

亚乎奴蒎类和生物碱类化学成分研究

潘如意^{1,2,3}, 孙彦君^{1,2,3*}, 陈豪杰^{1,2}, 李 孟^{1,2}, 司盈盈^{1,2}, 冯卫生^{1,2*}

1. 河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

3. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 研究亚乎奴 *Cissampelos pareira* var. *hirsuta* 的蒎类和生物碱类化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20、ODS、MCI 等柱色谱和半制备液相色谱对其化学成分进行分离纯化, 通过 MS、NMR 等波谱分析技术, 结合理化性质分析, 鉴定化合物结构。采用 MTS 法, 测试化合物 **1**、**2**、**4**、**6~9**、**13**、**14** 对人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞、人肺癌 A549 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人结肠癌 SW480 细胞的细胞毒性。结果 从亚乎奴 95% 乙醇提取物中分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为羽扇豆醇 (**1**)、白桦脂醇 (**2**)、3 β ,14-二羟基-14 β -孕甾-5-烯-20-酮 (**3**)、3 β -羟基-17 β -孕甾-5-烯-7,20-二酮 (**4**)、假虎刺酮 (**5**)、脱氢地芫内酯 (**6**)、黑麦草内酯 (**7**)、(+)-去氢催吐萝芙木醇 (**8**)、(3S,5R,6S,7E)-3,5,6-三羟基-7-巨豆烯-9-酮 (**9**)、(6R,7E,9S)-9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮 (**10**)、催吐萝芙木醇 (**11**)、8,9-二氢-8,9-二羟基巨豆三烯酮 (**12**)、橙黄胡椒酰胺乙酸酯 (**13**)、橙黄胡椒酰胺 (**14**)、橙黄胡椒酰胺苯甲酸酯 (**15**)。MTS 测试结果显示, 化合物 **2** 对 A549 细胞和 SMMC-7721 细胞具有一定的细胞毒活性, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值分别为 23.62、27.46 μ mol/L。结论 所有化合物均为首次从锡生藤属植物中分离得到, 包括三蒎类化合物 4 个 (**1~4**)、单蒎类化合物 8 个 (**5~12**)、生物碱类化合物 3 个 (**13~15**)。羽扇豆烷型三蒎可能为亚乎奴药材抗肿瘤活性的药效物质基础。

关键词: 亚乎奴; 蒎类化合物; 细胞毒活性; 羽扇豆烷型三蒎; 白桦脂醇; 橙黄胡椒酰胺

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)18-5607-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.003

Terpenoids and alkaloids from *Cissampelos pareira* var. *hirsuta*

PAN Ru-yi^{1,2,3}, SUN Yan-jun^{1,2,3}, CHEN Hao-jie^{1,2}, LI Meng^{1,2}, SI Ying-ying^{1,2}, FENG Wei-sheng^{1,2}

1. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

3. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To study the terpenoids and alkaloids from *Cissampelos pareira* var. *hirsuta*. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, ODS, MCI column chromatography and preparative HPLC, and their structures were identified by physicochemical properties, NMR and MS. Compounds **1**, **2**, **4**, **6~9**, **13** and **14** were tested for their cytotoxicity in human liver cancer SMMC-7721, breast cancer MCF-7, leukemia HL-60, lung cancer A549, colon cancer SW480 cell lines by MTS. **Results** Fifteen compounds were isolated from the 95% ethanol extract of *Cissampelos pareira* var. *hirsuta*, and their structures were identified as lupeol (**1**), betulin (**2**), 3 β ,14-dihydroxy-14 β -pregn-5-en-20-one (**3**), 3 β -hydroxy-17 β -pregn-5-ene-7,20-dione (**4**), carissone (**5**), dehydrololiolide (**6**), loliolide (**7**), dehydrovomifoliol (**8**), (3S,5R,6S,7E)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one (**9**), (6R,7E,9S)-9-hydroxy-4,7-megastigmadien-3-one (**10**), vomifoliol (**11**), 8,9-dihydro-8,9-dihydroxymegastigmatrione (**12**), aurantiamide acetate (**13**), aurantiamide (**14**), and aurantiamide benzoate (**15**). Compound **2** showed the most potent cytotoxic activities against the A549 and SMMC-7721 cell lines, with IC₅₀ values of 23.62 and 27.46

收稿日期: 2021-04-26

基金项目: 河南中医药大学省属高校基本科研业务专项 (2014KYYWF-QN26); 河南中医药大学科技创新人才 (2016XCXRC01); 河南省科技攻关 (192102310438); 河南省中医药科学研究专项 (20-21ZY1039)

作者简介: 潘如意 (1998—), 女 (汉族), 硕士研究生, 从事天然抗肿瘤活性物质研究。Tel: 18837138537 E-mail: 18837138537@163.com

*通信作者: 孙彦君 (1978—), 女 (汉族), 教授, 硕士生导师, 从事天然抗肿瘤活性物质研究。Tel: (0371)65962746 E-mail: sunyanjunily@126.com
冯卫生 (1960—), 男 (汉族), 教授, 博士生导师, 从事中药活性成分研究。Tel: (0371)60190296 E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

$\mu\text{mol/L}$, respectively. **Conclusion** All compounds are isolated from *Cissampelos* genus for the first time, including four triterpenoids (1~4), eight monoterpenoids (5~12) and three alkaloids (13~15). Lupane triterpenoids may be antitumor constituents from *Cissampelos pareira* var. *hirsuta*.

Key words: *Cissampelos pareira* var. *hirsuta* (Buch.ex DC.) Forman; terpenoids; cytotoxic; lupane triterpenoids; betulin; aurantiamide

亚乎奴为防己科植物锡生藤 *Cissampelos pareira* var. *hirsuta* (Buch. ex DC.) Forman 的干燥全株, 为傣族习用药材, 具有消肿止痛, 止血, 生肌之功效^[1]。现代药理研究表明, 亚乎奴具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗蛇毒等作用^[2-3]。目前, 已从该植物中发现了生物碱、黄酮、萜类、甾体、小分子酚酸等类型化学成分^[4], 关于其化学成分的研究多集中于生物碱, 为进一步阐明其药效物质基础, 为开发利用提供理论依据, 本课题组对亚乎奴 95%乙醇提取物的中的生物碱和萜类化合物进行研究, 共分离鉴定了 15 个化合物, 分别为羽扇豆醇(lupeol, 1)、白桦脂醇(betulin, 2)、3 β ,14-二羟基-14 β -孕甾-5-烯-20-酮(3 β ,14-dihydroxy-14 β -pregn-5-en-20-one, 3)、3 β -羟基-17 β -孕甾-5-烯-7,20-二酮(3 β -hydroxy-17 β -pregn-5-ene-7,20-dione, 4)、假虎刺酮(carissone, 5)、脱氢地芫普内酯(dehydrololiolide, 6)、黑麦草内酯(loliolide, 7)、(+)-去氢催吐萝芙木醇(dehydrovomifoliol, 8)、(3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-三羟基-7-巨豆烯-9-酮[(3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one, 9]、(6*R*,7*E*,9*S*)-9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮[(6*R*,7*E*,9*S*)-9-hydroxy-4,7-megastigmadien-3-one, 10]、催吐萝芙木醇(vomifoliol, 11)、8,9-二氢-8,9-二羟基巨豆三烯酮(8,9-dihydro-8,9-dihydroxymegastigmatrienone, 12)、橙黄胡椒酰胺乙酸酯(aurantiamide acetate, 13)、橙黄胡椒酰胺(aurantiamide, 14)、橙黄胡椒酰胺苯甲酸酯(aurantiamide benzoate, 15)。所有化合物均为首次从锡生藤属植物中分离得到。采用 MTS 法, 对化合物 1、2、4、6~9、13、14 进行了体外细胞毒活性评价, 结果显示化合物 2 对人肺癌细胞 A549 和人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞显示一定的细胞毒活性, 半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC₅₀)值分别为 23.62、27.46 $\mu\text{mol/L}$ 。

1 仪器与材料

Bruker AVANCE III 500 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司); Bruker maxis HD 型飞行时间质谱(德国 Bruker 公司); 制备型高效液相色谱仪(北京赛谱锐思科技有限公司); N-1000 型旋转蒸发仪(上

海爱朗仪器有限公司); SHB-B95A 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); DFZ-3 型真空干燥箱(上海医用恒温设备厂); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶(200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech 公司); ODS (100 μm , YMC); MCI Gel CHP-20 (日本三菱化学); 甲醇, 色谱纯(天津市四友精细化学品有限公司); MTS (美国 Promega 公司); 其他试剂均为分析级。

人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞株、人肺癌 A549 细胞株、人肝癌 SMMC-7721 细胞株、人乳腺癌 MCF-7 细胞株、人结肠癌 SW480 细胞株均购买自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

亚乎奴药材采集于云南, 经河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为锡生藤属植物锡生藤 *C. pareira* var. *hirsuta* (Buch. ex DC.) Forman 的干燥全株。

2 提取与分离

取干燥的亚乎奴药材 50.66 kg, 用 95%乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 减压浓缩得总浸膏 2 736.5 g。用蒸馏水混悬, 依次用石油醚、氯仿、正丁醇萃取, 得到石油醚萃取部位(351.1 g)、氯仿萃取部位(740.1 g)、正丁醇萃取部位(594.5 g)及水萃取部位(562.8 g)。

将氯仿萃取部位经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-丙酮(100:0~1:2)梯度洗脱得到 5 个组分 Fr. C1~C5。组分 Fr. C2 经硅胶柱色谱分离后, 重结晶得到化合物 1 (10 mg)。组分 Fr. C3 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯(100:0~100:50)梯度洗脱, 得到 7 个亚组分 Fr. C3-1~C3-7。亚组分 Fr. C3-3 经 Sephadex LH-20 柱色谱[二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱]分离, 得到 Fr. C3-3-1~C3-3-5。Fr. C3-3-4 经 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水(30%、50%、70%、73%、76%、79%、82%、85%、90%、100%)梯度洗脱, 得到 10 个组分 Fr. C3-3-4-1~C3-3-4-10。组分 Fr. C3-3-4-1 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯梯度(100:0~100:50)梯度洗脱, 得到组分 Fr. C3-3-4-1-3, 再经制备型高效液相色谱(23%乙腈)分离, 得到化合物 5 (3.6 mg,

$t_R=45.7$ min)、**6** (11.2 mg, $t_R=43.5$ min)。组分 Fr. C3-3-4-8 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯(100:0~100:30)洗脱, 得到化合物 **2** (5.6 mg)。Fr.C3-4 经 MCI 柱色谱分离, 甲醇-水(20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%) 洗脱, 得到 9 个亚组分 Fr. C3-4-1~C3-4-9。亚组分 Fr. C3-4-3 经制备型高效液相色谱(43%甲醇)分离, 得到化合物 **8** (16 mg, $t_R=23.0$ min)。亚组分 Fr.C3-4-4 以经制备型高效液相色谱(53%甲醇)分离, 得到化合物 **9** (3 mg, $t_R=26.0$ min)、**10** (3.5 mg, $t_R=32.4$ min)。组分 Fr. C4 经 MCI 柱色谱分离, 以甲醇-水(10%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、100%)梯度洗脱, 得到 8 个亚组分 Fr.C4-1~Fr.C4-6。经薄层色谱检识, 将 Fr.C4-1 经硅胶柱色谱分离, 用石油醚-丙酮(100:0~1:2)梯度洗脱, 得到 5 个亚组分 Fr. C4-1-1~C4-1-5。Fr.C4-1-3 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯(50:1~1:2)洗脱, 得到组分 Fr. C4-1-3-1~C4-1-3-4。Fr. C4-1-3-2 经制备型高效液相色谱(37%甲醇, 6 mL/min)分离, 得到化合物 **7** (3.0 mg, $t_R=40.1$ min)。亚组分 Fr. C4-1-4 用 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 以甲醇洗脱, 得到 Fr. C4-1-4-1~C4-1-4-3。Fr. C4-1-4-2 经制备型高效液相色谱分离, 第 1 次用 35%甲醇($t_R=32.9$ min)洗脱, 第 2 次用 25%乙腈(6 mL/min)制备得到化合物 **11** (17 mg, $t_R=27.4$ min)、**12** (3.3 mg, $t_R=40.5$ min)。组分 Fr. C4-2 经 Sephadex LH-20(甲醇洗脱)柱色谱分离, 得到 6 个亚组分 Fr. C4-2-1~C4-2-6。亚组分 Fr. C4-2-2 经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇(80:1~10:1)梯度洗脱, 得到 5 个组分 Fr. C4-2-2-1~C4-2-2-5, 组分 Fr. C4-2-2-1 经制备型高效液相色谱(52%乙腈, 6 mL/min)分离, 得到化合物 **3** (4.5 mg, $t_R=34.8$ min)、**4** (3.6 mg, $t_R=21.2$ min)。组分 Fr. C4-3 经硅胶柱色谱分离, 用石油醚-醋酸乙酯(10:1~1:2)梯度洗脱, 得到 5 个亚组分 Fr. C4-3-1~C4-3-5。Fr. C4-3-3 经制备型高效液相色谱(50%乙腈, 6 mL/min)分离, 得到化合物 **14** (7.4 mg, $t_R=40.2$ min)。组分 Fr. C4-4 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯(10:1~1:2)梯度洗脱, 得到 5 个亚组分 Fr. C4-4-1~C4-4-4。亚组分 Fr. C4-4-3 通过重结晶, 得到化合物 **13** (30 mg)。组分 Fr. C4-5 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯(10:1~1:2, 纯甲醇)梯度洗脱, 得到 3 个亚组分 Fr. C4-5-1~C4-5-3。亚组分

Fr. C4-5-2 经 Sephadex LH-20(甲醇洗脱)分离, 得到 5 个组分 Fr. C4-5-2-1~C4-5-2-5。Fr. C4-5-2-2 经制备型高效液相色谱(75%甲醇, 6 mL/min)分离, 得到化合物 **15** (19 mg, $t_R=44.8$ min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 3.45 (1H, m, H-3), 2.47 (1H, dd, $J=16.1$, 10.5 Hz, H-19), 1.02 (3H, s, H-23), 0.87 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-25), 1.23 (3H, s, H-26), 1.04 (3H, s, H-27), 0.81 (3H, s, H-28), 4.87 (1H, brs, H-29a), 4.72 (1H, brs, H-29b), 1.73 (3H, s, H-30); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 39.1 (C-1), 27.6 (C-2), 77.9 (C-3), 39.3 (C-4), 55.6 (C-5), 18.6 (C-6), 34.5 (C-7), 40.9 (C-8), 50.5 (C-9), 37.3 (C-10), 20.9 (C-11), 25.3 (C-12), 38.1 (C-13), 42.8 (C-14), 27.6 (C-15), 35.6 (C-16), 43.0 (C-17), 48.0 (C-18), 48.4 (C-19), 150.8 (C-20), 29.9 (C-21), 40.0 (C-22), 28.1 (C-23), 16.1 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.5 (C-27), 18.0 (C-28), 109.7 (C-29), 19.2 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物 **1** 为羽扇豆醇。

化合物 **2**: 白色针晶(二氯甲烷)。mp 236~238 °C。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 3.45 (1H, dd, $J=8.0$, 1.5 Hz, H-3), 0.95 (3H, s, H-23), 0.81 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, s, H-25), 1.01 (3H, s, H-26), 1.03 (3H, s, H-27), 4.47 (2H, m, H-28), 5.49 (1H, brs, H-29a), 5.11 (1H, brs, H-29b), 1.22 (3H, s, H-30); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 40.8 (C-1), 29.1 (C-2), 79.4 (C-3), 40.6 (C-4), 57.1 (C-5), 20.0 (C-6), 39.6 (C-7), 41.4 (C-8), 52.0 (C-9), 37.0 (C-10), 22.4 (C-11), 28.2 (C-12), 38.7 (C-13), 42.4 (C-14), 29.6 (C-15), 31.3 (C-16), 44.3 (C-17), 50.2 (C-18), 44.5 (C-19), 157.8 (C-20), 33.4 (C-21), 36.0 (C-22), 30.0 (C-23), 17.5 (C-24), 17.7 (C-25), 17.6 (C-26), 16.0 (C-27), 65.5 (C-28), 107.5 (C-29), 19.2 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **2** 为白桦酯醇。

化合物 **3**: 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.25 (1H, m, H-1a), 1.73 (1H, m, H-1b), 3.42 (1H, m, H-3), 5.41 (1H, m, H-6), 1.81 (1H, m, H-8), 1.12 (1H, m, H-9), 2.14 (1H, m, H-11a), 2.04 (1H, m, H-11b), 1.31 (1H, m, H-12a), 1.23 (1H, m, H-12b), 1.92 (1H, m, H-15a), 1.81 (1H, m, H-15b), 1.92 (2H, m, H-16), 3.00 (1H, dd, $J=9.5$, 4.5 Hz, H-17), 1.01 (3H, s, H-18), 1.04 (3H, s, H-19), 2.27

(3H, s, H-21); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 38.5 (C-1), 32.2 (C-2), 72.3 (C-3), 42.8 (C-4), 141.0 (C-5), 122.7 (C-6), 28.3 (C-7), 37.8 (C-8), 47.4 (C-9), 38.1 (C-10), 21.8 (C-11), 39.6 (C-12), 50.2 (C-13), 86.9 (C-14), 35.1 (C-15), 25.2 (C-16), 63.8 (C-17), 15.5 (C-18), 19.9 (C-19), 219.1 (C-20), 32.2 (C-21)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **3** 为 3 β ,14-二羟基-14 β -孕甾-5-烯-20-酮。

化合物 **4**: 白色粉末。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.27 (1H, t, $J = 11.3$ Hz, H-1a), 1.70 (1H, overlapped, H-1b), 3.69 (1H, m, H-3), 2.56-2.37 (2H, overlapped, H-4), 5.72 (1H, s, H-6), 1.81-1.51 (1H, overlapped, H-8), 1.50~1.33 (2H, overlapped, H-16), 2.05 (1H, m, H-11a), 1.81-1.51 (1H, overlapped, H-11b), 1.50~1.33 (2H, overlapped, H-12), 1.97 (1H, m, H-15a), 1.81~1.51 (1H, overlapped, H-15b), 1.81~1.51 (1H, overlapped, H-9), 2.05 (1H, dd, $J = 12.6, 3.4$ Hz, H-17), 0.66 (3H, s, H-18), 1.21 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 36.4 (C-1), 31.1 (C-2), 70.5 (C-3), 41.8 (C-4), 165.4 (C-5), 125.9 (C-6), 201.5 (C-7), 45.2 (C-8), 49.8 (C-9), 38.3 (C-10), 21.1 (C-11), 37.7 (C-12), 44.4 (C-13), 50.0 (C-14), 26.5 (C-15), 23.6 (C-16), 62.3 (C-17), 13.3 (C-18), 17.3 (C-19), 209.7 (C-20), 31.6 (C-21)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **4** 为 3 β -羟基-17 β -孕甾-5-烯-7,20-二酮。

化合物 **5**: 白色粉末。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.55 (1H, ddd, $J = 17.0, 11.7, 8.1$ Hz, H-2a), 2.33 (1H, overlapped, H-2b), 1.89 (1H, overlapped, H-6a), 2.92 (1H, m, overlapped, H-6b), 1.28 (6H, s, H-12, 13), 1.75 (3H, d, $J = 1.1$ Hz, H-14), 1.20 (3H, s, H-15); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 37.2 (C-1), 34.6 (C-2), 201.5 (C-3), 129.5 (C-4), 166.4 (C-5), 30.0 (C-6), 51.2 (C-7), 22.7 (C-8), 43.3 (C-9), 35.1 (C-10), 10.9 (C-11), 73.0 (C-12), 26.2 (C-13), 27.5 (C-14), 22.7 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **5** 为假虎刺酮。

化合物 **6**: 白色粉末。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.90 (1H, dd, $J = 13.7, 1.8$ Hz, H-2a), 2.83 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, H-2b), 2.58 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-4a), 2.48 (1H, dd, $J = 14.4, 1.8$ Hz, H-4b), 6.07 (1H, s, H-7), 1.32 (3H, s, H-9), 1.44 (3H, s, H-10), 1.60 (3H, s, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ :

36.7 (C-1), 54.8 (C-2), 206.8 (C-3), 53.7 (C-4), 87.9 (C-5), 173.3 (C-6), 115.3 (C-7), 181.0 (C-8), 27.2 (C-9), 29.9 (C-10), 26.2 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **6** 为脱氢地芩普内酯。

化合物 **7**: 无色结晶 (甲醇)。mp 152~153 $^{\circ}\text{C}$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.01 (1H, dt, $J = 14.4, 2.6$ Hz, H-2a), 1.55 (1H, dd, $J = 14.4, 3.6$ Hz, H-2b), 4.23 (1H, m, H-3), 2.45 (1H, dt, $J = 13.8, 2.4$ Hz, H-4a), 1.76 (1H, dd, $J = 14.4, 3.6$ Hz, H-4b), 5.77 (1H, s, H-7), 1.48 (3H, s, H-9), 1.29 (3H, s, H-10), 1.78 (3H, s, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 37.2 (C-1), 48.0 (C-2), 67.2 (C-3), 46.3 (C-4), 88.9 (C-5), 174.4 (C-6), 113.3 (C-7), 185.7 (C-8), 27.0 (C-9), 27.4 (C-10), 30.0 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **7** 为黑麦草内酯。

化合物 **8**: 白色粉末。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.62 (1H, d, $J = 17.2$ Hz, H-2a), 2.29 (1H, d, $J = 17.2$ Hz, H-2b), 5.95 (1H, s, H-4), 7.01 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 6.45 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 2.32 (3H, s, H-10), 1.08 (3H, s, H-11), 1.04 (3H, s, H-12), 1.92 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-13); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 42.6 (C-1), 50.5 (C-2), 200.3 (CO), 128.0 (C-4), 164.6 (C-5), 80.0 (C-6), 148.3 (C-7), 131.7 (C-8), 200.6 (CO), 27.6 (C-10), 23.5 (C-11), 24.7 (C-12), 19.1 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **8** 为 (+)-去氢催吐萝芙木醇。

化合物 **9**: 无色油状物。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.29 (1H, m, H-2a), 1.60 (1H, m, H-2b), 3.78 (1H, m, H-3), 1.67 (4H, dd, $J = 14.3, 9.2$ Hz, H-4a), 2.29 (1H, m, H-4b), 6.20 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 7.18 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8), 2.31 (3H, s, H-10), 1.20 (3H, s, H-11), 0.98 (3H, s, H-12), 1.21 (3H, s, H-13); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 36.1 (C-1), 47.6 (C-2), 64.4 (C-3), 41.3 (C-4), 68.8 (C-5), 70.8 (C-6), 145.4 (C-7), 133.8 (C-8), 200.2 (CO), 25.1 (C-10), 29.8 (C-11), 27.4 (C-12), 20.0 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **9** 为 (3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-三羟基-7-巨豆烯-9-酮。

化合物 **10**: 无色油状物。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.42 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-2a), 2.07 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, H-2b), 5.90 (1H, s, H-4), 2.68 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-6), 5.60 (1H, dd, $J = 16.0, 9.2$ Hz, H-7), 5.72 (1H, dd, $J = 15.3, 5.8$ Hz, H-8), 4.29 (1H, m,

H-9), 1.26 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 1.05 (3H, s, H-11), 1.01 (3H, s, H-12), 1.94 (3H, s, H-13); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 37.1 (C-1), 48.4 (C-2), 202.0 (C-3), 127.2 (C-4), 166.0 (C-5), 56.7 (C-6), 126.1 (C-7), 140.2 (C-8), 68.8 (C-9), 23.8 (C-10), 27.3 (C-11), 28.0 (C-12), 23.7 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **10** 为 (6*R*,7*E*,9*S*)-9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮。

化合物 **11**: 无色油状物。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.54 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-2a), 2.18 (1H, t, $J = 16.6$ Hz, H-2b), 5.90 (1H, s, H-4), 5.79 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7), 5.83 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-8), 4.34 (1H, m, H-9), 1.26 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 1.03 (3H, s, H-11), 1.06 (3H, s, H-12), 1.94 (3H, s, H-13); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 42.4 (C-1), 50.7 (C-2), 201.3 (CO), 127.1 (C-4), 167.4 (C-5), 80.0 (C-6), 130.1 (C-7), 136.9 (C-8), 68.7 (C-9), 23.8 (C-10), 24.5 (C-11), 23.5 (C-12), 19.6 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **11** 为催吐萝芙木醇。

化合物 **12**: 无色油状物。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.41 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2a), 2.34 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2b), 5.96 (1H, s, H-4), 6.01 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-7), 4.62 (1H, dd, $J = 9.8, 5.6$ Hz, H-8), 3.69 (1H, m, H-9), 1.18 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 1.32 (3H, s, H-11), 1.40 (3H, s, H-12), 2.13 (3H, d, $J = 0.8$ Hz, H-13); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 40.0 (C-1), 54.4 (C-2), 201.8 (C-3), 127.3 (C-4), 158.8 (C-5), 145.1 (C-6), 135.2 (C-7), 72.5 (C-8), 71.3 (C-9), 19.4 (C-10), 30.0 (C-11), 29.9 (C-12), 22.7 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **12** 为 8,9-二氢-8,9-二羟基巨豆三烯酮。

化合物 **13**: 白色针晶 (二氯甲烷)。mp 186~188 °C。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 4.78 (1H, dd, $J = 14.0, 7.9$ Hz, H-2), 3.22 (1H, dd, $J = 13.6, 5.9$ Hz, H-3a), 3.07 (1H, dd, $J = 13.6, 8.4$ Hz, H-3b), 7.25 (5H, m, H-5~9), 7.71 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-3', 7'), 7.44 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-4', 6'), 7.52 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-5'), 4.34 (1H, m, H-1''), 2.75 (2H, m, H-2''), 7.07 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, H-4'', 8''), 7.15 (3H, m, overlapped, H-5'', 6'', 7''), 3.93 (1H, dd, $J = 11.3, 4.9$ Hz, H-9''a), 3.82 (1H, dd, $J = 11.3, 4.2$ Hz, H-9''b), 2.01 (3H, s, COCH_3), 6.17 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, α -NH),

6.85 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, β -NH); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 170.3 (C-1), 55.0 (C-2), 38.5 (C-3), 136.7 (C-4), 128.7 (C-5, 9), 129.3 (C-6, 8), 127.1 (C-7), 167.1 (C-1'), 133.6 (C-2'), 128.6 (C-3', 7', 4'', 8''), 127.1 (C-4', 6'), 131.9 (C-5'), 49.4 (C-1''), 37.1 (C-2''), 136.6 (C-3''), 129.1 (C-5'', 7''), 126.7 (C-6''), 64.6 (C-9''), 20.8 (COCH_3), 170.8 (COCH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **13** 为橙黄胡椒酰胺乙酸酯。

化合物 **14**: 白色针晶 (二氯甲烷)。mp 180~182 °C。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.78 (1H, dd, $J = 8.9, 6.2$ Hz, H-2), 3.15 (1H, dd, $J = 13.8, 6.1$ Hz, H-3a), 2.94 (1H, dd, $J = 13.8, 6.1$ Hz, H-3b), 7.25 (5H, m, H-5~9), 7.69 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-3', 7'), 7.43 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4', 6'), 7.52 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-5'), 4.07 (1H, dd, $J = 11.2, 5.6$ Hz, H-1''), 2.94 (1H, dd, $J = 13.8, 7.5$ Hz, H-2''a), 2.71 (1H, dd, $J = 13.6, 8.2$ Hz, H-2''b), 7.17 (5H, m, H-4''~8''), 3.42 (2H, m, H-9''); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 173.3 (C-1), 56.6 (C-2), 38.8 (C-3), 139.6 (C-4), 129.3 (C-5, 9), 130.4 (C-6, 8), 127.7 (C-7), 170.0 (C-1'), 135.3 (C-2'), 129.4 (C-3', 7'), 128.5 (C-4', 6'), 132.8 (C-5'), 54.4 (C-1''), 37.9 (C-2''), 138.6 (C-3''), 130.4 (C-4'', 8''), 129.5 (C-5'', 7''), 127.3 (C-6''), 63.9 (C-9'')。以上数据与文献报道基本一致^[16-17], 故鉴定化合物 **14** 为橙黄胡椒酰胺。

化合物 **15**: 白色粉末。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.79 (1H, dd, $J = 9.4, 5.8$ Hz, H-2), 3.13 (1H, m, H-3a), 2.89 (1H, m, H-3b), 7.21 (5H, m, H-5~9), 7.68 (2H, overlapped, H-3', 7'), 7.48 (2H, overlapped, H-4', 6'), 7.36 (1H, overlapped, H-5'), 4.13 (1H, dd, $J = 11.2, 6.3$ Hz, H-1''), 7.21 (5H, m, H-4''~8''), 3.27 (2H, overlapped, H-9''), 7.68 (2H, overlapped, H-3''', 7'''), 7.48 (2H, overlapped, H-4''', 6'''), 7.36 (1H, overlapped, H-5'''); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.3 (C-1), 56.3 (C-2), 37.9 (C-3), 135.7 (C-4), 126.8~127.0 (C-5~9), 173.1 (C-1'), 134.4 (C-2'), 127.6 (C-3', 7'), 128.5 (C-4', 6'), 132.6 (C-5'), 51.9 (C-1''), 38.0 (C-2''), 138.6 (C-3''), 126.8~127.0 (C-4''~8''), 66.8 (C-9''), 170.3 (C-1'''), 134.4 (C-2'''), 127.6 (C-3''', 7'''), 128.5 (C-4''', 6'''), 132.5 (C-5''')。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **15** 为橙黄胡椒酰胺苯甲酸酯。

4 细胞毒活性评价

以顺铂为阳性对照药,将 100 μL 的肿瘤细胞(人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞、人肺癌 A549 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人结肠癌 SW480 细胞)接种到 96 孔细胞培养板中,培养 24 h。将待测化合物(1、2、4、6~9、13、14)以 40、8、1.6、0.32 和 0.064 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度加入,继续培养 48 h 后,向每个孔中加入 MTS (20 μL),并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下继续培养 4 h。在 492 nm 处测量吸光度。待测化合物对肿瘤细胞细胞毒活性的 IC_{50} 值用 Reed-Muench 方法计算。结果显示,化合物 2 对人肺癌 A549 细胞和人肝癌 SMMC-7721 细胞显示一定的细胞毒活性, IC_{50} 值为 (23.62 $\pm$ 1.63) 和 (27.46 $\pm$ 0.87) $\mu\text{mol/L}$, 其余化合物 IC_{50} 均大于 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

5 讨论

本实验运用多种色谱分离技术对锡生藤属植物亚乎奴的化学成分进行分离纯化,得到 15 个化合物(1~15),包括三萜类化合物 4 个(1~4)、单萜类化合物 8 个(5~12)、生物碱类化合物 3 个(13~15),首次在锡生藤属植物中发现了单萜类和酰胺类生物碱的存在,对防己科锡生藤属植物与其他属植物的植物化学分类学研究具有重要的指导意义。

对化合物 1、2、4、6~9、13、14 进行了肿瘤细胞毒活性的测定,测试结果显示所供试化合物中,化合物 2 对 A549 细胞和 SMMC-7721 细胞具有一定的细胞毒活性,提示本药材可能具有抗肿瘤活性,羽扇豆烷型三萜类化合物可能是亚乎奴发挥其抗肿瘤活性的药效物质基础。从亚乎奴中分离得到的 3 个酰胺类生物碱结构新颖独特,文献报道具有抗炎活性^[19-20],鉴于傣药亚乎奴临床上用于消肿止痛,提示酰胺类生物碱可能是亚乎奴发挥抗炎作用的药效物质基础,但具体的作用机制还需要进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 133.
- [2] Kumari S, Anmol, Bhatt V, *et al.* *Cissampelos pareira* L.: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 274: 113850.
- [3] Semwal D K, Semwal R B, Vermaak I, *et al.* From arrow poison to herbal medicine: The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological significance of *Cissampelos* (Menispermaceae) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1011-1028.

- [4] 云南省药物研究所,昆明制药厂,昆明军区总医院. 云南锡生藤的化学研究: 锡生藤碱 II 的分离 [J]. *中草药通讯*, 1973, 4(4): 5-8.
- [5] 王春雷, 赵艳敏, 付山, 等. 苹果树枝中三萜类成分研究 [J]. *武警后勤学院学报: 医学版*, 2018, 27(4): 318-321.
- [6] 罗伟, 汤良杰, 袁建丹, 等. 烟管蓟化学成分研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(22): 6781-6789.
- [7] 褚文希, 刘小红, 刘坤, 等. 徐长卿逆转肿瘤多药耐药活性部位化学成分研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(18): 2674-2679.
- [8] de Riccardis F, Minale L, Iorizzi M, *et al.* Marine sterols, side-chain-oxygenated sterols, possibly of abiotic origin, from the new Caledonian sponge *Stelodoryx chlorophylla* [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(2): 282-287.
- [9] 肖美添, 骆党委, 咎珂, 等. 白苞蒿的化学成分研究 (III) [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(3): 209-212.
- [10] Zheng J X, Zheng Y, Zhi H, *et al.* Γ -lactone derivatives and terpenoids from *Selaginella uncinata* and their protective effect against Anoxia [J]. *Chem Nat Compd*, 2014, 50(2): 366-369.
- [11] 项峥, 阎新佳, 温静, 等. 白花败酱草的化学成分研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(3): 185-187.
- [12] 石媛, 周福军, 单淇, 等. 黄杞叶脂溶性部分化学成分分离与鉴定 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2017, 34(1): 28-31.
- [13] Sun Y, Zhan Y C, Sha Y, *et al.* Norisoprenoids from *Ulua lactuca* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(3/4/5): 321-325.
- [14] Niu C, Yang L P, Zhang Z Z, *et al.* Chemical constituents of *Ampelopsis japonica* [J]. *Chem Nat Compd*, 2022, 58(3): 545-547.
- [15] Xiao W L, Chen W H, Zhang J Y, *et al.* Ionone-type sesquiterpenoids from the stems of *Ficus pumila* [J]. *Chem Nat Compd*, 2016, 52(3): 531-533.
- [16] Hui Y, Zhou X Q, Chen G Y, *et al.* Chemical constituents of the flowers of *Wedelia trilobata* [J]. *Chem Nat Compd*, 2019, 55(1): 160-163.
- [17] 张永欣, 朱童, 杨丹, 等. 黄连须根提取物生物碱类成分及抑菌活性研究 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(17): 2556-2561.
- [18] 李佳, 赵岑, 张朝凤, 等. 南山藤叶非甾体类化学成分研究 [J]. *药学与临床研究*, 2014, 22(4): 339-341.
- [19] Yoon C S, Kim D C, Lee D S, *et al.* Anti-neuroinflammatory effect of aurantiamide acetate from the marine fungus *Aspergillus* sp. SF-5921: Inhibition of NF- κ B and MAPK pathways in lipopolysaccharide-induced mouse BV2 microglial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(2): 568-574.
- [20] Takahiko I, Matsumi D, Yoshiki M, *et al.* Biological activity tests of chemical constituents from two Brazilian Labiate plants [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2007, 127(2): 389-395.

[责任编辑 王文倩]