

[成分分析]

广西地不容块根化学成分及其酪氨酸酶抑制、杀虫活性研究

农艳婷^{1,2}, 邹碧群³, 曾思文^{2,4}, 王亚凤², 阳丙媛², 黄永林², 郭伦发², 杨克迪¹,
何瑞杰^{2*}, 葛利^{1*}

(1. 广西大学医学院, 广西南宁 530004; 2. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室, 广西桂林 541006; 3. 桂林师范高等专科学校化学与药理学系, 广西桂林 541199; 4. 广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004)

摘要: 目的 研究广西地不容块根化学成分及其酪氨酸酶抑制、杀虫活性。方法 广西地不容块根 70% 乙醇提取物采用 Sephadex LH-20、MCI、ODS、半制备 HPLC、HSCCC 进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。以左旋多巴为底物, 测定酪氨酸酶抑制活性。以柑橘木虱防治效果为指标, 评价杀虫活性。结果 从中分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为延胡索乙素 (1)、去氢克班宁 (2)、crebanine (3)、stephanine (4)、liriodenine (5)、piperumbellactam A (6)、sinoacutine (7)、(+)-salutaridine N-oxide (8)、bisorargemonine (9)、(+)-corytuberine (10)、sebiferine (11)、palmatrubine (12)。化合物 5~7 对酪氨酸酶 IC₅₀ 值分别为 (0.170 2±0.010 1)、(0.766 3±0.033 1)、(0.519 3±0.007 5) mg/mL。化合物 2~5、7、8、10~12 对柑橘木虱的防治效果在 (19.33±0.57)%~(77.15±0.45)% 之间。结论 化合物 2、5、6、8~12 为首次从该植物块根中分离得到, 6、9 为首次从千金藤属植物中分离得到。化合物 5~7 具有较强的酪氨酸酶抑制活性, 7、8、10 具有较强的杀虫活性。

关键词: 广西地不容; 块根; 化学成分; 分离鉴定; 酪氨酸酶; 杀虫活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2024)10-3310-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.021

Chemical constituents from the root tubers of *Stephania kwangsiensis* and their tyrosinase inhibition and insecticidal activities

NONG Yan-ting^{1,2}, ZOU Bi-qun³, ZENG Si-wen^{2,4}, WANG Ya-feng², YANG Bing-yuan²,
HUANG Yong-lin², GUO Lun-fa², YANG Ke-di¹, HE Rui-jie^{2*}, GE Li^{1*}

(1. Medical College of Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Key Laboratory for Functional Phytochemicals and Continuous Utilization of Resources, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 3. Department of Chemistry and Pharmaceutical Science, Guilin Normal College, Guilin 541199, China; 4. School of Chemistry & Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

ABSTRACT: AIM To study the chemical constituents from the root tubers of *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo and their tyrosinase inhibition and insecticidal activities. **METHODS** The 70% ethanol extract from root tubers of *S. kwangsiensis* was isolated and purified by Sephadex LH-20, MCI, ODS, semi-preparative HPLC and HSCCC, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. The tyrosinase inhibitory activities were determined by using levodopa as substrate, and the insecticidal activities were evaluated by the control effect of *Diaphorina citri*. **RESULTS** Twelve compounds were isolated and identified as

收稿日期: 2023-10-23

基金项目: 国家自然科学基金 (32060108, 82060764); 广西自然科学基金 (2018GXNSFAA294033, 2023GXNSFAA02642); 广西重点研发计划 (桂科 AB23026013); 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室开放基金 (FPRU2022-5); 广西药物分子发现与成药性优化重点实验室开放课题 (GKLDDO-2023-B01); 桂北特色药资源研究中心科研项目 (YJZX202104); 桂林市创新平台和人才计划 (20210102-3)

作者简介: 农艳婷 (1998—), 女, 硕士生, 从事天然药物化学研究。E-mail: 1106901422@qq.com

* **通信作者:** 何瑞杰 (1979—), 男, 博士, 研究员, 从事天然产物化学研究。E-mail: heruijie937@163.com

葛利 (1984—), 女, 博士, 副教授, 从事天然产物化学研究。E-mail: geli_2009@163.com

tetrahydropalmatine (1), dehydrocrebanine (2), crebanine (3), stephanine (4), liriodenine (5), piperumbellactam A (6), sinoacutine (7), (+)-salutaridine *N*-oxide (8), bisnorargemonine (9), (+)-corytuberine (10), sebiferine (11) and palmatrubine (12). The IC₅₀ values of compounds 5–7 to tyrosinase were (0.170 2±0.010 1), (0.766 3±0.033 1) and (0.519 3±0.007 5) mg/mL, respectively. The control effects of compounds 2–5, 7, 8, 10–12 against *D. citri* ranged from (19.33 ± 0.57)% to (77.15 ± 0.45)%.

CONCLUSION Compounds 2, 5, 6, and 8–12 are isolated from this plant for the first time, 6 and 9 are first obtained from genus *Stephania*. Compounds 5–7 displayed significant tyrosinase inhibition activities. Compounds 7, 8 and 10 show strong insecticidal activities.

KEY WORDS: *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo; root tubers; chemical constituents; isolation and identification; tyrosinase; insecticidal activities

广西地不容 *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo 为防己科千金藤属草质落叶藤本植物, 主产于广西西北部到西南部、云南东南部^[1], 其块根为中药材金不换, 收载于《广西中药材标准(第二册)》^[2], 具有清热消毒、散瘀消肿、健胃止痛的功效, 可用于治疗胃、十二指肠溃疡疼痛、上呼吸道感染、跌打肿痛等^[3]。

广西地不容块根富含生物碱, 其总生物碱含量在3%~4%之间^[4]。研究发现, 广西地不容各部位提取物对褐飞虱均有触杀活性, 其块根中的 *L*-罗默碱对褐飞虱的触杀能力是马拉硫磷的7.48倍^[2]。火焰子生物碱和花椒生物碱对酪氨酸酶均有良好的抑制活性^[5-6]。富含生物碱的植物是发现新型植物源杀虫剂和天然酪氨酸酶抑制剂的重要来源^[7-8], 而目前广西地不容化学成分及其抑制酪氨酸酶活性和杀虫活性的相关报道很少。因此, 本实验对广西地不容块根乙醇提取物进行系统分离, 以左旋多巴为底物, 曲酸为阳性对照, 评价化合物对酪氨酸酶的抑制活性; 以水为对照, 评价单体化合物对生活在沃柑树上的成虫态或幼虫态柑橘木虱的杀虫活性, 以期从中发现活性较好者, 为该植物开发利用提供理论依据。

1 材料

MAT 95XP 高分辨质谱(美国赛默飞世尔科技公司); Avance III HD 500 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); SP-MAX3500FL 多功能荧光酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司); LC52 半制备液相色谱仪[赛谱锐思(北京)科技有限公司]。Sephadex LH-20 (25~100 μm, 瑞士 GE Healthcare Bio-Science 公司); MCI gel CHP 20P (75~150 μm, 日本三菱公司)。酪氨酸酶(上海麦克林生化科技股份有限公司); 左旋多巴、曲酸(批号 720A10S95239、H3109Z73868, 上海源叶生

物科技有限公司)。

植物于2019年8月在广西桂林恭城瑶族自治县采集, 经广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所黄俞淞研究员鉴定为广西地不容 *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo 的块根, 凭证标本(编号 20190824)保存于广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室。

2 提取与分离

干燥的广西地不容块根(8 kg)粉碎后, 用30 L 70%乙醇室温浸提3次, 每次3 d, 合并滤液, 减压浓缩后得到浸膏(1 261 g), 加蒸馏水混悬, 依次用石油醚、乙酸乙酯萃取3次。水部位经 DiaionHP-20 柱(10.0 cm×45.0 cm)分离, 以甲醇-水(0:100~100:0)梯度洗脱, TLC 检识合并, 得到 Fr. 1~Fr. 8。

Fr. 8 (125.0 g) 经 Sephadex LH-20 柱分离, 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得到 Fr. 8.1~Fr. 8.8, Fr. 8.2 (100.0 g) 经 ODS、MCI 柱分离, 以甲醇-水(含0.1%三乙胺)(0:100~100:0)梯度洗脱, 得到化合物 1 (15.0 mg)、2 (100.0 mg)、3 (10.0 mg)、4 (30.0 mg); Fr. 8.5 (3.2 g) 经 ODS 柱分离, 以甲醇-水(含0.1%三乙胺)(50:50~100:0)梯度洗脱, 得 Fr. 8.5.1~Fr. 8.5.7, Fr. 8.5.2 (1.0 g) 经反相半制备 HPLC (体积流量 2 mL/min, 检测波长 254 nm) 分离, 以甲醇-水(含0.1%三乙胺)(35:65~80:20)梯度洗脱, 得到化合物 5 (10.0 mg, *t_R* = 62 min)、6 (7.0 mg, *t_R* = 80 min)。Fr. 6 (165.4 g) 经 MCI 柱分离, 以甲醇-水(含0.1%三乙胺)(0:100~100:0)梯度洗脱, 得 Fr. 6.1~Fr. 6.6, Fr. 6.6 (34.2 g) 经 ODS 柱分离, 以甲醇-水(含0.1%三乙胺)(0:100~100:0)梯度洗脱, 得 Fr. 6.6.1~Fr. 6.6.4, Fr. 6.6.2 (2.7 g) 经 HSCCC (流动相

二氯甲烷-甲醇-水 10 : 6.5 : 3.5)、ODS 柱 [流动相甲醇-水 (含 0.1% 三乙胺) (0 : 100 ~ 100 : 0)] 分离, 甲醇结晶, 得化合物 **7** (50.0 mg)、**9** (20.0 mg); Fr. 6.5 (1.1 g) 经 MCI 柱分离, 以甲醇-水 (含 0.1% 三乙胺) (0 : 100 ~ 100 : 0) 梯度洗脱, 得化合物 **8** (20.0 mg); Fr. 6.3 (28.8 g) 经 ODS 柱分离, 以甲醇-水 (含 0.1% 三乙胺) (0 : 100 ~ 100 : 0) 梯度洗脱, 得 Fr. 6.3.1 ~ Fr. 6.3.9, Fr. 6.3.4 (10.5 g) 经 Sephadex LH-20、ODS、MCI 柱分离, 以甲醇-水 (含 0.1% 三乙胺) (0 : 100 ~ 100 : 0) 梯度洗脱, 得化合物 **10** (70.0 mg)、**11** (10.0 mg)、**12** (35.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色片状晶体, 熔点 147 ~ 148 °C, HR-ESI-MS m/z : 356.1863 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.91 (1H, dd, $J=8.7, 3.2$ Hz, H-14), 6.88 (1H, dd, $J=8.7, 2.6$ Hz, H-13), 6.86 (1H, s, H-1), 6.70 (1H, brs, H-4), 4.19 (1H, dd, $J=15.5, 2.5$ Hz, H-8), 3.82 (9H, m, 3×-OCH₃), 3.80 (3H, m, -OCH₃), 3.48 (2H, m), 3.41 (1H, m), 3.18 (1H, m), 3.08 (1H, m), 2.74 (2H, m), 2.60 (1H, m); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 151.7 (C-11), 149.2 (C-2), 149.1 (C-3), 146.2 (C-12), 130.7 (C-18), 128.9 (C-15), 128.7 (C-10), 127.8 (C-5), 125.2 (C-14), 113.0 (C-4), 112.7 (C-13), 110.5 (C-1), 60.7 (C-17), 60.5 (-OCH₃), 56.7 (-OCH₃), 56.4 (-OCH₃), 56.3 (-OCH₃), 54.8 (C-9), 52.6 (C-7), 36.5 (C-16), 29.3 (C-6)。以上数据与文献 [9-10] 报道基本一致, 故鉴定为延胡索乙素。

化合物 **2**: 淡黄色针状晶体, 熔点 155 ~ 156 °C, HR-ESI-MS m/z : 338.1390 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 7.78 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-11), 6.98 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-10), 6.53 (1H, s, H-3), 6.09 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-7), 5.94 (2H, d, $J=1.1$ Hz, -OCH₂O), 3.88 (3H, s, 8-OCH₃), 3.77 (3H, s, 9-OCH₃), 3.63 (2H, dd, $J=14.6, 4.3$ Hz, 5-CH₂), 2.99 (2H, m, 4-CH₂), 2.50 (3H, s, *N*-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 153.1 (C-8), 147.5 (C-9), 146.8 (C-2), 142.9 (C-1), 137.4 (C-6a), 130.4 (C-7a), 127.8 (C-3a), 127.7 (C-3), 125.3 (C-1b), 123.9 (C-11a), 117.3 (C-1a), 111.4 (C-11), 107.4 (C-10), 101.5 (-OCH₂O), 62.9 (C-

7), 60.6 (8-OCH₃), 56.1 (9-OCH₃), 54.3 (C-5), 44.2 (*N*-CH₃), 27.7 (C-4)。以上数据与文献 [11] 报道基本一致, 故鉴定为去氢克班宁。

化合物 **3**: 白色块状晶体, 熔点 116 ~ 117 °C, HR-ESI-MS m/z : 340.1544 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 7.77 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-11), 6.97 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-10), 6.52 (1H, s, H-3), 6.09 (1H, d, $J=1.1$ Hz, H-12a), 5.93 (1H, d, $J=1.1$ Hz, H-12b), 3.87 (3H, s, 9-OCH₃), 3.77 (3H, s, 8-OCH₃), 3.63 (1H, dd, $J=14.8, 4.4$ Hz, H-7), 2.99 (3H, m, H-4a, 5a, 6a), 2.57 (1H, m, H-4b), 2.49 (3H, s, *N*-CH₃), 2.40 (1H, td, $J=11.5, 3.6$ Hz, H-5b), 2.13 (1H, dd, $J=25.0, 14.2$ Hz, H-7a); ¹³C-NMR (125 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 153.0 (C-8), 147.3 (C-2), 146.7 (C-9), 142.8 (C-1), 130.3 (C-7a), 127.6 (C-3a), 127.5 (C-6b), 125.2 (C-11a), 123.8 (C-11), 117.1 (C-11b), 111.3 (C-10), 107.3 (C-3), 101.4 (C-12), 62.8 (C-6a), 60.5 (8-OCH₃), 55.9 (9-OCH₃), 54.1 (C-5), 44.1 (*N*-CH₃), 29.3 (C-4), 27.5 (C-7)。以上数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定为 crebanine。

化合物 **4**: 淡黄色柱晶, 熔点 153 ~ 154 °C, HR-ESI-MS m/z : 310.1446 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 7.69 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-11), 7.29 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-10), 6.94 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-9), 6.58 (1H, s, H-3), 6.10 (1H, d, $J=1.1$ Hz, H-12a), 5.95 (1H, d, $J=1.1$ Hz, H-12b), 3.87 (3H, s, 8-OCH₃), 3.67 (1H, dd, $J=15.0, 4.6$ Hz, H-7), 2.99 (3H, m, H-4a, 5a, 6a), 2.60 (1H, dd, $J=15.6, 4.1$ Hz, H-4b), 2.48 (3H, s, *N*-CH₃), 2.40 (1H, td, $J=13.5, 5.77$ Hz, H-5b), 2.07 (1H, m, H-7b); ¹³C-NMR (125 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 153.2 (C-8), 147.6 (C-2), 143.5 (C-1), 132.8 (C-11a), 128.2 (C-6b), 127.9 (C-10), 127.7 (C-3a), 124.4 (C-7a), 120.3 (C-11), 117.2 (C-11b), 110.6 (C-9), 108.2 (C-3), 101.5 (C-12), 62.8 (C-6a), 55.9 (8-OCH₃), 54.3 (C-5), 44.2 (*N*-CH₃), 26.8 (C-7), 25.4 (C-7)。以上数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定为 stephanine。

化合物 **5**: 黄色针状结晶, 熔点 261 ~ 262 °C, HR-ESI-MS m/z : 276.0663 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.57 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-

5), 8.32 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-11), 8.25 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-8), 7.73 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-4), 7.63 (1H, t, $J=8.2$ Hz, H-10), 7.48 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-9), 7.06 (1H, s, H-3), 6.32 (2H, s, -OCH₂O-); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 182.5 (C-7), 152.4 (C-2), 149.0 (C-1), 145.3 (C-6a), 143.5 (C-5), 136.3 (C-3a), 134.3 (C-10), 133.6 (C-11a), 132.2 (C-7a), 129.0 (C-8), 128.8 (C-9), 128.1 (C-11), 124.9 (C-4), 123.1 (C-6b), 108.0 (C-1a), 103.9 (C-3), 103.7 (-OCH₂O)。以上数据与文献 [13] 报道基本一致, 故鉴定为 liriodenine。

化合物 6: 淡黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 296.092 6 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ : 9.21 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-5), 7.88 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-8), 7.86 (1H, s, H-2), 7.56 (2H, m, H-6, 7), 7.19 (1H, s, H-9), 4.10 (6H, d, 3, 4-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 168.4 (C=O), 154.3 (C-3), 150.4 (C-4), 135.1 (C-10), 134.8 (C-8a), 129.1 (C-8), 127.5 (C-7), 126.8 (C-6), 125.9 (C-5), 125.5 (C-5a), 123.3 (C-11), 121.5 (C-1), 119.9 (C-4a), 109.9 (C-2), 104.6 (C-9), 59.9 (4-OCH₃), 56.9 (3-OCH₃)。以上数据与文献 [14] 报道基本一致, 故鉴定为 piperumbellactam A。

化合物 7: 白色方晶, 熔点 200~201 °C, HR-ESI-MS m/z : 328.154 4。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.85 (1H, s, H-5), 6.83 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-1), 6.64 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-2), 6.33 (1H, s, H-8), 3.84 (3H, s, 3-OCH₃), 3.74 (1H, d, $J=5.4$ Hz, H-9), 3.73 (3H, s, 6-OCH₃), 3.35 (1H, d, $J=17.8$ Hz, H-10b), 2.97 (1H, m, H-10a), 2.59 (1H, m, H-16b), 2.44 (1H, m, H-16a), 2.41 (3H, s, *N*-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 183.3 (C-7), 165.0 (C-14), 151.8 (C-6), 147.9 (C-3), 145.5 (C-4), 130.2 (C-11), 125.1 (C-12), 123.7 (C-8), 122.9 (C-5), 119.5 (C-1), 111.5 (C-2), 62.1 (C-9), 56.7 (3-OCH₃), 55.3 (6-OCH₃), 47.9 (C-16), 45.3 (C-13), 41.6 (*N*-CH₃), 38.2 (C-15), 33.6 (C-10)。以上数据与文献 [15-16] 报道基本一致, 故鉴定为 sinoacutine。

化合物 8: 白色固体, HR-ESI-MS m/z : 344.149 5 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD)

δ : 7.80 (1H, s, H-5), 6.91 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-2), 6.69 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-1), 6.45 (1H, s, H-8), 4.29 (1H, d, $J=5.1$ Hz, H-9), 3.86 (3H, s, -OCH₃), 3.75 (3H, s, -OCH₃), 3.49 (3H, m, *N*-CH₃), 3.23 (1H, m, H-10), 3.21 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-16), 2.43 (1H, dt, $J=13.6, 2.7$ Hz, H-15), 2.34 (1H, m, H-15); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 182.2 (C-7), 158.3 (C-6), 152.0 (C-14), 148.6 (C-3), 145.7 (C-4), 127.4 (C-12), 126.1 (C-11), 124.7 (C-5), 122.0 (C-8), 119.9 (C-1), 112.2 (C-2), 77.7 (C-16), 61.9 (C-9), 57.5 (-OCH₃), 56.7 (-OCH₃), 55.4 (*N*-CH₃), 43.6 (C-13), 36.4 (C-15), 34.3 (C-10)。以上数据与文献 [17] 报道基本一致, 故鉴定为 (+)-salutaridine *N*-oxide。

化合物 9: 黄色无定型粉末, HR-ESI-MS m/z : 328.154 7 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.74 (1H, s, H-7), 6.61 (1H, s, H-1), 6.53 (1H, s, H-4), 6.42 (1H, s, H-10), 4.13 (1H, d, $J=5.7$ Hz, H-6), 4.07 (1H, $J=5.6$ Hz, H-12), 3.82 (3H, s, 8-OCH₃), 3.74 (3H, s, 3-OCH₃), 3.38 (1H, m, H-5), 3.35 (1H, s, H-11), 2.69 (2H, m, H-5, 11), 2.55 (3H, s, *N*-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 148.5 (C-3), 148.1 (C-8), 146.8 (C-9), 146.3 (C-2), 130.1 (C-12a), 128.7 (C-6a), 124.6 (C-10a), 123.3 (C-4a), 115.5 (C-10), 114.6 (C-1), 112.7 (C-4), 111.4 (C-7), 57.8 (C-6), 57.6 (C-12), 56.5 (8-OCH₃), 56.4 (3-OCH₃), 40.4 (*N*-CH₃), 34.6 (C-5), 34.2 (C-11)。以上数据与文献 [18] 报道基本一致, 故鉴定为 bisnorargemonine。

化合物 10: 白色絮状晶体, 熔点 153~154 °C, HR-ESI-MS m/z : 328.154 9 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.82 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-9), 6.70 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 3.76 (6H, 2 \times -OCH₃), 3.04 (4H, m, H-4, 5), 2.65 (1H, m, H-7), 2.56 (3H, s, *N*-CH₃), 2.25 (1H, t, $J=14.0$ Hz, H-7); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 148.7 (C-2), 148.5 (C-10), 144.4 (C-11), 141.1 (C-1), 128.8 (C-3b), 127.0 (C-3a), 124.5 (C-7a), 121.5 (C-8), 120.7 (C-11a), 117.3 (C-11b), 110.6 (C-3), 110.35 (C-9), 62.6 (C-6a), 55.8 (2-OCH₃), 55.6 (10-OCH₃), 52.2 (C-5), 42.7 (*N*-CH₃), 34.5 (C-7),

27.6 (C-4)。以上数据与文献 [19] 报道基本一致, 故鉴定为 (+)-corytuberine。

化合物 11: 黄色晶体, 熔点 118 ~ 119 °C, HR-ESI-MS m/z : 342.170 2 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.07 (1H, s, H-4), 6.86 (1H, s, H-1), 6.76 (1H, s, H-5), 6.33 (1H, s, H-8), 3.85 (3H, s, 6-OCH₃), 3.81 (6H, 2, 3-OCH₃), 3.77 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-9), 3.40 (1H, d, $J=18.4$ Hz, H-10a), 3.04 (1H, dd, $J=18.4, 6.3$ Hz, H-10b), 2.56 (2H, m, H-16), 2.45 (3H, s, N-OCH₃), 1.97 (1H, dt, $J=13.0, 2.8$ Hz, H-15), 1.88 (1H, ddd, $J=13.0, 11.3, 5.7$ Hz, H-15); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 183.0 (C-7), 164.9 (C-14), 152.3 (C-3), 149.9 (C-2), 149.7 (C-6), 131.4 (C-11), 129.9 (C-12), 123.0 (C-8), 122.4 (C-5), 111.9 (C-1), 111.0 (C-4), 61.9 (C-9), 56.9 (6-OCH₃), 56.4 (3-OCH₃), 55.8 (2-OCH₃), 46.6 (C-16), 41.7 (N-CH₃), 41.6 (C-10), 33.4 (C-15)。以上数据与文献 [20-21] 报道基本一致, 故鉴定为 sebiferine。

化合物 12: 暗红色固体, HR-ESI-MS m/z : 339.146 2 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 9.26 (1H, s, H-8), 8.11 (1H, s, H-13), 7.52 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-11), 7.45 (1H, s, H-4), 6.93 (1H, s, H-1), 6.91 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-12), 4.62 (2H, t, $J=6.2$ Hz, 6-CH₂-), 3.95 (3H, s, 2-OCH₃), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃), 3.87 (3H, s, 10-OCH₃), 3.15 (2H, t, $J=6.2$ Hz, 5-CH₂-); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 163.7 (C-9), 152.6 (C-10), 150.9 (C-3), 150.5 (C-2), 147.4 (C-8), 135.7 (C-14), 133.9 (C-12a), 129.2 (C-4a), 124.4 (C-11), 121.7 (C-14a), 121.6 (C-8a), 119.5 (C-13), 112.3 (C-4), 109.4 (C-1), 108.6 (C-12), 56.9 (2-OCH₃), 56.8 (3-OCH₃), 56.6 (10-OCH₃), 55.8 (C-6), 28.5 (C-5)。以上数据与文献 [22] 报道基本一致, 故鉴定为 palmatrubine。

4 生物活性研究

4.1 酪氨酸酶抑制活性 参考文献 [23] 报道, 采用左旋多巴 (1 mg/mL) 作为底物, 曲酸作为阳性对照, 分为 A_{样品组} (20 μ L 样品或曲酸+10 μ L 酪氨酸酶)、A_{样品对照组} (20 μ L 样品或曲酸+10 μ L PBS)、B_{空白组} (20 μ L PBS+10 μ L 酪氨酸酶)、B_{空白对照组} (30 μ L PBS), 均置于 96 孔板中, 37 °C

孵育 10 min, 加入 40 μ L 左旋多巴, 37 °C 孵育 5 min, 在 475 nm 波长处测定吸光度, 每组重复 3 次, 根据酪氨酸酶活性抑制率计算 IC₅₀ 值, 公式为酪氨酸酶抑制率 = [1 - (A_{样品组} - A_{样品对照组}) / (B_{空白组} - B_{空白对照组})] \times 100%, 结果见表 1。

表 1 化合物 1~12 的 IC₅₀ 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

化合物	IC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)
1	1.283 9 \pm 0.029 0 **
2	1.653 6 \pm 0.020 9 **
3	2.249 2 \pm 0.049 1 **
4	>10.000 0
5	0.170 2 \pm 0.010 1 *
6	0.766 3 \pm 0.033 1 **
7	0.519 3 \pm 0.007 5 **
8	2.047 9 \pm 0.056 4 **
9	4.900 5 \pm 0.145 8 **
10	>10.000 0
11	1.482 8 \pm 0.175 2 **
12	1.476 6 \pm 0.026 3 **
曲酸	0.110 0 \pm 0.026 3

注: 与曲酸比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4.2 杀虫活性 参考文献 [24-25] 报道, 于 2023 年 6 月在阳朔县高田镇乐响村果园的普通有核沃柑树上进行, 实验时正值夏梢抽发期, 柑橘木虱成虫态与幼虫态均有, 在每株供试树上抽取几梢有虫叶片, 记载活虫数。施药前调查虫口基数, 施药后 6 d 调查残虫数。设置样品组和空白对照组 (CK, 只含水), 将各化合物用少量甲醇或丙酮溶解, 加水稀释至 1 000 mg/kg, 采用手持微型喷雾器向叶片、枝条均匀喷雾, 重复 3 次, 计算各化合物对柑橘木虱的防治效果 [25], 公式为防治效果 = 1 - (CK₀ \times PT₁) / (CK₁ \times PT₀) \times 100% (PT₀ 为药剂处理组药前活虫数, PT₁ 为药剂处理组药后活虫数, CK₀ 为空白对照组药前活虫数, CK₁ 为空白对照组药后活虫数), 结果见表 2。

表 2 各化合物对柑橘木虱的防治效果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Control effects of various compounds on *Diaphorina citri* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

化合物	虫口基数/只	残虫数/只	防治效果/%
2	46.0	25.0	46.64 \pm 0.26
3	43.0	21.6	40.41 \pm 0.29
4	42.3	28.3	19.53 \pm 0.42
5	42.0	26.0	39.88 \pm 0.48
7	50.3	15.3	65.77 \pm 0.70
8	38.3	11.0	60.15 \pm 0.47
10	63.3	18.3	77.15 \pm 0.45
11	43.0	23.0	34.50 \pm 0.32
12	37.6	26.3	19.33 \pm 0.57
CK	96.6	85.0	—

注: 虫口基数和防治效果均为平均值。

5 讨论与结论

本研究针对广西地不容富含生物碱的特点,综合运用HSCCC、MCI柱、Sephadex LH-20凝胶柱、ODS柱等对样品死吸附少的分离材料和纯化技术,从中分离得到12个生物碱,主要为阿朴菲型(2~5、10)、吗啡型(7、8、11)、原小檗碱型(1、12)等异喹啉类。其中,化合物2、5、6、8~12为首次从该植物中分离得到,6、9为首次从千金藤属植物中分离得到;部分生物碱显示出显著的抗炎、抗肿瘤、抗心律失常等作用,与该植物传统药用功效相符^[26-28]。此外,药理活性研究发现,化合物5~7表现出较强的酪氨酸酶抑制活性,1、2、11、12抑制能力稍弱;化合物2~5、7、8、10~12对柑橘木虱具有防治作用,其中10效果最好。上述结果不仅丰富了广西地不容的物质基础,还验证了这些成分的酪氨酸酶抑制活性和杀虫活性,可为其开发利用提供理论依据。

参考文献:

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志(第三十卷第一分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 67-69.

[2] 黄浩, 黄哲, 韦莹, 等. 特色壮药广西地不容研究进展[J]. 热带农业科学, 2023, 43(5): 38-44.

[3] 梁红, 蒙永业, 李修善. HPLC法测定金不换中延胡索乙素含量[J]. 企业科技与发展, 2012(14): 90-92.

[4] 马仁强, 邹红, 李华. 金不换药材质量标准研究[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1723-1725.

[5] 王晓梅, 赵立芳, 罗小林. 火焰子生物碱对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(1): 50-52.

[6] 王雅, 赵春萌, 谢婕, 等. 花椒生物碱提取工艺及抗氧化、抑制酪氨酸酶活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 303-307.

[7] 董小琦, 康兆勇, 刘胜男, 等. 新型植物源天然产物杀虫剂研究进展[J]. 农药学报, 2023, 25(5): 1-21.

[8] 倪建成, 范永飞, 叶祖云. 太子参化学成分、药理作用和应用的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(6): 1963-1977.

[9] 李木子, 张浩, 朱粉霞. 苦地丁的化学成分研究[J]. 华西药学杂志, 2019, 34(3): 120-126.

[10] 冯静, 于宗渊, 杨洪军, 等. 延胡索中生物碱成分的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 124-127.

[11] 杨德兰, 梅文莉, 戴好富. 小叶地不容块根中的细胞毒活性生物碱[J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(3): 206-210.

[12] Duc T D, Thi T T, Quoc H N, et al. Cytotoxic alkaloids from *Stephania dielsiana*[J]. *Chem Nat Compd*, 2018, 54(3): 613-616.

[13] 刘会珍, 陈佳倩, 金晨, 等. 瑶药长柄瓜馥木的化学成分及抗痛风作用的网络药理学[J]. 南昌大学学报(理科版), 2022, 46(6): 630-639.

[14] 李清, 瞿发林, 谭兴起, 等. 假蒟化学成分的研究[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1799-1802.

[15] 董红敬. 广西地不容生物碱高速逆流色谱制备技术及提取工艺研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.

[16] 沈晓静, 董建伟, 梅瑞峰, 等. 地不容生物碱成分研究[J]. 化学研究与应用, 2016, 28(12): 1730-1734.

[17] 何达海, 刘军, 方东梅, 等. 粉防己生物碱成分研究[J]. 药学学报, 2021, 56(12): 3503-3510.

[18] Costa E V, Soares L D N, Chaar J D S, et al. Benzylated dihydroflavones and isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Diclinanona calycina* (Annonaceae) and their cytotoxicities [J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3714.

[19] 吕子明, 孙武兴, 段绪红, 等. 延胡索化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 235-237.

[20] 彭扶云. 云南地不容的化学成分研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2014.

[21] Omar H, Fadaeinasab M, Taha H, et al. Aporphine alkaloids with *in vitro* antiplasmodial activity from the leaves of *Phoebe tavoyana*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2020, 22(1): 52-60.

[22] Le D H, Nishimura K, Tanahashi T. Alkaloids from the tuber of *Stephania cf. rotunda*[J]. *Nat Prod Commun*, 2016, 11(7): 949-952.

[23] 黄佳楠, 管福琴, 李林蔚, 等. 黑果枸杞果实提取物中花色苷对酪氨酸酶活性的抑制作用初探[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(3): 75-77.

[24] 邓明学, 韦薇, 谭有龙, 等. 18%螺螨酯胺SC防治柑橘蚜虫、木虱等4种害虫田间药效试验[J]. 南方园艺, 2022, 33(3): 61-64.

[25] 阳廷密, 王明召, 张素英, 等. 螺螨酯、噻虫嗪混矿物油对柑橘全爪螨和柑橘木虱的田间增效及减量作用[J]. 农药, 2019, 58(12): 924-928.

[26] 叶士勇, 曾春来, 吕玲春, 等. 延胡索乙素对大鼠下肢缺血再灌注损伤的影响及作用机制研究[J]. 心电与循环, 2023, 42(5): 434-437; 448; 505.

[27] 谭佳杰, 向玉玲, 熊远果, 等. 克班宁对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中南药学, 2023, 21(2): 392-397.

[28] 杨静, 许明君, 王钊力, 等. 千金藤碱通过MAPK/ERK信号通路对鼻咽癌大鼠的防治作用及对Survivin、XIAP、Bcl-2表达的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2021, 42(4): 633-638.