

射干苷元衍生物的制备及其体外抗肿瘤活性研究

陈 帅,袁崇均*,罗 森,余梦瑶,王 笏

四川省中医药科学院,成都 610041

摘要:以射干苷元为先导化合物合成了5个衍生物,并以射干苷元为对照,考察化合物体外抗肿瘤的活性,为研发新抗肿瘤药物提供依据。化学试验分别通过磺化反应、甲基化、乙基化反应合成化合物**1**~**5**,并根据红外、紫外、质谱、核磁等数据确定各化合物的结构,分别是射干苷元-5'-磺酸钠(**1**)、4',7-二甲基射干苷元(**2**)、4',7-二甲基射干苷元-5'-磺酸钠(**3**)、4',7-二乙基射干苷元(**4**)、4',7-二乙基射干苷元-5'-磺酸钠(**5**),其中化合物**5**为新化合物;活性研究表明各化合物组对HCT116、A549、HepG2细胞体外增值均有不同程度的抑制作用,效果明显强于同等剂量的射干苷元组,特别是化合物**3**对A549的 IC_{50} 为33.67 μ M,化合物**5**对HCT116和HepG2的 IC_{50} 分别为24.71和32.42 μ M,抗肿瘤活性明显,具有很好的开发利用价值。

关键词:射干苷元;衍生物;MTT法;人结肠癌细胞株;人肺癌细胞株;人肝癌细胞株

中图分类号:Q946

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)12-2093-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.12.012

The study on the preparation and antitumor activity in vitro of the derivatives of tectorigenin

CHEN Shuai, YUAN Chong-jun*, LUO Sen, YU Meng-yao, WANG Jia

Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041, China

Abstract: Five compounds were synthesized with tectorigenin as the lead compound, and the antitumor activity of the compounds in vitro was investigated by comparing with tectorigenin to provide basis for the research and development of new anti-tumor drugs. In chemical experiments, compounds **1-5** were synthesized by sulfonation, methylation, ethylation, and their structures were determined according to the data of IR, UV, MS and NMR, respectively, which were tectorigenin-5'-sodium sulfonate, 4',7-dimethyl tectorigenin, 4',7-dimethyl tectorigenin-5'-sodium sulfonate, 4',7-diethyl tectorigenin, 4',7-diethyl tectorigenin-5'-sodium sulfonate, respectively, in which compound **5** was proved to be a new compound. The results of activity study showed that the compounds could inhibit the proliferation of HCT116, A549 and HepG2 cells in vitro, and the effects were significantly stronger than the same dose of tectorigenin group, especially compound **3**, which had IC_{50} of 33.67 μ M for A549, and compound **5** which had IC_{50} of 24.71 and 32.42 μ M for HCT116 and HepG2, respectively. The anti-tumor activity is obvious, which has a good development and utilization value.

Key words: tectorigenin; derivative; MTT; HCT116; A549; HepG2

川射干为鸢尾科植物鸢尾(*Iris tectorum* Maxim.)的干燥根茎,具有清热解毒、祛痰、利咽之功效,用于热毒痰火郁结证,如咽喉肿痛、痰浊壅盛、咳嗽气喘者^[1],其主要药效成分为异黄酮类物质^[2,3],而射干苷元就是其中的主要有效成分。射干苷元又名鸢尾黄素,5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮,现代

研究表明射干苷元具有 $C_6-C_3-C_6$ 母核结构,也有 α 、 β 核不饱和吡喃酮以及 C_7-OH 、 $C_4'-OH$ 等活性中心存在,具有清除自由基、抗脂质过氧化损伤和降低血糖,防止动脉粥样硬化以及防止血管内皮细胞损伤作用,亦有对心肌梗死小鼠心脏有保护作用,还有抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、雌激素类作用等^[4-7]。本研究基于射干苷元的抗肿瘤作用,以射干苷元为先导化合物^[8],经过结构修饰、改造得到其衍生物射干苷元-5'-磺酸钠、4',7-二甲基射干苷元、4',7-二甲基射干苷元-5'-磺酸钠、4',7-二乙基射干苷元、4',7-

收稿日期:2019-06-27 接受日期:2019-12-06

基金项目:四川省应用基础计划(重点2016JY0009)

*通信作者 Tel:86-28-85237395; E-mail: cscdcm@126.com

二乙基射干苷元-5'-磺酸钠,并采用 MTT 法,考察其衍生物对 HCT116、A549、HepG2 细胞体外增值的影响^[9,10],初步探讨其药理活性,以期开发新型抗肿瘤的单体成分药物。

1 仪器与试剂

1.1 药品

射干苷元,陕西绿清生物工程有限公司,含量:98.86%,批号:20160502;射干苷元-5'-磺酸钠、4',7-二甲基射干苷元、4',7-二甲基射干苷元-5'-磺酸钠、4',7-二乙基射干苷元、4',7-二乙基射干苷元-5'-磺酸钠,含量均 $\geq 98\%$,批号分别为:20160403、20160501、20160503、20160601、20160702,试验前用生理盐水配制成所需浓度的液体备用。

1.2 细胞

人结肠癌细胞株 HCT116、人肺癌细胞株 A549、人肝癌细胞株 HepG2 均购自中国科学院细胞保存库。

1.3 主要试剂

氢氧化钠、盐酸、乙醇、硫酸二甲酯、硫酸二乙酯、浓硫酸、氯化钠,成都市科龙化工试剂厂生产,分析纯,批号分别为 2015120401、2015010111、2015010201、2015070304、2015080912、2015120304、2015020301;高糖 DMEM,美国 GibcoBRL;MTT,乙二胺四乙酸,美国 Sigma。

1.4 实验仪器

液质联用仪,型号为 RRLC-6410,美国 Agilent;核磁共振波谱仪,型号为 AV II,德国 Bruker;紫外分光光度仪,型号为 UV-2401PC,日本 Shimadzu;红外检测仪,型号为 FTIR8300,日本 Shimadzu 公司;微机熔点测定仪,型号为 WRS-2,上海易测仪器设备有限公司;电子天平型号为 CPA225D,德国赛多利斯;超纯水系统,美国 Millipore;CO₂ 培养箱,型号为 MCO-15AC,日本三洋;细胞培养瓶和 96 孔细胞培养板,美国 Corning;酶联免疫检测仪,美国 Thermo Fisher;微量移液器,法国 GILSON。

2 方法与结果

2.1 化合物的制备

2.1.1 化合物 1 的制备

取射干苷元 500 g,加 2 000 mL 浓硫酸,搅拌溶解,反应 2 h,倾入 20 L NaCl 饱和溶液中,边加边搅拌,析出沉淀,放置过夜,过滤,沉淀用水煮沸溶解,趁热过滤,放置,析晶,过滤,重结晶一次,过滤,60 °C 减压干燥,得化合物 1(600 g,含量 $>98\%$,收率为

89.55%)(见图 1)。

2.1.2 化合物 2 的制备

取射干苷元 200 g,加 NaOH 40 g,混匀,加 95% 乙醇 600 mL 于 4 L 圆底烧瓶中,于水浴中加热沸腾 5 分钟,再加 400 mL 硫酸二甲酯,反应半小时,取出,立即用盐酸调 pH 至 2~5,加水搅拌放冷。过滤,得淡黄色粉末,用 95% 乙醇搅拌均匀,过滤,反复洗涤至滤出液近无色,60 °C 减压干燥,得化合物 2(170 g,含量 $>98\%$,收率 77.74%)。

2.1.3 化合物 3 的制备

取化合物 1 100 g,加 NaOH 20 g,混匀,加 95% 乙醇 300 mL 于 2 L 圆底烧瓶中,于水浴中加热沸腾 5 分钟,再加 200 mL 硫酸二甲酯,反应半小时,取出,立即用盐酸调 pH 至 2~5,加水搅拌放冷。过滤,得淡黄色粉末,用 95% 乙醇搅拌均匀,过滤,反复洗涤至滤出液近无色,60 °C 减压干燥,得化合物 3(84 g,含量 $>98\%$,收率 78.53%)。

或者取化合物 2 100 g,加 400 mL 浓硫酸,搅拌溶解,反应 2 小时,倾入 4 L NaCl 饱和溶液中,边加边搅拌,析出沉淀,放置过夜,过滤,沉淀用水煮沸溶解,趁热过滤,放置,析晶,过滤,重结晶一次,过滤,60 °C 减压干燥,得化合物 3(97 g,含量 $>98\%$,收率 90.68%)。

2.1.4 化合物 4 的制备

取射干苷元 200 g,加 NaOH 40 g,混匀,加 95% 乙醇 600 mL 于 4 L 圆底烧瓶中,于水浴中加热沸腾 5 分钟,再加 400 mL 硫酸二乙酯,反应半小时,取出,立即用盐酸调 pH 至 2~5,加水搅拌放冷。过滤,得淡黄色粉末,用 95% 乙醇搅拌均匀,过滤,反复洗涤至滤出液近无色,60 °C 减压干燥,得化合物 4(182 g,含量 $>98\%$,收率 76.69%)。

2.1.4 化合物 5 的制备

取化合物 1 100 g,加 NaOH 20 g,混匀,加 95% 乙醇 300 mL 于 2 L 圆底烧瓶中,于水浴中加热沸腾 5 分钟,再加 200 mL 硫酸二乙酯,反应半小时,取出,立即用盐酸调 pH 至 2~5,加水搅拌放冷。过滤,得淡黄色粉末,用 95% 乙醇搅拌均匀,过滤,反复洗涤至滤出液近无色,60 °C 减压干燥,得化合物 5(88 g,含量 $>98\%$,收率 77.24%)。

或者取化合物 4 100 g,加 400 mL 浓硫酸,搅拌溶解,反应 2 小时,倾入 4 L NaCl 饱和溶液中,边加边搅拌,析出沉淀,放置过夜,过滤,沉淀用水煮沸溶解,趁热过滤,放置,析晶,过滤,重结晶一次,过滤,

60 °C 减压干燥,得化合物 **5** (115 g, 含量 > 98%, 收率 89.39%)。

2.2 化合物的鉴定

化合物 1 淡黄色针晶 (H₂O), HCl-Mg 反应阴性, AlCl₃ 显色呈淡黄色; mp. 166 ~ 168 °C; UV (EtOH) λ_{max}: 264 nm; IR (KBr) ν_{max} 3 465, 1 654, 1 652, 1 575, 1 494, 1 465, 1 278, 1 165, 1 070 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* 425 [M + Na]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.84 (1H, s, 5-OH), 7.88 (1H, s, H-2), 7.74 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6'), 7.25 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3'), 6.21 (1H, s, H-8), 3.70 (3H, s, 6-OCH₃), 1.31 (3H, t, 4'-CH₃), 1.14 (3H, t, 7-CH₃); 上述理化性质和光谱数据与文献^[11]报道一致,确定此化合物为射干苷元-5'-磺酸钠。

化合物 2 淡黄色结晶性粉末 (EtOH), HCl-Mg 反应阴性, AlCl₃ 显色呈淡黄色; mp. 164 ~ 167 °C; UV (EtOH) λ_{max}: 268 nm; IR (KBr) ν_{max} 3 462, 1 653, 1 609, 1 572, 1 469, 1 298, 1 188, 1 068 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* 329 [M + H]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.84 (1H, s, 5-OH), 7.76 (1H, s, H-2), 7.43 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', H-6'), 6.93 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', H-5'), 6.52 (1H, s, H-8), 3.92 (3H, s, 6-OCH₃), 3.83 (3H, s, 7-OCH₃), 3.81 (3H, s, 4'-OCH₃); 上述理化性质和光谱数据与文献^[12,13]报道一致,确定此化合物为 4',7-二甲基射干苷元。

化合物 3 淡黄色针晶 (H₂O), HCl-Mg 反应阴性, AlCl₃ 显色呈淡黄色; mp. 166 ~ 169 °C; UV (EtOH) λ_{max}: 264 nm; IR (KBr) ν_{max} 3 445, 1 654, 1 608, 1 587, 1 490, 1 465, 1 280, 1 181, 1 084, 1 025 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* 453 [M + Na]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.88 (1H, s, 5-OH), 7.96 (1H, s, H-2), 7.84 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6'), 7.46 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-2'), 6.98 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3'), 6.45 (1H, s, H-8), 3.94 (3H, s, 7-OCH₃), 3.82 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.72 (3H, s, 6-OCH₃); 上述理化性质和光谱数据与文献^[13]报道一致,确定此化合物为 4',7-二甲基射干苷元-5'-磺酸钠。

化合物 4 淡黄色结晶性粉末 (EtOH), HCl-Mg 反应阴性, AlCl₃ 显色呈淡黄色; mp. 163 ~ 166 °C; UV (EtOH) λ_{max}: 268 nm; IR (KBr) ν_{max} 3 465, 1 654, 1 608, 1 577, 1 490, 1 465, 1 290, 1 180, 1 074 cm⁻¹;

ESI-MS: *m/z* 357 [M + H]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.80 (1H, s, 5-OH), 7.86 (1H, s, H-2), 7.43 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', H-6'), 6.95 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', H-5'), 6.43 (1H, s, H-8), 4.15 (2H, q, 4'-OCH₂-), 4.06 (2H, q, 7-OCH₂-), 3.90 (3H, s, 6-OCH₃), 1.51 (3H, t, 4'-CH₃), 1.43 (3H, t, 7-CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ: 180.8 (C-4), 158.9 (C-4'), 158.1 (C-7), 153.3 (C-9), 153.2 (C-5), 152.6 (C-2), 132.4 (C-6), 129.8 (C-2', 6'), 122.9 (C-1'), 122.5 (C-3), 114.3 (C-3', 5'), 106.3 (C-10), 90.8 (C-8), 64.6 (4'-OCH₂-), 63.3 (7-OCH₂-), 60.5 (6-OCH₃), 14.6 (4'-CH₃), 14.4 (7-CH₃); 上述理化性质和光谱数据与文献^[14,15]报道一致,确定此化合物为 4',7-二乙基射干苷元。

化合物 5 淡黄色针晶 (H₂O), HCl-Mg 反应阴性, AlCl₃ 显色呈淡黄色; mp. 166 ~ 168 °C; UV (EtOH) λ_{max}: 264 nm; IR (KBr) ν_{max} 3 475, 1 658, 1 602, 1 579, 1 498, 1 467, 1 265, 1 174, 1 052 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* 481 [M + Na]⁺, 459, 437, 330, 318, 274, 245, 138, 可确认该化合物为 C₂₀H₁₉SO₉Na, 不饱和度为 11; 比较化合物 **4** 和化合物 **5** 的核磁数据, 两者基本一致, 仅前者 B 环 ¹H NMR 谱上有 4 个芳氢质子信号, H-2' 和 H-3' 互为邻位耦合, H-5' 和 H-6' 互为邻位耦合; 而后者 B 环上仅有 3 个芳氢质子信号, 说明有一芳氢质子被磺酸钠基所取代; ¹³C NMR 谱显示化合物 **2** 为 20 个碳原子, 和前者比较, 仅少了 1 个 δ_c114.3, 取而代之的是 δ_c130.4, 结果与 ¹H NMR 谱相印证, 由于苯酚磺化反应在室温进行 (20 ~ 25 °C), 只能得到邻位产物, 故取代发生在 C-3' 或 C-5' 上, δ_H7.74、δ_H7.25 互为间位耦合, δ_H7.25、δ_H6.95 互为邻位耦合, 证实 δ_H7.74 为 H-6', δ_H7.25 为 H-2', δ_H6.95 为 H-3', 确定取代发生在 C-5' 上, 由此确定了化合物 **5** 为 4',7-二乙基射干苷元-5'-磺酸钠, 确认为新化合物, 结构未见文献报道。具体表征如下, ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.82 (1H, s, 5-OH), 7.83 (1H, s, H-2), 7.74 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6'), 7.25 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-2'), 6.95 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3'), 6.17 (1H, s, H-8), 4.08 (2H, q, 4'-OCH₂-), 3.72 (2H, q, 7-OCH₂-), 3.57 (3H, s, 6-OCH₃), 1.31 (3H, t, 4'-CH₃), 1.14 (3H, t, 7-CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ: 180.7 (C-4), 154.5 (C-7), 154.2 (C-4'), 153.4 (C-2), 152.7 (C-9), 152.4 (C-5), 133.5 (C-2'), 132.1 (C-6),

130.4 (C-5'), 125.6 (C-1'), 123.4 (C-3), 120.5 (C-6'), 115.3 (C-3'), 106.3 (C-10), 90.9 (C-8), 64.8 (7-OCH₂-), 64.3 (4'-OCH₂-), 60.7 (6-OCH₃), 14.8

(7-CH₃), 14.6 (4'-CH₃)。

2.3 化合物的化学结构和合成路线

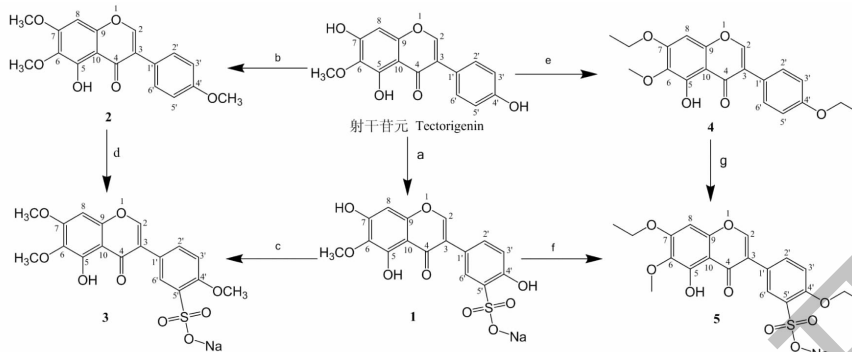


图1 化合物的化学结构和合成路线

Fig. 1 Chemical structures and synthetic route of compounds

注: a: 依次加入浓硫酸和饱和氯化钠溶液进行磺酸化反应, 收率 89.55%; b: 依次加入氢氧化钠, 乙醇和硫酸二甲酯进行甲酯化反应, 收率 77.74%; c: 依次加入氢氧化钠, 乙醇和硫酸二甲酯进行甲酯化反应, 收率 78.53%; d: 依次加入浓硫酸和饱和氯化钠溶液进行磺酸化反应, 收率 90.68%; e: 依次加入氢氧化钠, 乙醇和硫酸二乙酯进行乙酯化反应, 收率 76.69%; f: 依次加入氢氧化钠, 乙醇和硫酸二乙酯进行乙酯化反应, 收率 77.24%; g: 依次加入浓硫酸和饱和氯化钠溶液进行磺酸化反应, 收率 89.39%。Note: a: H₂SO₄ and NaCl solution were added in turn to carry out the sulfonation reaction, and the yield was 89.55%; b: NaOH, EtOH and DMS were added in turn to carry out the methyl reaction, and the yield was 77.74%; c: NaOH, EtOH and DMS were added in turn to carry out the methyl reaction, and the yield was 78.53%. d: H₂SO₄ and NaCl solution were added in turn to carry out the sulfonation reaction, and the yield was 90.68%; e: NaOH, EtOH and DES were added in turn for ethyl reaction, the yield was 76.69%; f: NaOH, EtOH and DES were added in turn for ethyl reaction, the yield was 77.24%; g: H₂SO₄ and NaCl solution were added in turn to carry out the sulfonation reaction, and the yield was 89.39%.

2.4 化合物对 HCT116、A549、HepG2 细胞株体外增殖的影响

2.4.1 细胞培养

分别取 HCT116、A549、HepG2 细胞株以含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基 (含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/mL) 培养于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱内。每隔 2~3 天, 以 0.05% 胰蛋白酶-0.53 mmol/L EDTA 消化传代。

2.4.2 分组给药及检测

分别取对数生长期的 HCT116、A549、HepG2 细胞, 用胰酶消化, 吹散, 制备细胞混悬液, 显微计数, 调整细胞浓度, 按 6 × 10³ 个/孔接种到 96 孔板, 在

37 °C 培养过夜。设置药物组 (化合物 1~5 浓度为 320、160、80、40、20、10、5 μM 的系列溶液), 空白对照组 (只加培养基) 和射干昔元阳性药对照组 (浓度为 320、160、80、40、20、10、5 μM 的系列溶液), 在 96 孔板中分别加入适宜浓度的各组样品, 每个浓度做 3 个重复, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 试验结束前 4 h, 将 96 孔板里的培养液吸出, 加入 100 μL PBS 缓冲液和 10 μL 5 mg/mL MTT 溶液, 37 °C 孵育 4 h, 加 100 μL 10% SDS 溶液 (0.01 M HCl 配制), 37 °C 孵育过夜, 测定 OD₅₇₀, 计算各样品浓度的抑制率 (抑制率 = (空白组 OD - 试验组 OD) / 空白组 OD × 100%), 采用 Curve Expert 计算 IC₅₀。

表 1 射干昔元及其衍生物体外抗肿瘤活性结果 (n = 3)

Table 1 Anti-tumor activity of tectorigenin and its derivatives *in vitro* (n = 3)

化合物 Compound	IC ₅₀ (μM)		
	HCT116	A549	HepG2
1	108.08 ± 9.38	87.68 ± 7.34	137.71 ± 2.27
2	135.28 ± 3.78	104.98 ± 2.36	74.26 ± 3.39
3	79.11 ± 5.39	33.67 ± 7.23	88.90 ± 5.62

续表 1 (Continued Tab. 1)

化合物 Compound	IC ₅₀ (μM)		
	HCT116	A549	HepG2
4	133.72 ± 3.53	108.25 ± 4.36	73.44 ± 2.03
5	24.71 ± 1.81	57.68 ± 3.63	32.42 ± 1.96
射干苷元 Tectorigenin	198.06 ± 4.53	202.50 ± 3.35	258.80 ± 5.47

由表 1 可知,射干苷元及其衍生物对 HCT116、A549、HepG2 细胞株体外增殖有一定的抑制作用;各化合物组对 HCT116、A549、HepG2 细胞株的抑制明显强于射干苷元阳性药对照组,其中化合物 **3** 对 A549 的 IC₅₀ 为 33.67 μM,化合物 **5** 对 HCT116 和 HepG2 细胞的 IC₅₀ 分别为 24.71 和 32.42 μM,证明其有良好的抗肿瘤活性,从而证实了结构改造的可行性和必要性。

3 讨论

从天然植物中寻找安全、高效的抗肿瘤药物,是开发抗肿瘤药物的重要途径。药用植物是一个巨大的宝库,对发掘新的抗肿瘤药物有着得天独厚的优势,特别是四川,有着“中医之乡,中药之库”的美誉,川射干作为川产道地药材,野生资源丰富,采收炮制简单,提取加工方便,黄酮成分含量高,并具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗病毒等诸多药理活性。本研究基川射干中主要成分射干苷元的抗肿瘤作用,以射干苷元为母体合成一系列化合物,并考察化合物对 HCT116、A549、HepG2 细胞株体外增殖的影响。结果证实,射干苷元及其衍生物均具有一定的抗肿瘤作用,特别是化合物 **3** 对于 A549 细胞株有良好的抑制活性,化合物 **5** 对于 HCT116 和 HepG2 细胞株有良好的抑制活性,可作为潜在抗肿瘤化合物继续研发,下一步将深入研究射干苷元及其衍生物的结构与活性关系,探讨其抗肿瘤机制,阐述其构效关系。

致谢: NMR 光谱、MS 由四川大学分析测试中心完成。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:41.
- Yuan CJ, Wang J, Chen S, et al. Study on the chemical constituents of *Iris tectorum* Maxim. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2008, 20:444-446.
- Li SL, Liu CM, Li SN, et al. Screening and identification of

lactate dehydrogenase inhibitors from *Belamcanda chinensis* extract using HPLC-ESI-MS [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29:595-600.

- Yan CM. The study on antiviral and anti-inflammatory activities of flavonoids [D]. Nanjing: Nanjing University (南京大学), 2012.
- Zhang L, Zhang L. Progress in chemical and pharmacological studies on *Iris tectorum* Maxim. [J]. J Shaanxi Coll Tradit Chin Med (陕西中医学院学报), 2014, 37:91-93.
- Chen BL. Advances in the research of the pharmacological activities of flavonoids [J]. Hainan Med J (海南医学), 2012, 23:109-121.
- Wang XL, Wu JL, Zhen M, et al. Effect of tectorigenin from pueraria flos on proliferation of hepatocarcinoma SMMC-7721 cells *in vitro* [J]. Chin New Drug J (中国新药杂志), 2010, 19:168-171.
- Li Z, Wang J, Zhou Y, et al. Lead compound optimization strategy (3)-structure modification strategies for improving water solubility [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2014, 49:1238-1247.
- Nan ML, Hao YF, Si XL, et al. Study on synthesis and identification of rotundic acid esters derivatives and *in vitro* antitumor activity [J]. J China Pharm (中国药房), 2019, 30:591-595.
- Wei WQ, Zhao MC, Liu J, et al. Influencing factors of the MTT based on tumor chemosensitivity assay *in vitro* [J]. Med J Chin PLA (解放军医药杂志), 2008, 20:25-27.
- Xu XM. The preparation method of isoflavone derivative from tectorigenin and its effective component antiviral drugs; CN200410044484.6 [P]. 2006-11-22.
- Yuan JH. Reaction of flavonoids with superoxide anion and synthesis of 4', 6, 7-trimethoxyisoflavone [D]. Beijing: Beijing Normal University (北京师范大学), 2002.
- Zhang XL. Studies on the structure modification and crystal structures of isoflavone components of flowers pueraria [D]. Shaanxi: Shaanxi Normal University (陕西师范大学), 2006.
- Yuan CJ, Chen C, Chen S, et al. Study on a impurity of the innovative drug diethyl tectoridingenin [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 29:3208-3212.
- Yuan CJ. An isoflavone derivative and preparation method and use; CN201610939889.9 [P]. 2016-11-01.