

中华大蟾蜍卵中 2 个蟾毒内酯类新化合物及其抗乳腺癌活性研究

张鹏伟^{1,2*}, 吴佳³, 田海妍², 黄露¹, 吕俊芳⁴

¹ 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510120; ² 暨南大学药学院, 广州 510632;

³ 广州中医药大学附属广东省中西医结合医院, 佛山 528200; ⁴ 香港中文大学中医药研究所, 香港 999077

摘要: 为探究中华大蟾蜍卵中化学成分, 通过多种色谱技术对其二氯甲烷萃取物进行分离纯化, 综合运用 NMR、MS、UV 等手段鉴定化合物结构, 并采用 MTT 法对这些化合物的抗人乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 的体外增殖活性进行评价。总共分离得到 5 个化合物, 分别为 3-(14-hydroxy-7Z-tetradecenoyl)-hellebrigenol (**1**)、3-(16-hydroxy-9Z-hexadecanoyl)-hellebrigenol (**2**)、3-(14-hydroxy-7Z-tetradecenoyl)-1 β -hydroxytelcinobufagin (**3**)、3-(14-hydroxy-tetradecanoyl)-hellebrigenol (**4**)、3-氧代沙蟾蜍精 (**5**)。其中化合物 **1** 和 **2** 为新化合物, 化合物 **5** 作为天然产物首次报道。活性测试结果显示, 所有化合物均有较强的抗乳腺癌活性, 新化合物 **1** 和 **2** 对三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的 IC₅₀ 分别为 0.230 $\pm$ 0.028、0.215 $\pm$ 0.064 μ mol/L。

关键词: 蟾蜍; 蟾毒内酯; 脂肪酸酯; 抗乳腺癌活性

中图分类号: R284; R915

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)8-1706-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.8.009

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.8.009

Two novel bufadienolides from the eggs of toad *Bufo gargarizans* and their anti-breast cancer activity

ZHANG Peng-wei^{1,2*}, WU Jia³, TIAN Hai-yan², HUANG Lu¹, LYU Jun-fang⁴

¹ The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou

510120, China; ² School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ³ Guangdong

Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangzhou University of Chinese

Medicine, Foshan 528200, China; ⁴ Institute of Chinese Medicine, the Chinese University of Hong Kong, HongKong 999077, China

Abstract: To investigate the chemical constituents in eggs of *Bufo gargarizans*, the dichloromethane extract was subjected to isolation and purification using various chromatographic techniques. Compound structures were elucidated through comprehensive methods such as NMR, MS, and UV spectroscopy, with *in vitro* anti-breast cancer cell MCF-7 and MDA-MB-231 activity evaluated *via* the MTT assay. Five compounds were isolated and identified as 3-(14-hydroxy-7Z-tetradecenoyl)-hellebrigenol (**1**), 3-(16-hydroxy-9Z-hexadecanoyl)-hellebrigenol (**2**), 3-(14-hydroxy-7Z-tetradecenoyl)-1 β -hydroxytelcinobufagin (**3**), 3-(14-hydroxy-tetradecanoyl)-hellebrigenol (**4**), and 3-oxo-arenobufagin (**5**). Compounds **1** and **2** are novel, while **5** is a newly reported natural product. The activity test results showed that all compounds exhibited significant anti-breast cancer activities. The IC₅₀ values of compounds **1** and **2** against the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 were 0.230 $\pm$ 0.028 and 0.215 $\pm$ 0.064 μ mol/L, respectively.

Key words: toad *Bufo gargarizans*; bufadienolides; fatty acid esters; anti-breast cancer activity

蟾蜍是重要的药用动物资源, 来源于蟾蜍的中

药蟾酥和蟾皮已被广泛应用于抗肿瘤、强心和镇痛等临床治疗, 现代研究证实其主要活性成分为蟾毒内酯类化合物 (bufadienolides)^[1,2]。蟾毒内酯是蟾蜍毒腺分泌的化学防御武器。目前研究表明, 中药蟾酥、蟾皮中蟾毒内酯类成分最为丰富。然而, 作为蟾蜍生命周期中重要的发育阶段, 蟾蜍卵的化学成

收稿日期: 2025-06-17 接受日期: 2025-10-21

基金项目: 广东省中医药局科研基金 (20241122, 20254048); 广东省中医院-香港中文大学协同创新项目 (YN2023QN14, YN2024HK14)

* 通信作者 Tel: 86-20-81887233; E-mail: pwzhang2020@gzucm.edu.cn

分研究相对薄弱^[3-5]。与成年蟾蜍相比,蟾蜍卵因缺乏运动能力而更需要依赖化学防御系统来抵御天敌,理论上应含有更丰富或更具活性的防御性成分^[6-8]。近年来,研究发现蟾蜍卵中蟾毒内酯具有独特的结构特征和显著的生物活性,表明蟾蜍卵可能是发现新型活性分子的重要资源库^[3-6]。

课题组前期研究发现蟾蜍卵中存在结构新颖的结合型蟾毒内酯^[3-5]。在此基础上,本文继续对中华大蟾蜍卵中蟾毒内酯类成分进行分离鉴定,并对其抗乳腺癌活性进行测试。本研究结果不仅丰富了蟾毒内酯类化合物的结构多样性,也为后续抗肿瘤新药研发提供了潜在的候选分子,同时为深入理解蟾蜍卵的化学防御机制提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蟾蜍卵采集自江苏东泰蟾蜍养殖基地,母体蟾蜍经暨南大学周光雄教授鉴定为中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*),标本保存于暨南大学药学院标本室(No. BBG-002)。

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231(批号:CRM-HTB-26)及 MCF-7(批号:CRM-HTB-22)源于美国标准生物制品收藏中心(ATCC)。其中,MDA-MB-231 是三阴性乳腺癌细胞系,MCF-7 是雌激素受体阳性的细胞系,二者是乳腺癌研究中常用的模式细胞。

1.2 试剂与仪器

柱层析用硅胶(200~300目,青岛海洋化工厂);硅胶 GF₂₅₄ 薄层预制板(烟台化学工业研究所);ODS C₁₈ 柱层析材料(德国 Merck 公司);石油醚、氯仿、甲醇和乙酸乙酯(分析纯,中国上海化学试剂厂);乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);氘代甲醇(纯度 99%,批号:56RNCQKX,上海安耐吉化学有限公司);多柔比星(纯度 98%,批号 D807083,广州质创生物科技有限公司);青霉素和链霉素双抗(批号:243581,美国 Gibco 公司);胎牛血清(批号:243581,广州依科赛生物科技有限公司);1640 细胞培养基(批号:C11875500,美国 Gibco 公司)。

(UV) V-550 型紫外可见光谱仪(日本 JASCO 公司);BRUKER AV-300 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);Agilent 6210 LC/MSD TOF 高分辨液相色谱质谱仪(美国 Agilent 公司);Varian Prostar 制备型高效液相色谱系统(美国 Dionex 公司);Cosmosil C₁₈ 制备柱(5 μm, 20 mm × 250 mm,美国 Phenomenex 公司);Spark 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

1.3 提取与分离

中华大蟾蜍卵 500 g,加入 500 mL 95% 乙醇超声提取 3 次,合并提取液,减压回收乙醇得总浸膏,加适量水混悬后,分别用石油醚、二氯甲烷萃取。得二氯甲烷部位(80 g),经硅胶柱层析(石油醚-乙酸乙酯)梯度洗脱,粗分为 6 个组分(Fr. 1~Fr. 6)。前 2 个组分主要含油脂,没有进一步分离。采用 ODS C₁₈ 硅胶柱,甲醇-水梯度洗脱对组分 Fr. 3~Fr. 5 进行分离,分别获得高蟾毒内酯组分 Fr. 3.5、Fr. 4.3、Fr. 5.3。Fr. 3.5 经制备 HPLC(65% 乙腈-水,7 mL/min)分离得到化合物 1(2.8 mg, *t_R* = 16 min)和 2(3.5 mg, *t_R* = 22 min)。Fr. 4.3 经制备 HPLC(68% 乙腈-水,流速:7 mL/min)分离得到化合物 3(3.6 mg, *t_R* = 13 min)。Fr. 5.3 经制备 HPLC(72% 乙腈-水,流速:7 mL/min)分离得到化合物 4(3.0 mg, *t_R* = 12 min)和 5(2.7 mg, *t_R* = 5 min)。

1.4 抗肿瘤活性测试

以 MDA-MB-231 及 MCF-7 为模型细胞株。细胞用含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(含 1% 双抗)在 37 °C 恒温、5% CO₂ 人工培养箱中培养。取大约 10 000 个对数生长期细胞,接种在 96 孔板中,每孔 200 μL 培养基,24 h 后加入不同浓度的化合物,阳性对照药物采用多柔比星(doxorubicin),继续培养 48 h,终止前除去上清液并加入 30 μL MTT/孔,培养箱孵育 4 h 后,每孔加入 100 μL DMSO,酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔的吸光度,并计算 IC₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 化合物的鉴定

化合物 1 无定形粉末;HR-ESI-MS: *m/z* 665.402 8 [M + Na]⁺(计算值 C₃₈H₅₈O₈Na⁺, 665.402 4),化学式为 C₃₈H₅₈O₈,不饱和度 10。吸收光谱显示其在约 298 nm 处有最大吸收。在¹H NMR 谱中可以观测到一组蟾毒内酯六元不饱和和内酯环的特征氢信号 δ_H 6.27(1H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.43(1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.99(1H, dd, *J* = 9.4, 2.4 Hz)。δ_H 5.35(2H, m)为一对烯氢质子信号,δ_H 5.11(1H, br s)为 C-3 位连氧次甲基的特征氢信号,δ_H 3.52(2H, t, *J* = 6.5 Hz)为连氧亚甲基信号,δ_H 4.23(1H, d, *J* = 11.4 Hz)和 δ_H 3.57(1H, d, *J* = 11.4 Hz)为一连氧亚甲基(-CH₂OH)上同碳化学不等价两质子,δ_H 1.30~1.35 之间应为脂肪酸的多个亚甲基氢信号,δ_H 0.70(3H, s)为 1 个角甲基信号。与典型蟾毒内酯(例如,蟾毒灵)相比,化合物 1 氢谱少了一组角甲基,

不饱和十四碳脂肪酸鉴定。在 HSQC 谱中 δ_{C} 63.0 (C14') 与 δ_{H} 3.52 (2H, t, $J = 6.5$ Hz) 有相关, ^1H - ^1H COSY 谱中可以观测到该质子 (δ_{H} 3.52) 与 δ_{H} 1.54 (H₂-13') 处质子耦合, H₂-13' 又与 δ_{H} 1.34 (H₂-12') 处质子耦合, 在 HMBC 谱中可以观测到 δ_{H} 1.34 (H₂-12') 与 δ_{C} 30.2 (C-11') 的远程相关, 证明分子中存在 -C^{11'}H₂C^{12'}H₂C^{13'}H₂C^{14'}H₂-OH 片段。另在 HMBC 谱中还可以观测到酯羰基 δ_{C} 175.0 (C1') 与 δ_{H} 2.34 (H₂-2') 的远程相关, 而 ^1H - ^1H COSY 谱中又可以观测到 H₂-2' 与 δ_{H} 1.62 (H₂-3') 耦合, H-3' 与 δ_{H} 1.34 (H₂-4') 相耦合, 这证明分子中 -C^{4'}H₂-C^{3'}H₂C^{2'}H₂-C^{1'}OO- 片段的存在。此外, 在 ^1H - ^1H COSY 谱中还观测到烯氢质子 δ_{H} 5.35 (2H, m) 分别与 δ_{H} 2.05 处亚甲基质子耦合, δ_{H} 2.05 处质子又与 δ_{H}

1.35 耦合, 结合 HMBC 谱中烯氢 δ_{H} 5.35 (2H, m) 分别与 δ_{C} 28.0, δ_{C} 28.1 (C6' 和 C9') 的远程相关, 推断分子中存在 -C^{9'}H₂-CH = CH-C^{6'}H₂- 对称片段, 且根据 C-6' 和 C-9' 的化学位移 (小于 30), 可以判断出双键的构型为顺式 (Z)^[9]。至此, 还剩下 δ_{C} 30.3、30.8 碳信号, 在 HSQC 中均与 δ_{H} 1.35 处氢相关, 归属为 2 个 -CH₂-(C-5' 和 C-10')。因此, 鉴定脂肪酸为 14-羟基-顺-7-十四碳烯酸 (14-hydroxy-7Z-tetradecenoic acid), 数据与我们之前报道一致^[3,4]。最终, 化合物 **1** 鉴定为嚏根草醇-3-14-羟基-顺-7-十四碳酸酯 [3-(14-hydroxy-7Z-tetradecenoyl)-hellebrigenol], 经检索该化合物为新化合物, 数据归属见表 1。化合物 **1** 和 **2** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 (www.trew.ac.cn)。

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据 (300 和 75 MHz, CD₃OD)
Table 1 ^1H NMR and ^{13}C NMR data of compounds **1** and **2** (300 and 75 MHz, CD₃OD)

No.	1		2	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1 α	2.32 (1H, m)	20.6	2.32 (1H, m)	20.7
β	1.39 (1H, m)		1.39 (1H, m)	
2 α	2.03 (1H, m)	28.3	2.03 (1H, m)	28.1
β	1.75 (1H, m)		1.75 (1H, m)	
3	5.11 (1H, br s)	71.5	5.11 (1H, br s)	71.5
4 α	2.30 (1H, m)	37.3	2.32 (1H, m)	37.3
β	1.92 (1H, m)		1.92 (1H, m)	
5	—	76.2	—	76.2
6 α	2.34 (1H, m)	36.6	2.34 (1H, m)	36.6
β	1.53 (1H, m)		1.53 (1H, m)	
7 α	1.30 (1H, m)	25.4	1.30 (1H, m)	25.5
β	2.00 (1H, m)		2.00 (1H, m)	
8	1.70 (1H, m)	41.7	1.70 (1H, m)	41.7
9	1.60 (1H, m)	39.8	1.60 (1H, m)	39.8
10	—	43.4	—	43.4
11 α	1.49 (1H, m)	22.6	1.49 (1H, m)	22.6
β	1.33 (1H, m)		1.33 (1H, m)	
12 α	1.57 (1H, m)	41.9	1.57 (1H, m)	41.9
β	1.42 (1H, m)		1.42 (1H, m)	
13	—	49.6	—	49.5
14	—	86.1	—	86.1
15 α	2.10 (1H, m)	32.9	2.10 (1H, m)	32.9
β	1.70 (1H, m)		1.70 (1H, m)	
16 α	2.20 (1H, m)	29.7	2.20 (1H, m)	29.7
β	1.72 (1H, m)		1.72 (1H, m)	

续表 1 (Continued Tab. 1)

No.	1		2	
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
17	2.56 (1H, dd, 9.6, 6.0)	52.1	2.56 (1H, dd, 9.6, 6.0)	52.1
18	0.70 (3H, s)	17.2	0.70 (3H, s)	17.2
19	4.23 (1H, d, 11.4)	65.4	4.23 (1H, d, 11.4)	65.4
20	3.57 (1H, d, 11.4)	—	3.57 (1H, d, 11.4)	124.9
21	—	125.0	—	124.9
22	7.43 (1H, d, 2.4)	150.5	7.43 (1H, d, 2.4)	150.5
23	7.99 (1H, dd, 9.4, 2.4)	149.3	7.98 (1H, dd, 9.4, 2.4)	149.3
24	6.27 (1H, d, 9.4)	115.4	6.28 (1H, d, 9.4)	115.5
25	—	164.8	—	164.8
1'	—	175.0	—	175.0
2'	2.34 (2H, t, 7.2)	35.6	2.33 (2H, t, 7.2)	35.6
3'	1.62 (2H, m)	26.0	1.62 (2H, m)	26.6
4'	1.34 (2H, m)	29.7 ^a	1.34 (2H, m)	29.7 ^a
5'	1.35 (2H, m)	30.8 ^a	1.34 (2H, m)	30.2 ^a
6'	2.05 (2H, m)	28.0	1.34 (2H, m)	30.3 ^a
7'	5.35 (1H, m)	131.1	1.35 (2H, m)	30.9 ^a
8'	5.35 (1H, m)	130.6	2.03 (2H, m)	28.1
9'	2.05 (2H, m)	28.1	5.35 (1H, m)	130.9
10'	1.35 (2H, m)	30.3 ^a	5.35 (1H, m)	130.8
11'	1.34 (2H, m)	30.2 ^a	2.03 (2H, m)	28.1
12'	1.34 (2H, m)	27.1	1.35 (2H, m)	30.8 ^a
13'	1.54 (2H, m)	33.7	1.33 (2H, m)	30.2 ^a
14'	3.52 (2H, t, 6.5)	63.0	1.35 (2H, m)	26.9
15'	—	—	1.52 (2H, m)	33.7
16'	—	—	3.53 (2H, t, 6.5)	63.0

注:^a 峰归属可在同列中互换
Note:^a Assignments maybe interchanged in each column.

化合物 2 无定形粉末;HR-ESI-MS;*m/z* 693.433 9 [M + Na]⁺ (计算值 C₄₀H₆₂O₈Na⁺, 693.433 7), 化学式为 C₄₀H₆₂O₈, 不饱和度 10。吸收光谱显示在 299 nm 有最大吸收, 推测该化合物亦为蟾毒内酯与脂肪酸成酯。在化合物 **2** 的氢谱中可以观测到蟾毒内酯不饱和和内酯环上的特征氢信号 δ_{H} 6.28 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.98 (1H, dd, *J* = 9.4, 2.4 Hz); δ_{H} 5.35 处是一对不饱和氢的信号, δ_{H} 5.11 (1H, br s) 为 C-3 位的连氧次甲基氢信号, δ_{H} 3.53 (2H, t, *J* = 6.5 Hz) 为脂肪酸侧链末端连氧亚甲基氢信号, δ_{H} 4.23 (1H, d, *J* = 11.4 Hz) 和 δ_{H} 3.57 (1H, d, *J* = 11.4 Hz) 为同碳化学不等价质子, δ_{H} 1.30 ~ 1.35 之间为脂肪酸的亚甲基氢信号, δ_{H} 0.70 (3H, s) 为 1 个角甲基信号。与典型蟾毒内酯相比, 化合物 **2** 也少了一组角甲基, 且 C-3 位氢化学位移向低场, 表明该位置羟基酯化。

分析¹³C NMR 和 DEPT-135 谱发现化合物 **2** 含有 40 个碳原子, 比化合物 **1** 多 2 个亚甲基, 与高分辨质谱数据一致。除不饱和和内酯环碳信号 (δ_{C} 124.9、150.5、149.3、115.5、164.8) 外, 还存在 2 个连氧季碳 (δ_{C} 76.2、86.1), 1 个连氧次甲基 (δ_{C} 71.5), 2 个连氧亚甲基 (δ_{C} 65.4、63.0), 1 个角甲基 (δ_{C} 17.2), 1 个酯羰基碳 (δ_{C} 175.0), 2 个烯碳 (δ_{C} 130.9、130.8)。在 HSQC 中可以观测到 δ_{H} 5.11 与 δ_{C} 71.5 相关, δ_{H} 4.23 (1H, d, *J* = 11.4 Hz) 及 δ_{H} 3.57 (1H, d, *J* = 11.4 Hz) 与 δ_{C} 65.4 相关的信号, δ_{H} 0.70 (H₃-18) 与 δ_{C} 17.2 相关, 并且在 HMBC 中可以观测到 δ_{H} 0.70 (H₃-18) 与 C-17 (δ_{C} 52.1) 和 C-14 (δ_{C} 86.1) 相关。根据以上信息, 并通过与化合物 **1** 及 hellebrigenol 图谱对比, 推断化合物 **2** 的母核亦为 hellebrigenol, 且其酯化也发生在 C-3 位置。结合¹³C NMR 和高分辨数据发现, 在 δ_{C} 26 ~ 36 之间化合物

2 多了2个CH₂信号,推断化合物**2**的侧链脂肪酸部分含16个碳原子,1个双键(-CH=CH-)及1个末端羟基(-CH₂OH)。进一步,在HSQC中可以观测到 δ_{H} 5.35(2H,m)与烯碳(δ_{C} 130.9,130.8)的相关; δ_{H} 3.53(-CH₂OH)与 δ_{C} 63.0相关,归属为-C^{16'}H₂OH。在¹H-¹H COSY谱中可以观测到H-16'(δ_{H} 3.53)与 δ_{H} 1.52(H-15')处2个质子偶合,H-15'又与 δ_{H} 1.35(H-14')处2个质子偶合,这证明分子中存在-C^{14'}H₂C^{15'}H₂C^{16'}H₂-OH片段。在HMBC谱中可以观测到酯羰基 δ_{C} 175.0(C1')与 δ_{H} 2.33(H-2')的远程相关,在¹H-¹H COSY谱中又可以观测到H-2'与 δ_{H} 1.62(H-3')偶合,H-3'与 δ_{H} 1.33(H-4')相偶合,这证明分子中-C^{4'}H₂C^{3'}H₂C^{2'}H₂-C^{1'}OO-片段的存在。在¹H-¹H COSY谱中还可观测到一对烯氢质子 δ_{H} 5.35(2H,m)与 δ_{H} 2.03处亚甲基质子偶合, δ_{H} 2.03处亚甲基质子又与 δ_{H} 1.35处质子偶合;结合HMBC谱中 δ_{H} 5.35(2H,m)分别与 δ_{C} 28.1、28.1、30.8、30.9的远程相关,推断分子中存在-CH₂-CH₂-CH=CH-CH₂-CH₂-对称片段。在HSQC图谱中剩下3个碳信号均与 δ_{H} 1.34相关,归属为3个-CH₂-。以上数据与之前报道的16-hydroxy-9Z-hexadecenoic acid一致^[4]。另外,在化合物**2**的NOESY谱图中,观察到H-4 α (δ_{H} 2.30)与H-7 α (δ_{H} 1.30)及H-9(δ_{H} 1.60)之间,H-8 β (δ_{H} 1.70)与H₃-18(δ_{H} 0.70)及H-19(δ_{H} 4.32)之间,以及H₃-18(δ_{H} 0.70)与H-21(δ_{H} 7.43)之间存在相关,这些NOE相关表明该化合物A/B顺式、B/C反式及C/D顺式的环连接构型,内酯环为 β 构型(见图2)。根据H-3呈现出宽单峰信号,表明H-3为 α 构型。最终,化合物**2**鉴定为噻根草醇-3-16-羟基-顺-9-十六碳酸酯[3-(16-hydroxy-9Z-hexadecanoyl)-hellebrigenol],经检索该化合物为新化合物,数据归属见表1。

化合物 3 无定形粉末;HR-ESI-MS: m/z 665.401 6 [M + Na]⁺(计算值 C₃₈H₅₈O₈Na⁺, 665.402 4),化学式 C₃₈H₅₈O₈,不饱和度10。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 8.02(1H, dd, J = 9.4, 2.4 Hz, H-22), 7.44(1H, d, J = 2.4 Hz, H-21), 6.28(1H, d, J = 9.4 Hz, H-23), 5.37(2H, m, H-7'/8'), 5.23(1H, br s, H-3), 3.56(1H, t, J = 6.5 Hz, H-14'), 2.57(1H, dd, J = 9.6, 6.0 Hz, H-17), 2.31(2H, d, J = 7.2 Hz, H-2'), 2.05(2H, m, H-6'), 2.05(2H, m, H-9'), 1.77(1H, m, H-8), 1.74(1H, m, H-9), 1.22

(3H, s, H-19), 0.74(3H, s, H-18); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 74.0(C-1), 32.0(C-2), 70.8(C-3), 36.6(C-4), 70.4(C-5), 36.0(C-6), 24.8(C-7), 42.0(C-8), 42.0(C-9), 43.9(C-10), 22.7(C-11), 41.5(C-12), 49.7(C-13), 85.7(C-14), 33.1(C-15), 29.8(C-16), 52.1(C-17), 17.2(C-18), 13.2(C-19), 124.9(C-20), 150.5(C-21), 149.3(C-22), 115.5(C-23), 164.8(C-24), 175.0(C-1'), 35.8(C-2'), 25.9(C-3'), 29.8(C-4'), 30.2(C-5'), 28.1(C-6'), 131.0(C-7'), 130.7(C-8'), 28.1(C-9'), 30.8(C-10'), 30.5(C-11'), 26.8(C-12'), 33.7(C-13'), 63.0(C-14')。以上数据与文献报道一致^[3,4],故化合物**3**鉴定为[3-(14-hydroxy-7Z-tetradecenoyl)-1 β -hydroxytelecinobufagin]。

化合物 4 无定形粉末;HR-ESI-MS: m/z 667.418 3 [M + Na]⁺(计算值: C₃₈H₆₀O₈Na⁺, 667.418 0),分子式 C₃₈H₆₀O₈,不饱和度9。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.99(1H, dd, J = 9.4, 2.4 Hz, H-22), 7.42(1H, d, J = 2.4 Hz, H-21), 6.28(1H, d, J = 9.4 Hz, H-23), 5.13(1H, br s, H-3), 4.23(1H, d, J = 11.4 Hz, H-19), 3.90(1H, s, H-1), 3.57(1H, d, J = 11.4 Hz, H-19), 3.56(1H, t, J = 6.5 Hz, H-14'), 2.56(1H, dd, J = 9.6, 6.5 Hz, H-17), 2.31(2H, d, J = 7.2 Hz, H-2'), 1.74(1H, m, H-8), 1.69(1H, m, H-9), 1.62(2H, m, H-3'), 1.54(2H, m, H-13'), 0.72(3H, s, H-18); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 20.7(C-1), 28.1(C-2), 71.5(C-3), 37.3(C-4), 76.2(C-5), 36.6(C-6), 25.2(C-7), 41.7(C-8), 39.8(C-9), 43.4(C-10), 22.6(C-11), 41.9(C-12), 49.6(C-13), 86.1(C-14), 32.9(C-15), 29.7(C-16), 52.1(C-17), 17.2(C-18), 65.9(C-19), 124.9(C-20), 150.5(C-21), 149.3(C-22), 115.4(C-23), 164.7(C-24), 174.8(C-1'), 35.5(C-2'), 26.0(C-3'), 30.2(C-4'), 30.4(C-5'), 30.6(C-6'), 30.6(C-7'), 30.7(C-8'), 30.8(C-9'), 30.8(C-10'), 30.8(C-11'), 27.0(C-12'), 33.7(C-13'), 63.0(C-14')。以上数据与文献报道一致^[3,4],故化合物**4**鉴定为噻根草醇-3-14-羟基-十四碳酸酯[3-(14-hydroxy-tetradecanoyl)-hellebrigenol]。

化合物 5 无定形粉末;HR-ESI-MS: m/z 415.210 9 [M + H]⁺(计算值 C₂₄H₃₁O₆⁺, 415.211 5),化学式 C₂₄H₃₀O₆,不饱和度10。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.93(1H, dd, J = 9.7, 2.6 Hz, H-

22), 7.52 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-21), 6.23 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-23), 4.43 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-11), 4.12 (1H, dd, $J = 9.6, 7.4$ Hz, H-17), 2.12 (1H, d, $J = 12.0$, H-8), 1.24 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 33.2 (C-1), 40.4 (C-2), 216.5 (C-3), 43.2 (C-4), 47.2 (C-5), 38.7 (C-6), 22.3 (C-7), 42.0 (C-8), 40.6 (C-9), 37.8 (C-10), 74.6 (C-11), 214.5 (C-12), 63.8 (C-13), 86.0 (C-14), 27.7 (C-15), 29.1 (C-16), 42.0 (C-17), 18.0 (C-18), 22.7 (C-19), 123.1 (C-20), 151.6 (C-21), 149.1 (C-22), 115.9 (C-23), 164.5 (C-24)。以上数据与文献报道 3-氧代沙蟾蜍精 (3-oxo-arenobufagin) 一致^[10], 该化合物曾被 Zhang 等^[10]以沙蟾蜍精为底物由真菌 *Alternaria alternate* 生物转化获得, 本研究首次报道蟾蜍卵中存在该天然产物。

2.2 抗肿瘤活性测试

利用 MTT 法对分离得到的化合物进行抗乳腺癌细胞增殖活性测试, 结果如表 2 所示。化合物 1~5 对 2 株乳腺癌细胞均表现出很强抑制活性, 且化合物 3 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 的细胞毒作用表现出一定选择性, IC_{50} 分别为 0.315 ± 0.156 和 $2.685 \pm 0.260 \mu\text{mol/L}$ 。

表 2 化合物 1~5 对乳腺癌细胞的增殖抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Antiproliferative effects of compounds 1-5 on breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物 Compound	$\text{IC}_{50} (\mu\text{mol/L})$	
	MCF-7	MDA-MB-231
1	0.039 ± 0.006	0.230 ± 0.028
2	0.314 ± 0.013	0.215 ± 0.064
3	0.315 ± 0.156	2.685 ± 0.260
4	0.130 ± 0.060	0.270 ± 0.001
5	0.026 ± 0.023	0.250 ± 0.042
多柔比星 Doxorubicin	6.070 ± 1.201	4.310 ± 1.010

3 结论

本研究从蟾蜍卵中分离得到 5 个蟾毒内酯类化合物, 其中化合物 1 和 2 为新化合物, 化合物 3 和 4 为已知化合物, 化合物 5 作为天然产物首次报道。化合物 1~4 的 C-3 位羟基均与脂肪酸成酯, 且脂肪酸结构有一定的特异性, 末端均含有羟基, 有的还存在双键, 这类蟾毒内酯成分是卵中特有的, 尚未在蟾

蜍其他部位发现。各化合物均显示了较强的抗乳腺癌细胞增殖活性, 化合物 3 对三阴性乳腺癌细胞系还有一定选择性。本研究进一步丰富了蟾毒内酯类化合物的结构类型, 为蟾毒内酯构效关系的探讨提供了基础。同时, 本研究也表明蟾蜍其他部位也可能存在新型结构的蟾毒内酯天然产物, 值得进一步研究。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00357>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Zhang PW, Jiang RW, Ye WC, et al. Bufadienolides from venom of *Bufo bufo gargarizans* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 841-845.
- 2 Meng LJ, Kong QH, Jiang N, et al. Chemical constituents from the skins of *Bufo bufo gargarizans* and their cytotoxic activities [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2023, 45: 3622-3626.
- 3 Zhang PW, Tian HY, Nie QL, et al. Structures and inhibitory activity against breast cancer cells of new bufadienolides from the eggs of toad *Bufo bufo gargarizans* [J]. RSC Adv, 2016; 6: 93832.
- 4 Chen Z, Yu Q, Chen J, et al. Bufadienolide-fatty acid conjugates from the fertilized eggs of toad *Bufo gargarizans*: isolation, characterization, toxicity, and antiproliferative evaluation [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72: 17377-17391.
- 5 Zhou S, Quan J, Li Z, et al. Bufadienolides from the eggs of the toad *Bufo bufo gargarizans* and their antimelanoma activities [J]. J Nat Prod, 2021, 84: 1425-1433.
- 6 Rodriguez C, Ibáñez R, Olmedo DA, et al. Anti-trypanosomal bufadienolides from the oocytes of the toad *Rhinella alata* (Anura, Bufonidae) [J]. Molecules, 2024, 29: 196.
- 7 üveges B, Szederkényi M, Mahr K, et al. Chemical defense of toad tadpoles under risk by four predator species [J]. Ecol Evol, 2019, 9: 6287-6299.
- 8 Gambassi F, Lanzi C, Ricci Z, et al. Life-threatening pediatric poisoning due to ingestion of *Bufo bufo* toad eggs: A case report [J]. Toxicon, 2022, 217: 13-16.
- 9 Baranovskii AV, Litvinovskaya RP, Aver'kova MA, et al. NMR spectra of androstane analogs of brassinosteroids [J]. J Appl Spectrosc, 2007, 74: 642-650.
- 10 Zhang X, Ye M, Dong YH, et al. Biotransformation of arenobufagin and cinobufotalin by *Alternaria alternata* [J]. Biocatal Biotransfor, 2011, 29: 96-101.