

山茶蕈牛肝菌子实体中化合物的结构分离鉴定及体外抗肿瘤活性

曾凡清¹, 冯娜^{2*}, 张劲松², 郑巧平¹

¹丽水市农业科学研究院, 丽水 323000, ²上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403

摘要: 山茶蕈牛肝菌 (*Boletus pseudoregius*) 子实体中分离得到的 7 个化合物, 通过波谱分析, 分别鉴定为: 烟酸(1)、腺苷(2)、琥珀酸(3)、麦角甾醇(4)、鸟苷(5)、脑苷脂 B(6) 和甘露醇(7), 这些化合物都是首次从山茶蕈牛肝菌 (*B. pseudoregius*) 子实体中获得, 对化合物进一步作了体外抗肿瘤实验, 结果表明, 化合物 2、4、5、7 对肿瘤细胞 K562 的增殖有不同程度的抑制作用, 其抑制率 IC₅₀ 值分别为: 76.3、80.4、88.7、96.5 μg/mL, 化合物 2、5、7 对肿瘤细胞 HepG2 也有明显的抑制作用, 其抑制率 IC₅₀ 分别为 93.8、98.6、97.1 μg/mL。

关键词: 牛肝菌; 次级代谢产物; 分离纯化; 生物活性

中图分类号: R285

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.002

Chemical Constituents from the Fruiting Bodies of *Boletus pseudoregius* and Their Inhibition to Tumor Cell Proliferation

ZENG Fan-qing¹, FENG Na^{2*}, ZHANG Jing-Song², ZHEN Qiao-ping¹

¹Lishui Academy of Agricultural Sciences, Lishui 323000, China; ²Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

Abstract: Seven compounds were isolated from fruiting bodies of *Boletus pseudoregius* by using column chromatography. According to the spectral data, they were identified as nicotinic acid (1), adenosine (2), succinic acid (3), ergosteol (4), guanosine (5), cerebroside B (6), D-mannitol (7). By *in vitro* cytotoxicity screening, compounds 2, 4, 5 and 7 were found to inhibit the proliferation of k562 tumor cells with IC₅₀ of 76.3, 80.4, 88.7 and 96.5 μg/mL respectively. Compound 2, 5, 7 showed inhibition to the proliferations of HepG2 with IC₅₀ of 93.8, 98.6, 97.1 μg/mL.

Key words: *Boletus pseudoregius*; secondary metabolites; separation and purification; cytotoxicity

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 材料

山茶蕈牛肝菌 (*Boletus pseudoregius*) 子实体采自浙江省丽水市庆元县月山村, 由广东省微生物研究所李泰辉教授鉴定。人白血病细胞株 K562、人肝肿瘤细胞株 HepG2 购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 试剂

TLC 板为烟台江友硅胶开发有限公司生产, 高效反相薄层层析硅胶板 (型号: RP-18F254S), 柱层

析硅胶 (100 ~ 200 目) 为青岛海洋化工厂生产, Sephadex LH-20 凝胶为 GE Healthcare 集团产品, 95% 乙醇、甲醇、丙酮、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇为国药集团化学试剂有限公司生产的分析纯试剂, 氘代氯仿和氘代甲醇为美 Cambridge Isotope Laboratories Inc. 产品。

0.05% 胰蛋白酶、DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、MEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 和胰酶 (含 0.25% EDTA) 购自于 Invitrogen 公司; 5-氟尿嘧啶 (5-fluoro-2,4(1 h,3 h) pyrimidinedione, 5-Fu)、二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司, 链霉素和青霉素购自 Amersco 公司; Alamar Blue Assay kit 购自 Biosource 公司; 96 孔培养板为 Costar 产品; RPMI 1640 完全培养基配制: 每升培养基中加入 FBS 100 mL, 浓度为 1% 的双抗 10 mL (青霉素 3 mg/mL, 链霉素 5 mg/mL), 过 0.22 μmol/L 滤膜后,

收稿日期: 2016-10-11 接受日期: 2016-11-30

基金项目: 丽水科技计划 (20120410); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS24)

* 通信作者 E-mail: Fengna006@163.com

分装 4 °C 保存。

DMEM 完全培养基配制:每升培养基中加入 FBS 100 mL,浓度为 1% 的双抗 10 mL (青霉素 3 mg/mL,链霉素 5 mg/mL),过 0.22 μmol/L 滤膜后,分装 4 °C 保存。

1.1.3 仪器

ESIMS 用 Agilent 1100LC/MSD SL 液质联用分析仪,EIMS 用 HP-5973N 质谱仪,均以甲醇为溶剂,直接进样测定。高分辨飞行时间质谱 HRMS(EI)用 Waters Micromass GCT 测定。H-NMR 谱和 C-NMR 谱用 Varian Inova-500 型核磁共振仪,以四甲基硅烷(TMS)为内标测定。

Synergy HT 多功能酶标仪(Bio-TEK 公司)、二氧化碳培养箱(Thermo Forma 公司)、细胞计数仪(BECKMAN-COULTER 公司)、倒置荧光显微镜(O-LYMPUS 公司)、1L 旋转蒸发器(BüCHI 公司)。

1.2 提取和分离

将山茶鞣牛肝菌干品 10 kg,晒干后,用等体积的 95% 乙醇(w/v)常温浸提过夜,过滤,重复操作三次,合并浸提液,用 20 L 旋转蒸发器回收乙醇,浓缩后浸膏备用,用 80% 乙醇复溶制成混悬液,依次用等体积的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取 3 次^[1]。蒸馏浓缩或减压浓缩后分别获得石油醚分部(51.34 g),氯仿分部 26.39 g,乙酸乙酯分部 8.32 g,正丁醇分部 80.5 g。

将萃取后的乙酸乙酯分部上硅胶柱(100~200 目),采用氯仿~甲醇(100:0~60:40)梯度洗脱,每份收集 160mL 洗脱液,共收集到 104 个流份,根据薄层层析(TLC)检测结果合并相近的流份,得到 24~28 流份(1.102 g),49~58 流份(2.262 g),24~28 流份得到化合物 1(38.9 mg),49~58 流份进行硅胶柱层析,硅胶(100~200 目)65 g,氯仿~甲醇(100:0~9:1)梯度洗脱每份收集 50mL 洗脱液,共收集 94 个流份,根据薄层层析(TLC)检测结果合并相近的流份,得到 30~37 流份(526.1 mg)、53~62 流份(119.1 mg),53~62 流份上 Sephadex LH-20 柱层析,甲醇洗脱得到化合物 2(17.5 mg),30~37 流份丙酮洗涤直到得到较纯的化合物(126.1 mg),再将此化合物溶于甲醇上 Sephadex LH-20 柱层析,甲醇洗脱,得到化合物 3(16.9 mg)。

将氯仿分部上硅胶柱,石油醚~丙酮(100:0~70:30)梯度洗脱,每份收集 300 mL 洗脱液,共收集 142 个流份,根据薄层层析(TLC)检测结果合并相

近的流份,20~26 流份(1.102g),49~72 流份(2.262 g),20~26 流份进行硅胶柱层析,重结晶得到白色固体,而后在石油醚分部也得到白色固体,经薄层层析可得,两个化合物为同一化合物,合并得到化合物 4(4.2 g);49~72 流份进行硅胶柱层析,氯仿~甲醇(100:0~9:1)梯度洗脱每份收集 50mL 洗脱液,共收集 94 个流份,根据薄层层析(TLC)检测结果合并相近的流份,53~62 流份(119.3 mg),将 53~62 流份上 Sephadex LH-20 柱层析,甲醇洗脱,得到化合物 5(21.5 mg)。

将石油醚分部上硅胶柱,石油醚~丙酮(100:0~70:30)梯度洗脱,每份收集 400mL 洗脱液,共收集 127 个流份,根据薄层层析(TLC)检测结果合并相近的流份,88~122 流份(11.13 g),将 88~122 流份上硅胶柱,氯仿~甲醇(100:0~9:1)梯度洗脱每份收集 50 mL 洗脱液,共收集 77 个流份,66~77 流份。将 66~72 流份 0.8434 g 上硅胶柱,氯仿-甲醇梯度(100:0-96:4)洗脱,得到 67 个流份,根据薄层层析(TLC)检测结果合并相近的流份,共合并为 5 个部分,50~67 流份(102.9 mg)。再将 50~67 流份溶于甲醇上 Sephadex LH-20 柱层析,甲醇洗脱,得到化合物 6(19.2 mg)。

将正丁醇相 80.5 g 分别用甲醇、氯仿、正丁醇溶解,溶解后的液体合并待用,不溶部分用水溶解,溶解后的液体加无水乙醇沉淀,获得的沉淀物即化合物 7(2.1 g)。

1.3 体外抗肿瘤活性筛选

K562 细胞培养于 RPMI1640 完全培养液中,HepG2 细胞培养于 DMEM 完全培养液中,在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下,于培养箱内传代培养。

抗肿瘤活性测定^[2]:参照文献[冯娜等]的方法进行修改,测定子实体各萃取物、萃取剩余物和水提取物对肿瘤细胞和正常细胞增殖的抑制作用。取对数生长期的 K562、HepG2 细胞,分别用相应的培养基将 4 种细胞稀释成为 2×10⁴ 个/mL 的单细胞悬液,分别加入 96 孔培养板中,每孔加入 199 μL,置于培养箱中 6 h 后,加入 1 μL 不同浓度的待测样品(作用浓度为 10、50、100 和 200 μg/mL),每浓度 3 个重复。阴性对照为 1 μL 的 DMSO,阳性对照为 5-Fu DMSO 溶液(作用浓度 2 μg/mL),培养 48 h 后取出,每孔加入 30 μL 的 0.1% Alamarblue 试剂,置培养箱中继续培养 6 h 后,用酶标仪在 570 和 600 nm 波长处测吸光度(A)值。根据 Alamarblue 试剂的公

式计算各种样品对肿瘤细胞 HepG2、K562 的增殖抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \{1 - [117216 \times A_{(570)}(\text{样品}) - 80586 \times A_{(600)}(\text{样品})] / [117216 \times A_{(570)}(\text{对照}) - 80586 \times A_{(600)}(\text{对照})]\} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 化合物的结构鉴定

该研究中获得的化合物的解析结果见图 1。

2.1.1 化合物 1

浅黄色固体;易溶于吡啶,微溶于甲醇、氯仿。该化合物分子式为 $C_6H_5NO_2$ 。正离子 ESI-MS m/z 124 $[M + H]^+$ 。 1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6): δ 8.16 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-2), 8.79 (1H, dd, $J = 2.1, 6.0$ Hz, H-6), 8.33 (1H, m, H-4), 7.53 (1H, m, H-5); ^{13}C NMR (125 MHz, Acetone- d_6): δ 168.1 (C-COOH), 154.0 (C-6), 151.6 (C-2), 139.5 (C-4), 129.0 (C-3), 125.5 (C-5)。该化合物的波谱数据与文献(SigneKorsager, Rolf H *et al.*, 2013)报道的一致,确定烟酸(nicotinic acid)^[3]。

2.1.2 化合物 2

白色粉末状固体;易溶于水、DMSO。分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$ 。比旋光度 $[\alpha]_D^{20} -63.8$ (c 0.983, H_2O)。负离子 ESIMS m/z 302 $[M + Cl]^-$, 533 $[2M-H]^-$ 。 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 8.35 (1H, s, H-8), 8.15 (1H, s, H-2), 7.32 (2H, br s, H-NH₂), 5.89 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-1'), 5.41 (2H, br s, OH-2', 3'), 5.16 (1H, br s, OH-5'), 4.60 (1H, dd, $J = 6.1, 11.2$ Hz, H-2'), 4.16 (1H, dd, $J = 4.7, 7.8$ Hz, H-3'), 3.97 (1H, dd, $J = 3.4, 6.7$ Hz, H-4'), 3.68 (1H, m, H-5'a), 3.56 (1H, m, H-5'b); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 157.2 (C-6), 153.5 (C-2), 140.7 (C-4), 142.0 (C-8), 121.4 (C-5), 91.3 (C-1'), 88.2 (C-4'), 75.5 (C-2'), 72.7 (C-3'), 63.5 (C-5')。该化合物的波谱数据与文献(于德泉等, 1999)报道一致,确定为腺苷(adenosine)^[4]。

2.1.3 化合物 3

白色结晶粉末;溶于甲醇,分子式为 $C_4H_6O_4$ 。ESI-MS m/z : 117 $[M-H]^-$; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 5.00 (2H, br s, H-1, 4), 2.56 (4H, t, $J = 10.6$ Hz, H-2, 3); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ

176.2 (C-1, 4), 29.8 (C-2, 3)。该化合物的波谱数据与文献^[5](蒋受军等, 2002)报道一致,确定为琥珀酸^[6](Succinic acid)。

2.1.4 化合物 4

白色粉末;溶于氯仿,微溶于丙酮。分子式为 $C_{28}H_{44}O$ 。比旋光度 $[\alpha]_D^{20} -117.5$ (c 2.450, $CHCl_3$)。正离子 ESI-MS m/z : 378 $[M-H_2O]^+$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.56 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-6), 5.38 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-7), 5.20 (2H, m, H-22, 23), 3.62 (1H, m, H-3), 2.45 (1H, m), 2.28 (1H, m), 2.07-1.22 (18H, m), 1.03 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.94 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.83 (6H, m, H-26, 27), 0.62 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 141.3 (C-8), 139.8 (C-5), 135.6 (C-22), 132.0 (C-23), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 70.4 (C-3), 55.8 (C-17), 54.6 (C-14), 46.3 (C-9), 42.8 (C-13), 42.8 (C-24), 40.8 (C-4), 40.4 (C-20), 39.1 (C-12), 38.4 (C-1), 37.0 (C-10), 33.1 (C-25), 32.0 (C-2), 28.3 (C-16), 23.0 (C-15), 21.1 (C-11), 21.1 (C-21), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28), 16.3 (C-19), 12.0 (C-18)。该化合物的波谱数据与文献^[7](刘玉红等, 2005)报道一致,确定为麦角甾醇(ergosterol)。

2.1.5 化合物 5

白色粉末;分子式为 $C_{10}H_{15}N_5O_{11}P_2$ 。 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 5.69 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, H-1'), 6.52 (2H, s, 2-NH₂), 7.93 (1H, s, H-8), 10.63 (1H, s, H-1); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 153.6 (C-2), 151.3 (C-4), 116.7 (C-5), 156.7 (C-6), 135.6 (C-8), 86.3 (C-1'), 70.3 (C-2'), 73.7 (C-3'), 85.2 (C-4'), 61.4 (C-5'), 该化合物的波谱数据与文献(荣国彬等, 2004)报道一致,确定为鸟苷^[8,9](Guanosine)。

2.1.6 化合物 6

白色固体;易溶于甲醇,微溶于丙酮。分子式为 $C_{41}H_{77}NO_9$ 。比旋光度 $[\alpha]_D^{20} -17.0$ (c 0.458, MeOH)。正离子 ESI-MS m/z : 728 $[M + H]^+$, 750 $[M + Na]^+$, 766 $[M + K]^+$; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 176.8 (C-1'), 136.7 (C-9), 134.8 (C-4), 131.9 (C-5), 124.3 (C-8), 104.1 (C-1''), 77.4 (C-3''), 77.3 (C-5''), 74.5 (C-2''), 73.0 (C-2'),

72.7 (C-3), 71.1 (C-4''), 69.3 (C-1), 62.4 (C-6''), 54.2 (C-2), 40.6 (C-10), 35.5-26.0 (C-3'-14', 6-7, 11-16), 23.5 (C-15', 17), 16.4 (C-19), 14.6 (C-16', 18)。该化合物的波谱数据与文献^[10](张鞍灵等, 2001)报道一致, 确定为脑苷脂 B (cerebroside B)。

2.1.7 化合物 7

白色固体; 易溶于水, DMSO, 微溶于甲醇。分子式为 $C_6H_{14}O_6$ 。比旋光度 $[\alpha]_D^{20} -3.5$ (c 2.080, H_2O)。正离子 ESI-MS m/z : 183 $[M + H]^+$, 200 $[M + NH_4]^+$, 205 $[M + Na]^+$ 。 1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 3.89 (2H, dd, $J = 2.7, 11.7$ Hz, H-1, 6), 3.79 (4H, m, H-2, 3, 4, 5), 3.70 (2H, dd, $J = 6.0, 11.7$ Hz, H-1, 6); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ 73.5 (C-2, 5), 72.0 (C-3, 4), 65.9 (C-1, 6)。该化合物的波谱数据与文献(石瑛等, 2006)报道一致, 确定为甘露醇^[11,12](D-mannitol)。

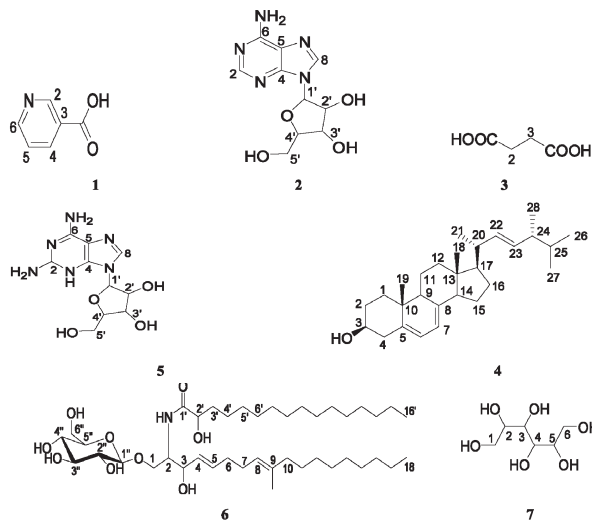


图 1 化合物的结构式

Fig. 1 The structure of compounds

2.2 化合物体外抑制肿瘤细胞的增殖筛选

化合物 2、5、7 对肿瘤细胞 HepG2 有不同程度的抑制作用, 其抑制率 IC_{50} 值分别为 93.8、98.6、97.1 $\mu g/mL$, 抑制率与化合物的浓度存在剂量相关关系。化合物 1、3、4、6 在最大浓度 (100 $\mu g/mL$) 作用下, 对肿瘤细胞 HepG2 增殖抑制率均低于 50% (图 2)。化合物 2、4、5、7 对肿瘤细胞 K562 的增殖有不同程度的抑制作用, 其抑制率 IC_{50} 值分别为 76.3、80.4、88.7、96.5 $\mu g/mL$ (图 3)。

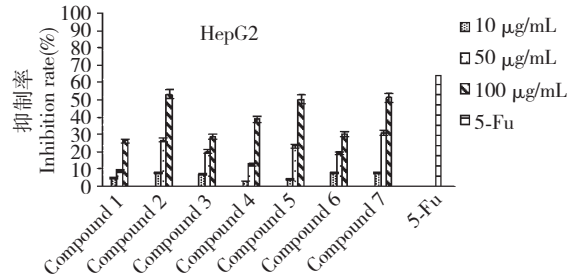


图 2 化合物对肿瘤细胞 HepG2 增殖的抑制作用

Fig. 2 The inhibition of compounds to HepG2's proliferation

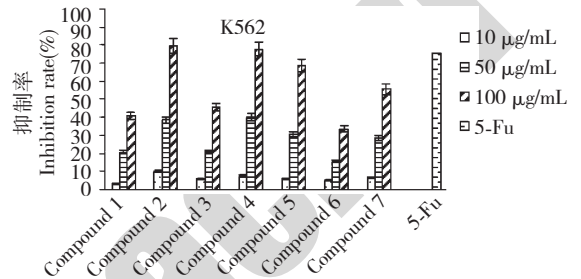


图 3 化合物对肿瘤细胞 K562 增殖的抑制作用

Fig. 3 The inhibition of compounds to K562's proliferation.

3 讨论

山茶靛是牛肝菌 (*B. pseudoregius*) 众多牛肝菌品种中的一个, 在丽水·庆元当地具有悠久的食用历史, 通过 ITS 测序, 用 blast 与 GenBank 中核酸数据进行比对分析, 结果与数据库中的牛肝菌分离菌株 KC152059、AY061738、AY621802 等具有较高的同源性, 其中与牛肝菌菌株 KC152059 同源性最高, 达 91%, 经广东省微生物研究所李泰辉教授形态学鉴定, 该菌株为拟桃红牛肝菌。

拟桃红牛肝菌属于菌根菌, 目前还不能人工培育, 只能野生采集, 对其研究也主要是从分类, 生境研究以及菌种的活力研究等方面开展, 对其活性的研究几乎没有。

本研究从野生采集的从山茶靛牛肝菌子实体醇提物中分离得到 7 个化合物, 分别为烟酸、腺苷、琥珀酸、麦角甾醇、鸟苷、脑苷脂 B 和甘露醇, 这些化合物都是首次从山茶靛牛肝菌子实体中发现, 之前我们发现山茶靛牛肝菌子实体对 K562 细胞的增殖有抑制作用, 这有可能跟山茶靛牛肝菌子实体中含有核苷、甾醇类物质有关, 此外, 麦角甾醇、甘露醇在单个子实体中含量较少, 但总体的累积量大, 且对肿瘤细胞 K562 的增殖有抑制作用, 这为山茶靛牛肝菌用作抗肿瘤用途提供了实验数据。

山茶蕈牛肝菌子实体中分离出化合物的数量与实验材料的多少存在正相关,要分离出种类多的化合物,实验材料的数量应足够大^[13];本研究的活性试验还只局限于体外细胞实验,体内的生物活性作用还需要进一步的实验验证。

参考文献

- Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, *et al.* Antitumor action of some basidiomycetes, especially *phellinus linteus*. *Gann*, 1968, 59:155-157.
- Feng N(冯娜), Wu N(吴娜), Yang Y(杨炎), *et al.* Compounds from the fruiting bodies of *Phellinus baumii* and their inhibition to tumor cell proliferation. *Mycosystema* (菌物学报), 2015, 34:124-130.
- Korsager S, Taaning RH, Skrydstrup T. Effective Palladium-Catalyzed Hydroxycarbonylation of Aryl Halides with Substoichiometric Carbon Monoxide. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 2891-2894.
- Yu DQ(于德泉), Yang JS(杨峻山), Handbook of Analytical Chemistry: Seventh(分析化学手册第7分册), Beijing: Chemical Industry Press, 1999. 621, 744, 907-908.
- Jiang SJ(蒋受军), Wei F(魏峰), Lu J(鲁静), *et al.* Chemical studies on the *Galeobdolon chinense*. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2002, 33:487-488.
- Arisawa M, Fujita A, Saga M, *et al.* Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. *J Nat Prod*, 1986, 49:621-625.
- Liu YH(刘玉红), Xu LC(徐凌川), Wang JP(王建平), *et al.* Chemical constituents from *Phylloporia ribis*. *J Chin Med Mater*(中药材), 2005, 28:998-999.
- Liu JC, Sun YX. Structural analysis of analkali-extractable and water-soluble polysaccharide (ABP-AW1) from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polym*, 2011, 86(2):429-432.
- Rong GB(荣国斌), Zhu SZ(朱士正). Structure determination of Organic Compounds Table of Spectral Data. Shanghai: East China University of Science and Technology Press (华东理工大学出版社出版), 2004. 154.
- Zhang AL(张鞍灵), Liu GQ(刘国强), Gao JM(高锦明). Chemical structure of cerebroside B. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*(西北植物学报), 2001, 21:684-688.
- Ghosal S, Mittal P. Free and glucosyloxy aceto-phenones from *pancratium biflorum*. *Phytochemistry*. 1989, 28:3193.
- Shi Y(石瑛), Tian L(田黎), Wang J(王婧), *et al.* Studies on the chemical constituents of the fermentation liquid from marine actinomycetes *Micromonospora sp.* and bacteria *Oceanospirillum sp.* *Chin J Marine Drugs*(中国海洋药物杂志), 2006, 25(1):6-10.
- Shon MY, Kim TH, Sung NJ. Antioxidants and free radical scavenging activity of *phellinus baumii* (*phellinus* of Hymenochaetaeaceae) extracts. *Food Chem*, 2003, 82:593-597.
- Yamano Y, Watanabe Y, Watanabe N, *et al.* Stereo-controlled synthesis of optically active β -D-glucopyranosides of 3-hydroxy-7, 8-didehydro- β -ionol. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48: 2017-2018.
- Pabst A, Barron D, Semon E, *et al.* Two diastereomeric 3-oxo- α -ionol 9-O- β -D glucopyranoside from Raspberry Fruit. *Phytochemistry*, 1992, 31:1649-1652.
- Khan SH, Mosihuzzaman M, Nahar N, *et al.* Three megastigmane glycosides from the leaves of *Pterospermum semisagittatum*. *Pharm Biol*, 2003, 41:512-515.
- Miyase T, Ueno A, Takizawa N, *et al.* Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* MORR. var. thunbergianum (MIQ.) NAKAI. III α . *Chem Pharm Bull*, 1988, 36:2475-2484.
- Hisamoto M, Kikuzaki H, Nakatani N. Constituents of the Leaves of *Peucedanum japonicum* Thunb. and their biological activity. *J Agric Food Chem*, 2004, 52:445-450.
- Tao Y, Jiang W, Cheng YY. Two new compounds from Two new compounds from *Senecio cannabifolius*. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14:826-830.
- Ito I, Kobayashi E, Li SH. Megastigmane glycosides and an acylated triterpenoid from *Eriobotrya japonica*. *J Nat Prod*, 2001, 64:737-740.
- McLean SF, Reynolds W, Tinto WF. Complete ¹³C and ¹H spectral assignments of prenylated flavonoids and a hydroxy fatty acid from the leaves of Caribbean *Artocarpus communis*. *Magne Reson Chem*, 1996, 34:719-722.
- Murata T, Miyase T, Yoshizaki F. New phenolic compounds from *Meehania urticifolia*. *J Nat Med*, 2011, 65:385-390.
- Nunn LCA, Smedley-Maclean I. The oxidation products of the unsaturated acids of linseed oil. *Biochem J*, 1935, 29:2742-2745.
- Daubert BF, Baldwin AR. Unsaturated synthetic glycerides. VII. Preparation and properties of synthetic 1-monoglycerides and simple triglycerides of linoleic and linolenic acids. *J Am Chem Soc*, 1944, 66:997-1000.
- Xie T(谢韬), Liu Z(刘净), Liang JY(梁敬敏), *et al.* Chemical constituents of *Artemisia scoparia* Waldst. Et kit. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2005, 30:1390-1391.

(上接第5页)