



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101824067 A

(43) 申请公布日 2010.09.08

(21) 申请号 201010164035.0

A61P 25/28(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.06

A61P 35/02(2006.01)

(71) 申请人 沈阳药科大学

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路  
103 号

(72) 发明人 李宁 李铤 李占林 李巍  
孟大利 肖皖

(74) 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司 21207

代理人 李宇彤

(51) Int. Cl.

C07J 63/00(2006.01)

A61K 31/704(2006.01)

A61K 31/56(2006.01)

A61K 31/58(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 13 页

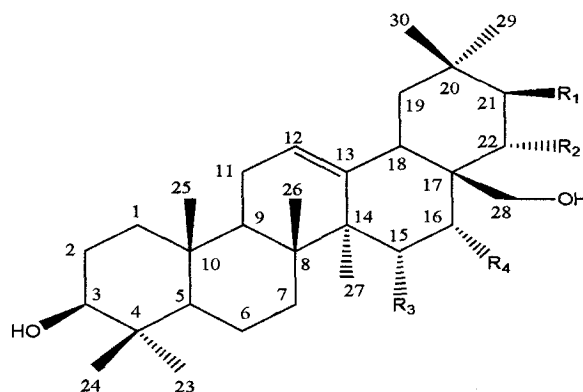
### (54) 发明名称

玉蕊醇型三萜皂苷类化合物、制备方法及其应用

### (57) 摘要

本发明属于医药技术领域,提供了玉蕊醇型三萜皂苷类化合物、制备方法及其应用,所述的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物通过利用闪式提取技术或溶剂提取法得提取液或萃取液、提取物或萃取液上非极性树脂柱得粗总皂苷,粗总皂苷经硅胶闪烁柱色谱法快速处理,溶剂梯度洗脱,再经中低压柱色谱, HPLC 技术得到玉蕊醇型三萜皂苷类化合物,制备过程中利用薄层色谱和 HPLC 技术检测玉蕊醇型三萜类化合物。所制备的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物具有较好的抗肿瘤活性和改善学习记忆的活性。

1. 玉蕊醇型三萜皂苷类化合物,其特征在于,该皂苷具有如下结构通式:



|                            | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1barrigenol R <sub>1</sub> | OH             | OH             | OH             | OH             |
| 2barrigenol A <sub>1</sub> | H              | OH             | OH             | OH             |
| 3barrigeno A <sub>2</sub>  | H              | OH             | H              | OH             |
| 4barringtogenol C          | OH             | OH             | H              | OH             |
| 516-deoxybarringtogenol C  | OH             | OH             | H              | H              |

玉蕊醇型三萜基本母核为上图中 1-5 种,其中 C-16, C-21, C-22, C-28 位上可有酰基取代,酰基取代的种类主要包括乙酰基,当归酰基,惕恪酰基;在 C-3, C-21, C-28 位可连接糖片段,糖的数目为 1-5 个,糖的种类为呋糖,葡萄糖醛酸,葡萄糖,阿拉伯糖,半乳糖,木糖,鼠李糖,糖之间的连接方式有 1-2 位连接,1-4 位连接,1-3 位连接和 1-6 位连接;呋糖上可有一个或二个酰基取代,酰基取代类型主要为乙酰基和 / 或当归酰基。

2. 一种如权利要求 1 所述的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,其特征在于:

(1) 粉碎选定的中药,然后利用闪式提取技术或溶剂提取法,采用 40% -100% 的乙醇或甲醇提取,减压回收提取液至醇浓度低于 5%,离心后取上清液;

(2) 上清液经非极性大孔树脂柱色谱处理,依次用水和醇梯度洗脱,各洗脱部位利用薄层色谱和 HPLC 技术,筛选富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位,得到 30% -80% 醇洗脱下来的流分为玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位,即粗总皂苷;

(3) 粗总皂苷经快速中低压反相柱色谱,以甲醇 / 水或乙醇 / 水梯度洗脱,减压回收溶剂,所得流分利用薄层色谱和 HPLC 技术筛选富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效流分;

(4) 上述步骤 (3) 中所得有效流分经半制备或制备型 HPLC 色谱分离,以甲醇 / 水,乙腈 / 水或甲醇 / 乙腈 / 水为流动相洗脱,得到玉蕊醇型三萜皂苷类化合物。

3. 一种如权利要求 1 所述的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,其特征在于:

(1) 粉碎选定的中药,然后利用闪式提取技术或溶剂提取法,采用 40% -100% 的乙醇或甲醇提取,减压回收提取液至醇浓度低于 5%,提取液分别用氯仿或二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,回收溶剂,收集得到氯仿或二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物;

(2) 正丁醇萃取物经非极性大孔树脂柱色谱处理,依次用水和醇梯度洗脱,各洗脱部位利用薄层色谱和 HPLC 技术筛选富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位,得到 30% -80% 醇洗脱下来的流分为玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位,即粗总皂苷;

(3) 乙酸乙酯萃取物和步骤(2)中所得粗总皂苷分别经快速中低压反相色谱,以甲醇/水或乙醇/水梯度洗脱,减压回收溶剂,所得流分利用薄层色谱和 HPLC 技术筛选富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效流分;

(4) 上述步骤(3)中所得有效流分经半制备或制备型 HPLC 色谱分离,以甲醇/水,乙腈/水或甲醇/乙腈/水为流动相洗脱,得到玉蕊醇型三萜皂苷类化合物。

4. 按照权利要求 1 或 2 所述玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,其特征在于:所述步骤(2)的醇为乙醇,其梯度洗脱浓度为 10% -100%。

5. 按照权利要求 1 所述玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,其特征在于:所述步骤(3)为粗总皂苷经快速中低压柱色谱法处理,洗脱溶剂为 1 : 10 ~ 10 : 1 的甲醇/水或乙醇/水,混合比例 1 : 5 ~ 5 : 1 的流分为玉蕊醇型三萜皂苷类成分的流分。

6. 按照权利要求 2 所述玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,其特征在于:所述步骤(3)为乙酸乙酯萃取物和步骤(2)中所得粗总皂苷分别经快速中低压柱色谱法处理,洗脱溶剂为 1 : 10 ~ 10 : 1 的甲醇/水或乙醇/水,混合比例 1 : 5 ~ 5 : 1 的流分为玉蕊醇型三萜皂苷类成分的流分。

7. 按照权利要求 1 所述玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,其特征在于:所述步骤(4)为步骤(3)中所得流分进一步经高效液相色谱分离,流动相为甲醇/水、乙腈/水或甲醇/乙腈/水,从甲醇/水混合溶剂比例为 1 : 5 ~ 4 : 1、乙腈/水混合溶剂比例为 1 : 10 ~ 3 : 1、甲醇/乙腈/水混合溶剂比例为 1 : 1 : 10 ~ 4 : 4 : 2 的流分中得到玉蕊醇型三萜皂苷类单体化合物。

8. 按照权利要求 2 所述玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,其特征在于:所述步骤(4)为步骤(3)中所得流分进一步经高效液相色谱分离,流动相为甲醇/水、乙腈/水或甲醇/乙腈/水,从甲醇/水混合溶剂比例为 1 : 5 ~ 4 : 1、乙腈/水混合溶剂比例为 1 : 10 ~ 3 : 1、甲醇/乙腈/水混合溶剂比例为 1 : 1 : 10 ~ 4 : 4 : 2 的流分中得到玉蕊醇型三萜皂苷类单体化合物。

9. 权利要求 1 所述的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

10. 权利要求 1 所述的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物在制备提高学习记忆的药物中的应用。

## 玉蕊醇型三萜皂苷类化合物、制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及皂苷类化合物制备,具体涉及玉蕊醇型三萜皂苷类化合物、制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 玉蕊醇型三萜基本母核为多羟基取代的齐墩果烷型三萜。玉蕊醇 R<sub>1</sub>(barrigenol R<sub>1</sub>), 玉蕊醇 A<sub>1</sub>(barrigenol A<sub>1</sub>), 玉蕊醇 A<sub>2</sub>(barrigenol A<sub>2</sub> orcamelliagenin A), 玉蕊醇 C(barringtogenol C or theasapogenol B) 以及 16-去氧玉蕊醇 C(16-deoxybarringtogenol C) 均属于玉蕊醇型三萜。到目前为止,已经分离出的玉蕊醇型三萜主要来源于植物界中,如玉蕊科的玉蕊属(Barringtonia),七叶树科的七叶树属(Aesculus),无患子科的车桑子属(Dodonaea),文冠果属(Xanthorocera)等。

[0003] 玉蕊醇型三萜通常具有细胞毒活性。一些含有玉蕊醇三萜的植物提取物具有一系列生物活性,如文献报道山茶花中正丁醇萃取物具有抑制橄榄油所致大鼠血浆甘油三酸酯提高的作用;从 *Dodonaea viscosa* 中得到的总皂苷部分具有增强吞噬作用和灭螺活性;有学者从 *Aesculus hippocastanum* 中分得具有抑制乙醇吸收和降糖作用的玉蕊醇型三萜化合物;有报道从 *Careya arborea* 中分离出来具有抗利什曼虫作用的皂苷;从 *Barringtonia asiatica* 中分离得到具有使瓢虫幼虫拒食活性的三萜皂苷;文献报道 *Myrtillocactus geometrizans* 的甲醇提取物和二氯甲烷萃取物具有杀虫作用;有关对玉蕊醇型皂苷单体的生物活性研究发现,文冠果总皂苷及一些单体成分具有显著改善小鼠学习记忆的作用。

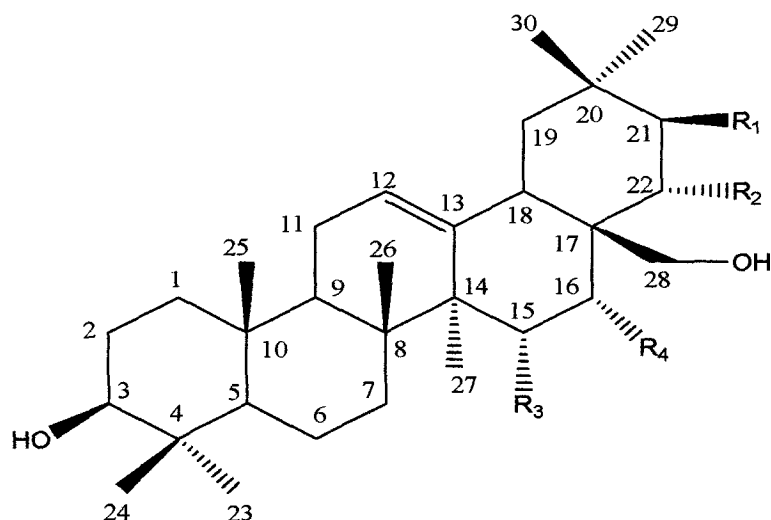
[0004] 为了能更充分的研究这类天然产物的药理活性,我们总结发现了一种快速、大量从植物界分离制备玉蕊醇型三萜皂苷类化合物并检测其抗肿瘤和改善学习记忆活性的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供了玉蕊醇型三萜皂苷类化合物、制备方法及其应用。

[0006] 本发明提供了玉蕊醇型三萜皂苷类化合物,该皂苷具有如下结构通式:

[0007]



|        |                            |                |                |                |                |
|--------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| [0008] |                            | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
| [0009] | 1barrigenolR <sub>1</sub>  | OH             | OH             | OH             | OH             |
| [0010] | 2barrigenolA <sub>1</sub>  | H              | OH             | OH             | OH             |
| [0011] | 3barrigeno A <sub>2</sub>  | H              | OH             | H              | OH             |
| [0012] | 4barringtogenol C          | OH             | OH             | H              | OH             |
| [0013] | 5 16-deoxybarringtogenol C | OH             | OH             | H              | H              |

[0014] 玉蕊醇型三萜基本母核为图中五种 (1-5); 其中 C-16, C-21, C-22, C-28 位上可有酰基取代, 酰基取代的种类主要包括乙酰基, 当归酰基, 惕恪酰基; 在 C-3, C-21, C-28 位可连接糖片段, 糖的数目为 1-5 个, 糖的种类为呋糖, 葡萄糖醛酸, 葡萄糖, 阿拉伯糖, 半乳糖, 木糖, 鼠李糖等, 糖之间的连接方式有 1-2 位连接, 1-4 位连接, 1-3 位连接和 1-6 位连接; 呋糖上可有一个或二个酰基取代, 酰基取代类型主要为乙酰基和当归酰基。

[0015] 本发明提供的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法, 可以通过以下两种方法中任意一种制备玉蕊醇型三萜皂苷类化合物,

[0016] 方法一:

[0017] (1) 粉碎选定的中药 (无患子科车桑子属、七叶树属、玉蕊科玉蕊属、山茶科山茶属等中药和植物), 然后利用闪式提取技术或溶剂提取法, 采用 40% -100% 的乙醇或甲醇提取, 减压回收提取液至醇浓度低于 5%, 离心后取上清液;

[0018] (2) 上清液经非极性大孔树脂 (非极性大孔吸附树脂, 如 D101, HPD100, HPD400, AB-8 等型号) 柱色谱处理, 依次用水和醇梯度洗脱, 各洗脱部位利用薄层色谱和 HPLC 技术 (210nm 检测), 筛选富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位, 得到 30% -80% 醇洗脱下来的流分为玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位, 即粗总皂苷;

[0019] (3) 粗总皂苷经快速中低压反相柱色谱, 以甲醇 / 水或乙醇 / 水梯度洗脱, 减压回收溶剂, 所得流分利用薄层色谱和 HPLC 技术 (210nm 检测) 筛选富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效流分;

[0020] (4) 上述步骤 (3) 中所得有效流分经半制备或制备型 HPLC 色谱分离, 以甲醇 / 水, 乙腈 / 水或甲醇 / 乙腈 / 水为流动相洗脱, 得到玉蕊醇型三萜皂苷类化合物;

[0021] 方法二:

[0022] (1) 粉碎选定的中药 (无患子科车桑子属、七叶树属、玉蕊科玉蕊属、山茶科山茶

属等中药和植物),然后利用闪式提取技术或溶剂提取法,采用 40% -100% 的乙醇或甲醇提取,减压回收提取液至醇浓度低于 5%,提取液分别用氯仿或二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取 2 到 5 次,萃取溶剂与提取液体积比 1 : 3 ~ 3 : 1,回收溶剂,收集得到氯仿或二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物;

[0023] (2) 正丁醇萃取物经非极性大孔树脂柱(非极性大孔吸附树脂,如 D101, HPD100, HPD400, AB-8 等型号)色谱处理,依次用水和醇梯度洗脱 4 ~ 8 个保留体积,各洗脱部位利用薄层色谱和 HPLC 技术(210nm 检测)筛选富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位,得到 30% -80% 醇洗脱下来的流分为玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位,即粗总皂苷;

[0024] (3) 乙酸乙酯萃取物和步骤(2)中所得粗总皂苷分别经快速中低压反相柱色谱,以甲醇/水或乙醇/水梯度洗脱,减压回收溶剂,所得流分利用薄层色谱和 HPLC 技术(210nm 检测)筛选富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效流分;

[0025] (4) 上述步骤(3)中所得有效流分经半制备或制备型 HPLC 色谱分离,以甲醇/水,乙腈/水或甲醇/乙腈/水为流动相洗脱,得到玉蕊醇型三萜皂苷类化合物。

[0026] 本发明提供的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,所述方法一和方法二中的步骤(2)中的醇为乙醇,其梯度洗脱浓度为 10% -100%。

[0027] 本发明提供的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,所述方法一中的步骤(3)为粗总皂苷经快速中低压柱色谱法处理,洗脱溶剂为不同比例的甲醇/水或乙醇/水,混合比例 1 : 5 ~ 5 : 1 的流分为玉蕊醇型三萜皂苷类成分的流分。

[0028] 本发明提供的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,所述方法二中的步骤(3)为乙酸乙酯萃取物和步骤(2)中所得粗总皂苷分别经快速中低压柱色谱法处理,洗脱溶剂为不同比例的的甲醇/水或乙醇/水,混合比例 1 : 5 ~ 5 : 1 的流分为玉蕊醇型三萜皂苷类成分的流分。

[0029] 本发明提供的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,所述方法一中的步骤(4)为步骤(3)中所得流分经进一步经高效液相色谱分离,流动相为甲醇/水、乙腈/水或甲醇/乙腈/水,从甲醇/水混合溶剂比例为 1 : 5 ~ 4 : 1、乙腈/水混合溶剂比例为 1 : 10 ~ 3 : 1、甲醇/乙腈/水混合溶剂比例为 1 : 1 : 10 ~ 4 : 4 : 2 的流分中得到玉蕊醇型三萜皂苷类单体化合物。

[0030] 本发明提供的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法,所述方法二中的步骤(4)为步骤(3)中所得流分进一步经高效液相色谱分离,流动相为甲醇/水、乙腈/水或甲醇/乙腈/水,从甲醇/水混合溶剂比例为 1 : 5 ~ 4 : 1、乙腈/水混合溶剂比例为 1 : 10 ~ 3 : 1、甲醇/乙腈/水混合溶剂比例为 1 : 1 : 10 ~ 4 : 4 : 2 的流分中得到玉蕊醇型三萜皂苷类单体化合物

[0031] 本发明提供的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物的制备方法制备方法简单可靠,重现性好,所制备的玉蕊醇型三萜皂苷类化合物有抗肿瘤活性和改善学习记忆的活性。

## 具体实施方式

[0032] 下面的实施例将对本发明予以进一步的说明,但并不因此而限制本发明。

[0033] 实施例 1 从文冠果果柄中制备玉蕊醇型三萜类化合物

[0034] (1) 文冠果干燥果柄粉碎后利用溶剂提取法,采用 75% 的乙醇回流提取三次,减

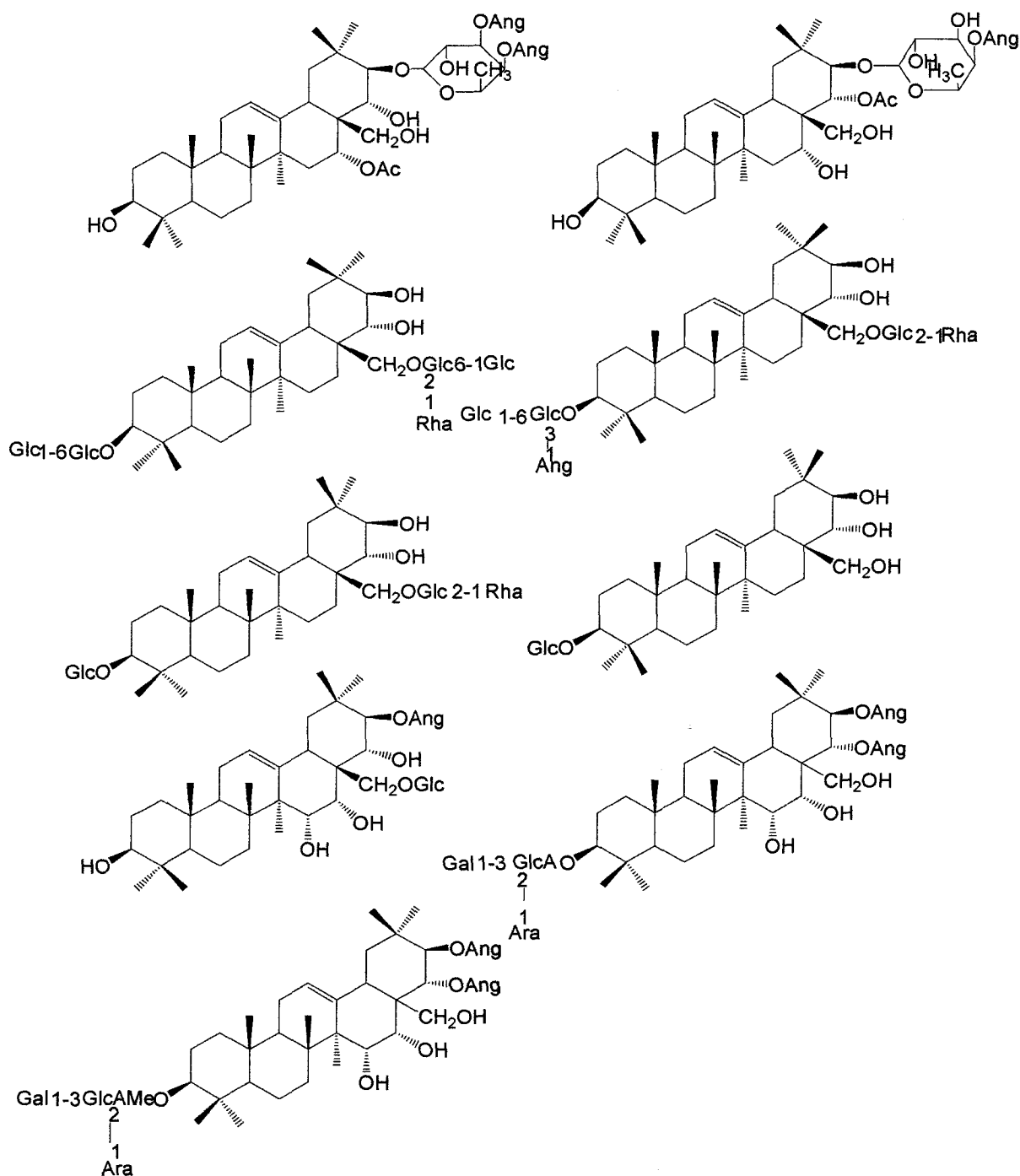
压回收提取液至醇浓度低于 5%，提取液分别用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取，回收溶剂收集得到氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取物；

[0035] (2) 正丁醇萃取物经非极性大孔树脂 (HPD-100) 柱色谱处理，依次用水和 30%，60%，80% 乙醇梯度洗脱，各洗脱部位利用薄层色谱技术，以氯仿 / 甲醇 / 水为展开剂，以硫酸 / 乙醇溶液为显色剂，筛选确定 60% 乙醇梯度洗脱部位富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位，得粗总皂苷；

[0036] (3) 乙酸乙酯萃取物和步骤 (2) 中所得粗总皂苷分别经快速中低压柱色谱处理，依次用甲醇：水为 2：8, 4：6, 5：5, 6：4, 9：1 梯度洗脱，各洗脱流分利用薄层色谱技术筛选确定粗总皂苷 4：6, 5：5, 6：4 洗脱部位为富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的流分；

[0037] (4) 步骤 (3) 中所得流分经制备型 HPLC 色谱分离得到如下所示的 9 个玉蕊醇皂苷单体化合物。

[0038]



[0039] 实施例 2 从文冠果果壳中制备玉蕊醇型三萜类化合物

[0040] (1) 干燥成熟文冠果果壳粉碎后利用溶剂提取法, 采用 90% 的乙醇回流提取二次, 减压回收提取液至醇浓度低于 3%, 离心后静置 24 小时, 取上清液;

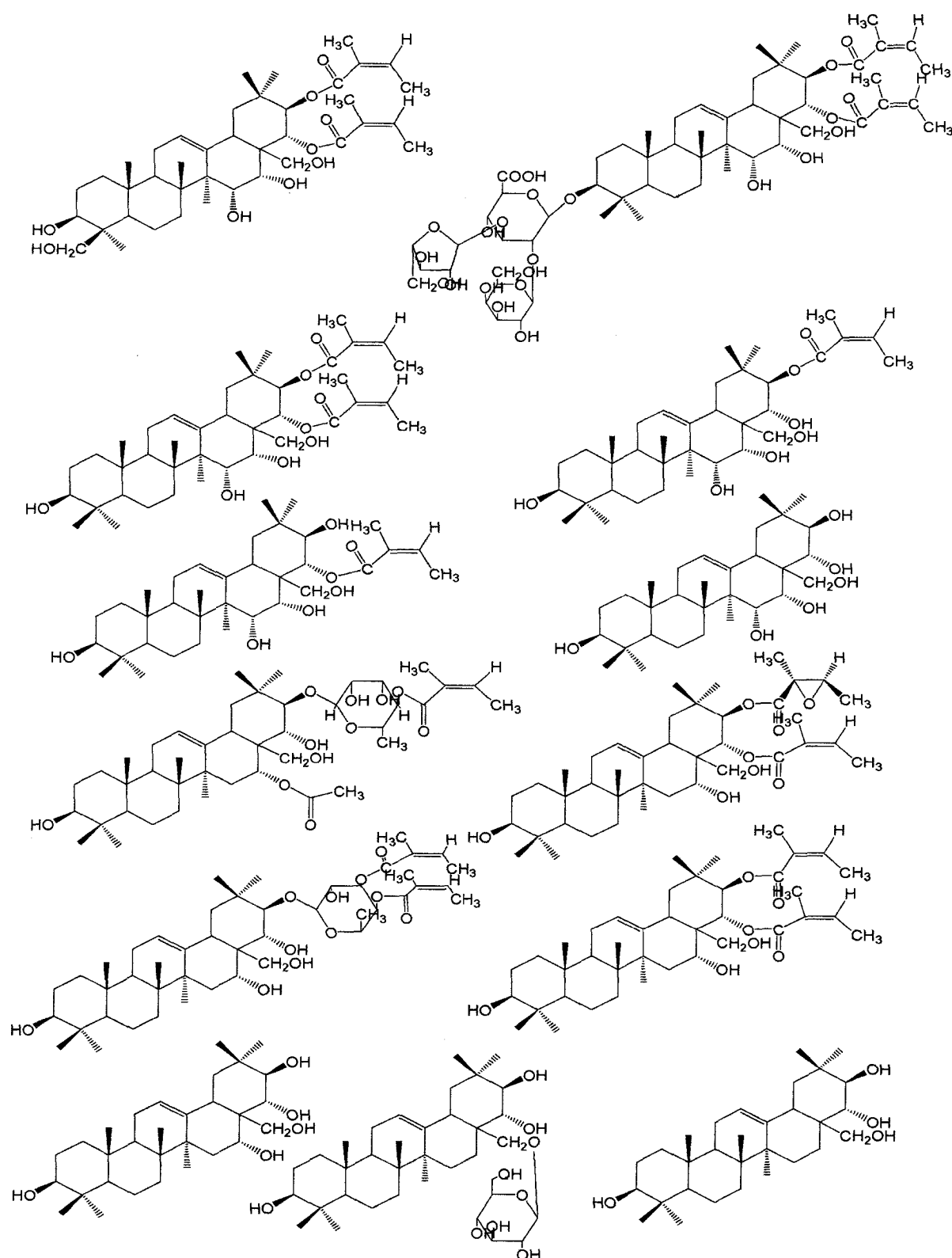
[0041] (2) 上清液经非极性大孔树脂 (D101) 柱色谱处理, 依次用水和 40%, 70%, 90% 乙醇梯度洗脱, 各洗脱部位利用 HPLC 技术 (210nm 检测) 筛选确定 70% 乙醇梯度洗脱部位富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位, 得粗总皂苷;

[0042] (3) 步骤 (2) 中所得粗总皂苷经快速中低压柱色谱处理, 依次用甲醇: 水为 3: 7, 4: 6, 5: 5, 6: 4, 7: 3, 9: 1 梯度洗脱, 各洗脱流分利用薄层色谱技术筛选确定粗总皂苷 5: 5, 6: 4, 7: 3 洗脱部位为富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的流分;

[0043] (4) 步骤 (3) 中所得流分经半制备型 HPLC 色谱分离, 以甲醇/水, 乙腈/水为流动

相洗脱得到如下所示的 13 个玉蕊醇型三萜化合物。

[0044]



[0045] 实施例 3 从山茶中分离制备环阿尔廷型三萜类化合物

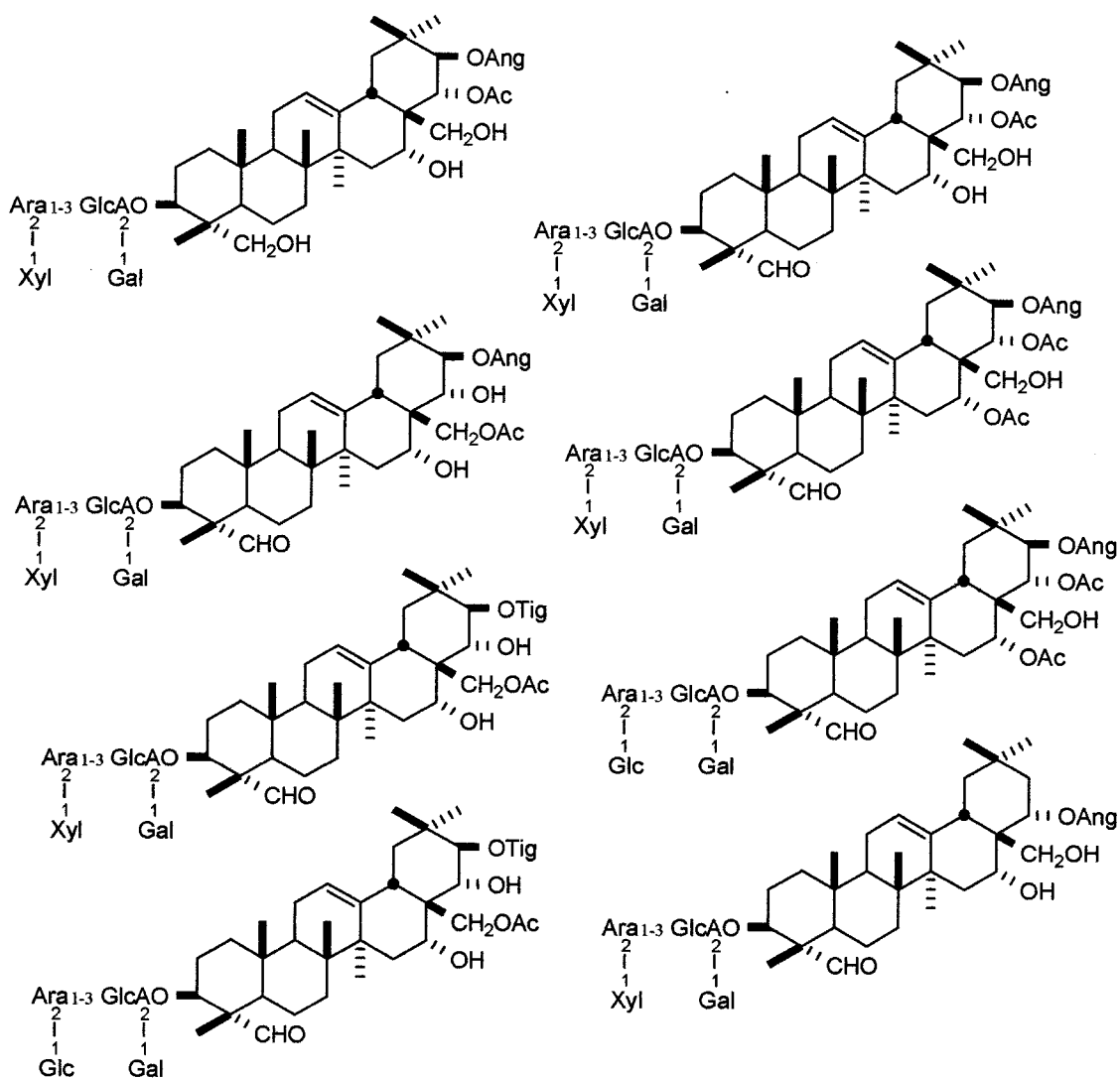
[0046] (1) 山茶干燥种子粉碎后利用溶剂提取法, 采用 100% 的甲醇, 80 度回流提取二次, 减压回收提取液至醇浓度低于 3%, 提取液用正丁醇萃取, 回收溶剂收集得到正丁醇萃取物;

[0047] (2) 正丁醇萃取物经非极性大孔树脂 (AB-8) 柱色谱处理, 依次用水, 60%, 100% 甲醇梯度洗脱, 各洗脱部位利用薄层色谱技术, 以氯仿 / 甲醇 / 水为展开剂, 以硫酸 / 乙醇溶液为显色剂, 筛选确定 60% 甲醇梯度洗脱部位富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的有效部位, 得粗总皂苷;

[0048] (3) 步骤 (2) 中所得粗总皂苷分别经中低压柱色谱处理, 依次用甲醇: 水为 3: 7, 4: 6, 6: 4, 9: 1 梯度洗脱, 各洗脱流分利用薄层色谱技术筛选确定粗总皂苷 4: 6, 6: 4 洗脱部位为富集玉蕊醇型三萜皂苷类成分的流分;

[0049] (4) 步骤 (3) 中所得流分经制备型 HPLC 色谱分离得到如下所示的 8 个玉蕊醇皂苷单体化合物。

[0050]



[0051] 实施例 4 从文冠果果柄中分离的部分玉蕊醇型三萜类化合物的体外抗肿瘤活性的测定

[0052] 采用 MTT 法, 在体外通过高通量筛选, 测定了所分离得到的部分玉蕊醇型三萜类化合物的体外抗肿瘤活性。实验结果如表 1 中所示。

[0053] 试验操作

[0054] (1) 细胞培养

[0055] 取对数生长期的人体肿瘤细胞 (人黑色素瘤细胞 (A375-S2) 和人宫颈癌细胞

(HeLa)), 以内含 10% (v/v) 胎牛血清 (fetal bovine serum) 的 RPMI-1640 培养液稀释为  $5 \times 10^4$  个 /L 的细胞悬浮液, 接种于 96 孔板中,  $100 \mu\text{L}$  / 孔, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、饱和湿度、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24h。

[0056] (2) 添加试药

[0057] 样品用 DMSO 溶解后, 用含 10% (v/v) 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释。将上述含药培养液加入 96 孔板中, 放置于与细胞培养相同条件的培养箱中培养 48h。

[0058] (3) 结果测定

[0059] MTT 法操作流程如下:

[0060] MTT 法: 接种细胞预培养 (24h), 药物处理 (48h), 加 MTT 染色 (4h), 离心除去上清液, 加 DMSO 溶解, 酶标仪 570nm 下测定 OD 值。

[0061] 数据分析按照以下方法计算:

[0062] 细胞生长抑制率 =  $[1 - \text{给药组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}] \times 100\%$ 。

[0063] 采用 LOGIT 法计算药物半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

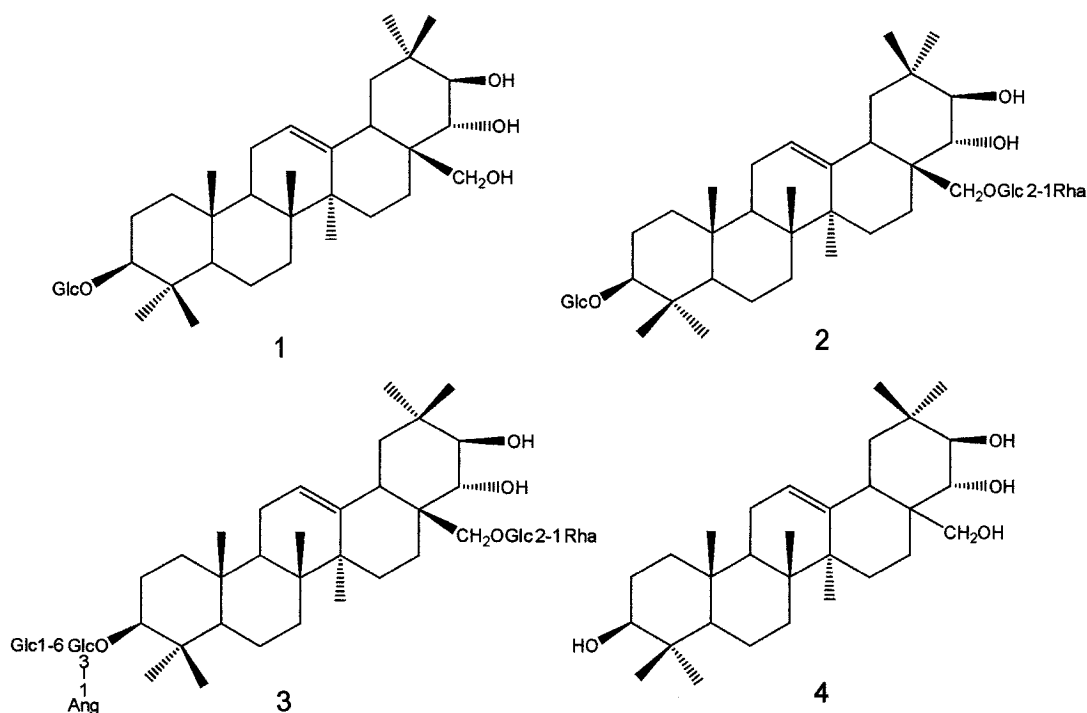
[0064] 试验结果如表 1 中所示。

[0065] 表 1

| Sample | Cells   | Concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ ) |       |       |       | $\text{IC}_{50}$<br>$\mu\text{mol/L}$ |
|--------|---------|--------------------------------------|-------|-------|-------|---------------------------------------|
|        |         | 12                                   | 120   | 240   | 480   |                                       |
| 1      | A375-S2 | 10.61                                | 34.12 | 90.16 | 97.72 | 67.63                                 |
|        | HeLa    | 9.09                                 | 37.15 | 75.73 | 93.18 | 94.59                                 |
| 2      |         | 9                                    | 90    | 180   | 360   |                                       |
|        | A375-S2 | -7.98                                | 2.00  | 8.66  | 11.59 | — <sup>1)</sup>                       |
|        | HeLa    | -2.48                                | 26.55 | 39.89 | 43.41 | —                                     |
|        |         | 10                                   | 100   | 200   | 500   |                                       |
| 3      | A375-S2 | 3.41                                 | 6.69  | 2.20  | 18.21 | —                                     |
|        | HeLa    | 8.01                                 | 8.01  | 18.07 | 16.59 | —                                     |
|        |         | 10                                   | 30    | 50    | 80    |                                       |
| 4      | A375-S2 | 11.25                                | 16.47 | 63.56 | 70.57 | 47.99                                 |
|        | HeLa    | -0.43                                | 68.92 | 82.43 | 96.32 | 32.77                                 |

[0067] 1) “—” indicated the  $\text{IC}_{50}$  value  $> 100 \mu\text{g/ml}$

[0068]



[0069] 实施例 5 从文冠果果壳中分离的部分玉蕊醇型三萜类化合物的体外抗肿瘤活性的测定

[0070] 采用 MTT 法, 在体外通过高通量筛选, 测定了所分离得到的部分玉蕊醇型三萜类化合物的体外抗肿瘤活性。实验结果如表 2 中所示。

[0071] 试验操作

[0072] (1) 细胞培养

[0073] 取对数生长期的六种人体肿瘤细胞 (人急性髓性白血病细胞株 (HL-60)、人前列腺癌细胞株 (PC-3MIE8)、人胃癌细胞株 (BGC-823)、人乳腺癌细胞株 (MDA-MB-435)、人肝癌细胞株 (Be1-7402)、人宫颈癌细胞株 (HeLa)), 以内含 10% (v/v) 胎牛血清 (fetal bovine serum) 的 RPMI-1640 培养液稀释为  $5 \times 10^4$  个 /L 的细胞悬浮液, 接种于 96 孔板中,  $100 \mu\text{L}$  /孔, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、饱和湿度、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24h。

[0074] (2) 添加试药

[0075] 样品用 DMSO 溶解后, 用含 10% (v/v) 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释。将上述含药培养液加入 96 孔板中, 放置于与细胞培养相同条件的培养箱中培养 48h。

[0076] (3) 结果测定

[0077] MTT 法操作流程如下:

[0078] MTT 法: 接种细胞预培养 (24h), 药物处理 (48h), 加 MTT 染色 (4h), 离心除去上清液, 加 DMSO 溶解, 酶标仪 570nm 下测定 OD 值。

[0079] 数据分析按照以下方法计算:

[0080] 细胞生长抑制率 =  $[1 - \text{给药组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}] \times 100\%$ 。

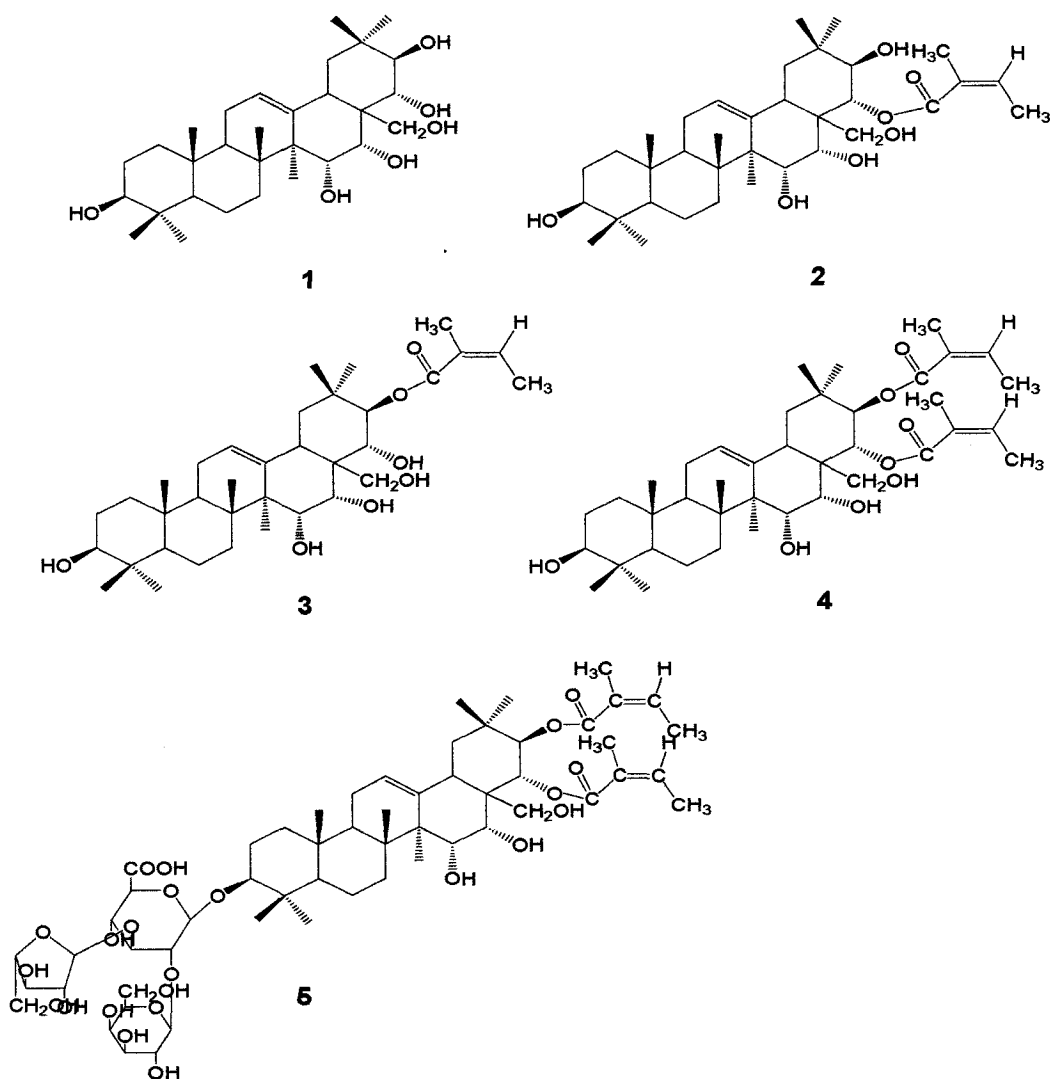
[0081] 采用 LOGIT 法计算药物半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

[0082] 试验结果如表 2 中所示。

[0083] 表 2

| Samples | Dose<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Cell lines <sup>1)</sup> |          |         |            |          |        |
|---------|------------------------------|--------------------------|----------|---------|------------|----------|--------|
|         |                              | HL-60                    | PC-3MIE8 | BGC-823 | MDA-MB-435 | Bel-7402 | HeLa   |
| 1       | 0.5                          | 2.23                     | -8.97    | 4.99    | 0.00       | -8.40    | -15.39 |
|         | 5                            | 6.09                     | -3.44    | -4.55   | 6.58       | -5.04    | -8.75  |
|         | 50                           | 4.98                     | 4.65     | 3.82    | 28.00      | -4.10    | 5.18   |
|         | IC <sub>50</sub>             | — <sup>2)</sup>          | —        | —       | —          | —        | —      |
| 2       | 1                            | 5.38                     | -14.04   | -0.53   | -14.87     | -8.48    | -11.06 |
|         | 10                           | 24.86                    | 0.54     | -16.49  | -13.85     | 1.85     | -2.66  |
|         | 100                          | 27.13                    | 14.50    | 4.56    | 0.55       | 11.77    | -0.87  |
|         | IC <sub>50</sub>             | —                        | —        | —       | —          | —        | —      |
| 3       | 1                            | 3.24                     | -10.23   | -0.89   | 1.56       | -6.59    | -10.50 |
|         | 10                           | 15.62                    | -5.16    | -2.78   | -4.86      | -5.42    | -2.64  |
|         | 100                          | 17.85                    | 0.26     | 5.48    | 7.52       | -1.94    | 0.54   |
|         | IC <sub>50</sub>             | —                        | —        | —       | —          | —        | —      |
| 4       | 1                            | -1.02                    | -0.57    | -4.58   | 4.32       | 0.58     | -7.42  |
|         | 10                           | -6.23                    | 5.68     | -7.62   | 8.91       | -1.97    | -2.39  |
|         | 100                          | -5.45                    | 7.89     | 8.95    | 11.67      | -0.69    | 0.23   |
|         | IC <sub>50</sub>             | —                        | —        | —       | —          | —        | —      |
| 5       | 0.5                          | 9.34                     | -13.90   | -11.71  | -4.50      | -9.78    | -12.72 |
|         | 5                            | 17.68                    | -7.63    | -5.92   | 2.92       | -1.24    | -4.05  |
|         | 50                           | 56.90                    | 92.03    | 92.45   | 93.14      | 92.96    | 95.49  |
|         | IC <sub>50</sub>             | 41.9                     | 41.0     | 40.2    | 18.6       | 39.3     | 34.2   |

[0085]



[0086] 实施例 5 从文冠果果壳中分离的部分玉蕊醇型三萜类化合物的改善学习记忆活性的测定

[0087] 采用体外 PC12D 细胞活性筛选体系,对部分玉蕊醇型三萜类化合物单体进行了促进 NGF 介导的神经突触生长活性的测定,结果见表 3。

[0088] 试验操作

[0089] (1) 细胞培养

[0090] PC12D 细胞保存于内含 5% (v/v) 胎牛血清、10% 马血清和 2mM 谷氨酰胺的 DMEM 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's medium, 高葡萄糖型) 中,置于 37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。临用时用含 1mM EGTA 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 培养 1h,接种于用聚 L- 赖氨酸覆盖的 24 孔培养板中 ( $2 \times 10^4$  个 / 孔)。

[0091] (2) 添加试剂

[0092] 供试样品 1 :供试药物溶解于 DMSO 中,并用含有 1% 胎牛血清和 2% 马血清的培养基稀释为 60、20、6  $\mu$ g/ml 三个梯度。

[0093] 供试样品 2 :供试药物溶解于 DMSO 中,并用含有 1% 胎牛血清和 2% 马血清的培养基稀释为 60、20、6  $\mu$ g/ml 三个梯度,同时加入 NGF (7S),使其浓度为 2ng/ml。

[0094] 阴性对照组 :NGF (7S),加入含有 1% 胎牛血清和 2% 马血清的培养基配制成浓度

为 2ng/ml 的溶液。

[0095] 阳性对照组 :NGF (7S), 加入含有 1% 胎牛血清和 2% 马血清的培养基配制成浓度为 30ng/ml 溶液。

[0096] 细胞在培养 24h 后, 在 24 孔板中加入上述配制好的各组样品溶液, 放置于与上述培养条件相同的环境下继续培养 48h。

[0097] (3) 结果测定

[0098] 在培养体系中加入含 1% 戊二醛的 PBS 缓冲溶液固定, 并保存于 PBS 溶液中。将长度为细胞直径一倍以上的细胞膜间延长定义为细胞突触, 并采用相差显微镜观察 PC12D 细胞突触的生成。每个数据点至少观察 100 个以上细胞的情况, 并记录形成突触的 PC12D 细胞的个数。

[0099] 数据处理 :

[0100] 形成突触细胞百分率 [Neurite-bearing cells(%)] =

[0101] [供试样品 2 组细胞数目 / 阳性对照组细胞数目] × 100%

[0102] 采用上述方法, 我们考察了文冠果果壳中的部分玉蕊醇型三萜在体外对 NGF 介导的神经突触形成的促进作用。其与阳性对照组相比, 形成突触细胞百分率结果如表 3 中所示。

[0103] 表 3

[0104]

| Samples | Neurite-bearing cells (% of positive control) <sup>1,2</sup> |    |    |
|---------|--------------------------------------------------------------|----|----|
|         | Conc.(μg/ml)                                                 |    |    |
|         | 60                                                           | 20 | 6  |
| 1       | — <sup>3</sup>                                               | 12 | 14 |
| 2       | —                                                            | 13 | 13 |
| 3       | —                                                            | 11 | 13 |
| 4       | —                                                            | 46 | 28 |
| 5       | 42                                                           | 29 | 22 |
| 6       | 38                                                           | 24 | 16 |
| 7       | 12                                                           | 13 | 10 |
| 8       | 12                                                           | 9  | 13 |

[0105] 1) NGF (2ng/ml, 12%) was used as the negative control.

[0106] 2) Strong activity :61-100%, moderate activity :31-60%, mild activity :10-30% .

[0107] 3) “—” indicated the death of the cells for the cytotoxicity of the fractions or compounds.

[0108]

