

& 167. 6(C-7), 150. 1(C-4), 145. 0(C-3), 122. 0(C-1, 6), 116. 7(C-2), 115. 3(C-5)。以上数据与文献报道的原儿茶酸一致^[5], 故鉴定化合物3为原儿茶酸。

化合物4: 无色针晶, 溴甲酚蓝反应阳性, mp 210~211 °C。¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) & 11. 88(1H, br s, -COOH), 7. 50(2H, d, *J*=7. 2 Hz, H-3, 5), 6. 88(2H, d, *J*=7. 2 Hz, H-3, 5), 7. 47(1H, d, *J*=16. 0 Hz, H-7), 6. 28(1H, d, *J*=16. 0 Hz, H-8); ¹³C-NMR(75 MHz, DMSO-*d*₆) & 168. 0(C-9), 159. 7(C-1), 144. 2(C-7), 130. 2(C-3, 5), 125. 4(C-1), 115. 8(C-2, 6), 115. 5(C-8)。以上数据与文献报道的对羟基桂皮酸一致^[6], 故鉴定化合物4为对羟基桂皮酸。

化合物5: 无色针晶, 溴甲酚蓝反应阳性。¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) & 8. 50(1H, s, H-2), 8. 16(2H, d, *J*=7. 8 Hz, H-4, 6), 7. 63(1H, t, *J*=7. 8 Hz, H-5); ¹³C-NMR(125 MHz, DMSO-*d*₆) & 166. 8(-COOH), 131. 0(C-2), 133. 3(C-1, 3), 129. 0(C-4, 6), 130. 4(C-5)。以上数据与文献报道的间羧基苯甲酸一致^[7], 故鉴定化合物5为间羧基苯甲酸。

化合物6: 无色针晶, 溴甲酚蓝反应阳性, mp 210. 0~213. 2 °C。¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) & 12. 20(1H, br s, -COOH), 9. 85(1H, br s, -OH), 7. 43(1H, dd, *J*=8. 7, 2. 7 Hz, H-6), 7. 42(1H, d, br s, H-2), 6. 84(1H, d, *J*=8. 7 Hz, H-5), 3. 80

(3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR(75 MHz, DMSO-*d*₆) & 167. 3(-COOH), 151. 1(C-4), 147. 3(C-3), 123. 5(C-6), 121. 7(C-1), 115. 1(C-2), 112. 8(C-5), 55. 6(-OCH₃)。以上数据与文献报道的香草酸一致^[8], 故化合物6鉴定为香草酸。

化合物7: 无色柱晶, 溴甲酚绿反应阳性, mp 184~187 °C。¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) & 12. 12(2H, br s, -COOH), 2. 39(4H, m, H-2, 3)。以上数据与文献报道的丁二酸一致^[9], 故化合物7鉴定为丁二酸。

参考文献:

- [1] Shen L R, Jin S M, Yin B W, *et al.* Chemical constituents of plants from the genus *Cerbera* [J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(7): 1438-1449
- [2] 张小坡, 张俊清, 刘明生, 等. 海芒果茎皮化学成分的研究[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1138-1140
- [3] Kim Y, Cho J Y, Kuk J H, *et al.* Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean [J]. *Curr Microbiol*, 2004, 48: 312-317
- [4] 李药兰, 戴杰, 黄伟欢, 等. 黄花倒水莲化学成分及其抗病毒活性[J]. 中草药, 2009, 40(3): 345-348
- [5] 唐丽, 李国玉, 杨炳友, 等. 广枣化学成分的研究[J]. 中草药, 2009, 40(4): 541-543
- [6] 蔡金艳, 宫立孟, 张惠勇, 等. 金钱莲化学成分的研究[J]. 中成药, 2008, 31(3): 370-372
- [7] 刘艳南, 苏试文, 朱挺儒. 翻白草化学成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 1983, 18: 17-23
- [8] 陈艳, 张国刚, 毛德双. 半枝莲化学成分的研究(I) [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(1): 48-50
- [9] 袁珂, 吕洁丽, 贾安. 含羞草化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志, 2006, 46(17): 1293-1295

8-烷基-13-溴代盐酸小檗碱合成及对人肝癌细胞株增殖的影响

阳平^{1,3}, 叶小利², 朱家颖¹, 朱小康¹, 李学刚^{1*}

(1 西南大学药学院, 重庆 400716; 2 西南大学生命科学院, 重庆 400716; 3 西南大学食品学院, 重庆 400716)

摘要: 目的 为了进一步提高小檗碱的抗肿瘤活性, 对小檗碱进行了烷基化, 为开发新抗肿瘤药物奠定基础。方法 以盐酸小檗碱为起始原料, 经格氏试剂烷基化及溴代反应, 合成一系列8-烷基-13-溴代盐酸小檗碱, 经UV、IR、¹H-NMR和元素分析进行结构鉴定。用四甲基偶氮唑盐(MTT)法观测产物对人肝癌细胞 HepG2 增殖能力的影响。结果 发现该细胞对目标产物的敏感性与碳链长度有很大关系, 其中8-辛基-13-溴代盐酸小檗碱对该细胞的敏感性最强, 在浓度为32 μg/mL时抑制率为96.82%, IC₅₀为3.33 μg/mL。结论 从IC₅₀可知在8个碳原子以内, 随着溴代小檗碱侧链的增长, 抗癌活性增强。

关键词: 盐酸小檗碱; 烷基化; 溴代; 细胞毒性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1765-06

①收稿日期: 2010-05-30

基金项目: 重庆市重大科技专项资助项目(CSTC, 2008AA5021); 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2008BB5257); 重庆市科委攻关项目(CSTC, 2010AC5007)

作者简介: 丁阳平(1978—), 男, 土家族, 湖南永顺人, 西南大学食品学院讲师, 博士生, 主要从事天然产物研究与开发。

Tel: 13883341918 E-mail: barry4784088@126.com

* 通讯作者 李学刚 Tel: 13808310978 E-mail: xuegangli2000@yahoo.com.cn

Synthesis of 8-alkyl-13-bromo berberine hydrochloride derivatives and their effect on proliferation of human HepG2 cell line

DING Yang-ping^{1,3}, YE Xiao-li², ZHU Jia-ying¹, ZHU Xiao-kang¹, LI Xue-gang¹

(1 School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2 School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400716, China; 3 School of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: **Objective** To study the antitumor activity of berberine which was alkylated based on the development of new antitumor drug. **Methods** The alkylation and bromination of berberine were performed with Grignard reagent and bromine respectively to give 8-alkyl-13-bromo berberine derivatives in good to excellent yields. The chemical structures of the derivatives were identified by UV, IR, ¹H-NMR, and elemental analysis. The antiproliferative effect of the derivatives on human hepatoma cell line HepG2 was evaluated by MTT after 48 h incubation. **Results** The results showed that the length of carbon chain of the derivatives was highly correlated with the tumor cell sensitivity and 8-octyl-13-bromo berberine showed the remarkable activity. Its inhibitory rate was 96.82% at the concentration of 32 μg/mL and IC₅₀ was 3.33 μg/mL. **Conclusion** Known from IC₅₀, the antitumor activity could be enhanced within eight carbon atoms as the bromide side chain extension.

Key words: berberine hydrochloride; alkylate; bromize; cytotoxicity

盐酸小檗碱是季铵型异喹啉生物碱中的一种,为黄连的主要活性成分。大量研究表明盐酸小檗碱除了传统抗菌作用以外,也具有明显的抗肿瘤作用^[1-5],作用机制包括降低S期肿瘤细胞并增加G₂/M期细胞数量,从而抑制细胞增殖^[6-7];诱导肿瘤细胞凋亡^[8-10];降低细胞内源致癌基因的表达^[11];抑制与细胞癌变相关酶的活性,如逆转录酶^[12]、拓扑异构酶^[13-14]、端粒酶等^[10]。为了进一步提高小檗碱抗肿瘤活性,本实验对小檗碱进行烷基化,以期寻找更好的肿瘤细胞抑制剂,为开发抗肿瘤药物奠定基础。

1 材料

1.1 细胞、试剂与药品:盐酸小檗碱(西安小草科技有限公司,质量分数为98%)、青霉素、链霉素(华北制药有限公司)、人肝癌胚胎瘤细胞 HepG2(中国典型培养物保藏中心)、特级胎牛血清、RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、胰蛋白酶(Sigma 公司)、DMSO-d₆、甲醇、冰醋酸、石油醚、NaCl 和聚山梨酯 80。所用化学试剂如未特别说明时均为分析纯。

1.2 仪器:Perkin—Elmer 16PC-FT 型红外分光光度仪(KBr 压片)、元素分析仪(Perkin Elmer 2400 型)、Bruker ARX—300 型核磁共振仪(DMSO-d₆ 为溶剂,TMS 为内标)、超净工作台(苏州金燕净化设备有限公司)、高压灭菌锅、RE—52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、二氧化碳培养箱(WJ—80B—II,南京莱步科技实业有限公司)、酶标仪(北京普朗公司)、电子天平(YP15K,上海光学仪器

厂)、48 微孔板(广州新中纬仪器设备有限公司)、玻璃点样毛细管(华西医科大学仪器厂)、核磁管。

2 合成方法

2.1 8-烷基-13-溴代-盐酸小檗碱及 13-溴代-盐酸小檗碱合成路线见图 1。

2.2 8-烷基-盐酸小檗碱的合成:取溴代烷 0.3 mol 溶于 300 mL 脱水四氢呋喃(THF)中,随后再加入 0.33 mol 镁屑,加热沸腾 2~4 h,制成相应的格氏试剂,再将 0.15 mol 小檗碱悬浮于 200 mL THF 中,室温下将格氏试剂迅速加入(注意防止爆沸),冷却后缓慢加入 15 mL 水除去多余的格氏试剂,离心后沉淀用 200 mL THF 分 3 次洗涤,合并滤液、浓缩得 8-烷基二氢盐酸小檗碱,将所得 8-烷基二氢盐酸小檗碱溶于热冰醋酸中,待冷却后缓慢加入等物质的量的溴,滤过,用少量石油醚洗掉残留的溴代烷,再加入具有 AgCl 的热甲醇溶液即可将溴化物中间体转化为相应的盐酸盐,甲醇重结晶,即得产物。TLC 初步定性鉴定。

2.3 盐酸小檗碱及烷基-盐酸小檗碱溴代反应体系的选择

2.3.1 底物添加顺序的选择:本实验研究了底物不同添加顺序对合成的影响。(1)顺加:即称取一定量样品溶解于适量冰醋酸中,置于三颈瓶中,然后把液溴与少量冰醋酸混合液慢慢滴加到装有样品的三颈瓶中,磁力搅拌。(2)反加:取一定量液溴与适量冰醋酸混合,置于三颈瓶中,然后称取适量样品,用少量甲酸溶解(盐酸小檗碱用甲酸,烷基盐酸小檗碱

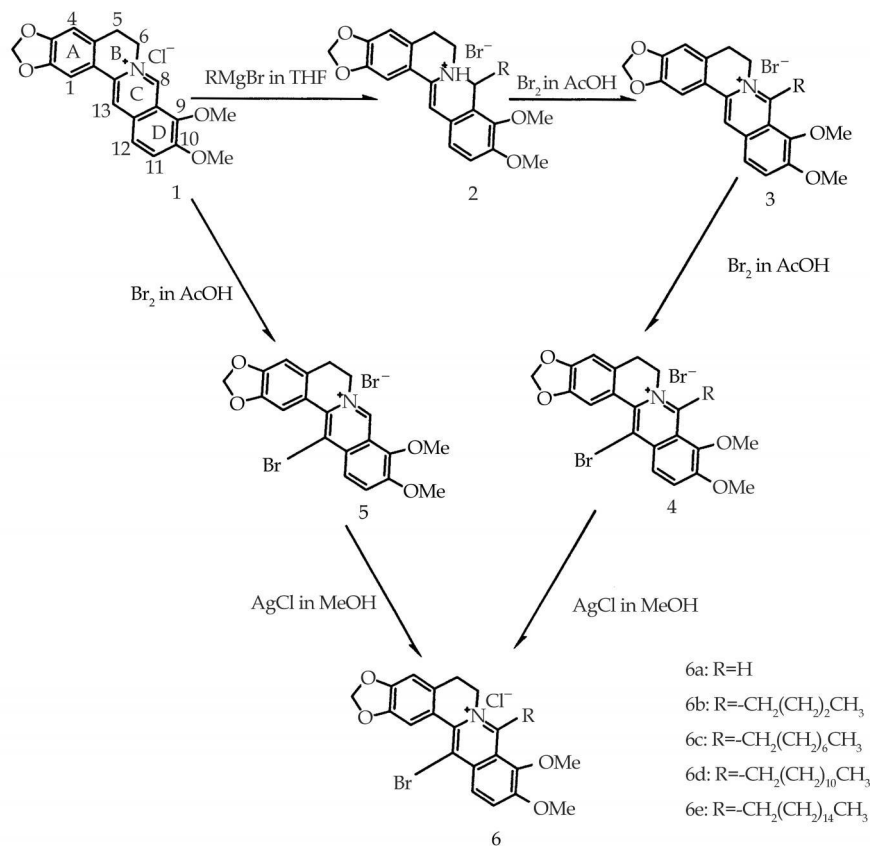


图 1 小檗碱衍生物合成路线

Fig 1 Synthesis route of berberine derivatives

用四氢呋喃, 下同), 慢慢滴加到装有含溴冰醋酸的三颈瓶中, 磁力搅拌。

2.3.2 反应物最佳比例的选择: 取 0.500 0 g 样品、60 mL 冰醋酸, 按溴与样品的物质的量比分别为 1:1、1:3、1:6、1:9、1:1 加入溴, 于 30 °C 条件下按反加顺序操作。计算溴代小檗碱的产率, 选择最佳反应物比例。

2.3.3 最适反应温度的选择: 取 0.500 0 g 样品、60 mL 冰醋酸, 上述最佳反应比例的溴, 按反加顺序分别在 20、30、40、50 °C 条件下反应。计算溴代小檗碱的产率, 选择最适反应温度。

2.3.4 最佳加样量的选择: 分别称取 0.100 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0 g 样品于 60 mL 冰醋酸中, 按上述最佳比例加入溴, 在最适反应温度下按反加顺序操作。计算溴代小檗碱的产率, 选择最佳加样量。

2.3.5 溴酸盐向盐酸盐的转化: 方法同 2.1.2。

2.4 产物结构鉴定

2.4.1 13-溴代-盐酸小檗碱: 黄色针晶, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.21(2H, t, 5-CH₂-), 4.11(6H, s, 9, 10-OCH₃), 4.96(2H, d, 6-CH₂-), 6.19

(2H, s), 7.11(1H, s, 4-Ar-H), 7.80(1H, s, 1-Ar-H), 8.52(1H, s, 11-Ar-H), 8.54(s, 12-Ar-H), 9.86(1H, s, 8-Ar-H); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3413, 2946, 2059, 1634, 1561, 1480, 1422, 1381, 1363, 1233, 1212, 1142, 1063, 1036, 930, 831, 595; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (lg ε) nm: 206(1.65)、231(1.25)、266(0.8)、350(0.79)、427(0.25); EA (C₂₀H₁₇NClBrO₄): 理论值 C 53.27, H 3.77, N 3.11; 实测值 C 53.40, H 3.64, N 3.21。

2.4.2 8-丁基-13-溴代-盐酸小檗碱: 黄色针晶, ¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.19(1H, 3H), 1.99(2H, m), 2.04(2H, m), 3.15(2H, t, 5-CH₂-), 3.77(2H, t), 4.04(3H, s, 9-OCH₃), 4.10(3H, s, 10-OCH₃), 4.84(2H, d, 6-CH₂-), 6.18(2H, s), 7.13(1H, s, 4-Ar-H), 7.75(1H, s, 1-Ar-H), 8.43(1H, s, 11-Ar-H), 8.54(s, 12-Ar-H); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3433, 2958, 2049, 1627, 1627, 1548, 1508, 1484, 1408, 1377, 1231, 1178, 1150, 1083, 1063, 1037, 949, 877, 598; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (lg ε) nm: 206(1.5)、231(1.25)、266(1.0)、350(0.85)、427(0.25); EA (C₂₄H₂₅NClBrO₄): 理论值 C 56.86, H

4 94, N 2 76; 实测值 C 56 79, H 4 98, N 2 78。

2 4 3 8-辛基-13-溴代-盐酸小檗碱: 黄色针晶, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.88 (3H, d), 1.30~1.33 (8H, m), 1.58 (2H, m), 1.80 (2H, m), 3.16 (2H, t, 5- CH_2 -), 3.74 (2H, t), 4.05 (3H, s, 9- OCH_3), 4.11 (3H, s, 10- OCH_3), 4.84 (2H, d, 6- CH_2 -), 6.18 (2H, s), 7.14 (1H, s, 4-Ar-H), 7.76 (1H, s, 1-Ar-H), 8.43 (1H, s, 11-Ar-H), 8.54 (s, 12-Ar-H); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 410, 2 925, 2 853, 2 048, 1 627, 1 605, 1 548, 1 508, 1 408, 1 377, 1 344, 1 283, 1 230, 1 149, 1 125, 1 087, 1 066, 1 036, 955, 935, 880, 822, 723, 600; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (lg ϵ) nm: 211 (1.65), 232 (1.45), 265 (1.2), 352 (1.0), 426 (0.35); EA ($\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NClBrO}_4$): 理论值 C 59.73, H 5.87, N 2.79; 实测值 C 59.69, H 5.91, N 2.48。

2 4 4 8-十二烷基-13-溴代-盐酸小檗碱: 黄色针晶, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.85 (3H, t), 1.26 (16H, m), 1.58 (2H, m), 1.78 (2H, m), 3.16 (2H, t, 5- CH_2 -), 3.75 (2H, t), 4.03 (3H, s, 9- OCH_3), 4.07 (3H, s, 10- OCH_3), 4.81 (2H, d, 6- CH_2 -), 6.17 (2H, s), 7.11 (1H, s, 4-Ar-H), 7.73 (1H, s, 1-Ar-H), 8.41 (1H, s, 11-Ar-H), 8.53 (s, 12-Ar-H); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 421, 2 923, 2 853, 2 047, 1 629, 1 606, 1 550, 1 508, 1 409, 1 379, 1 345, 1 283, 1 231, 1 150, 1 091, 1 062, 1 046, 947, 879, 838, 721, 605; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (lg ϵ) nm: 205 (0.7), 230 (0.5), 266 (0.35), 350 (0.33), 435 (0.1); EA ($\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{NClBrO}_4$): 理论值 C 62.09, H 6.63, N 2.26; 实测值 C 62.19, H 6.71, N 2.20。

2 4 5 8-十六烷基-13-溴代-盐酸小檗碱: 黄红色片状结晶, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.83 (3H, t), 1.24 (24H, m), 1.57 (2H, m), 1.79 (2H, m), 3.15 (2H, t, 5- CH_2 -), 3.73 (2H, t), 4.04 (3H, s, 9- OCH_3), 4.10 (3H, s, 10- OCH_3), 4.83 (2H, d, 6- CH_2 -), 6.18 (2H, s), 7.13 (1H, s, 4-Ar-H), 7.76 (1H, s, 1-Ar-H), 8.43 (1H, s, 11-Ar-H), 8.54 (s, 12-Ar-H); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 409, 2 921, 2 852, 2 043, 1 630, 1 616, 1 606, 1 550, 1 509, 1 409, 1 379, 1 363, 1 345, 1 282, 1 230, 1 151, 1 084, 1 047, 947, 879, 838, 721, 601; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (lg ϵ) nm: 207 (1.58), 232 (1.45), 271 (1.05), 352 (1.01), 430 (0.35); EA ($\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{NClBrO}_4$): 理论值 C 64.05, H 7.26, N 2.07; 实测值 C 64.10, H 7.15, N 2.16。

3 抗肿瘤细胞活性测试

3 1 HepG2 细胞培养: 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 并保持饱和湿度, 每日倒置相差显微镜观察细胞形态及生长情况, 对增殖状况良好的细胞用 0.25% 的胰酶消化并传代。

3 2 MTT 法检测目标产物对肝癌细胞生长的抑制作用: 将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 48 孔培养板中, 每孔 360 μL , 培养箱中孵育 24 h; 待细胞完全贴壁后, 将 48 孔板随机分为若干组, 每组每孔加入 40 μL 样品 (加入后终质量浓度为 2、4、8、16、32、64、128、256 $\mu\text{g/mL}$), 每组设 3 个复孔, 48 h 后吸弃各孔中的培养液, 换上 400 μL 无血清培养液, 同时加入 40 μL MTT (5 mg/mL), 轻振培养板, 孵育 4 h 后, 吸弃上清, 每孔加入二甲基亚砷 400 μL , 摇匀后于酶标仪 490 nm 处检测吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次, 计算细胞抑制率 (抑制率 = $1 - \text{细胞相对活度}$ = $1 - \text{样品处理组 } A_{490} / \text{对照组 } A_{490}$), 用 SPSS 15.0 版计算 IC_{50} 值。

4 结果

4 1 小檗碱及烷基小檗碱溴代反应体系的选择: 在合成化学中, 反应条件的选择非常关键。这不仅关系反应的速度, 而且还影响产物的产率, 故我们要选择最适宜反应体系, 以便达到最佳反应效果。

4 1.1 反应物添加顺序的确定: 由于样品在冰醋酸中的溶解度有限, 若是顺加, 当溴与样品的比例为 1:1 时就有沉淀析出, 而这时没有溴代产物生成, 加热溶解继续加溴的话, 由于温度升高、溴的氧化性增强, 也得不到目标产物, 故采用反加方法。

4 1.2 反应物最佳比例的选择: 选用 4 种反应物比例, 分别为 1:1、3:1、6:1、9:1, 其反应物比例和产率的关系见图 2。可以看出溴与样品的比例为 1:1 时没有溴代产物生成, 两者比例为 3:1 时产率为 10% 左右, 当两者比例达到 6:1 和 9:1 时溴代小檗碱产率不变, 但溴代烷基小檗碱的产率急剧下降, 可能的原因是溴具有很强的氧化性, 而烷基小檗碱的稳定性又不如小檗碱, 故两者最佳添加比例为 6:1。

4 1.3 最适反应温度的选择: 选用 4 个反应温度, 分别为 20、30、40、50 $^{\circ}\text{C}$, 反应温度与产率的关系见图 3。可知反应温度由 20 $^{\circ}\text{C}$ 到 30 $^{\circ}\text{C}$ 时产率增加达 88%, 温度继续上升则产率下降, 其中烷基小檗碱下降更快, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时产率只有 20% 左右, 故 30 $^{\circ}\text{C}$ 为反应最佳温度。

4 1.4 最佳添加量的选择: 在 60 mL 冰醋酸中, 选

择 4 个加样量, 分别为 0. 100 0、0. 250 0、0. 500 0、1. 000 0 g, 加样量与产率关系见图 4。可知加样量为 0. 100 0 g 时产率为 80% 左右, 加样量为 0. 500 0 g 时产率为 85%, 加样量为 1. 000 0 g 时产率为 20%, 故 0. 500 0 g 为最佳加样量。

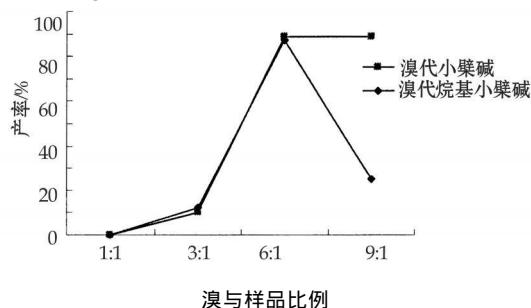


图 2 反应物比例对反应的影响

Fig 2 Influence of proportion on reaction

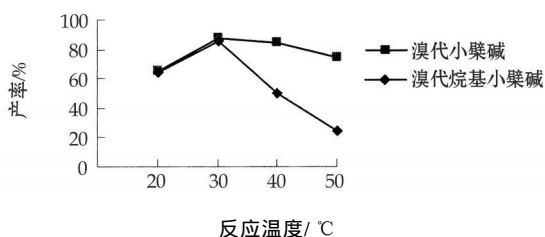


图 3 反应温度对反应的影响

Fig 3 Influence of temperature on reaction

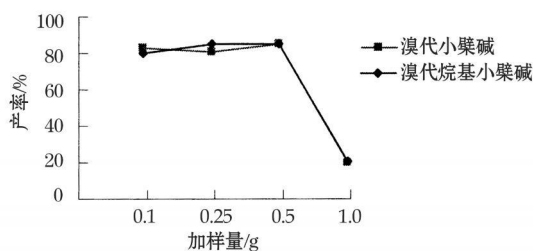


图 4 加样量与产量的关系

Fig 4 Relationship between sample amounts and yield

可知小檗碱及烷基小檗碱的最佳溴代反应体系为反应物比例 6: 1, 反应温度 30 °C, 冰醋酸 60 mL 时加样量为 0. 500 0 g。

4.2 产物结构鉴定: 当盐酸小檗碱烷基化后, 由氢谱可知 8 位上化学位移为 9. 86 的峰会消失, 同时在 δ 0. 8~2. 5、3. 75 处出现了甲基和一系列亚甲基峰, 由于烷基为给电子基团, 使盐酸小檗碱 5、6 位上的亚甲基略微向高场移动, δ 值减小; 红外图谱中波数为 2900 cm^{-1} 附近的峰增强, 并随碳链增长而强度加大; 紫外图谱中最大吸收波长及峰型没有太多变化。

当盐酸小檗碱及烷基盐酸小檗碱引入溴后, 氢谱中 13 位上 δ 为 8. 98 的峰会消失, 由于溴为强吸电子基团, 使邻位 12、11 位上的氢向低场移动, δ 分别由原来的 8. 00、8. 20 变为 8. 54、8. 52; 元素分析

值中的 C、H、N 的实测值跟理论值基本吻合; 红外图谱中波数为 600 cm^{-1} 左右出现了中强度吸收峰; 紫外图谱中最大吸收波长发生了蓝移, 由原来的 230 nm 变为 206 nm, 峰型也发生了改变。

4.3 目标产物对人肝癌细胞株增殖的影响: MTT 法检测目标产物对肝癌细胞生长的抑制作用。实验结果发现, 随着供试样品 6a、6b、6c、6d 质量浓度的增加, 对 HepG2 细胞抑制作用逐渐增强, 并且随着碳链的增加 (8 个碳原子以内) 活性加强, 在质量浓度为 2~32 $\mu\text{g/mL}$ 存在量效关系, 但碳原子数超过 8 个以后, 对癌细胞的抑制作用明显降低, 并且不存在量效关系, 见表 1。

表 1 供试样品对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的影响

Table 1 Anti proliferative effect of derivatives on human hepatoma cell line HepG2

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	目标产物抑制率/%				
	6a	6b	6c	6d	6e
2	21. 14	18. 98	22. 95	18. 98	12. 95
4	39. 32	40. 57	59. 55	45. 34	14. 32
8	43. 07	49. 32	79. 32	50. 23	10. 68
16	44. 55	65. 34	88. 41	63. 18	9. 87
32	54. 89	72. 73	96. 82	64. 89	11. 25
64	62. 39	89. 32	92. 39	59. 66	13. 75
128	69. 20	91. 59	95. 34	62. 27	9. 66
256	83. 52	86. 36	94. 43	57. 73	14. 55
IC ₅₀ (95% 可信区间)	18. 31	8. 17	3. 33	14. 76	—

由表 1 可知 8-辛基-13-溴代-盐酸小檗碱对人肝癌细胞株 HepG2 抑制作用最强, 在质量浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率达 96. 82%, 远远高于其他化合物, 但在高质量浓度条件下, 6a、6b 和 6c 都具有较强的抑制作用。由于长链烷基化合物 6d、6e 水溶性较差 (样品用 0. 8% 聚山梨酯及 2% *N,N*-二甲基甲酰胺溶液配制), 很难达到预设浓度, 因此其作用结果较差, 但不能代表它的真实效果, 因此怎样提高它的溶解性是下一步要研究的内容。IC₅₀ 可反映药物对肿瘤细胞的敏感性, 本研究 IC₅₀ 值用 SPSS 15.0 版计算, 其中 6c 的 IC₅₀ 值最小为 3. 33 $\mu\text{g/mL}$, 其敏感性比 6a 提高了 5 倍, 比 6b 提高了 2 倍, 由于 6d 和 6e 的抑制作用较低、且没有规律, 计算出来的 IC₅₀ 值误差较大。从 IC₅₀ 可知在 8 个碳原子以内, 随着溴代小檗碱侧链的增长, 抗癌活性增强。

5 讨论

盐酸小檗碱是黄连中的主要活性成分, 为了进一步研究和提高盐酸小檗碱的抗肿瘤作用, 本实验将其进行烷基化及溴代修饰, 获得一系列 8-烷基-13-溴代-盐酸小檗碱, 其结构经 UV、IR、¹H-NMR 和

元素分析进行确认。在研究溴代反应条件时, 本实验对产物的添加顺序、反应温度和加样量等因素进行了分析, 其中产物的添加顺序和反应温度是影响产物产率的关键因素, 当溴与样品采用顺加方式, 溴还未达到有效浓度样品就析出沉淀, 这样会导致产率降低, 甚至反应失败, 过早析出沉淀的可能原因是溴的加入会降低小檗碱在冰醋酸中的溶解度。本实验采用反加的方法能很好地解决这一问题, 刚加入的样品在高浓度溴的环境中很快转变为目标产物, 并且在目标产物达到饱和浓度以后会析出沉淀, 这样既简化了产物回收手段, 避免使用柱色谱分析, 又大大提高了产物产率。另外一个重要因素就是反应温度, 由于溴本身具有很强的氧化性, 在高温条件下其氧化性迅速增强, 并且在研究过程中发现, 不同底物稳定性不一样, 盐酸小檗碱大于烷基盐酸小檗碱, 其中烷基盐酸小檗碱又以 8-辛基-盐酸小檗碱稳定性最差, 在相同高温条件下 8-辛基-13-溴代-盐酸小檗碱产率最低。通过比较不同温度对产物产率的影响发现, 本实验的最高临界温度为 40℃, 反应最适温度为 30℃。

为了研究合成目标产物的抗癌活性, 本实验考察了其对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的影响, 结果发现碳链长度对该细胞的抑制起重要作用, 其中 8-辛基-13-溴代-盐酸小檗碱的活性最强, IC_{50} 为 3.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据抗肿瘤药物药效学指导原则规定: 体外试验 $IC_{50} \leq 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ (合成药) 或 $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g}/\text{mL}$ (植物药提取物), 则认为有一定抑制作用, 因此 6c 对该癌细胞增殖具有较强抑制作用。可能的机制是, 有效长度的烷基链能更好地帮助化合物 6c 进入肿瘤细胞, 并插入 DNA 螺旋分子中, 阻碍 DNA 复制, 从而抑制肿瘤细胞增殖^[5-6], 6c 的细胞毒性作用及作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 林 菁. 小檗碱对 K562 细胞生长的抑制作用 [J]. 福建医

学院学报, 1996, 30(4): 309-311

- [2] Wu S N, Yu H S, Jan C R, *et al.* Inhibitory effects of berberine on voltage and calcium activated potassium currents in human myeloma cells [J]. *Life Sci*, 1998, 62(25): 2283-2294
- [3] Chi C W, Chang Y F, Chao T W, *et al.* Flowcytometric analysis of the effect of berberine on the expression of glucocorticoid receptors in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Life Sci*, 1994, 54(26): 2099-2107
- [4] Kettmann V, Kostalova D, Jantova S, *et al.* *In vitro* cytotoxicity of berberine against HeLa and L1210 cancer cell lines [J]. *Pharmazie*, 2004, 59(7): 548-551
- [5] 章 涛, 李荏清, 杨俊卿, 等. 小檗碱抑制人乳腺癌 MDA-MB 231 细胞增殖及其与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的关系 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 244-247
- [6] Kuo C L, Chou C C, Yung B Y. Berberine complexes with DNA in berberine induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells [J]. *Cancer Lett*, 1995, 93(2): 193-200
- [7] Jantova S, Cipak L, Cernakova M, *et al.* Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in HeLa and L1210 cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(8): 1143-1149
- [8] 陈冠林, 谭宇蕙, 徐 勤, 等. 盐酸小檗碱诱导人胃癌 MGC 803 细胞凋亡的研究 [J]. 中药药理学与临床, 2000, 16(5): 16-17
- [9] 陈蔚文, 李燕红, 郭淑杰, 等. 小檗碱对人胃癌 MGC 803 细胞生长抑制及诱导凋亡的作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(1): 40
- [10] Wu H L, Hu C Y, Liu W H, *et al.* Berberine induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells is associated with down regulation of nucleophosmin/B23 and telomerase activity [J]. *Int J Cancer*, 1999, 81(6): 923-929
- [11] Chang K S. Down regulation of c-Ki ras2 gene expression associated with morphologic differentiation in human embryonal carcinoma cells treated with berberine [J]. *J Formos Med Assoc*, 1991, 90(1): 10-14
- [12] Manohar L S. Enzyme inhibition: inhibition of reverse transcriptase activity by protoberberine alkaloids and structure activity relationships [J]. *J Pharm Sci*, 1983, 72(5): 538-541
- [13] Gatto B, Sanders M M, Yu C, *et al.* Identification of topoisomerase I as the cytotoxic target of the protoberberine alkaloid coralyne [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(12): 2795-2800
- [14] Sanders M M, Liu A A, Li T K, *et al.* Selective cytotoxicity of topoisomerase directed protoberberines against glioblastoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 56(9): 1157-1166