

• 化学成分 •

马甲子的化学成分研究

武蕊娟^{1,2}, 宋联强³, 谭 镭², 詹 雁², 阮 佳², 徐超群^{2*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075

2. 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041

3. 北京以岭药业有限公司, 北京 102600

摘要: 目的 研究马甲子 *Paliurus ramosissimus* 的化学成分。方法 马甲子乙醇提取物通过反复硅胶柱色谱和高效液相色谱等方法进行分离纯化, 根据理化性质及 NMR、MS 等波谱技术对化合物进行结构鉴定。并采用 MTT 法对新化合物 **2** 进行体外抗肿瘤活性实验。结果 从马甲子乙醇提取物中分离得到 2 个化合物, 分别鉴定为白桦脂酸 (**1**) 和 2 α ,27-二反式对羟基肉桂酰氧基白桦脂酸 (**2**)。化合物 **2** 对 HepG-2 细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 分别为 20.34、14.83 μ mol/L。结论 化合物 **2** 为新化合物, 命名为马甲子素, 属于白桦脂酸型五环三萜类化合物, 化合物 **1** 和 **2** 均为首次从本植物中发现, 化合物 **2** 表现出显著的体外抗肿瘤活性。

关键词: 马甲子; 白桦脂酸; 马甲子素; 五环三萜; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)19-2834-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.002

Chemical constituents from *Paliurus ramosissimus*WU Rui-juan^{1,2}, SONG Lian-qiang³, TAN Lei², ZHAN Yan², RUAN Jia², XU Chao-qun²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

3. Beijing Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 102600, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents in the ethanol extract from *Paliurus ramosissimus*. **Methods** The compounds were isolated and purified by repeated silica gel column chromatographies and HPLC. The structures of the compounds were identified on the basis of chemical and spectral methods of NMR, MS, etc. Combined with the MTT method, the inhibitory effect of compound **2** *in vitro* against the HepG-2 and HeLa cells was assayed. **Results** Two new compounds were isolated from *P. ramosissimus* and identified as betulinic acid (**1**) and 2 α ,27-di (*E-p*-hydroxy cinnamoyloxy)-betulinic acid (**2**) for the first time. The IC₅₀ values of compound **2** are 20.34 and 14.83 μ mol/L against the HepG-2 and HeLa cells. **Conclusion** Compound **2** is a new compound named as paliurusene, which belongs to triterpenoids and shows the obvious cytotoxicity *in vitro* against the cancer cell lines.

Key words: *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; betulinic acid; paliurusene; pentacyclic triterpenoids; anti-tumor activity

马甲子 *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. 系鼠李科 (Rhamnaceae) 马甲子属 *Paliurus* Mill. 植物, 又名铁篱笆、铜钱树。在我国长江流域以南各省均有分布, 多生于丘陵林边灌丛中或荒山草地上。其根、果实、叶均可供药用, 根能除寒活血、解热消肿, 治疗跌打损伤及心腹疼痛; 果实能化瘀止血、

活血止痛, 我国台湾省民间用于治疗牙痛和腹痛^[1]; 叶能治疗无名肿痛, 民间多用于治疗疮疡等。也有报道证实马甲子醇提物具有镇咳祛痰的功效^[2]。国内外目前还未见有关马甲子活性成分的报道。本实验从马甲子中提取出 2 个单体化合物, 分别为白桦脂酸 (betulinic acid, **1**) 和 2 α ,27-二反式对羟基

收稿日期: 2015-06-10

基金项目: 四川省科技支撑计划 (15ZC1978); 四川省科研院所科技成果转化资金项目 (14010139); 四川省公益性科研院所基本科研业务专项

作者简介: 武蕊娟 (1989—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药新药与新型给药系统。Tel: 18384256141 E-mail: 344354319@qq.com

*通信作者 徐超群 (1964—), 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药新药与新型给药系统。

Tel: (028)85213973 E-mail: chaoqun_xu@sina.com

肉桂酰氧基白桦脂酸 [2 α ,27-di (*E*-*p*-hydroxy cinnamoyloxy)-betulinic acid, **2**]。其中化合物 **2** 为新化合物,命名为马甲子素,属于白桦脂酸型五环三萜类化合物。化合物 **1** 和 **2** 均为首次从本植物中发现。化合物 **2** 表现出显著的体外抗肿瘤活性,对 HepG-2 细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 分别为 20.34、14.83 μ mol/L。

1 材料与仪器

柱色谱硅胶(100~200、300~400 目)和薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂产品);Bruker Avance 600 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);VG-7070 质谱仪(英国 VG 公司);制备液相色谱系统(安捷伦 1200 系列);YMC-Pack ODS-A C₁₈ 柱;Sartorius BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);Mettler Toledo 超越系列专业型 XS 分析天平(梅特勒-托利多有限公司);XMTD-8222 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);FZ102 粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司);安捷伦 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),试剂均为分析纯。DMEM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司,美国);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、青霉素、链霉素(Amresco 公司,美国);胰蛋白酶(Gibco 公司,美国);人肝癌细胞 HepG-2、人宫颈癌细胞 HeLa(四川大学华西药学院靶向药物及释药系统教育部重点实验室提供);Thermo Forma 系列 CO₂ 培养箱(Sanyo,日本);Model-550 型酶联免疫检测仪(Bio-Rad,美国);SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州市净化设备总厂);倒置显微镜(型号 Fx-35DX, Nikon);离心机(型号 TGL-16G,上海医用分析仪器厂)。

实验用马甲子(多年生)于 2013 年 7 月采自四川省双流县牧马山,经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为鼠李科马甲子属植物马甲子 *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.。

2 方法

2.1 提取与分离^[3-4]

取马甲子 3 kg,粉碎后,用 95%乙醇 10 倍量浸泡 3 d 后,收集浸提液,减压浓缩得浸膏 225 g,浸膏用 20%乙醇液 3 L 进行超声溶解,用醋酸乙酯萃取,得到醋酸乙酯提取物(72.4 g),再经硅胶柱色谱分离,石油醚-醋酸乙酯系统(20:1、15:1、5:1、3:1、1:1)依次洗脱,得到 5 个组分 Fr. A~E。取一半量的 Fr. E(石油醚-醋酸乙酯 1:1)洗脱组分,经反复硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇(15:1)、

石油醚-醋酸乙酯(4:1)洗脱,TLC 检查,收集主要流分浓缩后重结晶,用石油醚溶解后有白色絮状结晶生成,减压干燥得化合物 **2** (99.8 mg);取另一半量的 Fr. E 洗脱组分,经硅胶柱色谱分离,再用制备液相色谱进一步纯化(YMC-Pack ODS-A C₁₈ 柱,流动相为 3%醋酸水溶液-乙腈),得化合物 **1** (65.1 mg)。

2.2 抗肿瘤活性检测

按文献方法^[5]复苏 HepG-2 和 HeLa 细胞,常规培养。取对数生长期细胞,用含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基配制 1×10^5 个/mL 单细胞悬液,接种于 96 孔板中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养至细胞贴壁后,加入不同浓度的化合物 **2**,终浓度分别为 108、81、54、22、16、10 μ mol/L,设阳性对照(0.025 mg/mL 5-Fu 注射液,天津金耀氨基酸有限公司,批号 1405221)、阴性对照(含 0.75%异丙基的 DMEM 培养基)、空白对照组(含 10%FBS 的 DMEM 培养基),复孔 4 个,继续培养 48 h。吸去上清液,用含 0.5 mg/mL MTT 的无血清 DMEM 孵育 3 h 后,弃上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,在酶标仪上于 490 nm 处检测吸光度(A)值。实验重复 3 次。按下列公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}})$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色针状晶体(甲醇),mp 292~294 $^{\circ}$ C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 12.1^{\circ}$ (*c* 0.582, MeOH)。由 HR-ESI-MS 得到分子式为 C₃₀H₄₈O₃ (*m/z* 455.261 5 [M-H]⁻, 计算值 455.352 5)。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.61 (1H, brs, H-29a), 4.47 (1H, brs, H-29b), 3.19 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.8 Hz, H-3 α), 0.96 (3H, s, H-23), 0.75 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-25), 0.82 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-27), 1.69 (3H, s, H-30); ¹³C-NMR (150MHz, DMSO-*d*₆) 数据见表 1。以上数据与文献报道一致^[4],故鉴定化合物 **1** 为白桦脂酸。

化合物 **2**: 土黄色粉末状固体(甲醇),mp 205~208 $^{\circ}$ C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 14.3^{\circ}$ (*c* 0.472, MeOH),由 HR-ESI-MS 得到分子式为 C₄₈H₆₀O₉ (*m/z* 779.417 3 [M-H]⁻, 计算值为 779.415 9)。IR 光谱显示分子含有羟基(3 450 cm⁻¹)和羰基(1 732 cm⁻¹)等官能团。¹³C-NMR 谱数据显示该化合物有 48 个碳,由 ¹H-NMR 谱数据(表 1)显示的芳氢和烯氢质子信号 δ 7.55 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, H-2', 6'), 6.80 (2H, d, *J* =

表1 化合物1和2的¹H-NMR (600 MHz) 和¹³C-NMR (150 MHz) 数据 (DMSO-*d*₆)
 Table 1 ¹H-NMR (600 MHz) and ¹³C-NMR (150 MHz) data of compounds 1 and 2 (DMSO-*d*₆)

碳位	化合物 1		化合物 2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	39.1 (t)	1.19 (dt, $J = 13.8, 3.0$ Hz)	43.8 (t)	1.94 (m), 0.96 (m)
2	28.0 (t)	1.56 (m), 1.56 (m)	72.2 (d)	4.90 (m)
3	78.0 (d)	3.19 (dd, $J = 11.4, 4.8$ Hz)	78.1 (d)	3.09 (dd, $J = 5.5, 5.5$ Hz)
4	39.3 (s)		39.5 (s)	
5	55.7 (d)	0.68 (overlapped)	54.5 (d)	0.87 (overlapped)
6	18.6 (t)	1.40 (m)	18.0 (t)	1.35 (m)
7	34.6 (t)		34.6 (t)	1.48 (m)
8	40.9 (s)		41.1 (s)	
9	50.8 (d)	1.26 (m)	50.8 (d)	1.38 (m)
10	37.4 (s)		38.2 (s)	
11	21.1 (t)	1.24 (m)	20.7 (t)	1.65 (m)
12	25.9 (t)	1.30 (m), 1.68 (m)	24.7 (t)	1.64 (m)
13	38.4 (d)	2.20 (dt, $J = 12.2, 3.6$ Hz)	38.3 (d)	2.40 (dt, $J = 12.0, 3.5$ Hz)
14	42.7 (s)		45.2 (s)	
15	31.0 (t)		23.6 (t)	1.75 (m), 1.30 (m)
16	32.7 (t)		32.1 (t)	2.11 (m), 1.30 (m)
17	56.4 (s)		55.1 (s)	
18	47.4 (d)	3.06 (td, $J = 11.4, 5.4$ Hz)	48.8 (d)	1.67 (overlapped)
19	49.6 (d)	1.61 (t, $J = 11.4$ Hz)	46.5 (d)	2.96 (m)
20	151.0 (s)		150.0 (s)	
21	30.1 (t)	1.42 (m), 1.97 (m)	30.0 (t)	1.79 (m), 1.27 (m)
22	37.3 (t)	1.97 (m)	36.1 (t)	1.81 (m), 1.38 (m)
23	28.5 (q)	0.96 (s)	28.4 (q)	0.91 (s)
24	16.1 (q)	0.75 (s)	16.1 (q)	0.73 (s)
25	16.2 (q)	0.94 (s)	16.8 (q)	0.92 (s)
26	16.3 (q)	0.82 (s)	17.4 (q)	0.92 (s)
27	14.8 (q)	0.98 (s)	62.1 (t)	4.51 (d, $J = 12.8$ Hz), 4.47 (d, $J = 12.8$ Hz)
28	178.8 (s)		177.2 (s)	
29	109.7 (t)	4.61 (brs), 4.47 (brs)	109.7 (t)	4.70 (brs), 4.58 (brs)
30	19.4 (q)	1.69 (s)	19.0 (q)	1.69 (s)
1'			125.0 (s)	
2'			130.0 (d)	7.55 (d, $J = 7.7$ Hz)
3'			115.8 (d)	6.80 (d, $J = 7.7$ Hz)
4'			159.8 (s)	
5'			115.8 (d)	6.80 (d, $J = 7.7$ Hz)
6'			130.0 (d)	7.55 (d, $J = 7.7$ Hz)
α			144.6 (d)	7.54 (d, $J = 16.1$ Hz)
β			115.1 (d)	6.30 (d, $J = 16.1$ Hz)
γ			166.6 (s)	
1''			125.2 (s)	
2''			130.3 (d)	7.55 (d, $J = 7.7$ Hz)
3''			115.8 (d)	6.80 (d, $J = 7.7$ Hz)
4''			159.6 (s)	
5''			115.8 (d)	6.80 (d, $J = 7.7$ Hz)
6''			130.3 (d)	7.55 (d, $J = 7.7$ Hz)
α'			144.0 (d)	7.54 (d, $J = 15.8$ Hz)
β'			114.4 (d)	6.38 (d, $J = 15.8$ Hz)
γ'			166.3 (s)	
28-COOH				12.12 (s)
4'-OH				9.94 (s)
4''-OH				9.97 (s)
3-OH				4.80 (d, $J = 5.2$ Hz)

7.7 Hz, H-3', 5'), 7.54 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H- α), 6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H- β), 7.55 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H-2'', 6''), 6.80 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H-3'', 5''), 7.54 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H- α'), 6.38 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H- β') 以及 ^{13}C -NMR 谱中的 18 个 sp^2 杂化碳吸收信号, 可以推测存在 2 个苯丙烯酸基, 再根据化学位移值 δ 159.8 和 159.6, 推测苯环的对位可能各有 1 个 OH 取代, 可知化合物 **2** 中含有 2 个对羟基肉桂酰氧基结构单元^[6]; 再由 H- α 和 H- β 的耦合常数 $J = 16.1$ Hz 与 H- α' 和 H- β' 的耦合常数 $J = 15.8$ Hz 可知 2 个对羟基肉桂酰氧基结构单元中双键的构型均为反式^[7]。 ^{13}C -NMR 谱中余下的 30 个碳信号包括 $6 \times \text{CH}_3$ 、 $11 \times \text{CH}_2$ 、 $6 \times \text{CH}$ 、 $7 \times \text{C}$, 且出现 δ 177.2 (C) 以及 δ 150.0 (C), 109.7 (CH_2) 和 19.0 (CH_3) 等白桦脂酸型三萜的特征峰, 可确定化合物 **2** 为白桦脂酸衍生物。通过和白桦脂酸的结构对比可看出, C-2 和 C-27 位的化学位移变为 δ 72.2 (d) 和 62.1 (t), 表明 C-2 位和 C-27 位有氧取代。在 HMBC 谱中 (图

1), 可见 H-2 和 C-3、C- γ 相关, H-3 和 C-23、C-24 相关, H-27 和 C-8、C-13、C- γ' 相关, H-29 和 C-19 相关, H-30 和 C-19、C-29 相关, 则确定 2 个对羟基肉桂酰氧基结构单元连接在 C-2 位和 C-27 位。由 H-2 和 H-3 的耦合常数 $J = 5.5$ Hz 和 ^{13}C -NMR 谱数据 δ 72.2 (C-2) 和 78.1 (C-3), 说明 H-2 的构型为 β 型, 则推测化合物 **2** 为 2 α , 27-二反式对羟基肉桂酰氧基取代的白桦脂酸。化合物 **2** 的 ^1H -NMR 谱数据: δ 4.90 (1H, m, H-2), 3.09 (1H, dd, $J = 5.5$, 5.5 Hz, H-3), 2.96 (1H, m, H-19), 4.51 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-27), 4.47 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-27), 4.70 (1H, brs, H-29), 4.58 (1H, brs, H-29), 0.73 (3H, s, H-23), 0.91 (3H, s, H-24), 0.92 (3H, s, H-25), 0.92 (3H, s, H-26), 1.69 (3H, s, H-30) 验证了上述推论。化合物 **2** 的结构见图 1。

3.2 抗肿瘤活性

对 HepG-2 和 HeLa 细胞的 MTT 实验结果表明 (图 2), 化合物 **2** 有一定的抗肿瘤活性。其对对人肝

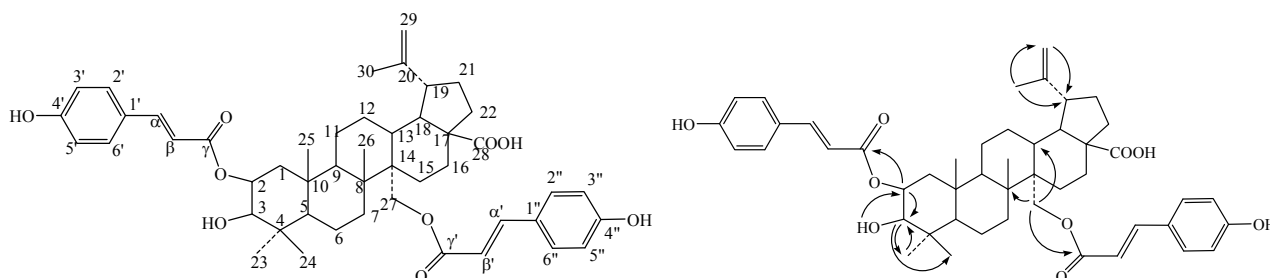


图 1 化合物 **2** 的结构及主要 HMBC 相关

Fig. 1 Structures and key HMBC correlation of compound **2**

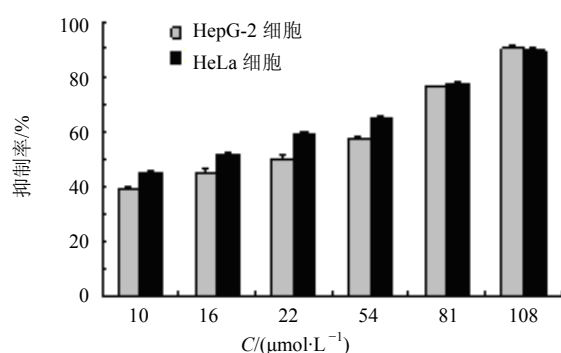


图 2 不同浓度化合物 **2** 对 HepG-2 和 HeLa 细胞增殖的抑制率
Fig. 2 Inhibition of compound **2** at different concentration on proliferation of HepG-2 and HeLa cells

癌 HepG-2 细胞和人宫颈癌 HeLa 细胞的 IC_{50} 分别为 20.34 和 14.83 $\mu\text{mol/L}$ 。

4 讨论

化合物 **1** (白桦脂酸) 为抗肿瘤的有效活性单

体, 可选择性地抑制黑色素瘤细胞的生长, 主要作用机制是诱导细胞凋亡, 其对 HIV-1 型感染也有抑制作用, 另外近期的研究表明白桦脂酸对肿瘤细胞具有广谱性的细胞毒性, 如对成神经细胞瘤、神经胶质瘤、恶性脑瘤、卵巢癌、宫颈癌、肺癌等恶性肿瘤以及已经对阿霉素产生抗性的肿瘤细胞都表现出很好的活性, 而对正常细胞基本没有损伤^[8-11]。化合物 **2** 是属于白桦脂酸型的五环三萜类化合物, 其也具有一定的抗肿瘤活性。本课题组在实验中发现马甲子醇提物的抗肿瘤活性要大于化合物 **1** 和化合物 **2** 单独作用时的抗肿瘤活性, 推断两者可能存在协同作用。马甲子中有效成分的抗肿瘤作用及其机制值得进一步研究。

参考文献

- [1] 丁磊, 张东明. 铁篱笆果化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(24): 2049-2051.

- [2] 韦国峰, 覃道光, 黄志文. 马甲子镇咳祛痰作用及化学成分提取分离 [J]. 右江民族医学学报, 1998, 20(2): 1-3.
- [3] 刘展眉, 何洁萍, 钟雪莲. 用清洁方法从洗树果中提取白桦脂酸等有效成分 [J]. 环境科学与技术, 2008, 31(1): 139-141.
- [4] 李万华, 李 琴, 栗巧云. 皂角刺中 5 个白桦脂酸型三萜的分离及抗菌 [J]. 西北大学学报, 2008, 38(6): 937-942.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 2007.
- [6] 吴立军, 相 婷, 刘铁汉, 等. 3β -反式对羟基肉桂酰氧基- 2α -羟基齐墩果酸的 NMR 研究 [J]. 中草药, 1998, 29(6): 367-369.
- [7] 刘 江, 王海峰, 曲佳琳, 等. 甘茶花的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 208-313.
- [8] 徐 军, 杨晋萍, 钱辰旭. 白桦脂酸的研究进展 [J]. 生命科学, 2011, 23(5): 503-510.
- [9] Xu T, Pang Q Y, Zhou D, *et al.* Proteomic Investigation into betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): 1-11.
- [10] 张 园, 张信文, 陈光英. 五环三萜类化合物抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2011, 24(1): 92-95.
- [11] 李万华, 李 琴, 王小刚, 等. 皂角刺中五个白桦脂酸型三萜抗 HIV 活性研究 [J]. 西北大学学报, 2007, 37(3): 401-403.