

岩黄连的抗乙肝病毒活性成分研究

吴颖瑞^{1*}, 马云宝², 赵友兴², 姚淑英², 周俊², 龚庆芳¹, 陈继军²

1. 中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006

2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 研究岩黄连 *Corydalis saxicola* 生物碱中具有抗乙肝病毒活性的化学成分。方法 利用柱色谱法分离纯化岩黄连总生物碱中的化学成分, 根据化合物的理化性质与波谱数据进行结构鉴定; 利用 HepG 2.2.15 细胞株对质量分数较高的化学成分进行抗乙肝病毒活性试验。结果 从岩黄连总生物碱中分离鉴定了 16 个生物碱, 分别为二氢血根碱 (1)、*d*-紫堇碱 (2)、旋卡文定碱 (3)、stylopine (4)、6-丙酮基-5, 6-二氢血根碱 (5)、二氢白屈菜红碱 (6)、四氢巴马汀 (7)、adlumidine (8)、(-)-salutaridine (9)、巴马汀 (10)、原阿片碱 (11)、小檗碱 (12)、coptisine (13)、thalifaurine (14)、dehydroapocavidine (15) 和木兰花碱 (16)。对质量分数较高的化合物 5、6、8~11、13、16 进行抗乙肝病毒活性试验, 结果表明化合物 5、8 活性一般, 化合物 11、16 活性较弱, 化合物 6 对 HBV 具有较强的抑制作用, 化合物 9 次之。结论 化合物 1、4~6、8、9、13、14 和 16 均为首次从该药用植物分离得到, 化合物 10 的质量分数较高, 是该植物的主要成分, 化合物 6 对 HBV 抑制活性较强, 可能是该植物主要的活性成分。

关键词: 岩黄连; 生物碱; 二氢白屈菜红碱; 巴马汀; 抗乙肝病毒活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0032-06

Anti-hepatitis virus constituents from *Corydalis saxicola*

WU Ying-rui¹, MA Yun-bao², ZHAO You-xing², YAO Shu-ying², ZHOU Jun², GONG Qing-fang¹, CHEN Ji-jun²

1. Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: **Objective** To study the anti-HBV constituents from *Corydalis saxicola*. **Methods** The constituents were repeatedly purified by column chromatography and were identified on the basis of spectral analysis and comparison of their spectral data with those previously reported. Compounds isolated in large amounts were assayed against HBV. **Results** Sixteen compounds were identified to be dihydrosanguinarine (1), *d*-corydaline (2), cavidine (3), stylopine (4), 6-acetonyl-5, 6-dihydrosanguinarine (5), dihydrochelerythrine (6), tetrahydropalmatine (7), adlumidine (8), (-)-salutaridine (9), palmatine (10), protopine (11), berberine (12), coptisine (13), thalifaurine (14), dehydroapocavidine (15), and (+)-magnoflorine (16). Compounds 5, 6, 8—11, 13, and 16 with high amounts were chosen to detect anti-HBV activities. Compounds 5 and 8 were moderately active, compounds 11 and 16 showed weak inhibitory effects, while compound 6 exhibited the most potent activity against HBsAg and HBeAg secretions in HepG 2.2.15 cell line, followed by compound 9. **Conclusion** Compounds 1, 4—6, 8, 9, 13, 14, and 16 are isolated from *C. saxicola* for the first time. Compound 10 is the main constituent and compound 6 exhibits the most potent activity against HBV.

Key words: *Corydalis saxicola* Bunting; alkaloid; dihydrochelerythrine; palmatine; anti-HBV activity

岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting 生长在岩缝中或岩石上, 为罂粟科植物石生黄堇, 其性寒味苦, 具清热解毒、抗炎利湿、止痛等功效, 在广西壮族地区, 民间常用其根治疗肝炎、肝硬化等疾病^[1], 也是目前临床上常用的治疗病毒性肝炎的药物之一。目前对岩黄连的研究主要在岩黄连总生物碱

的药理与临床应用方面, 虽然对其化学研究也有少量报道^[2-3], 但对其相应的抗乙肝病毒活性的报道甚少。为了明确该药用植物与临床应用相对应的活性成分, 更有效地利用该植物资源, 本实验对岩黄连的根进行了化学成分研究, 从岩黄连总生物碱中分离得到 16 个生物碱, 分别鉴定为二氢血根碱

收稿日期: 2011-05-10

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (桂科基 0832021)

作者简介: 吴颖瑞 (1966—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事抗病毒、抗菌的植物活性成分研究。Tel: (0773)5672238 E-mail: wyrui@gxib.cn

(dihydrosanguinarine, **1**)、*d*-紫堇碱(corydaline, **2**)、消旋卡文定碱(cavidine, **3**)、stylopine (**4**)、6-丙酮基-5, 6-二氢血根碱(6-acetonyl-5, 6-dihydrosanguinarine, **5**)、二氢白屈菜红碱(dihydrochelerythrine, **6**)、四氢巴马汀(tetrahydropalmatine, **7**)、adlumidine (**8**)、(-)-salutaridine (**9**)、巴马汀(palmatine, **10**)、原阿片碱(protopine, **11**)、小檗碱(berberine, **12**)、coptisine (**13**)、thalifaurine (**14**)、dehydroapocavidine (**15**)和木兰花碱[(+)-magnoflorine, **16**]。其中, 化合物**1**、**4**~**6**、**8**、**9**、**13**、**14**和**16**均为首次从该药用植物中分离得到。对质量分数较高的化合物**5**、**6**、**8**~**11**、**13**、**16**进行抗乙肝病毒活性试验, 结果表明化合物**5**和**8**活性一般, 化合物**11**、**16**活性较弱, 化合物**6**对HBV具有较强的抑制作用, 化合物**9**对HBV也有一定的抑制作用。

1 仪器与材料

XRC—1型熔点仪; VG Auto spec-3000 或API Qstar Pulsar LC—Q—TOF 质谱仪, Bruker AM—400 (400 MHz/100 MHz) 核磁共振仪, TMS 为内标。柱色谱硅胶(100~200、200~300 目)、薄层色谱硅胶 G 和 GF₂₅₄ 型硅胶为青岛海洋化工产品; Sephadex LH-20 为 Amersham Bioscience 公司产品, RP C-8 硅胶(40~63 μ m) 为 Merck 公司产品。改良碘化铋钾试剂为实验室自配, 所用试剂均为分析纯。HepG 2.2.15 细胞引自解放军(北京)第302医院, 酶标仪为 ELX800 (德国)。拉米夫定(3TC, 阳性药物对照)葛兰素史克(天津)产品, 高糖用 DMEM、G418 为 Gibco 公司产品, MTT、谷氨酸、HEPES 为 Amresco 公司产品, 胎牛血清购自天津血液病研究所, 乙肝表面抗原检测试剂盒为华美生物工程公司产品。

样品 2005 年 5 月采自广西东兰县, 由中国科学院昆明植物所周俊教授鉴定为罂粟科植物岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting 的根。

2 化学成分研究

2.1 提取与分离

干燥岩黄连根 5.5 kg, 粉碎, 用 95%乙醇 10 L 加热回流提取 3 次, 每次 3h, 滤过后浓缩, 然后用 2% HCl 溶液 8.0 L 浸泡, 滤过。水层用 25% 氨水调 pH 值至 10, 然后用氯仿提取, 得浸膏 93.6 g; 水层再用 10% NaOH 溶液调 pH 值至 12, 用正丁醇萃取, 得浸膏 63.6 g。

氯仿部分(93.6 g)经硅胶干柱色谱(氯仿-甲醇 2:1), 以 TLC 检测后合并 R_f 相近的部分得到 4 个组分 A~D。组分 A (12.3 g) 经减压柱色谱梯度洗脱(乙醚-醋酸乙酯 15:1, 10:1, 8:1, 5:1, 2:1), 得化合物 **1** (19 mg)、**2** (43 mg)、**3** (26 mg)、**4** (11 mg)、**5** (22 mg) 和 **6** (60 mg)。用同样方法从组分 B (氯仿-丙酮 15:1, 10:1, 5:1, 3:1) 中得化合物 **7** (34 mg) 和 **8** (142 mg), 从组分 C (氯仿-丙酮 1:1) 中得到化合物 **9** (281 mg)。组分 D (25.9 g) 在溶剂(氯仿-甲醇 1:1)中重结晶, 得化合物 **10** (12.56 g), 母液经减压柱色谱(氯仿-甲醇 9:1, 5:1, 1:1)得化合物 **11** (60 mg) 和 **12** (3 mg)。

正丁醇部分(63.6 g)经干柱柱色谱(氯仿-甲醇-水 7:3:0.50), 分为 5 个组分 E~I。组分 E (17.3 g) 用减压柱色谱(氯仿-甲醇 10:1)得化合物 **13** (125 mg)。用同样方法从组分 F 得化合物 **14** (22 mg) (氯仿-甲醇 4:1), 从组分 G 得化合物 **15** (28 mg) (氯仿-甲醇-丙酮 1:1:1), 组分 H (2.9 g) 经减压柱色谱梯度洗脱(氯仿-甲醇-水 8:2:0.2→6:4:0.4)得化合物 **16** (540 mg)。

2.2 结构鉴定

化合物 **1**: 白色晶体(氯仿-甲醇)。C₂₀H₁₅NO₄; FAB-MS *m/z*: 334 ([M]⁺, 100)。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ : 7.87 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-11), 7.85 (1H, s, H-4), 7.62 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-12), 7.45 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-10), 7.30 (1H, s, H-1), 6.98 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-9), 4.28 (2H, s, H-6), 6.06 (2H, s, OCH₂O-2, 3), 6.03 (2H, s, OCH₂O-7, 8), 2.56 (3H, s, NCH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) δ : 104.8 (C-1), 148.8 (C-2), 148.2 (C-3), 101.1 (C-4), 127.0 (C-14), 142.9 (C-15), 48.7 (C-6), 113.9 (C-17), 145.2 (C-7), 147.8 (C-8), 107.7 (C-9), 116.8 (C-10), 124.9 (C-18), 127.5 (C-16), 120.9 (C-11), 124.5 (C-12), 131.5 (C-13), 41.5 (NCH₃), 101.8 (OCH₂O-2, 3), 102.0 (OCH₂O-7, 8)。以上数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **1** 为二氢血根碱。

化合物 **2**: 黄色晶体(乙醇)。C₂₂H₂₇NO₄; FAB-MS *m/z*: 370 (96), 178 (50)。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ : 7.02 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-12), 6.93 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-11), 6.98 (1H, s, H-1), 6.76 (1H, s, H-4), 4.38 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-8a), 3.97 (3H, s, OCH₃-9), 3.95 (3H, s, OCH₃-3), 3.94 (3H, s, OCH₃-2), 3.93 (3H,

s, OCH₃-10), 3.81 (1H, brs, H-13'), 3.61 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-8b), 3.32 (1H, m, H-13), 3.16 (2H, m, H-6), 2.54 (2H, m, H-5), 0.95 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH₃-13); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) δ : 110.3 (C-1), 148.3 (C-2), 148.8 (C-3), 123.8 (C-4), 129.2 (C-4'), 29.6 (C-5), 51.6 (C-6), 55.0 (C-8), 128.9 (C-8'), 150.6 (C-9), 145.5 (C-10), 112.5 (C-11), 124.5 (C-12), 128.9 (C-12'), 38.7 (C-13), 66.3 (C-13'), 135.3 (C-13''), 55.8 (OCH₃-2), 56.0 (OCH₃-3), 60.0 (OCH₃-9), 55.7 (OCH₃-10), 18.2 (CH₃-13)。以上数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **2** 为 *d*-紫堇碱。

化合物 **3**: 褐色固体 (甲醇)。C₂₁H₂₃NO₄; FAB-MS m/z : 354 (100)。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ : 6.97 (1H, s, H-4), 6.87 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-11), 6.77 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-12), 6.76 (1H, s, H-1), 5.99 (2H, d, J = 18.0 Hz, OCH₂O-9, 10), 4.12 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-8a), 3.77 (3H, s, -OCH₃), 3.73 (3H, s, -OCH₃), 3.68 (1H, d, J = 4.3 Hz, H-13'), 3.49 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-8b), 3.03 (1H, dd, J = 4.3, 6.8 Hz, H-13), 2.53~3.31 (4H, m, H-5, 6), 1.15 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH₃-13); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) δ : 107.1 (C-1), 146.5 (C-2), 145.8 (C-3), 110.2 (C-4), 128.8 (C-4'), 29.6 (C-5), 51.5 (C-6), 53.8 (C-8), 117.4 (C-8'), 146.0 (C-9), 143.6 (C-10), 112.5 (C-11), 123.3 (C-12), 136.6 (C-12'), 38.9 (C-13), 63.4 (C-13'), 129.0 (C-13''), 101.6 (OCH₂O-9, 10), 55.9 (-OCH₃), 56.3 (-OCH₃), 19.0 (CH₃-13)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物 **3** 为消旋卡文定碱。

化合物 **4**: 黄色晶体 (甲醇)。C₁₉H₁₇NO₄; FAB-MS m/z : 324 (100)。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ : 6.92 (1H, s, H-1), 6.82 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-12), 6.70 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-11), 6.64 (1H, s, H-4), 5.99 (2H, d, J = 5.4 Hz, OCH₂O-2, 3), 5.95 (2H, d, J = 5.4 Hz, OCH₂O-9, 10), 4.10 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-8a), 3.40 (1H, brs, H-13'), 3.38 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-8b), 3.07 (1H, m, H-13a), 2.71 (1H, m, H-13b), 2.47~3.06 (4H, m, H-5, 6); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) δ : 107.0 (C-1), 143.7 (C-2), 146.5 (C-3), 117.7 (C-4), 128.3 (C-4'), 29.9 (C-5), 51.4 (C-6), 53.3 (C-8), 117.7 (C-8'), 146.7 (C-9), 145.5 (C-10), 107.1 (C-11), 121.5 (C-12), 129.4 (C-12'), 36.9 (C-13), 60.1 (C-13'), 131.4 (C-13''), 101.3 (OCH₂O-2, 3), 101.6 (OCH₂O-9, 10)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **4** 为

stylophine。

化合物 **5**: 无色针状晶体 (氯仿-甲醇)。C₂₃H₁₉NO₅, EI-MS m/z : 389 (18), 333 (25), 332 (100)。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.68 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-10), 7.50 (1H, s, H-4), 7.38 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-11), 7.13 (1H, s, H-1), 6.88 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-9), 6.80 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-12), 6.10 (2H, s, H-20), 6.08 (2H, s, H-19), 4.92 (1H, m, H-6), 2.65 (3H, s, NCH₃), 2.64 (1H, dd, J = 15.9, 3.6 Hz, H-1'a), 2.38 (1H, brm, H-1'b), 2.07 (3H, s, H-3'); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 104.3 (C-1), 142.2 (C-2), 147.2 (C-3), 99.8 (C-4), 54.1 (C-6), 148.1 (C-7), 147.6 (C-8), 116.7 (C-9), 107.7 (C-10), 124.2 (C-11), 120.1 (C-12), 138.7 (C-13), 115.6 (C-14), 125.1 (C-15), 130.9 (C-16), 126.9 (C-17), 123.2 (C-18), 101.4 (C-19), 101.7 (C-20), 42.9 (NCH₃), 46.6 (C-1'), 206.3 (C-2'), 30.2 (C-3')。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **5** 为 6-丙酮基-5, 6-二氢血根碱。

化合物 **6**: 黄色晶体 (氯仿-甲醇)。C₂₁H₁₉NO₄; FAB-MS m/z : 350 (100)。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ : 7.92 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-11), 7.89 (1H, s, H-1), 7.70 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-10), 7.65 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-12), 7.38 (1H, s, H-4), 7.05 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-9), 6.06 (2H, s, OCH₂O-2, 3), 4.42 (2H, s, H-6), 3.86 (3H, s, OCH₃-8), 3.78 (3H, s, OCH₃-7), 2.60 (3H, s, NCH₃), 2.64 (1H, dd, J = 15.9, 3.6 Hz, H-1'a), 2.38 (1H, brm, H-1'b), 2.07 (3H, s, H-3'); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) δ : 104.9 (C-1), 148.7 (C-2), 148.4 (C-3), 101.1 (C-4), 127.0 (C-14), 143.2 (C-15), 49.2 (C-6), 126.5 (C-17), 146.7 (C-7), 153.0 (C-8), 111.9 (C-9), 119.2 (C-10), 126.4 (C-18), 124.2 (C-16), 120.8 (C-11), 124.4 (C-12), 131.5 (C-13), 55.8 (OCH₃-7), 60.9 (OCH₃-8), 101.8 (OCH₂O-2, 3), 41.1 (NCH₃), 46.6 (C-1'), 206.3 (C-2'), 30.2 (C-3')。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **6** 为二氢白屈菜红碱。

化合物 **7**: 黄色晶体 (丙酮)。C₂₁H₂₅NO₄; FAB-MS m/z : 356 (100)。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ : 7.02 (1H, s, H-1), 6.96 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-12), 6.87 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-11), 6.75 (1H, s, H-4), 4.41 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8a), 3.87 (3H, s, OCH₃-9), 3.83 (3H, s, OCH₃-3), 3.76 (3H, s, OCH₃-10), 3.73 (3H, s, OCH₃-2), 3.72 (1H, brs, H-13'), 3.61

(1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8b), 3.41 (1H, m, H-13b), 2.78 (1H, m, H-13a), 2.67~3.26 (4H, m, H-5, H-6); ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz) δ : 110.4 (C-1), 148.6 (C-2), 148.4 (C-3), 123.3 (C-4), 127.5 (C-4'), 29.6 (C-5), 51.9 (C-6), 54.6 (C-8), 128.7 (C-8'), 150.8 (C-9), 145.7 (C-10), 111.6 (C-11), 127.6 (C-12), 129.5 (C-12''), 36.9 (C-13), 60.0 (C-13'), 130.7 (C-13''), 55.8 (OCH₃-2), 56.3 (OCH₃-3), 59.8 (OCH₃-9), 55.9 (OCH₃-10)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 故鉴定化合物 **7** 为四氢巴马汀。

化合物 **8**: 黄色棱晶 (丙酮)。C₂₀H₁₇NO₆, FAB-MS m/z : 368 (100)。 ^1H -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz) δ : 6.97 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-3'), 6.87 (1H, s, H-5), 6.66 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-2'), 6.09 (2H, d, $J = 18.4$ Hz, OCH₂O-4', 5'), 5.97 (2H, d, $J = 18.4$ Hz, OCH₂O-6, 7), 5.77 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-9), 4.14 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-1), 2.17~2.71 (4H, m, H-3, 4), 2.51 (3H, s, NCH₃); ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz) δ : 66.0 (C-1), 49.8 (C-3), 27.1 (C-4), 131.0 (C-4''), 108.8 (C-5), 146.5 (C-6), 144.9 (C-7), 108.5 (C-8), 125.7 (C-8''), 85.1 (C-9), 110.8 (C-1'), 116.1 (C-2'), 113.3 (C-3'), 147.2 (C-4'), 149.4 (C-5'), 141.0 (C-6'), 103.7 (OCH₂O-4', 5'), 101.5 (OCH₂O-6, 7), 49.8 (NCH₃), 167.3 (C=O)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **8** 为 adlumidine。

化合物 **9**: 黄色棱晶 (醋酸乙酯)。C₁₉H₂₁NO₄, FAB-MS m/z : 328 (100)。 ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.84 (1H, s, H-5), 6.83 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2), 6.64 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-1), 6.33 (1H, s, H-8), 3.77 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9), 3.36 (1H, d, $J = 18.3$ Hz, H-10a), 3.39 (3H, s, OCH₃-6), 3.83 (3H, s, OCH₃-3), 2.99 (1H, d, $J = 18.3, 5.2$ Hz, H-10b), 2.62 (1H, dd, $J = 10.2, 4.5$ Hz, H-15a), 2.47~2.60 (1H, m, H-16a), 2.47 (3H, s, NCH₃), 1.71 (1H, dd, $J = 10.2, 4.9$ Hz, H-16b), 1.28 (1H, dd, $J = 13.9, 4.5$ Hz, H-15b); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 123.1 (C-1), 111.5 (C-2), 148.0 (C-3), 145.5 (C-4), 119.6 (C-5), 151.8 (C-6), 183.3 (C-7), 125.1 (C-8), 62.2 (C-9), 30.8 (C-10), 130.1 (C-11), 125.1 (C-12), 45.2 (C-13), 164.8 (C-14), 38.2 (C-15), 48.0 (C-16), 56.7 (OCH₃-3), 55.3 (OCH₃-6), 41.6 (NCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **9** 为 (-)-salutaridine。

化合物 **10**: 黄色结晶 (甲醇)。C₂₁H₂₂NO₄⁺,

FAB-MS m/z : 352 (100)。 ^1H -NMR ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 400 MHz) δ : 9.67 (1H, s, H-8), 8.42 (1H, s, H-13), 7.83 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-12), 7.78 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-11), 7.34 (1H, s, H-1), 6.77 (1H, s, H-4), 4.86 (2H, dd, $J = 5.9, 5.9$ Hz, H-6), 4.11 (3H, s, OCH₃-9), 3.96 (3H, s, OCH₃-10), 3.94 (3H, s, OCH₃-2), 3.88 (3H, s, OCH₃-3), 3.71 (2H, dd, $J = 5.9, 5.9$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 100 MHz) δ : 108.0 (C-1), 149.3 (C-2), 152.0 (C-3), 110.6 (C-4), 128.0 (C-4'), 26.8 (C-5), 56.0 (C-6), 144.9 (C-8), 121.8 (C-8'), 144.2 (C-9), 150.2 (C-10), 120.0 (C-11), 123.1 (C-12), 133.4 (C-12'), 126.4 (C-13), 138.0 (C-13'), 118.6 (C-13''), 56.3 (OCH₃-2), 56.1 (OCH₃-3), 62.0 (OCH₃-9), 56.7 (OCH₃-10)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **10** 为巴马汀。

化合物 **11**: 淡黄色晶体 (氯仿-甲醇)。C₂₀H₁₉NO₅, FAB-MS m/z : 354 (100)。与原阿片碱对照品对照, 薄层色谱行为一致, 故鉴定化合物 **11** 为原阿片碱。

化合物 **12**: 黄色微晶体 (乙醇), FAB-MS m/z : 337 (100), 与小檗碱对照品在 3 种展开剂体系中共薄层, 色谱行为一致, 故鉴定化合物 **12** 为小檗碱。

化合物 **13**: 黄色棱晶 (乙醇)。C₁₉H₁₄NO₄⁺, FAB-MS m/z : 320 (100)。 ^1H -NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ : 9.88 (1H, s, H-8), 8.90 (1H, s, H-13), 7.99 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-11), 7.81 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-12), 7.74 (1H, s, H-1), 7.04 (1H, s, H-4), 6.50 (2H, s, OCH₂O-9, 10), 6.14 (2H, s, OCH₂O-2, 3), 4.87 (2H, dd, $J = 6.2, 6.1$ Hz, H-6), 3.19 (2H, dd, $J = 6.2, 6.1$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) δ : 105.1 (C-1), 146.9 (C-2), 149.6 (C-3), 108.1 (C-4), 130.3 (C-4'), 26.1 (C-5), 55.0 (C-6), 144.2 (C-8), 120.2 (C-8'), 143.6 (C-9), 147.5 (C-10), 120.7 (C-11), 120.8 (C-12), 132.2 (C-12'), 121.5 (C-13), 136.7 (C-13'), 111.5 (C-13''), 101.8 (OCH₂O-2, 3), 104.2 (OCH₂O-9, 10)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 故鉴定化合物 **13** 为 coptisine。

化合物 **14**: 黄色微晶 (甲醇)。C₁₉H₁₆NO₄⁺, FAB-MS m/z : 322 (95)。 ^1H -NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ : 9.41 (1H, s, H-8), 8.82 (1H, s, H-13), 8.01 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-12), 7.85 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-11), 7.52 (1H, s, H-1), 7.04 (1H, s, H-4), 6.51 (2H, s, -OCH₂O), 4.86 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H-6), 3.90 (2H, t,

$J = 5.7$ Hz, H-5), 3.87 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 111.4 (C-1), 146.4 (C-2), 150.6 (C-3), 112.4 (C-4), 127.0 (C-4'), 25.9 (C-5), 55.5 (C-6), 145.5 (C-8), 119.2 (C-8'), 143.7 (C-9), 146.9 (C-10), 120.5 (C-11), 121.0 (C-12), 132.5 (C-12'), 121.8 (C-13), 137.2 (C-13'), 111.7 (C-13''), 55.9 ($-\text{OCH}_3$), 104.5 ($-\text{OCH}_2\text{O}$)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **14** 为 thalifaurine。

化合物 **15**: 桔黄色无定形固体 (甲醇)。 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$, FAB-MS m/z : 336 (100)。 ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 9.90 (1H, s, H-8), 8.03 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-12), 7.96 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-11), 7.33 (1H, s, H-1), 6.89 (1H, s, H-4), 6.53 (2H, s, OCH_2O -9, 10), 4.74 (2H, m, H-6), 3.84 (3H, s, OCH_3 -3), 3.04 (2H, m, H-5), 2.94 (3H, s, CH_3 -13); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 114.6 (C-1), 146.3 (C-2), 149.1 (C-3), 115.3 (C-4), 130.1 (C-4'), 26.5 (C-5), 56.7 (C-6), 142.9 (C-8), 117.9 (C-8'), 144.6 (C-9), 146.8 (C-10), 119.4 (C-11), 120.1 (C-12), 131.9 (C-12'), 132.5 (C-13), 136.0 (C-13'), 110.8 (C-13''), 56.3 (OCH_3 -3), 104.6 (OCH_2O -9, 10), 18.2 (CH_3 -13)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 故鉴定化合物 **15** 为 dehydroapocavidine。

化合物 **16**: 黄色棱晶 (乙醇)。 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4^+$, FAB-MS m/z : 342 (100)。 ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6.39 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-9), 6.21 (1H, s, H-3), 3.51 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.43 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.37 (1H, 1H, brs, H-6'), 3.05 (1H, m, H-5eq), 3.02 (1H, m, H-5ax), 2.94 (1H, brd, $J = 12.4$ Hz, H-7ax), 2.91 (3H, s, NCH_3), 2.82 (1H, m, H-4ax), 2.52 (1H, brd, $J = 12.4$ Hz, H-7eq), 2.43 (3H, s, NCH_3), 2.25 (1H, brd, $J = 12.8$ Hz, H-4eq); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 152.0 (C-1), 150.9 (C-2), 118.7 (C-3), 118.4 (C-3'), 24.6 (C-4), 62.1 (C-5), 70.5 (C-6'), 31.4 (C-7), 122.4 (C-7'), 111.3 (C-8), 110.2 (C-9), 147.3 (C-10), 147.1 (C-11), 122.0 (C-11'), 121.3 (C-11''), 126.3 (C-11'''), 43.6 (NCH_3), 49.9 (NCH_3), 56.3 (OCH_3 -2), 56.5 (OCH_3 -10)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **16** 为木兰花碱。

3 抗乙型肝炎病毒活性研究

3.1 方法

化合物抗乙型肝炎病毒活性参照文献方法^[14]测定。

从液氮中取出HepG 2.2.15细胞, 在37 °C下水浴快速复苏, 重悬于完全培养基, 在37 °C、5% CO_2 条件下培养, 每隔2d传代1次, 保证实验所用细胞处于对数生长期。用胰蛋白酶将HepG 2.2.15细胞分散成 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞悬液, 按每孔100 μL 接种于96孔板中进行培养, 24 h后换用含药培养液, 每种药物以2.5% 二甲基亚砜溶解, 以培养基配成母液; 每个药物设4个质量浓度, 每个质量浓度设3个复孔, 以拉米夫定为阳性对照药; 每板设不加药物的正常细胞和试剂空白作对照。放置于37 °C、5% CO_2 条件下培养, 11 d后收集上清液。

取细胞上清液, 采用酶联免疫法, 用乙肝表面抗原及e抗原检测试剂盒, 在酶标仪上以630 nm为参考波长, 450 nm为检测波长进行检测, 读取吸光度(A)值, 检测药物对细胞分泌HBsAg、HBeAg的抑制作用, 药物对抗原的抑制率 = $(A_{\text{细胞组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{细胞组}} - A_{\text{空白组}})$, IC_{50} 值为药物对HBsAg或HBeAg的抑制率为50%时的药物浓度; 吸去上清的细胞孔中加入100 μL /孔, 含0.4 g/L MTT的无血清培养液, 在37 °C、5% CO_2 条件下继续培养4 h, 去上清液, 每孔用100 μL 二甲基亚砜溶解, 用酶标仪在490 nm波长下测定其 A 值, 检测药物对细胞的毒性作用, 药物对细胞的破坏率 = $(A_{\text{细胞组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{细胞组}} - A_{\text{空白组}})$, 药物半数毒性浓度(CC_{50})为试验孔存活细胞为对照孔细胞50%时的药物浓度。治疗指数(SI) = $\text{CC}_{50} / \text{IC}_{50}$ 。当 $\text{SI} > 2$ 时为低毒有效, $1 < \text{SI} < 2$ 时为低效高毒, $\text{SI} < 1$ 时为无毒无效。

3.2 活性试验结果

对从岩黄连中分离得到的质量分数较大的 8 个化合物分别进行抗乙型肝炎病毒活性试验, 结果见表1。化合物 **6** 对 HBsAg 的 IC_{50} 值小于 0.02 mg/mL, 化合物 **9** 的 IC_{50} 值为 0.09 mg/mL, 表明化合物 **6** 和化合物 **9** 对 HBsAg 均具有较强的抑制活性, 化合物 **10** 和 **16** 活性较弱, 其余化合物活性一般。从所筛选的化合物对 HBeAg 的作用来看, 化合物 **6** 的 IC_{50} 值小于 0.02 mg/mL, 化合物 **9** 的 IC_{50} 值为 0.15 mg/mL, 其余化合物 IC_{50} 值接近或大于 1 mg/mL, 表明化合物 **6** 和 **9** 对 HBeAg 具有较好的抑制作用, 化合物 **6** 的抑制作用最强, 化合物 **9** 次之, 其余化合物的活性一般。因此, 岩黄连作为一种抗肝炎中药的临床应用具有一定的化学物质基础, 研究结果对开发利用其植物资源具有一定参考价值。

表1 岩黄连主要生物碱抗乙肝病毒活性
Table 1 Inhibitory activities of main alkaloids from *C. saxicola* against HBV

化合物	CC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)	HBsAg		HBeAg	
		IC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)	SI	IC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)	SI
5	>1.00	0.65	>1.5	>1.00	1.0
6	0.06	<0.02	>3.5	<0.02	>3.5
8	>1.00	0.50	>2.0	>1.00	1.0
9	0.19	0.09	2.1	0.15	1.0
10	0.69	>1.50	<0.5	>1.50	<0.5
11	0.08	0.92	0.1	>1.50	<0.1
13	>1.02	0.88	>1.2	>1.02	1.0
16	1.09	>1.50	<0.7	1.50	<0.7
拉米夫定	9.81	3.37	2.9	9.83	1.0
岩黄连粗提物	0.21	0.16	1.3	<0.04	>5.3

参考文献

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1990.
- [2] 柯珉珉, 张宪德, 吴练中, 等. 岩黄连有效成分的研究 [J]. 植物学报, 1982, 24(3): 289-291.
- [3] 王奇志, 梁敬钰, 原悦. 岩黄连化学成分 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(1): 31-34.
- [4] Halbsguth C, Mei B O, Häberlein H. Positive cooperation of protoberberine type 2 alkaloids from *Corydalis cava* on the GABAA binding site [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 305-309.
- [5] Iwasa K, Gupta Y P, Cushman M. Absolute configurations of the *cis*- and *trans*-13-methyltetrahydroprotoberberines. Total synthesis of (+)-thalicttricavine, (+)-canadine, (±)-, (-)-, and (+)-thalicttrifoline, and (±)-, (-)-, and (+)-cavidine [J]. *J Org Chem*, 1981, 46: 4744-4750.
- [6] Chrzanowska M. Synthesis of (±)-stylopine [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58: 401-407.
- [7] Koul S, Razdan T K, Andotra C S, et al. Benzophenanthridine alkaloids from *Corydalis flabellata* [J]. *Planta Med*, 2002, 68: 262-265.
- [8] Oechsli S M, König G M, Oechsli-merkel K, et al. An NMR study of four benzophenanthridine alkaloids [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54: 519-524.
- [9] Blask G, Gula D J, Shamma M. The phthalide isoquinoline alkaloids [J]. *J Nat Prod*, 1982, 45: 105-122.
- [10] Sariyar G, Gülgeze H B, Güzler B. Salutaridine *N*-oxide from the capsules of *Papaver bracteatum* [J]. *Planta Med*, 1992, 58: 368-369.
- [11] Wafo P, Nyasse B, Fontaine C A. 7, 8-Dihydro-8-hydroxypalmatine from *Enantia chlorantha* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 501: 279-281.
- [12] Chen C H, Chen T M, Lee C. Thalifaurine and dehydroscretine, new quaternaryprotoberberine from *Talictum fauriei* [J]. *J Pharm Sci*, 1980, 69: 1061-1065.
- [13] Barbosa-Filho J M, Da-Cunha E V L, Cornélio M L, et al. Cissaglaberrimine, an aporphine alkaloid from *Cissampelos glaberrima* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44: 959-961.
- [14] Jiang Z Y, Zhang X M, Zhang F X, et al. A new triterpene and anti-hepatitis B virus compounds from *Alisma orientalis* [J]. *Planta Med*, 2006, 72(7): 72951-72954.