

黑籽重楼化学成分及其抗肿瘤活性研究

景松松¹, 王颖², 李雪娇¹, 李霞¹, 黄璐琦³, 肖培根⁴, 高文远^{1*}

1. 天津大学药物科学与技术学院 现代药物传递及功能高效化重点实验室, 天津 300072

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

3. 中国中医科学院 中药资源中心地道药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

4. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100093

摘要: **目的** 研究黑籽重楼 *Paris thibetica* 根状茎的化学成分及其抗肿瘤活性。**方法** 综合运用正相硅胶、Sephadex LH-20、ODS-C₁₈ 等柱色谱以及半制备高效液相色谱等方法进行分离纯化, 并通过 MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 等波谱学方法进行结构鉴定。采用 MTT 法研究化合物的体外抗肿瘤活性。**结果** 从黑籽重楼根状茎的乙醇提取物中分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为重楼皂苷 V (1)、重楼皂苷 I (2)、重楼皂苷 II (3)、重楼皂苷 VI (4)、偏诺皂苷元-3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖基 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷 (5)、重楼皂苷 H (6)、偏诺皂苷元-3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖苷 (7)、重楼皂苷 VII (8)、parisyunnanoside G (9)、trikamsteroside E (10)、豆甾醇-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖 (11)、 β -谷甾醇棕榈酸酯 (12)、 β -香树脂醇 (13)、4-羟基-5-甲基呋喃-3-羧酸 (14)。**结论** 所有化合物均为首次从黑籽重楼中分离得到, 化合物 10、12~14 为首次从重楼属植物中分离得到。化合物 1~8 对人肝癌细胞 BEL-7402 有细胞毒活性, 其中化合物 3 活性最好, IC₅₀ 为 0.48 μ mol/L。

关键词: 黑籽重楼; 甾体皂苷; 重楼皂苷 I; 重楼皂苷 II; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)06-1093-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.007

Chemical constituents from *Paris thibetica* and their antitumor activities

JING Song-song¹, WANG Ying², LI Xue-jiao¹, LI Xia¹, HUANG Lu-qi³, XIAO Pei-gen⁴, GAO Wen-yuan¹

1. Tianjin Key Laboratory for Modern Drug Delivery & High Efficiency, School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

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

3. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China

4. Institute of Medical Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To investigate the chemical constituents from *Paris thibetica* and their antitumor activities. **Methods** The separations and purifications were taken by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, ODS-C₁₈, and semi-preparative HPLC. The *in vitro* antitumor activities of the isolated compounds were studied by MTT method. **Results** Fourteen compounds were isolated from ethanol extract of the rhizomes of *P. thibetica*, which were identified as paris saponin V (1), paris saponin I (2), paris saponin II (3), paris saponin VI (4), pennogenin-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside (5), paris saponin H (6), pennogenin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside (7), paris saponin VII (8), parisyunnanoside G (9), trikamsteroside E (10), stigmasterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (11), β -sitosterol palmitate (12), β -amyirin (13), and 4-hydroxy-5-methylfuran-3-carboxylic acid (14). **Conclusion** All compounds are firstly reported from *P. thibetica*, and this is the first report of compounds 10 and 12—14 from the genus *Paris* L. Compounds 1—8 show cytotoxicities against BEL-7402. Among the tested compounds, compound 3 exhibits the strongest cytotoxicity with IC₅₀ value of 0.48 μ mol/L.

Key words: *Paris thibetica* Franch.; steroidal saponins; paris saponin I; paris saponin II; antitumor activities

收稿日期: 2016-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173487, 81373904, 81673535)

作者简介: 景松松 (1985—), 男, 在读博士, 研究方向为天然产物化学成分研究。E-mail: johnson3917@163.com

*通信作者 高文远 (1965—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药新产品和中药生物工程研究。Tel: (022)87401895 E-mail: pharmgao@tju.edu.cn

重楼属植物药用历史悠久,重楼早在《神农本草经》中就有记载,主要用于疔疮痈肿、蛇虫咬伤、跌扑伤痛等^[1],是著名中成药云南白药的重要组成部分。现代药理研究表明,重楼有抗肿瘤、免疫调节、镇痛镇静和抗炎等药理作用^[2-3]。《中国药典》规定,重楼基原植物为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 和七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara。由于药材需求量大,上述2种植物被大量挖采,资源日益匮乏,目前几乎所有重楼属植物均做药用^[4]。黑籽重楼 *Paris thibetica* Franch. 是重楼属多年生草本植物,主要分布于四川、云南、西藏等地。目前关于黑籽重楼的研究报道主要集中在形态学和分子生物学方面^[5-6],化学成分方面研究较少。根据已有文献报道^[7],黑籽重楼中含有甾体皂苷,与药典两种重楼植物化学成分相似。黑籽重楼在我国西南地区广泛分布,在商品流通中占较大比例^[7],民间主要作为重楼药材使用。但是黑籽重楼能否作为重楼的替代药材,还需要进一步明确该植物的化学成分。因此,为了寻找重楼的替代资源,进一步确认黑籽重楼的化学成分及其药理活性,本实验对黑籽重楼进行了系统的化学成分研究,从其根状茎中分离得到14个化合物,分别鉴定为重楼皂苷 V (paris saponin V, **1**)、重楼皂苷 I (paris saponin I, **2**)、重楼皂苷 II (paris saponin II, **3**)、重楼皂苷 VI (paris saponin VI, **4**)、偏诺皂苷元-3-*O*- α -L-呋喃阿拉伯糖基 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷 [pennogenin-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside, **5**]、重楼皂苷 H (paris saponin H, **6**)、偏诺皂苷元-3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖苷 (pennogenin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside, **7**)、重楼皂苷 VII (paris saponin VII, **8**)、parisyunnanoside G (**9**)、trikamsteroside E (**10**)、豆甾醇-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖 (stigmasterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside, **11**)、 β -谷甾醇棕榈酸酯 (β -sitosteryl palmitate, **12**)、 β -香树脂醇 (β -amyrin, **13**)、4-羟基-5-甲基呋喃-3-羧酸 (4-hydroxy-5-methylfuran-3-carboxylic acid, **14**)。所有化合物均为首次从黑籽重楼中分离得到,化合物 **10**、**12**~**14** 为首次从重楼属植物中分离得到。在此基础上,本实验还通过细胞毒性实验对分离得到化合物的体外抗肿瘤活性

进行了研究。

1 仪器与材料

Bruker Avance 600/500/400 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司); Agilent 1200/Agilent 6310 Ion Trap 液相色谱质谱联用仪(美国 Agilent 公司); Waters 1525 型分析性高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 创新通恒 LC3000 半制备高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司); YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μ m, 日本 YMC 公司); 上海亚荣 RE-2000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); ODS-C₁₈ 填料 (40~63 μ m, 日本 YMC 公司); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB); 大孔树脂 D101 (天津南开大学化工厂); 柱色谱硅胶 (100~200、200~300、300~400 目, 青岛海洋化工厂); 薄层硅胶板 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); 提取分离溶剂均为分析纯, 天津江天公司。

黑籽重楼采自四川峨眉山地区,经天津大学药物科学与技术学院高文远教授鉴定为黑籽重楼 *Paris thibetica* Franch., 标本(20110921)存放于天津大学药物科学与技术学院。

2 提取与分离

黑籽重楼根状茎 3.2 kg, 粉碎, 依次用 90%乙醇和 60%乙醇加热回流, 各提取 3 次, 每次 2 h。合并提取液, 减压回收乙醇得浸膏。然后将浸膏混悬于水中, 依次用石油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取, 回收溶剂得到石油醚萃取部分 6.8 g, 醋酸乙酯萃取部分 38.6 g, 正丁醇萃取部分 74.1 g。醋酸乙酯萃取部分用硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (10:0 $\rightarrow$ 0:10) 进行梯度洗脱, 得到 6 个组分 (Fr. A~F), Fr. B 再经过石油醚-醋酸乙酯系统的硅胶柱色谱反复纯化得到化合物 **12** (12 mg)、**13** (9 mg)。Fr. C 依次通过硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 10:0 $\rightarrow$ 5:5), 凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1), 制备液相 (70%甲醇) 纯化, 得到化合物 **1** (12 mg)、**2** (31 mg)、**8** (9 mg)。Fr. E 经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (10:0 $\rightarrow$ 4:6) 洗脱, 得到 3 个组分 (Fr. E-1~E-3), Fr. E-2 通过硅胶柱色谱反复分离得到化合物 **5** (6 mg)。Fr. E-3 依次通过硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 10:1 $\rightarrow$ 4:6), 凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1), RP-C₁₈ 填料柱色谱 (80%甲醇) 纯化, 得到化合物 **4** (5 mg)、**6** (13 mg)、**7** (9 mg)。Fr. F 通过甲醇反复冲洗得化合物 **11** (35 mg)。正丁醇萃取部分通过大孔

吸附树脂 D101 柱色谱, 依次用水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇梯度洗脱, 得到 5 个不同的洗脱部分 (Fr. G~K)。Fr. J (70%乙醇洗脱部分) 依次通过硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 10:1→5:5), 凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1), 制备液相 (70%甲醇) 纯化, 得到化合物 **3** (37 mg)、**14** (11 mg)。Fr. I (50%乙醇洗脱部分) 依次通过 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇), 制备液相 (55%甲醇) 纯化, 得到化合物 **9** (11 mg)、**10** (4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{39}H_{62}O_{12}$ 。 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 0.69 (3H, d, $J = 4.5$ Hz, CH_3 -27), 0.83 (3H, s, CH_3 -18), 1.06 (3H, s, CH_3 -19), 1.14 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -21), 1.79 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -Rha), 5.08 (H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc-H-1), 6.40 (H, s, Rha-H-1), 5.30 (1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 37.8 (C-1), 30.5 (C-2), 78.6 (C-3), 39.2 (C-4), 141.1 (C-5), 122.0 (C-6), 32.1 (C-7), 31.9 (C-8), 50.5 (C-9), 37.4 (C-10), 21.4 (C-11), 40.1 (C-12), 40.7 (C-13), 56.9 (C-14), 32.6 (C-15), 81.4 (C-16), 63.1 (C-17), 16.6 (C-18), 19.7 (C-19), 42.2 (C-20), 15.4 (C-21), 109.5 (C-22), 30.6 (C-23), 29.5 (C-24), 30.9 (C-25), 67.1 (C-26), 17.6 (C-27), Glc: 100.6 (C-1'), 80.0 (C-2'), 78.1 (C-3'), 72.0 (C-4'), 78.2 (C-5'), 62.9 (C-6'), Rha: 102.4 (C-1''), 72.8 (C-2''), 73.1 (C-3''), 74.4 (C-4''), 69.8 (C-5''), 19.0 (C-6'')。以上数据与文献报道^[8]的数据对比基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为重楼皂苷 V。

化合物 **2**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{44}H_{70}O_{16}$ 。 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 0.69 (3H, d, $J = 5.0$ Hz, CH_3 -27), 0.83 (3H, s, CH_3 -18), 1.05 (3H, s, CH_3 -19), 1.14 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -21), 1.78 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -Rha), 4.97 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc-H-1), 5.94 (1H, s, Ara-H-1), 6.30 (1H, s, Rha-H-1), 5.31 (1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 37.8 (C-1), 30.4 (C-2), 78.4 (C-3), 39.2 (C-4), 141.0 (C-5), 122.1 (C-6), 32.6 (C-7), 32.0 (C-8), 50.6 (C-9), 37.4 (C-10), 21.4 (C-11), 40.2 (C-12), 40.8 (C-13), 56.9 (C-14), 32.5 (C-15), 81.4 (C-16), 63.2 (C-17), 16.7 (C-18), 19.7 (C-19), 42.3 (C-20), 15.4 (C-21), 109.6 (C-22), 32.1 (C-23), 29.6 (C-24), 30.9 (C-25), 67.2 (C-26), 17.8 (C-27), Glc: 100.4 (C-1'), 78.0 (C-2'), 77.7 (C-3'), 77.0 (C-4'), 77.2 (C-5'),

61.7 (C-6'), Rha: 102.2 (C-1''), 72.8 (C-2''), 73.1 (C-3''), 74.4 (C-4''), 69.8 (C-5''), 19.0 (C-6''), Ara: 109.9 (C-1'''), 83.0 (C-2'''), 78.2 (C-3'''), 87.0 (C-4'''), 62.8 (C-5''')。以上数据与文献报道^[9]的数据对比基本一致, 故化合物 **2** 鉴定为重楼皂苷 I。

化合物 **3**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{51}H_{82}O_{20}$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 0.70 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, CH_3 -27), 0.82 (3H, s, CH_3 -18), 1.06 (3H, s, CH_3 -19), 1.13 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -21), 1.59 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, CH_3 -Rha II), 1.60 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -Rha III), 1.78 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -Rha I), 5.30 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, Glc-H-1), 5.83 (1H, s, Rha II-H-1), 6.28 (1H, s, Rha III-H-1), 6.40 (1H, s, Rha I-H-1), 5.32 (1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) δ : 38.0 (C-1), 30.6 (C-2), 78.6 (C-3), 39.5 (C-4), 141.3 (C-5), 122.3 (C-6), 32.8 (C-7), 32.2 (C-8), 50.8 (C-9), 37.6 (C-10), 21.36 (C-11), 40.3 (C-12), 40.9 (C-13), 57.1 (C-14), 32.7 (C-15), 81.6 (C-16), 63.4 (C-17), 16.8 (C-18), 19.9 (C-19), 42.5 (C-20), 15.5 (C-21), 109.7 (C-22), 32.3 (C-23), 29.7 (C-24), 31.1 (C-25), 67.3 (C-26), 17.8 (C-27), Glc: 100.8 (C-1'), 78.5 (C-2'), 78.2 (C-3'), 78.3 (C-4'), 77.5 (C-5'), 61.7 (C-6'), Rha I: 102.6 (C-1''), 73.0 (C-2''), 73.3 (C-3''), 74.6 (C-4''), 70.0 (C-5''), 19.1 (C-6''), Rha II: 102.7 (C-1'''), 73.4 (C-2'''), 73.7 (C-3'''), 80.9 (C-4'''), 68.8 (C-5'''), 19.3 (C-6'''), Rha III: 103.7 (C-1'''), 73.1 (C-2'''), 73.3 (C-3'''), 74.5 (C-4'''), 70.9 (C-5'''), 18.9 (C-6''')。以上数据与文献报道^[10]的数据对比基本一致, 故化合物 **3** 鉴定为重楼皂苷 II。

化合物 **4**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{39}H_{62}O_{13}$ 。 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 0.67 (3H, d, $J = 5.5$ Hz, CH_3 -27), 0.93 (3H, s, CH_3 -18), 1.06 (3H, s, CH_3 -19), 1.22 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -21), 1.75 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -Rha), 4.99 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc-H-1), 6.32 (1H, s, Rha-H-1); ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 37.8 (C-1), 30.4 (C-2), 78.1 (C-3), 39.2 (C-4), 141.0 (C-5), 122.0 (C-6), 32.7 (C-7), 32.0 (C-8), 50.4 (C-9), 37.4 (C-10), 21.2 (C-11), 32.3 (C-12), 45.4 (C-13), 53.3 (C-14), 32.6 (C-15), 90.2 (C-16), 90.4 (C-17), 17.4 (C-18), 19.7 (C-19), 45.0 (C-20), 10.1 (C-21), 110.1 (C-22), 32.3 (C-23), 29.0 (C-24), 30.6 (C-25), 66.9 (C-26), 17.6 (C-27), Glc: 100.5 (C-1'), 79.8 (C-2'), 78.4 (C-3'),

72.0 (C-4'), 78.1 (C-5'), 62.8 (C-6'), Rha: 102.3 (C-1''), 72.8 (C-2''), 73.0 (C-3''), 74.3 (C-4''), 69.7 (C-5''), 18.9 (C-6''). 以上数据与文献报道^[11]的数据对比基本一致, 故化合物 **4** 鉴定为重楼皂苷 VI。

化合物 **5**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{38}H_{60}O_{13}$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 0.68 (3H, d, $J = 4.2$ Hz, CH_3 -27), 0.91 (3H, s, CH_3 -18), 0.93 (3H, s, CH_3 -19), 1.19 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_3 -21), 4.92 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, Glc-H-1), 6.00 (1H, s, Ara-H-1); ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) δ : 37.5 (C-1), 30.2 (C-2), 78.3 (C-3), 39.3 (C-4), 140.9 (C-5), 121.8 (C-6), 32.4 (C-7), 31.8 (C-8), 50.2 (C-9), 37.1 (C-10), 21.0 (C-11), 32.1 (C-12), 45.2 (C-13), 53.1 (C-14), 32.3 (C-15), 90.1 (C-16), 90.2 (C-17), 17.2 (C-18), 19.4 (C-19), 44.8 (C-20), 9.8 (C-21), 109.3 (C-22), 32.1 (C-23), 28.8 (C-24), 30.5 (C-25), 66.7 (C-26), 17.3 (C-27), Glc: 102.5 (C-1'), 75.3 (C-2'), 76.7 (C-3'), 76.1 (C-4'), 77.0 (C-5'), 61.7 (C-6'), Ara: 109.9 (C-1''), 82.7 (C-2''), 78.4 (C-3''), 87.1 (C-4''), 62.7 (C-5''). 以上数据与文献报道^[12]的数据对比基本一致, 故化合物 **5** 鉴定为偏诺皂苷元-3-*O*- α -L-呋喃阿拉伯糖基 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **6**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{44}H_{70}O_{17}$ 。 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 0.69 (3H, d, $J = 5.5$ Hz, CH_3 -27), 0.96 (3H, s, CH_3 -18), 1.08 (3H, s, CH_3 -19), 1.23 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -21), 1.77 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -Rha), 4.95 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc-H-1), 5.93 (1H, s, Ara-H-I), 6.29 (1H, s, Rha-H-1), 5.28 (1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 37.9 (C-1), 30.5 (C-2), 78.2 (C-3), 39.2 (C-4), 141.0 (C-5), 122.1 (C-6), 32.7 (C-7), 32.1 (C-8), 50.5 (C-9), 37.5 (C-10), 21.3 (C-11), 32.4 (C-12), 45.5 (C-13), 53.3 (C-14), 32.7 (C-15), 90.3 (C-16), 90.5 (C-17), 17.5 (C-18), 19.8 (C-19), 45.1 (C-20), 10.1 (C-21), 109.9 (C-22), 32.4 (C-23), 29.1 (C-24), 30.8 (C-25), 67.0 (C-26), 17.6 (C-27), Glc: 100.4 (C-1'), 77.7 (C-2'), 78.0 (C-3'), 77.0 (C-4'), 77.3 (C-5'), 61.7 (C-6'), Rha: 102.2 (C-1''), 72.8 (C-2''), 73.1 (C-3''), 74.4 (C-4''), 69.8 (C-5''), 19.0 (C-6''), Ara: 110.1 (C-1'''), 83.0 (C-2'''), 78.4 (C-3'''), 87.0 (C-4'''), 62.8 (C-5'''). 以上数据与文献报道^[13]的数据对比基本一致, 故化合物 **6** 鉴定为重楼皂苷 H。

化合物 **7**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为

$C_{45}H_{72}O_{17}$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 0.68 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, CH_3 -27), 0.96 (3H, s, CH_3 -18), 1.08 (3H, s, CH_3 -19), 1.22 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_3 -21), 1.76 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -Rha I), 1.62 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -Rha II), 4.93 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, Glc-H-1), 6.39 (1H, s, Rha I-H-1), 5.85 (1H, s, Rha II-H-1), 5.30 (1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) δ : 38.0 (C-1), 30.6 (C-2), 78.6 (C-3), 39.5 (C-4), 141.3 (C-5), 122.3 (C-6), 32.9 (C-7), 32.3 (C-8), 50.7 (C-9), 37.6 (C-10), 21.4 (C-11), 32.8 (C-12), 45.6 (C-13), 53.5 (C-14), 32.6 (C-15), 90.6 (C-16), 90.5 (C-17), 17.6 (C-18), 19.9 (C-19), 45.3 (C-20), 10.2 (C-21), 110.3 (C-22), 32.6 (C-23), 29.3 (C-24), 30.9 (C-25), 67.2 (C-26), 17.8 (C-27), Glc: 100.7 (C-1'), 78.4 (C-2'), 78.3 (C-3'), 79.1 (C-4'), 77.4 (C-5'), 61.8 (C-6'), Rha I: 102.5 (C-1''), 73.0 (C-2''), 73.3 (C-3''), 74.6 (C-4''), 70.0 (C-5''), 19.1 (C-6''), Rha II: 103.4 (C-1'''), 73.0 (C-2'''), 73.2 (C-3'''), 74.4 (C-4'''), 70.9 (C-5'''), 19.0 (C-6'''). 以上数据与文献报道^[14]的数据对比基本一致, 故化合物 **7** 鉴定为偏诺皂苷元-3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **8**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{51}H_{82}O_{21}$ 。 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 0.68 (3H, d, $J = 5.5$ Hz, CH_3 -27), 0.96 (3H, s, CH_3 -18), 1.09 (3H, s, CH_3 -19), 1.23 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -21), 1.60 (3H, d, $J = 2.0$ Hz, CH_3 -Rha II), 1.61 (3H, d, $J = 2.5$ Hz, CH_3 -Rha III), 1.77 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -Rha I), 4.92 (1H, brs, Glc-H-1), 5.86 (1H, s, Rha II-H-1), 6.30 (1H, s, Rha III-H-1), 6.42 (1H, s, Rha I-H-1), 5.29 (1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 37.9 (C-1), 30.5 (C-2), 78.0 (C-3), 39.3 (C-4), 141.1 (C-5), 122.2 (C-6), 32.7 (C-7), 32.1 (C-8), 50.5 (C-9), 37.5 (C-10), 21.3 (C-11), 37.9 (C-12), 45.5 (C-13), 53.3 (C-14), 32.7 (C-15), 90.3 (C-16), 90.5 (C-17), 17.5 (C-18), 19.8 (C-19), 45.1 (C-20), 10.1 (C-21), 110.2 (C-22), 32.4 (C-23), 29.1 (C-24), 30.8 (C-25), 67.0 (C-26), 17.7 (C-27), Glc: 100.6 (C-1'), 78.3 (C-2'), 78.0 (C-3'), 78.3 (C-4'), 77.3 (C-5'), 61.5 (C-6'), Rha I: 102.5 (C-1''), 72.8 (C-2''), 73.2 (C-3''), 74.4 (C-4''), 69.9 (C-5''), 19.0 (C-6''), Rha II: 103.6 (C-1'''), 73.2 (C-2'''), 73.6 (C-3'''), 80.7 (C-4'''), 68.6 (C-5'''), 18.8 (C-6'''), Rha III: 102.5

(C-1'''), 73.0 (C-2'''), 73.2 (C-3'''), 74.3 (C-4'''), 70.7 (C-5'''), 19.2 (C-6''')。以上数据与文献报道^[9]的数据对比基本一致, 故化合物 **8** 鉴定为重楼皂苷 VII。

化合物 **9**: 白色固体, 分子式为 $C_{56}H_{88}O_{29}$ 。¹H-NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 1.02 (3H, s, CH_3 -19), 1.31 (3H, s, CH_3 -19), 1.71 (3H, d, $J = 5.5$ Hz, CH_3 -Rha), 1.84 (3H, s, CH_3 -27), 4.89 (1H, brd, $J = 9.0$ Hz, Xyl-H-1), 4.92 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, Gal-H-1), 5.82 (1H, brd, $J = 9.6$ Hz, Fuc-H-1), 6.37 (1H, brs, Rha-H-1), 5.50 (1H, brd, $J = 6.0$ Hz, H-6); ¹³C-NMR (150 MHz, C_5D_5N) δ : 84.8 (C-1), 38.3 (C-2), 68.3 (C-3), 44.1 (C-4), 139.8 (C-5), 125.1 (C-6), 32.1 (C-7), 33.3 (C-8), 50.5 (C-9), 43.1 (C-10), 24.3 (C-11), 40.3 (C-12), 41.4 (C-13), 57.2 (C-14), 32.8 (C-15), 84.1 (C-16), 58.1 (C-17), 17.1 (C-18), 15.4 (C-19), 42.7 (C-20), 70.5 (C-21), 111.1 (C-22), 69.8 (C-23), 76.4 (C-24), 109.8 (C-25), 138.3 (C-26), 16.1 (C-27), Glc: 100.5 (C-1'), 76.7 (C-2'), 88.7 (C-3'), 70.3 (C-4'), 78.1 (C-5'), 63.5 (C-6'), Rha: 102.1 (C-1''), 72.8 (C-2''), 72.8 (C-3''), 74.5 (C-4''), 69.9 (C-5''), 19.6 (C-6''), Xyl: 105.5 (C-1'''), 75.0 (C-2'''), 78.8 (C-3'''), 71.0 (C-4'''), 67.6 (C-5'''), Gal: 105.7 (C-1'''), 73.0 (C-2'''), 75.8 (C-3'''), 70.6 (C-4'''), 77.5 (C-5'''), 62.7 (C-6'''), Fuc: 103.9 (C-1'''), 70.1 (C-2'''), 74.2 (C-3'''), 73.8 (C-4'''), 70.3 (C-5'''), 17.3 (C-6''')。以上数据与文献报道^[15]的数据对比基本一致, 故化合物 **9** 鉴定为 parisyunnanose G。

化合物 **10**: 白色固体, 分子式为 $C_{48}H_{76}O_{23}$ 。¹H-NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 0.95 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -27), 1.08 (3H, s, CH_3 -18), 1.38 (3H, s, CH_3 -19), 1.67 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_3 -Rha), 4.98 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Xyl-H-1), 6.33 (1H, brs, Rha-H-1), 6.22 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, Api-H-1), 5.55 (1H, brs, H-6); ¹³C-NMR (150 MHz, C_5D_5N) δ : 84.4 (C-1), 37.9 (C-2), 68.6 (C-3), 44.1 (C-4), 139.9 (C-5), 125.1 (C-6), 32.3 (C-7), 33.5 (C-8), 50.7 (C-9), 43.3 (C-10), 24.3 (C-11), 40.8 (C-12), 41.2 (C-13), 57.4 (C-14), 32.8 (C-15), 83.9 (C-16), 58.1 (C-17), 17.3 (C-18), 15.4 (C-19), 46.0 (C-20), 62.7 (C-21), 112.9 (C-22), 70.7 (C-23), 73.4 (C-24), 36.4 (C-25), 61.1 (C-26), 13.4 (C-27), Ara: 101.0 (C-1'), 74.0 (C-2'), 85.0 (C-3'), 69.9 (C-4'), 67.5 (C-5'), Rha: 101.8 (C-1''), 72.2 (C-2''), 80.1 (C-3''), 72.9 (C-4''), 69.9 (C-5''),

19.4 (C-6''), Xyl: 106.9 (C-1'''), 75.0 (C-2'''), 78.7 (C-3'''), 71.3 (C-4'''), 67.3 (C-5'''), Api: 112.0 (C-1'''), 78.1 (C-2'''), 80.6 (C-3'''), 75.5 (C-4'''), 66.0 (C-5''')。以上数据与文献报道^[16]的数据对比基本一致, 故化合物 **10** 鉴定为 trikamsteroside E。

化合物 **11**: 白色固体, 分子式为 $C_{35}H_{58}O_6$ 。¹H-NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 0.68 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 1.09 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 2.48 (2H, t, $J = 11.5$ Hz, H-2), 2.74 (2H, d, $J = 12.5$ Hz, H-4), 5.23 (1H, dd, $J = 8.5, 15.0$ Hz, H-22), 5.06 (1H, brd, $J = 7.5$ Hz, Glc-H-1), 5.360 (1H, brs, H-6); ¹³C-NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 37.9 (C-1), 30.6 (C-2), 78.9 (C-3), 39.7 (C-4), 141.3 (C-5), 122.3 (C-6), 32.6 (C-7), 32.4 (C-8), 50.7 (C-9), 37.3 (C-10), 21.7 (C-11), 40.2 (C-12), 42.7 (C-13), 57.3 (C-14), 24.9 (C-15), 29.7 (C-16), 56.4 (C-17), 12.5 (C-18), 19.8 (C-19), 41.2 (C-20), 21.9 (C-21), 139.2 (C-22), 129.8 (C-23), 51.8 (C-24), 32.6 (C-25), 19.6 (C-26), 21.7 (C-27), 26.1 (C-28), 13.0 (C-29), Glc: 102.9 (C-1'), 75.7 (C-2'), 78.4 (C-3'), 72.0 (C-4'), 79.0 (C-5'), 63.2 (C-6')。以上数据与文献报道^[12]的数据对比基本一致, 故化合物 **11** 鉴定为豆甾醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖。

化合物 **12**: 白色固体, 分子式为 $C_{45}H_{80}O_2$ 。EI-MS m/z : 654 $[M]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.68 (3H, s, CH_3 -18), 0.82 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_3 -27), 0.83 (3H, d, $J = 2.4$ Hz, CH_3 -26), 0.85 (3H, d, $J = 3.6$ Hz, CH_3 -29), 0.89 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_3 -16'), 0.92 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -21), 1.02 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -19), 2.25 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2'); ¹³C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.2 (C-1), 28.0 (C-2), 73.9 (C-3), 38.4 (C-4), 139.9 (C-5), 122.7 (C-6), 32.1 (C-7), 32.1 (C-8), 50.3 (C-9), 36.8 (C-10), 21.2 (C-11), 39.9 (C-12), 42.5 (C-13), 56.9 (C-14), 24.5 (C-15), 28.4 (C-16), 56.3 (C-17), 12.0 (C-18), 19.5 (C-19), 36.3 (C-20), 19.0 (C-21), 34.2 (C-22), 26.4 (C-23), 46.1 (C-24), 29.2 (C-25), 20.0 (C-26), 19.2 (C-27), 23.3 (C-28), 12.2 (C-29); 173.4 (C-1'), 34.9 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.4 (C-4'), 29.5 (C-5'), 29.6 (C-6'), 29.8 (C-7'), 29.8 ~ 29.9 (C-8' ~ 13'), 32.1 (C-14'), 22.8 (C-15'), 14.2 (C-16')。以上数据与文献报道^[17]的数据对比基本一致, 故化合物 **12** 鉴定为 β -谷甾醇棕榈酸酯。

化合物 **13**: 白色结晶 (氯仿), 分子式为

$C_{30}H_{50}O$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.25, 1.13, 1.00, 0.97, 0.94, 0.87, 0.87, 0.83, 0.79 (3H, s, $CH_3 \times 8$), 3.22 (1H, dd, $J = 5.0, 11.5$ Hz, H-3), 5.18 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 79.2 (C-3), 39.1 (C-4), 55.3 (C-5), 18.5 (C-6), 32.8 (C-7), 40.0 (C-8), 47.8 (C-9), 37.1 (C-10), 23.7 (C-11), 121.9 (C-12), 145.4 (C-13), 41.9 (C-14), 26.3 (C-15), 27.1 (C-16), 32.6 (C-17), 47.4 (C-18), 47.0 (C-19), 31.2 (C-20), 34.9 (C-21), 37.3 (C-22), 28.3 (C-23), 15.6 (C-24), 15.7 (C-25), 17.0 (C-26), 26.2 (C-27), 28.5 (C-28), 33.5 (C-29), 23.9 (C-30)。以上数据与文献报道^[18]的数据基本一致, 故化合物 **13** 鉴定为 β -香树脂醇。

化合物 **14**: 白色固体, 分子式为 $C_6H_6O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 2.32 (1H, s, CH_3), 8.09 (1H, s, H-2); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 170.3 (COOH), 149.8 (C-4), 146.6 (C-3), 143.5 (C-5), 139.4 (C-2), 14.9 (5- CH_3)。以上数据与文献报道^[19]的数据基本一致, 故化合物 **14** 鉴定为 4-羟基-5-甲基呋喃-3-羧酸。

4 体外抗肿瘤活性实验

根据文献报道^[11]的 MTT 法, 测定了化合物 **1**~**14** 对人肝癌细胞 BEL-7402 的体外抗肿瘤活性。实验结果表明, 化合物 **1**~**8** 显示对人肝癌细胞 BEL-7402 有细胞毒活性, 其中化合物 **3** 活性最好, IC_{50} 为 $0.48 \mu mol/L$ 。其余化合物未显示对人肝癌细胞 BEL-7402 有细胞毒活性。

5 讨论

本实验从黑籽重楼中分离得到 14 个化合物, 体外抗肿瘤活性表明, 黑籽重楼中抗肿瘤活性成分是苷元 3 位连接糖链的甾体皂苷类化合物 (**1**~**8**), 其他化合物未显示出抗肿瘤活性。本实验表明黑籽重楼的主要化学成分是甾体皂苷类化合物, 与云南重楼和七叶一枝花化学成分类似, 并且部分分离得到的甾体皂苷显示了良好的抗肿瘤活性, 一定程度上证明了黑籽重楼具有作为重楼替代药材的物质基础, 能否作为重楼替代药材有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王跃虎, 牛红梅, 张兆云, 等. 重楼属植物的药用价值及其化学物质基础 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 833-839.
- [2] 赵保胜, 朱寅荻, 马 勇, 等. 中药重楼研究进展 [J].

- 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 267-270.
- [3] 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(3): 344-347.
- [4] 尹鸿翔, 张 浩, 薛 丹, 等. 川滇地区重楼属药用植物资源质量初评 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1344-1346.
- [5] 唐铭霞, 王 丽, 翁 周. 黑籽重楼种内 AFLP 遗传多样性及遗传分化研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45(2): 402-408.
- [6] 陈 照, 叶睿超, 张 瑞, 等. 黑籽重楼种内形态标记和 ISSR 标记的遗传分化研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2647-2649.
- [7] 李 青, 文飞燕, 尹鸿翔, 等. HPLC 测定黑籽重楼中的皂苷含量并评价其药材质量 [J]. 华西药学杂志, 2013, 28(4): 395-397.
- [8] 刘 海, 黄 芸, 张 婷, 等. 金线重楼的化学成分 [J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 409-412.
- [9] 黄贤校, 高文远, 满淑丽, 等. 北重楼的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1812-1815.
- [10] Munday S C, Wilkins A L, Miles C O, *et al.* Isolation and structure elucidation of dichotomin, a furostanol saponin implicated in hepatogenous photosensitization of sheep grazing *Panicum dichotomiflorum* [J]. *J Agr Food Chem*, 1993, 41(2): 267-271.
- [11] Wang Y, Gao W Y, Li X, *et al.* Chemical constituents from the rhizome of *Paris bashanensis* and their cytotoxic activity [J]. *Lat Am J Pharm*, 2013, 32(2): 232-238.
- [12] 赵志勇, 高文远, 黄贤校, 等. 长药隔重楼化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1917-1920.
- [13] 陈昌祥, 周 俊, 张玉童, 等. 滇产植物皂素成分的研究 VIII. 禄劝花叶重楼的甾体皂甙 [J]. 植物分类与资源学报, 1983, 5(2): 219-223.
- [14] 陈昌祥, 周 俊, 张玉童, 等. 滇重楼地上部分的甾体皂甙 [J]. 植物分类与资源学报, 1990, 12(3): 323-329.
- [15] Kang L P, Liu Y X, Eichhorn T, *et al.* Polyhydroxylated steroidal glycosides from *Paris polyphylla* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(6): 1201-1205.
- [16] Ono M, Sugita F, Shigematsu S, *et al.* Three new steroid glycosides from the underground parts of *Trillium kamschaticum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(7): 1093-1096.
- [17] 蔡晨秋, 赵明波, 唐 丽, 等. 苏木的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 230-233.
- [18] 韦建华, 陈 君, 蔡少芳, 等. 倒地铃化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1509-1511.
- [19] 赵 军, 杨伟俊, 任 远, 等. 刺山柑化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(1): 52-54.