

单叶蔓荆果实中多甲氧基黄酮类成分的分离、鉴定及细胞毒活性分析

高雪^{a,b,c,①}, 陈刚^{a,b,c}

(重庆工商大学: a. 催化与功能有机分子重庆市重点实验室, b. 天然药物研究重庆高校市级重点实验室,
c. 环境与生物工程学院, 重庆 400067)

Isolation, identification and cytotoxic activity analysis of polymethoxylated flavonoids from *Vitex rotundifolia* fruit
GAO Xue^{a,b,c,①}, CHEN Gang^{a,b,c} (Chongqing Technology and Business University; a. Chongqing Key Laboratory of Catalysis and Functional Organic Molecules, b. Chongqing Key Laboratory of Natural Medicine Research, c. School of Environmental and Biological Engineering, Chongqing 400067, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(2): 118-120

Abstract: Six polymethoxylated flavonoids were isolated from ethyl acetate fraction of ethanol extracts from *Vitex rotundifolia* Linn. f. fruit, and their structures were identified by NMR and MS methods, and cytotoxic activity of six compounds are analyzed by MTT method. The six compounds are oroxylin A (1), chrysofenol-D (2), casticin (3), artemetin (4), persicogenin (5) and 5,3'-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavanone (6). In which, persicogenin is isolated from *V. rotundifolia* for the first time. Oroxylin A, casticin, artemetin and 5,3'-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavanone can inhibit proliferation of human liver cancer cell line HepG2 *in vitro*, and their IC_{50} is 11.90, 12.54, 13.69 and 11.76 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, showing that the four compounds have a certain cytotoxic activity.

关键词: 单叶蔓荆; 果实; 多甲氧基黄酮类; 人肝癌细胞株 HepG2; 细胞毒活性

Key words: *Vitex rotundifolia* Linn. f.; fruit; polymethoxylated flavonoids; human liver cancer cell line HepG2; cytotoxic activity

中图分类号: Q946.8; R284.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)02-0118-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.02.18

单叶蔓荆 (*Vitex rotundifolia* Linn. f.) 为马鞭草科 (Verbenaceae) 牡荆属 (*Vitex* Linn.) 多年生落叶灌木, 其干燥成熟果实供药用, 具有疏散风热的功效^[1]。单叶蔓荆生于沙滩、海边及湖畔, 主要产于中国安徽、福建、广东、河北、江苏、江西、辽宁、山东、台湾和浙江等地, 日本、东南亚地区和太平洋群岛也有分布^[2]。据报道, 单叶蔓荆果实中富含二萜类、黄酮类及木脂素类成分^[3-6]。为了研究单叶蔓荆果实的药理活性, 作者对单叶蔓荆果实的化学成分进行了研究, 以期寻找新的具有抗肿瘤活性的药用植物资源, 为单叶蔓荆果实的进一步开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试单叶蔓荆果实于 2012 年 9 月采自四川, 由重庆工商大学陈刚博士鉴定。标本保存于重庆工商大学天然药物研究重庆高校市级重点实验室, 编号 201209-2。

主要仪器和试剂: HP-5988A GC/MS 型质谱仪 (美国安捷

伦公司); Perkin Elmer 3.41 自动记录旋光仪 (美国 Perkin Elmer 公司); Varian Mercury Plus-400BB 核磁共振仪 (美国 Varian 公司); Infinite M200 Pro 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); TE2000-U 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司)。柱层析硅胶和薄层色谱 (TLC) 用预制硅胶 GF₂₅₄ 均购自青岛海洋化工集团公司; 柱层析用聚酰胺粉购自郑州勤实科技有限公司; 人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院上海细胞库; 胰蛋白酶、二甲基亚砜和 MTT 均购自美国 Sigma 公司; RPMI1640 液体培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 其他试剂均为分析纯, 购自成都市科龙化工试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 化合物提取、分离和鉴定 称取单叶蔓荆果实 2 kg, 粉碎后用体积分数 95% 乙醇于室温下浸提 3 次, 每次 7 d, 合并提取液减压浓缩获得总浸膏 320 g; 将总浸膏溶于 2 L 蒸馏水中, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 2 L, 减压浓缩萃取液, 得到乙酸乙酯萃取物浸膏 106 g; 称取乙酸乙酯萃取物浸膏 100 g, 按体积比 1:1 拌入硅胶 (200 ~ 300 目) 进行柱层析, 分别用体积比 30:1、10:1、5:1、1:1 和 0:1 的石油醚-丙酮混合溶液进行梯度

收稿日期: 2014-09-05

基金项目: 重庆市高校创新团队建设计划项目 (KJTO201314)

作者简介: 高雪 (1980—), 女, 重庆人, 博士, 副研究员, 主要从事中药活性物质基础的研究。

①通信作者 E-mail: gaoxue@ctbu.edu.cn

加压洗脱,收集各流分并经 TLC 检测合并后得到 Fr1、Fr2、Fr3、Fr4 和 Fr5 共 5 个组分。其中 Fr2 和 Fr3 组分经过反复硅胶与聚酰胺柱层析、重结晶等进行纯化,分离得到化合物 1 (15 mg)、化合物 2 (5 mg)、化合物 3 (33 mg)、化合物 4 (26 mg)、化合物 5 (3 mg) 和化合物 6 (17 mg)。

结合 NMR 和 MS 数据并参考相关文献对获得的化合物进行结构鉴定。

1.2.2 细胞毒性测定 用 RPMI1640 液体培养基分别将上述 6 个化合物及丝裂霉素(阳性对照)配制成 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,然后用 RPMI1640 液体培养基逐级稀释成 50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液。

采用 MTT 法^[7]测定细胞生长抑制率。将处于对数生长期的人肝癌细胞株 HepG2 细胞悬液($3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)接种于 96 孔板中,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后分别加入 $100 \mu\text{L}$ 上述样品溶液及丝裂霉素溶液,空白组加入 $100 \mu\text{L}$ RPMI1640 液体培养基,每组设 5 个平行孔,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后用倒置显微镜进行观察。之后,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 质量分数 0.05% MTT 溶液,继续培养 4 h;吸去孔内培养液,每孔再加入 $100 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜,于摇床上低速振荡 10 min,用酶标仪在波长 570 nm 处测定各孔中细胞培养液的 OD 值,按公式“细胞生长抑制率 = (1 - 给药孔 OD 值/空白孔 OD 值) × 100%”计算细胞生长抑制率,并据此计算半抑制浓度(IC_{50})。

2 结果和分析

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1:淡黄色无定型粉末, EI-MS m/z : 284 $[\text{M}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 13.00 (1H, s, 5-OH), 7.88 (2H, brdd, $J=8.0, 2.0 \text{ Hz}$, H-2', 6'), 7.53 (3H, m, H-3', 4', 5'), 6.66 (1H, s, H-8), 6.61 (1H, s, H-3), 6.57 (1H, brs, 7-OH), 4.05 (3H, s, 6-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.1 (C-2), 105.2 (C-3), 183.0 (C-4), 153.2 (C-5), 131.3 (C-6), 155.2 (C-7), 93.5 (C-8), 152.1 (C-9), 105.9 (C-10), 130.4 (C-1'), 126.3 (C-2', 6'), 129.1 (C-3', 5'), 131.9 (C-4'), 60.9 (6-OCH₃)。该化合物的不饱和度为 11, ¹H-NMR 谱出现 1 个单取代苯环和 2 个单峰芳香氢信号, ¹³C-NMR 谱出现 15 个碳信号,其中有 1 个甲氧基信号,推测其可能是黄酮类成分,并且 ¹H-NMR 谱出现 5 位羟基的特征信号。参考文献[8]鉴定该化合物为千层纸素 A (oroxylin A)。

化合物 2:淡黄色无定型粉末, EI-MS m/z : 360 $[\text{M}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.68 (1H, s, 5-OH), 7.60 (1H, brs, H-2'), 7.50 (1H, d, $J=8.0 \text{ Hz}$, H-6'), 6.91 (1H, d, $J=8.0 \text{ Hz}$, H-5'), 6.87 (1H, s, H-8), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃), 3.79 (3H, s, 3-OCH₃), 3.73 (3H, s, 6-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 156.3 (C-2), 137.7 (C-3), 178.2 (C-4), 151.8 (C-5), 131.7 (C-6), 158.7 (C-7), 91.4 (C-8), 151.5 (C-9),

105.6 (C-10), 121.0 (C-1'), 115.3 (C-2'), 145.4 (C-3'), 146.4 (C-4'), 115.8 (C-5'), 120.3 (C-6'), 59.7 (3-OCH₃), 60.2 (6-OCH₃), 56.6 (7-OCH₃)。参考文献[9]鉴定该化合物为猫眼草酚 (chrysosplenol-D)。

化合物 3:淡黄色无定型粉末, EI-MS m/z : 374 $[\text{M}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.52 (1H, s, 5-OH), 7.63 (1H, dd, $J=8.6, 1.6 \text{ Hz}$, H-6'), 7.60 (1H, brs, H-2'), 6.95 (1H, d, $J=8.6 \text{ Hz}$, H-5'), 6.41 (1H, s, H-8), 3.90 (3H, s, 6-OCH₃), 3.87 (3H, s, 7-OCH₃), 3.84 (3H, s, 3-OCH₃), 3.78 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 154.7 (C-2), 137.9 (C-3), 177.9 (C-4), 151.6 (C-5), 131.2 (C-6), 157.8 (C-7), 89.4 (C-8), 151.3 (C-9), 105.5 (C-10), 122.5 (C-1'), 109.4 (C-2'), 144.5 (C-3'), 147.8 (C-4'), 113.4 (C-5'), 120.5 (C-6'), 59.8 (6-OCH₃), 59.1 (7-OCH₃), 55.3 (3-OCH₃), 55.0 (4'-OCH₃)。参考文献[10]鉴定该化合物为紫花牡荆素 (casticin)。

化合物 4:淡黄色无定型粉末, ESI-MS m/z : 389 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.60 (1H, s, 5-OH), 7.72 (1H, dd, $J=8.5, 2.0 \text{ Hz}$, H-6'), 7.65 (1H, d, $J=2.0 \text{ Hz}$, H-2'), 7.15 (1H, d, $J=8.5 \text{ Hz}$, H-5'), 6.92 (1H, s, H-8), 3.91 (3H, s, 6-OCH₃), 3.85 (3H, s, 7-OCH₃), 3.84 (3H, s, 3-OCH₃), 3.80 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.72 (3H, s, 3'-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 155.6 (C-2), 138.2 (C-3), 178.3 (C-4), 151.9 (C-5), 131.8 (C-6), 158.7 (C-7), 91.7 (C-8), 151.5 (C-9), 105.7 (C-10), 122.2 (C-1'), 111.5 (C-2'), 148.6 (C-3'), 151.4 (C-4'), 111.8 (C-5'), 122.2 (C-6'), 59.9 (3-OCH₃), 60.2 (6-OCH₃), 56.6 (7-OCH₃), 55.8 (3', 4'-OCH₃)。参考文献[11]鉴定该化合物为蒿黄素 (artemetin)。

化合物 5:淡黄色无定型粉末, EI-MS m/z : 316 $[\text{M}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.01 (1H, s, 5-OH), 7.05 (1H, d, $J=2.0 \text{ Hz}$, H-2'), 6.93 (1H, dd, $J=8.3, 2.0 \text{ Hz}$, H-6'), 6.88 (1H, d, $J=8.3 \text{ Hz}$, H-5'), 6.07 (1H, d, $J=2.0 \text{ Hz}$, H-8), 6.04 (1H, d, $J=2.0 \text{ Hz}$, H-6), 5.33 (1H, dd, $J=13.0, 3.0 \text{ Hz}$, H-2), 3.92 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.80 (3H, s, 7-OCH₃), 3.08 (1H, dd, $J=17.0, 13.0 \text{ Hz}$, H-3a), 2.79 (dd, $J=17.0, 3.0 \text{ Hz}$, H-3b); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 78.9 (C-2), 43.2 (C-3), 195.9 (C-4), 164.2 (C-5), 95.1 (C-6), 168.0 (C-7), 94.2 (C-8), 162.9 (C-9), 105.3 (C-10), 131.7 (C-1'), 110.7 (C-2'), 147.1 (C-3'), 146.0 (C-4'), 112.7 (C-5'), 118.1 (C-6'), 55.6 (7-OCH₃), 56.1 (4'-OCH₃)。参考文献[12]鉴定该化合物为桃皮素 (persicogenin)。

化合物 6:淡黄色无定型粉末, EI-MS m/z : 286 $[\text{M}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 11.86 (1H, s, 5-OH), 7.05 (1H, d, $J=2.0 \text{ Hz}$, H-2'), 6.93 (1H, dd, $J=8.3, 2.0 \text{ Hz}$, H-6'), 6.88 (1H, d, $J=8.3 \text{ Hz}$, H-5'), 6.10 (1H, s, H-8), 5.32 (1H, dd, $J=$

13.1, 3.0 Hz, H-2), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃), 3.87 (3H, s, 6-OCH₃), 3.84 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.08 (1H, dd, *J* = 17.2, 13.1 Hz, H-3a), 2.79 (dd, *J* = 17.2, 3.0 Hz, H-3b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 79.3 (C-2), 43.2 (C-3), 196.5 (C-4), 155.0 (C-5), 130.7 (C-6), 160.9 (C-7), 91.72 (C-8), 158.7 (C-9), 103.2 (C-10), 131.6 (C-1'), 110.7 (C-2'), 147.0 (C-3'), 146.0 (C-4'), 112.7 (C-5'), 118.1 (C-6'), 60.9 (6-OCH₃), 56.1 (7-OCH₃), 56.2 (4'-OCH₃)。参照文献[13]鉴定该化合物为5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄烷酮(5,3'-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavanone)。

2.2 细胞毒活性分析

细胞毒活性实验结果表明:从单叶蔓荆果实乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物中分离的6个化合物中,千层纸素A、紫花牡荆素、蒿黄素和5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄烷酮这4个成分对人肝癌细胞株 HepG2 的体外增殖均有一定的抑制作用, IC₅₀ 值分别为 11.90、12.54、13.69 和 11.76 μmol · L⁻¹, 均大于阳性对照丝裂霉素对人肝癌细胞株 HepG2 的 IC₅₀ 值 (0.91 μmol · L⁻¹), 表明这些成分的细胞毒活性低于丝裂霉素; 其中, 5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄烷酮为多甲氧基黄烷酮类化合物, 其抗 HepG2 增殖活性高于千层纸素 A、紫花牡荆素和蒿黄素; 千层纸素 A 为 B 环无取代的多甲氧基黄烷酮类化合物, 其抗 HepG2 增殖活性略高于 B 环二取代的多甲氧基黄烷酮类化合物紫花牡荆素和蒿黄素, 而紫花牡荆素的抑制活性略高于蒿黄素, 由此可见这些成分的细胞毒活性强弱可能与 B 环取代基中的甲氧基数量有关。

3 结 论

从单叶蔓荆果实乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物中分离鉴定出6个多甲氧基黄烷酮类化合物, 分别为千层纸素A、猫眼草酚、紫花牡荆素、蒿黄素、桃皮素和5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄烷酮, 其中桃皮素首次从该植物中分离得到。通过MTT细胞毒活性测定, 千层纸素A、紫花牡荆素、蒿黄素和5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄烷酮对人肝癌细胞株 HepG2 的体外增殖均具有一定的抑制作用。本研究结果为寻找新的具有抗肿瘤活性的药用植物资源奠定了实验基础, 并为单叶蔓荆的深度开发和应用提供了基础研究数据。

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: 252.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第六十五卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 131.
- [3] LEE C, LEE J W, JIN Q, et al. Anti-inflammatory constituents from the fruits of *Vitex rotundifolia* [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23: 6010-6014.
- [4] KAWAZOE K, YUTANI A, TAKAISHI Y. Aryl naphthalenes norlignans from *Vitex rotundifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 1657-1659.
- [5] ONO M, YAMAMOTO M, MASUOKA C, et al. Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia* [J]. *Journal of Natural Products*, 1999, 62: 1532-1537.
- [6] ONO M, YAMAMOTO M, YANAKA T, et al. Ten new labdane-type diterpenes from the fruit of *Vitex rotundifolia* [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 49: 82-86.
- [7] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65: 55-63.
- [8] 李云秋, 冯育林, 杨世林, 等. 刺山柑化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(4): 510-512.
- [9] 陈靖, 周玉波, 张欣, 等. 黄花蒿幼嫩叶的化学成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(11): 866-870.
- [10] 王燕, 吐尔洪·阿西木, 堵年生. 新疆一枝蒿化学成分的研究 [J]. *新疆医科大学学报*, 2004, 27(4): 361-363.
- [11] KIM H, YI J M, KIM N S, et al. Cytotoxic compounds from the fruits of *Vitex rotundifolia* against human cancer cell lines [J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2012, 55: 433-437.
- [12] SUKSAMRARN A, CHOTIPONG A, SUAVANSRI T, et al. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata* [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2004, 27: 507-511.
- [13] ACHARI B, CHOWDHURY U S, DUTTA P K, et al. Two isomeric flavanones from *Vitex negundo* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23: 703-704.

(责任编辑: 张明霞)