

# 狼毒大戟抗肿瘤活性成分

马玉坤, 马天成, 孙宇\*, 刘雷, 郭丽娜, 孙珈, 刘琦, 韩翠翠  
(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** **目的:** 筛选狼毒大戟抗肿瘤活性馏分, 分离活性单体化合物并对构效关系进行探讨。利用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS)对活性馏分的化学成分进行鉴定。**方法:** 采用噻唑蓝(MTT)法对狼毒大戟乙醇提取物的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取部位的抗肿瘤活性进行测试。综合运用多种现代色谱分离手段对活性萃取层石油醚层进行分离。利用核磁(NMR)和质谱(MS)技术鉴定化合物的化学结构。质谱使用ESI离子源, 正离子模式下采集数据, 结合狼毒大戟相关文献以及对照品信息进行数据分析, 解析活性馏分的化合物结构。**结果:** 从活性馏分层石油醚层分离得到6个单体化合物, 分别为岩大戟内酯A, 岩大戟内酯B, 17-羟-岩大戟内酯A, 17-羟-岩大戟内酯B, euphopilolide, atis-16-en-13(s)-hydroxy-3, 14-dione。对这些化合物的抗肿瘤活性的构效关系进行了探讨。利用UPLC-Q-TOF-MS对狼毒大戟乙醇提取物的石油醚萃取部位化学成分进行鉴定, 共鉴定化合物23个, 其中二萜类成分19个, 酚类成分2个, 脂肪酸类成分1个, 三萜类成分1个。峰18和峰21初步鉴定为新化合物。**结论:** 狼毒大戟的活性馏分层为石油醚层, 其主要成分为二萜类, 具有较好的抗肿瘤活性。UPLC-Q-TOF-MS技术能够快速准确地鉴定狼毒大戟活性馏分的化学成分结构, 为其质量评价和活性物质基础研究提供了参考。

**[关键词]** 狼毒大戟; 抗肿瘤活性; 二萜类成分; 乙醇提取物; 石油醚萃取部位

**[中图分类号]** R289; R284.1; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0156-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200216

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191010.1807.002.html>

**[网络出版时间]** 2019-10-11 09:20

## Anti-tumor Constituents from Rhizome of *Euphorbia fischeriana*

MA Yu-kun, MA Tian-cheng, SUN Yu\*, LIU Lei, GUO Li-na, SUN Jia, LIU Qi, HAN Cui-cui  
(Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To screen out active fraction from *Euphorbia fischeriana*, separate active components from *E. fischeriana* and explore structure-activity relationships, in order to analyze and identify chemical compositions of petroleum ether fraction from *E. fischeriana* ethanol extract by ultra-performance liquid chromatography with quadrupole-time-of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). **Method:** The anti-tumor activities of petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol and water extracts from *E. fischeriana* were tested by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. A variety of modern chromatographic separation methods were used to separate active compounds from petroleum ether layer. Compounds were isolated. Their structures were identified by NMR technique. The structure-activity relationships between anti-tumor activities and structures of compounds were investigated. UPLC-Q-TOF-MS technique was used to identify the structures of petroleum ether extract from *E. fischeriana*. Mass spectrometry was performed in the positive ion mode using ESI ion sources. **Result:** Six compounds were isolated from petroleum ether fraction. They were jolkinolide A, jolkinolide B, 17-hydroxyjolkinolide A, 17-hydroxyjolkinolide B, euphopilolide and atis-16-en-13(s)-hydroxy-3, 14-dione. A

**[收稿日期]** 20190925(002)

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(2017-KYYWF-0702)

**[第一作者]** 马玉坤, 硕士, 实习研究员, 从事天然药物化学成分研究, Tel: 0452-2663371, E-mail: 769650146@qq.com

**[通信作者]** \* 孙宇, 博士, 助理研究员, 从事天然药物化学成分及质量分析研究, Tel: 0452-2663371, E-mail: zsy5811321@126.com

total of 23 peaks were identified based on the comparison of retention times, accurate masses and fragmentation patterns with available standard compounds and literatures. Among them, there were 19 diterpenoids, 2 polyphenols, 1 fatty acid and 1 triterpenoid. Peaks No. 18 and No. 21 were tentatively identified as new compounds. **Conclusion:** The petroleum ether fraction showed a potential anti-tumor activity. The structure-activity relationships were discussed. UPLC-Q-TOF-MS technology can be used to quickly and accurately identify the structures, so as to provide a reference for its quality evaluation and active ingredient research.

**[Key words]** *Euphorbia fischeriana*; antitumor activities; diterpenoids; ethanol extract; petroleum ether fraction

狼毒大戟 (*Euphorbia fischeriana*) 在我国主要生长于内蒙古、东北及河北等地区。其根入药, 是一种传统的中药材。狼毒始载于《神农本草经》, 其味苦、辛, 性平, 有毒, 具有泄水逐饮, 破积杀虫的功效, 主治水腫腹脹, 痰食虫积, 心腹疼痛, 结核, 疥癬等<sup>[1]</sup>。到目前为止国内外研究人员已从狼毒大戟中分离得到九十余种单体化合物, 其中包括二萜类、三萜类、香豆素类、酚酸类、甾醇类等化合物<sup>[2-3]</sup>。并通过现代药理学实验手段证明其具有抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗肿瘤、抗癫痫等多种活性<sup>[4]</sup>。近年来, 抗肿瘤活性研究已成为研究热点<sup>[5]</sup>。目前对狼毒大戟的研究主要是以采用先分离纯化后利用波谱技术鉴定其结构, 最后进行活性测试的分析模式, 较为繁琐, 存在重复分离已知成分及分离得到成分没有活性等问题; 质量控制方面主要是有效成分的测定等初步研究, 针对狼毒大戟抗肿瘤活性成分的液质鉴定未见文献报道。为明确狼毒大戟活性成分的化学结构, 利用噻唑蓝 (MTT) 法对活性馏分层进行筛选, 对单体化合物进行分离与鉴定, 并对构效关系进行探讨。最后, 以分离得到单体化合物可能的质谱二级裂解规律为基础, 利用 UPLC-Q-TOF-MS 对狼毒大戟活性馏分的化学成分进行鉴定。共鉴定了 23 个化合物, 主要为二萜类成分, 其中 2 个为新化合物。为狼毒大戟抗肿瘤活性成分及机制的研究奠定了物质基础。

## 1 材料

N-1100 型旋转蒸发器 (Eyela 公司); 8800 型超声波清洗器 (美国 Branson 仪器有限公司); 106 型索氏动态提取浓缩机组, S-4002 型多功能萃取罐 (砥实机械); C-620 型中压制备色谱仪 (瑞士步琪仪器有限公司); CBIO21 型多功能紫外分析仪 (北京赛百奥科技有限公司); MS104S 型 1/1 万电子天平 (瑞士梅特勒公司); 2545 型全制备液相色谱仪, 2489 型紫外检测器, 2535 型半制备型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶

柱 (Sephadex LH-20, 美国 GE 公司); 柱色谱用硅胶 (100 ~ 200, 200-300 目), GF<sub>254</sub> 薄层色谱板 (青岛海洋化工厂); AM-600 型核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); 113-DAS 型电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器公司); 706 型 - 80 °C 超低温冰箱, Thermo-3111 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); LDZX-50KBS 型 50L 手轮式全不锈钢立式压力灭菌器 (上海申安医疗器械厂); BHC1300-II B2 型生物安全柜 (苏净安泰有限公司); ELX800 型全自动酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 5417R 型小型高速台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); IX51 型倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 96 孔细胞培养板, 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶 (美国 Corning 生物科技公司); 250 mL 试剂瓶 (德国 DURAN 实验器材公司); 20 μL, 200 μL, 1 000 μL 枪头 (Axygen 生物制品有限公司); 无水乙醇、石油醚、正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、二氯甲烷 (分析纯, 天津富宇试剂有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国默克公司); 二甲基亚砜 (美国 Gibco 公司); MTT (美国 Sigma 公司); 胰蛋白酶消化液 (海博古生物科技有限公司); 胎牛血清, RPMI-1640, MEM (美国 Gibco 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (上海博古生物科技有限公司); BEL-7402 人肝癌细胞, NCI-H460 人大细胞肺癌细胞 (中科院上海细胞库)。

## 2 方法

**2.1 狼毒的提取与萃取** 取切成厚度约 1 cm 的干燥的狼毒大戟根部约 30 kg 加入到提取罐中, 用无水乙醇 84 L 冷浸 24 h, 提取 5 次, 合并提取液并浓缩, 得到浸膏 2.38 kg。将浸膏用蒸馏水 8 L 溶解, 并倒入多功能萃取罐中, 加入石油醚 20 L, 搅拌 1 h, 静置 2 h, 取出石油醚层, 反复萃取 3 次, 合并石油醚层, 减压浓缩, 最终得到石油醚萃取物 (1 080 g)。同法得到乙酸乙酯萃取物 (700 g), 正丁醇萃取物 (200 g), 水层样品 (400 g)。

**2.2 狼毒大戟成分的抗肿瘤活性测试** 取对数期

生长的 BEL-7402 人肝癌细胞, NCI-H460 人大细胞肺癌细胞, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基配制细胞悬液, 以每孔  $7 \times 10^3$  个细胞  $180 \mu\text{L}$  体系接种于 96 孔细胞培养板中, 置于  $\text{CO}_2$  培养箱中, 培养 24 h 后, 每孔分别加入 5, 10, 20, 40, 80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度的待筛选样品  $20 \mu\text{L}$ , 每组设 5 个平行孔。药物分别作用 24 或 48 h 后弃去培养基, 每孔加入对应的培养基  $80 \mu\text{L}$ , 再加入 MTT 溶液  $20 \mu\text{L}$ , 继续在培养箱中培养 4 h。小心吸去上清培养基, 每孔加入 DMSO  $150 \mu\text{L}$  置摇床低速震荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 酶标仪 490 nm 波长下测定其吸光度  $A$ 。计算待筛选药物对肿瘤细胞的生长抑制率, 并求得半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

**2.3 活性馏分分离** 石油醚萃取物 100.0 g 经硅胶柱色谱用石油醚-乙酸乙酯 (100:5, 100:10, 100:15, 100:30, 100:50, 100:70, 100:100, 0:100) 梯度洗脱, TLC 检测合并成分相似的洗脱液, 减压浓缩得到 8 个组分 (LD-P-1 ~ LD-P-8)。组分 LD-P-2 (36.0 g) 用硅胶柱色谱分离, 用石油醚-乙酸乙酯 (100:0, 100:2, 100:5, 100:7, 100:10, 100:15, 0:100) 梯度洗脱, TLC 检测合并成分相似的洗脱液, 减压回收溶剂得到 7 个组分 LD-P-2-1 ~ LD-P-2-7。将 LD-P-2-4 组分使用 HPLC (反相) 进行分离, 调节流动相为甲醇-水 (80:20), 设定流速  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 得到化合物 1 (300.0 mg)。组分 LD-P-3 (16.4 g) 经硅胶柱色谱, 用石油醚-乙酸乙酯进行系统洗脱, 再用 TLC 跟踪分析合并相似洗脱液, 得到 6 个组分 (LD-P-3-1 ~ LD-P-3-6)。组分 LD-P-3-2 (4.8 g) 用硅胶柱色谱, 采用石油醚-乙酸乙酯 (100:0, 100:3, 100:7) 进行梯度洗脱, 再用 TLC 检测合并成分相似的洗脱液, 减压浓缩最终得到 4 个组分 (LD-P-3-2-1 ~ LD-P-3-2-4)。将 LD-P-3-2-4 组分利用重结晶得到化合物 2 (400.0 mg)。再将 LD-P-3-5 (2.6 g) 组分用硅胶柱色谱, 用石油醚-乙酸乙酯 (100:0, 100:5, 100:10) 进行梯度洗脱, 再用 TLC 跟踪分析合并相似洗脱液得到 (LD-P-3-5-1 ~ LD-P-3-5-5); 其中将 LD-P-3-5-4 组分使用 HPLC (反向) 示差检测器进行分离, 调节流动相为甲醇-水 (85:15), 设定流速为  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 得化合物 5 (15.0 mg)。组分 LD-P-6 (10.1 g) 利用硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇 (100:1, 80:1, 60:1, 40:1, 20:1) 进行梯度洗脱, 再用 TLC 跟踪分析, 合并相似馏分, 得到 4 个组分 (LD-P-6-1 ~ LD-P-6-4)。将 LD-P-6-2 (3.3 g) 组分再用硅胶柱色谱, 用石油醚-乙酸

乙酯 (100:10, 100:20, 100:30, 0:100) 进行梯度洗脱, 得到 4 个组分 (LD-P-6-2-1 ~ LD-P-6-2-4)。其中 LD-P-6-2-2 (1.1 g) 和 LD-P-6-2-1 (1.0 g) 分别进行重结晶得到化合物 3 (300 mg) 和化合物 4 (250 mg)。组分 LD-P-7 (7.0 g) 经硅胶柱色谱, 用石油醚-乙酸乙酯 (100:50, 100:70, 100:100, 0:100) 进行梯度洗脱, 再用 TLC 跟踪分析, 合并相似洗脱液, 得到 4 个组分 (LD-P-7-1 ~ LD-P-7-4); 其中 LD-P-7-2 (1.6 g) 组分经过重结晶得到化合物 6 (15.5 mg)。

## 2.4 狼毒大戟活性馏分成分鉴定

**2.4.1 色谱条件与质谱条件** 色谱条件: Phenomenex 色谱柱 (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A 0.1% 甲酸-水, 流动相 B 0.1% 甲酸-乙腈, 洗脱梯度 (0.01 min, 20% B; 0.01 ~ 1 min, 20% ~ 30% B; 1 ~ 7 min, 30% ~ 50% B; 7 ~ 10 min, 50% ~ 70% B; 10 ~ 15 min, 70% ~ 100% B; 15 ~ 16 min, 100% B; 16 ~ 16.1 min, 100% ~ 20% B; 16.1 ~ 18 min, 20% B) 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 0.3  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量 1  $\mu\text{L}$ 。质谱条件: 采用正离子扫描模式, 离子喷雾电压 5.5 kV; 离子源温度 600  $^{\circ}\text{C}$ ; 去簇电压 (DP) 100 V 和碰撞能量 (CE) 10 V。氮气为雾化气和辅助气, 雾化气压力 379 kPa, 辅助气压力 379 kPa, 气帘气压力 241 kPa。ESI 正离子模式下进行全扫描, 积累时间 250 ms。IDA 采用标准, 每个分析物, 超过 100 cps 的 15 个最强的碎片离子, 质量范围  $m/z$  100 ~ 1 200, 累积时间为 100 ms。碰撞电压差 15 eV, 动态背景扣除 DBS 开启。自动校准系统 (CDS) 对 MS 和 MS/MS 自动进行调谐和校正。数据获取和处理分析采用 PeakView<sup>®</sup> 2.1 软件, MasterView 软件。Analyst<sup>®</sup> TF 1.7.1 软件工作站。

**2.4.2 供试品溶液的制备** 将石油醚层样品取适量, 吹干, 复溶, 配置成质量浓度  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 即得。

## 3 结果与讨论

**3.1 狼毒大戟各萃取层活性测试** 根据 2.2 项下方法, 测试样品对 BEL-7402 和 NCI-H460 作用 24 h 后的抗肿瘤活性。活性结果见表 1。

**3.2 单体化合物结构鉴定** 通过对各萃取馏分的活性进行测试, 发现石油醚层的抗肿瘤活性最强。因此, 对石油醚层进行了进一步的分离, 得到了 6 个单体化合物。结构见图 1。对结构进行解析, 碳谱数据见表 2。

化合物 1 白色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$  315.195 2,

表 1 各萃取层和化合物 1,2,3,4,5,6 对 BEL-7402 和 NCI-H460 抗肿瘤活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

馏分/化合物	BEL-7402		NCI-H460	
	24 h	48 h	24 h	48 h
石油醚层	49.71 ± 0.36	-	39.43 ± 0.25	-
乙酸乙酯层	89.12 ± 0.51	-	92.66 ± 0.44	-
正丁醇层	> 100	-	> 100	-
水层	> 100	-	> 100	-
紫杉醇	6.21 ± 0.14	-	4.90 ± 0.37	-
1	> 100	> 100	> 100	> 100
2	16.61 ± 0.37	6.56 ± 0.42	69.54 ± 0.51	22.46 ± 0.17
3	20.59 ± 0.19	18.63 ± 0.29	38.07 ± 0.32	24.00 ± 0.37
4	18.78 ± 0.22	11.47 ± 0.26	16.76 ± 0.35	13.58 ± 0.23
5	66.97 ± 0.41	49.77 ± 0.45	> 100	61.99 ± 0.19
6	75.95 ± 0.26	> 100	> 100	> 100

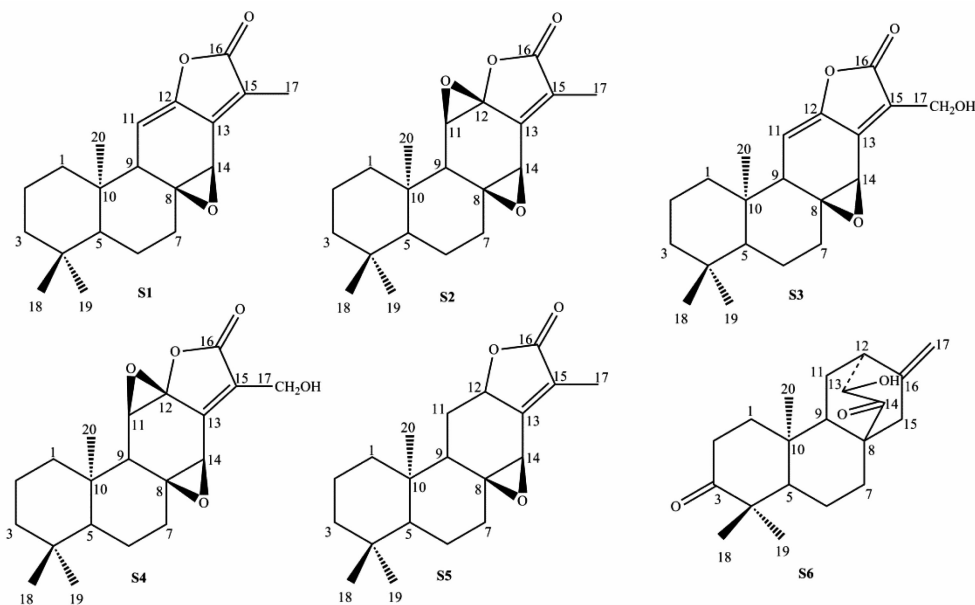


图 1 化合物 1~6 的结构及编号

Fig. 1 Structures and numbers of compounds 1-6

$[M + H]^+$ , 计算值 315.196 0, 确定分子式  $C_{20}H_{26}O_3$ 。IR (KBr)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 1 762, 1 656。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta_H$  0.72 (3H, s, H-20), 0.85 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, s, H-18), 2.05 (3H, s, H-17) 为 4 个甲基的氢信号;  $\delta_H$  2.63 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-9), 5.45 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-11) 为 9 位和 11 位的氢信号;  $\delta_H$  3.70 (1H, s, H-14) 为 14 位连氧的氢信号。 $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta_C$  8.7 (C-17), 33.5 (C-18), 21.9 (C-19) 和 15.0 (C-20) 为 4 个甲基碳信号;  $\delta_C$  104.1 (C-11), 147.0 (C-12), 145.0 (C-13), 125.2

(C-15) 为 4 个双键上碳信号;  $\delta_C$  61.2 (C-8), 54.5 (C-14) 为 2 个连氧的碳信号;  $\delta_C$  170.7 (C-16) 为羰基碳信号; 此外, 高场区存在 9 个脂肪族的碳信号。以上数据与文献 [6] 报道的岩大戟内酯 A 数据基本一致, 故鉴定化合物 1 为岩大戟内酯 A。

化合物 2 白色针状结晶, HR-ESI-MS,  $m/z$  331.190 8,  $[M + H]^+$ , 计算值 331.190 9, 确定分子式  $C_{20}H_{26}O_4$ 。IR (KBr)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 1 780。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta_H$  0.83 (3H, s, H-20), 0.85 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, s, H-18), 2.08 (3H, s, H-

表 2 化合物 1,2,3,4,5,6 的 <sup>13</sup>C-NMR 数据 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Table 2 <sup>13</sup>C-NMR data of compounds 1, 2, 3, 4, 5 and 6 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

No.	1	2	3	4	5	6
1	41.5	41.1	41.5	41.3	41.4	36.7
2	18.5	18.3	18.5	18.4	18.6	34.1
3	39.9	39.0	39.9	39.1	40.9	216.1
4	33.5	33.4	33.6	33.5	33.3	47.3
5	53.5	53.3	53.6	53.5	54.1	55.1
6	20.9	20.4	20.9	20.8	21.0	20.0
7	34.2	35.4	34.0	35.6	34.8	30.4
8	61.2	65.9	61.3	66.8	61.1	47.5
9	51.9	47.9	51.8	47.9	49.3	51.1
10	41.5	39.1	41.5	39.2	39.3	37.6
11	104.1	60.8	106.6	61.6	23.8	25.4
12	147.5	85.1	147.4	85.4	75.6	44.8
13	145.0	148.4	146.7	150.8	155.8	75.1
14	54.5	55.2	54.5	55.3	56.2	218.0
15	125.2	130.1	127.4	133.5	128.6	43.1
16	170.7	169.5	169.2	168.2	174.1	142.3
17	8.7	8.6	56.4	56.5	8.8	111.1
18	33.5	33.3	33.5	33.5	34.0	26.2
19	21.9	21.7	21.9	21.9	22.1	21.9
20	15.0	15.3	15.1	15.5	19.3	13.7

17) 为 4 个甲基的氢信号;  $\delta_{\text{H}}$  3.68 (1H, s, H-14), 4.04 (1H, s, H-11) 为 2 个连氧的氢信号。<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{C}}$  8.6 (C-17), 33.3 (C-18), 21.7 (C-19), 15.3 (C-20) 为 4 个甲基的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  148.4 (C-13), 130.1 (C-15) 为 2 个双键上的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  60.8 (C-11), 85.1 (C-12), 65.9 (C-8), 55.2 (C-14) 为 4 个连氧的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  169.5 (C-16) 为羰基碳信号; 此外, 高场区存在 9 个脂肪族的碳信号。以上数据与文献[6]报道的岩大戟内酯 B 数据基本一致, 故鉴定化合物 2 为岩大戟内酯 B。

化合物 3 白色粉末, HR-ESI-MS,  $m/z$  331.190 7,  $[M + H]^+$ , 计算值 331.190 9, 确定分子式 C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>。IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3 360, 1 714, 1 660。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{H}}$  0.74 (3H, s, H-20), 0.86 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, s, H-18) 为 4 个甲基的氢信号;  $\delta_{\text{H}}$  4.65 (2H, s, H-17) 为 17 位连氧的氢信号;  $\delta_{\text{H}}$  5.58 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-11) 为双键上的氢信号。<sup>13</sup>C-

NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 中,  $\delta_{\text{C}}$  33.5 (C-18), 21.9 (C-19), 15.1 (C-20) 为 3 个甲基的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  106.6 (C-11), 147.4 (C-12), 146.7 (C-13), 127.4 (C-15) 为 4 个双键上的碳信号; 61.3 (C-8), 54.5 (C-14), 56.4 (C-17) 为 3 个连氧的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  169.2 (C-16) 为羰基碳信号; 此外, 高场区存在 9 个脂肪族的碳信号。以上数据与文献[7]报道的 17-羟-岩大戟内酯 A 数据基本一致, 故鉴定化合物 3 为 17-羟-岩大戟内酯 A。

化合物 4 白色粉末, HR-ESI-MS,  $m/z$  331.185 5,  $[M + H]^+$ , 计算值 347.185 8, 确定分子式 C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>。IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3 490, 1 765, 1 680。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{H}}$  0.80 (3H, s, H-20), 0.80 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, s, H-18) 为 3 个甲基的氢信号;  $\delta_{\text{H}}$  4.02 (1H, s, H-11), 4.14 (1H, s, H-14), 4.59 (2H, m, H-17) 为连氧的氢信号。<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{C}}$  33.5 (C-18), 21.9 (C-19), 15.5 (C-20) 为 3 个甲基的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  150.8 (C-13), 133.5 (C-15) 为 2 个双键上的碳信号; 66.8 (C-8), 55.3 (C-14), 61.6 (C-11), 85.4 (C-12), 56.5 (C-17) 为 5 个连氧的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  168.2 (C-16) 为羰基碳信号; 此外, 高场区存在 9 个脂肪族的碳信号。以上数据与文献[6]报道的 17-羟-岩大戟内酯 B 数据基本一致, 故鉴定化合物 4 为 17-羟-岩大戟内酯 B。

化合物 5 白色粉末, HR-ESI-MS,  $m/z$  317.211 0,  $[M + H]^+$ , 计算值 317.211 7, 确定分子式 C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>。IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 1 754, 1 683。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{H}}$  0.88 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-20), 1.95 (3H, s, H-17) 为 4 个甲基氢信号;  $\delta_{\text{H}}$  3.75 (1H, s, H-14) 为连氧的氢信号。<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 中,  $\delta_{\text{C}}$  8.8 (C-17), 34.0 (C-18), 22.1 (C-19), 19.3 (C-20) 为 4 个甲基的碳信号; 155.8 (C-13), 128.6 (C-15) 为 2 个双键上的碳信号; 61.1 (C-8), 56.2 (C-14) 为 2 个连氧的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  174.1 (C-16) 为羰基碳信号; 此外, 高场区存在 11 个脂肪族的碳信号。以上数据与文献[8]报道的 euphopilolide 数据基本一致, 故鉴定化合物 5 为 euphopilolide。

化合物 6 白色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$  317.210 8,  $[M + H]^+$ , 计算值 317.211 7, 确定分子式 C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>。IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3 432, 3 070, 1 665, 848。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, s, H-18), 1.09 (3H, s, H-20) 为 3 个甲基的氢信号,  $\delta_{\text{H}}$  3.88 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-13) 为含氧取代

的次甲基中的质子;  $\delta_{\text{H}}$  4.86 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-17) 为双键上的亚甲基信号。 $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{C}}$  26.2 (C-18), 21.9 (C-19), 13.7 (C-20) 位 3 个甲基的碳信号; 142.3 (C-16), 111.1 (C-17) 为 2 个双键上的碳信号; 75.1 (C-13) 为连氧的碳信号;  $\delta_{\text{C}}$  216.1 (C-3), 218.0 (C-14) 为羰基碳信号; 此外, 高场区存在 12 个脂肪族的碳信号。以上数据与文献 [9] 报道的 atis-16-en-13(s)-hydroxy-3, 14-dione 数据基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 atis-16-en-13(s)-hydroxy-3, 14-dione。

**3.3 单体化合物活性测试** 根据 2.2 项下方法, 分别测试化合物 **1, 2, 3, 4, 5, 6** 对人肝癌细胞 BEL-7402 和人大细胞肺癌细胞 NCI-H460 的抗肿瘤活性。结果显示, 化合物 **2, 3, 4, 5, 6** 对 BEL-7402 细胞在作用 24 h 后有一定的增殖抑制作用, 同时随着浓度的增大, 抑制作用增强。而化合物 **1** 并未表现出明显的增殖抑制作用。化合物 **2, 3, 4** 对 NCI-H460 细胞在作用 24 h 后有一定的增殖抑制作用, 同时随着浓度的增大, 抑制作用增强。而化合物 **1, 5, 6** 均未显示明显的增殖抑制作用。为了进一步确定分离得到化合物对 BEL-7402 细胞和 NCI-H460 细胞的

增殖抑制作用是否与作用时间有关, 将该 6 种化合物对 BEL-7402 细胞和 NCI-H460 细胞作用 48 h。结果表明, 化合物 **2, 3, 4, 5** 对 BEL-7402 细胞的增殖抑制作用会随时间的增加而增大, 而化合物 **6** 在作用 24 h 时效果更佳。同时, 化合物 **1** 作用 48 h 后, 对 BEL-7402 细胞仍然没有增殖抑制作用。化合物 **2, 3, 4, 5** 对 NCI-H460 细胞的增殖抑制作用会随时间的增加而增大, 而化合物 **1, 6** 作用 48 h 后, 对 NCI-H460 细胞没有明显的增殖抑制作用。活性结果见表 1。

**3.4 利用液质联用技术对活性馏分成分鉴定** 将石油醚萃取层的样品进入 UPLC-Q-TOF-MS 系统。其 TIC 见图 2。解析的化合物结构见图 3。质谱数据及鉴定结果见表 3。对新化合物 **18** 和 **21** 的质谱二级裂解规律进行探讨, 主要碎片归属见图 4。

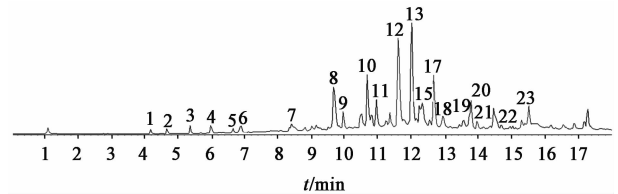


图 2 狼毒大戟石油醚层 TIC  
Fig. 2 TIC spectrogram of petroleum ether layer and numbers of *Euphorbia fischeriana*

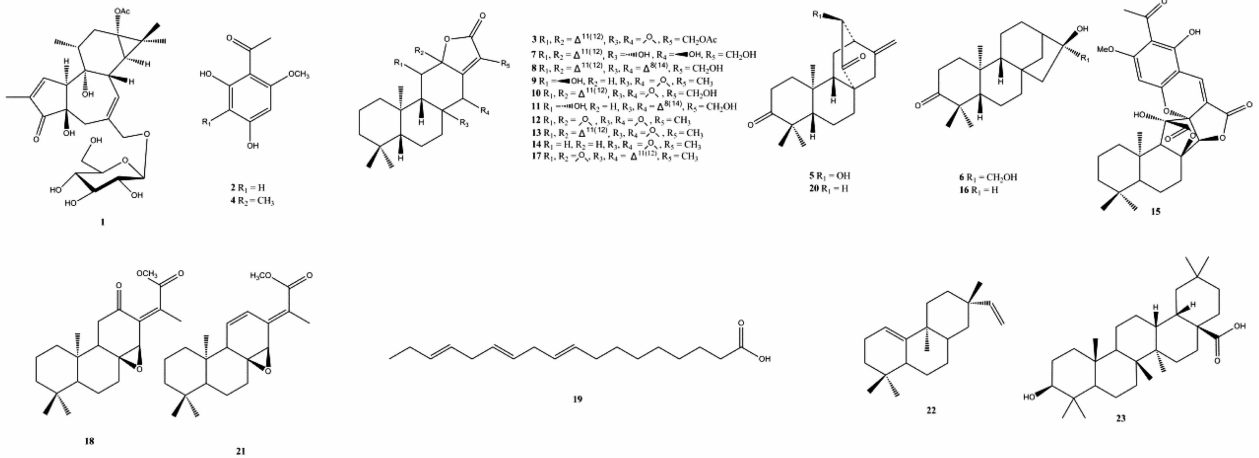


图 3 狼毒大戟石油醚层化合物结构  
Fig. 3 Structures of compounds from petroleum ether layer of *E. fischeriana*

4 讨论

通过 MTT 实验, 筛选出了活性馏分为石油醚层。从狼毒大戟石油醚层分离得到了 6 个单体化合物。化合物 **1~5** 为松香烷内酯型二萜, 化合物 **6** 为阿替生烷型二萜。从单体化合物 MTT 实验结果得知, 化合物 **2** 的抗肿瘤活性强于化合物 **1** 和化合物 **5**。因此, 推断松香烷内酯型二萜类化合物在 17 位

碳上没有羟基的取代时, 11 位和 12 位碳上环氧基团的存在会增强其活性。化合物 **3** 的活性强于化合物 **1**, 推测抗肿瘤活性可能也与 17 位碳上的羟基取代有关。

活性馏分层除了分离得到了 6 个单体化合物外, 还存在很多未知成分, 为确定活性馏分的成分的结构, 将活性馏分进液质联用系统分析, 以分离得到

表 3 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定狼毒大戟石油醚层化合物

Table 3 Compounds identified in petroleum ether layer of *E. fischeriana* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	保留时间/min	[M + H] <sup>+</sup>	$\delta$	分子式	碎片离子	可能的化合物结构
1	4.18	553.266 9	4.6	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	295.2, 277.2, 267.2	fischeroside A <sup>[10]</sup>
2	4.66	183.066 1	5.0	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	165.1, 153.0, 150.0, 141.1, 137.1, 123.0, 119.0, 109.1	1-(2,4-二羟基-6-甲氧苯基)乙酮 <sup>[11]</sup>
3	5.40	373.200 9	-0.1	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	313.2, 295.2, 277.2, 267.2, 225.1, 207.1	17-乙酰氧基岩大戟内酯 A <sup>[12]</sup>
4	6.04	197.080 2	-3.2	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	179.1, 167.0, 163.0, 151.1, 133.1, 123.1, 105.1	3-乙酰基-2,6-二羟基-4-甲氧基苯甲醛 <sup>[11]</sup>
5	6.69	317.213 0	5.9	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	299.2, 281.2, 271.2, 239.2, 187.1, 169.1	13(S)-羟基-16-烯-阿替斯-3,14-二酮 <sup>[9]</sup>
6	6.89	321.243 5	3.4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	303.2, 285.2, 267.2, 239.2, 227.2, 197.1, 173.1, 131.1	ent-(16R)-16,17-dihydroxykauran-3-one <sup>[4]</sup>
7	8.47	349.201 5	1.6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	331.2, 313.2, 303.2, 271.2, 267.2, 231.1	(4R, 4aR)-dihydroxy-3-hydroxymethyl-7, 7, 10a-trimethyl-2, 4, 4a, 5, 6, 6a, 7, 8, 9, 10, 10a, 10b-dodecahydrophenanthro [ 3, 2-b ] furan-2-one <sup>[13]</sup>
8	9.67	347.187 0	4.9	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	329.2, 311.2, 301.2, 283.2, 273.2, 265.2, 255.2, 237.2, 227.1, 213.1, 191.0, 163.0	17-羟-岩大戟内酯 B <sup>[6]</sup>
9	9.95	333.207 9	5.6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	315.2, 297.2, 287.2, 269.2, 251.2	11 $\beta$ -hydroxy-8, 14-epoxy-ent-abieta-13 (15)-en-16, 12-olide <sup>[14-15]</sup>
10	10.70	331.192 5	6.4	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	313.2, 295.2, 285.2, 271.2, 267.2, 189.1, 175.1	17-羟-岩大戟内酯 A <sup>[7]</sup>
11	10.95	317.212 9	5.6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	299.2, 281.2, 271.2, 253.2, 175.1	ent-11 $\beta$ -hydroxyabieta-8 ( 14 ) , 13 ( 15 ) -dien-16, 12 $\beta$ -olide <sup>[16]</sup>
12	11.61	331.191 4	3.0	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	313.2, 285.2, 267.2, 221.2, 193.1, 165.1, 137.1, 125.0	岩大戟内酯 B <sup>[6]</sup>
13	12.00	315.196 6	3.6	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	297.2, 287.2, 269.2, 227.1, 177.1, 175.1, 161.1, 149.1	岩大戟内酯 A <sup>[6]</sup>
14	12.31	317.211 4	0.9	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	317.2, 299.2, 271.2, 253.2, 215.1, 161.1	euphopilolide <sup>[8]</sup>
15	12.44	525.214 4	4.7	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	481.2, 463.2, 445.2, 417.2, 247.1	langduin D <sup>[17]</sup>
16	12.50	291.231 3	-1.9	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	205.2, 187.1, 147.1, 133.1, 113.1	ent-kaurane-3-oxo-16 $\alpha$ , 17-diol <sup>[18]</sup>
17	12.66	315.197 4	6.1	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	297.2, 269.2, 233.1, 227.1, 215.1, 191.1, 177.1, 175.1, 163.0, 149.1, 139.0, 131.1, 121.1, 105.1	岩大戟内酯 A 的同分异构体 <sup>[4]</sup>
18	12.93	347.223 5	5.2	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	315.2, 297.2, 287.2, 269.2, 215.1, 177.1, 159.0	( Z )-methyl 2-[ ( 3aR, 4aS, 10aR )-7, 7, 10a-trimethyl-2-oxooctahydro-1H-phenanthro [ 1, 10a-b ] oxiren-3 ( 2H, 3aH, 10bH )-ylidene] propanoate
19	13.72	279.233 0	4.1	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	261.2, 243.2, 233.2, 209.2, 195.1, 187.1, 173.1, 123.1, 109.1	$\alpha$ -亚麻酸 <sup>[19]</sup>
20	13.78	301.217 4	4.0	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	283.2, 255.2, 203.1, 177.1, 163.1, 145.1, 117.1	ent-atis-16 ( 17 ) -ene-3, 14-dione <sup>[20]</sup>
21	13.98	331.226 8	0.1	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	299.2, 281.2, 271.2, 243.2, 217.1, 193.1, 175.1, 161.1, 137.1	( E )-methyl 2-[ ( 3aR, 4aS, 10aR )-7, 7, 10a-trimethyl-3a, 5, 6, 6a, 7, 8, 9, 10, 10a, 10b-decahydro-3H-phenanthro [ 1, 10a-b ] oxiren-3-ylidene] propanoate
22	14.70	273.258 6	3.2	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	255.2, 231.2, 217.2, 203.2, 163.1, 161.1, 149.1, 133.1	( 2S, 4aS )-2, 4a, 8, 8-tetramethyl-2-vinyl-1, 2, 3, 4, 4a, 6, 7, 8, 8a, 9, 10, 10a-dodecahydrophenanthrene <sup>[4]</sup>
23	15.29	459.286 3	6.6	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	441.4, 423.4, 413.4, 405.4, 395.4, 305.2, 303.3, 287.2, 285.3, 231.2, 217.2, 215.2, 205.2, 149.1, 147.1	( 3 $\beta$ , 5 $\xi$ , 9 $\xi$ )-3-hydroxyoleanan-28-oic acid

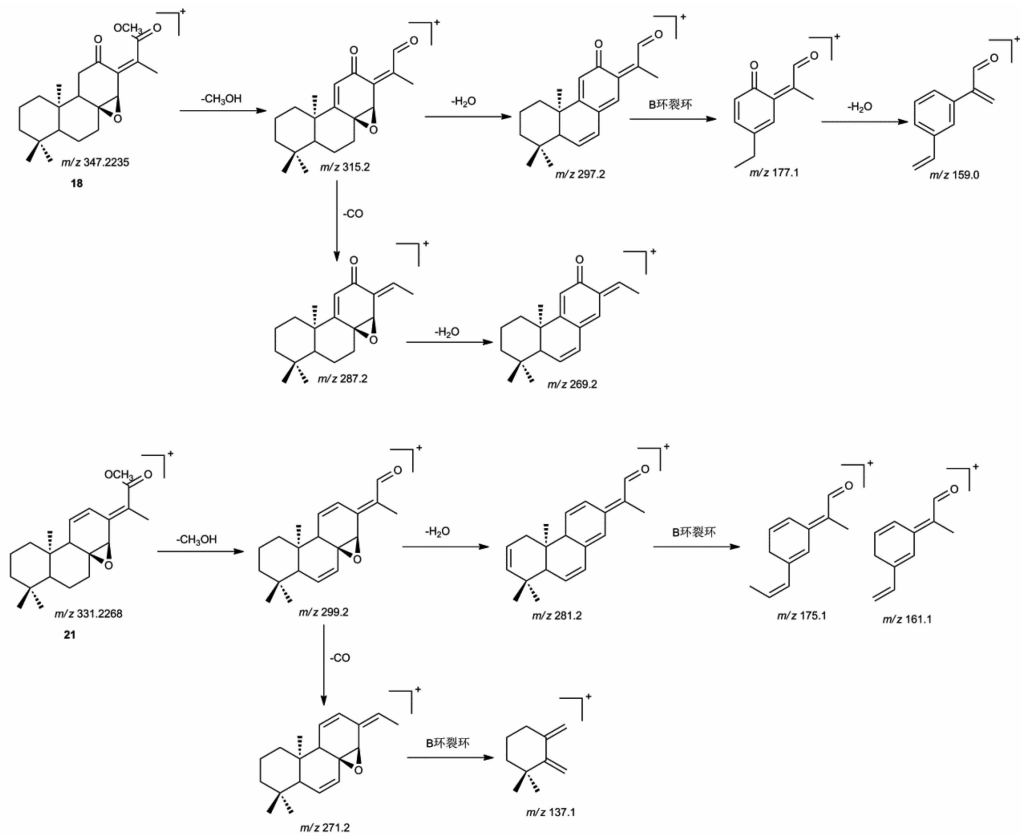


图 4 化合物 18 和 21 可能的主要裂解规律

Fig. 4 Major fragmentations proposed for compounds 18 and 21

的单体化合物可能的裂解规律为基础,对活性馏分的化学成分进行鉴定。通过文献查阅、数据分析及对对照品比对等方法,鉴定了 23 个化合物,活性馏分主要为二萜类成分。在质谱解析过程中,先计算化合物的分子式,计算其不饱和度,初步判定化合物的结构类型。利用 MSMS Library 对活性馏分中可能得结构进行预测。查询狼毒大戟相关文献报道,建立已知化合物数据库。再根据自建的质谱库结合对中可能得结构进行预测。利用 MasterView 软件数据处理系统,经在线数据库 chemspider 搜索比对,根据二级质谱确定结构<sup>[21]</sup>。

同时采用了质谱正离子与负离子扫描模式,结果显示正离子有着更好的二级碎片,因此,采用正离子模式对活性馏分的结构进行解析。通过对二萜类成分的质谱二级碎片分析可知,二萜类成分二级质谱中会产生失去中性分子 H<sub>2</sub>O, CO, HCOOH, CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>COOH 的碎片,并会产生裂环碎片<sup>[4]</sup>。其中峰 18 和峰 21 初步鉴定为未见文献报道的新化合物。但是由于二萜类结构复杂,质谱对同分异构体的鉴定有一定的局限性。为进一步的确证化合物的结构,有必要对化学成分进行进一步的分离纯化,

并利用 NMR 技术对结构进行确证。

[参考文献]

- [1] 邱韵紫,郁红礼,吴皓. 大戟科大戟属根类中药的毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):259-264.
- [2] SUN Y X, LIU J C. Chemical constituents and biological activities of *Euphorbia fischeriana* Steud. [J]. Chem Biodivers, 2011, 8(7): 1205-1214.
- [3] 俞媚华,侯爱君. 狼毒大戟抗乙肝病病毒活性成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22):3002-3006.
- [4] WANG C J, ZHANG X Q, YAN X H, et al. Chemical profiling of *Euphorbia fischeriana* Steud. by UHPLC-Q/TOF-MS [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2018, 151: 126-132.
- [5] JIAN B Y, ZHANG H, HAN C C, et al. Anti-cancer activities of diterpenoids derived from *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. Molecules, 2018, 23(2): 1-11.
- [6] 耿珠峰,欧阳捷,邓志威,等. NMR 在天然产物选择性分离与结构研究中的应用[J]. 波谱学杂志, 2009, 26(3):424-436.
- [7] PAN Q, SHI M F, MIN Z D. Studies on the <sup>2D</sup> NMR spectra of jolkinolide diterpenoids from *Euphorbia*

- fischeriana*[J]. China Pharm Univ, 2004, 35 ( 1 ): 16-19.
- [ 8 ] ZHANG X D, NI W, YAN H, et al. Daphnane type diterpenoid glucosides and futher constituents of *Euphorbia pilosa* [ J ]. Chem Biodivers, 2014, 11 ( 5 ): 760-766.
- [ 9 ] YI L D, ZHONG J J, YU T L. Five new diterpenes from *Euphorbia sieboldiana*[J]. Chin Chem Lett, 1990, 1(1) : 13-16.
- [10] WANG X Y, LIU L P, KANG T G, et al. Chemical constituents of *Euphorbia fischeriana* [ J ]. Chin J Nat Med, 2012, 10(4) : 299-302.
- [11] WEI Y L, YU Z L, HUO X K, et al. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana* and their inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase [ J ]. J Asian Nat Prod Res, 2018, 20(10) : 977-984.
- [12] CHE C T, ZHOU T X, MA Q G, et al. Diterpenes and aromatic compounds from *Euphorbia fischeriana* [ J ]. Phytochemistry, 1999, 52(1) : 117-121.
- [13] WANG C J, YAN Q L, MA Y F, et al. ent-Abietane and tiglane diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana* and their inhibitory effects against *Mycobacterium smegmatis*[J]. J Nat Prod, 2017, 80(5) : 1248-1254.
- [14] LIU Z G, LI Z L, BAI J, et al. Anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata* [J]. J Nat Prod, 2014, 77(4) : 792-799.
- [15] WANG H B, CHEN W, ZHANG Y Y, et al. Four new diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*[J]. Fitoterapia, 2013, 91, 211-216.
- [16] KUANG X Z, LI W, KAOYA Y, et al. Euphorins A-H: bioactive diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* [ J ]. J Nat Med, 2016, 70(3) : 412-422.
- [17] LEE J W, LEE Q, JIN Q, et al. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana* with inhibitory effects on nitric oxide production [ J ]. J Nat Prod, 2016, 79 ( 1 ): 126-131.
- [18] LIANG X, LIU Z G, CAO Y F, et al. Chemotaxonomic and chemical studies on two plants from genus of *Euphorbia*; *Euphorbia fischeriana* and *Euphorbia ebracteolata* [ J ]. Biochem Syst Ecol, 2014 ( 57 ): 345-349.
- [19] LEE S H, TANAKA T, NONAKA G, et al. Allose gallates from *Euphorbia fischeriana*[J]. Phytochemistry, 1991, 30(4) : 1251-1253.
- [20] YANG L B, LIU S J, ZHANG B, et al. Alboatisin A, a new diterpenoid from *Euphorbia fischeriana*[J]. J Chem Res, 2011, 35(12) : 692-693.
- [21] 罗君, 赵琳璐, 包江平, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析苗族药红花龙胆化学成分 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24) : 89-94.

[责任编辑 顾雪竹]