

紫茎泽兰中的萜类成分研究

宋萍¹, 陈敏玉², 王岩¹, 杨新洲^{2,3}, 梁旭^{2,3*}, 袁经权^{2*}(1.青海民族大学化学化工学院, 西宁 810007; 2. 广西中医药大学, 南宁 530200; 3.中南民族大学药学院, 武汉 430074)

摘要: 目的 对紫茎泽兰中的萜类成分及其药理活性进行研究。方法 采用 D101、HP20 大孔树脂、硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶色谱、高效液相色谱等多种分离分析手段, MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 等多种波谱技术以及 ECD 计算鉴定化合物结构, 并采用 MTT 法对分离得到的单体化合物进行细胞毒活性的筛选。结果 从紫茎泽兰 95%乙醇提取物的石油醚和乙酸乙酯萃取部位中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为泽兰酮 D(1)、thymoquinol 5-*O*- β -glucopyranoside(2)、thymoquinol 2-*O*- β -glucopyranoside(3)、2*R**,3*S**-toxol-7-*O*- β -D-glucopyranoside(4)、6-甲氧基-山柰酚-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(5)、万寿菊素-4'-甲氧基-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(6)、6-hydroxykaempferol-7-*O*- β -D-glucopyranoside(7)、eupatonriochromene(8)、demethoxyencecalin(9)、encecalin(10)。化合物 10 对食管癌细胞的 IC₅₀ 值为 178.4 μ mol·L⁻¹。结论 其中化合物 1 为新化合物, 化合物 6 为首次从泽兰属中分离得到, 化合物 2, 3, 7 为首次从紫茎泽兰中分离得到。化合物 10 对食管癌细胞 Eca-109 具有一定的细胞毒活性。

关键词: 紫茎泽兰; 化学成分; 杜松烷型倍半萜; 活性研究

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)14-1796-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.14.002

引用本文: 宋萍, 陈敏玉, 王岩, 等. 紫茎泽兰中的萜类成分研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(14): 1796-1802.

Study on Terpenoids from *Eupatorium Adenophorum* Spreng.

SONG Ping¹, CHEN Minyu², WANG Yan¹, YANG Xinzhou^{2,3}, LIANG Xu^{2,3*}, YUAN Jingquan^{2*}(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China; 2.Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 3.School of Pharmaceutical Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study on the terpenoids and their pharmacological activities in *Eupatorium adenophorum* Spreng. **METHODS** D101, HP20 macroporous resin, silica gel column chromatography, dextran gel chromatography, high performance liquid chromatography and other methods were used for separation analysis. Their structures were determined by MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR and other spectrographic techniques, as well as ECD calculation. The cytotoxic activity of these compounds were screened by the MTT method. **RESULTS** Ten compounds were isolated from the petroleum ether and ethyl acetate extraction fractions of 95% ethanolic extracts of *Eupatorium adenophorum* Spreng, and they were identified as eupatorinone D(1), thymoquinol 5-*O*- β -glucopyranoside(2), thymoquinol 2-*O*- β -glucopyranoside(3), 2*R**,3*S**-toxol-7-*O*- β -D-glucopyranoside(4), 6-methoxy-kaempferol-7-*O*- β -D-glucoside(5), patuletin-4'-methoxyl-7-*O*- β -D-glucopyranoside(6), 6-hydroxykaempferol-7-*O*- β -D-glucopyranoside(7), eupatonriochromene(8), demethoxyencecalin(9) and encecalin(10). Among them, the IC₅₀ value of compound 10 against esophageal cancer cells was 178.4 μ mol·L⁻¹. **CONCLUSION** Compound 1 is a newcadinane-type sesquiterpene, and compound 6 was isolated from genus *Eupatorium* for the first time, compounds 2, 3 and 7 were isolated from *Eupatorium adenophorum* Spreng for the first time. Compound 10 has certain cytotoxic activity against esophageal cancer cells Eca-109.

KEYWORDS: *Eupatorium adenophorum* Spreng.; chemical constituent; cadinane-type sesquiterpenoid; activity study

紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum* Spreng.) 又名破坏草、野泽兰、解放草等, 为菊科(Asteraceae) 泽兰属多年生草本植物^[1]。紫茎泽兰是中国外来入侵物种中危害最为严重的植物之一, 原产于中美洲的墨西哥和哥斯达黎加, 目前紫茎泽兰在中国

的云南、贵州、重庆、湖北、四川、广西、西藏、台湾等地广泛分布。紫茎泽兰作为世界性恶性杂草, 对入侵区的生态环境、农林牧业, 甚至对人类的健康生活都产生了极大危害^[2]。《云南药用植物名录》率先记载紫茎泽兰功效: 性凉, 味苦辛,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660656, 81573561); 青海省重点研发与转化计划项目(2020-HZ-802)

作者简介: 宋萍, 女, 教授 E-mail: spzhe@126.com *通信作者: 梁旭, 女, 博士生 E-mail: 17863252335@163.com 袁经权, 男, 博士, 研究员 Email: yjqgx@163.com

具有疏风解表、调经活血、解毒消肿功效, 主治风热感冒, 温病初起之发热, 月经不调, 闭经、崩漏, 无名肿毒, 热毒疮疡, 风疹瘙痒^[3]。现代研究表明紫茎泽兰具有昆虫拒食、抗菌、杀虫、抗炎、抗肿瘤等作用^[4-7]。因此, 期望充分利用这一有害资源, 使其变废为宝, 为紫茎泽兰的资源开发与利用提供参考。

紫茎泽兰中含有倍半萜类、甾体、三萜、黄酮和苯丙素酚类等化学成分, 以倍半萜和黄酮类为主^[7]。倍半萜类成分因其骨架类型丰富, 造成化学结构复杂多样, 是萜类化合物中数目最多的一类, 且具有抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗病毒等广泛的生物活性^[8]。故对紫茎泽兰中的萜类成分进行研究, 以期能为充分利用该资源提供基础。

1 材料

1.1 药材

实验用紫茎泽兰药材于2016年7月采自广西南宁, 经广西中医药大学药用植物教研室韦松基教授鉴定为菊科植物紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum* Spreng.)的全草, 药材标本(No.SC0862)存放于中南民族大学药学院标本馆。

1.2 仪器

Finnigan MAT-95 型质谱仪(德国 Finnigan 公司); Waters ACQUITY SQD 液相质谱仪(美国 Waters 公司); Nicolet 380 傅立叶红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司); ZF-6 型三用紫外线分析仪(上海嘉鹏科技有限公司); Bruker Avance III 600 MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); 中压色谱制备系统(青岛 Alga 公司); Waters 2535 半制备型高效液相色谱仪、Waters 2998 DAD 检测器、Waters 2707 自动进样器均购自美国 Waters 公司; 色谱柱为 COSMOSIL-C₁₈、C₈ 柱(250 mm×10 mm, 5 μm); Galaxil BF-CN 正相柱(250 mm×10 mm, 5 μm, 无锡加莱克色谱科技有限公司); 薄层色谱硅胶 H、柱色谱硅胶(烟台江友硅胶开发有限公司); HP20 离子交换树脂(日本三菱化学公司); D101 大孔树脂(天津百伦斯生物技术有限公司); 色谱甲醇、色谱乙腈(西陇科学股份有限公司); 超净台(苏州苏洁净化设备有限公司); MX-S 可调式混匀仪(北京大龙兴创实验仪器有限公司); RQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); D3024R 型高速冷冻微型离心机(美国 SCILOGEX 公司); Multiskan Go 型全波长酶标仪

(赛默飞世尔科技公司)。

1.3 试剂

甲醇、乙腈(含量≥99.0%, 色谱纯, 西陇科学股份有限公司); 95%乙醇(分析纯)、丙酮(含量≥99.5%)、正己烷(≥97.0%)、异丙醇(≥99.7%)均购自国药集团化学试剂有限公司; 石油醚(沸点60~90℃, 含量≥90%)、乙酸乙酯(含量≥99.5%)、正丁醇(含量≥99.5%)、二氯甲烷(含量≥99.5%)均购自成都市科隆化学品有限公司。

2 成分的提取和鉴定

2.1 提取和分离

紫茎泽兰(19 kg), 干燥, 粉碎, 用 95%乙醇冷浸提取(3×20 L), 减压回收溶剂, 得到乙醇总提取物。总浸膏用热水悬浮, 依次用石油醚(沸点60~90℃)、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 回收溶剂, 分别得到石油醚部位浸膏(170.0 g), 乙酸乙酯部位浸膏(180.0 g), 正丁醇部位浸膏(38.0 g)。

乙酸乙酯部位浸膏 180.0 g, 经 D101 大孔树脂柱色谱分离, 洗脱剂为水-乙醇(10%→85%), 分得 3 个组分 Fr.y 1~Fr.y 3。

Fr.y 3(34 g, 70%~85%乙醇部分), 以石油醚-乙酸乙酯(100:1→0:100)作为洗脱剂通过硅胶柱色谱法(300~400 目)分离, 通过点板合并得到 9 个组分(Fr.y 3.1~Fr.y 3.9)。Fr.y 3.6(0.6 mg)运用葡聚糖凝胶柱层析分离(洗脱剂: 甲醇), 所得 Fr.y 3.6.3(0.2 mg)通过半制备高效液相(科思美析 C₁₈ 柱, 乙腈-水, 40:60→85:15, 20 min, 两相均含 0.1%甲酸, 流速为 4 mL·min⁻¹)得到化合物 1(20 mg, *t*=12.96 min, 0.000 106%)。

Fr.y 1(108 g, 10%~50%乙醇部分), 以二氯甲烷-丙酮(100:1→2:1)作为洗脱剂, 通过硅胶柱色谱法(300~400 目)分离, 通过 TCL 点板合并得到 18 个组分, Fr.y 1.12(300 mg)通过半制备高效液相色谱(科思美析 C₈ 柱, 乙腈-水, 5:95→45:55, 25 min, 两相均含 0.1%甲酸, 流速为 4 mL·min⁻¹)得到化合物 2(23 mg, *t*=7.18 min, 0.000 121%)和 3(10.2 mg, *t*=7.63 min, 0.000 054%)。Fr.y 1.15(135 mg)通过半制备高效液相色谱(科思美析 C₈ 柱, 乙腈-水, 3:97→45:55, 30 min, 两相均含 0.1%甲酸, 流速为 4 mL·min⁻¹)得到化合物 4(23 mg, *t*=13.93 min, 0.000 121%)。

Fr.y 2(30 g, 50%~70%乙醇部分), 以二氯甲烷-甲醇(100:0→0:100)作为洗脱剂, 通过硅胶柱

色谱法(300~400 目)分离, TLC 点板合并, 得到 16 个组分。其中, Fr.y 2.9(400 mg)通过半制备高效液相色谱(科思美析 C₈ 柱, 乙腈-水, 10:90→50:50, 20 min, 两相均含 0.1% 甲酸, 流速为 4 mL·min⁻¹)得到化合物 **5**(2 mg, *t*=14.02 min, 0.000 011%)。Fr.y 2.8 和 Fr.y 2.12 中分别有黄色沉淀析出, 经二氯甲烷清洗抽滤后, 得到化合物 **6**(13 mg, 0.000 089%) 和 **7**(30 mg, 0.000 158%)。

取石油醚部位浸膏 170.0 g, 用 HP 20 大孔树脂柱色谱分离, 洗脱剂为水-乙醇(0%→30%→50%→70%→85%→90%→95%)→无水乙醇→丙酮, 分得 9 个组分 Fr. 1~Fr. 9。

Fr. 6(17 g, 70%~85%乙醇部分)洗脱剂通过硅胶柱色谱法(300~400 目)分离, 并通过 TLC 点板合并得到 11 个组分 Fr. 6.1~Fr. 6.11。将 Fr. 6.3~Fr. 6.8 合并, 再次用硅胶 H 进行分离, 通过 TLC 点板合并后, 其中, 第 3 组分(100 mg)通过半制备正相高效液相色谱分离[Galaksil BF-CN 正相色谱柱, 正己烷:(正己烷-异丙醇 7:3)95:5→50:50, 30 min, 流速为 4 mL·min⁻¹], 得到化合物 **8**(13 mg, *t*=5.26 min, 0.000 068%)。第 4 组分(33 mg)通过半制备高效液相色谱(科思美析 C₁₈ 柱, 乙腈-水, 40:60→0:100, 30 min, 两相均含 0.1% 甲酸, 流速为 4 mL·min⁻¹)得到化合物 **9**(2.2 mg, *t*=12.23 min, 0.000 012%)。第 5 组分(200 mg)通过半制备高效液相色谱(科思美析 C₁₈ 柱, 乙腈-水, 40:60→0:100, 30 min, 两相均含 0.1% 甲酸, 流速为 4 mL·min⁻¹)得到化合物 **10**(80 mg, *t*=11.87 min, 0.000 421%)。

2.2 电子圆二色谱(electronic circular dichroism, ECD)计算

Merck 分子力场(Merck molecular force field, MMFF)和 DFT/TD-DFT 计算分别运用 Spartan¹⁴ (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA)和 Gaussian 09^[9]来进行。使用 B3LYP/6-31G(d, p)水平的密度泛函理论 DFT 对 2 种化合物生成的构象异构体进行优化, 选择 Boltzmann 分布>1%的构象进行 ECD 计算, 之后再使用随时间变化的密度泛函理论(TD-DFT)方法, 在 B3LYP/6-311+G(d, p)的 MeOH 水平下计算优化的构象异构体。最后, 采用 SpecDis^[10-11]对实验数据和计算数据进行比较。

2.3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色油状物。HR-ESI-MS 给出其准分子离子峰[M+H]⁺峰 *m/z*: 235.169 2 [M+H]⁺(计

算值 235.169 2), 提示其分子式为 C₁₅H₂₂O₂, 计算不饱和度为 5。红外光谱(IR)在 3 460 cm⁻¹处存在着 OH 的伸缩振动, 在 1 676 cm⁻¹中的碳氧双键伸缩振动提示有 α, β 不饱和羰基存在。基于该化合物的波谱数据, 其与杜松烷型倍半萜 3-hydroxymurola-4,7(11)-dien-8-one 相似^[12]。推测二者主要的不同可能在于构型的差异。¹H-NMR 提示该化合物有 4 个甲基, 并且以单峰和双重峰的形式存在。其 ¹³C-NMR 显示, 该化合物共有 15 个碳原子, 结合氢谱推测该化合物可能为杜松烷型倍半萜, 并且该化合物有 1 个羰基碳信号 δ 204.8 和 2 个双键的 4 个碳信号, 分别为 δ 141.9, 136.2, 135.1, 127.2。其 ¹H-¹H COSY 谱显示 H-1 与 H-2 相关, H-2 和 H-3 相关, 提示 C(1)H-C(2)H₂-C(3)H 的存在, H-1 与 H-10 和 H-6 相关, H-10 与 H-9 相关, 提示 C(6)H-C(1)H-C(10)H₂-C(9)H 相关。HMBC 谱显示 H-15 与 C-3、C-4、C-5 相关, H-3 与 C-2、C-4、C-5 相关, 提示 C-2-C-3-C-4-C-5 连接的存在, 并且羟基连接在 C-3 位, 见图 1。

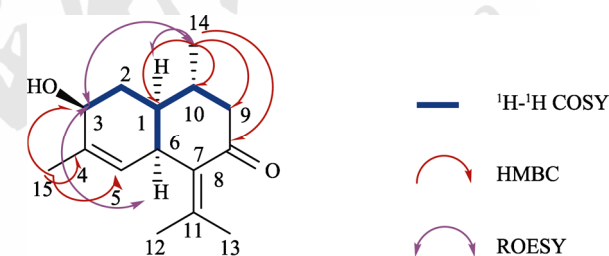


图 1 化合物 **1** 的 ¹H-¹H COSY、HMBC 和 ROESY 相关性
Fig. 1 ¹H-¹H COSY, HMBC and ROESY correlations of compound **1**

化合物 **1** 的相对立体结构进一步通过 ROESY 谱确定。H-1 与 H-14, H-3 存在 ROE 相关, H-3 和 H-14、H-6 和 H-14 存在 ROE 相关, 提示 H-1、H-3、H-6、H-14 在同侧(图 2)。经过 ECD 计算(图 3)确定绝对构型为 1*S*,3*S*,6*R*,10*R* 的 ECD 曲线与实验值吻合得很好。最终, 确定化合物 **1** 为(1*S*,3*S*,6*R*,10*R*)-3-hydroxy-4,10-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)-1,2,3,6,9,10-hexahydronaphthalen-2(1*H*)-one。将化合物 **1** 命名为泽兰酮 D(eupatorinone D)。化合物 **1** 的结构见图 1。

化合物 **1**: 黄色油状物。[α]_D²⁵ +84.26 (*c* 0.06, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 250.0 (1.57) nm; ECD (CDCl₃): 208(Δε 4.01), 220(Δε 2.60), 246(Δε 4.18), 326(Δε -0.50); IR ν_{max}: 3 460.3, 2 870.1, 1 676.1, 1 041.6 cm⁻¹; HRESIMS

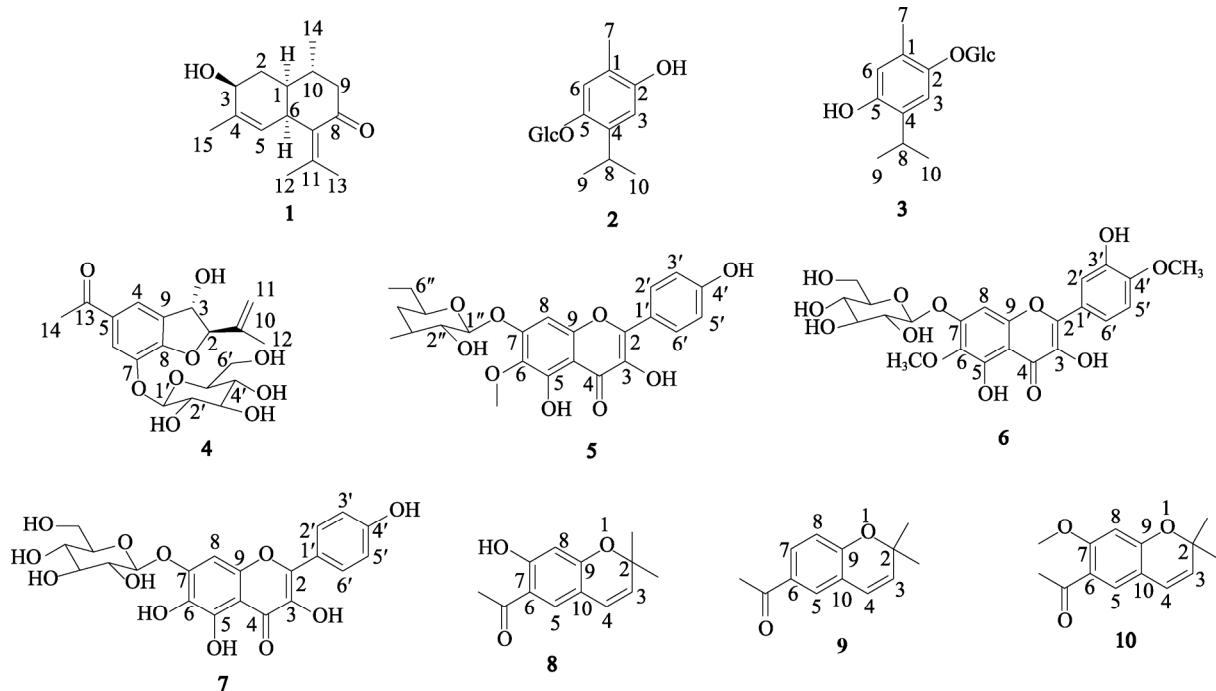


图2 化合物1~10结构式

Fig. 2 Structures of compounds 1-10

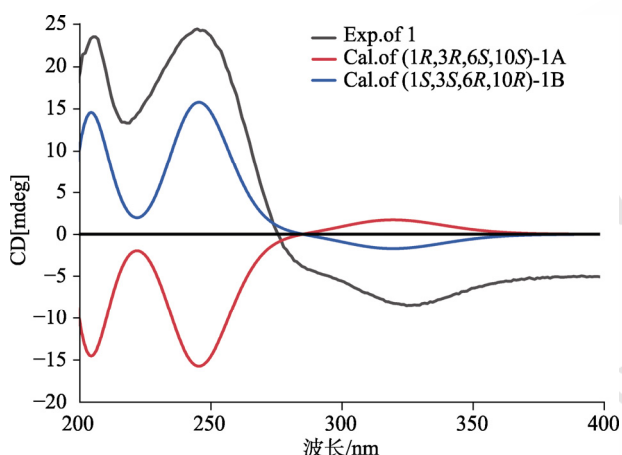


图3 化合物1的实验和计算ECD

Fig. 3 Experimental and calculated ECD of compound 1

m/z 235.169 2 $[M+H]^+$; 1H -NMR($CDCl_3$, 600 MHz) 和 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 150 MHz)数据见表1。

化合物2: 黄褐色油状物。ESI-MS m/z : 327 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ 1.15 和 1.16(3H each, d, $J=6.9$ Hz, isopropyl), 2.13 (3H, s, H-7), 3.43 (1H, m, H-8), 3.44 (1H, m, glucose-H), 3.71 (1H, dd, $J=12.1$, 5.2 Hz, H-6'), 3.88 (1H, dd, $J=12.1$, 2.2 Hz, H-6'), 4.70 (1H, d, $J=7.6$ Hz, anomeric), 6.61 (1H, s, H-3), 6.92 (1H, s, H-6); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ 123.2 (C-1), 151.8 (C-2), 113.0 (C-3), 138.2 (C-4), 149.2 (C-5), 120.3 (C-6), 16.1 (C-7), 27.0 (C-8), 23.5 和 23.4

表1 化合物1的 1H -NMR(600 MHz)和 ^{13}C -NMR(150 MHz)数据($CDCl_3$)

Tab. 1 1H -NMR(600 MHz) and ^{13}C -NMR(150 MHz) data of compound 1($CDCl_3$)

位置	δ_H	δ_C
1	1.77 (1H, m)	38.9
2	1.87 (1H, ddd, $J = 9.3, 5.3, 3.9$ Hz)	33.4
	2.27 (1H, m)	
3	3.98 (1H, d, $J = 5.3$ Hz)	67.0
4		135.1
5	5.11 (1H, br s)	127.2
6	3.52 (1H, m)	42.3
7		136.2
8		204.8
9	2.05 (1H, m)	51.2
	2.39 (1H, dd, $J = 14.1, 4.1$ Hz)	
10	2.32 (1H, m)	30.2
11		141.9
12	1.97 (3H, s)	23.2
13	1.82 (3H, s)	21.8
14	1.07 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	20.5
15	1.74 (3H, br s)	20.4

(isopropyl), 104.4 (C-1'), 75.2 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.5 (C-4'), 78.0 (C-5')和 62.7 (C-6')。将该化合物的波谱数据与文献[13]报道对照基本一致, 故鉴定化合物2为 thymoquinol 5- O - β -D-glucopyranoside, 结构式见图2。

化合物 **3**: 黄褐色油状物。ESI-MS m/z : 327 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ 1.17 和 1.19 (3H each, d, $J=6.9$ Hz, isopropyl), 2.18 (3H, s, H-7), 3.43 (1H, m, H-8), 3.44 (1H, m, glucose-H), 3.70 (1H, dd, $J=12.0, 5.5$ Hz, H-6'), 3.87 (1H, dd, $J=12.0, 2.3$ Hz, H-6'), 4.67 (1H, d, $J=7.7$ Hz, anomeric), 6.52 (1H, s, H-3), 6.98 (1H, s, H-6); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ 127.2 (C-1), 150.5 (C-2), 117.8 (C-3), 134.1 (C-4), 150.6 (C-5), 116.1 (C-6), 16.2 (C-7), 27.9 (C-8), 23.2 和 23.1 (isopropyl), 104.5 (C-1'), 75.1 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.6 (C-4'), 78.3 (C-5') 和 62.6 (C-6')。该化合物的波谱数据与文献[13]报道对照基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 thymoquinol 2- O - β -D-glucopyranoside, 结构式见图 2。

化合物 **4**: 透明油状物, ESI-MS m/z : 397 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ 7.79 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-6), 7.77 (1H, m, H-4), 5.14 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 5.13 (2H, m, H-3, 11b), 4.98 (1H, d, $J=3.9$ Hz, H-2), 4.95 (1H, s, H-11a), 3.86 (1H, dd, $J=1.4, 12.0$ Hz, H-6'b), 3.71 (1H, dd, $J=4.8, 12.0$ Hz, H-6'a), 3.51 (2H, m, H-2', 3'), 3.45 (2H, m, H-4', 5'), 2.56 (3H, s, H-14), 1.75 (3H, s, H-12); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ 96.8 (C-2), 76.6 (C-3), 122.0 (C-4), 132.9 (C-5), 120.2 (C-6), 142.7 (C-7), 154.7 (C-8), 132.1 (C-9), 142.9 (C-10), 113.4 (C-11), 17.4 (C-12), 199.0 (C-13), 26.7 (C-14), 102.7 (C-1'), 74.8 (C-2'), 77.8 (C-3'), 71.2 (C-4'), 78.3 (C-5'), 62.3 (C-6')。该化合物的波谱数据与文献[14]报道基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 2R*, 3S*-toxol-7- O - β -D-glucopyranoside, 结构式见图 2。

化合物 **5**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 479 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ 6.90 (1H, s, H-8), 8.13 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', H-6'), 6.91 (2H, d, $J=8.9$ Hz, H-3', H-5'), 5.11 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1'), 3.57 (2H, m, $J=7.6$ Hz, Glc H-2'', H-5''), 3.51 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-3''), 3.41 (1H, t, $J=9.2$ Hz, H-4''), 3.95 (1H, dd, $J=6.1, 12.2$ Hz, H-6a''), 3.71 (1H, dd, $J=2.2, 12.2$ Hz, H-6b''), 3.89 (3H, s, $-OCH_3$)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ 149.1 (C-2), 137.3 (C-3), 177.7 (C-4), 153.2 (C-5), 133.3 (C-6), 157.7 (C-7), 95.4 (C-8), 153.1 (C-9), 106.7

(C-10), 123.5 (C-1'), 116.3 (C-2'), 131.0 (C-3'), 160.8 (C-4'), 131.0 (C-5'), 116.3 (C-6'), Glc: 102.0 (C-1), 74.8 (C-2), 78.0 (C-3), 71.3 (C-4), 78.5 (C-5), 62.5 (C-6), 61.5 ($-OCH_3$)。将该化合物的波谱数据与文献[15]对比, 结果基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 6-甲氧基-山柰酚-7- O - β -D-葡萄糖苷, 结构式见图 2。

化合物 **6**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 507 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 600 MHz): δ 7.71 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-2'), 7.66 (1H, dd, $J=8.6, 2.2$ Hz, H-6'), 7.10 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5'), 6.96 (1H, s, H-8), 5.13 (1H, d, $J=7.6$ Hz, Glc H-1), 3.86 (3H, s, $-OCH_3$), 3.78 (3H, s, $-OCH_3$)。 ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$, 150 MHz): δ 147.2 (C-2), 136.2 (C-3), 176.3 (C-4), 146.2 (C-5), 131.8 (C-6), 151.4 (C-7), 93.9 (C-8), 149.5 (C-9), 105.0 (C-10), 123.4 (C-1'), 114.9 (C-2'), 147.2 (C-3'), 151.2 (C-4'), 111.8 (C-5'), 119.9 (C-6'), Glc: 100.1 (C-1), 73.2 (C-2), 76.7 (C-3), 69.6 (C-4), 77.3 (C-5), 60.6 (C-6), 60.4 ($-OCH_3$), 55.7 ($-OCH_3$)。该化合物的波谱数据与文献[16]报道基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 万寿菊素-4'-甲氧基-7- O - β -D-葡萄糖苷, 结构式见图 2。

化合物 **7**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 463 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ 6.97 (1H, s, H-8), 8.14 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3', 5'), 5.05 (1H, d, $J=7.5$ Hz, Glc H-1''), 3.59 (1H, m, Glc H-2''), 3.52 (1H, m, Glc H-3''), 3.42 (1H, t, $J=9.3$ Hz, Glc H-4''), 3.55 (1H, m, Glc H-5''), 3.96 (1H, dd, $J=2.2, 12.2$ Hz, Glc H-6a''), 3.72 (1H, dd, $J=6.1, 12.1$ Hz, Glc H-6b'')。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ 149.1 (C-2), 137.2 (C-3), 177.7 (C-4), 146.8 (C-5), 130.9 (C-6), 152.9 (C-7), 95.4 (C-8), 150.4 (C-9), 106.7 (C-10), 123.7 (C-1'), 130.9 (C-2'), 116.3 (C-3'), 160.8 (C-4'), 116.3 (C-5'), 130.9 (C-6'); Glc: 102.6 (C-1), 74.7 (C-2), 77.5 (C-3), 71.4 (C-4), 78.6 (C-5), 62.5 (C-6)。该化合物的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据与文献[17]报道基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 6-hydroxykaempferol-7- O - β -D-glucopyranoside, 结构式见图 2。

化合物 **8**: 黄色油状物。ESI-MS m/z : 219 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 12.7 (1H, s, OH), 7.31 (1H, s, H-5), 6.32 (1H, s, H-8),

6.27(1H, d, $J=9.9$ Hz, H-4), 5.57(1H, d, $J=9.9$ Hz, H-3), 2.52(3H, s, Me-13), 1.44(6H, s, Me-11,12); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): δ 202.5 (C-11), 165.2(C-9), 160.6(C-7), 129.0(C-3), 128.7 (C-5), 121.1(C-4), 114.1(C-6), 113.7(C-10), 104.6 (C-8), 78.0(C-2), 28.7(C-13,14), 26.4(C-12)。该化合物的波谱数据与文献[18]报道基本一致,故鉴定化合物 **8** 为 eupatonriochromene, 结构式见图 2。

化合物 **9** 无色油状物。ESI-MS m/z : 203[M+H] $^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): δ 7.74 (1H, dd, $J=2.2, 8.5$ Hz, H-7), 7.62 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-5), 6.79 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-8), 6.35 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H-3), 5.66 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H-4), 2.53(3H, s, Me-12), 1.46 (6H, s, Me-13,14); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): δ 197.0 (C-11), 157.6 (C-9), 131.4 (C-5), 130.5 (C-6), 130.4 (C-7), 127.1 (C-3), 121.8 (C-4), 120.8 (C-10), 116.3 (C-8), 77.1 (C-2), 28.5 (C-13,14), 26.5 (C-12)。该化合物的波谱数据与文献报道基本一致^[19],故鉴定化合物 **9** 为 demethoxyencecalin, 结构式见图 2。

化合物 **10**: 无色油状物。ESI-MS m/z : 233[M+H] $^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): δ 7.52 (1H, s, H-5), 6.37 (1H, s, H-8), 6.28 (1H, d, $J=9.8$ Hz, H-4), 5.51 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H-3), 3.86 (3H, s, 7-OMe), 2.55 (3H, s, Me-12), 1.43 (6H, s, Me-13,14); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): δ 197.8 (C-11), 161.2 (C-7), 158.6 (C-9), 129.2 (C-5), 128.5 (C-4), 121.4 (C-6), 120.7 (C-3), 114.1 (C-10), 99.7 (C-8), 77.8 (C-2), 28.5 (C-12), 32.1 (C-13,14), 55.7 (7-OMe)。该化合物的波谱数据与文献[20]报道基本一致,故鉴定化合物 **10** 为 encecalin, 结构式见图 2。

3 生物活性测试

3.1 细胞培养

食管癌细胞 Eca-109、肝癌细胞 HepG2 购自 ATCC。DMEM 作为基础培养基用于细胞的生长,向其中添加 10%胎牛血清(FBS)、100 U·mL $^{-1}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素作为完全培养基。将细胞培养在 CO_2 细胞培养箱中(5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$)。从液氮罐中复苏细胞,将它们传代 3 次,待其生长稳定后,再进行实验。

3.2 细胞毒性的测定

使用 MTT 测定法评估化合物在食管癌细胞

Eca-109、肝癌细胞 HepG2 中的毒性。将处于对数生长期的细胞接种在 96 孔板中,并培养至 90%融合。将样品溶解于二甲亚砜(DMSO)中,使样品浓度为 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。接着用 DMEM 培养基将样品稀释至指定浓度,每孔分别加入样品 200 μL 继续培养 48 h。接下来,将 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 加入到每个孔中,并将细胞在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 0.5 h。随后,弃去培养基,并向每个孔中加入 150 μL DMSO。使用酶标仪在 562 nm 处测量每个孔的吸光度。计算细胞抑制率(%)的公式如下:

细胞生长抑制率(%)=[1-(OD 对照组-OD 样品组)/(OD 对照组-OD 空白组)] $\times 100\%$ ^[21]。使用 GraphPad Prism 6.0 软件计算化合物的 IC_{50} 值。

经 MTT 分析,仅化合物 **10** 有弱的细胞毒活性, IC_{50} 值是 178.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,其他化合物的化合物基本没有活性, IC_{50} 值 >200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

紫茎泽兰作为一种外来入侵物种,繁殖能力极强,给西南地区农、林、牧业造成了难以遏制的生态危害。陈豪等^[6,22]通过研究发现紫茎泽兰的乙酸乙酯部位能通过激活线粒体凋亡通路发挥抗肝癌活性,挥发油部位可以通过抑制 STAT3 和 AKT 活化诱导肝癌细胞凋亡。因此,为充分利用这一资源,本实验通过对紫茎泽兰的 95%乙醇提取物的石油醚和乙酸乙酯部位进行研究,从中分离得到 10 个化合物,分别为泽兰酮 D(eupatorinone D, **1**)、thymoquinol 5- O - β -glucopyranoside(**2**)、thymoquinol 2- O - β -glucopyranoside(**3**)、2 R^* ,3 S^* -toxol-7- O - β -D-glucopyranoside(**4**)、6-甲氧基-山柰酚-7- O - β -D-葡萄糖苷(**5**)、万寿菊素-4'-甲氧基-7- O - β -D-葡萄糖苷(**6**)、6-hydroxykaempferol-7- O - β -D-glucopyranoside(**7**)、eupatonriochromene(**8**)、demethoxyencecalin(**9**)、encecalin(**10**)。其中化合物 **1** 为新的杜松烷型倍半萜,化合物 **6** 为首次从泽兰属中分离得到,化合物 **2**, **3**, **7** 为首次从紫茎泽兰中分离得到。对分离得到的化合物进行肝癌细胞 HepG2 和食管癌细胞 Eca-109 的细胞毒活性研究,发现化合物 **10** 对食管癌细胞 Eca-109 具有一定的细胞毒活性,推测其并不是对所有肿瘤细胞都具有细胞毒活性,并且其对食管癌细胞的细胞毒活性可能是由于甲氧基的存在,后续可继续对其作用机制及构效关系进行深入研究,为进一步开发和利用紫茎泽兰提供理论依据。

REFERENCES

- [1] 周忠奎. 紫茎泽兰防治与利用[J]. 中国林业, 2009, (15): 53.
- [2] ZHOU Q W, YANG G Q, WANG C W, et al. Research progress on invasion and control of *Eupatorium adenophorum* spreng and its bioactive substances[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2021, 49(6): 26-29.
- [3] 云南省药物研究所. 云南药用植物名录[M]. 云南: 云南药物研究所, 1975: 191.
- [4] LI Y M, LI Z Y, YE M. The chemical compositions and their bioactivities in the different parts of *Eupatorium adenophorum* spreng[J]. J Yunnan Agric Univ(云南农业大学学报), 2008, 23(1): 42-43, 45-46, 72.
- [5] HU C J, WANG C Y, HE Z R, et al. Study on antioxidant activity of extracts from *Ageratina adenophora* based on DPPH method[J]. Weed Sci(杂草科学), 2013, 31(4): 9-12.
- [6] 陈豪, 杨洁, 杨新洲, 等. 紫茎泽兰抗肝癌活性研究[J]. 中药材, 2018, 41(5): 1210-1213.
- [7] LIU P Y, LIU D, LI W H, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium* (1904-2014)[J]. Chem Biodivers, 2015, 12(10): 1481-1515.
- [8] JIANG X, SUN Q, ZHU J X, et al. Sesquiterpenes from *Kadsura heteroclita* rhizome and their cytotoxic activity[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(9): 46-50.
- [9] FRISCH M J, TRUCKS G E, SCHLEGEL H B, et al. Gaussian 09, Revision C.01 [CP]. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- [10] BRUHN T, SCHAUMLÖFFEL A, HEMBERGER Y, et al. Version 1.61 ed [CP]. University of Würzburg: Würzburg, Germany, 2013.
- [11] BRUHN T, SCHAUMLÖFFEL A, HEMBERGER Y, et al. SpecDis: quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra[J]. Chirality, 2013, 25(4): 243-249.
- [12] WANG M Z, ZHANG Y Y, LI S L, et al. Cadinene derivatives from *Eupatorium adenophorum*[J]. ChemInform, 2007, 38(18): 3104-3108.
- [13] ALI M S, SALEEM M, AKHTAR F, et al. Three p-cymene derivatives from *Zataria multiflora*[J]. Phytochemistry, 1999, 52(4): 685-688.
- [14] HANG D T T, HANH T T H, VAN MINH C, et al. An amorphane sesquiterpene and a benzofuran glucoside from *Eupatorium coelestinum*[J]. Phytochem Lett, 2011, 4(3): 377-379.
- [15] ZHANG M, LIU W L, GAO X, et al. Study on chemical constituents from *Eupatorium adenophorum* spreng[J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2015, 23(6): 697-702.
- [16] LI G Y, LÜ X Y, JIAN J P, et al. A new disubstituted succinate from the roots of *Tagetes erecta*[J]. Acta Pharm Sin(药科学), 2019, 54(8): 1457-1460.
- [17] SHAHZADI I, SHAH M M. Acylated flavonol glycosides from *Tagetes minuta* with antibacterial activity[J]. Front Pharmacol, 2015(6): 195.
- [18] KROHN K, STEINGRÖVER K, RAO M S. Isolation and synthesis of chalcones with different degrees of saturation[J]. Phytochemistry, 2002, 61(8): 931-936.
- [19] SATOH A, UTAMURA H, ISHIZUKA M, et al. Antimicrobial benzopyrans from the receptacle of sunflower[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(4): 664-665.
- [20] CASTAÑEDA P, GÓMEZ L, MATA R, et al. Phytochemical growth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquerivis*[J]. J Nat Prod, 1996, 59(3): 323-326.
- [21] DAI B L, SHI X P, MA N, et al. HMQ-T-B10 induces human liver cell apoptosis by competitively targeting EphrinB2 and regulating its pathway[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(11): 5231-5243.
- [22] CHEN H, ZHOU B, YANG J, et al. Essential oil derived from *Eupatorium adenophorum* spreng. Mediates anticancer effect by inhibiting STAT3 and AKT activation to induce apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Front Pharmacol, 2018(9): 483.

收稿日期: 2021-10-19

(本文责编: 蔡珊珊)