

## 北沙参中佛手柑内酯的分离鉴定及体外抗肿瘤活性的初步测定

董芳, 刘汉柱, 孙阳, 辛华<sup>①</sup>

(青岛农业大学, 山东 青岛 266109)

**Isolation and identification of bergapten in dry root of *Glehnia littoralis* and preliminary determination of its antitumor activity *in vitro*** DONG Fang, LIU Han-zhu, SUN Yang, XIN Hua<sup>①</sup> (Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2010, 19(1): 95-96

**Abstract:** Using silica gel column chromatography and recrystallization, a light yellow needle crystal with a purity of 97.21% was obtained from ethyl acetate fraction of ethanol extract from dry root of *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq., and was identified as bergapten by means of NMR. The experimental result of antitumor activity *in vitro* shows that 0.01-100.00 mg · L<sup>-1</sup> bergapten have inhibitory effect to liver cancer cell line HEP-G2, in which inhibition of 100.00 mg · L<sup>-1</sup> bergapten is the highest with an inhibitory rate of 95.0%. In concentrations of 0.01-100.00 mg · L<sup>-1</sup>, only 100.00 mg · L<sup>-1</sup> bergapten has an inhibitory effect to stomach cancer cell line SGC-7901 with an inhibitory rate of 79.6%.

**关键词:** 北沙参; 佛手柑内酯; 分离鉴定; 抗肿瘤活性

**Key words:** *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.; bergapten; isolation and identification; antitumor activity

中图分类号: S567.23+9; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2010)01-0095-02

北沙参为传统的中药材,来源于伞形科(Umbelliferae)植物珊瑚菜(*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.)的干燥根,具有养阴清肺、益胃生津的功效<sup>[1]</sup>,其道地产地为山东莱阳。

佛手柑内酯为香豆素类成分,香豆素类化合物具有抗高血压、抗艾滋病病毒(HIV)、抗癌及抗菌等多种生物活性,在制药行业中常被用作中间体和药物<sup>[2-3]</sup>,其中部分药效确切、安全、毒副作用小的成分已经被应用于临床。目前,有关北沙参的研究不少<sup>[4-5]</sup>,但有关带皮北沙参中佛手柑内酯的分离鉴定及其抗肿瘤活性的研究未见报道。

作者以带皮北沙参为材料,对其中所含的佛手柑内酯进行分离鉴定,并对佛手柑内酯的体外抗肿瘤活性进行了初步研究,以期对北沙参的进一步开发利用提供理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试带皮北沙参购自山东省莱阳市高格庄乡胡城村,粉碎后过20目筛,备用;人胃癌细胞株(SGC-7901)和肝癌母细胞株(HEP-G2)购自山东省医学科学研究所。

所用仪器:Bruker AM-400和DRX-500(TMS为内标,德国BRUKER光谱仪器公司),BUCHI R-210旋转蒸发器(香港步琪有限公司),ZF7三用紫外分析仪(巩义予华仪器有限公

司),Waters 717-600-2424(2489)高压液相色谱仪(美国Waters公司),半制备色谱柱(C<sub>18</sub>, 7 μm×7.8 mm×150 mm, C<sub>18</sub>, 5 μm×4.6 mm×150 mm,美国Waters公司),酶联免疫检测仪 Version 4.0(美国BIO-RAD公司产品)。

所用试剂:硅胶(200~300目,烟台江友硅胶开发有限公司),0.25%胰蛋白酶和四甲基偶氮唑盐(MTT)(Amresco公司产品),无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>新生小牛血清(北京元亨圣马生物技术有限公司),青霉素和链霉素(市售药品),无支原体胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司)。

#### 1.2 方法

1.2.1 佛手柑内酯的提取分离和鉴定 取样品粉末10 kg置于渗漉桶中,用40 L体积分数95%乙醇浸提72 h,过滤,滤渣重复提取2次,合并3次滤液,回收乙醇,得到浸膏1 200 g;将浸膏混悬于2 000 mL蒸馏水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得到石油醚部分570 g、乙酸乙酯部分80 g和正丁醇部分95 g。

将乙酸乙酯部分拌入等质量的柱色谱硅胶,用于法上样于硅胶层析柱上,从V(石油醚):V(乙酸乙酯)=100:0开始梯度洗脱。在洗脱体系为V(石油醚):V(乙酸乙酯)=5:1的流分中出现晶体,洗出晶体,重结晶3次,得到淡黄色针状晶体。利用NMR和HPLC等方法对该结晶进行结构鉴定。

1.2.2 体外抗肿瘤活性测定 在37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>条

收稿日期: 2009-05-20

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2008D45)

作者简介: 董芳(1984-),女,山东莱阳人,硕士研究生,主要从事资源植物学的研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: hxin@qau.edu.cn

件下,用含质量体积分数10%小牛血清、100 mg·L<sup>-1</sup>青霉素、100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素的RPMI-1640培养液对人胃癌细胞株SGC-7901和肝癌母细胞株HEP-G2进行传代培养。

称取2 mg佛手柑内酯,用200 μL二甲亚砜溶解后用无菌蒸馏水定容至5 mL,配成质量浓度为400 mg·L<sup>-1</sup>的母液,再用无菌蒸馏水分别稀释至100.00、10.00、1.00、0.10、0.01 mg·L<sup>-1</sup>,作为供试溶液,并以无菌蒸馏水为对照。取对数生长长期的SGC-7901细胞和HEP-G2细胞,用胰蛋白酶消化后以1 000 mg·L<sup>-1</sup>密度埋96孔板,每孔150 μL,24 h后分别加入佛手柑内酯供试溶液和无菌蒸馏水各50 μL;48 h后小心吸弃孔内溶液,每孔加RPMI-1640培养液150 μL,MTT液20 μL,于37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>饱和条件下继续孵育4 h后中止培养,小心吸弃孔内培养液;每孔加入150 μL二甲亚砜,振荡10 min。用酶标仪在570 nm处测吸光度值<sup>[4]</sup>。

### 1.3 数据统计处理

按下列公式计算细胞生长抑制率:抑制率=[(A-A<sub>1</sub>)/A]×100%,式中,A为对照组的吸光值,A<sub>1</sub>为供试液的吸光值。

利用Excel和DPS数据处理系统进行数据统计分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 佛手柑内酯的结构鉴定及纯度

淡黄色针状结晶(甲醇),mp:188℃~189℃。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>,500 MHz)δ:4.263(3H,s,-OCH<sub>3</sub>),6.270(1H,d,J=10 Hz,H-3),7.011(1H,d,J=210 Hz,H-3'),7.116(1H,s,H-8),7.582(1H,d,J=2 Hz,H-2'),8.133(1H,d,J=10 Hz,H-4)。<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>,125 MHz)δ:161.283(C-2),158.350(C-7),152.655(C-9),149.536(C-5),144.774(C-2'),139.309(C-4),112.587(C-6),112.480(C-3),106.329(C-10),105.055(C-3'),93.775(C-8),60.050(-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[6]报道的香柠檬内酯数据基本一致,故鉴定为香柠檬内酯,即佛手柑内酯。

经HPLC检验[柱温30℃,波长290 nm,流动相V(甲醇):V(水)=50:50],佛手柑内酯结晶纯度为97.21%。

### 2.2 佛手柑内酯的体外抗肿瘤活性

表1结果表明,不同质量浓度佛手柑内酯对肝癌母细胞株HEP-G2均有抑制效果,1.00、10.00和100.00 mg·L<sup>-1</sup>佛手柑内酯对HEP-G2的抑制率均在50%以上,其中,100.00 mg·L<sup>-1</sup>佛手柑内酯的抑制率高达95.0%,极显著高于其他处理组(P<0.01)。除100.00 mg·L<sup>-1</sup>佛手柑内酯对人胃癌细胞株SGC-7901有抑制作用外,其他质量浓度的佛手柑内酯对SGC-7901均没有抑制作用。

## 3 讨论

目前对于北沙参抗肿瘤药理作用的研究多集中于粗提

物<sup>[7-8]</sup>,而对于其单体化学成分的抗肿瘤活性研究很少。北沙参中的有效成分众多,且通过多途径、多层次作用于肿瘤细胞,因而,要明确北沙参抗肿瘤药理作用的活性物质基础,则需要从研究单体化学成分的药理作用入手,尤其应注重其主要活性成分——香豆素类成分的药理作用。

表1 不同质量浓度佛手柑内酯溶液对2种肿瘤细胞株的抑制作用<sup>1)</sup>  
Table 1 Inhibition of bergapten solution with different concentrations to two cancer cell lines<sup>1)</sup>

质量浓度/mg·L <sup>-1</sup> Concentration	对不同肿瘤细胞株的抑制率/% Inhibitory rate to different cancer cell lines	
	SGC-7901	HEP-G2
100.00	79.6A	95.0A
10.00	-13.6B	62.9B
1.00	-5.8B	55.4B
0.10	-31.0C	30.9C
0.01	-15.1B	17.3C

<sup>1)</sup> 同列中不同的大写字母表示差异极显著(P<0.01) Different capitals in same column indicate the highly significant difference (P<0.01).

从北沙参中提取的佛手柑内酯对肝癌母细胞株具有明显的抑制作用,且抑制作用随佛手柑内酯质量浓度降低而减弱;而仅100.00 mg·L<sup>-1</sup>佛手柑内酯对人胃癌细胞株有明显的抑制作用,其他质量浓度的佛手柑内酯均没有抑制作用,显示不同肿瘤细胞对佛手柑内酯的敏感度不同。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005年版(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 66.
- [2] Kostova I, Momekov G. New zirconium (IV) complexes of coumarins with cytotoxic activity[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2006, 41(6): 717-726.
- [3] 徐嵩, 徐世平, 李兰敏. 6-或7-(取代苯乙烯基)香豆素类化合物的合成及其抗癌活性的研究[J]. 药学学报, 2000, 35(2): 103-107.
- [4] Yuan Z, Kadota S, Li X. Biphenyl ferulate from *Glehnia littoralis* [J]. Chinese Chemistry Letters, 2002, 13(9): 865-866.
- [5] 辛华, 丁雨龙. 珊瑚菜植株分泌道发育和分布的解剖学观察[J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(2): 66-70.
- [6] 徐希科, 胡疆, 柳润辉, 等. 无花果根化学成分研究[J]. 药学服务与研究, 2005, 5(2): 138-140.
- [7] Okuyama T, Takata M, Nishino H, et al. Studies on the antitumor-promoting activity of naturally occurring substances. II. Inhibition of tumor-promoter-enhanced phospholipid metabolism by umbelliferous materials[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38(4): 1084-1086.
- [8] 王中民, 张永祥, 史美育, 等. 北沙参抗突变实验研究[J]. 上海中医药杂志, 1993(5): 47-48.