

民族药四数九里香的化学成分及其细胞毒活性研究(Ⅲ)

周永福^{1,2,3*}, 姚如杰¹, 黎学明², 杨成威¹¹重庆紫光化工股份有限公司, 重庆 401121; ²重庆大学化学化工学院, 重庆 400044; ³重庆工业职业技术学院, 重庆 401120

摘要:阐释民族药四数九里香 *Murraya tetramera* Huang 的药效物质基础。本文采用现代色谱分离技术从其醇提取物的乙酸乙酯萃取部位中分离和纯化得 15 个化合物, 采用核磁共振波谱技术和文献数据比对方法鉴定了化合物结构, 分别为 luteolin-7-*O*-glucoside (**1**)、3,4-dihydroxy benzeneacrylic acid (**2**)、2-hydroxycinnamic acid (**3**)、3,8-dihydroxy-4-methoxy-coumarin (**4**)、2-methyl-6-hydroxychromone (**5**)、chlorogenic acid (**6**)、methyl caffeate (**7**)、furo[3,2- α] carbazole (**8**)、(*E*)-2-(4-hydroxyphenyl) diazenyl phenol (**9**)、*N*-(2,6-dimethylphenyl)-*N'*-(4'-nitrophenyl) urea (**10**)、九里香碱 (**11**)、phorbazole C (**12**)、3-羟苯基喹唑啉酮 (**13**)、*N*-反式阿魏酰基-3-甲基多巴胺 (**14**)、6-丙酮基-5,6-二氢血根碱 (**15**)。15 个化合物均为首次从该植物中分离到; 采用 MTS 法分析了 15 个化合物的体外抑制肿瘤细胞增殖作用, 结果表明 15 个化合物对 5 株肿瘤细胞的体外生长具有不同程度的抑制作用, 其中化合物 **1, 8 ~ 15** 对人肿瘤细胞株 HL-60、A-549、SMMC-7721、SW-480、MCF-7 具有较好的抑制增殖作用。

关键词:民族药; 四数九里香; 化学成分; 抑制细胞增殖作用

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)4-0622-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.4.009

Compounds from *Murraya tetramera* Huang and their cytotoxic activity (Ⅲ)ZHOU Yong-fu^{1,2,3*}, YAO Ru-jie¹, LI Xue-ming², YANG Cheng-wei¹¹Chongqing Zi-Guang Chemical Co., Ltd., Chongqing 401121, China; ²College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; ³Chongqing Industry Polytechnic College, Chongqing 401120, China

Abstract: In order to study the pharmacodynamic material basis of the *Murraya tetramera* Huang; in this paper, fifteen compounds were isolated and purified from the ethyl acetate extract of its alcohol extract by modern chromatographic separation technology. And Identified the structure of the compounds by NMR spectroscopy, which were luteolin-7-*O*-glucoside (**1**), 3,4-dihydroxy benzeneacrylic acid (**2**), 2-hydroxycinnamic acid (**3**), 3,8-dihydroxy-4-methoxy-coumarin (**4**), 2-methyl-6-hydroxychromone (**5**), chlorogenic acid (**6**), methyl caffeate (**7**), furo[3,2- α] carbazole (**8**), (*E*)-2-(4-hydroxyphenyl) diazenyl phenol (**9**), *N*-(2,6-dimethylphenyl)-*N'*-(4'-nitrophenyl) urea (**10**), murrayanine (**11**), phorbazole C (**12**), 3-(2'-hydroxyphenyl)-4(3*H*)-quinazolidone (**13**), *N*-trans-feruloyl-3-methyldopamine (**14**), 6-acetone-5,6-dihydrosanguinarine (**15**). All compounds are isolated from this plant for the first time. The tumor inhibitory and proliferation effects of 15 compounds were analyzed by the MTS method. The inhibitive effects of the compounds on the growth of five tumor cells in vitro were studied. Especially, the compound **1, 8-15** have good growth inhibitory effect on human tumor cell lines HL-60, A-549, SMMC-7721, SW-480 and MCF-7.

Key words: national folk medicine; *Murraya tetramera* Huang; chemical constituents; inhibition cell proliferation

九里香属植物全球有 14 个种和 2 个变种, 其中我国有 9 个种和 1 个变种^[1]。九里香属植物药用记载始于《岭南采药录》, 目前,《中国药典》(2020 版) 收录九里香 (*Murraya paniculata* (L.) Jack) 和小叶

九里香 (*Murraya paniculata* (L.) var. *exotica* (L.) Huang) 两个种。现代药理研究表明, 九里香属植物药具有增强机体免疫力功能^[2]、抗菌消炎和麻醉^[3]、降血糖^[4]、行气止痛、活血化瘀之功效^[5]; 民间用于治疗胃痛、风湿痹痛、外治牙痛、跌扑肿痛、虫蛇咬伤^[6,7]; 现代药物化学研究表明, 其主要含有喹唑啉生物碱、黄酮类、香豆素类等^[8,9] 化学成分。

四数九里香 (*Murraya tetramera* Huang) 作为九

收稿日期: 2022-08-22

接受日期: 2022-11-02

基金项目: 重庆紫光化工股份有限公司博士后项目 (KQY20220530)

* 通信作者 E-mail: zhouyongful@126.com

里香属植物的一个种,主要分布于我国的广东、海南、广西、云南,生长在伴有石灰岩的山坡上。在云南少数民族地区(彝族、黎族、苗族、回族、壮族、傣族),民间以其干燥叶入药。四数九里香药用记载始见于《文山中草药》,后作为民族药收载于《云南省中药材标准》(2005年版)(第一册·彝族药)。在《全国中草药汇编》(1978年,下册)中记载“芸香科九里香属植物千只眼 *Murraya tetramera* Huang,以叶和根入药,夏秋采叶,秋季采根,洗净切段,均可鲜用或阴干备用”;“性辛、温,归肺、肝经”。四数九里香具有祛风解表,行气止痛,活血散瘀的功效^[10,11]。课题组调研发现有将四数九里香干燥叶的醇提物和精油制成注射剂,用于治疗肺癌^[12],然而、关于四数九里香抑制肿瘤细胞增殖作用药效物质基础的相关研究较少^[13]。为此,本实验以95%乙醇为提取溶剂、采用冷浸渍法对采自于云南的四数九里香进行提取、过滤、浓缩、制得浸膏;把浸膏用温水溶解,按溶剂极性大小依次进行萃取,利用传统柱层析法对乙酸乙酯萃取部位进行分离和纯化;采用现代波谱技术及文献数据比对鉴定化合物的结构;并以5株肿瘤细胞(人白血病肿瘤细胞株 HL-60、人肺腺癌细胞株 A-549、人肝癌细胞株 SMMC-7721、人结肠癌细胞株 SW-480、人乳腺癌细胞株 MCF-7)为模型,研究了各化学成分对5株肿瘤细胞的抑制增殖作用,该研究结果丰富了四数九里香化学成分研究内容,也为进一步揭示民族药四数九里香药效作用提供了物质基础和数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

核磁共振仪(TMS为内标、瑞士 Bruker 公司、400 MHz 型);柱色谱用硅胶 GF₂₅₄(200~300目、青岛海洋化工公司);葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20, ODS2A(50 μm,日本 YMC/维美希公司);二氧化碳培养箱(济南鑫贝西生物技术有限公司);多功能酶标分析仪(MULTISKAN FC)。实验用四数九里香于2016年2月采自云南省华宁县,经成都中医药大学陈新教授鉴定为芸香科九里香属四数九里香 *Murraya tetramera* Huang 的叶,植物标本(标本编号:20160122001)保存于重庆工业职业技术学院中医药物研究所;5株肿瘤细胞购自于中国科学院昆明植物所细胞库。

1.2 实验方法

1.2.1 化学成分的提取

四数九里香叶 35 kg,自然晾干,粉碎,用95%的乙醇溶液提取,过滤、浓缩提取液、合并得黑色浸膏 2.8 kg,温水溶解,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取得到石油醚萃取部分 200 g、乙酸乙酯萃取部分 680 g、正丁醇萃取部分 460 g。

1.2.2 化学成分的分离

将乙酸乙酯萃取部分上硅胶色谱柱,以石油醚-乙酸乙酯为流动相进行梯度洗脱,经 TLC 薄层层析鉴别后,合并得 39 个组分 A1~A39。A15(45 g)经过乙酸乙酯溶解,以 1:30(质量比)的比例上正相硅胶柱,经二氯甲烷-乙酸乙酯为流动相进行洗脱,经 TLC 检测后合并得 8 个组分 Fr. A15-1~A15-8。Fr. A15-8(5.3 g)上正相硅胶(300~400目)柱,合并相同组分,得到 Fr. A15-8-1~A15-8-8;Fr. A15-8-8 经葡聚糖凝胶柱(150 cm × 3.0 cm)纯化、得化合物 **1**(15.0 mg)和 **5**(14.9 mg);Fr. A15-8-7 经正相硅胶(300~400目)柱多次分离、凝胶柱(150 cm × 3.0 cm)色谱继续纯化、得化合物 **3**(11.1 mg)和 **4**(20.1 mg);Fr. A15-8-6 经正相硅胶(300~400目)柱多次分离、葡聚糖凝胶柱(150 cm × 3.0 cm)纯化、得化合物 **2**(13.1 mg)、**6**(22.0 mg)和 **7**(18.0 mg)。Fr. A15-1(15.0 g)上正相硅胶(300~400目)柱(60 cm × 5.0 cm),合并相同组分,得到 Fr. A15-1-1~A15-1-5;Fr. A15-1-1 经正相硅胶(300 × 400目)柱分离得化合物 **8**(13.8 mg)和 **9**(21.0 mg);Fr. A15-1-2 经正相硅胶(300 × 400目)柱分离、Sephadex LH-20 凝胶柱(150 cm × 3.0 cm)纯化得化合物制 **15**(8.9 mg)和 **14**(20.1 mg)。Fr. A15-2(5.0 g)经正相硅胶(300~400目)柱分离,合并相同组分,得到 Fr. A15-2-1~A15-2-7;Fr. A15-2-1 经正相硅胶(300~400目)柱分离、Sephadex LH-20 凝胶柱(150 cm × 3.0 cm)纯化得化合物 **10**(25.2 mg)和 **11**(12.7 mg);Fr. A15-2-2 经正相硅胶(300~400目)柱分离、Sephadex LH-20 凝胶柱(150 cm × 3.0 cm)纯化得化合物 **12**(10.0 mg)和 **13**(5.7 mg)。

1.2.3 化学成分的细胞毒活性

接种细胞:用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 5 000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 100 μL,细胞提前 12~24 h 接种培养。加入待测化合物溶液:化合物用 DMSO 溶解,化合物以 40 μmol/L 浓度进行初筛,每孔终体积

200 μL , 每种处理均设 3 个复孔。显色: 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 48 h 后, 弃孔内培养液得贴壁细胞, 每孔加 MTS 溶液 20 μL 和培养液 100 μL ; 设 3 个空白复孔(孔中滴有 MTS 溶液 20 μL 和培养液 100 μL 的混合液)继续孵育 2~4 h, 使充分进行反应后测定光吸收值。比色: 选择 490 nm 波长, 多功能酶标仪 (MULTISKAN FC) 读取各孔光吸收值, 记录结果。根据下列公式计算抑制率。

细胞抑制率 =

$$(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

式中: $A_{\text{空白}}$: 含有 MTS 溶液、培养液、细胞的吸光度; $A_{\text{对照}}$: 为含有 MTS 溶液、培养液、细胞、阳性化合物的吸光度; $A_{\text{样品}}$ 为具有 MTS 溶液、培养液、细胞和药物的吸光度。

每次实验均设顺铂 (DDP) 和紫杉醇 (Taxol) 两个阳性化合物, 以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法 (Reed and Muench 法) 计算化合物的 IC_{50} 值。

1.2.4 统计学方法

采用软件对所有数据进行统计学处理, 实验结果用均数 \pm 标准差表示, 使用单因素方差分析组间均数差异性, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 黄色针状结晶 (吡啶); ESI-MS: m/z 449.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.93 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 2'-H), 7.60 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, 2.1 Hz, 6'-H), 7.32 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, 5'-H), 7.11 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, 7-H), 7.02 (1H, s, 3-H), 6.81 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, 5-H), 5.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 1''-H), 4.45 (6H, m, 2'', 3'', 4'', 5'', 6''-H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 126.2 (C-1), 115.1 (C-2), 146.1 (C-3), 148.5 (C-4), 115.6 (C-5), 121.8 (C-6), 145.5 (C-7), 116.6 (C-8), 168.3 (C-9), 122.5 (C-1'), 114.6 (C-2'), 148.0 (C-3'), 151.7 (C-4'), 116.9 (C-5'), 120.1 (C-6'), 101.6 (C-1''), 74.9 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.2 (C-4''), 78.9 (C-5''), 62.3 (C-6'')。以上数据与文献^[14]报道一致, 故鉴定化合物 1 为 luteolin-7-*O*-glucoside。

化合物 2 黄色针状结晶 (甲醇); ESI-MS: m/z 181 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$; ^1H NMR (400

MHz, CD_3OD) δ : 7.59 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, 1'-H), 7.21 (1H, s, 2-H), 7.01 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, 5-H), 6.80 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, 6-H), 6.39 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, 2'-H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 126.4 (C-1), 116.4 (C-2), 145.8 (C-3), 148.9 (C-4), 116.0 (C-5), 115.5 (C-6), 145.2 (C-7), 121.9 (C-8), 168.5 (C-9)。以上数据与文献^[15]报道一致, 故鉴定化合物 2 为 3,4-dihydroxy benzeneacrylic acid。

化合物 3 白色结晶 (二氯甲烷/氯仿); ESI-MS: m/z 187 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.69 (1H, d, $J = 10.01$ Hz, H-3), 7.51 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 7.40 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 7.30 (1H, m, H-6'), 6.96 (1H, m, H-5'), 6.46 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 160.0 (C-1), 127.9 (C-2), 143.5 (C-3), 119.0 (C-1'), 154.3 (C-2'), 116.9 (C-3'), 132.1 (C-4'), 117.1 (C-5'), 124.5 (C-6')。以上数据与文献^[16]报道一致, 故鉴定化合物 3 为 2-hydroxycinnamic acid。

化合物 4 棕色结晶 (二氯甲烷/氯仿); ESI-MS: m/z 209 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.78 (1H, m, 3-OH), 10.13 (1H, m, 8-OH), 7.36 (1H, m, H-5), 7.21 (1H, m, H-7), 7.01 (1H, m, H-6), 3.80 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 159.1 (C-2), 125.5 (C-3), 153.8 (C-4), 117.4 (C-5), 124.2 (C-6), 113.6 (C-7), 144.9 (C-8), 139.5 (C-9), 117.7 (C-10), 59.9 (-OCH₃)。以上数据与文献^[17]报道一致, 故鉴定化合物 4 为 3,8-dihydroxy-4-methoxy-coumarin。

化合物 5 白色结晶 (甲醇); ESI-MS: m/z 176 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.39 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-8), 7.30 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-5), 7.21 (1H, dd, $J = 9.0$, 3.0 Hz, H-7), 6.12 (1H, s, H-3), 2.40 (3H, s, 2-CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 168.9 (C-2), 109.8 (C-3), 108.7 (C-4), 180.8 (C-5), 156.6 (C-6), 124.5 (C-7), 120.6 (C-8), 152.2 (C-9), 125.1 (C-10)。以上数据与文献^[18]报道一致, 故鉴定化合物 5 为 2-methyl-6-hydroxychromone。

化合物 6 白色结晶 (甲醇); ESI-MS: m/z 365 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_9$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.55 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3'),

7.05(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 6.95(1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6''), 6.76(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 6.25(1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2'), 2.02-2.63(4H, m, H-2, 6), 3.74(1H, dd, $J = 8.2, 3.0$ Hz, H-4); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ : 168.9(C-2), 109.8(C-3), 108.7(C-4), 180.8(C-5), 156.6(C-6), 124.5(C-7), 120.6(C-8), 152.2(C-9), 125.1(C-10)。以上数据与文献^[19]报道一致,故鉴定化合物**6**为 chlorogenic acid。

化合物 7 白色结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 195 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ : 7.49(1H, d, $J = 16.00$ Hz, H-7), 7.06(1H, d, $J = 2.00$ Hz, H-3), 7.00(dd, $J = 9.00, 2.00$ Hz, H-5), 6.77(1H, d, $J = 9.00$ Hz, H-6), 6.27(1H, d, $J = 16.00$ Hz, H-8), 3.69(3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ : 127.2(C-1), 116.2(C-2), 146.3(C-3), 148.9(C-4), 114.9(C-5, 8), 122.5(C-6), 145.9(C-7), 168.3(C=O), 52.2($-\text{OCH}_3$)。以上数据与文献^[20]报道一致,故鉴定化合物**7**为 methyl caffeate。

化合物 8 棕色结晶(二氯甲烷/氯仿);ESI-MS: m/z 208 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}$; ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 8.39(1H, br, 10-H), 8.09(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.99(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 7.72(1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 7.51(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.38-7.46(2H, m, H-3, 4), 7.28 - 7.30(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.00(1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ : 143.9(C-2), 103.5(C-3), 116.8(C-3a), 110.9(C-4), 124.5(C-5), 111.9(C-5a), 124.2(C-5b), 119.7(C-6), 117.9(C-7), 119.9(C-8), 104.4(C-9), 138.9(C-9a), 132.5(C-10a), 158.9(C-10b)。以上数据与文献^[21]报道一致,故鉴定化合物**8**为 furo[3,2- α]carbazole。

化合物 9 白色结晶(二氯甲烷/氯仿);ESI-MS: m/z 215 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$; ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 7.83(1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, H-3), 7.76(2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 7.29(1H, d, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-5), 7.02(1H, d, $J = 1.6, 8.0$ Hz, H-4), 6.95(1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, H-3), 6.92(2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ : 154.5(C-1), 137.8(C-2), 130.8(C-3), 119.8(C-4), 132.2(C-5), 117.6(C-6), 144.6(C-1'), 124.2(C-2', 6'), 116.0(C-3',

5'), 161.4(C-4')。以上数据与文献^[22]报道一致,故鉴定化合物**9**为 (*E*)-2-((4-hydroxyphenyl) diazenyl)phenol。

化合物 10 白色结晶(二氯甲烷/氯仿);ESI-MS: m/z 272 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$; ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 9.49(1H, brs, NH), 8.80(1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'), 8.09(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6'), 7.60(1H, d, $J = 7.3, 0.8$ Hz, H-5'), 7.30(1H, m, H-4), 7.19(2H, br. d, $J = 7.3$ Hz, H-3, 5), 7.05(1H, dt, $J = 7.3, 0.9$ Hz, H-4'), 6.01(1H, brs, NH), 2.30(3H, s, $-\text{CH}_3$), 1.50(3H, s, CH_3); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ : 138.9(C-1), 130.8(C-2, 6), 129.1(C-3, 5), 123.2(C-4), 144.4(C-1'), 116.9(C-2', 6'), 125.1(C-3', 5'), 159.5(C=O), 18.16(2- CH_3)。以上数据与文献^[23]报道一致,故鉴定化合物**10**为 *N*-(2,6-dimethylphenyl)-*N'*-(4'-nitrophenyl)urea。

化合物 11 黄色无定型粉末(吡啶);ESI-MS: m/z 226.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2$; ^1H NMR(400 MHz, Pyridine- d_5) δ : 10.02(1H, s, 3-CHO), 8.68(1H, s, 11-NH), 8.19(1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-4), 8.09(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.51(1H, dd, $J = 8.20, 7.80$ Hz, H-7), 7.49(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 7.45(1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 7.31(1H, dd, $J = 8.00, 7.80$ Hz, H-6), 4.05(3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C NMR(100 MHz, Pyridine- d_5) δ : 192.0(3-CHO), 146.2(C-1), 138.9(C-1a), 134.3(C-8a), 130.2(C-3), 127.2(C-8), 123.8(C-4a), 123.5(C-5a), 119.9(C-6), 120.7(C-5), 120.2(C-4), 115.8(C-7), 103.5(C-2), 55.9(1- OCH_3)。以上数据与文献^[24]报道一致,故鉴定化合物**11**为九里香碱。

化合物 12 白色结晶(吡啶);ESI-MS: m/z 294 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$; ^1H NMR(400 MHz, Pyridine- d_5) δ : 7.69(2H, s, $J = 8.0$ Hz, H-12, 16), 7.51(1H, s, H-9), 7.21(1H, s, H-2), 6.86(1H, s, $J = 8.0$ Hz, H-13, 15); ^{13}C NMR(100 MHz, Pyridine- d_5) δ : 118.9(C-2), 111.7(C-3), 111.2(C-4), 115.2(C-5), 151.9(C-6), 150.0(C-8), 120.7(C-9), 119.1(C-11), 125.5(C-12, 16), 115.8(C-13, 15), 157.9(C-14)。以上数据与文献^[25]报道一致,故鉴定化合物**12**为 phorbazole C。

化合物 13 白色结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 238 $[\text{M}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$; ^1H NMR(400 MHz,

CD₃OD) δ : 7.79 (1H, s, $J = 7.2$ Hz, H-10), 7.13 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-12), 7.01 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-11), 6.76 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-13), 4.26 (1H, m, H-5), 3.39 (1H, m, H-15a), 2.99 (1H, m, H-8a), 2.86 (1H, m, H-8b), 2.30 (3H, s, H-20), 2.15 (1H, m, H-15b), 2.14 (1H, m, H-6a), 2.13 (1H, m, H-7), 1.90 (2H, d, H-6b, 7b); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 176.2 (C-2), 78.6 (C-3), 65.7 (C-5), 32.4 (C-6), 34.5 (C-7), 47.5 (C-8), 127.3 (C-9), 126.6 (C-10), 121.8 (C-11), 129.5 (C-12), 109.9 (C-13), 143.5 (C-14), 38.5 (C-15), 192.3 (C-16), 98.3 (C-17), 136.3 (C-18), 170.8 (C-19), 13.3 (C-20)。以上数据与文献^[26]报道一致,故鉴定化合物 **13** 为 3-羟苯基喹唑酮。

化合物 14 白色结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 343 [M]⁺,分子式为 C₁₉H₂₁NO₅; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 9.36 (1H, s, 4'-OH), 8.65 (1H, s, 2-OH), 7.93 (1H, -NH), 7.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 7.11 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.96 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.77 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.60 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.38 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 3.75 (3H, s, -OCH₃), 3.36 (1H, m, H-8), 2.63 (1H, t, H-7); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 129.8 (C-1), 112.6 (C-2), 147.1 (C-3), 144.5 (C-

4), 115.2 (C-5), 120.5 (C-6), 34.3 (C-7), 40.1 (C-8), 55.3 (-OCH₃), 126.3 (C-1'), 109.9 (C-2'), 147.6 (C-3'), 147.9 (C-4'), 115.3 (C-5'), 121.2 (C-6'), 138.6 (C-7'), 118.8 (C-8'), 165.1 (C-9'), 55.3 (-OCH₃)。以上数据与文献^[27]报道一致,故鉴定化合物 **14** 为 *N*-反式阿魏酰基-3-甲基多巴胺。

化合物 15 白色结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 390.1 [M + H]⁺,分子式为 C₂₃H₁₉NO₅; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.65 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-11), 7.53 (1H, s, H-4), 7.48 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-12), 7.33 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-10), 7.11 (1H, s, H-1), 6.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 6.08 (2H, s, 19-Ha, b), 6.06 (2H, s, 20-Ha, b), 4.38 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, H-6), 2.67 (3H, s, N-CH₃), 2.63 (1H, dd, $J = 14.8$ Hz, H'-1a), 2.36 (1H, dd, $J = 14.8$ Hz, H'-1b), 2.03 (2H, s, 3'-CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 105.1 (C-1), 148.6 (C-2), 147.6 (C-3), 100.6 (C-4), 127.5 (C-4a), 139.5 (C-4b), 43.3 (N-CH₃), 54.1 (C-6), 144.3 (C-7), 146.3 (C-8), 107.9 (C-9), 116.5 (C-10), 125.6 (C-10a), 123.3 (C-10b), 120.1 (C-11), 124.1 (C-12), 131.1 (C-12a), 101.5 (19-OCH₂-), 101.1 (20-OCH₂-), 46.7 (C-1'), 31.3 (3'-CH₃), 207.1 (C=O)。以上数据与文献^[28]报道一致,故鉴定化合物 **15** 为 6-丙酮基-5,6-二氢血根碱。

化合物 **1~15** 结构见图 1。

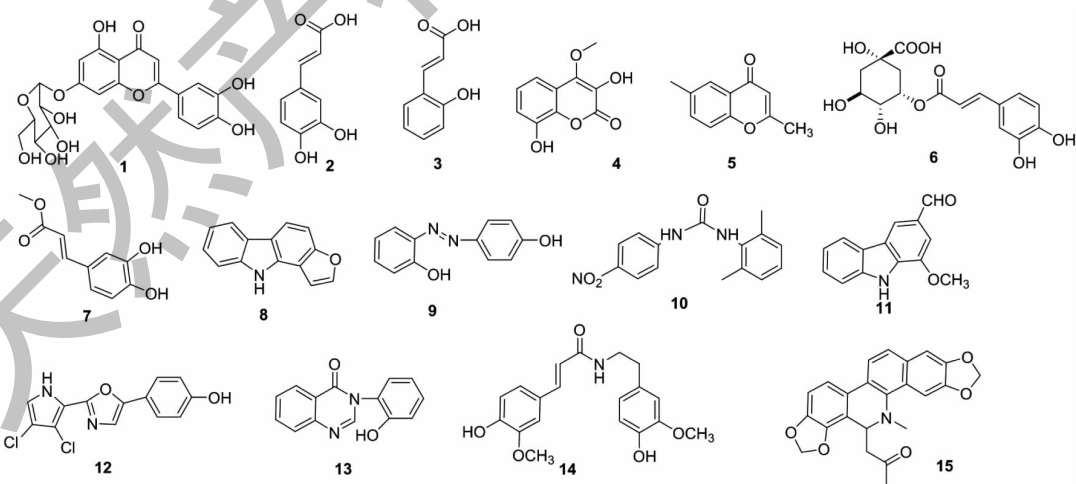


图 1 化合物 **1~15** 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds **1-15**

2.2 体外抑制肿瘤细胞增殖活性测试结果

药物干预细胞后,培养 48 h,检测化合物对 5 株

肿瘤细胞的增殖影响(阳性化合物为顺铂(DDP)和紫杉醇(taxol)结果见表 1。

表1 化合物1~15对5株肿瘤细胞增殖抑制率

Table 1 Effect of compounds 1-15 on five celles proliferation

化合物 Compound	细胞增殖抑制率 Cell inhibition rate(%)				
	HL-60	A-549	SMMC-7721	MCF-7	SW-480
1	55.19 ± 1.21 *	42.09 ± 1.39 *	64.17 ± 1.97 *	50.19 ± 1.25 *	45.12 ± 2.13 *
2	42.15 ± 1.26	22.78 ± 1.97	39.00 ± 1.69	26.12 ± 1.78	45.14 ± 1.79 *
3	40.12 ± 1.46	42.10 ± 1.46	19.13 ± 1.49	13.52 ± 1.46	35.41 ± 1.43
4	19.45 ± 1.19	12.79 ± 1.46	42.01 ± 1.51	27.42 ± 1.13	44.19 ± 1.43 *
5	10.05 ± 1.49	42.11 ± 1.40	41.13 ± 1.21	43.19 ± 0.41	35.08 ± 1.19
6	28.85 ± 1.12	32.12 ± 2.16	42.04 ± 1.19 *	37.28 ± 2.79	24.15 ± 1.16
7	40.16 ± 1.72	26.10 ± 1.19	41.19 ± 1.42	33.52 ± 0.19	35.41 ± 1.43
8	69.10 ± 2.13 *	61.79 ± 1.49 *	49.09 ± 1.46	77.19 ± 1.76 *	64.16 ± 1.73 *
9	80.25 ± 2.19 *	52.79 ± 1.39 *	71.03 ± 2.15 *	73.49 ± 1.45 *	65.30 ± 1.74 *
10	59.25 ± 1.74 *	72.19 ± 1.69 *	62.01 ± 1.79 *	67.71 ± 1.75 *	68.04 ± 1.49 *
11	60.09 ± 1.94 *	52.46 ± 1.87 *	41.93 ± 2.79	63.92 ± 0.19 *	79.46 ± 1.72 *
12	59.42 ± 1.87 *	60.19 ± 1.56 *	52.08 ± 1.79 *	67.79 ± 1.05 *	62.40 ± 2.19 *
13	60.35 ± 2.39 *	53.15 ± 1.91 *	81.50 ± 1.73 *	67.12 ± 1.49 *	71.58 ± 2.16 *
14	69.40 ± 2.42 *	72.02 ± 2.30 *	61.20 ± 2.40 *	67.22 ± 1.69 *	56.94 ± 1.46 *
15	69.70 ± 1.74 *	62.92 ± 1.70 *	76.71 ± 1.74 *	81.13 ± 1.28 *	59.89 ± 1.78 *
顺铂 DPP	51.43 ± 1.25	71.13 ± 1.29	60.68 ± 2.36	76.50 ± 2.54	81.24 ± 6.20
紫杉醇 Taxol	7.12 ± 1.68	42.76 ± 3.41	64.24 ± 5.21	41.35 ± 3.02	42.31 ± 5.13

注:与顺铂和紫杉醇相比, * $P < 0.05$ Note: Compared with cisplatin and taxol, * $P < 0.05$.

经细胞毒活性实验初步筛选,发现15个化合物在浓度点(40 $\mu\text{mol/L}$)表现出不同的抑制作用。其中对于肿瘤细胞株 HL-60,化合物9的抑制率最大,为(80.25 ± 2.19)%,化合物5的抑制率最小,为(10.05 ± 1.49)%;对于细胞株 A-549,化合物10的抑制率最大,为(72.19 ± 1.69)%,化合物4的抑制率最小,为(12.79 ± 1.46)%;对于肿瘤细胞株 SMMC-7721,化合物13的抑制率最大,为(81.50 ± 1.73)%,化合物3的抑制率最小,为(19.13 ± 1.49)%;对于细胞株 MCF-7,化合物15的抑制率最大,为(81.13 ± 1.28)%,化合物3的抑制率最低,为(13.52 ± 1.46)%;对于细胞株 SW-480,化合物

11的抑制率最大,为(79.46 ± 1.72)%,化合物6的抑制率最小,为(24.15 ± 1.16)%。

2.3 体外抑制肿瘤细胞增殖 IC_{50} 测试结果

在初步筛选结果的基础上,精密称取化合物1、8~15各1.0~3.0 mg,用DMSO溶解,以40.000、8.000、1.600、0.320、0.064 $\mu\text{mol/L}$ 为浓度梯度,进一步分析化合物1、8~15的 IC_{50} 值。以浓度梯度为横坐标,细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线,应用两点法(Reed and Muench法)计算化合物的 IC_{50} 值^[29],实验均设顺铂(DDP)和紫杉醇(taxol)两个阳性对照化合物,结果见表2。

表2 化合物1,8~15的细胞毒活性测试结果

Table 2 The cytotoxic activity of compound 1,8-15

化合物 Compound	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)				
	HL-60	A-549	SMMC-7721	MCF-7	SW480
1	60.13 ± 1.11	72.53 ± 1.46	51.63 ± 1.48	43.10 ± 1.46	68.28 ± 2.42
8	29.14 ± 2.16	34.51 ± 1.89	42.01 ± 1.21 *	37.45 ± 2.12	36.15 ± 2.43
9	30.01 ± 1.46	31.00 ± 1.11	26.05 ± 2.13	41.73 ± 1.3	30.18 ± 1.15
10	29.11 ± 1.29	41.53 ± 1.46	42.19 ± 2.31 *	29.02 ± 2.21	24.04 ± 2.20

续表 2 (Continued Tab. 2)

化合物 Compound	IC ₅₀ (μmol/L)				
	HL-60	A-549	SMMC-7721	MCF-7	SW480
11	24.16 ± 2.31	19.03 ± 2.23 *	29.03 ± 1.46	31.02 ± 1.49	25.08 ± 1.91
12	21.31 ± 1.21 *	30.79 ± 1.20	21.10 ± 1.16 *	29.39 ± 1.59 *	16.19 ± 1.51 *
13	21.69 ± 1.79 *	24.14 ± 1.46	24.13 ± 1.89	23.19 ± 1.79	15.41 ± 1.71 *
14	19.08 ± 1.10 *	22.02 ± 1.46 *	22.20 ± 1.36	26.02 ± 1.46	24.03 ± 1.16
15	19.13 ± 1.76 *	22.46 ± 1.49 *	21.21 ± 1.13 *	19.02 ± 1.24 *	20.04 ± 1.49
顺铂 DPP	4.56 ± 0.19	26.13 ± 0.16	13.65 ± 0.40	11.86 ± 0.93	9.60 ± 0.61
紫杉醇 Taxol	<0.008	<0.008	0.32 ± 0.02	<0.008	<0.008

注:与顺铂和紫杉醇相比, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with cisplatin and taxol, * $P < 0.05$.

经过对半抑制率 IC₅₀ 检测分析,发现对于细胞株 HL-60,在抑制率达到 50% 时,所需化合物 **1** 的浓度最大、所需浓度最低的化合物是 **14**;对于细胞株 A-549,在抑制率为 50% 时,所需化合物 **1** 的浓度最大、所需最低浓度的化合物是 **11**;对肝癌细胞 SMMC-7721,抑制率 50% 时,所需的最大浓度对应的化合物为 **1**、最低浓度的是化合物 **12**;对于乳腺癌细胞 MCF-7,抑制率 50% 时,所需最大浓度对应的化合物为 **1**、最低浓度的化合物是 **15**;对于结肠癌细胞 SW480,抑制率 50% 时,所需化合物的浓度最大化合物 **1**、最低浓度的化合物是 **13**。

3 讨论与结论

本实验从四数九里香醇提物的乙酸乙酯萃取部位分离鉴定 15 个化合物,其中化合物 **1** 为黄酮类,化合物 **2~7** 为苯丙素类,化合物 **8~15** 为生物碱;15 个化合物均为首次从该植物中分离得到;本实验还研究化合物 **1~15** 进行体外抑制肿瘤细胞增殖作用,结果表明生物碱类化合物对 5 株肿瘤细胞株 (HL-60、A-549、SMMC-7721、SW-480、MCF-7) 具有较好的抑制增殖作用。本实验结果丰富了民族药四数九里香化学成分及药效物质基础相关研究,为解释民族药四数九里香抑制肿瘤细胞增殖作用提供参考。后期将采用代谢 + 转录组学方法研究四数九里香味唑生物碱的合成遗传机理及相关化合物抑制肿瘤细胞增殖作用靶点及机制。

参考文献

- Zhou Y, Wang WG, Tu PF, et al. Chemical constituents from *Murraya tetramera* Huang [J]. J Chin Pharm Sci (中国药学报:英文版), 2016, 25: 201-205.
- Liu JL, Wang SR, Chen QH. Isolation, purification and analysis of the polysaccharide and proteinpoly saccharide of *Mur-*

raya paniculata [J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 1989, 5: 33-38.

- Mao ZZ, Huang B, Yu ZB. Anti-inflammatory of analgesic effects of volatile oil from *Murraya tetramera* Huang [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med (云南中医中药杂志), 2011, 32: 74-75.
- Yang QB, Huang XQ, Huang ZL, et al. Effect of *Murraya tetramera* Huang on blood lipid regulation and hemorheology in hyperlipidemia mice [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2017, 19: 37-40.
- Shan J, Wang XZ, Ma YD, et al. Studies on flavonoids from leaves of *Murraya paniculata* L. (I) [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2010, 45: 1910-1912.
- Jiang PC, Li J, Yang HC, et al. HPLC determination of meranzin and phebalosin in *Murraya exotica* [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2012, 27: 169-171.
- Guo P, Liu H, Zhu HJ, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of *Murraya exotica* [J]. Drug Clin (现代药物与临床), 2015, 30: 1172-1178.
- Yan JH, Ma YD, Wang XZ, et al. HPLC determination of flavonoids in leaves of *Murraya paniculata* L. Jack [J]. Chin J Pharm Anal (中国药物分析杂志), 2008, 28: 1630-1632.
- Tang QL, Lu YG, Luo YP. Progress on research of *Murraya paniculata* [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科学), 2009, 37: 11523-11525.
- Dai YH, Ding LS, Yi YF. Studies on the chemical constituents of the volatile oil from *Murraya tetramera* Huang [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1985, 16: 4-9.
- Zheng GT, Chen XY, Jiang HA. Study on pharmacological action of *Murraya tetramera* Huang [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学报), 1987, 4: 1-3.
- Zhou YF, Chen HP, Chen L, et al. Carbazole alkaloids from *Murraya tetramera* Huang and their cytotoxic activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 269-272.
- Ya QK, Lu WS, Chen JY, et al. Studies on the chemical con-

- stituents of *Murraya tetramera* Huang[J]. Guangxi Sci(广西科学),2010,17:347-348.
- 14 Li YY, Peng ZQ, He SL, et al. Chemical constituents from *Crepis crocea* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2015,40:3800-3804.
- 15 Zhou HY, Li SM. Study on constituents from leaves of *Phyllostachys pubescens* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志),2006,41:662-663.
- 16 Zhao K, Jiang Y, Xue PF, et al. Chemical constituents from barks of *Cinnamomum cassia* growing in China[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2013,44:2358-2363.
- 17 Gu LH, Li X, Yan SQ, et al. Studies on antibacterial constituents from *Gerbera anandria* (L.) Sch Bip. IV [J]. Acta Pharm Sin(药学学报),1989,24:744-748.
- 18 Miao JH, Yan YM, Wang XL, et al. A new phenolic dimer from *Ganoderma lucidum* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2014,26:1545-1547.
- 19 Yang XZ, Lin LG, Tang CP, et al. Non-alkaloid constituents from *Stemona sessilifolia* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2008,20:56-59.
- 20 Mi KP, Lee YY, Yun-Choi HS. Anti-platelet effect of the constituents isolated from the barks and fruits of *Magnolia obovata* [J]. Arch Pharmacol Res,2002,25:325-328.
- 21 Mei X, Tian YF, Jian XZ, et al. A novel synthesis route to furro[3,2- α] carbazole [J]. Chin Chem Lett(中国化学快报),2015,26:282-284.
- 22 Bae SJ, Ha YM, Kim JA, et al. A novel synthesized tyrosinase inhibitor: (*E*)-2-(2,4-dihydroxyphenyl) diazenyl phenyl-4-methylbenzenesulfonate as an azo-resveratrol analog [J]. Biosci Biotechnol Biochem,2013,77:65-72.
- 23 Perveen S, Mustafa S, Qamar K, et al. Antiproliferative effects of novel urea derivatives against human prostate and lung cancer cells; and their inhibition of β -glucuronidase activity [J]. Med Chem Res,2014,23:1099-1113.
- 24 Yan G, Qiao ZH, Wu YJ, et al. Study on coumarins and alkaloids from stems of *Clausena lenis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2020,51:1825-1830.
- 25 Rudi A, Stein Z, Green S, et al. Phorbazoles A-D, Novel chlorinated phenylpyrroloxazoles from the marine sponge *Phorbos aff clathrata* [J]. Tetrahedron Lett 1994,35:2589-2592.
- 26 Liu YH, Qin GW, Ding SP, et al. Studies on chemical constituents in root of *Isatisindigotica* III [J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药),2002,33:97-99.
- 27 Zhao YX, Ding XB. Studies on the alkaloids from *Salsola collina* Pall. [J]. Acta Pharm Sin(药学学报),2004,38:598-600.
- 28 Tang YL, Yang AM, Zhang YS. et al. Studies on the alkaloids from the herb of *Corydalis adunca* (I) [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2005,30:195-197.
- 29 He ZM, Bai B, Wang H, et al. The antitumor and antiviral activity of total flavonoids from *Senecio scandens* *in vitro* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2010,32:2045-2047.