

· 化学与分析 ·

京大戟的化学成分分离及其对斑马鱼胚胎的毒性

张楷承, 姚芳, 曹雨诞*, 陈佩东, 丁安伟*

(南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 南京 210023)

[摘要] **目的:**对京大戟进行化学成分研究,并采用斑马鱼胚胎对得到的化合物进行毒性评价。**方法:**京大戟干燥根用95%乙醇50℃温浸提取,将提取物用乙酸乙酯萃取得到乙酸乙酯部位,采用硅胶柱色谱,中压制备柱色谱,制备液相等色谱技术和方法进行分离纯化,通过理化性质与波谱数据并结合文献对化合物结构进行鉴定。同时采用模式生物斑马鱼的胚胎评价京大戟中各化合物的急性毒性,选取24h发育正常的斑马鱼胚胎,预试验确定各化合物的96h全部死亡剂量(96h-LC₁₀₀)和96h无死亡剂量(96h-LC₀),正式试验每个化合物设8个浓度和一个空白组,并观察给药后96h斑马鱼胚胎的发育和死亡情况,重复3次,计算不同化合物对斑马鱼胚胎的96h半数致死浓度(96h-LC₅₀)。**结果:**从京大戟乙酸乙酯部位中共分离得到16个化合物,分别鉴定为肉豆蔻酸(1),甘遂甾醇(2),大戟二烯醇(3),十四烷酸丁基酯(4),阿魏酸二十八酯(5),β-谷甾醇(6),豆甾醇(7),(3β)-stigmast-5-en-3-ylpalmitate(8),α-菠菜甾醇(9),球松素(10),油酸(11),泪杉醇(12),亚油酸(13),pekinenal(14),neomotioliol(15),(3β)-3-hydroxyanosta-8,24-diene-7,11-dione(16)。**结论:**其中化合物4,8,10~13,16为首次从该植物中分得,经斑马鱼胚胎毒性评价,毒性化合物为10,12,14,16。

[关键词] 京大戟;化学成分;斑马鱼胚胎毒性筛选;球松素;亚油酸

[中图分类号] R284.2;R285.5;R2-031;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0021-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181114

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.0926.011.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 10:34

Chemical Constituents of *Euphorbia pekinensis* and Its Toxicity to Embryo of Zebrafish

ZHANG Kai-cheng, YAO Fang, CAO Yu-dan*, CHEN Pei-dong, DING An-wei*

(*Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the chemical constituents of *Euphorbia pekinensis*, and evaluate the toxicity of the obtained compounds by using zebrafish embryo. **Method:** The roots of *Euphorbia pekinensis* were extracted with 95% ethanol and then extracted with ethyl acetate to obtain the ethyl acetate fraction. The ethyl acetate fraction was then separated and purified by silica gel column chromatography, medium pressure column chromatography and preparative liquid chromatography methods, while their structures were identified by physical and chemical properties and spectral data combined with literature. At the same time, the model organism

[收稿日期] 20180108(009)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81503250);江苏高校优势学科建设工程项目(ysxk-2014);江苏高校品牌专业建设工程项目(PPZY2015A070)

[第一作者] 张楷承,在读硕士,从事中药质量标准及创新药物研究,E-mail: kaichengzhangqy@163.com

[通信作者] *曹雨诞,副教授,博士,从事中药质量标准及创新药物研究,Tel:025-85811519,E-mail: raindc@163.com;

*丁安伟,教授,博士生导师,从事中药质量标准及创新药物研究,Tel:025-85811523,E-mail: awding105@163.com

zebrafish embryo was used to evaluate the acute toxicity of each compound in *E. pekinensis*. The zebrafish embryo normally developed for 24 h was selected to determine the 96 h-LC₁₀₀ and 96 h-LC₀ of each compound in preliminary experiment. Then in the formal experiment, eight concentrations and a blank control group were set for each compound. Development and death of zebrafish embryos at 96 h after administration were observed. The experiment was repeated for three times to calculate 96 h median lethal concentration (96 h-LC₅₀) of different compounds on zebrafish embryos. **Result:** Sixteen compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of *E. pekinensis*, and identified as tetradecanoic acid (**1**), tirucallol (**2**), 5 α -eupha-8, 24-dien-3 β - (**3**), butyl myristate (**4**), octacosyl (2*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (**5**), 24-propylcholesterol (**6**), stigmasterol (**7**), (3 β)-stigmast-5-en-3-ylpalmitate (**8**), α -spinasterol (**9**), pinostrobin (**10**), oleic acid (**11**), manool (**12**), linoleic acid (**13**), pekinenal (**14**), neomotiol (**15**), and (3 β)-3-hydroxyanosta-8, 24-diene-7, 11-dione (**16**). **Conclusion:** compounds **4**, **8**, **10-13** and **16** were isolated from this plant for the first time. In the evaluation of toxicity by using zebrafish embryos, the toxic compounds were compounds **10**, **12**, **14** and **16**.

[**Key words**] *Euphorbia pekinensis*; chemical component; toxicity screening by zebrafish embryos; pinostrobin; manool

京大戟为大戟科大戟属植物大戟的干燥根^[1]。首载于《神农本草经》，列为下品。历版《中国药典》^[2]均有收载。京大戟主要分布于江苏南京、扬州等地；四川、广西、江西等地均产^[3]。其药性苦寒，归肺、脾、肾经，具有泻水逐饮、消肿散结的功效，京大戟为有毒中药，临床多使用其醋制品，治疗水肿胀满、二便不利、胸腹积水、痰饮积聚、气逆咳喘等症^[2]。京大戟中化学成分较为复杂，文献报道已从中分离出二萜、三萜、黄酮、有机酸、鞣质以及香豆素类等化学成分^[4-9]，现代药理学研究表明京大戟在泻下、利尿、抗炎、抗癌和抗白血病方面均有一定的疗效^[10]。因京大戟苦寒有毒，且毒性成分与毒性机制以及醋制减毒的原理尚不明确，这些都制约着京大戟临床应用。研究表明，京大戟的毒性部位为其乙酸乙酯部位^[11-12]，故本文对京大戟乙酸乙酯部位的化学成分进行进一步研究，旨在筛选京大戟中的毒性成分，为后续京大戟毒性研究提供依据。通过分离得到了16个化合物，其中有7个化合物为首次从京大戟中分离得到。

斑马鱼是一种新型的模式动物，因其与人类基因具有高度同源性，在蛋白质水平上其关键部位的同源性几乎是100%，广泛用于药物高通量筛选以及毒性研究^[13-14]，同时近年来斑马鱼越来越多的应用到中药领域，如中药化学成分的毒性筛选^[15]，体内代谢^[16]等研究。斑马鱼胚胎产量高、易收集，可多次重复，便于观察且结果准确，同时节约时间、成本较低，具有其独特的优势^[17]。故本文采用斑马鱼胚胎对京大戟中分离的化合物进行毒性评价，得到

4个毒性化合物。

1 材料

AR400型核磁共振仪(四甲基硅烷为内标,瑞士Bruker公司);LTQ Orbitrap型质谱(德国赛默飞世尔科技公司);RE-5210型旋转蒸发器(上海科晓科学仪器有限公司);79-1型磁力搅拌器(江苏杰瑞尔电器有限公司);CCA-20型低温冷却液循环泵(宁波市双嘉仪器有限公司);EZPlus型中压柱色谱(苏州利穗科技有限公司);DAC50制备型高效液相色谱仪(江苏汉邦科技有限公司,配NP7010输液泵及NU3010C紫外检测器),1525型半制备液相(美国Waters公司,配2996DAD检测器),XBrige-Prep C₁₈色谱柱(19 mm × 150 mm, 5 μ m),Pheceda C₁₈色谱柱(20 mm × 250 mm, 5 μ m);SHZ-III型循环水式真空泵(南京科尔仪器设备有限公司);薄层色谱展开缸(北京新恒能分析仪器有限公司);ZF-20C型暗箱式紫外分析仪(上海精密仪器仪表有限公司);密度计(武强县玻璃仪器仪表厂);MS-105DV型1/10万电子天平(瑞士梅特勒);人工海水(参照《The Zebrafish Book》);LGJ-10型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);氘代试剂(南京雅瑞德赛医药研发有限公司);薄层硅胶板,柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂);其他试剂均为分析纯。

京大戟购于广西(批号20160616),经南京中医药大学吴啟南教授鉴定为大戟科植物京大戟 *Euphorbia pekinensis* 的块根。

实验用鱼为野生型 AB 品系斑马鱼[体长(3.5 ± 0.3) cm, 体质量(0.45 ± 0.1) g], 购于南京

尧顺禹生物科技有限公司,约7月龄,斑马鱼成鱼在(28.5 ± 0.5) °C的水中自然交配繁殖鱼卵,养殖与繁殖方法参照《The Zebrafish Book》^[18]。

2 提取和分离

取京大戟 36 kg,粉碎,过四号筛,加入 10 倍量 95% 乙醇于 50 °C 温浸提取 5 次,每次 24 h,回收乙醇,得京大戟乙醇浸膏 4.86 kg。将乙醇浸膏加 1.5 倍硅藻土拌匀,加入 10 倍量乙酸乙酯萃取至无色,回收溶剂,得京大戟乙酸乙酯萃取物 1.00 kg。将乙酸乙酯萃取物加硅胶(100 ~ 200 目)拌匀得乙酸乙酯样品 2.488 kg,取 2 kg 进行硅胶柱色谱(200 ~ 300 目)分离,流动相为石油醚和乙酸乙酯。依次用石油醚-乙酸乙酯(100:0,100:3,100:5,100:10,100:20,100:50,100:100,0:100)梯度洗脱,得到 8 个极性部位 Fr. 1 ~ Fr. 8。Fr. 2(69.86 g)用硅胶拌匀后采用中压柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(100:0,100:1,100:2,100:3,100:5,100:10,100:50)梯度洗脱,得到 7 个极性段 Fr. 2-1 ~ Fr. 2-7,Fr. 2-3 经制备液相纯化得到化合物 **1**(40 mg),**2**(50 mg)和 **3**(200 mg)。Fr. 2-4 与 Fr. 2-5 合并,硅胶拌匀后进行硅胶柱色谱分离,得到的馏分经制备液相纯化得到化合物 **4**(50 mg),**5**(16 mg),**6**(9 mg)。Fr. 2-6 经制备液相分离纯化后得化合物 **7**(12 mg)。Fr. 2-7 用硅胶拌匀,经硅胶柱色谱分离得到化合物 **8**(20 mg)和 **9**(15 mg)。Fr. 3(25.77 g)用硅胶拌匀后采用中压制备色谱,以石油醚-乙酸乙酯(100:0,100:3,100:5,100:10,100:20,100:50)梯度洗脱。得到 6 个极性段 Fr. 3-1 ~ 3-6,Fr. 3-1 经正相制备色谱进行纯化得到化合物 **10**(11 mg)。Fr. 3-2 用硅胶拌匀后经硅胶柱色谱分离纯化得到化合物 **11**(150 mg)和 **12**(70 mg)。Fr. 3-3 用硅胶拌匀,经硅胶柱色谱分离纯化得到化合物 **13**(80 mg)。Fr. 3-5 用硅胶拌匀,经硅胶柱色谱分离得组分 Fr. 3-5-1,采用三氯甲烷-甲醇进行重结晶得到化合物 **14**(60 mg)。Fr. 4(6 g)用硅胶拌匀,采用中压柱色谱,依次用(100:5,100:10,100:20,100:50)梯度洗脱,得到 4 个极性段 Fr. 4-1 ~ Fr. 4-4,Fr. 4-2 经制备液相分离纯化得化合物 **15**(80 mg)。Fr. 4-4 用硅胶拌匀,经硅胶柱色谱梯度洗脱分离得到组分 Fr. 4-4-1 ~ Fr. 4-4-5,将 Fr. 4-4-4 ~ Fr. 4-4-5 合并,经制备液相纯化得化合物 **16**(25 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色固体(甲醇),ESI-MS m/z 227 $[M - H]^-$,分子式为 $C_{14}H_{28}O_2$ 。¹H-NMR(400 MHz,

$CDCl_3$) δ : 2.35(2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2), 1.64(2H, m), 1.20 ~ 1.60(20H, m, H-3 ~ H-13), 0.88(3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-14)。¹³C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.73(C=O), 33.96(C-2), 31.94(C-3), 29.63 ~ 29.71(C-4, C-5, C-6), 29.60(C-7), 29.45(C-8), 29.37(C-9), 29.25(C-10), 29.07(C-11), 24.69(C-12), 22.71(C-13), 14.13(C-14), 以上数据与文献[19]报道基本一致,故鉴定化合物 **1** 为肉豆蔻酸(tetradecanoic acid)。

化合物 **2** 白色针晶(甲醇),ESI-MS m/z 425 $[M - H]^-$,分子式为 $C_{30}H_{50}O$ 。¹H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.08(1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-24), 3.25(1H, dd, $J = 12.0, 4.6$ Hz, H-3), 1.69(3H, s, H-26), 1.60(3H, br s, H-27), 1.02(3H, s, H-29), 0.96(3H, s, H-19), 0.87(3H, s, H-28), 0.86(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 0.81(3H, s, H-18), 0.76(3H, s, H-30)。¹³C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 35.26(C-1), 27.92(C-2), 79.02(C-3), 38.93(C-4), 50.96(C-5), 18.69(C-6), 28.05(C-7), 133.54(C-8), 134.07(C-9), 37.27(C-10), 21.45(C-11), 27.92(C-12), 44.11(C-13), 50.12(C-14), 30.79(C-15), 29.83(C-16), 49.95(C-17), 15.52(C-18), 20.14(C-19), 35.26(C-20), 18.94(C-21), 37.27(C-22), 24.94(C-23), 125.25(C-24), 130.89(C-25), 17.62(C-26), 25.70(C-27), 24.36(C-28), 28.01(C-29), 15.52(C-30)。以上数据与文献[20]报道数据基本一致,故鉴定化合物 **2** 为甘遂甾醇(tirucallol)。

化合物 **3** 白色针晶(甲醇),ESI-MS m/z 227 $[M + H]^+$,分子式为 $C_{30}H_{50}O$ 。¹H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.11(1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-24), 3.20(1H, dd, $J = 11.5, 4.5$ Hz, H-3), 1.65(3H, s, H-26), 1.56(3H, s, H-2), 1.08(3H, s, H-29), 0.99(3H, s, H-19), 0.88(3H, s, H-28), 0.83(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 0.79(3H, s, H-18), 0.75(3H, s, H-30);¹³C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 34.79(C-1), 27.40(C-2), 78.49(C-3), 38.42(C-4), 50.44(C-5), 18.41(C-6), 27.60(C-7), 133.11(C-8), 133.53(C-9), 36.77(C-10), 21.01(C-11), 29.19(C-12), 43.60(C-13), 49.53(C-14), 30.39(C-15), 29.25(C-16), 49.15(C-17), 15.01(C-18), 19.64(C-19), 35.36(C-20), 18.43(C-21), 34.97(C-22), 24.29(C-23), 124.69(C-24), 130.39(C-25), 17.15(C-26), 25.20(C-27), 23.92(C-28), 27.59(C-29), 15.15(C-30)。以上数据与文献[21]基本一致,故鉴定化合物 **3** 为

大戟二烯醇(5 α -eupha-8,24-dien-3 β -ol)。

化合物4 白色片状结晶(甲醇),ESI-MS m/z 285 [M + H]⁺,分子式为C₁₈H₃₆O₂。¹³C-NMR(100 MHz,CDCl₃) δ :13.74(C-1),19.26(C-2),30.86(C-3),64.40(C-4),174.01(C-5),34.43(C-6),25.05(C-7),29.17(C-8),29.37(C-9),29.71(C-10),29.66(C-11),29.61(C-12),29.59(C-13),29.54(C-14),29.48(C-15),31.93(C-16),22.69(C-17),14.14(C-18)。以上数据与文献[22]基本一致,故鉴定化合物4为十四烷酸丁基酯(butyl myristate)。

化合物5 白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z 609 [M + Na]⁺,分子式为C₃₈H₆₆O₄。¹H-NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :7.65(1H,d, J =15.0 Hz,HC-7),7.08(1H,dd, J =8.1,1.9 Hz,H-6),7.06(1H,d, J =1.9 Hz,H-2),6.93(1H,d, J =8.1 Hz,H-5),6.30(1H,d, J =15.0 Hz,HC-9),5.90(1H,br s,OH),4.21(2H,q, J =6.7 Hz,OCH₂),3.95(3H,s,CH₃O),1.23~1.32(52H,s,CH₂ \times 26),0.90(3H,t,CH₃);¹³C-NMR(100 MHz,CDCl₃) δ :167.37(C=O),147.89(C-4),146.75(C-3),144.60(C-7),127.06(C-1),123.03(C-6),115.69(C-5),114.69(C-2),109.29(C-8),64.61(OCH₂),55.93(OCH₃),21.04~31.93(CH₂ \times 26),14.20(CH₃)。以上数据与文献[23]基本一致,故鉴定化合物5为阿魏酸二十八酯[octacosyl(2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate]。

化合物6 白色针晶(甲醇),ESI-MS m/z 428 [M - H]⁻,分子式为C₃₀H₅₂O。¹H-NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :5.38(1H,d, J =5.4 Hz,H-6),3.56(1H,t, J =4.5 Hz,H-3),1.03(3H,s,CH₃-18),0.70(3H,s,CH₃-19),0.95(3H,s,CH₃-21),0.87(6H,d, J =7.0 Hz,CH₃-26,27),0.82(3H,t, J =7.2 Hz,CH₃-29)。¹³C-NMR(100 MHz,CDCl₃) δ :37.26(C-1),26.09(C-2),71.81(C-3),42.33(C-4),140.76(C-5),121.72(C-6),31.92(C-7),31.67(C-8),50.14(C-9),36.15(C-10),21.09(C-11),39.79(C-12),42.33(C-13),56.78(C-14),24.31(C-15),28.25(C-16),56.07(C-17),19.40(C-18),11.87(C-19),36.15(C-20),18.79(C-21),31.92(C-22),28.25(C-23),45.85(C-24),31.92(C-25),11.99(C-26),19.82(C-27),23.08(C-28),19.04(C-29)。以上数据与文献[21]报道一致,故鉴定化合物6为 β -谷甾醇(24-propylcholesterol)。

化合物7 白色晶体(甲醇),ESI-MS m/z 414

[M - H]⁻,分子式为C₂₉H₅₀O。¹H-NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :5.11(1H,t, J =5.5 Hz,H-22),5.10(1H,t, J =3.5 Hz,H-23),3.25(1H,dd, J =4.5 Hz,H-3),1.02(3H,s,19-CH₃),0.97(3H,s,21-CH₃),0.77(3H,s,18-CH₃),0.82(3H,s,29-CH₃),0.89(8H,m,26-CH₃,27-CH₃,25-CH₂);¹³C-NMR(100 MHz,CDCl₃) δ :134.01(C-5),133.53(C-22),130.86(C-23),125.20(C-6),78.99(C-3),50.96(C-14),50.02(C-17),49.63(C-13),44.11(C-24),38.93(C-9),37.26(C-4),35.87(C-20),35.42(C-12),35.25(C-10),30.89(C-1),29.76(C-7),28.14(C-25),28.05(C-2),27.93(C-16),27.67(C-8),25.74(C-28),24.76(C-15),24.47(C-16),21.53(C-11),20.14(C-21),18.92(C-19),17.68(C-27),15.62(C-29),15.53(C-18)。以上数据与文献[24]基本一致,故鉴定化合物7为豆甾醇(stigmasterol)。

化合物8 白色固体(甲醇),ESI-MS m/z 652 [M - H]⁻,分子式为C₄₅H₈₀O₂。¹³C-NMR(100 MHz,CDCl₃) δ :37.01(C-1),27.83(C-2),73.67(C-3),38.17(C-4),139.73(C-5),122.57(C-6),31.93(C-7),31.88(C-8),50.04(C-9),36.61(C-10),21.04(C-11),38.17(C-12),42.32(C-13),56.70(C-14),25.08(C-15),27.83(C-16),56.04(C-17),11.86(C-18),19.33(C-19),36.16(C-20),18.78(C-21),34.74(C-22),26.04(C-23),45.85(C-24),29.12(C-25),19.82(C-26),19.04(C-27),23.08(C-28),11.99(C-29),173.33(C-1'),34.74(C-2'),25.08(C-3'),29.26(C-4'),29.37(C-5'),29.46(C-6'),29.60(C-7'-13'),29.71(C-8'-13'),31.88(C-14'),22.70(C-15'),14.12(C-16')。以上数据与文献[25]报道基本一致,故鉴定化合物8为(3 β)-stigmast-5-en-3-yl-palmitate。

化合物9 无色针晶(甲醇),ESI-MS m/z 412 [M - H]⁻,分子式为C₂₉H₄₈O。¹H-NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :0.57(3H,s,H-18),0.82(3H,s,H-19),1.06(3H,d, J =6.6 Hz,H-21),3.62(1H,m,H-3),5.04(1H,br s,H-7),5.08(1H,dd, J =15.0,8.4 Hz,H-22),5.18(1H,dd, J =15.0,8.4 Hz,H-23);¹³C-NMR(100 MHz,CDCl₃) δ :37.15(C-1),31.49(C-2),71.06(C-3),38.01(C-4),40.27(C-5),29.65(C-6),117.46(C-7),139.56(C-8),49.46(C-9),34.23(C-10),21.38(C-11),39.47(C-12),43.30(C-13),55.13(C-14),23.02(C-15),28.51(C-16),55.91(C-17),12.25(C-18),13.05(C-19),40.82

(C-20), 21.09 (C-21), 138.16 (C-22), 129.45 (C-23), 51.25 (C-24), 31.88 (C-25), 21.56 (C-26), 19.00 (C-27), 25.40 (C-28), 12.06 (C-29)。以上数据与文献[26]报道基本一致,故鉴定化合物**9**为 α -菠菜甾醇。

化合物**10** 白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z 269 $[M - H]^-$,分子式为 $C_{16}H_{14}O_4$ 。 1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.03 (1H, s, OH), 7.42 ~ 7.45 (5H, m, H-2' ~ 6'), 6.08 ~ 6.11 (2H, s, H-6, 8), 5.44 (1H, dd, $J = 12.8, 2.8$ Hz, H-2), 3.07 (1H, dd, $J = 16.8, 12.8$ Hz, H-3 α), 2.84 (1H, dd, $J = 16.8, 2.8$ Hz, H-3 β), 3.81 (3H, s, OCH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 94.29 (C-1), 79.24 (C-2), 43.40 (C-3), 195.77 (C-4), 164.16 (C-5), 95.17 (C-6), 168.16 (C-7), 162.80 (C-8), 103.16 (C-9), 55.70 (C-10), 138.38 (C-1'), 126.16 (C-2'), 128.88 (C-3'), 128.88 (C-4'), 128.88 (C-5'), 126.13 (C-6')。上述数据与文献[27]报道一致,故鉴定化合物**10**为球松素(pinostrobin)。

化合物**11** 淡黄色黏稠液体(甲醇),ESI-MS m/z 281 $[M - H]^-$,分子式为 $C_{18}H_{34}O$ 。 1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.88 (3H, t, CH_3), 1.201 ~ 1.53 (22H, m, $11 \times CH_2$), 1.64 (2H, m, CH), 2.06 (4H, m, $2 \times CH_2CH$), 2.34 (2H, t, CH_2CO_2H), 5.33 (2H, m, 2CH), 11.19 (1H, br s, CO_2H); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.72 (C-1), 29.43 (C-2), 29.36 (C-3), 34.00 (C-4), 31.91 (C-5), 29.68 (C-6), 29.64 (C-7), 29.59 (C-8), 130.02 (C-9), 129.72 (C-10), 29.32 (C-11), 29.24 (C-12), 29.14 (C-13), 29.04 (C-14), 27.32 (C-15), 24.69 (C-16), 22.69 (C-17), 14.11 (C-18)。以上数据与文献[28]报道基本一致,故鉴定化合物**11**为油酸(oleic acid)。

化合物**12** 无色透明油状物(甲醇),ESI-MS m/z 289 $[M - H]^-$,分子式为 $C_{20}H_{34}O$ 。 1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.92 (1H, dd, $J = 17.3, 10.8$ Hz, H-14), 5.21 (1H, dd, $J = 17.3, 1.3$ Hz, H-15 α), 5.05 (1H, dd, $J = 10.8, 1.3$ Hz, H-15 β), 4.82 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-17 α), 4.51 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-17 β), 2.38 (1H, ddd, $J = 12.7, 4.2, 2.4$ Hz, H-7 α), 1.96 (1H, dt, $J = 12.7, 5.0$ Hz, H-7 β), 1.28 (3H, s, H-16), 0.87 (3H, s, H-19), 0.80 (3H, s, H-18), 0.68 (3H, s, H-20); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 41.47 (C-1), 19.40 (C-2), 38.37 (C-3), 39.89 (C-4), 55.61 (C-5), 24.45 (C-6), 39.10 (C-7), 148.68 (C-

8), 57.37 (C-9), 33.62 (C-10), 17.73 (C-11), 42.22 (C-12), 73.56 (C-13), 145.32 (C-14), 111.50 (C-15), 27.66 (C-16), 106.44 (C-17), 21.72 (C-18), 33.62 (C-19), 14.44 (C-20)。以上数据与文献[29]基本一致,故鉴定化合物**12**为泪杉醇(manool)。

化合物**13** 淡黄色油状液体(甲醇),ESI-MS m/z 289 $[M - H]^-$,分子式为 $C_{18}H_{32}O_2$ 。 ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.30 (C-1), 33.92 (C-2), 24.67 (C-3), 29.14 (C-4), 29.07 (C-5), 29.03 (C-6), 29.70 (C-7), 27.21 (C-8), 130.21 (C-9), 128.06 (C-10), 25.63 (C-11), 127.90 (C-12), 130.02 (C-13), 27.18 (C-14), 29.58 (C-15), 31.92 (C-16), 22.69 (C-17), 14.06 (C-18)。以上数据与文献[30]基本一致,故鉴定化合物**13**为亚油酸(linoleic acid)。

化合物**14** 白色颗粒状结晶(三氯甲烷-甲醇),ESI-MS m/z 325 $[M + Na]^+$,分子式为 $C_{20}H_{30}O_2$ 。 1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.18 (1H, s, H-18), 6.08 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-3), 5.24 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-7), 5.04 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, H-11), 5.07 (1H, dd, $J = 4.6, 2.8$ Hz, H-5), 1.64 (3H, s, H-20), 1.54 (3H, s, H-19), 1.16 (3H, s, H-16), 1.15 (3H, s, H-17); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 39.63 (C-1), 34.08 (C-2), 161.69 (C-3), 142.68 (C-4), 69.75 (C-5), 33.65 (C-6), 117.35 (C-7), 138.40 (C-8), 38.65 (C-9), 24.44 (C-10), 123.46 (C-11), 134.13 (C-12), 38.34 (C-13), 25.62 (C-14), 28.05 (C-15), 23.14 (C-16), 21.87 (C-17), 193.91 (C-18), 16.74 (C-19), 18.17 (C-20)。以上数据与文献[31]基本一致,故鉴定化合物**14**为pekinenal。

化合物**15** 白色片状结晶(甲醇),ESI-MS m/z 426 $[M]^+$,分子式为 $C_{30}H_{50}O$ 。 1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.07 (1H, t, $J = 2.3$ Hz, H-12), 3.24 (1H, dd, $J = 5.7, 10.35$ Hz, H-3), 1.13 (6H, s, $2 \times CH_3$), 0.95 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.90 (3H, s), 0.84 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.81 (3H, s), 0.77 (3H, s), 0.75 (3H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.01 (C-1), 27.13 (C-2), 79.10 (C-3), 38.80 (C-4), 55.53 (C-5), 18.60 (C-6), 32.54 (C-7), 39.27 (C-8), 48.10 (C-9), 37.60 (C-10), 23.56 (C-11), 117.92 (C-12), 145.48 (C-13), 41.63 (C-14), 25.05 (C-15), 34.61 (C-16), 40.05 (C-17), 52.63 (C-18), 22.83 (C-19), 28.39 (C-20), 60.01 (C-21), 31.74 (C-22), 28.05 (C-23), 15.39 (C-24), 15.28 (C-25), 16.32 (C-26),

22. 22 (C-27), 18. 58 (C-28), 22. 51 (C-29), 22. 66 (C-30)。以上数据与文献[32]报道基本一致,故鉴定化合物 **15** 为 neomotioli。

化合物 **16** 白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z 453 $[M-H]^-$,化学式为 $C_{30}H_{46}O_3$ 。 1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ :5. 08(1H, t, $J = 7. 0$ Hz, H-24), 3. 27(1H, dd, $J = 5. 2, 11. 0$ Hz, H-3), 2. 89(1H, dt, $J = 13. 8, 3. 6$ Hz, H-1), 2. 74(1H, $J = 16. 0$, H-12), 2. 60(1H, $J = 16. 0$ Hz, H-12), 2. 46 ~ 2. 52(m, CH_2), 2. 10 ~ 2. 17(1H, m), 1. 96(1H, m), 1. 82 ~ 2. 08(m, CH_2), 1. 75(1H, m), 1. 68(1H, m), 1. 66 ~ 1. 78(m, CH_2), 0. 88 ~ 1. 60(6H, s), 1. 06 ~ 1. 38(4H, m), 0. 9(1H, d, $J = 7. 0$ Hz, CH_3 -29)。 ^{13}C -NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ :33. 90(C-1), 27. 90(C-2), 77. 93(C-3), 38. 57(C-4), 49. 28(C-5), 35. 88(C-6), 202. 04(C-7), 149. 77(C-8), 154. 81(C-9), 39. 81(C-10), 199. 91(C-11), 51. 44(C-12), 49. 28(C-13), 48. 48(C-14), 31. 85(C-15), 27. 40(C-16), 49. 19(C-17), 16. 8(C-18), 17. 58(C-19), 27. 90(C-20), 18. 31(C-21), 35. 88(C-22), 24. 85(C-23), 124. 78(C-24), 131. 25(C-25), 25. 70(C-26), 17. 75(C-27), 27. 94(C-28), 15. 04(C-29), 25. 97(C-30)。以上数据与文献[33]报道基本一致,故鉴定化合物 **16** 为 (3β)-3-hydroxyanosta-8, 24-diene-7, 11-dione。

4 斑马鱼胚胎毒性评价

4.1 全部死亡剂量 (LC_{100}) 和无死亡剂量 (LC_0) 的测定 将各化合物分别用人工海水溶解(化合物不易溶于水则加入不超过 0. 5% 的 DMSO 助溶),将其配制成不同浓度的一系列样品,实验于 24 孔板中进行,每孔挑取 10 枚健康发育 24 h 的斑马鱼胚胎,每孔加入药液 2 mL,每个化合物设 1 个空白组,给药后每隔 24 h 观察并记录胚胎的发育及死亡情况,96 h 后统计斑马鱼胚胎死亡数,各化合物 96 h- LC_{100} 和 96 h- LC_0 (化合物 96 h- $LC_{100} > 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,则认为此化合物对斑马鱼胚胎在 96 h 内不具有急性毒性,不进行下一步实验)。

4.2 半数致死浓度 (LC_{50}) 的测定 预实验确定的毒性化合物,根据其 LC_{100} 和 LC_0 的范围,选定合适的组间比例,分别按照几何级数梯度设 8 个实验浓度组以及一个人工海水对照组。每个浓度组设定 3 个平行组以及一个对照组。实验期间每 24 h 观察鱼卵的孵化及死亡情况并及时记录,整个实验周期结束后,将数据进行统计分析,计算各毒性化合物对斑马鱼的 96 h 半数致死浓度(96 h- LC_{50})。

4.3 数据处理 实验结果采用 SPSS 20. 0 软件进行统计分析,半数致死浓度用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

4.4 毒性评价结果 各化合物的 96 h- LC_{100} 和 96 h- LC_0 测定结果见表 1。筛选得到的 4 个毒性化合物对斑马鱼胚胎的 96 h- LC_{50} 测定结果见表 1。

表 1 各毒性化合物 96 h- LC_{100} , 96 h- LC_0 , 96 h- LC_{50} ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 96 h- LC_{100} , 96 h- LC_0 , 96 h- LC_{50} of toxic compounds ($\bar{x} \pm s$) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

化合物	96 h- LC_{100}	96 h- LC_0	96 h- LC_{50}
pekinenal	20	4. 19	8. 50 \pm 0. 29
泪杉醇	4	0. 84	1. 61 \pm 0. 03
球松素	31. 46	10. 09	13. 54 \pm 0. 62
(3β)-3-hydroxyanosta-8, 24-diene-7, 11-dione	29. 62	6. 1	12. 04 \pm 0. 18

5 总结与讨论

京大戟为我国传统中药,多用于治疗水肿胀满、胸腹积水、痰饮积聚等证,因其苦寒有毒,且为中药“十八反”之一,醋制减毒原理尚不明确,临床使用存在诸多限制,故阐明京大戟毒性物质基础以及醋制减毒的原理是现代研究的重点。文献报道表明京大戟中含有的萜类成分为其主要活性成分,其中二萜类成分多具有强烈的生理活性,如抗炎、泻下、抗病毒、抗肿瘤等;同时也具有皮肤眼睛刺激致炎、促发致癌等毒性反应^[10-11]。本文通过对京大戟化学成分分离以及斑马鱼胚胎毒性筛选得到 4 个毒性化合物,其中毒性较大的两个化合物均为二萜类,其中 casbane 型二萜 pekinenal 对人体多种癌细胞系均具有细胞毒性^[28];泪杉醇则为一种双环二萜,实验过程中发现对斑马鱼胚胎的毒性极大,同时可能具有严重的皮肤及眼睛刺激性; (3β)-3-hydroxyanosta-8, 24-diene-7, 11-dione 为含有双羰基的三萜类化合物,对斑马鱼胚胎皮肤具有一定刺激性;球松素则为黄酮类成分,同样可能具有皮肤、眼睛等刺激性。其余如大戟醇等三萜类化合物、肉豆蔻酸等脂肪酸类化合物均未对斑马鱼胚胎表现出明显的急性毒性。

中医药理论中药物的毒性即为其偏性,而偏性正是药物达到治疗效果的重要特性,故对于京大戟的毒性应在中医药理论指导下分为二的看待,在正常人体或动物体内,京大戟可能表现出刺激致炎、致癌等毒性作用;而在特定的证候如便秘、腹水等情况下,则表现出如泻下、消肿等治疗作用。现代研究表明,京大戟中主要有效成分与毒性成分可能均为二萜类化合物,结合二萜类成分的结构,推测其双重

生理活性可能与其环状结构有关,而这类环状结构多不稳定,故京大戟炮制时加入醋煮,在加热以及酸性环境中可能会水解或发生其他化学反应导致其结构变化,从而使其含量降低,缓和药性,突出京大戟的治疗作用。本文采用现代分析方法对京大戟化学成分进行分离,为京大戟的毒性物质基础以及醋制减毒原理的研究奠定了基础,同时也为以新型模型生物斑马鱼进行中药有效成分的高通量活性筛选提供了新思路。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 精选本. 4卷[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:806.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:269.

[3] 葛秀允,孙立立,张乐林. 京大戟炮制的历史沿革研究[C]//2010中药炮制技术、学术交流暨产业发展高峰论坛论文集,成都,2010:162-165.

[4] 李文海. 箭舌豌豆和京大戟化学成分及生物活性研究[D]. 兰州:兰州大学, 2010.

[5] LIANG Q L, DAI C C, JIANG J H, et al. A new cytotoxic casbane diterpene from *Euphorbia pekinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(8):514-516.

[6] WANG K L, YU H L, WU H, et al. A new casbane diterpene from *Euphorbia pekinensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(15):1456-1460.

[7] 陈海鹰,陶伟伟,曹雨诞,等. 京大戟化学成分的研究[J]. *中成药*, 2013, 35(4):745-748.

[8] 张瑜洋. 京大戟化学成分的研究[D]. 长春:吉林大学, 2010.

[9] 孔令义,闵知大. 大戟根化学成分的研究[J]. *药学学报*, 1996(7):524-529.

[10] 王宝丽,邹迪新,程钱,等. 京大戟化学成分及药理作用研究概述[J]. *环球中医药*, 2016, 9(7):896-900.

[11] 张乐林,葛秀允,孙立立,等. 醋制对京大戟毒性和药效的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(19):276-279.

[12] 张楷承,曹雨诞,姚芳,等. 京大戟醋制前后对斑马鱼胚胎的急性毒性研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(12):2291-2297.

[13] 彭蕴茹,韦英杰,丁永芳,等. 基于斑马鱼模型的药物毒性研究进展与中药毒性研究新策略[J]. *中草药*, 2017, 48(1):17-30.

[14] 舒斌,韦英杰,张陆勇,等. 采用模式生物斑马鱼评价三种中药成分的急性毒性[J]. *云南中医学院学报*, 2010, 33(1):35-37.

[15] 许冰洁,张立将,李春启,等. 斑马鱼胚胎评价5种药物的发育毒性与模型验证[J]. *中国药理学通报*,

2016, 32(1):74-79.

[16] 韦英杰,贾晓斌,詹扬,等. 丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮和丹参酮I组合物在斑马鱼体内的代谢研究[J]. *中草药*, 2013, 44(9):1149-1156.

[17] 赵崇军,田敬欢,王金凤,等. 斑马鱼在中药研究中的应用进展[J]. *中草药*, 2015, 46(17):2635-2648.

[18] Westerfeld M. *The Zebrafish Book* [M]. Eugene: Eugene University of Oregon Press, 1995.

[19] 李春雷,崔广东,史高峰,等. 低毒工业大麻叶的化学成分研究[J]. *中成药*, 2009, 31(1):104-105.

[20] 许明峰,沈莲清,王奎武. 雷丸化学成分的研究[J]. *中草药*, 2011, 42(2):251-254.

[21] 陈海鹰,陶伟伟,曹雨诞,等. 京大戟化学成分的研究[J]. *中成药*, 2013, 35(4):745-748.

[22] Sakaue K. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology [J]. *J Inst Image Inf Television Eng*, 2001, 55(12):1605-1608.

[23] 周兴旺,徐国钧,王强. 地骨皮化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(11):675-676.

[24] 刘竹乾. 京大戟化学成分及其杀鼠活性的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.

[25] SUN H, ZHANG J, YE Y, et al. Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from the rhizome of *Astilbe chinensis* [J]. *Chem Inform*, 2003, 34(45):2414-2423.

[26] 李伟,时圣明,唐云,等. 合子草化学成分的研究(I) [J]. *中草药*, 2014, 45(15):2143-2147.

[27] Hodgetts K J. Inter- and intramolecular Mitsunobu reaction based approaches to 2-substituted chromans and chroman-4-ones [J]. *Tetrahedron*, 2005, 61(28):6860-6870.

[28] Pai Z P, Khlebnikova T B, Mattsat Y V, et al. Catalytic oxidation of fatty acids. I. Epoxidation of unsaturated fatty acids [J]. *React Kinet Catal Lett*, 2009, 98(1):1-8.

[29] 赵明,陈丽杰,裴世春,等. 细叶杜香化学成分研究(I) [J]. *中草药*, 2014, 45(11):1532-1535.

[30] Marwah R G, Fatope M O, Deadman M L, et al. Musanahol: A new aureonitol - related metabolite from a *Chaetomium* sp [J]. *Cheminform*, 2007, 38(49):8174-8180.

[31] LIANG Q L, DAI C C, JIANG J H, et al. A new cytotoxic casbane diterpene from *Euphorbia pekinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(8):514-516.

[32] Chakravarty A K, Masuda K, Suzuki H, et al. Unambiguous assignment of ¹³C chemical shifts of some hopane and migrated hopane derivatives by 2D NMR [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(9):2865-2876.

[33] LU Z Q, CHEN G T, ZHANG J Q, et al. Four new lanostane triterpenoids from *Euphorbia humifusa* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2007, 90(11):2245-2250.

[责任编辑 顾雪竹]