

• 化学成分 •

毛叶藜芦中 1 个新的生物碱

时嘉敏, 刘兴鸿, 何翠林, 林立五, 陈东林*

四川大学华西药学院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 研究毛叶藜芦 *Veratrum grandiflorum* 根茎的化学成分及其抗肿瘤活性。方法 采用硅胶柱色谱、C-18 反相柱色谱进行分离纯化, 运用 MS、NMR 等波谱技术鉴定化合物的结构, 采用 MTT 法测定化合物 1~6 对人肝癌 HepG2 细胞的细胞毒活性, 采用流式细胞术检测化合物 3 对 HepG2 细胞凋亡的影响。结果 从毛叶藜芦根茎中分离得到了 8 个甾体生物碱类化合物, 分别鉴定为 (3S,15S)-3 β -当归酰基-15 α -乙酰基棋盘花胺 (1)、表红介芬胺 (2)、藜芦胺 (3)、介芬胺 (4)、3-当归酰基棋盘花胺 (5)、藜芦托素 (6)、veramitaline (7)、veralkamine (8)。结论 化合物 1 为 1 个新化合物, 化合物 7、8 为首次从该植物中分离得到, 化合物 3 对 HepG2 细胞具有中等强度的细胞毒活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 (13.70 $\pm$ 0.99) μ mol/L, 并且能够诱导 HepG2 细胞发生早期凋亡。

关键词: 毛叶藜芦; 甾体生物碱; (3S,15S)-3 β -当归酰基-15 α -乙酰基棋盘花胺; 表红介芬胺; 藜芦胺; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3365-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.001

A new alkaloid from *Veratrum grandiflorum*

SHI Jia-min, LIU Xing-hong, HE Cui-lin, LIN Li-wu, CHEN Dong-lin

West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents of the roots and rhizomes of *Veratrum grandiflorum* and its antitumor activities. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel, C-18 reversed phase column chromatography, and their structures were identified by MS and NMR analyses. The cytotoxic activities of compounds 1—6 against HepG2 (human liver cancer cell line) were evaluated by MTT method. The effect of compound 3 on cell apoptosis of HepG2 was detected by flow cytometry. **Results** Eight steroidal alkaloids were isolated and their structures were identified as (3S,15S)-3 β -angeloyl-15 α -acetylzygadenine (1), epirubijervine (2), veratramine (3), jervine (4), 3-angeloylzygadenine (5), veratrosine (6), veramitaline (7) and veralkamine (8). **Conclusion** Compound 1 is a new alkaloid, compounds 7—8 are isolated from this plant for the first time. Compound 3 showed moderate cytotoxic activity against human tumor cell line HepG2 with IC₅₀ value of (13.70 $\pm$ 0.99) μ mol/L, and induced early apoptosis of HepG2 cells.

Key words: *Veratrum grandiflorum* (Maxim.) Loes. f.; steroidal alkaloid; (3S,15S)-3 β -angeloyl-15 α -acetylzygadenine; epirubijervine; veratramine; antitumor activities

毛叶藜芦 *Veratrum grandiflorum* (Maxim.) Loes. f. 隶属于百合科 (Liliaceae) 藜芦属 *Veratrum* Linn., 为多年生草本植物, 又被称为人头发, 主要分布于我国浙江、江西、台湾、湖北、湖南、四川和云南等省。《全国中草药汇编》中记载常用藜芦属植物的根茎及全草入药可祛痰、催吐、杀虫, 也可用于中

风痰壅、癫痫、疟疾、骨折、治疗癣、灭蝇蛆^[1]。目前文献报道藜芦属植物的化学成分主要包括甾体生物碱类、黄酮类、芪类、二肽类以及其他类化合物^[2], 其药理作用包括抗血栓^[3]、降血压^[4]、抗肿瘤^[5]、抗菌^[6]、抗炎^[7]等。虽然目前关于藜芦属植物的研究报道较多, 但对于毛叶藜芦的研究却相对

收稿日期: 2019-12-23

作者简介: 时嘉敏 (1994—), 女, 天然药物化学专业硕士研究生。Tel: 18280066958 E-mail: 823604115@qq.com

*通信作者 陈东林, 副教授, 硕士生导师。E-mail: chendl@scu.edu.cn

较少,为进一步明确毛叶藜芦中药理活性的物质基础。本实验利用酸提碱沉法进行提取,通过反复硅胶柱色谱分离纯化得到了 8 个甾体生物碱类化合物,鉴定为 (3S,15S)-3 β -当归酰基-15 α -乙酰基棋盘花胺 [(3S,15S)-3 β -angeloyl-15 α -acetylzygadenine, **1**]、表红介芬胺 (epirubijervine, **2**)、藜芦胺 (veratramine, **3**)、介芬胺 (jervine, **4**)、3-当归酰基棋盘花胺 (3-angeloylzygadenine, **5**)、藜芦托素 (veratrosine, **6**)、veramitaline (**7**)、veralkamine (**8**),其中,化合物 **1** 为 1 个新化合物,化合物 **7**、**8** 为首次从毛叶藜芦中分离得到。化合物 **3** 对 HepG2 细胞显示出一定的细胞毒活性,半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 (13.70 $\pm$ 0.99) μ mol/L,并且能够诱导 HepG2 细胞发生早期凋亡。

1 仪器与材料

400/600 MHz 核磁共振仪 (Varian Unity Inova 公司,美国); AmaZon SL 质谱仪 (Bruker 公司,美国); Nicolet 6700 红外分光光度计 (Termo Electron Corporation, Waltham, 美国); 岛津 UV-3600 紫外分光光度计 (岛津公司,日本); 高精度全自动旋光仪 POL-1/2 (ATAGO 公司,日本); ELx808 型多功能酶标计数仪 (博腾科学仪器,美国); Novecyte 流式细胞仪 (ACEA 公司,美国); 正相柱色谱硅胶 (200~300、100~200 目,青岛海洋化工有限公司); C-18 反相填料 (日本富士公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (BD Pharmingen 公司); 其余试剂均为分析纯 (成都恒信化学试剂有限公司)。

毛叶藜芦药材来源于成都市荷花池中药材市场,经四川大学华西药学院王建忠副教授鉴定为百合科藜芦属植物毛叶藜芦 *Veratrum grandiflorum* (Maxim.) Loes. f., 标本 (VG20180601) 保存于四川大学华西药学院天然药物化学研究室。

2 方法

2.1 提取与分离

毛叶藜芦干燥根茎 20 kg,用 0.1 mol/L 盐酸 (200 L) 浸泡过夜,采用渗漉法进行提取,直至渗漉液中检测无生物碱为止,合并渗漉液。用浓氨水碱化渗漉液 pH 值为 10,用醋酸乙酯 (3 倍量) 萃取渗漉液 3 次,减压浓缩回收溶剂后得浸膏 150 g。总生物碱浸膏 (150 g) 进行硅胶柱色谱分离,用石油醚-丙酮 (10:1、5:1、2:1、1:1、0:1) 梯度洗脱,展开剂中加入 0.2% 三乙胺,得到 6 个流分 Fr. 1~6。

流分 Fr. 1 (5.7 g) 经硅胶柱色谱分离,石油醚-丙酮 (10:1、8:1、5:1) 梯度洗脱,得到 5 个流分 Fr. 1-1~1-5。流分 Fr. 1-2 (1.6 g) 经反复硅胶柱色谱分离,石油醚-丙酮 (10:1) 洗脱,得到化合物 **7** (13 mg),流分 Fr. 1-4 (1.8 g) 经反复硅胶柱色谱分离,石油醚-丙酮 (10:1) 等度洗脱,得到化合物 **2** (200 mg)。

流分 Fr. 2 (17 g) 经硅胶柱色谱分离,石油醚-丙酮 (10:1、5:1、1:1) 梯度洗脱,得到 6 个流分 Fr. 2-1~2-6。流分 Fr. 2-3 (1.2 g) 经反复硅胶柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇 (100:1) 洗脱,再经石油醚-丙酮 (10:1、5:1、3:1、1:1) 反复分离纯化得到化合物 **3** (300 mg)、**8** (8 mg),流分 Fr. 2-4 (4.3 g) 经反复硅胶柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇 (50:1) 洗脱,石油醚-丙酮 (10:1、5:1、3:1、1:1) 反复分离纯化得到化合物 **1** (21 mg)、**5** (400 mg)。

流分 Fr. 4 (28 g) 经硅胶柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇 (50:1、30:1、20:1、10:1) 洗脱,得到 9 个流分 Fr. 4-1~4-9。其中流分 Fr. 4-2 (3.6 g) 经环己烷-醋酸乙酯 (5:1、3:1、1:1) 反复洗脱得到化合物 **4** (150 mg)。

流分 Fr. 6 (31 g) 经硅胶柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇 (20:1、10:1、5:1、2:1) 洗脱,得到 12 个流分 Fr. 6-1~6-12。Fr. 6-3 依次用二氯甲烷-甲醇 (20:1、10:1、5:1) 洗脱之后得到 6 个流分 Fr. 6-3-1~6-3-6,其中 Fr. 6-3-3 用 C-18 反相柱甲醇-水 (1:2、1:1、2:1) 梯度洗脱得到化合物 **6** (400 mg)。

2.2 细胞毒性实验

采用 MTT 法,检测化合物 **1**~**6** 对人肝癌细胞 HepG2 的细胞毒活性,HepG2 细胞于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基 (加入 1% 双抗) 中培养至对数生长期,取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中正常培养 24 h 后,加药,使化合物 **1**~**6** 以不同的浓度 (1~150 μ mol/L) 作用于肿瘤细胞,每个浓度设置 3 个复孔,并设空白对照组和阴性对照组。培养 48 h 后,于每孔加 20 μ L MTT 染色,继续培养 4 h 后,吸弃原培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,并于酶标仪 570 nm 波长测其吸光度 (A) 值,实验重复 3 次,通过 A 值计算不同给药浓度下的细胞增殖抑制率,并用 Graphpad Prism 6 软件计算 IC₅₀ 值。

2.3 细胞凋亡实验

取对数生长期的细胞离心计数后, 将 HepG2 细胞以每孔 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 个接种于 6 孔板中, 将培养板置于 37°C 的 CO_2 培养箱中培养 24 h。吸弃上层培养基, 加入 2 mL 不同浓度 (0、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$) 的化合物 **3** 作用于肿瘤细胞。48 h 后收集细胞, 首先将上层培养液吸取到流式管中, 6 孔板中加入胰蛋白酶 (无 EDTA) 消化, 加入培养基中和后, 合并上层培养液离心, 弃去上层液体, 细胞沉淀用预冷的 PBS 洗 2 遍, 加入 100 μL Annexin-Binding Buffer, 每个样品管加入 5 μL Annexin-FITC 和 5 μL PI, 避光孵育 10 min, 上机前加入 200 μL Annexin-Binding Buffer 稀释, 1 h 内上流式细胞仪检测, 实验重复 3 次, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 NOVOEXPRESS 软件对凋亡数据进行分析。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末 (二氯甲烷)。10% 硫酸-乙醇溶液加热后显紫红色, 改良碘化铋钾试剂

呈现阳性反应, 提示化合物可能为生物碱。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -21.5$ (c 0.2, CH_2Cl_2); HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 618.363 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值为 618.364 2, $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{NO}_9$), 提示化合物分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{NO}_9$, 不饱和度为 10; $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 236; $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 399, 1 736, 1 715, 2 936, 1 380, IR 光谱显示化合物 **1** 中存在羟基 ($3\,399\text{ cm}^{-1}$)、羰基 ($1\,736$ 、 $1\,715\text{ cm}^{-1}$) 等特征信号。 $^1\text{H-NMR}$ 谱 (表 1) 中显示出 1 组乙酰基信号 δ_{H} 2.04 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO-15}$), 和 1 组当归酰基的质子信号 δ_{H} 6.09 (1H, q, $J = 7.1\text{ Hz}$, H-3'), 1.98 (3H, d, $J = 7.1\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{-4'}$), 1.88 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-5'}$); 3 个甲基信号 δ_{H} 0.99 (3H, s), 1.17 (3H, s), 1.06 (3H, d, $J = 6.9\text{ Hz}$); 3 个与氧原子相连的碳上的质子信号 δ_{H} 4.99 (1H, d, $J = 4.5\text{ Hz}$, H-3), 5.07 (1H, d, $J = 3.4\text{ Hz}$, H-15), 4.22 (1H, brs, H-16), 其 $^{13}\text{C-NMR}$ (表 1) 和 DEPT 谱显示该化合物有 34 个碳信号, 其中 $6 \times \text{CH}_3$ 、 $9 \times \text{CH}_2$ 、 $11 \times \text{CH}$ 、 $8 \times \text{C}$ 。其中 δ_{C} 170.2, 20.7 为乙酰基碳信号, δ_{C} 168.3, 127.8, 138.8, 16.0, 21.0 为当归酰基碳信号, δ_{C} 104.7, 95.7 为西藜芦碱型

表 1 化合物 **1** 的氢、碳谱核磁共振波谱数据 (600/150 MHz, CDCl_3)

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

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	1.66 (m), 1.58 (m)	32.9	22 α	1.72 (m)	69.7
2	2.16 (m), 1.65 (m)	26.8	23	1.63 (m), 1.52 (m)	18.5
3 α	4.99 (d, $J = 4.5\text{ Hz}$)	75.1	24	1.60 (m), 1.49 (m)	29.0
4	—	104.7	25	1.89 (m)	27.4
5	2.05 (m)	46.4	26	2.27 (m)	61.2
6	1.94 (m), 1.75 (m)	19.1		2.65 (d, $J = 11.0\text{ Hz}$)	
7	2.01 (m), 1.66 (m)	17.3	27- CH_3	1.06 (d, $J = 6.9\text{ Hz}$)	17.2
8 β	2.57 (dd, $J = 11.7, 6.0\text{ Hz}$)	44.5	Angeloyl		
9	—	95.7	1'	—	168.3
10	—	45.8	2'	—	127.8
11	2.18 (m), 1.56 (m)	33.4	3'	6.09 (q, $J = 7.1\text{ Hz}$)	138.8
12 α	1.89 (m)	47.1	4'- CH_3	1.98 (d, $J = 7.1\text{ Hz}$)	16.0
13 β	1.58 (m)	34.5	5'- CH_3	1.89 (s)	20.7
14	—	79.8	Acetyl		
15 β	5.07 (d, $J = 3.4\text{ Hz}$)	71.3	1''		170.2
16 α	4.22 (brs)	69.4	2''	2.04 (s)	21.0
17 α	1.32 (m)	45.4	4-OH	3.97 (s)	
18	1.76 (m), 2.70 (m)	61.8	14-OH	3.36 (s)	
19- CH_3	0.99 (s)	19.1	16-OH	4.29 (s)	
20	—	73.1	20-OH	4.34 (s)	
21- CH_3	1.17 s	20.2			

生物碱 C-4 和 C-9 的特征碳信号, 以上数据提示化合物 **1** 为典型的西藜芦碱型的生物碱。化合物 **1** 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与 3-当归酰基棋盘花胺^[8] 非常接近, 但是却比其多出了 1 个乙酰基信号, 并且质子信号 H-15 (5.07, d, $J = 3.4$ Hz) 较 3-当归酰基棋盘花胺 H-15 (3.74, d, $J = 3.0$ Hz) 往低场偏移 1.33, 提示乙酰基可能连于 C-15 位。HMBC 谱 (图 1) 中显示质子信号 $\delta_{\text{H}} 4.99$ (H-3) 与碳信号 $\delta_{\text{C}} 168.3$ (C-1'), 26.8 (C-2), 32.9 (C-1), 46.4 (C-5), 104.7 (C-4) 相关, 进一步确定当归酰基连于 C-3 位; 质子信号 $\delta_{\text{H}} 5.07$ (H-15) 与 $\delta_{\text{C}} 170.2$ ($\text{CH}_3\text{CO}-$), 45.4 (C-17), 47.1 (C-12), 69.4 (C-16), 79.8 (C-14) 相关, 确定乙酰基连于 C-15 位。

化合物 **1** 的相对立体构型由 NOESY 谱来确定。NOESY 谱 (图 2) 显示 $\text{CH}_3-19/\text{H}-5$ 、 $\text{CH}_3-19/\text{H}-6\beta$ 、 $\text{CH}_3-19/\text{H}-8$ 、 $\text{H}-8/\text{H}-6\beta$ 、 $\text{H}-8/\text{H}-13$ 、 $\text{H}-8/\text{H}-15$ 存在 NOE 相关, 表明 CH_3-19 、H-5、H-8、H-13、H-15 同为 β 构型; $\text{H}-17/\text{H}-12$ 、 $\text{H}-17/\text{H}-16$ 、 $\text{H}-17/\text{H}-18\alpha$ 、 $\text{H}-17/\text{H}-22$ 、 $\text{H}-16/\text{CH}_3-21$ 、 $\text{CH}_3-21/\text{H}-22$ 、 $\text{H}-22/\text{H}-26\alpha$ 存在 NOE 相关, 表明 H-17、H-12、H-16、H-22、 CH_3-21 同为 α 构型; 化合物 **1** 的 CD 谱 (图 3) 也

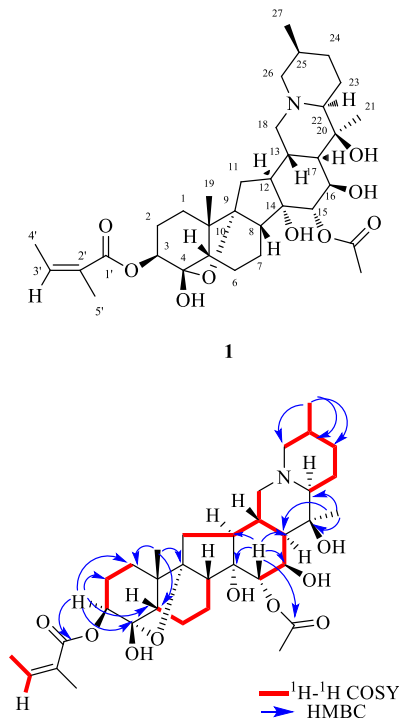


图 1 化合物 **1** 的结构和主要的 HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY ($\text{H} \rightarrow \text{H}$) 相关

Fig. 1 Structure and key correlations of HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) and $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY ($\text{H} \rightarrow \text{H}$) of compound **1**

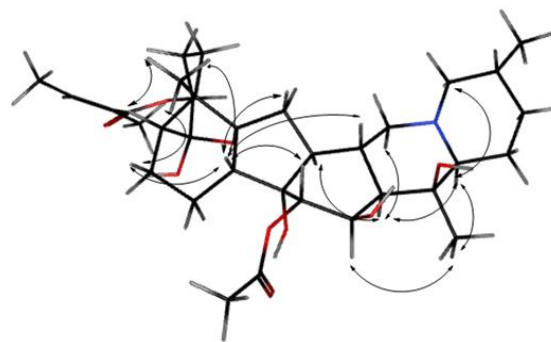


图 2 化合物 **1** 主要的 NOESY 相关

Fig. 2 Key correlations of NOESY ($\text{H} \rightarrow \text{H}$) of compound **1**

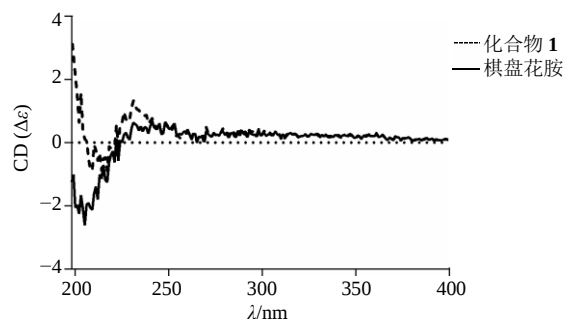


图 3 化合物 **1** 和棋盘花胺的 CD 谱

Fig. 3 CD of compound **1** and zygadenine

证明其与棋盘花胺具有相同的立体构型, 因此鉴定化合物 **1** 为 (3S,15S)-3 β -当归酰基-15 α -乙酰基棋盘花胺, 为 1 个新化合物。

化合物 **2**: 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷、甲醇。ESI-MS m/z : 414.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 0.87 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.89 (3H, s, H-18), 0.95 (3H, d, $J = 4.9$ Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 5.35 (1H, brs, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ : 37.0 (C-1), 31.1 (C-2), 71.2 (C-3), 41.9 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 31.8 (C-7), 31.5 (C-8), 49.4 (C-9), 36.2 (C-10), 33.0 (C-11), 72.4 (C-12), 44.2 (C-13), 43.9 (C-14), 28.3 (C-15), 68.8 (C-16), 53.4 (C-17), 17.4 (C-18), 19.3 (C-19), 36.7 (C-20), 17.2 (C-21), 74.7 (C-22), 30.5 (C-23), 31.5 (C-24), 31.1 (C-25), 60.4 (C-26), 19.1 (C-27)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **2** 为表红介芬胺。

化合物 **3**: 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷、甲醇。ESI-MS m/z : 410.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 0.80 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 1.11 (3H, s, H-19), 1.34 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-21), 2.29

(3H, s, H-18), 3.49 (1H, tt, $J = 11.0, 4.0$ Hz, H-3), 3.42 (1H, m, H-20), 3.13 (1H, td, $J = 10.3, 4.4$ Hz, H-23), 2.89 (1H, td, $J = 11.5, 5.1$ Hz, H-26eq), 6.91 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-15), 7.06 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-16), 5.46 (1H, brd, $J = 3.9$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 39.2 (C-1), 32.0 (C-2), 72.5 (C-3), 42.6 (C-4), 144.0 (C-5), 122.8 (C-6), 31.3 (C-7), 42.4 (C-8), 58.7 (C-9), 38.0 (C-10), 31.5 (C-11), 133.7 (C-12), 144.1 (C-13), 145.0 (C-14), 120.8 (C-15), 126.3 (C-16), 141.2 (C-17), 16.0 (C-18), 19.2 (C-19), 37.4 (C-20), 21.2 (C-21), 67.9 (C-22), 71.9 (C-23), 45.0 (C-24), 32.6 (C-25), 54.8 (C-26), 19.6 (C-27)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物**3**为藜芦胺。

化合物**4**: 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷、甲醇。ESI-MS m/z : 425.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.01 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 1.02 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 1.03 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-18), 3.49 (1H, m, H-3), 3.42 (1H, m, H-23), 3.16 (1H, dd, $J = 12.8, 4.2$ Hz, H-26), 2.90 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-22), 5.42 (1H, brd, $J = 4.0$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 38.1 (C-1), 31.5 (C-2), 72.3 (C-3), 42.2 (C-4), 143.4 (C-5), 122.1 (C-6), 31.7 (C-7), 39.7 (C-8), 63.6 (C-9), 38.2 (C-10), 208.5 (C-11), 138.7 (C-12), 146.5 (C-13), 45.5 (C-14), 25.3 (C-15), 32.0 (C-16), 87.0 (C-17), 12.2 (C-18), 18.7 (C-19), 41.4 (C-20), 11.0 (C-21), 67.4 (C-22), 77.0 (C-23), 39.7 (C-24), 31.8 (C-25), 55.1 (C-26), 19.0 (C-27)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物**4**为介芬胺。

化合物**5**: 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷。ESI-MS m/z : 576.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.00 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-27), 1.22 (3H, s, H-21), 5.00 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-3), 4.41 (1H, brs, H-16), 3.73 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-15), angeloyl: 6.12 (1H, q, $J = 7.3$ Hz, H-3'), 1.89 (3H, m, H-5'), 1.99 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, H-4'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 32.9 (C-1), 26.9 (C-2), 75.2 (C-3), 104.9 (C-4), 46.5 (C-5), 19.1 (C-6), 17.2 (C-7), 44.4 (C-8), 96.3 (C-9), 45.8 (C-10), 33.3 (C-11), 46.4 (C-12), 34.2 (C-13), 80.9 (C-14), 69.9 (C-15), 69.8 (C-16), 44.0 (C-17), 61.7 (C-18), 18.5 (C-19), 73.4 (C-20), 20.0 (C-21), 70.4 (C-22), 17.3 (C-23), 29.0 (C-24), 27.5 (C-25), 61.4 (C-26), 16.6

(C-27), angeloyl: 168.7 (C-1'), 127.6 (C-2'), 139.2 (C-3'), 16.0 (C-4'), 20.7 (C-5')。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物**5**为3-当归酰基棋盘花胺。

化合物**6**: 白色无定形粉末, 易溶于甲醇。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.37 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Glc-H-1), 5.48 (1H, brd, $J = 4.3$ Hz, H-6), 0.80 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 1.12 (3H, s, H-19), 1.33 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 2.27 (3H, s, H-18), 6.92 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-15), 7.05 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-16), 5.48 (1H, brd, $J = 4.3$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 39.3 (C-1), 32.3 (C-2), 79.9 (C-3), 42.4 (C-4), 143.8 (C-5), 123.1 (C-6), 30.4 (C-7), 42.4 (C-8), 58.7 (C-9), 39.2 (C-10), 31.5 (C-11), 133.7 (C-12), 144.1 (C-13), 145.1 (C-14), 120.9 (C-15), 126.3 (C-16), 141.0 (C-17), 16.0 (C-18), 19.1 (C-19), 38.2 (C-20), 21.2 (C-21), 67.9 (C-22), 71.6 (C-23), 44.9 (C-24), 31.3 (C-25), 54.4 (C-26), 19.6 (C-27), 102.5 (Glc-C-1), 75.1 (Glc-C-2), 78.0 (Glc-C-3), 71.7 (Glc-C-4), 77.8 (Glc-C-5), 62.7 (Glc-C-6)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物**6**为藜芦托素。

化合物**7**: 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.34 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-6), 0.59 (3H, s, H-18), 0.91 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.97 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, H-21), 3.53 (1H, tdd, $J = 11.4, 6.2, 5.3$ Hz, H-3), 3.22 (1H, brs, H-12), 2.95 (1H, dd, $J = 17.1, 10.1$ Hz, H-26ax), 3.62 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-26eq); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 37.1 (C-1), 31.6 (C-2), 71.2 (C-3), 42.3 (C-4), 140.6 (C-5), 121.6 (C-6), 31.4 (C-7), 32.0 (C-8), 44.2 (C-9), 36.1 (C-10), 30.1 (C-11), 71.7 (C-12), 46.1 (C-13), 47.5 (C-14), 23.2 (C-15), 27.3 (C-16), 44.1 (C-17), 13.7 (C-18), 19.0 (C-19), 44.5 (C-20), 19.8 (C-21), 176.3 (C-22), 26.2 (C-23), 27.7 (C-24), 27.0 (C-25), 55.8 (C-26), 19.2 (C-27)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物**7**为veramitaline。

化合物**8**: 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-19), 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 5.34 (1H, brs, H-6), 5.28 (1H, brs, H-12), 4.09 (1H, dd, $J = 11.3, 5.8$ Hz, H-16), 3.54 (1H, tt, $J = 10.7, 4.7$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 37.0 (C-1), 32.1 (C-2), 71.5 (C-3),

42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.1 (C-6), 24.9 (C-7), 35.1 (C-8), 45.9 (C-9), 36.7 (C-10), 31.5 (C-11), 115.8 (C-12), 150.4 (C-13), 45.3 (C-14), 35.4 (C-15), 71.0 (C-16), 50.2 (C-17), 22.1 (C-18), 19.1 (C-19), 45.5 (C-20), 9.2 (C-21), 57.0 (C-22), 24.9 (C-23), 30.3 (C-24), 26.2 (C-25), 50.9 (C-26), 16.4 (C-27)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为 veralkamine。

3.2 细胞毒活性测定结果

由表 2 可知化合物 **2**、**3** 对 HepG2 细胞显示出中等强度的细胞毒活性, IC_{50} 值分别为 (38.72 ± 4.36) 、 $(13.70 \pm 0.99) \mu\text{mol/L}$, 化合物 **4**、**6** 对 HepG2 细胞显示出较弱的细胞毒活性, 化合物 **1**、**5** 对 HepG2 细胞未显示出明显的细胞毒活性。

3.3 细胞凋亡检测结果

由表 3 和图 4 可知, 使用 15、20、25 $\mu\text{mol/L}$

的化合物 **3** 分别处理 HepG2 细胞 48 h 后, 相比与对照组早期凋亡的细胞比例由 $(5.13 \pm 1.48) \%$ 分别增加到 $(10.83 \pm 0.31) \%$ 、 $(18.66 \pm 0.95) \%$ 、 $(31.57 \pm 3.94) \%$, 说明化合物 **3** 能够呈浓度依赖性地诱导 HepG2 细胞发生早期凋亡。

表 2 化合物 1~6 的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Cytotoxic activity of compounds 1—6 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
1	>150
2	38.72 ± 4.36
3	13.70 ± 0.99
4	54.75 ± 11.69
5	>150
6	72.23 ± 5.39

阳性对照药物顺铂的 IC_{50} 值为 $9.80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [14]

The half inhibition concentration of Cisplatin is $9.80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [14]

表 3 化合物 3 对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of compound 3 on cell apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	活细胞率/%	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	死细胞率/%	总凋亡率/%
0	88.43 ± 1.72	5.13 ± 1.48	3.22 ± 0.88	3.21 ± 1.18	8.36 ± 2.18
15	82.59 ± 1.70	$10.83 \pm 0.31^{***}$	4.68 ± 1.74	1.93 ± 0.20	$15.51 \pm 1.56^*$
20	76.27 ± 1.24	$18.66 \pm 0.95^{**}$	3.86 ± 0.44	1.21 ± 0.36	$22.52 \pm 0.89^{**}$
25	62.37 ± 1.56	$31.57 \pm 3.94^*$	4.65 ± 1.26	1.41 ± 1.18	$36.22 \pm 2.74^{**}$

与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

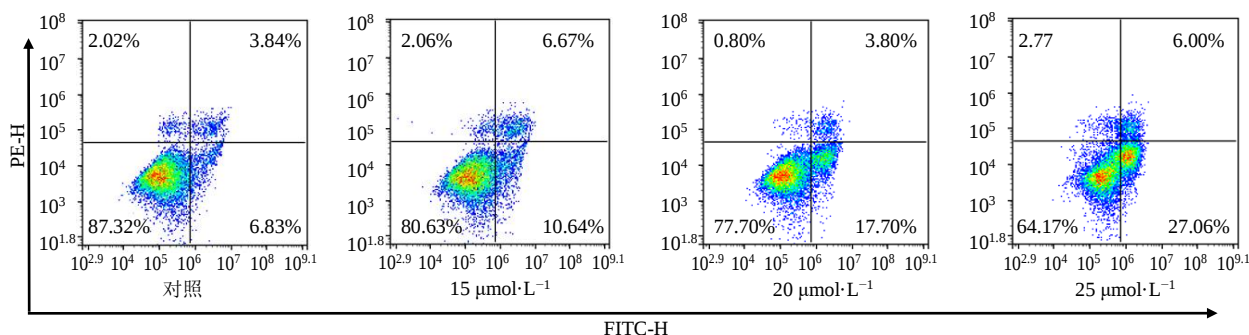


图 4 化合物 3 诱导 HepG2 细胞发生凋亡

Fig. 4 Compound 3 induced apoptosis of HepG2 cells

4 讨论

通过对毛叶藜芦中的生物碱成分的研究, 分离得到 8 个甾体生物碱类化合物, 其中化合物 **1** 为 1 个新化合物, 化合物 **7**、**8** 为首次从该植物中分离得到的化合物。通过 MTT 实验和细胞凋亡实验发现, 化合物 **3** 对 HepG2 细胞具有中等强度的细胞毒

活性, IC_{50} 值为 $(13.70 \pm 0.99) \mu\text{mol/L}$, 并且能够诱导 HepG2 细胞发生早期凋亡。

参考文献

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [2] 汤建, 李慧梁, 黄海强, 等. 藜芦属植物化学成分

- 研究近况 [J]. 药学进展, 2006, 30(5): 206-212.
- [3] Tang J, Li H L, Shen Y H, *et al.* Antitumor and antiplatelet activity of alkaloids from *Veratrum dahuricum* [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(6): 821-826.
- [4] Wang L, Li W, Liu Y. Hypotensive effect and toxicology of total alkaloids and veratramine from roots and rhizomes of *Veratrum nigrum* L. in spontaneously hypertensive rats [J]. *Die Pharmazie-An Int J Pharm Sci*, 2008, 63(8): 606-610.
- [5] Chen X, Cheng Q, She M, *et al.* Expression of sonic hedgehog signaling components in hepatocellular carcinoma and cyclopamine-induced apoptosis through Bcl-2 downregulation *in vitro* [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(5): 315-323.
- [6] Zhou C X, Liu J Y, Ye W C, *et al.* Neoveratraline A and B, two antifungal alkaloids with a novel carbon skeleton from *Veratrum taliense* [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(30): 5743-5747.
- [7] Cholakova M, Bratanov M, Christov V, *et al.* The *veratrum* alkaloid, veratroylzygadenine, suppresses contact dermatitis in mice [J]. *J Med Plants Res*, 2009, 3(12): 1109-1112.
- [8] Zaho W, Tezuka Y, Kikuchi T, *et al.* Studies on the constituents of *Veratrum* plants. I.: Constituents of *Veratrum maackii* REG; Isolation and structure determinatin of a new alkaloid, maackinine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(11): 2920-2928.
- [9] 张 谨. 毛叶藜芦根部化学成分研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [10] Tezuka Y, Kikuchi T, Zhao W, *et al.* Two new steroidal alkaloids, 20-isoveratramine and verapatuline, from the roots and rhizomes of *veratrum patulum* [J]. *J Nat Prods*, 1998, 61(9): 1078-1081.
- [11] 汤 建. 兴安藜芦抗肿瘤活性成分的发现及结构修饰 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [12] Zhou C X, Tan R X, Ye W C, *et al.* Steroidal alkaloids from *Veratrum taliense* [J]. *Indian J Chem*, 2000, 39B: 283-286.
- [13] Sun Y, Chen J X, Zhou L, *et al.* Three new pregnane alkaloids from *Veratrum taliense* [J]. *Helv Chim Acta*, 2012, 95(7): 1114-1120.
- [14] Wei G, Wang J, Du Y. Total synthesis of solamargine [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(10): 2930-2933.