

长白山地区钝叶瓦松茎提取物的成分及活性研究

尹秀梅¹, 金春梅^{1,3}, 王思宏^{2,3*}

1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133002

2. 延边大学 测试中心, 吉林 延吉 133002

3. 延边大学 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002

摘要: 目的 研究长白山地区钝叶瓦松 *Orostachys malacophyllus* 茎中活性成分。方法 使用色谱法分离钝叶瓦松甲醇提取物的醋酸乙酯萃取物中的化合物, 利用核磁共振波谱、质谱等技术进行结构鉴定, 采用 CCK-8 方法测试活性。结果 从钝叶瓦松茎甲醇提取物中分离鉴定出 5 个成分, 分别为苹果酸-1-乙酯 (1)、2-(3,4-二羟基苯酰基氧代)-苹果酸单乙酯 (2)、2-(3,4-二羟基苯酰基氧代)-苹果酸二甲酯 (3)、2-对羟基苯酰基氧代-苹果酸二甲酯 (4)、邻苯二甲酸二异丁酯 (5)。结论 化合物 1~5 为从该属植物中首次分离得到, 其中化合物 2 是新化合物, 命名为瓦松酚酸; 其对 HeLa 细胞的细胞毒活性的 IC₅₀ 值为 111.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

关键词: 钝叶瓦松; 苹果酸-1-乙酯; 2-(3,4-二羟基苯酰基氧代)-苹果酸单乙酯; 邻苯二甲酸二异丁酯; 瓦松酚酸; 细胞毒活性
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)05-0859-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.003

Chemical constituents and activity of stem extract from *Orostachys malacophyllus* in Changbai Mountain

YIN Xiu-mei¹, JIN Chun-mei^{1,3}, WANG Si-hong^{2,3}

1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China

2. Analysis and Test Center, Yanbian University, Yanji 133002, China

3. Key Laboratory of Organism Functional Factors of the Changbai Mountains of Ministry of Education, Yanbian University, Yanji 133002, China

Abstract: Objective To explore the active constituents from the stems of *Orostachys malacophyllus* in Changbai Mountain. **Methods** The ethyl acetate fraction of the methanol extract from the stems of *O. malacophyllus* was separated by chromatographic methods, structure identification was by means of nuclear magnetic resonance and mass spectra, and the activity was determined by CCK-8 experiment. **Results** Five compounds were isolated and identified as 1-ethyl-2-hydroxysuccinate (1), 1-ethyl-2-*O*-[(3,4-dihydroxybenzoyl) oxy]-succinate (2), 1,4-dimethy-2-*O*-[(3,4-dihydroxybenzoyl) oxy]-succinate (3), 1,4-dimethy-2-*O*-[(4-dihydroxybenzoyl) oxy]-succinate (4), and diisobutyl phthalate (5). **Conclusion** Compounds 1—5 are isolated from the plants of this genus for the first time. Among them, compound 2 is a new compound named orostachysolic acid, and exhibits cytotoxicity against HeLa cell with IC₅₀ value of 111.5 $\mu\text{mol/L}$.

Key words: *Orostachys malacophyllus* (Pall.) Fisch.; 1-ethyl-2-hydroxysuccinate; 1-ethyl-2-*O*-[(3,4-dihydroxybenzoyl) oxy]-succinate; diisobutyl phthalate; orostachysolic acid; cytotoxicity

瓦松属植物为多年生肉质草本植物, 作为药用资源的瓦松属植物有 7 种, 包括瓦松 *Orostachys fimbriata* (Turcz.) Berger、钝叶瓦松 *O. malacophyllus* (Pall.) Fisch.、黄花瓦松 *O. spinosus* (L.) C. A. Mey.、

狼爪瓦松 *O. cartilaginea* A. Bor.、塔花瓦松 *O. chaneitii* (Lévl.) Berger、晚红瓦松 *O. erubescens* (Maxim.) Ohwi、小苞瓦松 *O. thyrsiflora* Fisch.^[1]。

随着人们对肉质植物的研究兴趣越发浓厚, 景

收稿日期: 2016-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21365023)

作者简介: 尹秀梅 (1971—), 女, 高级实验师, 研究方向为天然产物活性成分研究。Tel: (0433)2436004 E-mail: yinxm@ybu.edu.cn

*通信作者 王思宏 (1969—), 男, 副教授, 研究方向为基于磁性材料的天然产物活性成分研究。Tel: (0433)2733063 E-mail: shwang@ybu.edu.cn

天科瓦松属植物也正在受到研究者的关注。瓦松属植物含有的化学成分有黄酮、甾醇、酚酸、三萜以及强心苷等^[2-3]。国内外对该属植物化学成分和药理方面已经有研究^[4-10]，但都缺少深度挖掘瓦松的潜在药用价值的研究。钝叶瓦松具有清热解毒、止血消肿、利湿敛疮等传统功效^[11-13]。目前对该属植物化学成分和生物活性的研究相对较少，且多集中在粗提取物上。因此，本实验对长白山地区钝叶瓦松的化学成分及生物活性进行研究，从其茎的甲醇提取物中分离鉴定5个成分，分别为苹果酸-1-乙酯(1-ethyl-2-hydroxysuccinate, **1**)、2-(3,4-二羟基苯酰基氧代)-苹果酸单乙酯(1-ethyl-2-O-[(3,4-dihydroxybenzoyl) oxy]-succinate, **2**)、2-(3,4-二羟基苯酰基氧代)-苹果酸二甲酯(1,4-dimethy-2-O-[(3,4-dihydroxybenzoyl) oxy]-succinate, **3**)、2-对羟基苯酰基氧代-苹果酸二甲酯(1,4-dimethy-2-O-[(4-dihydroxybenzoyl) oxy]-succinate, **4**)、邻苯二甲酸二异丁酯(diisobutyl phthalate, **5**)。其中，化合物**1**~**5**为从该属植物中首次分离得到；**2**为新化合物，命名为瓦松酚酸，其对HeLa细胞的细胞毒活性IC₅₀值为111.5 μmol/L。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦)；AV-300 型核磁共振仪(瑞士布鲁克)；手

提式紫外检测器(254 nm, 上海顾村电光仪器厂)；柱色谱用硅胶(100~200 目, 青岛海浪硅胶干燥厂)；甲醇、三氯甲烷、石油醚、醋酸乙酯、二氯甲烷均为分析纯。

实验所用的药材钝叶瓦松茎采集于吉林省长白山地区，经延边大学药学院生药学教研部吕惠子副教授鉴定为钝叶瓦松 *Orostachys malacophyllus* (Pall.) Fisch., 其标本(YB-DW-0001)保存于延边大学药学院植物标本室。

2 方法

2.1 提取与分离

称取干燥的钝叶瓦松茎约2 kg，粉碎，室温条件下甲醇浸泡，超声提取3次，每次30 min。滤过，收集提取液，合并3次提取液，浓缩干燥得提取物56.2 g。然后将提取物悬于水中，用醋酸乙酯进行萃取，经浓缩得到醋酸乙酯萃取物22.3 g。将醋酸乙酯萃取物经硅胶柱色谱分离，石油醚-醋酸乙酯-甲醇混合溶剂梯度洗脱(100%石油醚、石油醚-醋酸乙酯1:10~1:3、石油醚-醋酸乙酯-甲醇10:3:1)，经TLC检测并合并得到组分，经反复硅胶柱色谱进行分离纯化，得到化合物**1**(4.2 mg)、**2**(3.6 mg)、**3**(4.5 mg)、**4**(5.1 mg)、**5**(4.0 mg)。结构见图1。

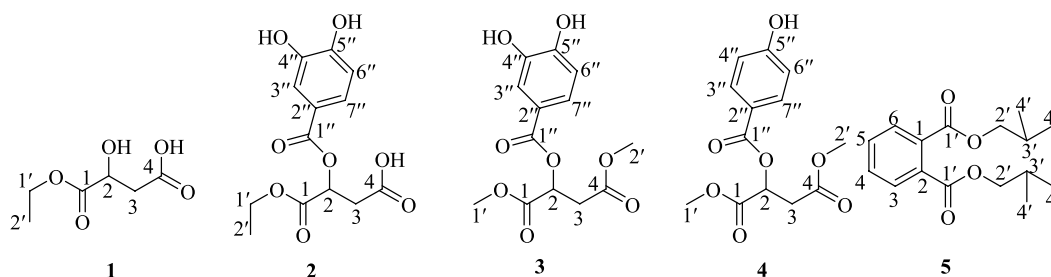


图1 化合物1~5的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—5

2.2 细胞存活率测定

在37℃、5% CO₂的条件下，将人宫颈癌HeLa细胞培养于含10%胎牛血清、100 g/L青霉素、100 g/L链霉素的DMEM培养基中，每2~3天消化传代1次，取其中处于对数生长期的细胞进行实验。实验组分别加入不同浓度梯度药物的培养液(2.5、5、10 μmol/mL)，同时设置对照组，每组设置3个复孔，加药后继续在培养箱中孵育24 h，倒置显微镜下观察。培养结束后，避光条件下每孔加入CCK-8溶液10 μL，然后将96孔板继续在培养箱内孵育1~4 h，用酶标仪于450 nm波长处测定各孔

吸光度(A)值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

3 结构鉴定

化合物**1**：亮黄色油状物，¹H-NMR(300 MHz, CD₃OD) δ: 4.47 (1H, t, J = 6.0 Hz, H-2), 4.20 (2H, q, J = 6.0 Hz, H-1'), 2.71 (2H, dd, J = 6.0, 12.0 Hz, H-3), 1.27 (3H, t, J = 6.0 Hz, H-2'); ¹³C-NMR(75 MHz, CDCl₃) δ: 173.4 (C-1), 170.5 (C-4), 67.3 (C-2), 60.9 (C-1'), 38.7 (C-3), 14.1 (C-2'); TOF-MS m/z 162.05 [M]⁺，上述数据与文献报道一致^[14-15]，确定化合物**1**及其乙酯位置，鉴定其结构为苹果酸-1-乙酯。

化合物 **2**: 无色胶状物, 分子式为 $C_{13}H_{14}O_8$; $[\alpha]_D^{20} +5.4$ (c 0.11, MeOH); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 203, 216, 260; IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 358, 2 918, 2 852, 1 704, 1 616, 1 051; 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.42 (1H, s, H-3''), 7.41 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6''), 6.78 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-7''), 4.46 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-2), 4.19 (2H, q, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 2.71 (2H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-3), 1.26 (3H, t, $J = 6.0$ Hz, H-2'); ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 173.3 (C-1), 172.6 (C-1''), 168.8 (C-4), 150.1 (C-4''), 144.7 (C-5''), 122.5 (C-3''), 121.7 (C-2''), 116.3 (C-6''), 114.3 (C-7''), 67.3 (C-2), 60.9 (C-1'), 38.5 (C-3), 13.0 (C-4); DEPT 135 δ : 122.5 (CH), 116.3 (CH), 114.3 (CH), 67.3 (CH), 60.9 (CH_2), 38.5 (CH_2), 13.0 (CH_3); TOF-MS m/z : 298.42 $[M]^+$ 。紫外光谱提示结构中有苯环体系, 红外光谱显示有羟基、羰基和取代苯的信号, 氢谱中 δ 4.46, 4.19, 2.71, 1.26 和碳谱中 δ 173.3, 168.8, 67.3, 60.9, 38.5, 13.0 与化合物 **1** 骨架一致。由 DEPT-135 谱中化学位移在 δ 122.5 (CH), 116.3 (CH), 114.3 (CH) 处是 3 组吸收峰, 以及氢谱中的化学位移 δ 7.42 是单峰, δ 7.41 和 6.78 是相互偶合关系, 确定化合物结构中是 1, 3, 4 取代苯。基于化合物 **1** 的骨架, 根据上述波谱数据再结合质谱, 推断化合物 **2** 乙酯位置, 结合 2-(3,4-二羟基苯酰基氧代)-苹果酸-1-甲酯的数据^[16], 确定化合物 **2** 为 2-(3,4-二羟基苯酰基氧代)-苹果酸单乙酯。

化合物 **3**: 无色胶状物, 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.53 (1H, s, H-3''), 7.49 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6''), 6.83 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-7''), 4.69 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-2), 3.77 (3H, s, H-1'), 3.75 (3H, s, H-2'), 3.05 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 170.2 (C-1), 170.1 (C-4), 165.6 (C-1''), 149.5 (C-4''), 143.4 (C-5''), 124.1 (C-3''), 120.9 (C-2''), 116.7 (C-6''), 114.8 (C-7''), 68.6 (C-2), 53.0 (C-1'), 52.5 (C-2'), 36.2 (C-3); TOF-MS m/z : 298.07 $[M]^+$, 综合分析化合物 **3** 的 1H -和 ^{13}C -NMR 数据发现与文献报道一致^[16], 鉴定化合物 **3** 为 2-(3,4-二羟基苯酰基氧代)-苹果酸二甲酯。

化合物 **4**: 无色胶状物, $[\alpha]_D^{20} +5.5$ (c 0.11, MeOH); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 202, 217, 259; IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 213, 2 919, 2 850, 1 730, 1 679, 1 050; 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.86 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3'', 7''), 6.82 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-4'', 6''), 4.59 (1H, t, $J = 6.0$

Hz, H-2), 3.75 (3H, s, H-1'), 3.67 (3H, s, H-2'), 3.02 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 170.1 (C-1), 169.8 (C-4), 165.4 (C-1''), 142.6 (C-5''), 131.2 (C-3'', 7''), 119.8 (C-2''), 114.9 (C-4'', 6''), 68.5 (C-2), 51.7 (C-1'), 51.2 (C-2'), 35.5 (C-3); TOF-MS m/z : 282.07 $[M]^+$, 综合分析化合物 **4** 的 1H -和 ^{13}C -NMR 数据, 与文献报道相对照^[17], 鉴定化合物 **4** 为 2-对羟基苯酰基氧代-苹果酸二甲酯。

化合物 **5**: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 301 $[M+Na]^+$, 279 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.74 (2H, q, $J = 3.0$ Hz, H-3, 6), 7.56 (2H, q, $J = 3.0$ Hz, H-4, 5), 4.11 (4H, d, $J = 4.0$ Hz, H-2', 2'), 2.06 (2H, sept, $J = 4.0$ Hz, H-3', 3'), 1.01 (12H, d, $J = 4.0$ Hz, H-4', 4', 4', 4'); ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.7 (C-1', 1'), 132.2 (C-1, 2), 130.9 (C-3, 6), 128.8 (C-4, 5), 71.8 (C-2', 2'), 27.7 (C-3', 3'), 19.2 (C-4', 4', 4', 4'), 上述数据与文献报道一致^[18-22], 由此可鉴定化合物 **5** 为邻苯二甲酸二异丁酯。

4 肿瘤细胞增殖抑制活性

采用 CCK-8 方法对 5 个化合物进行了肿瘤细胞增殖抑制活性筛选, 其中化合物 **1**~**5** 对 HeLa 细胞的细胞毒性的 IC_{50} 值分别为 136.6、111.5、150.0、163.3、200.4 $\mu mol/L$ 。其中, 化合物 **1**~**4** 含有相同苹果酸骨架, 构效关系有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 尹秀梅, 王思宏. 长白山景天科植物品种、植物成分及酶抑制活性的研究进展 [J]. 延边大学学报: 自然科学版, 2015, 41(1): 89-94.
- [2] 肖杰, 柴军红, 杨春文, 等. 不同产地瓦松活性成分初步研究 [J]. 中国林副特产, 2015, 134(1): 26-28.
- [3] 郑万金, 仲英, 孙敬勇, 等. 瓦松的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 859-862.
- [4] 李承范, 王思宏, 李东浩. 狼爪瓦松提取物的抗氧化活性的研究 [J]. 食品科技, 2015, 40(4): 285-288.
- [5] Choi S Y, Chung M J, Seo W D, *et al.* Inhibitory effects of *Orostachys japonicus* extracts on the formation of N-nitrosodimethylamine [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(16): 6075-6078.
- [6] Kim H J, Lee J Y, Kim S M, *et al.* A new epicatechin gallate and calpain inhibitory activity from *Orostachys japonicus* [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(1): 73-76.
- [7] Kim J H, Lee S H, Jang H D, *et al.* (-)-Epicatechin derivate from *Orostachys japonicus* as potential inhibitor of the human butyrylcholinesterase [J]. *Int J Biol*

- Macromol*, 2016, 91: 1033-1039.
- [8] Lee J H, Lee S J, Park S, *et al.* Characterisation of flavonoids in *Orostachys japonicus* A. Berger using HPLC-MS/MS: Contribution to the overall antioxidant effect [J]. *Food Chem*, 2010, 124(4): 1627-1633.
- [9] Yoon N Y, Min B S, Lee H K, *et al.* A potent anti-complementary acylated sterol glucoside from *Orostachys japonicus* [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(8): 892-896.
- [10] Zhang H Y, Oh J, Jang T S, *et al.* Glycolipids from the aerial parts of *Orostachys japonicus* with fatty acid synthase inhibitory and cytotoxic activities [J]. *Food Chem*, 2012, 131(4): 1097-1103.
- [11] 金英花, 朴哲龙. 吉林省龙井地区瓦松属植物种群生态特性 [J]. 延边大学农学学报, 2014, 36(4): 306-310.
- [12] 袁 鹏. 钝叶瓦松中活性成分的研究 [D]. 延边: 延边大学, 2016.
- [13] Nugroho A, Kim M H, Han Y R, *et al.* High-performance liquid chromatographic quantification of flavonol glycosides in *Orostachys* species [J]. *Nat Prod Sci*, 2012, 18(1): 32-38.
- [14] Giumanini A G, Verardo G, Della Martina D, *et al.* Improved method for the analysis of organic acids and new derivatization of alcohols in complex natural aqueous matrixes: Application to wine and apple vinegar [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(6): 2875-2882.
- [15] Houston T A, Wilkinson B L, Blanchfield J T. Boric acid-catalyzed chemoselective esterification of α -hydroxycarboxylic acids [J]. *Org Lett*, 2004, 6(5): 679-681.
- [16] Saxena U, Akella V. Novel conjugation-facilitated transport of drugs across blood brain barrier: India, WO 2013035053 A2 [P]. 2013-03-14.
- [17] Jiang Z B, Jiang B Y, Zhu C G, *et al.* Aromatic acid derivatives from the lateral roots of *Aconitum camichaelii* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(9): 891-900.
- [18] Ahmadi F, Sadeghi S, Modarresi M, *et al.* Chemical composition, *in vitro* anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* benth of Iran [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(5): 1137-1144.
- [19] 李 雯, 田新雁, 肖朝江, 等. 黄花香茶菜地下部分化学成分及生物活性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1091-1095.
- [20] 李 洋, 郑承剑, 秦路平. 毛鸡屎藤全草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 658-660.
- [21] 林大都, 刘嘉炜, 李武国, 等. 蒲桃茎化学成分及其体外细胞毒活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 1993-1997.
- [22] 刘冰晶, 陈光英, 蓝 简, 等. 斜脉暗罗茎化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1264-1266.