

## 青龙衣化学成分分离及其体外抗肿瘤活性的研究

柴丽华<sup>1,2</sup>, 宋海龙<sup>2</sup>, 马晓玲<sup>2</sup>, 陈刚<sup>2</sup>, 石磊岭<sup>2\*</sup>, 魏鸿雁<sup>2\*</sup>

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

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 研究青龙衣(核桃楸 *Juglans mandshurica* 未成熟果实的外果皮)的化学成分及其体外抗肿瘤活性。方法 应用多种色谱方法对青龙衣 95%甲醇提取物进行分离纯化,利用 NMR、MS 等波谱技术结合理化性质进行结构鉴定;通过 MTT 法,以子宫癌细胞(HeLa)、人胃癌细胞(HGC-27)和结肠癌细胞(Ht-29)为目标细胞,检测得到化合物的体外抗肿瘤活性。结果 从青龙衣 95%甲醇提取物的二氯甲烷萃取部位中分离鉴定出了 12 个化合物,分别为 5,5'-dimethoxybiphenyl-2,2'-diol (1)、4,17-dimethoxy-2-oxatricyclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaene-10,16-diol (2)、3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基-苯基)-丙基-1-酮(3)、4-羟基-3,5-二甲基苯甲酸(4)、(4S)-4-羟基-1-四氢萘酮(5)、(4R)-O-methylsclerone (6)、阿魏酸(7)、(4S)-4,5,8-trihydroxy- $\alpha$ -tetralon(8)、5,8-二羟基-4-甲氧基- $\alpha$ -四氢萘酮(9)、(6R,7E)-4,7-megastigmadien-3,9-dione (10)、3,4'-dihydroxy-3'-methoxybenzenepentanoic acid (11)、vomifoliol (12)。结论 其中化合物 1~3、6、10~11 首次从青龙衣中得到,并且化合物 2、6、8、9 为青龙衣中的特有成分。化合物 6、10 对 3 种细胞均有良好的抑制作用,化合物 1、3、8、9、11 对 3 种肿瘤细胞表现出一定的体外抑制活性,其半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)值为 6.25~50.2  $\mu$ mol/L。

**关键词:** 胡桃科; 核桃楸; 青龙衣; 化学成分; 抗肿瘤活性; 阿魏酸; 5,8-二羟基-4-甲氧基- $\alpha$ -四氢萘酮;

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)19-5822-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.004

## Study on isolation of chemical constituents from *green walnut husks* and its antitumor activity *in vitro*

CHAI Li-hua<sup>1,2</sup>, SONG Hai-long<sup>2</sup>, MA Xiao-ling<sup>2</sup>, CHEN Gang<sup>2</sup>, SHI Lei-ling<sup>2</sup>, WEI Hong-yan<sup>2</sup>

1. School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

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

**Abstract: Objective** To study the chemical constituents and their antitumor activity from *green walnut husks*. **Methods** The chemical constituents of 95% methanol extract from *Green walnut husks* were systematically studied by various chromatographic techniques. The chemical structures of the compounds were identified by means of spectroscopic techniques and physicochemical properties. The antitumor activity of the obtained compounds *in vitro* was determined by MTT assay using (Hela), human gastric cancer cells (HGC-27) and colon cancer cells (Ht-29) as target cells. **Results** Twelve compounds were isolated from the dichloromethane extracted of 95% methanol extracted from *green walnut husks*, including 5,5'-dimethoxybiphenyl-2,2'-diol (1), 4,17-dimethoxy-2-oxatricyclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaene-10,16-diol (2), 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propan-1-one (3), 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (4), (4S)-4-hydroxy-1-tetralone (5), (4R)-O-methylsclerone (6), ferulic acid (7), (4S)-4,5,8-trihydroxy- $\alpha$ -tetralon (8), 5,8-dihydroxy-4-methoxy- $\alpha$ -tetralone (9), (6R,7E)-4,7-megastigmadien-3,9-dione (10), 3,4'-dihydroxy-3'-methoxybenzenepentanoic acid (11), and vomifoliol (12). **Conclusion** Among them, compounds 1-3, 6, 10-11 are obtained from *green walnut husks* for the first time, and compounds 2, 6, 8, and 9 are unique to *green walnut husks*. The results show that compounds 6 and 10 have a good inhibitory effect on three types of cells. Compounds 1, 3, 8, 9, and 11 show a

收稿日期: 2021-02-20

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2020D01A116)

作者简介: 柴丽华(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向为天然产物化学。E-mail: chailihua0119@163.com

\*通信作者: 石磊岭(1977—),男,副研究员,从事中药学研究。E-mail: shileiling@sina.com

魏鸿雁(1969—),女,研究员,从事中药学研究。E-mail: why-wlmq@sina.com

certain inhibitory activity on three kinds of tumor cells *in vitro*. Their IC<sub>50</sub> ranges from 6.25 to 50.2 μmol/L.

**Key words:** Juglandaceae; *Juglans mandshurica* Maxim.; green walnut husk; chemical constituents; antitumor activity; ferulic acid; 5,8-dihydroxy-4-methoxy- $\alpha$ - tetralone

青龙衣是胡桃科 (Juglandaceae) 植物落叶乔木核桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 未成熟果实的青色外果皮, 又被称为核桃青皮, 始载于《开元本草》, 其镇痛、治痢功效在《山东中草药手册》《救急方》等医药典籍中早有记载, 民间也有将其泡水饮用起止痛之效的应用。现代研究表明, 青龙衣中含有丰富的化学成分, 包括醌类、黄酮类、二芳基庚烷类、酚酸类等<sup>[1]</sup>, 具有良好的抗菌、抗肿瘤、镇痛等多种药理活性<sup>[2-3]</sup>。为了进一步探究青龙衣中的活性物质基础, 本实验通过硅胶柱色谱、反相 C<sub>18</sub> 柱色谱、MCI 中压色谱结合制备型高效液相色谱仪对青龙衣提取物二氯甲烷萃取部位进行了分离纯化, 分别鉴定了 12 个化合物: 5,5'-dimethoxybiphenyl-2,2'-diol (1)、4,17-dimethoxy-2-oxatricyclo [13.2.2.13,7] eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaene-10,16-diol (2)、3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基-苯基)-丙基-1-酮 [3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propan-1-one, 3]、4-羟基-3,5-二甲基苯甲酸 (4-hydroxy-3,5-dimethoxy-benzoic acid, 4)、(4S)-4-羟基-1-四氢萘酮 [(4S)-4-hydroxy-1-tetralone, 5]、(4R)-O-methylsclerone (6)、阿魏酸 (ferulic acid, 7)、(4S)-4,5,8-trihydroxy- $\alpha$ -tetralon (8)、5,8-二羟基-4-甲氧基- $\alpha$ -四氢萘酮 (5,8-dihydroxy-4-methoxy- $\alpha$ -tetralone, 9)、4-megastigmen-3,9-dione (10)、3,4'-dihydroxy-3'-methoxybenzenepene tanoic acid (11)、vomifoliol (12)。其中化合物 1~3、6、10~11 首次从青龙衣中得到, 且化合物 2、6、8、9 为青龙衣中特有成分。采用 MTT 法对 12 个化合物进行体外抑制肿瘤细胞试验, 结果表明, 化合物 1、3、6、8~11 对 3 种不同肿瘤细胞表现出不同的抑制活性。

## 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-Obitrap XL 液质联用仪 (Thermo Fisher 公司), 制备型 Agilent 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 柱色谱硅胶 (青岛海洋化工有限公司), 薄层色谱用硅胶 G、H、GF<sub>254</sub>, MCI (日本三菱化学公司), 常规试剂均为分析纯。

青龙衣采购于新疆和田药材市场, 经新疆中药民族药研究所贾晓光研究员鉴定为核桃楸 *J.*

*mandshurica* Maxim. 未成熟果实的干燥外果皮。

## 2 提取与分离

干燥青龙衣 10 kg, 粉碎, 用 95% 甲醇热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩得浸膏 1075 g。总浸膏用水分散, 依次用石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇进行萃取, 萃取液减压浓缩至干, 得到石油醚部位浸膏 185 g、二氯甲烷部位浸膏 260 g、醋酸乙酯部位浸膏 168 g、正丁醇部位浸膏 287 g。

取二氯甲烷部位浸膏经过硅胶 (100~200 目) 柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (10:1→0:1) 梯度洗脱, 薄层色谱检测, 合并相似洗脱液得到 4 个流分 Fr. A~D。Fr. B (100 g) 经硅胶 (100~200 目) 柱色谱进一步分离, 石油醚-二氯甲烷 (1:10→0:1) 梯度洗脱, 得到 4 个流分 Fr. B-I~B-IV。Fr. B-I (20.0 g) 经反复硅胶柱色谱分离, 石油醚-二氯甲烷 (1:8→0:1) 梯度洗脱, 得到 4 个部位 Fr. B-I-1~B-I-4。Fr. B-I-1 (3.0 g) 过 MCI 中压色谱, 30%~100% 甲醇梯度洗脱, 得到 6 个组分 Fr. B-I-1a~B-I-1f。Fr. B-I-1d 经制备型 HPLC (甲醇-水 65:35) 制备得到化合物 2 (2.2 mg)。Fr. B-I-2 (1.8 g) 进行反相 C<sub>18</sub> 柱色谱分离, 30%~100% 甲醇梯度洗脱, 得到 7 个组分 Fr. B-I-2a~B-I-2g。Fr. B-I-2a 经制备型 HPLC (甲醇-水 28:72) 制备得到化合物 3 (6.1 mg)、4 (35.3 mg)、5 (20.3 mg)。Fr. B-I-2b 经制备型 HPLC (甲醇-水 48:52) 制备得到化合物 1 (3.9 mg)。Fr. B-I-3 (0.9 g) 进行反相 C<sub>18</sub> 柱色谱分离, 30%~100% 甲醇梯度洗脱, 得到 5 个组分 Fr. B-I-3a~B-I-3e。Fr. B-I-3a 经制备型 HPLC (甲醇-水 38:62) 制备得到化合物 6 (3.4 mg)、7 (6.4 mg)。Fr. B-I-3c 经制备型 HPLC (乙腈-水 38:62) 制备得到化合物 11 (2.7 mg)。Fr. B-I-4 (2.2 g) 进行反相 C<sub>18</sub> 柱色谱分离, 30%~100% 甲醇梯度洗脱, 得到 8 个组分: Fr. B-I-4b 经制备型 HPLC (甲醇-水 40:60) 制备得到化合物 8 (17.5 mg)、9 (3.8 mg)、12 (3.2 mg)。Fr. B-I-4c 经制备型 HPLC (乙腈-水 30:70) 制备得到化合物 10 (2.5 mg)。

## 3 结构鉴定

化合物 1: 无色油状物。ESI-MS *m/z*: 269 [M+

Na]<sup>+</sup>(计算值 269, C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.64 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3, 3'), 6.69 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-4, 4'), 6.99 (2H, s, H-6, 6'), 3.71 (6H, s, 5, 5'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 128.2 (C-1, 1'), 150.6 (C-2, 2'), 116.6 (C-3, 3'), 124.2 (C-4, 4'), 149.5 (C-5, 5'), 111.8 (C-6, 6'), 56.6 (5, 5'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道的基本一致<sup>[4]</sup>, 故鉴定化合物 **1** 为 5,5'-dimethoxybiphenyl-2,2'-diol。

化合物 **2**: 无色粉末 (甲醇)。ESI-MS *m/z*: 381 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 381, C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.88 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-3), 6.66 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, H-4), 5.70 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 3.15 (1H, m, H-9), 6.60 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-18), 6.91 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-19); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 147.8 (C-1), 142.7 (C-2), 150.9 (C-3), 125.6 (C-4), 126.7 (C-5), 115.1 (C-6), 29.4 (C-7), 28.2 (C-8), 23.7 (C-9), 37.4 (C-10), 72.7 (C-11), 35.9 (C-12), 28.1 (C-13), 135.5 (C-14), 113.9 (C-15), 151.3 (C-16), 148.5 (C-17), 109.0 (C-18), 121.7 (C-19), 61.9 (2-OCH<sub>3</sub>), 57.0 (16-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[5]</sup>, 故鉴定化合物 **2** 为 4,17-dimethoxy-2-oxatricyclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaene-10,16-diol。

化合物 **3**: 黄色油状物。ESI-MS *m/z*: 219 [M+Na]<sup>+</sup>(计算值 219, C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.55 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.87 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.59 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, H-6), 3.18 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-8), 3.95 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-9), 3.91 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 130.8 (C-1), 113.9 (C-2), 149.3 (C-3), 153.5 (C-4), 116.0 (C-5), 124.9 (C-6), 199.9 (C-7), 42.7 (C-8), 59.1 (C-9), 56.5 (3-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[6]</sup>, 故鉴定化合物 **3** 为 3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基-苯基)-丙基-1-酮。

化合物 **4**: 淡黄色粉末 (甲醇)。ESI-MS *m/z*: 221 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 221, C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.32 (2H, s, H-2, 6), 3.87 (6H, s, 3, 5-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 122.1 (C-1), 108.4 (C-2, 6), 148.9 (C-3, 5), 141.8 (C-4), 56.9 (3, 5-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道的基本一致<sup>[7]</sup>, 故鉴定化合物 **4** 为 4-羟基-3,5-二甲基苯甲酸。

化合物 **5**: 黄色油状物。ESI-MS *m/z*: 185 [M+

Na]<sup>+</sup>(计算值 185, C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 4.92 (1H, dd, *J* = 10.4, 3.6 Hz, H-4), 7.65 (2H, m, H-5, 6), 7.42 (1H, m, H-7), 7.95 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-8); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 200.1 (C-1), 36.5 (C-2), 33.3 (C-3), 68.4 (C-4), 148.1 (C-4a), 127.8 (C-5), 135.4 (C-6), 128.7 (C-7), 129.2 (C-8), 132.5 (C-8a)。以上数据与文献报道的基本一致<sup>[8-9]</sup>, 故鉴定化合物 **5** 为 (4*S*)-4-羟基-1-四氢萘酮。

化合物 **6**: 黄色油状物。ESI-MS *m/z*: 216 [M+Na]<sup>+</sup>(计算值 216, C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 5.11 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-4), 7.09 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, H-6), 7.24 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-7), 7.32 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, H-8), 3.79 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 197.9 (C-1), 32.9 (C-2), 30.4 (C-3), 59.8 (C-4), 131.3 (C-4a), 155.4 (C-5), 116.5 (C-6), 128.5 (C-7), 120.5 (C-8), 132.4 (C-8a), 55.9 (5-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[10]</sup>, 故鉴定化合物 **6** 为 (4*R*)-*O*-methylsclerone。

化合物 **7**: 白色结晶 (甲醇)。mp 169~171 °C。ESI-MS *m/z*: 217 [M+Na]<sup>+</sup>, (计算值 217, C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.28 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.79 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 7.078 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H-6), 7.49 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-7), 6.38 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-8), 3.81 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 124.7 (C-1), 115.8 (C-2), 149.1 (C-3), 147.9 (C-4), 115.5 (C-5), 122.8 (C-6), 144.4 (C-7), 111.1 (C-8), 168.1 (COOH), 55.7 (3-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[11]</sup>, 故鉴定化合物 **7** 为阿魏酸。

化合物 **8**: 淡黄色粉末 (甲醇)。ESI-MS *m/z*: 217 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 217, C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 5.07 (1H, s, H-4), 7.10 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-7); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 205.8 (C-1), 32.8 (C-2), 30.4 (C-3), 59.6 (C-4), 129.3 (C-4a), 146.7 (C-5), 125.6 (C-6), 116.9 (C-7), 154.5 (C-8), 115.2 (C-8a)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[12]</sup>, 故鉴定化合物 **8** 为 (4*S*)-4,5,8-trihydroxy- $\alpha$ -tetralone。

化合物 **9**: 淡黄色粉末 (甲醇)。ESI-MS *m/z*: 231 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 231, C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 4.76 (1H, m, H-4),

7.15 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-6), 6.81 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-7), 3.34 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 205.5 (C-1), 32.5 (C-2), 26.2 (C-3), 67.9 (C-4), 147.0 (C-5), 125.5 (C-5a), 126.4 (C-6), 117.8 (C-7), 154.7 (C-8), 115.3 (C-8a), 56.1 (4-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[13]</sup>, 故鉴定化合物 **9** 为 5,8-二羟基-4-甲氧基- $\alpha$ -四氢萘酮。

化合物 **10**: 无色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 231 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 231, C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 5.73 (1H, s, H-4), 1.91 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz, H-6), 2.09 (3H, s, 10-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, s, 11-CH<sub>3</sub>), 0.99 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub>), 1.96 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 41.9 (C-1), 46.8 (C-2), 197.9 (C-3), 124.5 (C-4), 165.3 (C-5), 49.3 (C-6), 24.0 (C-7), 35.9 (C-8), 208.0 (C-9), 29.9 (C-10), 28.4 (C-11), 26.7 (C-12), 22.9 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **10** 为 (6*R*,7*E*)-4,7-megastigmadien-3,9-dione。

化合物 **11**: 黄色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 263 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 263, C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.59 (1H, m, H-4), 6.71 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 6.65 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5'), 5.55 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-6'), 3.72 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 179.2 (COOH), 43.8 (C-2), 69.0 (C-3), 40.0 (C-4), 31.5 (C-5), 133.3 (C-1'), 112.4 (C-2'), 147.3 (C-3'), 144.3 (C-4'), 115.2 (C-5'), 120.3 (C-6'), 55.5 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 **11** 为 3,4'-dihydroxy-3'-methoxy benzenepentanoic acid。

化合物 **12**: 白色粉末 (甲醇)。ESI-MS  $m/z$ : 256 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 256, C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 5.89 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-5), 6.29 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-7), 6.99 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-8), 4.24 (1H, m, H-9), 1.00 (3H, s, H-10), 0.91 (3H, s, H-11), 0.94 (3H, s, H-12), 1.57 (3H, s, H-13); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 78.6 (C-1), 43.2 (C-2), 49.2 (C-3), 189.0 (C-4), 126.6 (C-5), 162.3 (C-6), 130.6 (C-7), 139.2 (C-8), 63.7 (C-9), 23.8 (C-10), 24.2 (C-11), 23.3 (C-12), 22.3 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物 **12** 为 vomifoliol。

#### 4 体外抗肿瘤活性筛选

采用 MTT 比色法测试化合物 **1~12** 的体外抑

制宫颈癌 HeLa 细胞、人胃癌 HGC-27 细胞以及结肠癌 Ht-29 细胞的活性<sup>[17-18]</sup>。以化合物 **1~12** 为实验组, 顺铂为阳性对照组, 同时设立空白组。

培养基稀释后, 将 HeLa、HGC-27 以及 Ht-29 细胞以  $6 \times 10^4$ /mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, CO<sub>2</sub> 培养箱中正常培养 24 h 后, 各组加入相对应的药物, 设置 5 个浓度, 每个浓度 3 个复孔; 培养 48 h 后, 于每孔加 MTT 10  $\mu$ L 染色; 继续培养 4 h 后, 吸弃原培养液, 每孔加入 DMSO 100  $\mu$ L, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 并于酶联免疫检测仪 570 nm 波长处检测吸光度 ( $A$ ) 值, 根据  $A$  值计算化合物的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>), 结果见表 1。

表 1 化合物 **1**、**3**、**6**、**8~11** 分别对 HeLa、HGC-27、Ht-29 细胞的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of compounds **1**, **3**, **6** and **8~11** on cell lines HeLa, HGC-27 and Ht-29, respectively

化合物	IC <sub>50</sub> /( $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> )		
	HeLa 细胞	HGC-27 细胞	Ht-29 细胞
<b>1</b>		50.20	
<b>3</b>		48.90	21.20
<b>6</b>	6.25	46.10	21.80
<b>8</b>	48.40		
<b>9</b>	27.70		
<b>10</b>	31.50	49.50	28.20
<b>11</b>			50.10
顺铂	3.45	32.94	29.47

实验结果显示结果表明化合物 **6**、**10** 对 3 种细胞均有良好的抑制作用, 化合物 **6** 对 3 种肿瘤细胞的抑制效果接近顺铂。化合物 **3** 对 Ht-29 细胞的抑制活性优于顺铂; 化合物 **9** 对 HeLa 细胞有明显抑制作用; 化合物 **1**、**8**、**11** 对 3 种肿瘤细胞则表现出不同较弱的抑制活性。

#### 5 讨论

本实验从青龙衣 95% 甲醇提取物的二氯甲烷萃取部位中分离得到了 12 个化合物, 并对其进行了体外抗肿瘤活性试验, 结果表明青龙衣中的特有成分化合物 **6**, 以及化合物 **10** 对宫颈癌细胞株 HeLa、人胃癌细胞株 HGC-27 以及结肠癌细胞株 Ht-29 均具有较好的体外抑制作用, 化合物 **3** 对 Ht-29 细胞表现出显著的抑制活性, 说明化合物 **3**、**6** 和 **10** 具有进一步开发抗肿瘤新药的潜力。本实验为探究青龙衣中的活性物质基础提供了理论依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 沈广志, 杨爱华, 邹桂华. 青龙衣化学成分及生物活性研究进展 [J]. 实验室科学, 2018, 21(6): 1-7.
- [2] 唐春丽, 杨冰, 方自扬, 等. 核桃青皮提取物的抑菌和协同抑菌作用 [J]. 中国药师, 2018, 21(4): 577-580.
- [3] 曾桥. 核桃青皮活性成分及抗肿瘤作用研究新进展 [J]. 农产品加工, 2018(9): 63-66.
- [4] Li X B, Chen G Y, Liu R J, *et al.* A new biphenyl derivative from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis longicolla* HL-2232 [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(19): 2264-2267.
- [5] Jiang Z H, Tanaka T, Inutsuka C, *et al.* Alkaloids, diarylheptanoid and naphthalene carboxylic acid ester from *Rhoiptelea chiliantha* [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 2001, 49(6): 737-740.
- [6] 李行诺, 楚楚, 毛慧琼, 等. 地骨皮化学成分研究 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(9): 805-808.
- [7] 杨新洲, 林理根, 唐春萍, 等. 直立百部的非生物碱化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(1): 56-59.
- [8] Liu L J, Li W, Koike K, *et al.* New alpha-tetralonyl glucosides from the fruit of *Juglans mandshurica* [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 2004, 52(5): 566-569.
- [9] Fournet A, Barrios A A, Muñoz V, *et al.* Antileishmanial activity of a tetralone isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis [J]. *Planta Med*, 1994, 60(1): 8-12.
- [10] Chang C W, Chang H S, Cheng M J, *et al.* Inhibitory effects of constituents of an endophytic fungus *Hypoxyton investiens* on nitric oxide and interleukin-6 production in RAW264. 7 macrophages. [J]. *Chem Biodiver*, 2014, 11(6): 949.
- [11] 郑晓珂, 李钦, 冯卫生. 冬凌草水溶性化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(4): 300-302.
- [12] Cimmino A, Villegas-Fernández A M, Andolfi A, *et al.* Botrytone, a new naphthalenone pentaketide produced by *Botrytis fabae*, the causal agent of chocolate spot disease on *Vicia faba* [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(17): 9201-9206.
- [13] 李冬梅, 彭友伦, 刘光明. 漾濞泡核桃青皮化学成分的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 962-965.
- [14] 魏荷琳, 周斯祥, 姜勇, 等. 三叉苦叶的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1193-1197.
- [15] Wang Z B, Gao H Y, Xu F M, *et al.* Three new compounds from the leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms [J]. *Chin Chem Lett*, 2010, 21(6): 702-705.
- [16] Hammami S, Ben Jannet H, Bergaoui A, *et al.* Isolation and structure elucidation of a flavanone, a flavanone glycoside and vomifoliol from *Echiochilon fruticosum* growing in Tunisia [J]. *Molecules*, 2004, 9(7): 602-608.
- [17] 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.
- [18] 彭文文, 刘欣媛, 曾广智, 等. 小叶臭黄皮咪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.

[责任编辑 王文倩]