[分 析]

入侵植物飞机草的化学成分及其抗肿瘤活性

张丽坤^{1,2}, 罗都强^{3*}, 冯玉龙⁴, 董廷发^{1,5}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3. 河北大学, 河北 保定 071002; 4. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110866; 5. 中国科学院成都生物研究所,
四川 成都 610041)

摘要: 目的 分离、鉴定入侵植物飞机草叶片的化学成分, 探讨其对肿瘤细胞的抑制活性。方法 利用正相硅胶柱色谱、薄层色谱、羟丙基葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 和重结晶等方法对飞机草叶片乙醇提取物的乙酸乙酯萃取相进行分离纯化, 根据核磁共振波谱数据鉴定化合物的结构, 采用 MTT 法筛选具有抑制肿瘤细胞生长活性的化合物。结果 共分离鉴定出 11 个化合物, 分别为山柰酚-4'-甲基醚 (1)、金合欢素 (2)、异樱花素 (3)、 β -谷甾醇 (4)、烟筒花素 (5)、胡萝卜苷 (6)、5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基二氢黄酮 (7)、4,2'-二羟基-4',5',6'-三甲氧基查尔酮 (8)、飞机草素 (9)、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮 (10) 和 homohesperitin (11); 化合物 1、2、5、7 和 9~11 对乳腺癌细胞 (MCF-7)、人神经胶质瘤细胞 (U251)、肝癌细胞 (HepG2)、子宫颈癌细胞 (HeLa) 以及肺癌细胞 (A549) 有一定的抑制作用。结论 化合物 5、10、11 为首次从飞机草中分离得到; 化合物 2 和 7 对上述 5 种癌细胞的抑制活性强于阳性对照物顺铂。

关键词: 飞机草; 入侵植物; 黄酮类化合物; 查尔酮; 肿瘤细胞

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2013)03-0545-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2013.03.026

Chemical constituents of *Chromolaena odorata* and their anticancer activities

ZHANG Li-kun^{1,2}, LUO Du-qiang^{3*}, FENG Yu-long⁴, DONG Ting-fa^{1,5}

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China; 2. Graduate College of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Hebei University, Baoding 071002, China; 4. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 5. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the chemical constituents from the leaves of *Chromolaena odorata* as an invasive plant and their anticancer activity. **METHODS** Methanol extract of *Chromolaena odorata* was isolated and purified from the acetic ether part of the alcohol extract of leaves of *Chromolaena odorata* by column chromatography on Silica gel and Sephadex LH-20, Silica gel thin layer chromatography and recrystallization. Nuclear magnetic resonance technique was used to identify structures of the chemicals isolated. The anticancer activity of the chemicals was evaluated by MTT method. **RESULTS** Eleven compounds were isolated as kaempferide-4'-methoxy ether (1), acacetin (2), isosakurnaein (3), β -sitosterol (4), hortensin (5), daucosterol (6), 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxy dihydroflavone (7), 4,2'-dihydroxy-4',5',6'-trimethoxychalcone (8), odoratin (9), 3,5-dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone (10), homohesperitin (11). Compounds 1, 2, 5, 7 and 9~11 showed the abilities to inhibit human cancer cells including breast cancer cell line MCF-7, human glioma cell U251, hepatoma cell line HepGa2, cervical cancer hela cells and lung cancer line A549 *in vitro*. **CONCLUSION** Compound 5, 10 and 11 are isolated from *Chromolaena odorata* for the first time. Compound 2 and 7 perform more effective in anti-

收稿日期: 2012-06-29

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30830027); 中国科学院知识创新工程重要方向性项目 (KSCX2-YW-Z-A019)

作者简介: 张丽坤 (1985—), 女, 硕士生, 主要从事生物入侵生态学。E-mail: yndlzk@163.com

* 通信作者: 罗都强 (1965—), 男, 教授, 主要从事天然产物化学及农药活性研究。Tel: (0312) 5929898, E-mail: duqiangluo@163.com

cancer than cisplatin as a positive control.

KEY WORDS: *Chromolaena odorata*; invasive plant; flavonoids; chalcone; cancer cells

飞机草 *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King and H. Robinson 为菊科 (Compositae) 多年生草本植物, 是我国首批公布的恶性入侵杂草之一^[1], 其入侵能严重危害农林牧业生产和生物多样性安全, 恶化环境等^[2]。开发利用飞机草的药用价值是飞机草“变害为宝”的途径之一。《中华本草》记载, 飞机草具有散瘀消肿、解毒以及止血功效, 是我国民间常用草药^[3]。研究发现, 飞机草叶片提取物中的木犀草素和刺槐素对人肺癌细胞 NCI-H187 具有中等抑制活性, 木犀草素还对人体肺癌细胞 BC 具有毒性^[4]。对飞机草化学成分的研究已有很多报道^[1,4-5], 但对其所含化学成分的药理药效研究还很少。为了筛选更多的生物活性物质以及更有效地开发飞机草的药用价值, 本实验对飞机草叶片的化学成分及其对肿瘤细胞的抑制活性进行了研究。

1 仪器与材料

Bruker AM-400/500 核磁共振仪 [TMS (四甲基硅烷) 为内标]; 柱色谱硅胶及薄层色谱硅胶 (GF₂₅₄ 10~40 μm, 200~300 目, 烟台江友硅胶开发有限公司); Sephadex LH-20 (25~100 μm, GE Healthcare Co., Ltd., Sweden)。所用有机试剂均为分析纯。飞机草叶片于 2011 年 1 月采于中国科学院西双版纳热带植物园。乳腺癌细胞 (MCF-7)、人神经胶质瘤细胞 (U251)、肝癌细胞 (HepG2)、子宫颈癌细胞 (HeLa) 以及肺癌细胞 (A549) 由河北大学药物化学与分子诊断重点实验室提供。

2 提取与分离

取飞机草叶片 5.5 kg, 室温阴干、粉碎, 用 150 L 95% 乙醇浸提 4 次, 每次 7 d, 合并提取液, 减压回收乙醇得浸膏 1.5 kg。将浸膏悬浮于 1 000 mL 水 (20 ℃) 中, 用 5 倍体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 得乙酸乙酯部分 184 g。取乙酸乙酯部位, 硅胶柱色谱分离, 石油醚-乙酸乙酯 (100:0→20:80) 梯度洗脱, 用薄层色谱检测, 合并相似组分, 得到 G1、G2、G3、G4 和 G5 五个组分。小极性组分 G1 (石油醚洗脱) 和大极性组分 G5 (甲醇洗脱) 经薄层色谱无明显主点, 未进行分离。G2 组分 [石油醚-乙酸乙酯 (90:10) 洗脱部分; 64 g] 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (100:0

→5:1) 为流动相, 分得 G2a、G2b 和 G2c 三个亚组分。G2a 重结晶得化合物 1 (1.5 g), 用凝胶色谱分离得化合物 5 (80 mg)。G2b 继续用柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (100:0→2:1) 依次洗脱得化合物 10 (8 mg) 和 9 (35 mg)。G2c 用重结晶和薄层色谱分离得化合物 3 (167 mg)。G3 [石油醚-乙酸乙酯 (6:1) 洗脱部分; 84 g] 重结晶得化合物 2 (89 mg), 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (9:1→1:1) 为流动相得 G3a 和 G3b 两个组分, G3a 用硅胶柱色谱洗脱得化合物 8 (67 mg); G3b 经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 分离得到化合物 7 (56 mg) 和 11 (67 mg)。G4 经石油醚-乙酸乙酯 (3:1) 洗脱部分, 重结晶得化合物 4 (16 mg) 和 6 (38 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: C₁₆H₁₂O₅, 黄色雪花状结晶, ¹H-NMR (600 MHz CD₃OD) δ: 6.29 (1 H, br d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.45 (1 H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 8.16 (2 H, dd, J = 1.2, 8.8 Hz, H-2', H-6'), 7.04 (2 H, dd, J = 1.2, 8.8 Hz, H-3', H-5'), 3.89 (3 H, s, OCH₃)。 ¹³C-NMR 数据见表 1。以上数据与文献 [16] 报道一致, 故鉴定为山柰酚-4'-甲基醚。

化合物 2: C₁₆H₁₂O₅, 黄色粉末, ¹H-NMR (600 MHz CDCl₃) δ: 6.85 (1 H, s, H-3), 6.21 (1 H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 6.51 (1 H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 8.03 (2 H, d, J = 9.0 Hz, H-2' H-6'), 7.12 (2 H, d, J = 9.0 Hz, H-3', H-5'), 3.86 (3 H, s, 4'-OCH₃)。 ¹³C-NMR 数据见表 1。以上数据与文献 [10] 报道一致, 故鉴定为金合欢素。

化合物 3: C₁₆H₁₄O₅, 白色针状结晶, ¹H-NMR (600 MHz CDCl₃) δ: 7.40 (2 H, d, J = 9 Hz, H-2', H-6'), 6.97 (2 H, d, J = 9 Hz, H-3', H-5'), 6.02 (1 H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 6.00 (1 H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 5.38 (1 H, dd, J = 2.5, 12.5 Hz, H-2), 3.12 (1 H, dd, J = 12.5, 17.0 Hz, H-3α), 2.78 (1 H, dd, J = 2.5 Hz, 17 Hz, H-3β), 3.86 (3 H, s, 4'-OCH₃)。 ¹³C-NMR 数据见表 1。以上数据与文献 [5] 报道一致, 故鉴定为异樱花素。

表 1 化合物 1、2、3、5 和 7-11 的¹³C-NMR (600 MHz) 数据
Tab. 1 ¹³C-NMR (600 MHz) data of compounds 1-3, 5, and 7-11

C	化合物							C	化合物	
	1	2	3	5	7	10	11		8	9
2	146.3	146.2	78.1	152.7	79.1	145.7	78.9	1	128.3	128.2
3	136.1	103.5	41.9	131.3	43.2	135.6	43.2	2	130.4	130.2
4	176	181.8	196.2	182.1	196.8	175.1	195.9	3	116	114.5
5	160.8	162.3	163.5	103	154.2	160.8	163	4	160	161.6
6	98.3	98.9	95.8	163.2	128.2	97.9	95.1	5	116	114.5
7	164	163.3	166.6	162.2	157.3	165.7	165.6	6	130.4	130.2
8	93.6	94	94.9	94.2	94.5	92.2	96.7	α	143.3	143.4
9	156.3	157.3	162.8	152.4	158.5	156.8	163.5	β	124.1	124.1
10	103.2	103.7	101.8	104.1	103	103.9	103.2	CO	192.9	192.9
1'	123.3	122.8	130.6	122.8	130.2	123.1	131.6	1'	108.8	108.8
2'	129.4	128.3	128.2	128.2	127.6	128.8	110.7	2'	162.6	162.6
3'	114.1	114.6	113.8	114.5	114.1	114	146.9	3'	135.3	135.3
4'	160.5	161.4	159.4	157.2	159.9	161.1	145.7	4'	155	155
5'	114.1	114.6	113.8	114.5	114.1	114	112.7	5'	96.6	96.6
6'	129.4	128.3	128.2	128.2	127.6	128.8	118.2	6'	157.8	160
OCH ₃	55.4	55.5	55.2	59.9	60.9	55.8	55.7	OCH ₃	56.1	55.4
				55.5	55.4	55.4	56.1		61.3	56.1
									61.9	61.3
										61.9

化合物 4: 分子式 C₂₉H₅₀O, 白色针状晶体 (CHCl₃), 与 β-谷甾醇对照品共薄层, 其 R_f 值一致, 鉴定为 β-谷甾醇。

化合物 5: C₁₇H₁₄O₆, 黄色粉末, ¹H-NMR (600 MHz DMSO) δ: 8.03 (2 H, d, J = 9 Hz, H-2', H-6'), 7.11 (2 H, d, J = 9 Hz, H-3', H-5'), 6.85 (1 H, s, H-8), 6.62 (1 H, s, H-5), 3.86 (3 H, s, 6-OCH₃), 3.75 (3 H, s, 7-OCH₃), ¹³C-NMR 数据见表 1。以上数据和文献 [19] 一致, 故鉴定为烟筒花素。

化合物 6: C₃₅H₆₀O₆, 白色无定形粉末 (吡啶), 与胡萝卜苷对照品共薄层, 其 R_f 值与已知对照品对照相同, 混合熔点不下降, 确定为胡萝卜苷。

化合物 7: C₁₇H₁₆O₆, 白色粉末, ¹H-NMR (600 MHz CDCl₃) δ: 7.40 (2 H, d, J = 9 Hz, H-2', H-6'), 6.98 (2 H, d, J = 9 Hz, H-3', H-5'), 6.13 (1 H, s, H-8), 5.38 (1 H, dd, J = 3.2, 12.4 Hz, H-2), 3.11 (1 H, dd, J = 12.5 Hz, 17.0 Hz, H-3α), 2.82 (1 H, dd, J = 2.5 Hz, 17 Hz, H-3β), 3.97 (3 H, s, 6-OCH₃), 3.86 (3 H, s, 4'-OCH₃), ¹³C-NMR 数据见表 1。以上数据与文献 [16] 对照一致, 故鉴定为 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基二氢黄酮。

化合物 8: C₁₈H₁₈O₆, 橘红色针状结晶, ¹H-

NMR (600 MHz CDCl₃) δ: 13.78 (1 H, s, 2'-OH), 7.86 (1 H, d, J = 15 Hz, H-β), 7.84 (1 H, d, J = 15 Hz, H-α), 7.58 (2 H, d, J = 9 Hz, H-2, H-6), 6.91 (2 H, d, J = 9 Hz, H-3, H-5), 6.32 (1 H, s, H-3'), 3.94 (3 H, s, 4'-OCH₃), 3.91 (3 H, s, 6'-OCH₃), 3.86 (3 H, s, 5'-OCH₃), ¹³C-NMR 数据见表 1。以上数据和文献 [4] 对照一致, 故鉴定其为 4,2'-二羟基-4',5',6'-三甲氧基查尔酮。

化合物 9: C₁₉H₂₀O₆, 橘红色针状结晶, ¹H-NMR (600 MHz CDCl₃) δ: 13.78 (1 H, s, 2'-OH), 7.86 (1 H, d, J = 15 Hz, H-β), 7.84 (1 H, d, J = 15 Hz, H-α), 7.60 (2 H, d, J = 9 Hz, H-2, H-6), 6.96 (2 H, d, J = 9 Hz, H-3, H-5), 6.31 (1 H, s, H-3'), 3.94 (3 H, s, 4'-OCH₃), 3.91 (3 H, s, 6'-OCH₃), 3.87 (3 H, s, 5'-OCH₃), 3.85 (3 H, s, 4-OCH₃), ¹³C-NMR 数据见表 1。以上数据和文献 [5] 对照一致, 故鉴定其为飞机草素。

化合物 10: C₁₇H₁₄O₆, 黄色粉末, ¹H-NMR (600 MHz CDCl₃) δ: 8.19 (2 H, d, J = 9 Hz, H-2', H-6'), 7.05 (2 H, d, J = 9 Hz, H-3', H-5'), 6.50 (1 H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 6.40 (1 H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 3.95 (3 H, s, 7-OCH₃), 3.90 (3 H, s, 4'-OCH₃), ¹³C-NMR 数据见表 1。以上数据和文献 [17] 一致, 故鉴定为 3,5-二羟基-7,

4'-甲氧基黄酮。

化合物 11: $C_{17}H_{14}O_6$, 白色结晶, 1H -NMR (600 MHz $CDCl_3$): 12.0 (br s, 5-HO), 7.06 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.95 (1 H, d, $J=10.0$ Hz, H-6'), 6.90 (1 H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.09 (2 H, d, $J=2.0$ Hz, H-6, H-8), 5.36 (1 H, dd, $J=2.5, 12.5$ Hz, H-2), 3.94 (3 H, s, 4'-OCH₃), 3.83 (3 H, s, 3'-OCH₃), 3.09 (1 H, dd, $J=14.0; 12.0$ Hz, H-3 α), 2.79 (1 H, dd, $J=14.0, 3.0$ Hz, H-3 β), ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上数据和文献 [18] 报道一致, 故鉴定其为 homohesperetin。

4 活性筛选

采用 MTT 法^[19], 对除胡萝卜苷和 β -谷甾醇外的其他化合物进行了抗肿瘤活性鉴定, 发现化合物 1、2、5、7 和 9~11 对乳腺癌细胞 (MCF-7)、人神经胶质瘤细胞 (U251)、肝癌细胞 (HepG2)、子宫颈癌细胞 (HeLa) 以及肺癌细胞 (A549) 均有一定的抑制作用, 其中化合物 2 和 7 对 5 种肿瘤细胞的体外抑制活性均高于阳性对照物顺铂。3 和 8 两种化合物 48 h 的半抑制浓度值 (IC_{50}) 均大于 40 $\mu\text{mol/mL}$, 可能对肿瘤细胞没有抑制作用。见表 2。

表 2 化合物 1、2、3、5 和 7-11 体外肿瘤细胞抑制活性筛选结果

Tab. 2 Inhibitory activities of compounds 1, 2, 3, 5, and 7-11 against human cancer cells *in vitro*

化合物	48 h 的半抑制浓度 IC_{50} / ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	MCF-7	U251	HepG-2	Hela	A549
1	17.41	75.1	18.30	23.62	32.17
2	0.029	0.651	1.283	0.048	4.097
3	251.6	132.2	124.2	125.1	117.6
5	32.52	14.69	13.36	17.56	19.33
7	0.753	2.565	2.886	0.083	1.077
8	46.05	57.88	87.67	55.98	105.4
9	29.74	10.73	20.57	20.96	11.89
10	29.12	18.51	33.06	21.03	17.51
11	18.38	17.62	33.30	20.46	12.84
DPP (顺铂)	0.126	1.637	2.045	0.378	9.288

参考文献:

[1] 丁智慧, 张学媚, 刘吉开, 等. 飞机草中的化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 22-24.
[2] 张黎华, 冯玉龙. 外来入侵杂草的生物防治及生防因子对本地非目标种的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(2): 802-809.

[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
[4] Suksamran A, Chotipong A, Suavansri T, et al. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata* [J]. *Acrh Pharm Res*, 2004, 27(5): 507-511.
[5] Bose P K, Chakrabarti P, Chakravarti, et al. Flavonoid constituents of *Eupatorium odoratum* L[J]. *Photochemistry*, 1973, 12(3): 667-668.
[6] Huang H L, Wang C M, Wang Z H, et al. Tirucallane-type triterpenoids from *Dysaxylum lenticellatum* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(10): 2235-2242.
[7] Barua R N, Sharma R P, Thyacsarajan G, et al. Flavonoids of *Chromolaena odorata* [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17(10): 1807-1808. doi: 10.1016/s0031-9422(00)88710-5.
[8] Garvalho M G, Costa P M, Abreu H S. Flavanones from *Vernonia diffusa* [J]. *J Braz Chem Soc*, 1999, 10(2): 162-166.
[9] Rossi M H, Yoshida M, Miaia J G S. Neolignans, styrylprones and flavonoids from an Aniba Species [J]. *Phytochemistry*, 1993, 45(6): 1263-1269.
[10] Wollenweber E, Dorr M, Munlappant R. Exudate flavonoids in a tropical weed, *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King ET H. Robinson [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1995, 23(7/8): 873-874.
[11] Wollenweber E, Roitman J N. Novel methyl ether of quercet-agenin from *Chromolaena odorata* leaf exudate [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1996, 24(5): 479-480.
[12] Apori S O, Long R J, Castro F B, et al. Chemical composition and nutritive value of leaves and stems of tropical weed *Chromolaena odorata* [J]. *Grass and forage Science*, 2000, 55(1): 1771-1773.
[13] Harborne J B, Williams C A. The flavonoids: advances in research [M]. London, New York: Chapman and Hall, 1982.
[14] 袁经权, 杨峻山, 缪剑华. 飞机草化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1771-1773.
[15] Pisutthanan N, Liawruangrath S, Bremner J B. A new flavonoid from *Chromolaena odorata* [J]. *Nat Prod Res*, 2006, 20(13): 1192-1198.
[16] Pisutthanan N, Liawruangrath S, Bremner J B, et al. Chemical constituents and biological activities of *Chromolaena odorata* [J]. *Chiang Mai Journal Science*, 2005, 32(2): 139-148.
[17] Srinivasa R K, Chaudhury P K, Pradhan A. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(2): 729-732.
[18] Chakraborty A K, Rambhade S, Patil U K. *Chromolaena odorata* (L.): An overview [J]. *J Pharm Res*, 2011, 4(3): 573-576.
[19] Ohtsuki T, Hiraka T, Kikuchi H, et al. Flavonoids from *Eupatorium odoratum* with death receptor 5 promoter enhancing activity [J]. *Heterocycles*, 2009, 77(2): 1379-1388.