

文章编号:1001-6880(2017)8-1270-08

# 川黄柏果实中的化学成分及抗肿瘤活性

晏 晨<sup>1</sup>, 张云东<sup>1</sup>, 王星慧<sup>2</sup>, 骆 衡<sup>2\*</sup><sup>1</sup>安顺市人民医院, 安顺 561000; <sup>2</sup>贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002

**摘要:**通过应用多种色谱方法从川黄柏果实的乙醇提取物中分离得到10个单体化合物,运用现代波谱技术鉴定了它们的结构,分别为:23-aldehyde-tirucall-7-ene-3-one (**1**)、(23R,24S)-21-oxomelianodiol (**2**)、3β,22S-dihydroxy-tirucalla-7,24-dien-23-one (**3**)、21,23-lactone-24,25 dihydroxy-tirucall-7-ene-3-one (**4**)、Aphagranins F (**5**)、24,25-epoxy-tirucall-7-ene-3,23-dione (**6**)、木栓酮(Friedelin, **7**)、吴茱萸次碱(Rutaecarpine, **8**)、反,反,顺-2,4,8-N-异丁基十四碳三烯酰胺(**9**)、7-脱甲基软木花椒素(7-Demethylsuberosin, **10**)。其中化合物**1**新的天然产物,**2-5,7**系首次从该植物中分离得到。体外抗肿瘤活性表明,化合物**3**对乳腺癌MDA细胞的增殖具有较好的抑制作用,化合物**5**对白血病K562细胞的生长具有较好的抑制作用,其IC<sub>50</sub>分别为7.38(±3.24) μmol/L、3.86(±2.71) μmol/L。

**关键词:**川黄柏; 化学成分; 果实; 结构鉴定

中图分类号:R96

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.002

## Chemical Constituents and Anti-tumor Activity from the Fruits of *Phellodendron chinense* Schneid

YAN Chen<sup>1</sup>, ZHANG Yun-dong<sup>1</sup>, WANG Xing-hui<sup>2</sup>, LUO Heng<sup>2\*</sup><sup>1</sup>An Shun City People's Hospital, Anshun 561000, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Chemistry for Natural Product of Guizhou Province and Chinese Academy of Science, Guiyang 550002, China

**Abstract:** Ten compounds were obtained from the ethanol extract of the fruits of *Phellodendron chinense* Schneid by applying various chromatographic techniques. Their structures were elucidated and identified as 23-aldehyde-tirucall-7-ene-3-one (**1**), (23R,24S)-21-oxomelianodiol (**2**), 3β,22S-dihydroxy-tirucalla-7,24-dien-23-one (**3**), 21,23-lactone-24,25 dihydroxy-tirucall-7-ene-3-one (**4**), Aphagranins F (**5**), 24,25-epoxy-tirucall-7-ene-3,23-dione (**6**), Friedelin (**7**), Rutaecarpine (**8**), (2E,4E,8Z)-N-isobutyl tetradecatrienamide (**9**), 7-Demethylsuberosin (**10**) respectively, based on the spectral data. Among them, compound **1** were new natural products, **2-5,7** were obtained from the fruits of *P. chinense* for the first time. Compound **3** and **5** can inhibit the proliferation of MDA and K562 cells, respectively, their IC<sub>50</sub> were 7.38 (±3.24) μmol/L, 3.86 (±2.71) μmol/L, accordingly.

**Key words:** *Phellodendron chinense* Schneid; chemical constituents; fruits; structural elucidation

川黄柏为芸香科(Rutaceae)黄檗属植物黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid)的干燥树皮<sup>[1]</sup>,具有清热燥湿,泻火除蒸,解毒疗疮的功效,用于湿热泻痢,黄疸,带下,热淋、脚气、痿躄、骨蒸劳热,盗汗,遗精,疮疡肿毒,湿疹瘙痒等功能<sup>[2]</sup>。川黄柏主产于我国南方各省,以四川、贵州产量最大<sup>[3]</sup>,临床应

用广泛,在医药工业中作为提取小檗碱的原料之一<sup>[4]</sup>。其果实常用作镇咳祛痰药添加剂,治疗慢性支气管炎,果实提取物具有灭杀家蝇和白蚁拒食活性<sup>[5]</sup>。笔者曾经对其变种秃叶黄柏的果实进行了大量的化学成分研究,为了更好的了解种与种之间的化学成分的差异性,我们对黔产川黄柏果实的化学成分进行系统研究,本文报道了从中分离鉴定的10个化合物,分别为:23-aldehyde-tirucall-7-ene-3-one (**1**)、(23R,24S)-21-oxomelianodiol (**2**)、3β,22S-dihydroxy-tirucalla-7,24-dien-23-one (**3**)、21,23-lactone-24,25 dihydroxy-tirucall-7-ene-3-one (**4**)、Aphagranins F (**5**)、24,25-epoxy-tirucall-7-ene-3,23-

收稿日期:2017-03-08 接受日期:2017-05-02

基金项目:贵州省卫生计生委科学技术基金(gzwjkj2016-1-010);

贵州省2014年度“百千万”人才引进计划“千人创新创业人才”项目(2013-QR-008);安顺市科技创新平台建设项目(2016-7);贵州省中医药管理局专项基金(QZYY-2015-093)

\*通信作者 Tel:86-851-83804492; E-mail:luohengzz@sina.com

dione (**6**)、木栓酮 (Friedelin, **7**)、吴茱萸次碱 (Rutaecarpine, **8**)、反, 反, 顺-2,4,8-N-异丁基十四碳三烯酰胺 (**9**)、7-脱甲基软木花椒素 (7-Demethylsuberosin, **10**)。其中化合物 **1** 为新的天然产物, **2~5** 系首次从该植物中分离得到。

## 1 仪器与材料

旋转蒸发仪(东京理化, N-1100D-WD); INOVA 400 MHz、500 MHz 超导核磁共振波谱仪(美国瓦里安公司), 四甲基硅烷 (TMS) 为内标; ESI 质谱由 Bruker HTC/Esquire 质谱仪测定; 高效液相为 Waters 1525 EF, 检测器 Waters 2998 检测器, 色谱柱为 Waters sunfire C<sub>18</sub> (10 × 150 mm, 4.6 × 250 mm); 正相硅胶(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20(三菱公司); C<sub>18</sub> 反相硅胶(日本 YMC 公司); 酶标仪(美国 BIOTEK 公司), C6 流式细胞仪(美国 BD 公司), Allegra X-15R 台式离心机(美国贝克曼公司), Axio Vert. A1 倒置生物显微镜(德国卡尔蔡司公司), TS100 双目倒置相差生物显微镜(日本尼康公司)。

化学实验用溶剂为工业重蒸溶剂, 显色剂为 8% 的硫酸乙醇溶液。DEME 培养液(美国 HyClone 公司生产), 胎牛血清(杭州四季青公司生产), 0.25% 胰酶 (Trypsin) 为美国 HyClone 产品, 四甲基偶氮唑蓝 [3-(4,5-Dimethyl-thiazol)-2-yl-tetrazolium bromide; MTT] 购自 Sigma 公司, 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide; DMSO)、青链霉素混合液、碘化丙啶 (PI) 均为北京索莱宝科技有限公司产品, 细胞周期检测所用 RNA 酶购自日本 Takara 公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒为美国 BD 公司产品。

样品采自贵州省安顺市西秀区老落坡林场任庭周川黄柏种植基地, 经过贵阳医学院孙庆文老师鉴定为川黄柏, 试验样本(Assrmyy201411)保存于安顺市人民医院药学实验室。

## 2 实验方法

### 2.1 化合物提取与分离

干燥川黄柏果实 15 kg, 用 95% 的乙醇回流提取 3 次, 提取温度为 80 °C, 每次时间为 3 h, 浓缩回收酒精得粗提物约 2.0 kg, 加水混溶成浑浊液体, 用乙酸乙酯等体积萃取 3 次, 回收乙酸乙酯得浸膏 900.0 g。乙酸乙酯部分经过硅胶柱层析, 用石油醚/丙酮(60:1 ~ 0:1)快速梯度洗脱的 Fr1 ~ Fr4 4 个部分, 其中 Fr1 再次以石油醚/乙酸乙酯(80:1 ~ 0

:1) 梯度洗脱, 被分成 5 个亚部分, 分别为 Fr1 (1 ~ 5)。其中 Fr1-2 经 MCI 材料脱色谱, 90% 的酒精洗脱下来浓缩、重结晶得化合物 **7** (120.5 mg), Fr1-3 (8.5 g) 通过凝胶柱层析(氯仿: 甲醇 = 1:1), 重结晶得化合物 **1** (280.2 mg), Fr1-4 经过反相柱层析洗脱(甲醇: 水 = 80% : 20%) 得 **4** (35.6 mg), Fr1-5 经过反相柱层析洗脱(甲醇: 水 = 75% : 25%), 再经过高效液相色谱色谱 HPLC 制备分离(流动相为甲醇: 水 = 85% : 15%, 流速为 6 mL/min) 得化合物 **5** (12.2 mg) 和 **6** (8.6 mg); Fr4 (360 g) 经过 MCI 脱色素, 再用反相硅胶柱层析(甲醇: 水 = 60% : 40%) 洗脱分成 Fr4 (1-5) 部分, 然后每一个部分再通过高效液相色谱色谱制备分离纯化, 分别得化合物 **10** (8.0 mg)、**2** (14.3 mg)、**3** (7.4 mg)、**8** (27.4 mg)、**9** (9.6 mg)。

### 2.2 细胞毒性检测

#### 2.2.1 供试样品的配置

试验化合物采取两步稀释法, 第一步用 DMSO 稀释, 第二步用不含血清的 DMEM 培养液稀释, 试验化合物浓度为 100 μmol/L。加样品后确保 DMSO 含量不超过总体积的 1%。

#### 2.2.2 细胞准备

将贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室保存的人红白血病细胞 HEL、人慢性髓细胞性白血病细胞 K562、前列腺增生细胞 BPH1、前列腺癌细胞 PC3 及乳腺癌细胞 MDA 于 37 °C 水浴箱中迅速解冻, 离心收集细胞后, 用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素、1% 链霉素的 DMEM 培养液, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温饱和湿度的培养箱中进行培养, 收集对数生长期细胞进行实验。

#### 2.2.3 MTT 检测细胞增殖抑制率

取培养至对数期的细胞, 800 rpm 离心 5 min, 弃上清后加入新的培养液调整细胞浓度至  $1 \times 10^4$  个/mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 190 μL 细胞液, 设置 3 个复孔及空白组与对照组, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温饱和湿度条件下培养 4 h, 加 100 μmol/L 试验化合物 10 μL, 使其终浓度为 5 μmol/L; 对照组加入 10 μL 与试验化合物同比例稀释的 DMSO, 空白组加 10 μL 无血清培养液。继续培养 72 h 后, 1500 rpm 离心 8 min, 分别用倒置荧光显微镜进行观察并拍照, 然后加入 100 μL DMEM 培养基与 MTT 混合液(DMEM 与 MTT 混合比例为 9:1, 现配现用), 培养 4 h 后, 1500 rpm 离心 8 min, 每孔加 150

$\mu\text{L}$  DMSO, 震荡 5~10 min, 用酶标仪检测 490 nm 处的吸光值(OD 值), 并计算其细胞增殖抑制率。

#### 2.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

将培养至对数期的细胞按  $2 \times 10^5/\text{mL}$ 、每孔 2 mL 接种于 6 孔板中培养每组设 3 个复孔及空白组与对照组, 悬浮细胞培养 4 h 后加 100  $\mu\text{mol/L}$  试验化合物 100  $\mu\text{L}$ , 贴壁细胞完全贴壁后加 100  $\mu\text{mol/L}$  试验化合物 100  $\mu\text{L}$ , 空白组及对照组分别加入 100  $\mu\text{L}$  无血清 DMEM 培养液和与同比例稀释的 DMSO。继续培养 72 h, 将悬浮细胞直接转移至离心管, 而贴壁细胞用 0.25% 无 EDTA 胨酶消化后转移至离心管, 1000 rpm 离心 8 min, 弃上清, 预冷 PBS 洗 3 次, 至培养基颜色消失, 重悬于 binding buffer (10 mmol/L HEPES, pH = 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>), 细胞浓度  $1 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 。取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 加 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{L}$  PI (50  $\mu\text{g/mL}$ ), 于室温黑暗中孵育 15 min, 加入 400  $\mu\text{L}$  binding buffer, 轻轻混匀, 1 h 内上流式细胞仪检测。计算凋亡占总细胞数的百分比。凋亡细胞为 Annexin V 阳性细胞。

#### 2.2.5 数据统计分析

所有的数据处理采用 SPSS 13.0 软件 (SPSS 13.0, 2005, SPSS Inc., Chicago, USA) 采用 F 检验分析其差异。在实验中运用一般的线性模型分析数据, 显著差异表示为  $P < 0.05$  (F-检验), 极显著差异表示为  $P < 0.01$  (F-检验)。

### 3 实验结果

#### 3.1 结构鉴定

**化合物 1** 无色粉末, 溶于氯仿, 乙酸乙酯和丙酮, ESI-MS,  $m/z$ : 769.9 [2M + H]<sup>+</sup>, HR-ESI-MS,  $m/z$ : 791.59419 [2M + Na]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>, 其详细的氢谱、碳谱核磁数据见表 1, 与文献<sup>[6-8]</sup>报道 Piscidinol A 的高碘酸钠氧化产物数据基本一致, 故鉴定化合物 1 为 23-aldehyde-tirucall-7-ene-3-one (图 1)。

**化合物 2**  $[\alpha]_D^{25} -53.2$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>), 无色粉末, 溶于氯仿, 乙酸乙酯和丙酮, ESI-MS,  $m/z$ : 487.4 [M + H]<sup>+</sup>, HR-ESI-MS,  $m/z$ : 995.65806 [2M + Na]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub>。核磁共振氢谱数据显示, 化合物 2 具有 7 个甲基 ( $\delta_H$  0.82, 1.00, 1.02, 1.06, 1.11, 1.28, 1.33), 一个烯基质子: 5.31, d (3.0); 核磁共振碳谱数据显示有 30 个碳原子,

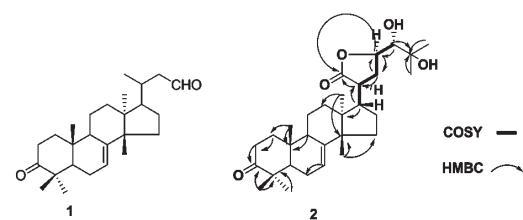


图 1 化合物 1~2 的结构和化合物 2 的 HMBC 和 COSY 关键相关信号

Fig. 1 Chemical structures of **1, 2** and key HMBC and COSY correlations of **2**

DEPT 图谱显示化合物有 7 个甲基为: 23.3 (C-18), 12.6 (C-19), 26.5 (C-26), 26.4 (C-27), 21.4 (C-28), 24.4 (C-29), 27.4 (C-30), 8 个亚甲基, 7 个次甲基(包含 1 个烯氢次甲基, 2 个连氧次甲基), 8 个季碳原子(包含有 1 个烯烃季碳原子, 一个连氧季碳原子, 1 个酮羰基, 1 个酯羰基), 以上 NMR 波谱数据结合两个烯碳信号 ( $\delta$  118.1 CH, 145.3 qC) 说明化合物 2 是一个含  $\Delta^{7,8}$  双键的甘遂烷型三萜。氢谱信号中没有甲基信号双峰, 同时在 95-110 之间没有连氧次甲基信号, 而多了一个酯羰基, 推测 21 位和 23 位形成 5 元内酯环结构。在 HMBC 谱中(图 1 所示), 侧链中 H-23/C-21, H-20/C-21, H-20/C-22, H-23/C-22, H-24/C-23, H-24/C-25, H-26/C-25 和 H-27/C-25 具有相关性, H-HCOSY 谱中, H-17/H-20, H-20/H-22 和 H-23/H-22 具有相关性, 在 NOE 图谱中, 可以明显的看到 H-23/H-20, H-23/H-18, H-20/H-18 的相关, H-24 与 H17, H22 $\beta$ , H-12 $\beta$  相关, 综合所述, 化合物 2 被命名为 (23R, 24S)-21-oxomelianodiol。文献<sup>[9-11]</sup> 中报道了 melianodiol 的 21 位羟基氧化结构, 但没有对其进行核磁数据的归属。其详细数据见表 1。

**化合物 3** 无色粉末, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.08 (1H, s, H-24), 5.27 (1H, brs, H-7), 4.17 (1H, s, H-22), 3.24 (1H, dd, *J* = 4.5, 11.0 Hz, H-3), 2.22, 1.97 (each 3H, s, H-26, H-27), 1.03 (3H, s, H-30), 0.97 (3H, s, H-28), 0.86 (6H, s, H-29, H-18), 0.74 (3H, s, H-19), 0.63 (1H, d, *J* = 7.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 37.2 (C-1), 27.6 (C-2), 79.2 (C-3), 38.9 (C-4), 50.6 (C-5), 23.9 (C-6), 117.99 (C-7), 145.7 (C-8), 48.9 (C-9), 34.9 (C-10), 18.0 (C-11), 33.5 (C-12), 43.3 (C-13), 51.3 (C-14), 33.9 (C-15), 28.0 (C-16), 49.0 (C-17), 21.9 (C-18), 13.1 (C-19), 39.5 (C-

表 1 化合物 1 和 2 的碳、氢信号归属

Table 1  $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) data of 1 and 2 ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz, recorded in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	1		2	
	$\delta$ : (H)	$\delta$ : (C)	$\delta$ : (H)	$\delta$ : (C)
1 $\alpha$	1.15, m	3.85	1.45, m	38.4
1 $\beta$	1.98, m		1.99, m	
2 $\alpha$	2.24, m	34.9	2.24, m	34.8
2 $\beta$	2.75, td (5.5, 14.5)		2.76, td (5.5, 14.5)	
3	—	216.7	—	216.7
4	—	47.8	—	47.8
5	1.72, m	52.3	1.72, m	52.4
6	2.09, m	24.3	2.09, m	24.3
7	5.31, d (3.0)	118.1	5.31, d (3.0)	118.1
8	—	145.6	—	145.3
9	2.28, m	48.4	2.29, m	48.3
10	—	35.0	—	35.0
11	1.57, m	18.2	1.60, m	17.6
12 $\alpha$	1.64, m	33.5	1.72, m	31.0
12 $\beta$	1.81, m		1.80, m	
13	—	43.6	—	43.6
14	—	51.3	—	50.4
15	1.51, m	33.8	1.57, m	33.8
16 $\alpha$	1.27, m	28.4	1.49, m	24.0
16 $\beta$	1.94, m		1.85, m	
17	1.57, m	52.8	2.36, m	47.1
18	0.86, s	21.9	0.82, s	23.3
19	1.00, s	21.9	1.00, s	12.6
20	2.04, s	31.9	2.68, m	40.2
21	0.96, d (6.5)	19.7	—	178.0
22 $\alpha$	2.14, m	50.9	2.20, m	29.7
22 $\beta$	2.18, m		2.37, m	
23	9.76, d (2.5)	203.3	4.59, m	77.2
24	—	—	3.29, dd (1.5, 9.5)	76.4
25	—	—	—	72.4
26	—	—	1.33, s	26.5
27	—	—	1.28, s	26.4
28	1.11, s	21.6	1.11, s	21.4
29	1.05, s	24.5	1.02, s	24.4
30	1.01, s	27.4	1.06, s	27.4

20), 12.0 (C-21), 79.2 (C-22), 201.4 (C-23), 119.2 (C-24), 159.6 (C-25), 27.4 (C-26), 21.4

(C-27), 27.5 (C-28), 14.7 (C-29), 27.6 (C-30)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道一致,故鉴定化合物 3 为

*3β,22S-Dihydroxy-tirucalla-7,24-dien-23-one。*

**化合物 4** 无色粉末,<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.08 (1H, s, H-24), 5.32 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-7), 4.17 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-22), 2.76 (1H, td, J = 5.6, 14.4 Hz, H-2<sub>β</sub>), 2.23 (3H, s, H-27), 1.97 (3H, s, H-26), 1.13 (3H, s, H-30), 1.07 (3H, s, H-29), 1.05 (3H, s, H-28), 1.01 (3H, s, H-19), 0.67 (3H, s, H-18), 0.64 (3H, s, H-21); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 38.5 (C-1), 34.9 (C-2), 216.3 (C-3), 47.8 (C-4), 52.3 (C-5), 24.3 (C-6), 117.9 (C-7), 145.8 (C-8), 48.4 (C-9), 34.9 (C-10), 18.2 (C-11), 33.4 (C-12), 43.3 (C-13), 51.4 (C-14), 34.0 (C-15), 28.0 (C-16), 49.0 (C-17), 12.8 (C-18), 21.5 (C-19), 39.5 (C-20), 12.0 (C-21), 78.7 (C-22), 201.3 (C-23), 119.1 (C-24), 159.6 (C-25), 24.3 (C-26), 21.4 (C-27), 28.1 (C-28), 21.9 (C-29), 27.6 (C-30)。以上数据与文献<sup>[13,14]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 4 为 22-Hydroxytirucalla-7,24-dien-3,23-dione。

**化合物 5** 无色粉末,<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.31 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-7), 4.13 (1H, dd, J = 5.2, 8.8 Hz, H-23), 3.47 (2H, q, J = 6.8 Hz, H-CH<sub>2</sub>, 25-OEt), 3.09 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-24), 2.78 (1H, td, J = 5.6, 14.4 Hz, H-2<sub>β</sub>), 1.32 (3H, s, H-26), 1.25 (3H, s, H-27), 1.17 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-CH<sub>3</sub>, 25-OEt), 1.12 (3H, s, H-29), 1.05 (3H, s, H-28), 1.02 (3H, s, H-30), 1.01 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21), 0.82 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 38.6 (C-1), 34.9 (C-2), 216.9 (C-3), 47.9 (C-4), 52.4 (C-5), 24.4 (C-6), 117.9 (C-7), 145.9 (C-8), 48.5 (C-9), 35.0 (C-10), 18.3 (C-11), 33.7 (C-12), 43.5 (C-13), 51.2 (C-14), 34.0 (C-15), 28.5 (C-16), 53.8 (C-17), 22.0 (C-18), 12.8 (C-19), 33.8 (C-20), 18.9 (C-21), 39.8 (C-22), 68.9 (C-23), 76.5 (C-24), 79.7 (C-25), 22.2 (C-26), 22.3 (C-27), 24.6 (C-28), 21.6 (C-29), 27.4 (C-30), 57.0 (CH<sub>2</sub>-OEt), 16.0 (CH<sub>3</sub>-OEt)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 5 为 Aphagranins F

**化合物 6** 无色粉末,<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.31 (1H, s, H-7), 3.33 (1H, s, H-24), 2.74 (1H, td, J = 5.6, 14.4 Hz, H-2<sub>β</sub>), 2.53 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-22<sub>α</sub>), 1.42 (3H, s, H-26), 1.26

(3H, s, H-27), 1.10 (3H, s, H-29), 1.04 (3H, s, H-28), 1.00 (3H, s, H-30), 0.99 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21), 0.85 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 38.5 (C-1), 35.0 (C-2), 216.9 (C-3), 47.8 (C-4), 52.2 (C-5), 24.3 (C-6), 118.0 (C-7), 145.6 (C-8), 48.3 (C-9), 34.9 (C-10), 18.5 (C-11), 33.4 (C-12), 43.6 (C-13), 51.3 (C-14), 33.9 (C-15), 28.3 (C-16), 52.9 (C-17), 22.0 (C-18), 12.8 (C-19), 32.7 (C-20), 19.5 (C-21), 48.0 (C-22), 207.0 (C-23), 65.6 (C-24), 61.1 (C-25), 24.8 (C-26), 18.5 (C-27), 24.5 (C-28), 21.6 (C-29), 27.4 (C-30)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 6 为 24,25-epoxy-tirucall-7-ene-3,23-dione。

**化合物 7** 白色粉末,<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.18 (3H, s, H-28), 1.05 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-29), 0.87 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-23), 0.86 (3H, s, H-25), 0.72 (3H, s, H-24); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 22.3 (C-1), 41.5 (C-2), 213.4 (C-3), 58.2 (C-4), 42.1 (C-5), 41.3 (C-6), 18.2 (C-7), 53.1 (C-8), 37.5 (C-9), 59.5 (C-10), 35.6 (C-11), 30.5 (C-12), 38.3 (C-13), 39.7 (C-14), 32.4 (C-15), 36.0 (C-16), 30.0 (C-17), 42.8 (C-18), 35.4 (C-19), 28.2 (C-20), 32.8 (C-21), 39.3 (C-22), 6.8 (C-23), 14.7 (C-24), 17.9 (C-25), 20.3 (C-26), 18.6 (C-27), 32.1 (C-28), 25.0 (C-29), 31.8 (C-30)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 7 为 Friedelin。

**化合物 8** 黄色针状晶体, mp 277 ~ 280 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.82 (1H, brs, -NH), 7.15~8.34 (8H, m, H-1 ~ 4, 11 ~ 14), 4.59 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-5), 3.22 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-6); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 127.2 (C-2), 145.4 (C-3), 41.0 (C-5), 19.0 (C-6), 118.1 (C-7), 125.0 (C-8), 120.1 (C-9), 119.9 (C-10), 125.0 (C-11), 112.7 (C-12), 138.8 (C-13), 147.4 (C-15), 126.7 (C-16), 134.6 (C-17), 126.2 (C-18), 126.5 (C-19), 120.8 (C-20), 160.8 (C-21)。以上数据与文献<sup>[18,19]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 8 为吴茱萸次碱。

**化合物 9** 白色粉末, mp. 47 ~ 49 °C。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.18 (1H, dd, J = 10.5,

15.0 Hz, H-3), 6.14 (1H, dd,  $J = 10.5, 15.0$  Hz, H-4), 6.07 (1H, ddd,  $J = 6.0, 6.5, 15.0$  Hz, H-5), 5.76 (1H, d,  $J = 15.0$  Hz, H-2), 5.49 (1H, brs, H-N), 5.37-5.42 (1H, m, H-9), 5.30-5.35 (1H, m, H-8), 3.16 (2H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-1'), 2.11-2.20 (4H, m, H-6, 7), 2.00 (1H, dt,  $J = 7.0, 7.5$  Hz, H-10), 1.75-1.83 (1H, m, H-2'), 1.25-1.36 (6H, m, H-11, H-12 and H-13), 0.92 (6H, d,  $J = 6.5$  Hz, 2个异丁基甲基), 0.88 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 166.3 (C-1), 121.9 (C-2), 141.2 (C-3), 128.2 (C-4), 142.4 (C-5), 33.0 (C-6), 22.6 (C-7), 128.5 (C-8), 130.9 (C-9), 27.2 (C-10), 31.5 (C-11 or C-12), 29.3 (C-11 or C-12), 26.5 (C-13), 14.1 (C-14), 20.1 (两个异丁基甲基)。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道一致,故鉴定化合物9为反,反,顺-2,4,8-N-异丁基十四碳三烯酰胺。

### 3.2 体外抗肿瘤活性研究

#### 3.2.1 细胞毒性

利用MTT法检测了5  $\mu\text{mol/L}$  川黄柏果实中的化学成分对人红白血病细胞HEL、人慢性髓细胞性白血病细胞K562、前列腺癌细胞PC3及乳腺癌细胞MDA增殖的抑制作用(图2),结果表明化合物3对

乳腺癌细胞的增殖具有较好的抑制作用,化合物5对K562细胞的生长具有较好的抑制作用,其抑制率分别为45.42( $\pm 3.24$ )%和54.93( $\pm 4.21$ )%。分别检测了不同浓度的化合物3及5对两种细胞生长的抑制效果(图3A),结果表明这两个化合物对癌症细胞的生长的抑制作用于其浓度呈一定的相关性,表明其抗癌作用呈浓度依赖性。并计算其IC<sub>50</sub>值,化合物3对MDA的IC<sub>50</sub>值为7.38( $\pm 3.24$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,化合物5对K562细胞的IC<sub>50</sub>值为3.86( $\pm 2.71$ ) $\mu\text{mol/L}$ 利用倒置荧光显微镜观察化合物3及5对两种细胞生长及细胞形态的影响(3B),结果表明化合物3及5均明显抑制了细胞的生长,但其细胞形态变化明显,出现了凋亡小体。

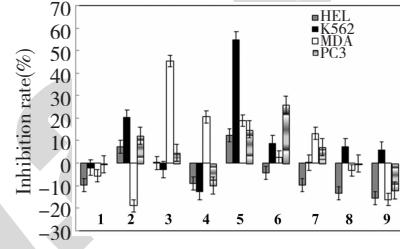


图2 化合物1~9的细胞毒活性

Fig. 2 Cytotoxic activities of chemical constituents from *P. chinense* fruits

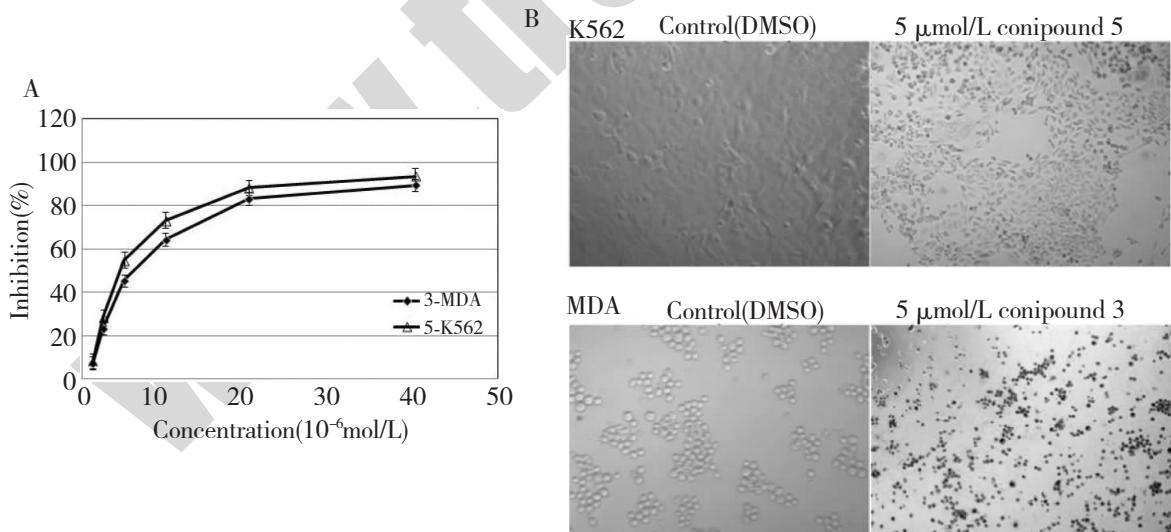


图3 A:化合物3、5不同浓度下对相应肿瘤细胞生长的抑制作用;B:利用倒置荧光显微镜观察两种化合物对癌细胞生长及细胞形态的变化(化合物浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ )

Fig. 3 A: The inhibitory effect of different concentrations of 3 and 5 against cancer cells correspondingly; B: The morphology, growth rate were analyzed by inversion fluorescence microscope (sample concentration was 5  $\mu\text{mol/L}$ )

#### 3.2.2 流式细胞仪分析细胞凋亡

利用流式细胞仪检测了3及5对两种癌细胞的

诱导凋亡效果(图4A)及差异(Fig. 4B),结果分析表明两种化合物均能极显著诱导其癌细胞凋亡(P

<0.01), 说明这两种化合物分别对两种癌细胞的

生长抑制作用是通过诱导癌细胞凋亡起作用的。

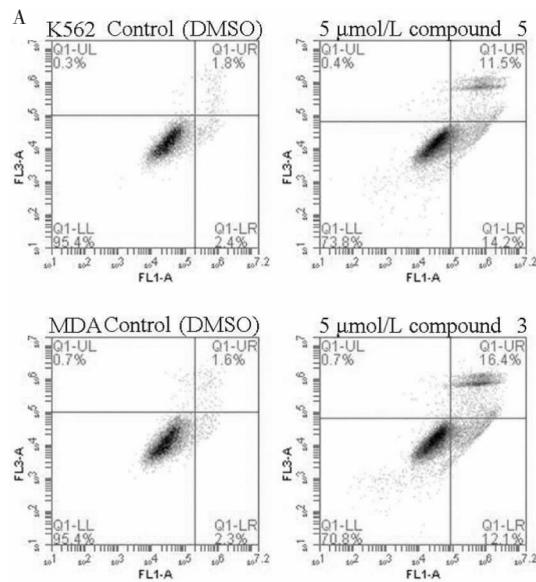


图 4 流式细胞仪检测 3 及 5 对两种细胞的诱导凋亡效果(A)

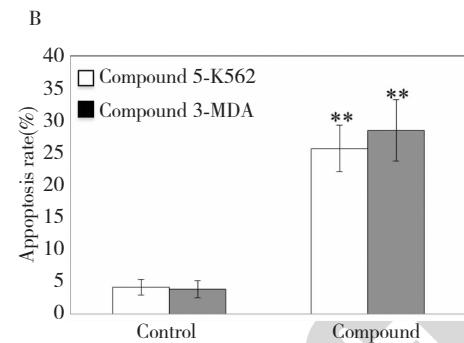
Fig. 4 The apoptosis effect (A) and its difference (B) were analyzed by flow cytometry

## 4 结论

通过应用多种色谱方法从川黄柏果实的乙醇提取物中分离得到 10 单体化合物, 化合物 1 为新的天然产物, 体外抗肿瘤活性表明, 化合物 3 对 MDA 细胞的增殖具有较好的抑制作用, 化合物 5 对 K562 细胞的生长具有较好的抑制作用, 它们  $IC_{50}$  值分别为  $7.38 (\pm 3.24) \mu\text{mol/L}$ ,  $3.86 (\pm 2.71) \mu\text{mol/L}$ , 并能极显著诱导相应肿瘤细胞凋亡 ( $P < 0.01$ )。本研究成果丰富了川黄柏果实中的化学成分及生物活性内容, 为其进一步的研究开发提供参考资料。

## 参考文献

- State Administration of Traditional Chinese, the Editorial Board of Chinese Materia Medica (国家中医药管理局,《中华本草》编委会). *Chinese Materia Medica*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999. 3775-3776.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2005. 214.
- Wang HQ (王衡奇), Qin MJ (秦民坚), Yu GD (余国奠). Advances in study on chemical constituents and pharmacologies of *Phellodendron*. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2001, 20(4): 6-8.
- Xu M (徐敏), Wan DG (万德光). Principal component a-



nalysis and cluster analysis of trace elements in *Phellodendronchinense* Schneid. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19: 151-153.

- Yan C (晏晨), Guo HW (郭洪位), Zhang YD (张云东), et al. Study on the chemical constituents of the volatile oil from *Phellodendronchinense* Schneid. in Guizhou province. *J Qiannan Med Coll National* (黔南民族医专学报), 2015, 28(2): 90-92.
- Purushothaman KK, Durabwamy K, Connolly JD, et al. Triterpenoids from *Walsurapisczda*. *Phytochemistry*, 1985, 24: 2349-2354.
- Mulholland DA, Taylor DAH. Protolimonoids from *Turraeanilotica*. *Phytochemistry*, 1988, 27: 1220-1221.
- Angela MC, Francisco SO, Maria ILM, et al. Triterpenes from *Cedrelaodorata*. *Phytochemistry*, 1991, 30: 1225-1229.
- Merrien A, Polons J. The natural occurrence of melianodiol and its diacetate in *Samaderamadagascariensis* (Simaroubaceae): Model Experiments on Melianodiol directed towards Simarolide. *Chem Comm*, 1971, 6: 261-263.
- Epe B, Mondon A. Zur Kenntnis der bitterstoffeausneoraceen, XII. *Tetrahedr Lett*, 1979, 20: 2015-2018.
- Zhou F, Ma XH, Li ZJ, et al. Four new tirucallane triterpenoids from the fruits of *Meliaazedarach* and their cytotoxic activities. *Chem Biodivers*, 2016, 13: 1738-1746.
- Luo XD, Wu SH, Ma YB, et al. Tirucallane triterpenoids from *Dysoxylumhainanense*. *Phytochemistry*, 2000, 54: 801-805.

(下转第 1438 页)