

黄花棘豆中 1 个新的喹诺里西啉生物碱

王亭亭^{1,2}, 张雅昆^{1,2}, 张洪艳^{1,2}, 薛 站^{1,2}, 霍晓敏^{1,2}, 曾艳荣¹, 谭承建^{1*}

1. 贵州民族大学民族医药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州民族大学化学工程学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 研究黄花棘豆 *Oxytropis ochrocephala* 的生物碱成分。方法 采用硅胶、反相 RP-18、Sephadex LH-20 柱色谱、半制备高效液相色谱等分离方法对黄花棘豆生物碱进行分离纯化, 通过波谱技术和化学计算对化学结构进行鉴定; 采用浸虫浸叶法对含量相对较大的化合物 **4**、**7** 进行抗斜纹夜蛾杀虫试验, 采用 MTT 法对化合物 **1** 进行抗乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 活性试验。结果 从黄花棘豆生物碱分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为黄花棘豆碱 H (**1**)、sophoridine (**2**)、allomatrine (**3**)、isosophoridine (**4**)、sophoramine (**5**)、7 α -hydroxysophoramine (**6**)、oxylupanine (**7**)、lehmannine (**8**)、flavesine G (**9**)、13 β -hydroxymatrine (**10**), 化合物 **4**、**7** 杀斜纹夜蛾的半数致死浓度 (50% lethal concentration, LC₅₀) 分别为 44.02、8.72 mg/mL。浓度为 1×10^{-4} mol/L 时, 化合物 **1** 对乙肝表面抗原分泌的抑制率为 $(33.87 \pm 3.20)\%$ 。结论 化合物 **1** 为 1 个新的喹诺里西啉二聚体生物碱, 化合物 **7**~**10** 为首次从黄花棘豆中分离得到。化合物 **7** 对斜纹夜蛾幼虫表现出较强的杀虫活性, 化合物 **1** 表现出较强的抗 HBV 生物活性。

关键词: 黄花棘豆; 斜纹夜蛾; 抗乙型肝炎病毒; 喹诺里西啉生物碱; 黄花棘豆碱 H; oxylupanine; lehmannine; flavesine G
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)04-1026-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.04.002

A new quinolizidine alkaloid from *Oxytropis ochrocephala*

WANG Ting-ting^{1,2}, ZHANG Ya-kun^{1,2}, ZHANG Hong-yan^{1,2}, XUE Zhan^{1,2}, HUO Xiao-min^{1,2}, ZENG Yan-rong¹, TAN Cheng-jian¹

1. College of Ethnic Medicine, Guizhou Minzu University, Guiyang 550025, China

2. College of Chemical Engineering, Guizhou Minzu University, Guiyang 550025, China

Abstract: **Objective** To study the alkaloids from *Oxytropis ochrocephala*. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel column, reverse-phase column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and semi-preparative-HPLC, and the chemical structures were identified by extensive spectroscopic analysis and electronic circular dichroism (ECD) calculations. The activities against *Spodoptera litura* of compounds **4** and **7** were evaluated on the insect-dipping and leaf-dipping method and the activities against HBV of compound **1** were evaluated by the MTT method. **Results** Ten alkaloids were obtained and identified as ochrocephalamine H (**1**), sophoridine (**2**), allomatrine (**3**), isosophoridine (**4**), sophoramine (**5**), 7 α -hydroxysophoramine (**6**), oxylupanine (**7**), lehmannine (**8**), flavesine G (**9**) and 13 β -hydroxymatrine (**10**), respectively. Compounds **4** and **7** indicated bioactivities against *Spodoptera litura* with LC₅₀ of 44.02 and 8.72 mg/mL. When the concentration was 1×10^{-4} mol/L, the inhibition rates of compound **1** on HBsAg secretion were $(33.87 \pm 3.20)\%$. **Conclusion** Ochrocephalamine H (**1**) is a new quinolizidine dimeric alkaloid, while compounds **7**—**10** were obtained from *O. ochrocephala* for the first time. Compound **7** showed significant insecticidal activity against the third-instar larvae of *Spodoptera litura*. Compound **1** showed strong anti-HBV biological activity.

Key words: *Oxytropis ochrocephala* Bunge; *Spodoptera litura*; HBV; quinolizidine alkaloid; ochrocephalamine H; oxylupanine; lehmannine; flavesine G

收稿日期: 2022-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32160110); 国家自然科学基金项目 (31660103)

作者简介: 王亭亭 (1996—), 女, 硕士研究生, 从事天然产物提取与分离。E-mail: 1719982992@qq.com

*通信作者: 谭承建, 男, 博士, 教授, 从事天然药物化学研究。E-mail: tcj1229@163.com

黄花棘豆 *Oxytropis ochrocephala* Bunge 又称马绊肠、醉马草、团巴草，是分布于我国西部草场的豆科棘豆属多年生有毒植物^[1]。黄花棘豆在青海与甘肃的面积多达 1.899×10^6 hm²，分别占毒杂草面积的 71.81% 和 34.19%^[2-4]。据《青藏高原甘南藏药植物志》中记载，黄花棘豆全草味甘、微苦，性温，可治腹水、止肠痛，其根味甘，性温，可治慢性肾炎浮肿、久病衰弱、贫血等症^[5]。

黄花棘豆含有黄酮类、三萜皂苷类、生物碱类等化学成分^[6]，其中生物碱类成分表现出抗乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 和杀虫活性^[7]。课题组前期从中发现了苦豆碱型、苦参碱型和金雀花碱型等生物碱成分。Ochrocephalamines C~D 表现出较强的抗 HBV 生物活性^[8]，化合物 ochrocephalamine A、sophoramine、5 β ,7 β -sophoramine 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫具有显著的杀灭效果^[9-10]。为进一步发现其潜在活性成分，为资源化利用提供依据，本研究继续对黄花棘豆生物碱成分进行研究，分离鉴定了 10 个化合物，分别为黄花棘豆碱 H (ochrocephalamine H, **1**)、sophoridine (**2**)、allomatrine (**3**)、isosophoridine (**4**)、sophoramine (**5**)、7 α -hydroxysophoramine (**6**)、oxylupanine (**7**)、lehmannine (**8**)、flavesine G (**9**)、13 β -hydroxy matrine (**10**)，其中化合物 **1** 为新的喹啉里西啶二聚体生物碱，化合物 **7**~**10** 为首次从黄花棘豆中分离得到。化合物 **1** 表现出明显的抗 HBV 活性，化合物 **7** 具有较强的抗斜纹夜蛾活性。

1 材料与仪器

高效液相色谱仪 UltiMate3000 (赛默飞世尔科技有限公司); XB bridge BEH C₁₈ 色谱柱 (美国 Waters 公司); AV Neo-400 MHz 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Agilent G6230 飞行时间质谱仪 (Agilent 公司); UV-2700 紫外分光光度计 (日本岛津公司); Nicolet iS10 Thermo 中红外光谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); Jasco P-1020 全自动数字旋光仪 (Jasco 公司); Applied Photophysics 数字式圆二色谱仪 (美国 Agilent 公司); 旋转蒸发仪 (瑞士步琦有限公司, BUCHI Rotavapor R-3); 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限公司); ZF-6 型三用紫外分析仪 (上海嘉鹏科技有限公司); SephadexLH-20 (Amersham Biosciences); GF₂₅₄ 薄层板、柱色谱硅胶 (100~200、200~300、300~400 目, 青岛海洋化工厂分厂); LiChroprep RP-18 (40~

63 μ m, EMD Millipore Corporation); 甲醇、二氯甲烷、丙酮、醋酸乙酯、石油醚 (分析纯, 成都科隆化学品有限公司); 甲醇 (色谱级)、乙腈 (色谱级)、碘化钾、次硝酸铋 (瑞金特化学品有限公司); 浓盐酸、氨水、冰醋酸 (川东化工有限公司); 三氟乙酸 (TFA, 阿拉丁生化科技股份有限公司); 聚山梨酯 80 (成都金山化学试剂有限公司); 无水乙醇 (安徽泽升科技有限公司); 氢氧化钠 (成都金山化学试剂有限公司); Forma 3111 型 CO₂ 培养箱 (Thermo 公司); 酶标仪 MD190 (MD 公司); 倒置相差显微镜 Nikon TS2FL (Nikon 公司); 生物净化工作台 BCM-1000A (江苏苏州安泰空气技术有限公司); 胎血牛请 (FBS, 杭州四季青生物工程材料公司); 细胞培养基 (MEM)、噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司); 抗原检测试剂盒 (英科新创科技股份有限公司, 乙肝表面抗原 (HBsAg) 批号 2022045112; 乙肝 e 抗原 (HBcAg) 批号 2021065308); 金丝桃苷 (上海诗丹得生物技术有限公司)。

黄花棘豆于 2017 年 8 月采自青海省湟中县, 由青海大学莫重辉教授鉴定为黄花棘豆 *O. ochrocephala* Bunge, 凭证标本 (ZhaoBy-201708) 保存于西北农林科技大学动物医学院有毒植物研究所。

2 提取与分离

黄花棘豆全草 50 kg, 粉碎后用 95% 乙醇热回流提取, 合并滤液, 得粗浸膏 5 kg。沸水捻溶后, 用 2 mol/L HCl 调 pH 1~3, 等体积二氯甲烷萃取 3 次, 酸水层用 2 mol/L NaOH 调 pH 9~11, 等体积二氯甲烷萃取, 合并二氯甲烷层, 减压浓缩, 得总生物碱 310 g。取 210 g 样品用硅胶柱色谱进行分离, 梯度洗脱 (二氯甲烷-甲醇 100:1~甲醇), 得到 A₁~A₈。

A₄ (30.8 g) 通过反相柱色谱 (RP-18) (水-甲醇 90:1~甲醇) 进行分离, 得到 22 个组分 B₁~B₂₂。B₁₇ (198.3 mg) 用 SephadexLH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 进行分离, 得到 C₁~C₆。C₄ 用硅胶柱色谱进行 3 次分离纯化, 二氯甲烷-甲醇 (15:1)、醋酸乙酯-甲醇 (10:1)、丙酮-甲醇 (10:1) 洗脱, 得到化合物 **6** (5.9 mg)。C₃ 用硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 20:1) 进行分离得到化合物 **5** (19.7 mg) 和 D₅。D₅ 用硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯-甲醇 20:20:1) 分离, 得到化合物 **3** (8.2 mg) 和 **8** (6.3 mg)。

A₅ (14.53 g) 通过反相柱色谱 (RP-18) (水-甲醇 90:1~甲醇) 进行分离, 得到 E₁~E₇。E₄ (1.2

g) 用硅胶柱色谱法进行分离(二氯甲烷-甲醇 15:1), 得到 F₁~F₈。F₄ 用硅胶柱色谱法进行纯化(二氯甲烷-甲醇 18:1), 得到化合物 **2** (16.8 mg)。F₆ 用硅胶柱色谱法进行纯化(二氯甲烷-甲醇 10:1), 得到 G₁~G₇。G₅ 用半制备 HPLC [水-甲醇-三氟乙酸(TFA) 90:10:0.05, 体积流量 1 mL/min] 纯化得到化合物 **10** (15.2 mg), $t_R=12.620$ min。G₆ (48.2 mg) 用硅胶柱色谱(石油醚-丙酮-甲醇 20:20:1 体系中加入 0.05%氨水), 得到 H₃, 继续用半制备 HPLC (水-乙腈-TFA 96:4:0.05, 体积流量 1.2 mL/min) 纯化得到化合物 **1** (8.6 mg, $t_R=16.125$ min)。

A₇ (7.66 g) 用 SephadexLH-20 柱色谱(二氯甲烷-甲醇 1:1) 进行分离, 得到 I₁~I₅。I₂ (4.21 g) 用硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 10:1、5:1) 进行分离得到化合物 **4** (0.76 g) 和 J₅, J₅ 用硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 25:1, 加入 0.01%氨水) 进行分离, 得到化合物 **7** (246.23 mg) 和 K₄。K₄ 用硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 15:1, 加入 0.05%氨水) 进行分离, 得到化合物 **9** (30.23 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状物(甲醇), $[\alpha]_D^{20}+151.20$ (c 0.30, MeOH), IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3431, 2931, 2860,

1645, 1597, 1565, 1468, 1442。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 203 (4.17), 228 (3.76), 310 (3.82)。HR-ESI-MS m/z 513.320 1 [M + Na]⁺ (计算值 513.320 0, C₃₀H₄₂N₄O₂Na), 结合 1D-NMR 数据确定化合物 **1** 的分子式为 C₃₀H₄₂N₄O₂, 不饱和度为 12。

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) (表 1) 谱图中显示 2 个烯烃质子信号 δ_H 7.30 (1H, d, $J=7.7$ Hz), 6.30 (1H, d, $J=7.5$ Hz); 4 个苦参碱型特征质子信号 δ_H 4.97 (1H, dd, $J=13.8, 5.5$ Hz), 3.29 (1H, t, $J=13.6$ Hz), 4.33 (1H, dd, $J=12.6, 4.2$ Hz), 3.10 (1H, t, $J=12.4$ Hz)。¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) 谱图中显示 30 个碳信号, 结合 DEPT 谱图发现化合物 **1** 中有 4 个季碳信号(包含 2 个酰胺羰基信号 δ_C 163.2, 170.9), 10 个次甲基信号, 16 个亚甲基信号。信号 δ_C 51.7 (C-2), 64.2 (C-6), 56.5 (C-10), 58.3 (C-2'), 65.4 (C-6'), 58.2 (C-10') 分别与 N 原子相连。核磁图谱中呈现苦参碱的核磁信号 δ_C 58.3 (C-2'), 22.5 (C-3'), 28.7 (C-4'), 37.3 (C-5'), 65.4 (C-6'), 42.6 (C-7'), 27.5 (C-8'), 21.8 (C-9'), 58.2 (C-10'), 53.6 (C-11'), 170.9 (C-15'), 43.6 (C-17'), 除了 C-12' (δ_C 29.8)、C-13' (δ_C 30.2)、C-14' (δ_C 37.5), 较苦参碱分别向低场位移了 δ 1.0、10.6、4.1。其他信号与

表 1 化合物 **1** 的 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) 数据
Table 1 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) and ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) data of compound **1**

碳位	δ_H	δ_C (DEPT)	碳位	δ_H	δ_C (DEPT)
2	2.91 (m), 2.24 (m)	51.7 (t)	2'	2.82 (m), 2.02 (m)	58.3 (t)
3	1.69 (m)	22.1 (t)	3'	1.59 (m)	22.5 (t)
4	2.29 (m)	27.9 (t)	4'	1.65 (m)	28.7 (t)
5	2.09 (m, H-5 α)	34.4 (d)	5'	1.83 (m, H-5' α)	37.3 (d)
6	2.05 (m, H-6 α)	64.2 (d)	6'	2.30 (m, H-6' α)	65.4 (d)
7	2.75 (m, H-7 β)	38.6 (d)	7'	1.87 (m, H-7' α)	42.6 (d)
8	1.85 (m)	24.8 (t)	8'	2.07 (m), 1.49 (m)	27.5 (t)
9	1.43 (m)	21.6 (t)	9'	1.49 (m)	21.8 (t)
10	2.94 (m), 2.15 (m)	56.5 (t)	10'	2.82 (m), 2.02 (m)	58.2 (t)
11		149.7 (s)	11'	3.91 (m, H-11' β)	53.6 (d)
12	6.30 (d, $J=7.5$ Hz)	104.0 (d)	12'	2.10 (m)	29.8 (t)
13	7.30 (d, $J=7.7$ Hz)	135.9 (d)	13'	3.40 (m, H-13' α)	30.2 (d)
14		131.0 (s)	14'	2.65 (dd, $J=1.2, 4.4$, H-14' β) 2.50 (dd, $J=17.2, 8.6$, H-14' α)	37.5 (t)
15		163.2 (s)	15'		170.9 (s)
17	4.97 (dd, $J=13.8, 5.5$ Hz, H-17 β) 3.29 (t, $J=13.6$ Hz, H-17 α)	45.0 (t)	17'	4.33 (dd, $J=12.6, 4.2$ Hz, H-17' β) 3.10 (t, $J=12.4$ Hz, H-17' α)	43.6 (t)

7 β -sophroamine^[11]相似,除了 C-13 (δ_{C} 135.9)、C-15 (δ_{C} 163.2),较 7 β -sophroamine 分别向高场位移了 δ 5.3、2.9, C-14 (δ_{C} 131.0) 向低场位移了 δ 14.6。以上数据表明该化合物可能是 1 个苦参碱与 7 β -sophroamine 通过 C-13'/C-14 聚合而成的化学结构。

在 HMBC 谱图(图 1)中, H-11'与 C-13'和 C-15 相关, H-13'与 C-11'、C-15'、C-14 和 C-13 相关, H-13 与 C-13'、C-15 和 C-11 相关, H-12 与 C-14、C-13 和 C-11 相关,进一步证实化合物 1 的 2 个亚结构通过 C-13'/C-14 相连接。化合物 1 的相对构型通过与生源相关化合物 ochrocephalamine A 比较及 ROESY 实验来确定。ROESY 谱图中, H-17' α 与 H-5'相关、H-5'分别与 H-6'和 H-7'相关,表明 H-5'、H-6'和 H-7'为 α 型。H-13'与 H-5'相关,表明 H-13'为 α 型, H-13'与 H-14' (δ_{H} 2.50) 相关,表明 H-14' (δ_{H} 2.50) 为 α 型。H-17' β (δ_{H} 4.33) 与 H-11'相关,说明 H-11'为 β 型。H-17 α (δ_{H} 3.29) 与 H-5、H-6 相关,则 H-5、H-6 均为 α 型。ROESY 图谱中没有观察到 H-7 与 H-6 的相关。H-7 位的 β 取向,通过与化合物 7 β -sophroamine 的核磁数据对照来确定。综上所述,化合物 1 相对构型得以确定(图 1)。

化合物 1 的绝对构型通过化学计算来确定。在分子力学力场(MMFF94)下进行构象搜索,在 B3LYP/6-311+G(d)水平下,使用密度泛函理论(DFT)优化构象,采用 TDDFT 方法对化合物 1 进行 ECD 计算, ECD 计算曲线与实验吻合(图 2),故化合物 1 的结构鉴定如图 1 所示,经检索为 1 个新化合物,命

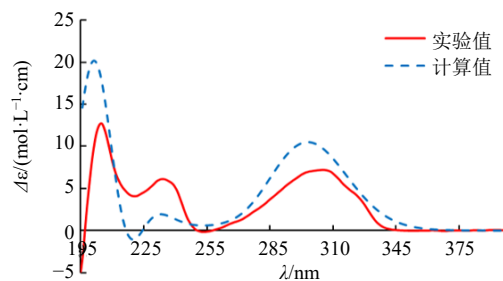


图 2 化合物 1 的实验和计算 ECD 谱图

Fig. 2 Experimental and calculated ECD spectra of compound 1

名为黄花棘豆碱 H (ochrocephalamine H)。

化合物 2: 无色透明针状结晶(二氯甲烷-甲醇), ESI-MS m/z : 249 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 3.38~3.15 (3H, m, H-11, 17), 2.79 (2H, m, H-2a, 10a), 2.25 (3H, m, H-14, 6), 2.11 (2H, m, H-2b, 10b), 1.94 (2H, m, H-3a, 5), 1.86~0.99 (12H, m, H-3b, 4, 7, 8, 9, 12, 13); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 172.5 (C-15, s), 63.5 (C-6, d), 57.5 (C-2, t), 56.6 (C-11, d), 50.6 (C-10, t), 48.7 (C-17, t), 41.6 (C-7, d), 33.0 (C-14, t), 31.4 (C-5, d), 30.6 (C-12, t), 28.6 (C-4, t), 23.5 (C-3, t), 22.9 (C-8, t), 22.8 (C-9, t), 19.4 (C-13, t)。以上数据与文献报道基本一致^[12],故鉴定化合物 2 为 sophoridine。

化合物 3: 浅黄色油状物, ESI-MS m/z : 249 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 3.28~3.16 (3H, m, H-11, 17), 2.90~2.78 (2H, m, H-2a, 10a), 2.43~2.24 (3H, m, H-14, 6), 2.14 (2H, t, $J = 13.1$ Hz, H-2b, 10b), 2.00~1.83 (2H, m, H-3a, 5), 1.83~1.41 (12H, m, H-3b, 4, 7~9, 12, 13); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 171.7 (C-15, s), 71.5 (C-6, d), 61.3 (C-11, d), 57.3 (C-2, t), 56.7 (C-10, t), 47.3 (C-17, t), 47.0 (C-7, d), 40.1 (C-5, d), 33.4 (C-14, t), 29.0 (C-12, t), 28.1 (C-4, t), 27.4 (C-3, t), 25.3 (C-8, t), 25.2 (C-9, t), 19.8 (C-13, t)。以上数据与文献报道基本一致^[12],故鉴定化合物 3 为 allomatrine。

化合物 4: 无色透明片状结晶(二氯甲烷-甲醇), ESI-MS m/z : 249 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.50 (1H, dd, $J = 11.8, 2.0$ Hz, H-17a), 3.40 (2H, m, H-17b, 11), 3.20~3.00 (3H, m, H-14, 6), 2.91 (1H, dd, $J = 12.7, 2.4$ Hz, H-2a), 2.66 (1H, dd, $J = 13.8, 3.3$ Hz, H-10a), 2.25~2.14 (2H, m, H-2b, 10b), 2.14~2.00 (2H, m, H-3a, 5), 2.00~1.89 (2H,

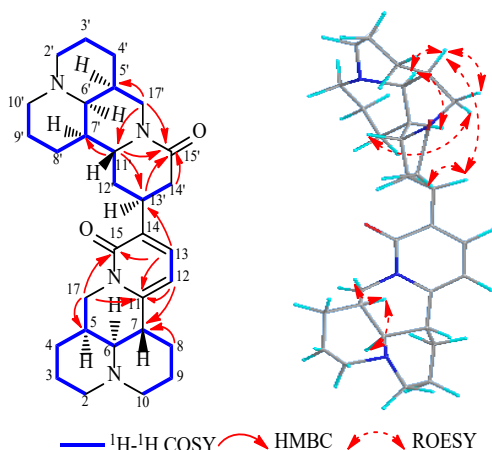


图 1 化合物 1 的化学结构及主要 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY、HMBC 和 NOESY 相关信号

Fig. 1 Chemical structure and key $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, HMBC and NOESY correlations of compound 1

m, H-3b, 7), 1.88~1.03 (10H, m, H-4, 8, 9, 12, 13); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 172.6 (C-15, s), 63.3 (C-6, d), 60.4 (C-11, d), 53.7 (C-10, t), 46.3 (C-17, t), 46.2 (C-2, t), 35.6 (C-5, d), 35.4 (C-7, d), 33.3 (C-14, t), 27.1 (C-12, t), 25.9 (C-8, t), 23.9 (C-3, t), 21.5 (C-4, t), 19.4 (C-13, t), 19.1 (C-9, t)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 4 为 isosporidrine。

化合物 5: 白色结晶 (二氯甲烷-甲醇), ESI-MS m/z : 245 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.54 (1H, dd, $J = 8.9, 7.3$ Hz, H-13), 6.59 (1H, dd, $J = 7.4, 2.4$ Hz, H-14), 6.48 (1H, dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, H-12), 4.13 (1H, dd, $J = 7.2, 15.2$ Hz, H-17a), 3.84 (1H, dd, $J = 15.2, 12.4$ Hz, H-17b), 3.09 (1H, m, H-7), 2.81 (2H, m, H-2a, 10a), 2.50 (1H, m, H-2b), 2.38 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, H-10b), 2.28~2.11 (2H, m, H-4), 2.03~1.74 (4H, m, H-5, 6, 8), 1.67~1.51 (4H, m, H-3, 9); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 57.7 (C-2, t), 21.3 (C-3, t), 27.7 (C-4, t), 32.8 (C-5, d), 61.5 (C-6, d), 39.5 (C-7, d), 28.7 (C-8, t), 22.2 (C-9, t), 57.5 (C-10, t), 150.1 (C-11, s), 106.6 (C-12, d), 141.1 (C-13, d), 116.4 (C-14, d), 166.1 (C-15, s), 45.3 (C-17, t)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 5 为 sophoramine。

化合物 6: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 261 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.60 (1H, dd, $J = 7.3, 9.0$ Hz, H-13), 6.76 (1H, dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, H-12), 6.58 (1H, dd, $J = 8.9, 1.2$ Hz, H-14), 4.62 (1H, s), 4.09 (1H, dd, $J = 15.4, 7.5$ Hz, H-17 β), 3.80 (1H, dd, $J = 15.4, 12.3$ Hz, H-17 α), 2.86 (2H, m, H-5, 10 β), 2.77 (1H, m, H-8 β), 2.69 (1H, m, H-2 β), 2.18~2.06 (4H, m, H-6, 8 α , 4), 1.96~1.65 (6H, m, H-2 α , 10 α , 3, 9); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 165.9 (C-15, s), 149.9 (C-11, s), 141.2 (C-13, d), 118.4 (C-14, d), 106.7 (C-12, d), 70.1 (C-7, s), 67.8 (C-6, d), 57.5 (C-2, t), 57.2 (C-10, t), 45.3 (C-17, t), 37.5 (C-8, t), 27.5 (C-4, t), 26.6 (C-5, d), 23.2 (C-9, t), 21.0 (C-3, t)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 6 为 7 α -hydroxysophoramine。

化合物 7: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 265 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.71 (1H, dd, $J = 13.7, 2.1$ Hz, H-10a), 3.78 (1H, td, $J = 12.7, 3.5$ Hz, H-17a), 3.50 (1H, m, H-15a), 3.35 (1H, m,

H-15b), 3.16 (1H, m, H-17b), 3.09 (2H, dd, $J = 11.7, 4.3$ Hz, H-10b), 2.86 (1H, m, H-11), 2.77 (1H, m, H-7), 2.49~2.27 (3H, m, H-3, 13a), 2.06~1.97 (1H, m, H-8a), 1.97~1.85 (1H, m, H-12a), 1.77~1.62 (3H, m, H-12b, 13b, 14a), 1.33~1.20 (2H, m, H-8b, 14b); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 172.6 (C-2, s), 77.3 (C-11, d), 71.3 (C-15, t), 60.7 (C-6, d), 57.9 (C-17, t), 46.9 (C-10, t), 40.1 (C-7, d), 33.3 (C-3, t), 31.4 (C-8, t), 27.7 (C-9, d), 26.1 (C-12, t), 22.7 (C-14, t), 21.4 (C-5, t), 20.8 (C-13, t), 19.6 (C-4, t)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 7 为 oxylupanine。

化合物 8: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 247 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 5.76~5.61 (2H, m, H-12, 13), 4.59 (1H, dd, $J = 12.4, 4.3$ Hz, H-17 β), 4.37 (1H, m, H-11 β), 3.08 (1H, t, $J = 24.7$ Hz, H-17 α), 2.99 (2H, m, H-14), 2.62 (2H, m, H-2a, 10a), 1.83~1.66 (4H, m, H-2b, 10b, 5, 6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 165.7 (C-15, s), 124.0 (C-12, d), 122.6 (C-13, d), 63.6 (C-6, d), 57.2 (C-11, d), 57.0 (C-10, t), 54.6 (C-2, t), 44.4 (C-17, t), 41.6 (C-7, d), 40.0 (C-5, d), 32.0 (C-14, t), 27.8 (C-4, t), 26.7 (C-8, t), 21.2 (C-3, t), 20.9 (C-9, t)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 8 为 lehmannine。

化合物 9: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 261 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.64 (1H, s, H-17a), 3.51~3.42 (4H, m, H-2, 10), 2.81~2.70 (6H, m, H-4, 8, 12), 2.24 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-14), 2.04~1.84 (8H, m, H-13, 3, 4, 9); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 181.3 (C-15, s), 153.6 (C-6, s), 150.0 (C-11, s), 135.6 (C-17, d), 116.7 (C-5, s), 115.2 (C-7, s), 51.2 (C-2, t), 50.6 (C-10, t), 37.9 (C-14, t), 31.3 (C-12, t), 26.4 (C-13, t), 25.1 (C-4, t), 23.2 (C-8, t), 20.9 (C-9, t), 20.7 (C-3, t)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 9 为 flavesine G。

化合物 10: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 265 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.34 (1H, dd, $J = 12.8, 4.4$ Hz, H-17 α), 4.04 (1H, td, $J = 10.3, 5.6$ Hz, H-13), 3.13 (1H, t, $J = 12.7$ Hz, H-17 β), 2.88 (2H, t, $J = 15.6$ Hz, H-10 β , 2 β), 2.56 (1H, dd, $J = 17.3, 3.7$ Hz, H-14 α), 2.40 (1H, dd, $J = 17.1, 5.8$ Hz, H-14 β), 2.26 (1H, s, H-6), 2.19 (1H, m, H-12 β), 2.08 (2H, m, H-2 α , 10 β), 1.98 (1H, m, H-4 β), 1.96 (1H, m, H-3 β),

1.74 (2H, m, H-3 α , 9 α), 1.72~1.57 (5H, m, H-5, 12 α , 7, 8), 1.50 (1H, m, H-9 β), 1.49 (1H, m, H-4 α); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.3 (C-15, s), 65.0 (C-6, d), 63.1 (C-13, d), 58.2 (C-2, t), 58.2 (C-10, t), 50.9 (C-11, d), 44.3 (C-7, d), 42.4 (C-17, t), 40.8 (C-14, t), 36.6 (C-5, d), 34.4 (C-12, t), 28.7 (C-4, t), 27.2 (C-8, t), 22.0 (C-3, t), 21.5 (C-9, t)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **10** 为 13 β -hydroxymatrine。

4 斜纹夜蛾幼虫杀虫实验

采用浸虫浸叶的方法对含量相对较大的化合物 **4**、**7** 进行杀虫活性测试。将化合物 **4** 配制成 40.0、20.0、10.0、5.0、2.5 mg/mL, **7** 配制成 20.0、10.0、5.0、2.5 mg/mL 的溶液待用, 溶剂为 5% 的聚山梨酯-80。将 0.8 cm² 的圆形菜叶在不同浓度待测液中浸泡 20 s 取出, 置于培养皿中 (每个培养皿中放置 1 张滤纸, 防止湿度过重), 每个培养皿 30 片。取 30 只大小一致且健康的 3 龄斜纹夜蛾幼虫, 在待测液中浸渍 5 s 取出放在培养皿中, 用封口膜封口

并扎孔通气。每个质量浓度设置 3 个平行, 空白对照为 5% 的聚山梨酯-80 溶液。统计 24、48、72 h 幼虫的死亡只数, 通过 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析, 化合物 **4**、**7** 的半数致死浓度 (50% lethal concentration, LC_{50}) 值分别为 44.02、8.72 mg/mL。

5 抗 HBV 活性实验

采用 MTT 法测定化合物 **1** 抗 HBV 活性, 准确称取化合物 **1**, 用 DMSO 溶液分别配制成浓度分别为 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L 的待测液。人肝癌 HepG2.2.15 细胞以每孔 2×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL 置恒温箱中培养 24 h。弃去上清液后, 分别加入 60 μL 新鲜培养基和 10 μL 的待测液, 以金丝桃苷为阳性对照。培养 72 h 后重复之前操作步骤再培养 48 h, 测定吸光度 (A) 值, 检测 HBsAg 和 HBeAg 分泌情况。结果显示, 化合物 **1** 浓度为 1×10^{-4} mol/L 时对 HBsAg 和 HBeAg 的分泌抑制率分别为 (33.87 $\pm$ 3.20) %、(5.00 $\pm$ 6.40) %, 与阳性对照金丝桃苷的抑制能力相近, 且对 HBsAg 分泌的抑制作用强于 HBeAg (表 2)。

表 2 化合物 **1** 对细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用

Table 2 Inhibitory activity of compound **1** against secretion of HBsAg and HBeAg

化合物	浓度/(mol·L ⁻¹)	抑制率/%		
		HepG2.2.15 细胞	HBsAg 分泌	HBeAg 分泌
1	1×10^{-4}	2.28 $\pm$ 3.22	33.87 $\pm$ 3.20	5.00 $\pm$ 6.40
	1×10^{-5}	0.09 $\pm$ 0.12	17.49 $\pm$ 4.97	3.12 $\pm$ 4.41
	1×10^{-6}	0	0	3.12 $\pm$ 4.41
金丝桃苷	1×10^{-4}	6.07 $\pm$ 2.45	41.27 $\pm$ 3.93	39.94 $\pm$ 1.01
	1×10^{-5}	1.08 $\pm$ 1.86	27.77 $\pm$ 0.98	24.64 $\pm$ 5.43
	1×10^{-6}	3.32 $\pm$ 5.76	15.80 $\pm$ 6.32	18.10 $\pm$ 5.57

6 讨论

从黄花棘豆总生物碱中得到 10 个化合物, 化合物 **1** 为苦参碱与 7 β -sophroamine 通过 C-13'/C-14 聚合而成的新化合物, 化合物 **7**~**10** 首次从黄花棘豆中分离得到。化合物 **4** 和 **7** 表现出抗斜纹夜蛾生物活性, 其 LC_{50} 分别为 44.02、8.72 mg/mL。浓度为 1×10^{-4} mol/L 时, 化合物 **1** 对 HBsAg 分泌的抑制率为 (33.87 $\pm$ 3.20) %, 表现出较强的抗 HBV 生物活性。

以苦参碱、槐胺碱、槐定碱等为主的喹诺里西啶生物碱具有丰富的药理活性, 在抗 HBV 及抗癌中有广泛的应用^[20]。有研究者发现苦参碱 C-13 或

C-14 位强吸电子基取代可增强其抗 HBV 活性, 且安全性较高^[21]。富含苦参碱、槐胺碱的苦参是我国常用药用植物。本课题组前期从黄花棘豆中分离得到大量苦参碱、槐胺碱等化合物^[22], 该研究在一定程度上拓展了上述生物碱的来源。同时, 黄花棘豆也是我国青藏、新疆等西部地区的常用民间药材。《青海中医单验方选》中记载, 黄花棘豆花或根煎汤凉服可治水肿跟脾脏病^[23]。本次从黄花棘豆中分离鉴定出喹诺里西啶生物碱, 并表现出一定的抗 HBV 生物活性, 该研究能为黄花棘豆的临床应用及资源化利用提供依据, 也能够一定程度缓解作为毒害草的黄花棘豆给草原经济带来的损失。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵延涛, 万学攀, 樊月圆, 等. 黄花棘豆生物碱薄层层析分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(3): 51-53.
- [2] 赵宝玉. 疯草(甘肃棘豆)生物碱系统分析及其毒性的比较病理学研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2001.
- [3] 邓建梅. 天祝天然草地主要有毒植物资源调查及黄花棘豆化感作用研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [4] 李明源, 王继莲, 姚拓, 等. 祁连山高寒草地扁蓿豆和黄花棘豆耐冷 PGPB 的筛选及促生特性研究 [J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(11): 2074-2086.
- [5] 杜品. 青藏高原甘南藏药植物志 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2006, 248.
- [6] 徐超, 刘斌, 石任兵. 棘豆属植物化学成分与药理作用 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2008, 23(1): 1-7.
- [7] Wang L S, You Y J, Wang S Q, *et al.* Synthesis, characterization and *in vitro* anti-tumor activities of matrine derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(12): 4100-4102.
- [8] Zhou K S, Yi P, Yang T, *et al.* Ochrocephalamines B—D, three alkaloids from *Oxytropis ochrocephala* Bunge [J]. *Org Lett*, 2019, 21(13): 5051-5054.
- [9] Liu L N, Ran J Q, Li L J, *et al.* Ochrocephalamine A, a new quinolizidine alkaloid from *Oxytropis ochrocephala* Bunge [J]. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57(46): 5047-5049.
- [10] 薛站. 黄花棘豆生物碱成分及其生物活性研究 [D]. 贵阳: 贵州民族大学, 2022.
- [11] He L J, Liu J S, Luo D, *et al.* Quinolizidine alkaloids from *Sophora tonkinensis* and their anti-inflammatory activities [J]. *Fitoterapia*, 2019, 139: 104391.
- [12] Galasso V, Asaro F, Berti F, *et al.* On the molecular and electronic structure of matrine-type alkaloids [J]. *Chem Phys*, 2006, 330(3): 457-468.
- [13] Ibragimov B T, Tishchenko G N, Talipov S A, *et al.* Structure of isosophoridine [J]. *Chem Nat Compd*, 1981, 17(4): 340-344.
- [14] Ueno A, Morinaga K, Fukushima S, *et al.* Studies on the lupin alkaloids. VII. isolation and structure of (-)-DELTA.7-dehydrosophoramine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1978, 26(6): 1832-1836.
- [15] Choudhary M I, Parvez K, *et al.* Quinolizidine alkaloids from *Sophora alopecuroides* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(2): 190-192.
- [16] Zhang S Y, Li W, Nie H, *et al.* Five new alkaloids from the roots of *Sophora flavescens* [J]. *Chem Biodivers*, 2018, 15(3): e1700577.
- [17] 刘斌, 李金亮, 元英进. 苦豆子种子中生物碱的分离及 lehmannine 的结构确定 [J]. 中草药, 2001, 32(4): 293-296.
- [18] Zhang Y B, Luo D, Yang L, *et al.* Matrine-type alkaloids from the roots of *Sophora flavescens* and their antiviral activities against the hepatitis B virus [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(10): 2259-2265.
- [19] Tang Q, Luo D, Lin D C, *et al.* Five matrine-type alkaloids from *Sophora tonkinensis* [J]. *J Nat Med*, 2021, 75(3): 682-687.
- [20] Tan C J, Zhao Y, Goto M, *et al.* Alkaloids from *Oxytropis ochrocephala* and antiproliferative activity of sophoridine derivatives against cancer cell lines [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 1495-1497.
- [21] Gao L M, Han Y X, Wang Y P, *et al.* Design and synthesis of oxymatrine analogues overcoming drug resistance in hepatitis B virus through targeting host heat stress cognate 70 [J]. *J. Med. Chem*, 2011, 54: 869-876.
- [22] 薛站, 霍晓敏, 张雅昆, 等. 黄花棘豆生物碱成分及其抗斜纹夜蛾活性研究 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(19): 110-116.
- [23] 邹寒雁. 青海中医单验方选 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 155-156.

[责任编辑 王文倩]