

叶下珠中黄酮类化学成分及其生物活性

魏春山¹, 吴春^{2,3}, 胡辰², 梁秋萍², 童光东¹, 周光雄^{2*}¹深圳市中医院肝病科, 深圳 518033; ²暨南大学药学院中药和天然药物研究所 广东省普通高校中药和天然药物药效物质基础重点实验室, 广州 510632; ³厦门医学院 福建省道地药材生物工程重点实验室, 厦门 361023

摘要: 利用色谱分离方法与现代波谱分析技术, 对叶下珠乙酸乙酯提取物的化学成分进行了系统的研究。从中分离鉴定了 14 个黄酮类化合物, 分别为槲皮素-3-(4"-O-乙酰基)-O- α -L-鼠李糖-7-O- α -L-鼠李糖苷(1)、槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷(2)、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷(3)、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷(4)、芸香甙(5)、槲皮素(6)、山柰酚(7)、山柰酚-3-O- α -L-鼠李糖苷(8)、木犀草素(9)、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷(10)、蒙花苷(11)、山柰酚-3-O- β -芸香糖苷(12)、柚皮苷(13)、橙皮苷(14)。除 5~7 外的所有化合物均从该植物中首次分离。对分离所得的化合物进行了体外细胞毒和抗氧化活性测试, 结果显示化合物 6、9 和 10 表现出一定的细胞毒活性, 所有化合物均具有不同程度的抗氧化活性。

关键词: 叶下珠; 黄酮类化合物; 细胞毒活性; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2; O629.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.010

Chemical Constituents, Cytotoxic and Antioxidant Activities of Flavanoids from *Phyllanthus urinaria*

WEI Chun-shan¹, WU Chun^{2,3}, HU Chen², LIANG Qiu-ping², TONG Guan-dong¹, ZHOU Guang-xiong^{2*}¹Department of Hepatology, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China;²Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New Drugs Research, Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, College of Pharmacy Jinan University, Guangzhou 510632, China; ³Fujian Provincial Key Laboratory of Genuine Regional Drug Bio-engineering, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China

Abstract: The whole plant of *Phyllanthus urinaria* L. (Euphorbiaceae) were used to investigate on their chemical constituents and bioactivities, fourteen flavonoids were isolated from the EtOAc fraction derived from 95% EtOH extract of *P. urinaria* by a combination of various chromatographic techniques, including column chromatography over silica gel and Sephadex LH-20 as well as reversed-phase HPLC. The structures of these flavonoids were determined on the basis of spectroscopic analysis including MS and NMR data. They were identified as quercetin-3-(4"-O-acetyl)-O- α -L-rhamnopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside (1), quercetin-7-O- α -L-rhamnoside (2), quercetin-3-O- α -L-rhamnoside (3), quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (4), rutin (5), quercetin (6), kaempferol (7), kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside (8), luteolin (9), luteolin-7-O- β -D-glucoside (10), buddleioside (11), kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -L-rhamnoside (12), naringin (13), hesperidin (14). All the compounds, except for 5-7, were isolated from *P. urinaria* for the first time. Compounds 6, 9 and 10 showed potential cytotoxic effects, and all of these compounds had antioxidant activity to some extent.

Key words: *Phyllanthus urinaria*; flavonoids; cytotoxicity; antioxidation

叶下珠又名珍珠草、阴阳草、假油树等, 为大戟科 (Euphorbiaceae) 叶下珠属植物叶下珠 (*Phyllanthus urinaria* L.) 的全草。该全草药用具有解毒、消

炎、清热、止泻、利尿之效, 可治赤目肿痛、肠炎腹泻、痢疾、肝炎、小儿疳积、肾炎水肿、尿路感染等^[1]。自 1982 年印度学者 Thyagarajan 等人首次报道苦味叶下珠 (*Phyllanthus amarus*) 体外对乙型肝炎病毒表面抗原 HbsAg 有显著的灭活作用后^[2], 该属植物引起了国内外学者的广泛关注。现代药理研究显示, 叶下珠具有抗乙型肝炎病毒、抗肿瘤、保肝护肝、抗

收稿日期: 2017-08-07 接受日期: 2017-09-01

基金项目: 深圳市科技计划 (JCYJ20150401163247220)

* 通信作者 Tel: 86-20-85221469; E-mail: guangzxh@sina.com

菌、抗血栓、抗氧化等方面的药理作用^[3-9]。目前对叶下珠的研究主要在其提取物的药理活性方面,对化学成分的研究较少,已报道的化合物有木脂素类、鞣质类、有机酸等^[10-12]。为进一步揭示该植物的药效作用物质基础,本文对由叶下珠全草 95% 乙醇提取物制得的乙酸乙酯萃取部位进行了化学成分研究,从中分离得到了 14 个黄酮类化合物。通过理化性质和波谱分析,以及与文献对照的方法,将其分别鉴定为:槲皮素-3-(4"-O-乙酰基)-O- α -L-鼠李糖-7-O- α -L-鼠李糖苷(1)、槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷(2)、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷(3)、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷(4)、芸香苷(5)、槲皮素(6)、山柰酚(7)、山柰酚-3-O- α -L-鼠李糖苷(8)、木犀草素(9)、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷(10)、蒙花苷(11)、山柰酚-3-O- β -芸香糖苷(12)、柚皮苷(13)、橙皮苷(14)。除化合物 5、6 和 7 外,其余 11 个化合物均为首次从该植物中分离得到。对其中分离所得的 11 个化合物进行了体外抗人源肝癌细胞 HepG2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 活性测试,结果显示化合物 6、9 和 10 表现出一定的细胞毒活性。采用 ORAC 测定的方法,评价了所分离化合物的抗氧化活性,结果表明所分离的化合物均具有不同程度的抗氧化活性。

1 仪器与材料

LCQ Advantage MAX 质谱仪(美国 Finnigan 公司),Avance-400 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司),安捷伦 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。薄层色谱用硅胶 GF254(烟台化学工业研究所),ODS(日本 YMC 公司),Sephadex LH-20(瑞典 Pharmacia 公司),氘代试剂(美国 CIL 公司),色谱纯甲醇(山东禹王有限公司),分析纯化学试剂(天津富士精细化工有限公司),所用其他试剂为分析纯或色谱纯。

叶下珠药材由深圳市中医院提供,由暨南大学生药学教研室周光雄教授鉴定为大戟科(Euphorbiaceae)叶下珠属植物叶下珠(*Phyllanthus urinaria* L.)的全草,标本(No. 20110901)保存于暨南大学药学院生药学教研室。

2 提取与分离

干燥的叶下珠全草(10 kg)粉碎后用 10 倍量 95% 乙醇渗漉提取 3 次,减压回收溶剂至无醇味,得流浸膏约 950 g。取浸膏用水混悬,依次用石油醚、

氯仿和乙酸乙酯各萃取三次,合并萃取液,减压回收溶剂,分别得石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位(约 130 g)。乙酸乙酯部位经硅胶柱层析(氯仿-甲醇系统:100:0、98:2、95:5、90:10、80:20、70:30、60:40、0:100),进行梯度洗脱,经薄层层析检测,合并相同组分得 6 个馏分。馏分 3 经 Sephadex LH-20 柱层析(纯甲醇),经薄层层析检测,合并相同组分得 10 个馏分(Fr 1-10)。馏分 Fr 9 经制备型高效液相色谱(甲醇-水系统)得化合物 6(30 mg)、9(7 mg)、7(14 mg)。馏分 Fr 2 经 ODS 开放柱层析(水-甲醇系统:80:20、70:30、60:40、40:60、20:80、0:100),经薄层层析检测,合并相同组分得 7 个子馏分(Sfr 1-7)。子馏分 Sfr 2 经制备型高效液相色谱(甲醇-水系统)得化合物 1(15 mg)、5(22 mg)和 12(20 mg)。子馏分 Sfr 3 经制备型高效液相色谱(甲醇-水系统)得化合物 11(15 mg)、13(16 mg)和 14(19 mg)。子馏分 Sfr 6 经制备型高效液相色谱(甲醇-水系统)得化合物 2(13 mg)、3(21 mg)、4(4 mg)、8(13 mg)和 10(9 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 黄色无定型粉末(CH₃OH);分子式为 C₂₉H₃₂O₁₆;UV(MeOH) λ_{\max} : 263, 335, 356 nm;ESI-MS:*m/z* 659 [M + Na]⁺。薄层层析后在 360 nm 处有荧光,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。¹H NMR(CD₃OD, 300 MHz) δ : 7.31(1H, br. s, H-2'), 7.27(1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-6'), 6.91(1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-5'), 6.68(1H, br. s, H-8), 6.43(1H, br. s, H-6), 5.56(1H, br. s, H-1'''), 5.50(1H, br. s, H-1'');¹³C NMR(CD₃OD, 75 MHz) δ : 179.7(C-4), 172.7(4"-COCH₃), 163.6(C-7), 163.0(C-5), 158.1(C-2), 150.1(C-9), 146.7(C-3'), 140.1(C-4'), 135.9(C-3), 123.0(C-6'), 122.7(C-1'), 117.1(C-5'), 116.5(C-2'), 107.6(C-10), 107.5(C-1''), 102.6(C-6), 100.0(C-1'''), 95.7(C-8), 75.0(C-4''), 71.8(C-2''), 71.4(C-4'''), 70.3(C-3''), 70.2(C-3'''), 69.8(C-5''), 69.7(C-2'''), 69.7(C-5'''), 21.1(4"-COCH₃), 18.2(C-6'''), 17.7(C-6'')。该化合物的¹H 和¹³C NMR 与文献^[13]中槲皮素-3-(4"-O-乙酰基)-O- α -L-鼠李糖-7-O- α -L-鼠李糖苷基本一致,故该化合物鉴定为槲皮素-3-(4"-O-乙酰基)-O- α -L-鼠

李糖-7-*O*- α -L-鼠李糖苷。

化合物 2 黄色无定型粉末(CH₃OH);分子式为C₂₁H₂₀O₁₁;UV(CH₃OH) λ_{\max} :257,366 nm;ESI-MS *m/z*:447 [M-H]⁻。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。¹H NMR(DMSO-*d*₆,300 MHz) δ :7.73(1H,d,*J* = 1.8 Hz,H-2'),7.58(1H,dd,*J* = 8.5,1.8 Hz,H-6'),6.89(1H,d,*J* = 8.5 Hz,H-5'),6.78(1H,d,*J* = 1.9 Hz,H-8),6.41(1H,d,*J* = 1.9 Hz,H-6),5.54(1H,br. s,H-1");¹³C NMR(DMSO-*d*₆,75 MHz) δ :176.0(C-4),165.7(C-7),163.0(C-5),160.7(C-4'),159.1(C-9),158.3(C-2),136.4(C-3),124.6(C-1'),122.8(C-6'),116.4(C-3'),115.8(C-2'),113.5(C-5'),105.8(C-10),103.3(C-1"),99.9(C-6),94.3(C-8),71.7(C-4"),70.3(C-3"),70.1(C-2"),69.9(C-5"),18.0(C-6")。该化合物的¹H和¹³C NMR与文献^[14]中槲皮素-7-*O*- α -鼠李糖苷基本一致,故该化合物鉴定为槲皮素-7-*O*- α -鼠李糖苷。

化合物 3 黄色无定型粉末(CH₃OH);分子式为C₂₁H₂₀O₁₁;UV(CH₃OH) λ_{\max} :257,366 nm;ESI-MS *m/z*:447 [M-H]⁻。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。¹H NMR(CD₃OD,300 MHz) δ :7.34(1H,d,*J* = 2.0 Hz,H-2'),7.32(1H,dd,*J* = 8.3,2.0 Hz,H-6'),6.90(1H,d,*J* = 8.3 Hz,H-5'),6.35(1H,d,*J* = 2.0 Hz,H-6),6.17(1H,d,*J* = 2.0 Hz,H-8),5.54(1H,d,*J* = 1.6 Hz,H-1");¹³C NMR(CD₃OD,75 MHz) δ :179.8(C-4),165.1(C-7),163.0(C-5),159.2(C-9),158.4(C-2),149.9(C-4'),146.5(C-3'),136.5(C-3),123.2(C-6'),122.4(C-1'),117.5(C-5'),116.7(C-2'),105.8(C-10),103.7(C-1"),99.5(C-6),94.6(C-8),73.4(C-4"),72.2(C-3"),72.1(C-2"),72.0(C-5"),17.8(C-6")。该化合物的¹H和¹³C NMR与文献^[15]中槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷基本一致,故该化合物鉴定为槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷。

化合物 4 黄色无定型粉末(CH₃OH),分子式为C₂₁H₂₀O₁₂;UV(CH₃OH) λ_{\max} :206,257,360 nm;ESI-MS *m/z*:465 [M+H]⁺。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三

氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。¹H NMR(DMSO-*d*₆,300 MHz) δ :6.20(1H,d,*J* = 1.5 Hz,H-6),6.38(1H,d,*J* = 1.5 Hz,H-8),6.84(1H,d,*J* = 8.4 Hz,H-5'),7.55(1H,dd,*J* = 8.4,1.8 Hz,H-6'),7.60(1H,d,*J* = 1.8 Hz,H-2'),5.46(1H,d,*J* = 7.4 Hz,H-1");¹³C NMR(DMSO-*d*₆,75 MHz) δ :177.5(C-4),166.7(C-7),163.0(C-5),159.1(C-9),158.3(C-2),149.7(C-4'),145.4(C-3'),135.4(C-3),123.6(C-1'),123.8(C-6'),117.5(C-5'),116.8(C-2'),105.8(C-10),104.0(C-1"),99.9(C-6),94.3(C-8),78.4(C-4"),78.1(C-3"),75.7(C-2"),71.2(C-5"),61.0(C-6")。该化合物的¹H和¹³C NMR与文献^[15]中槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷基本一致,故该化合物鉴定为槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 5 黄色无定型粉末(CH₃OH);分子式为C₂₇H₃₀O₁₆;UV(CH₃OH) λ_{\max} :206,257,360 nm;ESI-MS *m/z*:611 [M+H]⁺。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。¹H NMR(DMSO-*d*₆,300 MHz) δ :7.57(1H,d,*J* = 1.8 Hz,H-2'),7.53(1H,dd,*J* = 8.4,1.8 Hz,H-6'),6.82(1H,d,*J* = 8.4 Hz,H-5'),6.37(1H,d,*J* = 1.5 Hz,H-8),6.19(1H,d,*J* = 1.5 Hz,H-6),5.12(1H,br. s,H-1"),4.50(1H,d,*J* = 3.0 Hz,H-1''');¹³C NMR(DMSO-*d*₆,75 MHz) δ :177.4(C-4),164.1(C-7),161.0(C-5),157.4(C-2),156.2(C-9),148.9(C-4'),145.5(C-3'),133.5(C-3),122.4(C-1'),121.2(C-6'),116.5(C-5'),115.7(C-2'),104.8(C-10),101.4(C-1"),100.7(C-1'''),99.5(C-6),94.6(C-8),76.2(C-3"),76.0(C-5"),74.1(C-2"),72.2(C-4'''),71.4(C-4"),70.5(C-2'''),70.2(C-3'''),68.9(C-5'''),67.3(C-6"),18.3(C-6''')。该化合物的¹H和¹³C NMR与文献^[13]报道基本一致,故该化合物鉴定为芸香苷。

化合物 6 黄色无定型粉末(CH₃OH);分子式为C₁₅H₁₀O₇;UV(CH₃OH) λ_{\max} :206,257,360 nm;ESI-MS *m/z*:301 [M-H]⁻。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。¹H NMR(DMSO-*d*₆,300 MHz) δ :12.48(1H,

s, H-5), 7.67 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 175.8 (C-4), 163.7 (C-7), 160.0 (C-5), 156.1 (C-9), 147.7 (C-4'), 146.3 (C-2), 145.4 (C-3'), 135.4 (C-3), 122.6 (C-1'), 120.8 (C-6'), 115.8 (C-2'), 115.5 (C-5'), 103.8 (C-10), 98.9 (C-6), 93.3 (C-8)。该化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR与文献^[13]报道的槲皮素基本一致,故该化合物鉴定为槲皮素。

化合物7 黄色无定型粉末(CH_3OH);分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$;UV(CH_3OH) λ_{max} :206,257,360 nm;ESI-MS m/z :287 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 12.46 (1H, s, H-5), 7.75 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 177.4 (C-4), 164.1 (C-7), 162.2 (C-9), 159.9 (C-4'), 157.0 (C-5), 146.4 (C-2), 136.5 (C-3), 130.7 (C-2', 6'), 123.4 (C-1'), 116.5 (C-3', 5'), 103.8 (C-10), 98.9 (C-6), 94.3 (C-8)。该化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR与文献^[13]报道的山萘酚基本一致,故该化合物鉴定为山萘酚。

化合物8 黄色无定型粉末(CH_3OH);分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$;UV(CH_3OH) λ_{max} :206,257,360 nm;ESI-MS m/z :433 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 12.62 (1H, s, H-5), 8.10 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.96 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.29 (1H, br. s, H-1"); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 177.7 (C-4), 164.7 (C-7), 161.0 (C-5), 157.3 (C-2), 156.1 (C-9), 134.4 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 120.6 (C-1'), 115.5 (C-3', 5'), 104.8 (C-10), 104.1 (C-1"), 98.9 (C-6), 93.3 (C-8), 71.2 (C-4"), 70.7 (C-3"), 70.4 (C-2"), 70.2 (C-5"), 17.5 (C-6")。该化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR与文

献^[13]报道基本一致,故该化合物鉴定为山萘酚-3- O - α -L-鼠李糖苷。

化合物9 黄色无定型粉末(CH_3OH);分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$;UV(CH_3OH) λ_{max} :205,257,361 nm;ESI-MS m/z :285 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ 。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色,提示该化合物可能为黄酮类化合物。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 12.98 (1H, s, H-5), 7.40 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 7.39 (1H, s, H-2'), 6.88 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.66 (1H, br. s, H-8), 6.44 (1H, s, H-3), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 181.6 (C-4), 164.1 (C-7), 163.4 (C-2), 161.2 (C-9), 157.0 (C-5), 149.9 (C-4'), 145.5 (C-3'), 121.4 (C-1'), 119.2 (C-6'), 116.5 (C-5'), 113.7 (C-2'), 103.8 (C-10), 102.5 (C-3), 98.5 (C-6), 93.6 (C-8)。该化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR与文献^[16]报道基本一致,故该化合物鉴定为木犀草素。

化合物10 黄色无定型粉末(CH_3OH);分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$;UV(CH_3OH) λ_{max} :206,257,360 nm;ESI-MS m/z :447 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ 。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 12.99 (1H, s, H-5), 6.43 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.90 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 7.42 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6'), 7.46 (1H, s, H-2'), 5.11 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1"); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 181.9 (C-4), 164.7 (C-7), 163.3 (C-2), 161.1 (C-9), 157.0 (C-5), 149.7 (C-4'), 145.4 (C-3'), 121.6 (C-1'), 119.8 (C-6'), 116.5 (C-5'), 113.8 (C-2'), 104.0 (C-1"), 103.8 (C-10), 102.4 (C-3), 98.9 (C-6), 93.3 (C-8), 77.4 (C-4"), 76.6 (C-3"), 73.3 (C-2"), 69.7 (C-5"), 60.8 (C-6")。该化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR与文献^[16]报道的木犀草素-7- O - β -D-葡萄糖苷基本一致,故该化合物鉴定为木犀草素-7- O - β -D-葡萄糖苷。

化合物11 黄色无定型粉末(CH_3OH);分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$;UV(CH_3OH) λ_{max} :205,256,360 nm;ESI-MS m/z :593 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 。薄层层析后在360 nm处有荧光吸收,浓硫酸-香草醛显亮黄色(TLC),三氯化铁反应呈黄绿色。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300

MHz) δ : 12.91 (1H, s, H-5), 8.06 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'), 7.16 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-3', 5'), 6.80 (1H, br. s, H-8) 和 6.46 (1H, br. s, H-6), 6.96 (1H, s, H-3), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 5.20 (1H, br. s, H-1'''), 4.45 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1''), 1.08 (3H, d, $J = 5.1$ Hz, H-6'''); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 182.1 (C-4), 164.3 (C-2), 163.0 (C-9), 162.3 (C-4'), 161.7 (C-5), 157.3 (C-7), 128.5 (C-2', 6'), 122.4 (C-1'), 114.8 (C-3', 5'), 105.7 (C-10), 104.9 (C-3), 100.6 (C-6), 100.4 (C-1''), 100.1 (C-1?), 95.2 (C-8), 76.5 (C-3''), 69.7 (C-4''), 75.4 (C-5''), 73.3 (C-2''), 72.9 (C-4'''), 70.4 (C-3'''), 70.2 (C-2'''), 68.1 (C-5'''), 66.3 (C-6''), 55.7 (-OCH₃), 17.7 (C-6'''). 该化合物的¹H 和¹³C NMR 与文献^[17]报道的蒙花苷基本一致,故该化合物鉴定为蒙花苷。

化合物 12 黄色粉末(CH₃OH);分子式为 C₂₇H₃₀O₁₆;UV (CH₃OH) λ_{\max} : 285, 326 nm;ESI-MS m/z : 609 [M-H]⁻。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 8.10 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.23 (1H, br. s, H-1''), 4.15 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-1'''); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 179.6 (C-4), 164.7 (C-7), 160.7 (C-4'), 159.0 (C-5), 156.3 (C-2), 155.1 (C-9), 132.4 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 121.6 (C-1'), 114.4 (C-3', 5'), 103.8 (C-10), 101.8 (C-1''), 100.3 (C-1'''), 98.9 (C-6), 93.3 (C-8), 79.7 (C-5''), 75.6 (C-3''), 73.3 (C-2''), 71.5 (C-4'''), 70.3 (C-2'''), 70.0 (C-3'''), 69.4 (C-4''), 67.9 (C-5'''), 66.8 (C-6''), 17.6 (C-6'''). 该化合物的¹H 和¹³C NMR 与文献^[18]报道基本一致,故该化合物鉴定为山柰酚-3-O- β -芸香糖苷。

化合物 13 黄色粉末(CH₃OH);分子式为 C₂₇H₃₂O₁₄;UV (CH₃OH) λ_{\max} : 213, 286 nm;ESI-MS m/z : 603 [M+Na]⁺。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 7.28 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.09 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.80 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.14 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 5.48 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-2), 5.26 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1'''), 5.08 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.16 (1H, dd, $J = 17.0, 12.8$ Hz, H-3b), 2.72 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-3a); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ :

197.3 (C-4), 164.2 (C-7), 166.1 (C-2), 163.7 (C-4'), 162.7 (C-5), 159.8 (C-9), 129.1 (C-2', 6'), 122.0 (C-1'), 117.3 (C-3', 5'), 107.4 (C-10), 104.3 (C-3), 103.9 (C-1'''), 101.4 (C-6), 99.3 (C-1''), 96.1 (C-8), 79.4 (C-3'''), 79.0 (C-2''), 78.5 (C-3''), 78.2 (C-5''), 73.7 (C-5'''), 72.0 (C-4'''), 71.9 (C-2'''), 71.0 (C-4''), 62.1 (C-6''), 18.4 (C-6'''). 该化合物的¹H 和¹³C NMR 与文献^[19]报道的柚皮苷基本一致,故该化合物鉴定为柚皮苷。

化合物 14 黄色粉末(CH₃OH);分子式为 C₂₈H₃₄O₁₅;UV (CH₃OH) λ_{\max} : 285, 326 nm;ESI-MS m/z : 633 [M+Na]⁺。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 5.40 (1H, d, $J = 12.3, 2.2$ Hz, H-2), 4.97 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, br. s, H-1'''), 3.16 (1H, dd, $J = 17.0, 12.8$ Hz, H-3b), 2.76 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-3a); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 197.0 (C-4), 165.3 (C-7), 163.3 (C-5), 162.7 (C-9), 148.0 (C-4'), 145.4 (C-3'), 130.6 (C-1'), 118.0 (C-6'), 114.9 (C-2'), 112.5 (C-5'), 103.4 (C-10), 100.7 (C-1'''), 99.7 (C-1''), 96.5 (C-6), 95.0 (C-8), 78.6 (C-2), 76.1 (C-5''), 75.5 (C-3''), 73.2 (C-4'''), 72.1 (C-2''), 70.7 (C-4''), 70.2 (C-3'''), 69.6 (C-2'''), 68.5 (C-5'''), 66.0 (C-6''), 56.3 (-OCH₃), 41.4 (C-3), 17.9 (C-6'''). 该化合物的¹H 和¹³C NMR 与文献^[19]报道的橙皮苷基本一致,故该化合物鉴定为橙皮苷。

4 细胞毒活性实验

采用 MTT 法^[20]测定各化合物的细胞毒活性。将细胞悬液接种于 96 孔板,细胞密度为 8×10^4 C/mL,培养 24 h,细胞融合度至 70% ~ 80% 开始加药。将各化合物溶于 DMSO 中,其初始浓度为 10 mg/mL。设立空白组、对照组 (Vincristine) 和样品组,最大给药浓度为 100 μ g/mL,随后运用倍半稀释的方法依次降低浓度 (50、25、12.5、6.3、3.1、1.6 μ g/mL)。每个浓度设 3 个复孔。加药后孵育 2 d,弃去培养液后加入 30 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL) 再孵育 4 h。孵育后,吸弃上清液后加入 100 μ L DMSO 震荡混匀。使用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值,然后用数据处理软件 Origin 8 (OriginLab, Northampton, MA, USA) 计算出各个化合物的 IC₅₀ 值。14 个化合物中化合物 6、9 和 10 显示出一定的细胞毒活性 (表 1)。

表1 化合物对 HepG2 和 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 值Table 1 Cytotoxicities of **6**, **9** and **10** against HepG2 and MCF-7

No.	HepG2 (IC ₅₀ in μg/mL)	MCF-7 (IC ₅₀ in μg/mL)
6	25.6	>50
9	17.5	30.9
10	18.4	43
阳性对照 Vincristine	0.74	0.24

5 抗氧化活性实验

采用氧自由基吸收能力 (ORAC) 测定法评估各化合物的抗氧化活性。ORAC 反应是一个经典的氢原子转移的氧化过程。其操作方法简便,是目前评价抗氧化能力最权威的方法,多使用于高通量筛选和常规质量控制。测定方法参考文献^[21]:依次在 96 孔酶标板各微孔中分别加入荧光素钠溶液(终浓度 63 nmol/L)、磷酸钾缓冲液(终浓度 75 mmol/L, pH 7.4)、待测样品(以 75 mmol/L 磷酸钾缓冲液配制)各 20 μL,置于仪器中振荡混匀 5 s, 37 °C 下预热 10 min 后,加入 AAPH(过氧化自由基发生剂,终浓度 12.8 mmol/L) 140 μL 启动反应,然后迅速将 96 孔酶标板放入预置温度为 37 °C 的荧光分析仪内,开始测定。激发波长为 485 nm,发射波长为 538 nm。采用动力学方式,每 2 min 测定一次,直至荧光衰减为零止。反应设置未添加 AAPH 的荧光自然衰减变化和未添加抗氧化保护荧光衰退物质(以 20 μL 缓冲液代替)的单纯 AAPH 作用对照(+AAPH),相应的无 AAPH 作用未添加抗氧化物质的对照孔为单纯 FL 荧光衰退对照(-AAPH)。各微孔不同时间点的绝对荧光强度与未添加 AAPH 的空白荧光强度相比,得到相对荧光强度 f_t ,以相对荧光强度对时间作图。每个样品重复 3 次,计算荧光衰退曲线下面积 AUC。

实验结果以抗氧化物质的 ORAC 值表示。抗氧化物质荧光衰退曲线下面积减去未添加抗氧化物质单纯 AAPH 作用曲线下面积得到该抗氧化物质的保护面积(Net AUC),抗氧化物质的 ORAC 值即为样品荧光衰退曲线的保护面积(Net AUC_{sample})与标准抗氧化物质 Trolox 的保护面积(Net AUC_{trolox})的比值(若两者浓度不同,应换算成相同浓度后再比较)。化合物的 ORAC 值如表 2 所示(化合物 **4** 因量少未测定),其中化合物 **1**、**2**、**5** 和 **8** 均显示出较强的抗氧化活性。

表2 化合物抗氧化活性的 ORAC 值

Table 2 ORAC values of compounds

No.	ORAC (U/mol)	No.	ORAC (U/mol)
1	9.32	8	9.08
2	8.26	9	3.00
3	6.99	10	7.35
4	NT	11	2.41
5	20.42	12	7.42
6	5.01	13	0.93
7	2.27	14	2.14

注:U 为 1 mol 当量的 Trolox; NT: Not test.

Note: U was equivalent Trolox of 1 mol; NT: Not test.

6 小结与讨论

本文对由叶下珠乙醇提取物制得的乙酸乙酯萃取部位进行了化学成分的分离鉴定研究,该部位化学成分主要为黄酮及黄酮苷类化合物,黄酮结构类型有黄酮类、黄酮醇类、二氢黄酮类。除化合物 **5**、**6**、**7** 外,其余 11 个化合物均为首次从该植物中分离得到。对分离所得的 11 个化合物进行了体外抗人源肝癌细胞 HepG2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 活性测试,结果显示化合物 **6**、**9** 和 **10** 表现出一定的细胞毒活性。化合物 **1**、**2**、**5** 和 **8** 显示出较强的抗氧化活性。

研究发现^[22],人体肿瘤细胞可产生大量的过氧化氢等活性氧类化合物,在研究的如卵巢癌、乳腺癌、结肠癌等 7 种人肿瘤细胞中,过氧化氢产生的速率高达 0.5 nmol/10⁴ 细胞/h。实验中对肿瘤细胞具有明显细胞毒活性的几种化合物也具有较明显的抗氧化活性。而在体外抗氧化反应中具有较强的抗氧化活性化合物对肿瘤细胞的细胞毒活性不明显,有待更进一步的实验研究解释原因。

参考文献

- 1 Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences (中国科学院中国植物志编委会). Flora of China (中国植物志), Beijing: Science Press, 1994. 44, 093.
- 2 Thyagarajan SP, Subramanina S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *Lancet*, 1988, 1: 764-766.
- 3 Yang CM, Cheng HY, Lin TC, et al. The *in vitro* activity of geraniin and 1, 3, 4, 6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1

- and type 2 infection. *J Ethnopharmacol*, 2007, 110:555-558.
- 4 He LH, Qi L, Lu JX, *et al.* Pharmaceutical developing of Shaanxi *Phyllanthus urinaria* L. III inactivation of HBV antigen in vitro by the extracts and constituents. *Northwest Pharm J*, 1996, 11(1):11-14.
 - 5 Zhong Y (仲英), Zuo CX (左春旭), Li FQ (李风琴), *et al.* Studies on chemical constituents of *Phyllanthus urinaria* L. and its antiviral activity against Hepatitis B Virus. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23:363-364.
 - 6 Hong JF (洪剑锋). The effect of *Phyllanthus* extracts on hepatoma cells. Changsha: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), MSc. 2013.
 - 7 Zhou SW (周世文), Xu CF (徐传福), Zhou N (周宁), *et al.* Protective effect of *Phyllanthus urinaria* L. on injuries of liver cells. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 1996, 11:209-212.
 - 8 Shen ZQ (沈志强), Dong ZJ (董泽军), Wu LO (吴蓝鸥), *et al.* Effects of the fraction from *Phyllanthus urinaria* on thrombosis and its mechanism. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15:46-50.
 - 9 Lin SY, Wang CC, Lu YL, *et al.* Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46:2485-2492.
 - 10 Chang CC, Lien YC, Karin CS, *et al.* Lignans from *Phyllanthus urinaria*. *Phytochemistry*, 2003, 63:825-833.
 - 11 Zhang LZ (张兰珍), Guo YJ (郭亚健), Tu GZ (涂光忠), *et al.* Isolation and identification of a novel polyphenolic compound from *Phyllanthus urinaria* L. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25:724-725.
 - 12 Wan ZX (万振先), Zhou GP (周国平), Yi YH (易杨华), *et al.* Studies on the chemical constituent of common leaf flower (*Phyllanthus urinaria*). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25:455-456.
 - 13 Pistelli L, Noccioli C, Martera M, *et al.* Antioxidant flavonol glycosides from *Drycnium hirsutum*. *Chem Nat Compd*, 2006, 42:281-284.
 - 14 Ba YY (巴寅颖), Liu QY (刘倩颖), Shi RB (石任兵), *et al.* Studies on flavonoids from *Euonymus alatus*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43:242-246.
 - 15 Shang XY (尚小雅), Li S (李帅), Wang SJ (王素娟), *et al.* Studies on flavonoids from *Bauhinia aurea*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40:196-199.
 - 16 Xu Y (徐燕), Liang JY (梁敬钰). Chemical constituents of *Sonchus oleraceus* L. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2005, 36:411-413.
 - 17 Ji S (吉双), Zhang YC (张予川), Diao YP (刁云鹏), *et al.* Chemical constituents from *Folium artemisiae argy.* *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2009, 26:617-619.
 - 18 Wang PH, Lee SS. Active chemical constituents from *Sauropus androgynous*. *J Chin Chem Soc*, 1997, 44:145-149.
 - 19 Zhang QH (张庆华), Jiang YH (蒋以号), Gong QF (龚千锋), *et al.* Analysis of flavonoids from Fructus *Aurantii* of zhang-band processed products. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21:2536-2537.
 - 20 Li J (李杰), Liu YQ (刘玉琴). Progress and application of MTT method in tumor research. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床), 1998, 25:312-313.
 - 21 Xu JK (续洁琨), Yao XS (姚新生), Kurihara H (栗原博). Oxygen radical absorbance capacity assay and its application. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2006, 22:1015-1021.
 - 22 Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res J*, 1991, 51:794-798.

(上接第 2111 页)

- 11 Liu BG (刘彬果), Guo WY (郭文勇), Zhong L (钟蕾), *et al.* Application macroporous resin adsorption technology in the traditional Chinese medicine (TCM) preparations. *Pharm J Chin PLA* (解放军药科学学报), 2003, 19:453-457.
- 12 Hao CQ (郝彩琴), Guo HY (郭鸿雁), Leng XH (冷晓红), *et al.* Optimization of the dynamic reflux extraction technology of gentiopicroside from *Gentiana macrophylla* Pall by orthogonal experiments. *J Northwest Forest Univ* (西北林学院学报), 2013, 28:123-125.
- 13 Ha JNS (哈及尼沙), A LMJ (阿力木江), A BLZ (阿布力孜), *et al.* Purification and PTP1B inhibition activity of total polyphenols from *Cydonia oblonga* Mill. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:1448-1452.
- 14 Wang XJ (汪学军), Min CL (闵长莉), Han PL (韩彭垒). Antibacterial effect of the extracts from different parts of *Macleaya cordata* against coliforms. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:247-250.
- 15 Leng XH (冷晓红), Wang ZQ (王志强), Li J (李军). The antibacterial activity *in vitro* of alkaloids of *Sophora alopecuroides* on pathogens of Cow Mastitis. *Chin J Veterin Drug* (中国兽药杂志), 2013, 47(9):31-33.
- 16 Wang L (王琳), Nie YQ (聂艳琼), Sun N (孙娜), *et al.* Research advances in the chemical components molecular biology and pharmacology of Radix *Gentianae Macrophyllae*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2012, 40:9629-9630.