

# 巴戟天中蒽醌类化合物及生物活性研究

杨振民<sup>1</sup>, 欧亚非<sup>1</sup>, 伊勇涛<sup>2</sup>, 胡 军<sup>3</sup>, 赵明月<sup>3</sup>, 张 艳<sup>4</sup>, 刘 珊<sup>3\*</sup>, 曾世通<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>上海烟草集团技术中心北京工作站, 北京 101121; <sup>2</sup>福建中烟工业有限责任公司, 厦门 361021;

<sup>3</sup>中国烟草总公司郑州烟草研究院; <sup>4</sup>郑州大学基础医学院药理教研室, 郑州 450001

**摘要:**采用硅胶柱层析结合制备液相从巴戟天(*Morinda officinalis*)中分离得到8个蒽醌类化合物。根据化合物的波谱数据并与文献对照进行了结构鉴定,分别为2-羟甲基-3-羟基蒽醌(2-hydroxymethyl-3-hydroxyanthraquinone, **1**)、3-羟基-2-羟甲基-1-甲氧基蒽醌(3-hydroxy-2-hydroxymethyl-1-methoxyanthraquinone, **2**)、2-羟基-1-甲氧基蒽醌(2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone, **3**)、3-羟基-1,2-二甲氧基蒽醌(3-hydroxy-1,2-dimethoxyanthraquinone, **4**)、甲基异茜草素-1-甲醚(rubiadin-1-methyl ether, **5**)、1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌(1,3-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone, **6**)、1,3-二羟基-2-乙氧甲基蒽醌(ibericin, **7**)、1,2-二羟基-3-甲基蒽醌(1,2-dihydroxy-3-methylanthraquinone, **8**)。其中蒽醌(**2**)为首次从该植物中分得。利用MTT法对分离出的蒽醌的体外抗癌活性进行筛选,结果显示蒽醌(**3**)、(**5**)和(**7**)对肝癌细胞SMMC-7721增殖有明显的抑制作用,当蒽醌的浓度为400 μmol/L时,蒽醌(**3**)、(**5**)和(**7**)对肝癌细胞的抑制率分别为44.63%、20.52%、54.89%。

**关键词:**巴戟天;蒽醌;3-羟基-2-羟甲基-1-甲氧基蒽醌;生物活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)1-0087-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.1.014

## Isolation, identification and bioactivity of anthraquinones in *Morinda officinalis*

YANG Zhen-min<sup>1</sup>, OU Ya-fei<sup>1</sup>, YI Yong-tao<sup>2</sup>, HU Jun<sup>3</sup>, ZHAO Ming-yue<sup>3</sup>, LIU Shan<sup>3\*</sup>, ZENG Shi-tong<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Beijing working station, Technical Center of Shanghai Tobacco Group Co., Ltd, Beijing 101121, China;

<sup>2</sup>China Tobacco-Fujian Industrial CO., Ltd, Xiamen 361021, China;

<sup>3</sup>Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC; <sup>4</sup>Department of Pharmacology, College of Basic Medical Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** Eight anthraquinones were isolated from the Chinese medicine: *Morinda officinalis*, using silica gel column chromatography and preparative HPLC. Those anthraquinones were identified as 2-hydroxymethyl-3-hydroxyanthraquinone (**1**), (3-hydroxy-2-hydroxymethyl-1-methoxyanthraquinone (**2**), 2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone (**3**), 3-hydroxy-1,2-dimethoxyanthraquinone (**4**), rubiadin-1-methyl ether (**5**), 1,3-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone (**6**), ibericin (**7**) and 1,2-dihydroxy-3-methylanthraquinone (**8**) on the basis of spectral data and comparison with literatures. Anthraquinone (**2**) was isolated from this plant for the first time. The anticancer activities of those anthraquinones were screened by MTT assay. Results showed that three anthraquinones (**3**, **5** and **7**) had obvious inhibitory effects on the proliferation of hepatic carcinoma cell lines (SMMC-7721) *in vitro*. When the concentration of anthraquinone was 400 μmol/L, inhibitory rates of anthraquinones (**3**, **5** and **7**) against SMMC-7721 reached 44.63%, 20.52% and 54.89%, respectively.

**Key words:** *Morinda officinalis*; anthraquinone; 3-hydroxy-2-hydroxymethyl-1-methoxyanthraquinone; bioactivity

巴戟天(*Morinda officinalis*),属于茜草科 Rubiaceae,主要分布于广东省、福建、广西、和海南等地,其根是我国著名的“四大南药”之一。巴戟天含有蒽醌类、有机酸类、多糖类、低聚糖类、环烯醚萜类等

活性成分<sup>[1-5]</sup>,具有补肾、强筋骨、祛风湿等功效<sup>[6]</sup>。蒽醌类化合物作为巴戟天的主要化学成分之一,在巴戟天中主要游离态蒽醌形式存在,其生物活性研究主要集中在防治糖尿病和骨质疏松症方面,Liu Q<sup>[7]</sup>等认为巴戟天中的蒽醌类化合物能够促进脂肪细胞的分化,特别 Alizarin-2-methyl ether,其分化脂

肪细胞的速度是胰岛素的 131%, 对于糖尿病防治具有一定意义。此外, Bao 等<sup>[8]</sup>和 Wu 等<sup>[9]</sup>都认为巴戟天中的蒽醌类化合物在防止骨流失及增强骨密度方面具有一定的活性。但是, 关于巴戟天中蒽醌在抗肿瘤活性方面的研究却鲜有报道。

本实验采用硅胶柱层析结合制备液相从巴戟天中分离得到 8 个蒽醌类化合物, 并对它们的体外抗肿瘤活性进行了研究, 为今后巴戟天的质量控制及药理学作用提供了实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

巴戟天干燥根产于福建永定。

柱色谱用硅胶(200~300目, 青岛海洋化工厂); HPLC 级纯水; 二甲基亚砜、正己烷、乙酸乙酯(分析纯, 天津北方天医化学试剂厂); 甲醇(色谱级, J. T. Baker, USA)。培养基 RMPI-1640; Gibco 公司; 优级胎牛血清; 杭州四季青生物工程有限公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT); sigma 公司; 人肝癌 SMMC-7721 细胞株; 郑州大学基础医学院药理教研室;

### 1.2 仪器与设备

Milli-Q system 纯水系统(Millipore, MA, USA); Agilent 1200 高效液相色谱(配有 DAD 检测器, 美国 Agilent 公司); DRX-400 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); PrepStar Dynamax SD-1 制备液相系统(配有紫外检测器, 美国 Varian 公司); Finnigan LTQ 质谱仪(配置 ESI 离子源, 美国 Thermo 公司); Nikon T100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司); HERA-cell 二氧化碳培养箱(德国 GmbH 公司); 高速低温离心机(德国 GmbH 公司); 酶标仪(美国 DYNEX 公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 蒽醌的分离鉴定

将巴戟天根干燥粉碎, 过 20 目筛, 备用。取 10 kg 巴戟天根干粉, 用 95% 乙醇于 50 °C 萃取 3 次, 每次 2 h, 合并三次萃取液, 减压回收溶剂得乙醇浸膏。将所得浸膏用水混悬, 然后依次用正己烷、乙酸乙酯萃取, 减压回收溶剂, 得正己烷、乙酸乙酯萃取物 0.5、0.8 kg。将正己烷和乙酸乙酯的萃取物混合后经硅胶柱层析分离, 用正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱得 5 个流份, 回收溶剂后得流份 1 75 mg (n-hexane: EtOAc 16: 1)、流份 2 150 mg (n-hexane: EtOAc 8: 1)、流份 3 100 mg (n-hexane: EtOAc 4: 1)、流份 4

75 mg (n-hexane: EtOAc 2: 1) 和流份 5 45 mg (n-hexane: EtOAc 1: 1)。将所得流份 2-4 用 DMSO 溶解, 然后上制备液相色谱进行制备, 检测波长 280 nm, 色谱柱 RPC18 (41.4 × 250 mm i. d.; 5~8 μm; Varian), 流动相 MeOH/H<sub>2</sub>O, 流速 40 ml/min。流份 2 得化合物 1 (20 mg) 和化合物 2 (23 mg), 流份 3 得化合物 3 (43 mg) 和化合物 4 (45 mg), 流份 4 得化合物 5 (32 mg) 和化合物 6 (34 mg), 流份 5 得化合物 7 (16 mg) 和化合物 8 (22 mg)。提取分离的流程见图 1。

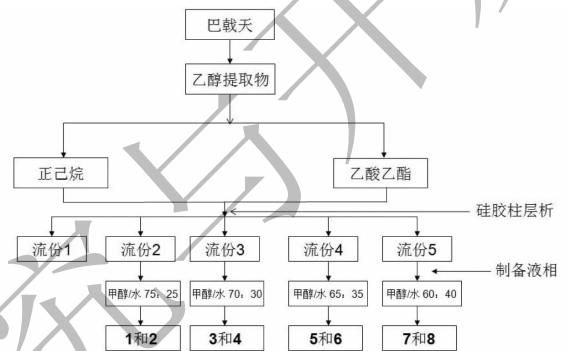


图 1 巴戟天中蒽醌类化合物的提取分离流程

Fig. 1 Isolation flowchart of anthraquinones from *M. officinalis*

<sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 谱用 Bruker DRX-400 核磁共振波谱仪测定。纯度检测用 Agilent 1200 高效液相色谱测定, 检测波长为 280 nm, 色谱柱为 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 5 μm), 流动相为水/甲醇, 流速 1 mL/min, 梯度洗脱 0~30 min, 甲醇 5%~95%。质谱用 Finnigan LTQ (配置 ESI 离子源)。(−)ESI-MS<sup>n</sup> 操作参数: 鞘气, N<sub>2</sub> 30 arbitrary units; 辅助气, N<sub>2</sub> 10 arbitrary units; 吹扫气, N<sub>2</sub> 10 arbitrary units; 电喷雾电压, −4 kV; 扫描范围 100~1000 m/z。

#### 1.3.2 抗肿瘤活性

分离出的蒽醌单体均用 DMSO 配制成 0.04 mol/L 的母液, 临用前用 10% 的 RMPI-1640 培养液稀释至 400 μmol/L, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 然后依次稀释至 400、200、100、50、25、10、5、1 μmol/L。

实验分为空白对照组, 正常细胞对照组, DMSO 溶剂对照组, 药物处理组。DMSO 的最终浓度控制在 0.5% 以下, 设置终浓度为 0.5% DMSO 的处理组为溶剂对照组。每组设五个复孔。

肿瘤细胞(人肝癌细胞 SMMC-7721)用含 10% 胎牛血清的 RMPI-1640 液在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。取对数生长期的细胞, 调整细胞浓度为 6

$\times 10^4$  个/mL, 种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。24 h 后加入含有不同浓度药物的培养液 100  $\mu\text{L}$ , 继续培养 48 h, 观察细胞生长状态, 吸出培养液, PBS 洗 1~2 遍, 加入 150  $\mu\text{L}$  1640 培养液, 15  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 (5 mg/mL; PBS 溶液配制), 继续培养 4 h, 培养结束后, 小心吸取上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 终止反应, 在 37  $^\circ\text{C}$  恒温振荡箱震荡 15~20 min, 待甲瓚结晶完全溶解后用酶标仪在 570 nm 波长处测量各组每孔 A 值。肿瘤细胞生长抑制率  $\eta = (1 - A_{\text{药物处理组}} / A_{\text{溶剂对照组}}) \times 100\%$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 结构鉴定

从巴戟天中共分离出 8 个蒽醌类化合物 (图 2), 其结构鉴定如下:

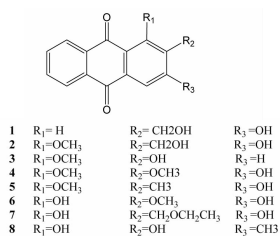


图 2 巴戟天中蒽醌类化合物的分子结构

Fig. 2 Chemical structures of eight anthraquinones isolated from the roots of *M. officinalis*

**化合物 1** 黄色粉末; ESI-MS:  $m/z$  253 [ $\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 8.22 (1H, s, H-1), 7.51 (1H, s, H-4), 8.15 (2H, m, H-5, H-8), 7.86 (2H, m, H-6, H-7), 4.58 (2H, s, 2- $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 11.12 (1H, brs, 3-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 126.6 (C-1), 133.5 (C-2), 160.1 (C-3), 111.6 (C-4), 125.5 (C-4a), 127.0 (C-5), 134.4 (C-6), 134.9 (C-7), 127.0 (C-8), 133.7 (C-8a), 182.0 (C-9), 136.9 (C-9a), 183.1 (C-10), 133.8 (C-10a), 58.3 (2- $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道一致, 故鉴定为 2-hydroxymethyl-3-hydroxyanthraquinone。

**化合物 2** 黄色粉末; ESI-MS:  $m/z$  283 [ $\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.51 (1H, s, H-4), 8.12 (2H, m, H-5, H-8), 7.86 (2H, m, H-6, H-7), 3.85 (3H, s, 1- $\text{OCH}_3$ ), 4.55 (2H, s, - $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 11.20 (1H, brs, 3-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 162.1 (C-1), 129.3 (C-2), 162.6 (C-3), 110.2 (C-4), 135.8 (C-4a), 126.6 (C-5), 133.9 (C-6), 135.1 (C-7), 127.1 (C-8), 135.0 (C-8a), 180.5 (C-

9), 118.3 (C-9a), 183.0 (C-10), 132.5 (C-10a), 62.9 (1- $\text{OCH}_3$ ), 52.6 (2- $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道一致, 故鉴定为 3-hydroxy-2-hydroxymethyl-1-methoxyanthraquinone。

**化合物 3** 黄色粉末; ESI-MS:  $m/z$  253 [ $\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.30 (1H, d, H-3), 7.90 (1H, d, H-4), 8.12 (2H, m, H-5, H-8), 7.84 (2H, m, H-6, H-7), 3.81 (3H, s, 1- $\text{OCH}_3$ ), 10.83 (1H, brs, 2-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 148.2 (C-1), 158.2 (C-2), 121.8 (C-3), 125.4 (C-4), 126.2 (C-4a), 127.0 (C-5), 134.5 (C-6), 134.3 (C-7), 126.6 (C-8), 132.8 (C-8a), 182.5 (C-9), 127.1 (C-9a), 181.9 (C-10), 134.9 (C-10a), 61.0 (1- $\text{OCH}_3$ ); 以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道一致, 故鉴定为 2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone。

**化合物 4** 黄色粉末; ESI-MS:  $m/z$  283 [ $\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.51 (1H, s, H-4), 8.11 (2H, m, H-5, H-8), 7.86 (2H, m, H-6, H-7), 3.86 (3H, s, 1- $\text{OCH}_3$ ), 3.83 (3H, s, 2- $\text{OCH}_3$ ), 11.12 (1H, s, 3-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 155.6 (C-1), 147.3 (C-2), 156.7 (C-3), 111.3 (C-4), 130.8 (C-4a), 126.6 (C-5), 124.9 (C-6), 133.9 (C-7), 127.0 (C-8), 135.0 (C-8a), 180.7 (C-9), 119.7 (C-9a), 182.5 (C-10), 132.5 (C-10a), 61.7 (1- $\text{OCH}_3$ ), 61.1 (2- $\text{OCH}_3$ ); 以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道一致, 故鉴定为 3-hydroxy-1,2-dimethoxyanthraquinone。

**化合物 5** 黄色粉末; ESI-MS:  $m/z$  267 [ $\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.46 (1H, s, H-4), 8.10 (2H, m, H-5, H-8), 7.82 (2H, m, H-6, H-7), 3.76 (3H, s, 1- $\text{OCH}_3$ ), 2.13 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 161.1 (C-1), 126.6 (C-2), 163.3 (C-3), 109.8 (C-4), 132.5 (C-4a), 126.4 (C-5), 133.7 (C-6), 134.9 (C-7), 127.0 (C-8), 135.0 (C-8a), 180.4 (C-9), 117.7 (C-9a), 183.2 (C-10), 132.5 (C-10a), 60.9 (1- $\text{OCH}_3$ ), 9.5 (2- $\text{CH}_3$ ); 以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道一致, 故鉴定为 rubiadin-1-methyl ether。

**化合物 6** 桔红色粉末; ESI-MS:  $m/z$  269 [ $\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.18 (1H, s, H-4), 8.08 (2H, m, H-5, H-8), 7.85 (2H, m, H-6, H-7), 3.84 (3H, s, 2- $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 157.4 (C-1), 140.0 (C-2), 158.1 (C-3),

109.5 (C-4), 129.3 (C-4a), 126.7 (C-5), 135.0 (C-6), 134.9 (C-7), 127.1 (C-8), 133.4 (C-8a), 186.9 (C-9), 110.6 (C-9a), 181.7 (C-10), 133.3 (C-10a), 60.5 (2-OCH<sub>3</sub>); 以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道一致, 故鉴定为 1,3-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone。

**化合物 7** 黄色粉末; ESI-MS:  $m/z$  297 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.17 (1H, s, H-4), 8.15 (2H, m, H-5, H-8), 7.87 (2H, m, H-6, H-7), 4.45 (2H, s, 2-CH<sub>2</sub>-), 3.47 (2H, q, J = 7.0 Hz, 2-O-CH<sub>2</sub>-), 1.09 (3H, t, J = 7.0 Hz, 2-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 164.4 (C-1), 117.4 (C-2), 164.4 (C-3), 108.5 (C-4), 134.2 (C-4a), 127.2 (C-5), 135.1 (C-6), 134.6 (C-7), 126.7 (C-8), 133.3 (C-8a), 185.5 (C-9), 109.5 (C-9a), 182.6 (C-10), 133.8 (C-10a), 65.5, 59.8, 15.7 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道一致, 故鉴定为 ibericin。

**化合物 8** 黄色粉末; ESI-MS:  $m/z$  253 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.25 (1H, s, H-4), 8.15 (2H, m, H-5, H-8), 7.86 (2H, m, H-6, H-7), 2.06 (3H, s, 3-CH<sub>3</sub>), 11.26 (3H, brs, 2-OH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 163.3 (C-1), 162.9 (C-2), 133.5 (C-3), 107.8 (C-4), 109.4 (C-4a), 126.8 (C-5), 135.0 (C-6), 134.9 (C-7), 127.2 (C-8), 132.2 (C-8a), 186.7 (C-9), 117.8 (C-9a), 182.3 (C-

10), 133.4 (C-10a), 8.5 (3-CH<sub>3</sub>); 以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道一致, 故鉴定 1,2-dihydroxy-3-methylanthraquinone。

## 2.2 蒽醌抗肝癌细胞增殖活性的筛选

针对 8 种蒽醌进行了体外抗肿瘤活性筛选, 实验分为空白对照组、正常细胞对照组、溶剂对照组、药物处理组。经统计, 各组实验的正常细胞对照组和溶剂对照组均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 说明样品溶剂 DMSO 对细胞生长没有影响。相对于溶剂对照, 蒽醌对肝癌细胞 (SMMC-7721) 增殖的抑制作用如表 1。由表 1 可以看出, 经药物处理 48 h 后, 蒽醌 (3)、(5) 和 (7) 对体外培养的人肝癌细胞增殖都有一定抑制作用, 而其它蒽醌在 1 ~ 400  $\mu\text{mol}$  的浓度范围内均没有抑制作用。蒽醌的浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时, 蒽醌 (3) 和蒽醌 (5) 相对于溶剂对照组, 对肝癌细胞增殖没有明显的抑制作用 ( $P > 0.05$ ), 而蒽醌 (7) 具有一定的抑制作用, 抑制率为 21.36% ( $P < 0.05$ ); 蒽醌浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  时, 经过蒽醌 (3) 和 (7) 处理的肝癌细胞, 其增殖受到明显的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 而蒽醌 (5) 还是没有明显的活性 ( $P > 0.05$ ); 当蒽醌的浓度为 400  $\mu\text{mol/L}$  时, 蒽醌 (3)、(5) 和 (7) 对肝癌细胞的抑制率分别为 44.63%、20.52%、54.89% ( $P < 0.01$ ), 且蒽醌 (3) 和 (7) 抑制程度呈剂量依赖关系。

表 1 蒽醌对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用 (48 h,  $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 1 Inhibitory effect of anthraquinones on SMMC-7721 (48 h,  $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Anthraquinone	$\eta$ (%)							
	400 $\mu\text{mol/L}$	200 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$
1	4.41 $\pm$ 8.48	1.07 $\pm$ 8.18	1.78 $\pm$ 6.90	4.88 $\pm$ 7.68	6.18 $\pm$ 4.81	4.98 $\pm$ 6.33	10.24 $\pm$ 9.98	10.24 $\pm$ 4.59
2	4.12 $\pm$ 3.40	-2.43 $\pm$ 3.52	-1.59 $\pm$ 5.36	-3.56 $\pm$ 4.54	-3.99 $\pm$ 3.42	-4.70 $\pm$ 4.56	-3.81 $\pm$ 4.61	-1.42 $\pm$ 5.33
3	44.63 $\pm$ 3.76**	21.75 $\pm$ 4.42**	7.09 $\pm$ 5.35	0.42 $\pm$ 4.82	-0.82 $\pm$ 5.53	0.32 $\pm$ 5.36	0.14 $\pm$ 5.68	0.58 $\pm$ 4.26
4	0.38 $\pm$ 3.23	-5.01 $\pm$ 5.57	-4.43 $\pm$ 3.55	-5.86 $\pm$ 2.93	-5.45 $\pm$ 2.81	-5.14 $\pm$ 3.53	-4.57 $\pm$ 3.83	-5.47 $\pm$ 6.82
5	20.52 $\pm$ 3.66**	7.60 $\pm$ 2.82	-1.19 $\pm$ 3.73	3.76 $\pm$ 4.52	3.66 $\pm$ 2.69	-2.38 $\pm$ 3.66	-1.12 $\pm$ 5.63	-1.66 $\pm$ 2.91
6	-4.99 $\pm$ 5.39	4.33 $\pm$ 3.19	1.11 $\pm$ 5.58	2.45 $\pm$ 3.63	3.62 $\pm$ 4.09	2.31 $\pm$ 5.09	4.02 $\pm$ 2.68	4.91 $\pm$ 3.94
7	54.89 $\pm$ 2.96**	51.78 $\pm$ 3.86**	21.36 $\pm$ 5.55*	6.31 $\pm$ 3.58	1.74 $\pm$ 3.92	-2.35 $\pm$ 4.30	-1.59 $\pm$ 3.64	1.20 $\pm$ 3.55
8	2.29 $\pm$ 3.49	-0.09 $\pm$ 4.41	-0.78 $\pm$ 2.23	-0.09 $\pm$ 3.85	-2.59 $\pm$ 4.36	-0.72 $\pm$ 6.93	0.88 $\pm$ 5.12	1.31 $\pm$ 3.77

注: 与溶剂对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with solvent control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

根据 MTT 法的检测结果, 对蒽醌 (3)、(5) 和 (7) 作用 72 h 后的 SMMC-7721 细胞进行了形态学观察 (图 3)。从图 3 可以看出, 溶剂对照的细胞饱满舒展, 贴壁成片生长, 而蒽醌 (3)、(5)

和 (7) 都能使 SMMC-7721 细胞变圆, 体积减小, 且细胞大小不一, 数量减少, 说明这三种蒽醌在 400  $\mu\text{mol/L}$  时对 SMMC-7721 细胞增殖具有一定的抑制作用。

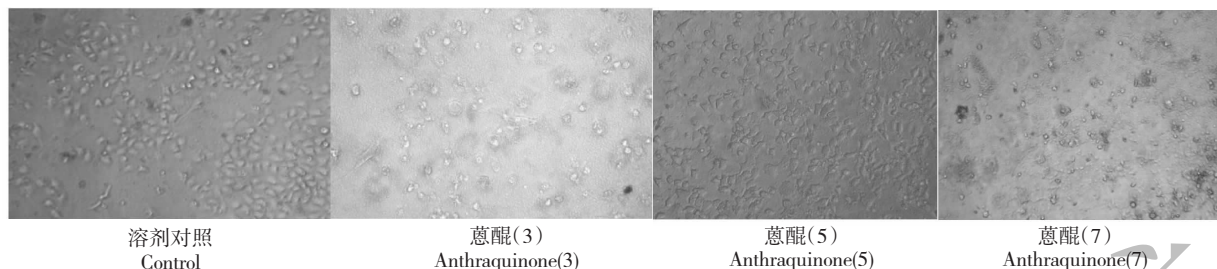


图3 蒽醌(3,5和7)对SMMC-7721细胞形态学的影响(400  $\mu\text{mol/L}$ , 48 h,  $\times 100$ )

Fig. 3 Effects of anthraquinones(3,5 and 7) on the morphology of SMMC-7721 cells(400  $\mu\text{mol/L}$ , 48 h,  $\times 100$ )

### 3 结论

目前,巴戟天中蒽醌的常用分离方法是将巴戟天的根先用乙醇提取,回收乙醇得浸膏,然后将浸膏用极性由小到大的有机溶剂依次进行萃取,得各个流分。由于蒽醌的极性相对较小,所以游离态的蒽醌多集中在极性较小的溶剂中,最后用硅胶柱反复层析得到各个蒽醌单体<sup>[15]</sup>。此种分离方法相对较繁琐,而在本实验中,作者根据对蒽醌类化合物在280 nm处有紫外吸收,利用柱层析结合制备液相对蒽醌类相对集中的两个流份(正己烷萃取物和乙酸乙酯萃取物)进行分离,制备液相检测器波长设定在280 nm,很容易就得到纯度相对较高的蒽醌单体,相对于单用硅胶柱层析,此方法简便可行,操作性强。

蒽醌类化合物作为天然醌类化合物中数量最多的一类化合物,其分布广泛(如百合科、豆科、茜草科、鼠李科和蓼科等),以前蒽醌主要被用作天然染料,后来蒽醌被发现具有许多药用价值和生物活性而受到重视。在抗菌方面,研究表明蒽醌类化合物能对各种细菌或真菌起到抑制或杀灭的作用<sup>[16]</sup>,如从茜草科植物海南染木树(*S. hainanense*)分离得到的1-羟基-3,6-二甲氧基-9,10-蒽醌和3-羟基-1-甲氧基-2-甲酯基-9,10-蒽醌对金黄色葡萄球菌具有很好的抑制作用,7-羟基-1,2-二甲氧基-6-甲基-9,10-蒽醌和虎刺醇对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌具有较强的抑制活性<sup>[27]</sup>。在抗氧化方面,崔剑等<sup>[18]</sup>在均相体系中利用紫外光谱法,研究了偶氮二异丁腈(AIBN)引发的亚油酸(LH)过氧化反应,发现蒽醌(AQ)、1,2-二羟基-9,10-蒽醌(AQ1, 2-OH)、1,8-二羟基-9,10-蒽醌(AQ1, 8-OH)对LH过氧化均有抑制作用;另外,龙远春等<sup>[19]</sup>采用1,1-二苯基-2-三硝基苯胂法、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐法、铁离子还原法对不同产地决明子总

蒽醌的体外抗氧化活性进行了测定。

此外,蒽醌类化合物还具有抗肿瘤活性。曾斐等<sup>[20]</sup>研究认为胡萝卜苷、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸等望江南中蒽醌类化合物均对肝癌HepG2的具有抑制作用,其中大黄酸药物干预组HepG2细胞凋亡比较明显,部分细胞核浓染呈亮蓝色,出现凋亡小体;李加宁等<sup>[21]</sup>研究了大黄素对体外人肺腺癌细胞增殖的抑制作用,认为一定范围内,大黄素的浓度越大、作用时间越长对肿瘤细胞生长的抑制作用越强,凋亡率也越高,且抑制作用具有时效和量效关系;Wang N等<sup>[22]</sup>认为茜草科植物白花蛇舌草的有效成分2-羟基-3-甲基蒽醌能够激活p-p38MAPK以促进人白血病细胞U937的凋亡,Shi Y等<sup>[23]</sup>的研究显示白花蛇舌草的两个蒽醌类成分(2-羟基-3-甲基蒽醌和1-甲氧基-2-羟基蒽醌)对肿瘤细胞SPC-1-A, Bcap37和HepG2增殖也具有抑制作用,且2-羟基-3-甲基蒽醌的抑制作用更强。

由此可见,蒽醌类化合物具有广泛的生物活性。高等植物中含蒽醌最多的是茜草科植物,其中巴戟天属植物几乎都含有蒽醌类化合物,具有重要的研究开发价值。通过本实验发现蒽醌(3)、(5)、(7)对肝癌细胞SMMC-7721增殖有明显的抑制作用,当蒽醌的浓度为400  $\mu\text{mol/L}$ 时,蒽醌(3)、(5)、(7)对肝癌细胞增殖的抑制率分别为44.63%、20.52%、54.89%,为巴戟天的药物开发及蒽醌类化合物的构效关系研究提供了依据。

### 参考文献

- 1 Yang F, Su YF, Zhao ZQ, et al. Anthraquinones and iridoids from *Morinda officinalis* [J]. Chem Nat Compd, 2016, 52: 989-991.
- 2 Yoshikawa M, Yamaguchi S, Nishisaka H, et al. Chemical constituents of Chinese natural medicine, morinda radix, the dried roots of *Morinda officinalis* How.; structures of morin-

- dolide and morofficaloside [J]. Chem Pharm Bull, 1995, 43:1462-1465.
- 3 Yong JP, Lu CZ, Huang SJ, et al. Chemical components isolated from the roots of *Morinda officinalis* [J]. Chem Nat Compd, 2015, 51:548-549.
- 4 Wu DF(吴冬凡), Fang ZJ(房志坚). Studies on the chemical constituents from *Morinda officinalis* How. extracted with petroleum ether [J]. Asia-Pacific Trad Med(亚太传统医药), 2009, 5:42-43.
- 5 Yang ZM(杨振民), Yi YT(伊永涛), Gao CC(高川川), et al. Isolation and identification of water\_soluble polysaccharide from *Morinda officinalis* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2011, 23:1-5.
- 6 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China Vol I(中华人民共和国药典) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005:55-56.
- 7 Liu Q, Kim SB, Ahh JH, et al. Anthraquinones from *Morinda officinalis* roots enhance adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells [J]. Nat Prod Res, 2012, 26:1750-1754.
- 8 Bao LL, Qin LP, Liu L, et al. Anthraquinone compounds from *Morinda officinalis* inhibit osteoclastic bone resorption in vitro [J]. Chem-Biol Interact, 2011, 94:97-105.
- 9 Wu YB, Zheng CJ, Qin LP, et al. Antiosteoporotic activity of anthraquinones from *Morinda officinalis* on osteoblasts and osteoclasts [J]. Molecules, 2009, 14:573-583.
- 10 Li B, Zhang DM, Luo YM, et al. Three new and antitumor anthraquinone glycosides from *Lasianthus acuminatissimus* MERR [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54:297-300.
- 11 Wijnsma R, Verpoorte R, Mulder-Krieger T, et al. Anthraquinones in callus cultures of *Cinchona ledgeriana* [J]. Phytochemistry, 1984, 23:2307-2311.
- 12 Zhao H, Biehl E. Preparation of naturally occurring anthraquinones using the aryne reaction [J]. J Nat Prod, 1995, 58:1970-1974.
- 13 Roberge G, B rassard P. Reactions of ketene acetals. 13. Synthesis of contiguously trihydroxylated naphtho- and anthraquinones [J]. J Org Chem, 1981, 46:4161-4166.
- 14 Frage BM, Quintana N, Díaz CE. Anthraquinones from natural and transformed roots of *Plocama pendula* [J]. Chem Biodivers, 2009, 6:182-192.
- 15 Yang YJ, Shu HY, Min ZD. Anthraquinones from *Morinda officinalis* and *Damnacanthus officinarum* Huang [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 1992, 27:358-364.
- 16 Deng LH, Xie Z, Mai LY, et al. Advances in studies on antibacterial activity and mechanism of anthraquinone compounds [J]. Chin J New Drug(中国新药杂志), 25:2450-2455.
- 17 Wang Y, Chen WH, Chen GY, et al. Anthraquinones from the leaves of *Saprosma hainanense* [J]. Chin J Org Chem(有机化学), 2014, 34:522-525.
- 18 Cui J, Li ZL, Hong XY, et al. Studies on the antioxidant of anthraquinone derivatives and  $\beta$ -carotene [J]. Acta Chimica Sinica(化学学报), 2004, 62:1095-1100.
- 19 Long YC, Zhang X, Wang GD, et al. Anthraquinone composition and antioxidant activity of *Semen Cassiae* from different regions [J]. Food Sci(食品科学), 2017, 38:145-151.
- 20 Zeng F, Li XF, Huang YS, et al. Extraction of anthraquinones in *Cassia occidentalis* L. and its intervention activity of liver cancer [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2016, 34:2031-2035.
- 21 Li JN, Lu FZ, Xiao JL, et al. Inhibitory effect of emodin on proliferation of human lung adenocarcinoma cells *in vitro* [J]. Chin J Integr Trad West Med(中国中西医结合杂志), 2015, 25:640-642.
- 22 Wang N, Li DY, Niu HY, et al. 2-hydroxy-3-methylanthraquinone from *Hedyotis diffusa* WILD induces apoptosis in human leukemia U937 cells through modulation of MAPK pathways [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36:752-758.
- 23 Shi Y, Wang CH, Gong XG. Apoptosis-inducing effects of two anthraquinones from *Hedyotis diffusa* WILD [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31:1075-1078.
- (上接第 86 页)
- 16 Wen QW, Lin X, Liu Y, et al. Phenolic and lignan glycosides from the butanol extract of *Averrhoa carambola* L. root [J]. Molecules, 2012, 17:12330-12340.
- 17 Zhao YX, Sun XY. Spectroscopic analysis of organic molecules(有机分子结构光谱鉴定) [M]. Beijing: Science Press 2003. 75-83.
- 18 Jong-Anurakkun N, Bhandari MR, Kawabata J.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*) [J]. Food Chem, 2007, 103:1319-1323.
- 19 Gao DF, Zhang YJ, Yang CR, et al. Phenolic antioxidants from green tea produced from *Camellia taliensis* [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56:7517-7521.
- 20 Min BS, Lee JP, Na MK, et al. A new naphthopyrone from the root of *Pleuropterus ciliinervis* [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51:1322-1324.