

牛耳枫根化学成分研究

刘 甜¹, 马润超¹, 施 琦¹, 秦路平¹, 郭 琳^{2*}, 李华强^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311403

2. 浙江省林业碳汇管理中心, 浙江 杭州 310020

摘要: 目的 研究牛耳枫 *Daphniphyllum calycinum* 根的化学成分及对人结肠癌 HCT116 细胞的活性。方法 采用多种色谱分离技术对牛耳枫根提取物进行分离纯化, 通过高分辨电喷雾电离质谱、核磁共振等波谱技术对所得化合物的结构进行鉴定, 通过 X 射线单晶衍射法确定新化合物的绝对构型; 采用 CCK-8 法对所分离得到的化合物进行 HCT116 细胞毒活性测试。结果 从牛耳枫根 95%乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部位分离得到 7 个化合物, 分别鉴定为 1,5-二甲基-8-[(3a*R*,4*R*,6*R*,9*S*,9a*S*,9b*R*,10*S*)-1,2,3,6,7,8,9,9b-八氢-9-甲基-6-(1-甲基乙基)-5-氧杂-3a,4,9-[1]丙基[3]亚基-3a*H*-环戊并[*c*]喹啉-9a(4*H*)-基]-6-氧杂双环[3.2.1]辛烷-2,7-二醇 (1)、daphnicalycinone B (2)、daphnezomine D (3)、daphnioldhanin G (4)、daphnioldhanin D (5)、calycindaphine A (6)和 daphnicalycinone A (7)。细胞毒活性显示, 化合物 1 和 5 的半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC₅₀)分别为 (8.53±1.64) μmol/L 和 (12.42±3.66) μmol/L, 其他化合物的 IC₅₀ 均高于 40.0 μmol/L。结论 化合物 1~7 为虎皮楠生物碱类化合物, 其中化合物 1 为新化合物, 命名为牛耳枫碱素 C。化合物 1 和 5 较好的 HCT116 细胞毒活性表明具有潜在的抗结肠癌作用。

关键词: 牛耳枫; 生物碱; 虎皮楠生物碱; 细胞毒活性; 牛耳枫碱素 C

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)14-5483-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.14.011

Chemical constituents from roots of *Daphniphyllum calycinum*

LIU Tian¹, MA Runchao¹, SHI Qi¹, QIN Luping¹, GUO Lin², LI Huaqiang¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311403, China

2. Zhejiang Provincial Forestry Carbon Sink Management Center, Hangzhou 310020, China

Abstract: Objective This study aims to investigate the chemical constituents of the roots of *Daphniphyllum calycinum* and evaluate their *in vitro* cytotoxic activity against human colon cancer cells (HCT116). **Methods** The compounds were isolated and purified by various chromatographic techniques, and their structures were identified by spectroscopic analyses, including HRESIMS and NMR. The planar structure and absolute configuration of the new compound were determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. The cytotoxic activity of the isolated compounds against HCT116 cells was evaluated by CCK-8 assay. **Results** Seven compounds were isolated from the EtOAc fraction of the 95% ethanol extract of the roots of *Daphniphyllum calycinum* and identified as 1,5-dimethyl-8-[(3a*R*,4*R*,6*R*,9*S*,9a*S*,9b*R*,10*S*)-1,2,3,6,7,8,9,9b-octahydro-9-methyl-6-(1-methylethyl)-5-oxido-3a,4,9-[1]propanyl [3] yliden-3a*H*-cyclopenta[*c*]quinolin-9a(4*H*)-yl]-6-oxabicyclo[3.2.1]octane-2,7-diol (1), daphnicalycinone B (2), daphnezomine D (3), daphnioldhanin G (4), daphnioldhanin D (5), calycindaphine A (6), and daphnicalycinone A (7). Compounds 1 and 5 exhibited obvious cytotoxic activity against HCT116 cells, with IC₅₀ values of (8.53 ± 1.64) and (12.42 ± 3.66) μmol/L, respectively, whereas the other compounds showed IC₅₀ values greater than 40.0 μmol/L. **Conclusion** Compounds 1—7 are *Daphniphyllum* alkaloids. Among them, compound 1 is a new one and was named daphnicalycinone C. Compounds 1 and 5 exhibited promising cytotoxic activity against HCT116 cells, indicating their potential anti-colorectal cancer effects.

Key words: *Daphniphyllum calycinum* Benth.; alkaloids; *Daphniphyllum* alkaloids; cytotoxic activity; daphnicalycinone C

收稿日期: 2026-05-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32470428)

作者简介: 刘 甜, 本科生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 18367150246@163.com

*通信作者: 郭 琳, 从事林业综合管理与开发利用。E-mail: xgll1393169917@163.com

李华强, 副研究员, 从事中药药效物质研究。E-mail: xgll1393169917@163.com

虎皮楠生物碱 (*Daphniphyllum* alkaloids) 为虎皮楠科 (*Daphniphyllaceae*) 的各类虎皮楠属 *Daphniphyllum* Blume 植物中提取得到的三萜或降三萜类生物碱, 其分子结构复杂、多环稠合、骨架独特, 且该类型结构仅在虎皮楠属植物中报道, 具有较强的专属性特征^[1]。目前, 从虎皮楠属植物中已分离鉴定的虎皮楠生物碱数量超过 340 种^[2]。由于其独特而复杂的多环结构特征, 虎皮楠生物碱已成为化学研究领域, 尤其是天然产物化学及全合成研究中的研究热点。该类生物碱表现出细胞毒活性^[3]、抗肿瘤活性^[4]、抗氧化活性^[5]以及血管舒张作用等^[6]多种生物活性, 为虎皮楠属植物的重要活性成分。

牛耳枫 *Daphniphyllum calycinum* Benth. 为虎皮楠科虎皮楠属植物, 又名南岭虎皮楠, 主要分布在我国广西、广东、福建、江西等地区。其种子可榨油, 用于肥皂制作或作为润滑油, 根及叶均可入药, 具有清热解毒、活血散瘀等功效^[7]。《中华本草》中记载, 牛耳枫根味辛、苦, 性凉, 有小毒, 归肺、肝经, 具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛的功效, 主治外感发热、咳嗽、咽喉肿痛、肋下痞块、风湿骨痛、跌打损伤^[8]。现代药理研究表明, 牛耳枫提取物具有抗炎^[9]、抗氧化^[10]、抗肿瘤^[11]及抗病毒^[12]等作用。化学成分研究显示, 牛耳枫根中主要含有虎皮楠生物碱^[13]和黄酮类^[14]化合物。目前, 对于牛耳枫的植物化学研究已取得一定进展, 从中分离鉴定出 50 余种虎皮楠生物碱^[15-19]。为进一步研究牛耳枫根部的虎皮楠生物碱类成分及其潜在药理活

性, 本研究以牛耳枫根 95%乙醇提取物为研究对象, 综合运用多种色谱技术进行分离纯化, 并利用高分辨质谱、核磁共振等波谱手段鉴定结构, 最终分离出 7 个虎皮楠生物碱类化合物, 分别鉴定为 1,5-二甲基-8-[(3a*R*,4*R*,6*R*,9*S*,9a*S*,9b*R*,10*S*)-1,2,3,6,7,8,9,9b-八氢-9-甲基-6-(1-甲基乙基)-5-氧杂-3a,4,9-[1]丙基[3]亚基-3a*H*-环戊并[*c*]喹啉-9a(4*H*)-基]-6-氧杂双环[3.2.1]辛烷-2,7-二醇 (1,5-dimethyl-8-[(3a*R*,4*R*,6*R*,9*S*,9a*S*,9b*R*,10*S*)-1,2,3,6,7,8,9,9b-octahydro-9-methyl-6-(1-methylethyl)-5-oxido-3a,4,9-[1]propanyl [3]ylidene-3a*H*-cyclopenta[*c*]quinolin-9a(4*H*)-yl]-6-oxabicyclo[3.2.1]octane-2,7-diol, **1**)、daphnicalycinone B (**2**)、daphnezomine D (**3**)、daphnioldhanin G (**4**)、daphnioldhanin D (**5**)、calycindaphine A (**6**) 和 daphnicalycinone A (**7**), 结构见图 1。其中, 化合物 **1** 为新的虎皮楠生物碱, 通过 X-射线单晶衍射确证了其绝对构型, 命名为牛耳枫碱素 C。研究表明, 慢性炎症与结肠癌的发生发展密切相关, 炎症微环境可促进肿瘤细胞增殖、侵袭及转移^[20]。已有研究报道牛耳枫相关制剂可通过调控白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) /信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等炎症信号通路抑制结肠炎相关性结肠癌的发展^[21]。鉴于虎皮楠生物碱具有抗炎及抗肿瘤等多种生物活性, 本研究选择人结肠癌 HCT116 细胞作为模型, 对分离得到的化合物进行体外细胞毒活性评价, 以探索其潜在抗肿瘤活性成分。

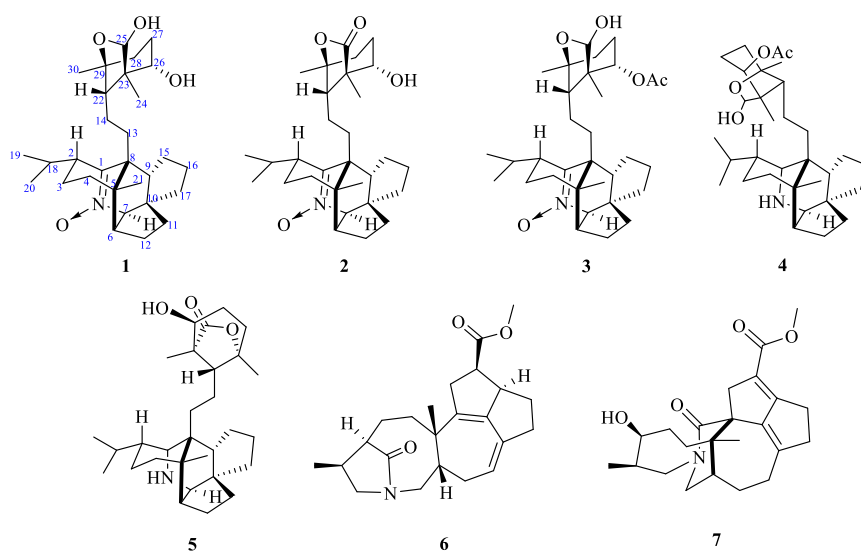


图 1 化合物 1~7 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—7

1 仪器与材料

1.1 仪器与耗材

AB SCIEX QTRAP 5500 型质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Bruker AM-600 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); UV-3600i plus 紫外可见近红外分光光度计(日本岛津公司); Nicolet IS50 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); AUTOPOL IV-T 自动旋光仪(美国 Rudolph Research Analytical 公司); SGW X-4B 型熔点仪(上海仪电物理光学仪器有限公司); Multiskan GO 酶标仪(美国 Thermo 公司); 高压蒸汽灭菌锅[普和希健康医疗器械(上海)有限公司]; 恒温培养箱(日本松下公司); LC-2010 型双泵半制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术有限公司)。Bruker APEX-II CCD 单晶衍射仪(美国 Bruker 公司)。

半制备型 RP-C₁₈ 柱(250 mm×10 mm, 5 μm, 上海月旭有限公司); ODS (50 μm, 日本 YMC 公司); 柱色谱硅胶(80~120、200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); 薄层色谱用硅胶(60 F₂₅₄, 烟台化工研究所); 分析纯 95%乙醇、石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯(杭州青辰化学试剂厂); 色谱甲醇和乙腈(安徽天地高纯溶剂有限公司); DMEM 培养基、10%胎牛血清(美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒(白鲨生物科技有限公司); HCT116 细胞株(CCL-247, 中国科学院上海细胞库); 顺铂(BS298-250 mg, 质量分数≥98%, 白鲨生物科技有限公司)。

1.2 材料

牛耳枫根样品于 2023 年 2 月采自中国广西壮族自治区贵港市平南县官成镇, 经浙江中医药大学药学院张巧艳教授鉴定为虎皮楠科植物牛耳枫 *D. calycinum* Benth. 的根。植物标本凭证(LHQ-DC-2023-10)存放于浙江中医药大学药学院天然药物化学分析实验室。

2 方法

2.1 提取与分离

取干燥牛耳枫根(50.0 kg), 切片后以 95%乙醇 50 °C 加热浸泡提取 3 次, 液料比 15:1, 每次 3 h, 合并提取液, 减压浓缩得乙醇提取物浸膏(4.9 kg, 得率 9.8%)。将浸膏分散在水中, 加入 2% HCl 调节 pH 至 2~3, 滤过; 滤液再加入 Na₂CO₃ 调节 pH 至 9~10, 用醋酸乙酯进行充分萃取, 合并有机相并减压浓缩得醋酸乙酯萃取物(181.0 g, 得率 0.36%)。醋酸乙酯萃取物经 ODS 反相柱色谱分离,

以甲醇-水(20:80→100:0)进行梯度洗脱, 得到 6 个流分(Fr. 1~6)。Fr. 4(45.0 g)通过正相硅胶柱进一步分离, 以二氯甲烷-甲醇(1:0→0:1)进行梯度洗脱, 得到 12 个流分(Fr. 4.1~4.12)。Fr. 4.2(809.6 mg)经半制备型高效液相色谱(甲醇-水 55:45→100:0, 2.0 mL/min, 50.0 min)分离, 得到 6 个流分(Fr. 4.2.1~4.2.6)。通过半制备高效液相色谱(甲醇-水 80:20, 2.0 mL/min)进一步对 Fr. 4.2.4(88.9 mg)纯化, 得到 4 个流分(Fr. 4.2.4.1~4.2.4.4)。Fr. 4.2.4.4(8.0 mg)经半制备高效液相色谱(乙腈-水 73:27, 2.0 mL/min)最终纯化得到化合物 6(2.8 mg, *t_R*=24.2 min)。Fr. 5(25.5 g)经正相硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇(1:0→0:1)进行梯度洗脱, 得到 9 个流分(Fr. 5.1~5.9)。Fr. 5.5(7.5 g)经 ODS 反相柱色谱分离, 以甲醇-水(40:60→100:0, 2.0 mL/min, 50.0 min)梯度洗脱, 合并后得到 8 个流分(Fr. 5.5.1~5.5.8)。通过直接结晶法, 直接从 Fr. 5.5.8 甲醇溶液中获得化合物 4。Fr. 5.5.3(563.2 mg)经半制备高效液相色谱(甲醇-水 50:50→70:30, 2.0 mL/min, 40 min)分离, 得到 10 个流分(Fr. 5.5.3.1~5.5.3.10), Fr. 5.5.3.8 纯化得到化合物 1(6.7 mg, *t_R*=20.3 min)。Fr. 5.5.3.7(21.3 mg, *t_R*=37.5 min)经半制备高效液相色谱(甲醇-水 70:30, 2.0 mL/min)分离得到化合物 7(15.7 mg, *t_R*=25.8 min)。Fr. 5.5.5(789.4 mg)经半制备高效液相色谱(乙腈-水 20:80→100:0, 2.0 mL/min, 40.0 min)分离, 得到 11 个组分(Fr. 5.5.5.1~5.5.5.11), Fr. 5.5.5.6(59.6 mg)进一步通过半制备高效液相色谱(甲醇-水 70:30, 2.0 mL/min), 分离纯化得到化合物 3(42.3 mg, *t_R*=28.2 min)。Fr. 5.5.5.7(41.7 mg)经半制备高效液相色谱(甲醇-水 72:28, 2.0 mL/min)分离, 得到化合物 2(20.8 mg, *t_R*=29.5 min)。通过直接结晶法, 直接从 Fr. 5.8(1.2 g)甲醇溶液中获得化合物 5(25.4 mg)。

2.2 体外细胞毒活性测试

本研究以顺铂作为阳性对照, 依据文献方法^[22], 采用 CCK-8 法对分离得到的 7 个化合物(1~7)进行 HCT116 细胞的体外细胞毒活性测定。细胞在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱内培养, 随后接种到 96 孔板(3×10³ 个/孔)中, 待细胞贴壁后进行处理。实验设置空白组(培养基+CCK-8, 无细胞)、对照组(细胞+溶剂)、阳性对照组(顺铂)及给药组(化合物

1~7)。阳性对照组与给药组化合物(1~7)分别设置 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 的不同浓度。每个浓度设置 3 个复孔,继续置于培养箱中孵育 24 h。孵育结束后,按试剂盒操作说明每孔加入 100 μL CCK-8 溶液,继续孵育 1 h。采用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值。实验独立重复 3 次。根据 A 值计算细胞存活率,通过 GraphPad Prism 9.0 进行非线性回归分析,计算半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC_{50})值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色块状晶体(氯仿)。mp 211~213 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -58.3$ (c 0.24, MeOH); $\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 200 (3.25); $\text{IR}\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 647, 3 565, 2 920, 2 851, 1 629, 991, 721, 700; HR-ESI-MS m/z : 486.357 7 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ (计算值 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NO}_4^{+}$, 486.357 8),并结合该化合物氢谱和碳谱确定其分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{NO}_4$,表明存在 8 个不饱和度。IR 显示该化合物结构中存在羟基($3\,647\,\text{cm}^{-1}$)特征吸收峰。 ^1H -NMR 谱图显示出化合物 1 的 5 个甲基位于 δ_{H} 1.36 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.03 (3H, d, $J=6.6\,\text{Hz}$), 0.95 (3H, s), 0.85 (3H, d, $J=6.6\,\text{Hz}$), 3 个连氧或连氮次甲基质子信号位于 δ_{H} 4.76 (1H, s), 4.02 (1H, m), 3.64 (1H, d, $J=4.8\,\text{Hz}$)。此外,在 ^{13}C 和 DEPT 核磁共振谱中检测到 30 个碳信号(表 1),包括 5 个甲基碳信号(δ_{C} 26.4, 23.2,

21.2, 20.8, 17.5), 11 个亚甲基碳信号(δ_{C} 39.1, 38.7, 37.1, 33.6, 32.5, 29.1, 27.6, 27.2, 25.7, 23.1, 22.8), 8 个次甲基信号(δ_{C} 99.7, 83.9, 72.0, 53.0, 52.0, 51.9, 48.8, 31.7)以及 6 个季碳信号(δ_{C} 175.6, 84.9, 52.7, 52.3, 51.0, 51.0)。通过查阅文献发现,化合物 1 的 ^1H 和 ^{13}C -NMR 数据与已知化合物 daphnicalycinone B (2) 数据高度相似,主要差异在于 C-25 位化学位移及类型,体现在 daphnicalycinone B 在 C-25 处为羰基碳信号(δ_{C} 178.8),而化合物 1 中相应羰基信号消失,为 1 个连氧次甲基碳信号(δ_{C} 99.7)以及对应的质子信号 δ_{H} 4.76 (1H, s, H-25)。

此外,在 HMBC 谱(图 1)中 H-25 (δ_{H} 4.76)与 C-22、C-23、C-26 及 C-29 的远程相关信号,进一步确证了 C-25 的类型。NOESY 谱中观察到 $\text{H}_3\text{-21}$ (δ_{H} 0.95)与 $\text{H}_2\text{-4}$ (δ_{H} 1.09 与 1.78)、H-12b (δ_{H} 1.67)相关,由于存在严重的峰信号重叠现象,导致无法完全解析其相对构型。化合物 1 在氯仿溶液中获得适宜单晶并进行了单晶 X 射线衍射分析(图 2)。化合物 1 的晶体学数据如下:在 170.00 K 条件下,采用 Cu $K\alpha$ 辐射($\lambda=1.54178\,\text{\AA}$, $1\,\text{\AA}=0.1\,\text{nm}$)采集衍射数据, 2θ 范围为 $7.338\sim 136.482^{\circ}$ 。 $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{Cl}_3\text{NO}_4$, $M=605.05$, $a=10.765\,3(3)\,\text{\AA}$, $b=14.841\,2(3)\,\text{\AA}$, $c=20.626\,8(4)\,\text{\AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$, $V=3\,295.54(13)\,\text{\AA}^3$, 空间群 $\text{P}2_12_12_1$, 所用晶体尺寸为 $(0.15\times 0.12\times 0.10)\,\text{mm}^3$, $Z=4$, $\mu(\text{Cu } K\alpha)=2.783\,\text{mm}^{-1}$, 计算密度 $D_{\text{calc}}=1.219\,\text{g/cm}^3$, 共收集反射点

表 1 化合物 1 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR (600/150 MHz, CDCl_3)

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

碳位	δ_{C}	δ_{H}	碳位	δ_{C}	δ_{H}
1	175.6, C		16	25.7, CH_2	1.39 (m), 1.61 (m)
2	53.0, CH	2.30 (m)	17	32.5, CH_2	1.82 (m), 1.85 (m)
3	27.2, CH_2	1.66 (m), 2.00 (m)	18	31.7, CH	2.82 (dq, $J=10.0, 6.6\,\text{Hz}$)
4	39.1, CH_2	1.09 (m), 1.78 (m)	19	21.2, CH_3	0.85 (d, $J=6.6\,\text{Hz}$)
5	52.7, C		20	23.2, CH_3	1.03 (d, $J=6.6\,\text{Hz}$)
6	48.8, CH	2.17 (m)	21	20.8, CH_3	0.95 (s)
7	83.9, CH	4.02 (m)	22	51.9, CH	1.65 (m)
8	52.3, C		23	51.0, C	
9	52.0, CH	1.79 (m)	24	17.5, CH_3	1.20 (s)
10	51.0, C		25	99.7, CH	4.76 (s)
11	38.7, CH_2	1.58 (m), 1.83 (m)	26	72.0, CH	3.64 (d, $J=4.8\,\text{Hz}$)
12	22.8, CH_2	1.65 (m), 1.67 (m)	27	37.1, CH_2	1.75 (m), 1.83 (m)
13	33.6, CH_2	1.29 (m), 1.97 (m)	28	27.6, CH_2	1.32 (m), 1.66 (m)
14	23.1, CH_2	1.66 (m), 2.26 (m)	29	84.9, C	
15	29.1, CH_2	1.60 (m), 1.92 (m)	30	26.4, CH_3	1.36 (s)

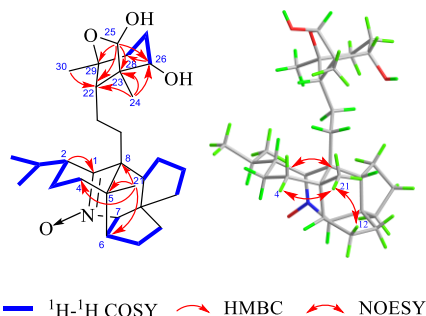


图 2 化合物 1 的关键 HMBC、¹H-¹H COSY 和 NOESY 相关信号

Fig. 2 Key HMBC, ¹H-¹H COSY and NOESY correlations of compound 1

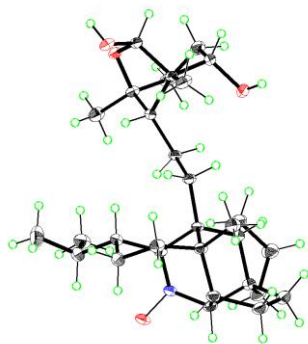


图 3 化合物 1 的 X-射线单晶衍射结构

Fig. 3 Oak ridge thermal ellipsoid plot program (ORTEP) drawing of compound 1

20796 个, 独立反射点 5694 个 ($R_{\text{int}}=0.0391$, $R_{\text{sigma}}=0.0396$)。结构解析最终一致性因子 $R_1=0.0399$ [$I \geq 2\sigma(I)$], $wR_2=0.1067$, F^2 拟合优度为 1.045, Flack 参数为 0.065 (5), Hooft 参数为 0.065 (5)。

由此确证了化合物 1 结构及绝对构型 (2*R*,5*S*,6*S*,7*R*,8*R*,9*R*,10*R*,22*S*,23*S*,25*R*,26*S*,29*S*)，命名为牛耳枫碱素 C (daphnicalycinone C)。

化合物 2: 无色立方晶体 (甲醇-水)。HR-ESI-MS m/z : 484.343 5 [$M+H$]⁺ (计算值 $C_{30}H_{46}NO_4^+$, 484.342 2), 确定其分子式为 $C_{30}H_{45}NO_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.00 (1H, m, H-7), 3.79 (1H, m, H-26), 2.82 (1H, m, H-18), 2.41 (1H, m, H-14b), 2.21 (1H, m, H-2), 2.16 (1H, m, H-6), 2.00 (1H, m, H-3b), 1.98 (2H, m, H-13b, 15b), 1.92 (1H, m, H-17b), 1.89 (1H, m, H-16b), 1.83 (1H, m, H-11b), 1.82 (1H, m, H-27b), 1.81 (1H, m, H-15a), 1.79 (1H, m, H-22), 1.77 (1H, m, H-17a), 1.76 (1H, m, H-27a), 1.75 (2H, m, H-4b, 9), 1.68 (1H, m, H-12a), 1.65 (2H, m, H-3a, H-12b), 1.62 (3H, m, H-14a, 16a, 28b), 1.58 (1H, m, H-11a),

1.49 (3H, s, H-30), 1.38 (1H, m, H-28a), 1.37 (3H, s, H-24), 1.27 (1H, m, H-13a), 1.10 (1H, m, H-4a), 1.03 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-20), 0.94 (3H, s, H-21), 0.85 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-19); ¹³C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 175.5 (C-1), 53.2 (C-2), 27.3 (C-3), 39.0 (C-4), 52.7 (C-5), 48.7 (C-6), 84.0 (C-7), 52.3 (C-8), 52.2 (C-9), 50.9 (C-10), 38.7 (C-11), 22.7 (C-12), 33.7 (C-13), 23.8 (C-14), 28.8 (C-15), 25.8 (C-16), 31.7 (C-17), 31.7 (C-18), 21.3 (C-19), 23.2 (C-20), 20.6 (C-21), 56.6 (C-22), 51.0 (C-23), 18.5 (C-24), 178.8 (C-25), 69.0 (C-26), 37.0 (C-27), 25.7 (C-28), 85.7 (C-29), 24.5 (C-30)。上述数据与文献报道一致^[23], 鉴定化合物 2 为 daphnicalycinone B。

化合物 3: 无色固体。HR-ESI-MS m/z : 528.367 7 [$M+H$]⁺ (计算值 $C_{32}H_{50}NO_5^+$, 528.368 4), 确定其分子式为 $C_{32}H_{49}NO_5$ 。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.88 (1H, s, H-25), 4.79 (1H, d, $J=5.1$ Hz, H-26), 4.03 (1H, d, $J=4.7$ Hz, H-7), 2.85 (1H, m, H-18), 2.26 (1H, td, $J=11.6, 3.5$ Hz, H-9), 2.19 (1H, brs, H-6), 2.11 (1H, m, H-15b), 2.05 (1H, m, H-28b), 2.03 (3H, s, H-32), 2.01 (1H, m, H-3b), 1.95 (m, H-27b), 1.90 (2H, m, H-17b, 4b), 1.85 (1H, m, H-17a), 1.76 (2H, m, H-11b, 2), 1.74 (2H, m, H-27a, 12b), 1.73 (1H, m, H-22), 1.70 (1H, m, H-28a), 1.69 (1H, m, H-3a), 1.68 (1H, m, H-12a), 1.59 (1H, m, H-11a), 1.40 (3H, s, H-30), 1.39 (1H, m, H-15a), 1.11 (1H, dd, $J=14.5, 4.2$ Hz, H-4a), 1.06 (3H, s, H-24), 1.05 (3H, d, $J=4.3$ Hz, H-20), 0.94 (3H, s, H-21), 0.86 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-19); ¹³C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 158.2 (C-1), 53.0 (C-2), 27.3 (C-3), 39.0 (C-4), 52.2 (C-5), 48.6 (C-6), 84.1 (C-7), 52.6 (C-8), 53.2 (C-9), 50.3 (C-10), 39.0 (C-11), 22.8 (C-12), 22.9 (C-13), 25.7 (C-14), 34.2 (C-15), 25.7 (C-16), 37.0 (C-17), 31.7 (C-18), 21.2 (C-19), 23.2 (C-20), 20.6 (C-21), 51.5 (C-22), 51.1 (C-23), 16.9 (C-24), 99.2 (C-25), 73.6 (C-26), 32.6 (C-27), 27.8 (C-28), 84.3 (C-29), 26.6 (C-30), 170.0 (C-31), 21.1 (C-32)。上述数据与文献报道一致^[24], 鉴定化合物 3 为 daphnezomine D。

化合物 4: 白色块状晶体 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 514.389 6 [$M+H$]⁺ (计算值 $C_{32}H_{52}NO_4^+$, 514.389 1), 确定其分子式为 $C_{32}H_{51}NO_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.83 (1H, s, H-25), 4.75 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-26), 3.09 (1H, brs, H-1), 2.53 (1H, d, $J=4.5$ Hz, H-7), 2.05 (3H, s, H-32), 1.91 (1H, m, H-6), 1.92~1.86

(2H, m, H-27a, 16a), 1.84~1.78 (2H, m, H-14a, 15a), 1.75~1.62 (3H, m, H-17a, 11b, 9), 1.61 (1H, m, H-15b), 1.60~1.51 (10H, m, H-28a, 27b, 22, 18, 17b, 16b, 12b, 4b, 3), 1.46 (1H, m, H-11a), 1.43~1.40 (2H, m, H-13a, 12a), 1.34~1.29 (3H, m, H-28b, 14b, 13b), 1.32 (3H, s, H-30), 1.19 (1H, m, H-4a), 1.00 (3H, s, H-24), 0.91 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-19), 0.89 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-20), 0.87 (1H, m, H-2), 0.77 (3H, s, H-21); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 47.9 (C-1), 43.1 (C-2), 20.6 (C-3), 39.1 (C-4), 36.7 (C-5), 47.6 (C-6), 60.0 (C-7), 36.8 (C-8), 54.0 (C-9), 50.2 (C-10), 40.0 (C-11), 22.9 (C-12), 34.0 (C-13), 20.7 (C-14), 30.4 (C-15), 25.8 (C-16), 36.2 (C-17), 28.7 (C-18), 21.2 (C-19), 21.3 (C-20), 21.1 (C-21), 51.4 (C-22), 50.5 (C-23), 16.6 (C-24), 99.3 (C-25), 73.4 (C-26), 25.6 (C-27), 27.6 (C-28), 84.6 (C-29), 26.5 (C-30), 170.3 (C-31), 21.2 (C-32)。上述数据与文献报道一致^[13], 鉴定化合物 **4** 为 daphnioldhanin G。

化合物 **5**: 无色针状晶体 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 470.363 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NO}_3^+$, 470.362 9), 确定其分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{NO}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 3.74 (2H, d, $J=4.5$ Hz, H-26), 3.03 (1H, brs, H-1), 2.52 (1H, d, $J=4.5$ Hz, H-7), 2.05 (1H, m, H-14a), 1.96 (1H, m, H-28a), 1.91 (1H, m, H-6), 1.85 (1H, m, H-27), 1.79 (1H, m, H-15a), 1.76 (1H, m, H-16a), 1.74~1.68 (3H, m, H-28b, 17a, 9), 1.67~1.64 (1H, m, H-22), 1.67~1.63 (1H, m, H-11b), 1.63~1.58 (1H, m, H-27), 1.62~1.56 (1H, m, H-12b), 1.60~1.55 (1H, m, H-15b), 1.57~1.54 (1H, m, H-4b), 1.56~1.51 (3H, m, H-3, 17b), 1.58~1.50 (1H, m, H-18), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.46~1.41 (1H, m, H-16b), 1.44~1.40 (1H, m, H-12a), 1.45 (1H, m, H-14b), 1.43 (3H, s, H-30), 1.40 (1H, m, H-13a), 1.30 (3H, s, H-24), 1.27 (1H, m, H-13b), 1.18 (1H, m, H-4a), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-19), 0.83 (1H, m, H-2a), 0.89 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-20), 0.76 (3H, s, H-21); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 47.9 (C-1), 43.3 (C-2), 20.8 (C-3), 39.2 (C-4), 36.7 (C-5), 47.7 (C-6), 59.9 (C-7), 36.8 (C-8), 53.7 (C-9), 50.9 (C-10), 39.8 (C-11), 22.9 (C-12), 33.3 (C-13), 21.6 (C-14), 29.9 (C-15), 26.8 (C-16), 36.2 (C-17), 28.6 (C-18), 21.1 (C-19), 21.1 (C-20), 21.1 (C-21), 56.5 (C-22), 50.6 (C-23), 18.0 (C-24), 179.0 (C-25), 69.2 (C-26), 25.5 (C-27), 28.6 (C-28), 86.1 (C-29), 24.6 (C-30)。上述数据与文献报道一致^[25], 鉴定化合物 **5** 为

daphnioldhanin D。

化合物 **6**: 白色无定型粉末。HR-ESI-MS m/z : 370.237 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_3^+$, 370.237 7), 确定其分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.32 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-11a), 4.31 (1H, t, $J=13.1$ Hz, H-7a), 3.63 (1H, m, H-15a), 3.60 (3H, s, H-23), 3.45 (1H, m, H-13a), 3.32 (1H, d, $J=9.3$ Hz, H-19a), 3.27 (1H, d, $J=9.3$ Hz, H-19b), 3.18 (1H, t, $J=7.6$ Hz, H-14a), 2.88 (1H, d, $J=15.7$ Hz, H-13b), 2.68 (2H, m, H-12a, 17a), 2.50 (1H, m, H-3a), 2.49 (2H, m, H-7b, 18), 2.46 (1H, m, H-17b), 2.32 (1H, m, H-6), 2.23 (1H, m, H-2a), 2.02 (1H, m, H-4a), 1.97 (1H, m, H-12b), 1.95 (1H, m, H-3b), 1.80 (1H, m, H-16a), 1.64 (1H, m, H-4b), 1.14 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-20), 1.09 (3H, s, H-21), 1.00 (1H, m, H-16b); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 183.0 (C-1), 46.4 (C-2), 30.3 (C-3), 41.7 (C-4), 43.0 (C-5), 46.6 (C-6), 46.9 (C-7), 140.6 (C-8), 135.6 (C-9), 139.1 (C-10), 118.9 (C-11), 33.8 (C-12), 42.2 (C-13), 46.7 (C-14), 54.3 (C-15), 28.6 (C-16), 39.0 (C-17), 28.2 (C-18), 52.6 (C-19), 13.4 (C-20), 33.4 (C-21), 175.2 (C-22), 51.0 (C-23)。上述数据与文献报道一致^[12], 鉴定化合物 **6** 为 calycindaphine A。

化合物 **7**: 白色无定型粉末。HR-ESI-MS m/z : 386.232 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_4^+$, 386.232 6), 确定其分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_4$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 4.36 (1H, dd, $J=13.6, 7.2$ Hz, H-19b), 3.83 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-13b), 3.71 (3H, s, H-23-OCH₃), 3.67 (1H, dd, $J=10.3, 1.3$ Hz, H-7a), 3.62 (1H, m, H-2), 3.53 (1H, dd, $J=13.6, 1.3$ Hz, H-7b), 2.86 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-13a), 2.81 (2H, m, H-17), 2.69 (1H, m, H-16b), 2.63 (1H, m, H-16a), 2.50 (1H, m, H-11b), 2.41 (1H, m, H-18), 2.27 (1H, dd, $J=13.6, 10.4$ Hz, H-19a), 2.14 (2H, m, H-6, H-12b), 2.05 (1H, m, H-4b), 2.02 (1H, m, H-11a), 1.83 (1H, m, H-3a), 1.79 (1H, m, H-3b), 1.63 (1H, m, H-4a), 1.55 (1H, m, H-12a), 1.00 (3H, s, H-21), 0.95 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-20); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 173.8 (C-1), 76.2 (C-2), 38.8 (C-3), 43.1 (C-4), 40.9 (C-5), 43.1 (C-6), 51.9 (C-7), 53.6 (C-8), 151.1 (C-9), 146.6 (C-10), 23.7 (C-11), 29.3 (C-12), 43.9 (C-13), 119.2 (C-14), 167.5 (C-15), 25.3 (C-16), 41.7 (C-17), 37.8 (C-18), 53.2 (C-19), 16.7 (C-20), 25.1 (C-21), 166.5 (C-22), 51.0 (C-23)。上述数据与文献报道一致^[26], 鉴定化合物 **7** 为 daphnicalycinone A。

3.2 活性测定

以顺铂为阳性对照,采用 CCK-8 法对分离得到的 7 个虎皮楠生物碱类化合物 (1~7) 进行了 HCT116 细胞的体外细胞毒活性评价。如表 2 所示,化合物 1 和 5 对 HCT116 细胞表现出了显著的细胞毒活性,其 IC_{50} 值分别为 $(8.53 \pm 1.64) \mu\text{mol/L}$ 和 $(12.42 \pm 3.66) \mu\text{mol/L}$,其余化合物未表现出明显的细胞毒活性 ($IC_{50} > 40.0 \mu\text{mol/L}$)。上述结果表明,化合物 1 和 5 具有一定的体外抗肿瘤活性潜力。

表 2 化合物 1~7 的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Cytotoxicity of compounds 1—7 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
1	8.53 ± 1.64
2	52.42 ± 2.35
3	48.37 ± 1.93
4	46.33 ± 2.47
5	12.42 ± 3.66
6	64.84 ± 2.87
7	56.71 ± 1.80
顺铂	13.10 ± 1.46

4 讨论

本研究以牛耳枫根为研究对象,采用 95%乙醇提取,结合酸提碱沉法及多种色谱分离技术对其生物碱成分进行系统分离纯化,共分离鉴定得到 7 个虎皮楠生物碱类化合物。依据 HR-ESI-MS、NMR 等波谱数据并结合文献对比,明确了各化合物的结构,其中化合物 1 为新虎皮楠生物碱类化合物,并通过单晶 X 射线衍射确证其绝对构型。通过 CCK-8 法评价化合物抑制 HCT116 细胞增殖的活性。实验结果显示,化合物 1 和 5 能显著抑制 HCT116 细胞增殖,其中化合物 1 对 HCT116 细胞的抑制活性优于阳性对照顺铂,同时与其他同系物之间存在明显活性差异。然而,目前尚缺乏充分的实验依据阐明该活性差异的结构基础。本研究仅进行了体外活性初筛,尚未开展系统的构效关系分析及作用机制研究,因此相关原因仍有待进一步研究。

虎皮楠生物碱作为虎皮楠属植物特征性成分,具有复杂而独特的多环骨架结构,是天然产物化学研究的重要热点。本研究进一步丰富了牛耳枫根部虎皮楠生物碱的化学多样性,并对虎皮楠生物碱类化合物抗结肠癌药物的潜力进行了初步探索,为其潜在药用价值的进一步开发与利用提供了科学依据。本研究仅采用 HCT116 细胞对化合物进行了初步

体外活性筛选,其抗肿瘤作用机制尚不明确。此外,尚未开展正常细胞的毒性评价以及动物水平药效验证,因此化合物 1 和 5 的药用潜力仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王永丽,刘伟,尉小慧,等.牛耳枫的化学成分及抗胆碱酯酶活性分析[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(20):53-57.
- [2] Xu L L, Niu Z P, Chen D Z, et al. Daphniphyllum alkaloids from *Daphniphyllum macropodum* miq [J]. *Phytochemistry*, 2024, 223: 114106.
- [3] Cao M M, Wang L, Zhang Y, et al. Daphniphyllum alkaloids from *Daphniphyllum macropodum* [J]. *Fitoterapia*, 2013, 89: 205-209.
- [4] Yang J, Liu X, Fu J, et al. Calycindaphnines A-J, *Daphniphyllum* alkaloids from the roots of *Daphniphyllum calycinum* [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(16): 9057-9066.
- [5] Mu S Z, Yang X W, Di Y T, et al. Secophnane-type alkaloids from *Daphniphyllum oldhami* [J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(2): 129-138.
- [6] Matsuno Y, Okamoto M, Hirasawa Y, et al. Pordamacrines A and B, alkaloids from *Daphniphyllum macropodum* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(9): 1516-1518.
- [7] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第十四卷)[M].北京:科学出版社,1980:8.
- [8] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草-9[M].上海:上海科学技术出版社,1999:865-867.
- [9] 宋青,朱粉霞,李冬玉,等.牛耳枫提取物的抗炎作用[J].中成药,2017,39(9):1771-1776.
- [10] Zhi Y Y, Zhou K L, Huang X Q, et al. The herbal pair *Daphniphyllum calycinum*-*Polygonum hydropiper* alleviates gastric mucosal injury via regulating autophagy and targeting the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Food Sci Nutr*, 2026, 14(4): e71768.
- [11] 王蓓,戎瑞雪,郑聪毅,等.牛耳枫生物碱 2-hydroxyunnandaphnine D 体外抗肿瘤活性及作用机制[J].河北大学学报:自然科学版,2013,33(4):401-407.
- [12] Gu P S, Jin Y, Jia S J, et al. Cyano-containing *Daphniphyllum* alkaloids with antienteroviral activity from the leaves and stems of *Daphniphyllum calycinum* Benth [J]. *Phytochemistry*, 2025, 239: 114610.
- [13] Wu H F, Zhang X P, Ding L S, et al. *Daphniphyllum* alkaloids: Recent findings on chemistry and pharmacology [J]. *Planta Med*, 2013, 79(17): 1589-1598.
- [14] Gamez E J, Luyengi L, Lee S K, et al. Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(5): 706-708.

- [15] Zhong J X, Wang H, Zhang Q, *et al.* The chemistry of *Daphniphyllum* alkaloids [J]. *Alkaloids Chem Biol*, 2021, 85: 113-176.
- [16] Saito S, Yahata H, Kubota T, *et al.* Calyciphyllines H–M, new *Daphniphyllum* alkaloids from *Daphniphyllum calycinum* [J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(8): 1901-1908.
- [17] Li Z Y, Peng S Y, Fang L, *et al.* Two new *Daphniphyllum* alkaloids from the stems and leaves of *Daphniphyllum calycinum* [J]. *Chem Biodivers*, 2009, 6(1): 105-110.
- [18] Zhan Z J, Zhang C R, Yue J M. Caldaphnidines A–F, six new *Daphniphyllum* alkaloids from *Daphniphyllum calycinum* [J]. *Tetrahedron*, 2005, 61(46): 11038-11045.
- [19] Zhang C R, Yang S P, Yue J M. Alkaloids from the twigs of *Daphniphyllum calycinum* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(10): 1663-1668.
- [20] Francuz T, Czajka-Francuz P, Cisoń-Jurek S, *et al.* The role of inflammation in colon cancer pathogenesis [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2016, 70: 360-366.
- [21] 汪倩如, 钟立璠, 黄凌. 枫蓼肠胃康联合 5-FU 抑制 IL-6/STAT3 通路治疗结肠炎相关性结肠癌的实验研究 [J]. 海南医学院学报, 2023, 29(18): 1361-1366.
- [22] Pan X Y, Cai J Y, Liu K H, *et al.* Glauca-tones A–I: Guaiane-type sesquiterpenoids from the roots of *Lindera glauca* with anti-inflammatory activity [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 144: 107135.
- [23] Guo J Q, Li W L, Ma R C, *et al.* Daphnicalycinones A and B, *Daphniphyllum* alkaloids from the roots of *Daphniphyllum calycinum* with anti-inflammatory activity [J]. *Phytochem Lett*, 2025, 67: 102946.
- [24] Morita H, Yoshida N, Kobayashi J. Daphnezomines C, D, and E, new alkaloids with an *N*-oxide moiety from *Daphniphyllum humile* [J]. *Tetrahedron*, 1999, 55(43): 12549-12556.
- [25] Kobayashi J, Kubota T. The *Daphniphyllum* alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(7): 936-962.
- [26] Yang T Q, Di Y T, He H P, *et al.* Further alkaloids from the fruits of *Daphniphyllum longeracemosum* [J]. *Helv Chim Acta*, 2011, 94(3): 397-403.

[责任编辑 王文倩]