

## 赛北紫堇化学成分及其对肝癌细胞的增殖抑制作用

南泽东<sup>1,2</sup>, 韩广田<sup>2</sup>, 李喜安<sup>2</sup>, 任华忠<sup>2</sup>, 鱼江<sup>2</sup>, 王寿峰<sup>3</sup>, 郭力<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 西南道地药材协同创新中心, 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室, 成都 611137; 2. 乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000; 3. 四川轻化工大学化工学院, 四川 自贡 643000)

**[摘要]** 目的:对赛北紫堇90%乙醇提取物化学成分进行系统研究,并对分离得到的化合物进行体外细胞增殖抑制作用评价。方法:采用正相硅胶, LH-20型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20), ODS柱色谱以及半制备高效液相色谱等分离技术进行分离纯化,运用NMR, MS等波谱方法以及理化性质结合文献数据对分离得到的化合物进行结构鉴定,并采用四甲基唑蓝(MTT)法测定了分离得到的13个化合物对人肝癌HepG2, SMMC-7721细胞的体外抑制活性。结果:从赛北紫堇90%乙醇提取物中分离并鉴定了13个化合物,其结构分别为5-羟基吡啶-2-甲酸乙酯(1), 元胡内酯(2), 3,4-顺-3,4-二羟基-β-紫罗兰酮(3), megastigmane(4), 9-hydroxy-4,7-megastigmadien-3-one(5), blumenol A(6), 吡啶-3-羧酸(7), 1-methyl-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one(8), 腺嘌呤(9), 烟酰胺(10), 2-羟甲基-5-羟基吡啶(11), 腺嘌呤核苷(12), β-胡萝卜素(13)。细胞增殖抑制作用显示化合物3对人肝癌HepG2细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为24.7 μmol·L<sup>-1</sup>(阳性药顺铂IC<sub>50</sub>为4.8 μmol·L<sup>-1</sup>), 化合物4对人肝癌SMMC-7721细胞的IC<sub>50</sub>为13.8 μmol·L<sup>-1</sup>(阳性药顺铂IC<sub>50</sub>为5.4 μmol·L<sup>-1</sup>)。结论:其中化合物1为一新的天然产物,3~8为首次从紫堇属中分离得到,化合物2,9~12为首次从赛北紫堇中分离得到。化合物3对人肝癌HepG2具有较弱的抑制活性,化合物4对人肝癌SMMC-7721具有中等的抑制活性,其他化合物对上述两种肝癌细胞均没有明显的抑制活性。

**[关键词]** 赛北紫堇; 化学成分; 结构鉴定; 细胞增殖抑制作用

**[中图分类号]** R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0163-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201711

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200605.1510.004.html>

**[网络出版日期]** 2020-6-5 16:59

## Chemical Constituents of *Corydalis impatiens* and Their Inhibitory Effect on Proliferation of Hepatoma Cells

NAN Ze-dong<sup>1,2</sup>, HAN Guang-tian<sup>2</sup>, LI Xi-an<sup>2</sup>, REN Hua-zhong<sup>2</sup>, YU Jiang<sup>2</sup>,  
WANG Shou-feng<sup>3</sup>, GUO Li<sup>1\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), School of Pharmacy, Southwest Genuine Medicinal Materials Collaborative Innovation Center, State Key Laboratory of Resources Systems Research and Development Utilization of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Leshan Vocational & Technical college, Leshan 614000, China; 3. Sichuan University of Science and Engineering, College of Chemical Engineering, Zigong 643000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To systematically investigate the chemical constituents of 90% ethanol extract of *Corydalis impatiens*, and evaluate their inhibitory effect on cell proliferation *in vitro*. **Method:** The chemical constituents were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, ODS column chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC). the structures were identified by spectroscopy

**[收稿日期]** 20191031(017)

**[基金项目]** 四川省科技计划项目(2016JY0087); 乐山职业技术学院博士科研启动基金项目(201606)

**[第一作者]** 南泽东, 博士, 副教授, 从事天然产物活性成分及新药研究, E-mail: nanzdchem@163.com

**[通信作者]** \* 郭力, 博士, 教授, 从事中药化学成分及质量标准研究, E-mail: gli64@sina.com

methods such as NMR and MS, as well as analysis of physicochemical properties and/or comparison with literature data, and the inhibitory activities of 13 compounds on HepG2 and SMMC-7721 cells were measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. **Result:** Thirteen known compounds were isolated and identified from 90% ethanol extract of *Corydalis impatiens* as ethyl-5-hydroxy-2-pyridinecarboxylate (**1**), coryhumolide (**2**), 3, 4-*cis*-3, 4-dihydroxy- $\beta$ -ionone (**3**), megastigmane (**4**), 9-hydroxy-4, 7-megastigmadien-3-one (**5**), blumenol A (**6**), indole-3-carboxy acid (**7**), 1-methyl-[1, 2, 4]triazolo[4, 3-*b*][1, 2, 4]triazin-7-one (**8**), adenine (**9**), nicotinamide (**10**), 2-hydroxymethyl-5-pyridinol (**11**), adenosine (**12**), and  $\beta$ -daucosterol (**13**). Cytotoxicities assay showed that the  $IC_{50}$  value of compound **3** for the hepatic cell line HepG2 was  $24.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (positive control drug cisplatin:  $4.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and  $IC_{50}$  value of compound **4** for the hepatic cell line SMMC-7721 was  $13.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (positive control drug cisplatin:  $5.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). **Conclusion:** Compound **1** was a new natural compound, compounds **3-8** were obtained from genus *Corydalis* for the first time, and compounds **2, 9-12** were isolated from this plant for the first time. Compound **3** exhibited weak inhibitory effect on hepatic cell line HepG2, and compound **4** exhibited moderate inhibitory effect on hepatic cell line SMMC-7721. The other compounds rest of ones exhibited no obvious inhibitory effect on hepatic cell line HepG2 or SMMC-7721.

[Key words] *Corydalis impatiens*; chemical constituents; structure elucidation; cytotoxic activity

赛北紫堇为紫堇属植物, 彝药名瓦都, 为一年生或两年生草本, 全草入药, 具有清热解毒、消肿镇痛之功效<sup>[1]</sup>, 生长于海拔 1 700 米附近的林下、山坡灌丛下、草丛中或地边路旁。主要分布于内蒙古、甘肃、青海、四川及西藏等地<sup>[2]</sup>。化学成分研究表明该属植物主要含有生物碱类成分, 之外还含有黄酮、甾体、挥发油等成分。药理活性研究发现该属植物具有抗肿瘤、抗炎镇痛、抗心律失常、保肝等广泛的药理活性<sup>[3-7]</sup>。由于生长环境、产量等客观原因, 对赛北紫堇的现代研究一直滞后, 极大地限制了其药用价值的发挥。目前, 已有的对赛北紫堇研究的报道, 药理活性主要集中在总生物碱的毒理<sup>[8]</sup>、镇痛抗炎<sup>[9-10]</sup>、抗心肌缺血<sup>[11]</sup>等活性, 对该药材的单体化合物的药理活性报道很少, 化学成分的研究也不够系统<sup>[12]</sup>。为进一步阐明该药材的药效物质基础, 寻找有活性的单体化合物, 本实验采用多种色谱分离技术, 从其 90% 乙醇提取物中分离得到的 13 个化合物, 其结构分别为 5-羟基吡啶-2-甲酸乙酯 (**1**), 元胡内酯 (**2**), 3, 4-顺-3, 4-二羟基- $\beta$ -紫罗兰酮 (**3**), megastigmane (**4**), 9-hydroxy-4, 7-megastigmadien-3-one (**5**), blumenol A (**6**), 吡啶-3-羧酸 (**7**), 1-methyl-[1, 2, 4]triazolo[4, 3-*b*][1, 2, 4]triazin-7-one (**8**), 腺嘌呤 (**9**), 烟酰胺 (**10**), 2-羟甲基-5-羟基吡啶 (**11**), 腺嘌呤核苷 (**12**),  $\beta$ -胡萝卜素 (**13**)。其中化合物 **1** 为一新的天然产物, **3-8** 为首次从紫堇属中分离得到, 化合物 **2, 9-12** 为首次从赛北紫堇中分离得到。同时采用噻唑蓝 (MTT) 法测定了分离得到的 13 个化合物对人肝癌 HepG2,

SMMC-7721 细胞的体外抑制活性。

## 1 材料

Avance III 600 MHz 型, Avance III 400 MHz 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); 6320 型质谱仪 (美国 Agilent 公司); LC-3000 型高效液相色谱仪 (北京创新通恒科技有限公司); X-4 型显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司制造, 温度未校正); Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 半制备色谱柱 (10 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); CO<sub>2</sub> 培养箱 (日本 Sanyo 公司); TS100 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); DNM-9602G 型全自动酶标仪 (北京普朗新技术有限公司); BD Transwell 小室 (美国 Corning 公司);

GF<sub>254</sub> 薄层色谱硅胶, 柱色谱用硅胶 (200~300 目) (青岛海洋化工厂), ODS 柱色谱材料 (德国 Merk 公司), LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 瑞士 Pharmacia 公司); HPLC 试剂 (美国 Mreda 公司), 乙醇、二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯、丙酮 (分析纯, 天津大茂化学试剂厂)。DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (上海生工生物工程公司, E600001-0500); MTT (美国 Sigma 公司); 阳性药顺铂 (齐鲁制药有限公司, 国药准字 H37021358)。

赛北紫堇药材 2016 年 10 月购于西藏拉萨药材市场, 由四川省食品药品学校蔡运潭副教授鉴定为罂粟科赛北紫堇 *Corydalis impatiens* 的全草, 标本现存于乐山职业技术学院药学系 (No. CI201610)。细胞增殖抑制作用测试所用的人肝癌 HepG2, SMMC-7721 细胞由四川大学华西基础医学与法医学院

提供。

## 2 提取分离

取干燥赛北紫堇药材 15 kg, 粉碎后用 90% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 将 3 次提取液合并后减压浓缩得浸膏 1 kg。取浸膏加适量水混悬, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 浓缩回收溶剂后分别得到石油醚部位 95 g, 乙酸乙酯部位 260 g, 正丁醇部位 320 g。采用酸溶碱沉法对 260 g 乙酸乙酯部位进行处理, 最终得到碱性部位 63 g, 酸性部位 160 g。

取碱性部位 (63 g), 进行硅胶柱 (200~300 目, 1.2 kg) 色谱分离, 用二氯甲烷-甲醇 (50:1, 20:1, 10:1, 4:1, 2:1) 梯度洗脱, 得到 10 个主要流分 B.1~B.10。B.1 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮 (3:1~1:1) 梯度洗脱, 得到 4 个主要流分 B.1-1~B.1-4。B.1-3 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 色谱分离, 得化合物 2 (5 mg); B.2 经硅胶柱色谱, 用石油醚-乙酸乙酯 (2:1~1:3) 梯度洗脱, 得到 8 个主要流分 B.2-1~B.2-8。B.2-7 反复经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 色谱纯化, 得化合物 8 (3 mg); B.4 经硅胶柱色谱, 用石油醚-二氯甲烷-甲醇 (5:5:1~2:2:1) 梯度洗脱, 得到 4 个主要流分 B.4-1~B.4-4。B.4-2 经 HPLC (乙腈-水, 35:65) 色谱分离, 得化合物 5 (4 mg)。B.5 经硅胶柱色谱, 用石油醚-二氯甲烷-甲醇 (10:10:1~2:2:1) 梯度洗脱, 得到 10 个主要流分 B.5-1~B.5-10。B.5-2 经 HPLC (乙腈-水, 35:65) 色谱分离, 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得化合物 6 (6 mg); B.5-3 经 ODS 色谱分离, 用甲醇-水 (20:80, 40:60, 60:40) 梯度洗脱, 得到 5 个主要流分 Fr.5-3-1~Fr.5-3-5。Fr.5-3-2 经 HPLC (乙腈-水, 30:70) 色谱分离, 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得化合物 1 (2 mg) 和 3 (10 mg); B.5-7 出现很多不溶性白色粉末固体, 经二氯甲烷-甲醇洗去杂质, 得到化合物 13 (20 mg); B.5-8 经 HPLC (乙腈-水, 25:75) 色谱分离, 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得化合物 10 (9 mg) 和 11 (7 mg); B.8 经硅胶柱色谱, 用石油醚-二氯甲烷-甲醇 (10:10:1~2:2:1) 梯度洗脱, 得到 8 个主要流分 B.8-1~B.8-8。B.8-2 经 HPLC (乙腈-水, 25:75) 色谱分离, 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得化合物 4 (10 mg); B.9 经硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇 (10:1~2:1) 梯度洗脱, 得到 6 个主要流分 B.9-1~B.9-6。B.9-1 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二

氯甲烷-甲醇, 1:1) 色谱分离得化合物 7 (8 mg); B.9-2 经 HPLC (乙腈-水, 20:80) 色谱分离, 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得化合物 9 (14 mg) 和 12 (8 mg)。

## 3 结构鉴定

化合物 1 为白色无定形粉末, UV<sub>254</sub> 下显暗斑; ESI-MS  $m/z$  166 [M-H]<sup>-</sup>, 结合 <sup>13</sup>C-NMR 数据给出分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>, 不饱和度为 5。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub>: 8.18 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-6), 8.03 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-3), 7.28 (1H, dd,  $J=2.4, 8.4$  Hz, H-4), 4.39 (2H, q,  $J=7.2$  Hz, H-8), 1.39 (3H, t,  $J=7.2$  Hz, H-9); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub>: 139.2 (C-2), 123.8 (C-3), 128.0 (C-4), 159.6 (C-5), 139.7 (C-6), 166.1 (C-7), 62.5 (C-8), 14.6 (C-9)。上述数据与文献 [13] 报道的 5-羟基吡啶-2-甲酸乙酯 (ethyl-5-hydroxy-2-pyridinecarboxylate) 数据基本一致, 文献中用于合成 Avibactam (CAS: 1192500-31-4) 所用的一个原料化合物。该化合物为一新的天然产物。

化合物 2 为淡黄色针状晶体 (CH<sub>3</sub>OH), 熔点为 167~169 °C, UV<sub>254</sub> 下显暗斑; ESI-MS  $m/z$  179 [M+H]<sup>+</sup>, 结合 <sup>13</sup>C-NMR 数据给出分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, 不饱和度为 7。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 7.10 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-5), 6.88 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-4), 6.19 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.27 (2H, br s, H-3), <sup>1</sup>H-NMR 数据与文献 [14] 报道的基本一致, 但是该文献只报道了该化合物的氢谱数据; 另外一篇文献 [15] 对该化合物在氘代三氯甲烷中的 <sup>13</sup>C-NMR 数据进行了报道, 但是文献报道的两个碳原子 [171.7 (C-1), 71.8 (C-3)] 与本实验测定的 [168.0 (C-1), 70.1 (C-3)] 数据有比较大的出入, 为了保证数据的准确性, 本实验对该化合物进行了 2D-NMR 的测试, 通过 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC 对碳谱进行了准确的归属, <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 168.0 (C-1), 70.1 (C-3), 139.2 (C-3a), 114.3 (C-4), 113.9 (C-5), 149.0 (C-6), 145.0 (C-7), 108.6 (C-7a), 103.3 (C-OCH<sub>2</sub>O)。通过以上波谱数据鉴定该化合物为元胡内酯 (coryhumolide)。

化合物 3 为白色无定形粉末, UV<sub>254</sub> 下显暗斑; ESI-MS  $m/z$  225 [M+H]<sup>+</sup>, 结合 <sup>13</sup>C-NMR 数据给出分子式为 C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>, 不饱和度为 4。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub>: 7.15 (1H, d,  $J=16.2$  Hz, H-7), 6.12 (1H, d,  $J=16.2$  Hz, H-8), 3.96 (1H, br d,  $J=4.2$  Hz, H-4), 3.88 (1H, ddd,  $J=3.6, 4.2, 12.6$  Hz, H-

3), 2.31(3H, s, H-10), 1.88(3H, s, H-13), 1.73(1H, t,  $J=12.6$  Hz, H-2b), 1.58(1H, br d,  $J=4.2$  Hz, H-2a), 1.11(3H, s, H-12), 1.08(3H, s, H-11);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 36.9 (C-1), 41.1 (C-2), 66.4 (C-3), 71.2 (C-4), 131.1 (C-5), 140.2 (C-6), 141.9 (C-7), 133.6 (C-8), 198.2 (C-9), 27.5 (C-10), 27.5 (C-11), 29.8 (C-12), 19.7 (C-13)。以上波谱数据与文献[16]报道一致,故鉴定该化合物为3,4-顺-3,4-二羟基- $\beta$ -紫罗兰酮(3,4-*cis*-3,4-dihydroxy- $\beta$ -ionone)。

化合物4为白色无定形粉末;ESI-MS  $m/z$  245  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据给出分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_4$ , 不饱和度为2。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.06(1H, dd,  $J=1.2, 16.2$  Hz, H-7), 5.78(1H, dd,  $J=6.6, 16.2$  Hz, H-8), 4.34(1H, dq,  $J=1.2, 6.6$  Hz, H-9), 4.04(1H, m, H-3), 1.76(2H, m, H-4), 1.64(1H, t,  $J=12.6$  Hz, H-2b), 1.44(1H, m, H-2a), 1.27(3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-10), 1.19(3H, s, H-11), 1.13(3H, s, H-13), 0.84(3H, s, H-11);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 40.7 (C-1), 46.5 (C-2), 65.3 (C-3), 45.7 (C-4), 77.8 (C-5), 78.9 (C-6), 131.2 (C-7), 136.1 (C-8), 69.6 (C-9), 24.2 (C-10), 27.1 (C-11), 26.2 (C-12), 27.5 (C-13)。以上波谱数据与文献[17]报道一致,故鉴定该化合物为megastigmane。

化合物5为白色无定形粉末,  $\text{UV}_{254}$ 下显暗斑;ESI-MS  $m/z$  231  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据给出分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_2$ , 不饱和度为4。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.78(1H, s, H-4), 5.72(1H, dd,  $J=5.6, 15.2$  Hz, H-8), 5.59(1H, dd,  $J=9.2, 15.2$  Hz, H-7), 4.28(1H, m, H-9), 2.62(1H, d,  $J=9.2$  Hz, H-6), 2.32(1H, d,  $J=16.4$  Hz, H-2b), 1.96(1H, d,  $J=16.4$  Hz, H-2a), 1.89(3H, br s, H-13), 1.20(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-10), 1.00(3H, s, H-11), 0.96(3H, s, H-12);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 36.6 (C-1), 48.1 (C-2), 198.1 (C-3), 126.1 (C-4), 162.3 (C-5), 56.0 (C-6), 126.4 (C-7), 140.5 (C-8), 68.0 (C-9), 24.2 (C-10), 27.3 (C-11), 28.0 (C-12), 23.4 (C-13)。以上波谱数据与文献[18]报道一致,故鉴定该化合物为9-hydroxy-4,7-megastigmadien-3-one。

化合物6为白色无定形粉末,  $\text{UV}_{254}$ 下显暗斑;ESI-MS  $m/z$  247  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据给出分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ , 不饱和度为4。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.86(1H, s, H-4), 5.85

(1H, br d,  $J=15.6$  Hz, H-8), 5.84(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-7), 4.32(1H, m, H-9), 2.42(1H, d,  $J=16.8$  Hz, H-2b), 2.09(1H, d,  $J=16.8$  Hz, H-2a), 1.88(3H, d,  $J=1.2$  Hz, H-13), 1.20(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-10), 1.04(3H, s, H-12), 1.00(3H, s, H-11);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 41.8 (C-1), 50.4 (C-2), 197.5 (C-3), 126.9 (C-4), 164.2 (C-5), 79.4 (C-6), 129.3 (C-7), 137.1 (C-8), 67.8 (C-9), 24.4 (C-10), 24.3 (C-11), 23.4 (C-12), 19.2 (C-13)。以上波谱数据与文献[19]报道一致,故鉴定该化合物为布卢门醇(blumenol A)。

化合物7为无色油状物,  $\text{UV}_{254}$ 下显暗斑;ESI-MS  $m/z$  160  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据给出分子式为 $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2$ , 不饱和度为7。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 8.16(1H, m, H-4), 8.07(1H, m, H-2), 7.53(1H, m, H-7), 7.21(2H, m, H-5, 6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 132.8 (C-2), 108.4 (C-3), 121.9 (C-4), 123.3 (C-5), 122.1 (C-6), 112.8 (C-7), 137.5 (C-8), 127.3 (C-9), 166.5 (3-COOH)。上述数据与文献[20]报道的吲哚-3-羧酸(indole-3-carboxy acid)数据一致。

化合物8为淡黄色无定形粉末,  $\text{UV}_{254}$ 下显暗斑;ESI-MS  $m/z$  152  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据给出分子式为 $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$ , 不饱和度为6。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 8.10(1H, s, H-3), 7.92(1H, s, H-8), 2.45(3H, s, 1- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 147.6 (C-3), 133.4 (C-6), 161.4 (C-7), 148.1 (C-9), 32.9 (N- $\text{CH}_3$ )。上述数据与文献[21]报道的1-methyl-[1,2,4] triazolo [4,3-b] [1,2,4] triazin-7-one数据基本一致。

化合物9为白色无定形粉末,  $\text{UV}_{254}$ 下显暗斑;ESI-MS  $m/z$  136  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据给出分子式为 $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3$ , 不饱和度为6。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 8.37(1H, s, H-2), 8.32(1H, s, H-8);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 149.7 (C-2), 145.8 (C-4), 116.2 (C-5), 152.1 (C-6), 142.4 (C-8)。上述数据与文献[22]报道的腺嘌呤(adenine)数据一致。

化合物10为白色无定形粉末,  $\text{UV}_{254}$ 下显暗斑;ESI-MS  $m/z$  123  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据给出分子式为 $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ , 不饱和度为5。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 8.92(1H, dd,  $J=1.2, 2.4$  Hz, H-2), 8.59(1H, dd,  $J=1.8, 4.8$  Hz, H-6), 8.19(1H, ddd,  $J=1.2, 1.8, 7.8$  Hz, H-4), 7.54(1H, dd,  $J=4.8, 7.8$  Hz, H-5);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 149.5

(C-2), 131.4(C-3), 137.3(C-4), 125.1(C-5), 152.8(C-6), 169.8(C-7)。上述数据与文献[23]报道的烟酰胺(nicotinamide)数据基本一致。

化合物11为白色无定形粉末,UV<sub>254</sub>下显暗斑;ESI-MS  $m/z$  126[M+H]<sup>+</sup>,结合<sup>13</sup>C-NMR数据给出分子式为C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>,不饱和度为4。<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub>: 8.01(1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-6), 7.36(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-3), 7.23(1H, dd,  $J=2.4$ , 8.4 Hz, H-4), 4.59(1H, s, H-7);<sup>13</sup>C-NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub>: 137.3(C-2), 154.7(C-3), 123.3(C-4), 125.0(C-5), 152.5(C-6), 65.2(C-7)。上述数据与文献[24]报道的2-羟甲基-5-羟基吡啶(2-hydroxymethyl-5-pyridinol)数据基本一致。

化合物12为白色无定形粉末,UV<sub>254</sub>下显暗斑;ESI-MS  $m/z$  268[M+H]<sup>+</sup>,结合<sup>13</sup>C-NMR数据给出分子式为C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>,不饱和度为7。<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub>: 8.31(1H, s, H-8), 8.18(1H, s, H-2), 5.96(1H, d,  $J=6.6$  Hz, H-1'), 4.74(1H, dd,  $J=6.6$ , 5.4 Hz, H-2'), 4.32(1H, dd,  $J=3.0$ , 5.4 Hz, H-3'), 4.17(1H, dd,  $J=3.0$ , 5.4 Hz, H-4'), 3.88(1H, dd,  $J=3.0$ , 12.0 Hz, H-5'a), 3.70(1H, dd,  $J=12.0$ , 3.0 Hz, H-5'b);<sup>13</sup>C-NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub>: 153.5(C-2), 150.0(C-4), 121.1(C-5), 157.6(C-6), 142.0(C-8), 91.3(C-1'), 72.7(C-2'), 75.5(C-3'), 88.2(C-4'), 63.5(C-5')。以上波谱数据与文献[23]报道一致,且与腺嘌呤核苷对照品共薄层,Rf值一致,故鉴定该化合物为腺嘌呤核苷(adenosine)。

化合物13为白色无定形粉末;熔点282~283℃;5%硫酸乙醇溶液显紫红色,Molish反应为阳性;与β-胡萝卜素对照品共薄层,3种溶剂系统展开Rf值均一致,混合后测定熔点不下降,故鉴定该化合物为β-胡萝卜素(β-daucosterol)。

#### 4 体外抗肿瘤活性测试

采用MTT法<sup>[25]</sup>测试分离得到的化合物对人肝癌细胞HepG2, SMMC-7721的增殖抑制作用。将分离得到的13个化合物分别用DMSO溶解后配成10 mmol·L<sup>-1</sup>储备液,临用前稀释成所需浓度。

将对数生长期人肝癌细胞HepG2, SMMC-7721以2×10<sup>3</sup>个/cm<sup>2</sup>接种到96孔板中,每孔100 μL,同时设空白组、顺铂组以及给药组,每组设3个复孔,于5% CO<sub>2</sub>, 37℃培养24 h。将每种受试化合物的储备液分别稀释成浓度为2.5, 5.0, 10, 20, 40 μmol·L<sup>-1</sup>。然后将上述培养基更换为受试化合物的含药培养

基,继续培养48 h后,随后更换为无血清培养基,在避光条件下每孔加入质量浓度为5 g·L<sup>-1</sup>体积为20 μL的MTT溶液,继续于37℃孵化4 h,弃去培养液,每孔加入DMSO试剂150 μL振摇10 min后用酶标仪测量波长在570 nm处的吸光度A。抑制率=(A<sub>顺铂</sub>-A<sub>加药</sub>)/(A<sub>顺铂</sub>-A<sub>空白</sub>)×100%。按上述公式计算化合物对HepG2, SMMC-7721细胞增殖的抑制率。实验重复3次,取平均值并用SPSS 22.0计算化合物的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

测试结果显示化合物3对人肝癌HepG2具有较弱的抑制活性,IC<sub>50</sub>为24.7 μmol·L<sup>-1</sup>(阳性药顺铂IC<sub>50</sub>为4.8 μmol·L<sup>-1</sup>),化合物4对人肝癌SMMC-7721具有中等抑制活性,IC<sub>50</sub>为13.8 μmol·L<sup>-1</sup>(阳性药顺铂IC<sub>50</sub>为5.4 μmol·L<sup>-1</sup>)。其他化合物对上述2种肝癌细胞均没有明显的抑制活性。

#### 5 讨论

本课题对赛北紫堇90%乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位化学成分进行系统研究,研究表明该植物中主要含有异喹啉生物碱类成分(另文报道)。本文报道化学成分多样性的另外13个成分,其中化合物3~6为降碳倍半萜类成分,化合物1, 10, 11为吡啶类生物碱成分,化合物9, 12为嘌呤类生物碱成分,化合物7为吲哚类生物碱成分,化合物2, 8, 13为其他类成分。这些化合物中,3~6这种含13个碳原子的降碳倍半萜类型成分也是首次从紫堇属植物中分离得到,这类化合物的发现可能对该药材植物分类学有一定的参考意义。之外,作者对上述分离得到的13个化合物进行了抗人肝癌细胞HepG2, SMMC-7721细胞增殖抑制作用测试,测试结果显示只有化合物3和4对人肝癌HepG2或SMMC-7721细胞增殖具有一定的抑制活性。本研究结果进一步丰富了该药材的化学成分、为其后续的质量控制及单体化合物的药理作用的深入研究提供一定的参考价值。

#### [参考文献]

- [1] 李耕冬,贺延超. 彝医植物药[M]. 成都:四川民族出版社,1990:45-46.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第九卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:632.
- [3] 李珂,张得钧,李占强,等. 紫堇属植物生物碱及其生物活性研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2018,45(10):748-757.
- [4] 刘璐,吴立军,杨春娟. 紫堇属植物中异喹啉类生物碱的化学结构和生物活性的研究进展[J]. 实用药物

- 与临床, 2016, 19(3):371-380.
- [5] 尚伟庆, 陈月梅, 高小力, 等. 紫堇属藏药的化学与药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7):1190-1198.
- [6] 於佳佳, 崔秀月, 毛美娜, 等. 紫堇属植物中异喹啉类生物碱的综述[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(3):407-409.
- [7] 吕芳, 徐筱杰. 紫堇属藏药中生物碱成分及生物活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4):779-780.
- [8] 李海丽, 吴彤, 潘国庆. 赛北紫堇总生物碱LD<sub>50</sub>的测定[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(10):2371-2372, 2379.
- [9] 李海丽, 潘国庆, 酉志亮, 等. 藏药赛北紫堇总生物碱镇痛药效学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(4):544-546.
- [10] 宋晓楠, 吴训文, 王伟, 等. 赛北紫堇总生物碱抗炎作用研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(6):1381-1382.
- [11] 潘国庆, 唐大轩, 张莉, 等. 塞北紫堇总生物碱对异丙肾上腺素致心肌缺血损伤的保护作用及机制[J]. 华西药理学杂志, 2017, 32(3):273-275.
- [12] 王琪, 王顺善, 马吉元, 等. 塞北紫堇中生物碱成分及其药理作用的研究进展[J]. 华西药理学杂志, 2019, 34(4):421-424.
- [13] WANG T, DU L D, WAN D J, et al. A New synthetic route to avibactam: lipase catalytic resolution and the simultaneous debenzoylation/sulfation [J]. *Org Process Res Dev*, 2018, 22(3):267-272.
- [14] 刘川, 赵守训. 江苏元胡块茎中化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(5):261-265.
- [15] DONALD W H, HERBERT L H, DAVID B M. <sup>13</sup>C magnetic resonance spectra of some isoquinoline alkaloids and related model compounds[J]. *Canadian J Chem*, 1976, 54(14):2252-2260.
- [16] 陆瑶, 李志宏, 马林, 等. 栽培尼泊尔菊三七化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19):3777-3781.
- [17] TAKEDA Y, OKADA Y, MASUDA T, et al. New megastigmane and tetraketide from the leaves of *Euscaphis japonica* [J]. *Chem Pharmaceut Bull*, 2000, 48(5):752-754.
- [18] D'ABROSCA B, DELLAGRECA M, FIORENTINO A, et al. Structure elucidation and phytotoxicity of C<sub>13</sub> nor-isoprenoids from *Cestrum parqui* [J]. *Phytochemistry (Elsevier)*, 2004, 65(4):497-505.
- [19] 何江波, 牛艳芬, 李金仙, 等. 骆驼蹄瓣中萜类成分研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23):4634-4638.
- [20] 李浩华, 周燕燕, 陈玉婵, 等. 紫玉盘内生真菌节菱孢中1个新的异香豆素类化合物[J]. 中草药, 2016, 47(3):369-373.
- [21] JACQUESD, MICHEL F, CLAUDE M. <sup>13</sup>C-NMR spectra of s-triazolo-as-triazinones: application to isomeric and tautomeric structure determination [J]. *Organic Magnetic Resonance*, 1980, 13(5):330-334.
- [22] 刘意, 成亮, 何泉泉, 等. 蕨麻的化学成分研究[J]. 中草药, 2014, 45(19):2742-2747.
- [23] 南泽东, 赵明波, 姜勇, 等. 塔中栽培荒漠肉苁蓉化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16):2665-2670.
- [24] 何成军, 彭成, 戴鸥, 等. 益母草注射液化学成分研究[J]. 中草药, 2014, 45(21):3048-3052.
- [25] 宋英奇, 马帅静, 晏晓杰, 等. 氧化白藜芦醇对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭和自噬的研究[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(6):46-50.

[责任编辑 顾雪竹]