

牛膝菊中的萜类及甾醇类成分*

潘争红¹, 赵 楠¹, 黄 荣¹, 马国义², 李祖强¹

(1. 云南大学 化学学院, 云南 昆明 650091; 2. 悉尼大学 药理学系, 澳大利亚)

摘要:在细胞毒试验结果指导下,同步对牛膝菊(*Galinsoga parviflora*)全株的有效部位进行化学成分分离纯化,得到7个化合物,通过理化数据测定及波谱数据分析,鉴定了化学结构,分别是:对映-贝壳杉-16-烯-19-酸(1);对映-15-当归酰氧基-16-贝壳杉烯-19-酸(2);对映-15-当归酰氧基-16,17-环氧-19-贝壳杉烷酸(3);豆甾醇(4);-菠甾醇(5);-菠甾醇硬脂酸酯(6);-谷甾醇(7)。同时,细胞毒试验表明,牛膝菊的氯仿及乙酸乙酯提取物有一定细胞毒性,其 IC_{50} 分别为8.5,10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词:牛膝菊;细胞毒性;萜烯;甾醇

中图分类号:Q 949.758.5;Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2007)06-0613-04

牛膝菊(*G. parviflora* Cav. Ic. et Descr.)^[1]为菊科(Compositae)牛膝菊属(*Galinsoga* Ruiz)植物,又名辣子草、铜锤草、珍珠草、向阳花。牛膝菊属植物主要分布于热带美洲,全世界共有5个种,我国有2个种,牛膝菊仅分布于西南地区的云南、四川、贵州等省^[2]。

牛膝菊全株可入药,民间用于治疗各种疾病,有止血、消炎(扁桃体炎、咽喉炎、急性黄疸肝炎)等功效。本课题组通过细胞毒试验,发现其有一定的细胞毒活性。关于该植物的化学成分及抗癌活性,国内外尚无人报道。

本文的化学成分研究是在抗癌活性药理筛选结果指导下进行的。用HL60(人白血病)细胞对牛膝菊的95%乙醇提取物及溶剂分步提取的组分进行细胞毒性筛选试验的结果表明,氯仿和乙酸乙酯分步提取的组分有一定的细胞毒性,其 IC_{50} 分别为8.5,10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对有活性的氯仿和乙酸乙酯组分进行分离纯化,得到18个单体。通过理化数据测定及1D-和2D-NMR及MS等波谱分析,鉴定出其中的7个萜类及甾醇类化合物,分别是:对映-贝壳杉-16-烯-19-酸(1);对映-15-当归酰氧基-16-贝壳杉烯-19-酸(2);对映-15-

当归酰氧基-16,17-环氧-19-贝壳杉烷酸(3);豆甾醇(4);-菠甾醇(5);-菠甾醇硬脂酸酯(6);-谷甾醇(7)。化合物1~7均为首次从该植物中分离得到。

1 实验部分

1.1 仪器和材料 熔点用北京第三光学仪器厂X-6型显微熔点测定仪测定,温度未校正。NMR用Brucker公司Avance DRX 500型核磁共振仪测定,TMS为内标。MS用英国VG公司Auto spec-3000型质谱仪测定。柱层析用粗硅胶(0.075~0.037 mm)为青岛海洋化工厂产品,细硅胶(40~60 μm)及TLC硅胶片(F254)为Merck公司产品。

牛膝菊采自云南省石屏县,由云南大学胡志浩教授鉴定,拉丁学名为*Galinsoga parviflora* Cav. Ic. et Descr.

1.2 分离提取 干燥的牛膝菊全株10 kg,95%乙醇浸泡30 d,提取浸膏(A_0 ,950 g),用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、及甲醇分步萃取,得组分 A_1 , A_2 , A_3 , A_4 。对 A_1 (155 g)及细胞毒试验筛选有活性的组分 A_2 和 A_3 ($m_2 = 105 \text{ g}$, $m_3 = 100 \text{ g}$),用硅胶多次柱层析,以石油醚-乙酸乙酯-甲醇作洗脱剂,得

* 收稿日期:2007-07-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(29962004)。

作者简介:潘争红(1979-),男,广西人,硕士生,主要从事天然药物成分方面的研究。

通讯作者:李祖强(1943-),男,云南人,教授,主要从事抗癌活性天然药物成分研究。

A_{1a} ~ A_{5a}, A_{1b} ~ A_{7b}, A_{1c} ~ A_{7c} 等 19 个组分. 分别用 (0.075 ~ 0.037 mm) 硅胶为吸附剂, 以 (石油醚/乙酸乙酯/甲醇) 为洗脱剂梯度洗脱或用细硅胶真空抽提层析再重结晶, 纯化得 18 个单体. 其中从 A_{5b} 柱中梯度洗脱、重结晶得化合物 1, 2, 从合并的 (A_{7b}, A_{1c}) 柱中分离纯化得化合物 2, 3, 从合并的 (A_{5a}, A_{1b}) 柱中分离纯化得化合物 4, 5, 6, 从 A_{2b} 柱中分离纯化得化合物 6, 7.

1.3 细胞毒性试验 分别称取 10 mg 的 A₀, A₁, A₂, A₃, A₄ 等 5 个样品, 用二甲亚砜配成 0, 1, 10, 100 μg/mL 溶液, 置于培养瓶中, 分别加入含有等数目 HL60 (人白血病) 细胞的 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基, 保存在 5% CO₂ 的 37 的恒温箱内. 分别在 12, 24, 48, 72 h 的时间段, 观察细胞生长情况, 最后用染料排斥试验法计算对 HL60 细胞生长抑制率. 体外试验在悉尼大学癌症医学系药理实验室实施.

2 结果与讨论

2.1 细胞毒活性 牛膝菊的粗提物 (A₀) 及其分步提取组分 (A₁, A₂, A₃, A₄) 的 IC₅₀ 分别为 18, 25.8, 8.5, 10.5, 50.1 μg/mL. 结果表明, 氯仿及乙酸乙酯提取组分有一定的细胞毒活性.

2.2 结构鉴定 化合物 1, 白色针状晶体, m. p. 166 ~ 168 (CH₃OH). 结合 ESI-MS m/z : 303 [M + H]⁺ 及 ¹H, ¹³C NMR 和 DEPT 谱得分子式 C₂₀H₃₀O₂, 其不饱和度为 6. ¹³C NMR 和 DEPT 谱 (见表 1) 显示有: 3 个 CH, 2 个 CH₃, 10 个 CH₂, 5 个季碳. 其中 184.12 是羧酸羰基 (COOH) 信号, 155.91 (C) 和 103.01 (CH₂) 表明有环外双键存在, 去除羰基和双键, 还有 4 个不饱和度, 且碳的吸收峰均在高场都是饱和碳, 可以推断含有 4 个环, ¹³C NMR 和 ¹H NMR 谱数据与文献 [3, 4] 对照基本一致, 可确定化合物 1 是一个贝壳杉烯型二萜类化合物, 命名为对映 - 贝壳杉 - 16 - 烯 - 19 - 酸 (ent - kaur - 16 - en - 19 - oic acid). 此化合物是首次从牛膝菊属植物中分离得到.

化合物 2, 白色晶 m. p. 198 ~ 199. ESI-MS m/z : 401 [M + H]⁺ 及 ¹H, ¹³C NMR 和 DEPT 谱得分子式 C₂₅H₃₆O₄, ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7.27 (1H, s, COOH), 6.06 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, H - 3), 5.36 (1H, s, H - 15), 5.13 (2H, s, H - 17), 2.79 (1H, s, H - 13), 2.16 (2H, d, H - 3), 1.98

(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H - 4), 1.88 (3H, s, H - 5), 1.23 (3H, s, H - 18), 1.28 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H - 9), 1.12 (1H, t, $J = 12.2$ Hz, H - 5), 0.96 (3H, s, H - 20); ¹³C NMR 和 DEPT 谱 (见表 1) 显示有: 5 个 CH (包括在 1 个双键 CH), 4 个 CH₃, 9 个 CH₂ (包括在 1 个环外双键), 7 个季碳 (包括在 2 个羰基). 去除 2 个双键和 2 个羰基, 还剩 4 个不饱和度, 通过对比化合物 2 和 1 的 ¹³C NMR 图谱, 可见两者具有相似的骨架结构, 区别在于化合物 2 多了 1 个酯 C=O, 1 个 C=CH, 2 个 CH₃, 由 ¹H 6.06 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, H - 3), 1.98 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H - 4) 及与文献 [3] 对照可知, 这是个当归酰基信号; 另外, 15 位碳的化学位移明显向低场移动 (48.98 变成 80.54), 推断化合物 2 为 1 的 15 位当归酰化物. 综上所述, 化合物 2 鉴定为对映 - 15 - 当归酰氧基 - 16 - 贝壳杉烯 - 19 - 酸 (ent - 15 - angeloyloxy - 16 - kauren - 19 - oic - acid) [3, 5]. 此化合物是首次从牛膝菊属植物中分离得到.

化合物 3, 白色片晶, m. p. 234 ~ 235, 结合 ESI-MS m/z : 417 [M + H]⁺ 及 ¹H, ¹³C NMR 和 DEPT 得分子式 C₂₅H₃₆O₅, ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7.27 (1H, s, COOH), 6.06 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, H - 3), 4.80 (1H, s, H - 15), 3.12 (1H, d, Ha - 17), 2.78 (1H, d, H - 17), 2.18 (2H, d, H - 14), 1.98 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H - 4), 1.93 (3H, s, H - 5), 1.24 (3H, s, H - 18), 1.22 (1H, t, H - 9), 1.11 (1H, t, H - 5), 0.98 (3H, s, H - 20); 比较化合物 2 和 3 的 ¹³C NMR 和 DEPT 谱, 见表 1, 区别仅在于化合物 3 比 2 少 1 个 C=CH, 而多了 1 个 CH₂OCH₂ 基团, 再比较 16, 17 位的化学位移, 推断化合物 3 为 2 的 16, 17 位 (端烯) 环氧化物. 与文献 [5] 对照基本一致, 鉴定该化合物为对映 - 15 - 当归酰氧基 - 16, 17 - 环氧 - 19 - 贝壳杉烷酸 (ent - 15 - angeloyloxy - 16, 17 - epoxy - 19 - kauranoic acid). 此化合物首次从牛膝菊中得到.

化合物 4 无色针状晶体, m. p. 168 ~ 170, 由 ESI-MS (m/z): 413 [M + H]⁺, 结合 DEPT 和 ¹³C NMR 可推知其分子式为: C₂₉H₄₈O. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 5.36 (1H, s, H - 6), 5.17 (1H, dd, $J = 15.2, 8.4$ Hz, H - 22), 5.03 (1H, dd, $J = 15.2, 8.4$ Hz, H - 23), 3.55 (1H, m, $J = 4.8$ Hz, H - 3); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) 140.70 (C - 5), 138.33 (C - 22), 129.25 (C - 23), 121.72 (C - 6),

71.80(C-3), 56.86(C-17), 55.93(C-14), 51.24(C-24), 50.13(C-9), 42.30(C-4), 42.21(C-13), 40.52(C-20), 39.67(C-12), 37.25(C-1), 36.51(C-10), 31.89(C-2,8,25), 31.66(C-7), 28.93(C-16), 25.42(C-28), 24.37(C-15), 21.22(C-21), 21.08(C-11,27), 19.41(C-19), 18.98(C-26), 12.27(C-29), 12.05(C-18). ^1H NMR, ^{13}C NMR 数据与文献[6,7]一致, 鉴定化合物 4 为豆甾醇(stigmasterol).

表 1 化合物 1~3 的 ^{13}C NMR 数据($\text{C}, \text{CDCl}_3, 125 \text{ MHz}$)

Tab. 1 ^{13}C NMR data of compound 1-3($\text{C}, \text{CDCl}_3, 125 \text{ MHz}$)

位置	1	2	3
1	40.72 t	40.55 t	40.64 t
2	19.11 t	19.02 t	19.00 t
3	37.83 t	37.64 t	37.63 t
4	43.75 s	43.71 s	43.66 s
5	57.08 d	56.57 d	56.67 d
6	21.85 t	20.73 t	20.67 t
7	41.30 t	37.40 t	36.48 t
8	44.25 s	47.55 s	47.85 s
9	55.14 d	52.93 d	52.91 s
10	39.70 s	39.86 s	39.83 s
11	18.44 t	18.46 t	19.80 t
12	33.12 t	32.65 t	28.89 t
13	43.87 d	42.57 d	41.22 d
14	39.70 t	35.00 t	35.37 t
15	48.98 d	80.54 d	81.95 d
16	155.91 s	155.58 s	66.39 s
17	103.01 t	109.96 t	49.66 t
18	28.97 q	28.85 q	28.89 q
19	184.12 s	184.51 s	184.13 s
20	15.61 q	15.78 q	15.75 q
1		168.05 s	167.95 s
2		128.27 s	128.07 s
3		137.36 d	137.37 d
4		15.78 q	15.97 q
5		20.84 q	20.83 q

化合物 5, 白色粒晶, 由 CI-MS(m/z): 412 $[\text{M}]^+$, IR(cm^{-1}): 3420 显示有羟基吸收峰, 3010 ~ 2780, 1630, 1010 说明有双键存在, 结合 ^1H NMR 可推断其分子式: $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$. ^1H -NMR 谱图数据与 β -菠甾醇^[8,9]对照基本一致, 鉴定此化合物为 β -菠甾醇(β -spinasterol).

化合物 6, 白色蜡状晶体, m.p. 108 ~ 110 °C. Liebermann-Burchard 反应显示为甾体化合物, 由 EI-MS(m/z): 679 $[\text{M}+1]^+$, 结合 DEPT 和 ^{13}C NMR 可推知其分子式为: $\text{C}_{47}\text{H}_{82}\text{O}_2$. IR(cm^{-1}) 显示有羰基存在. 4.65(m, H-3), 5.03(m, H-23), 5.13(m, H-7,22) 是甾体化合物的骨架化学位移. 172.96 显示有酯羰基. 再结合 ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC 对 ^1H -NMR 和 ^{13}C NMR 进一步仔细分析和指认, 上述数据与文献[8]对照基本一致. 鉴定化合物为 β -菠甾醇硬脂酸酯.

化合物 7, 无色针状晶体, m.p. 138 ~ 139 °C, Liebermann-Burchard 反应显示为甾体化合物, 由 EI-MS(m/z): 415 $[\text{M}+1]^+$, 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 可推知其分子式为: $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$. ^1H NMR ($\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}$): 0.68(3H, s, H-18), 0.81(3H, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, H-27), 0.84(6H, s, H-26, H-29), 0.96(3H, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, H-21), 1.00(3H, s, H-19), 3.53(1H, m, H-3), 5.36(1H, m, H-6). ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 图谱与 β -谷甾醇^[10,11]对照基本相同. 故确定其结构为 β -谷甾醇(β -sitosterol).

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 74 卷)[M]. 北京: 科学出版社: 1985.
- [2] 傅立国, 陈潭清, 郎楷永, 等. 中国高等植物(第 11 卷)[M]. 青岛: 青岛出版社, 2005.
- [3] 龚运淮. 天然有机化合物的 ^{13}C 核磁共振化学位移[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1986.
- [4] 龚运淮, 丁立生. 天然产物核磁共振碳谱分析[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2005.
- [5] Ferdinand Bohlmann, Jürgen Ziesche, KING R M, et al. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an ent-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia*[J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(4): 751-756.
- [6] 张晓琦, 戚进, 叶文才. 苍耳茎化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(5): 404-405.

- [7] 张卫东,陈万生,孔德云,等. 中药灯盏细辛化学成分研究() [J]. 第二军医大学学报,2000,21(10):914-916.
- [8] HELLER S R,MIOLINE G W A. EPA/NIH MS Spectral database[M]. Washington. US: Government Printing Office,1979,83-48-7.
- [9] 田晶,肖志艳,陈雅开,等. 夏枯草皂甙 A 的结构鉴定 [J]. 药学学报,2000,35(1):29-31.
- [10] 白素平,范秉琳,闫福林. 东风菜中甾体成分研究 [J]. 新乡医学院学报,2005,22(3):185-187.
- [11] 陆江海,黄勤安,赵玉英,等. 醉鱼草化学成分的研究 [J]. 中草药,2001,32(4):296-299.

Terpenes and sterols from *Galinsoga parviflora*

PAN Zheng-hong¹, ZHAO Lei¹, HUANG Rong¹, MA Guo-yi², LI Zu-qiang¹

(1. Experimental Center, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Faculty of Pharmacy, the University of Sydney, NSW, Australia)

Abstract: The chemical constituents of *Galinsoga parviflora* were studied. Seven compounds were isolated from *G. parviflora* by column chromatographies of sephadex LH-20 and silica gel. Their structures were identified by physical and chemical properties and spectral data analysis. All the seven compounds were isolated from this plant for the first time. These compounds are: ent-kaur-16-en-19-oic acid, ent-15-angeloyloxy-16-kaur-19-oic acid, ent-15-angeloyloxy-16, 17-epoxy-19-kauranoic acid, stigmasterol, -spinasterol, -spinasteryl octadecanate, -sitostel. Cytotoxicity screening of the extracts from *Galinsoga parviflora* Cav was carried out by HL60 cell. Two extractive fractions obtained with chloroform and ethyl acetate possess anti-cancer activities. Their IC₅₀ are 8.5, 10.5 μg/mL respectively.

Key words: *Galinsoga parviflora* Cav.; cytotoxicity; terpenes; sterols

* * * * *

(上接第 612 页)

S-wave velocity structures in both sides of Dayingjiang fault inversed by receiver function

FU Zhu-wu¹, LIU Jian-hua², XU Yi², WEN Li-min¹, XU Wai-fen¹, MA Hong-hu¹

(1. Department of Geophysics, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Institute of Geology and Geophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China)

Abstract: The studied area is 24.2°—25.2°N, 97.5°—98.5°E. The studied five digital seismic stations distributed in the both sides of the Dayingjiang fault in the studied area. The S-wave velocity structures within the depth of 0—100 km beneath five stations are inversed from the broadband teleseismic P waveforms by receiver function. The results show: In the northwest side of the Dayingjiang fault, the depth of Moho is about 38 km, and in the southeast side, the depth of Moho is 40—42 km. The S-wave velocity structures of the crust and upper mantle differ obviously in the both sides of the fault. In the southeast side, there are lower velocity zones in both crust and upper mantle beneath the stations; but in the northwest side, there are lower velocity zones only in the crust beneath the stations. In the studied area, the S-wave velocity structures shows strong horizontal heterogeneity.

Key words: Dayingjiang fault; receiver function; S-wave velocity structure; crust; upper mantle; Yunnan