



## 紫草乌中生物碱成分及其对H9c2细胞毒性研究

何健民, 严园锋, 尹田鹏

引用本文:

何健民, 严园锋, 尹田鹏. 紫草乌中生物碱成分及其对H9c2细胞毒性研究[J]. *热带亚热带植物学报*, 2023, 31(3): 395–400.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4616>

---

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 毛山小橘枝叶中生物碱类成分的研究

Studies on the Alkaloids from Twigs and Leaves of *Glycosmis craibii*

*热带亚热带植物学报*. 2022, 30(3): 441–445 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4465>

#### 木槿的化学成分研究

Chemical Constituents from the Stems of *Hibiscus syriacus*

*热带亚热带植物学报*. 2021, 29(3): 331–338 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4288>

#### 三叶木通藤茎的三萜成分及其抗菌活性研究

Triterpenes from Stems of *Akebia trifoliata* and Their Antibacterial Activities

*热带亚热带植物学报*. 2022, 30(1): 144–150 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4489>

#### 越南槐根的抗HIV活性成分研究

Chemical Constituents with Anti-HIV Activities from the Roots of *Sophora tonkinensis*

*热带亚热带植物学报*. 2023, 31(3): 417–423 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4599>

#### 大叶桃花心木树皮化学成分研究

Chemical Constituents from Barks of *Swietenia macrophylla*

*热带亚热带植物学报*. 2023, 31(1): 141–146 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4539>

向下翻页, 浏览PDF全文

# 紫草乌中生物碱成分及其对 H9c2 细胞毒性研究

何健民<sup>1</sup>, 严园锋<sup>2</sup>, 尹田鹏<sup>2\*</sup>

(1. 保山学院资源环境学院, 云南 保山 678000; 2. 遵义医科大学生物工程学院, 广东 珠海 519041)

**摘要:** 为了解我国特有药用乌头种紫草乌(*Aconitum episcopale*)的生物碱类化学成分及其对大鼠心脏细胞 H9c2 的细胞毒性, 从紫草乌中分离出 10 个 C<sub>19</sub>-二萜生物碱, 根据理化性质和波谱数据, 其结构分别鉴定为滇乌碱 (1)、粗茎乌头碱甲 (2)、黄草乌碱丙 (3)、黄草乌碱甲 (4)、丽乌亭 (5)、猎鹰乌头碱 (6)、14-O-乙酰萨卡可尼亭 (7)、萨卡可尼亭 (8)、查斯曼宁 (9) 和展毛黄草乌碱 A (10)。化合物 5、6 和 10 为首次从该植物中分离得到。化合物 1~4、6~7 和 9~10 对大鼠心脏细胞 H9c2 增殖的半数抑制浓度为 163.8~341.6 μg/mL, 表明紫草乌中的生物碱对 H9c2 细胞具有毒性作用。

**关键词:** 紫草乌; 乌头属; 二萜生物碱; 核磁共振波谱; 毒性; 化学成分

doi: 10.11926/jtsb.4616

## Alkaloidal Constituents of *Aconitum episcopale* and Their Toxicity on H9c2 Cells

HE Jianmin<sup>1</sup>, YAN Yuanfeng<sup>2</sup>, YIN Tianpeng<sup>2\*</sup>

(1. School of Resource and Environment, Baoshan University, Baoshan 678000, Yunnan, China; 2. School of Bioengineering, Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, Guangdong, China)

**Abstract:** To understand the alkaloidal constituents of *Aconitum episcopale*, an *Aconitum* species endemic to China, and their toxicity against rat cardiomyocyte H9c2 cells, ten diterpenoid alkaloids were extracted from its roots. Based on physical and chemical properties and spectral data, their structures were identified as yunaconitine (1), crassicauline A (2), vilmorrianine C (3), vilmorrianine A (4), forestine (5), falconeridine (6), 14-O-acetylsachaconitine (7), sachaconitine (8), chasmanine (9) and vilmotenitine A (10), were isolated and identified from *A. episcopale* roots. Compounds 5, 6 and 10 were isolated from this species for the first time. The median inhibition concentrations of compounds 1-4, 6-7 and 9-10 on H9c2 cells ranged from 163.8 to 341.6 μg/mL, showing the alkaloids in *A. episcopale* had toxic effects on H9c2 cells.

**Key words:** *Aconitum episcopale*; *Aconitum*; Diterpenoid alkaloid; NMR; Toxicity; Chemical constituent

毛茛科(Ranunculaceae)乌头属(*Aconitum*)植物是重要的中药药源植物。目前《中华人民共和国药典》<sup>[1]</sup>正式收录 2 种乌头属植物: 乌头(*A. carmichaelii*)和北乌头(*A. kusnezoffii*)。此外, 我国民间至少还有 76 种乌头属植物药用, 如短柄乌头(*A. brachy-*

*podum*)、黄花乌头(*A. coreanum*)、铁棒锤(*A. pendulum*)、瓜叶乌头(*A. hemisleyanum*)等<sup>[2]</sup>。紫草乌(*A. episcopale*), 异名西南乌头、深裂黄草乌、藤乌, 是我国特有的药用乌头种, 分布于云南西北部和四川西南部, 生长在海拔 2 400~3 200 m 山地<sup>[3]</sup>。紫草乌

收稿日期: 2022-01-21 接受日期: 2022-02-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860095); 云南省地方本科高校基础研究联合专项项目(2018FH001-126); 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2018]1193); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2022-020)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31860095), the Joint Special Project for Basic Research of Local Universities in Yunnan (Grant No. 2018FH001-126), the Project for Science and Technology in Guizhou (Grant No. [2018]1193), and the Project for Science and Technology Research of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine in Guizhou (Grant No. QZYY-2022-020).

作者简介: 何健民(1983 年生), 男, 副教授, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: 420787946@qq.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ytp@zmu.edu.cn

块根具有罕见的解救其他草乌中毒作用, 其以“堵喇”之名在西南地区已有近千年药用历史, 纳西族医药古籍《东巴经》、彝族医药古籍《造药治病书》和清代《植物名实图考》中均有记载, 有报道该植物提取物具有一定的抗心律失常作用<sup>[4]</sup>。

二萜生物碱是乌头属植物的特征性有效成分, 紫草乌含大量的二萜生物碱类成分<sup>[5]</sup>。为更好地开发利用我国这一特色药用乌头资源, 本课题组对云南丽江的紫草乌开展生物碱成分研究, 从其根中分离出 10 个二萜生物碱, 此外, 鉴于乌头类药材的毒性主要表现为心脏毒性, 采用 CCK-8 试剂盒(Cell Counting Kit-8)法测试部分化合物对小鼠心脏细胞 H9c2 的毒性, 为紫草乌的开发与利用提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和材料

DRX-500 和 DRX-600 型 NMR 仪(德国 Bruker 公司); G3250AA TOF 型 MS 仪(美国 Agilent 公司); UPHW-II-90T 型超纯水机(四川优普超纯科技有限公司); Spectramax M5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司), CB150 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Binder 公司)。

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)和青霉素-链霉素(PS)(美国 Invitrogen 公司); 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 96 孔板、CCK-8 试剂盒(上海碧云天公司); 柱色谱硅胶(300~400 目)和 GF<sub>254</sub> 型薄层色谱硅胶板(青岛海洋化工厂); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (美国 GE 公司); 三氯甲烷、甲醇、石油醚、二乙胺、氨水(分析纯, 天津化学试剂有限公司); 氘代三氯甲烷(CDCl<sub>3</sub>) (宁波旋光医药科技有限公司); 改良碘化铊钾试剂(碱式硝酸铊 0.85 g, 加冰醋酸 10 mL、水 40 mL 溶解, 再加 40%碘化钾溶液 20 mL 摇匀, 得前液; 取前液 1 mL, 加 0.6 mol/L 盐酸 2 mL, 加水至 10 mL 即得)。

紫草乌原药材于 2018 年 11 月采于云南省丽江市, 经保山学院汪建云教授鉴定为毛茛科乌头属植物紫草乌(*Aconitum episcopale*)的根, 标本(2018-ae-1)保存于保山学院。大鼠心肌细胞 H9c2 购自美国标准生物制品收藏中心(ATCC)。

### 1.2 提取和分离

紫草乌块根 10.0 kg 阴干、粉碎后, 用 0.1 mol/L 盐酸 40 L 进行渗漉, 至渗漉液无生物碱反应。渗漉

液以 25%氨水调至 pH 9, 加入乙酸乙酯萃取 3 次, 每次约 20 L。合并乙酸乙酯层, 减压浓缩得深褐色总生物碱浸膏 47.5 g。总生物碱浸膏以硅胶(300~400 目, 下同)拌样, 进行硅胶柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇(50:1→1:1)梯度洗脱。采用薄层色谱法通过改良碘化铊钾试剂显色监测洗脱过程, 合并相同组分, 结果共获得 8 个洗脱组分(Fr.A~Fr.H)。

取 Fr.B 组分(1.5 g), 经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮-二乙胺, 100:20:1)和凝胶柱色谱(甲醇), 得化合物 **2** (45 mg)和 **3** (15 mg)。取 Fr.C 组分(0.5 g), 经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮-二乙胺, 100:20:1)和凝胶柱色谱(甲醇), 得化合物 **1** (24 mg)。取 Fr.D 组分(2.5 g), 依次经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮-二乙胺, 100:20:1)、凝胶柱色谱(甲醇)和硅胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇, 10:1), 得化合物 **4** (35 mg)、**5** (3 mg)和 **6** (18 mg)。取 Fr.E 组分(3.8 g), 经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮-二乙胺, 100:20:1), 得化合物 **7** (230 mg)和 **8** (4 mg)。取 Fr.F 组分(1.8 g), 经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮-二乙胺, 100:20:1)和凝胶柱色谱(甲醇), 得化合物 **10** (13 mg)。取 Fr.G 组分(1.3 g), 经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮-二乙胺, 100:20:1), 得化合物 **9** (186 mg)。

### 1.3 体外心脏细胞毒性测定方法

参照张丽娟等<sup>[6]</sup>的方法, 大鼠心肌细胞 H9c2 培养于含 10%胎牛血清、1%双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM 培养液中, 待细胞生长到 80%左右, 用 0.25%胰蛋白酶消化传代, 置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中培养后换液, 根据细胞状态及密度定期进行换液或传代。将对数生长期 H9c2 细胞计数接种于 96 孔板中(100 μL/孔, 即 5×10<sup>3</sup> cells/孔), 每孔加入完全培养基 0.1 mL, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜, 弃上清液, 考察细胞抑制率, 每组平行 6 次, 药物作用 24 h 后, 每孔加入 10% CCK-8 溶液 20 μL, 在 37 °C 培养 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 A<sub>450</sub>, 计算细胞抑制率(I)。空白组细胞抑制率为 0, I=(1-实验组 A<sub>450</sub>/对照组 A<sub>450</sub>)×100%。采用统计学软件 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA)中的 Tukey 对细胞抑制率进行单因子方差分析(One-Way ANOVA), 实验重复 3 次。

### 1.4 结构鉴定

**化合物 1** 白色针晶; 分子式 C<sub>35</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>11</sub>, ESI-MS *m/z*: 660.34 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 7.99 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2'/H-6'), 6.91 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3'/H-5'), 4.86 (1H, d, *J* = 5.2 Hz,

H-14), 4.01 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-6), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4'), 3.53, 3.29, 3.25, 3.15 (各 3H, s, OCH<sub>3</sub>×4), 3.76 (1H, dd,  $J = 9.6$  Hz, 7.6 Hz, H-3), 3.62, 3.48 (各 1H, ABq,  $J = 9.0$  Hz, H-18), 3.38 (1H, dd,  $J = 8.8, 5.8$  Hz, H-16), 3.11 (1H, dd,  $J = 8.2, 6.0$  Hz, H-1), 3.00 (1H, brs, H-7), 2.86 (1H, brs, H-17), 1.33 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>-8), 1.09 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_c$  82.3 (C-1), 33.7 (C-2), 71.6 (C-3), 43.3 (C-4), 47.5 (C-5), 83.2 (C-6), 48.8 (C-7), 85.6 (C-8), 44.8 (C-9), 40.9 (C-10), 50.3 (C-11), 35.3 (C-12), 74.8 (C-13), 78.6 (C-14), 39.7 (C-15), 83.6 (C-16), 61.8 (C-17), 77.2 (C-18), 48.9 (C-19), 47.5 (C-21), 13.4 (C-22), 55.9 (OCH<sub>3</sub>-1), 57.9 (OCH<sub>3</sub>-6), 58.9 (OCH<sub>3</sub>-16), 59.2 (OCH<sub>3</sub>-18), 21.7 (OCOCH<sub>3</sub>-8), 170.0 (OCOCH<sub>3</sub>-8), 166.1 (OCO-14), 122.6 (C-1'), 131.8 (C-2'/C-6'), 113.9 (C-3'/C-5'), 163.5 (C-4'), 55.5 (OCH<sub>3</sub>-4')。以上数据与文献[7]报道一致, 故鉴定为滇乌碱。

**化合物 2** 白色粉末; 分子式 C<sub>35</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>10</sub>, ESI-MS  $m/z$ : 644.34 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  8.00 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2'/H-6'), 6.91 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3'/H-5'), 4.86 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz, H-14), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4'), 3.51, 3.27, 3.25, 3.14 (各 3H, s, OCH<sub>3</sub>×4), 3.95 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-6), 3.59, 3.17 (各 1H, ABq,  $J = 8.6$  Hz, H-18), 3.37 (1H, dd,  $J = 9.0, 5.6$  Hz, H-16), 3.01 (1H, m, H-1), 2.99 (1H, brs, H-17), 1.32 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>-8), 1.08 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_c$  83.8 (C-1), 26.4 (C-2), 35.0 (C-3), 39.4 (C-4), 49.2 (C-5), 83.1 (C-6), 45.2 (C-7), 85.7 (C-8), 49.6 (C-9), 41.1 (C-10), 50.3 (C-11), 35.9 (C-12), 75.0 (C-13), 78.6 (C-14), 39.4 (C-15), 85.1 (C-16), 62.2 (C-17), 80.5 (C-18), 53.7 (C-19), 49.3 (C-21), 13.6 (C-22), 56.3 (OCH<sub>3</sub>-1), 57.9 (OCH<sub>3</sub>-6), 58.8 (OCH<sub>3</sub>-16), 59.4 (OCH<sub>3</sub>-18), 21.8 (OCOCH<sub>3</sub>-8), 170.0 (OCOCH<sub>3</sub>-8), 166.2 (OCO-14), 122.8 (C-1'), 131.8 (C-2'/C-6'), 113.8 (C-3'/C-5'), 163.5 (C-4'), 55.5 (OCH<sub>3</sub>-4')。以上数据与文献[8]报道一致, 故鉴定为粗茎乌头碱甲。

**化合物 3** 白色粉末; 分子式 C<sub>35</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>9</sub>, ESI-MS  $m/z$ : 628.35 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  8.00 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2'/H-6'), 6.91 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3'/H-5'), 5.02 (1H, t,  $J = 4.8$  Hz, H-14), 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4'), 3.37, 3.27, 3.26, 3.17

(各 3H, s, OCH<sub>3</sub>×4), 4.05 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-6), 3.62, 3.22 (各 1H, ABq,  $J = 8.4$  Hz, H-18), 3.32 (1H, m, H-16), 3.04 (1H, m, H-1), 2.99 (1H, brs, H-17), 1.38 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>-8), 1.07 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_c$  85.2 (C-1), 26.6 (C-2), 35.0 (C-3), 39.3 (C-4), 49.5 (C-5), 83.0 (C-6), 45.1 (C-7), 86.0 (C-8), 49.3 (C-9), 44.1 (C-10), 50.5 (C-11), 29.1 (C-12), 39.3 (C-13), 75.5 (C-14), 38.0 (C-15), 83.6 (C-16), 61.8 (C-17), 80.6 (C-18), 53.9 (C-19), 49.2 (C-21), 13.6 (C-22), 56.2 (OCH<sub>3</sub>-1), 58.0 (OCH<sub>3</sub>-6), 56.7 (OCH<sub>3</sub>-16), 59.3 (OCH<sub>3</sub>-18), 21.9 (OCOCH<sub>3</sub>-8), 169.9 (OCOCH<sub>3</sub>-8), 166.7 (OCO-14), 123.1 (C-1'), 131.9 (C-2'/C-6'), 113.9 (C-3'/C-5'), 163.4 (C-4'), 55.6 (OCH<sub>3</sub>-4')。以上数据与文献[9]报道一致, 故鉴定为黄草乌碱丙。

**化合物 4** 淡黄色粉末; 分子式 C<sub>35</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>10</sub>, ESI-MS  $m/z$ : 644.34 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7.98 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2'/H-6'), 6.89 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3'/H-5'), 5.01 (1H, t,  $J = 5.0$  Hz, H-14), 4.09 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-6), 3.61, 3.46 (各 1H, ABq,  $J = 9.0$  Hz, H-18), 3.34, 3.30, 3.27, 3.23 (各 3H, s, OCH<sub>3</sub>×4), 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-3'), 1.38 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>-8), 1.07 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_c$  83.9 (C-1), 33.7 (C-2), 72.1 (C-3), 43.5 (C-4), 47.2 (C-5), 82.7 (C-6), 45.2 (C-7), 86.2 (C-8), 49.1 (C-9), 43.5 (C-10), 50.8 (C-11), 28.8 (C-12), 39.6 (C-13), 75.7 (C-14), 38.5 (C-15), 83.1 (C-16), 61.8 (C-17), 77.5 (C-18), 49.1 (C-19), 48.0 (C-21), 13.6 (C-22), 170.2 (OCOCH<sub>3</sub>-8), 22.1 (OCOCH<sub>3</sub>-8), 55.8 (OCH<sub>3</sub>-1), 57.0 (OCH<sub>3</sub>-6), 56.0 (OCH<sub>3</sub>-16), 59.5 (OCH<sub>3</sub>-18), 166.4 (OCO-14), 123.2 (C-1'), 132.1 (C-2'/C-6'), 114.1 (C-3'/C-5'), 163.8 (C-4'), 55.8 (OCH<sub>3</sub>-3')。以上数据与文献[5]报道一致, 故鉴定为黄草乌碱甲。

**化合物 5** 白色粉末; 分子式 C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>9</sub>, ESI-MS  $m/z$ : 602.33 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7.95 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2'/H-6'), 6.91 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3'/H-5'), 5.12 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-14), 4.01 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-6), 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4'), 3.35, 3.27, 3.25, 3.23 (各 3H, s, OCH<sub>3</sub>×4), 3.62, 2.60 (1H, ABq,  $J = 9.0$  Hz, H-18), 3.30 (1H, m, H-16), 3.11 (1H, dd,  $J = 10.3, 6.3$  Hz, H-1), 3.05 (1H, brs, H-7), 1.07 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C

NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  85.6 (C-1), 26.3 (C-2), 35.2 (C-3), 39.5 (C-4), 49.9 (C-5), 82.7 (C-6), 48.6 (C-7), 73.9 (C-8), 53.7 (C-9), 42.5 (C-10), 50.4 (C-11), 36.7 (C-12), 76.4 (C-13), 80.3 (C-14), 42.0 (C-15), 83.5 (C-16), 62.4 (C-17), 80.8 (C-18), 53.9 (C-19), 49.4 (C-21), 13.8 (C-22), 56.5 ( $\text{OCH}_3$ -1), 58.4 ( $\text{OCH}_3$ -6), 57.7 ( $\text{OCH}_3$ -16), 59.4 ( $\text{OCH}_3$ -18), 166.8 (OCO-14), 122.6 (C-1'), 132.0 (C-2'/C-6'), 114.0 (C-3'/C-5'), 163.7 (C-4'), 55.6 ( $\text{OCH}_3$ -4')。以上数据与文献[10]报道一致, 故鉴定为丽鸟亭。

**化合物 6** 白色粉末; 分子式  $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_9$ , ESI-MS  $m/z$ : 602.33  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  7.62 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.0$  Hz, H-6'), 7.56 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 6.87 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 5.14 (1H, t,  $J = 5.0$  Hz, H-14), 4.11 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-6), 3.91, 3.90 (各 3H, s,  $\text{OCH}_3$ -3',  $\text{OCH}_3$ -4'), 3.29, 3.28, 3.25, 3.19 (各 3H, s,  $\text{OCH}_3$ ×4), 3.68, 2.59 (各 1H, ABq,  $J = 8.6$  Hz, H-18), 3.04 (1H, dd,  $J = 10.2, 6.4$  Hz, H-1), 2.94 (1H, brs, H-7), 1.07 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  85.6 (C-1), 26.4 (C-2), 35.0 (C-3), 39.3 (C-4), 47.0 (C-5), 82.0 (C-6), 53.9 (C-7), 74.0 (C-8), 49.7 (C-9), 45.3 (C-10), 50.4 (C-11), 29.3 (C-12), 37.2 (C-13), 76.9 (C-14), 41.6 (C-15), 82.9 (C-16), 62.0 (C-17), 80.8 (C-18), 54.1 (C-19), 49.2 (C-21), 13.7 (C-22), 56.2 ( $\text{OCH}_3$ -1), 57.8 ( $\text{OCH}_3$ -6), 56.3 ( $\text{OCH}_3$ -16), 59.3 ( $\text{OCH}_3$ -18), 166.2 (OCO-14), 123.0 (C-1'), 110.5 (C-2'), 148.8 (C-3'), 153.0 (C-4'), 112.2 (C-5'), 123.6 (C-6'), 56.0 ( $\text{OCH}_3$ -3'), 56.1 ( $\text{OCH}_3$ -4')。以上数据与文献[11]报道一致, 故鉴定为猎鹰乌头碱。

**化合物 7** 无色针晶; 分子式  $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{NO}_5$ , ESI-MS  $m/z$ : 434.29  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  4.81 (1H, t,  $J = 5.0$  Hz, H-14), 2.04 (3H, s,  $\text{OCOCH}_3$ -14), 3.26, 3.21 (各 3H, s,  $\text{OCH}_3$ ×2), 3.10 (1H, dd,  $J = 10.8, 6.6$  Hz, H-1), 3.18 (1H, dd,  $J = 9.4, 4.2$  Hz, H-1), 2.95 (1H, brs, H-7), 0.76 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 1.04 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  86.2 (C-1), 26.5 (C-2), 38.0 (C-3), 34.6 (C-4), 50.9 (C-5), 25.5 (C-6), 46.3 (C-7), 74.0 (C-8), 45.5 (C-9), 45.0 (C-10), 49.1 (C-11), 28.7 (C-12), 35.7 (C-13), 77.2 (C-14), 41.2 (C-15), 81.9 (C-16), 62.0 (C-17), 26.5 (C-18), 56.3 (C-19), 49.5 (C-21), 13.7 (C-22), 56.3 ( $\text{OCH}_3$ -1), 56.4 ( $\text{OCH}_3$ -16),

170.9 ( $\text{OCOCH}_3$ -14), 21.5 ( $\text{OCOCH}_3$ -14)。以上数据与文献[5]报道一致, 故鉴定为 14-*O*-乙酰萨卡可尼亭。

**化合物 8** 白色粉末; 分子式  $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_4$ , ESI-MS  $m/z$ : 392.28  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  4.81 (1H, d,  $J = 4.3$  Hz, OH-14), 4.12 (1H, dd,  $J = 9.5, 4.8$  Hz, H-14), 3.41 (1H, m, H-16), 3.08 (1H, dd,  $J = 10.9, 6.5$  Hz, H-1), 3.36, 3.25 (各 3H, s,  $\text{OCH}_3$ ×2), 3.12 (1H, brs, H-7), 3.08, 2.98 (各 1H, ABq,  $J = 9.0$  Hz, H-18), 1.04 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  86.8 (C-1), 26.5 (C-2), 38.1 (C-3), 37.8 (C-4), 51.0 (C-5), 25.3 (C-6), 45.9 (C-7), 73.1 (C-8), 47.2 (C-9), 37.7 (C-10), 49.1 (C-11), 27.9 (C-12), 47.2 (C-13), 75.8 (C-14), 38.6 (C-15), 82.4 (C-16), 62.7 (C-17), 26.4 (C-18), 57.0 (C-19), 49.6 (C-21), 13.9 (C-22), 56.5 ( $\text{OCH}_3$ -1), 56.6 ( $\text{OCH}_3$ -16)。以上数据与文献[12]报道一致, 故鉴定为萨卡可尼亭。

**化合物 9** 白色针晶; 分子式  $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_6$ , ESI-MS  $m/z$ : 452.29  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  4.56 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, OH-14), 4.19 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-6), 4.09 (1H, dd,  $J = 9.8, 4.9$  Hz, H-14), 3.39 (1H, m, H-16), 2.98 (1H, dd,  $J = 10.7, 6.5$  Hz, H-1), 3.33, 3.01, 3.29, 3.23 (各 3H, s,  $\text{OCH}_3$ ×4), 3.12 (1H, brs, H-7), 3.71, 2.63 (各 1H, ABq,  $J = 8.5$  Hz, H-18), 1.06 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  86.4 (C-1), 26.1 (C-2), 35.4 (C-3), 39.6 (C-4), 48.8 (C-5), 82.5 (C-6), 52.7 (C-7), 72.7 (C-8), 50.5 (C-9), 45.7 (C-10), 50.4 (C-11), 28.5 (C-12), 38.0 (C-13), 75.7 (C-14), 38.9 (C-15), 82.2 (C-16), 62.8 (C-17), 80.9 (C-18), 53.9 (C-19), 49.5 (C-21), 13.9 (C-22), 56.4 ( $\text{OCH}_3$ -1), 57.5 ( $\text{OCH}_3$ -6), 56.6 ( $\text{OCH}_3$ -16), 59.4 ( $\text{OCH}_3$ -18)。以上数据与文献[11]报道一致, 故鉴定为查斯曼宁。

**化合物 10** 白色粉末; 分子式  $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_3$ , ESI-MS  $m/z$ : 374.27  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  5.30 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-7), 3.39 (1H, m, H-16), 3.31, 3.15 (各 3H, s,  $\text{OCH}_3$ ×2), 0.72 (3H, s,  $J = 8.5$  Hz, H-18), 0.96 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  85.2 (C-1), 26.4 (C-2), 39.2 (C-3), 33.5 (C-4), 41.6 (C-5), 22.8 (C-6), 119.3 (C-7), 137.4 (C-8), 46.9 (C-9), 48.5 (C-10), 41.3 (C-11), 36.5 (C-12), 48.9 (C-13), 218.6 (C-14), 37.5 (C-15), 80.1 (C-16), 49.9 (C-17), 26.1 (C-18), 58.1 (C-

19), 52.7 (C-21), 12.7 (C-22), 54.9 (OCH<sub>3</sub>-1), 56.1 (OCH<sub>3</sub>-16)。以上数据与文献[13]报道一致, 故鉴定为展毛黄草乌碱 A。

### 1.5 体外心脏细胞毒性初步评价

结果表明, 测试的紫草乌根中二萜生物碱均对 H9c2 细胞增殖有抑制作用。与空白对照相比, 二萜生物碱对 H9c2 细胞增殖的抑制率随浓度增加而升高, 且差异达显著水平( $P < 0.05$ )。从表 1 可见, 250  $\mu\text{g/mL}$  二萜生物碱的抑制率为 32.12%~70.33%, 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 163.8~341.6  $\mu\text{g/mL}$ 。其中双酯类化合物(C-8 和 C-14 均取代有酯基, 如化合物 1~4)表现出较高的 H9c2 细胞毒性(IC<sub>50</sub><250  $\mu\text{g/mL}$ ), 而单酯类(如化合物 7)和醇胺类成分(化合物 9 和 10)则表现出相对低的 H9c2 细胞毒性。此外, 总生物碱对 H9c2 的细胞毒性比单体化合物低(IC<sub>50</sub>=442.4  $\mu\text{g/mL}$ )。

表 1 部分化合物对 H9c2 增殖的抑制毒性

Table 1 Anti-proliferation toxicity against H9c2 cells of some compounds

化合物 Compound	抑制率 Inhibitory rate /%	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	59.83±0.80*	208.5
2	69.57±1.22*	174.1
3	56.27±1.43*	229.1
4	70.33±1.21*	163.8
6	65.33±2.02*	199.7
7	35.22±1.35*	286.4
9	37.44±0.98*	270.8
10	32.12±0.39*	341.6
总生物碱 Total alkaloid	22.38±1.02*	442.4
乌头碱 Aconitine	59.83±0.80*	208.5

\*:  $P < 0.05$ ;  $n = 6$

## 2 结果和讨论

本研究从云南的紫草乌中分离鉴定了 10 个乌头碱型 C<sub>19</sub>-二萜生物碱类化合物, 分别为滇乌碱 (1)、粗茎乌头碱甲 (2)、黄草乌碱丙 (3)、黄草乌碱甲 (4)、丽乌亭 (5)、猎鹰乌头碱 (6)、14-O-乙酰萨卡可尼亭 (7)、萨卡可尼亭 (8)、查斯曼宁 (9) 和展毛黄草乌碱 A (10), 其中化合物 5、6 和 10 为首次从该植物中分离得到。C<sub>19</sub>-乌头碱型二萜生物碱为紫草乌的主要化学成分<sup>[5,14-15]</sup>。紫草乌中的 C<sub>19</sub>-二萜生物碱包括双酯类(化合物 1~4)、单酯类(化合物 5~7)和醇胺类生物碱(化合物 8~10), 其中单酯碱和醇胺碱的含量高于双酯碱。

细胞毒性结果表明, 双酯型 C<sub>19</sub>-二萜生物碱的

心脏细胞毒性高于单酯型和醇胺型。动物药理研究也已证实, 双酯类 C<sub>19</sub>-乌头碱型二萜生物碱具有极强的毒性, 但随着 C-8 位酯基和 C-14 位芳香酯基的先后水解, 形成单酯类和醇胺类生物碱则毒性大为降低, 并可表现出一定的抗心律失常作用<sup>[16-17]</sup>。单酯类和醇胺类 C<sub>19</sub>-乌头碱或为紫草乌抗心律失常作用的有效成分, 是其发挥解救其他乌头中毒的药效物质。此外, 紫草乌总生物碱对 H9c2 毒性比单体化合物低, 或源于组分间相互作用的结果, 提示总生物碱中存在具有拮抗心脏毒性的成分, 这与乌头类药材如附子兼具致心律失常与抗心律失常作用的表现一致<sup>[16]</sup>。

### 参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol. 1 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2005: 39-191. [国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 39-191.]
- [2] XIAO P G, WANG F P, GAO F, et al. A pharmacophylogenetic study of *Aconitum* L. (Ranunculaceae) from China [J]. Acta Phytotax Sin, 2006, 44(1): 1-46. [肖培根, 王锋鹏, 高峰, 等. 中国乌头属植物药用亲缘学研究 [J]. 植物分类学报, 2006, 44(1): 1-46.]
- [3] WANG W T. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 27 [M]. Beijing: Science Press, 1979: 264. [王文采. 中国植物志, 第 27 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 264.]
- [4] LIANG J Y, YAN Z Y, CHEN X, et al. Research on the anti-arrhythmic effect of Yi Nationality herb "Dulao" [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2008, 19(9): 2108-2109. [梁俊玉, 严铸云, 陈新, 等. 彝药“都拉”抗心律失常药理作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2108-2109.]
- [5] SHEN X J, MA J R, WANG Z B, et al. Study on the diterpenoid alkaloids of *Aconitum episcopale* from Dali [J]. Chem Res Appl, 2020, 32(2): 308-311. [沈晓静, 马俊蓉, 王志斌, 等. 大理紫乌头的二萜生物碱成分研究 [J]. 化学研究与应用, 2020, 32(2): 308-311. doi: 10.3969/j.issn.1004-1656.2020.02.022.]
- [6] ZHANG L J, TANG X E, YAO M Q, et al. Investigation of the toxicity of three alkaloids in *Junggar aconitum* on H9c2 cells [J]. J Xinjiang Med Univ, 2018, 41(11): 1391-1395. [张丽娟, 汤兴娥, 姚美琪, 等. 准噶尔乌头中 3 种生物碱对 H9c2 细胞的毒性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(11): 1391-1395. doi: 10.3969/j.issn.1009-5551.2018.11.017.]
- [7] XIONG J, LIU W Y, HE D, et al. Diterpenoid alkaloids in aerial parts of *Aconitum transsectum* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2019, 50(10):

- 2279–2284. [熊娇, 刘王艳, 何丹, 等. 直缘乌头地上部分二萜生物碱成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2279–2284. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.004.]
- [8] GAO F, LI Y Y, WANG D, et al. Diterpenoid alkaloids from the Chinese traditional herbal “Fuzi” and their cytotoxic activity [J]. *Molecules*, 2012, 17(5): 5187–5194. doi: 10.3390/molecules17055187.
- [9] GUO Z J, YANG Z Y, TAN W H, et al. Chemical constituents from processed products of *Aconitum vilmoriniani* radix [J]. *J Chin Med Mat*, 2015, 38(5): 988–991. [郭志俊, 杨竹雅, 谭文红, 等. 制黄草乌化学成分研究 [J]. 中药材, 2015, 38(5): 988–991. doi: 10.13863/j.issn.1001-4454.2015.05.025.]
- [10] PELLETIER S W, YING C S, JOSHI B S, et al. The structures of forestine and foresticine, two new C<sub>19</sub>-diterpenoid alkaloids from *Aconitum forrestii* Stapf. [J]. *J Nat Prod*, 1984, 47(3): 474–477. doi: 10.1021/np50033a013.
- [11] DESAI H K, PELLETIER S W. Falconericine and falconeridine: Two new alkaloids from *Aconitum falconeri* Stapf. [J]. *Heterocycles*, 1989, 29(2): 225–230. doi: 10.3987/COM-89-4795.
- [12] YIN T P, LUO Z H, WANG M, et al. Study on diterpenoid alkaloids in *Aconitum carmichaeli* from Guizhou Province [J]. *China Pharm*, 2019, 30(22): 3096–3100. [尹田鹏, 罗智慧, 王敏, 等. 黔产乌头的二萜生物碱类成分研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(22): 3096–3100. doi: 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.22.14.]
- [13] CAI L, FANG H X, YIN T P, et al. Unusual C<sub>19</sub>-diterpenoid alkaloids from *Aconitum vilmorinianum* var. *patentipilum* [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 14: 106–110. doi: 10.1016/j.phytol.2015.09.010.
- [14] LI Y M, GONG Y, JIANG Y P, et al. Diterpenoid alkaloids from *Aconitum episcopale* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 2013, 44(8): 951–954. [李咏梅, 龚元, 姜艳萍, 等. 紫乌头中二萜生物碱的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 951–954. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.006.]
- [15] YANG J H, LI Z Y, LI L, et al. Diterpenoid alkaloids from *Aconitum episcopale* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(2): 345–348. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00387-2.
- [16] ZHOU Y P. Review and consideration of studies on arrhythmia-inducing and anti-arrhythmic effects of “Fuzi” (IV) [J]. *Pharmacol Clin Chin Mat Med*, 2015, 31(5): 153–158. [周远鹏. 附子致心律失常和抗心律失常作用研究的综述及其思考(四) [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(5): 153–158. doi: 10.13412/j.cnki.zyyj.2015.05.050.]
- [17] DZHAKHANGIROV F N, SULTANKHODZHAEV M N, TASH-KHODZHAEV B, et al. Diterpenoid alkaloids as a new class of antiarrhythmic agents: Structure-activity relationship [J]. *Chem Nat Compd*, 1997, 33(2): 190–202. doi: 10.1007/BF02291540.