

青花椒生物碱类化学成分及生物活性研究

吴蓉蓉¹, 田书璿¹, 陈 勇¹, 胡琳珍^{1*}, 张勇慧^{2*}

1. 湖北大学生命科学学院, 药物高通量筛选技术国家地方联合工程研究中心(湖北), 中药生物技术湖北省重点实验室, 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430062

2. 华中科技大学同济医学院药学院 天然药物化学与资源评价湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430030

摘要:目的 研究青花椒 *Zanthoxylum schinifolium* 生物碱类化学成分及其生物活性。方法 采用正相硅胶、Sephadex LH-20、重结晶、半制备 HPLC 等色谱方法进行分离纯化, 通过理化性质及波谱数据鉴定化合物结构, 并通过 MTS 法对化合物进行细胞毒活性筛选。结果 从青花椒根部的醋酸乙酯提取物中分离得到 9 个生物碱, 分别鉴定为白藜碱(1)、茵芋碱(2)、青花椒碱(3)、6-甲氧基-呋喃喹诺酮(4)、(+)-(S)-异普拉得斯碱(5)、(+)-(S)-阿瑞罗甫碱(6)、(-)-(S)-日立宁(7)、加锡弥罗果碱(8)、(-)-(S)-丙酮基白屈菜赤碱(9)。结论 化合物 4 为新的天然产物, 化合物 5~9 为首次从该植物中分离得到。其中化合物 9 能够抑制人支气管上皮细胞的生长, 对肿瘤细胞 HL-60、SMMC-7721 和 A-549 细胞株具有潜在的细胞毒活性。关键词: 芸香科; 花椒属; 青花椒; 生物碱; 细胞毒活性; 6-甲氧基-呋喃喹诺酮; (-)-(S)-丙酮基白屈菜赤碱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)06-1305-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.006

Studies on chemical constituents and bioactivities of alkaloids from *zanthoxylum schinifolium*

WU Rong-rong¹, TIAN Shu-ying¹, CHEN Yong¹, HU Lin-zhen¹, ZHANG Yong-hui²

1. Hubei Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, National Local Joint Engineering Research Center for High-throughput Drug Screening Technology, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China

2. Hubei Key Laboratory of Natural Medicinal Chemistry and Resource Evaluation, School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To study the chemical structure and bioactivity of the alkaloids from *Zanthoxylum schinifolium*. **Methods** The alkaloids were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography, recrystallization, and semi-preparative HPLC. Their structures were elucidated by physical and spectroscopic analysis. The cytotoxic activity of these compounds were tested by MTS. **Results** Nine alkaloids were obtained and identified as dictamnine (1), skimmianine (2), schinifoline (3), 6-methoxy-furanoquinolone (4), (+)-(S)-isoplatydesmine (5), (+)-(S)-araliopsine (6), (-)-(S)-ribalinine (7), (-)-(S)-edulinine (8), and (-)-(S)-6-acetonyldihydrochelerythrine (9). **Conclusion** Compound 4 is a new natural product and compounds 5—9 are isolated from this plant for the first time. Compound 9 has potential cytotoxicity towards HL-60, SMMC-7721, and A549.

Key words: Rutaceae; *Zanthoxylum* L.; *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc.; alkaloids; cytotoxicity; 6-methoxy-furanoquinolone; (-)-(S)-6-acetonyldihydrochelerythrine

芸香科(Rutaceae)花椒属 *Zanthoxylum* L. 植物全世界约 250 种, 遍布于亚洲、美洲、非洲及大洋洲的热带和亚热带地区, 原产于中国长江以南和西南省份^[1-3], 该属植物的根、茎、叶和果实均可入药。青花椒是一种常用的中药材, 可用于治疗脘腹

冷痛、呕吐泄泻、虫积腹痛、湿疹瘙痒等, 又作食品调味料。《中国药典》1990 年版一部记载花椒有温中止痛、杀虫止痒的功效, 并规定青花椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 或花椒 *Z. bungeanum* Maxim. 的干燥成熟果皮作为传统药

收稿日期: 2018-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31700298); 药物高通量筛选技术国家地方联合工程研究中心开放基金项目(湖北)(M20181008)

作者简介: 吴蓉蓉(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。

*通信作者 胡琳珍, 副教授, 硕士生导师, 主要从事天然药物及生物活性研究。E-mail: linzhenhu@hubu.edu.cn

张勇慧, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物及生物活性研究。E-mail: zhangyh@mails.tjmu.edu.cn

用。研究表明花椒属植物中主要含有生物碱、酰胺、木脂素、香豆素、精油和脂肪酸等化学成分^[4]。在这些天然产物中,生物碱被报道具有一些独特的生物活性,如抗肿瘤和抗 HIV 活性^[5]。关于该属植物中化学成分的研究已有大量报道,但对其有效成分的研究却十分有限^[6]。为进一步明确其物质基础,寻找活性成分,本研究采用多种色谱分析技术,从青花椒根部的醋酸乙酯提取液中分离得到 9 种生物碱成分,分别鉴定为白藜碱(dictamnine, **1**)、茵芋碱(skimmianine, **2**)、青花椒碱(schinifoline, **3**)、6-甲氧基-呋喃喹诺酮(6-methoxy-furanoquinolone, **4**)、(+)-(*S*)-异普拉得斯碱 [(+)-(*S*)-isoplatydesmine, **5**]、(+)-(*S*)-阿瑞罗甫碱 [(+)-(*S*)-araliopsine, **6**]、(-)-(*S*)-日立宁 [(-)-(*S*)-ribalinine, **7**]、加锡弥罗果碱 [(-)-(*S*)-edulinine, **8**]、(-)-(*S*)-丙酮基白屈菜赤碱 [(-)-(*S*)-6-acetonyldihydrochelerythrine, **9**]。其中化合物 **4** 为新的天然产物,化合物 **5**~**9** 是首次从该植物中分离得到。通过 MTS 法对分离得到的化合物进行细胞毒活性筛选,其中化合物 **9** 对肿瘤细胞 HL-60、SMMC-7721 及 A549 具有潜在的细胞毒活性。

1 仪器与材料

Bruker AM-400 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); Perkin-Elmer 341 polarimeter 旋光仪(美国 PerkinElmer 公司);紫外全波长扫描仪 Varian Cary 50(美国 VARIAN 公司); Bruker Vertex 70 红外光谱仪(德国 Bruker 公司);高效液相(HITACHI pump L-2130、UV Detector L-2400、DIONEAP680 HPLC pump、DIONEAPVD 170u);半制备反相色谱柱(YMC-pack ODS-A, 250 mm×10 mm, 5 μm);反相保护柱(Scihome C₁₈);Sephadex LH-20(YMC);ODS 填料(YMC*GEL ODS-A S-50 μm);MCI GEL(75~150 μm Mitsubishi Chemical Corporation);柱色谱硅胶(100、200~300 目、硅胶 H, 青岛海洋化工厂);乙腈、甲醇(色谱纯, Fisher 公司);其余试剂为国产分析纯。

实验细胞:人早幼粒白血病 HL-60 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞、人肺腺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人结肠癌 SW-480 细胞、人支气管上皮 BEAS-2B 细胞,以上各细胞株均来源于中国科学院细胞库;顺铂(美国 Sigma 公司);DMSO(江苏南京试剂厂);新生胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);MTS(美国 Sigma 公司);96 孔培养板(Corning);生物显微镜(江南光电股份公司);

CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司);酶标仪(Multiskan AscentV1.23)。

干燥青花椒(20.0 kg)采自湖北省蕲春县,标本(2013-1011)存于华中科技大学同济药学院天然药物化学教研室,由张长弓教授鉴定为芸香科花椒属植物青花椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 的根茎。

2 提取与分离

青花椒根茎 20.0 kg,干燥粉碎成粗粉,95%乙醇浸泡提取 4 次,滤过后合并滤液,减压浓缩得总浸膏 0.72 kg。采用酸提碱沉的方法提取生物总碱,总膏用适量水混悬,加氯仿搅拌均匀后,加 HCl 溶液调至 pH 值为 3,萃取后将水部位加氨水调至 pH 值为 12,加氯仿萃取,得氯仿部位总膏,约 38.5 g。将 38.5 g 的氯仿总膏经硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇(100:1→25:1)梯度洗脱得 6 个流分(Fr. 1~6)。其中 Fr. 2 经重结晶和硅胶柱色谱纯化得到化合物 **3** (211.0 mg)。Fr. 3 通过硅胶柱色谱,经氯仿-甲醇(100:1→25:1)梯度洗脱,再通过 Sephadex LH-20 柱色谱反复纯化,得到化合物 **1** (20.0 mg)和 **2** (95.0 mg)。Fr. 4 通过正相硅胶色谱柱(氯仿-甲醇 100:1→5:1)梯度洗脱得 4 个流分(Fr. 4a~4d),Fr. 4c 进 HPLC,运用反相硅胶柱色谱(甲醇-水 55:45)纯化后得到化合物 **5** (17.6 mg)、**6** (10.2 mg)、**7** (20.0 mg)。Fr. 4d 通过正相硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 100:1→5:1)洗脱后,再通过 Sephadex LH-20 柱色谱纯化后得到化合物 **8** (21.0 mg)。Fr. 5 经正相硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 30:1)后,得 5 个流分(Fr. 5a~5e),其中 Fr. 5c 通过 HPLC(甲醇-水 45:55)精分后得到化合物 **9** (16.4 mg)。Fr. 6 运用正相硅胶柱色谱梯度洗脱(氯仿-甲醇体系),再经由 Sephadex LH-20 纯化,得到化合物 **4** (4.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**:无色针状结晶(氯仿),溶于氯仿和甲醇。紫外 254 nm 处显荧光。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.43~8.27 (4H, m, Ar-H), 7.62 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-11), 7.08 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-10), 4.45 (3H, s, 4-OMe);¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 164.0 (C-2), 157.0 (C-4), 145.8 (C-1), 143.7 (C-11), 129.8 (C-7), 128.0 (C-8), 123.9 (C-6), 122.6 (C-5), 118.9 (C-9), 104.9 (C-10), 103.6 (C-3), 59.2 (4-OMe)。与文献报道数据一致^[7],故鉴定化合物 **1** 为白藜碱。该化合物仅从花椒属植物 *Z. budrunga* Wall.^[8]、*Z.*

rhetsa (Roxb.) DC.^[9]以及两面针 *Z. nitidum* (Roxb.) DC.^[3]中分离得到过。

化合物 **2**: 淡黄色棱晶 (氯仿), 溶于氯仿和甲醇。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.00 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-5), 7.56 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-2), 7.21 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-6), 7.02 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-3), 4.41 (3H, s, 4-OMe), 4.09 (3H, s, 7-OMe), 4.01 (3H, s, 8-OMe); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 164.6 (C-9a), 157.5 (C-4), 152.4 (C-9), 143.3 (C-2), 141.7 (C-7), 140.6 (C-8), 118.4 (C-5), 115.1 (C-12), 112.3 (C-6), 104.9 (C-3), 102.3 (C-10), 61.9 (8-OMe), 59.2 (4-OMe), 57.0 (7-OMe)。与文献报道数据一致^[10], 故鉴定化合物 **2** 为茵芋碱。文献报道该化合物从花椒属植物 *Z. budrunga* Wall.^[8]、*Z. rhoifolium* Lam.^[11]和布枯属^[12]植物中也分离得到过。

化合物 **3**: 白色针状结晶 (氯仿), 溶于氯仿和甲醇。紫外 254 nm 处显荧光。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.24 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 7.44 (1H, m, H-7), 7.28 (1H, m, H-8), 7.16 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-6), 5.97 (1H, s, H-3), 3.51 (3H, s, *N*-Me), 2.44 (2H, m, H-1'), 1.45 (2H, m, H-2'), 1.15~1.24 (8H, m, H-3'~6'), 0.75 (3H, t, J = 6.9 Hz, H-7'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 177.3 (C-4), 154.6 (C-2), 141.6 (C-9), 131.7 (C-7), 126.1 (C-10), 125.9 (C-5), 122.9 (C-6), 115.3 (C-8), 110.5 (C-3), 34.4 (C-1'), 33.9 (*N*-Me), 31.4 (C-5'), 28.9 (C-3'), 28.7 (C-4'), 28.1 (C-2'), 22.4 (C-6'), 13.9 (C-7')。数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **3** 为青花椒碱。

化合物 **4**: 浅黄色棱晶 (氯仿), 易溶于氯仿。薄层板展开时, 在多种溶剂体系中均呈单一斑点, 紫外 254 nm 处显荧光。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.73 (1H, dd, J = 1.0, 8.6 Hz, H-7), 7.62 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 7.32 (1H, m, H-8), 7.17 (1H, dd, J = 0.9, 7.5 Hz, H-9), 7.10 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-3), 4.45 (3H, s, 6-OMe); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 162.8 (C-4), 157.8 (C-9b), 151.3 (C-6), 143.6 (C-2), 136.0 (C-6a), 124.5 (C-9a), 119.1 (C-7), 113.1 (C-8), 110.5 (C-9), 105.2 (C-2), 104.2 (C-3), 59.3 (6-OMe)。实验测得 IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 1 659, 1 630, 1 583 和 1 515, 与文献数据^[14] IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 1 650, 1 630, 1 570 和 1 500 非常接近; 并通过 HR-ESI-MS 分析, m/z : 201.078 8 [M + H]⁺, 得到该化合物分子式为 C₁₂H₉NO₃ (计算值 201.079 0, C₁₂H₁₀NO₃), 故鉴定

化合物 **4** 为 6-甲氧基-呋喃喹诺酮。该化合物是呋喃喹诺酮的衍生物^[14], 是首次发现的天然产物。

化合物 **5**: 白色针状结晶 (甲醇), 易溶于甲醇和氯仿。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +41° (c 0.70, MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.30 (1H, dd, J = 1.1, 8.1 Hz, H-5), 7.73 (1H, ddd, J = 1.5, 6.8, 8.3 Hz, H-7), 7.68 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-8), 7.42 (1H, m, H-6), 4.97 (1H, t, J = 8.7 Hz, H-3), 3.82 (3H, s, *N*-Me), 3.24 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2), 1.38 (3H, s, 2'-Me), 1.27 (3H, s, 3'-Me); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 175.0 (C-4), 164.3 (C-3b), 140.0 (C-8a), 132.8 (C-7), 126.7 (C-4a), 126.5 (C-5), 124.9 (C-6), 116.5 (C-8), 101.7 (C-3a), 93.6 (C-2), 72.2 (C-1'), 32.3 (*N*-Me), 28.2 (C-3), 25.8 (C-3'), 24.8 (C-2')。数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为 (+)-(*S*)-异普拉得斯碱。该化合物为首次从花椒属中发现, 此前仅从 *Araliopsis tabouensis* Aubrév. & Pellegr. 中分离得到^[15]。

化合物 **6**: 白色针状结晶 (甲醇), 易溶于甲醇和氯仿。薄层板展开时, 在多种溶剂体系中均呈单一斑点, 紫外 254 nm 处显荧光。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +42° (c 0.43, MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.81 (1H, dd, J = 1.3, 7.9 Hz, H-9), 7.64 (1H, ddd, J = 1.5, 7.2, 8.7 Hz, H-7), 7.54 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6), 7.29 (1H, m, H-8), 4.91 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-2), 3.67 (3H, s, *N*-Me), 3.13 (2H, d, J = 9.3 Hz, H-3), 1.33 (3H, s, H-3'), 1.26 (3H, s, H-2'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 164.9 (C-9b), 163.3 (C-4), 141.7 (C-6a), 132.6 (C-7), 124.1 (C-8), 123.4 (C-9), 116.4 (C-6), 113.8 (C-9a), 109.2 (C-3a), 93.5 (C-2), 72.5 (C-1'), 29.8 (*N*-Me), 29.6 (C-3), 25.3 (C-2', 3')。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **6** 为 (+)-(*S*)-阿瑞罗甫碱。该化合物常在花椒属植物 *Z. simulans* Hance 中分离得到^[17], 此为首次从青花椒中分离得到。

化合物 **7**: 白色针状结晶 (甲醇), 易溶于甲醇和氯仿。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -14.0° (c 0.5, MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.30 (1H, m, H-6), 7.74 (1H, dd, J = 1.5, 8.7 Hz, H-7), 7.70 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-9), 7.39 (1H, ddd, J = 1.8, 6.2, 8.0 Hz, H-8), 3.89 (1H, t, J = 5.4 Hz, H-3), 3.79 (3H, s, *N*-Me), 2.94 (1H, dd, J = 5.1, 16.8 Hz, H-4b), 2.71 (1H, dd, J = 5.7, 16.8 Hz, H-4a), 1.49 (3H, s, 1'-Me), 1.46 (3H, s, 2'-Me); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 178.6 (C-5), 157.1 (C-9b), 140.5 (C-9a), 133.4 (C-8), 126.7 (C-7), 124.6

(C-5b), 124.3 (C-6), 116.8 (C-9), 98.6 (C-5a), 84.5 (C-2), 69.2 (C-3), 31.3 (*N*-Me), 26.9 (C-4), 25.5 (C-1'), 22.3 (C-2')。与文献报道数据一致^[17], 故鉴定化合物 **7** 为 (-)-(*S*)-日立宁。该化合物为首次从该植物中分离得到, 曾在芸香科植物 *Ruta graveolens* L. 中被发现^[18]。

化合物 **8**: 白色结晶 (氯仿), 溶于氯仿和甲醇。 $[\alpha]_D^{20}$ -32.0° (*c* 1.41, MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.80 (1H, dd, *J* = 1.0, 8.0 Hz, H-5), 7.54 (1H, m, H-7), 7.38 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-8), 7.27 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-6), 3.93 (3H, s, 4-OMe), 3.69 (3H, s, *N*-OMe), 3.58 (1H, m, H-2'), 3.06 (1H, dd, *J* = 1.9, 13.8 Hz, H-1'b), 2.70 (1H, dd, *J* = 10.2, 13.8 Hz, H-1'a), 1.28 (3H, s, 4'-Me), 1.27 (3H, s, 5'-Me); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 166.1 (C-2), 161.9 (C-4), 139.0 (C-10), 130.8 (C-7), 123.7 (C-6), 122.7 (C-5), 121.1 (C-3), 117.8 (C-9), 114.6 (C-8), 79.1 (C-3'), 73.1 (C-2'), 62.5 (4-OMe), 30.1 (*N*-OMe), 27.7 (C-1'), 25.5 (C-4'), 24.2 (C-5')。数据与文献报道一致^[16,19], 故鉴定化合物 **8** 为加锡弥罗果碱。文献报道该化合物曾在花椒属中被发现^[17], 但首次从青花椒植物中分离得到。

化合物 **9**: 黄色粉末, 易溶于氯仿。 $[\alpha]_D^{20}$ -131° (*c* 0.1, CHCl₃); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.67 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-11), 7.51 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-10), 7.48 (1H, s, H-4), 7.45 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-12), 7.07 (1H, s, H-1), 6.92 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-9), 6.00 (2H, d, *J* = 1.4 Hz, H-13), 5.01 (1H, dd, *J* = 3.5, 11.2 Hz, H-6), 3.92 (3H, s, 8-OMe), 3.89 (3H, s, 7-OMe), 2.60 (3H, s, *N*-Me), 2.54 (1H, dd, *J* = 11.3,

14.8 Hz, H-1'a), 2.23 (1H, dd, *J* = 3.5, 14.9 Hz, H-1'b), 2.03 (3H, s, 3'-Me); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 208.0 (-C = O), 152.3 (C-8), 148.3 (C-3), 147.7 (C-2), 145.6 (C-7), 139.4 (C-4b), 131.2 (C-12a), 128.3 (C-4a), 127.5 (C-6a), 124.9 (C-10a), 124.0 (C-10b), 123.4 (C-12), 119.9 (C-11), 119.0 (C-10), 111.7 (C-9), 104.5 (C-1), 101.2 (C-13), 100.7 (C-4), 61.1 (8-OMe), 56.0 (7-OMe), 55.0 (C-6), 47.0 (C-1'), 43.0 (*N*-Me), 31.3 (C-3')。数据与文献报道一致^[16,20], 故鉴定化合物 **9** 为 (-)-(*S*)-丙酮基白屈菜赤碱。该化合物是首次从该植物中分离得到, 此前分别从 *Garcinia lucida* Vesque^[21]、*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.^[22]和花椒属植物 *Z. integrifolium* (Merr.) Merr.^[23]、*Z. rhetsa* (Roxb.) DC.^[9]、*Z. nitidum* (Roxb.) DC.^[3]及 *Z. capense* (Thunb.) Harv.^[24]中分离得到, 这意味着花椒属、博落回属、藤黄属等种属中存在相同化合物, 表明 3 个种属之间可能存在类似的生物合成途径。

4 细胞毒活性筛选

对分离鉴定的新化合物进行了细胞毒活性筛选, 结果见表 1。

采用人肺腺癌 A549 细胞、人早幼粒白血病 HL-60 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞和人结肠癌 SW480 细胞进行体外细胞毒活性筛选, 以人支气管上皮细胞 BEAS-2B 为对照的正常细胞。采用顺铂作为阳性对照。准确称取待测样品化合物 **1**~**9** 及阳性对照药, 用适量的 DMSO 溶解 (DMSO 终体积分数 < 0.1%), 配制成样品母液备用。将传代后处于对数生长期的肿瘤细胞用培养基配成单个细胞悬液 (1.0×10^5 /孔) 加入

表 1 MTS 法细胞毒活性测定结果

Table 1 Results of cytotoxicity assay by MTS method

化合物	IC ₅₀ /(μ mol·L ⁻¹)					
	HL-60	SMMC-7721	A549	MCF-7	SW-480	BEAS-2B
1	>40	>40	>40	>40	>40	—
2	>40	>40	>40	>40	>40	—
3	>40	>40	>40	>40	>40	—
4	>40	>40	>40	>40	>40	—
5	>40	>40	>40	>40	>40	—
6	>40	>40	>40	>40	>40	—
7	>40	>40	>40	>40	>40	—
8	>40	>40	>40	>40	>40	—
9	8.68	25.35	25.46	>40	>40	24.10
顺铂	3.08	10.20	9.08	17.48	11.99	—

到96孔板中,每孔100 μL 。培养过夜后,加入受试样品溶液(40 $\mu\text{mol/L}$)进行初筛,每孔终体积200 μL ,每个样品设置3个复孔。将细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 以及饱和湿度条件下,于 CO_2 的培养箱中,培养48 h。每孔加入10 μL MTS继续培养4 h,再加入三联液(10% SDS-5%异丙醇-0.012 mol/L HCl),100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。室温放置12 h后于酶标仪595 nm下测定各孔吸光度(A)值,通过 A 值计算化合物对细胞生长抑制率,进而得到半数抑制浓度(IC_{50})。

$$\text{抑制率} = (A_c - A_s) / (A_c - A_b)$$

A_s 为实验孔 A 值(含细胞、培养基、MTS溶液和药物溶液);

A_c 为对照孔 A 值(含细胞、培养基、MTS溶液,不含药物);

A_b 为空白孔 A 值(含培养基、MTS溶液,不含细胞、药物)

结果(表1)显示化合物9对HL-60、SMMC-7721及A549细胞有潜在的细胞毒活性, IC_{50} 值分别为8.68、25.35、25.46 $\mu\text{mol/L}$ 。

参考文献

- [1] 孙小文,段志兴.花椒属药用植物研究进展[J].药学学报,1996,31(3):231-240.
- [2] Yang X. Aroma constituents and alkylamides of red and green huajiao (*Zanthoxylum bungeanum* and *Zanthoxylum schinifolium*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(5): 1689-1696.
- [3] Hu J, Zhang W D, Shen Y H, *et al.* Two novel alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 90(4): 720-722.
- [4] 王宇,巨勇,王钊.花椒属植物中生物活性成分研究近况[J].中草药,2002,33(7):666-670.
- [5] Tan G T, Pezzuto J M, Kinghorn A D, *et al.* ChemInform Abstract: Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase [J]. *J Nat Prod*, 1991, 22(31): 143-154.
- [6] Cheng M J, Wu C C, Tsai I L, *et al.* Chemical and antiplatelet constituents from the stem of *Zanthoxylum beecheyanum* [J]. *J Chin Chem Soc*, 2004, 51(5): 1065-1072.
- [7] 潘竞先,白青,姚冰,等.崖椒茎的化学成分[J].植物资源与环境,1993,2(3):26-28.
- [8] Rahman M M, Islam M A, Khondkar P, *et al.* Alkaloids and lignans from *Zanthoxylum budrunga* (Rutaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2005, 33(1): 91-96.
- [9] Tantapakul C, Phakhodee W, Ritthiwigrom T, *et al.* Antibacterial compounds from *Zanthoxylum rhetsa* [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(7): 1139-1142.
- [10] Brown N M D, Grundon M F, Harrison D M, *et al.* Quinoline alkaloids-XXI. The ^{13}C NMR spectra of hemiterpenoid alkaloids and related prenyl-quinolines [J]. *Tetrahedron*, 1980, 36(24): 3579-3584.
- [11] De Moura N F, Ribeiro H B, Machado E C S, *et al.* Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(8): 1443-1446.
- [12] Jackson G E, Campbell W E, Davidowitz B. Two dimensional NMR study of 8-methoxyflindersine, skimmianine and monocrotaline [J]. *Spectroscopy Lett*, 1990, 23(8): 971-982.
- [13] Wang D, Gao C, Liu S, *et al.* Structure investigation of a new alkaloid from *Zanthoxylum schinifolium* Sieb et Zucc [J]. *Chem Res Chin U*, 1991, 7(2): 124-128.
- [14] Grundon M F, McCorkindale N J, Rodger M N. The synthesis of furano [3',2',3,4] quinolines and the structure of dictamninc acid [J]. *J Chem Soc*, 1955(0), 4284-4290.
- [15] Wabo H K, Tane P, Connolly J D, *et al.* Tabouensinium chloride, a novel quaternary pyranoquinoline alkaloid from *Araliopsis tabouensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2005, 19(6): 591-595.
- [16] Boyd D R, Sharma N D, Barr S A, *et al.* ChemInform Abstract: Synthesis and absolute stereochemistry assignment of enantiopure dihydrofuroand dihydropyranoquinoline alkaloids [J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 2000, 32(20): 3397-3405.
- [17] Chang Z Q, Liu F, Wang S L, *et al.* Studies on the chemical constituents of *Zanthoxylum simulans* Hance [J]. *Acta Pharm Sin*, 1981, 16(5): 394-396.
- [18] Rollinger J M, Schuster D, Danz B, *et al.* In silico target fishing for rationalized ligand discovery exemplified on constituents of *Ruta graveolens* [J]. *Planta Med*, 2009, 75(3): 195-204.
- [19] Yang X, Feng Y, Duffy S, *et al.* A new quinoline epoxide from the Australian plant *Drummondia calida* [J]. *Planta Med*, 2011, 77(14): 1644-1647.
- [20] Chen J J, Fang H Y, Duh C Y, *et al.* New indolopyridoquinazoline benzocphenanthridines and cytotoxic constituents from *Zanthoxylum integrifolium* [J]. *Planta Med*, 2005, 71(5): 470-475.
- [21] Fotie J, Bohle D S, Olivier M, *et al.* Trypanocidal and antileishmanial dihydrochelerythrine derivatives from *Garcinia lucida* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(10): 1650-1653.
- [22] Feng F, Ye F Z, Li C L, *et al.* Two new benzophenanthridine isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* [J]. *J Nat Med*, 2012, 10(5): 378-282.
- [23] Chen J J, Lin Y H, Daya S H, *et al.* New benzenoids and anti-inflammatory constituents from *Zanthoxylum nitidum* [J]. *Food Chem*, 2011, 125(2): 282-287.
- [24] Mansoor T A, Borralho P M, Luo X, *et al.* 6-Acetyldihydrochelerythrine is a potent inducer of apoptosis in HCT116 and SW620 colon cancer cells [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(8): 1825-1830.