

苦藟的化学成分及其细胞毒活性研究

樊佳佳^{1,2}, 郑希龙³, 夏欢¹, 佟永春¹, 刘霞^{2*}, 孙奕^{1*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 湖北 武汉 430070

3. 中国医学科学院药用植物研究所海南分所, 海南 万宁 571100

摘要: 目的 对酸浆属植物苦藟 *Physalis angulata* 的全草进行化学成分及肿瘤细胞毒活性研究。方法 运用硅胶、Sephadex LH-20 凝胶等柱色谱和 HPLC 等方法, 并结合液质联用分析技术, 采用活性跟踪的方法从苦藟全草中分离细胞毒活性成分。根据理化常数测定和各种谱学 (1D 和 2D NMR、MS) 数据分析等鉴定化合物结构, MTT 法测定化合物的细胞毒活性。结果 从苦藟全草的 95% 乙醇水提取物中共分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为酸浆苦素 A (1)、酸浆苦素 B (2)、酸浆苦素 C (3)、酸浆苦素 D (4)、酸浆苦素 F (5)、酸浆苦素 H (6)、酸浆苦素 I (7)、5 α -乙氧基-6 β -羟基-5,6-二氢酸浆苦素 B (8)、酸浆苦素 O (9)、 β -谷甾醇 (10)、2-羧基苯胺羧酸甲酯 (11)、2-(乙酰胺基)-苯甲酸 (12)。结论 化合物 11 为新天然产物, 化合物 1~3、9 为首次从苦藟中分得, 化合物 1~9 为酸浆苦素类 (physalins) 甾体化合物。细胞毒活性实验结果显示, 化合物 1~9 对肺癌细胞株 A549 均具有较强的增殖抑制活性, 其中以 2、3、6、8 的抑制活性最为显著, 其 IC₅₀ 值为 1.9~20.2 μ mol/L。

关键词: 酸浆属; 苦藟; 酸浆苦素; 酸浆苦素 B; 5 α -乙氧基-6 β -羟基-5,6-二氢酸浆苦素 B; 2-羧基苯胺羧酸甲酯

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)06-1080-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.005

Chemical constituents from whole herb of *Physalis angulata* and their cytotoxic activity

FAN Jia-jia^{1,2}, ZHENG Xi-long³, XIA Huan¹, TONG Yong-chun¹, LIU Xia², SUN Yi¹

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

3. Hainan Branch Institute of Medical Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Wanning 571100, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from whole herb of *Physalis angulata* and test their cytotoxic activity.

Methods Compounds were isolated by chromatography methods and LC-MS guided analysis, structures were determined by spectroscopic techniques of 1D- and 2D-NMR (HSQC, HMBC, ¹H-¹H COSY, and NOESY), cytotoxic activity experiments were conducted by MTT method. **Results** Twelve compounds were identified as physalins A (1), B (2), C (3), D (4), F (5), H (6), I (7), O (9), 5 α -ethoxy-6 β -hydroxy-5,6-dihydrophysalin B (8), β -sitosterol (10), 2-carboxyxanilic acid methyl ester (11), and acetaminobenzoic acid (12). **Conclusion** Among these compounds, compound 11 is a new natural product. Compounds 1—3 and 9 are firstly obtained from *P. angulata*. All compounds are tested for their inhibitory activities against human lung adenocarcinoma strain A-549, with IC₅₀ values of 1.9—20.2 μ mol/L, which indicates good cytotoxic activity of these physalins.

Key words: *Physalis* L.; *Physalis angulata* L.; physalin; physalin B; 5 α -ethoxy-6 β -hydroxy-5,6-dihydrophysalin B; 2-carboxyxanilic acid methyl ester

苦藟 *Physalis angulata* L. 为茄科酸浆属植物, 集中于我国东部至西南部。苦藟的果实可供食用, 大多分布于美洲热带地区, 在我国分布较少, 主要 其全草具有清热解毒、镇痛、利尿之功效, 常用于

收稿日期: 2016-09-25

作者简介: 樊佳佳 (1991—), 女, 在读硕士生, 研究方向为天然产物活性成分研究。E-mail: 1498153451@qq.com

*通信作者 孙奕 (1975—), 女, 副研究员, 主要从事天然产物活性成分研究。E-mail: ysun@icmm.ac.cn

刘霞 (1973—), 女, 副教授, 研究方向为中药资源鉴定。E-mail: lrx1125@126.com

治疗疟疾、哮喘、咽炎、前列腺炎、慢性乙肝、消化和肠道疾病等症^[1-2]。苦藨曾以民间偏方使用较多，而在药材市场流通销售极少。目前国内少有研究其化学成分及其药理活性的报道^[3-4]；有研究表明，迄今为止苦藨中已有 60 余种不同结构和不同骨架的甾体类次级代谢产物，大体可分为 3 类：酸浆苦素类 (physalins)、睡茄内酯类 (withanolides)、魏察酸浆苦素类 (withaphysalins)，其中多数甾体化合物在抗菌消炎、细胞毒、细胞免疫及抗肿瘤方面均表现出显著的生物学活性^[5-11]。酸浆苦素类化合物具有 13,14-裂环-16,24-环麦角甾烷型的基本结构，因其具有淡淡的苦味，故得名为酸浆苦素。为了更加深入地研究苦藨中所含该类化合物及其生物活性，本实验通过运用活性跟踪分离的方法，采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、HPLC 等从苦藨全草的 95%乙醇水提取物中分离得到 12 个化合物（部分结构见图 1），经理化常数测定和各

种谱学（1D 和 2D NMR、MS）数据分析等鉴定其结构分别为酸浆苦素 A (physalin A, 1)、酸浆苦素 B (physalin B, 2)、酸浆苦素 C (physalin C, 3)、酸浆苦素 D (physalin D, 4)、酸浆苦素 F (physalin F, 5)、酸浆苦素 H (physalin H, 6)、酸浆苦素 I (physalin I, 7)、5 α -乙氧基-6 β -羟基-5,6-二氢酸浆苦素 B (5 α -ethoxy-6 β -hydroxy-5,6-dihydrophysalin B, 8)、酸浆苦素 O (physalin O, 9)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, 10)、2-羧基苯胺羧酸甲酯 (2-carboxyoxanilic acid methyl ester, 11)、2-(乙酰胺基)-苯甲酸 (acetaminobenzoic acid, 12)。其中，化合物 11 为新天然产物，化合物 1~3、9 为首次从苦藨中分得；化合物 1~9 为酸浆苦素类 (physalins) 甾体化合物。细胞毒活性实验结果显示化合物 1~9 对人肺癌细胞株 A549 均具有较强的增殖抑制活性，其中以 2、3、6、8 的抑制活性最为显著，其 IC₅₀ 值分别为 2.0、20.2、1.9、7.6 μ mol/L。

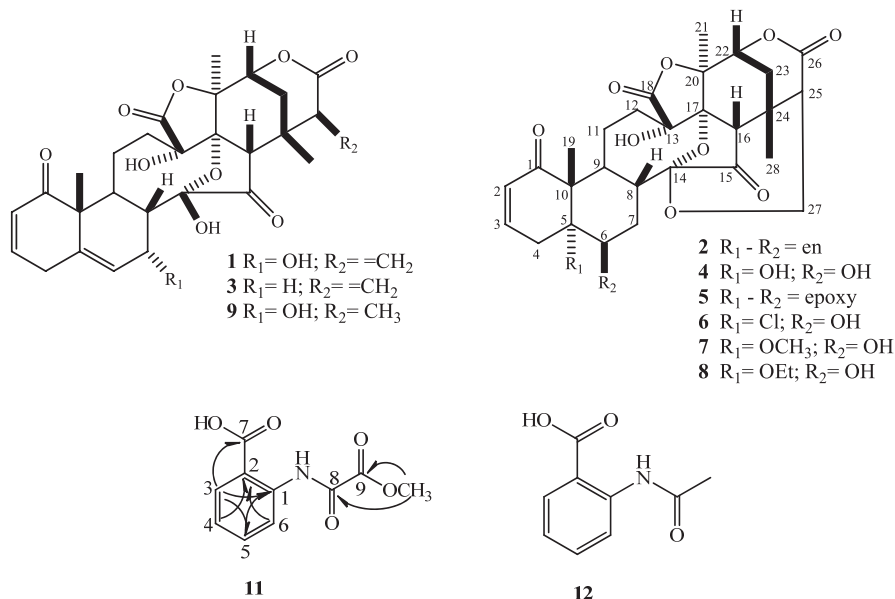


图 1 化合物 1~9、11、12 的结构及 11 的主要 HMBC 相关

Fig. 1 Structures of compounds 1—9, 11, 12 and HMBC correlations of compound 11

1 材料

LTQ Orbitrap velos pro 质谱仪（高分辨静电场轨道阱质谱，ESI 源），Thermo Fisher；Xcalibur 3.0，Metworks 1.3 和 Mass Frontier 7.0 软件用于数据采集和数据分析。Bruker ARX-600 型核磁共振波谱仪，瑞士 Bruker；Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱仪；薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄、柱色谱用硅胶（200~300 目），青岛海洋化工有限公司生产；凝胶 Sephadex LH-20，瑞士 Pharmacia 公司生产。所用

试剂甲醇（色谱纯）为天津康科德科技有限公司产品，其他试剂（分析纯）为北京化工厂产品。

苦藨全草于 2013 年 7 月采自海南，由中国中医科学院中药研究所生物中心提供，经该中心郑希龙副研究员鉴定为苦藨 *Physalis angulata* L.，标本（KZ201308）现存于中国中医科学院中药研究所。

2 提取与分离

将苦藨全草（6.2 kg）碾碎，用 95%乙醇水回流提取 3 次，每次 2 h。合并提取液后，减压回收溶

剂。总提取物加入适量的水混悬分散,依次用三氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇萃取,萃取液浓缩后,得三氯甲烷层浸膏 194 g。将三氯甲烷层样品以硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(100:0→0:100)梯度洗脱,得组分 KZ1~KZ45。经 TLC 薄层色谱分析,将成分相似组分合并得到 K1~K11。对 K3 部分进行正相硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-丙酮(40:1)洗脱后,得化合物 **2** (50 mg);对 K4 部分进行重结晶,得到化合物 **10** (21 mg);以二氯甲烷-丙酮(25:1)洗脱部分再通过制备型 HPLC (30%~50%乙腈-水)纯化得化合物 **3** (2.5 mg)、**5** (5.8 mg)、**9** (2.8 mg) 和 **12** (2 mg)。对 K4 部分过硅胶柱色谱(石油醚-醋酸乙酯-丙酮 8:0.5:0.5、6:0.5:0.5、4:0.5:0.5、2:0.5:0.5 和醋酸乙酯-丙酮 1:1)梯度洗脱,对醋酸乙酯-丙酮(10:3)洗脱组分进行 Sephadex LH-20 柱色谱除色素(二氯甲烷-甲醇 1:1),再对所得组分通过制备型 HPLC (40%~60%甲醇-水)梯度洗脱,得化合物 **1** (4.8 mg)、**6** (3.0 mg)、**7** (2.7 mg) 和 **8** (15.6 mg)。对 K7 部分过硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇(100:3、100:5、100:7、100:9)进行梯度洗脱,所得各组分通过 TLC 薄层色谱法点板合并后,通过制备型 HPLC (35%~55%甲醇-水)纯化,得化合物 **4** (5.5 mg) 和 **11** (3.4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 527.11 $[M+H]^+$, 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.08 (3H, s, CH₃-19), 1.10 (1H, m, H-11 β), 1.52 (3H, s, CH₃-28), 1.72 (3H, s, CH₃-21), 1.79 (1H, m, H-8), 1.86 (1H, m, H-12 β), 2.08 (1H, m, H-23 β), 2.10 (1H, m, H-23 α), 2.18 (1H, m, H-11 α), 2.21 (1H, m, H-12 α), 2.80 (1H, m, H-9), 2.81 (1H, m, H-4 α), 2.83 (1H, s, H-16), 3.21 (1H, brd, J = 21.8 Hz, H-4 β), 4.48 (1H, m, H-22), 4.52 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-7), 5.07 (1H, d, J = 2.1 Hz, 7-OH), 5.55 (1H, s, 13-OH), 5.58 (1H, s, H-27 β), 5.59 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-6), 5.66 (1H, dd, J = 2.1, 10.8 Hz, H-2), 6.36 (1H, s, 14-OH), 6.38 (1H, s, H-27 α), 6.58 (1H, m, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[12-13], 确定化合物 **1** 为酸浆苦素 A。

化合物 **2**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 511.11 $[M+H]^+$, 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.09 (3H, s, CH₃-19), 1.16 (3H, s, CH₃-28), 1.78 (3H, s, CH₃-21),

2.16 (1H, m, H-12 α), 2.87 (1H, s, H-16), 2.88 (1H, d, J = 4.4 Hz, H-25), 3.17 (2H, d, J = 6.0 Hz, H-4), 3.60 (1H, dd, J = 13.2, 1.1 Hz, H-27 β), 4.25 (1H, dd, J = 13.2, 4.4 Hz, H-27 α), 4.57 (1H, m, H-22), 5.58 (1H, brd, J = 6.2 Hz, H-6), 5.80 (1H, dd, J = 10.0, 2.0 Hz, H-2), 6.30 (1H, s, 13-OH), 6.89 (1H, ddd, J = 17.1, 2.0, 2.0 Hz, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[14], 确定化合物 **2** 为酸浆苦素 B。

化合物 **3**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 511.06 $[M+H]^+$, 1H -NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 1.21 (3H, s, CH₃-19), 1.26 (1H, m, H-11 β), 1.60 (3H, s, CH₃-28), 1.98 (3H, s, CH₃-21), 2.13 (1H, m, H-12 α), 2.65 (1H, m, H-4 α), 2.89 (1H, brd, J = 15.0 Hz, H-4 β), 2.90 (1H, s, H-16), 3.26 (1H, m, H-9), 3.29 (1H, m, H-8), 4.58 (1H, m, H-22), 5.61 (1H, d, J = 6.1 Hz, H-6), 5.75 (1H, s, 13-OH), 5.76 (1H, s, H-27 α), 5.85 (1H, brd, J = 9.7 Hz, H-2), 6.69 (1H, s, H-27 β), 6.69 (1H, s, 14-OH), 6.77 (1H, m, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[15], 确定化合物 **3** 为酸浆苦素 C。

化合物 **4**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 545.20 $[M+H]^+$, 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.93 (1H, m, H-11), 1.10 (3H, s, CH₃-19), 1.16 (3H, s, CH₃-28), 1.44 (1H, dd, J = 16.0, 10.1 Hz, H-12 β), 1.77 (1H, m, H-7 α), 1.80 (3H, s, CH₃-21), 1.81 (1H, m, H-7 β), 1.92 (1H, brd, J = 14.8 Hz, H-23 β), 1.97 (1H, dd, J = 19.0, 4.9 Hz, H-4 α), 2.09 (1H, m, H-12 α), 2.10 (1H, dd, J = 14.6, 3.7 Hz, H-23 α), 2.19 (1H, td, J = 11.3, 4.3 Hz, H-8), 2.79 (1H, s, H-16), 2.88 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-25), 3.10 (1H, brd, J = 19.0 Hz, H-4 β), 3.11 (1H, m, H-9), 3.48 (1H, m, H-6), 3.57 (1H, d, J = 13.3 Hz, H-27 β), 4.24 (1H, dd, J = 13.1, 4.3 Hz, H-27 α), 4.23 (1H, s, 5-OH), 4.57 (1H, m, H-22), 4.90 (1H, d, J = 3.5 Hz, 6-OH), 5.69 (1H, dd, J = 10.0, 2.1 Hz, H-2), 5.77 (1H, s, 13-OH), 6.62 (1H, ddd, J = 10.0, 4.9, 2.1 Hz, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[16], 确定化合物 **4** 为酸浆苦素 D。

化合物 **5**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 527.53 $[M+H]^+$, 1H -NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 1.20 (1H, m, H-11 β), 1.26 (3H, s, CH₃-19), 1.31 (3H, s, CH₃-28), 1.84 (1H, dd, J = 10.8, 15.6 Hz, H-12 β), 1.95 (3H, s, CH₃-21), 1.98 (1H, m, H-4 α), 2.16 (1H, brd, J = 13.8

表 1 化合物 1~9 的 ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱数据
Table 1 ^{13}C -NMR and DEPT data of compounds 1—9

碳位	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^a	5 ^b	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a
1	203.4, C	202.4, C	204.9, C	204.3, C	206.1, C	200.3, C	203.4, C	204.6, C	202.1, C
2	127.2, CH	126.9, CH	127.4, CH	127.3, CH	128.0, CH	127.2, CH	127.8, CH	127.6, CH	127.0, CH
3	142.9, CH	146.2, CH	146.1, CH	142.9, CH	146.6, CH	142.9, CH	141.2, CH	141.8, CH	146.7, CH
4	30.9, CH ₂	32.3, CH ₂	33.0, CH ₂	35.2, CH ₂	33.6, CH ₂	36.9, CH ₂	35.6, CH ₂	27.8, CH ₂	32.2, CH ₂
5	139.2, C	135.6, C	139.7, C	76.4, C	62.0, C	82.4, C	81.8, C	81.4, C	139.5, C
6	127.5, CH	123.4, CH	125.0, CH	72.6, CH	65.2, CH	72.7, CH	66.2, CH	66.7, CH	127.0, CH
7	61.3, CH	24.4, CH ₂	27.2, CH ₂	26.7, CH ₂	25.0, CH ₂	26.8, CH ₂	26.8, CH ₂	27.0, CH ₂	61.5, CH
8	46.5, CH	40.2, CH	42.6, CH	38.3, CH	37.6, CH	38.4, CH	37.9, CH	38.1, CH	46.3, CH
9	29.2, CH	33.1, CH	34.3, CH	30.5, CH	34.4, CH	30.9, CH	30.0, CH	29.7, CH	29.2, CH
10	54.0, C	52.0, C	54.7, C	54.0, C	51.0, C	54.4, C	53.9, C	54.2, C	54.1, C
11	24.0, CH ₂	24.2, CH ₂	24.4, CH ₂	24.8, CH ₂	23.8, CH ₂	24.4, CH ₂	24.9, CH ₂	24.7, CH ₂	23.5, CH ₂
12	29.3, CH ₂	25.7, CH ₂	29.5, CH ₂	25.8, CH ₂	25.9, CH ₂	25.8, CH ₂	25.9, CH ₂	25.8, CH ₂	29.8, CH ₂
13	82.1, C	78.2, C	82.1, C	78.7, C	79.7, C	78.4, C	78.5, C	78.9, C	82.3, C
14	101.6, C	106.3, C	102.5, C	106.9, C	107.2, C	106.4, C	106.7, C	106.9, C	101.0, C
15	213.8, C	209.4, C	211.8, C	209.9, C	207.7, C	209.8, C	209.9, C	209.9, C	216.1, C
16	52.8, CH	54.1, CH	53.7, CH	54.0, CH	56.5, CH	53.8, CH	54.1, CH	54.2, CH	53.3, CH
17	79.0, C	80.7, C	80.1, C	80.5, C	80.2, C	80.9, C	80.5, C	80.5, C	79.5, C
18	172.2, C	171.8, C	172.5, C	171.8, C	172.3, C	171.6, C	171.9, C	171.9, C	171.9, C
19	13.3, CH ₃	16.8, CH ₃	17.4, CH ₃	13.3, CH ₃	15.9, CH ₃	14.1, CH ₃	13.7, CH ₃	13.5, CH ₃	14.0, CH ₃
20	82.3, C	80.3, C	82.9, C	80.7, C	81.2, C	80.5, C	80.7, C	80.5, C	82.2, C
21	21.0, CH ₃	21.7, CH ₃	21.3, CH ₃	21.7, CH ₃	21.6, CH ₃	21.7, CH ₃	21.7, CH ₃	21.1, CH ₃	21.4, CH ₃
22	76.2, CH	76.3, CH	77.2, CH	76.4, CH	77.1, CH	76.3, CH	76.4, CH	76.3, CH	76.4, CH
23	30.8, CH ₂	31.4, CH ₂	31.8, CH ₂	31.3, CH ₂	33.2, CH ₂	31.3, CH ₂	31.3, CH ₂	31.3, CH ₂	26.0, CH ₂
24	35.0, C	30.5, C	36.8, C	30.5, C	31.3, C	30.5, C	30.5, C	30.5, C	34.5, C
25	138.5, C	49.4, CH	134.9, C	49.4, CH	50.3, CH	49.3, CH	49.5, CH	49.4, CH	40.8, CH
26	161.9, C	167.3, C	164.1, C	167.3, C	166.8, C	167.3, C	167.4, C	167.4, C	172.0, C
27	131.6, CH ₂	60.6, CH ₂	133.3, CH ₂	60.5, CH ₂	60.9, CH ₂	60.6, CH ₂	60.5, CH ₂	60.6, CH ₂	171.9, CH ₃
28	26.8, CH ₃	24.5, CH ₃	26.1, CH ₃	24.5, CH ₃	26.7, CH ₃	24.4, CH ₃	24.5, CH ₃	24.5, CH ₃	25.1, CH ₃
OCH ₃							49.4		
CH ₃ -OCH ₂								15.6	
OCH ₂ -CH ₃								56.3	

a-DMSO-*d*₆ 为溶剂 (150 MHz); b-CDCl₃ 为溶剂 (150 MHz)

a-presents DMSO-*d*₆ (150 MHz); b-presents CDCl₃ (150 MHz)

Hz, H-23 α), 2.44 (1H, d, J = 4.2 Hz, H-23 β), 2.59 (1H, m, H-8), 2.64 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-25), 2.90 (1H, s, H-16), 3.00 (1H, brd, J = 21.0 Hz, H-4 β), 3.27 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-6), 3.75 (1H, d, J = 13.2 Hz, H-27 β), 4.52 (1H, dd, J = 13.8, 6.0 Hz, H-27 α), 4.55 (1H, m, H-22), 5.76 (1H, s, 13-OH), 6.04 (1H, dd, J = 10.2, 2.4 Hz, H-2), 6.85 (1H, ddd, J = 10.0, 5.0, 2.0

Hz, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[17-18], 确定化合物 **5** 为酸浆苦素 F。

化合物 **6**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 563.16 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.16 (3H, s, CH₃-28), 1.23 (3H, s, CH₃-19), 1.80 (3H, s, CH₃-21), 1.93 (1H, dd, J = 15.0, 1.8 Hz, H-23 α), 1.96 (1H, m, H-7 α), 2.10 (1H, dd, J = 14.7, 3.5 Hz, H-23 β), 2.26

(1H, m, H-8), 2.46 (1H, dd, $J = 20.5, 5.1$ Hz, H-4 α), 2.82 (1H, s, H-16), 2.89 (1H, brd, $J = 3.6$ Hz, H-25), 3.47 (1H, td, $J = 20.6, 2.4$ Hz, H-4 β), 3.58 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-27 β), 3.88 (1H, dt, $J = 4.0, 2.5$ Hz, H-6), 4.26 (1H, dd, $J = 13.4, 4.4$ Hz, H-27 α), 4.56 (1H, dd, $J = 2.5, 3.1$ Hz, H-22), 5.66 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, 6-OH), 5.82 (1H, dd, $J = 10.6, 2.6$ Hz, H-2), 6.06 (1H, s, 13-OH), 6.78 (1H, ddd, $J = 16.0, 2.6, 2.4$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[19-20], 确定化合物 **6** 为酸浆苦素 H。

化合物 **7**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 559.12 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.95 (1H, m, H-11), 1.15 (3H, s, CH₃-19), 1.16 (3H, s, CH₃-28), 1.43 (1H, dd, $J = 16.3, 10.0$ Hz, H-12), 1.60 (1H, m, H-7 α), 1.80 (3H, s, CH₃-21), 1.83 (1H, m, H-7 β), 1.92 (1H, dd, $J = 14.3, 1.7$ Hz, H-23 α), 2.09 (1H, dd, $J = 14.5, 3.8$ Hz, H-23 β), 2.20 (1H, m, H-8), 2.36 (1H, dd, $J = 20.2, 5.1$ Hz, H-4 α), 2.78 (1H, s, H-16), 2.88 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-25), 2.91 (1H, brd, $J = 11.0$ Hz, H-4 β), 2.91 (3H, s, OCH₃), 3.58 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-27 β), 3.81 (1H, s, H-6), 4.24 (1H, dd, $J = 13.4, 4.4$ Hz, H-27 α), 4.56 (1H, m, H-22), 5.55 (1H, s, 13-OH), 5.69 (1H, dd, $J = 10.0, 3.0$ Hz, H-2), 5.81 (1H, s, 6-OH), 6.64 (1H, m, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[21], 确定化合物 **7** 为酸浆苦素 I。

化合物 **8**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 573.23 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH₃CH₂O), 0.95 (1H, m, H-11 β), 1.14 (3H, s, CH₃-19), 1.16 (3H, s, CH₃-28), 1.47 (1H, m, H-12 β), 1.65 (1H, m, H-7 α), 1.79 (1H, m, H-11 α), 1.80 (3H, s, CH₃-21), 1.83 (1H, m, H-7 β), 1.92 (1H, dd, $J = 14.5, 1.7$ Hz, H-23 α), 2.10 (1H, m, H-12 α), 2.10 (1H, dd, $J = 14.5, 3.6$ Hz, H-23 β), 2.18 (1H, m, H-8), 2.33 (1H, dd, $J = 20.2, 4.9$ Hz, H-4 α), 2.78 (1H, s, H-16), 2.87 (1H, brd, $J = 4.0$ Hz, H-25), 2.93 (1H, brd, $J = 20.2$ Hz, H-4 β), 3.03 (1H, m, OCH₂Me-a), 3.23 (1H, m, OCH₂Me-b), 3.58 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-27 β), 3.82 (1H, brs, H-6 α), 4.25 (1H, dd, $J = 13.3, 4.4$ Hz, H-27 α), 4.56 (1H, dd, $J = 3.2, 2.3$ Hz, H-22), 5.55 (1H, s, 13-OH), 5.72 (1H, dd, $J = 10.0, 2.8$ Hz, H-2), 6.64 (1H, ddd, $J = 10.0, 4.9, 2.8$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的

基本一致^[21], 确定化合物 **8** 为 5 α -乙氧基-6 β -羟基-5,6-二氢酸浆苦素 B。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 529.32 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.03 (3H, s, CH₃-19), 1.14 (1H, m, H-11 β), 1.15 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, CH₃-27), 1.30 (3H, s, CH₃-28), 1.68 (3H, s, CH₃-21), 1.78 (1H, brd, $J = 14.7$ Hz, H-23 β), 1.88 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, H-8), 1.94 (1H, m, H-12 β), 2.02 (1H, dd, $J = 14.7, 4.0$ Hz, H-23 α), 2.08 (1H, m, H-8), 2.21 (1H, m, H-12 α), 2.59 (1H, q, $J = 7.5$ Hz, H-25), 2.92 (1H, dd, $J = 21.0, 4.7$ Hz, H-4 α), 2.96 (1H, s, H-16), 3.01 (1H, dd, $J = 11.5, 9.2$ Hz, H-9), 3.26 (1H, brd, $J = 21.0$ Hz, H-4 β), 4.50 (1H, dd, $J = 5.7, 4.2$ Hz, H-7), 4.53 (1H, m, H-22), 5.02 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, 7-OH), 5.58 (1H, s, 13-OH), 5.72 (1H, d, $J = 6.1$ Hz, H-6), 5.84 (1H, dd, $J = 9.7, 1.8$ Hz, H-2), 6.84 (1H, s, 14-OH), 6.94 (1H, m, H-3); ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[22], 确定化合物 **9** 为酸浆苦素 O。

化合物 **10**: 白色针状结晶 (三氯甲烷), 体积分数为 10% 硫酸乙醇试剂显紫红色斑点。与 β -谷甾醇对照品共薄层, 3 种溶剂展开系统中的 R_f 值相同, 混合后熔点不降, 故确定化合物 **10** 为 β -谷甾醇。

化合物 **11**: 白色粉末, ESI-MS 给出 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 峰为 m/z 224.06, 由 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) 数据可知, 该化合物含 1 个连氧甲基 (δ_{C} 46.73), 1 个苯环 (δ_{C} 119.7, 120.7, 123.4, 132.3, 134.6, 142.7), 3 个羰基 (δ_{C} 166.3, 171.0, 172.2)。由 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) 数据推断该化合物含有 1 个羧基 δ_{H} 12.64 (1H, s, 7-COOH), 结合以上数据推断其分子式为 C₁₀H₉NO₅。利用 HSQC 谱对化合物的氢、碳进行相应归属 (表 2); 在 HMBC 谱 (图 1) 中, δ_{H} 8.46 (H-3) 分别与 C-1 (δ 142.7), C-5 (δ 134.6) 和 C-7 (δ 172.2) 相关, 从而得知 C-7 位为羧基与苯环相连; δ_{H} 3.96 (-OCH₃) 与另外 2 个羰基 C-8 (δ 166.3) 和 C-9 (δ 171.0) 相关, 结合 2 个取代基的化学位移值特征, 推断该甲氧基依次与 9 位羰基和 8 位酰胺基相连, 且 C-1 位与 8 位酰胺基连接。综上所述, 该化合物具有二酮酰胺结构, 为 2-羧基苯胺羧酸甲酯。经查阅文献, 该化合物为合成反应中的中间产物^[23], 本实验从天然界首次鉴定, 为新天然产物。

化合物 **12**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 180.07 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.09 (3H, s,

表 2 化合物 11 的氢、碳谱数据 (DMSO- d_6)

Table 2 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 11 (DMSO- d_6)

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1		142.7
2		119.7
3	8.46 (1H, d, $J = 6.1$ Hz)	132.3
4	7.15 (1H, t, $J = 6.1$ Hz)	123.4
5	7.53 (1H, t, $J = 6.2$ Hz)	134.6
6	9.22 (1H, d, $J = 6.0$ Hz)	120.7
7		172.2
8		166.3
9		171.0
-OCH ₃	3.96 (3H, s)	47.0
-NH	10.87 (1H, s)	
-OH	12.64 (1H, s)	

CH₃-2), 7.04 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-5), 7.42 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-4), 7.98 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 8.45 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3), 12.47 (1H, s, -OH); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 25.08 (C-9), 116.1 (C-3), 119.1 (C-1), 121.9 (C-5), 131.1 (C-6), 132.1 (C-4), 140.8 (C-2), 168.1 (-COCH₃), 169.5 (-COOH)。以上波谱数据与文献报道的基本一致^[24], 确定化合物 12 为 2-(乙酰胺基)-苯甲酸。

4 细胞毒活性实验

将非小细胞肺癌 A549 细胞株 (购自中国医学科学院基础医学研究所协和细胞库) 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度环境下培养于含 10% 胎牛血清的完全培养基, 待细胞呈对数增长时铺板, 调整细胞悬液浓度至 1×10^4 个/mL, 在 96 孔培养板中每孔加入 200 μL 细胞悬液。待细胞贴壁生长 24 h 后, 加入 12 个待测样品及阳性对照药阿霉素 (ADM)、阴性对照组及空白组, 同时加入等体积含 1% DMSO 的生理盐水, 与细胞共同孵育 72 h 后, 加入终浓度 0.5 g/mL MTT 溶液, 继续培养 4 h。吸弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 置摇床上振荡 10 min, 待其充分溶解后于酶标仪下检测 570 nm 波长处各孔的吸光度 (A) 值, 计算各化合物的细胞抑制率及 IC₅₀ 值。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

化合物 1~12 的 IC₅₀ 值见表 3, 结果显示, 在 12 个单体化合物中, 化合物 1~9 均表现出对 A549 细胞株体外增殖的抑制作用, 化合物 10、11、12 则无明显细胞毒活性。其中化合物 2、3、6、8 对 A549 细胞株的细胞毒活性尤为显著。

表 3 化合物 1~12 的细胞毒活性结果

Table 3 IC₅₀ of compounds isolated from whole herb of *P. angulata*

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	67.7	8	7.6
2	2.0	9	53.2
3	20.2	10	98.1
4	74.8	11	402.6
5	20.7	12	244.1
6	1.9	ADM	0.38
7	52.9		

5 讨论

酸浆属植物苦蕒 *P. angulata* 中富含甾体类化合物, 该类化合物在抗菌消炎、细胞毒、细胞免疫及抗肿瘤方面表现出显著生物活性, 迄今为止, 国内对其化学成分及其药理活性的研究较少, 本实验通过对苦蕒全草进行提取分离, 鉴定出 12 个化合物, 包括 10 个甾体化合物和 1 个新天然产物。细胞毒活性结果表明, 酸浆苦素类化合物对肺癌 A549 细胞株均表现出显著的体外增殖抑制作用, 为开发有潜力的抗癌新药提供了物质基础; 此外, 通过查阅文献, 发现国内外文献中对酸浆苦素 C 以及新天然产物 2-羧基苯胺羧酸甲酯的详细 NMR 谱数据均无报道, 因此, 本实验归属了酸浆苦素 C 的详细谱学数据以及 2-羧基苯胺羧酸甲酯的 1D-和 2D-NMR 核磁数据作为补充, 以供参考。

参考文献

- [1] Maldonado E, Hurtado N E, Pérez-Castorena A L, et al. Cytotoxic 20,24-epoxywithanolides from *Physalis angulata* [J]. *Steroids*, 2015, 104: 72-78.
- [2] Huang C, Xu Q M, Chen C, et al. The rapid discovery and identification of physalins in the calyx of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem mass spectrometry together with a novel three-step data mining strategy [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1361: 139-152.
- [3] 杨燕军, 陈梅果, 胡玲, 等. 苦蕒的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(20): 1715-1718.
- [4] 贺庆平. 苦蕒中 Withanolide 型化合物的化学成分研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- [5] Chen L X, He H, Qiu F. Natural withanolides: an overview [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(4): 705-740.
- [6] Choudhary M. I, Yousaf S, Ahmed S, et al. Antileishmanial physalins from *Physalis minima* [J].

- Chem Biodivers*, 2005, 2(9): 1164-1171.
- [7] Abe F, Nagafuji S, Okawa M, *et al.* Trypanocidal constituents in plants 6, Minor withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(8): 1226-1228.
- [8] He Q P, Ma L, Luo J Y, *et al.* Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* L. [J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(3): 443-449.
- [9] Lee S W, Pan M H, Chen C M, *et al.* Withangulatin I, a new cytotoxic withanolide from *Physalis angulata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(2): 234-236.
- [10] Jin Z, Mashuta M S, Stolorow N J, *et al.* Physangulidines A, B, and C: Three new antiproliferative withanolides from *Physalis angulata* L. [J]. *Org Lett*, 2012, 14(5): 1230-1233.
- [11] Reyes-Reyes E M, Jin Z, Vaisberg A J, *et al.* Physangulidine A, a withanolide from *Physalis angulata*, Perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(1): 2-7.
- [12] 林 峰, 王金辉. 锦灯笼中酸浆苦素类化学成分的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(6): 470-471.
- [13] 幸 福, 蒋建勤. 锦灯笼的化学成分研究 [J]. *药学与临床研究*, 2013, 21(4): 344-345.
- [14] 许 枏, 王 冰, 周 翎, 等. 酸浆化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(2): 175-178.
- [15] Kawai M, Matwura T. The structure of physalis C a bitter principle of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* [J]. *Tetrahedron*, 1970, 26(7): 1743-1745.
- [16] Row L R, Reddy K S, Sarma N S, *et al.* New Physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. Structure and reaction of physalins D, I, G and K [J]. *Phytochemistry*, 1980, 19(6): 1175-1178.
- [17] Fang L Q, Chai H B, Castillo J J, *et al.* Cytotoxic constituents of *Brachistus stramonifolius* [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(5): 520-523.
- [18] Janua'rio A H, Filho E R, Pietro R C L R, *et al.* Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae) [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(5): 445-448.
- [19] Makino B, Kawai M, Ogura T, *et al.* Structure revision of physalin H isolated from *Physalis angulata* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(11): 1668-1674.
- [20] Arai M A, Uchida K, Sadhu S K, *et al.* Physalin H from *Solanum nigrum* as an Hh signaling inhibitor blocks GLI1-DNA-complex formation [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2014, 10: 134-140.
- [21] Kawai M, Makino B, Yamamura H, *et al.* Upon "Physalin L." isolated from *Physalis minima* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(3): 661-663.
- [22] Kawai M, Ogura T, Makino B, *et al.* Physalin N and O from *Physalis alkekengi* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(12): 4299-4302.
- [23] Bergnmn J, Stalhandske C. Cyclization of *N*-acylanthranilic acids with vilsmeier reagents. chemical and structural studies [J]. *Tetrahedron*, 1996, 52(3): 753-770.
- [24] Osborne A G, Goolamali Z. ¹H and ¹³C NMR spectral studies of some 4*H*-3,1-benzoxazin-4-ones and their 2-acylaminobenzoic acid precursors [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2000, 56(6): 1079-1100.