

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201709002

引文格式: 刘安韬, 张婷, 梁杏梅. 鸭儿芹的化学成分及对 Hep G2 细胞毒性 [J]. 广西植物, 2018, 38(4):469-474

LIU AT, ZHANG T, LIANG XM. Chemical constituents of *Cryptotaenia japonica* and toxicity to Hep G2 [J]. *Guihaia*, 2018, 38(4):469-474

鸭儿芹的化学成分及对 Hep G2 细胞毒性

刘安韬, 张婷*, 梁杏梅

(广西卫生职业技术学院, 南宁 530021)

摘要: 该研究采用大孔树脂(D101)、硅胶、羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)和十八烷基硅烷键合硅胶(ODS)等色谱方法,对鸭儿芹的化学成分进行了分离纯化,根据理化性质、质谱和核磁共振波谱数据,并参考相关文献综合分析化合物结构,进而采用噻唑蓝(MTT)法,对鸭儿芹化合物抗 Hep G2 细胞活性进行筛选。结果表明:共从鸭儿芹中分离鉴定了 7 个化合物,分别为 p-(acetylamino)phenol(1),辛酸甲酯(2),丁酸异戊酯(3),N,N-二甲基-苯并咪唑-2 胺(4),5-羟基-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)庚 3 酮(5),3,5 二丁基六氢吡咯里嗪(6),(S)-4-(1-hydroxyallyl)phenyl acetate(7)。其中,化合物 6 对细胞具有抑制作用,抑制率达到 89.1%。该研究结果表明化合物 1-7 均为首次从鸭儿芹中分离得到,其中化合物 6 对 Hep G2 细胞的生长具有抑制作用,且具有剂量依赖性。

关键词: 鸭儿芹, 化合物, 抗肿瘤活性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)04-0469-06

Chemical c constituents of *Cryptotaenia japonica* and toxicity to Hep G2

LIU Antao, ZHANG Ting*, LIANG Xingmei

(Guangxi Medical College, Nanning 530021, China)

Abstract: Chemical constituents of *Cryptotaenia japonica* were separated and purified by macroporous resin D101, silica gel chromatography, Sephadex LH-20 and octadecylsilyl(ODS). Component structures were identified by physical and chemical properties, using spectral analysis included MS and NMR. MTT method was used to evaluate anti-tumor activities of chemical components. The results were as follows: Seven constituents were obtained from *C. japonica*. The structures were identified as p-(acetylamino)phenol(1), methyl caprylate(2), isopentyl butyrate(3), N,N-dimethyl-1H-benzo [d]imidazol-2-amine(4), 5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptan-3-one(5), (3R*, 5S*, 7aR)-3,5-dibutylhexahydro-1H-pyrrolizine(6), (S)-4-(1-hydroxy-allyl)phenyl acetate(7). Compounds 1-7 were obtained for the first time from *C. japonic*. Component 6 showed significant inhibitory effect against Hep G2 with the inhibition ratio 89.1% and had dose-dependent effect.

Key words: *Cryptotaenia japonica*, compound, anti-tumor activity

收稿日期: 2017-10-13

基金项目: 广西自然科学基金青年基金(2014GXNSFBA118202) [Supported by Guangxi Natural Science Foundation for Young Scholars (2014GXNSFBA118202)]。

作者简介: 刘安韬(1980-),男,吉林永吉人,硕士,副教授,主要从事天然药物资源开发与利用,(E-mail)liuantao@gmail.com。

*通信作者: 张婷,硕士,中级药师,主要从事天然药物资源开发与利用,(E-mail)23966396@qq.com。

鸭儿芹 (*Cryptotaenia japonica*) 为伞形科植物鸭儿芹的全草,又名三叶芹、鸭脚板草、野芹菜等。在全国各地均有广泛的分布(中国科学院植物研究所,1985)。鸭儿芹具有消炎解毒、活血消肿的功效,主治肺炎、肺脓肿、淋病、感冒咳嗽、跌打损伤,外用治皮肤瘙痒等病症(江苏新医学院,1977)。鸭儿芹中含有黄酮类化合物(李长生等,2006;李胜华和牛友芽,2012)和挥发油类成分(江丰等,2006),挥发性萜类化合物,占总挥发性成分的82.37%(瞿万云等,2003)。鸭儿芹提取物有着较广泛的药理活性,实验结果表明其具有清咽(高敏等,2005),保肝降酶等作用(田琳和龚其海,2008;李娟等,2012)。

本研究运用大孔树脂(D101),硅胶,羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20),十八烷基硅烷键合硅胶(ODS)等色谱方法,对鸭儿芹的化学成分进行分离纯化,从中分离鉴定了7个化合物,分别为p-(acetylamino)phenol(**1**),辛酸甲酯(**2**),丁酸异戊酯(**3**),N,N-二甲基-苯并咪唑-2胺(**4**),5-羟基-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)庚3酮(**5**),3,5-二甲基六氢吡咯里嗪(**6**), (S)-4-(1-hydroxyallyl)phenyl acetate(**7**)。化合物**1**~**7**均为首次从鸭儿芹中分离得到,进而采用四氯唑盐还原(MTT)法,对鸭儿芹的化合物抗Hep G2细胞活性进行筛选,化合物**6**对细胞具有抑制作用,且具有剂量依赖性。

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

R3型旋转蒸发仪(瑞士步琪有限公司),AV-400型核磁共振光谱仪(德国Bruker公司),1100 Series LC/MSD Trap 质谱仪(美国Agilent公司),XR6A型显微熔点仪(上海光学仪器一厂),Sephadex LH-20(美国Pharmacia公司),薄层色谱硅胶预涂板(青岛裕民源硅胶试剂厂),ODS(80Bin, YMC, 日本Merck公司),柱色谱硅胶(80~100, 300~400目,青岛裕民源硅胶试剂厂),MR-96A型酶标仪(深圳迈瑞公司),CJ-1F型医用净化工作台(苏州冯氏实验动物设备有限公司),3111型CO₂培养箱(美国热电(赛默飞世尔)公

司),台式离心机(北京时代北利离心机有限公司),DMIL倒置显微镜(德国Leica)。

人肝癌细胞株Hep G2,购自中国典型培养物保藏中心。

培养瓶和培养板购自Corning公司。噻唑蓝(3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司;青霉素、链霉素购自Invitrogen公司,DMEM培养基购自GIBCO公司,胎牛血清购自Hyclone公司。鸭儿芹植物样本于2014年3月至2015年5月采自广西桂林雁山区,经广西中医药大学廖月葵高级实验师鉴定为伞形科植物鸭儿芹(*Cryptotaenia japonica*)。

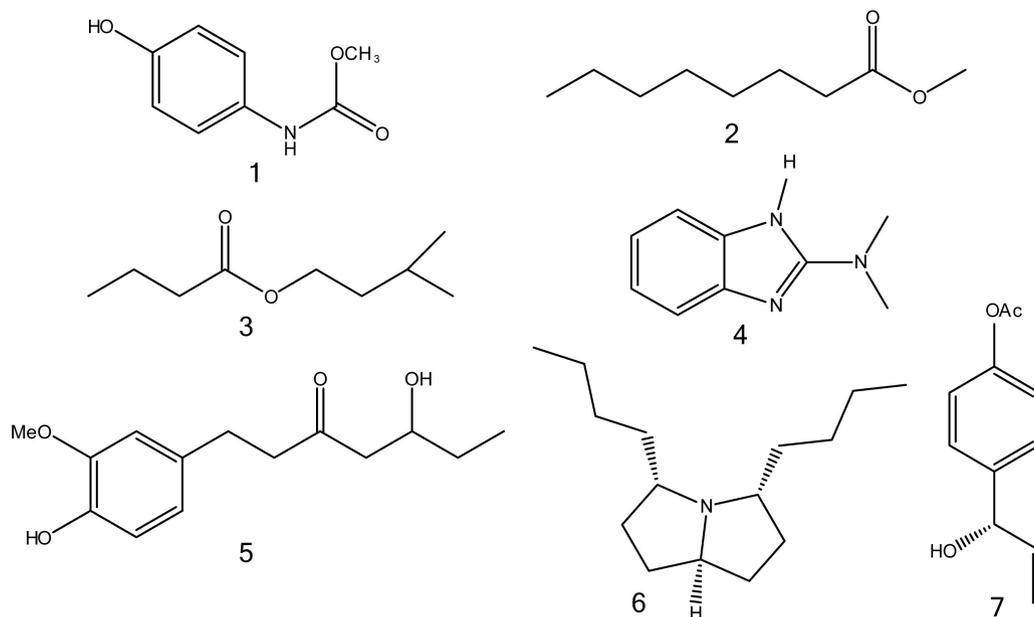
1.2 方法

1.2.1 提取和分离 首先取鸭儿芹干燥药材粗粉约5 kg,60%乙醇加热回流提取3次,每次3 h,过滤合并提取液,浓缩,回收乙醇获得浸膏980 g。然后浸膏混悬于水溶液中分别用石油醚,氯仿,醋酸乙酯,正丁醇进行萃取,回收溶剂得到石油醚部分浸膏29.44 g,氯仿部分浸膏48.6 g、乙酸乙酯部分浸膏57.9g、正丁醇部分浸膏230 g。最后水溶液部位过大孔树脂D101,用水洗脱后,用95%乙醇洗脱,洗脱液减压回收乙醇,真空干燥,获得水溶性部分浸膏约535.5 g。

正丁醇部分经硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇(9:1,8:2)甲醇-乙酸乙酯(14:1,12:1)洗脱,共分得7个部分,各部分继续用氯仿-甲醇为流动相硅胶柱色谱分离,经反复Sephadex LH-20柱色谱、ODS柱色谱分离纯化得到化合物**1**(43.1 mg)。

乙酸乙酯部分经硅胶柱色谱分离,氯仿-乙酸乙酯(50:1,10:1,1:1),氯仿-甲醇(10:1,1:1)乙酸乙酯-甲醇(1:5,1:1)洗脱,共分成8个部分,其中1~5部分经反复Sephadex LH-20柱色谱、ODS柱色谱分离纯化得到化合物**2**(50 mg)、化合物**3**(17.5 mg)、化合物**4**(95 mg)、化合物**5**(51 mg)、化合物**6**(61.8 mg)、化合物**7**(9 mg)。

1.2.2 抗肿瘤活性实验 细胞株用含10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素的DMEM培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养,2~3 d换一次液,用0.25%胰蛋白酶消化传代。在Leica显微



注：1. *p*-(acetylamino)phenol；2. 辛酸甲酯；3. 丁酸异戊酯；4. *N,N*-二甲基-苯并咪唑-2 胺；5. 5-羟基-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)庚 3 酮；6. 3,5 二丁基六氢吡咯里嗪；7. (*S*)-4-(1-羟基allyl)phenyl acetate。

Note: 1. *p*-(acetylamino)phenol; 2. Methyl caprylate; 3. Isopentyl butyrate; 4. *N,N*-dimethyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amine; 5. 5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptan-3-one; 6. (3*R**, 5*S**, 7*aR*)-3,5-dibutylhexahydro-1*H*-pyrrolizine; 7. (*S*)-4-(1-hydroxy-allyl)phenyl acetate.

图 1 化合物 1-7

Fig. 1 Structure of compounds 1-7

镜下观察加药前后细胞形态学变化。

取对数生长期的肿瘤细胞,制成 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 200 μL ,每组设 3 个平行孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h 后分别加入不同浓度的样品。另设阴性对照组,继续培养 72 h。实验终止前 4 h,每孔加入浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 50 μL ,4~6 h 后,弃去培养液,每孔加 DMSO 100 μL ,震荡 5 min,待结晶溶解后用酶标仪于 570 nm 波长测定 OD 值。按公式计算肿瘤细胞抑制率:抑制率 (Inhibitory Rate, IR%) = (1 - 实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值) $\times 100\%$,用 SPSS 18.0,计算抑制 50% 细胞生长的样品浓度,以 IC₅₀ 表示。

2 结构鉴定与抗肿瘤活性测试

2.1 结构鉴定 图 1

化合物 1 白色结晶。FAB-MS m/z : 167.16,

分子式为 $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.68 (3H, s, -OCH₃), 7.38 (2H, dd, $J = 7.5, 1.5\text{Hz}$, H-3,5), 6.73 (2H, dd, H-2,4), 9.97 (1H, s, H-NH), 9.94 (1H, s, -OH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (600MHz, CD_3OD) δ : 172.87 (C = O), 131.4 (C-4), 116.70 (C-2, C-4), 124.54 (C-3, C-5), 154.8 (C-5), 23.84 (-OCH₃)。以上数据与 Lewis et al (2003) 报道一致,推断化合物 1 为 *p*-(acetylamino)phenol。

化合物 2 白色脂肪状。FAB-MS m/z : 158.13, 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 0.88 (3H, d, $J = 8.0\text{Hz}$, H-1), 1.26 (2H, dd, $J = 7.1, 8.0\text{Hz}$, H-2), 1.26 (2H, s, $J = 7.1\text{Hz}$, H-3), 1.26 (2H, dd, $J = 7.1\text{Hz}$, H-4), 1.33 (1H, s, $J = 7.1\text{Hz}$, H-5), 1.66 (2H, s, H-6), 2.32 (2H, dd, H-7), 3.61 (3H, s, H-OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 13.28 (C-1), 22.39 (C-2), 31.7 (C-3), 28.82 (C-4,5), 24.67 (C-6), 33.61 (C-7), 78.05

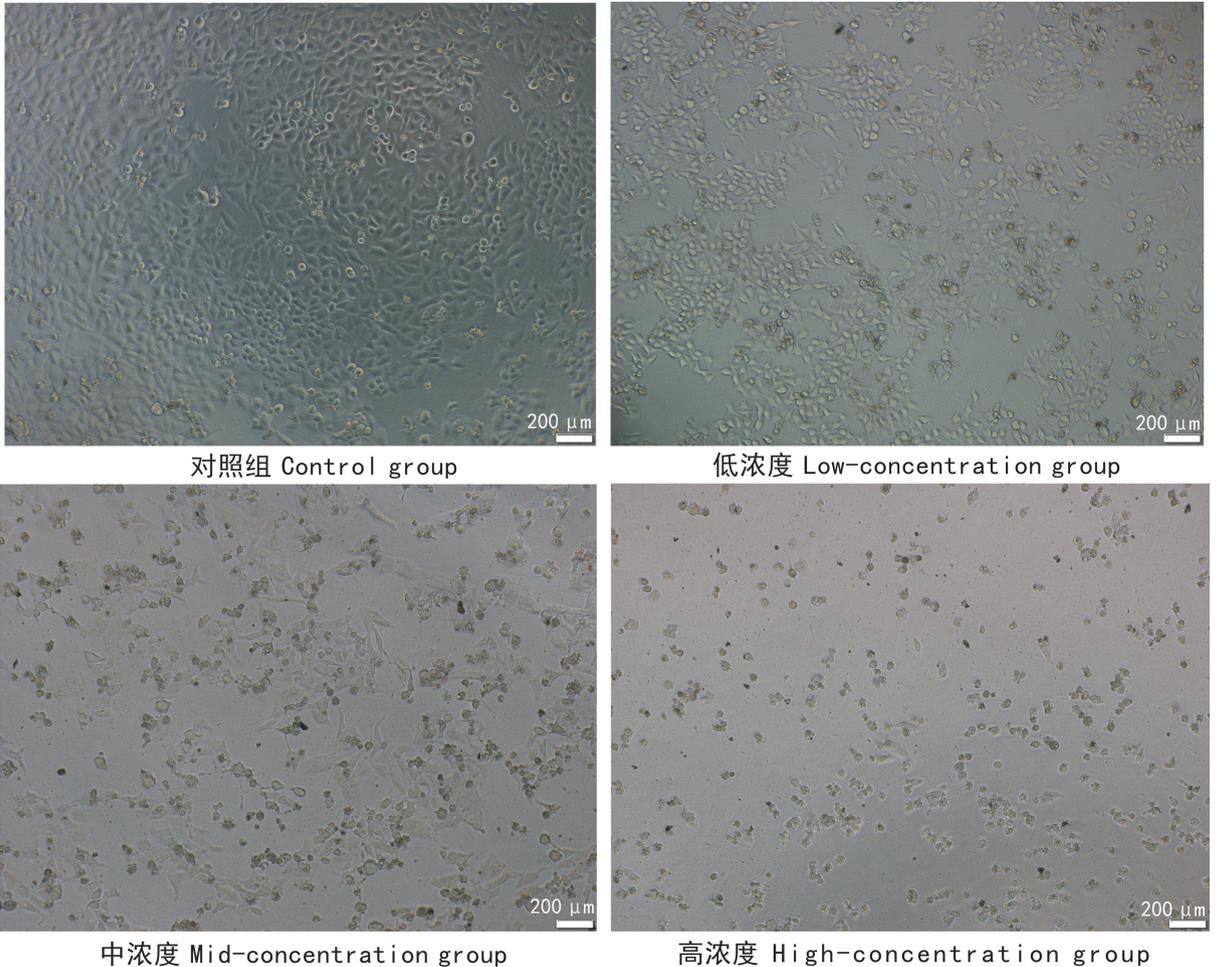


图 2 化合物 6 抑制 HepG2 细胞生长的细胞形态学观察
Fig. 2 Morphological changes of Hep G2 by inhibitory of Compound 6

(C-8), 50.94 (C-OCH₃), 174.4 (C=O)。以上数据与 Chinta et al (2016) 报道一致, 推断化合物 2 为辛酸甲酯。

化合物 3 淡黄色粉末。FAB-MS m/z : 158.13, 分子式为 C₉H₁₈O₂。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 0.99 (3H, d, J = 8.0 Hz, H-1), 0.97 (6H, d, J = 8.0 Hz, H-8, 9), 4.13 (2H, d, J = 7.1 Hz, H-3), 2.32 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-5), 1.81 (1H, m, H-7), 1.68 (2H, m, H-2), 1.52 (2H, m, H-6)。¹³C-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 13.09 (C-1), 28.81 (C-8, C-9), 22.32 (C-2), 33.66 (C-5), 31.64 (C-3), 24.7 (C-7), 176.71 (C-4), 115.58 (C-6), 175.0 (C=O)。以上数据推断, 故鉴定化合物 3 为丁酸异

戊酯。

化合物 4 淡黄色粉末。FAB-MS m/z : 161.1, 分子式为 C₉H₁₁N₃。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 12.40 (1H, s, J = 8.0 Hz, H-2), 3.06 (6H, s, H-CH₃), 7.12 (4H, d, J = 7.5, 1.5 Hz, H-4, 5, 6, 7)。¹³C-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 170.13 (C-2), 153.28 (C-4a), 130.27 (C-7a), 122.1 (C-6), 122.4 (C-7), 114.84 (C-4), 22.12 (C-CH₃), 22.12 (C-CH₃)。以上数据与 Benassi et al (2010) 报道一致, 鉴定化合物 4 为 N,N-二甲基-苯并咪唑-2 胺。

化合物 5 淡黄色油滴。FAB-MS m/z : 252.14, 分子式为 C₁₄H₂₀O₄。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 9.96 (1H, s, J = 8.0 Hz, H-4'-OH), 6.77

(1H, s, H-5-OH), 6.59 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6'), 6.64 (2, dd, J = 8.5, 1.5 Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2'), 3.72 (1H, m, J = 7.0 Hz, H-5), 3.77 (3H, s, H-3'-OCH₃), 2.80 (2H, d, H-2), 2.71 (2H, m, H-4), 2.78 (2H, d, H-1), 1.46 (2H, m, H-6), 0.89 (3H, d, H-7)。¹³C-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 28.96 (C-1), 31.87 (C-2), 178.44 (C-3), 33.88 (C-4), 73.32 (C-5), 29.56 (C-6), 14.12 (C-7), 133.09 (C-1'), 113.21 (C-2'), 150.50 (C-3'), 171.33 (C-4'), 116.46 (C-5'), 121.98 (C-6'), 37.26 (C-OCH₃)。从以上数据推断, 故鉴定化合物 **5** 为 5-羟基-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)庚-3-酮。

化合物 **6** 淡黄色粉末。FAB-MS *m/z*: 224.23, 分子式为 C₁₅H₂₉N。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 2.25 (2H, m, J = 8.0 Hz, H-3, 5), 2.25 (1H, m, H-8), 1.66 (4H, m, H-1, 2, 6, 7), 1.41 (4H, m, H-1, 2, 6, 7), 1.31 (4H, m, H-9, 9'), 1.25 (4H, m, H-10, 10'), 1.31 (4H, m, H-11, 11'), 0.88 (6H, m, H-12, 12')。¹³C-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 29.07 (C-1, 7), 29.25 (C-2, 6), 31.94 (C-3, 5), 33.94 (C-8), 29.60 (C-9, 9'), 29.69 (C-10, 10'), 24.70 (C-11, 11'), 22.7 (C-12, 12'), 14.13 (C-13, 13')。从以上数据推断, 故鉴定化合物 **6** 为 (3R, 5S, 7ar)-3,5-dibutylhexahydro-1H-pyrrolizine (3,5-二丁基六氢吡咯里嗪)。

化合物 **7** 淡白色结晶。FAB-MS *m/z*: 192.08, 分子式为 C₁₁H₁₂O₃。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 5.12 (1H, s, J = 8.0 Hz, H-7-OH), 7.21 (2H, d, J = 8.2 Hz, H-2, 6), 7.28 (2H, d, J = 8.2 Hz, H-3, 5), 5.56 (1H, d, H-7), 2.31 (3H, s, H-CH₃), 6.30 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-8), 5.00 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-9), 4.99 (1H, m, H-9)。¹³C-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 121.97 (C-1), 78.10 (C-2, 6), 78.10 (C-3, 5), 114.82 (C-4), 77.58 (C-7), 114.82 (C-8), 77.84 (C-9), 169.95 (C-CO), 22.2 (C-CH₃)。以上数据推断, 故鉴定化合物 **7** 为 (S)-4-(1-hydroxyallyl) phenyl acetate。

2.2 抗肿瘤活性测试

细胞药理筛选结果(表 1)表明, 在 7 个化合物中, 其中化合物 **6** 对细胞生长具有抑制作用, 抑制

表 1 化合物 1-7 对 Hep G2 生长的抑制作用的影响

Table 1 Inhibitory effects of compounds 1-7 on Hep G2

样品编号 Code of sample	化合物 Compounds						
	1	2	3	4	5	6	7
IC ₅₀ (μg · mL ⁻¹)	>200	>200	>200	>200	131.2	52.31±4.77	163.1
抑制率 Inhibition ratio (%)	21.3	9.8	3.4	14.3	43.1	89.1	31.3

率达到 89.1%, 可以使 Hep G2 细胞皱缩变圆, 细胞密度明显降低, 细胞碎片增多, 部分细胞出现空泡样变, 并且具有剂量依赖性。IC₅₀ 浓度为 (52.31±4.77) μg · mL⁻¹, 在得到的所有化合物中对肝癌细胞的抑制作用最为明显。

3 讨论与结论

通过对鸭儿芹化学成分进行提取分离和结构鉴定, 确证 7 个化合物的化学结构, 均为首次从鸭儿芹植物中分离得到的。化合物 **6** 对细胞生长具有抑制作用, 抑制率达到 89.1%, 可以使 Hep G2 细胞皱缩变圆, 细胞密度明显降低, 细胞碎片增多, 部分细胞出现空泡样变, 并且具有剂量依赖性。IC₅₀ 浓度为 (52.31±4.77) μg · mL⁻¹, 在得到的所有化合物中对肝癌细胞的抑制作用最为明显。

化合物 **6** 为双吡咯分子的杂环化合物, 该类结构(颜文革和张守芳, 2000)首先发现于吡咯里西啶生物碱分子中, 该类化合物在新药开发上是一个相当活跃的研究领域, 相信化合物 **6** 为先导化合物进行结构优化和修饰, 可能发现新的具有抗癌作用的药物。

参考文献:

BENASSI R, GRANDI R, PAGNONI UM, et al, 2010. Study of the effect of N-protonation and N-methylation on the ¹H and ¹³C chemical shifts of the six-membered ring in

- benzazoles and 2-substituted N, N-dimethylamino derivatives [J]. *Magn Reson Chem*, 24(5):415-420.
- CHINTA SP, GOLLER S, UHL G, et al, 2016. Identification and synthesis of branched wax type esters, novel surface lipids from the spider *Argyrodes elevatus* (Araneae: Theridiidae) [J]. *Chem Biodivers*, 13(9):1202-1220.
- GAO M, LIU J, WANG Y, et al, 2005. The effect on the throat-clearing function and wistar rats weight and biochemistry indexes of the *Cryptotaenia japonica* [J]. *J Prev Med Inf*, 21(3):375-376. [高敏, 刘佳, 王雨, 等, 2005. 鸭儿芹的清咽功能及对大鼠体重和生化指标的影响 [J]. *预防医学情报杂志*, 21(3):375-376.]
- Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, 1985. Chinese higher plant illustrations (II) [M]. Beijing: Science Press: 406. [中国科学院植物研究所, 1985. 中国高等植物图鉴(第二册) [M]. 北京: 科学出版社: 406.]
- JIANG F, FENG LH, LAI XP, 2006. To optimize the preparation technology of oil in *Cryptotaenia japonica* by orthogonal test [J]. *Jiangxi Med J*, 41(7):509-510. [江丰, 冯丽华, 赖小平, 2006. 正交试验法优选鸭儿芹挥发油的提取工艺 [J]. *江西医药*, 41(7):509-510.]
- Jiangsu New Medical College, 1977. The dictionary of Chinese herbal medicine [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press: 1842-1843. [江苏新医学院, 1977. 中药大辞典(下册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社: 1842-1843.]
- LEWIS EA, ADAMEK TL, VINING LC, et al, 2003. Metabolites of a blocked chloramphenicol producer [J]. *J Nat Prod*, 66(1):62-66.
- LI CS, ZHU D, DENG J, et al, 2006. Study on the extraction technology and determination of flavonoids in *Cryptotaenia japonica* [J]. *Food Sci*, 27(11):357-360. [李长生, 朱笃, 邓娟, 等, 2006. 鸭儿芹总黄酮提取及含量测定研究 [J]. *食品科学*, 27(11):357-360.]
- LI J, XIE YC, JIANG XH, et al, 2012. Hepatoprotective effect and antioxidant activity of *Cryptotaenia japonica* extracts [J]. *High Sciencepap Onl*, 5(23):2264-2267. [李娟, 谢运昌, 蒋小华, 等, 2012. 鸭儿芹提取物抗氧化和保肝作用研究 [J]. *中国科技论文在线精品论文*, 5(23):2264-2267.]
- LI SH, NIU YY, 2012. Study on chemical constituents in *Cryptotaenia japonica* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 43(12):2365-2368 [李胜华, 牛友芽, 2012. 鸭儿芹的化学成分研究 [J]. *中草药*, 43(12):2365-2368.]
- QU WY, YANG CH, YU AN, et al, 2003. Study of the volatile chemical constituents of *Cryptotaenia japonica* Hassk [J]. *Fine Chem*, 20(7):416-418. [瞿万云, 杨春海, 余爱农, 等, 2003. 鸭儿芹挥发性化学成分的研究 [J]. *精细化工*, 20(7):416-418.]
- TIAN L, GONG QH, 2008. Protective effect of total flavonoids from *Cryptotaenia japonica* Hassk on CCl₄-induced acute liver injury in mice [J]. *Acta Acad Med Zunyi*, 31(1):8-10. [田琳, 龚其海, 2008. 鸭儿芹总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. *遵义医学院学报*, 31(1):8-10.]
- YAN WG, ZHANG SF, 2000. The survey of studies on the pyrolizininone derivatives [J]. *Chin J Med Chem*, 10(1):71-74. [颜文革, 张守芳, 2000. 吡咯里嗪化合物的药用研究概况 [J]. *中国药物化学杂志*, 10(1):71-74.]