

吉林延龄草的非皂苷类成分及其细胞毒活性

冯密艳^{1,2,3}, 陈宇^{2,3}, 严欢^{2,3}, 倪伟^{2,3}, 秦徐杰^{2,3*}, 刘海洋^{2,3*}

1. 云南大学化学科学与工程学院·药学院, 云南 昆明 650224

2. 中国科学院昆明植物研究所, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201

3. 云南省天然药物化学重点实验室, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 研究吉林延龄草 *Trillium kamschaticum* 非止血活性部位化学成分及其生物活性。方法 采用硅胶、反相 C₁₈、Sephadex LH-20 等色谱材料和重结晶方法进行分离纯化, 通过理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构, 并用 MTT 法评价部分化合物的细胞毒活性。结果 从吉林延龄草非止血活性部位分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为 β -蜕皮激素 (1)、水龙骨科素 B (2)、integristerone B (3)、(9Z,15Z)-11,12,13-三羟基-9,15-十八碳二烯酸 (4)、(Z)-11,12,13-三羟基-9-十八碳烯酸 (5)、(9Z,15Z)-11,12,13-三羟基-9,15-十八碳二烯酸甲酯 (6)、(Z)-11,12,13-三羟基-9-十八碳烯酸甲酯 (7)、7,11-二甲基-3-亚甲基-10 β ,11-二羟基-1,6-十二碳二烯醇-10-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷 (8)、山柰酚-3-O- α -L-阿拉伯吡喃糖基 (1 \rightarrow 6)-O- β -D-半乳糖吡喃糖苷 (9)、5-羟基-4-羟甲基-二氢吡喃-2-酮 (10)。细胞毒活性测试表明, 化合物 1、9 和 10 的 IC₅₀ 值分别为 (26.6 \pm 1.3) μ mol/L (DU145 细胞株)、(16.2 \pm 6.2) μ mol/L (CEM 细胞株) 和 (23.7 \pm 1.2) μ mol/L (HeLa 细胞株)。结论 化合物 4~7 和 10 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 1、9 和 10 具有一定的细胞毒活性。

关键词: 吉林延龄草; β -蜕皮激素; (9Z,15Z)-11,12,13-三羟基-9,15-十八碳二烯酸; 5-羟基-4-羟甲基-二氢吡喃-2-酮; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)01-0090-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.012

Non-saponin constituents and their cytotoxicities from *Trillium kamschaticum*

FENG Mi-yan^{1,2,3}, CHEN Yu^{2,3}, YAN Huan^{2,3}, NI Wei^{2,3}, QIN Xu-jie^{2,3}, LIU Hai-yang^{2,3}

1. School of Chemical Science and Technology & School of Pharmacy, Yunnan University, Kunming 650224, China

2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

3. Yunnan Key Laboratory of Natural Medicinal Chemistry, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents and bioactivity of the moieties without hemostatic effects of *Trillium kamschaticum*. **Methods** All compounds were isolated and purified by means of silica gel column chromatography, reverse phase C₁₈ column chromatography, Sephadex LH-20, and recrystallization methods. Their structures were determined by physicochemical properties, and spectral data. The cytotoxic activity of selected compounds was also evaluated using the MTT method. **Results** Ten compounds were obtained from the moieties without hemostatic effects of *T. kamschaticum* and their structures were identified as β -ecdysone (1), polypodine B (2), integristerone B (3), (9Z,15Z)-11,12,13-trihydroxyoctadeca-9,15-dienoic acid (4), (Z)-11,12,13-trihydroxyoctadec-9-enoic acid (5), methyl (9Z,15Z)-11,12,13-trihydroxyoctadeca-9,15-dienoate (6), methyl (Z)-11,12,13-trihydroxyoctadec-9-enoate (7), 7,11-dimethyl-3-methylene-1,6-dodecadien-10 β ,11-diol-10-O- β -D-glucopyranoside (8), kaempferol-3-O- α -L-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-galactopyranoside (9), and 5-hydroxy-4-hydroxymethyl-2H-pyran-2-one (10), respectively. Compounds 1, 9, and 10 showed cytotoxic activities with IC₅₀ values of (26.6 \pm 1.3) μ mol/L (DU145 cells), (16.2 \pm 6.2) μ mol/L (CEM cells), and (23.7 \pm 1.2) μ mol/L (HeLa cells), respectively. **Conclusion** Compounds 4~7 and 10 are obtained for the first time from

收稿日期: 2017-08-30

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31600283); 中国科学院昆明植物研究所学科交叉引导性项目 (KIB2017004); 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室资助项目 (P2017-ZZ04)

作者简介: 冯密艳 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: fengmiyan@mail.kib.ac.cn

*通信作者 秦徐杰 (1984—), 男, 助理研究员, 主要从事植物资源化学研究。E-mail: qinxujie@mail.kib.ac.cn

刘海洋 (1971—), 男, 研究员, 主要从事中药资源可持续利用研究。E-mail: haiyangliu@mail.kib.ac.cn

Trillium genus, and compounds **1**, **9**, and **10** showed cytotoxic activities.

Key words: *Trillium kamtschaticum* Pall. ex Pursh; β -ecdysone; (9Z,15Z)-11,12,13-trihydroxyoctadeca-9,15-dienoic acid; 5-hydroxy-4-hydroxymethyl-2H-pyran-2-one; cytotoxicity

延龄草为百合科延龄草属 *Trillium* L. 植物,属于多年生草本。延龄草属植物全世界共有约 50 种,我国共有 3 种,即延龄草 *Trillium tschonoskii* Maxim.、吉林延龄草 *T. kamtschaticum* Pall. ex Pursh 和西藏延龄草 *T. govanianum* Wall. ex Royle。吉林延龄草主要分布于我国的吉林地区,生于海拔 500~1 400 m 的林下、林边或潮湿之处。在日本、朝鲜、俄罗斯及北美地区也有零星分布^[1]。延龄草又称芋儿七、鱼儿七(《陕西中草药》)、马尾七、尸儿七以及头顶一颗珠等,是著名的土家族四大神药(文王一支笔、七叶一枝花、江边一碗水、头顶一颗珠)之一^[2-3]。延龄草全株均可入药,其味甘,性平,有小毒,根茎可作为中药材“头顶一颗珠”,用于月经不调、崩漏、外伤出血、跌打损伤等症,在土家族、苗族等少数民族地区广泛应用^[4]。

该属植物的次生代谢产物主要为甾体皂苷(薯蓣皂苷、偏诺皂苷、延龄草皂苷),同时还含有黄酮苷、倍半萜苷、苯丙素苷等类型的化合物^[5]。在前期活性研究中发现吉林延龄草的 70%乙醇洗脱部位具有显著诱导兔血小板聚集活性,并从该活性部位分离鉴定了一系列甾体皂苷类化合物^[6-7]。本研究以化学成分及生物活性多样性为出发点,开展非活性部位的化学成分研究。从吉林延龄草非活性部位(30%和 90%乙醇洗脱部位)分离得到 10 个化合物,分别鉴定为 β -蜕皮激素(β -ecdysone, **1**)、水龙骨科素 B (polypodine B, **2**)、integristerone B (**3**)、(9Z,15Z)-11,12,13-三羟基-9,15-十八碳二烯酸 [(9Z,15Z)-11,12,13-trihydroxyoctadeca-9,15-dienoic acid, **4**]、(Z)-11,12,13-三羟基-9-十八碳烯酸 [(Z)-11,12,13-trihydroxyoctadec-9-enoic acid, **5**]、(9Z,15Z)-11,12,13-三羟基-9,15-十八碳二烯酸甲酯 [methyl (9Z,15Z)-11,12,13-trihydroxyoctadeca-9,15-dienoate, **6**]、(Z)-11,12,13-三羟基-9-十八碳烯酸甲酯 [methyl (Z)-11,12,13-trihydroxyoctadec-9-enoate, **7**]、7,11-二甲基-3-亚甲基-10 β ,11-二羟基-1,6-十二碳二烯二醇-10-O- β -D-葡萄糖苷 (7,11-dimethyl-3-methylene-1,6-dodecadien-10 β ,11-diol-10-O- β -D-glucopyranoside, **8**)、山柰酚-3-O- α -L-阿拉伯糖基(1 \rightarrow 6)-O- β -D-半乳糖苷 [kaempferol-3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-

O- β -D-galacopyranoside, **9**] 和 5-羟基-4-羟甲基-二氢吡喃-2-酮 [5-hydroxy-4-hydroxymethyl-2H-pyran-2-one, **10**]。化合物 **4**~**7** 和 **10** 为首次从该属植物中分离得到;细胞毒活性测试结果表明化合物 **1**、**9** 和 **10** 具有一定的细胞毒活性。

1 仪器与材料

Bruker AM-400、Bruker DRX-500 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪(Agilent 公司);ZORBAX SB-C₁₈ 高效液相半制备柱(250 mm \times 9.4 mm, Agilent 公司);薄层色谱硅胶(200~300 目)、薄层色谱硅胶板 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工厂产品;凝胶为 Sephadex LH-20 (Amersham 生科公司);反相填充材料 RP₁₈ (40~60 μ m, Merck 公司);常规试剂为分析纯,高效液相用试剂为色谱纯。

吉林延龄草全草,于 2012 年 7 月采自吉林磐石市,由中国科学院昆明植物所纪运恒博士鉴定为吉林延龄草 *Trillium kamtschaticum* Pall. ex Pursh, 标本(HY0016)保存在中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室。

2 提取与分离

干燥吉林延龄草全草(10 kg)粉碎后分别用 70%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压回收溶剂至无乙醇味,再用正丁醇进行萃取,减压浓缩,得正丁醇萃取部位浸膏 839.4 g。浸膏用少量 20%乙醇溶解后,经大孔吸附树脂梯度洗脱得到 30%乙醇、70%乙醇、90%乙醇 3 个洗脱部位。

90%乙醇洗脱部位(101.4 g)经 MCI 脱色后,得到 3 个组分 Fr. A~C。Fr. B (20.5 g)经硅胶柱色谱,氯仿-甲醇-水(20:1:0 \rightarrow 5:1:0.1)梯度洗脱,得 6 个组分 Fr. B-1~B-6。Fr. B-2 (2.3 g)经 Sephadex LH-20 纯化(氯仿-甲醇 1:1)后重结晶得到化合物 **6** (98.0 mg);Fr. B-3 (4.6 g)经反复硅胶柱色谱,得化合物 **1** (16.2 mg);Fr. B-4 (2.5 g)经 Sephadex LH-20 纯化(氯仿-甲醇 1:1),并反复重结晶得到化合物 **2** (74.6 mg)。Fr. C (68.5 g)经 RP₁₈ 梯度洗脱(甲醇-水 30:70 \rightarrow 90:10)得 5 个组分 Fr. C-1~C-5。Fr. C-1 (9.6 g)经硅胶柱色谱,经氯仿-甲醇-水(10:1:0.05 \rightarrow 5:1:0.1)梯度洗

脱得化合物 **3** (7.6 mg) 和 **7** (90.6 mg); Fr. C-2 (1.8 g) 与 Fr. C-3 (2.1 g) 经氯仿-甲醇 (1:1) 重结晶分别得化合物 **5** (33.4 mg) 和 **4** (56.5 mg); Fr. C-4 (12.2 g) 经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇-水 (15:1:0.01→5:1:0.1) 梯度洗脱, 后经半制备高效液相色谱纯化 (甲醇-水 35:65) 得化合物 **8** (14.4 mg)。

30%乙醇洗脱部位 (430.5 g) 进行硅胶柱色谱分离, 氯仿-乙醇-水 (7:3:0.5→1:1:1) 梯度洗脱得 5 个组分 Fr. D~H。Fr. G (350.5 g) 经 RP₁₈ (甲醇-水 30:70→70:30), 共得到 7 个组分 Fr. G-1~G-7。其中 Fr. G-2 (10.7 g) 经过反复硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇-水 (10:1:0→5:1:0.1) 梯度洗脱, 得到化合物 **9** (76.0 mg); Fr. G-4 (7.9 g) 经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 和半制备高效液相色谱纯化 (甲醇-水 25:75) 得到化合物 **10** (44.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色针晶 (氯仿-甲醇), ESI-MS m/z : 467 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{27}H_{44}O_7$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 6.23 (1H, s, H-7), 1.59 (3H, s, H-21), 1.37 (3H, s, H-26), 1.37 (3H, s, H-27), 1.22 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) δ : 203.5 (d, C-6), 166.2 (s, C-8), 121.7 (d, C-7), 84.2 (d, C-14), 77.6 (d, C-22), 76.9 (s, C-20), 69.6 (d, C-25), 68.2 (d, C-2), 68.1 (d, C-3), 51.5 (d, C-5), 50.1 (d, C-17), 48.2 (s, C-13), 42.7 (t, C-24), 38.7 (s, C-10), 38.0 (t, C-1), 34.5 (d, C-9), 32.5 (t, C-15), 32.0 (t, C-4), 31.8 (t, C-12), 30.2 (q, C-26), 30.0 (q, C-27), 27.5 (t, C-23), 24.5 (q, C-19), 21.8 (q, C-21), 21.5 (t, C-11), 21.1 (t, C-16), 18.0 (q, C-18)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **1** 为 β -蜕皮激素。

化合物 **2**: 白色针晶 (氯仿-甲醇), ESI-MS m/z : 497 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{27}H_{44}O_8$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 6.23 (1H, s, H-7), 1.59 (3H, s, H-21), 1.37 (3H, s, H-26), 1.37 (3H, s, H-27), 1.22 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) δ : 201.0 (s, C-6), 166.9 (s, C-8), 120.0 (d, C-7), 80.0 (s, C-14), 79.9 (s, C-5), 77.6 (d, C-22), 76.8 (s, C-20), 69.9 (d, C-25), 69.6 (d, C-3), 68.0 (d, C-2), 50.0 (d, C-17), 48.8 (s, C-10), 48.2 (s, C-13), 42.7 (t, C-24), 38.3 (d, C-9), 36.0 (t, C-4), 34.9 (t, C-1), 32.1 (t, C-12), 31.7 (t, C-15), 30.2 (q, C-27), 30.0 (q, C-26), 27.5 (t, C-23), 22.1 (t, C-11), 21.8 (s, C-21), 21.5 (t, C-16), 17.9 (q, C-19), 17.2 (q, C-18)。以上数据与文献

报道一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为水龙骨科素 B。

化合物 **3**: 白色针晶 (氯仿-甲醇), ESI-MS m/z : 513 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{27}H_{44}O_9$ 。 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 6.23 (1H, s, H-7), 1.59 (3H, s, H-21), 1.37 (3H, s, H-26), 1.37 (3H, s, H-27), 1.20 (3H, s, H-18), 1.16 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 202.3 (s, C-6), 166.6 (s, C-8), 120.4 (d, C-7), 85.0 (s, C-14), 80.4 (s, C-5), 78.4 (d, C-22), 77.9 (s, C-20), 76.1 (d, C-1), 71.3 (s, C-25), 70.0 (d, C-3), 69.1 (d, C-2), 50.5 (d, C-17), 48.5 (s, C-13), 47.8 (s, C-10), 42.4 (t, C-24), 39.7 (d, C-9), 37.6 (t, C-4), 32.6 (t, C-12), 31.8 (t, C-15), 29.7 (q, C-26), 28.9 (q, C-27), 27.3 (t, C-23), 22.6 (t, C-11), 21.4 (t, C-16), 21.0 (q, C-21), 18.0 (q, C-18), 14.0 (q, C-19)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为 integristerone B。

化合物 **4**: 白色蜡状物, ESI-MS m/z : 351 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{18}H_{32}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.50 (1H, td, $J = 11.6, 6.9$ Hz, H-16), 5.46 (1H, dd, $J = 11.1, 9.1$ Hz, H-10), 5.38 (1H, td, $J = 11.1, 7.0$ Hz, H-9), 5.31 (1H, td, $J = 11.6, 7.2$ Hz, H-15), 4.47 (1H, dd, $J = 9.1, 6.1$ Hz, H-11), 3.71 (1H, td, $J = 8.7, 2.9$ Hz, H-13), 3.27 (1H, dd, $J = 6.1, 2.9$ Hz, H-12), 0.91 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 177.7 (s, C-1), 133.1 (d, C-9), 132.8 (d, C-16), 131.1 (d, C-10), 128.0 (d, C-15), 76.8 (d, C-12), 71.6 (d, C-13), 68.9 (d, C-11), 14.5 (q, C-18)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为 (9Z,15Z)-11,12,13-三羟基-9,15-十八碳二烯酸。

化合物 **5**: 白色蜡状物, ESI-MS m/z : 353 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{18}H_{34}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.57 (1H, td, $J = 11.0, 7.4$ Hz, H-9), 5.50 (1H, dd, $J = 11.0, 9.1$ Hz, H-10), 4.46 (1H, dd, $J = 9.1, 6.5$ Hz, H-11), 3.72 (1H, td, $J = 8.1, 3.6$ Hz, H-13), 3.26 (1H, dd, $J = 6.5, 3.6$ Hz, H-12), 0.97 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 177.7 (s, C-1), 134.6 (d, C-9), 130.7 (d, C-10), 76.9 (d, C-12), 71.7 (d, C-13), 69.0 (d, C-11), 14.7 (q, C-18)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为 (Z)-11,12,13-三羟基-9-十八碳烯酸。

化合物 **6**: 白色蜡状物, ESI-MS m/z : 365 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{19}H_{34}O_5$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.51 (1H, td, $J = 11.6, 6.8$ Hz, H-16), 5.47 (1H, dd, $J = 11.2, 9.1$ Hz, H-10), 5.38 (1H, td, $J =$

11.2, 7.6 Hz, H-9), 5.31 (1H, td, $J = 11.6, 7.2$ Hz, H-15), 4.48 (1H, dd, $J = 9.1, 6.5$ Hz, H-11); 3.72 (1H, td, $J = 8.7, 2.9$ Hz, H-13), 3.64 (3H, s, H-19), 3.27 (1H, dd, $J = 6.5, 2.9$ Hz, H-12), 0.92 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 176.0 (s, C-1), 133.2 (d, C-9), 132.8 (d, C-16), 131.1 (d, C-10), 128.0 (d, C-15), 76.9 (d, C-12), 71.7 (d, C-13), 69.0 (d, C-11), 52.0 (q, C-19), 14.1 (q, C-18)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **6** 为 (9Z,15Z)-11,12,13-三羟基-9,15-十八碳二烯酸甲酯。

化合物 **7**: 白色蜡状物, ESI-MS m/z : 367 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_5$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.58 (1H, td, $J = 11.0, 7.4$ Hz, H-9), 5.46 (1H, dd, $J = 11.0, 9.2$ Hz, H-10), 4.46 (1H, dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, H-11), 3.72 (1H, td, $J = 8.1, 3.2$ Hz, H-13), 3.64 (3H, s, H-19), 3.26 (1H, dd, $J = 6.8, 3.2$ Hz, H-12), 0.89 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 176.0 (s, C-1), 134.6 (d, C-9), 130.8 (d, C-10), 76.9 (d, C-12), 71.7 (d, C-13), 69.0 (d, C-11), 52.0 (q, C-19), 14.4 (q, C-18)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为 (Z)-11,12,13-三羟基-9-十八碳烯酸甲酯。

化合物 **8**: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 319 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 6.47 (1H, dd, $J = 17.7, 10.8$ Hz, H-1), 5.49 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1'), 5.42 (1H, m, H-6), 5.31 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-2), 5.10 (2H, m, H-15), 1.61 (3H, s, H-14), 1.30 (3H, s, H-13), 1.25 (3H, s, H-12); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 116.8 (t, C-1), 146.9 (d, C-2), 139.9 (d, C-3), 125.1 (d, C-6), 90.7 (d, C-10), 25.6 (q, C-12), 114.0 (t, C-13), 27.4 (q, C-14), 16.3 (q, C-15), 106.6 (d, C-1'), 63.0 (t, C-6')。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为 7,11-二甲基-3-亚甲基-10 β ,11-二羟基-1,6-十二碳二烯二酯-10- O - β -D-葡萄糖苷。

化合物 **9**: 黄色固体粉末, ESI-MS m/z : 603 $[\text{M} +$

$\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.05 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.85 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'), 6.16 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.32 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1''), 3.96 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1'''); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 177.4 (s, C-4), 164.2 (s, C-7), 161.2 (s, C-5), 160.0 (s, C-4'), 156.5 (s, C-9), 156.4 (s, C-2), 133.2 (s, C-3), 131.0 (d, C-2'), 131.0 (d, C-6'), 120.8 (s, C-1'), 115.1 (d, C-3'), 115.1 (s, C-5'), 104.0 (s, C-10), 102.7 (d, C-1''), 101.6 (d, C-1'''), 98.4 (d, C-6), 93.7 (d, C-8), 74.3 (d, C-4''), 72.9 (d, C-3'''), 72.5 (d, C-3''), 71.0 (d, C-2'''), 70.4 (d, C-2''), 68.2 (d, C-5''), 67.4 (d, C-4'''), 66.5 (t, C-6''), 65.0 (t, C-5''')。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为山柰酚-3- O - α -L-阿拉伯糖基 (1 \rightarrow 6)- O - β -D-半乳糖苷。

化合物 **10**: 橙红色针晶 (氯仿-甲醇), ESI-MS m/z : 165 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ 。 TLC 紫外 (254 nm) 下有荧光, FeCl_3 显色为蓝色。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.90 (1H, s, H-6), 6.49 (1H, s, H-3), 4.40 (2H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 176.8 (s, C-2), 170.4 (s, C-5), 147.4 (s, C-4), 141.0 (s, C-6), 110.7 (s, C-3), 61.2 (t, C-7)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **10** 为 5-羟基-4-(羟甲基)-二氢吡喃-2-酮。

4 活性测定

采用 MTT 法^[16]评价了化合物 **1**、**9** 和 **10** 对白血病细胞系 (CCRF-CEM)、人肝癌细胞系 (Huh7)、人结肠细胞系 (HCT116)、肺腺癌细胞系 (A549)、人宫颈癌细胞系 (HeLa) 和人前列腺癌细胞系 (DU145) 的细胞毒活性。化合物 **1**、**9**、**10** 和对照依托泊苷 (VP-16, 北京 Sigma 科技有限公司) 分别以 5 个浓度梯度 (100、50、25、12.5 和 6.25 $\mu\text{mol/L}$) 加入到细胞中。37 $^\circ\text{C}$ 孵育 72 h 后, 570 nm 波长下测定吸光度值。通过 GraphPad Prism 软件中非线性分析计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。结果见表 1。

表 1 化合物 **1**、**9**、**10** 和 VP-16 的细胞毒性
Table 1 Cytotoxicities of compounds **1**, **9**, **10**, and VP-16

化合物	IC_{50} 值/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$					
	CCRF-CEM	Huh7	HCT116	A549	HeLa	DU145
1	>100	47.4 \pm 9.1	>100	>100	82.2 \pm 1.3	26.6 \pm 1.3
9	16.2 \pm 6.2	65.6 \pm 2.3	>100	>100	>100	>100
10	>100	>100	>100	>100	23.7 \pm 1.2	>100
VP-16	5.8 \pm 1.9	7.4 \pm 1.3	28.2 \pm 0.9	27.5 \pm 2.6	8.0 \pm 1.6	2.6 \pm 1.1

由表1可以看出,化合物1对Huh7、HeLa和DU145细胞系均有一定的细胞毒活性,其中对DU145细胞系的抑制率最好,其 IC_{50} 值达到 $(26.6 \pm 1.3) \mu\text{mol/L}$ 。此外,化合物10对HeLa细胞系也有一定的抑制作用, IC_{50} 为 $(23.7 \pm 1.2) \mu\text{mol/L}$,且强于化合物1,而化合物9对CEM细胞系有较强的抑制作用, IC_{50} 为 $(16.2 \pm 6.2) \mu\text{mol/L}$,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 宋立人, 洪 恂. 现代中药学大词典 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [3] 李 群, 王 丽. 适合于延龄草的 ISSR 体系的建立 [J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2007, 30(4): 523-525.
- [4] 谢万宗. 全国中草药汇编: 上册 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [5] 侯志琨. 延龄草化学成分及药理作用研究展望 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(2): 215-221.
- [6] Chen Y, Ni W, Yan H, *et al.* Spirostanol glycosides with hemostatic and antimicrobial activities from *Trillium kamtschaticum* [J]. *Phytochemistry*, 2016, 131: 165-173.
- [7] Qin X J, Si Y A, Chen Y, *et al.* Cytotoxic steroidal saponins from *Trillium kamtschaticum* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(11): 2267-2273.
- [8] Nishimoto N, Shinoro Y. Ecdysteroids from *Pfaffia zresznoides* and reassignment of some ^{13}C NMR chemical shifts [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(9): 2505-2507.
- [9] Baltaev U, Gorovits M B, Abdullaev N D, *et al.* Phytoecdysones of *rhaponticum integrifolium* III. Integristerone B [J]. *Chem Nat Compd*, 1979, 14(4): 388-393.
- [10] Yadav J S, Chadner M C. Stereoselective synthesis of (11*R*, 12*S*, 13*S*)-trihydroxy-(9*Z*, 15*Z*)-octadecadienoic acid: A constituent of rice plant suffering from rice blast disease [J]. *Tetrahedron Lett*, 1990, 31(34): 4349-4359.
- [11] 朱建华, 文 蔚, 胡艳山, 等. 青蒿酸诱导西洋参冠瘿组织生物合成羟基十八碳烯酸 (英文) [J]. 中药材, 2012, 35(6): 869-872.
- [12] Kato T, Yamaguchi Y, Ueyhara T, *et al.* Oxygenated unsaturated fatty acids possessing anti-rice blast fungus activity, isolated from rice plants [J]. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*, 1985, 27: 413-419.
- [13] 张忠立, 左月明, 熊师华, 等. 延龄草根及根茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1689-1691.
- [14] Nakano K, Maruhashi A, Nohara T, *et al.* A flavonol glycoside and a sesquiterpene cellobioside from *Trillium tschonoskii* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(5): 1245-1251.
- [15] Lin A, Lu X M, Fang Y C. Two new 5-hydroxy-2-pyrone derivatives isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus flavus* [J]. *J Antibiot*, 2008, 61(4): 245-249.
- [16] Qin X J, Yu Q, Yan H, *et al.* Meroterpenoids with antitumor activities from Guava (*Psidium guajava*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(24): 4993-4999.