

药食两用小蓟中细胞毒活性成分解析

王泽玉, 张晓霞, 吴勇, 王欣, 李金杰, 戴雪玲, 尚小雅*
(北京联合大学 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室 北京 100191)

摘要 本课题组前期研究发现,小蓟乙醇提取石油醚萃取部位具有较好的抑制多种人肿瘤细胞毒活性的作用,现对其中强活性亚组分的化学成分进行研究,挖掘发挥细胞毒活性的功能因子。在体外抑制细胞毒活性指导下,应用多种色谱技术进行分离纯化,采用波谱学方法进行结构鉴定,并结合文献数据对照确定化合物结构。从石油醚的 1 个活性组分中共分离鉴定了 5 个甾体化合物,分别为: 3β -羟基豆甾-5-烯-7-酮、豆甾-22-烯- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -三醇、 6β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮、 6β -羟基-豆甾-4,22-二烯-3-酮和 6β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮。5 个化合物均为首次从蓟属植物中发现;除化合物 α -豆甾-22-烯- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -三醇外,其余 4 个化合物对不同人肿瘤细胞均具有一定的抑制活性。

关键词 小蓟; 细胞毒活性; 分离纯化; 结构鉴定

文章编号 1009-7848(2022)07-0226-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.07.023

小蓟 [*Cirsium setosum* (Willd.) MB.] 为菊科蓟属植物刺儿菜的干燥地上部分,为多年生草本植物,广泛分布于我国大部分地区;其嫩叶是民间喜欢食用的一种野菜,具有丰富的营养和药用价值^[1]。文献报道小蓟具有止血、凝血、抗菌、抗炎、抑制肿瘤,以及降脂、降糖、提高心肌收缩力、升压、抗疲劳和抗衰老等作用^[2]。小蓟止血、凝血等的活性因子已研究清楚,而对于小蓟中抗肿瘤活性因子除本课题组的研究外,未检索到其它文献报道。由于小蓟可食用、安全无毒,常作为药饮与其它药物联用,治疗膀胱癌、肺癌等,提取物在体外 MTT 实验中对人源化的肝癌、胃癌和宫颈癌等细胞均具较好的抑制作用^[3-4]。以小蓟为对象,研究其抗肿瘤活性的物质基础,建立质控标准,开发能够长期食用且预防或缓解肿瘤的功能食品,具有重要的实际意义。

本课题组一直致力于小蓟抗肿瘤活性因子的挖掘。在体外 MTT 活性指导下,发现小蓟提取物的主要样品量和抗肿瘤活性集中在乙醇提取石油醚萃取部位。借助正相硅胶色谱分离纯化方法,将石油醚萃取部位分成 11 个不同极性的组分,发现其中 5 个组分显示出较好的体外抑制多种人肿瘤

细胞的活性,课题组前期从上述活性组分中分离鉴定了 26 个化合物,其中 8 个化合物具有细胞毒活性^[3-7]。本文继续对石油醚部位剩余未研究的强活性亚组分进行分析,以彻底明确其抗肿瘤的的物质基础;为小蓟抗肿瘤的应用、预防或缓解肿瘤功能食品的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小蓟采自安徽九华山,经九华山黄精研究所柯云武工程师鉴定为菊科植物小蓟 (*Cirsium setosum* (Willd.) MB),标本(20081028)保存于北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室。

GF₂₅₄ 薄层色谱(TLC)硅胶和 160~200 目柱色谱硅胶,青岛海洋化工厂;Sephadex LH-20 凝胶,GE 公司;低压反相硅胶色谱柱和正相氨基色谱柱,ISCO 公司;高压液相 C18 Sunfire 和 X-bridge 制备柱(250 mm × 10 mm × 5 μm),Waters 公司;甲醇、乙醇、丙酮、氯仿和石油醚等均为分析纯级,北京化学试剂厂;HPLC 色谱级和 UPLC 质谱级甲醇、乙腈,美国 Fisher 公司;试验用超纯水,美国 Millipore 制水机制备;四甲基偶氮唑盐(MTT),德国 Serva 公司;1640 培养液,用时临时配制。

1.2 仪器与设备

旋转蒸发器,瑞士 Buchi 公司;CombiFlash 低

收稿日期: 2021-07-28

基金项目: 北京市教委科技计划重点项目
(KZ201811417049)

作者简介: 王泽玉(1999—),女,硕士生

通信作者: 尚小雅 E-mail: shangxiaoya@buu.edu.cn

压快速色谱分离仪,美国 ISCO 公司;2545 HPLC 色谱仪,2998 型检测器,美国 Waters 公司;Thermo QE Plus orbitrap 高分辨质谱仪,美国赛默飞公司;Inova 500 核磁共振仪,美国 Varian 公司;Millipore 超纯水仪,美国密理博公司。

1.3 单体的制备方法

小蓟干燥地上部分 20 kg,依次用体积分数 95%,80%和 60%的乙醇超声(380 W)提取 3 次,每次 1 h,合并提取液减压浓缩得浸膏;浸膏水溶后依次用石油醚和乙酸乙酯萃取,得到石油醚(468.5 g)、乙酸乙酯(180.0 g)和水相 3 部分。体外细胞毒活性测试发现石油醚部位对多种人源性肿瘤细胞有较好的抑制活性,用石油醚部分过正相硅胶柱色谱,流动性用石油醚-丙酮(100:1~0:100)分成极性不同的 11 个组分:Sh1~Sh11;体外 MTT 实验发现组分 Sh2,Sh4,Sh5,Sh7,Sh9 均显示出较好的细胞毒活性,课题组前期已从上述活性组分分离鉴定了 26 个化合物,其中 8 个化合物具有细胞毒活性^[4,6-7],本文继续对 Sh9 中的亚组分进行研究。

组分 Sh9 经正相硅胶柱层析,流动相用石油醚-丙酮[(100:1)~(2:1)]梯度洗脱,得到亚组分 Sh9-1~Sh9-7。将亚组分 Sh9-2 经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱,石油醚-氯仿-甲醇(5:5:1)反复洗脱,再经 Waters 2545 高效液相 Sunfire 制备柱制备,流动性甲醇-水(95:5),流速为 18 mL/min 洗脱,得到化合物 1(6 mg, $t_R = 17$ min,紫外检测波长 238 nm)。亚组分 Sh9-7 经低压快速分离仪 C18 反相 flash 柱色谱,流动相甲醇-水[(65:35)~(100:0)]梯度洗脱,纯化后的样品过凝胶柱,流动相为石油醚-氯仿-甲醇(5:5:1)洗脱,主要馏分加热溶于丙酮,放置冷却后析出白色沉淀,将其反复沉淀过滤,得到化合物 2(15 mg)。亚组分 Sh9-6 经快速分离仪氨基 flash 柱色谱,流动相石油醚-丙酮[(50:1)~(2:1)]梯度洗脱,得到的主成分在丙酮中放置出现沉淀,沉淀经低压快速分离仪 C18 反相 flash 柱色谱,流动相甲醇-水[(60:40)~(100:0)]梯度洗脱,纯化后的样品上 Waters 2545 高效液相 X-bridge 制备柱制备,流动性甲醇-水(93:7),流速为 18 mL/min 洗脱,得到化合物 3(5 mg, $t_R = 21.0$ min,紫外检测波长 238

nm)、化合物 4(8 mg, $t_R = 19.5$ min,紫外检测波长 238 nm)和化合物 5(6 mg, $t_R = 19.0$ min,紫外检测波长 238 nm)。

1.4 化合物的质谱分析

将分离得到的单体化合物用甲醇溶解,配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,过 0.22 μm 滤膜后直接进行高分辨质谱分析。高分辨质谱条件参数:离子源:HESI;扫描模式:正离子模式和负离子模式;喷雾电压:正离子(3.5 kV),负离子(4.0 kV);鞘气流量:50 units;辅助气流量 10 units;离子源温度:320 $^{\circ}\text{C}$;毛细管温度:320 $^{\circ}\text{C}$;分辨率:70 000;二级碰撞能量:20,40,60 eV 归一化能量;一级质谱扫描范围: m/z :100~500。

1.5 细胞毒活性筛选方法

收集生长良好的 5 种肿瘤细胞(HCT-116:人结肠癌细胞,HepG2:人肝癌细胞,BGC-823:人胃癌细胞,NCI-H1650:人肺支气管癌细胞,A2780:人卵巢癌细胞),用含 10%牛血清的 RPMI1640 培养基配制成 1×10^4 cell/mL 细胞悬液,接种于 96 孔培养板内,每孔 100 μL (含 1 000 个肿瘤细胞),置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 恒温箱中培养 24 h 后加样。试验设空白对照和样品组,受试样品设低、中、高 3 个浓度(1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每个浓度 3 个平行孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 温箱里培养 4 d。弃去培养液,每孔加入 MTT 溶液(0.4 mg/mL,RPMI 1640 配制)100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,轻度振荡溶解 Fomazan 颗粒,置于酶标仪上,在 540 nm 检测波长下测定 OD 值,计算其抑制率。以药物的不同浓度及对细胞的抑制率作图,可得到剂量反应曲线,从中求出半数抑制浓度(IC_{50})。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = (1 - \text{OD}_{\text{样品}} / \text{OD}_{\text{对照}}) \times 100 \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 化合物的结构鉴定

2.1.1 β -羟基豆甾-5-烯-7-酮的结构鉴定 化合物为白色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ 谱中高场区显示 6 个甲基质子信号,其中有 2 个单峰质子信号 δ_{H} 1.20 (3H, s) 和 0.68 (3H, s),3 个双峰质子信号 δ_{H} 0.93 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)、0.83 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)

和 0.81 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) 和 1 个三重峰质子信号 δ_{H} 0.85 (3H, t, $J = 8.0$ Hz); 低场区显示 1 个双键质子信号 δ_{H} 5.69 (1H, s), 较低场有 1 个明显的多重峰连氧质子信号 δ_{H} 3.68 (1H, m), 提示结构是含不饱和键的甾体化合物。 ^{13}C -NMR 谱显示该结构有 29 个碳原子, 低场信号 δ_{C} 202.4, 165.2, 126.3, 结合氢谱低场信号 δ_{H} 5.69, 提示结构中含有 α, β -不饱和酮的结构片段, 双键上有 1 个叔碳、1 个季碳; 连氧碳信号 δ_{C} 70.7, 结合氢谱较低场中多重峰质子信号 δ_{H} 3.68 (1H, m), 推测结构是 3 位羟基的豆甾烯酮类结构。HRESIMS 一级质谱显示 m/z : 429.37234 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论计算值: 429.37271), 分子式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$; 二级特征碎片离子有 411.36194, 393.35144, 369.31519, 271.20541, 229.15872, 213.16377, 197.13251, 175.11182; 根据碎片离子推测此结构是 3β -羟基豆甾-5-烯-7-酮 (3β -Hydroxystigmast-5-en-7-one); 将该化合物的核磁数据与文献[8]比对发现, 二者数据一致, 故确证了所推导结构的正确性。

2.1.2 豆甾-22-烯- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$ -三醇的结构鉴定
化合物为针状结晶(丙酮)。 ^1H -NMR 谱显示 6 个甲基质子信号, 其中有 2 个甲基单峰质子信号 δ_{H} 1.66 (3H, s) 和 0.77 (3H, s), 3 个甲基质子双峰信号 δ_{H} 1.10 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.83 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 0.80 (3H, d, $J = 7.5$ Hz) 和 1 个甲基质子

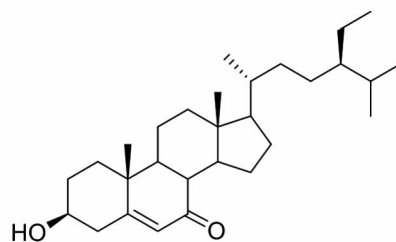
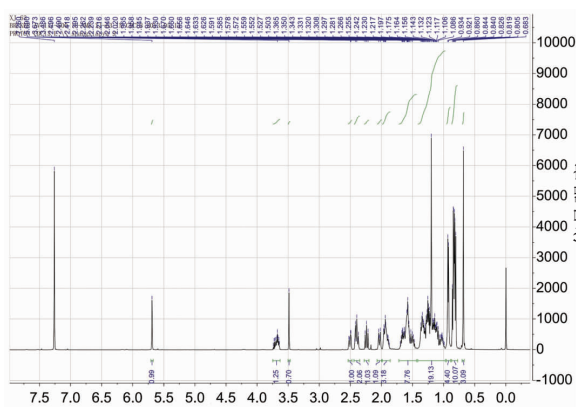


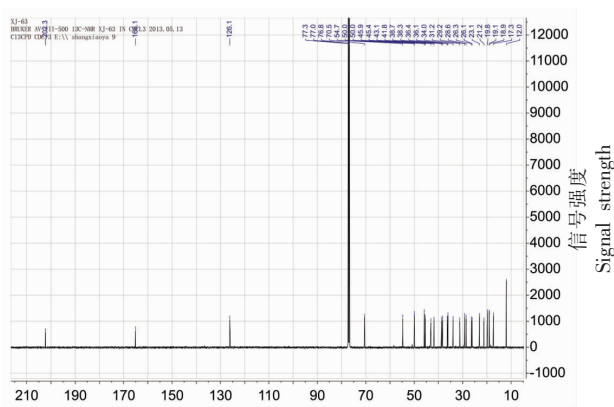
图 1 3β -羟基豆甾-5-烯-7-酮的结构式

Fig.1 Structure of compounds
 3β -hydroxystigmast-5-en-7-one

三重峰信号 δ_{H} 0.86 (3H, t, $J = 6.5$ Hz); 2 个与氧相连的质子信号 δ_{H} 2.94 (1H, m) 和 4.85 (1H, m), 2 个双键质子信号 δ_{H} 5.21 (1H, dd, $J = 15.0, 8.5$ Hz) 和 5.06 (1H, dd, $J = 15.0, 9.0$ Hz)。 ^{13}C -NMR 谱显示 29 个碳原子, 低场有 2 个双键碳信号 δ_{C} 138.9 和 129.4, 3 个连氧的碳信号 δ_{C} 76.3, 75.9, 67.3。根据氢和碳谱的特征数据推断, 此结构为含有 1 个双键和 3 个羟基的豆甾醇类化合物。HRESIMS 一级质谱显示 m/z : 445.36871 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论计算值: 445.36872), 分子式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_3$; 二级特征碎片离子有 427.26258, 409.34802, 407.33206, 353.28513; 根据碎片离子推测此结构是豆甾-22-烯- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$ -三醇 (Stigmast-22-ene- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$ -triol); 将该化合物的核磁数据与文献[9]和[10]比对发现, 二者数据一致, 故确证了所推导结构的正确性。



化学位移
Chemical shift/ppm
(a) 氢谱图



化学位移
Chemical shift/ppm
(b) 碳谱图

图 2 3β -羟基豆甾-5-烯-7-酮的核磁图

Fig.2 NMR of compound 3β -hydroxystigmast-5-en-7-one

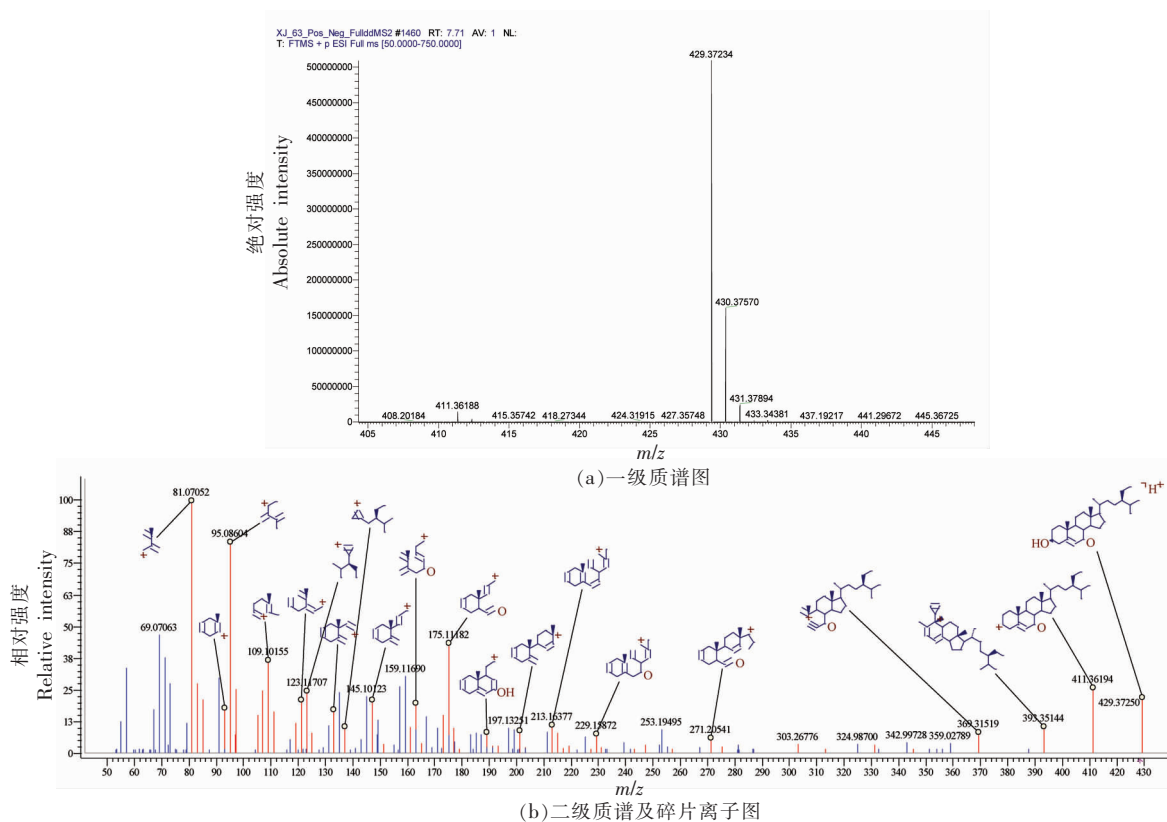


图 3 3β -羟基豆甾-5-烯-7-酮的质谱图

Fig.3 MS of 3β -hydroxystigmast-5-en-7-one

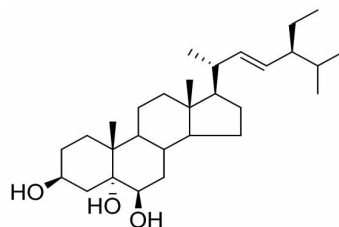


图 4 豆甾-22-烯- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -三醇的结构式

Fig.4 Structure of stigmast-22-ene- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol

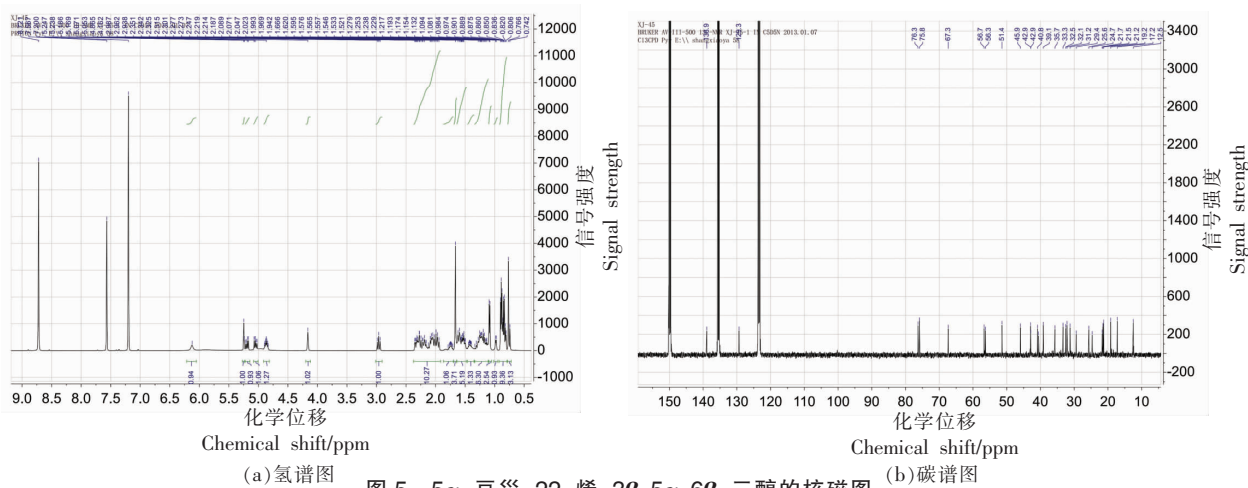
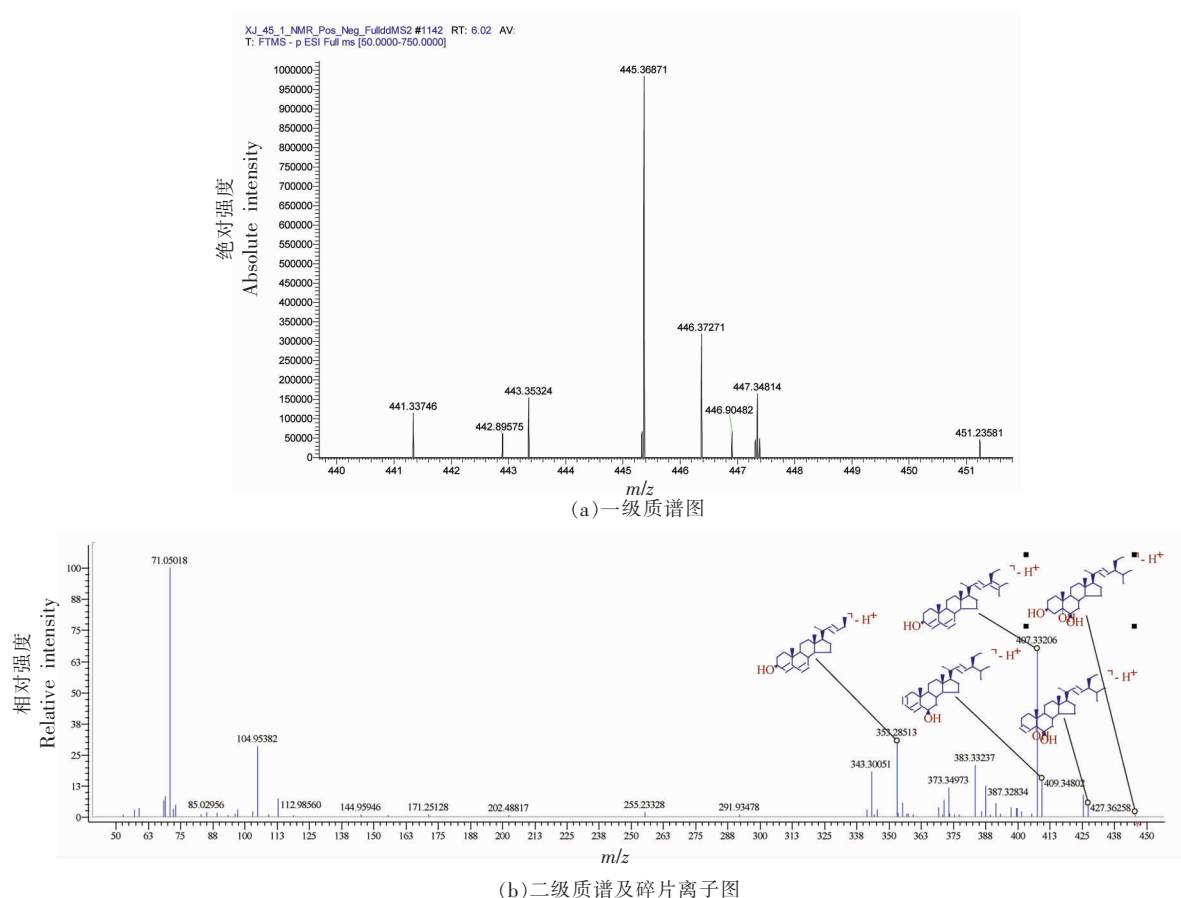


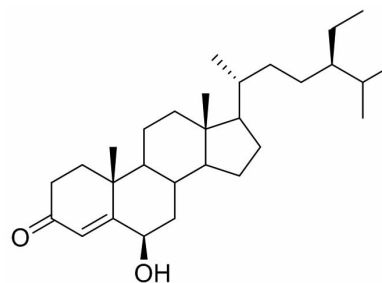
图 5 5α -豆甾-22-烯- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -三醇的核磁图

Fig.5 NMR of 5α -stigmast-22-ene- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol

图6 5 α -豆甾-22-烯-3 β ,5 α ,6 β -三醇的质谱图Fig.6 MS of 5 α -stigmast-22-ene-3 β ,5 α ,6 β -triol2.1.3 6 β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮的结构鉴定

化合物为白色粉末。¹H-NMR 谱高场区显示 6 个甲基质子信号,其中有 2 个单峰质子信号 δ_{H} 1.55 (3H, s) 和 0.73 (3H, s),3 个双峰质子信号 δ_{H} 1.01 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)、0.91 (3H, d, $J = 8.0$ Hz) 和 0.87 (3H, d, $J = 7.0$ Hz),1 个三重峰质子信号 δ_{H} 0.90 (3H, t, $J = 7.5$ Hz);低场区 2 个质子信号 [连氧质子信号 δ_{H} 4.55 (1H, br s) 和烯键质子信号 δ_{H} 6.05 (1H, s)],提示结构为含 α,β -不饱和酮的甾体。¹³C-NMR 谱 29 个碳原子,碳谱低场信号 δ_{C} 199.6,125.8,169.8,结合氢谱相应低场信号 δ_{H} 6.05 (1H, s),确证结构存在 α,β -不饱和酮片段;1 个连氧碳信号 δ_{C} 72.5,结合氢谱质子信号 δ_{H} 4.55 (1H, br s),表明结构有 1 个羟基;推测结构中存在羟基、 α,β -不饱和酮的甾体结构。HRESIMS 一级质谱显示 m/z :429.37234 [M+H]⁺ (理论计算值:429.37271),分子式为 C₂₉H₄₈O₂;二

级特征碎片离子有 411.36197,393.35156,175.11182,159.11691;根据碎片离子推测此结构是 6 β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮 (6 β -Hydroxy-stigmasta-4-en-3-one);将该化合物的核磁数据与文献[11]比对发现,二者数据一致,故确证了所推导结构的正确性。

图7 6 β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮的结构式Fig.7 Structure of 6 β -hydroxy-stigmasta-4-en-3-one

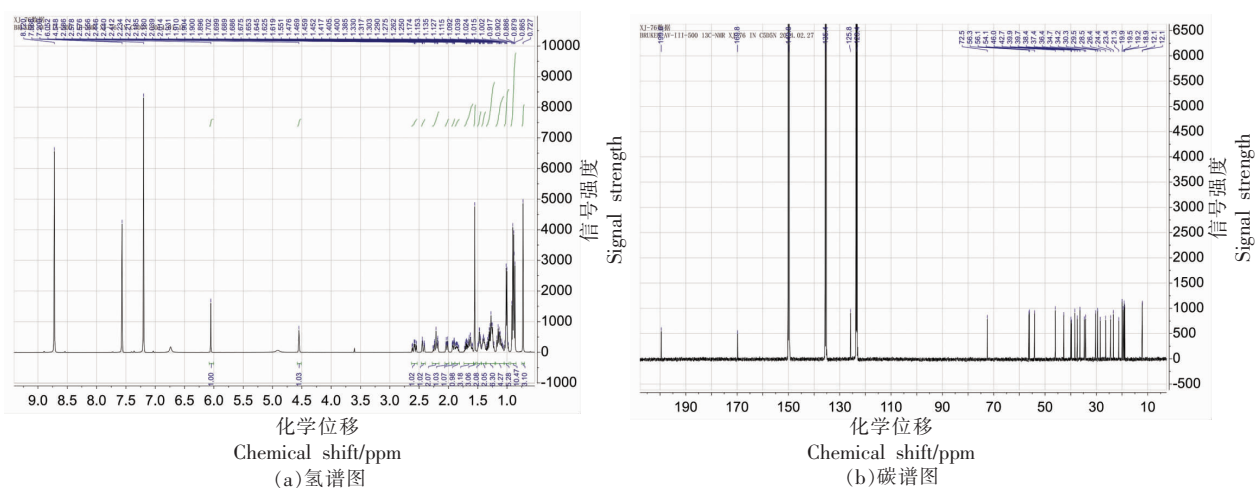


图 8 6β-羟基-豆甾-4-烯-3-酮的核磁图
Fig.8 NMR of 6β-hydroxy-stigmasta-4-en-3-one

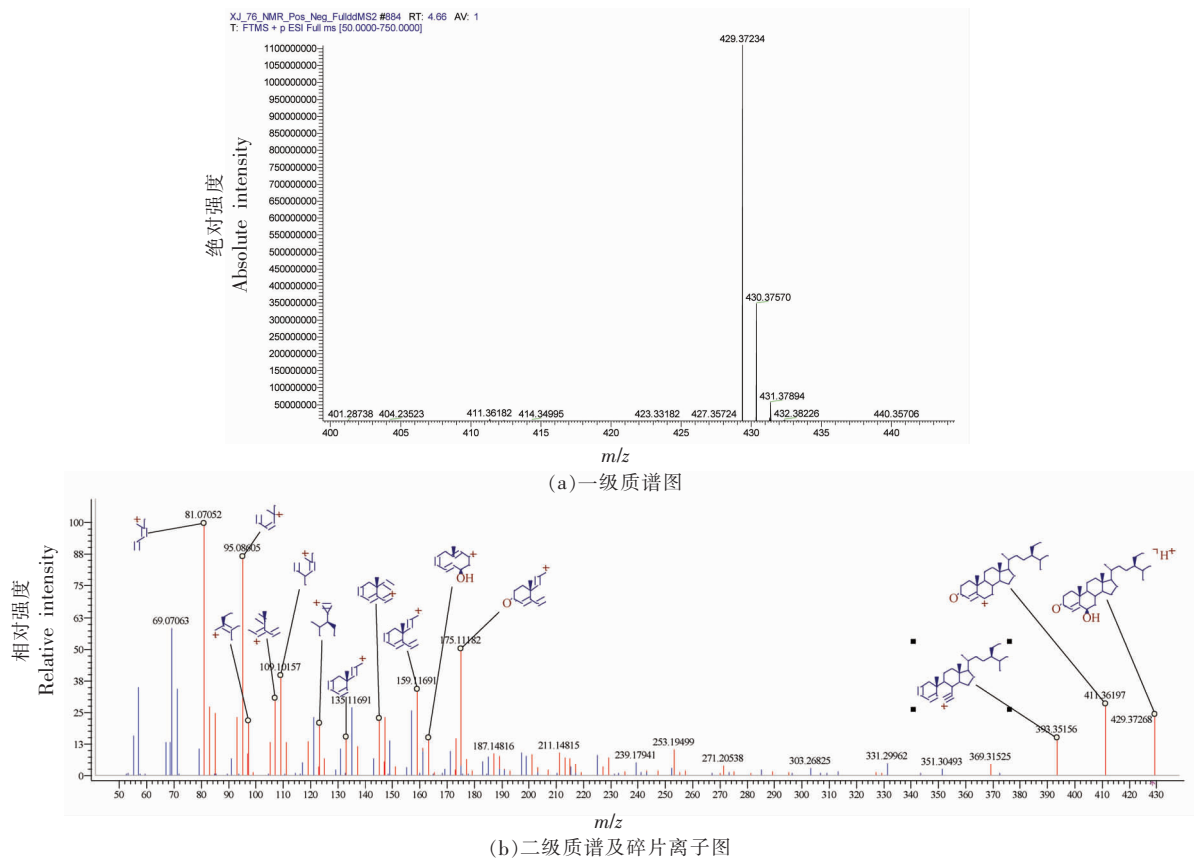


图 9 6β-羟基-豆甾-4-烯-3-酮的质谱图
Fig.9 MS of 6β-hydroxy-stigmasta-4-en-3-one

2.1.4 6β-羟基-豆甾-4,22-二烯-3-酮的结构鉴定 化合物为白色粉末。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱与化合物 3 十分相似,仔细对照波谱数据发现,母核数据完全一致,差别只是支链 22 位饱和键变成

了双键。HRESIMS 一级质谱显示 m/z :427.35654 [M+H]⁺(理论计算值:427.35706), 分子式为 C₂₉H₄₆O₂, 也表明结构中少了 2 个氢原子;二级特征碎片离子有 409.34613,365.61716,271.20587,

253.19574, 123.08091; 根据碎片离子推测此结构是 6β -羟基-豆甾-4,22-二烯-3-酮 (6β -Hydroxy-stigmasta-4,22-dien-3-one); 将该化合物的核磁数据与文献[11]比对发现,二者数据一致,故证实了所推导结构的正确性。

2.1.5 6β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮的结构鉴定

化合物为无色针状结晶 (丙酮)。 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱与化合物 3 十分相似,仔细对照发现, $^{13}\text{C-NMR}$ 谱只有 28 个碳原子,比化合物 3 少了 1 个碳;母核数据与化合物 3 完全相符,差别在支链;化合物 3 中 23 位碳的位置在 δ_{C} 26.4,而此结构中向底场移动了 4.2 ppm 到 δ_{C} 30.6,24 位碳从 δ_{C} 46.0 向高场移动了 7 ppm 到 δ_{C} 39.0,25 位碳从 δ_{C} 29.5 向低场移动了 3.1 ppm 到 δ_{C} 32.6;推测

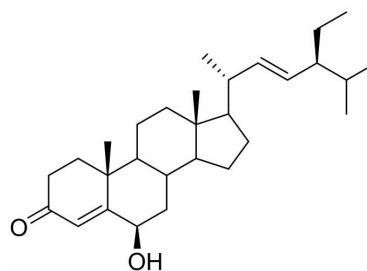


图 10 6β -羟基-豆甾-4,22-二烯-3-酮的结构式

Fig.10 Structure of 6β -hydroxy-stigmasta-4,22-dien-3-one

24 位连接的乙基变成了甲基。HRESIMS 一级质谱显示 m/z : 415.35641 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论计算值: 415.35696),分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_2$;二级特征碎片离

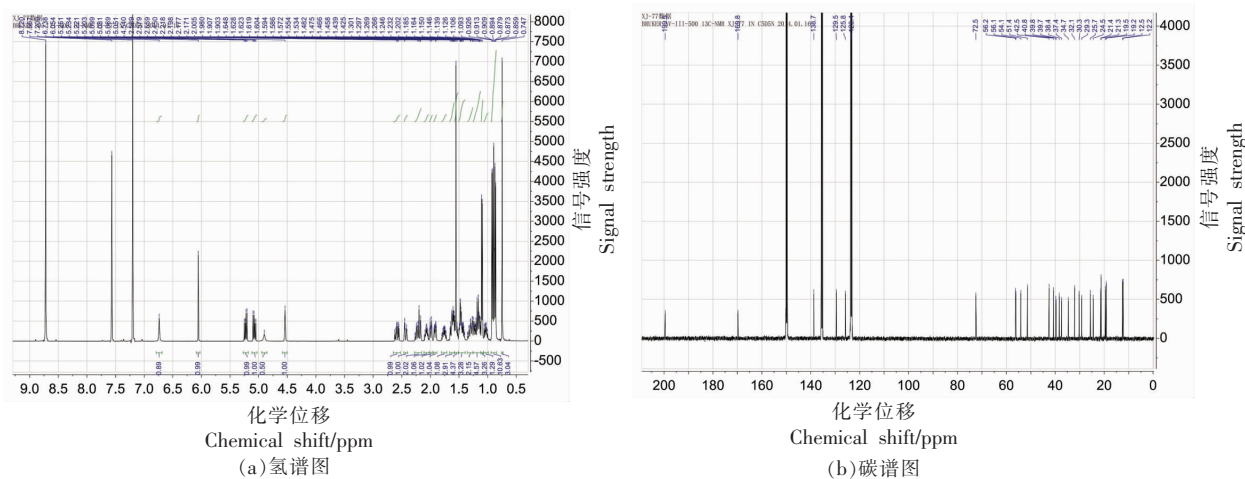
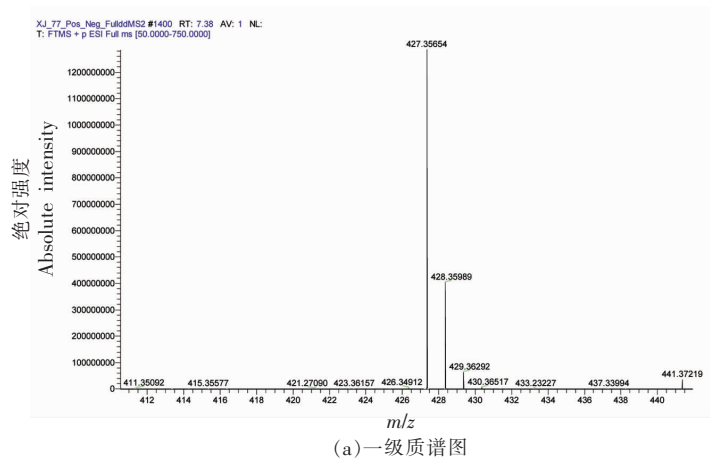
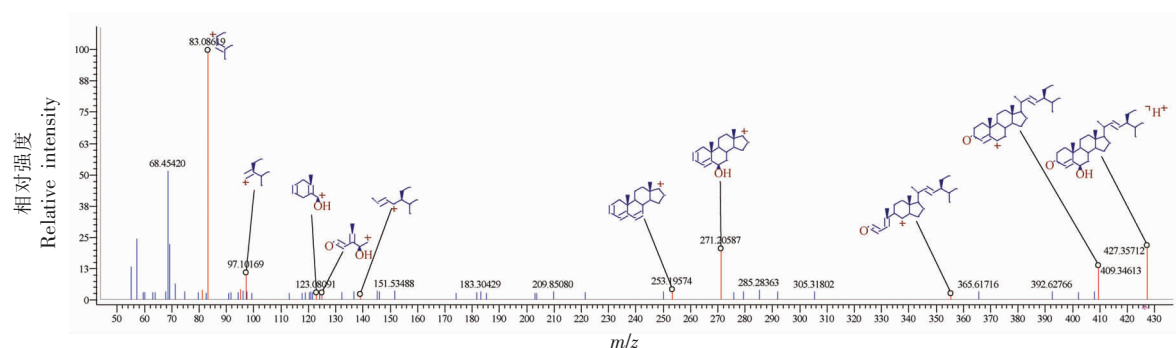


图 11 6β -羟基-豆甾-4,22-二烯-3-酮的核磁图

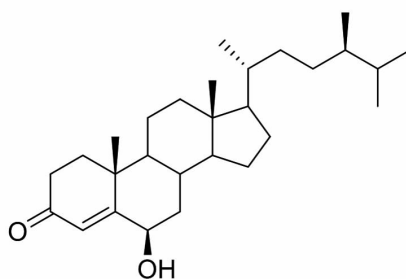
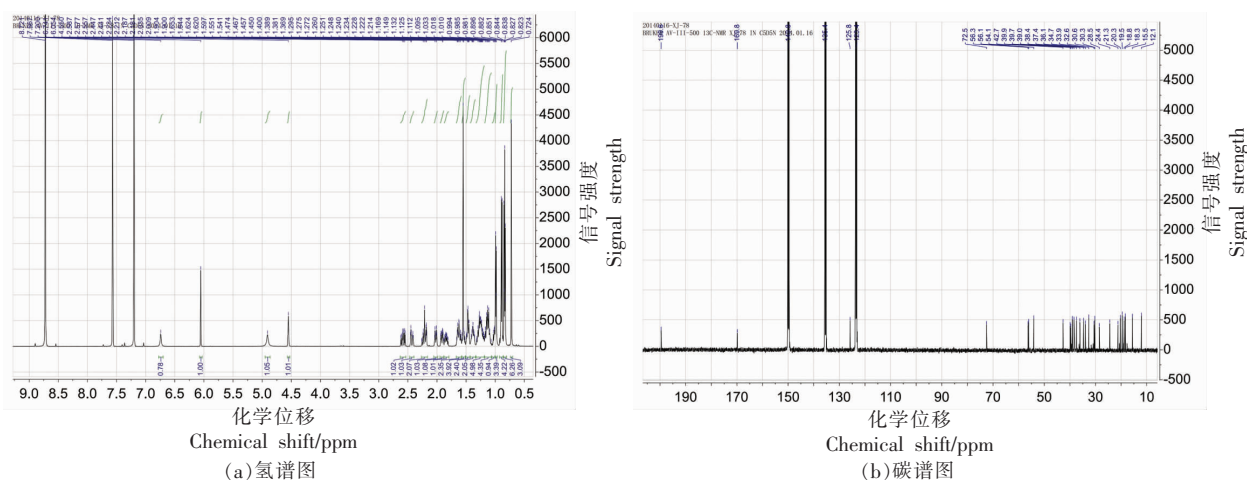
Fig.11 NMR of 6β -hydroxy-stigmasta-4,22-dien-3-one



(a)一级质谱图



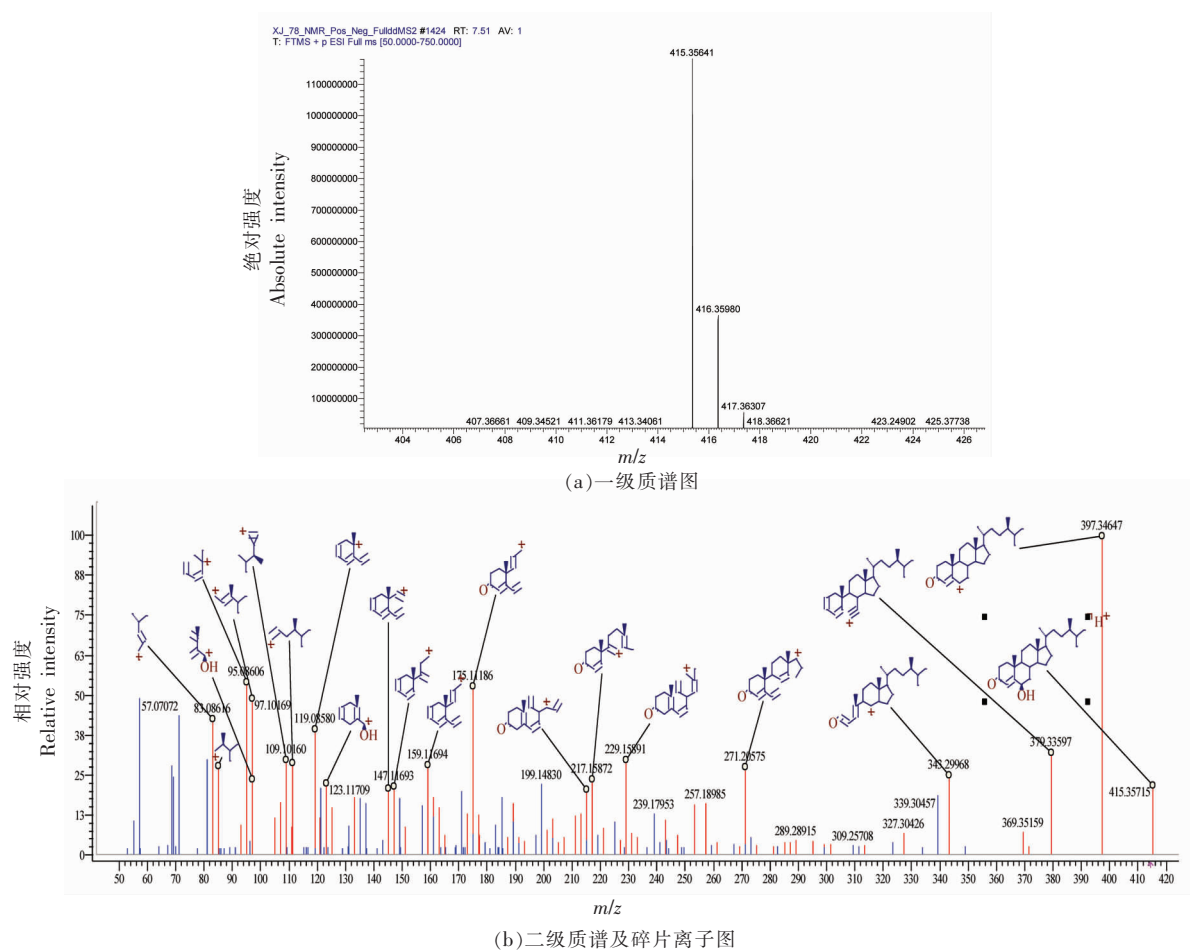
(b) 二级质谱及碎片离子图

图 12 6β -羟基-豆甾-4,22-二烯-3-酮的质谱图Fig.12 MS of 6β -hydroxy-stigmasta-4,22-dien-3-one图 13 6β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮的结构式Fig.13 Structure of 6β -hydroxycampest-4-en-3-one图 14 6β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮的核磁图Fig.14 NMR of 6β -hydroxycampest-4-en-3-one

子有 397.34647, 379.33597, 343.29968, 271.20575, 229.15891, 217.15872, 217.15872, 175.11186, 159.11694; 根据碎片离子推测此结构是 6β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮 (6β -Hydroxycampest-4-en-3-one); 将该化合物的核磁数据与文献[11]和[12]比对发现, 二者数据一致, 故确证了所推导结构的正确性。

2.2 化合物的核磁波谱数据

2.2.1 3β -羟基豆甾-5-烯-7-酮的波谱数据 化合物为白色粉末。HRESIMS m/z : 429.37234 [$M+H$]⁺ (理论计算值: 429.37271)。¹H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 5.69 (1H, s, H-6), 3.68 (1H, m, H-3), 1.20 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.85 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, H-29), 0.83

图 15 6β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮的质谱图Fig.15 MS of 6β -hydroxycampest-4-en-3-one

(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.68 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} : 36.5 (C-1), 31.4 (C-2), 70.7 (C-3), 42.0 (C-4), 165.2 (C-5), 126.3 (C-6), 202.4 (C-7), 45.6 (C-8), 50.1 (C-9), 38.9 (C-10), 21.4 (C-11), 38.4 (C-12), 43.3 (C-13), 50.1 (C-14), 26.5 (C-15), 28.7 (C-16), 54.9 (C-17), 12.1 (C-18), 17.5 (C-19), 36.2 (C-20), 19.1 (C-21), 34.1 (C-22), 26.3 (C-23), 46.0 (C-24), 29.3 (C-25), 19.9 (C-26), 19.2 (C-27), 23.2 (C-28), 12.1 (C-29)。

2.2.2 豆甾-22-烯- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$ -三醇的波谱数据
化合物为针状结晶(丙酮)。HRESIMS 一级质谱显示 m/z : 445.36871 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论计算值: 445.36872), 分子式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

δ_{H} : 5.21 (1H, dd, $J = 15.0, 8.5$ Hz, H-22), 5.06 (1H, dd, $J = 15.0, 9.0$ Hz, H-23), 4.85 (1H, m, H-5), 2.94 (1H, m, H-6), 1.66 (3H, s, CH₃-19), 1.10 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH₃-21), 0.86 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, CH₃-29), 0.83 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH₃-27), 0.77 (3H, s, CH₃-18), 0.80 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, CH₃-26); ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) δ : 32.5 (C-1), 33.3 (C-2), 67.3 (C-3), 42.8 (C-4), 75.9 (C-5 or C-6), 76.3 (C-6 or C-5), 35.7 (C-7), 31.2 (C-8), 45.9 (C-9), 39.2 (C-10), 21.5 (C-11), 40.8 (C-12), 42.9 (C-13), 56.4 (C-14), 24.7 (C-15), 29.4 (C-16), 56.7 (C-17), 12.5 (C-18), 17.2 (C-19), 40.5 (C-20), 19.2 (C-21), 138.9 (C-22), 129.4 (C-23), 51.4 (C-24), 32.1 (C-25), 21.7 (C-26),

21.2 (C-27), 25.6 (C-28), 12.5 (C-29)。

2.2.3 6 β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮的波谱数据

化合物为白色粉末。HRESIMS m/z :429.37234 [M+H]⁺(理论计算值:429.37271), 分子式为 C₂₉H₄₈O₂。¹H-NMR (C₅D₅N, 500 MHz) δ : 6.05 (1H, s, H-4), 4.55 (1H, br s, H-6), 1.55 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), 0.91 (3H, d, J = 8.0 Hz, H-27), 0.90 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-29), 0.87 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-26), 0.73 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 125 MHz) δ : 37.4 (C-1), 34.7 (C-2), 199.6 (C-3), 125.8 (C-4), 169.8 (C-5), 72.5 (C-6), 39.9 (C-7), 30.3 (C-8), 54.1 (C-9), 38.4 (C-10), 21.3 (C-11), 39.7 (C-12), 42.7 (C-13), 56.1 (C-14), 24.4 (C-15), 28.5 (C-16), 56.3 (C-17), 12.1 (C-18), 19.5 (C-19), 36.4 (C-20), 18.9 (C-21), 34.2 (C-22), 26.4 (C-23), 46.0 (C-24), 29.5 (C-25), 20.0 (C-26), 19.2 (C-27), 23.4 (C-28), 12.1 (C-29)。

2.2.4 6 β -羟基-豆甾-4,22-二烯-3-酮的波谱数据

化合物为白色粉末。HRESIMS m/z : 427.35654 [M+H]⁺(理论计算值:427.35706), 分子式为 C₂₉H₄₆O₂。¹H-NMR (C₅D₅N, 500 MHz) δ : 6.05 (1H, s, H-4), 5.23 (1H, d, J = 15, 9 Hz, H-22), 5.08 (1H, d, J = 15, 9 Hz, H-23), 4.54 (1H, br s, H-6), 1.55 (3H, s, H-19), 1.10 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), 0.89 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-29), 0.92 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-27), 0.87 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-27), 0.75 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 125 MHz) δ : 37.4 (C-1), 34.7 (C-2), 199.5 (C-3), 125.8 (C-4), 169.8 (C-5),

72.5 (C-6), 39.8 (C-7), 30.5 (C-8), 54.1 (C-9), 38.4 (C-10), 21.3 (C-11), 39.7 (C-12), 42.5 (C-13), 56.1 (C-14), 24.5 (C-15), 29.3 (C-16), 56.2 (C-17), 12.2 (C-18), 19.5 (C-19), 40.8 (C-20), 21.4 (C-21), 138.7 (C-22), 129.5 (C-23), 51.4 (C-24), 32.1 (C-25), 21.2 (C-26), 19.2 (C-27), 25.7 (C-28), 12.5 (C-29)。

2.2.5 6 β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮的波谱数据

化合物为无色针状结晶(丙酮)。HRESIMS m/z : 415.35641 [M+H]⁺(理论计算值:415.35696), 分子式为 C₂₈H₄₆O₂。¹H-NMR (C₅D₅N, 500 MHz) δ : 6.05 (1H, s, H-4), 4.55 (1H, br s, H-6), 1.55 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), 0.89 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-27), 0.84 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-26), 0.83 (3H, d, J = 7.5 Hz, H-28), 0.72 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 125 MHz) δ : 37.4 (C-1), 34.7 (C-2), 199.6 (C-3), 125.8 (C-4), 169.8 (C-5), 72.5 (C-6), 39.9 (C-7), 30.3 (C-8), 54.1 (C-9), 38.4 (C-10), 21.3 (C-11), 39.7 (C-12), 42.7 (C-13), 56.1 (C-14), 24.4 (C-15), 28.5 (C-16), 56.3 (C-17), 12.1 (C-18), 19.5 (C-19), 36.1 (C-20), 18.8 (C-21), 33.9 (C-22), 30.6 (C-23), 39.0 (C-24), 32.6 (C-25), 20.3 (C-26), 18.3 (C-27), 15.5 (C-28)。

2.3 细胞毒活性筛选结果

采用 MTT 法对分离得到的 5 个单体化合物分别进行体外细胞毒活性验证, 结果如表 1 所示。

表 1 细胞毒活性筛选结果

Table 1 Cytotoxic data of compounds

化合物	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹				
	HCT-116	HepG2	BGC-823	A2780	NCI-H1650
3 β -羟基豆甾-5-烯-7-酮	42.45	43.24	26.16	>100	30.12
5 α -豆甾-22-烯-3 β ,5 α ,6 β -三醇	>100	>100	>100	>100	>100
6 β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮	13.89	20.45	55.21	>100	>100
6 β -羟基-豆甾-4,22-二烯-3-酮	25.17	33.54	>100	>100	>100
6 β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮	44.11	13.25	20.49	>100	>100
紫杉醇(阳性对照)	0.0002	0.0076	0.0006	0.0204	0.80

3 结论

在体外 MTT 活性测试指导下,从小蓟石油醚未研究的亚组分中,借助常压、低压和高压液相色谱,并利用正相硅胶、氰基硅胶、C18 反向硅胶以及 Sephadex LH-20 凝胶填料,分离得到 5 个化合物;并对分离得到的化合物借助一维核磁和高分辨质谱确定了化合物的结构,再与已知文献比对,确证了结构的正确性。采用 MTT 法对分离得到的 5 个单体化合物分别进行体外细胞毒活性验证,除化合物豆甾-22-烯-3 β ,5 α ,6 β -三醇以外,其它 4 个化合物对 HCT-116 细胞和 HepG2 细胞均有明显抑制作用;其中 6 β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮对 HCT-116 细胞抑制作用最强,而 6 β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮对 HepG2 细胞抑制作用最强,推测羰基可能是其活性基团。此外,3 β -羟基豆甾-5-烯-7-酮、6 β -羟基-豆甾-4-烯-3-酮和 6 β -羟基-芸苔甾-4-烯-3-酮对 HGC-823 细胞具有抑制作用,仅 3 β -羟基豆甾-5-烯-7-酮对 NCI-H1650 细胞有抑制作用。所有被测化合物对 A2780 细胞均无抑制作用。

参 考 文 献

- [1] 杨炳友, 杨春丽, 刘艳, 等. 小蓟的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(23): 5039-5048.
YANG B Y, YANG C L, LIU Y, et al. Research progress on *Cirsium setosum*[J]. Chinese Herbal Medicine, 2017, 48(23): 5039-5048.
- [2] 韩文聪, 董优, 孙颖, 等. 小蓟的药理作用与临床应用研究[J]. 海峡药学, 2019, 31(4): 84-87.
HAN W C, DONG Y, SUN Y, et al. Pharmacological action and clinical application of *Cirsium setosum*[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2019, 31(4): 84-87.
- [3] 孙珍, 李冷鸢, 阮珍珍, 等. 小蓟中甾体类化合物的分离及结构鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 124-127.
SUN Z, LI L L, YUAN Z Z, et al. Isolation, purification and structural elucidation of steroids from *Cirsium setosum* (Willd.) MB [J]. Food Science, 2012, 33(19): 124-127.
- [4] 阮珍珍, 吴春彦, 王阿利, 等. 小蓟中氧化蒲公英赛酮和醇的分离鉴定和细胞毒活性测试[J]. 中国食品学报, 2014, 14(3): 196-204.
YUAN Z Z, WU C Y, WANG A L, et al. Isolation, purification, elucidation and cytotoxicity activity on oxidotaraxerone and oxidationtaraxerol of *Cirsium Setosum* (Willd.) MB[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(3): 196-204.
- [5] 李冷鸢, 孙珍, 尚小雅, 等. 小蓟三萜类化合物成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 951-955.
LI L L, SUN Z, SHANG X Y, et al. Triterpene compounds from *Cirsium setosum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(7): 951-955.
- [6] YUAN Z Z, DUAN H M, SHANG X Y, et al. A-Tocospiro C, a novel cytotoxic A-tocopheroid from *Cirsium setosum*[J]. Phytochemistry Letter, 2014, 8(1): 116-120.
- [7] LIN P C, JI L L, ZHONG X J, et al. Taraxastane-type triterpenoids from the medicinal and edible plant *Cirsium setosum*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2019, 17(1): 22-26.
- [8] 尚小雅, 王若兰, 尹素琴, 等. 紫红曲代谢产物中的甾体成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1809-1811.
SHANG X Y, WANG R L, YIN S Q, et al. Steroids from *Monascus purpureus* metabolite [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2009, 34(14): 1809-1811.
- [9] FOLEY D A, O'CALLAGHAN Y, BRIEN N M, et al. Synthesis and characterization of stigmastanol oxidation products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 58(2): 1165-1173.
- [10] 王媛. 毛叶巴豆的化学成分研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
WANG Y. Studies on the chemical constituents of *Croton caudatus*[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2006.
- [11] 贾陆, 郭明明, 李东, 等. 黄秋葵石油醚部位化学成分的研究 II [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(7): 891-895.
JIA L, GUO M M, LI D, et al. Chemical constituents from petroleum ether portion of *Abelmoschus esculentus* II[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2011, 36(7): 891-895.

- [12] GEORGESA P, SYLVESTREA M, RUEGGERB H, et al. Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax[J]. *Steroids*, 2006, 71(8): 647-652.

Analysis of Cytotoxic Active Ingredients from Edible and Medicin *Cirsium setosum*

Wang Zeyu, Zhang Xiaoxia, Wu Yong, Wang Xin, Li Jinjie, Dai Xueling, Shang Xiaoya*
(Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100191)

Abstract The previous research of our group found that the petroleum ether-soluble portion of the ethanol extract of *Cirsium setosum* had a good inhibitory effects on cytotoxic activity of a variety of human tumor cells *in vitro*. Now it is necessary to study the chemical composition of unresearched strong active subfractions, and to explore the functional factors that exert cytotoxic activities. Under the guidance of inhibiting cytotoxic activity *in vitro*, various chromatographic techniques were used for separation and purification, and spectroscopy methods were used for structural elucidation, and the structures were determined by comparison with known literature data. Five steroids were isolated from an active subfraction of the petroleum ether of ethanolic extract of *Cirsium setosum*, and determined as 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one, stigmast-22-ene-3 β ,5 α ,6 β -triol, 6 β -hydroxy-stigmasta-4-en-3-one, 6 β -hydroxy-stigmasta-4,22-dien-3-one and 6 β -hydroxycampest-4-en-3-one. To the best of our knowledge, this is the first report showing the presence of all the compounds in the genus *Cirsium*. In the *in vitro* assays, except for the stigmast-22-ene-3 β ,5 α ,6 β -triol, the other four compounds all showed selective cytotoxicities.

Keywords *Cirsium setosum*; cytotoxic activity; isolation and purification; structure elucidation