

中药玄参中的2个新生物碱

刘 鹏[#], 祝琳琳[#], 靖淑瑾, 李 想, 苏成园, 张 薇*, 刘 斌*

(北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: 采用常压硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、反相柱色谱及半制备高效液相色谱等色谱技术对玄参科玄参属植物玄参 (*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.) 干燥根的 70% 乙醇提取物进行化学成分研究, 共分离得到 13 个化合物, 依据其理化性质及 UV、IR、NMR、MS、ECD 等多种波谱分析方法鉴定了化合物的结构, 分别为 11 α -isopropylcytisine (1)、13 α -isopropylcytisine (2)、尿嘧啶 (3)、(S)-5-羟基吡咯烷-2-酮 (4)、pterolactam (5)、methyl-L-pyroglutamate (6)、山柰素 (7)、木犀草素 (8)、5,6,7,4'-四甲氧基黄酮 (9)、6'-羟基-2',3',4,4'-四甲氧基查尔酮 (10)、东莨菪苷 (11)、hymexelsin (12) 和 8-羟基香豆素 (13), 其中, 化合物 1 和 2 为新化合物, 化合物 3、4、7~12 首次从该植物中分离得到。通过对分离得到的化合物进行肿瘤细胞毒活性研究, 结果表明化合物 8 和 9 对小鼠乳腺癌细胞 (4T1) 具有微弱的细胞毒活性。

关键词: 玄参; 生物碱; 化学成分; 黄酮; 香豆素; 细胞毒活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)03-0750-07

Two new alkaloids from the roots of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.

LIU Peng[#], ZHU Lin-lin[#], JING Shu-jin, LI Xiang, SU Cheng-yuan, ZHANG Wei*, LIU Bin*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract: Two new alkaloids along with eleven known ones, were isolated from the 70% ethanol extract of the roots of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. by various chromatographic methods, including silica gel, Sephadex LH-20, reverse phase C₁₈ and semi-preparative HPLC. Their structures were determined by physicochemical properties and spectroscopic methods, including UV, IR, MS, 1D/2D NMR and ECD. They were identified as 11 α -isopropylcytisine (1), 13 α -isopropylcytisine (2), uracil (3), (S)-5-hydroxypyrrolidin-2-one (4), pterolactam (5), methyl-L-pyroglutamate (6), kaempferide (7), luteolin (8), 5,6,7,4'-tetramethoxyflavone (9), 6'-hydroxy-2',3',4,4'-tetramethoxychalcone (10), scopolin (11), hymexelsin (12), and 8-hydroxycoumarin (13). Among them, compounds 1 and 2 are two new compounds, while compounds 3, 4, 7–12 were isolated from this plant for the first time. An antitumor activity assay showed that compounds 8 and 9 had weak cytotoxicity against breast cancer cells (4T1).

Key words: *Scrophularia ningpoensis*; alkaloid; chemical constituents; flavonoid; coumarin; cytotoxicity

玄参为玄参科玄参属草本植物玄参 (*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.) 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 味甘、苦、咸, 性微寒, 归肺、胃、肾经, 具有清热凉血, 滋

阴降火, 解毒散结的功效, 为我国常用大宗中药, 广泛用于治疗热病伤阴、津伤便秘、骨蒸劳热、夜寐不安、目赤、咽痛、瘰疬等疾病^[1], 且在中药方剂中经常配伍入药, 如咽炎片、清喉咽合剂、玄麦甘桔颗粒、四妙勇安汤等。因玄参应用广泛, 故对其化学成分及其药理活性研究一直备受关注。目前从玄参中发现的化学成分主要包括环烯醚萜类和苯丙素类^[2], 其具有抗炎、抗菌、抗氧化、降血压、降血糖等作用^[3]。玄参中尚有生物碱

收稿日期: 2021-09-24; 修回日期: 2021-10-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774101); 北京中医药大学青年科学家培育计划 (BUCM-2019-QNKXJC008).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-53912129, E-mail: liubinyn67@163.com;

Tel: 86-10-53912129, E-mail: zhangwei_bucm@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1403

类、黄酮类、香豆素类、糖类、三萜类、挥发油类等成分, 这些成分报道相对较少。

由上可知, 玄参化学成分和药理活性研究虽取得了一定的成果, 但仍有巨大研究开发潜力, 相对于玄参的广泛应用, 对其化学成分研究的相对滞后制约了对玄参及其配伍方剂进行更为深入的开发。本课题组前期对玄参中的环烯醚萜及苯丙素类化学成分进行了研究, 发现一些结构新颖的化合物^[4], 为进一步寻找结构新颖、活性良好的化学成分, 丰富玄参的化学成分库, 本课题组继续对其化学成分进行深入、系统的研究。本实验采用多种分离手段和结构鉴定技术从玄参中分离并鉴定了13个化合物, 包括6个生物碱类化合物(1~6)、4个黄酮类化合物(7~10)和3个香豆素类化合物(11~13), 其中化合物1和2为两个新化合物, 8个化合物为首次从玄参中分离得到, 结构见图1, 以上研究进一步丰富了玄参的物质基础研究。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物1 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{25} = -95.2$ (c 0.21, MeOH)。碘化铯钾反应(TLC)显橘红色, 提示该化合物可能为生物碱。HR-ESI-MS显示准分子离子峰 m/z 233.164 6 $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{21}N_2O^+$, 计算值233.164 8), 推断其分子式为 $C_{14}H_{20}N_2O$, 不饱和度为6。UV光谱显示在203、235、311 nm处有最大吸收, IR光谱显示存在氨基(3 431 cm^{-1})、羰基(1 655 cm^{-1})和苯环(1 574、1 547 cm^{-1})的特征吸收峰。

1H NMR谱显示存在 α -吡啶酮环的3个特征性双键质子信号 δ_H 7.46 (1H, dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz)、6.42 (1H, dd, $J = 9.0, 1.4$ Hz) 和 6.26 (1H, dd, $J = 7.0, 1.4$ Hz), 2组含氮亚甲基质子信号 δ_H 3.98 (2H, d, $J = 4.0$ Hz) 和 3.22 (1H, dd, $J = 12.0, 2.7$ Hz)、2.69 (1H, dt, $J = 12.0, 2.4$ Hz)。以上信息提示化合物1可能为吡啶酮类喹诺里西啉生物碱^[5]。此外, 在高场区还可观察到一组异丙基质子信号 δ_H 2.24 (1H, m)、0.96 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)、0.99 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)。 ^{13}C NMR谱显示存在14个碳信号, 包括 α -吡啶酮环的5个碳信号 δ_C 165.8, 116.7, 141.3, 107.9, 153.8; 2个含氮亚甲基碳信号 δ_C 52.9, 48.6; 1个含氮次甲基碳信号 δ_C 67.1。此外, 在高场区还可观察到6个碳信号 δ_C 36.1, 21.7, 29.1, 26.5, 20.4, 20.4。这些特征信息构建了吡啶酮类喹诺里西啉生物碱基本母核和取代情况。

结合 1H - 1H COSY、HSQC、HMBC谱所提供的信息, 完成对化合物1碳氢信号的准确归属(表1)。将化合物1的NMR信号与已知化合物clathrotropine进行对比^[5], 发现二者十分相似, 区别仅在于clathrotropine中的原D环信号缺失以及化合物1中多出的一组异丙基信号。同时结合化合物1存在6个不饱和度, 可推断化合物1为具有三环骨架的吡啶酮类喹诺里西啉型生物碱。在 1H - 1H COSY谱中可观察到如图2所示的质子自旋偶合体系, 在HMBC谱中可观察到H-15 (δ_H 0.99)、H-16 (δ_H 0.96)与C-11 (δ_C 67.1)存在相关, 可确定异丙基连接于C-11位(图2)。在NOESY谱中可观察到H-7 (δ_H 2.98)和H-5 (δ_H 6.26), H-9 (δ_H 2.54)和H-16 (δ_H 0.96),

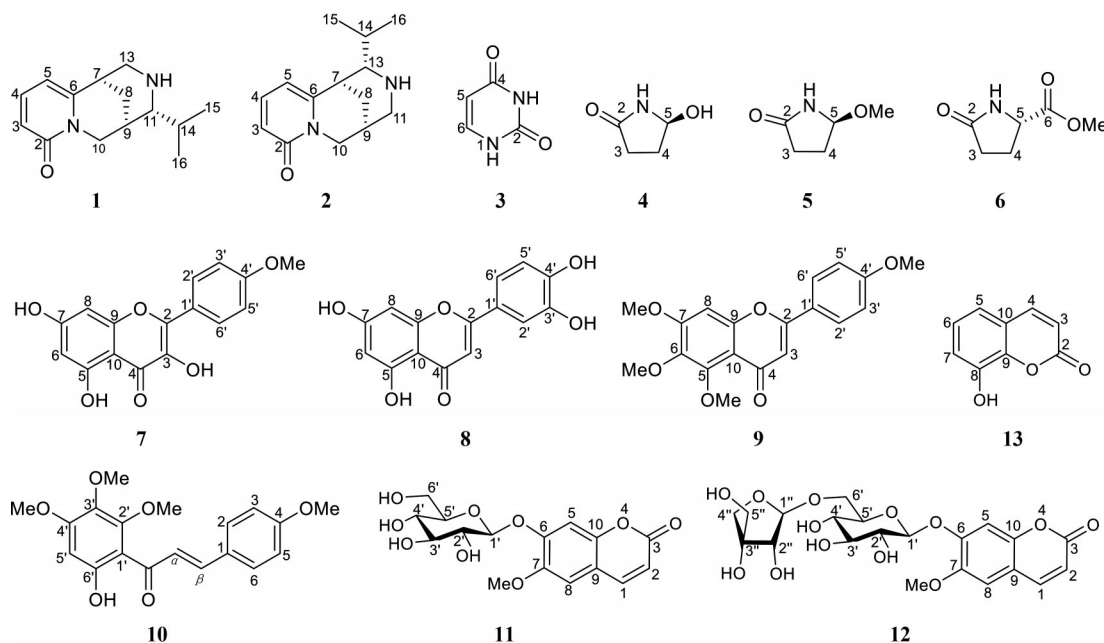


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-13

Table 1 NMR data of compounds **1** and **2** in CD₃OD (400 MHz for ¹H NMR, 100 MHz for ¹³C NMR, *J* in Hz). ^aOverlapped signals are reported without designating multiplicity

No.	1		2	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}
2	–	165.8	–	165.8
3	6.42 (dd, 9.0, 1.4)	116.7	6.41 (dd, 9.0, 1.3)	116.4
4	7.46 (dd, 9.0, 7.0)	141.3	7.46 (dd, 9.0, 7.0)	141.3
5	6.26 (dd, 7.0, 1.4)	107.9	6.24 (dd, 7.0, 1.3)	108.1
6	–	153.8	–	155.0
7	2.98	36.1	3.13 (m)	36.9
8	1.76 (br d, 13.3, α) 2.13 (dt, 13.3, 3.0, β)	21.7	1.74 (dq, 13.3, 2.0, α) 2.14 (br d, 13.3, β)	21.3
9	2.54	29.1	2.32	28.6
10	3.98 (d, 4.0)	52.9	3.90 (dd, 15.5, 6.5, α) 4.03 (d, 15.5, β)	51.6
11	2.37 (dd, 10.2, 1.9)	67.1	3.14 (br d, 12.3, α) 2.75 (dt, 12.3, 2.2, β)	47.7
13	3.22 (dd, 12.0, 2.7, α) 2.69 (dt, 12.0, 2.4, β)	48.6	2.31	68.0
14	2.24	26.5	2.28 (m)	26.3
15	0.99 (d, 6.6)	20.4	1.02 (d, 6.1)	20.4
16	0.96 (d, 6.6)	20.4	0.99 (d, 6.1)	20.4

H-10 β (δ_{H} 3.98) 和 H-11 (δ_{H} 2.37), H-14 (δ_{H} 2.24) 和 H-13 α (δ_{H} 3.22)/H-15 (δ_{H} 0.99), H-10 α (δ_{H} 3.98) 和 H-8 α (δ_{H} 1.76) 存在相关, 可确定该化合物的相对构型如图3所示。运用 ORCA 4.2.1 软件, 采用 TDDFT 方法^[6,7]分别计算了两种可能的绝对构型的理论 CD 谱, 并分别与实测的 CD 谱进行比较 (图4), 确定化合物 **1** 的绝对构型为 7*R*,9*R*,11*R*。综上所述, 确定了化合物 **1** 的结构, 为一个新的生物碱类化合物, 命名为 11 α -isopropylcystisine。

化合物 **2** 白色无定形粉末, [α]_D²⁵ = -220.1 (*c* 0.71, MeOH)。碘化铋钾反应呈阳性, 提示其可能为生物碱类化合物。HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 *m/z* 233.164 6 [M+H]⁺ (C₁₄H₂₁N₂O⁺, 计算值 233.164 8), 推断其分子式为 C₁₄H₂₀N₂O, 不饱和度为 6, 是化合物 **1** 的同分异构体。UV 光谱显示在 203、234、310 nm 处有最大吸收。IR 光谱同样显示存在氨基 (3 430 cm⁻¹)、羰基 (1 655 cm⁻¹) 和苯环 (1 573、1 547 cm⁻¹) 的特征吸收峰。¹H NMR 谱显

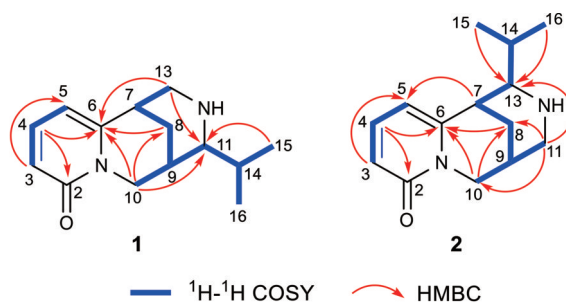


Figure 2 Key ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compounds **1** and **2**

示存在 α -吡啶酮环的 3 个特征性双键质子信号 δ_{H} 7.46 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz)、6.41 (1H, dd, *J* = 9.0, 1.3 Hz) 和 6.24 (1H, dd, *J* = 7.0, 1.3 Hz)。2 组可能与氮相连的亚甲基质子信号 δ_{H} 3.90 (1H, dd, *J* = 15.5, 6.5 Hz)、4.03 (1H, d, *J* = 15.5 Hz) 和 δ_{H} 3.14 (1H, br d, *J* = 12.3 Hz)、2.75 (1H, dt, *J* = 12.3, 2.2 Hz)。以上信息提示化合物 **2** 为吡啶酮类喹诺里西啶生物碱^[5]。此外, 与化合物 **1** 类似, 化合物 **2** 中也同样存在一组异丙基信号 δ_{H} 2.28 (1H, m)、1.02 (3H, d, *J* = 6.1 Hz)、0.99 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), δ_{C} 26.3, 20.4, 20.4。

结合 ¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC 谱提供的信息, 可对化合物 **2** 的碳氢信号进行全归属 (表 1)。将化合物 **2** 的 NMR 信号与化合物 **1** 对比, 发现二者十分相似, 仅在 11-CH 和 13-CH 存在差异, 提示二者中异丙基取代位置可能不同。在化合物 **2** 的 HMBC 谱中可观察到 H-15 (δ_{H} 1.02) 和 H-16 (δ_{H} 0.99) 与 C-13 (δ_{C} 68.0) 存在相关, 说明异丙基连接在 C-13 位。在 NOESY 谱中可观察到 H-10 β (δ_{H} 4.03) 与 H-11 β (δ_{H} 2.75), H-5 (δ_{H} 6.24) 和 H-7 (δ_{H} 3.13), H-7 (δ_{H} 3.13) 与 H-13 (δ_{H} 2.31)/H-15 (δ_{H} 1.02) 存在相关, 还可观察到 H-8 α (δ_{H} 1.74) 与 H-11 α (δ_{H} 3.14) 存在相关, 可确定化合物 **2** 的相对构型如图3所示。此外, 基于 TDDFT 理论进行了计算 CD, 7*R*,9*S*,11*S*-**2** 的计算 ECD 曲线与化合物 **2** 的实验 ECD 曲线基本一致 (图4),

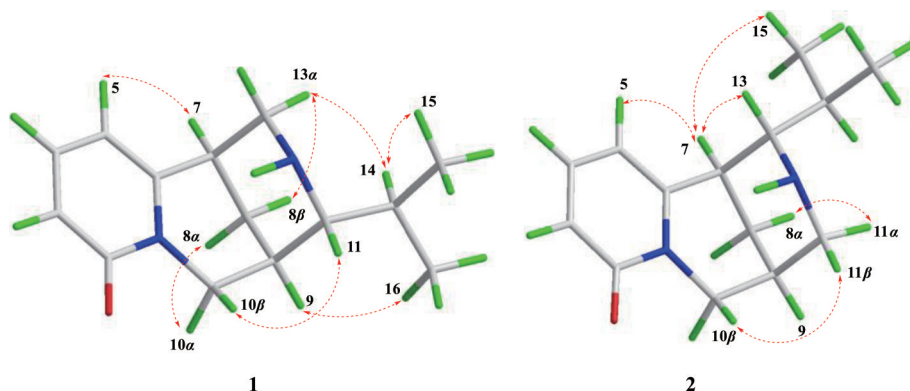


Figure 3 Key NOE correlations of compounds **1** and **2**

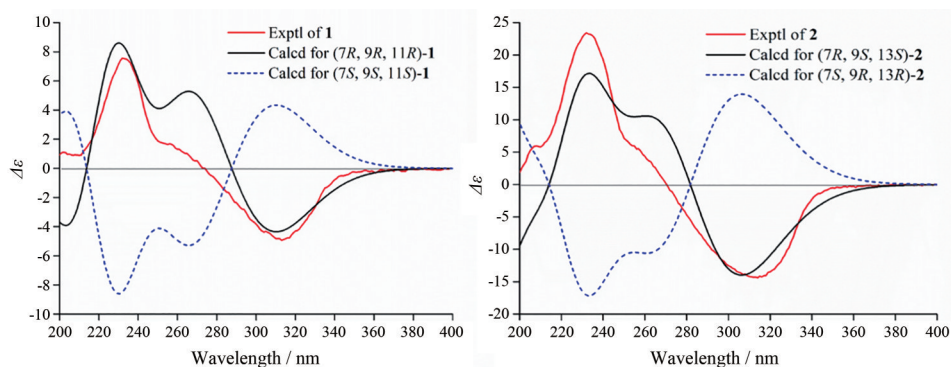


Figure 4 Calculated and experimental CD spectra of **1** and **2**

因此确定化合物**2**的绝对构型为7*R*,9*S*,13*S*。综上所述,确定了化合物**2**的结构,为一个新的生物碱类化合物,命名为13*α*-isopropylcytisine。

2 细胞毒性

采用MTT法,测试了分离所得的化合物对小鼠乳腺癌细胞4T1和人非小细胞肺癌细胞系A549的细胞毒性。结果显示化合物**8**和**9**在浓度为50 μmol·L⁻¹时对4T1具有微弱的细胞毒性,抑制率分别为64.46%和54.35%。

实验部分

RE-52 A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SHB-III A 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); KQ-500 DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH-S2 二孔智能水浴(郑州长城科工贸有限公司); Sartorius BT 25 S 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。Agilent-1260 型高效液相色谱仪(G1311C 四元泵系统和G1315D 二极管阵列检测器)配备一根 Waters Sunfire C18 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 150 mm); 岛津半制备型高效液相色谱仪(LC-20AR 二元泵系统和SPD-20A 检测器)配备一根制备型高效液相色谱柱 COMOSIL C18 (5 μm, 10 mm × 250 mm)。柱色谱用 ODS (50 μm, YMC 产品); 柱色谱用 Sephadex LH-20 (Pharmacia 产品); MCI GEL CHP 20P (日本三菱公司); 柱色谱用硅胶(200~300 目)、薄层色谱用硅胶 G、硅胶 G 预制薄层板(20 cm × 20 cm)(青岛海洋化工厂)。CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司); 酶标仪(德国 BMG Labtech 公司); 超纯净水仪(美国 Millipore 公司); 人肺癌细胞 A549 及小鼠乳腺癌细胞 4T1(北京协和细胞资源中心); 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 培养皿(美国 Corning 公司); 96 孔板(美国 Corning 公司); DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司); DMSO(美国 Sigma-Aldrich 公司); PBS

缓冲液(美国 Corning 公司); 甲基噻唑蓝(MTT)(北京拜尔迪生物科技有限公司); 阿霉素(麦克林生化科技有限公司)。主要显色剂包括: 10% 硫酸乙醇溶液, 5% 香草醛浓硫酸溶液等。甲醇、乙腈(色谱级, Fisher 公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

玄参药材(产地: 湖北恩施), 批号: 20180314, 经北京中医药大学中药资源与鉴定系赵婷老师鉴定为玄参科玄参属植物玄参(*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.) 的干燥根, 药材存放于北京中医药大学中药学院 B419 实验室。

1 提取分离

干燥的玄参根(40 kg)经粉碎,加10倍量70%乙醇回流提取3次,每次2 h,趁热过滤,合并提取液,减压浓缩后,得总浸膏12.7 kg。将总浸膏加水分散,依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和的正丁醇分别萃取3次,合并萃取液后减压浓缩,得到乙酸乙酯部位310 g。乙酸乙酯部位经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 0:100)为洗脱剂进行梯度洗脱,以薄层色谱进行检识,合并得到27个不同极性的流分(Fractions 1~27)。Fraction 25(34.0 g)经乙酸乙酯-甲醇系统(100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 90:10, 0:100)梯度洗脱,得到8个流分(Fr. A~H)。Fr. E(1.60 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇为洗脱剂)分离,得到5个流分(Fr. E1~E5)。Fr. E3(723.6 mg)经 ODS 柱色谱,以甲醇-水(25:75, 40:60, 80:20, 100:0)梯度洗脱,得到4个流分(Fr. E3.1~E3.4)。Fr. E3.1(225.2 mg)经半制备高效液相色谱(甲醇:水=5:95)得到化合物**3**(5.4 mg, $t_R = 12.5$ min)、化合物**6**(6.5 mg, $t_R = 18.4$ min)和化合物**4**(3.1 mg, $t_R = 32.5$ min)。Fr. E3.3(72.8 mg)经半制备高效液相色谱(甲醇-水=43:57)得到化合物**13**(3.3 mg, $t_R = 8.2$ min)。Fraction 27(30.0 g)经乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱(100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1)得到9个组分(Fr. 1~9)。

Fr. 2 (6.23 g) 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-乙酸乙酯 (9:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1) 梯度洗脱得到4个组分 (Fr. 2.1~2.4)。Fr. 2.1 (1.21 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 = 1:1), 再经 ODS 柱色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱 (20:80, 40:60, 60:40), 得到化合物 **7** (4.5 mg)、化合物 **10** (3.8 mg) 和化合物 **8** (3.5 mg)。Fr. 2.2 (1.50 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 = 1:1) 除去色素后, 经半制备高效液相色谱 (乙腈-水 = 45:55) 得到化合物 **1** (6.5 mg, $t_R = 23.5$ min)、化合物 **2** (4.5 mg, $t_R = 42.2$ min)。Fr. 2.3 (1.15 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 = 1:1) 除去色素, 经 ODS 柱色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱 (10:90, 30:70, 50:50, 70:30), 得到化合物 **9** (3.8 mg) 和化合物 **5** (4.6 mg)。Fr. 2.4 (1.02 g) 经 ODS 柱色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱 (10:90, 30:70, 50:50, 70:30, 90:10, 100:0), 得到5个流分 (Fr. 2.4.1~2.4.5)。Fr. 2.4.4 (0.12 g) 经半制备高效液相色谱 (乙腈-水 = 15:85) 得到化合物 **12** (4.5 mg, $t_R = 10.8$ min) 和化合物 **11** (6.0 mg, $t_R = 23.1$ min)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 白色无定形粉末 (甲醇); $[\alpha]_D^{25} = -95.2$ (c 0.21, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} : (log ϵ) 203.0 (2.71)、235.0 (2.43)、311.0 (2.53) nm; IR (KBr) ν_{max} : 3 431、1 655、1 574、1 546 cm^{-1} ; HR-ESI-MS m/z 233.164 6 $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{21}N_2O^+$, 计算值 233.164 8); 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) 和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。

化合物 **2** 白色无定型粉末 (甲醇); $[\alpha]_D^{25} = -220.1$ (c 0.71, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} : (log ϵ) 203.0 (2.92)、234.0 (2.69)、310.0 (2.76) nm; IR (KBr) ν_{max} : 3 430、1 655、1 573、1 547 cm^{-1} ; HR-ESI-MS m/z 233.164 6 $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{21}N_2O^+$, 计算值 233.164 8); 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) 和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。

化合物 **3** 白色无定形粉末 (甲醇), 5% 香草醛-浓硫酸反应显棕黑色。ESI-MS m/z : 113 $[M+H]^+$, 相对分子质量 112, 分子式 $C_4H_4N_2O_2$ 。 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_H 7.38 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6), 5.60 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ_C 153.6 (C-2), 167.4 (C-4), 101.7 (C-5), 143.7 (C-6)。以上数据与文献^[8]对比, 确定化合物 **3** 为尿嘧啶 (uracil)。

化合物 **4** 白色无定形粉末 (甲醇), $[\alpha]_D^{25} = -2.38$ (c 0.042, MeOH); 5% 香草醛-浓硫酸反应显棕色。ESI-MS m/z : 102 $[M+H]^+$, 相对分子质量 101, 分子式 $C_4H_7NO_2$ 。 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_H 5.25 (1H, dd, $J = 6.3, 1.7$ Hz, H-5), 2.49 (1H, overlapped, H-3a)/2.19 (1H, ddd, $J = 16.8, 9.8, 3.6$ Hz, H-3b), 2.37 (1H, overlapped, H-4a)/1.90 (1H, m, H-4b)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ_C

180.8 (C-2), 29.5 (C-3), 31.3 (C-4), 80.9 (C-5)。以上数据与文献^[9,10]对比, 确定化合物 **4** 为 (*S*)-5-羟基吡咯烷-2-酮 ((*S*)-5-hydroxypyrrolidin-2-one)。

化合物 **5** 白色无定形粉末 (甲醇), $[\alpha]_D^{25} = +1.12$ (c 0.27, MeOH); 5% 香草醛-浓硫酸反应显棕黑色。ESI-MS m/z : 116 $[M+H]^+$, 相对分子质量 115, 分子式 $C_5H_9NO_2$ 。 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_H 4.88 (1H, dd, $J = 6.0, 0.8$ Hz, H-5), 3.30 (3H, s, 5-OCH₃), 2.43 (1H, H-3a)/2.18 (1H, H-3b), 2.29 (1H, s, H-4a)/2.00 (1H, s, H-4b)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ_C 181.6 (C-2), 29.3 (C-3), 28.8 (C-4), 88.8 (C-5), 54.8 (5-OCH₃)。以上数据与文献^[11,12]对比, 确定化合物 **5** 为 pterolactam。

化合物 **6** 白色无定形粉末 (甲醇), 5% 香草醛-浓硫酸反应显灰色。ESI-MS m/z : 144 $[M+H]^+$, 相对分子质量 143, 分子式 $C_6H_9NO_3$ 。 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_H 4.29 (1H, dd, $J = 9.0, 4.5$ Hz, H-5), 3.75 (3H, s, 6-OCH₃), 2.47 (1H, overlapped, H-4a)/2.15 (1H, overlapped, H-4b), 2.24~2.39 (2H, overlapped, H-3)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ_C 178.9 (C-2), 174.5 (C-6), 57.0 (C-5), 52.9 (6-OCH₃), 30.3 (C-3), 25.8 (C-4)。以上数据与文献^[13]对比, 确定化合物 **6** 为 methyl-*L*-pyroglutamate。

化合物 **7** 黄色无定形粉末 (甲醇)。254 nm 下有暗斑, 5% 香草醛-浓硫酸显浅黄色。ESI-MS m/z : 301 $[M+H]^+$, 相对分子质量 300, 分子式 $C_{16}H_{12}O_6$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ_H 12.44 (1H, s, 5-OH), 10.82 (1H, br s, 7-OH), 9.52 (1H, br s, 3-OH), 8.13 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 7.11 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.46 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.84 (3H, s, 4'-OCH₃)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ_C 146.2 (C-2), 136.1 (C-3), 176.0 (C-4), 160.7 (C-5), 98.2 (C-6), 164.0 (C-7), 93.5 (C-8), 156.2 (C-9), 103.1 (C-10), 123.3 (C-1'), 129.3 (C-2'), 129.3 (C-6'), 160.5 (C-4'), 114.0 (C-3'), 114.0 (C-5'), 55.4 (4'-OCH₃)。以上数据与文献^[14]对比, 确定化合物 **7** 为山柰素 (kaempferide)。

化合物 **8** 黄色无定形粉末 (甲醇), 254 nm 下有暗斑, 5% 香草醛-浓硫酸显浅黄色。ESI-MS m/z : 287 $[M+H]^+$, 相对分子质量 286, 分子式 $C_{15}H_{10}O_6$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ_H 12.98 (1H, s, 5-OH), 7.41 (1H, dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz, H-6'), 7.40 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.89 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ_C 163.9 (C-2), 102.9 (C-3), 181.7 (C-4), 161.5 (C-5), 98.9 (C-6), 164.2 (C-7), 93.9 (C-8), 157.3 (C-9), 103.7 (C-10), 121.5 (C-1'), 113.4 (C-2'), 145.8 (C-3'), 149.7 (C-4'), 116.0 (C-5'), 119.0 (C-

6')。以上数据与文献^[15]对比, 确定化合物**8**为木犀草素(luteolin)。

化合物**9** 黄色无定形粉末(甲醇), 5%香草醛-浓硫酸显浅黄色。ESI-MS m/z : 343 $[M+H]^+$, 相对分子质量342, 分子式 $C_{19}H_{18}O_6$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ_H 8.00 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 7.18 (1H, s, H-8), 7.08 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'), 6.69 (1H, s, H-3), 3.94 (3H, s, 5-OCH₃), 3.84 (3H, s, 6-OCH₃), 3.80 (3H, s, 7-OCH₃), 3.76 (3H, s, 4'-OCH₃)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ_C 161.9 (C-2), 106.1 (C-3), 175.6 (C-4), 153.9 (C-5), 139.7 (C-6), 157.4 (C-7), 97.3 (C-8), 151.6 (C-9), 112.0 (C-10), 123.0 (C-1'), 127.8 (C-2'), 127.8 (C-6'), 114.4 (C-3'), 114.4 (C-5'), 160.2 (C-4'), 61.8 (5-OCH₃), 61.0 (6-OCH₃), 56.4 (7-OCH₃), 55.5 (4'-OCH₃)。以上数据与文献^[16]对比, 确定化合物**9**为5,6,7,4'-四甲氧基黄酮(5,6,7,4'-tetramethoxyflavone)。

化合物**10** 浅黄色无定形粉末(甲醇), 254 nm下有暗斑, 5%香草醛-浓硫酸显浅黄色。ESI-MS m/z : 345 $[M+H]^+$, 相对分子质量344, 分子式为 $C_{19}H_{20}O_6$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ_H 12.40 (1H, s, 2'-OH), 7.69 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2,6), 7.61 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H- β), 7.48 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H- α), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3,5), 6.38 (1H, s, H-3'), 3.84 (3H, s, 5'-OCH₃), 3.84 (3H, s, 6'-OCH₃), 3.81 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.70 (3H, s, 4-OCH₃)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ_C 127.2 (C-1), 130.4 (C-2), 130.4 (C-6), 114.6 (C-3), 114.6 (C-5), 158.2 (C-4), 110.1 (C-1'), 158.3 (C-2'-OH), 96.5 (C-3'), 161.4 (C-4'), 134.7 (C-5'), 153.3 (C-6'), 124.5 (C- α), 143.4 (C- β), 55.4 (4-OCH₃), 56.0 (4'-OCH₃), 60.6 (5'-OCH₃), 61.5 (6'-OCH₃)。以上数据与文献^[17]对比, 确定化合物**10**为6'-羟基-2',3',4,4'-四甲氧基查尔酮(6'-hydroxy-2',3',4,4'-tetramethoxychalcone)。

化合物**11** 白色无定形粉末(甲醇), 5%香草醛-浓硫酸反应显浅红色, Molish反应呈阳性。ESI-MS m/z : 377 $[M+Na]^+$, 相对分子质量354, 分子式 $C_{16}H_{18}O_9$ 。 1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_H 7.90 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.20 (1H, s, H-5), 7.17 (1H, s, H-8), 6.30 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 5.06 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 3.90 (3H, s, 7-OCH₃), 3.90 (1H, br d, $J = 12.0$ Hz, H-6'a), 3.70 (1H, dd, $J = 12.0, 5.6$ Hz, H-6'b), 3.37~3.57 (4H, H-2',3',4',5')。 ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_C 163.6 (C-2), 114.5 (C-3), 145.7 (C-4), 110.8 (C-5), 148.3 (C-6), 151.7 (C-7), 102.1 (C-8), 150.7 (C-9), 114.6 (C-10), 105.3 (C-1'), 74.7 (C-2'), 78.4 (C-3'), 71.2 (C-4'), 77.8 (C-5'), 62.4 (C-6'), 57.1 (7-OCH₃)。以上数据与文献^[18]对比, 确定化合

物**11**为东莨菪苷(scopolin)。

化合物**12** 白色无定形粉末(甲醇), 5%香草醛-浓硫酸反应显浅红色, Molish反应呈阳性。ESI-MS m/z : 509 $[M+Na]^+$, 相对分子质量486, 分子式 $C_{21}H_{26}O_{13}$ 。 1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_H 7.90 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.22 (1H, s, H-5), 7.20 (1H, s, H-8), 6.31 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 4.99 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.95 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-1''), 4.06 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4''a), 4.05 (1H, dd, $J = 11.0, 1.8$ Hz, H-6'a), 3.98 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-2''), 3.91 (3H, s, 7-OCH₃), 3.77 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4''b), 3.70 (1H, H-5'), 3.64 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-5''a), 3.61 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-5''b), 3.60 (1H, dd, $J = 11.0, 7.3$ Hz, H-6'b), 3.46~3.55 (2H, H-3',4'), 3.34 (1H, dd, $J = 9.8, 7.5$ Hz, H-2')。 ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_C 163.9 (C-2), 114.5 (C-3), 145.8 (C-4), 110.8 (C-5), 148.2 (C-6), 151.7 (C-7), 102.2 (C-8), 150.7 (C-9), 114.6 (C-10), 105.5 (C-1'), 74.7 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.2 (C-5'), 69.1 (C-6'), 111.2 (C-1''), 77.9 (C-2''), 80.5 (C-3''), 75.0 (C-4''), 65.6 (C-5''), 57.1 (OCH₃)。以上数据与文献^[19]对比, 确定化合物**12**为hymexelsin。

化合物**13** 白色无定形粉末(甲醇), 10%硫酸-乙醇显红色, 5%香草醛-浓硫酸反应显红色。ESI-MS m/z : 161 $[M-H]^+$, 相对分子质量162, 分子式 $C_9H_6O_3$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ_H 10.34 (1H, s, 8-OH), 8.00 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.12 (3H, m, H-5,6,7), 6.45 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ_C 160.0 (C-2), 118.1 (C-3), 142.2 (C-4), 116.0 (C-5), 144.7 (C-6), 144.7 (C-7), 124.4 (C-8), 144.9 (C-9), 118.4 (C-10)。以上数据与文献^[20]对比, 确定化合物**13**为8-羟基香豆素(8-hydroxycoumarin)。

3 细胞毒活性测试

通过MTT法测试化合物**1**~**13**的细胞毒活性, 测试细胞株为小鼠乳腺癌细胞4T1和人非小细胞肺癌细胞系A549。实验过程将培养的4T1、A549肿瘤细胞铺96孔板, 培养24 h。给药(浓度为50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 6复孔, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿霉素为阳性对照), 孵育48 h后, 基于MTT法用酶标仪在570 nm波长下检测吸光值, 根据如下公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = [1 - (\text{实验组吸光度值} - \text{调零孔吸光度值}) / (\text{对照组吸光度值} - \text{调零孔吸光度值})] \times 100\%$$

致谢: 深圳大学药学院刘颖博士在ECD计算方面给予指导和帮助。

作者贡献: 刘鹏主要负责对中药玄参进行提取、分离和

结构鉴定; 祝琳琳协助对化学成分进行活性筛选和文章整理; 靖淑瑾对化学成分进行活性筛选; 李想协助进行提取和萃取工作; 苏成园协助完成化合物分离和结构鉴定工作; 张薇为通讯作者, 全程指导实验设计、结构解析和论文撰写和修改; 刘斌为通讯作者, 负责实验的整体设计把关和文章审阅。

利益冲突: 本文的研究无任何利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典, 一部) [S]. Vol I. Beijing: China Medical Science Press, 2020,1: 121-122.
- [2] Huo YF, Zhan ZL, Wang HL, et al. Chemical constituents from the roots of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. and their anti-inflammatory activities [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2020, 55: 1207-1214.
- [3] Pasdaran A, Hamed A. The genus *Scrophularia*: a source of iridoids and terpenoids with a diverse biological activity [J]. Pharm Biol, 2017, 55: 2211-2233.
- [4] Liu P, Zhou MN, Zhu LL, et al. New iridoid and phenylethanoid glycosides from the roots of *Scrophularia ningpoensis* [J]. Tetrahedron, 2021, 94: 132325.
- [5] Sagen AL, Gertsch J, Becker R, et al. Quinolizidine alkaloids from the curare adjuvant *Clathrotopis glaucophylla* [J]. Phytochemistry, 2002, 61: 975-978.
- [6] Neese F. The ORCA program system [J]. WIREs, 2012, 2: 73-78.
- [7] Neese F. Software update: the ORCA program system, version 4.0 [J]. WIREs, 2018, 8: e1327.
- [8] Hu YM, Wang H, Ye WC, et al. Aqueous constituents from *Stellaria Media* (L.) Cyr. [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2005, 36: 523-525.
- [9] Dai YH, Cui Z, Li JL, et al. A new thiaziedione from the fruits of *Xanthium sibiricum* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10: 303-305.
- [10] Kim KH, Lee IK, Park KM, et al. Isolation of γ -lactam alkaloids from the *Macrolepiota neomastoidea* [J]. Bull Korean Chem Soc, 2008, 29: 1591-1593.
- [11] Feng WS, Li M, Zheng XK, et al. Study on chemical constituents of immunosuppressive parts from the roots of *Rehmannia glutinosa* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2014, 49: 1496-1502.
- [12] Chen Y, Li SW, Yin FZ, et al. Lagerindicine, a new pyrrole alkaloid isolated from the flowers of *Lagerstroemia indica* Linnaeus [J]. Nat Prod Bioprospect, 2020, 11: 73-79.
- [13] Aggarwal VK, Astle CJ, Iding H, et al. Separation of pyrrolidine allylation products by diastereoselective enzymatic ester hydrolysis [J]. Tetrahedron Lett, 2005, 46: 945-947.
- [14] Maruyama H, Sumitou Y, Sakamoto T, et al. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from Brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32: 1244-1250.
- [15] Xu XH, Qian SH, Bian MG, et al. Chemical constituents from the leaves of *Broussonetia papyrifera* . [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2007, 5: 190-192.
- [16] Inuma M, Matsuura S, Kusuda K. ^{13}C -Nuclear magnetic resonance (NMR) spectral studies on polysubstituted flavonoids. I. ^{13}C -NMR spectra of flavones [J]. Chem Pharm Bull, 1980, 28: 708-716.
- [17] Yang JN, Yang JY, Cao J, et al. Flavonoids and other compounds from two species of the genus *Eupatorium* . [J]. Chem Nat Compd, 2020, 56: 539-541.
- [18] Chen FY, Chu Y, Chen J, et al. Studies on chemical constituents of *Chloranthus fortunei* [J]. Chin Tradit Herb Med (中草药), 2020, 51: 1485-1490.
- [19] Sibanda S, Ndengu B, Multari G, et al. A coumarin glucoside from *Xeromphis obovata* . [J]. Phytochemistry, 1989, 28: 1550-1552.
- [20] Sadavongvivad C, Supavilai P. Three monohydroxycoumarins from *Alyxia lucida* . [J]. Phytochemistry, 1977, 16: 1451.