

• 化学成分 •

粟米草三萜类化学成分及其活性研究

王洁雪¹, 杨 敏¹, 邓国伟¹, 张小玲¹, 何 冰¹, 刘玉容¹, 宋志军^{2*}

1. 成都师范学院化学与生命科学学院 功能分子研究所, 四川 成都 611130

2. 广西药用植物园, 广西 南宁 500023

摘 要: 目的 研究粟米草 *Mollugo pentaphylla* 中的三萜类化学成分, 寻找其中具有细胞毒活性化合物。方法 综合运用大孔吸附树脂、硅胶柱色谱、半制备型高效液相及 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等各种色谱技术进行系统化学研究, 根据其理化性质和 MS、NMR 等波谱数据鉴定化合物结构, 同时对所得的三萜皂苷进行细胞毒活性测试。结果 从粟米草干燥地上部分醇提取物中共分离得到 6 个三萜类化合物, 分别鉴定为粟米草苷 E (1)、3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl]-28-*O*-[β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid (2)、竹节香附皂苷 R₈ (3)、竹节香附素 A (4)、mollugogenols A (5)、齐墩果酸 (6)。细胞毒活性显示, 化合物 1~5 对人前列腺癌 DU145 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞及人早幼粒白血病 HL-60 细胞均显示一定的抑制作用, 尤其是对人早幼粒急性白血病 HL-60 细胞, 其 IC₅₀ 分别为 10.21、38.43、40.28、20.59、83.16 μ mol/L。结论 化合物 1 为新的齐墩果酸型三萜皂苷, 2~4 为首次从该植物中分离得到。细胞毒活性显示, 化合物 1~5 对人前列腺癌 DU145 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞及人早幼粒白血病 HL-60 细胞均显示一定的抑制作用。

关键词: 粟米草; 三萜皂苷; 粟米草苷 E; 竹节香附皂苷 R₈; 竹节香附素 A; 齐墩果酸; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)04-0902-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.012

Chemical compositions and anticancer activity of *Mollugo pentaphylla*WANG Jie-xue¹, YANG Min¹, DENG Guo-wei¹, ZHANG Xiao-ling¹, HE Bing¹, LIU Yu-rong¹, SONG Zhi-jun²

1. Institute of Functional Molecules, College of Chemistry and Life Science, Chengdu Normal University, Chengdu 611130, China

2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 500023, China

Abstract: **Objective** To investigate the chemical compositions and anticancer activity of *Mollugo pentaphylla*. **Methods** These compounds were isolated by various technologies, such as silica gel, Sephadex LH-20 and high performance liquid chromatography. Their structures were elucidated on the basis of physicochemical properties and spectroscopic data. The cytotoxic activities of compounds 1–5 against five cancer cell lines were tested by MTT. **Results** Six compounds were isolated from this plant and identified as mollugoside E (1), 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl]-28-*O*-[β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyl]oleanolic acid (2), raddeanoside R₈ (3), raddeanin A (4), mollugogenol A (5), and oleanolic acid (6). The cytotoxic activities results showed that compounds 1–5 had certain inhibitory effects on human prostate cancer DU145 cell lines, cervical cancer Hela cell lines and early-juvenile leukemia HL 60 cell lines, especially on HL 60 cells with IC₅₀ value of 10.21, 38.43, 40.28, 20.59, and 83.16 μ mol/L, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new triterpenoid saponin and compounds 2–4 are isolated first time from *M. pentaphylla*. The cytotoxic activities results showed that compounds 1–5 had certain inhibitory effects on DU145, Hela and HL 60 cell lines.

Key words: *Mollugo pentaphylla* L.; triterpenoid saponin; mollugoside E; raddeanoside R₈; raddeanin A; oleanolic acid; cytotoxic activity

收稿日期: 2019-11-25

基金项目: 四川省科技厅项目 (2019YJ0440); 四川省大学生创新创业训练项目 (S201914389069)

作者简介: 王洁雪 (1985—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为天然产物化学与新药研发。Tel: 18208163663 E-mail: 50584033@qq.com

*通信作者 宋志军, 副研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为中药化学, 中药质量标准, 抗肿瘤、抗菌药物研发。

Tel: 13557996571 E-mail: songzj430@aliyun.com

粟米草 *Mollugo pentaphylla* L. 为蓼科粟米草属植物,在我国南部至江南各地均有分布,民间以全草入药,具有清热解毒、利湿等功效,主治腹痛泄泻、感冒咳嗽、疮疖肿毒等症状^[1-4]。皂苷组分在抗实验性心律失常、抗肿瘤、抑制血小板源生长因子(PDGF)诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖作用等方面,具有明显的药理活性,但尚无相关活性成分报道^[5-8]。

本实验从粟米草醇提取物中共分离得到了6个三萜类化合物,分别鉴定为星粟草苷 E (1)、3-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl]-28-O-[β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid (2)、竹节香附皂苷 R₈ (raddeanoside R₈, 3)、竹节香附素 A (raddeanin A, 4)、mollugogenol A (5)、齐墩果酸 (oleanolic acid, 6)。其中化合物1为新的三萜皂苷类化合物,2~4为首次从该植物中分离得到。化合物结构见图1。采用MTT法进行细胞毒活性实验,化合物1~5对人前列腺癌DU145细胞、人宫颈癌HeLa细胞及人早幼粒白血病HL-60细胞均显示一定的抑制作用,尤其是对HL-60细胞作用相对明显,其半数抑制浓度(IC₅₀)分别为10.21、38.43、40.28、20.59、83.16 μ mol/L。

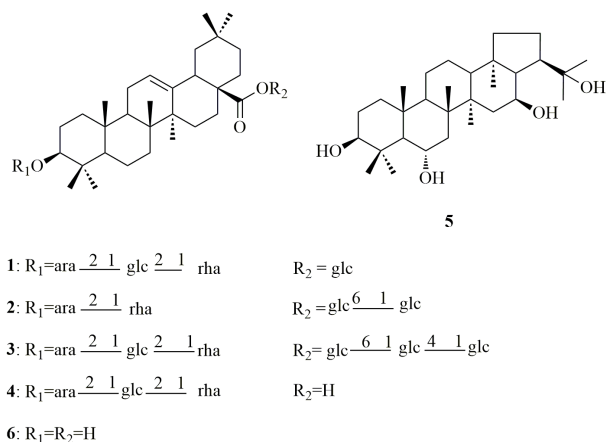


图1 化合物1~6的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—6

1 仪器与材料

Bruker 400 型核磁共振波谱仪 (TMS 为内标) (瑞士 Bruker 公司); 中压制备色谱仪 (MPLC) FS-9200T (天津博纳艾杰尔科技有限公司); 检测波长为 205 nm, Waters 2545 半制备型高效液相色谱仪配 2487 检测器 (美国 waters 公司); 柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 乙腈、甲醇 (色谱纯), 其余试剂为国产分析纯。细胞株 (DU145、

HL-60、HeLa, 美国 ATCC 公司)。

实验所用粟米草药材2018年5月采购于安徽省亳州中药材市场,经中国科学院成都生物研究所赵佐成研究员鉴定为粟米草 *Mollugo pentaphylla* L. 的干燥地上部分,标本 (CN20180502) 保存于成都师范学院化学与生命科学学院标本室。

2 提取与分离

将粟米草 8 kg 加 10 倍体积的 80%乙醇。加热回流提取 3 次,每次 2 h。将提取液合并,减压回收至基本无醇味,再加等体积的水进行分散稀释。中速滤纸滤过,将滤液上 D101 大孔吸附树脂,水洗至流出液基本无色,依次用 30%、70%、95%乙醇进行洗脱,收集各部分洗脱液并回收乙醇,得到各段粗提取物: 30%乙醇部分 36 g、70%乙醇部分 95 g、95%乙醇部分 23 g。对各段进行薄层色谱 (TLC) 检测,发现样品主要集中在 70%乙醇洗脱部分。将 70%乙醇洗脱部分 (90 g) 用甲醇溶解,进行硅胶柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇-水 (10:1:0.01 $\rightarrow$ 1:1:0.01) 洗脱,约 1 L 收集 1 份,共收集 36 份。用 TLC 对各流分进行检测,合并相同部分,得到 Fr. A~F。对具有明显斑点的 Fr. B (1.3 g) 进行再次硅胶柱色谱分离, TLC 进行过程监控,收集较为单一部分 Fr. B1、B6; Fr. B1 用甲醇重结晶,得化合物 6 (32 mg), Fr. B6 用半制备进行分离纯化,流动相为甲醇-水 (68:72),检测波长为 205 nm,得到化合物 5 (18 mg); 将 Fr. C (2.8 g) 用常压反相硅胶柱色谱进行再次粗分,以甲醇-水 (50:50 $\rightarrow$ 80:20) 进行梯度洗脱, TLC 过程监控,得到 3 个较单一部分 Fr. C2、C5、C8,对得到的每一部分样品再用半制备高效液相进行精制,流动相为乙腈-水 (35:55),检测波长为 205 nm。从 Fr. C2 部分得到化合物 1 (22 mg)、Fr. C5 部分得到化合物 2 (15 mg), Fr. C8 部分得到化合物 4 (36 mg)。Fr. F (0.8 g) 再次进行硅胶柱色谱分离, TLC 进行过程检测,得到 1 个较为单一的组分 Fr. F1,将 Fr. F1 进行半制备反相色谱分离,流动相为乙腈-水 (38:42),检测波长为 205 nm,收集主要目标化合物,减压浓缩至干,甲醇溶解,滤过,滤液上 Sephadex LH-20 再次分离,甲醇为流动相,得到化合物 3 (12 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1, 白色无定形粉末, mp 216~218 $^{\circ}$ C, $[\alpha]_D^{25} +46.2^{\circ}$ (c 0.1, 甲醇), Liebermann-Burchard 反应呈阳性, Molish 反应显示阳性,推测其可能为三

萜皂苷类化合物。HR-ESI-MS m/z : 1 081.560 4 [$M + Na$] $^+$, (计算值 1 081.559 5, $C_{53}H_{86}O_{21}Na$ [$M + Na$] $^+$), 结合碳谱和氢谱数据 (表 1), 提示其分子式为 $C_{53}H_{86}O_{21}$ 。 1H -NMR (400 MHz, pyridin- d_5) 谱图中, 氢信号主要集中在中高场区。在高场部分给出 8 组甲基氢信号 δ_H 0.83, 0.86, 0.89, 1.06, 1.09, 1.17, 1.24 (各 3H, s), 1.61 (3H, d, $J = 6.4$ Hz); 低场部分出现 4 组糖的端基氢信号 δ_H 6.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.11 (1H, s), 5.07 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.83 (1H, d, $J = 5.5$ Hz), 从偶合常数判断, 2 个为 β 构型, 2 个为 α 构型; 以及 1 个烯烃的质子信号 δ_H 5.40 (1H, brs)。

结合 ^{13}C -NMR、DEPT 135 及 HSQC (100 MHz, pyridin- d_5) 图谱分析, 得知该化合物共有 53 个碳信号, 包括 8 个季碳、24 个叔碳、13 个仲碳以及 8 个伯碳。其中在低场区显示有 1 个酯羰基碳信号 δ_C

176.9 (s), 1 对烯烃碳信号 δ_C 144.6 (s), 123.3 (d) 以及 4 个糖的端基碳信号 δ_C 105.2 (d), 105.1 (d), 102.4 (d), 96.2 (d); 高场区有 8 个甲基碳信号 δ_C 33.6 (q), 28.6 (q), 26.6 (q), 24.6 (q), 19.1 (q), 17.9 (q), 17.5 (q), 16.1 (q)。通过与文献报道对比^[9], 发现该化合物与 raddeanin A 母核结构基本一致, 所不同的是两者相对分子质量相差 162, 在碳谱中多 1 个葡萄糖单元信号碳信号: δ_C 96.2 (d), 74.6 (d), 79.0 (d), 71.9 (d), 79.4 (d), 63.0 (t), 同时处于低场位置的 28 位碳向高场移动了 δ 4.0, 说明化合物 1 的 28 位羧基接了 1 个葡萄糖单元, 以上推论经过二维核磁进一步确证。

利用 HSQC 对化合物的碳氢信号进行全归属, 并通过 HMBC (图 2) 进一步确认该化合物的连接顺序, 并与化合物 raddeanin A 进行比对。同时对化合物 1 进行酸水解, 通过 TLC 的方式与对照品进行

表 1 化合物 1 的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (400/100 MHz, pyridin- d_5)
Table 1 1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 1 (400/100 MHz, pyridin- d_5)

碳位	δ_H	δ_C	碳位	δ_H	δ_C
1	1.44 (m), 0.91 (m)	39.5, t	28		176.9, s
2	2.01 (m), 1.83 (m)	27.1, t	29	0.89 (s)	32.5, q
3	3.27 (dd, $J = 11.6, 3.6$ Hz)	88.6, d	30	0.86 (s)	24.6, q
4		40.0, s	Ara-1	4.83 (d, $J = 2.0$ Hz)	105.2, d
5	0.77 (brd, $J = 11.2$ Hz)	56.5, d	2	4.62 (m)	75.4, d
6	1.44 (m), 1.29 (m)	19.1, t	3	4.30 (m)	72.9, d
7	1.80 (m), 1.74 (m)	33.0, t	4	4.51 (m)	68.6, d
8		40.4, s	5	4.19 (m), 3.71 (m)	65.3, t
9	1.60 (m)	48.5, d	Glc-1	5.07 (d, $J = 7.8$ Hz)	105.1, d
10		37.5, s	2	3.92 (m)	75.2, d
11	1.86 (m)	24.3, t	3	4.14 (m)	78.7, d
12	5.40 (brs)	123.3, d	4	4.34 (m)	71.6, d
13		144.6, s	5	4.00 (m)	79.8, d
14		42.6, s	6	4.42 (m), 4.38 (m)	62.7, t
15	1.42 (m), 1.32 (m)	33.5, t	Rha-1	6.11 (s)	102.4, d
16	1.93 (m), 2.01 (m)	23.9, t	2	4.70 (m)	72.8, d
17		47.5, s	3	4.56 (m)	73.0, d
18	3.17 (dd, $J = 13.6, 3.2$ Hz)	46.7, d	4	4.23 (m)	74.4, d
19	1.25 (m), 1.57 (m)	42.6, t	5	4.56 (m)	70.5, d
20		31.2, s	6	1.61 (d, $J = 6.4$ Hz)	19.1, q
21	1.32 (m), 1.06 (m)	34.5, t	Glc'-1	6.32 (d, $J = 8.0$ Hz)	96.2, d
22	1.42 (m), 1.30 (m)	33.6, t	2	4.20 (m)	74.6, d
23	1.17 (s)	28.6, q	3	3.89 (m)	79.0, d
24	1.09 (s)	17.5, q	4	4.13 (m)	71.9, d
25	0.83 (s)	16.1, q	5	4.26 (m)	79.4, d
26	1.06 (s)	17.9, q	6	4.45 (m), 4.29 (m)	63.0, t
27	1.24 (s)	26.6, q			

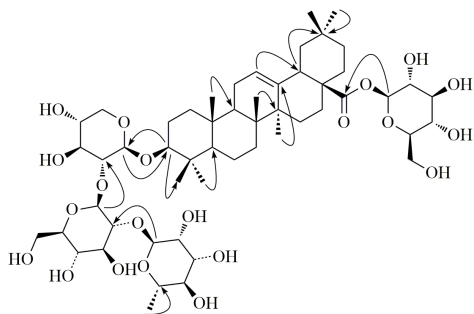


图2 化合物1的HMBC相关

Fig. 2 HMBC correlations of compound 1

比较分析,显示该化合物含有 *L*-阿拉伯糖、*L*-鼠李糖及 *D*-葡萄糖;综上所述,该化合物鉴定为 3-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-吡喃阿拉伯糖基齐墩果酸皂苷元-28-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖酯苷,经 Scifinder 系统检索,为新化合物,命名粟米草苷 E。

化合物 2: 白色无定形粉末, Liebermann-Burchard 反应呈阳性, molish 反应呈阳性, TLC 喷 5% 硫酸-香草醛加热显色,呈紫红色,提示该化合物可能为三萜皂苷; ESI-MS: m/z 1 059 $[M+H]^+$, 1 081 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 0.87 (3H, s, 25-CH₃), 0.88 (3H, s, 30-CH₃), 0.90 (3H, s, 29-CH₃), 1.07 (3H, s, 24-CH₃), 1.10 (3H, s, 26-CH₃), 1.17 (3H, s, 23-CH₃), 1.26 (3H, s, 27-CH₃), 5.45 (1H, brs, H-12), 3.24 (1H, d, J = 13.2 Hz, H-18), 4.88 (1H, d, J = 7.2 Hz, Ara-H-1), 6.14 (1H, s, Rha-H-1), 6.33 (1H, d, J = 8.0 Hz, Glc-H-1), 5.00 (1H, d, J = 7.8 Hz, Glc'-H-1), 1.62 (1H, d, J = 6.0 Hz, Rha-H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 38.7 (t, C-1), 26.7 (t, C-2), 88.6 (d, C-3), 39.2 (s, C-4), 55.8 (d, C-5), 18.3 (t, C-6), 33.1 (t, C-7), 40.0 (s, C-8), 47.5 (d, C-9), 36.6 (s, C-10), 24.0 (t, C-11), 122.3 (d, C-12), 144.0 (s, C-13), 42.2 (s, C-14), 28.2 (t, C-15), 23.3 (t, C-16), 47.0 (s, C-17), 41.7 (d, C-18), 46.2 (t, C-19), 30.5 (s, C-20), 33.9 (t, C-21), 32.5 (t, C-22), 28.2 (q, C-23), 17.2 (q, C-24), 16.8 (q, C-25), 17.8 (q, C-26), 26.0 (q, C-27), 176.6 (s, C-28), 33.0 (q, C-29), 23.3 (q, C-30), Ara: 104.3 (d, C-1), 75.2 (d, C-2), 73.6 (d, C-3), 69.5 (d, C-4), 64.3 (t, C-5), Rha: 101.5 (d, C-1), 72.5 (d, C-2), 72.6 (d, C-3), 73.2 (d, C-4), 68.8 (d, C-5), 18.4 (q, C-6), Glc: 95.7 (d, C-1), 73.7 (d, C-2), 78.6 (d, C-3), 70.6 (d, C-4), 77.8 (d, C-5), 69.1 (t, C-6), Glc': 105.2 (d, C-1), 74.7 (d, C-2), 78.3 (d, C-3), 71.3 (d,

C-4), 78.2 (d, C-5), 62.5 (t, C-6)。以上数据及理化性质与文献报道基本一致^[10-11],故鉴定化合物 2 为 3-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-arabinopyranosyl]-28-*O*- β -*D*-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -*D*-glucopyranosyl]oleanolic acid。

化合物 3: 白色无定形粉末, TLC 喷 5% 硫酸-香草醛加热反应呈紫红色, Liebermann-Burchard 反应呈阳性,提示该化合物可能为三萜皂苷; ESI-MS m/z : 1 367 $[M+H]^+$, 1 389 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 0.89 (3H, s, 25-CH₃), 0.94 (3H, s, 30-CH₃), 1.09 (3H, s, 29-CH₃), 1.10 (3H, s, 24-CH₃), 1.14 (3H, s, 26-CH₃), 1.17 (3H, s, 23-CH₃), 1.26 (3H, s, 27-CH₃), 1.64 (3H, d, J = 6.0 Hz, Rha-H-6), 1.67 (3H, d, J = 6.0 Hz, Rha'-H-6), 4.78 (1H, d, J = 7.2 Hz, Ara-H-1), 4.95 (1H, d, J = 7.8 Hz, Glc'-H-1), 5.11 (1H, d, J = 8.0 Hz, Glc-H-1), 5.40 (1H, brs, H-12), 5.85 (1H, s, Rha'-H-1), 6.10 (1H, s, Rha-H-1), 6.23 (1H, d, J = 8.0 Hz, Glc''-H-1); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 38.8 (t, C-1), 26.5 (t, C-2), 88.8 (d, C-3), 39.8 (s, C-4), 56.0 (d, C-5), 18.9 (d, C-6), 33.1 (t, C-7), 39.7 (s, C-8), 48.1 (d, C-9), 36.9 (s, C-10), 23.3 (t, C-11), 122.7 (d, C-12), 144.3 (s, C-13), 42.1 (s, C-14), 28.6 (t, C-15), 23.5 (t, C-16), 46.0 (s, C-17), 41.5 (d, C-18), 46.8 (t, C-19), 30.5 (s, C-20), 33.2 (t, C-21), 32.5 (t, C-22), 28.2 (q, C-23), 16.9 (q, C-24), 15.6 (q, C-25), 17.6 (q, C-26), 26.1 (q, C-27), 176.8 (s, C-28), 33.4 (q, C-29), 23.5 (q, C-30), Ara: 104.7 (d, C-1), 76.2 (d, C-2), 72.6 (d, C-3), 69.5 (d, C-4), 64.3 (t, C-5), Glc: 106.3 (d, C-1), 78.7 (d, C-2), 75.2 (d, C-3), 71.6 (d, C-4), 78.8 (d, C-5), 62.4 (t, C-6), Rha: 101.5 (d, C-1), 72.5 (d, C-2), 72.2 (d, C-3), 74.3 (d, C-4), 69.8 (d, C-5), 18.4 (d, C-6), Glc': 95.7 (d, C-1), 75.4 (d, C-2), 78.6 (d, C-3), 70.6 (d, C-4), 77.9 (d, C-5), 70.1 (t, C-6), Glc'': 104.8 (d, C-1), 76.7 (d, C-2), 78.3 (d, C-3), 79.3 (d, C-4), 77.2 (d, C-5), 61.5 (t, C-6), Rha: 102.5 (d, C-1), 72.6 (d, C-2), 72.8 (d, C-3), 74.1 (d, C-4), 69.8 (d, C-5), 18.4 (q, C-6)。以上数据及理化性质与文献报道基本一致^[9],故鉴定化合物 3 为竹节香附皂苷 R₈。

化合物 4: 白色无定形粉末, TLC 喷 5% 硫酸-香草醛加热显色,反应呈紫红色, Liebermann-Burchard 反应呈阳性,提示该化合物可能为三萜皂苷; ESI-MS m/z : 897 $[M+H]^+$, 919 $[M+Na]^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.84 (3H, s, 25- CH_3), 0.86 (3H, s, 30- CH_3), 0.90 (3H, s, 29- CH_3), 0.92 (3H, s, 24- CH_3), 1.04 (3H, s, 26- CH_3), 1.14 (3H, s, 23- CH_3), 1.28 (3H, s, 27- CH_3), 5.43 (1H, brs, H-12) 4.82 (1H, d, $J=7.5$ Hz, Ara-H-1), 5.26 (1H, d, $J=7.8$ Hz, Glc-H-1), 6.11 (1H, s, Rha-H-1); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 38.9 (t, C-1), 26.5 (t, C-2), 89.0 (d, C-3), 39.5 (s, C-4), 55.8 (d, C-5), 19.0 (t, C-6), 33.2 (t, C-7), 39.6 (s, C-8), 47.9 (d, C-9), 36.9 (s, C-10), 23.7 (t, C-11), 122.6 (d, C-12), 144.8 (s, C-13), 41.9 (s, C-14), 28.4 (t, C-15), 23.6 (t, C-16), 47.0 (s, C-17), 41.8 (d, C-18), 46.3 (t, C-19), 30.8 (s, C-20), 34.2 (t, C-21), 32.3 (t, C-22), 28.2 (q, C-23), 16.9 (q, C-24), 15.6 (q, C-25), 17.5 (q, C-26), 26.1 (q, C-27), 180.4 (s, C-28), 33.1 (q, C-29), 23.7 (q, C-30), Ara: 104.9 (d, C-1), 76.3 (d, C-2), 72.5 (d, C-3), 69.7 (d, C-4), 64.8 (t, C-5), Glc: 106.5 (d, C-1), 79.8 (d, C-2), 75.6 (d, C-3), 71.4 (d, C-4), 78.4 (d, C-5), 62.5 (t, C-6), Rha: 101.5 (d, C-1), 72.8 (d, C-2), 72.3 (d, C-3), 74.1 (d, C-4), 69.4 (d, C-5), 18.4 (q, C-6)。以上数据及理化性质与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 4 为竹节香附素 A。

化合物 5: 白色无定形粉末, TLC 喷 5%硫酸-香草醛加热显色, 反应呈紫红色, Liebermann-Burchard 反应呈阳性, 提示该化合物可能为三萜皂苷; ESI-MS m/z : 477 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 500 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.78 (3H, s, 28- CH_3), 0.88 (3H, s, 23- CH_3), 0.92 (3H, s, 26- CH_3), 0.94 (3H, s, 27- CH_3), 1.01 (3H, s, 24- CH_3), 1.26 (3H, s, 29- CH_3), 1.31 (3H, s, 30- CH_3), 3.30 (1H, t, $J=7.2$ Hz, H-3), 3.65 (1H, m, H-6), 3.70 (1H, m, H-16); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 38.7 (t, C-1), 27.5 (t, C-2), 78.7 (d, C-3), 39.5 (s, C-4), 59.8 (d,

C-5), 66.0 (d, C-6), 42.6 (t, C-7), 43.0 (s, C-8), 49.0 (d, C-9), 39.2 (s, C-10), 21.5 (t, C-11), 23.0 (t, C-12), 47.2 (s, C-13), 43.1 (s, C-14), 45.2 (t, C-15), 66.9 (d, C-16), 57.8 (d, C-17), 46.3 (s, C-18), 39.2 (t, C-19), 25.5 (t, C-20), 52.1 (d, C-21), 70.5 (s, C-22), 30.4 (q, C-23), 16.2 (q, C-24), 15.5 (q, C-25), 16.8 (q, C-26), 17.4 (q, C-27), 18.6 (q, C-28), 31.1 (q, C-29), 22.6 (q, C-30)。以上数据及理化性质与文献报道基本一致^[13-14], 故鉴定化合物 5 为 mollugogenol A。

化合物 6: 白色簇状结晶 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应呈阳性, 将化合物 6 与齐墩果酸对照品共薄层检查, 斑点颜色及 R_f 值完全一致; 同时, 其 HPLC 分析与对照品保留时间也完全一致, 故鉴定化合物 6 为齐墩果酸。

4 细胞毒活性测定

化合物 1~5, 使用 DMSO 溶解, 配成浓度为 100 mmol/L 的母液, 储存于 -20°C 。临用时用相应的培养液将其稀释为 100、10、1、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 进行实验。DMSO 配制的样品进行实验时, DMSO 的终体积分数为 0.1%。阳性药依托泊苷注射乳浓度为 100、10、1、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。

取对数生长期的 DU145、HeLa、HL-60 细胞, 调整适当的细胞密度, 接种于 96 孔板内, 每孔 100 μL , 培养于 37°C 、5% CO_2 的培养箱内。培养 24 h 后加药, 作用 72 h。分设对照组 (培养液)、给药组 (化合物 1~5) 和阳性对照组 (依托泊苷), 每组设 4 个复孔。将细胞与 0.25 mg/mL MTT 于 37°C 共同抚育 3~4 h, 离心吸除上清液, 加入 100 μL DMSO, 完全溶解后使用酶标仪于 492 nm 测定其吸光度 (A) 值, 按照公式计算细胞抑制率。IC₅₀ 数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。结果见表 2。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

表 2 化合物 1~5 对 HL-60 细胞存活的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 *In vitro* cytotoxicities of compounds 1—5 against HL-60 cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n=4$)

化合物	抑制率/%				IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
	0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
1	-5.70 ± 1.46	-5.53 ± 2.32	46.30 ± 1.51	81.19 ± 0.41	10.21
2	1.52 ± 1.32	3.11 ± 0.65	8.13 ± 0.90	83.11 ± 0.14	38.43
3	-4.70 ± 0.22	-5.53 ± 0.85	2.73 ± 0.77	77.66 ± 0.37	40.28
4	-1.40 ± 2.41	2.37 ± 0.52	62.80 ± 0.14	89.21 ± 0.08	20.59
5	-2.02 ± 0.76	0.53 ± 1.13	4.76 ± 0.55	80.02 ± 0.15	83.16
依托泊苷	10.83 ± 0.42	37.33 ± 0.21	87.12 ± 0.29	86.39 ± 0.42	1.65

5 讨论

本研究对粟米草的地上干燥部分进行化学成分及细胞毒活性研究,共分离得到6个齐墩果酸型三萜化合物,其中1为新化合物,2~5首次从该植物中分离得到。细胞毒活性显示均具有一定的药理活性,尤其是对HL-60细胞株相对明显。本研究丰富了对粟米草植物化学成分与药理活性的认识,对进一步开发利用该药用资源提供了参考依据。

参考文献

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [2] 刘可越. 粟米草属植物资源、成分及药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 149-150.
- [3] 李雪芹, 高春华, 刘建云, 等. 粟米草提取物对自发性高血压大鼠的降压作用 [J]. 山东医药, 2005, 17(6): 8-12.
- [4] 汪开治. 埃及科学家发现粟米草根含抗癌化合物 [J]. 浙江林业科技, 2006, 26(2): 33.
- [5] 熊建军, 龚 帆, 吴周环, 等. 粟米草皂甙对血管平滑肌细胞增殖的影响及机制探讨 [J]. 山东医药, 2010, 50(18): 27-28.
- [6] 干丽君, 龚 帆, 熊建军, 等. 粟米草三贴皂苷对PDGF诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(8): 947-950.
- [7] 刘可越, 刘海军, 高春华, 等. 粟米草中化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1916-1917.
- [8] 龚 帆, 彭素文, 李兴暖, 等. 粟米草三萜皂苷抗实验性心律失常作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(9): 2095-2097.
- [9] Wu F E, Koike K, Ohmoto T, *et al.* Saponins from Chinese folk medicine, “Zhu jie xiang fu” *Anemone raddeana* Regel [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(9): 2445-2447.
- [10] Hideaki K, Masanori K, Kaoru U, *et al.* Studies on the saponins of *Lonicera japonica* Thunb. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(12): 4769-4775.
- [11] Kinjo J, Uemura H, Nakamura M, *et al.* Two new triterpenoidal glycosides from *Medicago polymorpha* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 46(2): 1339-1341.
- [12] 匡海学, 田振坤. 两头尖的化学成分研究 [J]. 中草药, 1996, 27(6): 328-330.
- [13] Patra A, Mitra A K. Carbon-13 NMR spectra of some novel migrated hopanes and 2 α -H hopanes [J]. *Org Magn Res*, 1981, 17(2): 148-150.
- [14] Jha O P, Ghosh P K, Singh B P. Chemical investigation of *Mollugo pentaphylla* [J]. *J Indian Chem Soc*, 1984, 61(1): 93-94.