

# 三叶青三氯甲烷部位化学成分及其抗肿瘤活性研究

丁丽<sup>1</sup>, 章璐幸<sup>1</sup>, 邱彦<sup>2</sup>, 王延辉<sup>1</sup> (1. 浙江医药高等专科学校药理学系, 浙江 宁波 315100; 2. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 目的 研究三叶青三氯甲烷部位的化学成分及其体外抗肿瘤活性。方法 利用硅胶, 制备薄层板, LH-20 等各种色谱技术分离单体化合物, 通过 NMR 和质谱对化合物进行结构鉴定, 并采用气-质联用色谱对三叶青三氯甲烷部位的其他成分进行分析, 采用 MTT 法对分离得到的单体化合物进行抗肿瘤活性评价。结果 通过经典色谱法分离得到 6 个化合物, 分析鉴定为  $\beta$ -谷甾醇(1), 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛(2), 齐墩果酸(3), 5-羟甲基糠醛(4), 壬二酸(5) 和香草酸(6), 并通过 GC-MS 指认了 22 个化合物。结论 化合物 2~6 首次从三叶青中分离得到。化合物 1 和 3 对 HeLa229 有较强的细胞毒活性,  $IC_{50}$  分别为 40.78, 25.69  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。化合物 3 对 A375 有较强的细胞毒活性,  $IC_{50}$  为 69.87  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。三叶青三氯甲烷部位的体外抗肿瘤活性由多种成分共同作用产生。

**关键词:** 三叶青; 气质联用; 抗肿瘤; 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛; 5-羟甲基糠醛; 香草酸

doi: 10.11669/cpj.2015.21.005 中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2015)21-1857-04

## Chemical Constituents in Chloroform Extraction of *Tetrastigmatis hemsleyani* Diels et. Gilg and Their Antitumor Activities

DING Li<sup>1</sup>, ZHANG Lu-xing<sup>1</sup>, QIU Yan<sup>2</sup>, WANG Yan-hui<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. College of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the chemical constituents in chloroform extraction of *Tetrastigmatis hemsleyani* diels et. Gilg and their antitumor activities. **METHODS** Various chromatography techniques such as column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 and preparative TLC were used to isolate and purify the compounds. Their structures were identified by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and MS. Their antitumor activities was tested by MTT method. Moreover, the other compounds of chloroform extraction were detected by GC-MS. **RESULTS** Six compounds were isolated by classic chromatography and identified as  $\beta$ -sitosterol(1), 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde(2), oleanolic acid(3), 5-hydroxymethyl furfural(4), azelaic acid(5), vanillic acid(6). Twenty-two compounds were identified by GC-MS. **CONCLUSION** Compounds 2-6 are isolated from this plant for the first time. Compounds 1 and 3 shows strong cytotoxic activities against HeLa229 with  $IC_{50}$  values of 40.78, 25.69  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. Compound 3 also showed strong cytotoxic activities against with  $IC_{50}$  values of 69.87  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The result proved that antitumor activity of chloroform extraction of *Tetrastigmatis hemsleyani* diels et. Gilg is due to the contribution of multi-components.

**KEY WORDS:** *Tetrastigmatis hemsleyani*; GC-MS; antitumor; 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde; 5-hydroxymethyl furfural; vanillic acid

中药材三叶青是葡萄科植物三叶崖爬藤(*Tetrastigmatis hemsleyani* Diels et Gilg)的干燥块根, 在民间常被用于小儿惊厥高热、支气管炎、肺炎、扁桃体炎、咽喉炎、肝炎及病毒性脑膜炎的治疗<sup>[1]</sup>。课题组前期对三叶青抗肿瘤活性部位进行筛选, 发现三氯甲烷提取部位有较强的体外肿瘤细胞抑制作用<sup>[2-3]</sup>, 为探明其中抗肿瘤活性成分, 我们采用经典柱色谱技术结合气相色谱-质谱联用仪对其进行化学成分研究。本实验通过溶剂提取、硅胶色谱、制备薄层色谱等方法分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为

$\beta$ -谷甾醇(1), 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛(2), 齐墩果酸(3), 5-羟甲基糠醛(4), 壬二酸(5) 和香草酸(6), 其中 2~6 首次从该植物中分离得到, 并采用 GC-MS 鉴定出 22 个化合物。利用 MTT 法对化合物 1~6 进行体外抗肿瘤实验, 结果表明, 化合物 3 具有显著的抗肿瘤活性。

### 1 仪器与材料

Bruker AV-500 型, INOVO 400 MHz 型核磁共振波谱仪; AB 3200 Q-trap 质谱仪, Agilent LC-MS 液

基金项目: 宁波市自然科学基金资助项目(2012A610181)

作者简介: 丁丽, 女, 硕士, 讲师 研究方向: 中药药效物质基础及其质量控制 Tel: (0574) 88222732 E-mail: nbncdl@163.com

中国药学杂志 2015 年 11 月第 50 卷第 21 期

Chin Pharm J 2015 November, Vol. 50 No. 21 • 1857 •

质联用仪 柱色谱用硅胶(200~300目)和薄层色谱板(青岛海洋化工厂);葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(Pharmacia公司)。GC-MS采用 Thermo scientific ITQ 900 气相色谱-质谱联用仪测定。酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),倒置生物显微镜(Motic 实业集团有限公司);CO<sub>2</sub>培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司),人宫颈癌细胞株 HeLa 229 和人恶性黑色素瘤细胞株 A375 系由本校细胞实验室冻存并提供,MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide](美国 Amresco 公司),RPMI 1640 培养液(美国 Invitrogen 公司),胎牛血清、胰岛素(上海蓝季科技发展有限公司),5-氟尿嘧啶注射液(天津金耀氨基酸有限公司);乙醇、三氯甲烷均为分析纯。

三叶青药材购自宁波市鄞州医药药材公司,经浙江医药高等专科学校中药系杨雄志教授鉴定为 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et. Gilg 的干燥块根。

## 2 样品的提取与制备

### 2.1 样品 I 的提取

将三叶青药材 20 kg 粉碎后,加体积分数 95% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,体积分数 60% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,过滤,减压浓缩得乙醇浸膏,用少量水将上述浸膏分散,用三氯甲烷萃取,回收溶剂后,得到样品 I 62.1 g。

### 2.2 样品 II 的制备

取三叶青药材 1 kg,粉碎后,照“2.1”项下方法提取,回收三氯甲烷,得到浸膏 29.4 mg。取上述浸膏适量,加三氯甲烷溶解成 3 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液,即得。

## 3 经典柱色谱分离方法

将样品 I 经硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(20:1~1:10)梯度洗脱,收集各部分洗脱液,经薄层色谱检视,合并为 8 个组分(Fr1~Fr8)。其中,Fr1 经硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(10:1~1:10)洗脱得到化合物 1(264 mg),2(14 mg),3(20 mg),Fr3 经硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(10:1~1:10)洗脱,再经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,三氯甲烷-甲醇(200:1~60:1)反复洗脱,得化合物 4(13 mg),5(10 mg),6(18 mg)。

## 4 GC-MS 测试

色谱条件: Thermo TRACE TR-WAXMS 毛细管

色谱柱(30.0 m×0.25 mm,液膜厚度 0.25 μm),分流比 20:1,气化温度 250 °C,接口温度 240 °C,程序升温(起始温度 140 °C,保持 2 min,以 3 °C·min<sup>-1</sup> 升至 220 °C,保持 10 min);载气为氦气,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。质谱条件为 EI 源电子能量 70 eV;离子源温度 240 °C;扫描范围 50~650 amu。

## 5 结构鉴定

### 5.1 经典柱色谱鉴定结果

化合物 1: 白色针晶(石油醚-乙酸乙酯),mp 137~140 °C。Liebermann-Burchard 反应阳性。在不同展开系统下展开,10% 硫酸乙醇溶液显色,斑点颜色、R<sub>f</sub> 与对照品 β-谷甾醇一致,确定该化合物为 β-谷甾醇。

化合物 2: 白色粉末(甲醇),mp 80~82 °C。EI-MS *m/z* 168 [M<sup>+</sup>]<sup>1</sup>H-NMR(500 MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.41(1H,d,J=8.5 Hz,H-6),7.40(1H,s,H-2),6.84(1H,d,J=8.5 Hz,H-5),3.89(3H,s,OCH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C-NMR(125 MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 142.6(C-1),123.2(C-2),151.6(C-3),147.5(C-4),115.5(C-5),113.1(C-6),56.4(OCH<sub>3</sub>),168.1(C=O)。以上波谱数据与文献[4]报道的数据一致,故鉴定化合物 2 为 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛。

化合物 3: 无色针晶(石油醚-乙酸乙酯),mp 303~305 °C。EI-MS *m/z* 456 [M<sup>+</sup>]<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.70(3H,s,H-24),0.73(3H,s,H-30),0.90(3H,s,H-27),0.92(3H,s,H-25),0.95(3H,s,H-26),0.98(3H,s,H-29),1.12(3H,s,H-23),3.19(1H,m,H-3),5.20(1H,s,H-12)。<sup>13</sup>C-NMR(100 MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 37.5(C-1),27.0(C-2),81.3(C-3),39.0(C-4),56.1(C-5),16.8(C-6),32.2(C-7),40.1(C-8),48.0(C-9),37.3(C-10),22.6(C-11),123.2(C-12),144.7(C-13),42.3(C-14),27.8(C-15),23.5(C-16),46.7(C-17),41.2(C-18),46.6(C-19),23.0(C-20),33.7(C-21),31.4(C-22),26.5(C-23),16.0(C-24),15.1(C-25),18.2(C-26),27.3(C-27),180.8(C-28),33.0(C-29),33.0(C-30)。以上波谱数据与文献[5]报道的数据一致,故鉴定化合物 3 为齐墩果酸。

化合物 4: 淡黄色油状物(石油醚-乙酸乙酯)。EI-MS *m/z* 126 [M<sup>+</sup>]<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.22(1H,d,J=3.6 Hz,H-3),6.50(1H,d,J=3.6 Hz,H-4),4.70(2H,s,H-6),9.56(1H,s,CHO)。<sup>13</sup>C-NMR(100 MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.5(C-2),121.3(C-

3) 109.0 (C-4) ,158.1 (C-5) ,56.8 (CH<sub>2</sub>OH) ,177.5 (CHO)。以上波谱数据与文献[6]报道的数据一致,故鉴定化合物4为羟甲基糠醛。

化合物5:淡黄色粉末(石油醚-乙酸乙酯),mp 104~106℃。EI-MS  $m/z$  188 [M<sup>+</sup>]<sub>0</sub><sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.18 (4H, t, H-2, H-8) ,1.47 (4H, t, H-3, H-7) ,1.25 (6H, s, H-4, H-5, H-6)。<sup>13</sup>C-NMR(125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 174.0 (C-1, C-9) ,33.3 (C-2, C-8) ,28.1 (C-4, C-5, C-6) ,24.4 (C-3, C-7)。以上波谱数据与文献[7]报道的数据一致,故鉴定化合物5为壬二酸。

化合物6:白色粉末(乙酸乙酯),mp 207~209℃。EI-MS  $m/z$  168 [M<sup>+</sup>]<sub>0</sub><sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.41 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2) ,7.42 (1H, dd,  $J=8.2$  Hz, H-6) ,6.83 (1H, dd,  $J=8.0, 3.0$  Hz, H-5) ,9.82 (1H, s, 4-OH) ,12.47 (1H, s, COOH) ,3.80 (3H, s, OCH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C-NMR(125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 121.6 (C-1) ,112.9 (C-2) ,147.0 (C-3) ,151.2 (C-4) ,115.2 (C-5) ,123.6 (C-6) ,55.6 (OCH<sub>3</sub>) ,167.0 (COOH)。以上波谱数据与文献[8]报道的数据一致,故鉴定化合物6为香草酸。

## 5.2 GC-MS 分析结果

采用GC-MS从样品II中分离出91个峰,通过Thermo Xcalibur工作站检索NIST标准质谱图库,同

时结合文献解析,指出22个化合物。按峰面积归一化法进行计算,求出各化学成分的相对百分含量,见表1和图1。

## 6 抗肿瘤活性测定

收集对数生长期人宫颈癌细胞Hela229和人恶性黑色素瘤细胞A375分别培养在含10%(体积分数)灭活新生小牛血清RPMI-1640培养液中,用0.25%的胰蛋白酶消化后,分别配成 $3.3 \times 10^4$ 个·mL<sup>-1</sup>的细胞悬液接种于96孔培养板中,每孔加细胞悬液150 μL;培养24 h后,除去培养液,取化合物1~7用10%(体积分数)DMSO配成的药液,质量浓度分别为5、10、25、50、75、100 μg·mL<sup>-1</sup>,每孔200 μL,每个浓度设3个复孔,同时设空白对照,阳性对照(5-氟脲嘧啶),在37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱湿条件下培养48 h后,每孔加入5 g·L<sup>-1</sup> MTT 20 μL,培养4 h后,弃去上清液,加入150 μL DMSO,震荡10 min,570 nm波长下测定A值。按下式计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率。

肿瘤细胞生长抑制率(%) = (1 - 实验组平均A值/对照组平均A值) 100%

结果表明,化合物1和3对Hela229细胞有较强的细胞毒活性,IC<sub>50</sub>分别为40.78, 25.69 μg·mL<sup>-1</sup>。化合物3对A375细胞有较强的细胞毒活

表1 三叶青三氯甲烷提取物中22个化合物及相对含量

Tab. 1 The 22 compounds and relative contents of the chloroform extract of *Tetrastigmatis hemsleyani*

No.	Retention time/min	Compounds	Molecular formula	Relative molecular weight	Relative amount/%
1	9.86	(2E, 5Z)-14-Methyl-2,15-octadecadien-1-ol	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O	280	0.12
2	10.99	10,12,14-Nonacosatriynoic acid	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	426	0.18
3	14.81	2,6,10-Trimethyltetradecane	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	240	0.40
4	16.18	Octadecanoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	9.54
5	17.62	2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206	0.11
6	18.87	Ethyl 14-methyl-hexadecanoate	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	0.25
7	19.24	Ethyl hydrogen succinate	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	146	1.23
8	21.58	Eicosanoic acid	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	312	0.93
9	22.04	6-Octadecenoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282	5.06
10	22.25	9-Octadecenoic acid(9Z)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	356	0.83
11	22.72	(8Z)-7-Methyl-8-tetradecenyl acetate	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268	0.68
12	23.26	9-Cis,11-trans-Octadecadienoic methyl ester	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294	23.88
13	24.66	2-Cyclohexylpiperidine	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N	167	0.50
14	24.94	Methyl 9,12,15-octadecatrienoate	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	306	3.72
15	27.20	1,2-Benzenedicarboxylate, decyl octyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	0.62
16	33.48	13-Methyl-tetradecanoic acid, methyl ester	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	378	13.26
17	40.44	Cis-6,9,12,15-docosatetraenoic acid, methyl ester	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	346	1.05
18	43.26	Ethyl palmitate	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	0.98
19	44.93	n-Propyl 11-octadecenoate	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	324	3.70
20	48.55	Ethyl 9,12-hexadecadienoate	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	15.71
21	54.02	Cis-4,7,10,13,16,19-Doconexent	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	328	1.89
22	64.67	14,15β-Epoxy-ββ,11α-dihydroxy-5β-bufa-20,22-dienolide	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	400	0.23

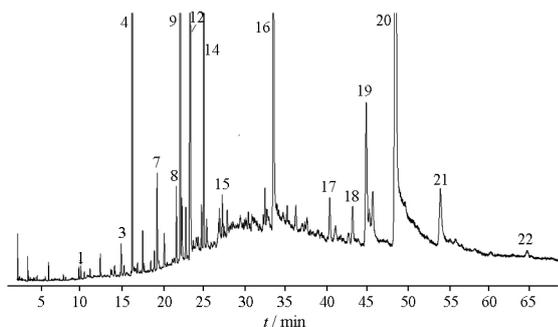


图1 三叶青三氯甲烷提取物总离子流图

Fig. 1 The total ion chromatograms of the chloroform extract constituents of *Tetrastigmatis hemsleyani*

性  $IC_{50}$  为  $69.87 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。化合物 5 对 HeLa229 细胞和 A375 细胞的  $IC_{50}$  分别为 158.71 和  $168.11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 显示出较弱的细胞毒活性。而化合物 2、6 对两种肿瘤细胞几乎没有体外细胞毒作用。

## 7 讨论

目前,三叶青在浙江民间常被用于肿瘤的治疗,前期实验表明,三叶青粗提物在体内外有抗肿瘤作用<sup>[3,9]</sup>。本实验对三叶青的抗肿瘤活性部位进行全面的化学成分研究,探明其中具有较强体外肿瘤抑制作用的化学成分主要为齐墩果酸、 $\beta$ -谷甾醇、5-羟甲基糠醛和壬二酸对 HeLa229 细胞或 A375 细胞也有一定的抑制作用。三叶青三氯甲烷部位有大量弱极性的化合物,为全面研究其化学成分,我们对其进行 GC-MS 分析,发现该部位的物质多为有机酸及其酯类。脂肪酸的抗肿瘤作用已有报道<sup>[10-12]</sup>,结合经典柱色谱分离所得成分的抗肿瘤活性实验,本课题组认为,三叶青三氯甲烷部位的体外抗肿瘤活性由多种成分共同作用产生。

## REFERENCES

- [1] CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY. *Collection Words of Chinese Materia Medica*( 中药辞海 [M]. Beijing: China Medical Pharmacological Science and Technology Publishing House, 1996: 290-291.
- [2] DING L, JI Q X. Study preliminary on the anti-tumor effect of the extract of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et. Gilg[J]. *Strait Pharm J*( 海峡药学), 2011, 23( 12): 46-54.
- [3] DING L, JI Q X. Effects of Fat soluble extract of *Tetrastigma hemsleyanum* on the proliferation and melanin synthesis of human melanoma A375 cells [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*( 时珍国医国药), 2012, 23( 4): 962-963.
- [4] YANG X Z, LIN L G, TANG C P, et al. Non-alkaloid constituents from *Stermona sessilifolia* [J]. *Nat Prod Res Dev*( 天然产物研究与开发), 2008, 20( 1): 56-59.
- [5] LI S X, WANG T, TIAN Q, et al. Chemical constituents from *Swertia cincta* Burk. and their antagonistic effects on Benign prostatic hyperplasia [J]. *Chin Pharm J* ( 中国药理学杂志), 2015, 50( 6): 502-506.
- [6] LI X, WANG J H, MENG D L, et al. Chemical constituents of *Atractylodes chinensis* ( DC. ) Koidz. roasted with bran [J]. *J Shenyang Pharm Univ*( 沈阳药科大学学报), 2003, 20( 3): 173-175.
- [7] PENG J P, LI X. Studies on the chemical constituents of *Cynanchum hancocianum* ( II) [J]. *J Shenyang Pharm Univ*( 沈阳药科大学学报), 1990, 7( 4): 284-285.
- [8] ZHOU J H, YANG J S. Study on chemical constituents *Trollius ledebouri* [J]. *Chin Pharm J*( 中国药理学杂志), 2005, 40( 10): 733-736.
- [9] DING L, JI Q X, LV W T, et al. Study on antitumor effect of aqueous extract of *Tetrastigma hemsleyanum* in vitro and in vivo [J]. *Chin Tradit Pat Med*( 中成药), 2013, 35( 5): 208-210.
- [10] NATALIE D R, RGIA A O, MIYOUNG S, et al. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease [J]. *J Am Diet Assoc*, 2009, 109( 4): 668-679.
- [11] SIEGEL I, LIU T L, YAGHOUBZADEH E, et al. Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells [J]. *Natl Cancer Inst*, 1987, 78( 1): 271-277.
- [12] BEGIN M E, ELLS G, DAS U N, et al. Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids [J]. *Natl Cancer Inst*, 1986, 77( 5): 1053-1053.

( 收稿日期: 2015-04-29)