

野雉尾金粉蕨中一个新的大环黄酮

廖广凤[#], 莫柳艳[#], 滕明雪, 徐秀虹, 黄千禧, 卢汝梅^{*}

(广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530001)

摘要: 采用大孔树脂、硅胶、反相硅胶、葡聚糖凝胶及高效液相等色谱法, 从野雉尾金粉蕨中分离纯化得到7个化合物。通过核磁共振谱、质谱等波谱学方法分别鉴定为金粉蕨酮 A (1)、槲皮素 (2)、槲皮素-3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷 (3)、山柰酚-7-O- β -D-葡萄糖苷 (4)、山柰酚-3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷 (5)、(-)-prunin (6) 和 1,3,6,7-四羟基吡酮 (7), 其中化合物 1 为结构新颖的大环黄酮类化合物, 其余化合物均为首次从该植物中分离得到。采用 MTS 法测试化合物对 5 种肿瘤细胞株的细胞毒活性, 结果显示化合物 7 对肺癌 A549、肝癌 SMMC-7721 和结肠癌 SW480 细胞具有弱的细胞增殖抑制活性。

关键词: 野雉尾金粉蕨; 金粉蕨酮 A; 金粉蕨属; 黄酮; 细胞毒活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)02-0423-06

A new macrocyclic flavonoid from *Onychium japonicum*

LIAO Guang-feng[#], MO Liu-yan[#], TENG Ming-xue, XU Xiu-hong, HUANG Qian-xi, LU Ru-mei^{*}

(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract: Seven compounds were isolated from *Onychium japonicum* by macroporous resin, silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography and semi-preparative HPLC. Their structures were identified by NMR, MS and other spectroscopic methods as onychone A (1), quercetin (2), quercetin-3-O- α -L-rhamnoside (3), kaempferol-7-O- β -D-glucopyranoside (4), kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (5), (-)-prunin (6), and norathyriol (7). Compound 1 is a novel macrocyclic flavonoid, and all the others are reported from this plant for the first time. *In vitro* cytotoxic activities of compounds 1-7 were evaluated by MTS testing with five cancer cell lines. Compound 7 exhibited weak cytotoxicity against tumor cell lines A549, SMMC-7721, and SW480.

Key words: *Onychium japonicum*; onychone A; *Onychium*; flavonoids; cytotoxic activity

野雉尾金粉蕨 *Onychium japonicum* (Thumb.) Kunze 是中国蕨科金粉蕨属植物, 又称小叶金花草、解毒蕨、解毒草、野鸡尾等, 广泛分布于我国华东、华中、东南及西南地区, 日本、菲律宾、印度尼西亚等也有分布^[1,2]。野雉尾金粉蕨在广西壮族地区是常用的解毒药 (壮药名: Gutgajdoeg 棍盖冬), 壮医认为其具有调龙路 (人体血液循环的通路), 通气道 (人体与环境进行气体交换

功能的通道)、谷道 (人体消化、吸收食物并排出残渣的通道), 解毒除湿, 止血的功效, 用于治疗贫痧 (感冒)、能蚌 (黄疸)、阿意味 (痢疾)、林得叮相 (跌打损伤) 和农药中毒等疾病^[3]。该药临床上常单用或配伍用于治疗癌症等疾病, 是正在研制的抗肿瘤新药“壮药复方铁草胶囊 (国家科技支撑计划 2006BAI06A17)”的主要药物之一^[4]。“壮药复方铁草胶囊”是广西国际壮医医院用于治疗肝癌、肺癌等恶性肿瘤的临床经验方, 具有消肿散结、驱邪扶正之功, 临床效果显著^[5]。同时, 现代药理研究亦表明野雉尾金粉蕨的醇提物能明显抑制小鼠体内移植性肿瘤小鼠肉瘤 S₁₈₀ 和小鼠肝癌 H₂₂ 的生长, 而且呈现量效关系^[6]。文献报道野雉尾金粉蕨的主要

收稿日期: 2022-09-21; 修回日期: 2022-11-03.

基金项目: 广西科技基地和人才专项 (2019AC20275); 广西中医药大学桂派中医药传承创新团队资助项目 (2022B005).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 Tel: 86-771-4953513, E-mail: lrm1969@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1067

成分有黄酮^[7,8]、蒽素倍半萜^[9]及鸟巢烷二萜^[10]等类成分。为了进一步阐明野雉尾金粉蕨的化学成分,筛选出结构新颖具有抗肿瘤活性的天然产物,本文对野雉尾金粉蕨乙酸乙酯部位的化学成分进行研究,从中分离鉴定了7个黄酮类成分,分别鉴定为金粉蕨酮A(1)、槲皮素(2)、槲皮素-3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷(3)、山柰酚-7-O- β -D-葡萄糖苷(4)、山柰酚-3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷(5)、(-)-prunin(6)和1,3,6,7-四羟基吡酮(7),其中化合物1为结构罕见的大环黄酮类化合物,其他化合物均为首次从该植物中分离得到(图1)。活性测试结果显示,化合物7对肺癌A549、肝癌SMMC-7721和结肠癌SW480细胞具有一定的细胞增殖抑制活性。

结果与讨论

1 结构解析

化合物1 黄色固体, $[\alpha]_D^{20} +769.7$ (c 0.1, MeOH)。HR-ESI-MS显示准分子离子峰 m/z : 737.171 7 $[M-H]^-$ (计算值 737.171 8), 提示该化合物分子式为 $C_{36}H_{34}O_{17}$, 不饱和度为20。

1H NMR谱中显示有10个芳香或双键质子信号(表1), 推测可能含有1个ABX耦合体系的苯环 [δ_H 8.03 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'''), 7.38 (1H, dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, H-6'''), 6.97 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''')]; 1个AA'BB'耦合体系的苯环 [δ_H 7.54 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2', -6'), 6.68 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-3', -5')]; 1个孤立的芳香质子信号 δ_H 6.35 (1H, s, H-8) 及2个反式双键质子信号 [δ_H 7.74 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'''), 6.69 (1H, d, $J = 16.1$ Hz,

H-8''')]; 以及11个连氧次甲基或亚甲基和1个甲基质子信号 δ_H 1.33 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-6''), 推测可能为2个糖基的质子信号。 ^{13}C NMR谱、DEPT谱结合HSQC谱显示34个碳信号(包含2个重叠的碳信号 δ_C 133.2和116.5), 包括14个季碳, 其中 δ_C 179.0、168.1为2个羰基信号; 20个次甲基碳。其中 δ_C 145.2、117.2为2个烯碳信号; 1个连氧亚甲基信号 δ_C 64.0及1个甲基信号 δ_C 18.1。 1H - 1H COSY谱显示H-5'''/H-6'''相关, H-7'''/H-8'''相关, HMBC谱显示H-2''''与C-4''''、C-6''''、C-7''''相关, H-6''''与C-2''''、C-4''''、C-7''''相关, H-7''''与C-2''''、C-6''''、C-9''''相关, H-8''''与C-1''''相关, 确证了对羟基桂皮酰结构片的存在(图2)。

1H - 1H COSY谱显示两组糖残基自旋耦合片段: H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/3'-6''和H-1'''/H-2'''/H-3'''/H-4'''/H-5'''/H-2-6''', 推测可能存在一个鼠李糖和一个葡萄糖单元; 通过酸水解实验, 并结合糖端基质子耦合常数 [δ_H 5.44 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-1''), 3.36 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1''')], 最终确定为 α -L-鼠李糖和 β -D-葡萄糖^[11]。HMBC谱显示H-3''与C-1'''相关, H-6''''与C-9''''相关, 说明鼠李糖的C-3''位通过氧原子与葡萄糖的端基C-1'''位相连, 葡萄糖基的C-6''''通过酯键与对羟基桂皮酸片段的C-9''''相连。

至此, 该化合物剩余15个碳原子, 1H - 1H COSY谱显示H-2' (H-6')/H-3' (H-5')相关, HMBC谱显示H-2' (H-6')与C-2相关, H-8与C-6、C-7、C-10相关, 结合化学位移和分子式, 说明该化合物还存在一个黄酮母核。HMBC谱显示, 鼠李糖的H-1''与C-3相关, 对羟基桂皮

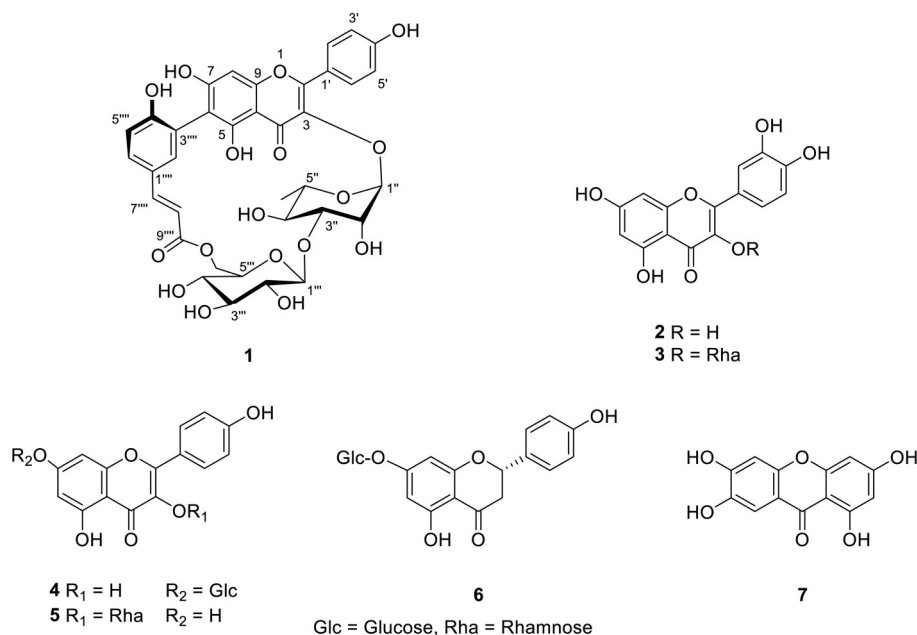


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-7

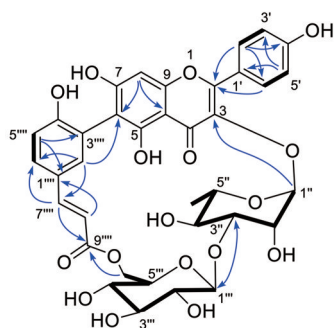


Figure 2 ^1H - ^1H COSY (—) and key HMBC (—) correlations of compound **1**

酰的H-2'''与C-6相关(图2),说明鼠李糖的端基C-1''通过氧原子连接在黄酮的C-3位,对羟基桂皮酸的C-3'''连接在黄酮的C-6位,形成了如图1所示的大环黄酮结构。

化合物**1**黄酮的A环与桂皮酰基的苯环间存在联苯轴手性分子的特征,进一步采用TDDFT方法,计算了该化合物简化模型的ECD谱,发现计算ECD谱与实验ECD谱(图3) Cotton吸收峰一致,从而确定化合物**1**的绝对构型为aS,命名为金粉蕨酮A(onychone A)。该化合物属于结构罕见的大环黄酮类,大环母核中由对羟基桂皮酰、葡萄糖、鼠李糖以及黄酮的A和B环构成。

2 化合物的肿瘤细胞毒活性

体外细胞毒活性测试结果表明(表2),化合物**7**对

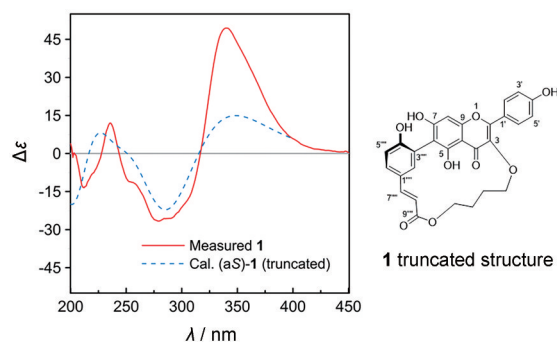


Figure 3 Comparison of the measured ECD spectrum of compound **1** and calculated for (aS)-**1** (truncated). ($\sigma = 0.46$; shift = +10 nm)

肺癌A549、肝癌SMMC-7721和结肠癌SW480细胞显示弱的细胞毒活性;在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,化合物**1**~**6**对测试的5种肿瘤细胞增殖均无显著抑制作用。

实验部分

岛津UV-2401PC型紫外可见分光光度仪、LC-20AR半制备液相色谱仪(日本岛津公司),半制备柱为YMC-Pack ODS-A (250 mm × 10 mm, 5 μm)、分析柱为YMC-Pack ODS-A (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (日本株式会社维美希上海代表处);鲁道夫Autopol IV旋光仪、布鲁克Avance III -500 MHz型核磁共振波谱仪(德国鲁道夫公司);赛默飞世尔NICOLET iS10型中红外光谱仪(美国赛默飞世尔公司);安捷伦TOF-G6230型质

Table 1 ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) spectroscopic data for **1** in CD_3OD

No.	δ_{c} , type	δ_{H} (J in Hz)	No.	δ_{c} , type	δ_{H} (J in Hz)
2	159.7, C		5''	72.0, CH	3.90, dq (9.5, 6.1)
3	134.3, C		6''	18.1, CH_3	1.33, d (6.1)
4	179.0, C		1'''	107.0, CH	3.36, d (7.7)
5	162.9, C		2'''	76.3, CH	3.16, overlapped
6	106.5, C		3'''	77.1, CH	3.27, t (9.2)
7	162.2, C		4'''	71.6, CH	3.04, t (9.4)
8	100.1, CH	6.35, s	5'''	77.4, CH	3.16, overlapped
9	155.7, C		6'''	64.0, CH_2	5.35, dd (12.0, 2.0) 3.51, dd (12.0, 9.6)
10	107.0, C		1''''	127.0, C	
1'	122.0, C		2''''	133.7, CH	8.03, d (2.1)
2',6'	133.2, CH	7.54, d (8.3)	3''''	120.9, C	
3',5'	116.5, CH	6.68, d (8.3)	4''''	158.9, C	
4'	161.6, C		5''''	117.9, CH	6.97, d (8.2)
1''	102.8, CH	5.44, d (1.3)	6''''	133.3, CH	7.38, dd (8.3, 2.3)
2''	68.7, CH	3.65, dd (3.6, 1.3)	7''''	145.2, CH	7.74, d (16.0)
3''	85.4, CH	3.08, dd (9.3, 3.7)	8''''	117.2, CH	6.69, d (16.1)
4''	72.5, CH	3.46, d (9.5)	9''''	168.1, C	

Table 2 Cytotoxicity of compound **7** against tumor cell lines. DDP: Cisplatin

Compd.	IC_{50} value/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				
	HL-60	A549	SMMC-7721	MDA-MB-231	SW480
7	> 50	39.18 ± 1.40	25.67 ± 0.50	> 50	36.77 ± 2.04
DDP	6.65 ± 0.83	16.74 ± 0.68	5.05 ± 0.12	26.69 ± 0.50	28.83 ± 0.83
Taxol	< 0.008	< 0.008	0.12 ± 0.02	< 0.008	< 0.008

谱仪、安捷伦 1100 及 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 赛默飞世尔 FAB-DFS 型质谱仪 (德国赛默飞世尔科技公司); 中低压半制备-REVELERIS X2 型液相色谱仪 (美国格雷斯戴维森公司); 柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目)、薄层硅胶板 60 F254 (青岛海洋化工厂); ODS 填料 (日本 YMC 公司); MCI 填料 (日本三菱化学公司); Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司); 甲醇、乙腈 [色谱级, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; 实验用水 (自制, Milli-Q 型超纯水机); *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐、邻甲苯异硫氰酸酯、吡啶 (上海麦克林生化科技有限公司); *D*-葡萄糖、*L*-鼠李糖 (成都麦德生科技有限公司); 其他试剂为分析纯 (西陇化工股份有限公司)。二氧化碳培养箱、MULTISKAN FC 酶标仪 (赛默飞世尔公司); 移液枪 (德国艾本德); 白血病 HL-60、肺癌 A549、肝癌 SMMC-7721、乳腺癌 MDA-MB-231、结肠癌 SW480 细胞株 (美国 ATCC)。

野雉尾金粉蕨药材于 2020 年 5 月由广西仙茱中药科技有限公司提供, 经广西中医药大学廖月葵高级实验师鉴定为中国蕨科金粉蕨属植物野雉尾金粉蕨 *Onychium japonicum* (Thumb.) Kunze 的干燥全草。植物标本 (编号 JDC-001) 保存于广西中医药大学药学院。

1 提取与分离

干燥的野雉尾金粉蕨全草 18 kg, 用 75% 乙醇加热回流提取 2 次, 每次 2 h。合并提取液后减压浓缩得总浸膏 2 076 g, 总浸膏用等量水悬浮, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 回收溶剂, 得石油醚部位浸膏 110 g, 乙酸乙酯部位浸膏 1 023 g, 正丁醇部位浸膏 217 g 和水部位浸膏 726 g。

乙酸乙酯部位浸膏 950 g, 经 AB-8 大孔树脂柱色谱分离, 依次以甲醇-水 (30%~100%) 梯度洗脱, 得到 5 个组分 Fr. A~Fr. E。Fr. B 经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (50:1→30:1→10:1→5:1→3:1→1:1→0:1) 系统梯度洗脱, 得到 11 个组分 Fr. B.1~Fr. B.11。Fr. B.8 经 C18 反相中低压柱色谱 (甲醇-水, 10%~100%) 得到 8 个组分 Fr. B.8.1~Fr. B.8.8。Fr. B.8.5 用硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (50:1→30:1→20:1→15:1→10:1→5:1→1:1→0:1) 为洗脱剂进行梯度洗脱, 得到 8 个组分 Fr. B.8.5.1~Fr. B.8.5.8。Fr. B.8.5.5 经半制备高效液相色谱 (25% 乙腈-水, 3 mL·min⁻¹) 分离得到化合物 7 (4.9 mg, *t_R* = 24.2 min)、化合物 2 (4.2 mg, *t_R* = 37.1 min)。Fr. B.8.5.8 经 MCI 柱色谱 (甲醇-水, 30%~100%) 得到 6 个组分 Fr. B.8.5.8.1~Fr. B.8.5.8.6。Fr. B.8.5.8.4 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇) 分离, 再经半制备高效液相色谱 (22% 乙腈-水, 3 mL·min⁻¹) 分离得到化合物 5 (29.3 mg, *t_R* = 33.0 min)。Fr. B.9 经

C18 柱色谱 (甲醇-水, 10%~100%) 得到 11 个组分 Fr. B.9.1~Fr. B.9.11。Fr. B.9.5 经半制备高效液相色谱 (43% 甲醇-水, 3 mL·min⁻¹) 分离得到化合物 6 (8.5 mg, *t_R* = 17.5 min)、4 (3.2 mg, *t_R* = 22.0 min)、3 (7.0 mg, *t_R* = 30.0 min)。Fr. B.9.8 经半制备高效液相色谱 (28% 乙腈-水, 3 mL·min⁻¹) 分离得到化合物 1 (5.9 mg, *t_R* = 19.5 min)。

2 酸水解及衍生化反应

称取化合物 1 (1.0 mg), 加入 2 mol·L⁻¹ 盐酸 (5 mL), 密封, 于 100 °C 反应 4 h, 减压浓缩至干后加入 5 mL 蒸馏水溶解, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 5 mL。将水解得到的单糖部分和标准糖分别溶于含有 *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐 (1.0 mg) 的吡啶 (1 mL) 中, 并在 60 °C 下加热反应 1 h 后加入邻甲苯异硫氰酸酯 (2 μL), 并将溶液在 60 °C 下继续反应 1 h, 浓缩至干。对反应混合物进行 HPLC 分析 [YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈: 水 = 25:75, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长为 250 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 5 μL]。通过比较标准糖衍生物和样品单糖衍生物的保留时间, 确定化合物中单糖的绝对构型 (*D*-葡萄糖 20.43 min, *L*-鼠李糖 34.67 min)。

3 结构鉴定

化合物 1 黄色固体; $[\alpha]_D^{20} +769.7$ (*c* 0.1, MeOH); HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 *m/z*: 737.171 7 [M-H]⁻ (计算值 737.171 8), 分子式为 C₃₆H₃₄O₁₇; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 203 (4.18), 227 (4.47), 298 (4.54) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3 424, 2 911, 1 703, 1 641, 1 601, 1 508, 1 359, 1 173, 1 070, 983, 812 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) 数据见表 1。

化合物 2 黄色粉末; EI-MS *m/z*: 302 [M]⁺, 分子式 C₁₅H₁₀O₇; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 7.74 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 7.63 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 148.0 (C-2), 137.3 (C-3), 177.3 (C-4), 158.2 (C-5), 99.3 (C-6), 165.7 (C-7), 94.4 (C-8), 162.5 (C-9), 104.5 (C-10), 124.2 (C-1'), 116.0 (C-2'), 146.2 (C-3'), 148.7 (C-4'), 116.2 (C-5'), 121.6 (C-6')。以上数据与文献^[12]报道基本一致, 故鉴定化合物 2 为槲皮素。

化合物 3 黄色粉末; ESI-MS *m/z*: 471 [M+Na]⁺, 分子式 C₂₁H₂₀O₁₁; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 7.34 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 7.31 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, H-6'), 6.91 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.35 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-1''), 4.22 (1H, dd, *J* = 3.4, 1.7 Hz, H-2''), 3.75 (1H, dd, *J* = 9.4, 3.4 Hz, H-3''), 3.42 (1H, dq, *J* =

9.5, 6.2 Hz, H-5''), 3.35 (1H, m, H-4''), 0.94 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-6''); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 159.3 (C-2), 136.2 (C-3), 179.6 (C-4), 163.2 (C-5), 99.8 (C-6), 166.0 (C-7), 94.7 (C-8), 158.5 (C-9), 105.9 (C-10), 123.0 (C-1'), 116.9 (C-2'), 146.4 (C-3'), 149.8 (C-4'), 116.4 (C-5'), 122.8 (C-6'), 103.5 (C-1''), 71.9 (C-2''), 72.1 (C-3''), 73.2 (C-4''), 72.0 (C-5''), 17.7 (C-6''). 以上数据与文献^[13]报道基本一致, 故鉴定化合物**3**为槲皮素-3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖苷。

化合物**4** 黄色粉末; ESI-MS m/z : 447 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 8.13 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.77 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.47 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.06 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 3.94 (1H, dd, $J = 12.1, 2.3$ Hz, H-2''), 3.72 (1H, dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz, H-3''), 3.55 (1H, ddd, $J = 9.8, 5.8, 2.3$ Hz, H-5''), 3.50 (2H, m, H-4'', 6''a), 3.40 (1H, t, $J = 9.3$ Hz, H-6''b); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 148.8 (C-2), 137.6 (C-3), 177.6 (C-4), 162.2 (C-5), 100.2 (C-6), 164.5 (C-7), 95.6 (C-8), 157.8 (C-9), 106.3 (C-10), 123.6 (C-1'), 130.9 (C-2', 6'), 116.3 (C-3', 5'), 160.8 (C-4'), 101.6 (C-1''), 74.7 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.3 (C-4''), 78.4 (C-5''), 62.5 (C-6''). 以上数据与文献^[14]报道基本一致, 故鉴定化合物**4**为山柰酚-7-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物**5** 黄色粉末; ESI-MS m/z : 455 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.75 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.34 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, s, H-6), 5.37 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1''), 4.24 (1H, dd, $J = 3.3, 1.7$ Hz, H-2''), 3.72 (1H, m, H-3''), 3.34 (2H, m, H-4'', 5''), 0.93 (3H, m, H-6''); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 159.2 (C-2), 136.2 (C-3), 179.5 (C-4), 163.1 (C-5), 99.8 (C-6), 165.9 (C-7), 94.8 (C-8), 158.5 (C-9), 105.9 (C-10), 122.6 (C-1'), 131.9 (C-2', 6'), 116.5 (C-3', 5'), 161.5 (C-4'), 103.4 (C-1''), 71.9 (C-2''), 72.1 (C-3''), 73.2 (C-4''), 72.0 (C-5''), 17.6 (C-6''). 以上数据与文献^[15]报道基本一致, 故鉴定化合物**5**为山柰酚-3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖苷。

化合物**6** 淡黄色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -42.1$ (c 0.1, MeOH); ESI-MS m/z : 457 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.32 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.21 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.19 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.38 (1H, dt, $J = 2.8, 13.0$ Hz, H-2), 4.97 (1H, dd, $J = 5.4, 7.2$ Hz, H-1''), 3.88 (1H, ddd, $J = 1.1, 2.2, 12.2$ Hz, H-6''a), 3.69 (1H, ddd,

$J = 3.9, 5.5, 12.1$ Hz, H-6''b), 3.43 (4H, m, H-2'', 3'', 4'', 5''), 3.17 (1H, ddd, $J = 1.5, 13.0, 17.2$ Hz, H-3a), 2.75 (1H, dt, $J = 3.3, 17.2$ Hz, H-3b); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 80.7 (C-2), 44.1 (C-3), 198.5 (C-4), 164.9 (C-5), 98.0 (C-6), 167.0 (C-7), 96.9 (C-8), 164.6 (C-9), 104.9 (C-10), 130.8 (C-1'), 129.1 (C-2', 6'), 116.3 (C-3', 5'), 159.1 (C-4'), 101.2 (C-1''), 74.6 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.1 (C-4''), 77.8 (C-5''), 62.3 (C-6''). 以上数据与文献^[16,17]报道基本一致, 故鉴定化合物**6**为(-)-prunin。

化合物**7** 黄白色粉末; EI-MS m/z : 260 $[\text{M}]^+$, 分子式 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_6$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.43 (1H, s, H-8), 6.81 (1H, s, H-5), 6.28 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-4), 6.14 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 164.4 (C-1), 98.7 (C-2), 166.3 (C-3), 94.7 (C-4), 159.4 (C-4a), 155.2 (C-5a), 103.5 (C-5), 144.8 (C-6), 153.2 (C-7), 109.1 (C-8), 113.9 (C-8a), 181.1 (C-9), 103.3 (C-9a)。以上数据与文献^[18]报道基本一致, 故鉴定化合物**7**为1,3,6,7-四羟基吡酮。

4 肿瘤细胞毒活性测试

用含10%胎牛血清的培养液(DMEM或RMPI1640)配成单个细胞悬液, 以每孔 $3 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 个细胞数接种到96孔板, 每孔体积100 μL , 培养24 h后弃去旧培养液。分组给药, 每组3个复孔, 空白组加入新的完全培养液, 实验组分别加入含待测样品的完全培养液200 μL /孔, 单体化合物用DMSO溶解, 初次筛选终浓度为单体化合物50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 根据初筛结果进行复筛, 单体化合物终浓度分别为50、10、2、0.4、0.08 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 并设顺铂(DDP)和紫杉醇(Taxol)两个阳性对照组。给药后放入培养箱中培养48 h后, 弃去贴壁细胞孔内的培养液并加入MTS溶液和培养液分别为20和100 μL ; 弃去悬浮细胞孔内培养上清液100 μL , 再加入MTS溶液20 μL 。设置加入MTS溶液和培养液分别为20和100 μL 的3个空白复孔, 放入培养箱中继续孵育2~4 h后测定光吸收值。使用多功能酶标仪于492 nm波长处, 读取并记录各孔OD值。

细胞的生长抑制率 = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$, 并利用Graphpad Prism计算半数抑制浓度(IC_{50})。

作者贡献: 廖广凤是本文第一作者, 负责实验设计及指导、结构解析和论文写作; 莫柳艳是本文共同第一作者, 负责提取分离、活性测试及论文撰写; 滕明雪、徐秀虹和黄千禧协助完成部分提取分离纯化工作; 卢汝梅是本文的通讯作者, 负责实验设计及把关, 提供本文思路, 参与稿件修改等工作。

利益冲突: 所有作者声明本文无任何利益冲突。

References

- [1] Huang RS. Selection of Zhuang Medicine (First volume) (壮药选编·上册) [M]. Nanning: Guangxi Science & Technology Publishing House Co., Ltd., 2019: 20.
- [2] Editorial Committee of Flora of China. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol. 3. Beijing: Science Press, 1999, 3: 136.
- [3] Teng HL, Mei ZN. Resource List of Chinese Zhuang Medicine (中国壮药资源名录) [M]. Beijing: Traditional Chinese Medicine Ancient Books Publishing House, 2014: 13-14.
- [4] Teng HL, Guo LC, Zhao XP. Identification of *Onychium japonicum* (Thunb.) kunze var. *Japonicum* from different origin by TLC [J]. J Guangxi Acad Sci (广西科学院学报), 2015, 31: 302-304.
- [5] Zhong M, Yu SM. Experimental study on anti-tumor effect of FuFangTieCao Capsule [J]. Guangxi Chin Med (广西中医药), 2010, 33: 54-56.
- [6] Lv L, Pang SH, Chen YH, et al. Anti-tumor effect of Jiedujue extracts of Zhuang nationality on mice [J]. Lishizhen Med Mater Res (时珍国医国药), 2006, 17: 692-693.
- [7] Li MC. Study on the Chemical Constituents from *Onychium japonicum* (野雉尾金粉蕨的化学成分研究) [D]. Tianjing: Tianjing Medical University, 2007.
- [8] Fang Y. Studies on Screening the Hemostatic Active Fraction and Chemical Constitutents in Active Fraction from *Onychium japonicum* (野鸡尾止血活性部位筛选及其化学成分研究) [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2016.
- [9] Mo LY, Liao GF, Liu JY, et al. Chemical constituents of *Onychium japonicum* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2022, 6: 1379-1383.
- [10] Zan K, Gan Y, Xie P, et al. Anti-inflammatory new cyathane diterpene glucosides from *Onychium japonicum* [J]. Phytochem Lett, 2021, 44: 206-209.
- [11] Thanh T, Minh TT, Hien D, et al. Chemical constituents of *Phoebe poilanei* and their cytotoxic activity [J]. Nat Prod Commun, 2019, 14: 1-5.
- [12] Fan CM, Chou GX, Zhu EY. Chemical constituents from *Crotalaria sessiliflora* L. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 775-779.
- [13] Lu WJ, Ya QK, Chen JY, et al. A new flavonal glycoside from *Baeckea Frutescens* L. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 1032-1035.
- [14] Zhou W, Lei Z, Lai D, et al. Natural glycosides from *Indigofera stachyoides* Radix [J]. Records Nat Prod, 2019, 14: 83-88.
- [15] Liu Y, Rong XH, Tan JY, et al. Chemical constituents of flavonoids and alkaloids from leaves of *Datura metel* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 4141-4152.
- [16] Turner A, Chen SN, Joike MK, et al. Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: a new antiadherence assay [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 8940-8947.
- [17] Kazuya M, Satomi S, Akane M, et al. Tyrosinase inhibitory activity of extracts from *Prunus persica* [J]. Separations, 2022, 9: 107.
- [18] Hong SS, Suh HJ, Oh JS. Phenolic chemical constituents of the stem barks of *Robinia pseudoacaci* [J]. Chem Nat Compd, 2017, 53: 359-361.