

赛北紫堇中的酚类成分及其细胞毒活性研究

南泽东^{1,2}, 韩广田², 李喜安², 任华忠², 鱼江², 王寿峰^{3*}, 郭力^{1*}

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, 乐山 614000; ³四川轻化工大学化工学院, 自贡 743000

摘要:综合运用正相硅胶、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对罂粟科植物赛北紫堇的化学成分进行系统研究。运用 NMR, MS 等波谱方法以及理化性质结合文献数据鉴定了从赛北紫堇 90% 乙醇提取物中分离得到的 20 个酚类化合物, 分别为: (3*S*)-5-guaiacyl-3-hydroxypentanoic methyl ester (**1**)、8-对羟苄基槲皮素(**2**)、8-对羟苄基山奈酚(**3**)、6-对羟苄基槲皮素(**4**)、槲皮素(**5**)、山奈酚(**6**)、金圣草黄素(**7**)、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基(口山)酮(**8**)、1-羟基-2,3,5-三甲氧基(口山)酮(**9**)、1-羟基-2,3,4,6-四甲氧基(口山)酮(**10**)、*p*-hydroxyphenylferulate(**11**)、5,7-二羟基香豆素(**12**)、4,4'-二羟基二苄醚(**13**)、3-甲氧基-4-羟基苯乙醇(**14**)、3,4-二羟基苯乙醇(**15**)、对羟基苯乙醇(**16**)、对羟苄基乙醚(**17**)、对羟基苯甲醇(**18**)、1,2,4-苯三酚(**19**)、邻二苯酚(**20**)。其中化合物 **1** 为一新的天然产物, **2~4** 和 **7~20** 为首次从紫堇属中分离得到, 化合物 **5** 和 **6** 为首次从赛北紫堇中分离得到。采用四甲基唑蓝法测定了 20 个化合物对人肝癌 HepG2、SMMC-7721 细胞的体外抑制活性, 结果显示化合物 **2** 和 **3** 对人肝癌 HepG2 具有一定的抑制活性, IC₅₀ 值分别为 16.8 和 19.2 μmol/L。

关键词:赛北紫堇; 酚类成分; 结构鉴定; 细胞毒活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)7-1164-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.7.011

Phenolic compounds with cytotoxic activity from *Corydalis impatiens*

NAN Ze-dong^{1,2}, HAN Guang-tian², LI Xi-an², REN Hua-zhong², YU Jiang², WANG Shou-feng^{3*}, GUO Li^{1*}

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: To investigate the chemical constituents from *Corydalis impatiens*, various column chromatography techniques, including silica gel, Sephadex LH-20, ODS and semi-preparative HPLC were used. The structures were identified by NMR, MS, physicochemical properties and/or comparison with literature data. As a result, twenty known phenolic compounds were isolated and identified as (3*S*)-5-guaiacyl-3-hydroxypentanoic methyl ester (**1**), 8-*C-p*-hydroxybenzylquercetin (**2**), 8-*C-p*-hydroxybenzylkaempferol (**3**), 6-*C-p*-hydroxybenzylquercetin (**4**), quercetin (**5**), kaempferol (**6**), chrysoeriol (**7**), 1,7-dihydroxy-3,8-dimethoxyxanthone (**8**), 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxyxanthone (**9**), 1-hydroxy-2,3,4,6-tetramethoxyxanthone (**10**), *p*-hydroxyphenylferulate (**11**), esculetin (**12**), 4,4'-dihydroxydibenzyl ether (**13**), 3-methoxy-4-hydroxy-phenylethanol (**14**), 3,4-dihydroxyphenylethanol (**15**), 4-hydroxyphenylethanol (**16**), *p*-hydroxybenzylethyl ether (**17**), *p*-hydroxyphenylmethanol (**18**), 1,2,4-trihydroxybenzene (**19**), 1,2-benzenediol (**20**). Compound **1** is a new natural compound, **2-4** and **7-20** were obtained from genus *Corydalis* for the first time, and **5** and **6** were isolated from this plant for the first time. All of the compounds obtained were evaluated *in vitro* by MTT assay against human hepatic cell line HepG2 and SMMC-7721. Compounds **2** and **3** exhibited moderate inhibition on HepG2 with IC₅₀ values of 16.8 and 19.2 μmol/L, respectively.

收稿日期: 2019-11-29

接受日期: 2020-04-24

基金项目: 四川省科技计划项目应用基础计划(2016JY0087); 乐山职业技术学院博士科研启动基金(201606)

* 通信作者 E-mail: gli64@sina.com

Key words: *Corydalis impatiens*; phenolic constituents; structure elucidation; cytotoxic activity

赛北紫堇 *Corydalis impatiens* 为罂粟科紫堇属植物,彝族药名瓦都,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^[1],生长于海拔 1 700 m 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^[2]。目前,已有多篇文献^[3,4]对该属植物的化学成分及其药理活性进行了综述,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,具有广泛的药理活性,如抗肿瘤、抗炎镇痛、抗心律失常、保肝等。由于生长环境、产量等原因,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,主要集中在质量标准^[5]、含量测定^[6]、总生物碱药理活性^[7]以及化学成分^[8]的研究。为进一步阐明该药材的药效物质基础,本实验采用硅胶柱色谱、凝胶 Sephadex LH-20 色谱、半制备高效液相色谱等分离技术对赛北紫堇成分进行分离,并采用四甲基唑蓝(MTT)法测定化合物对人肝癌 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的体外抑制活性。

1 仪器与材料

Bruker-600M、Bruker-400M 核磁共振仪(德国 Bruker 公司);Agilent 6320 型质谱仪(美国 Agilent 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);Hanon P850 全自动型旋光仪(济南海能仪器股份有限公司);LC-3000 高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司);Agilent Eclipse XDB-C₁₈(10 mm × 250 mm, 5 μm)半制备色谱柱;CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);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);薄层色谱和柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂),ODS 柱色谱材料(德国 Merk 公司),Sephadex LH-20(瑞士 Pharmacia 公司);HPLC 试剂(美国 MREDA 公司),实验过程中所用的乙醇、二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯、丙酮为分析纯(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);四甲基唑蓝(美国 Sigma 公司)。

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秦运潭副教授鉴定为赛北紫堇 *Corydalis impatiens*,标本现存于乐山职业

技术学院药学系(No. CI201610)。细胞毒活性测试所用的人肝癌 HepG2、SMMC-7721 细胞由四川大学华西基础医学与法医学院提供。

2 试验方法

2.1 提取分离

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,合并 3 次提取液,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,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,将其分散到 2 L 蒸馏水中,用 1 mol/LHCl 调 PH 至 3~4,滤去不溶物得酸性部位 160 g,然后用 1 mol/LNaOH 调 PH 至 9~10,得到碱性部位 63 g。

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.3 经硅胶柱色谱,用石油醚-丙酮(3:1→1:3)梯度洗脱,得到 8 个主要流分 B.3-1~B.3-8。B.3-2 经 HPLC(30% 乙腈-水)色谱分离,得化合物 **17**(8 mg)。B.3-6 反复经 Sephadex LH-20 凝胶柱(二氯甲烷-甲醇,1:1)纯化得化合物 **14**(6 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.5-8 经 HPLC(15% 乙腈-水)色谱分离,得化合物 **15**(4 mg)和 **20**(5 mg);B.6 经 HPLC(10% 乙腈-水)色谱分离,得化合物 **13**(8 mg)、**16**(12 mg)和 **18**(20 mg);B.9 反复经 Sephadex LH-20 凝胶柱(二氯甲烷/甲醇,1:1)色谱分离,得化合物 **12**(11 mg);B.10 经硅胶柱色谱,用石油醚-二氯甲烷-甲醇(3:3:1)洗脱,得化合物 **19**(4 mg)。

酸性部位(160 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 12 个主要流分 Fr.1~Fr.10。Fr.3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱(二氯甲烷-甲醇,1:1)色谱分离,得到 2 个主要流分 Fr.3-1~Fr.3-2。Fr.3-1 经 HPLC(45% 乙腈-水)色谱分离,得化合物 **10**(12 mg);Fr.4 经硅胶柱色谱,用石油醚-丙酮(3:1→1:3)梯度洗脱,得到 4 个主要流分 Fr.4-1~Fr.4-4。Fr.4-3 经 HPLC(40% 乙腈-水)色谱分离,得化合物 **1**(5 mg)和 **9**(10 mg);Fr.5 经

ODS 色谱分离,用甲醇-水(20%、40%、60%)梯度洗脱,得到3个主要流分 Fr. 5-1 ~ Fr. 5-3。Fr. 5-2 经 HPLC(30% 乙腈-水)色谱分离,得化合物 **7**(3 mg) 和 **8**(6 mg); Fr. 6 经 ODS 色谱分离,用甲醇-水(20%、40%、60%)梯度洗脱,得到4个主要流分 Fr. 6-1 ~ Fr. 6-4。Fr. 6-2 经 HPLC(35% 甲醇-水)色谱分离,得化合物 **11**(8 mg) 和 **6**(13 mg); Fr. 10 经硅胶柱色谱分离,用二氯甲烷-甲醇(10:1、6:1、4:1、2:1)梯度洗脱,得到5个主要流分 Fr. 10-1 ~ Fr. 10-5。Fr. 10-3 经 HPLC(18% 乙腈-水)色谱分离,得化合物 **3**(15 mg); Fr. 10-4 反复经 HPLC(15% 乙腈-水)色谱分离,得化合物 **5**(20 mg)、**2**(24 mg) 和 **4**(13 mg)。

2.2 活性测试

用 MTT 法进行测试,将分离得到的20个酚类化合物分别用 DMSO 溶解后配成 10 mmol/L 储备液,临用前稀释。将对数生长期人肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 以 2×10^3 个/cm² 的密度接种到 96 孔板中,每孔 100 μ L,并设空白组、对照组以及给药组,每组设3个平行孔,于5% CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。然后更换为受试化合物分别为 2.5、5.0、10、20、40 μ mol/L 的含药培养基,继续培养 48 h 后,更换为无血清培养基,避光条件下每孔加入 5 mg/mL 体积为 20 μ L 的 MTT 溶液,继续于 37 $^{\circ}$ C 孵化 4 h,然后弃去培养液,每孔加入 DMSO 150 μ L 振摇 10 min 后用酶标仪测量波长在 570 nm 处的吸光度 OD 值。按下述公式计算化合物对 HepG2、SMMC-7721 细胞增殖的抑制率。抑制率 = (OD_{对照} - OD_{加药}) / (OD_{对照} - OD_{空白}) \times 100%。实验重复 3 次,取平均值并用 SPSS 软件计算化合物的半数抑制浓度 IC₅₀ 值。

3 实验结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1** 为白色无定形粉末,UV₂₅₄ 下显暗斑; [α]_D²⁰ -18.6 (c 0.1, CHCl₂), ESI-MS: m/z 277 [M + Na]⁺, 结合 ¹³C NMR 数据给出分子式为 C₁₃H₁₈O₅, 不饱和度为 5。¹H NMR 谱显示有一个 1,3,4-三取代的苯环质子信号 [δ 6.82 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.72 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.65 (1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6')]、两个甲氧基质子信号 [δ 3.82 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.61 (3H, s, 1-OCH₃)]; ¹³C NMR 谱显示该化合物有 13 个碳,其中包含六个芳香碳信号 [δ 148.1 (C-3'), 145.4 (C-4'), 134.4 (C-1'), 121.5 (C-6'), 115.6 (C-5'), 112.7 (C-2')]、两个甲

氧基信号 [δ 56.1 (3'-OCH₃), 51.5 (1-OCH₃)]、一个酯羰基信号 [172.8 (C-1)]; 根据 ¹H-¹H COSY, 可以得到片段 -CH₂-CH(OH)-CH₂-CH₂-; 通过 ¹H-¹H COSY、HSQC 及 HMBC 谱对 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据进行准确的归属: ¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ : 6.82 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.72 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.65 (1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6'), 3.99 (1H, m, H-3), 3.82 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.61 (3H, s, 1-OCH₃), 2.71 (1H, m, H-5b), 2.58 (1H, m, H-5a), 2.49 (1H, dd, J = 4.4, 15.2 Hz, H-2b), 2.40 (1H, dd, J = 8.4, 15.2 Hz, H-2a), 1.73 (2H, m, H-4); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) δ : 172.8 (C-1), 43.0 (C-2), 69.4 (C-3), 40.1 (C-4), 32.1 (C-5), 134.4 (C-1'), 112.7 (C-2'), 148.1 (C-3'), 145.4 (C-4'), 115.6 (C-5'), 121.5 (C-6'), 56.1 (3'-OCH₃), 51.5 (1-OCH₃)。以上波谱数据与文献^[9]报道的基本一致,文献中为了确定化合物 (3*S*)-5-guaiacyl-3-hydroxypentanoic acid 中 3 位碳的绝对构型时对 1 位羧基进行甲酯化,故该化合物鉴定为 (3*S*)-5-guaiacyl-3-hydroxypentanoic methyl ester,为一新的天然产物。

化合物 **2** 为淡黄色无定形粉末,UV₂₅₄ 下显暗斑; ESI-MS: m/z 409 [M + H]⁺, 结合 ¹³C NMR 数据给出分子式为 C₂₂H₁₆O₈, 不饱和度为 15。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.78 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'), 7.48 (1H, dd, J = 2.4, 8.4 Hz, H-6'), 7.10 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3'', H-7''), 6.85 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.63 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-4'', 6''), 6.28 (1H, s, H-6), 4.06 (2H, s, H-1''); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 148.1 (C-2), 137.0 (C-3), 177.5 (C-4), 155.5 (C-5), 98.8 (C-6), 160.3 (C-7), 107.8 (C-8), 163.0 (C-9), 104.5 (C-10), 124.4 (C-1'), 116.2 (C-2'), 146.1 (C-3'), 148.7 (C-4'), 116.3 (C-5'), 121.6 (C-6'), 28.2 (C-1''), 133.2 (C-2''), 130.2 (C-3'', 7''), 116.0 (C-4'', 6''), 156.3 (C-5'')。以上数据与文献^[10]报道一致,故鉴定该化合物为 8-对羟苕基槲皮素。

化合物 **3** 为淡黄色无定形粉末,UV₂₅₄ 下显暗斑; ESI-MS: m/z 393 [M + H]⁺, 结合碳谱数据得到其分子式为 C₂₂H₁₆O₇, 不饱和度为 15。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.93 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 7.06 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3'', H-7''), 6.85 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 5'), 6.64 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-4'',

6''), 6.29 (1H, s, H-6), 4.06 (2H, s, H-1''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 148.1 (C-2), 137.0 (C-3), 177.6 (C-4), 155.7 (C-5), 98.8 (C-6), 160.4 (C-7), 107.6 (C-8), 163.1 (C-9), 104.6 (C-10), 123.9 (C-1'), 130.8 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 160.5 (C-4'), 28.2 (C-1''), 133.1 (C-2''), 130.1 (C-3'', 7''), 116.0 (C-4'', 6''), 156.4 (C-5''). 以上数据与文献^[11]报道一致, 故鉴定该化合物为 8-对羟苜基山奈酚一致。

化合物 4 为淡黄色无定形粉末, UV_{254} 下显暗斑; ESI-MS: m/z 409 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 结合 ^{13}C NMR 数据给出分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_8$, 不饱和度为 15。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.73 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz, H-6'), 7.14 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'', H-7''), 6.87 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.62 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4'', 6''), 6.44 (1H, s, H-8), 3.86 (2H, s, H-1''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 147.7 (C-2), 137.2 (C-3), 177.3 (C-4), 159.3 (C-5), 112.7 (C-6), 160.5 (C-7), 93.7 (C-8), 156.3 (C-9), 104.4 (C-10), 124.3 (C-1'), 116.0 (C-2'), 146.2 (C-3'), 148.7 (C-4'), 116.2 (C-5'), 121.6 (C-6'), 27.8 (C-1''), 133.6 (C-2''), 130.6 (C-3'', 7''), 115.7 (C-4'', 6''), 156.1 (C-5''). 以上数据与文献^[12]报道一致, 故鉴定该化合物为 6-对羟苜基槲皮素。

化合物 5 为淡黄色无定形粉末, UV_{254} 下显暗斑; ESI-MS: m/z 303 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 结合 ^{13}C NMR 数据给出分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, 不饱和度为 11。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.50 (1H, s, 5-OH), 7.69 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 7.55 (1H, dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 146.3 (C-2), 135.2 (C-3), 175.3 (C-4), 155.6 (C-5), 97.7 (C-6), 163.4 (C-7), 92.8 (C-8), 160.2 (C-9), 102.5 (C-10), 121.4 (C-1'), 114.5 (C-2'), 144.5 (C-3'), 147.2 (C-4'), 115.1 (C-5'), 119.4 (C-6')。以上数据与文献^[13]报道一致, 故鉴定该化合物为槲皮素。

化合物 6 为淡黄色无定形粉末, UV_{254} 下显暗斑; ESI-MS: m/z 287 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 结合 ^{13}C NMR 数据给出分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, 不饱和度为 11。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.07 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.37 (1H, s,

H-8), 6.17 (1H, s, H-6); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 148.0 (C-2), 137.1 (C-3), 177.3 (C-4), 162.5 (C-5), 99.3 (C-6), 165.6 (C-7), 94.5 (C-8), 158.2 (C-9), 104.5 (C-10), 123.7 (C-1'), 130.7 (C-2', 6'), 116.3 (C-3', 5'), 160.5 (C-4')。上述数据与文献^[14]对照基本一致, 故鉴定该化合物为山奈酚。

化合物 7 为淡黄色无定形粉末, ESI-MS: m/z 301 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 结合 ^{13}C NMR 数据给出分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$, 不饱和度为 11。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 7.56 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.55 (1H, dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz, H-6'), 6.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.87 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 3.89 (3H, s, 3'- OCH_3); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 163.5 (C-2), 103.1 (C-3), 181.6 (C-4), 161.4 (C-5), 99.0 (C-6), 164.9 (C-7), 94.1 (C-8), 157.4 (C-9), 103.1 (C-10), 120.3 (C-1'), 110.1 (C-2'), 150.9 (C-3'), 148.0 (C-4'), 115.8 (C-5'), 120.3 (C-6'), 55.9 (3'- OCH_3)。上述数据与文献^[15]报道基本一致, 故鉴定该化合物为金圣草黄素。

化合物 8 为淡黄色无定形粉末, UV_{254} 下显暗斑; ESI-MS: m/z 287 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 结合碳谱数据得出分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$, 不饱和度为 10。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 13.12 (1H, s, 1-OH), 7.37 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-6), 7.15 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-5), 6.35 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4), 6.32 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 5.97 (1H, s, 7-OH), 4.03 (3H, s, 8- OCH_3), 3.88 (3H, s, 3- OCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 163.6 (C-1), 97.0 (C-2), 166.5 (C-3), 92.1 (C-4), 157.2 (C-4a), 113.8 (C-5), 122.5 (C-6), 144.3 (C-7), 150.7 (C-8), 114.7 (C-8a), 180.6 (C-9), 104.0 (C-9a), 145.5 (C-10a), 55.8 (3- OCH_3), 62.8 (8- OCH_3)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 故鉴定该化合物为 1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮。

化合物 9 为淡黄色无定形粉末, ESI-MS: m/z 301 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 结合 ^{13}C NMR 数据给出分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$, 不饱和度为 10。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.68 (1H, s, 1-OH), 7.64 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, H-8), 7.17 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.09 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, H-6), 6.46 (1H, s, H-4), 3.93 (3H, s, 5- OCH_3), 3.90 (3H, s, 3- OCH_3), 3.87 (3H, s, 2- OCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 153.8 (C-1), 131.6 (C-2), 159.7 (C-3), 90.7 (C-4), 152.8 (C-

4a), 148.0 (C-5), 115.2 (C-6), 123.3 (C-7), 116.2 (C-8), 120.7 (C-8a), 180.7 (C-9), 103.9 (C-9a), 145.9 (C-10a), 56.1 (2-OCH₃), 56.2 (3-OCH₃), 60.6 (8-OCH₃)。上述数据与文献^[17]报道基本一致,故鉴定该化合物为1-羟基-2,3,5-三甲氧基吡山酮。

化合物 10 为淡黄色无定形粉末,UV₂₅₄下显暗斑;ESI-MS: m/z 331 [M-H]⁻,结合¹³C NMR 数据给出分子式为C₁₇H₁₆O₇,不饱和度为10。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 12.48 (1H, s, 1-OH), 7.63 (1H, dd, J = 1.6, 8.0 Hz, H-7), 7.19 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-7), 7.13 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-5), 4.10 (3H, s, 3-OCH₃), 3.96 (3H, s, 6-OCH₃), 3.94 (3H, s, 2-OCH₃), 3.89 (3H, s, 4-OCH₃);¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 150.2 (C-1), 132.5 (C-2), 153.9 (C-3), 135.2 (C-4), 145.4 (C-4a), 115.7 (C-5), 148.4 (C-6), 116.1 (C-7), 123.4 (C-8), 120.5 (C-8a), 181.3 (C-9), 104.7 (C-9a), 146.0 (C-10a), 61.6 (2-OCH₃), 61.5 (3-OCH₃), 60.9 (4-OCH₃), 56.2 (6-OCH₃)。以上波谱数据与文献^[18]报道基本一致,故鉴定该化合物为1-羟基-2,3,4,6-四甲氧基吡山酮。

化合物 11 为无色油状物,ESI-MS: m/z 287 [M+H]⁺,结合¹³C NMR 数据给出分子式为C₁₆H₁₄O₅,不饱和度为10。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7.62 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 7.61 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.51 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', H-6'), 7.11 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.89 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 5'), 6.87 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.38 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8), 3.90 (3H, s, 3-OCH₃);¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 127.0 (C-1), 111.3 (C-2), 148.7 (C-3), 149.8 (C-4), 116.2 (C-5), 123.8 (C-6), 145.6 (C-7), 115.9 (C-8), 169.0 (C-9), 145.9 (C-1'), 130.9 (C-2', 6'), 116.6 (C-3', 5'), 160.4 (C-4'), 56.3 (3-OCH₃)。以上波谱数据与文献^[19]报道一致,故鉴定该化合物为 *p*-hydroxyphenylferulate。

化合物 12 为无色针状晶体 (CH₃OH), 熔点为 268 ~ 269 °C; UV₂₅₄ 下显亮蓝色荧光; ESI-MS: m/z 177 [M-H]⁻, 结合碳谱数据得出其分子式为 C₉H₆O₄, 不饱和度为 7。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.77 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-4), 6.93 (1H, s, H-5), 6.75 (1H, s, H-8), 6.17 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3);¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 164.3 (C-2), 112.8 (C-

3), 146.0 (C-4), 112.5 (C-4a), 113.0 (C-5), 144.5 (C-6), 152.0 (C-7), 103.6 (C-8), 150.5 (C-8a)。以上波谱数据与文献^[20]报道一致,故鉴定该化合物为 5,7-二羟基香豆素一致。

化合物 13 为淡黄色无定形粉末,UV₂₅₄下显暗斑;ESI-MS: m/z 229 [M-H]⁻,结合¹³C NMR 数据给出分子式为 C₁₄H₁₄O₃, 不饱和度为 8。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.15 (4H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6, 2', 6'), 6.75 (4H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5, 3', 5'), 4.39 (4H, s, H-7, 7');¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 130.3 (C-1, 1'), 130.8 (C-1, 6, 2', 6'), 116.1 (C-3, 5, 3', 5'), 158.3 (C-4, 4'), 72.7 (C-7, 7')。以上波谱数据与文献^[21]报道一致,故鉴定该化合物为 4,4'-二羟基二苜蓿。

化合物 14 为白色无定形粉末,UV₂₅₄下显暗斑;ESI-MS: m/z 167 [M-H]⁻,结合¹³C NMR 数据给出分子式为 C₉H₁₂O₃, 不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.79 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.70 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5), 6.64 (1H, dd, J = 1.8, 7.8 Hz, H-6), 3.83 (3H, s, 3-OCH₃), 3.70 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8), 2.73 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7);¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 131.8 (C-1), 113.7 (C-2), 148.8 (C-3), 145.9 (C-4), 116.1 (C-5), 122.4 (C-6), 39.8 (C-7), 64.5 (C-8), 56.3 (3-OCH₃)。以上波谱数据与文献^[22]报道一致,故鉴定该化合物为 3-甲氧基-4-羟基苯乙醇。

化合物 15 白色无定形粉末,ESI-MS: m/z 153 [M-H]⁻,结合¹³C NMR 数据给出分子式为 C₈H₁₀O₃, 不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.67 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5), 6.64 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.52 (1H, dd, J = 1.8, 7.8 Hz, H-6), 3.67 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8), 2.66 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7);¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 131.8 (C-1), 117.1 (C-2), 146.1 (C-3), 144.6 (C-4), 116.3 (C-5), 121.2 (C-6), 39.8 (C-7), 64.6 (C-8)。以上数据与文献^[23]报道一致,故鉴定该化合物为 3,4-二羟基苯乙醇。

化合物 16 白色针状晶体 (甲醇), 熔点为 92 ~ 94 °C; UV₂₅₄ 下显暗斑; ESI-MS: m/z 137 [M-H]⁻, 结合¹³C NMR 数据给出分子式为 C₈H₁₀O₂, 不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.03 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 6.70 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 3.68 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8), 2.71 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7);¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 131.0 (C-

1), 130.9 (C-2, 6), 116.1 (C-3, 5), 156.8 (C-4), 39.4 (C-7), 64.6 (C-8)。上述数据与文献^[24]报道基本一致, 故鉴定该化合物为对羟基苯乙醇。

化合物 17 为白色无定形粉末, UV₂₅₄ 下显暗斑; ESI-MS: m/z 151 [M-H]⁻, 结合¹³C NMR 数据给出分子式为 C₉H₁₂O₂, 不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.19 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 6.77 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 4.43 (2H, s, H-7), 3.53 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 1.23 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 130.4 (C-1), 115.2 (C-2, 6), 129.6 (C-3, 5), 155.3 (C-4), 72.4 (C-7), 65.5 (C-1'), 15.2 (C-2')。以上波谱数据与文献^[25]报道一致, 故鉴定该化合物为对羟基苯乙基醚。

化合物 18 白色针状晶体 (CH₃OH), 熔点为 114 ~ 120 °C, UV₂₅₄ 下显暗斑; ESI-MS: m/z 123 [M-H]⁻, 结合¹³C NMR 数据给出分子式为 C₇H₈O₂, 不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.16 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 6.75 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 4.48 (2H, s, H-7); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 133.5 (C-1), 116.1 (C-2, 6), 129.8 (C-3, 5), 157.8 (C-4), 65.1 (C-7)。以上数据与文献^[26]报道一致, 故鉴定该化合物为对羟基苯甲醇。

化合物 19 为白色针状晶体 (CH₃OH), 熔点为 139 ~ 141 °C, UV₂₅₄ 下显暗斑; ESI-MS: m/z 125 [M-

H]⁻, 结合¹³C NMR 数据给出分子式为 C₆H₆O₃, 不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.43 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3), 7.40 (1H, dd, $J = 1.8, 7.8$ Hz, H-5), 6.77 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 123.6 (C-1), 145.9 (C-2), 115.6 (C-3, 5), 150.8 (C-4), 117.8 (C-6)。以上波谱数据与文献^[27]报道一致, 故鉴定该化合物为 1,2,4-苯三酚。

化合物 20 为白色片状晶体 (CH₃OH), 熔点为 102 ~ 103 °C, UV₂₅₄ 下显暗斑; ESI-MS: m/z 109 [M-H]⁻, 结合¹³C NMR 数据得到分子式为 C₆H₆O₂, 不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.87 (2H, dd, $J = 1.8, 7.2$ Hz, H-3, 6), 6.80 (2H, dd, $J = 1.8, 7.2$ Hz, H-4, 5); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 163.1 (C-1, 2), 132.9 (C-4, 5), 116.0 (C-3, 6)。以上波谱数据与文献^[28]报道一致, 故鉴定该化合物为邻二苯酚。

3.2 活性测试结果

测试结果 (见表 1) 显示化合物 2、3 对人肝癌 HepG2 具有中等抑制活性, IC₅₀ 值分别为 16.8 和 19.2 $\mu\text{mol/L}$ (阳性对照药顺铂 IC₅₀ 值为 4.8 $\mu\text{mol/L}$); 化合物 11 对人肝癌 SMMC-7721 具有较弱的抑制活性, IC₅₀ 值分别为 24.6 $\mu\text{mol/L}$ (阳性对照药顺铂 IC₅₀ 值为 5.4 $\mu\text{mol/L}$); 其他化合物对人肝癌细胞 HepG2, SMMC-7721 没有明显的抑制作用 (IC₅₀ 值都大于 40 $\mu\text{mol/L}$)。

表 1 化合物 1 ~ 20 的体外抗肿瘤活性

Table 1 *In vitro* antitumor activities of the compounds 1-20

化合物 Compound	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)		化合物 Compound	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	
	HepG2	SMMC-7721		HepG2	SMMC-7721
1	>40	>40	12	>40	>40
2	16.8	>40	13	>40	>40
3	19.2	>40	14	>40	>40
4	>40	>40	15	>40	>40
5	>40	>40	16	>40	>40
6	>40	>40	17	>40	>40
7	>40	>40	18	>40	>40
8	>40	>40	19	>40	>40
9	>40	>40	20	>40	>40
10	>40	>40	顺铂 ^a Cisplatin ^a	4.8	5.4
11	>40	24.6			

注: ^a 阳性对照药物。

Note: ^a positive control.

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, 研究结果表明

该植物中主要含有生物碱类成分 (另文报道), 酚类成分。同时也对所有分离得到的酚类化合物进行了抗人肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 细胞毒活性测

试,结果显示化合物 **2** 和 **3** 对人肝癌 HepG2 具有中等抑制活性,化合物 **11** 对人肝癌 SMMC-7721 具有较弱的抑制活性,而其他酚类化合物对上述两种受试癌细胞没有明显的抑制作用。本研究将为该药材的药效物质基础的阐明、进一步的质量控制及其他药理作用的深入研究具有一定的参考价值。

参考文献

- Li GD, He YC. Yi Medicine Plants (彝医植物药) [M]. Chengdu: Sichuan Ethnic Publishing House, 1990: 45-46.
- Chinese Traditional Chinese Medicine Commission. Chinese Materia Medica: Vol 9 (中华本草: 第9卷) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999: 632.
- Li K, Zhang DJ, Li ZQ, et al. Alkaloids in the *Corydalis* plants and their biological activities: research advances [J]. J Int Pharm Res (国际药学研究杂志), 2018, 45: 748-757.
- Shang WQ, Chen YM, Gao XL, et al. Phytochemical and pharmacological advance on Tibetan medicinal plants of *Corydalis* [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 1190-1198.
- Chen WS, Wang J, Yang ZH, et al. Study on the quality standard of Tibetan medicine *Corydalis impatiens* [J]. Chin Med Herald (中国医药导报), 2019, 16: 116-119.
- Niu XF, Li WF, Xu HB, et al. Simultaneous quantification of 11 isoquinoline alkaloids in *Corydalis impatiens* (Pall.) Fisch by HPLC [J]. J Sep Sci, 2013, 36: 2090-2095.
- Li HL, Pan GQ, You ZL, et al. Studies on analgesic effects of the total alkaloids of Tibetan medicine Saibei *Corydalis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 544-546.
- Li JC, Dong XH, Deng WJ, et al. Studies on the alkaloids from roots of *Corydalis impatiens* [J]. Chin Med Mat (中药材), 2010, 33: 210-213.
- Tian LW, Xu M, Li Y, et al. Phenolic compounds from the branches of *Eucalyptus maiden* [J]. Chem Biodivers, 2012, 9: 123-130.
- He CN, Wang CL, Guo SX, et al. Study on chemical constituents of *Anoectochilus roxburghii* [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2005, 40: 581-583.
- Dai O, Yang L, Zhou QM, et al. Chemical constituents from tubers of *Bletilla striata* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 43-47.
- Zhou Q, Chen L, Yin HJ, et al. Two new flavonols from *Cudrania cochinchinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16: 976-981.
- Han WL, Liu L, Zhang XQ, et al. Chemical constituents from leaves of *Morus multicaulis* [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 695-698.
- Dong L, Chen M, Li M, et al. A new cyanosides from *Rhodiola bupleuroides* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 1383-1386.
- Wang Y, Sun W, Zhang JH, et al. Antibacterial and antioxidant properties of compounds extracted from *Petrosimonia sibirica* L. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 251-254.
- Shen J, Tan GS, Liu JF, et al. Chemical constituents from the roots of *Juglans mandshurica* Maxim [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2008, 6: 354-356.
- Que S, Zhao YY, Zhang QY. Studies on chemical constituents of Tibetan medicine *Caryopteris toroetii* [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2008, 33: 2639-2641.
- Deachathai S, Mahabusarakam W, Phongpaichit S, et al. Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis* [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 464-469.
- Zhang ZZ, Ownby S, Wang P, et al. New phenolic compounds from *Liatris elegans* [J]. Nat Prod Res, 2010, 24: 1079-1085.
- Zhou YF, Wu MZ, Chen HP, et al. Compounds isolated from *Murraya tetramera* Huang and their cytotoxic activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 627-632.
- Zhang WM, Yang L, Li XF, et al. Screening of active compounds from *Gastrodia elata* Blume for vascular smooth muscle relaxation [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2011, 17: 157-160.
- Feng WS, Su FY, Zheng XK, et al. Study on chemical constituents of *Aquilegia yabeana* Kita [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2011, 46: 496-499.
- Yuan X, Zhang L, Zhao JQ, et al. Chemical constituents from *Lagotis breviflora* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 1437-1440.
- Nan ZD, Zhao MB, Jiang Y, et al. Chemical constituents from stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim desert [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 2665-2670.
- Liu MF, Han Y, Xing DM, et al. Chemical constituents from the rhizoma of *Arundina graminifolia* [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2004, 29: 56-58.
- Wang Y, Chen S, Lu RP, et al. Chemical constituents of *Anoectochilus roxburghii* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 2619-2624.
- Zhang YL, Feng ZY, Zheng XK, et al. Chemical constituents from the leaves of *Rehmannia glutinosa* Libosch [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2014, 49: 15-21.
- Lu RM, Pan LW, Wei JH, et al. Chemical constituents of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 2757-2761.