

伊犁贝母中化学成分及其体外抗肿瘤活性研究

金悦仙^{1,2}, 魏鸿雁², 马晓玲², 陈刚², 石磊岭^{2*}, 张晶^{1*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

摘要: 目的 研究伊犁贝母 *Fritillaria pallidiflora* 的化学成分及其体外抗肿瘤活性。方法 应用多种色谱方法进行分离纯化, 利用 NMR、MS 等波谱技术结合理化性质进行结构鉴定; 并采用 MTT 法评价化合物对宫颈癌 HeLa 细胞、结肠癌 Ht-29 细胞和人恶性黑色素瘤 A375 细胞的体外抑制活性。结果 从伊犁贝母 95%乙醇提取物中分离得到 13 个化合物, 分别鉴定为 1-O-阿魏酰单甘油酯 (1)、4-羟基苯甲醛 (2)、环(D)-脯(D)-苯丙 (3)、香草酸 (4)、2-羟基-3-苯基丙酸甲酯 (5)、灯盏花苷 II (6)、反式肉桂酸甲酯 (7)、西贝母碱 (8)、阿魏酸乙酯 (9)、贝母辛 (10)、环(脯氨酸-甘氨酸) (11)、西贝母碱苷 (12)、6,7-二甲氧基-2-萘乙酸 (13)。结论 化合物 1~7、9、11、13 为首次从伊犁贝母属中分离得到; 化合物 3、8、10~12 对 3 种肿瘤细胞株具有不同程度的抑制活性, 其中化合物 10 活性较强, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 22.07、52.47、48.27 $\mu\text{mol/L}$ 。

关键词: 伊犁贝母; 生物碱类; 抗肿瘤活性; 灯盏花苷 II; 西贝母碱; 贝母辛; 西贝母碱苷

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)06-1562-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.003

Chemical constituents from *Fritillaria pallidiflora* and their antitumor activities *in vitro*

JIN Yue-xian^{1,2}, WEI Hong-yan², Ma Xiao-ling², CHEN Gang², SHI Lei-ling², ZHANG Jing¹

1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Xinjiang Institute of Chinese and Ethnic Medicine, Urumqi 830002, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents from *Fritillaria pallidiflora* and their antitumor activities. **Methods** Separation and purification of 95% ethanol extract of *F. pallidiflora* were carried out by using silica gel column, gel column and pre-HPLC and other chromatographic techniques, using NMR, MS, and other spectral techniques combined with physical and chemical properties were used for structural identification; *In vitro* tumor cell inhibitory activities of constituents to cervical cancer cells (HeLa), colon cancer cells (Ht-29) and human malignant melanoma cells (A375) were evaluated. **Results** Thirteen chemical constituents, including 1-O-feruloylglycerol (1), 4-hydroxybenzaldehyde (2), cyclo(D)-pro-(D)-phe (3), vanillic acid (4), 2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid methyl ester (5), erigeside II (6), methyl cinnamate (7), imperialine (8), ethyl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate (9), peimisine (10), cyclo(pro-gly) (11), sipeimine-3 β -D-glucoside (12), and 6,7-dimethoxynaphthalene-2-carboxylic acid (13) were isolated from *F. pallidiflora*. **Conclusion** Compounds 1—7, 9, 11, and 13 are isolated from *F. pallidiflora* for the first time. And compounds 3, 8, 10—12 exhibit inhibitory activity against the tested cell lines. The IC₅₀ of compound 10 to the tested cell lines were 22.07, 52.47, and 48.27 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

Key words: *Fritillaria pallidiflora* Schrenk; alkaloids; antitumor activity; erigeside II; imperialine; peimisine; sipeimine-3 β -D-glucoside

伊犁贝母 *Fritillaria pallidiflora* Schrenk 为百合科 (Liliaceae) 贝母属 *Fritillaria* L. 植物, 主要分布于新疆伊犁河流域^[1-2]。其鳞茎入药, 味苦、甘、微

凉, 归肺、心经, 临床上用于治疗呼吸系统疾病的良药。伊犁贝母被收录在《中国药典》2015 年版中的“伊贝母”项下^[3], 是新疆维吾尔族传统维药

收稿日期: 2020-07-12

基金项目: 2018 年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2018]43 号); 国家中医药管理局全国中药资源普查项目(GZY-KJS-2018-004)

作者简介: 金悦仙, 硕士研究生, 从事天然产物化学研究。E-mail: jyx0107@126.com

*通信作者: 石磊岭, 副研究员, 从事天然产物化学研究。E-mail: shileiling@sina.com

张晶, 博士生导师, 教授, 从事天然产物化学研究。E-mail: zhjing0701@163.com

之一^[4], 且产量较高, 和同类贝母相比较具有较高的生物碱含量^[5]。现代药理学表明, 伊犁贝母具有镇咳祛痰、抗炎、抗菌等生理活性^[6-7]。为进一步阐明伊犁贝母的物质基础, 本研究对伊犁贝母 95%乙醇提取物进行了系统研究, 分离得到了 13 个化合物, 分别鉴定为 1-*O*-阿魏酰单甘油酯 (1-*O*-feruloylglycerol, **1**)、4-羟基苯甲醛 (4-hydroxybenzaldehyde, **2**)、环(*D*)-脯-(*D*)-苯丙 [cyclo(*D*)-Pro-(*D*)-Phe, **3**]、香草酸 (vanillic acid, **4**)、2-羟基-3-苯基丙酸甲酯 (2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid methyl ester, **5**)、灯盏花苷 II (erigeside II, **6**)、反式肉桂酸甲酯 (methyl cinnamate, **7**)、西贝母碱 (imperialine, **8**)、阿魏酸乙酯 [ethyl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate, **9**]、贝母辛 (peimisine, **10**)、环(脯氨酸-甘氨酸) [cyclo(pro-gly), **11**]、西贝母碱苷 (sipeimine-3 β -*D*-glucoside, **12**)、6,7-二甲氧基-2-萘乙酸 (6,7-dimethoxynaphthalene-2-carboxylic acid, **13**)。其中, 化合物 **1**~**7**、**9**、**11**、**13** 为首次从伊犁贝母属中分离得到。通过 MTT 法评价了 13 个化合物针对人宫颈癌 HeLa 细胞、结肠癌 Ht-29 细胞、人恶性黑色素瘤 A375 细胞的体外抑制活性, 结果显示化合物 **3**、**8**、**10**~**12** 分别对 3 种肿瘤细胞株具有不同程度的抑制活性, 其中化合物 **10** 活性最强, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 22.07、52.47、48.27 μ mol/L。

1 仪器与材料

Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); 赛默飞世 LTQ-Orbitrap XL 液质联用仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 柱色谱硅胶和薄层色谱用硅胶 G、H、GF₂₅₄ (青岛海洋化工有限公司); HW-40C 凝胶 (Toyopearl 公司), V-3003K 型旋转蒸发仪、SZ-93 型循环水真空泵 (上海振捷实验设备有限公司); 超声波清洗仪 (天津科贝尔光电技术有限公司); BS223S 分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); 常规试剂均为分析纯 (北京化工厂)。

伊犁贝母 (栽培) 采自新疆博尔塔拉蒙古自治州温泉县安格里格乡奇其尔根布呼村, 经新疆维吾尔自治区中药民族药研究所贾晓光研究员鉴定为伊犁贝母 *F. pallidiflora* Schrenk 的干燥鳞茎。

2 提取与分离

取伊犁贝母鳞茎部 20 kg, 均分成 2 部分, 阴干, 粉碎为粗粉, 每个部分 (10 kg) 均用体积分数

95%乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得到的总浸膏分为 2 部分, 第 1 部分浸膏 (1089 g)、第 2 部分浸膏 (991 g)。

第 1 部分总浸膏用水分散后, 依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯各萃取 3 次, 萃取液减压浓缩至干, 最终得到石油醚部位浸膏 49.2 g、氯仿部位浸膏 56.1 g、醋酸乙酯部位浸膏 94.5 g。取氯仿部位浸膏 (56.1 g) 经硅胶柱 (100~200 目) 色谱, 石油醚-氯仿 (40:1 $\rightarrow$ 0:1)、氯仿-甲醇 (80:1 $\rightarrow$ 0:1) 梯度洗脱得到 10 个流分 Fr. 1~10。Fr. 5 (2.7 g) 经硅胶柱 (100~200 目) 色谱, 石油醚-氯仿 (1:1.5 $\rightarrow$ 0:1)、氯仿-甲醇 (80:1 $\rightarrow$ 0:1) 梯度洗脱得到 8 个流分 Fr. 5-1~5-8。Fr. 5-4 经 HPLC 半制备色谱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, 60%甲醇) 得到化合物 **1** (2.4 mg) 和 **2** (2.3 mg)。Fr. 5-6 经 C₁₈ 反相柱色谱 (30%~90%甲醇溶液梯度洗脱) 得到 6 个流分 Fr. 5-6-1~5-6-6, Fr. 5-6-2 经 HPLC 半制备色谱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, 65%甲醇) 得到化合物 **3** (3.2 mg)。Fr. 6 (2.9 g) 经 C₁₈ 反相柱色谱 (30%~90%甲醇溶液梯度洗脱) 得到 6 个流分 Fr. 6-1~6-6, Fr. 6-1 经反复凝胶及高效液相色谱分离纯化得到化合物 **4** (4.9 mg)。Fr. 7 (3.1 g) 经 C₁₈ 反相柱色谱 (30%~90%甲醇溶液梯度洗脱) 得到 6 个流分 Fr. 7-1~7-6, Fr. 7-2 经 HPLC 半制备色谱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, 60%甲醇) 得到化合物 **5** (2.9 mg)。Fr. 9 (3.3 g) 经 C₁₈ 反相柱色谱 (30%~90%甲醇梯度洗脱) 得到 6 个流分 Fr. 9-1~9-6, Fr. 9-2 经 HPLC 半制备色谱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, 55%甲醇) 得到化合物 **6** (3.4 mg)。

第 2 部分用 2%盐酸 (pH 3.5) 捏溶, 滤得酸液, 将酸液用石油醚萃取脱脂, 然后用氨水调 pH 值至 10, 依次用氯仿及水饱和的正丁醇萃取, 得到氯仿部位 (18.2 g) 和正丁醇部位 (70.3 g)。取氯仿部位浸膏 (18.2 g) 经硅胶柱 (100~200 目) 色谱, 石油醚-丙酮-三乙胺 (20:1:0.1 $\rightarrow$ 1:5:0.1) 梯度洗脱得到 9 个流分 Fr. A~I。Fr. A 经反复硅胶、凝胶色谱分离纯化, 得到化合物 **7** (2.8 mg)。Fr. B 经反复重结晶得到化合物 **8** (30 mg)。Fr. C 经 HPLC 半制备色谱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, 60%甲醇) 得到化合物 **9** (2.5 mg)。Fr. E 经 HPLC 半制备色谱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, 70%甲醇) 得到化合物 **10** (3.1 mg)。

和 **11** (4.4 mg)。Fr. G 经反复重结晶得到化合物 **12** (62.3 mg)，其母液经 HPLC 半制备色谱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm×10 mm, 5 μ m, 48% 甲醇) 得到化合物 **13** (2.9 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 291 $[M+Na]^+$ (计算值 291, $C_{13}H_{16}O_6Na$ $[M+Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.68 (1H, m, H-7'), 7.08 (1H, m, H-2'), 7.04 (1H, m, H-6'), 6.93 (1H, m, H-5'), 6.36 (1H, m, H-8'), 4.37 (2H, m, H-1), 3.86 (1H, m, H-2), 3.85 (2H, m, H-3), 3.92 (3H, s, 3'-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 168.9 (C-9'), 146.3 (C-3'), 146.2 (C-7'), 146.1 (C-4'), 126.9 (C-1'), 123.6 (C-6'), 114.9 (C-5'), 114.6 (C-8'), 109.5 (C-2'), 72.6 (C-2), 65.6 (C-1), 62.4 (C-3), 56.1 (3'-OMe)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **1** 为 1-*O*-阿魏酰单甘油酯。

化合物 **2**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 145 $[M+Na]^+$ (计算值 145, $C_7H_6O_2Na$ $[M+Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.96 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 6.94 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 9.88 (1H, s, 1-CHO), 5.67 (1H, s, 4-OH); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 130.3 (C-1), 132.5 (C-2), 116.1 (C-3), 161.2 (C-4), 116.1 (C-5), 132.5 (C-6), 190.9 (1-CHO)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **2** 为 4-羟基苯甲醛。

化合物 **3**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 267 $[M+Na]^+$ (计算值 267, $C_{14}H_{16}N_2O_2Na$ $[M+Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.29 (1H, m, H-2), 2.52, 2.50 (2H, m, H-3), 3.34, 2.33 (2H, m, H-4), 3.59, 3.57 (2H, m, H-5), 4.30 (1H, m, H-2'), 2.82, 2.80 (2H, m, H-3'), 7.35 (1H, m, H-5'), 7.34 (1H, m, H-6'), 7.30 (1H, m, H-7'), 7.29 (1H, m, H-8'), 7.23 (1H, m, H-9')。 ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.8 (C-1), 60.3 (C-2), 28.8 (C-3), 22.7 (C-4), 45.6 (C-5), 165.2 (C-1'), 56.4 (C-2'), 37.0 (C-3'), 136.0 (C-4'), 129.4 (C-5'), 129.3 (C-6'), 127.7 (C-7'), 129.4 (C-8'), 129.3 (C-9')。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **3** 为环-(*D*)-脯-(*D*)-苯丙。

化合物 **4**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 191 $[M+Na]^+$ (计算值 191, $C_8H_8O_4Na$ $[M+Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.58 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3), 6.98 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 7.72 (1H, dd, $J = 1.8$ Hz,

8.4 Hz, H-7), 7.43 (1H, s, COOH), 7.08 (1H, s, 5-OH), 3.49 (3H, s, 4-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.7 (C-1), 121.3 (C-2), 114.4 (C-3), 150.8 (C-4), 146.4 (C-5), 112.2 (C-6), 114.4 (C-7), 56.3 (4-OMe)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **4** 为香草酸。

化合物 **5**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 203 $[M+Na]^+$ (计算值 203, $C_{10}H_{12}O_3Na$ $[M+Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.31 (1H, m, H-4'), 7.29 (2H, m, H-3', 5'), 7.21 (2H, m, H-2', 6'), 4.48 (1H, dd, $J = 7.2$, 5.4 Hz, H-2), 3.20 (1H, dd, $J = 4.2$, 13.8 Hz, H-3 α), 3.14 (1H, dd, $J = 4.2$, 13.8 Hz, H-3 β), 3.77 (3H, s, 1-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 174 (C-1), 136.6 (C-1'), 129.8 (C-3'), 129.6 (C-5'), 128.6 (C-4'), 127.1 (C-2', 6'), 71.4 (C-2), 40.7 (C-3), 56.8 (1-OMe)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **5** 为 2-羟基-3-苯基丙酸甲酯。

化合物 **6**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 365 $[M+Na]^+$ (计算值 365, $C_{16}H_{22}O_8Na$ $[M+Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.44 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, s, H-5), 7.05 (1H, m, H-7), 5.14, 5.90 (2H, m, H-8), 5.93 (1H, m, H-9), 3.80 (1H, m, H-10), 3.49 (1H, m, H-11), 3.61 (1H, m, H-12), 3.91 (1H, m, H-13), 3.82 (2H, m, H-14), 2.04 (4H, s, 11~14-OH), 3.85 (3H, s, 2-OMe), 3.85 (3H, s, 6-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 137.8 (C-1), 152.7 (C-2), 106.7 (C-3), 120.1 (C-4), 106.7 (C-5), 152.7 (C-6), 136.9 (C-7), 116.7 (C-8), 105.7 (C-9), 76.8 (C-10), 70.4 (C-11), 74.4 (C-12), 74.4 (C-13), 62.6 (C-14), 56.4 (2-OMe), 56.4 (6-OMe)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **6** 为灯盏花苷 II。

化合物 **7**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 185 $[M+Na]^+$ (计算值 185, $C_{10}H_{10}O_2Na$ $[M+Na]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.7 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 7.57 (1H, dd, $J = 1.2$, 2.4 Hz, H-4), 7.56 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3, 5), 7.42 (2H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2, 6), 6.46 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 3.81 (3H, s, H-10); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.6 (C-9), 145.1 (C-7), 134.5 (C-1), 130.4 (C-2, 6), 129.1 (C-4), 128.2 (C-3, 5), 117.9 (C-8), 51.9 (C-10)。以上数据与文献描述一致^[14], 故鉴定化合物 **7** 为反式肉桂酸甲酯。

化合物 **8**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 452 $[M+Na]^+$ (计算值 452, $C_{27}H_{43}NO_3Na$ $[M+Na]^+$)。 1H -NMR

(600 MHz, CDCl_3) δ : 1.47 (2H, m, H-1), 1.76 (2H, m, H-2), 3.46 (2H, s, H-3), 2.01 (2H, m, H-4), 2.38 (1H, m, H-5), 2.38 (2H, m, H-7), 1.74 (1H, m, H-8), 1.47 (1H, m, H-9), 1.55 (2H, m, H-11), 1.40 (1H, m, H-12), 1.61 (1H, m, H-13), 1.40 (1H, m, H-14), 1.53 (4H, m, H-15, 16), 1.48 (1H, m, H-17), 2.38 (4H, m, H-18, 26), 1.15 (3H, m, H-19), 1.47 (1H, m, H-20), 1.33 (3H, m, H-21), 2.38 (1H, m, H-22), 1.59 (4H, m, H-23, 24), 1.61 (1H, m, H-25), 1.09 (3H, m, H-27), 2.02 (1H, m, 3-OH), 2.01 (1H, m, 20-OH); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 30.6 (C-1), 30.4 (C-2), 70.6 (C-3), 30.4 (C-4), 56.7 (C-5), 211.1 (C-6), 46.6 (C-7), 39.1 (C-8), 56.5 (C-9), 38.3 (C-10), 30.6 (C-11), 40.3 (C-12), 39.1 (C-13), 46.6 (C-14), 26.9 (C-15), 19.6 (C-16), 49.0 (C-17), 59.8 (C-18), 22.4 (C-19), 72.1 (C-20), 22.4 (C-21), 70.8 (C-22), 19.8 (C-23), 37.6 (C-24), 27.8 (C-25), 61.4 (C-26), 17.3 (C-27)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **8** 为西贝母碱。

化合物 **9**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 245 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 245, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$)。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.63 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 7.08 (1H, dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, H-6), 7.04 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 6.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.30 (1H, $J = 15.6$ Hz, H-8), 4.27 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H-10), 3.93 (3H, s, 3-OMe), 1.35 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, 10-Me); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 167.5 (C-9), 148.0 (C-4), 147.8 (C-3), 144.9 (C-7), 127.6 (C-1), 123.2 (C-2), 115.8 (C-5), 114.8 (C-6), 109.4 (C-8), 60.6 (C-10), 56.1 (3-OMe), 14.6 (10-Me)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **9** 为阿魏酸乙酯。

化合物 **10**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 450 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 450, $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$)。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.47 (2H, m, H-1), 1.73 (2H, m, H-2), 3.17 (1H, m, H-3), 1.74 (2H, m, H-4), 2.30 (2H, m, H-7), 1.75 (1H, m, H-8), 1.76 (1H, m, H-9), 1.16 (1H, m, H-10), 2.09 (2H, m, H-11), 1.73 (1H, m, H-13), 2.09 (1H, m, H-14), 1.74 (2H, m, H-15), 1.75 (2H, m, H-16), 1.63 (3H, m, H-18), 1.16 (3H, m, H-19), 2.28 (1H, m, H-20), 1.09 (3H, s, H-21), 2.81 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-22), 3.79 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-23), 1.72 (2H, m, H-24), 1.47 (1H, m, H-25), 2.64 (2H, m, H-26), 1.03 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 39.1 (C-1),

31.7 (C-2), 70.5 (C-3), 37.1 (C-4), 56.7 (C-5), 210.6 (C-6), 45.8 (C-7), 46.0 (C-8), 54.5 (C-9), 38.5 (C-10), 28.5 (C-11), 128.5 (C-12), 141.0 (C-13), 48.6 (C-14), 24.2 (C-15), 30.0 (C-16), 85.1 (C-17), 13.1 (C-18), 12.5 (C-19), 39.7 (C-20), 10.7 (C-21), 66.3 (C-22), 75.6 (C-23), 30.4 (C-24), 31.6 (C-25), 54.7 (C-26), 18.9 (C-27)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **10** 为贝母辛。

化合物 **11**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 177 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 177, $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$)。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 3.61 (2H, s, H-3), 2.09 (2H, m, H-4), 2.35 (2H, m, H-5), 4.68 (1H, m, H-6), 8.11 (1H, m, NH-8), 4.05 (2H, m, H-9); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 159.1 (C-1, C=O), 153.6 (C-2, C=O), 45.5 (C-3), 25.3 (C-4), 29.8 (C-5), 63.1 (C-6), 46.7 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **11** 为环(脯氨酸-甘氨酸)。

化合物 **12**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 614 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 614, $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{NO}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$)。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.47 (2H, m, H-1), 1.76 (2H, m, H-2), 2.53 (1H, m, H-3), 2.01 (2H, m, H-4), 2.38 (1H, m, H-5), 2.39 (2H, m, H-7), 1.74 (1H, m, H-8), 1.47 (1H, m, H-9), 1.55 (2H, m, H-11), 1.40 (2H, m, H-12), 1.61 (1H, m, H-13), 1.40 (1H, m, H-14), 1.53 (4H, m, H-15, 16), 1.48 (1H, m, H-17), 2.38 (4H, m, H-18, 26), 1.15 (3H, m, H-19), 1.47 (1H, m, H-20), 1.33 (3H, m, H-21), 2.38 (1H, m, H-22), 1.59 (4H, m, H-23, 24), 1.61 (1H, m, H-25), 1.09 (3H, m, H-27), 3.76 (1H, m, H-2'), 3.47 (1H, m, H-3'), 3.49 (1H, m, H-4'), 3.56 (1H, m, H-5'), 4.40 (1H, m, H-6'), 3.51 (2H, m, H-7'), 2.05 (4H, m, 3',4',5',7'-OH); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 30.6 (C-1), 29.7 (C-2), 72.2 (C-3), 28.7 (C-4), 56.7 (C-5), 211.1 (C-6), 46.6 (C-7), 39.1 (C-8), 56.5 (C-9), 38.3 (C-10), 30.6 (C-11), 40.3 (C-12), 39.1 (C-13), 46.6 (C-14), 26.9 (C-15), 19.6 (C-16), 49.0 (C-17), 59.8 (C-18), 22.4 (C-19), 72.1 (C-20), 22.4 (C-21), 70.8 (C-22), 19.8 (C-23), 37.6 (C-24), 27.8 (C-25), 61.4 (C-26), 17.3 (C-27), 78.2 (C-2'), 69.7 (C-3'), 73.4 (C-4'), 75.7 (C-5'), 101.1 (C-6'), 61.7 (C-7')。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **12** 为西贝母碱苷。

化合物 **13**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 255 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 255, $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$)。 ^1H -NMR

(600 MHz, CDCl_3) δ : 7.54 (1H, s, H-8), 6.94 (1H, s, H-1), 6.96 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3), 6.80 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-4), 5.88 (1H, brs, -OH), 3.75 (6H, s, -OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 165.8 (-COOH), 148.4 (C-6), 146.2 (C-7), 144.4 (C-1), 131.2 (C-10), 126.1 (C-9), 122.6 (C-8), 115.8 (C-4), 114.5 (C-3), 114.3 (C-2), 109.7 (C-5), 55.7 (-OMe), 51.2 (-OMe)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **13** 为 6,7-二甲氧基-2-萘乙酸。

4 抗肿瘤活性筛选

采用 MTT 比色法测定化合物 **1**~**13** 的体外抑制人宫颈癌 HeLa 细胞^[19]、结肠癌 Ht-29 细胞以及人恶性黑色素瘤 A375 细胞的活性^[20]。以化合物 **1**~**13** 为实验组, 顺铂为阳性对照组, 同时设对照组。分别称取 2 mg 待测样品, 用 DMSO 溶液充分溶解后, 配制成为 40 mg/mL 的母液, 过滤除菌后避光保存于 -20°C 冰箱中。实验前采用倍半稀释法, 用完全培养基将母液稀释为实验浓度。取对数生长期的 HeLa 细胞、Ht-29 细胞、A375 细胞, 并用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液后, 细胞计数, 以 $6 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板中, 并在 CO_2 培养箱中培养 24 h 后给药。对照组给予等体积的 PBS。实验组中分别加入培养基配制的不同质量浓度 (0、200、400、600、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 待测样品; 在阳性对照组中加入不同浓度的顺铂, 每个浓度设 3 个复孔, 继续培养 48 h, 在避光条件下, 加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 (10 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 在培养箱中再培养 4 h, 弃上清后加入 DMSO 溶液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。放置于摇床上震荡 5~10 min, 使结晶充分溶解后, 并于酶联免疫检测仪 570 nm 波长处检测吸光度 (A), 根据 A 值计算半数抑制浓度 (IC_{50}), 见表 1。结果显示化合物 **3** 和 **11** 对 HeLa、A375 细胞具有一定的体外抑制作用, 化合物 **8** 对 HeLa 细胞的抑制作用较弱, 但对 A375 细胞的抑制作用较强, 化合物 **12** 对 HeLa、Ht-29 细胞的抑制作用较弱, 化合物 **10** 对 HeLa、Ht-29 和 A375 细胞的具有一定抑制作用。

5 讨论

多项研究表明伊犁贝母具有抗肿瘤活性, Shen 等^[21]运用色谱技术结合波谱技术从伊犁贝母中分离鉴定出了对 HeLa 细胞具有良好抑制作用的活性成分, 其 IC_{50} 值为 5.1~75.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。本实验从伊犁贝母中分离鉴定出了 13 个化合物, 根据已有对贝母属中抗肿瘤活性物质的研究, 对 13 个化合物

表 1 化合物 **3**、**8**、**10**~**12** 分别对 HeLa、Ht-29、A375 细胞的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of compounds **3**, **8**, **10**—**12** on HeLa, Ht-29, A375 cell lines

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	HeLa	Ht-29	A375
3	50.70	>100	65.68
8	95.43	>100	24.23
10	22.07	52.47	48.27
11	50.29	>100	65.19
12	83.61	76.02	>100
顺铂	3.42	28.45	29.38

进行了体外抗肿瘤活性实验。结果表明, 化合物 **10** 对 HeLa 细胞、Ht-29 细胞以及 A375 细胞均具有良好的抑制活性, 说明伊犁贝母的抗肿瘤活性具有巨大的开发潜力^[22], 对进一步研究抗肿瘤新药提供了一定的帮助。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张亚山, 宫喜臣. 伊犁贝母的栽培技术 [J]. 特种经济动植物, 2002, 5(6): 26-27.
- [2] 陈梅花, 王慧春, 朱艳媚, 等. 贝母的药理研究 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(1): 103-105.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 141-142.
- [4] Li S L, Li P, Lin G, *et al.* Simultaneous determination of seven major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 873(2): 221-228.
- [5] 伊江兰, 麦迪尼亚提. 伊犁贝母总生物碱的研究概述 [J]. 新疆中医药, 2002, 20(4): 77-79.
- [6] 徐惠波, 孙晓波, 温富春. 伊犁贝母和梭砂贝母生理活性的初步比较 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(7): 391.
- [7] Wu Y B, Su J, Guo R X, *et al.* Two new non-taxoids from leaves of *Taxus cuspidata* [J]. *Chem Nat Compd*, 2014, 50(4): 603-605.
- [8] 王萍, 许静, 王琪, 等. 黑刺蒺藜根茎中苯丙素和二苯乙烯类化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1531-1535.
- [9] 李浩华, 周燕燕, 陈玉婵, 等. 紫玉盘内生真菌节菱孢中 1 个新的异香豆素类化合物 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 369-373.
- [10] 刘海滨, 高昊, 王乃利, 等. 红树林真菌草酸青霉 (092007) 的环二肽类成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(8): 474-478.
- [11] 沈小玲, 曾惠芳, 陈珍, 等. 山橘的化学成分研究 [J].

- 中国药学杂志, 2002, 37(1): 14-17.
- [12] 杨新洲, 吕静南, 郝吉, 等. 昆虫共生真菌 *Fusarium oxysporum* BM2 的代谢产物及其抗肝癌活性研究 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2016, 35(3): 42-47.
- [13] Zhang W, Chen W, Wang Y, *et al.* Studies on the structure of two new glycosides from *Erigeron breviscapus*. [J]. *J Chin Pharmaceut Sci*, 2000, 9(3): 122-124.
- [14] 尹田鹏, 陈阳, 舒燕, 等. 玉龙乌头的化学成分研究 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2018, 40(1): 148-153.
- [15] 曹新伟. 川贝母的化学成分研究与贝母属药用植物质量评价 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
- [16] 柳庆龙, 陈阿虹, 唐进英, 等. 胆木枝叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 52-57.
- [17] 于洋, 王建华, 方圣涛, 等. 污损生物膜细菌 *Pseudoalteromonas issachenkonii* YT1305-1 的鉴定及其代谢物化学成分分析 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1278-1286.
- [18] 沈岚, 蒋思萍, 朱华结. 藏波罗花化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(9): 1210-1213.
- [19] 王晓娟, 谢谦, 刘杨, 等. 土家族药物扣子七中三萜皂苷成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1831-1838.
- [20] 彭文文, 刘欣媛, 曾广智, 等. 小叶臭黄皮呋唑生物碱化学成分及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 886-890.
- [21] Shen S, Li G, Huang J, *et al.* Steroidal saponins from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(4): 785-794.
- [22] 于立坚, 马润娣, 于廷曦. 土贝母苷甲和苷乙的抗肿瘤作用 [J]. 中国新药杂志, 2002, 11(9): 692-694.

[责任编辑 王文倩]