

蟾皮中的蟾蜍甾烯类成分及其细胞毒活性研究

李宝晶^{1,2}, 吴 炎², 王 磊^{2*}, 叶文才^{2*}

1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500

2. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632

摘要: 目的 研究蟾皮(中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 的干燥皮)中的蟾蜍甾烯类成分及其细胞毒活性。方法 利用硅胶、ODS、凝胶、高效液相色谱等方法对中药蟾皮的化学成分进行分离, 运用 IR、UV、NMR、MS 及单晶 X-衍射等波谱学方法对分离得到的化合物进行结构鉴定, 采用 MTT 法测试化合物对人肝癌 HepG2 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞及人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖抑制活性。结果 从蟾皮 95%乙醇提取物的氯仿萃取部位共分离鉴定了 14 个蟾蜍甾烯类成分, 分别为 3,23-二羟基- γ -内酯-24-去甲-14,20(22)-二烯-21-胆酸(1)、3-表-酯蟾毒配基(2)、3-表-去乙酰华蟾蜍精(3)、3-表-蟾蜍灵(4)、3-氧-去乙酰华蟾蜍精(5)、3-氧-蟾蜍它灵(6)、3-氧-伪沙蟾蜍精(7)、3-oxo- $\Delta^{4(5)}$ -resibufogenin(8)、3-oxo- $\Delta^{4(5)}$ -cinobufotalin(9)、3-dehydroscillarenin(10)、3-氧-毛地黄毒苷配基(11)、digirezigenin(12)、bufogargarizin A(13)、bufogargarizin B(14)。化合物 6、9、10 对 HepG2、A549 及 HeLa 细胞具有显著的增殖抑制活性, 半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.11~1.67 μ mol/L。结论 化合物 1 为新天然产物, 并首次报道其核磁数据; 化合物 1~14 均为首次从蟾皮中分离得到; 化合物 6、9、10 具有显著的细胞毒活性。

关键词: 蟾皮; 蟾蜍甾烯类化合物; 细胞毒活性; 3,23-二羟基- γ -内酯-24-去甲-14,20(22)-二烯-21-胆酸; 3-表-酯蟾毒配基; 3-氧-蟾蜍它灵

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)10-2876-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.003

Cytotoxic bufadienolides of skin of *Bufo bufo gargarizans*

LI Bao-jing^{1,2}, WU Yan², WANG Lei², YE Wen-cai²

1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: **Objective** To investigate the cytotoxic bufadienolides from the skin of *Bufo bufo gargarizans*. **Methods** Compounds were isolated by a combination of various chromatographic methods including silica gel, ODS and HPLC, and their structures were elucidated based on spectroscopic analyses (IR, UV, NMR, and MS) and single crystal X-ray diffraction. The *in vitro* cytotoxic activities of 10 bufadienolides were evaluated in HepG2, A549, and Hela cells by MTT assay. **Results** A total of 14 compounds were isolated from the skin of *B. bufo gargarizans* and identified as 3,23-dihydroxy- γ -lactone-24-norchola-14,20(22)-dien-21-oic acid (1), 3-*epi*-resibufogenin (2), 3-*epi*-desacetylcinobufagin (3), 3-*epi*-bufalin (4), 3-ketodesacetylcinobufagin (5), 3-oxo-cinobufagin (6), 3-oxo- ψ -bufarenogin (7), 3-oxo- $\Delta^{4(5)}$ -resibufogenin (8), 3-oxo- $\Delta^{4(5)}$ -cinobufotalin (9), 3-dehydroscillarenin (10), 3-dehydrodigitoxigenin (11), digirezigenin (12), bufogargarizin A (13), and bufogargarizin B (14). Three compounds (6, 9, and 10) displayed significant anti-proliferative activities on HepG2, A549 and Hela cells with IC₅₀ values of 0.11-1.67 μ mol/L. **Conclusion** Compound 1 is a new natural product. Compounds 1-14 are reported for the first time in the skin of *B. bufo gargarizans*. Compounds 6, 9, and 10 show significant cytotoxic activities.

Key words: skin of *Bufo bufo gargarizans*; bufadienolides; cytotoxicity; 3,23-dihydroxy- γ -lactone-24-norchola-14,20(22)-dien-21-oic acid; 3-*epi*-resibufogenin; 3-oxo-cinobufagin

收稿日期: 2020-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860760); 云南省应用基础研究计划项目(2017FD110); 云南民族大学民族药资源化学国家民族事务委员会-教育部重点实验室开放基金(MZY1608)

作者简介: 李宝晶(1988—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础及活性研究。E-mail: libaojingcpu@163.com

*通信作者: 叶文才(1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: chywc@aliyun.com

王 磊(1982—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为天然药物活性成分研究。E-mail: cpuwanglei@126.com

蟾皮为蟾蜍科(Bufonidae)蟾蜍属 *Bufo* Laurenti 动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 的干燥皮,具有清热解毒、利水消肿等功效,主治痈疽、肿毒、瘰癧、痞积腹胀^[1],临床常用于治疗恶性肿瘤、慢性乙型肝炎、面神经麻痹等。蟾皮中主要含有蟾蜍甾烯类、吲哚烷胺类生物碱、蟾蜍环酰胺等成分^[2-4],其中蟾蜍甾烯类化合物为其主要成分。蟾皮和蟾酥中的蟾蜍甾烯类化合物,如 bufalin、cinobufagin、resibufagin 等具有良好的抗肿瘤作用^[5]。以蟾皮为原料制成的华蟾素注射液对肿瘤细胞有明显抑制作用,临床用于中晚期肿瘤的治疗^[6-7]。为进一步明确蟾皮的抗肿瘤药效物质基础,本研究对蟾皮的化学成分进行研究,共分离并鉴定了 14 个蟾蜍甾烯类化合物,分别鉴定为 3,23-dihydroxy- γ -lactone-24-norchola-14,20(22)-dien-21-oic acid (**1**)、3-表-酯蟾毒配基(3-*epi*-resibufogenin, **2**)、3-表-去乙酰华蟾蜍精(3-*epi*-desacetylcinobufagin, **3**)、3-表-蟾蜍灵(3-*epi*-bufalin, **4**)、3-氧-去乙酰华蟾蜍精(3-ketodesacetyl-cinobufagin, **5**)、3-氧-蟾蜍它灵(3-oxo-cinobufagin, **6**)、3-氧-伪沙蟾蜍精(3-oxo- ψ -bufarenogin, **7**)、3-oxo- $\Delta^{4(5)}$ -resibufogenin (**8**)、3-oxo- $\Delta^{4(5)}$ -cinobufotalin (**9**)、3-dehydroscillarenin (**10**)、3-氧-毛地黄毒苷配基(3-dehydro-digitoxigenin, **11**)、digirezigenin (**12**)、bufogargarizin A (**13**)、bufogargarizin B (**14**)。其中,化合物 **1** 为新天然产物,并首次报道其 NMR 数据。以上化合物均为首次从蟾皮中分离得到。此外,对分离得到的部分蟾蜍甾烯类化合物进行抗人肝癌 HepG2 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞及人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的活性测试,结果显示具有良好的细胞毒活性,其中 3 个化合物(**6**、**9**、**10**)具有显著的肿瘤细胞增殖抑制活性,半数抑制浓度(IC₅₀) 在 0.11~1.67 μ mol/L。

1 仪器与材料

JASCO P-1020 旋光仪、JASCO V-550 紫外/可见光谱仪、JASCO FI/IR-480 Plus Fourier Transform 红外光谱仪(日本 JASCO 公司); Bruker AV-300、Bruker AV-400 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); Finnigan LCQ Advantage MAX 质谱仪(美国 Thermo 公司); Agilent 6210 LC/MSD TOF 质谱仪(美国 Agilent 公司); 分析型及制备型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司); 超净工作台(新加坡 Esco 公司); IX51 型

倒置荧光显微镜(日本 Olympus 株式会社); MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 自动双重纯水蒸馏器(上海申立玻璃仪器公司); 96 孔细胞培养板(美国 Corning Costar 公司); 精密移液枪(法国 Gilson 公司); 高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司)。

硅胶(200~300 目,青岛海洋化工公司); ODS 填料(60~80 μ m, YMC 公司); Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences 公司); 分析型 HPLC 色谱柱采用 Cosmosil 5C₁₈-MS-II (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 制备型及半制备型 HPLC 分别采用 Cosmosil 5C₁₈-MS-II (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μ m) 及 Cosmosil 5C₁₈-MS-II (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m) 色谱柱,日本半井公司; 氘代试剂(美国 CIL 公司); 实验中所用化学试剂,均为分析纯或色谱纯; RPMI-1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、新生牛血清(newborn bovine serum, NBS)、胰蛋白酶、青-链霉素均购自美国 Gibco 公司; 盐酸多柔比星(doxorubicin, 批号 14023143, 山西普德药业有限公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、NaHCO₃ 及其他试剂购自美国 Sigma 公司。

实验用中华大蟾蜍的干燥皮共 2000 张,购买于济南天兴蟾业。经暨南大学周光雄教授鉴定为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor, 标本(No.201112271)现保存于暨南大学中药及天然药物研究所。

2 提取与分离

蟾皮(共 13 kg)粉碎成粗粉,用 3 倍量 95% 乙醇回流提取(80 $^{\circ}$ C) 4 次,每次 1 h,合并提取液,减压浓缩得 95%乙醇总提取物。将 95%乙醇总提取物,分别用 3 L 水混悬后,氯仿萃取,重复 4 次,合并萃取液,减压浓缩得氯仿部位(150 g)。氯仿部位(150 g)经硅胶柱色谱,环己烷-丙酮(100:0、98:2、95:5、90:10、85:15、80:20、70:30、1:1、0:100)梯度洗脱,经薄层色谱分析得到 8 个主流分(Fr. A~H)。

Fr. C (15 g)经硅胶柱色谱,氯仿-丙酮(98:2、95:5、90:10、80:20、70:30、0:100)梯度洗脱得到 6 个流分(Fr. C1~C6)。其中亚流分 Fr. C2 (5.5 g)经反相 ODS 柱色谱(甲醇-水),50%甲醇洗脱部位利用半制备型 HPLC (55%乙腈, 3 mL/min)纯化,得到化合物 **9** (26.7 mg, t_R =12.5 min)、**8** (8.3 mg, t_R =13.6 min); 60%甲醇洗脱部

位利用半制备型 HPLC (80% 甲醇, 3 mL/min) 纯化, 得到化合物 **6** (57.3 mg, $t_R=19.8$ min)。Fr. C3 (1.3 g) 经反相 ODS 柱色谱, 50% 甲醇洗脱, 后通过半制备型 HPLC (55% 甲醇, 3 mL/min) 纯化, 得到化合物 **11** (1.1 mg, $t_R=33.1$ min)、**12** (2.3 mg, $t_R=41.0$ min)。Fr. C4 (1.5 g) 经反相 ODS 柱色谱 (甲醇-水), 60% 甲醇洗脱部位析出无色方晶, 得到化合物 **4** (5.7 mg)。Fr. C5 (3.7 g) 经反相 ODS 柱色谱 (甲醇-水), 50% 甲醇洗脱部位通过半制备型 HPLC (50% 乙腈, 3 mL/min) 纯化, 得到化合物 **10** (9.7 mg, $t_R=10.6$ min); 60% 甲醇洗脱部位析出无色方晶, 得到化合物 **2** (4.8 mg), 析晶后母液通过制备型 HPLC (55% 乙腈, 6 mL/min) 纯化, 得到化合物 **1** (1.3 mg, $t_R=53.7$ min)。

Fr. E (11 g) 经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇 (100:0、100:1、100:2、100:5、10:1、8:2、1:1) 梯度洗脱得到 9 个流分 (Fr. E1~E9)。其中亚流分 Fr. E4 (3.5 g) 经反相 ODS 柱色谱 (甲醇-水), 60% 甲醇洗脱部位利用半制备型 HPLC (40% 甲醇, 3 mL/min) 纯化, 得到化合物 **14** (8.7 mg, $t_R=20.5$ min)、**13** (3.3 mg, $t_R=28.7$ min)。Fr. E5 (3.0 g) 经反相 ODS 柱色谱 (甲醇-水), 30% 甲醇洗脱部位利用制备型 HPLC (25% 乙腈, 6 mL/min) 纯化, 得到化合物 **7** (2.6 mg, $t_R=42.3$ min), 60% 甲醇洗脱部位利用制备型 HPLC (45% 乙腈, 6 mL/min) 纯化, 得到化合物 **5** (26.9 mg, $t_R=47.4$ min)。

Fr. G (8 g) 经反相 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20) 梯度洗脱, 得到 16 个流分 (Fr. G1~G16)。其中 Fr. G14 (0.5 g) 经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇) 分离后, 经制备型 HPLC (50% 乙腈, 6 mL/min) 纯化, 得到化合物 **3** (14.8 mg, $t_R=22.4$ min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色针晶 (甲醇), 香草醛-浓硫酸反应显棕色; $[\alpha]_D^{26} -54.65^\circ$ (c 0.5, CH₃OH)。依据 HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰 m/z 357.232 6 $[M+H]^+$ (计算值为 357.243 0), 确定化合物 **1** 的分子式为 C₂₃H₃₂O₃, 不饱和度 8。IR 光谱显示羟基 (3403 cm⁻¹) 和羰基 (1748 cm⁻¹) 的特征吸收。UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 205 (4.21)。化合物 **1** 的 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 图谱中, 低场区显示 2 个烯质子信号 [δ_H 7.18 (1H, dd, $J=3.6, 1.6$ Hz, H-22), 5.20 (1H, dd, $J=2.1, 1.3$ Hz, H-15)]; 中、高场区显示 1 个连氧的

亚甲基质子 [δ_H 4.82 (2H, dt, $J=3.6, 1.6$ Hz, H-23)], 2 个角甲基质子信号 [δ_H 0.96 (3H, s, H-19), 0.74 (3H, s, H-18)]。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 谱中, 共显示 23 个碳信号, 其中低场区 δ_C 174.6 为酯羰基碳信号, δ_C 155.0, 116.4 以及 δ_C 145.5, 135.1 为两组烯碳信号。中场区 δ_C 70.3 为 1 个连氧的亚甲基信号, δ_C 67.2 为 1 个连氧的次甲基信号。高场区 δ_C 23.7, 19.2 为 2 个角甲基信号。结合上述信息, 确定化合物 **1** 具有甾体的母核, 且具有 3-羟基, 但并不含有蟾蜍甾烯类化合物的特征六元内酯环, 可能为 C-23 甾类化合物。化合物 **1** 的 ¹H-¹H COSY 谱中可观察到 3 组质子自旋偶合体系 (图 1), 确证了甾体环戊烷骈多氢菲母核的存在, 同时在 3 位有羟基取代, 14、15 位具有双键。此外, δ_H 4.82 (H-23) 和 δ_C 135.1 (C-20), 174.6 (C-21), δ_H 0.74 (H-18) 和 δ_C 41.7 (C-12) 之间的远程相关信号 (图 1), 进一步确定了化合物 **1** 的 17 位连接的是不同于甲型强心甾的五元内酯环。至此确定化合物 **1** 的平面结构 (图 1), 并对 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据得以全归属 (表 1)。

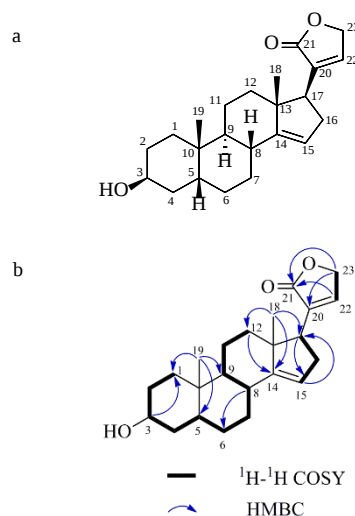


图 1 化合物 **1** 的化学结构 (a) 和 ¹H-¹H COSY 及部分 HMBC 相关 (b)

Fig. 1 Chemical structure (a), ¹H-¹H COSY and selected HMBC correlations (b) of compound **1**

化合物 **1** 的 ROESY 谱中观察到 Me-18 (δ_H 0.74) 和 H-8 (δ_H 2.05)、H-11 β (δ_H 1.46)、H-22 (δ_H 7.18), Me-19 (δ_H 0.97) 和 H-1 β (δ_H 1.43)、H-5 (δ_H 1.76)、H-6 β (δ_H 1.25)、H-11 β (δ_H 1.46) 具有 NOE 相关, 说明这些质子处于同侧。同理, H-17 (δ_H 2.94) 和 H-12 α (δ_H 2.05), H-9 (δ_H 1.42) 和 H-2 α (δ_H 1.55)、H-7 α (δ_H 1.55)、H-12 α (δ_H 2.05), H-4 α (δ_H 1.96) 和

表 1 化合物 1 的 NMR 数据 (400/100 MHz, CDCl₃)
Table 1 NMR data of compound 1 (400/100 MHz, CDCl₃)

碳位	δ_H	δ_C	碳位	δ_H	δ_C
1	1.54 (1H, m, H-1 α), 1.43 (1H, m, H-1 β)	29.9	13		48.5
2	1.55 (1H, m, H-2 α), 1.50 (1H, m, H-2 β)	28.0	14		155.0
3	4.10 (1H, brs)	67.2	15	5.20 (1H, dd, $J = 2.1, 1.3$ Hz)	116.4
4	1.96 (1H, m, H-4 α), 1.35 (1H, m, H-4 β)	33.4	16	2.49 (1H, m, H-16 α), 2.43 (1H, m, H-16 β)	34.9
5	1.76 (1H, m)	36.5	17	2.94 (1H, t, $J = 8.9$ Hz)	48.9
6	1.96 (1H, m, H-6 α), 1.25 (1H, m, H-6 β)	26.4	18	0.74 (1H, s)	19.2
7	1.55 (1H, m, H-7 α), 1.24 (1H, m, H-7 β)	22.1	19	0.97 (1H, s)	23.7
8	2.05 (1H, m)	35.6	20		135.1
9	1.42 (1H, m)	40.0	21		174.6
10		35.5	22	7.18 (1H, dd, $J = 3.6, 1.6$ Hz)	145.5
11	1.65 (1H, m, H-11 α), 1.46 (1H, m, H-11 β)	24.2	23	4.82 (2H, dt, $J = 3.6, 1.6$ Hz)	70.3
12	2.05 (1H, m, H-12 α), 1.47 (1H, m, H-12 β)	41.7			

H-2 α (δ_H 1.55)、H-7 α (δ_H 1.55) 具有 NOE 相关, 说明这些质子处于另一侧, 由此确定了化合物 1 的相对构型 (图 2-a)。为确定化合物 1 的绝对构型, 进行化合物 1 的单晶铜靶 X 射线衍射实验, 最终确定绝对构型 (图 2-b)。化合物 1 单晶衍射实验参数如下: C₂₃H₃₂O₃ (fw = 356.49); 斜方晶系 (orthorhombic), 空间群 $P2_12_12_1$; $a=0.637\ 842\ (10)$ nm, $b=1.281\ 540\ (15)$ nm, $c=2.336\ 33\ (4)$ nm, $\alpha=\beta=\gamma=90.00$; $V=1.909\ 77\ (5)$ nm³, $T=293\ (2)$ K, $Z=4$, $D_C=1.240$ mg/mm³, $F(000)=776$ 。在 $3.78 \leq \theta \leq 62.66$, 共收集 3073 个独立反射点, 其中 2933 个反射点用于结构求解 [$I > 2\sigma(I)$]。最后的偏离因子 $R=0.028\ 5$, $R_w=0.073\ 1$, $S=1.076$ 。Flack parameter = -0.08 (19)。综上所述, 鉴定化合物 1 为 3,23-二羟基- γ -内酯-24-去甲-14,20(22)-二烯-21-胆酸, 为 1 个新天然产物^[8], 首次报道并归属其 NMR 数据。

化合物 2: 无色方晶 (甲醇), 香草醛-浓硫酸反应显绿色; $[\alpha]_D^{26} + 17.56^\circ$ ($c\ 1.0$, CH₃OH); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 203 (4.68), 295 (4.33); IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3437, 2934, 1709, 1642, 1540, 1375; ESI-MS m/z : 385 [M+H]⁺, 分子式为 C₂₄H₃₂O₄。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.78 (1H, dd, $J = 9.7, 2.4$ Hz, H-22), 7.23 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-21), 6.24 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-23), 0.95 (3H, s, H-19), 0.77 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 33.9 (C-1), 30.7 (C-2), 71.7 (C-3), 36.3 (C-4), 40.1 (C-5), 26.4 (C-6), 21.0 (C-7), 41.6 (C-8), 35.1 (C-9), 35.1 (C-10), 21.0 (C-11), 39.5 (C-12), 45.4 (C-13), 74.8 (C-14), 60.1

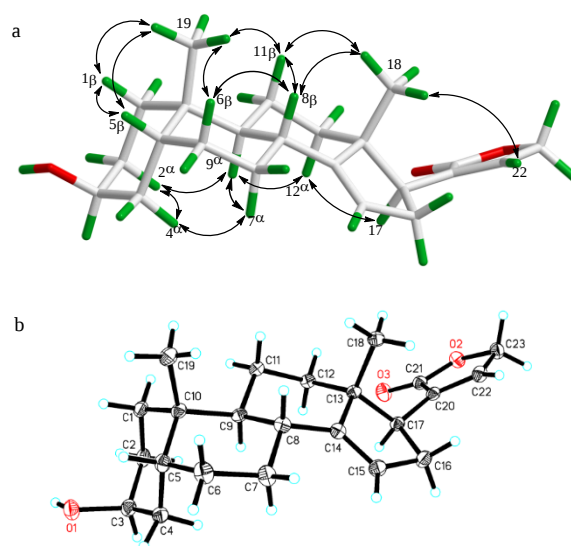


图 2 化合物 1 的部分 ROESY 相关 (a) 和单晶结构 (b)
Fig. 2 Selected ROESY correlations (a) and X-ray crystal structure (b) of compound 1

(C-15), 32.5 (C-16), 47.9 (C-17), 17.0 (C-18), 23.4 (C-19), 122.4 (C-20), 149.7 (C-21), 147.1 (C-22), 115.4 (C-23), 162.2 (C-24)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 2 为 3-表-脂蟾蜍精。

化合物 3: 无色方晶 (甲醇), 香草醛-浓硫酸反应显红棕色; $[\alpha]_D^{26} + 116.33^\circ$ ($c\ 0.1$, CH₃OH); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 203 (4.57), 218 (4.37), 296 (4.46); IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3419, 2933, 1698, 1631, 1535, 1334; ESI-MS m/z : 401 [M+H]⁺ 分子式为 C₂₄H₃₂O₄。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.93 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-22), 7.45 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-21), 6.16 (1H, dd, $J = 9.2, 1.7$ Hz, H-23), 0.88 (3H, s, H-19), 0.66

(3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 30.4 (C-1), 34.6 (C-2), 69.8 (C-3), 36.0 (C-4), 41.1 (C-5), 26.1 (C-6), 20.4 (C-7), 32.9 (C-8), 39.1 (C-9), 34.8 (C-10), 20.5 (C-11), 38.9 (C-12), 44.4 (C-13), 71.7 (C-14), 62.1 (C-15), 70.6 (C-16), 50.8 (C-17), 17.1 (C-18), 23.1 (C-19), 117.9 (C-20), 151.1 (C-21), 150.0 (C-22), 112.0 (C-23), 161.3 (C-24)。以上数据与文献报道对比一致^[10], 故鉴定化合物 **3** 为 3-表-去乙酰华蟾蜍精。

化合物 **4**: 无色方晶 (甲醇), 香草醛-浓硫酸反应 (TLC) 显青蓝色; $[\alpha]_D^{26} -19.02^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 204 (4.39), 299 (3.91); $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3421, 2941, 1703, 1635, 1541, 1363; ESI-MS m/z : 387 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.83 (1H, dd, $J = 9.7, 2.6$ Hz, H-22), 7.22 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-21), 6.25 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-23), 0.91 (3H, s, H-18), 0.69 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 35.2 (C-1), 36.4 (C-2), 71.8 (C-3), 36.6 (C-4), 27.2 (C-5), 21.4 (C-6), 42.7 (C-7), 41.7 (C-8), 35.0 (C-9), 21.7 (C-10), 28.9 (C-11), 41.0 (C-12), 48.5 (C-13), 85.5 (C-14), 33.0 (C-15), 30.8 (C-16), 51.4 (C-17), 16.7 (C-18), 23.4 (C-19), 122.8 (C-20), 148.7 (C-21), 146.9 (C-22), 115.5 (C-23), 162.5 (C-24)。通过 ^1H - ^1H -COSY、HSQC、HMBC、NOESY 等二维谱对核磁数据进行了归属, 鉴定化合物 **4** 为 3-表-蟾蜍灵^[11]。

化合物 **5**: 无色针晶 (甲醇), 香草醛-浓硫酸反应显黄绿色; $[\alpha]_D^{26} +24.61^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 204 (3.55), 294 (3.48), 215 (3.46); $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3452, 2936, 1716, 1698, 1540, 1423; ESI-MS m/z : 399 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_5$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.94 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-22), 7.46 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-21), 6.17 (1H, dd, $J = 9.2, 1.7$ Hz, H-23), 0.96 (3H, s, H-18), 0.69 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 36.1 (C-1), 36.7 (C-2), 211.8 (C-3), 41.7 (C-4), 43.1 (C-5), 25.4 (C-6), 19.6 (C-7), 38.6 (C-8), 32.6 (C-9), 34.8 (C-10), 20.7 (C-11), 38.8 (C-12), 44.5 (C-13), 71.6 (C-14), 62.2 (C-15), 70.6 (C-16), 50.9 (C-17), 17.1 (C-18), 22.1 (C-19), 117.9 (C-20), 151.2 (C-21), 150.0 (C-22), 112.1 (C-23), 161.3 (C-24)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **5** 为 3-氧-去乙酰华蟾蜍精。

化合物 **6**: 无色针晶 (甲醇), 香草醛-浓硫酸反应显棕绿色; $[\alpha]_D^{26} +0.06^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 203 (4.49), 294 (4.19); $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3490, 2938, 1717, 1642, 1540, 1374; ESI-MS m/z : 441 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.87 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-22), 7.47 (1H, s, H-21), 6.24 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-23), 0.96 (3H, s, H-18), 0.73 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 36.0 (C-1), 36.7 (C-2), 211.7 (C-3), 41.6 (C-4), 43.0 (C-5), 25.2 (C-6), 19.4 (C-7), 38.3 (C-8), 32.5 (C-9), 34.7 (C-10), 20.7 (C-11), 38.7 (C-12), 44.7 (C-13), 71.8 (C-14), 59.5 (C-15), 74.5 (C-16), 49.0 (C-17), 16.9 (C-18), 22.0 (C-19), 116.0 (C-20), 152.2 (C-21), 148.5 (C-22), 112.9 (C-23), 160.8 (C-24), 169.4 (C-25), 20.2 (C-26)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **6** 为 3-氧-华蟾蜍精。

化合物 **7**: 无定形粉末, 香草醛-浓硫酸反应显黄色; $[\alpha]_D^{26} -27.77^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 205 (3.96), 292 (3.44); $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3436, 2940, 1715, 1629, 1541, 1386; ESI-MS: m/z 415 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.63 (1H, dd, $J = 9.7, 2.6$ Hz, H-22), 7.53 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-21), 6.22 (1H, dd, $J = 9.7, 2.6$ Hz, H-23), 0.99 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 36.5 (C-1), 37.1 (C-2), 211.6 (C-3), 42.1 (C-4), 43.6 (C-5), 26.7 (C-6), 20.2 (C-7), 39.4 (C-8), 45.5 (C-9), 36.7 (C-10), 213.9 (C-11), 82.0 (C-12), 53.9 (C-13), 82.1 (C-14), 33.5 (C-15), 27.2 (C-16), 45.4 (C-17), 18.2 (C-18), 22.7 (C-19), 119.7 (C-20), 150.9 (C-21), 148.2 (C-22), 113.2 (C-23), 161.2 (C-24)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **7** 为 3-氧-伪沙蟾蜍精。

化合物 **8**: 无色针晶 (甲醇), 香草醛-浓硫酸反应显棕色; $[\alpha]_D^{26} +61.87^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 203 (4.47), 238 (4.48), 299 (4.21); $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 2941, 2864, 1717, 1667, 1539, 1369; ESI-MS m/z : 381 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.76 (1H, dd, $J = 9.8, 2.6$ Hz, H-22), 7.55 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-21), 6.28 (1H, dd, $J = 9.8, 2.6$ Hz, H-23), 5.64 (1H, s, H-4), 1.17 (3H, s, H-19), 0.74 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 35.0 (C-1), 33.6 (C-2), 198.0

(C-3), 123.3 (C-4), 170.1 (C-5), 31.3 (C-6), 26.4 (C-7), 33.1 (C-8), 52.0 (C-9), 38.3 (C-10), 20.6 (C-11), 37.9 (C-12), 44.5 (C-13), 73.5 (C-14), 59.4 (C-15), 31.5 (C-16), 45.9 (C-17), 16.5 (C-18), 17.1 (C-19), 121.9 (C-20), 150.7 (C-21), 147.3 (C-22), 114.2 (C-23), 161.1 (C-24)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **8** 为 3-oxo- $\Delta^{4(5)}$ -resibufogenin。

化合物 **9**: 无定形粉末, 香草醛-浓硫酸反应显棕色; $[\alpha]_D^{25} + 38.40^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 203 (4.37), 237 (4.46), 292 (4.01); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 2939, 1726, 1665, 1540, 1375; ESI-MS m/z : 439 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.85 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-22), 7.48 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-21), 6.25 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-23), 5.65 (1H, s, H-4), 1.81 (3H, s, H-26), 1.17 (3H, s, H-19), 0.77 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 34.9 (C-1), 33.6 (C-2), 198.0 (C-3), 123.4 (C-4), 169.8 (C-5), 31.2 (C-6), 26.2 (C-7), 32.6 (C-8), 51.5 (C-9), 38.3 (C-10), 20.5 (C-11), 38.4 (C-12), 44.5 (C-13), 71.4 (C-14), 59.3 (C-15), 74.4 (C-16), 48.8 (C-17), 16.8 (C-18), 17.1 (C-19), 115.9 (C-20), 152.4 (C-21), 148.4 (C-22), 113.0 (C-23), 160.8 (C-24), 169.3 (C-25), 20.2 (C-26)。以上数据与文献对比一致^[13], 故鉴定化合物 **9** 为 3-oxo- $\Delta^{4(5)}$ -cinobufotalin。

化合物 **10**: 无定形粉末, 香草醛-浓硫酸反应显黄色; $[\alpha]_D^{25} + 19.61^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 202 (3.97), 239 (4.27), 299 (3.74); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3461, 2941, 1715, 1654, 1540, 1369; ESI-MS m/z : 383 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.92 (1H, dd, $J = 9.7, 2.6$ Hz, H-22), 7.53 (1H, dd, $J = 2.6, 0.8$ Hz, H-21), 6.31 (1H, dd, $J = 9.7, 0.8$ Hz, H-23), 5.64 (1H, s, H-4), 1.11 (3H, s, H-19), 0.66 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 35.1 (C-1), 33.6 (C-2), 198.1 (C-3), 123.0 (C-4), 170.8 (C-5), 32.4 (C-6), 27.6 (C-7), 41.2 (C-8), 48.9 (C-9), 38.3 (C-10), 21.0 (C-11), 39.5 (C-12), 47.9 (C-13), 83.0 (C-14), 31.9 (C-15), 28.4 (C-16), 49.8 (C-17), 16.6 (C-18), 17.2 (C-19), 122.6 (C-20), 149.3 (C-21), 147.3 (C-22), 114.3 (C-23), 161.4 (C-24)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **10** 为 3-dehydroscillarenin。

化合物 **11**: 无定形粉末, 香草醛-浓硫酸反应显橙色; $[\alpha]_D^{25} + 29.60^\circ$ (c 0.5, CH_3OH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm):

217 (4.19); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3451, 2938, 1747, 1625, 1541, 1384; ESI-MS m/z : 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 5.93 (1H, s, H-22), 5.06 (1H, dd, $J = 18.4, 1.6$ Hz, H-21a), 4.95 (1H, dd, $J = 18.4, 1.6$ Hz, H-21b), 1.06 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 38.0 (C-1), 37.9 (C-2), 216.0 (C-3), 43.0 (C-4), 45.5 (C-5), 27.8 (C-6), 22.2 (C-7), 42.5 (C-8), 37.5 (C-9), 36.4 (C-10), 22.4 (C-11), 40.7 (C-12), 51.1 (C-13), 86.2 (C-14), 33.4 (C-15), 28.1 (C-16), 52.1 (C-17), 16.4 (C-18), 22.9 (C-19), 178.4 (C-20), 75.4 (C-21), 117.9 (C-22), 177.3 (C-23)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **11** 为 3-dehydrodigitoxigenin。

化合物 **12**: 无定形粉末, 香草醛-浓硫酸反应显蓝色; $[\alpha]_D^{25} + 30.13^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 212 (4.02); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3403, 2936, 1748, 1647, 1541, 1377; ESI-MS m/z : 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.89 (1H, s, H-22), 4.95 (1H, dd, $J = 18.7, 1.6$ Hz, H-21a), 4.84 (1H, dd, $J = 18.7, 1.6$ Hz, H-21b), 1.03 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 30.7 (C-1), 28.5 (C-2), 67.6 (C-3), 34.1 (C-4), 37.4 (C-5), 27.0 (C-6), 21.7 (C-7), 40.5 (C-8), 34.7 (C-9), 36.5 (C-10), 22.0 (C-11), 39.0 (C-12), 46.5 (C-13), 75.2 (C-14), 60.3 (C-15), 31.7 (C-16), 47.9 (C-17), 16.1 (C-18), 24.2 (C-19), 176.9 (C-20), 75.7 (C-21), 119.0 (C-22), 176.9 (C-23)。通过 $^1\text{H}-^1\text{H-COSY}$ 、 HSQC 、 HMBC 、 NOESY 等二维谱对核磁数据进行了归属, 鉴定化合物 **12** 为 digirezigenin^[17]。

化合物 **13**: 无定形粉末, 香草醛-浓硫酸反应显红色; $[\alpha]_D^{25} - 22.15^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 204 (3.70), 217 (3.58), 296 (3.68); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3420, 2936, 1724, 1601, 1535, 1377; ESI-MS m/z : 463 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_8$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.07 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-22), 7.42 (1H, s, H-21), 6.30 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-23), 5.52 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-16), 3.68 (1H, m, H-3), 3.86 (1H, s, H-15), 1.91 (3H, s, H-26), 0.90 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 34.0 (C-1), 32.3 (C-2), 70.8 (C-3), 54.9 (C-4), 209.9 (C-5), 64.5 (C-6), 26.8 (C-7), 37.8 (C-8), 58.0 (C-9), 81.4 (C-10), 21.4 (C-11), 41.7 (C-12), 47.0 (C-13), 73.5 (C-14), 60.8 (C-15), 76.6 (C-16), 51.0 (C-17), 17.9 (C-18),

118.3 (C-20), 153.6 (C-21), 150.8 (C-22), 114.1 (C-23), 164.0 (C-24), 171.6 (C-25), 20.3 (C-26)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **13** 为 bufogargarizin A。

化合物 **14**: 无定形粉末, 香草醛-浓硫酸反应显藏青色; $[\alpha]_D^{26} -18.35^\circ$ (c 1.0, CH_3OH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 203 (3.59), 217 (3.48), 294 (3.68); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3421, 2938, 1714, 1629, 1536, 1380; ESI-MS m/z : 459 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_8$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.05 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-22), 7.43 (1H, s, H-21), 6.29 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-23), 5.56 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-16), 4.43 (1H, ddd, $J = 15.9, 9.3, 6.9$ Hz, H-2), 3.82 (1H, s, H-15), 1.91 (3H, s, H-26), 0.92 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 35.6 (C-1), 71.7 (C-2), 51.9 (C-3), 79.8 (C-4), 39.7 (C-5), 22.4 (C-6), 39.9 (C-7), 58.1 (C-8), 212.7 (C-9), 62.7 (C-10), 24.3 (C-11), 39.4 (C-12), 46.5 (C-13), 72.3 (C-14), 61.0 (C-15), 76.4 (C-16), 51.2 (C-17), 17.5 (C-18), 118.2 (C-20), 153.7 (C-21), 150.7 (C-22), 114.2 (C-23), 164.0 (C-24), 171.6 (C-25), 20.3 (C-26)。以上数据与文献对比一致^[18], 故鉴定化合物 **14** 为 bufogargarizin B。

4 体外细胞毒活性实验

采用 MTT 法, 体外测试化合物 **1**、**2**、**4**、**6**~**12** 不同浓度下对 HepG2、A549 及 HeLa 细胞的增殖抑制活性。实验选用多柔比星 (dox) 为阳性对照化合物, 受试样品以 DMSO 溶解, 实验具体操作参照文献方法^[19]进行, 以 IC_{50} 为指标评价各化合物的细胞毒活性。结果表明, 除化合物 **1** 无活性外, 蟾皮中的蟾蜍甾烯类化合物在不同浓度下对 HepG2、A549 及 HeLa 细胞均表现出增殖抑制作用 (表 2)。其中, 3 个蟾蜍甾烯类化合物 (**6**、**9**、**10**) 对 3 种肿瘤细胞均具有显著的增殖抑制活性, IC_{50} 值分别为 0.40、0.63、0.78 $\mu\text{mol/L}$, 1.02、0.76、1.67 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.21、0.11、0.30 $\mu\text{mol/L}$ 。

5 讨论

本研究从中药蟾皮中分离鉴定了 14 个蟾蜍甾烯类化合物, 均为首次从蟾皮中分离得到。其中, 化合物 **1** 为新天然产物, 具有特殊的五元内酯环结构[21-羰基, $\Delta^{20(22)}$], 与常见的甲型强心甾结构[23-羰基, $\Delta^{20(22)}$]不同, 本实验首次报道并归属了化合物 **1** 的 NMR 数据, 并用单晶 X-衍射的方法确定其绝对构型。从中华大蟾蜍的耳后腺分泌物中分离得到 sarmentogenin^[20], 化合物 **1** 可能的生物合成途径如图 3 所示。

表 2 蟾皮中部分蟾蜍甾烯类化合物对 HepG2、A549 及 HeLa 的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Cytotoxic activities of bufadienolides on HepG2, A549, and HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	HepG2	A549	HeLa
dox	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.07	0.26 ± 0.08
1	>100	>100	>100
2	6.20 ± 1.43	16.11 ± 1.73	16.74 ± 3.84
4	2.78 ± 0.33	1.61 ± 0.32	2.46 ± 0.60
6	0.40 ± 0.06	0.63 ± 0.15	0.78 ± 0.16
7	2.80 ± 0.47	5.19 ± 0.44	5.85 ± 1.14
8	29.92 ± 6.91	20.20 ± 5.35	17.53 ± 5.71
9	1.02 ± 0.34	0.76 ± 0.08	1.67 ± 0.26
10	0.21 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.30 ± 0.09
11	7.88 ± 1.82	10.67 ± 0.33	9.25 ± 1.45
12	12.07 ± 2.48	5.82 ± 0.26	15.28 ± 3.00

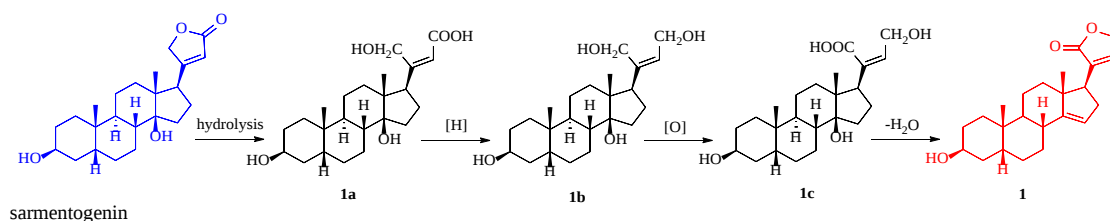


图 3 化合物 **1** 可能的生物合成途径

Fig. 3 Proposed biogenetic pathway of compound **1**

本研究首次报道了化合物 **1**、**4**、**7~9**、**11**、**12** 对 HepG2 细胞、A549 细胞以及 HeLa 细胞的细胞毒活性, 结果表明, 蟾皮中部分蟾蜍甾烯类化合物对 HepG2、A549 及 HeLa 细胞表现出显著的体外增殖抑制作用。初步分析可得到以下构效关系: 3 位为 α -羟基, 3 位羟基氧化为羰基, A 环引入 α,β -不饱和酮, 14,15-环氧取代均使活性降低, 与文献报道一致^[21]。值得注意的是, 以往的研究认为甾体母核 17 位的五元不饱和内酯环为活性必须基团^[21], 化合物 **1** 与化合物 **11**、**12** 相比, 均具有五元不饱和内酯, 但成酯位置不同, 化合物 **1** (21-羰基成酯) 与化合物 **11**、**12** (23-羰基成酯) 活性产生了显著差异, 由此可见, 酯基位置亦是内酯环作为活性必须基团的关键因素。以上研究为蟾蜍甾烯类成分的进一步构效关系研究, 以及中药蟾皮及相关制剂抗肿瘤物质基础的阐明提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 360-361.
- [2] 李维熙, 孙辉, 李茜, 等. 中华大蟾蜍皮化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 183-185.
- [3] Zhao H Y, Wu F K, Qiu Y K, et al. Studies on cytotoxic constituents from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(9): 793-800.
- [4] Wang D L, Qi F H, Tang W, et al. Chemical constituents and bioactivities of the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor [J]. *Chem Biodivers*, 2011, 8(4): 559-567.
- [5] 苏永华, 尹西才, 谢觉民, 等. 三种蟾毒单体对 SMMC-7721 和 BEL-7402 人肝癌细胞生长的抑制作用 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(4): 393-395.
- [6] 王东亮. 华蟾素抗肝癌有效成分的筛选、鉴定及作用机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [7] Qi F H, Li A Y, Zhao L, et al. Cinobufacini, an aqueous extract from *Bufo bufo gargarizans* Cantor, induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3): 654-661.
- [8] Yoshii E, Koizumi T, Mizuno S, et al. Studies on the synthesis of cardiostonic steroids. II. Synthesis of 17 β -(3-furyl)-5 β ,14 β -androstane-3 β ,14 β -diol [J]. *Chem Pharm Bull*, 1976, 24(12): 3216-3219.
- [9] Xin X L, Xie X H. Selective 3-OH isomerization of resibufogenin by cell suspension cultures of *Ginkgo biloba* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2005, 14(1): 10-12.
- [10] He X J, Hu H, Wu Y X, et al. Urinary metabolites of cinobufagin in rats and their antiproliferative activities [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(6): 489-499.
- [11] Toma S, Hirai Y, Sugimoto C, et al. Metabolic fate of bufalin and cinobufagin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1991, 111(11): 687-694.
- [12] He X J, Tang J S, Qiao A M, et al. Cytotoxic biotransformed products from cinobufagin by *Mucor spinosus* and *Aspergillus Niger* [J]. *Steroids*, 2006, 71(5): 392-402.
- [13] Zhang X, Ye M, Dong Y H, et al. Biotransformation of arenobufagin and cinobufotalin by *Alternaria alternata* [J]. *Biocatal Biotransformation*, 2011, 29(2/3): 96-101.
- [14] Ye M, Han J, An D G, et al. New cytotoxic bufadienolides from the biotransformation of resibufogenin by *Mucor polymorphosporus* [J]. *Tetrahedron*, 2005, 61(37): 8947-8955.
- [15] Zhang X, Ye M, Dong Y H, et al. Biotransformation of bufadienolides by cell suspension cultures of *Saussurea involucreata* [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(14/15): 1779-1785.
- [16] Habermehl G G, Hammann P E, Wray V. ¹³C-NMR spectra of 5 β , 14 β -hydroxysteroids [J]. *Magn Reson Chem*, 1985, 23(11): 959-963.
- [17] Hofer P, Linde H, Meyer K. 14 α ,15 α -Epoxy- $\langle\beta\rangle$ -anhydrodigitoxigenin und 14 β ,15 β -epoxy- $\langle\beta\rangle$ -anhydrodigitoxigenin [J]. *Helv Chim Acta*, 1962, 45(122): 1041-1044.
- [18] Tian H Y, Wang L, Zhang X Q, et al. Bufogargarizins A and B: Two novel 19-norbufadienolides with unprecedented skeletons from the venom of *Bufo bufo gargarizans* [J]. *Chemistry*, 2010, 16(36): 10989-10993.
- [19] Li B J, Tian H Y, Zhang D M, et al. Bufadienolides with cytotoxic activity from the skins of *Bufo bufo gargarizans* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 105: 7-15.
- [20] Niklaus H, Dobrila Ž, Horst H A L, et al. Weitere cardenolide aus Ch'an Su. Über Krötengifte 37. Mitteilung [J]. *Helv Chim Acta*, 1970, 53(8): 2051-2059.
- [21] Kamano Y, Yamashita A, Nogawa T, et al. QSAR evaluation of the Ch'an Su and related bufadienolides against the colchicine-resistant primary liver carcinoma cell line PLC/PRF/5(1) [J]. *J Med Chem*, 2002, 45(25): 5440-5447.

[责任编辑 王文倩]