

葫蔓藤根茎总生物碱的化学成分和抗肿瘤活性研究

沈锦煌¹,杨娜娜¹,张艺凡²,郑卫敏¹,马新华¹,钟添华³,张永红^{1*}

¹福建医科大学药学院,福州 350122;²福建医科大学附属第一医院医学影像科,福州 350004;

³自然资源部第三海洋研究所,厦门 361006

摘要:对葫蔓藤根茎总生物碱进行化学成分及肿瘤细胞毒活性研究。采用硅胶柱色谱、MCI-gel、Sephadex LH-20、HPLC 等方法进行分离纯化,从葫蔓藤根茎的总生物碱中分离得到 9 个吲哚类生物碱,通过核磁共振、质谱等波谱分析技术将它们的结构鉴定为钩吻碱甲(1)、钩吻素子(2)、葫蔓藤碱乙(3)、钩吻氯碱(4)、19-(S)-羟基二氢钩吻氯碱(5)、钩吻碱戊(6)、19-(S)-钩吻醇碱(7)、19-(R)-钩吻醇碱(8)、钩吻素己(9)。并对分离得到的化合物通过 MTT 法进行抗肿瘤活性检测,发现化合物 1~3 对肝癌细胞 HepG2 显示了很好的肿瘤细胞毒活性,IC₅₀值分别为 10.02 ± 0.16, 3.98 ± 0.11, 9.87 ± 0.18 μM。

关键词:葫蔓藤;生物碱;化学成分;肿瘤细胞毒活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)10-1675-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.10.006

Study on alkaloid constituents from the roots and stems of *Gelsemium elegans* Benth. and their cytotoxicity

SHEN Jin-huang¹, YANG Na-na¹, ZHANG Yi-fan²,

ZHENG Wei-min¹, MA Xin-hua¹, ZHONG Tian-hua³, ZHANG Yong-hong^{1*}

¹College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China;

²Medical Imaging Department, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China;

³Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361006, China

Abstract: To investigate the alkaloid constituents of *Gelsemium elegans* Benth. and evaluate their cytotoxic, the alkaloid constituents were separated and purified by chromatographic techniques, including column chromatography of silica gel, MCI-gel, Sephadex LH-20 and HPLC. Their structures were mainly elucidated by NMR and MS spectroscopic techniques. Nine indole alkaloids were isolated and purified from the roots and stems of *Gelsemium elegans* Benth., they were identified as gelsemine (1), koumine (2), humanenine (3), gelsevirine (4), 19-(S)-hydroxydihydrogelsevirine (5), koumidine (6), 19-(S)-kouminol (7), 19-(R)-kouminol (8), gelsenicine (9). The antitumor activity of the isolated compounds was detected by MTT assay. Compounds 1-3 exhibited significant cytotoxic activity against HepG2 cancer cells, with IC₅₀ values of 10.02 ± 0.16, 3.98 ± 0.11 and 9.87 ± 0.18 μM respectively.

Key words: *Gelsemium elegans* Benth.; chemical composition; alkaloids; cytotoxic activity

葫蔓藤为马钱科(Loganiaceae)葫蔓藤属(*Gelsemium*)植物的全草。该属植物在全世界一共有三种,分别为葫蔓藤(*Gelsemium elegans* Benth.),主要分布在我国福建、浙江、云南、广西、广东、湖南、贵

州、江西等南部地区及东南亚地区^[1];常绿钩吻(*Gelsemium sempervirens* Ait.)以及沼泽茉莉(*Gelsemium romkimmii* Small.),主要分布于美洲国家^[2]。葫蔓藤又名钩吻、断肠草、大茶药、猪人参等,为常绿木质藤本。全株有大毒,根、茎、枝、叶供药用,有消肿止痛、拔毒杀虫之效;民间有用于肝、胃、宫颈、乳腺、甲状腺等癌症的晚期治疗,有一定的疗效。生物碱是葫蔓藤中的主要化学成分。此外,还含有甾烷、三萜类、香豆素类等化合物。

收稿日期:2021-03-04 接受日期:2021-07-05

基金项目:国家自然科学基金(41806173);自然资源部海洋三所海洋生物遗传资源重点实验室开放课题(HY201807);福建省科技创新平台项目(2018Y2001);福建省自然科学基金(2020J01619)

*通信作者 Tel:86-591-22862016;E-mail:zhangyh@fjmu.edu.cn

近年来研究表明葫蔓藤总生物碱具有抗肿瘤、镇静镇痛、调节免疫功能等作用。有学者报道了吗啡、汉防己、延胡索等六种生物碱镇痛作用强弱的对比研究,发现葫蔓藤总生物碱提高痛阈的作用强度仅次于吗啡^[3]。葫蔓藤乙醇提取物具有对抗环磷酰胺对小鼠的免疫抑制作用^[4]。葫蔓藤总生物碱可显著促进正常小鼠巨噬细胞吞噬功能,对正常小鼠其他免疫功能无明显影响^[4]。研究发现葫蔓藤的毒性主要来自吡啶类生物碱^[5]。葫蔓藤总碱中许多单体化合物疗效高但毒性大,对该植物进行深入研究,为进一步开发利用葫蔓藤植物,寻找具有抗肿瘤、镇静镇痛等活性成分和以其为原料药合成活性更高的化合物具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

实验所用仪器为 Avance II 400 MHz 核磁共振仪 (Bruker Biospin); LCMS-2020 质谱仪 (日本岛津); Waters 半制备高效液相色谱仪 (美国 Waters); 170SX FT-IR 红外光谱仪 (Thermo Nicolet); FD-2 系列冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); BUCHI Ropavapor R-200 旋转蒸发仪 (瑞士 BUCHI 公司); MCI 填料 (日本三菱化学株式会社); Sephadex LH-20 (瑞典 GE Healthcare); 柱色谱和薄层色谱硅胶均为青岛海洋化工厂产品; 96 孔细胞培养板 (美国 Lab serv); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 超净工作台 (上海整新 SZX-7P); 5% CO₂ 及饱和湿度孵育箱 (美国 Thermo Forma 公司); 台式高速离心机 (美国 Beckman 公司); 酶标仪 (美国 Thermo 公司 Multiskan FC 型)。

实验所用氘代试剂为 CDCl₃、CD₃OD (美国 Sigma 公司); 其他试剂均为分析纯; RPMI 1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 噻唑蓝 (MTT) (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); DMSO、链霉素、青霉素 (武汉塞维尔生物科技有限公司); 胰蛋白酶 (武汉塞维尔生物科技有限公司); 小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3)、人肝癌细胞 (HepG2)、人慢性髓系白血病细胞 (K562)、人肺癌细胞 (A549) (中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所)。

1.2 材料

实验使用的葫蔓藤根茎于 2014 年 10 月采摘于福州市台江区,由福建医科大学天然药物学系张永红教授鉴定为葫蔓藤 (*Gelsemium elegans* Benth.), 标本 (No. zyh20141002) 存放于福建医科大学药学

院天然药物化学教研室。

1.3 提取与分离

取干燥的葫蔓藤根茎 5 kg, 粉碎, 置于容量为 20 L 的下口瓶中。甲醇室温浸泡一周后, 回收溶剂得醇提浸膏, 用同样方法再提取 2 次, 合并醇提浸膏。用 2% HCl 溶解浸膏, 抽滤, 得滤液。滤液先用 300 mL 氯仿萃取, 除去脂溶性杂质, 加 5 mol/L NaOH 碱化调 pH > 11 得到红棕色沉淀^[6]。然后分别用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇各萃取 3 次, 合并萃取液, 回收溶剂, 分别得到氯仿萃取物 (45.1 g)、乙酸乙酯萃取物 (323.5 g)、和正丁醇萃取物 (77.6 g)。将氯仿萃取物和乙酸乙酯萃取物合并, 用等量的硅胶 (100 ~ 200 目) 拌样, 湿法装柱, 干法上样, 洗脱剂为二氯甲烷-甲醇 (1:0 ~ 0:1) 梯度洗脱, 每 500 mL 为一馏分, 回收溶剂合并得到 6 个馏分, Fr. 1 ~ Fr. 6。Fr. 1 (67.2 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (CH₂Cl₂: CH₃OH = 1:1) 洗脱, 再经半制备高效液相色谱 (C₁₈ 柱, 甲醇: 水 = 65:35) 分离纯化得到化合物 **1** (25.0 mg)、**2** (23.0 mg)、**3** (10.0 mg)、**6** (12.0 mg)。Fr. 3 (56.1 g) 经 Sephadex LH-20 柱 (CH₂Cl₂: CH₃OH = 1:1) 洗脱, 再经半制备高效液相色谱 (C₁₈ 柱, 甲醇: 水 = 55:45) 分离纯化得到化合物 **9** (9.0 mg)。Fr. 4 (87.6 g) 经 Sephadex LH-20 柱 (CH₂Cl₂: CH₃OH = 1:1) 洗脱, 再经半制备高效液相色谱 (C₁₈ 柱, 甲醇: 水 = 45:55) 分离纯化得到化合物 **4** (5.0 mg)、**5** (50 mg)、**7** (10.0 mg)、**8** (15.0 mg)。

1.4 抗肿瘤活性筛选

采用 MTT 法^[7]测定部分单体化合物对人肝癌细胞 (HepG2)、人肺癌细胞 (A549)、人慢性髓系白血病细胞 (K562)、小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3) 的体外抗肿瘤活性。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配成单个细胞悬液, 以约 3 × 10⁴ ~ 6 × 10⁴ 个/mL, 接种于 96 孔培养板上, 每孔体积 100 μL, 每个浓度设定 3 个复孔, 重复进行两次平行实验, 过夜培养使其贴壁。取适量预先用二甲基亚砷配制的 50 mg/mL 药物, 用培养基配置成浓度 160、80、40、20、10、5、2.5、1.25 μM 的溶液, 吸取 96 孔板中原培养液, 加入上述不同浓度的药物溶液, 每孔 100 μL, 在 37 °C 条件下培养 48 h 后, 加入 20 μL MTT 溶液 (用 PBS 配制, pH = 7.4), 继续培养 4 h, 通过离心, 弃去上清, 随后每孔加入二甲基亚砷 150 μL, 震荡 10 min, 用酶标仪 (BIO-RAD) 于 490 nm 处测量各孔的 OD (吸光度) 值, 各组取平均值, 根据平

均值计算抑制率, 用 SPSS12.0 进行统计学分析, 并计算 IC_{50} (半数抑制浓度) 值。

$$\text{抑制率} = (\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{给药}}) / \text{OD}_{\text{空白}} \times 100\%$$

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 无色针状结晶(甲醇); 化学式为 $C_{20}H_{22}N_2O_2$, ESI-MS: m/z 323.3 $[M + H]^+$ 。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.34 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9), 7.18 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-11), 6.96 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-10), 6.23 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-12), 6.21 (1H, dd, $J = 10.7, 15.5$ Hz, H-19), 5.02 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-18b), 4.93 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-18a), 3.95 (1H, dd, $J = 2.0, 10.7$ Hz, H-17b), 3.93 (1H, dd, $J = 2.0, 10.7$ Hz, H-17a), 3.69 (1H,

s, H-3), 3.58 (1H, s, H-5), 2.80 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-21b), 2.74 (1H, dd, $J = 2.5, 14.1$ Hz, H-14b), 2.46 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-21a), 2.36 (1H, br d, $J = 8.5$ Hz, H-16), 2.31 (1H, m, H-15), 2.25 (3H, s, *N*-Me), 1.98 (1H, m, H-14a), 1.97 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 180.6 (C-2), 70.9 (C-3), 73.2 (C-5), 52.0 (C-6), 55.5 (C-7), 133.1 (C-8), 129.2 (C-9), 122.6 (C-10), 129.5 (C-11), 110.4 (C-12), 142.6 (C-13), 23.7 (C-14), 37.0 (C-15), 38.9 (C-16), 62.2 (C-17), 113.0 (C-18), 139.7 (C-19), 55.0 (C-20), 66.5 (C-21), 40.4 (*N*-Me)。以上数据与文献^[8]报道基本一致, 故鉴定该化合物为钩吻碱甲(结构见图1)。

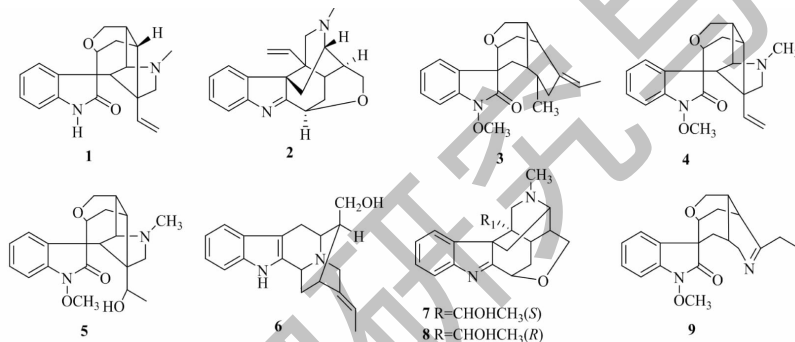


图1 化合物1~9的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-9

化合物 2 无色柱状结晶(氯仿); 化学式为 $C_{20}H_{22}N_2O$, ESI-MS: m/z 307.6 $[M + H]^+$ 。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.61 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-12), 7.54 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9), 7.36 (1H, t, $J = 5.2$ Hz, H-11), 7.25 (1H, t, $J = 5.2$ Hz, H-10), 5.01 (1H, s, H-3), 4.84 (1H, dd, $J = 1.2, 10.7$ Hz, H-18 β), 4.79 (1H, dd, $J = 1.2, 12.0$ Hz, H-18 α), 4.68 (1H, dd, $J = 6.1, 8.1$ Hz, H-19), 4.26 (1H, dd, $J = 1.4, 11.0$ Hz, H-17 β), 3.60 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-17 α), 3.16 (1H, s, H-21 β), 3.07 (1H, s, H-21 α), 2.80 (1H, m, H-16), 2.78 (1H, m, H-5), 2.62 (3H, s, *N*-Me), 2.61 (1H, m, H-14 β), 2.41 (1H, m, H-6 α), 2.36 (1H, m, H-6 β), 2.32 (1H, m, H-15), 1.89 (1H, dt, 2.1, 12.1 Hz, H-14 α); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 185.4 (C-2), 70.9 (C-3), 56.8 (C-5), 28.5 (C-6), 57.9 (C-7), 143.6 (C-8), 122.9 (C-9), 125.9 (C-10), 128.1 (C-11), 120.9 (C-12), 154.8 (C-13), 25.2 (C-14), 33.0 (C-15), 38.7 (C-16), 61.3 (C-

17), 115.7 (C-18), 137.2 (C-19), 45.2 (C-20), 57.7 (C-21), 42.6 (*N*-Me)。以上数据与文献^[9]报道基本一致, 故鉴定该化合物为钩吻素子。

化合物 3 淡黄色块状结晶(甲醇); 化学式为 $C_{21}H_{26}N_2O_3$, ESI-MS: m/z 355.4 $[M + H]^+$ 。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.48 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-9), 7.34 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, H-11), 7.15 (1H, t, $J = 5.2$ Hz, H-10), 7.06 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-12), 5.47 (1H, q, $J = 4.4$ Hz, H-19), 4.24 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-17a), 4.04 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-17b), 3.98 (3H, s, *N*-OMe), 3.56 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-3), 3.47 (2H, m, H-21), 3.38 (1H, m, H-5), 2.62 (1H, m, H-15), 2.47 (1H, dd, $J = 5.2, 16.0$ Hz, H-6b), 2.36 (3H, s, *N*-Me), 2.30 (1H, m, H-16), 2.29 (2H, m, H-14), 1.74 (1H, dd, $J = 5.6, 15.3$ Hz, H-6a), 1.68 (3H, d, $J = 4.4$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 176.1 (C-2), 73.6 (C-3), 62.7 (C-5), 29.2 (C-6), 56.7 (C-7), 130.4 (C-8), 127.4 (C-

9), 124.4 (C-10), 129.4 (C-11), 108.5 (C-12), 139.9 (C-13), 26.9 (C-14), 35.7 (C-15), 38.6 (C-16), 67.5 (C-17), 12.9 (C-18), 121.2 (C-19), 138.2 (C-20), 46.4 (C-21), 42.6 (*N*-Me), 64.0 (*N*-OMe)。以上数据与文献^[10]报道基本一致,故鉴定该化合物为葫蔓藤碱乙。

化合物 4 淡黄色固体(甲醇);化学式为 $C_{21}H_{24}N_2O_3$, ESI-MS: m/z 353.7 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.55 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-9), 7.34 (1H, m, H-11), 7.09 (1H, m, H-10), 7.04 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-12), 6.20 (1H, dd, $J = 5.1, 10.7$ Hz, H-19), 5.08 (1H, dd, $J = 5.1, 12.0$ Hz, H-18 α), 5.00 (1H, dd, $J = 5.1, 12.0$ Hz, H-18 β), 4.08 (1H, m, H-17 α), 3.96 (3H, s, *N*-OMe), 3.91 (1H, m, H-17 β), 3.71 (1H, m, H-3), 3.52 (1H, s, H-5), 2.82 (1H, dd, $J = 2.5, 14.2$ Hz, H-14 α), 2.77 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-21 α), 2.46 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-16), 2.36 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-21 β), 2.33 (1H, m, H-15), 2.25 (3H, s, *N*-Me), 2.04 (1H, m, H-14 β), 1.95 (1H, s, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 173.2 (C-2), 69.3 (C-3), 71.9 (C-5), 50.8 (C-6), 52.2 (C-7), 128.0 (C-8), 128.2 (C-9), 122.6 (C-10), 127.8 (C-11), 107.0 (C-12), 139.3 (C-13), 35.6 (C-14), 22.5 (C-15), 37.5 (C-16), 62.5 (C-17), 112.4 (C-18), 137.9 (C-19), 53.7 (C-20), 65.2 (C-21), 38.9 (*N*-Me), 60.7 (*N*-OMe)。以上数据与文献^[11]报道基本一致,故鉴定该化合物为钩吻绿碱。

化合物 5 白色粉末(氯仿);化学式为 $C_{21}H_{26}N_2O_4$, ESI-MS: m/z 371.4 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.31 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-9), 7.04 (1H, dt, $J = 3.9, 0.8$ Hz, H-11), 6.97 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-12), 6.95 (1H, dt, $J = 0.8, 7.8$ Hz, H-10), 5.50 (1H, q, $J = 7.5$ Hz, H-19), 4.15 (1H, dd, $J = 1.8, 10.6$ Hz, H-17 α), 3.97 (3H, s, *N*-OMe), 3.80 (1H, s, H-3), 3.46 (1H, s, H-5), 3.12 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-21 α), 2.61 (1H, dd, $J = 2.6, 9.0$ Hz, H-14 α), 2.45 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-21 β), 2.36 (1H, m, H-16), 2.24 (3H, s, *N*-Me), 2.05 (1H, dd, $J = 2.6, 9.0$ Hz, H-14 β), 2.01 (1H, m, H-15), 2.02 (1H, dd, $J = 2.0, 11$ Hz, H-17 β), 1.86 (1H, s, H-6), 1.17 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 174.0 (C-2), 69.2 (C-3), 71.8 (C-

5), 50.1 (C-6), 52.3 (C-7), 127.9 (C-8), 128.2 (C-9), 123.1 (C-10), 128.4 (C-11), 107.4 (C-12), 139.2 (C-13), 22.3 (C-14), 35.6 (C-15), 39.2 (C-16), 61.6 (C-17), 19.4 (C-18), 64.8 (C-19), 56.5 (C-20), 58.9 (C-21), 39.2 (*N*-Me), 63.4 (*N*-OMe)。以上数据与文献^[12]报道基本一致,故鉴定该化合物为 19-(*S*)-羟基二氢钩吻绿碱。

化合物 6 无色片晶(甲醇);化学式为 $C_{19}H_{22}N_2O$, ESI-MS: m/z 295.4 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.41 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 7.28 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-12), 7.04 (1H, m, H-11), 6.98 (1H, m, H-10), 5.40 (1H, q, $J = 6.1$ Hz, H-19), 4.23 (1H, dd, $J = 2.1, 9.7$ Hz, H-3), 3.73 (2H, m, H-21), 3.63 (1H, m, H-5), 3.50 (1H, dd, $J = 4.1, 12.7$ Hz, H-17 β), 3.49 (1H, m, H-6 β), 3.30 (1H, m, H-6 α), 3.24 (1H, dd, $J = 5.2, 15.2$ Hz, H-17 α), 2.71 (1H, m, H-15), 2.27 (1H, m, H-16), 2.17 (1H, dd, $J = 5.8, 12.0$ Hz, H-14 β), 1.88 (1H, dd, $J = 6.8, 12.1$ Hz, H-14 α), 1.64 (3H, d, $J = 10.8$ Hz, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 138.7 (C-2), 49.3 (C-3), 54.0 (C-5), 23.1 (C-6), 105.8 (C-7), 127.4 (C-8), 118.6 (C-9), 118.8 (C-10), 119.9 (C-11), 112.0 (C-12), 137.5 (C-13), 29.1 (C-14), 34.9 (C-15), 43.9 (C-16), 61.1 (C-17), 12.6 (C-18), 115.9 (C-19), 140.9 (C-20), 54.5 (C-21)。以上数据与文献^[13]报道基本一致,故鉴定该化合物为钩吻碱戊。

化合物 7 淡黄色粉末(甲醇);化学式为 $C_{20}H_{24}N_2O_2$, ESI-MS: m/z 325.6 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.71 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-9), 7.54 (1H, m, H-12), 7.39 (1H, m, H-11), 7.31 (1H, m, H-10), 4.90 (1H, q, $J = 5.1$ Hz, H-19), 4.30 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-21 α), 3.64 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-21 β), 3.62 (1H, m, H-17 β), 3.62 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 3.59 (1H, m, H-17 α), 2.98 (1H, m, H-6 β), 2.96 (1H, m, H-6 α), 2.95 (1H, m, H-14 β), 2.83 (1H, m, H-14 α), 2.71 (1H, m, H-16), 2.71 (3H, s, *N*-Me), 2.25 (1H, m, H-15), 0.67 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 187.7 (C-2), 70.5 (C-3), 56.5 (C-5), 30.5 (C-6), 57.0 (C-7), 143.9 (C-8), 123.8 (C-9), 125.9 (C-10), 127.8 (C-11), 120.2 (C-12), 153.6 (C-13), 23.6 (C-14), 37.8 (C-15), 27.4 (C-16), 60.6 (C-

17), 18.5 (C-18), 66.1 (C-19), 47.3 (C-20), 53.2 (C-21), 41.4 (N-Me)。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 故鉴定该化合物为 19-(S)-钩吻醇碱。

化合物 8 淡黄色粉末 (甲醇); 化学式为 $C_{20}H_{24}N_2O_2$, ESI-MS: m/z 325.2 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.68 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-9), 7.43 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-12), 7.20 (1H, m, H-11), 7.02 (1H, m, H-10), 5.13 (1H, q, $J = 5.5$ Hz, H-19), 4.22 (1H, m, H-17 β), 4.15 (1H, m, H-17 α), 3.93 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 3.64 (1H, m, H-21 β), 3.52 (1H, m, H-21 α), 3.17 (1H, m, H-6 β), 3.00 (1H, m, H-6 α), 2.50 (3H, s, N-Me), 2.46 (1H, m, H-16), 2.42 (1H, m, H-15), 2.31 (1H, m, H-14 β), 2.29 (1H, m, H-14 α), 0.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 185.7 (C-2), 70.8 (C-3), 56.7 (C-5), 28.0 (C-6), 58.7 (C-7), 143.5 (C-8), 123.6 (C-9), 126.3 (C-10), 129.0 (C-11), 122.1 (C-12), 154.7 (C-13), 24.5 (C-14), 39.7 (C-15), 29.0 (C-16), 61.2 (C-17), 16.2 (C-18), 67.2 (C-19), 47.9 (C-20), 56.7 (C-21), 42.6 (N-Me)。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 故鉴定该化合物为 19-(R)-钩吻醇碱。

化合物 9 淡黄色粉末 (甲醇); 化学式为 $C_{19}H_{22}N_2O_3$, ESI-MS: m/z 327.8 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.54 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-9), 7.28 (1H, m, H-11), 7.06 (1H, m, H-10), 6.94 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-12), 4.31 (1H, m, H-3), 4.24

(2H, m, H-17), 3.65 (1H, m, H-5), 3.30 (3H, s, N-OMe), 2.97 (1H, m, H-19 α), 2.59 (1H, m, H-19 β), 2.58 (1H, m, H-16), 2.45 (1H, m, H-15), 2.31 (1H, m, H-6 α), 2.30 (1H, m, H-14 β), 2.29 (1H, m, H-14 α), 2.26 (1H, d, m, H-6 β), 1.23 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 173.0 (C-2), 73.3 (C-3), 76.2 (C-5), 38.6 (C-6), 57.4 (C-7), 133.5 (C-8), 125.9 (C-9), 124.6 (C-10), 129.3 (C-11), 107.8 (C-12), 139.1 (C-13), 27.9 (C-14), 40.9 (C-15), 43.6 (C-16), 62.6 (C-17), 10.2 (C-18), 25.6 (C-19), 187.5 (C-20), 63.9 (N-OMe)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 故鉴定该化合物为钩吻素己。

2.2 体外肿瘤细胞毒活性筛选

以 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) 为阳性药, 对葫蔓藤根茎总生物碱分离得到的化合物 **1**~**9**, 共 9 个化合物进行了对人肝癌细胞 (HepG2)、人肺癌细胞 (A549)、人慢性髓系白血病细胞 (K562)、小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3) 的体外抗肿瘤活性。实验结果见表 1, 化合物 **1**~**4** 和 **6**, 对人肝癌细胞株 HepG2 显示了很好的肿瘤细胞毒抑制活性, 而化合物 **1**~**9** 对人肺癌细胞 (A549)、人慢性髓系白血病细胞 (K562)、小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3) 的肿瘤抑制活性较差。其中化合物 **2** (钩吻素子) 对 HepG2 的活性最好, IC₅₀ 值达到了 $3.98 \pm 0.11 \mu\text{M}$, 化合物 **1** 和 **3** 对 HepG2 的 IC₅₀ 值分别为 10.02 ± 0.16 和 $9.87 \pm 0.18 \mu\text{M}$ 。

表 1 化合物对 HepG2、A549、K562 和 NIH3T3 细胞株的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Cytotoxicity of compounds on HepG2, A549, K562 and NIH3T3 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

化合物 Compound	IC ₅₀ (μM)			
	HepG2	A549	K562	NIH3T3
1	10.02 \pm 0.16	>200	>200	>200
2	3.98 \pm 0.11	>200	>200	>200
3	9.87 \pm 0.18	>200	>200	>200
4	27.72 \pm 0.35	>200	>200	>200
5	124.52 \pm 5.75	>200	>200	>200
6	35.18 \pm 0.63	>200	>200	>200
7	165.52 \pm 6.79	>200	>200	>200
8	151.48 \pm 9.27	>200	>200	>200
9	>200	>200	>200	>200
5-氟尿嘧啶 5-Fluorouracil	81.38 \pm 9.97	80.53 \pm 8.76	45.4 \pm 6.94	143.52 \pm 14.62

3 结论

本研究采用硅胶柱色谱、MCI-gel、Sephadex LH-20、HPLC 等方法对胡蔓藤根茎的总生物碱进行分离纯化,共分离得到9个吲哚类生物碱,分别为钩吻碱甲、钩吻素子、胡蔓藤碱乙、钩吻氯碱、19-(S)-羟基二氢钩吻氯碱、钩吻碱戊、19-(S)-钩吻醇碱、19-(R)-钩吻醇碱和钩吻素己。并对这9个吲哚类生物碱进行体外抗肿瘤活性测试,结果显示胡蔓藤生物碱对人肝癌细胞 HepG2 的抗肿瘤活性最好,而对 A549、K562 和 NIH3T3 的抑制作用较弱,钩吻碱甲、钩吻素子和胡蔓藤碱己对 HepG2 的 IC_{50} 值分别为 10.02 ± 0.16 、 3.98 ± 0.11 和 $9.87 \pm 0.18 \mu\text{M}$ 。其中钩吻素子对人肝癌细胞 HepG2 具有良好的细胞毒活性,具有一定的抗肿瘤药物开发潜力。本研究通过对胡蔓藤根茎总生物碱的化学成分和抗肿瘤活性的研究,进一步明确胡蔓藤的抗肿瘤活性的药效学基础,为胡蔓藤生物碱开发成为高效低毒的抗肿瘤药物提供一定的理论依据。

参考文献

- Xu HR, Liao HJ, Wang HJ, et al. The research advances of *Gelsemium elegans* Benth [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2016, 25(10): 37-38.
- Zhao YT, Wu SP, Hu CL, et al. Reviews on chemical compositions and pharmacological effect of *Gelsemium elegans* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学), 2019, 25(3): 200-210.
- Shao JB, Wang QX, Shi N, et al. Studies on acute toxicity and analgesic effects of total alkaloids of *Corydalis Rhizoma* [J]. J Zhejiang Chin Med Univ (浙江中医药大学学报), 2019, 43: 1156-1161.
- Wang Y, Li YW, Sun ZL, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Gelsemium elegans* Benth [J]. J Tradit Chin Vet Med (中兽医医药杂志), 2016, 35(6): 27-29.
- Sun MX, Xu QQ, Meng WQ, et al. The advances in pharmacological and toxicological mechanisms of *Gelsemium elegans* Benth [J]. J Toxicol (毒理学杂志), 2020, 34(4): 66-71.
- Sun MX, Cui Y, Li Y, et al. Indole alkaloids from *Gelsemium elegans* [J]. Phytochemistry, 2019, 162: 232-240.
- He H, Qian XY, Jin MF, et al. Polyphyllin VII inhibited the proliferation and migration of lung cancer H460 cells [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 433-439.
- Lin L, Liu YC, Liu ZY. The difference in cytotoxic activity between two optical isomers of gelsemine from *Gelsemium elegans* Benth. on PC12 cells [J]. Molecules, 2019, 24(10): 2004.
- Wang L, Sun L, Liu HY, et al. Chemical constituents of *Gelsemium elegans* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48: 2028-2032.
- Li NP, Liu JS, Liu JW, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from the fruits of *Gelsemium elegans* and their anti-inflammatory activities [J]. Bioorg Chem, 2021, 107: 104624.
- Sun MX, Y C, Y L, et al. Indole alkaloids from *Gelsemium elegans* [J]. Phytochemistry, 2019, 162: 232-240.
- Wei Z, Xu W, Wang GY, et al. Gelsekoumidines A and B: two pairs of atropisomeric bisindole alkaloids from the roots of *Gelsemium elegans* [J]. Org Lett, 2017, 19(19): 5194.
- Xu YK, Lin Y, Liao SG, et al. Koumine, humantenine, and yohimbane alkaloids from *Gelsemium elegans* [J]. J Nat Prod, 2015, 78(7): 1511.
- Sun F, Xing QY, Liang XT. Structures of (19R)-kouminol and (19S)-kouminol from *Gelsemium elegans* [J]. J Nat Prod, 1989, 52: 1180-1182.
- Li NP, Liu M, Huang XJ, et al. Gelsecorydines A-E, five gelsedine-corynanthe-type bisindole alkaloids from the fruits of *Gelsemium elegans* [J]. J Org Chem, 2018, 83: 5707-5714.