

千根草化学成分研究 II

雷翔, 盛亚丽, 王红刚*

广东药科大学, 广州 510006

摘要: 本实验的目的是为了研究千根草全草的化学成分及其细胞毒活性。采用多种柱色谱技术对其进行分离纯化, 从千根草中分离得到 7 个化合物, 经 NMR 和 HR-ESI-MS 鉴定它们的结构为开环异落叶松树脂酚(1)、二氢去氢二愈创木基醇(2)、3-[2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl] propyl acetate(3)、3,3'-bis(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran)(4)、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷(5)、butylbrevifolin carboxylate(6)和芹菜素(7)。化合物 1~6 为首次从该植物中分离得到。采用 MTT 法检测不同浓度的药物(化合物 1~4 和 6)对 Huh7.5 和 A549 细胞活力的影响。当药物浓度为 40 μMol/L 时, 化合物 6 能明显地抑制这两株细胞的增殖。

关键词: 千根草; 化学成分; 木脂素; 黄酮

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.11.010

Chemical Constituents of Whole Plant of *Euphorbia thymifolia* II

LEI Xiang, SHENG Ya-li, WANG Hong-gang*

Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the chemical constituents of the whole plant of *Euphorbia thymifolia* L. and to investigate the cytotoxic activities of the isolated compounds. The constituents were isolated and purified from *E. thymifolia* by various column chromatography. Their structures were elucidated by NMR and HR-ESI-MS and identified as secoisolariciresinol (1), dihydrodehydrodiconiferyl alcohol (2), 3-[2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl] propyl acetate (3), 3,3'-bis(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran) (4), apigenin-7-O-β-D-glucopyranside (5), butylbrevifolin carboxylate (6) and apigenin (7). Compounds 1-6 were isolated from this plant for the first time. MTT assays were performed to detect the viability of Huh7.5 and A549 cells by different concentrations of drugs (compounds 1-4 and 6). When the concentration of the drugs was 40 μMol/L, compound 6 significantly reduced the proliferation of two cells.

Key words: *Euphorbia thymifolia* L.; chemical constituents; lignans; flavonoid

千根草又名小飞扬草, 为大戟科大戟属植物千根草 *Euphorbia thymifolia* L. 的全草, 千根草主要收录在广东、广西等的一些地方志或者地方中药手册中^[1]。其味微酸、涩, 性微凉, 具有清热利湿、消肿解毒, 收敛止痒等功效, 内服治疟疾、泄泻、乳痈、痔疮, 外用治湿疹、飞扬疮、天疱疮、烂头胎毒、过敏性皮炎、皮肤瘙痒等症^[1]。为了考察其抑菌活性成分, 本课题组在前期研究中对千根草 70% 乙醇总提取物及其乙酸乙酯、石油醚和正丁醇萃取部位的抑菌活性进行了研究, 发现其抑菌活性大小顺序依次为

乙酸乙酯、石油醚、正丁醇^[2], 并从千根草全草的乙酸乙酯部位中分离得到 13 个化合物^[3]。在此基础上, 本课题组对千根草全草的乙酸乙酯部位和正丁醇部位进行进一步研究, 从中分离得到 7 个化合物, 并选取其中 5 个非黄酮类化合物(化合物 1~4 和 6)对肝癌细胞 Huh7.5 和肺癌细胞 A549 进行活性筛选。

1 材料与方法

1.1 仪器

Bruker AV-500 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司), UPLC-QTOF 6500(美国安捷伦科技公司), LC-6AD 半制备液相色谱仪(岛津企业管理有限公司), COSMOSIL PACKED COLUMN 5PYE(10L. D. x 250

mm, Nacalai Tesque 公司)。酶标仪和 CO₂ 培养箱 (Thermo 公司)

1.2 试剂

Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司), MCI GELCHP20P (三菱化学公司), ODS (日本 YMC 公司产品), 聚酰胺 (浙江台州市路桥四甲生化塑料厂产品), 柱层析色谱和薄层色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂产品; 色谱纯甲醇 (山东禹王公司产品), 所有分析试剂均为天津大茂公司产品。

千根草于 2015 年 9 月购于清平市场, 经本实验室刘基柱副教授鉴定为大戟科大戟属千根草 *Euphorbia thymifolia* L. 全草, 标本保存于广东药科大学中药学院。

1.3 细胞株

肝癌细胞 Huh7.5 和肺癌细胞 A549 (ATCC 公司)。

1.4 提取与分离

提取方法见文献^[3]。取 23.0 g 乙酸乙酯部位浸膏经 MCI 柱色谱, 水-甲醇 (80:20→0:100) 梯度洗脱, 得到九个流分 Fr. A~I。Fr. F (4.0 g) 经 Sephadex LH-20 (甲醇) 得到 Fr. F1~F4, 将 Fr. F2 (1.10 g) 依次经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇系统, 50:1→8:2) 和 ODS 柱色谱 (水-甲醇系统, 40:60→0:100) 洗脱, 再经制备型 HPLC 得到化合物 **1** (2.0 mg, $t_R = 13.0$ min) 和化合物 **2** (3.8 mg, $t_R = 15.5$ min), 化合物 **1**~**2** 的液相条件: 水-甲醇, 0~5 min, 60% 甲醇; 5~35 min, 60%~100% 甲醇; 35~40 min, 100% 甲醇; 流速: 3 mL/min; 检测波长: 202 nm)。Fr. H (2.28 g) 经 Sephadex LH-20 (甲醇) 得到 Fr. H1~6, Fr. H2 (340 mg) 经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇系统, 100:1→9:1) 得到七个流分 Fr. H2-1~Fr. H2-7, Fr. H2-1 (40.0 mg) 经硅胶柱色谱 (石油醚-乙酸乙酯系统, 9:1→3:2) 洗脱, 再经制备型 HPLC 得到化合物 **3** (1.4 mg, $t_R = 12.9$ min) 和化合物 **4** (1.4 mg, $t_R = 9.7$ min), 化合物 **3**~**4** 的液相条件: 水-甲醇, 0~5 min, 80% 甲醇; 5~35 min, 80%~100% 甲醇; 35~40 min, 100% 甲醇; 流速: 3 mL/min; 检测波长: 202 nm)。

将正丁醇部位 (426.2 g) 上样于 D101 大孔树脂, 乙醇-水 (10:90→100:0) 进行梯度洗脱。合并、浓缩乙醇-水 70:30 的洗脱流分, 经硅胶柱色谱、MCI 层析柱色谱、聚酰胺层析柱色谱、重结晶得到化合物 **5** (2.2 mg)、化合物 **6** (11.0 mg)。合并、浓缩

乙醇-水 55:45 的洗脱流分, 经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、重结晶分离纯化得到化合物 **7** (3.1 mg)。

1.5 细胞毒性试验 (MTT 法)

检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓩 (Formazan) 并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲基亚砜 (DMSO) 能溶解细胞中的甲瓩, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值, 在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。根据测得的吸光度值 (OD 值), 来判断活细胞数量, OD 值越大, 细胞活性越强 (如果是测药物毒性, 则表示药物毒性越小)。

实验步骤: 1、肝癌 Huh7.5 和肺癌 A549 细胞在长到约 80%~90%, 消化离心收集后, 将上清液去掉, 加入 3 mL 培养基使其混匀。检测细胞密度后, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL。2、将细胞悬液制备好后, 轻轻混匀, 每孔加入 100 μ L, 这样待测细胞的密度为 1×10^5 个/mL (边缘孔用无菌 PBS 填充)。3、将接种好的细胞培养板放入培养箱中培养, 至细胞单层铺满孔底 (96 孔平底板), 分别加入浓度梯度的药物 (化合物 **1**~**4** 和化合物 **6**)。4、5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 倒置显微镜下观察药物的作用效果。5、每孔加入 10 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h。6、终止培养, DMSO 溶解结晶。每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 **1** 无定形粉末; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.81 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5', 5''), 6.63 (2H, dd, $J = 1.9, 8.0$ Hz, H-6', 6''), 6.58 (2H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2', 2''), 3.82 (6H, s, OMe), 3.83 (2H, m, H-1a, 4a), 3.56 (2H, dd, $J = 4.7, 11.3$ Hz, H-1b, 4b), 2.63~2.77 (4H, m, H-5a, 5b, 6a, 6b), 1.86 (2H, brs, H-2, 3); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 146.6 (C-3', 3''), 144.0 (C-4', 4''), 132.6 (C-1', 1''), 121.8 (C-6', 6''), 114.2 (C-5', 5''), 111.5 (C-2', 2''), 61.1 (C-1, 4), 56.0 (OMe), 44.0 (C-2, 3), 36.1 (C-5, 6); HR-ESI-MS m/z : 361.1661 [M-H]⁻ (calcd for C₂₀H₂₅O₆,

361.1657)。以上数据与文献报道^[4]基本一致,故鉴定化合物 **1** 为开环异落叶松树脂酚。

化合物 2 无定形粉末;¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.89 (2H, m, H-8), 2.67 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, H-7), 3.61 (1H, m, H-8'), 3.70 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-9), 3.86 (3H, s, 3-OCH₃), 3.88 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.93 (2H, m, H-9'), 5.54 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-7'), 6.67 (1H, s, H-6), 6.68 (1H, s, H-2), 6.87 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.91 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, H-6'), 6.94 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 133.3 (C-1), 112.6 (C-2), 144.4 (C-3), 146.7 (C-4), 127.9 (C-5), 116.1 (C-6), 32.2 (C-7), 34.8 (C-8), 62.5 (C-9), 56.1 (3-OCH₃), 135.6 (C-1'), 109.0 (C-2'), 146.8 (C-3'), 145.8 (C-4'), 114.4 (C-5'), 119.6 (C-6'), 88.0 (C-7'), 54.0 (C-8'), 64.1 (C-9'), 56.2 (3'-OCH₃); HR-ESI-MS *m/z*: 359.1495 [M-H]⁻ (calcd for C₂₀H₂₃O₆, 359.1500)。以上数据与文献报道^[5]基本一致,故鉴定化合物 **2** 为二氢去氢二愈创木基醇。

化合物 3 无定形态粉末;¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.95 (2H, m, H-9), 2.06 (3H, s, H-12), 2.65 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-8), 3.60 (1H, m, H-3), 3.87 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.88 (3H, s, 7-OCH₃), 3.89 (1H, m, H-13), 3.98 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.8 Hz, H-13), 4.10 (2H, m, H-10), 5.54 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-2), 6.65 (1H, brs, H-4), 6.65 (1H, brs, H-6), 6.88 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.91 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, H-6'), 6.94 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 88.0 (C-1), 54.0 (C-3), 128.0 (C-3a), 116.2 (C-4), 134.8 (C-5), 112.6 (C-6), 144.4 (C-7), 146.9 (C-7a), 32.2 (C-8), 30.7 (C-9), 63.9 (C-10), 171.4 (C-11), 21.2 (C-12), 64.0 (C-13), 133.2 (C-1'), 109.0 (C-2'), 146.8 (C-3'), 145.8 (C-4'), 114.4 (C-5'), 119.6 (C-6'), 56.0 (7-OCH₃), 56.0 (3'-OCH₃); HR-ESI-MS *m/z*: 401.1604 [M-H]⁻ (calcd for C₂₂H₂₅O₇, 401.1606)。以上数据与文献报道^[6]基本一致,故鉴定化合物 **3** 为 3-[2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofura-5-yl]propyl acetate。

化合物 4 无定形粉末;¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.10 (2H, m, H-3, 3'), 3.88 (2H, dd, *J* =

9.3, 3.7 Hz, H-2e, 2'e), 3.91 (6H, s, OMe), 4.25 (2H, dd, *J* = 9.1, 6.9 Hz, H-2a, 2'a), 4.74 (2H, d, *J* = 4.4 Hz, H-4, 4'), 6.82 (2H, dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, H-7, 7'), 6.90 (2H, d, *J* = 1.8 Hz, H-5, 5'), 6.89 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8, 8'); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 71.8 (C-2, 2'), 54.3 (C-3, 3'), 86.0 (C-4, 4'), 114.4 (C-5, 5'), 146.9 (C-6, 6'), 119.1 (C-7, 7'), 108.7 (C-8, 8'), 145.4 (C-9, 9'), 133.1 (C-10, 10'), 56.1 (-OCH₃); HR-ESI-MS *m/z*: 357.1353 [M-H]⁻ (calcd for C₂₀H₂₁O₆, 357.1344)。以上数据与文献报道^[7]基本一致,故鉴定化合物 **4** 为 3,3'-bis(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran)。

化合物 5 淡黄色粉末;¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.97 (1H, s, 5-OH), 10.41 (1H, s, 4'-OH), 7.96 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.87 (1H, s, H-3), 6.83 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.44 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 5.08 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1'), 5.40 ~ 4.60 (4H, m, Glc-OH), 3.73 ~ 3.15 (6H, m, Glc-H); HR-ESI-MS *m/z*: 431.1007 [M-H]⁻ (calcd for C₂₁H₁₉O₁₀, 431.0984)。以上数据与文献报道^[8,9]基本一致,故鉴定化合物 **5** 为芹菜素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷。

化合物 6 黄色粉末;¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.30 (1H, s, H-7), 4.41 (1H, dd, *J* = 2.0, 7.8 Hz, H-8), 4.07 (1H, dt, *J* = 6.7, 10.8 Hz, H-1a'), 3.97 (1H, dt, *J* = 6.6, 10.8 Hz, H-1b'), 3.00 (1H, dd, *J* = 7.8, 18.7 Hz, H-9a), 2.43 (1H, dd, *J* = 2.0, 18.7 Hz, H-9b), 1.52 (2H, m, H-2'), 1.22 (2H, m, H-3'), 0.82 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-4'); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.02 (C-10), 171.95 (C-11), 160.16 (C-1), 149.61 (C-5), 145.74 (C-2), 143.69 (C-4), 140.30 (C-6), 138.56 (C-3), 115.03 (C-3a), 112.96 (C-7a), 108.05 (C-7), 64.29 (C-1'), 40.82 (C-8), 37.10 (C-2'), 29.91 (C-9), 18.54 (C-3'), 13.52 (C-4'); HR-ESI-MS *m/z*: 347.0788 [M-H]⁻ (calcd for C₁₇H₁₅O₈, 347.0772)。以上数据与文献报道^[10]基本一致,故鉴定化合物 **6** 为 butylbrevifolin carboxylate。

化合物 7 淡黄色粉末;¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ: 7.85 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.59 (1H, s, H-

3), 6.45 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (126 MHz, Methanol- d_4) δ : 183.9 (C-4), 166.3 (C-2), 166.2 (C-7), 163.2 (C-5), 162.8 (C-4'), 159.5 (C-9), 129.4 (C-2', 6'), 123.3 (C-1'), 117.0 (C-3', 5'), 105.3 (C-10), 103.8 (C-3), 100.2 (C-6), 95.1 (C-8)。以上数据与文献报道^[11]基本一致,故鉴定化合物**7**为芹菜素。

2.2 MTT 法检测 5 种药物 (化合物 1~4 和化合物 6) 对两种癌细胞增殖的抑制

当药物浓度为 40 $\mu\text{Mol/L}$ 时,化合物**1**、**2**、**3**和**4**在肝癌 Huh7.5 和肺癌 A549 两株细胞中,均未显示出明显的细胞毒性效果;仅化合物**6**(butylbrevifolin carboxylate)在两株细胞中均显示出明显的细胞毒性效果,细胞存活率分别为 79.1% 和 67.3%,且随着药物浓度的增加,抑制作用越强。结果表明 butylbrevifolin carboxylate 在体外实验对肝癌 Huh7.5 和肺癌 A549 细胞的增殖有抑制作用。

参考文献

- 1 Ministry of Health of Logistics Department of Guangzhou Army (广州部队后勤部卫生部). Chinese Herbal Medicine Handbook (常用中草药手册). Beijing: People's Medical Publishing House, 1969. 157-242
- 2 Wang HG (王红刚), Pan QT (潘秋婷), Liang ST (梁斯婷), et al. Studies on the antibacterial effect of extracts from *Euphorbia thymifolia* in vitro. *Strait Pharm J* (海峡药学),

2014, 26: 147-149.

- 3 Wang HG (王红刚), Huang QL (黄巧玲), Sheng YL (盛亚丽), et al. Chemical constituents of whole plant of *Euphorbia thymifolia*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45: 2766-2769.
- 4 Ward RS, Hughes DD. Oxidative cyclisation of 3, 4-dibenzyltetrahydrofurans using ruthenium tetra (trifluoroacetate). *Cheminform*, 2001, 32: 2057-2064.
- 5 Yoshiyasu F, Mai N, Hiroyuki M, et al. Two new benzofuran-type lignans from the wood of *Viburnum awabuki*. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44: 1418-1420.
- 6 Chen JX, Huang SH, Wang L, et al. Two pairs of enantiomeric neolignans from *Lobelia chinensis*. *Nat Prod Commun*, 2010, 10: 1627-1630.
- 7 Saleem R, Faizi S, Deeba F, et al. A new bisbenzopyran from *Aloe barbadensis* roots. *Planta Med*, 1997, 63: 454-456.
- 8 Ma YM, Zhang ZW, Feng CL. Flavonoids of *Broussonetia papyrifera*. *Chem Nat Compd*, 2009, 45: 881-882.
- 9 Itokawa H, Suto K, Takeya K. Studies on a novel *P*-coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from *Patchouli*. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29: 254-256.
- 10 Gayosso-De-Lucio J, Torres-Valencia M, Rojo-Domínguez A, et al. Selective inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by brevifolin carboxylate derivatives isolated from *Geranium bellum* rose. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 5936-5939.
- 11 Tian Y (田瑛), Liu XQ (刘细桥), Dong JX (董俊兴). Apigenin glycosides from *Euphorbia humifusa* Wild. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2009, 44: 496-499.

(上接第 1975 页)

- 22 Huang Y (黄燕), Wu P (吴平). SAS Statistical Analysis and Application. Beijing: China Machine Press, 2006.
- 23 Huang LY (黄丽华), Wang CJ (王纯洁), Na RGW (纳仁高娃), et al. Effect of geniposide on LPS-induced activation of TLR4-NF- κ B pathway in RAW264.7 macrophage cell line. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2013, 29: 1012-1014.

- 24 Li HS (李海珊), Liu LQ (刘丽乔), Nie SP (聂少平). Effects of green tea polysaccharides on intestinal health and immune regulation in mice. *Food Sci* (食品科学), 2017, 38: 187-192.
- 25 Fan Y, Lu Y, Wang D, et al. Effect of epimedium polysaccharide-propolis flavone immunopotentiator on immunosuppression induced by cyclophosphamide in chickens. *Cellular Immunol*, 2013, 281(1): 37-43.