

延胡索中 9 种生物碱对醌还原酶诱导活性研究

施菁, 李元圆, 崔勤敏, 陈婷, 上官盈盈* (浙江医学高等专科学校药学系, 杭州 310053)

摘要: 目的 对延胡索的生物碱类成分及其醌还原酶(QR)诱导活性进行系统研究。方法 运用色谱学和波谱学方法分离鉴定了 9 个化合物的结构, 并对分离得到的化合物单体进行 QR 诱导活性测定。结果 从该植物中分得 9 个化合物, 分别鉴定为 *d*-紫堇碱(I)、去氢海罂粟碱(II)、四氢巴马汀(III)、原阿片碱(IV)、 α -别隐品碱(V)、四氢非洲防己碱(VI)、去氢紫堇碱(VII)、小檗碱(VIII)、巴马汀(IX)。QR 诱导活性筛选结果表明 *d*-紫堇碱(I)和四氢非洲防己碱(VI)显示了一定的 QR 诱导活性。结论 首次对延胡索中的生物碱单体进行了 QR 诱导活性测定, 考察结果具有实际指导意义。

关键词: 延胡索; 生物碱; 醌还原酶

基金项目: 浙江省科技厅分析测试基金(2008F70017)

作者简介: 施菁, 女, 硕士, 副教授 Tel: (0571)87692881 E-mail: shij136@hotmail.com *通信作者: 上官盈盈, 女, 教授 Tel: (0571)87692683 E-mail: ying-ying6@163.com

Study on Nine Alkaloids from *Corydalis Rhizoma* with Quinone Reductase Inducing Activities

SHI Jing, LI Yuanyuan, CUI Qinmin, CHEN Ting, SHANGGUAN Yingying* (Department of Pharmacy, Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the chemical constituents from *Corydalis Rhizoma* and their quinone reductase(QR) inducing activities *in vitro*. **METHODS** Chromatographic and spectroscopic methods were used to isolate and identify the alkaloids from the ethanol extraction of *Corydalis Rhizoma*. QR induction assay was employed to investigate the QR inducing activities of the isolated alkaloids. **RESULTS** Nine compounds were isolated and identified as *d*-corydaline(I), dehydroglauicine(II), tetrahydropalmatin(III), protopine(IV), α -allocryptopine(V), tetrahydrocolumbamine(VI), dehydrocorydaline(VII), berberine(VIII), palmatine(IX). Among these alkaloids, *d*-corydaline(I) and tetrahydrocolumbamine(VI) possessed moderate QR inducing activities *in vitro*. **CONCLUSION** The QR inducing activities of alkaloids from *Corydalis Rhizoma* were investigated for the first time, and the results generally show a positive significance.

KEY WORDS: *Corydalis Rhizoma*; alkaloids; quinone reductase

中药延胡索是罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 主产于浙江省东阳、磐安一带, 为著名的浙八味之一。性味辛、苦、温, 具有活血、利气、止痛的功效^[1]。现代药理研究认为延胡索除了有镇痛、镇静催眠、抗血栓、抗心律失常、改善心肌供氧等作用外, 还具有抗肿瘤作用^[2]。其镇痛、镇静催眠、抗冠心病等作用已得到广泛研究与临床应用, 但还未见其生物碱成分对肿瘤化学预防作用的相关研究报道。

醌还原酶(QR)是普遍存在于人体各种组织的黄素蛋白酶^[3-5]。它具有解毒醌类毒性物质和活化生物还原性抗肿瘤药物的双重功能, 因此可分别发挥肿瘤预防和治疗的作用。笔者在研究延胡索抗肿瘤有效部位和活性单体的筛选过程中, 对延胡索中的生物碱类成分进行了系统研究, 并进行 QR 诱导活性筛选, 以寻找具有肿瘤预防及治疗的活性单体, 从而能更好地利用本药材。

1 实验材料与仪器

Bruker AMX-400 型核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司); Agilent 1200 制备型 HPLC 色谱仪(美国 Agilent 公司); Thermo Finnigan LCQ Deca XPplus ESI 离子阱质谱检测器(美国 San Jose 公司); Infinite F200 酶标仪(瑞士 TECAN 公司); TLC 用硅胶 GF254(青岛海洋化工厂); 柱色谱硅胶(37~54 μm , 青岛海洋化工厂); 其他所用试剂均为分析纯; 延胡索药材采于浙江磐安(2008 年 8 月采集), 由浙江大学药学院马忠俊副教授鉴定为延胡索 *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang 的块茎。

2 实验方法

2.1 提取和分离

取延胡索药材 5 kg, 阴干粉碎后用 95%乙醇溶液回流提取, 提取液减压浓缩后依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取。二氯甲烷萃取部分(60 g)经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯溶剂系统(20:1~1:40)梯度洗脱得到 10 个流分(A1~A10)、以二氯甲烷-甲醇溶剂系统(50:1~1:20)梯度洗脱, 得到 10 个流分(A11~A20)。其中流分 A7 经反复硅胶柱色谱、制备型高效液相色谱等多种色谱学方法, 分离得到 2 个化合物, 分别为化合物 II(15.2 mg)和化合物 VI(20.0 mg)。流分 A12 经反复硅胶柱色谱、制备型高效液相色谱等多种色谱学方法, 分离得到 7 个化合物, 分别为化合物 I(155.2 mg)、化合物 III(532.0 mg)、化合物 IV(132.0 mg)、化合物 V(20.0 mg)、化合物 VII(1320.0 mg)、化合物 VIII(220.0 mg)、化合物 IX(90.0 mg)。

2.2 生物活性实验

2.2.1 结晶紫法测定细胞毒活性试验 以每孔 10^4 个的密度将鼠肝癌细胞株 Hepa 1c1c7(购买于 ATCC)接种于 96 孔板中, 在包含 10%胎牛血清、0.01%青霉素 G、0.15%碳酸氢钠、0.01%硫酸链霉素的培养液中生长 24 h, 环境条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% CO_2 的潮湿空气。然后将已知浓度的待测化合物溶解在 DMSO 中加入各孔并保持 24 h。每孔加入 DMSO 后应保证 DMSO 的终浓度小于 0.5%。弃掉培养液, 每孔加入 200 μL 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 结晶紫(2%乙醇溶液)。常温下放置染色 10 min 左右, 弃掉结

晶紫溶液, 用水迅速洗涤 3 次。将水甩干后每孔加入 200 μL 0.5% SDS(50%乙醇溶液), 常温下振荡 5 min, 550 nm 下测定吸光度。测得的吸光度经空白组(没有种细胞的孔)进行校正, 并以相当于对照组(没有处理的孔中细胞)吸光度的百分率表示细胞存活率。每组实验应至少独立重复 3 次并取平均值作为最后结果。

2.2.2 QR 诱导活性测定 以每孔 10^4 个的密度将鼠肝癌细胞株 Hepa 1c1c7 接种于 96 孔板中, 在包含 10%胎牛血清、0.01%青霉素 G、0.15%碳酸氢钠、0.01%硫酸链霉素的培养液中生长 24 h, 环境条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% CO_2 的潮湿空气。然后将已知浓度的待测化合物溶解在 DMSO 中加入各孔并保持 24 h。每孔加入 DMSO 后应保证 DMSO 的终浓度小于 0.5%。弃掉培养液, 每孔加入含有 0.8%洋地黄皂苷和 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 振荡 10 min 以消化细胞。在每孔加入配制方法如下的混合液 200 μL (该混和液应临用前配制): 将 7.5 mL 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl(pH 7.4)、100 mg 小牛血清、1 mL 1.5%吐温 20、0.1 mL 7.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 FAD、1 mL 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖-6-磷酸、90 μL 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NADP、300 单位葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、45 mg MTT 用去离子水配制成 150 mL 的溶液。在加入混和液之前加入 0.2 μL 甲萘醌(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶解在乙腈中)。待加入完成后, 将 96 孔板轻轻振荡 5 min。这时在每一孔中可见蓝色的甲臜形成, 在 550 nm 波长下测定吸光度。空白组中不含细胞, 对照组为 Hepa 1c1c7 细胞和含 0.5% DMSO 基质液但不含待测化合物。待测化合物的 QR 诱导活性的计算方法: 先将给药组和对照组的吸光度减去空白组的吸光度, 然后用给药组的吸光度值比对照组的吸光度值作为 QR 诱导活性的指标。每组实验应至少独立重复 3 次。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 I: 无色棱状柱晶, ESI-MS (m/z): 370 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.91(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-12), 6.82(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-11), 6.69(1H, s, H-1), 6.61(1H, s, H-4), 4.20(1H, d, $J=15.5$ Hz, H-8), 3.87(12H, m, $4\times\text{OCH}_3$), 3.69(1H, d, H-14), 3.51(1H, d, $J=15.5$ Hz, H-8), 3.23(1H, m, H-13), 3.13(2H, m, H-6), 2.60(2H, m, H-5), 0.95(3H, d, $J=7$ Hz, CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz,

CDCl_3) δ : 150.0(C-9), 147.6(C-3), 147.1(C-2), 144.8(C-10), 134.9(C-12a), 128.5, 128.4, 128.3(C-4a, -14a, -8a), 124.1(C-12), 111.1(C-11), 110.9(C-4), 108.7(C-1), 63.1(C-14), 60.1($-\text{OCH}_3$), 56.0($-\text{OCH}_3$), 55.9($-\text{OCH}_3$), 55.8($-\text{OCH}_3$), 54.5(C-8), 51.4(C-6), 38.3(C-13), 29.3(C-5), 18.3($-\text{CH}_3$)。以上数据与文献[6]比较, 鉴定为 *d*-紫堇碱(*d*-corydaline)。

化合物 II: 绿棕色晶状粉末, ESI-MS (m/z): 353 $[\text{M}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.08(1H, s, H-11), 7.05(1H, s, H-8), 6.97(1H, s, H-3), 6.56(1H, br s, H-7), 4.02(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.02(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.01(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.88(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.34(2H, t, $J=6$ Hz, H-5), 3.26(2H, t, $J=6$ Hz, H-4), 3.06(3H, s, $-\text{NCH}_3$)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 150.5, 149.0, 145.7, 144.3, 142.4, 130.2, 129.7, 125.2, 118.4, 118.0, 110.3, 108.9, 106.4, 101.3, 60.0, 56.3, 55.7, 55.6, 50.5, 40.5, 31.3。以上数据与文献[6-7]比较, 鉴定为去氢海罂粟碱(dehydroglauicine)。

化合物 III: 无色片晶, 碘化铯钾反应呈阳性; ESI-MS(m/z): 356 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.89(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-12), 6.79(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-11), 6.74(1H, s, H-1), 6.62(1H, s, H-4), 4.25(1H, d, $J=15.5$ Hz, H-8), 3.89(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.87(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.86(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.85(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.55(2H, m), 3.21(3H, m), 2.83(1H, m), 2.66(2H, m)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 150.3(C-9), 147.5(C-2), 147.4(C-3), 145.1(C-10), 129.7(C-14a), 128.7(C-12a), 127.7(C-8a), 126.8(C-4a), 123.9(C-12), 111.3(C-4), 110.9(C-11), 108.5(C-1), 60.2($-\text{OCH}_3$), 59.3(C-14), 56.1($-\text{OCH}_3$), 55.9($-\text{OCH}_3$), 55.8($-\text{OCH}_3$), 54.0(C-8), 51.5(C-6), 36.4(C-13), 29.1(C-5)。以上数据与文献[6, 8]比较, 鉴定为四氢巴马汀(tetrahydropalmatine)。

化合物 IV: 白色粉末, ESI-MS (m/z): 353 $[\text{M}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.90(1H, s, H-1), 6.70(1H, d, $J=7.0$ Hz, H-12), 6.68(1H, d, $J=7.0$ Hz, H-11), 6.65(1H, s, H-4), 5.95(2H, s, $\text{O-CH}_2\text{-O}$), 5.93(2H, s, $\text{O-CH}_2\text{-O}$), 3.58(2H, br s, H-8), 2.53(4H, br s, H-5, H-6), 1.92(3H, s, $-\text{NCH}_3$)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 195.0(C-14), 148.0(C-3), 146.3(C-2), 146.0(C-9), 145.9(C-10), 136.2

(C-4a), 132.8(C-14a), 129.0(C-12a), 125.1(C-12), 117.9(C-8a), 110.5(C-4), 108.2(C-1), 106.8(C-11), 101.2(–OCH₂O–), 100.9(–OCH₂O–), 57.8(C-6), 50.8(C-8), 46.5(C-13), 41.5(–NCH₃), 31.8(C-5)。以上数据与文献[6, 9]比较, 鉴定为原阿片碱(proto-pine)。

化合物V: 白色柱状结晶, mp 175~176 °C; ESI-MS(*m/z*): 369[M]⁺。¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃)δ: 6.95(1H, s, H-8), 6.91(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-14), 6.80(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-13), 6.63(1H, s, H-5), 5.93(2H, s, –OCH₂O–), 3.85(3H, s, –OCH₃), 3.78(3H, s, –OCH₃), 3.74(2H, br s, H-18), 3.2~3.4(2H, br s, H-2), 2.4~2.8(4H, br s, H-3, H-11), 1.85(3H, s, N-CH₃)。 ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃)δ: 193.4(C-10), 151.6(C-16), 148.0(C-6), 147.3(C-15), 146.0(C-7), 136.0(C-4), 132.9(C-9), 129.6(C-12), 128.6(C-17), 127.7(C-13), 110.6(C-14), 110.4(C-8), 109.3(C-5), 101.2(–OCH₂O–), 60.8(–OCH₃), 57.5(C-2), 55.6(–OCH₃), 50.1(C-18), 46.3(C-11), 41.2(–NCH₃), 32.4(C-3)。以上数据与文献[10]比较, 鉴定为α-别隐品碱(α-allocryptopine)。

化合物VI: 白色粉末, ESI-MS(*m/z*): 342 [M+H]⁺。 ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆)δ: 8.69(1H, s), 6.88(2H, s), 6.70(1H, s), 6.64(1H, s), 4.05(1H, d, *J*=15.5 Hz), 3.77(3H, s), 3.74(3H, s), 3.72(3H, s), 3.34(2H, m), 3.14(2H, m), 2.89(1H, m), 2.51(3H, m)。 ¹³C-NMR(125 MHz, DMSO-*d*₆)δ: 150.3(C-9), 146.5(C-10), 145.1、144.9(C-2 和 C-3), 130.4(C-14a), 128.8(C-12a), 128.1(C-8a), 125.2(C-4a), 124.2(C-12), 112.9(C-4), 112.4(C-11), 111.7(C-1), 60.0、59.0(C-14, 9-OCH₃), 56.2、56.0(2×OCH₃), 53.9(C-8), 51.7(C-6), 36.3(C-13), 29.0(C-5)。以上数据与文献[8]比较, 鉴定为四氢非洲防己碱(tetrahydrocolumbamine)。

化合物VII: 黄色针状结晶, ESI-MS(*m/z*): 366 [M]⁺。 ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃)δ: 10.15(1H, s, H-8), 7.93(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-11), 7.87(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-12), 7.17(1H, s, H-1), 6.93(1H, s, H-4), 5.03(2H, t, H-6), 4.24(3H, s, –OCH₃), 4.07(3H, s, –OCH₃), 4.07(3H, s, –OCH₃), 3.95(3H, s, –OCH₃), 3.21(2H, t, *J*=5.5 Hz, H-5), 2.97(3H, s, –CH₃)。 ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃)δ: 151.3(C-9), 150.4(C-3), 147.8(C-2), 145.9(C-10), 145.4

(C-8), 136.5(C-14), 133.8(C-12a), 131.9(C-4a), 129.1(C-13), 125.5(C-11), 121.6(C-8a), 120.1(C-12), 119.2(C-14a), 114.0(C-1), 110.7(C-4), 62.6(–OCH₃), 57.5(C-6), 57.0(–OCH₃), 56.5(–OCH₃), 56.3(–OCH₃), 28.1(C-5), 18.0(–CH₃)。以上数据与文献[9]比较, 鉴定为去氢紫堇碱(dehydrocorydaline)。

化合物VIII: 黄色针晶, mp 154~160 °C; 与碘化铋钾反应呈阳性。其 TLC 与小檗碱对照品对照一致, 与标准品混合后熔点不下降, 鉴定为小檗碱(berberine)。

化合物IX: 黄色针状结晶, ESI-MS(*m/z*): 352[M]⁺。 ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD)δ: 9.75(1H, s, H-8), 8.80(1H, s, H-13), 8.09(1H, d, *J*=9.0 Hz, H-11), 8.00(1H, d, *J*=9.1 Hz, H-12), 7.63(1H, s, H-4), 7.03(1H, s, H-1), 4.94(2H, t, *J*=6.5 Hz, H-6), 4.20(3H, s, –OCH₃), 4.09(3H, s, –OCH₃), 3.99(3H, s, –OCH₃), 3.93(3H, s, –OCH₃), 3.28(2H, t, *J*=6.5 Hz, H-5)。 ¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD)δ: 152.3(C-3), 150.5(C-9), 149.4(C-2), 144.9(C-8), 144.2(C-10), 138.3(C-14), 133.8(C-12a), 128.6(C-4a), 126.7(C-13), 123.1(C-12), 121.8(C-14a), 119.9(C-11), 119.0(C-8a), 110.7(C-4), 108.5(C-1), 61.1(–OCH₃), 56.2(C-6), 55.9(–OCH₃), 55.6(–OCH₃), 55.2(–OCH₃), 26.4(C-5)。以上数据与文献[9]比较, 鉴定为巴马汀(palmatine)。

3.2 QR 诱导活性筛选结果

延胡索中9种生物碱的QR诱导活性测试结果见表1。

表1 延胡索中9种生物碱的QR诱导活性测试结果

Tab 1 Activities of nine alkaloids from *Corydalis Rhizoma* in the QR induction and crystal violet assays in Hepa 1c1c7 cells

化合物	筛选浓度 /μmol·L ⁻¹	QR 诱导活性 (相当于对照组的倍数)	细胞存活率/%
I	20	1.42±0.08	86.9±5.0
II	20	<1 ¹⁾	98.6±1.4
III	20	<1	95.4±2.6
IV	20	<1	92.8±9.7
V	20	<1	103.3±3.1
VI	20	1.54±0.09	90.2±4.0
VII	20	<1	82.4±6.4
VIII	20	<1	101.3±3.9
IX	20	<1	106.8±8.2
4'-溴黄酮 ²⁾	20	2.32±0.06	102.1±6.6

注: 1)测试结果<1 说明没有 QR 诱导活性; 2)4'-溴黄酮为阳性对照

Note: 1)Test compound had no activity if its value was lower than 1; 2)4'-bromoflavone was tested as the positive control

表 1 筛选结果表明化合物 I (*d*-紫堇碱)和化合物 VI(四氢非洲防己碱)均显示一定的 QR 诱导活性, 且在具有 QR 诱导活性的浓度条件下($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)无明显细胞毒作用, 这正符合肿瘤化学预防剂低毒、高效的要求。从这一点说, *d*-紫堇碱和去氢非洲防己碱有一定的应用前景, 可作为潜在有效的肿瘤化学预防剂进行更加深入的机制和相关方面研究。

4 结论

本研究运用色谱学和波谱学方法从中药延胡索中分离鉴定了 9 个生物碱类成分, 分别为 *d*-紫堇碱(I)、去氢海罂粟碱(II)、四氢巴马汀(III)、原阿片碱(IV)、 α -别隐品碱(V)、四氢非洲防己碱(VI)、去氢紫堇碱(VII)、小檗碱(VIII)、巴马汀(IX)。在随后的 QR 诱导活性筛选中, *d*-紫堇碱(I)和四氢非洲防己碱(VI)显示出一定活性。这是首次对延胡索中的生物碱类成分进行的 QR 诱导活性研究, 其结果具有一定意义, 可为肿瘤化学预防剂的开发提供一定理论和实验基础。

REFERENCES

[1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 130.

- [2] TAO Y W, TIAN G Y. Studies on the physicochemical properties, structure and antitumor activity of polysaccharide YhPS-1 from the root of *Corydalis yanhusuo* Wang [J]. Chin J Chem, 2006, 24(2): 235-239.
- [3] BELINSKY M, JAISWAL A K. NAD(P)H: quinine oxidoreductase 1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues [J]. Cancer Metastasis Rev, 1993, 12(2): 103-117.
- [4] BEGLEITER A, LEITH M K, CRUPHEY T J, et al. Induction of DT-diaphorase in cancer chemoprevention and chemotherapy [J]. Oncol Res, 1997, 9(6/7): 371-382.
- [5] MAJUMDER P L, BANERJEE S, SEN S. Three stilbenoids from the orchid *Agrostophyllum callosum* [J]. Phytochem, 1996, 42(3): 847-852.
- [6] XU X H, WANG Z T, YU G D, et al. Alkaloids from Rhizoma *Corydalis* [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2002, 33(6): 483-486.
- [7] FU X Y, LIANG W Z, TU G T. Chemical study of alkaloids from Rhizoma *Corydalis* [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1986, 21(6): 447-453.
- [8] HU T T, ZHANG X, MA S Z, et al. Chemical constituents from *Corydalis yanhusuo* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(15): 1917-1920.
- [9] YU D Q, YANG J S. Handbook of Analytical Chemistry(分析化学手册) [M]. Vol 7. Beijing: Chemical Industry Press, 1999: 690-692.
- [10] WANG Q Z, LIANG J Y, YUAN Y. Chemical constituents of *Corydalis saxicola* [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2007, 5(1): 31-34.

收稿日期: 2010-07-19