

云南美登木活性成分的研究

I. 抗癌成分美登素和美登普林的分离和鉴定

周韵丽 黄丽瑛 周倩如 蒋福祥 贺贤国
(中国科学院上海药物研究所)

李朝明 王 春 李炳钧
(中国科学院云南热带植物研究所, 昆明)

从云南美登木(*Maytenus hookeri* Loes) 茎中, 分得两个抗肿瘤活性很强的微量成分, 通过理化分析和紫外、红外、核磁共振谱及质谱测定, 分别证实为美登素(maytansine)和美登普林(maytanprine).

美登木为卫矛科 *Maytenus* 属植物, 分布在热带美洲, 非洲和亚洲. 1972 年 Kupchan 等^[1] 从埃塞俄比亚和肯尼亚收集的卵叶美登木(*M. ovatus*) 或称齿叶美登木(*M. serrata*) 中, 首次分得了结构新颖的微量成分美登素(maytansine, **1**) (0.2 mg/kg 干植物) 显示很强的抗肿瘤活性, 引起有关科学工作者的极大注意.

关于 *Maytenus* 属植物的研究, 国外曾做过 20 多种^[2], 但能分到美登素抗癌成分的, 只有卵叶美登木和布昌南美登木(*M. buchananii*) 两种^[3]. 此外, 能得到这一结构类型抗癌成分的植物是卫矛科的 *Putterlickia verrucosa*^[4] 和鼠李科的 *Colubrina texensis*^[5].

为了寻找高效、低毒的抗癌化合物, 在生物活性试验的基础上, 我们对云南美登木(*M. hookeri* Loes)^[6] 进行了活性成分的研究.

将云南美登木茎, 按下述提取分离流程图进行处理, 水液中析出结晶, 经检定为卫矛醇(dulcitol)^[7]. 四氯化碳层浓缩后加丙酮, 放置后有无色针状结晶析出, 用氯仿-丙酮重结晶, m. p. 为 244°C, 红外光谱: 1722, 1240 cm^{-1} 示有酰基存在. 此结晶经氢氧化钠醇溶液水解所得去乙酰基化合物, 用氯仿-丙酮重结晶后, m. p. 为 198°C, 对 Liebermann-Buchard 试剂呈阳性反应. 通过元素分析和红外光谱测定证实为 β -香树素(β -amyrin)^[7].

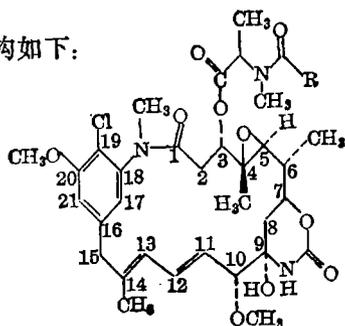
氯仿层生物试验活性明显. 此部分按流程图所示, 经二次氧化铝干柱层析, 氯仿为展开剂, 在 254 nm 紫外灯下将各色带进行分割, 并分别测定生物活性, 其中以 B-2 生物活性最强; B-2 部分通过硅胶柱层析(详见表), 流分 62~64 薄层层析鉴定基本显示为一个主要斑点(图 1), 经硅胶制备薄层层析进一步分离纯化, 在二氯甲烷-乙醚(1:1) 混合液中放置, 析出无色方板状结晶, 得率 0.15 ppm, m. p. 172°C, 重结晶后, m. p. 为 182°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{17.6} = -142.9^\circ$ (氯仿), 质谱 m/z 691(M^+), 630, 485, 470, 450, 128, 100. 通过紫外光谱、红外光谱和核磁共振谱的测定与文献[3]比较, 证实为美登素 **1**. 流分 52~61 薄层层析鉴定基本亦显示一个主要斑点, 但其比移值高于美登素(图 1). 通过高效液相层析分

1979 年 6 月 22 日收到.

离、纯化,在二氯甲烷-乙醚(1:1)中放置即有结晶析出, m. p. 为 170°C , 得率 0.08 ppm. 重结晶后, m. p. 为 178°C . 质谱 m/z 705(M^+), 644, 485, 470, 450, 142, 114. 通过紫外光谱、红外光谱和核磁共振谱的测定,与文献^[8]比较,证实为美登普林 2.

美登素和美登普林的抗肿瘤活性均很强,对小鼠腹水型肿瘤,在剂量为 20~25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时即有明显疗效^[9a]. 对水稻纹枯,油菜菌核、棉立枯病等几种主要作物病菌,也有很强的抑制作用^[9b].

美登素和美登普林的结构如下:



1 R=CH₃(maytansine) 2 R=C₂H₅(maytanprine)

提取分离流程图

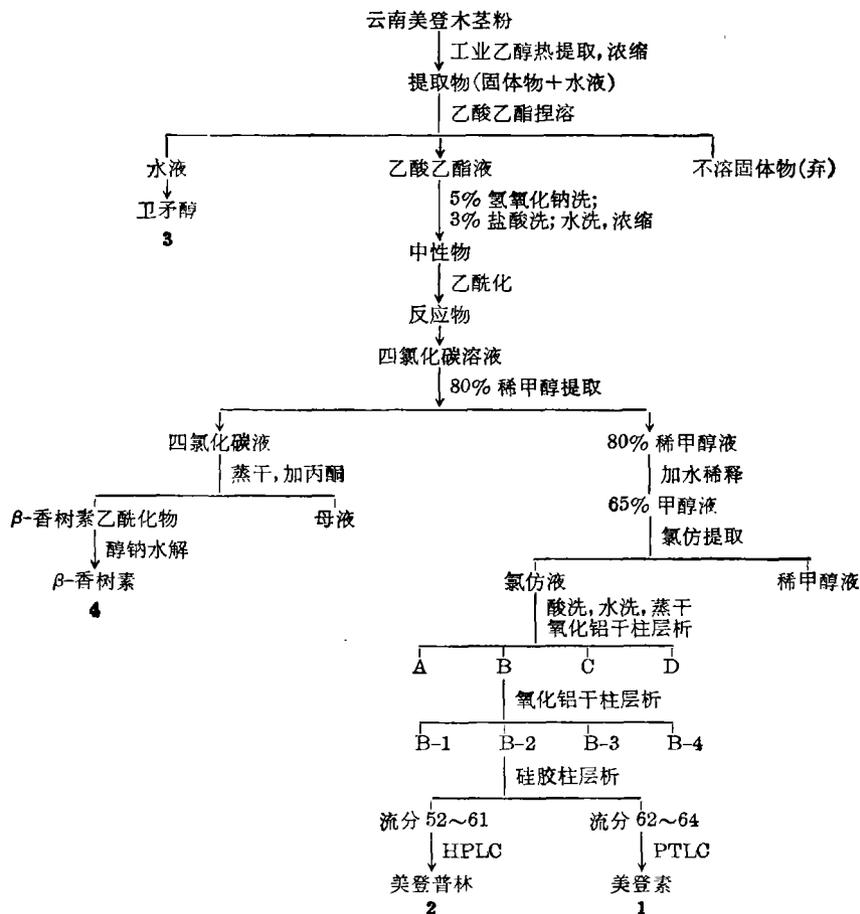


表 1 B-2 硅胶柱层析(流分经 TLC 检查*后合并)

流分编号	冲 洗 溶 剂	重量(g)	活性检查**	活性化合物
1~3	二氯甲烷	0.050	-	
4~6	二氯甲烷	0.100	-	
7~10	二氯甲烷	0.035	-	
11~15	二氯甲烷-甲醇(99:1)	0.060	-	
16~17	二氯甲烷-甲醇(99:1)	0.510	±	
18~19	二氯甲烷-甲醇(99:1)	0.330	±	
20~26	二氯甲烷-甲醇(99:1)	0.605	+	
27~28	二氯甲烷-甲醇(99:1)	0.600	++	
29~30	二氯甲烷-甲醇(99:1)	0.535	++	
31~41	二氯甲烷-甲醇(99:1)	0.345	++	
42~51	二氯甲烷-甲醇(98.5:1.5)	0.225	+++	
52~61	二氯甲烷-甲醇(98:2)	0.760	+++	2(美登普林)
62~64	二氯甲烷-甲醇(98:2)	0.451	+++	1(美登素)
65~70	二氯甲烷-甲醇(98:2)	0.070	+	
71~76	二氯甲烷-甲醇(97.5:2.5)	0.060	±	
77~79	二氯甲烷-甲醇(97.5:2.5)	0.050	-	
80~83	二氯甲烷-甲醇(97:3)	0.100	-	
84~89	二氯甲烷-甲醇(97:3)	0.370	-	
90~93	二氯甲烷-甲醇(97:3)	0.070	-	
94	甲醇	0.160	+	

* 吸附剂: 硅胶 GF₂₅₄; 展开剂: 乙酸乙酯-甲醇(97:3V/V); 254 nm 紫外灯检测。

** 用水稻纹枯、油菜菌核、棉立枯等植物病原真菌试验。

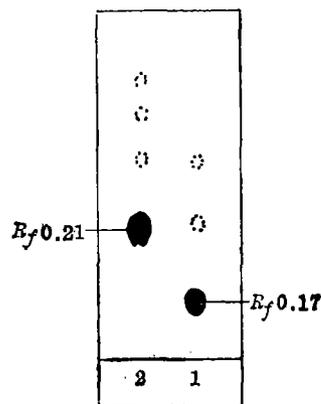


图 1 美登素及美登普林的薄层层析

1—美登素(流分 62~64);
2—美登普林(流分 52~61)

吸附剂: 硅胶 GF₂₅₄;
展开剂: 乙酸乙酯-甲醇
(97:3V/V);

254 nm 紫外灯检测

实 验

熔点用 Kofler 显微熔点测定仪测定, 未经校正; 紫外光谱用 SP-1800 型仪测定(溶剂为乙醇); 红外光谱用 SP-100 型仪测定(KBr 压片); 核磁共振谱系用 JNM-SP-100 型测定, TMS 为内标; 质谱用 MAT-711(Varian) 仪测定, 直接进样 EI, 70 eV; 高效液相层析系用自制 GYS-II 型仪, 层析柱为 $\phi 10 \times 150$ mm 的硅胶柱, 检测器为 254 nm 紫外检测器; 薄层层析吸附剂为硅胶 GF₂₅₄, 展开剂为乙酸乙酯-甲醇(97:3)。

一、中性物的提取

283 kg 云南美登木茎粗粉, 用 5 倍量的工业乙醇回流提取 4 次, 抽提液减压回收乙醇, 所得提取物加入乙酸乙酯多次捏溶, 合并乙酸乙酯液, 先用预冷的 5% 氢氧化钠液, 后用 3% 盐酸溶液进行液-液分配, 除去其中的酸性物和碱性物, 然后用水将乙酸乙酯液洗至中性, 减压蒸干得中性物 2.82 kg(得率约 1%)。

二、中性物的乙酰化

将前所得 2.82 kg 的中性物分作几份, 每份加一倍量吡啶及 1.2 倍量乙酸酐, 摇匀, 室温放置过夜, 减压抽干, 加四氯化碳溶解, 然后加入等体积 80% 稀甲醇进行分配, 分出四氯化碳层, 稀甲醇层再用四氯化碳振摇数次, 合并四氯化碳液, 用 80% 甲醇提取多次, 使能溶于稀甲醇的物质尽可能提出, 合并所有稀甲醇液, 加水稀释成 65%, 放置, 分出残

留的四氯化碳液,然后用氯仿提取多次.合并氯仿液,减压浓缩至小体积,用2%盐酸洗、水洗,干燥、蒸干,得淡黄色疏松粉质 117.5g(0.04% 干植物).

三、氧化铝干柱层析

将上述所得 117.5g 淡黄色疏松粉质分成若干份,每份 3.5g,用少量氯仿溶解后与 5 倍量氧化铝拌匀、凉干.取一直径为 3.2cm 的尼龙管,装入 245g 氧化铝,然后将吸附样品的氧化铝装于柱顶.以氯仿为展开剂,下行展开至下端.将尼龙管平放并在 254 nm 紫外灯下按不同色带切割成 4 段.合并各干柱层析切割后的相应氧化铝,用甲醇-氯仿(1:1)混合溶剂浸泡,过滤得 A, B, C, D 四个部分.经生物活性测定, B 部分(29.5g)活性最强.此部分薄层层析检查,在主色斑上下还示有其它斑点,因此,将 B 部分按上述操作,再进行一次氧化铝干柱层析,分出 B-1, B-2, B-3, B-4 四部分,活性测定以 B-2 部分最高,共得 4.85g.

四、B-2 部分的硅胶柱层析

4.85g B-2 溶于少量二氯甲烷中,加到用二氯甲烷湿装的 360g 硅胶柱(ϕ 3 cm)中,用二氯甲烷和不同比例的二氯甲烷-甲醇液洗脱,每份收集 300 ml.所有流分经薄层层析检查后合并(见前表).生物活性测定以流分 42~51, 52~61 和 62~64 为最强.

五、美登素(1)的分离和鉴定

上述流分 62~64 所得 0.451g 样品,以硅胶 HF₂₅₄ 为吸附剂,乙酸乙酯-甲醇(97:3 V/V)为展开剂进行制备薄层层析,在 254 nm 紫外灯下分割成四部分,分别用氯仿-甲醇(1:1)浸泡后滤出,减压蒸干,然后用二氯甲烷溶解,干燥、过滤.蒸去二氯甲烷得第一部分(原点) 27.6 mg,第二部分 149.5 mg,第三部分 153.4 mg,第四部分 104.8 mg,分别加入二氯甲烷-乙醚(1:1)混合溶剂,溶解后室温放置.几天以后在第二部分中析出板状结晶, m. p. 为 172°C.经几次重结晶后, m. p. 为 182°C, $[\alpha]_D^{17.6} = -142.9^\circ$ (c. 0.036, 氯仿).

紫外光谱 $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$: 233(s, 28900); 243(肩; s, 26800); 254(s, 26800); 281(s, 5280); 288(s, 5610) nm.

红外光谱(KBr): 1739, 1724, 1661, 1577, 1188, 1080 cm^{-1} .

核磁共振谱 δ 值(ODCl_3): 0.8(3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$), 1.30(3H, d, $J = 6$ Hz, $\text{C}_6\text{-CH}_3$), 1.32(3H, d, $J = 7$ Hz, $\text{C}_2\text{-CH}_3$), 1.64(3H, s, $\text{C}_{14}\text{-CH}_3$), 2.11(3H, s, $\text{C}_2\text{-NCOCH}_3$), 2.20(1H, dd, $J_{2,2} = 15$ Hz, $J_{2,3} = 12$ Hz, $\text{C}_2\text{-H}$), 2.60(1H, dd, $J_{2,2} = 15$ Hz, $J_{2,3} = 12$ Hz, $\text{C}_2\text{-H}$), 2.84(3H, s, $\text{C}_2\text{-NOCH}_3$), 3.02(1H, d, $J_{5,6} = 9$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 3.10(1H, d, $J_{15,15} = 13$ Hz, $\text{C}_{15}\text{-H}$), 3.18(3H, s, $\text{C}_1\text{-NCH}_3$), 3.35(3H, s, $\text{C}_{10}\text{-OCH}_3$), 3.44(1H, d, $J_{10,11} = 9$ Hz, $\text{C}_{10}\text{-H}$), 3.52(1H, s, $\text{C}_9\text{-OH}$), 3.64(1H, d, $J_{15,15} = 13$ Hz, $\text{C}_{15}\text{-H}$), 3.98(3H, s, $\text{C}_{20}\text{-OCH}_3$), 4.22(1H, m, $\text{C}_7\text{-H}$), 4.74(1H, dd, $J_{2,3} = 12$ Hz, $\text{C}_3\text{-H}$), 5.30(1H, q, $J = 7$ Hz, $\text{C}_2\text{-H}$), 5.62(1H, dd, $J_{10,11} = 9$ Hz, $J_{11,22} = 15$ Hz, $\text{C}_{11}\text{-H}$), 6.24(1H, s, $\text{C}_9\text{-NH}$), 6.40(1H, dd, $J_{11,12} = 15$ Hz, $J_{12,13} = 11$ Hz, $\text{C}_{12}\text{-H}$), 6.68(1H, d, $J = 11$ Hz, $\text{C}_{13}\text{-H}$), 6.75, 6.84(2H, d, $J = 1.5$ Hz, $\text{C}_{17}\text{-H}$, $\text{C}_{21}\text{-H}$), 1.10~2.5(3H, $\text{C}_6\text{-H}$, $\text{C}_8\text{-2H}$).

从以上理化数据和光谱分析证实是美登素(1).

六、美登普林(2)的分离和鉴定

上述流分 52~61 所得 0.76 g, 用高效液相层析分离. 收集主峰, 抽干后用二氯甲烷溶解, 过滤、干燥、蒸干, 加入新配的二氯甲烷-乙醚(1:1)混合溶剂, 溶解后室温放置. 析出结晶, m. p. 为 170°C, 重结晶后, m. p. 为 178°C, $[\alpha]_D^{25} - 126.9^\circ$ (c. 0.026, 氯仿).

紫外光谱 $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$: 233(ϵ , 32780); 242(ϵ , 30320); 254(ϵ , 29610); 282(ϵ , 5110), 290(ϵ , 4970) nm.

红外光谱(KBr): 1739, 1724, 1661, 1577, 1188, 1080 cm^{-1} .

核磁共振谱 δ 值: 与 1 比较, 少了一个 2.11(3H, s, $\text{C}_2-\text{NCOCH}_3$), 多一个 1.16(3H, t, 显示 $\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_3$), 其余均同于 1.

根据以上理化数据和光谱分析, 证实是美登普林(2).

七、卫矛醇(3)的鉴定

乙醇提取物加乙酸乙酯捏溶后分出的水液, 放置后析出的结晶, 用稀甲醇重结晶几次, m. p. 为 189°C.

红外光谱(KBr): 3235, 1624, 1466, 1385, 1351, 1295, 1205, 1112, 1075, 1043, 1029, 924, 861 cm^{-1} . 与 Sadtler 标准光谱(1044-B)全同.

八、 β -香树素(4)的鉴定

经 80% 稀甲醇提取后分出的四氯化碳液, 减压蒸干后所得黑色胶状残渣, 加丙酮溶解放置. 析出结晶, 过滤, 用氯仿-丙酮重结晶几次, 得到无色针状结晶, m. p. 为 244°C. 取 100 mg, 加入 10 ml 2% 氢氧化钠-乙醇液, 加热水解. 减压蒸干, 加水, 氯仿提取, 氯仿提取液用水洗至中性, 干燥, 蒸干. 固体置氯仿-丙酮中, 析出结晶, m. p. 为 197°C.

[分析] $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ 计算值: C, 84.44; H, 11.81. 实测值: C, 84.10; H, 11.44.

红外光谱(KBr): 3290, 2950, 1430, 1380, 1250, 1200, 1120, 1090, 1040, 1000, 820, 645 cm^{-1} .

上述理化数据和光谱分析, 与文献[7]报道的 β -amyrin 一致.

参 考 文 献

- [1] S. M. Kupchan, Y. Komoda, W. A. Court, G. J. Thomas, R. M. Smith, A. Karim, C. J. Gilmore, R. C. Haltiwanger, R. F. Bryan. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 1354 (1972).
- [2] R. Brüning, H. Wagner, *Phytochemistry* **17**, 1821 (1978).
- [3] (a) S. M. Kupchan, Y. Komoda, G. J. Thomas, H. P. J. Hintz, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1065 (1972); (b) S. M. Kupchan, Y. Komoda, A. R. Branfman, R. G. Dailey, Jr., V. A. Zimmerly, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 3706 (1974).
- [4] S. M. Kupchan, A. R. Branfman, A. T. Sneden, A. K. Verma, R. G. Dailey, Jr., Y. Komoda, Y. Nagao. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 5294 (1975).
- [5] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 390 (1973).
- [6] 中国科学院植物研究所《中国高等植物图鉴》第 2 册, 662 页, 科学出版社, 北京, 1972.
- [7] M. Tin-wa, N. R. Farnsworth, H. H. S. Fong, R. N. Blomster, J. Trojanek, D. G. Alraham, G. J. Persinos, O. B. Dokosi, *Lloydia* **34**, 79 (1971).
- [8] S. M. Kupchan, Y. Komoda, A. R. Branfman, A. T. Sneden, W. A. Court, G. J. Thomas, H. P. J. Hintz, R. M. Smith, A. Karim, G. A. Howie, A. K. Verma, Y. Nagao, R. G. Dailey, Jr., V. A. Zimmerly, William C. Sumner, Jr., *J. Org. Chem.* **42**, 2394 (1977).
- [9] (a) 中国科学院上海药物研究所药室室肿瘤组, 未发表; (b) 中国科学院上海药物研究所抗菌素室, 未发表.

**STUDIES ON THE ACTIVE PRINCIPLES OF
MAYTENUS HOOKERI LOES**

**I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION
OF TWO ANTITUMOR PRINCIPLES—
MAYTANSINE AND MAYTANPRINE**

ZHOU YUN-LI HUANG LI-YING ZHOU QIAN-RU JIANG FU-XIANG

HE XIAN-GUO

(*Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica*)

LI CHAO-MING WANG CHUN LI BING-JUN

(*Yunnan Institute of Tropical Botany, Academia Sinica, Kunming*)

ABSTRACT

Two minor but potent antitumor crystalline principles **1** and **2** have been isolated from the stems of *Maytenus hookeri* Loes. They show significant inhibitory activity against Ehrlich ascites tumor *in vivo* at the dosage of 20~25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ level. According to the chemical and spectroscopic data they were identified as maytansine and maytanprine respectively.