

房山紫堇地上部分化学成分及其抗乳腺癌细胞增殖作用研究

邓卫芳¹, 贺金亮¹, 朱一栋², 邓超凡², 南泽东^{2*}¹山西中医药大学第一临床学院, 晋中 030619;²北方民族大学化学与化学工程学院 化工技术基础国家民委重点实验室, 银川 750021

摘要:对房山紫堇 *Corydalis fangshanensis* 地上部分化学成分及其体外抗乳腺癌细胞活性进行研究。采用各种色谱分离技术对乙酸乙酯和正丁醇两个萃取部位进行系统分离纯化, 通过多种波谱数据 (1D、2D NMR、MS、IR、UV) 鉴定化合物结构, 从房山紫堇乙酸乙酯和正丁醇两个部位中鉴定了 17 个化合物, 分别为 7-acetyl thalifoline (**1**)、pyncarrhine (**2**)、corynoxidine (**3**)、*trans*-isocorypalmine *N*-oxide (**4**)、四氢巴马汀 (**5**)、四氢药根碱 (**6**)、liriotalupiferine (**7**)、异波尔定碱 (**8**)、乌药碱 (**9**)、脱氢甲卡维丁 (**10**)、feruloylputrescine (**11**)、木黄酮 (**12**)、二甲基咖啡酸 (**13**)、4-羟基-3-甲氧基桂皮酰基- β -D-葡萄糖苷 (**14**)、水仙苷 (**15**)、丁香脂素 4- O - β -D-葡萄糖苷 (**16**)、异落叶松脂醇 9- O - β -D-葡萄糖苷 (**17**)。其中化合物 **1** 作为天然产物首次报道, **2**~**17** 是首次从房山紫堇中分离得到。结合体外 MTT 法评价单体化合物对人乳腺癌肿瘤细胞 (MDA-MB-231、MCF-7) 抑制作用。结果显示化合物 **2**~**10**、**13**、**15**~**17** 对 MDA-MB-231 细胞有一定的抑制作用, 其 IC₅₀ 值范围为 8.00~79.99 μ mol/L, 化合物 **2**~**10**、**16**、**17** 对 MCF-7 细胞有抑制作用, IC₅₀ 值范围为 7.29~86.91 μ mol/L。

关键词:房山紫堇; 化学成分; 结构确定; 乳腺癌抑制活性

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)2-0252-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.2.008

Chemical constituents from the aerial parts of *Corydalis fangshanensis* and their inhibitory effects on breast cancer cells proliferation

DENG Wei-fang¹, HE Jin-liang¹, ZHU Yi-dong², DENG Chao-fan², NAN Ze-dong^{2*}¹Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;²Key Laboratory of Chemical Engineering and Technology of State Ethnic Affairs Commission, School of Chemistry and Chemical Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, China

Abstract: To investigate the chemical constituents from the aerial parts of *Corydalis fangshanensis* and the inhibitory effects on the human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). The chemical constituents of ethyl acetate and *n*-butanol extracts were systematically isolated and purified by multiple column chromatography. The constituents were identified by NMR (1D, 2D), MS, IR, UV, etc. Seventeen compounds were obtained and identified as 7-acetyl thalifoline (**1**), pyncarrhine (**2**), corynoxidine (**3**), *trans*-isocorypalmine *N*-oxide (**4**), tetrahydropalmatine (**5**), tetrahydrojatrorrhizine (**6**), liriotalupiferine (**7**), isoboldine (**8**), (*R*)-*N*-methylcoclaurine (**9**), dehydroapocavidine (**10**), feruloylputrescine (**11**), xylogranatinin (**12**), dimethylcaffic acid (**13**), 4-hydroxy-3-methoxycinnamyl- β -D-glucopyranoside (**14**), narcissin (**15**), syringaresinol-4- O - β -D-glucopyranoside (**16**), isolaricresinol-9- O - β -D-glucopyranoside (**17**). Compound **1** was first reported as a natural product, **2**-**17** were obtained from *Corydalis fangshanensis* for the first time. The inhibitory effects assay was carried out by MTT method. Anti-tumor activities assay indicated that **2**-**10**, **13**, **15**-**17** exhibited certain inhibition on MDA-MB-231 cell lines with the IC₅₀ values of 8.00-79.99 μ mol/L, and the IC₅₀ values of **2**-**10**, **16**, **17** for the MCF-7 cell lines were 7.29-86.91 μ mol/L.

Key words: *Corydalis fangshanensis*; chemical components; structure elucidation; breast cancer inhibitory activity

收稿日期: 2023-06-21 接受日期: 2023-10-11

基金项目: 宁夏自然科学基金一般项目 (2022AAC03292); 北方民族大学科研启动项目 (2021KYQD35); 山西省自然科学基金青年基金 (201801D221432); 山西中医药大学科技创新能力培育计划 (2019PY-072)

* 通信作者 Tel: 86-018834810708; E-mail: nanzdchem@163.com

房山紫堇 *Corydalis fangshanensis* 为罂粟科 (Papaveraceae) 紫堇属一年生草本植物, 主要分布在北京房山、山西、河南、河北等地, 生于海拔 500 ~ 1 600 m 的石灰岩多石山坡上^[1]。紫堇属药材多以全草入药, 性味以甘、寒为主, 具有清热解毒之功效, 多用于治疗感冒发热、疮疡肿痛、溃烂等症^[2]。前期研究发现该属植物含有生物碱、黄酮、香豆素、有机酸等化学成分, 其中生物碱是主要药理活性成分^[3]。现代药理学研究发现该属生物碱类成分具有抗肿瘤、抗炎症痛、抗心肌缺血、抗菌、保肝等多种活性^[4]。2020 版《中华人民共和国药典》收录紫堇属中延胡索 *C. yanhusuo*、夏天无 *C. decumbens*、苦地丁 *C. bungeana* 等药用植物, 复方延胡索片、夏天无注射液等药物在临床都有应用^[5]。目前, 由于生长环境、产量等原因, 对房山紫堇的化学成分或药理活性研究鲜有报道, 阻碍了其药用成分的发掘。为此, 本研究对采自山西左权县的房山紫堇进行系统的化学成分及体外抗乳腺肿瘤细胞毒活性的研究, 采用多种色谱分离技术, 对 80% 乙醇粗提物进行系统分离, 并对分离得到的化合物进行乳腺肿瘤细胞抑制作用测试, 以期为该药材抗乳腺癌应用及其后期质量控制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Bruker AV-600、500、400 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Bruker micrOTOF Q II 高分辨质谱仪 (美国 Bruker Daltonics 公司); Waters Xevo TQD 低分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); Spectrum 100 FTIR 红外光谱仪 (美国 PerkinElmer 公司); Agress1100 型高效液相色谱仪 (大连依利特分析仪器有限公司); Hanon P850 型旋光仪 (济南海能仪器公司); Thermo BDS-C₁₈ (10 mm × 250 mm, 5 μm) 半制备色谱柱 (美国 Thermo Fisher 公司); KS-240 超声机 (深圳市洁康洗净电器公司); CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); DMILLED 型荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司); EnSpire 型全波长酶标仪 (美国 Perkinelmer 公司); BCV-4S1 超净工作台 (上海一恒有限公司)。

正相硅胶 (200 ~ 300 目, 批号 2321030026, 青岛海洋化工厂; 300 ~ 400 目, 北京伊诺凯科技公司); Sephadex LH-20 凝胶 (批号 17-0090-02, 瑞典 Pharmacia 公司); Rp-C₁₈ 硅胶 (批号 F1855900505, 德国默克公司); GF₂₅₄ 型薄层色谱板 (烟台江友硅胶开发

有限公司); 甲醇和乙腈 (色谱级, 纯度 > 99.9%, 美国迈瑞达公司); 其余化学试剂均为分析纯 (批号: 天津大茂化学试剂厂); MCI-gel (CHP20P, 75 ~ 150 μm, 日本三菱公司, 批号: 7H801); DMEM 培养基 (批号: 11960-069, 美国 Thermo Fisher 公司); 胎牛血清 (批号: E510008-0100, 上海生工生物工程公司); MTT 及 DMSO 化学试剂 (纯度 ≥ 99.8%、99.7%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 阳性对照药注射用顺铂 (冻干型, 批号: 2H0344B03, 山东齐鲁制药有限公司)。

房山紫堇药材 2018 年 9 月采自山西左权县, 由四川省食品药品学校秦运潭副教授鉴定为房山紫堇 *Corydalis fangshanensis*, 标本存于北方民族大学化工学院 (No. CF20180901)。抗肿瘤活性测试所用的乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 购于中国科学院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 提取分离

房山紫堇药材 3.5 kg, 切碎后用 80% 乙醇超声提取 3 次 (30 min/次), 合并提取液并减压浓缩, 得浓缩浸膏 180 g。将其分散到蒸馏水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 最后得到石油醚、乙酸乙酯和正丁醇三个部位量分别为 36.0、23.0 和 32.0 g。

乙酸乙酯部位浸膏 (23.0 g), 经正相硅胶柱色谱分离 (200 ~ 300 目, 0.8 kg), 以二氯甲烷-甲醇 (20:1 → 1:1, V/V) 梯度洗脱, 薄层色谱检测合并得到 5 个粗流分 FZB1 ~ FZB5。FZB2 经 Sephadex LH-20 色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1, V/V) 洗脱得流分 FZB2-1。FZB2-1 经正相硅胶 (300 ~ 400 目) 柱色谱分离, 用石油醚-二氯甲烷-甲醇 + 0.5% 甲酸 (20:20:1 → 3:3:1, V/V) 梯度洗脱, 得到化合物 **1** (8.0 mg)、**5** (5.2 mg) 和 **6** (10.0 mg); FZB3 经 MCI 色谱分离, 以甲醇-水 (20% → 80%, V/V) 梯度洗脱得到三个主要流分 FZB3-1 ~ FZB3-3。FZB3-1 经硅胶 (300 ~ 400 目) 柱色谱分离, 以石油醚-二氯甲烷-甲醇 + 0.5% 甲酸 (5:5:1, V/V) 等度洗脱, 依次得到化合物 **3** (5.0 mg)、**4** (6.0 mg) 和 **2** (4.0 mg); FZB3-2 经制备薄层色谱分离, 并经 Sephadex LH-20 色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1, V/V) 洗脱得到化合物 **7** (6.0 mg) 和 **8** (10.0 mg); FZB3-3 经硅胶 (300 ~ 400 目) 柱色谱分离, 以氨水饱和的石油醚-二氯甲烷-甲醇 (8:8:1, V/V) 等度洗脱, 得到化合物 **12** (12.0 mg) 和 **11** (5.0 mg); FZB4 经 Sephadex LH-20 色谱

分离,以二氯甲烷-甲醇(1:1, V/V)洗脱得流分 FZB4-1。FZB4-1 经硅胶(300~400目)柱色谱分离,以氨水饱和的石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1, V/V)等度洗脱,得到化合物 **9**(3.0 mg)和 **10**(4.0 mg);FZB5 经硅胶(300~400目)柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇系统(10:1→3:1, V/V)梯度洗脱,得到化合物 **13**(3.5 mg)。

正丁醇浸膏(32.0 g),经正相硅胶柱(200~300目,1.0 kg)色谱分离,用二氯甲烷-甲醇系统(15:1→2:1, V/V)梯度洗脱,最终合并得到6个粗流分 FZD1~FZD6。FZD1 经 MCI 柱色谱分离,以甲醇-水(20%→80%, V/V)梯度洗脱得到 FZD1-1 流分。FZD1-1 经半制备高效液相色谱分离,以甲醇-水(35:65, V/V)系统洗脱得到化合物 **16**(8.0 mg, $t_R = 18.96$ min)和 **17**(9.0 mg, $t_R = 19.34$ min);FZD2 经 Sephadex LH-20 色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(1:1, V/V)洗脱,得流分 FZD2-1。FZD2-1 经薄层色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(4:1)为展开剂,得到化合物 **14**(8.0 mg);FZD5 经正相硅胶(300~400目)柱色谱分离,以乙酸乙酯-甲醇(10:1→3:1, V/V)梯度洗脱,得到化合物 **15**(4.2 mg)。

1.2.2 活性检测

采用 MTT 法^[6]测试化合物 **1**~**17** 对两种人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 增殖抑制作用。将所测化合物均用 DMSO 溶解后配成浓度为 40 mmol/L 储备液,保藏于 4 °C 冰箱备用。临用前,加入培养基稀释成所需浓度,本实验配制为 0.032、0.16、0.8、4.0、20.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 等 6 种不同浓度。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 配成细胞悬液,并于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养,将对数生长期的细胞悬浮液接种于 96 孔板中(约 4.5×10^4 个/mL),每孔 100 μL 。培养 24 h 后,再加入上述不同浓度的含药培养基,同时设置空白组和阳性顺铂(DDP)对照组,37 °C 继续培养 48 h,然后避光条件下每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液,继续孵化 4 h 后弃去培养液,每孔加入 150 μL 的 DMSO 后用酶标仪($\lambda = 570$ nm)测定其吸光度 A 值。根据公式计算抑制率:抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{加药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次,然后用 SPSS 软件(23.0 版本)计算 IC_{50} 值。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 **1** 白色固体粉末;碘化铋钾显紫红色;

(+)-HR-ESI-MS; m/z 272.0897 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{Na}$, 272.0893)。红外光谱显示特征的羰基吸收峰(1753、1650 cm^{-1})及苯环吸收峰(923 cm^{-1}); ^1H NMR(见表1)显示有两个对位苯环氢信号 7.73(1H, s, H-8)、6.70(1H, s, H-5),说明该化合物有一个 1,2,4,5 四取代苯环结构; ^1H - ^1H COSY(见图1)给出一个 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 片段,结合氢谱 3.54(2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-3)可知其中一个亚甲基连 N 原子,通过 ^{13}C NMR 还得到酰胺羰基信号 164.0(C-1),通过分析以上 NMR 数据推测该化合物具有异喹啉骨架,通过 HMBC(见图1)实验中 H-4 与 C-5 相关,以及 H-8 与 C-1 相关进一步证实该化合物的母核为一个异喹啉。之外,通过 ^1H 和 ^{13}C NMR(见表1)得到一个连氮甲基信号 3.11(3H, s, $N\text{-CH}_3$),一个乙酰基信号 2.30(3H, s, $-\text{COCH}_3$),一个甲氧基信号 3.58(3H, s, $-\text{OCH}_3$)。在 1D-NOE 实验中,甲氧基与 H-5 相关证明甲氧基连到 C-6 上,乙酰基与 H-8 相关证明乙酰基连到 C-7 上。自此,化合物 **1**

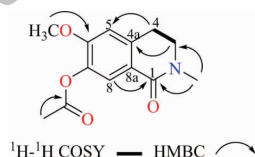


图1 化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 和主要 HMBC 相关

Fig. 1 ^1H - ^1H COSY and key HMBC correlations of compound **1**

表1 化合物 **1** 的氢谱和碳谱(600 MHz and 150 MHz, CDCl_3)

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR data of compound **1**
(600 MHz and 150 MHz, CDCl_3)

位置 Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	-	164.0
2	-	-
3	3.53(t, $J = 7.2$)	48.1
4	2.97(t, $J = 7.2$)	27.9
4a	-	137.5
5	6.70(s)	110.2
6	-	153.6
7	-	138.6
8	7.73(s)	122.8
8a	-	122.4
6-OCH ₃	3.85(s)	56.0
7-COCH ₃	2.30(s)	20.5
7-COCH ₃	-	168.9
$N\text{-CH}_3$	3.11(s)	35.1

的结构确定为 7-acetyl thalifoline, 检索 Scifinder、中国知网等数据库显示该结构曾在 2002 年通过合成的方法得到^[7]。因此,本文中该化合物作为天然产物首次报道。

化合物 2 白色无定型粉末,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 192.2 $[M]^+$; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.79 (1H, s, H-1), 7.18 (1H, s, H-5), 7.08 (1H, s, H-8), 4.02 (3H, s, 6-OCH₃), 3.98 (2H, t, $J = 8.5$ Hz, H-3), 3.71 (3H, s, *N*-CH₃), 3.21 (2H, t, $J = 8.5$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 166.5 (C-1), 50.8 (C-3), 26.0 (C-4), 131.9 (C-4a), 112.2 (C-5), 157.9 (C-6), 147.9 (C-7), 119.9 (C-8), 118.7 (C-8a), 57.1 (6-OMe), 47.3 (*N*-CH₃)。以上数据与文献^[8]报道一致,故确定该化合物为 pycnarrhine。

化合物 3 为淡黄色粉末固体,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 372.2 $[M + H]^+$; $[\alpha]_D^{20} = -83.4$ (c 0.1, CH₃OH); 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.07 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-12), 6.99 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-11), 6.89 (1H, s, H-1), 6.82 (1H, s, H-4), 4.79 (1H, dd, $J = 12.0, 4.5$ Hz, H-14), 4.70 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-8b), 4.60 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-8a), 3.87/3.86/3.85/3.84 (各 3H, s, $4 \times OCH_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 110.7 (C-1), 149.7 (C-2), 150.1 (C-3), 110.7 (C-4), 125.4 (C-4a), 25.1 (C-5), 65.2 (C-6), 67.6 (C-8), 123.9 (C-8a), 152.1 (C-9), 147.0 (C-10), 112.8 (C-11), 124.9 (C-12), 125.9 (C-12a), 30.4 (C-13), 69.0 (C-14), 126.7 (C-14a), 56.4 (2-OCH₃), 56.4 (3-OCH₃), 60.6 (9-OCH₃), 56.8 (10-OCH₃)。以上数据与文献^[9]报道一致,故确定该化合物为 corynoxidine。

化合物 4 为淡黄色油状物,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 358.2 $[M + H]^+$; $[\alpha]_D^{20} = -46.6$ (c 0.1, CH₃OH); 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.05 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-12), 7.01 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-11), 6.80 (2H, s, H-1, H-4), 4.78 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8b), 4.69 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8a), 3.86/3.85/3.84 (各 3H, s, $3 \times OCH_3$), 3.54 (1H, dd, $J = 16.5, 5.0$ Hz, H-13b), 3.22 (1H, dd, $J = 16.5, 12.0$ Hz, H-13a); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 112.4 (C-1), 146.9 (C-2), 148.8 (C-3), 113.7 (C-4), 126.1 (C-4a), 24.9 (C-5), 65.1 (C-6), 66.9 (C-8), 123.8 (C-8a), 152.1 (C-9), 147.0 (C-10), 113.3 (C-

11), 124.9 (C-12), 125.0 (C-12a), 30.4 (C-13), 69.2 (C-14), 123.0 (C-14a), 56.39 (3-OCH₃), 60.6 (9-OCH₃), 56.42 (10-OCH₃)。以上数据与文献^[10]报道一致,故确定该化合物为 *trans*-isocorypalmine *N*-oxide。

化合物 5 浅黄色固体粉末,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 356.2 $[M + H]^+$; $[\alpha]_D^{20} = -158.0$ (c 0.1, CH₃OH); 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.98 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-12), 6.95 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-11), 6.91 (1H, s, H-1), 6.76 (1H, s, H-4), 4.39 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8b), 3.96 (1H, m, H-14), 3.85/3.85/3.84/3.82 (各 3H, s, $4 \times OCH_3$), 3.56 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8a), 3.46 (1H, m, H-13b), 3.17 (1H, m, H-6b), 2.97 (1H, m, H-5b), 2.89 (1H, m, H-13a), 2.83 (1H, m, H-5a), 2.82 (1H, m, H-6a); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 110.3 (C-1), 149.8 (C-2), 149.5 (C-3), 112.9 (C-4), 126.7 (C-4a), 28.4 (C-5), 52.4 (C-6), 54.2 (C-8), 127.4 (C-8a), 152.0 (C-9), 146.3 (C-10), 113.3 (C-11), 125.3 (C-12), 128.7 (C-12a), 35.6 (C-13), 60.9 (C-14), 125.3 (C-14a), 56.38 (2-OCH₃), 56.7 (3-OCH₃), 60.7 (9-OCH₃), 56.42 (10-OCH₃)。以上数据与文献^[11]报道一致,故确定该化合物为四氢巴马汀。

化合物 6 浅黄色固体粉末,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 342.2 $[M + H]^+$; $[\alpha]_D^{20} = -167.4$ (c 0.1, CH₃OH); 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.06 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-12), 7.02 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-11), 6.83 (1H, s, H-1), 6.79 (1H, s, H-4), 4.66 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-8b), 4.49 (1H, dd, $J = 12.0, 4.5$ Hz, H-14), 4.27 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-8a), 3.89/3.87/3.86 (各 3H, s, $3 \times OCH_3$), 3.78 (1H, m, H-13b), 3.64 (1H, m, H-6b), 3.39 (1H, m, H-5b), 3.24 (1H, m, H-13a), 3.02 (1H, m, H-5a), 2.98 (1H, m, H-6a); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 112.5 (C-1), 147.2 (C-2), 149.2 (C-3), 113.0 (C-4), 123.7 (C-4a), 27.1 (C-5), 52.1 (C-6), 53.2 (C-8), 125.3 (C-8a), 152.3 (C-9), 146.4 (C-10), 114.2 (C-11), 123.6 (C-12), 126.0 (C-12a), 34.2 (C-13), 60.9 (C-14), 125.6 (C-14a), 56.41 (3-OCH₃), 60.8 (9-OCH₃), 56.43 (10-OCH₃)。以上数据与文献^[12]报道一致,故确定该化合物为四氢药根碱。

化合物 7 为淡黄色油状物,碘化铯钾呈阳性;

ESI-MS: m/z 328.2 $[M + H]^+$; $[\alpha]_D^{20} = -104.6$ (c 0.1, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8.09 (1H, s, H-11), 6.71 (1H, s, H-8), 6.62 (1H, s, H-3), 3.87/3.86 (各 3H, s, 2 \times OCH₃), 3.20 (1H, m, H-6a), 3.10 (2H, m, H-5), 3.01 (1H, dd, $J = 13.5, 4.0$ Hz, H-7b), 3.69 (1H, m, H-4b), 2.64 (1H, m, H-7a), 2.61 (3H, s, N -CH₃), 2.46 (1H, m, H-4a); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 146.5 (C-1), 121.2 (C-1a), 125.5 (C-1b), 148.6 (C-2), 110.0 (C-3), 126.5 (C-3a), 28.9 (C-4), 54.5 (C-5), 64.2 (C-6a), 34.6 (C-7), 129.6 (C-7a), 114.2 (C-8), 147.3 (C-9), 142.8 (C-10), 115.6 (C-11), 123.8 (C-11a), 56.6 (1-OCH₃), 56.5 (9-OCH₃), 43.5 (N -CH₃)。以上数据与文献^[13]报道一致,故确定该化合物为 liriitolipiferine。

化合物 8 为淡黄色油状物,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 328.2 $[M + H]^+$; $[\alpha]_D^{20} = -105.4$ (c 0.1, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.01 (1H, s, 11-OH), 8.50 (1H, s, 1-OH), 7.97 (1H, s, H-11), 6.70 (1H, s, H-8), 6.60 (1H, s, H-3), 3.79 (3H, s, 2-OCH₃), 3.74 (3H, s, 10-OCH₃), 3.17 (1H, brs, H-7b), 2.97 (1H, m, H-6a), 2.94 (1H, m, H-5b), 2.93 (1H, m, H-4b), 2.59 (1H, m, H-4a), 2.42 (3H, s, N -CH₃), 2.36 (1H, m, H-5a), 2.25 (1H, m, H-7a); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 140.9 (C-1), 119.9 (C-1a), 126.6 (C-1b), 146.9 (C-2), 109.4 (C-3), 123.0 (C-3a), 28.4 (C-4), 53.0 (C-5), 62.4 (C-6a), 33.6 (C-7), 129.2 (C-7a), 115.1 (C-8), 145.3 (C-9), 145.5 (C-10), 113.7 (C-11), 123.6 (C-11a), 55.9 (2-OCH₃), 55.9 (10-OCH₃), 43.6 (N -CH₃)。以上数据与文献^[14]报道一致,故确定该化合物为异波尔定碱。

化合物 9 为浅黄色无定形粉末,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 300.2 $[M + H]^+$; $[\alpha]_D^{20} = -76.2$ (c 0.1, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.93 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.72 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5'), 6.69 (1H, s, H-5), 6.14 (1H, s, H-8), 3.99 (1H, m, H-1), 3.82 (3H, s, 6-OCH₃), 3.37 (1H, m, H-3b), 3.12 (1H, dd, $J = 14.0, 5.0$ Hz, H-9b), 2.98 (1H, m, H-3a), 2.94 (1H, m, H-4b), 2.86 (1H, dd, $J = 14.0, 7.5$ Hz, H-9a), 2.79 (1H, m, H-4a), 2.63 (3H, s, N -CH₃); ¹³C NMR (125

MHz, CD₃OD) δ : 66.1 (C-1), 47.3 (C-3), 24.9 (C-4), 124.0 (C-4a), 115.7 (C-5), 148.5 (C-6), 145.6 (C-7), 112.5 (C-8), 129.8 (C-8a), 40.6 (C-9), 127.9 (C-1'), 131.7 (C-2', 6'), 116.3 (C-3', 5'), 56.3 (6-OCH₃), 41.9 (N -CH₃)。以上数据与文献^[15]报道一致,故确定该化合物为乌药碱。

化合物 10 为淡黄色固体粉末,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 336.1 $[M]^+$; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 9.71 (1H, s, H-8), 7.99 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-12), 7.90 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-11), 7.36 (1H, s, H-1), 6.93 (1H, s, H-4), 6.48 (2H, s, -OCH₂O-), 4.76 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-6), 3.95 (3H, s, 3-OCH₃), 3.12 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-5), 2.99 (3H, s, 13-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 115.6 (C-1), 146.5 (C-2), 150.9 (C-3), 115.9 (C-4), 132.2 (C-4a), 28.5 (C-5), 58.8 (C-6), 143.6 (C-8), 119.6 (C-8a), 146.5 (C-9), 148.9 (C-10), 120.5 (C-11), 121.4 (C-12), 133.3 (C-12a), 134.7 (C-13), 138.0 (C-14), 112.9 (C-14a), 57.0 (3-OCH₃), 106.2 (-OCH₂O-), 18.8 (13-CH₃)。以上数据与文献^[16]报道一致,故确定该化合物为脱氢甲卡维丁。

化合物 11 为白色无定型粉末固体,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 265.2 $[M + H]^+$; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.43 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.12 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.02 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.42 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 3.88 (3H, s, 3-OCH₃), 3.33 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 3.21 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-4'), 1.63 (4H, m, H-2', 3'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 128.2 (C-1), 111.6 (C-2), 148.5 (C-3), 149.3 (C-4), 118.2 (C-5), 123.3 (C-6), 142.2 (C-7), 116.5 (C-8), 169.4 (C-9), 42.1 (C-1'), 27.8 (C-2'), 27.2 (C-3'), 39.7 (C-4'), 56.4 (3-OCH₃)。以上数据与文献^[17]报道一致,故确定该化合物为 feruloylputrescine。

化合物 12 为白色固体粉末,碘化铯钾呈阳性;ESI-MS: m/z 193.1 $[M + H]^+$; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.86 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-7), 7.10 (1H, s, H-1), 6.76 (1H, s, H-4), 6.19 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-6), 3.91 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 109.9 (C-1), 147.1 (C-3), 104.0 (C-4), 164.1 (C-5), 112.5 (C-6), 146.1 (C-7), 151.5 (C-8), 153.1 (C-8a), 56.8 (3-OCH₃)。以上数

据与文献^[18]报道一致,故确定该化合物为木黄酮。

化合物 13 为白色固体粉末;ESI-MS: m/z 207.2 $[M-H]^-$; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.60 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.06 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6), 6.81 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.35 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 3.89、3.77 (各 3H, s, $2 \times OCH_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 127.7 (C-1), 111.7 (C-2), 149.4 (C-3), 150.6 (C-4), 115.2 (C-5), 124.1 (C-6), 146.8 (C-7), 116.5 (C-8), 169.7 (C-9), 56.5 (3- OCH_3), 52.0 (4- OCH_3)。以上数据与文献^[19]报道一致,故确定该化合物为二甲基咖啡酸。

化合物 14 为白色固体粉末;ESI-MS: m/z 357.1 $[M+H]^+$; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.70 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.09 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.38 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 5.56 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 3.89 (3H, s, 3- OCH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 124.4 (C-1), 111.9 (C-2), 149.4 (C-3), 150.9 (C-4), 116.5 (C-5), 127.6 (C-6), 148.2 (C-7), 114.8 (C-8), 167.7 (C-9), 95.8 (C-1'), 74.1 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.1 (C-4'), 78.8 (C-5'), 62.4 (C-6'), 56.5 (3- OCH_3)。以上数据与文献^[20]报道一致,故确定该化合物为 4-羟基-3-甲氧基桂皮酰基- β -D-葡萄糖苷。

化合物 15 为黄色固体粉末;ESI-MS: m/z 625.2 $[M+H]^+$, 结合 ^{13}C NMR 数据得到分子式为 $C_{28}H_{32}O_{16}$; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.94 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.22 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-1'''), 3.94 (3H, s, 3'- OCH_3), 1.08 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6'''); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 158.5 (C-2), 135.5 (C-3), 179.4 (C-4), 163.1 (C-5), 99.9 (C-6), 166.1 (C-7), 94.9 (C-8), 158.9 (C-9), 104.4 (C-10), 123.0 (C-1'), 114.6 (C-2'), 148.3 (C-3'), 150.9 (C-4'), 116.1 (C-5'), 124.0 (C-6'), 56.8 (3'- OCH_3), 104.4 (C-1''), 75.9 (C-2''), 77.4 (C-3''), 71.6 (C-4''), 78.2 (C-5''), 68.5 (C-6''), 102.5 (C-1'''), 72.1 (C-2'''), 72.3 (C-3'''), 73.8 (C-4'''), 69.8 (C-1'''), 17.9 (C-6''')。以上数据与文献^[21]报道一致,故确定该化合物为水仙苷。

化合物 16 为白色固体粉末;ESI-MS: m/z 579.2 $[M-H]^-$, 结合 ^{13}C NMR 数据得到分子式为 $C_{28}H_{36}O_{13}$; $[\alpha]_D^{20} = -8.7$ (c 0.1, CH_3OH); 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 6.66 (2H, s, H-2, H-6), 6.60 (2H, s, H-2', H-6'), 4.89 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 4.66 (2H, m, H-7), 4.61 (2H, m, H-7'), 4.18 (2H, m, H-9), 3.21 (2H, m, H-9'), 3.76 (6H, s, $2 \times OCH_3$), 3.75 (6H, s, $2 \times OCH_3$); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 133.6 (C-1), 104.1 (C-2, 6), 152.6 (C-3, 5), 137.2 (C-4), 85.4 (C-7), 53.7 (C-8), 71.3 (C-9), 131.3 (C-1'), 103.6 (C-2', 6'), 147.9 (C-3', 5'), 134.8 (C-4'), 85.1 (C-7'), 53.6 (C-8'), 71.2 (C-9'), 102.6 (C-1''), 74.2 (C-2''), 76.5 (C-3''), 69.9 (C-4''), 77.2 (C-5''), 60.9 (C-6''), 56.4 ($2 \times OCH_3$), 56.0 ($2 \times OCH_3$)。以上数据与文献^[22]报道一致,故确定该化合物为丁香脂素 4- O - β -D-葡萄糖苷。

化合物 17 为白色固体粉末;ESI-MS: m/z 523.2 $[M+H]^+$, 结合 ^{13}C NMR 数据得到分子式为 $C_{26}H_{34}O_{11}$; $[\alpha]_D^{20} = +24.5$ (c 0.1, CH_3OH); 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 6.80 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.70 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-5), 6.49 (1H, dd, $J = 7.6, 2.0$ Hz, H-6), 6.60 (1H, s, H-2'), 6.07 (1H, s, H-5'), 4.02 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1''), 3.72 (3H, s, 3- OCH_3), 3.70 (3H, s, 3'- OCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 136.4 (C-1), 113.4 (C-2), 146.6 (C-3), 144.0 (C-4), 115.0 (C-5), 120.6 (C-6), 45.0 (C-7), 43.6 (C-8), 67.1 (C-9), 126.5 (C-1'), 111.3 (C-2'), 145.0 (C-3'), 143.5 (C-4'), 115.7 (C-5'), 132.2 (C-6'), 32.0 (C-7'), 37.0 (C-8'), 62.3 (C-9'), 103.6 (C-1''), 73.1 (C-2''), 76.3 (C-3''), 69.5 (C-4''), 76.2 (C-5''), 60.5 (C-6''), 55.1 (3- OCH_3), 55.0 (3'- OCH_3)。以上数据与文献^[23]报道一致,故确定该化合物为异落叶松脂醇 9- O - β -D-葡萄糖苷。

化合物 1~17 的结构见图 2。

2.2 活性测试

抗肿瘤活性测试 (见表 2) 显示,化合物 2~10、13、15~17 对 MDA-MB-231 细胞有一定的抑制作用,其 IC_{50} 值范围为 8.00~79.99 $\mu mol/L$ (顺铂 $IC_{50} = 3.54 \mu mol/L$), 化合物 2~10、16、17 对 MCF-7 细胞有抑制作用, IC_{50} 值范围为 7.29~86.91 $\mu mol/L$ (阳性对照顺铂 $IC_{50} = 23.02 \mu mol/L$)。从抗乳腺癌

肿瘤测试结果来看,大部分生物碱类成分对两种人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 表现出不同程度的增殖抑制作用,苜基异喹啉生物碱 **3**、**4**、**10** 的抑

制作用较显著,可能与其结构中含有氮正离子有关。此外,两种木脂素苷类化合物 **16** 和 **17** 对两种乳腺癌细胞抑制作用也比较明显。

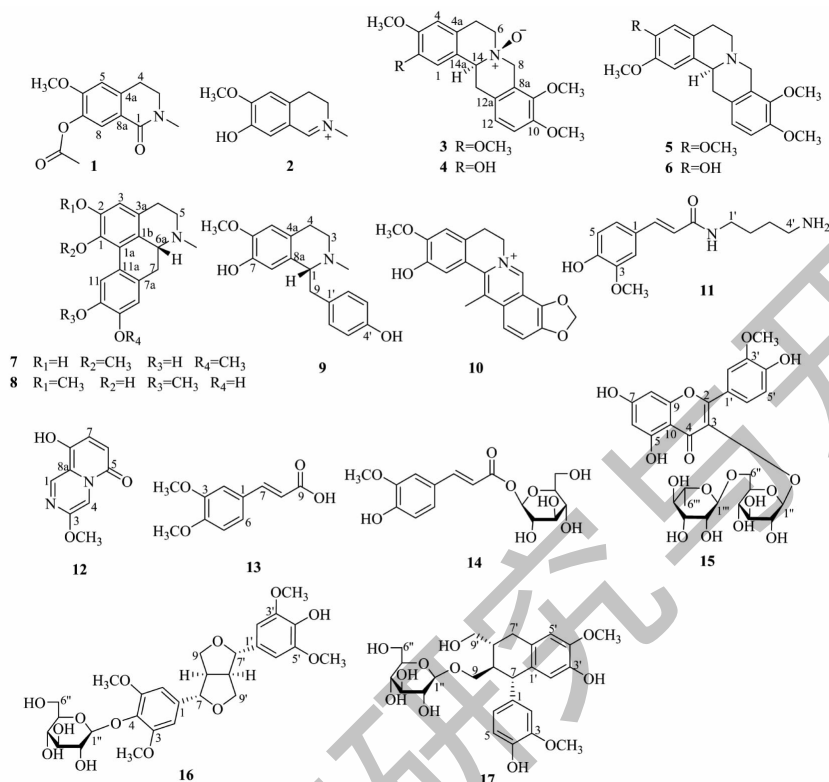


图2 化合物 1~17 的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of compounds 1-17

表2 化合物 1~17 对乳腺癌细胞抑制活性

Table 2 Inhibitory activity of 1-17 on MDA-MB-231 and MCF-7 cells

化合物 Compound	IC ₅₀ (μmol/L)		化合物 Compound	IC ₅₀ (μmol/L)	
	MDA-MB-231	MCF-7		MDA-MB-231	MCF-7
1	> 100	> 100	2	17.43 ± 1.05	27.75 ± 1.59
3	12.08 ± 0.91	11.88 ± 0.40	4	8.18 ± 0.11	8.98 ± 0.42
5	31.21 ± 0.87	17.51 ± 1.24	6	21.87 ± 1.44	> 100
7	11.31 ± 1.41	24.16 ± 1.13	8	18.48 ± 0.99	27.89 ± 0.83
9	54.20 ± 0.95	86.91 ± 3.48	10	8.00 ± 0.12	22.14 ± 2.69
11	> 100	> 100	12	> 100	> 100
13	79.99 ± 7.50	> 100	14	> 100	> 100
15	42.36 ± 0.78	> 100	16	35.33 ± 0.84	22.84 ± 1.30
17	25.68 ± 0.45	7.29 ± 0.73	顺铂 Cisplatin	3.54 ± 0.14	23.02 ± 0.14

3 结论

本实验从房山紫堇 80% 乙醇提取物中(乙酸乙酯和正丁醇)共分离得到 17 个单体化合物,化合物 **1**~**10** 为异喹啉生物碱类成分,**11**、**12** 为其他生物碱

类成分,化合物 **13**、**14** 为苯丙素类成分,化合物 **15** 为黄酮苷类成分,化合物 **16**、**17** 为木脂素苷类成分。其中,化合物 **1** 作为天然产物首次报道,**2**~**17** 是首次从房山紫堇中分离得到。上述分离得到的化合物

与文献报道的紫堇属成分类型基本一致。体外抑制乳腺癌细胞增殖的活性测试结果显示,化合物 **3**、**4**、**7**、**10** 对 MDA-MB-231 具有明显的抑制活性,化合物 **4**、**17** 对 MCF-7 细胞具有明显的抑制活性,其他化合物对上述乳腺癌肿瘤细胞没有表现出抑制作用。活性测试结果来看,大部分苜基异喹啉生物碱类成分都有一定的抑制作用,但是分离得到的生物碱类化合物总体较少,很难对其构效关系进行有效的总结,后续工作可以对一些含量较高的苜基异喹啉生物碱类成分进行结构修饰,然后总结其构效关系。本研究结果对房山紫堇药材药效物质基础的阐明、质量控制及药理作用的进一步深入研究有一定的参考价值。

参考文献

- Chinese Flora Commission. Flora of China; Vol 32(中国植物志:32卷)[M]. Beijing: Science Press, 1999, 424.
- Zhang XF, Wang SC. The Investigation on Qinghai *Corydalis* medicinal plant resources and their exploitation[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 1997, 8: 70-71.
- Deng AP, Zhang Y, Zhou L, et al. Systematic review of the alkaloid constituents in several important medicinal plants of the genus *Corydalis*[J]. Phytochemistry, 2021, 183: 112644.
- 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.
- 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, 2020: 145, 210, 291.
- Zhou YM, Tang J, Xiong SH, et al. Polar chemical constituents from *Prunella vulgaris* L. and their anti-human breast tumor activities[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2017, 52: 362-366.
- Huang WJ, Singh OV, Chen CH, et al. Activation of iodosobenzene by catalytic tetrabutylammonium iodide and its application in the oxidation of some isoquinoline alkaloids[J]. Helv Chim Acta, 2002, 85: 1069-1078.
- Siwon J, Verpoorte R, Beek TV, et al. Alkaloids from *Pycnarhena longifolia*[J]. Phytochemistry, 1981, 20: 323-325.
- Kim DK, Lee KT, Baek NI, et al. Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27: 1127-1131.
- Chen JJ, Duh CY, Chen IS. New tetrahydroprotoberberine N-oxide alkaloids and cytotoxic constituents of *Corydalis tashi-roi*[J]. Planta Med, 1999, 65: 643-647.
- Zuo AX, Ma YS, Rao GX. Alkaloids roots of *Stephania manshanica*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 136-139.
- Sun YT, Wang AL, Li DH, et al. Nitrogenous chemical constituents from *Tinosporae Radix*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46: 1287-1291.
- Yang XL, Yang YP, Ge YW, et al. Chemical constituents in chloroform fraction of *Houttuynia cordata*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44: 314-318.
- Chi PN, Sykes MJ, Claudie DJ, et al. Antiproliferative aporphine alkaloids from *Litsea glutinosa* and ethnopharmacological relevance to Kuuku I'yu traditional medicine[J]. Aust J Chem, 2015, 69: 145-151.
- Chaichompoo W, Chokchaisiri R, Apiratikul N, et al. Cytotoxic alkaloids against human colon adenocarcinoma cell line (HT-29) from the seed embryos of *Nelumbo nucifera*[J]. Med Chem Res, 2018, 27: 939-943.
- Wu YR, Ma YB, Zhao YX, et al. Anti-hepatitis virus constituents from *Corydalis saxicola*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43: 32-37.
- Taiji N, Mai S, Shinjiro O, et al. Occurrence of hydroxycinnamoylputrescines in xylogenic bamboo suspension cells[J]. Plant Biotechnol, 2013, 30: 447-453.
- Li JF, Xu YK. Constituents from the leaves and twigs of *Amoora ouangliensis* and their anti-inflammatory activities[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 1361-1366.
- Wang RR, Gu Q, Wang YH, et al. Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis*[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 117: 249-256.
- Cao YG, Ren YJ, Hao ZY, et al. Chemical constituents from the ethyl acetate fraction of *Gardenia jasminoides* var. *radicana*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2022, 34: 413-419.
- Monsef-Esfahani HR, Hajiaghaee R, Shahverdi AR, et al. Flavonoids, cinnamic acid and phenyl propanoid from aerial parts of *Scrophularia striata*[J]. Pharm Biol, 2010, 48: 333-336.
- Ma YP, Zhang HX, Sun G, et al. Chemical constituents from *Adenosma buchneroides*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 1376-1381, 1398.
- Zhao CC, Shao JH, Li X. Chemical constituents from fruits of *Ailanthus altissima*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34: 2197-2199.