bSchool of Chemistry and Chemical Engineering,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

Abstract The chemical composition of *Olenlandia cantonensis* How, a herbal medicine is reported. A new pentacyclic triterpenoid urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol was obtained from the EOAc eluted fraction of the ethanol extract of *Olenlandia cantonensis* How. The structure was elucidated by spectroscopy methods including NMR(1D and 2D), IR and MS. Urs-12-en-29 α -oic acid-3 β -ol exhibited potent inhibiting effect against the human DNA topoisomerase I (hTopo I), the cancer cell lines BEL-7402 and MCG-803 with the IC₅₀ values 12.0 $\times$ 10⁻⁶, 6.5 $\times$ 10⁻⁶ and 8.0 $\times$ 10⁻⁶ g/mL, respectively. The low polarity fatty oil, the eluted fraction of V(petroleum ether) : V(EOAc) = 20 : 1 was also quantitatively analyzed by gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS). As a result, 60 compounds were detected. The fatty oil mainly composed of long chain aliphatics, terpene and steroid compounds with percentages of 36.16%, 6.42% and 9.28%, respectively.

Keywords *Olenlandia cantonensis* How, chemical constituents, urs-en-29 α -oic acid-3 β -ol, bioactivity