

菊状千里光化学成分及抗真菌活性研究

谢小燕, 王睿睿, 邹秋萍, 苏刘艳, 李艳平*, 何红平*

云南中医药大学 中药学院, 昆明 650500

摘要: 研究菊状千里光的化学成分, 为进一步探讨其药理作用提供理论依据。菊状千里光乙醇提取物经大孔树脂初步分离后, 采用凝胶色谱、硅胶色谱、MCI 等方法分离纯化化合物, 通过化合物的理化性质与波谱数据分析鉴定其结构。使用 MTT 法测定分离得到的两个生物碱对正常肝细胞 L-02 的毒性, 并通过琼脂平板打孔法对菊状千里光中得到的部分化合物进行抗真菌活性检测。从菊状千里光全草的乙醇浸膏中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为 othosenine (1)、2-(4-*O*- β -D-glucopyranosyl) syringylpropane-1, 3-diol (2)、刺五加苷 E (3)、紫丁香苷 (4)、异鼠李素-3-*O*- β -D-半乳糖苷 (5)、槲皮素-3-*O*- β -D-鼠李糖苷 (6)、 $\Delta^{5,22}$ -豆甾烯醇 (7)、奥索千里光碱 (8)、异鼠李素 (9)、槲皮素 (10)、咖啡酸乙酯 (11)。其中, 化合物 1 和 2 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 3、4、7 和 11 为首次从该种中分离得到。化合物 1 为一个新的天然产物, 其核磁数据为首次报道, 两个吡咯里西啶类生物碱 1 和 8 对人正常肝细胞 L-02 无毒性, 化合物 1、7 和 8 与氟康唑联用, 对白色念珠菌耐药株有显著协同抑菌作用。

关键词: 菊状千里光; 化学成分; 生物碱; 肝细胞毒性; 抗真菌活性

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)12-2035-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.12.007

Chemical constituents and antifungal activity of *Senecio laetus* Edgew.

XIE Xiao-yan, WANG Rui-rui, ZOU Qiu-ping, SU Liu-yan, LI Yan-ping*, HE Hong-ping*

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

Abstract: In order to provide the reference for the further studies of *Senecio laetus* Edgew., we devote to investigate the chemical constituents from the whole plant of *S. laetus*. The silica gel, sephadex LH-20 and MCI gel were used for the isolation and the purification of compounds of the ethanol extract of *S. laetus*. Afterwards, the spectroscopic methods (^1H NMR, ^{13}C NMR) were used for the structural identification. The toxicity of two alkaloids 1 and 8 to hepatocytes were evaluated by MTT. And the antifungal activity was evaluated by agar plate drilling method. Eleven compounds were isolated from ethanol extract of the *S. laetus* and identified as othosenine (1), 2-(4-*O*- β -D-glucopyranosyl) syringylpropane-1, 3-diol (2), eleutheroside E (3), syringin (4), isorhamnetin-3-*O*- β -D-galactoside (5), quercetin-3-*O*- β -D-rhamnoside (6), stigmasta-5, 22-dien-3 β -ol (7), othosenine (8), isorhamnetin (9), quercetin (10), caffeoyl acetate (11). Compounds 1 and 2 were isolated for the first time from the genus *Senecio*, and compounds 3, 4, 7 and 11 were isolated from *S. laetus* firstly. Compound 1 is a new natural product and its NMR data was reported for the first time. The two pyrrolizidine alkaloids 1 and 8 showed no toxicity to normal hepatocytes cell line L-02. Compounds 1, 7 and 8 showed excellent synergistic antibacterial effect on *Candida albicans* resistant strains when combined with fluconazole.

Key words: *Senecio laetus* Edgew.; chemical composition; alkaloids; hepatotoxicity; antifungal activity

菊状千里光 (*Senecio laetus* Edgew.) 为菊科 (Compositae) 千里光属多年生草本植物^[1], 多生于海拔 1 100 ~ 3 750m 的田边、路边和林下, 主要分布

于重庆、西藏、湖北、云贵等地。因其具有活血, 消肿, 祛风, 除湿等功效, 长久以来, 民间常用菊状千里光来治疗肝炎、跌打损伤、瘀积肿痛、乳痛和疮痍肿疡等疾病^[2,3]。近年的药理学研究也表明^[4-9] 菊状千里光具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性。千里光属植物具有丰富的次生代谢产物, 包括生物碱类化合物、黄酮类化合物、萜类化合物、

收稿日期: 2021-02-22 收稿日期: 2021-09-29

基金项目: 云南省应用基础研究项目 (2017FF116 (-003), 2018FF001 (-029), 2019FF002 (-005)); 云南省教育厅科学研究基金 (2015Y316)

* 通信作者 Tel: 86-013064282878; E-mail: hehongping@ yahoo. com, lyp8691@ 163. com

酚酸类化合物和香豆素类化合物等^[2]。其主要成分为吡咯里西啶类生物碱(PAs)和倍半萜类化合物,其中大部分的倍半萜类化合物具有抗炎、抗细菌、抗结核以及抗真菌感染活性,而吡咯里西啶类生物碱常具有肝毒性^[10]。对菊状千里光全草进行了化学成分研究^[11-13],从中分离得到27个化合物,包括3个生物碱、4个甾醇类、5个酚酸类、9个黄酮类、4个有机酸类化合物等。目前对这类植物的化学成分研究报道较少,对菊状千里光活性的研究主要集中于挥发油成分和功能性评价,对其中可能具有肝毒性的生物碱类成分和其他活性成分的研究较少。为进一步阐明菊状千里光的化学成分,明确其活性和毒性成分,我们对采自云南省德宏州的菊状千里光植物进行化学成分研究。此外,我们还评价了部分化合物的抗真菌活性和对肝细胞毒性,以期对菊状千里光植物药用资源的合理安全性开发利用提供科学的依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器及试剂

PrecisaXS125A 分析天平(瑞士普利赛斯公司);ZF8 三用紫外分析仪(上海康华生化仪器制造厂);BUCHIRotavaporR-205 型旋转蒸发器(瑞士步琪有限公司);AS2005 中压制备液相仪(江苏汉邦科技有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);PH050 型干燥箱(上海益恒实验仪器有限公司);BUCHI Heating BachB-490 型电热恒温水浴锅(瑞士步琪有限公司);Bruker AM-400 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)。薄层色谱及柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂);MCI Gel CHP-20P 为日本三菱化工;羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20 凝胶)为 Pharmacia 公司进口分装;十八烷基键合硅胶(Rp-18)为日本富士硅化工产品。所有试剂均为分析纯。氟康唑(南昌弘益药业有限公司,50 mg,171128);DMSO 溶剂(MP Biomedicals, LLC, 100 mL, Q6949);沙氏液体培养基(广东环凯微生物科技有限公司,250 g,1069251);念珠菌临床耐药株 23[#](由昆明医科大学第一附属医院李玉叶教授赠送)按常规方法复苏,划线培养于 4 ℃ 下保存。

CO₂ 细胞培养箱(Thermo Electron Corporation);酶标仪(M200 PRO 多功能酶标仪);台式离心机(上海医疗器械有限公司手术器械厂);水处理超滤器(Millipore 公司);荧光倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);

正常人肝 L-02 细胞(购自中国科学院昆明动物研究所);胎牛血清(Hyclone);RPMI-1640(美国 Gibco Invitrogen 公司);胰蛋白酶(美国 Amresco 公司);沙堡氏液体培养基。所有试剂均为分析纯。

植物样品菊状千里光全草(晒干)15 kg 于 2016 年 9 月采于德宏州盈江县铜壁关乡茶山寨。经昆明植物研究所刘思德鉴定为菊状千里光,标本(标本号:201609)保存于云南中医药大学中药学院中药化学实验室。

1.2 提取与分离

菊状千里光干燥全草 15 kg,粉碎(80 目)后用 80% 乙醇室温下浸提 4 次,每次 24 h,合并提取液,减压浓缩得浸膏 4.3 kg。用 2.5% HCl 调 pH = 2,得滤液和沉淀(A)836 g。滤液经氯仿萃取,得氯仿部分(B)80 g。水相用 NaOH 调 pH = 10 后,分别用氯仿和正丁醇萃取得到氯仿部分(C)33 g 和正丁醇部分(D)2.0 kg。A 部分(836 g)经 MCI 色谱,用甲醇-水(3:7→9:1)梯度洗脱,得到 A1 ~ A4 部分。A1 (5.8 g)用硅胶柱层析(氯仿-甲醇,20:1→1:1)分离,然后用 Sephadex LH-20 柱层析(氯仿-甲醇,1:1)纯化,得到 **9**(10.0 mg)和 **11**(14.2 mg)。通过对组分 A2 (3g)经硅胶(氯仿-丙酮,40:1→1:1)和 Sephadex LH-20 柱层析(氯仿-甲醇,1:1)得到化合物 **10**(4.9 mg)。A3 (5.8 g)采用硅胶柱以石油醚-丙酮(15:1、10:1、5:1、1:1)洗脱,通过薄层色谱点板合并得到 A3-1 ~ A3-3。A3-2 以制备型高效液相进行分离纯化,选择较适合 A3-2 的 HPLC 分离条件是:色谱柱 Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 9.4 mm, 5 μm);检测波长:210 nm;流动相:甲醇-水(40:60, V/V);流速:3 mL/min 等度洗脱,得到 **4**(6.8 mg, *t_R* = 16.8 min)和 **5**(5.1 mg, *t_R* = 21.6 min)。B 部分先采用硅胶柱层析以氯仿-甲醇(25:1→1:1)为洗脱剂进行梯度洗脱,从氯仿-甲醇(15:1)洗脱部位得到化合物 **6**(6.0 mg)。C 部分(30 g)用硅胶柱以氯仿-丙酮(35:1、25:1、15:1、8:1、3:1)进行梯度洗脱,得到 C1 ~ C5 部分。化合物 **7**(11.8 mg)和 **8**(9.7 mg)从 C3-1 中通过重复硅胶柱色谱氯仿-甲醇(40:1→10:1)获得。D 部分用 D101 以水和 30%、60%、90% 和 100% 的甲醇进行洗脱得到 D1 ~ D4,其中 D2 (5.7 g)经 RP-18 色谱,用甲醇-水(20%→90%)洗脱,然后用 Sephadex LH-20 色谱(氯仿-甲醇,1:1)纯化,得到 **1**(4.5 mg)和 **2**(7.1 mg)。组分 D3 在硅胶上用石油醚-丙酮(10:1)和甲醇(45%→70%,

3 mL/min) 进行色谱分析后得到化合物 **3** (11.5 mg), 其中液相分析制备条件: 色谱柱 Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 9.4 mm, 5 μm); 检测波长: 210 nm; 流动相: 甲醇-水 (45: 55, V/V); 流速: 3 mL/min 等度洗脱。

1.3 抑菌实验方法

取 96 孔板, 将阳性药物氟康唑稀释为初浓度 1 mg/mL, 待测化合物样品用沙氏液体培养基稀释为 1 mg/mL 的加载液, 检测联合用药时, 浓度加倍, 体积减半, 然后进行 5 倍倍比稀释, 共设置 6 个浓度梯度, 每个浓度设 3 个复孔。各孔加入测试真菌悬液, 其中白色念珠菌标准株浓度为 1×10^5 CFU/mL, 白色念珠菌耐药株浓度为 1×10^5 CFU/mL, 于 37 °C 培养 24 h。酶标仪测定 625 nm 下的 OD 值。实验同时设置培养基对空白对照、菌液对照以及氟康唑阳性药物对照。

$$\text{真菌活性抑制率} = (1 - \text{样品 OD 值} / \text{实验对照孔 OD 值}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{联合指数 (FICI)} = EC_A / A + EC_B / B \quad (2)$$

公式(2)中 A 和 B 分别为两药单用时的 EC₅₀ 值, EC_A 和 EC_B 分别为两药联合时的 EC₅₀ 值。当 EC 值高于检测最高限时以做高限浓度的两倍值用以计算 FICI。本实验中 EC₅₀ 值的计算以氟康唑的最小真菌生长 50% 时的抑制百分数来计算。当 FICI ≤ 0.5 时, 表示两药的作用方式为协同; 当 0.5 < FICI ≤ 4 时, 表示两药的作用方式为无关; 当 FICI > 4 时, 表示两药的作用方式为拮抗。

1.4 细胞存活率测定

人正常肝细胞株 L-02, 于 37 °C 水浴复苏。用含 10% FBS (胎牛血清)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。取培养第 3 代的对数期细胞, 用胰蛋白酶消化, 以 2×10^4 /mL 的细胞密度接种于 96 孔板, 设置 5 个复孔, 培养 48 h 后给予分离得到的生物碱化合物样品, 培养 24 h 后用 MTT 法于 570 nm 波长测 OD 值, 计算细胞的存活率以评价生物碱的毒性。

$$\text{细胞存活率} = (\text{给药组平均 OD 值} / \text{正常对照组平均 OD 值}) \times 100\%$$

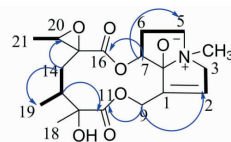
2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 **1** 白色无定型粉末; (+) ESI-MS: m/z 382 [M + H]⁺, HR-ESI-MS (m/z 382.186 4 [M +

H]⁺, calcd for C₁₉H₂₈NO₇, 382.186 6), 确定分子式 C₁₉H₂₇NO₇, 不饱和度为 7。¹H NMR 图谱表明分子中存在 4 个甲基信号 [δ_H 2.33 (3H, s), 1.36 (3H, s), 0.95 (3H, s), 1.25 (3H, d, J = 4 Hz)] 和 4 个次甲基信号, 其中包括 1 个连氧次甲基信号为 [δ_H 3.05 (1H, s)], 1 个端基碳的次甲基信号为 [δ_H 6.20 (1H, br s)]。¹³C NMR 和 DEPT 谱图显示 19 个碳原子, 包括 4 个甲基 (1 个连氮的甲基), 5 个亚甲基, 4 个次甲基和 6 个季碳。化合物的 ¹H NMR、¹³C NMR 和 DEPT 谱显示该化合物有 2 个羰基信号 [δ_C 178.3 (s), 170.4 (s)], 1 个双键碳信号 [δ_H 6.20 (1H, br s); δ_C 136.7, 135.2], 1 个连氮的甲基信号为 [δ_H 2.33 (3H, s); δ_C 43.3] 和一个连氧季碳信号 [δ_C 160.1] (见表 1)。结合上述数据发现化合物 **1** 与已知化合物 ligularizine^[14] 的非常相近, 最大的不同在于它们的 C-12 位取代基和 C-8 位取代基不同, 表现在谱图中化合物 **1** 的 C-12 为羟基取代, 而 C-8 位同时连接氮原子和氧负离子, 表现为化学位移值在 δ_C 160.1。以上波谱数据结合 HSQC、HMBC、¹H-¹H COSY 谱确定化合物 **1** 为 othosenzhe。化合物 **1** 的相对构型通过 ROESY 相关谱及与文献报道核磁数据比对来确定。从 ROESY 谱中 H-4 与 H-18、H-19 及 H-21 的相关, 表明 H-4、H-18、H-19、H-21 为 β 构型; C19-OH 为 α 构型。故化合物 **1** 鉴定为 othosenine (结构见图 1)。

化合物 **2** 白色粉末状结晶 (甲醇); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ: 6.52 (1H, s, H-6'), 6.52 (1H, s, H-2'), 4.83 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-1''), 3.74 (6H, s, 3'/5'-OCH₃), 3.58 (1H, m, H-1a), 3.67 (1H, m, H-1b), 3.58 (1H, m, H-3a), 3.67 (1H, m, H-3b), 3.41 (1H, dd, J = 11.5, 5.7 Hz, H-6''a), 3.61 (1H, dd, J = 11.5, 21 Hz, H-6''b), 3.19 (1H, m, H-3''), 3.19 (1H, m, H-5''), 3.15 (1H, m, H-4''), 3.03 (1H, m, H-3''), 2.71 (1H, m, H-2); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 150 MHz) δ: 152.2 (C-3'), 152.2 (C-5'), 137.9



— ¹H-¹H COSY HMBC

图 1 化合物 **1** 的化学结构及关键相关

Fig. 1 Structure and key correlations of compound **1**

表1 化合物1在CD₃OD中的¹H(400 MHz)和¹³C(100 MHz)NMR数据

Table 1 ¹H (400 MHz) and ¹³C (100 MHz) NMR data of compound 1 in CD₃OD

No.	δ _H	δ _C
1		136.8
2	6.20, br s	135.2
3a	3.82, br d, <i>J</i> = 12.0 Hz	62.2
3b	3.66, br d, <i>J</i> = 12.0 Hz	
N-CH ₃	2.33, s	43.3
5a	3.29, m	58.0
5b	3.07, m	
6	2.25, m	36.4
7	4.90, br t	80.7
8		164.1
9a	5.47, d, <i>J</i> = 12.0 Hz	62.2
9b	4.24, d, <i>J</i> = 12.0 Hz	
11		178.4
12		79.0
13	1.95, m	40.5
14a	2.20, d, <i>J</i> = 12.0 Hz	37.4
14b	1.15, d, <i>J</i> = 12.0 Hz	
15		66.0
16		170.4
18-Me	1.36, s	25.0
19-Me	0.95, s	13.3
20	3.05, s	57.9
21	1.25, d, <i>J</i> = 4.0 Hz	14.5

(C-1'), 133.2 (C-4'), 106.7 (C-2', 6'), 103.0 (C-1''), 77.1 (C-3''), 76.5 (C-5''), 74.2 (C-2''), 69.9 (C-4''), 62.7 (C-1, 3), 60.9 (C-6''), 56.4 (3'/5'-OCH₃), 50.7 (C-2)。以上数据与文献^[11]报道的数据基本一致,故化合物2鉴定为2-(4-*O*-β-D-glucopyranosyl) syringylpropane-1,3-diol。

化合物3 白色粉末状结晶(甲醇);¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 6.65 (4H, s, H-2, 2', 6, 6'), 4.96 (2H, d, *J* = 12.0 Hz, H-1'', 1'''), 3.74 (12H, s, 3, 5, 3', 5'-OCH₃), 3.60 (2H, dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, Hb-6'', 6'''), 3.53 (2H, dd, *J* = 3.4, 0.9 Hz, Ha-6'', 6'''), 3.41 (2H, m, H-4'', 4'''), 3.40 (2H, m, H-2'', 2'''), 3.37 (2H, m, H-3'', 3'''), 3.15 (2H, m, H-5'',

5'''); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 152.9 (C-3, 3', 5, 5'), 137.6 (C-1, 1'), 133.9 (C-4, 4'), 104.7 (C-2, 2', 6, 6'), 103.1 (C-1'', 1'''), 85.5 (C-7, 7'), 77.7 (C-5'', 5'''), 77.0 (C-3'', 3'''), 74.6 (C-2'', 2'''), 71.8 (C-9, 9'), 70.2 (C-4'', 4'''), 61.0 (C-6'', 6'''), 55.8 (3, 5, 3', 5'-OCH₃), 54.1 (C-8, 8')。以上数据与文献^[15]报道的数据基本一致,故化合物3鉴定为刺五加苷E。

化合物4 白色无定型粉末;¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 6.72 (2H, s, H-3, 5), 6.45 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7), 6.35 (1H, dt, *J* = 16.0, 5.5 Hz, H-8), 4.10 (2H, d, *J* = 5.5 Hz, H-9), 3.77 (6H, s, 2, 6-OCH₃), 4.75 (1H, s, H-1'), 3.74 (1H, dd, *J* = 11.2, 1.8 Hz, H-6'a), 3.58 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.0 Hz, H-6'b), 3.42 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-2'), 3.40 (2H, m, H-3', 4'), 3.18 (1H, m, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 153.2 (C-2, 6), 134.4 (C-7), 133.1 (C-1), 130.6 (C-4), 128.9 (C-8), 105.0 (C-3, 5), 103.8 (C-1'), 77.7 (C-5'), 77.1 (C-3'), 74.6 (C-2'), 70.4 (C-4'), 61.9 (C-9), 61.5 (C-6'), 56.8 (OCH₃)。以上数据与文献^[12]报道的数据基本一致,故化合物4鉴定为紫丁香苷。

化合物5 黄色粉末状结晶(甲醇);¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.62 (1H, s, 5-OH), 8.03 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.50 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.45 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.50 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, galactose-1''), 3.85 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.35-3.61 (6H, m, galactose); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100MHz) δ: 177.9 (C-4), 164.6 (C-7), 161.7 (C-5), 156.8 (C-2), 156.3 (C-9), 149.9 (C-3'), 147.5 (C-4'), 133.6 (C-3), 122.3 (C-6'), 121.5 (C-1'), 115.6 (C-5'), 114.0 (C-2'), 104.5 (C-10), 102.1 (C-1''), 99.2 (C-6), 94.2 (C-8), 76.3 (C-5''), 73.4 (C-3''), 71.1 (C-2''), 68.3 (C-4''), 60.9 (C-6''), 56.4 (OCH₃)。以上数据与文献^[11]报道的数据基本一致,故化合物5鉴定为异鼠李素-3-*O*-β-*D*-半乳糖苷。

化合物6 黄色粉末状结晶(甲醇);¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.64 (1H, s, 5-OH), 10.86 (1H, s, 7-OH), 9.70 (1H, s, 4'-OH), 9.34 (1H, s, 3'-OH), 7.30 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.27 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-

5'), 6.37(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.23(1H, d, $J = 1.4$ Hz, Rha-H"-1), 0.83(3H, d, $J = 5.8$ Hz, Rha-H"-6); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 177.9(C-4), 164.6(C-7), 161.8(C-5), 156.8(C-2), 156.7(C-9), 148.9(C-4'), 145.3(C-3'), 133.6(C-3), 122.4(C-6'), 121.6(C-1'), 116.4(C-5'), 115.6(C-2'), 104.4(C-10), 102.3(C-1''), 99.1(C-6), 94.0(C-8), 71.7(C-4''), 71.0(C-3''), 70.5(C-5''), 70.2(C-2''), 17.9(C-6''). 以上数据与文献^[13]报道的数据基本一致,故化合物**6**鉴定为槲皮素-3-*O*- β -D-鼠李糖苷。

化合物 7 白色粉末状结晶(氯仿); ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.34(1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-6), 5.16(1H, dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, H-22), 5.01(1H, dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, H-23), 3.52(1H, m); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100 MHz) δ : 140.8(C-5), 138.3(C-23), 129.3(C-22), 121.7(C-6), 71.8(C-3), 56.9(C-14), 56.0(C-17), 51.2(C-24), 50.1(C-9), 42.3(C-13, 4), 40.5(C-20), 39.7(C-12), 37.3(C-1), 36.5(C-10), 31.9(C-2, 7, 8, 25), 28.9(C-16), 25.4(C-28), 24.4(C-15), 21.2(C-21), 21.1(C-11, 26), 12.1(C-18, 29), 19.4(C-19), 19.0(C-27)。以上数据与文献^[16]报道的数据基本一致,故化合物**7**鉴定为 $\Delta^{5,22}$ -豆甾烯醇。

化合物 8 白色粉末(氯仿); ^1H NMR(CDCl_3 , 600 MHz) δ : 6.11(1H, br s, H-2), 5.47(1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-9a), 5.09(1H, br s, H-7), 4.33(1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-9b), 3.42(1H, br d, $J = 18.1$ Hz, H-3a), 3.28(1H, br d, $J = 18.1$ Hz, H-3b), 2.98(1H, q, $J = 5.4$ Hz, H-20), 2.90(1H, m, H-5a), 2.61(2H, m, H-5b, 6a), 2.22(1H, m, H-6b), 2.13(1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-14), 2.06(3H, s, N-Me), 1.91(1H, dq, $J = 6.6, 11.0$ Hz, H-13), 1.33(3H, s, Me-18), 1.23(3H, d, $J = 5.4$ Hz, Me-21), 1.14(3H, d, $J = 6.3$ Hz, Me-19); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 150 MHz) δ : 191.9(C-8), 177.8(C-11), 167.9(C-16), 137.2(C-2), 134.3(C-1), 78.4(C-7), 77.2(C-12), 64.3(C-9), 63.7(C-15), 58.8(C-3), 56.0(C-20), 53.0(C-5), 40.0(N-Me), 38.5(C-13), 37.1(C-14), 35.6(C-6), 23.9(C-18), 13.5(C-21), 12.4(C-19)。以上数据与文献^[11]报道基本一致,故鉴定化合物**8**为奥索千里光碱。

化合物 9 黄色粉末; ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400

MHz) δ : 7.76(1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.69(1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, H-6'), 6.94(1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.48(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.85(3H, s, 3'-OCH₃); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 183.4(C-4), 164.8(C-7), 163.4(C-2), 161.5(C-5), 157.3(C-9), 149.4(C-4'), 146.9(C-3'), 121.9(C-1'), 121.6(C-6'), 115.2(C-5'), 113.2(C-2'), 104.2(C-3), 103.6(C-10), 99.0(C-6), 93.8(C-8), 59.8(-OCH₃)。以上数据与文献^[11]报道基本一致,故鉴定化合物**9**为异鼠李素。

化合物 10 淡黄色粉末; ^1H NMR($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz) δ : 12.16(1H, s, 5-OH), 7.83(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.70(1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 7.00(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.53(1H, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.27(1H, $J = 1.6$ Hz, H-6); ^{13}C NMR($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 100 MHz) δ : 175.5(C-4), 164.1(C-7), 160.2(C-5), 156.8(C-9), 146.0(C-2), 144.9(C-3'), 122.8(C-1'), 120.5(C-6'), 115.2(C-2'), 147.3(C-4'), 114.8(C-5'), 102.4(C-10), 98.2(C-6), 93.5(C-8), 35.7(C-3)。以上波谱数据与文献^[11]报道基本一致,故鉴定化合物**10**为槲皮素。

化合物 11 无色方晶; ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7.50(1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.06(1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 7.00(1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.78(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.30(1H, d, $J = 16$ Hz, H-8), 4.17(2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-OCH₂CH₃), 1.25(3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-OCH₂CH₃); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 167.0(C-9), 148.9(C-3), 146.1(C-4), 145.5(C-7), 126.6(C-6), 121.8(C-1), 116.2(C-2), 115.3(C-5), 114.5(C-4), 60.2(C-10), 14.7(C-11)。以上波谱数据与文献^[17]报道基本一致,故鉴定化合物**11**为咖啡酸乙酯。

2.2 化合物对白色念珠球菌的抑菌活性

结果表明,氟康唑对白色念珠球菌的敏感菌株抑制活性显著,但对耐药菌株无效。菊状千里光中化合物单独使用时,对白色念珠菌敏感株和耐药株均无抑制作用,然而,当与氟康唑联合使用时,化合物**7**对白色念珠菌敏感株有显著的协同抑菌作用,其联合指数 FICI₅₀分别为 0.008 6, 化合物**1**和**8**对白色念珠菌耐药菌株有显著的协同抑菌作用,其联合指数 FICI₅₀分别为 0.004 4 和 0.012 4,为极好的

协同抑菌作用(见表2)。

表2 菊状千里光中化合物与阳性对照对白色念珠菌的抑制活性表

Table 2 Inhibitory activity of compounds in *S. laetus* and positive control against *C. albicans*

样品 Sample	EC ₅₀ (μg/mL)		FICI ₅₀	
	敏感菌 Sensitive bacteria	耐药菌 Drug resistant bacteria	敏感菌 Sensitive bacteria	耐药菌 Drug resistant bacteria
氟康唑 Fluconazol (FLUCZ)	2.11	>1 000		
2	>1 000	>1 000		
FLUCZ + 2	3.46	>1 000	1.64	
7	>1 000	>1 000		
FLUCZ + 7	2.85	>1 000	0.008 6	
1	>1 000	>1 000		
FLUCZ + 1	3.48	4.40	1.65	0.004 4
8	>1 000	>1 000		
FLUCZ + 8	3.96	12.37	1.88	0.012 4
9	>1 000	>1 000		
FLUCZ + 9	4.09	>1 000	1.94	
10	>1 000	>1 000		
FLUCZ + 10	3.90	>1 000	1.85	

2.3 菊状千里光中两个生物碱化合物的肝毒性评价

两个生物碱(化合物**1**和**8**)对L-02细胞存活率影响的评价结果表明化合物**1**对细胞生长无明显

影响;化合物**8**有一定的促进细胞生长作用(见表3)。以上结果表明在细胞水平两个生物碱均无肝细胞毒性。

表3 菊状千里光中生物碱对L-02细胞存活率影响

Table 3 Effects of alkaloids from *S. laetus* on the survival rate of L-02 cells

指标 Index	1		8	
给药浓度 Dose concentration (μg/mL)	50	100	50	100
细胞存活率 Cell survival rate	98.3%	103.3%	108.5%	105.5%

3 讨论与结论

近年来,由于癌症发病率升高,肿瘤患者的增加,放疗、化疗、免疫抑制剂等治疗手段的应用,使得临床上严重真菌感染的病例不断增加,在全球的念珠菌感染病例中,白色念珠菌(*Candida albicans*)是最为主要的感染病原菌之一,氟康唑作为抗真菌的一线药物,对白色念珠球菌的敏感菌治疗效果显著,然而随着真菌耐药性的普遍产生,使得治疗越发困难。因此寻找与现有抗真菌药物联合应用,发挥协同抗真菌作用的药物是对抗耐药真菌感染行之有效的方

法之一。我们前期对云南道地药材菊状千里光挥发油进行了抗真菌活性检测和GC-MS化学成分分析,发现菊状千里光挥发油具有极好地协同抑菌

活性^[18]。进一步对菊状千里光全草的乙醇提取物中得到的部分化合物及其抗真菌活性进行了系统的研究,结果发现其中两个生物碱和两个甾体类化合物与氟康唑联用时表现出极好的协同抑菌作用。千里光属中草药,我国约有160余种,其中药用品种有10多种,早在一千多年前,《本草拾遗》中就有记载千里光“味苦,平,小毒”^[19],迄今为止,国内外的一些文献记载千里光属中草药可能含有不同程度的吡咯里啶生物碱(PAs),这种生物碱被认为对人及动物的器官有一定致损伤的毒性,特别是对肝组织有明显的肝毒性,可能引起肝细胞出血性坏死,肝巨细胞症以及静脉闭塞症等。我们的研究从菊状千里光的全草中分离得到了两个吡咯里啶生物碱,

但这两个化合物对正常的肝细胞并未表现出毒性,也未见对这个吡咯里啶生物碱肝毒性的报道,然而作为云南民间常用药材,菊状千里光的用药安全性仍需对其鲜品、干品以及不同药用部位和不同给药方式做进一步的毒性评价。

参考文献

- 1 Ali SI, Gopalakrishnan B, Venkatesalu V. Evaluation of larvicidal activity of *Senecio laetus* Edgew. against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and *Bancroftian filariasis* vector, *Culex quinquefasciatus*-Science-Direct[J]. S Afr J Bot, 2018, 114:117-125.
- 2 Tian XY. Studies on the bioactive constituents of four Chinese traditional and herbal medicines[D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College(中国医学科学院中国协和医科大学研究生院), 2006.
- 3 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:33.
- 4 Liang AH, Ye ZG. General situation of the toxicity researches on *Senecio*[J]. J Tradit Chin Med(中国中药杂志), 2006, 31:93-97.
- 5 He LX. Study on the toxicity of *Senecio faberii* Hemsl[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University(四川农业大学), 2013.
- 6 Wang XK. Hepatotoxicity of *Senecio scandens*[D]. Beijing: Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine(中国中医科学院), 2008.
- 7 Yao G, Liang TQ, Zhang H, et al. The influence of ethanol extraction of *Senecio scandens* collected in Guizhou on the viscera quality and organ coefficient[J]. J Guizhou Univ Tradit Chin Med(贵州中医药大学学报), 2020, 42:29-33.
- 8 Feng Q, Li XY, Sun R. Advance research on pharmacological effect and toxicity of *Senecio scandens*[J]. Chin J Pharmacov(中国药物警戒), 2014, 3:151-157.
- 9 Jiang KY, Ye XL, Xiong F, et al. The protective effects and mechanism of *Alismatis Rhizoma* extracts against senecionine-induced acute liver injury in mice[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2021, 2:1-13.
- 10 Wu B, Wu LJ. Advances in studies on chemical constituents of *Senecio*[J]. J Tradit Chin Med(中国中药杂志), 2003, 28(2):6-9.
- 11 Zhang CF, Jin J, Zhang M. Studies on chemical constituents of *Senecio laetus* Edgew[J]. J Chin Pharm Sci(中国药学杂志), 2008, 43:1214-1217.
- 12 Jin J, Zhang CF, Zhang M. Studies on the constituents of *Senecio laetus* Edgew[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2007, 9(7):13-14.
- 13 Li L, Zhang CF, Zhang M. Phenolic constituents from the herb of *Senecio laetus*[J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2009, 17:294-297.
- 14 Urones JG, Barcala PB, Marcos IS, et al. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio gallicus* and *S. adonidifolius*[J]. Phytochemistry, 1988, 27:1507-1510.
- 15 Li SH. Chemical constituents of *Gendarussa vulgaris*[J]. Chin Tradit Herb Med(中草药), 2018, 49:3998-4002.
- 16 Mou MY, Zhang QJ, Kang WY, et al. Chemical constituents and bioactivity of *Teucrium pilosum*[J]. J Tradit Chin Med(中国中药杂志), 2009, 34:2189-2193.
- 17 Li YZ, Wen YZ, Yang XZ, et al. Chemical constituents from ethyl acetate extract of *Eupatorium adenophorum*[J]. Chin Tradit Herb Med(中草药), 2020, 51:932-936.
- 18 Xie XY, Shi XB, Su LY, et al. GC-MS analysis and antifungal activity of essential oils from aerial parts of *Senecio laetus* Edgew. of Yunnan Province[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2021, 39(2):98-101.
- 19 Chen LX, Li N, Zhang M. Study of the *Senecio scandens* Buch-Ham[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2006, 18:13-16.