

## • 化学成分 •

## 芫花中瑞香烷型二萜原酸酯类化合物及其肿瘤细胞毒活性

邵泽艳<sup>1,2</sup>, 商倩<sup>1</sup>, 赵娜夏<sup>1</sup>, 张士俊<sup>1</sup>, 夏广萍<sup>1</sup>, 白秀秀<sup>1,2</sup>, 董虹玲<sup>1,2</sup>, 韩英梅<sup>1\*</sup>

1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

**摘要:**目的 研究芫花 *Daphne genkwa* 中的瑞香烷型二萜原酸酯类成分及其肿瘤细胞毒活性。方法 采用色谱分离技术进行分离和纯化, 并根据谱学数据确定化合物的结构, 采用 MTT 法评价化合物对 NCI-H1975 肺癌细胞株和 SK-BR-3 乳腺癌细胞株的细胞毒活性。结果 从芫花中分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为异芫花酯甲(1)、芫花酯甲(2)、芫花酯丁(3)、芫花酯庚(4)、异芫花酯乙(5)、芫花酯乙(6)。结论 化合物 1 为新化合物。化合物 1~6 对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞株显示了较强的细胞毒活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 217.1、172.6、170.2、809.4、83.7、61.6 nmol/L, 而对肺癌 NCI-H1975 细胞株未显示细胞毒活性。

**关键词:** 芫花; 二萜原酸酯类; 细胞毒活性; 异芫花酯甲; 芫花酯丁

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)02-0128-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.002

## Daphnane diterpene esters from flower buds of *Daphne genkwa* and their cytotoxic effects on cancer cells

SHAO Ze-yan<sup>1,2</sup>, SHANG Qian<sup>1</sup>, ZHAO Na-xia<sup>1</sup>, ZHANG Shi-jun<sup>1</sup>, XIA Guang-ping<sup>1</sup>, BAI Xiu-xiu<sup>1,2</sup>, DONG Hong-ling<sup>1,2</sup>, HAN Ying-mei<sup>1</sup>

1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To study daphnane diterpene esters from the flower buds of *Daphne genkwa* and to evaluate their cytotoxicity against tumor cells. **Methods** The compounds were isolated and purified by means of chromatographic techniques and their structures were identified on the basis of spectral features. Cytotoxic activity against NCI-H1975 lung cancer cells and SK-BR-3 breast cancer cells were assessed for all the compounds by MTT method. **Results** Six compounds were isolated and identified as isoyuanhuacin (1), yuanhuacin (2), yuanhuatin (3), yuanhuagin (4), isoyuanhuadin (5), and yuanhuadin (6). **Conclusion** Compound 1 is a new compound. Compounds 1—6 exhibit the strong cytotoxicity on SK-BR-3 human breast cancer cells with the IC<sub>50</sub> values of 217.1, 172.6, 170.2, 809.4, 83.7, and 61.6 nmol/L, respectively, but show no effect on NCI-H1975 human lung cancer cells.

**Key words:** *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.; daphnane diterpene ester; cytotoxic activity; isoyuanhuacin; yuanhuatin

芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 收载于《中国药典》2010 年版(一部), 为传统的泻下逐水药<sup>[1]</sup>。现代研究表明芫花含有黄酮类、二萜原酸酯类等多种化学成分<sup>[2]</sup>, 其中二萜原酸酯类成分以显著的生物活性广泛受到关注。为探明芫花中瑞香烷型二萜原酸酯的抗肿瘤药效关系, 本研究对芫花中该类成分进行进一步的

分离, 得到 6 个化合物(1~6), 分别鉴定为异芫花酯甲(isoyuanhuacin, 1)、芫花酯甲(yuanhuacin, 2)、芫花酯丁(yuanhuatin, 3)、芫花酯庚(yuanhuagin, 4)、异芫花酯乙(isoyuanhuadin, 5)、芫花酯乙(yuanhuadin, 6), 其中化合物 1 为新化合物。肿瘤细胞毒活性测试结果显示这些化合物对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞株增殖普遍具有较强的抑制作用, 而

收稿日期: 2012-11-20

基金项目: 国家重大新药创新专项(2011ZX09401-009)

作者简介: 邵泽艳(1987—), 女, 硕士, 药物分析专业。Tel: 13920791093 E-mail: shaozeyan-1987-2@163.com

\*通信作者 韩英梅, 研究员。Tel: (022)23006959 E-mail: hanyingmei@163.com

网络出版时间: 2012-12-25 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121225.0904.001.html>

对肺癌 NCI-H1975 细胞株增殖基本无活性, 提示这类化合物对不同肿瘤细胞株可能具有选择性细胞毒作用。

### 1 仪器和材料

Bruker AV 400 MHz 核磁共振仪 (德国布鲁克公司); Waters Model 510 型制备型高效液相色谱仪 (Waters 公司); SP100 型紫外检测器 (SP 公司); Kromasil ODS C<sub>18</sub> 半制备色谱柱 (200 mm×20 mm, 5 μm, 大连依利特公司); ZAB—HS 有机磁式质谱仪 (英国 VG 公司); 200~300 目和 60~100 目色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (GE Healthcare 公司); SBC MCI GEL 反相色谱填料 (F 型 75~150 μm, 成都科谱生物有限公司); 紫外可见分光光度计 (TU—1810, 北京普析通用仪器有限责任公司); 其余试剂均为化学纯。

芫花花蕾购自河北安国药材市场, 经天津药物研究院韩英梅研究员鉴定为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et. Zucc. 的干燥花蕾。标本 (YH01) 存放于天津药物研究院新药设计与发现重点实验室。

### 2 提取与分离

取芫花干燥花蕾 9 kg, 用 70%乙醇室温下冷浸提取 2 次, 每次 6 d。合并 2 次提取液, 60 °C 下减压浓缩, 所得总浸膏用适量水混悬, 依次用石油醚 (60~90 °C)、醋酸乙酯、正丁醇反复萃取, 减压浓缩得到石油醚部分 114.1 g, 醋酸乙酯部分 167.0 g, 正丁醇部分 317.9 g。石油醚部分经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (1:0→0:1) 梯度洗脱, 流分经 TLC 检测合并, 共得 26 个组分。组分 19 (2.3 g) 经 MCI gel 柱色谱 (甲醇-水洗脱)、多次 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇洗脱) 分离, 最终用半制备型 HPLC (甲醇-水, 85:15 洗脱) 精制, 得化合物 **1** (60.0 mg)、**2** (234.9 mg)。组分 22 (2.1 g) 经反复的 MCI gel 柱色谱 (甲醇-水) 和半制备型 HPLC (甲醇-水 78:22) 纯化, 得化合物 **3** (20.2 mg)、**4** (10.1 mg)、**5** (18.4 mg)、**6** (218.5 mg)。

### 3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  (nm): 232。HR-EI-MS  $m/z$ : 649.300 7 [M+H]<sup>+</sup> (计算值 649.300 7, C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>O<sub>10</sub>)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.89 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-3'', 7''), 7.57 (1H, brs, H-1), 7.58 (1H, m, H-5''), 7.44 (2H, brt,  $J$  = 7.6 Hz, H-4'', 6''), 7.01 (1H, dd,  $J$  = 15.6, 11.2 Hz, H-3'), 6.02 (1H, dd,  $J$  =

11.2, 10.8 Hz, H-4'), 5.77 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-2'), 5.62 (1H, m, H-5'), 5.23 (1H, s, H-12), 5.03 (1H, s, H-16a), 5.01 (1H, s, H-16b), 4.91 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-14), 4.21 (1H, brs, H-7), 3.93 (1H, brs, H-20a), 3.84 (1H, brs, H-20b), 3.82 (1H, brs, H-10), 3.63 (2H, brt, H-5, 8), 2.57 (1H, dd,  $J$  = 7.6, 14.4 Hz, H-11), 2.22 (2H, m, H-6'), 1.88 (3H, s, H-17), 1.76 (3H, s, H-19), 1.39 (3H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-18), 1.32 (2H, m, H-7'), 1.29 (2H, m, H-8'), 1.26 (2H, m, H-9'), 0.89 (3H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-10'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 209.4 (C-3), 165.4 (C-1''), 160.2 (C-1), 143.0 (C-15), 136.9 (C-5'), 136.8 (C-2), 133.3 (C-5''), 129.8 (C-2''), 129.7 (C-4'), 129.4 (C-3'', 7''), 128.6 (C-4'', 6''), 126.8 (C-3'), 124.3 (C-2'), 117.1 (C-1'), 113.6 (C-16), 83.9 (C-13), 80.6 (C-14), 78.9 (C-12), 78.3 (C-9), 72.2 (C-6), 71.7 (C-7), 64.7 (C-20), 63.9 (C-5), 60.7 (C-4), 47.4 (C-10), 44.0 (C-11), 35.8 (C-8), 31.3 (C-8'), 29.1 (C-7'), 27.8 (C-6'), 22.5 (C-9'), 18.7 (C-17), 18.2 (C-18), 14.0 (C-10'), 9.8 (C-19)。

<sup>1</sup>H-NMR 谱中低场区环内双键上的质子信号  $\delta$  7.57 (1H, brs, H-1) 以及 <sup>13</sup>C-NMR 中一个羰基碳信号  $\delta$  209.4 和一组双键碳信号  $\delta$  160.2, 136.8, 提示结构中存在  $\alpha$ ,  $\beta$  不饱和环酮单元; <sup>1</sup>H-NMR 谱高场区显示的 3 个甲基氢信号分别为 2 个连烯键季碳甲基 ( $\delta$  1.88, 1.76)、1 个连叔碳甲基 ( $\delta$  1.39), 低场区 4 个连氧叔碳上的氢信号  $\delta$  5.23 (1H, s, H-12), 4.91 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-14), 4.21 (1H, brs, H-7), 3.63 (1H, brt, H-5) 和末端双键上的 2 个特征质子信号  $\delta$  5.03 (1H, s, H-16a), 5.01 (1H, s, H-16b), 结合 <sup>13</sup>C-NMR 谱中  $\delta$  78.3, 80.6, 83.9 处的 3 个环氧醚键碳信号以及  $\delta$  117.1 处特征性的连三氧季碳信号, 说明该化合物具有典型的瑞香烷型二萜原酸酯的母核结构<sup>[3]</sup>, 并且  $\delta$  72.2 (C-6) 和 71.7 (C-7) 在较高场, 说明 C-6, C-7 位成氧环<sup>[4]</sup>; <sup>1</sup>H-NMR 谱低场区还显示 1 组单取代苯环氢信号  $\delta$  7.89 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-3'', 7''), 7.57~7.59 (1H, m, H-5''), 7.44 (2H, brt,  $J$  = 7.6 Hz, H-4'', 6''), 提示有 1 苯甲酰基取代; 此外一组长链烯烃键氢信号  $\delta$  7.01 (1H, dd,  $J$  = 15.6, 11.2 Hz), 6.02 (1H, dd,  $J$  = 11.2, 10.8 Hz), 5.77 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz), 5.62 (1H, m, H-5'), 以及脂肪链亚甲基氢信号  $\delta$  2.22 (2H, m, H-6'), 1.32 (2H, m, H-7'), 1.29 (2H, m, H-8'), 1.26 (2H, m, H-9'), 0.89 (3H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-10') 提示结构中存在 decadienoyl 侧链片

断。该化合物的母核结构与分子式与茺花酯甲<sup>[4]</sup>完全相同,区别仅在于 decadienoyl 侧链部分。在  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱中  $\delta$  5.77 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz), 7.01 (1H, dd,  $J = 15.6, 11.2$  Hz) 处的 2 个反式烯键氢相关, 而且在 HMBC 谱中均与  $\delta$  117.1 处的 C-1' 信号相关, 结合二者峰形特征, 分别归属为 H-2', H-3', 同时在  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱中 H-3' 又与 6.02 (1H, dd,  $J = 11.2, 10.8$  Hz) 处的氢信号相关, 后者又与 5.62 (1H, m) 相关, 据此, 分别确定后二者为 H-4', H-5', 同法进一步归属了 H-6'~10' 信号。与茺花酯甲相比, H-3' 向低场位移了 0.32, H-5' 向高场位移了 0.25, 结合 H-4' 耦合常数 ( $J = 11.2, 10.8$  Hz), 推测化合物 **1** 的 C-4', 5' 位是顺式双键构型, 而茺花酯甲 C-4', 5' 位是反式双键, 推断该化合物 C-1' 侧链单元呈 2'E, 4'Z-decadienoyl 结构。结合  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、HSQC、HMBC 谱的其他相关信息, 对 decadienoyl 侧链部分进行了 C、H 信号的归属。综上分析, 命名化合物 **1** 为异茺花酯甲。结构见图 1。

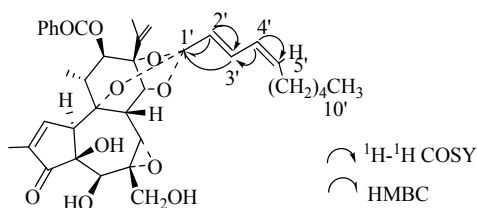


图 1 化合物 **1** 的主要  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 和 HMBC 相关

Fig. 1 Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of compound **1**

化合物 **2**: 白色粉末, HR-EI-MS  $m/z$ : 649.300 0  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 649.300 7,  $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$ )。  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.89 (1H, dd,  $J = 7.6, 2.4$  Hz, H-3'', 7''), 7.58 (2H, m, H-1, 5''), 7.45 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-4'', 6''), 6.69 (1H, dd,  $J = 15.2, 10.4$  Hz, H-3'), 6.06 (1H, dd,  $J = 10.8, 14.8$  Hz, H-4'), 5.87 (1H, m, H-5'), 5.68 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz, H-2'), 5.22 (1H, s, H-12), 5.01 (2H, brs, H-16), 4.89 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-14), 4.22 (1H, s, H-7), 3.93 (1H, brs, H-20a), 3.84 (1H, brs, H-20b), 3.82 (1H, m, H-10), 3.64 (1H, s, H-5), 3.63 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 2.55 (1H, dd,  $J = 7.2, 14.4$  Hz, H-11), 2.11 (2H, m, H-6'), 1.87 (3H, s, H-17), 1.77 (3H, s, H-19), 1.39 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-18), 1.38 (2H, m, H-7'), 1.24~1.29 (4H, m, H-8', 9'), 0.89 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-10');  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 209.4 (C-3), 165.4 (C-1''), 160.3

(C-1), 143.0 (C-15), 139.4 (C-5'), 136.9 (C-2), 135.1 (C-3'), 133.3 (C-5''), 129.7 (C-2''), 129.5 (C-3'', 7''), 128.6 (C-4'), 128.6 (C-4'', 6''), 122.3 (C-2'), 117.1 (C-1'), 113.6 (C-16), 83.9 (C-13), 80.5 (C-14), 78.9 (C-12), 78.2 (C-9), 72.2 (C-6), 71.9 (C-7), 64.7 (C-20), 64.1 (C-5), 60.6 (C-4), 47.5 (C-10), 44.1 (C-11), 35.8 (C-8), 32.7 (C-6'), 31.3 (C-8'), 28.9 (C-7'), 22.5 (C-9'), 18.8 (C-17), 18.3 (C-18), 14.0 (C-10'), 9.9 (C-19)。综上分析并将波谱数据与文献对照<sup>[4]</sup>, 鉴定化合物 **2** 为茺花酯甲。

化合物 **3**: 白色粉末, HR-EI-MS  $m/z$ : 605.238 2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 605.238 1,  $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$ )。  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.93 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-3'', 7''), 7.74 (2H, m, H-3', 7'), 7.58 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-5''), 7.46 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-4'', 6''), 7.38~7.39 (3H, m, H-5', 4', 6'), 5.40 (1H, s, H-12), 5.06 (1H, s, H-16a), 5.02 (1H, s, H-16b), 4.98 (1H, d,  $J = 2.8$  Hz, H-14), 4.06 (1H, brs, H-7), 3.88 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-20a), 3.80 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-20b), 3.67 (1H, d,  $J = 2.8$  Hz, H-8), 3.64 (1H, s, H-5), 3.04 (1H, dd,  $J = 6.0, 13.2$  Hz, H-10), 2.57 (1H, dd,  $J = 6.8, 14.0$  Hz, H-11), 2.37 (1H, m, H-1a), 2.24 (1H, m, H-2), 1.91 (3H, s, H-17), 1.60 (1H, m, H-1b), 1.50 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-18), 1.10 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-19);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 220.0 (C-3), 165.5 (C-1''), 142.9 (C-15), 135.5 (C-2'), 133.3 (C-5''), 129.8 (C-2''), 129.6 (C-3'', 7''), 129.5 (C-5'), 128.1 (C-4', 6'), 125.9 (C-3', 7'), 118.1 (C-1'), 113.6 (C-16), 83.7 (C-13), 81.2 (C-14), 79.1 (C-9), 78.4 (C-12), 74.9 (C-6), 71.2 (C-7), 65.1 (C-20), 64.2 (C-5), 60.8 (C-4), 44.0 (C-10), 43.9 (C-2), 42.8 (C-11), 36.1 (C-8), 33.4 (C-1), 18.8 (C-17), 18.7 (C-18), 12.3 (C-19)。以上  $^1\text{H}$ -NMR 数据与文献报道一致<sup>[5]</sup>, 鉴定化合物 **3** 为茺花酯丁。通过二维核磁共振波谱分析, 首次对该化合物的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱信号进行了归属。

化合物 **4**: 白色粉末, HR-EI-MS  $m/z$ : 585.269 5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 585.269 4,  $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$ )。  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.57 (1H, brs, H-1), 6.69 (1H, dd,  $J = 15.6, 11.2$  Hz, H-3'), 6.32 (1H, dd,  $J = 14.8, 10.4$  Hz, H-5'), 6.09 (2H, dd,  $J = 11.2, 14.8$  Hz, H-4', 6'), 5.77 (1H, dd,  $J = 15.2, 7.2$  Hz, H-7'), 5.71 (1H, d,  $J = 15.2$ , H-2'), 5.01 (1H, s, H-16), 4.98 (1H, s, H-16), 4.95 (1H, brs, H-14), 4.76 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-12),

4.25 (1H, s, H-7), 3.94 (1H, s, H-20a), 3.80~3.84 (2H, m, H-20b, 10), 3.48 (1H, s, H-5), 3.51 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 2.38 (1H, dd,  $J = 7.2, 14.8$  Hz, H-11), 2.09 (2H, dd,  $J = 7.6, 14.8$  Hz, H-8'), 1.99 (3H, s, 2"-CH<sub>3</sub>), 1.83 (3H, s, H-17), 1.79 (3H, s, H-19), 1.42 (2H, m, H-9'), 1.29 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-18), 0.90 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-10'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 209.4 (C-3), 169.7 (C-1"), 160.3 (C-1), 143.1 (C-15), 137.3 (C-5'), 136.9 (C-7'), 136.8 (C-2), 134.8 (C-3'), 130.1 (C-6'), 128.3 (C-4'), 123.5 (C-2'), 116.9 (C-1'), 113.3 (C-16), 83.7 (C-13), 80.4 (C-14), 79.2 (C-12), 78.2 (C-9), 72.3 (C-6), 71.8 (C-7), 65.1 (C-20), 64.2 (C-5), 60.6 (C-4), 47.4 (C-10), 43.9 (C-11), 35.4 (C-8), 34.9 (C-8'), 22.3 (C-9'), 21.1 (C-2"), 18.7 (C-17), 18.2 (C-18), 13.6 (C-10'), 9.9 (C-19)。以上数据与文献报道一致<sup>[4]</sup>, 故鉴定化合物 4 为芫花酯庚。

化合物 5: 白色粉末, HR-EI-MS  $m/z$ : 587.286 1  $[M+H]^+$  (计算值为 587.285 1, C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>O<sub>10</sub>)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.55 (1H, brs, H-1), 6.98 (1H, dd,  $J = 15.6, 11.6$  Hz, H-3'), 6.00 (1H, t,  $J = 11.2$  Hz, H-4'), 5.74 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz, H-2'), 5.60 (1H, m, H-5'), 5.02 (1H, s, H-12), 4.98 (1H, s, H-16a), 4.97 (1H, s, H-16b), 4.77 (1H, d,  $J = 2.8$  Hz, H-14), 4.25 (1H, s, H-7), 3.93 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-20a), 3.83 (2H, m, H-10, 20b), 3.55 (1H, s, H-5), 3.52 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 2.38 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-11), 2.19 (2H, dd,  $J = 7.6$  Hz, H-6'), 1.99 (3H, s, 2"-CH<sub>3</sub>), 1.84 (3H, s, H-17), 1.79 (3H, s, H-19), 1.30 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-18), 1.38~1.43 (2H, m, H-7'), 1.25~1.31 (4H, m, H-8', 9'), 0.88 (3H, t,  $J = 5.6$  Hz, H-10'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 209.5 (C-3), 169.7 (C-1"), 160.3 (C-1), 143.1 (C-15), 136.9 (C-2), 136.4 (C-5'), 129.7 (C-4'), 126.9 (C-3'), 124.4 (C-2'), 117.0 (C-1'), 113.3 (C-16), 83.7 (C-13), 80.5 (C-14), 78.3 (C-12), 78.2 (C-9), 72.3 (C-6), 71.9 (C-7), 65.2 (C-20), 64.2 (C-5), 60.5 (C-4), 47.5 (C-10), 44.0 (C-11), 35.4 (C-8), 31.4 (C-8'), 29.1 (C-7'), 27.8 (C-6'), 22.5 (C-9'), 21.1 (C-2"), 18.7 (C-17), 18.2 (C-18), 14.0 (C-10'), 9.9 (C-19)。以上数据与文献报道一致<sup>[6]</sup>, 故鉴定化合物 5 为异芫花酯乙。

化合物 6: 白色粉末, HR-EI-MS  $m/z$ : 587.285 3  $[M+H]^+$  (计算值为 587.285 1, C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>O<sub>10</sub>)。<sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.54 (1H, brs, H-1), 6.66 (1H, dd,  $J = 15.6, 10.8$  Hz, H-3'), 6.02 (1H, dd,  $J = 14.8, 10.8$  Hz, H-4'), 5.83 (1H, m, H-5'), 5.63 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz, H-2'), 4.98 (1H, s, H-12), 4.95 (2H, s, H-16), 4.73 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-14), 4.22 (1H, s, H-7), 3.89 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-20a), 3.80 (2H, m, H-10, 20b), 3.51 (1H, s, H-5), 3.48 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 2.35 (1H, dd,  $J = 7.2, 14.8$  Hz, H-11), 2.07 (2H, dd,  $J = 7.2, 14.0$  Hz, H-6'), 1.96 (3H, s, H-2"), 1.80 (3H, s, H-17), 1.73 (3H, s, H-19), 1.26 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-18), 1.32~1.39 (2H, m, H-7'), 1.23~1.28 (4H, m, H-8', 9'), 0.86 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-10'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 209.5 (C-3), 169.6 (C-1"), 160.4 (C-1), 143.1 (C-15), 139.3 (C-5'), 136.9 (C-2), 135.0 (C-3'), 128.6 (C-4'), 122.3 (C-2'), 117.0 (C-1'), 113.3 (C-16), 83.7 (C-13), 80.4 (C-14), 78.2 (C-12), 78.1 (C-9), 72.3 (C-6), 71.9 (C-7), 65.1 (C-20), 64.2 (C-5), 60.5 (C-4), 47.4 (C-10), 44.0 (C-11), 35.4 (C-8), 32.6 (C-6'), 31.3 (C-8'), 28.7 (C-7'), 22.5 (C-9'), 21.1 (C-2"), 18.7 (C-17), 18.2 (C-18), 14.0 (C-10'), 9.9 (C-19)。以上数据与文献报道一致<sup>[4]</sup>, 鉴定化合物 6 为芫花酯乙。

## 4 肿瘤细胞毒活性筛选

### 4.1 活性测定

精密称取各样品 1 mg, 溶于一定量 DMSO, 配制成 200  $\mu$ mol/L 的溶液。精确吸取样品液 100  $\mu$ L, 加入 900  $\mu$ L 无血清培养基, 稀释成 20  $\mu$ mol/L, 备用。分别取对数生长期人非小细胞肺腺癌 NCI-H1975 细胞株、人乳腺癌 SK-BR-3 细胞株细胞悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 用玻璃滴管轻轻吹打成单细胞悬液, 显微镜下血细胞计数板计数活细胞。96 孔板每孔接种细胞悬液 180  $\mu$ L (细胞浓度为每孔约 10 000 个细胞), 在 37  $^{\circ}$ C、100% 相对湿度、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱预培养 24 h 后, 每孔加 20  $\mu$ L 样品溶液 (终浓度设为: 化合物 6、1、2 分别为 2  $\mu$ mol/L、400 nmol/L、80 nmol/L、16 nmol/L、3.2 nmol/L; 化合物 5、3、4 分别为 5  $\mu$ mol/L、1  $\mu$ mol/L、200 nmol/L、40 nmol/L、8 nmol/L)。并设阴性对照 (等浓度 DMSO) 及空白本底 (不加细胞), 各组均设 3 个复孔。再连续培养 48 h, 然后用 MTT 法测定。每孔加入 20  $\mu$ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 吸去上清液。每孔加入 100  $\mu$ L DMSO, 置微量振荡器振荡 5 min 使结晶完全溶解,

于酶标仪 492 nm 单波长比色,测定吸光度 ( $A$ ) 值,计算化合物的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值 (表 1)。结果表明化合物 1~6 对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞株增殖显示较强的抑制作用,而对人非小细胞肺腺癌 NCI-H1975 细胞株增殖无明显抑制作用。

表 1 化合物对 SK-BR-3 细胞株细胞毒活性  
Table 1 Cytotoxic activity of compounds on SK-BR-3 cells

| 化合物 | $IC_{50} / (nmol \cdot L^{-1})$ |
|-----|---------------------------------|
| 1   | 217.1                           |
| 2   | 172.6                           |
| 3   | 170.2                           |
| 4   | 809.4                           |
| 5   | 83.7                            |
| 6   | 61.6                            |

## 4.2 结果分析

本研究分离得到的 6 个瑞香烷型二萜原酸酯类化合物对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞显示了较强的细胞毒活性,而对人非小细胞肺腺癌 NCI-H1975 细胞无明显活性,提示这类化合物对不同类型的肿瘤细胞具有选择性。表 1 显示化合物 5、6 活性强于化合物 1、2,其结构差异仅在于前者 C-12 位羟基为乙酰化而后者为苯甲酰基取代,说明 C-12 位羟基上的取代基对其肿瘤细胞毒活性产生较大影响。化合物 4~6 在萆烯醇侧链结构存在差异,其中化合物 4

侧链为 C-2', 4', 6' 三烯结构,活性较化合物 5、6 弱近 10 倍,化合物 5、6 是 C-5', 6' 位的顺反异构体,也有活性强度差别,说明 C-1' 侧链上的烯键数目和顺反结构的差异均可影响活性,而烯键数目对活性的影响较大。化合物 2、4、6 对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞的  $IC_{50}$  值远低于文献报道<sup>[4]</sup>中对 DNA 拓扑异构酶 I 的抑制浓度 ( $IC_{50}$ : 40.0、53.0、50.0  $\mu mol/L$ ),提示对拓扑异构酶的抑制可能不是这类化合物细胞毒活性的主要作用机制,而是另有其他作用途径存在,其作用机制尚待更为深入的研究。

## 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 张保献,原思通,张静修,等. 芫花的现代研究概况 [J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 2(10): 21-24.
- [3] 徐任生,叶阳,赵维民. 天然药物化学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2004.
- [4] Zhang S X, Li X N, Zhang F H, *et al.* Preparation of yuanhuacine and relative daphne diterpene esters from *Daphne genkwa* and structure-activity relationship [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14: 3888-3895.
- [5] 胡邦豪,沙怀,王成瑞,等. 芫花花蕾抗生育有效成分的研究——新的二萜原酸酯芫花酯丁的分离与结构 [J]. 化学学报, 1985, 43(5): 460-462.
- [6] 夏素霞,李玲芝,李菲菲,等. 芫花花蕾中的两个新二萜 [J]. 化学学报, 2011, 69(20): 2518-2522.