

• 化学成分 •

左金方的生物碱类成分及其对肿瘤细胞的细胞毒活性

钱平, 杨秀伟*

北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 药学院天然药物学系, 北京 100191

摘要: 目的 研究左金方(由黄连和吴茱萸按质量比6:1组成)中的生物碱类成分并评价其对人消化道肿瘤细胞的细胞毒活性。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20等柱色谱方法进行分离纯化,通过理化性质和谱学数据鉴定化合物结构;MTT法测定化合物对人胃癌细胞系NCI-N87细胞和人结肠腺癌细胞系Caco-2细胞增殖的抑制活性。结果 从左金方70%乙醇提取物的正丁醇溶性部分分离得到了15个生物碱,分别鉴定为吴茱萸次碱(1)、吴茱萸碱(2)、瑞特西宁(3)、黄连碱(4)、吴茱萸果酰胺III(5)、8-三氯甲基-7,8-二氢巴马亭(6)、表小檗碱(7)、8-三氯甲基-7,8-二氢表小檗碱(8)、8-三氯甲基-7,8-二氢黄连碱(9)、巴马亭(10)、小檗碱(11)、1,2,3,4-四氢-1-羰基-β-咔啉(12)、降氧化北美黄连次碱(13)、氧化表小檗碱(14)、紫堇定(15)。化合物1、2、4和11对NCI-N87和Caco-2细胞增殖具有抑制活性,IC₅₀值为12.61~91.18 μmol/L。结论 化合物8为新化合物;化合物1、2、4和11可能是左金方在消化道局部发挥抗肿瘤作用的主要有效成分。

关键词: 左金方; 黄连; 吴茱萸; 8-三氯甲基-7,8-二氢表小檗碱; 小檗碱; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)01-0008-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.002

Alkaloids from Zuojin Formula and their cytotoxicities against proliferation of cancer cells

QIAN Ping, YANG Xiu-wei

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Objective To study the alkaloid constituents of Zuojin Formula, consisting of *Coptidis Rhizoma* and *Euodiae Fructus*, and to evaluate their cytotoxicities against the proliferation of cancer cells in human digestive tract. **Methods** The constituents were isolated and purified by column chromatography on silica gel and Sephadex LH-20, as well as the chemical structures of alkaloids were determined by physicochemical properties and spectral data analyses. The cytotoxicities assay against human gastric NCI-N87 and colon adenocarcinoma Caco-2 cell lines was carried out by MTT method. **Results** Fifteen alkaloids were obtained from the normal butanol soluble fraction of 70% ethanolic extract in Zuojin Formula and identified as rutaecarpine (1), evodiamine (2), rhesinine (3), coptisine (4), wuchuyuamide III (5), 8-trichloromethyl-7, 8-dihydropalmatine (6), epiberberine (7), 8-trichloromethyl-7, 8-dihydroepiberberine (8), 8-trichloromethyl-7, 8-dihydrocoptisine (9), palmatine (10), berberine (11), 1, 2, 3, 4-tetrahydro-1-oxo-β-carboline (12), noroxyhydrastinine (13), 8-oxo-epiberberine (14), and corydaldine (15). Compounds 1, 2, 4, and 11 showed the inhibitory activities against the proliferation of NCI-N87 and Caco-2 cell with the half inhibitory concentration of 12.61—91.18 μmol/L. **Conclusion** Compound 8 is a new compound. Compounds 1, 2, 4, and 11 may be the main effective components in Zuojin Formula against the proliferation of cancer cells in human digestive tract.

Key words: Zuojin Formula; *Coptidis Rhizoma*; *Euodiae Fructus*; 8-trichloromethyl-7, 8-dihydroepiberberine; berberine; cytotoxicity

左金方最早记载在《金匱钩玄》卷一《火》,后收于元代医家朱震亨的《丹溪心法》^[1],临床应用已有700余年的历史,传统剂型为水丸,现代剂型

有左金胶囊、左金片等;广义上还包括反左金系列。左金方由黄连、吴茱萸以质量比6:1组成,临床上主要用于治疗溃疡、胃炎、胃食管反流病以及一些

收稿日期: 2013-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173508);“十二五”国家科技支撑专项(2011BAI07B08)

作者简介: 钱平(1987—),男,博士研究生。

*通信作者 杨秀伟 E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

肝胆和肠道疾病^[2]。“左金”的意义,《古今名医方论》谓“木从左而制从金也”,《医方集解》称“谓使金令得行于左而平肝也”。方中重用黄连大苦大寒泄心以泄肝火,为君药;吴茱萸疏肝解郁、降逆止呕,为佐使药。二药伍用,“一寒一热,寒者正治,热者从治,故能相济以立功也”。反左金丸与左金丸药味组成相同,但用量相反,药性偏重有差异,是典型的“方证对应”的药对。近年来左金方在治疗和预防消化道肿瘤方面的潜力逐渐引起关注,相关药理作用的体内、外研究已有报道^[3-6]。由于复方是中药临床应用的主要形式,所以中药物质基础的研究应以复方为载体,遵循整体性原则,寻找或建立科学、快速、准确地研究中药复方物质基础的方法。作为建立中药复方物质基础研究方法学的一种尝试,本实验以药对为切入点,为探明左金方中发挥抗肿瘤作用的活性成分对其进行研究。从左金方 70%乙醇提取物的正丁醇溶性部分分离鉴定了 15 个生物碱,包括吲哚类生物碱吴茱萸次碱(rutaecarpine, **1**)、吴茱萸碱(evodiamine, **2**)、瑞特西宁(rhetsinine, **3**)、吴茱萸果酰胺 III(wuchuyamide III, **5**)和 1,2,3,4-四氢-1-羧基- β -咔啉(1,2,3,4-tetrahydro-1-oxo- β -carboline, **12**);原小檗碱类生物碱黄连碱(coptisine, **4**)、8-三氯甲基-7,8-二氢巴马亭(8-trichloromethyl-7,8-dihydropalmatine, **6**)、表小檗碱(epiberberine, **7**)、8-三氯甲基-7,8-二氢表小檗碱(8-trichloromethyl-7,8-dihydroepiberberine, **8**)、8-三氯甲基-7,8-二氢黄连碱(8-trichloromethyl-7,8-dihydrocoptisine, **9**)、巴马亭(palmatine, **10**)、小檗碱(berberine, **11**)和氧化表小檗碱(8-oxo-epiberberine, **14**);简单异喹啉类生物碱降氧化北美黄连次碱(noroxyhydrastinine, **13**)和紫堇定(corydaldine, **15**)。化合物**6**、**8**、**9**和对照物 8-三氯甲基-7,8-二氢小檗碱(**16**)的结构见图 1,其中化合物**8**为新化合物。采用 MTT 法评价了以上化合物对人胃癌细胞系 NCI-N87 细胞和人结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞增殖的抑制活性。

1 仪器与材料

Nexus—470 型 FTIR 红外光谱仪(Thermo Nicolet Inc., Madison, WI, USA); Cary 300 UV-vis 紫外光谱仪(Varian Inc., Palo Alto, CA, 美国); Bruker AV III 400 型核磁共振波谱仪(Bruker BioSpin AG Facilities, Fällanden, 瑞士); Finnigan TRACE 2000 GC-MS 质谱仪(EI-MS)(Thermo

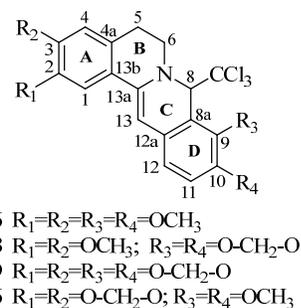


图 1 化合物**6**、**8**、**9**、**16**的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds **6**, **8**, **9**, and **16**

Finnigan, San Jose, CA, 美国); Bruker APEX IV FT-ICR 高分辨质谱仪(Bruker Daltonics, Inc., Billerica, MA, 美国)(HR-ESI-MS); LC 3000 半制备型高效液相色谱(SP-HPLC)仪系统(北京创新通恒科技有限公司),配置 P3050 二元泵, CXTM-3000 色谱工作站;中压液相色谱柱(46 cm×2.6 cm, 北京元宝山色谱科技有限公司);三洋 MCO-15 AC 气套式二氧化碳培养箱(三洋电机株式会社,日本大阪);Thermo Multiskan MK 3 全自动酶标仪(Thermo-Labsystems, Franklin, MA, 美国);柱色谱硅胶(200~300 目,青岛海洋化工厂产品);中性氧化铝(300~400 目,上海盛亚化工有限公司);Sephadex LH-20 为 Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden) 产品;薄层色谱硅胶 H 和 GF₂₅₄ 薄层色谱(TLC)硅胶板分别为青岛海洋化工厂和 Merck 公司(Darmstadt, 德国)产品。分析纯乙醇、甲醇、醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、环己烷、三乙胺等为北京化工厂产品。96 孔板(Costar®3599, 批号 35511024)购于美国 Corning 公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, 批号 MKBH0595V)和二甲基亚砜(DMSO, 批号 SZBC0040V)购于美国 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清(FBS, 批号 989267),非必需氨基酸(NEAA, 批号 1212513),RPMI 1640(批号 1237305)和 DMEM(批号 1237317)等培养基购于美国 Life Technologies 公司;青链霉素混合液(批号 20121009)购于北京索莱宝科技有限公司;人胃癌细胞系 NCI-N87 细胞株(中国医学科学院细胞资源中心);人结肠腺癌 Caco-2 细胞株(#HTB-37, ATCC, 美国)。

黄连(批号 20101015)由重庆市石柱县黄连规范化种植基地提供,为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎;吴茱萸(批号

20050901) 采于湖南省湘潭市, 为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 干燥近成熟的果实, 2 种药材均经北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室杨秀伟教授鉴定, 符合《中国药典》2010 年版相应项标准; 药材凭证标本保存于北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室。

2 提取与分离

黄连 7.2 kg 与吴茱萸 1.2 kg 药材粗粉混合, 用 6 倍量 70% 乙醇水溶液回流提取 5 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩得干膏 2.5 kg (收率 29.76%)。取干膏 1.3 kg 用水分散, 依次用 2 倍量的醋酸乙酯、水饱和和正丁醇分别萃取 8 次, 合并萃取液, 减压浓缩, 得醋酸乙酯萃取物 75 g, 正丁醇萃取物 482 g。取正丁醇萃取物 (400 g) 经硅胶柱色谱, 以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇 (含 0.1% 三乙胺) (6:1:0→1:2:0.15→0:0:1) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同流分, 得到 5 个组分 BFr. 1~5。BFr. 1 于三氯甲烷-醋酸乙酯 (6:1) 中静置, 析出化合物 **1** (40 mg); 剩余部分取其中 2 g, 经硅胶柱色谱, 以环己烷-醋酸乙酯 (8:1) 洗脱, 得到化合物 **2** (4.7 mg)。BFr. 2 分为 2 部分 BFr. 2a 和 BFr. 2b, 皆于三氯甲烷-醋酸乙酯 (1:1) 中静置, 从 BFr. 2a 中析出化合物 **3** (550 mg); 从 BFr. 2b 中析出化合物 **4** (720 mg); 合并 BFr. 2a 和 BFr. 2b 母液, 浓缩至干, 得残渣 (10 g), 然后经硅胶柱色谱, 以环己烷-醋酸乙酯 (20:1→1:4) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同流分, 得到 6 个组分 BFr. 2-1~2-6, 其中 BFr. 2-3 以三氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗涤纯化, 得到化合物 **5** (4.2 mg)。BFr. 3 再以三氯甲烷-醋酸乙酯 (2:1) 洗涤, 洗涤液浓缩后经中性氧化铝柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇 (1:0→1:1) 梯度洗脱, 得化合物 **6** (200 mg); 沉淀部分 (48 g) 经中性氧化铝柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇 (1:0→1:1) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同流分, 得到 4 个组分 BFr. 3-1~3-4, 其中的 BFr. 3-2 于三氯甲烷-甲醇 (4:1) 中静置, 析出化合物 **7** (100 mg); 剩余部分 (2 g) 经中压液相色谱 (中性氧化铝 250 g), 以三氯甲烷-甲醇 (98:2) 洗脱 (体积流量 15 mL/min, 柱压 0.5 MPa), 得到 14 个流分 (每个流分收集 300 mL), 流分 4~5 析出化合物 **8** (12 mg); BFr. 3-3 于三氯甲烷中静置, 析出化合物 **9** (6.9 mg); 取 BFr. 3-3 (2 g), 经中压液相色谱 (薄层色谱硅胶 H 120 g)

以三氯甲烷-甲醇 (10:1) 洗脱 (体积流量 15 mL/min, 柱压 1.3 MPa), 得到 13 个流分 (每个流分收集 500 mL); 取流分 3~7 (1 g) 经中性氧化铝 (500 g) 柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇 (1:0→98:2) 梯度洗脱, 得到化合物 **10** (280 mg) 和 **11** (520 mg)。取 BFr. 4 (74 g) 经硅胶柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇 (1:0→1:10) 梯度洗脱, 得到 3 个组分 BFr. 4-1~4-3。取 BFr. 3-1 与 BFr. 4-3 合并为 BFr. 3a, 取其中 20 g 经硅胶柱色谱, 以醋酸乙酯-甲醇-水 (21:4:3→21:7:3→0:95:5) 梯度洗脱, 得到 3 个组分 (BFr. 3a-1~3a-3); 合并 BFr. 3a-1 与 BFr. 4-1 (15 g), 经硅胶柱色谱, 以环己烷-醋酸乙酯 (2:1→1:5)、醋酸乙酯-甲醇 (1:1) 梯度洗脱, 得到 8 个组分 BFr. 3a-1-1~3a-1-8。合并 BFr. 3a-1-5 与 BFr. 2-4, 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇 (1:1) 纯化, 得到化合物 **12** (6.2 mg); BFr. 3a-1-6 和 BFr. 3a-1-7 于三氯甲烷-甲醇 (1:1) 中静置, 分别析出化合物 **13** (80 mg) 和 **14** (30 mg); BFr. 3a-1-8 经硅胶柱色谱, 以环己烷-醋酸乙酯 (1:4) 洗脱纯化, 得到化合物 **15** (17 mg)。

3 细胞毒活性测定

细胞毒活性测定采用 MTT 法^[7]。NCI-N87 和 Caco-2 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中分别用 RPMI 1640 和 DMEM 培养基 (含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 培养。取对数生长期细胞, 分别以每孔 1×10⁴ 个细胞的密度接种于 96 孔板中^[8], 培养 24 h 后, 加入用不含血清的培养基稀释的受试化合物溶液, 受试化合物终浓度分别为 0.25、2.5、10、25、50、100 μmol/L。培养 48 h 后, 每孔中加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h, 再向每孔中加入 100 μL 三联液^[9]溶解生成的甲臜结晶, 用酶标仪于 540 nm 波长处测定吸光度 (*A*) 值, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

以细胞增殖抑制率对药物浓度的对数值进行回归, 计算半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。

4 结果

4.1 结构鉴定

与对照品共薄层色谱分析, 并进行 EI-MS 和 NMR 数据比较, 鉴定化合物 **1**、**2**、**4**、**9**、**10**、**11** 和 **13** 分别为吴茱萸次碱、吴茱萸碱^[10]、黄连碱、8-三氯甲基-7, 8-二氢黄连碱、巴马亭、小檗碱、降氧化北美黄连次碱^[11]。

化合物 **3**: 浅黄色固体。EI-MS m/z : 319 $[M]^+$, 301 $[M-H_2O]^+$ (基峰); 分子式为 $C_{19}H_{17}N_3O_2$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.74 (1H, s, N-H), 4.11 (2H, dd, $J = 6.4, 6.3$ Hz, H-5), 3.18 (2H, dd, $J = 6.4, 6.3$ Hz, H-6), 7.70 (1H, dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, H-9), 7.12 (1H, td, $J = 8.2, 8.0, 1.0$ Hz, H-10), 7.31 (1H, td, $J = 8.3, 8.2, 1.0$ Hz, H-11), 7.42 (1H, dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz, H-12), 6.90 (1H, q, $J = 5.0$ Hz, 14-N-H), 6.70 (1H, dd, $J = 8.3, 0.8$ Hz, H-16), 7.32 (1H, td, $J = 8.3, 8.0, 1.5$ Hz, H-17), 6.49 (1H, td, $J = 8.0, 7.8, 0.8$ Hz, H-18), 7.30 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, H-19), 2.82 (3H, d, $J = 5.0$ Hz, N-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 126.0 (C-2), 161.0 (C-3), 46.8 (C-5), 20.5 (C-6), 122.5 (C-7), 124.4 (C-8), 120.9 (C-9), 120.0 (C-10), 125.6 (C-11), 112.8 (C-12), 138.4 (C-13), 149.7 (C-15), 110.8 (C-16), 133.5 (C-17), 114.2 (C-18), 131.4 (C-19), 116.9 (C-20), 174.7 (C-21), 29.5 (N-CH₃)。以上数据与羟基吴茱萸碱^[12]和瑞特西宁^[13]的相关数据基本一致, 文献报道二者为互变异构体^[14], 在 SciFinder 数据库中检索也同时给出这 2 个结构。EI-MS 谱中 m/z 301 $[M-H_2O]^+$ 为基峰, 支持羟基吴茱萸碱的结构, 但由 1H - 1H COSY 及 1H -NMR 数据可知 δ_H 6.90 (1H, q) 和 δ_H 2.82 (3H, d, N-CH₃) 相互耦合 ($J = 5.0$ Hz), 且在 HMBC 谱中 δ_H 6.90 与 C-20 和 C-16 有相关, 而与 C-3 无相关, 表明 δ_H 6.90 并非为羟基氢信号, 而是 14 位氮上的氢信号。综合上述分析, 鉴定化合物 **3** 为瑞特西宁。

化合物 **5**: 黄色固体。EI-MS m/z : 323 $[M]^+$; 分子式为 $C_{18}H_{17}N_3O_3$ 。 1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.24 (1H, dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz, H-5), 7.27 (1H, brdd, $J = 8.2, 7.8$ Hz, H-6), 7.69 (1H, td, $J = 8.4, 8.2, 1.4$ Hz, H-7), 7.21 (1H, brd, $J = 8.4$ Hz, H-8), 3.61 (3H, s, N-CH₃), 6.64 (1H, brd, $J = 8.4$ Hz, H-3'), 7.23 (1H, td, $J = 8.4, 8.2, 1.1$ Hz, H-4'), 6.60 (1H, brdd, $J = 8.2, 8.1$ Hz, H-5'), 7.71 (1H, dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, H-6'), 3.38 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-8'), 4.52 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-9'), 6.28 (2H, brs, N-H₂); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 150.3 (C-2), 161.7 (C-4), 128.9 (C-5), 123.0 (C-6), 135.1 (C-7), 115.8 (C-8), 140.5 (C-9), 115.5 (C-10), 30.7 (N-CH₃), 117.8 (C-1'), 150.9 (C-2'), 117.3 (C-3'), 134.4 (C-4'), 113.5 (C-5'), 131.1 (C-6'), 200.1 (C-7'), 37.1 (C-8'), 38.2 (C-9')。以上数

据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **5** 为吴茱萸果酰胺 III。

化合物 **6**: 浅黄色粉末。EI-MS m/z : 469 $[M]^+$; 分子式为 $C_{22}H_{22}Cl_3NO_4$ 。 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 波谱数据见表 1。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **6** 为 8-三氯甲基-7, 8-二氢巴马亭。

化合物 **7**: 橙色固体。EI-MS m/z : 336 $[M]^+$; 分子式为 $C_{20}H_{18}NO_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.71 (1H, s, H-1), 7.09 (1H, s, H-4), 3.22 (2H, m, H-5), 4.90 (2H, m, H-6), 9.97 (1H, s, H-8), 8.04 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-11), 7.86 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-12), 9.09 (1H, s, H-13), 3.93 (3H, s, 2-OCH₃), 3.87 (3H, s, 3-OCH₃), 6.53 (2H, s, 9, 10-OCH₂O-); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 108.7 (C-1), 146.9 (C-2), 151.4 (C-3), 111.3 (C-4), 128.5 (C-4a), 25.9 (C-5), 55.3 (C-6), 144.6 (C-8), 111.6 (C-8a), 143.8 (C-9), 148.7 (C-10), 120.7 (C-11), 121.6 (C-12), 132.5 (C-12a), 121.0 (C-13), 137.1 (C-13a), 119.0 (C-13b), 56.2 (2-OCH₃), 55.9 (3-OCH₃), 104.5 (9, 10-OCH₂O-)。以上数据与文献报道一致^[17-18], 故鉴定化合物 **7** 为表小檗碱。

化合物 **8**: 黄棕色固体。IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 446, 2 994, 2 918, 2 832, 1 604, 1 512, 1 476, 1 464, 1 241, 1 060, 810; UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 234 (4.25), 281 (4.00), 348 (3.45), 379 (3.56); EI-MS m/z : 453.2 $[M]^+$ (4), 418.2 $[M-Cl]^+$ (29), 383.3 $[M-Cl_2]^+$ (17), 336.4 $[M-CCl_3]^+$ (66), 320.3 (100); HR-ESI-MS m/z : 454.037 16 $[M+H]^+$ (计算值 454.037 42, $C_{21}H_{19}Cl_3NO_4$); 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 数据见表 1。由 NMR 数据可知, 化合物 **8** 有 1 个亚甲二氧基、2 个甲氧基、2 个相邻亚甲基、2 个邻位耦合的芳氢、3 个孤立芳氢、10 个季碳, 推断化合物 **8** 为原小檗碱型生物碱。与季铵型原小檗碱类生物碱相比, 该化合物的芳氢信号尤其是 H-8 明显向高场移动, 推测其为 C-8 位取代的 7, 8-二氢原小檗碱类生物碱。化合物 **8** 的 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 谱显示出 18 个氢信号及 21 个碳信号, 且 DEPT 及 HSQC 谱提示存在 10 个季碳, 故判断其 C-8 位的取代基上有 1 个季碳, 且 C-8 化学位移为 δ_C 74.0 (d), 与已知化合物 **6**、**9** 相近, 因此推测 C-8 位取代基为三氯甲基, 并经高分辨质谱给出的分子式 $C_{21}H_{18}Cl_3NO_4$ 证实。化合物 **8** 的 NMR 信号, 尤其是 C-8a~C-11 的化学位移值与已知化合物 8-三氯甲基-7, 8-二氢小檗碱 (**16**)^[16] 存在较大差

表1 化合物6、8、9、16的¹H-和¹³C-NMR数据(400/100 MHz, CDCl₃)
Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compounds 6, 8, 9, and 16 (400/100 MHz, CDCl₃)

碳位	6		8		9		16 ^[16]	
	$\delta_{\text{H}}(J/\text{Hz})$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(J/\text{Hz})$	$\delta_{\text{C}}(\text{DETP})$	$\delta_{\text{H}}(J/\text{Hz})$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(J/\text{Hz})$	δ_{C}
1	7.19 (s)	107.0	7.18 (s)	106.8 d	7.16 (s)	104.0	7.16	104.1
2		147.8		147.8 s		146.8		146.7
3		149.2		149.2 s		147.5		147.4
4	6.64 (s)	110.9	6.63 (s)	110.9 d	6.61 (s)	108.2	6.61	108.1
4a		127.3		127.3 s		128.7		128.7
5	3.42 (m)	30.0	3.43 (m)	30.0 t	3.35 (m)	30.5	3.34 (m)	30.5
	2.74 (m)		2.73 (m)		2.71 (m)		2.72 (m)	
6	3.85 (m)	51.7	3.81 (m)	52.0 t	3.83 (m)	51.9	3.87 (m)	51.6
	3.74 (m)		3.74 (m)		3.70 (m)		3.70 (m)	
8	5.64 (s)	73.6	5.40 (s)	74.0 d	5.40 (s)	73.9	5.64 (s)	73.5
8a		114.8		104.8 s		104.8		114.8
9		146.4		144.9 s		144.8		146.3
10		149.6		145.5 s		145.6		149.7
11	6.98 (d, 8.4)	114.6	6.87 (d, 8.0)	109.6 d	6.86 (d, 8.0)	109.7	6.97 (d)	114.5
12	6.89 (d, 8.4)	118.5	6.70 (d, 8.0)	116.6 d	6.67 (d, 8.0)	116.7	6.86 (d)	118.6
12a		129.5		130.1 s		130.0		129.3
13	6.15 (s)	97.0	6.21 (s)	97.5 d	6.14 (brs)	98.0	6.10	97.5
13a		137.5		137.4 s		137.4		137.6
13b		123.5		123.4 s		125.0		125.0
8-CCl ₃		105.6		105.6 s		105.6		105.5
2,3-OCH ₂ O-					5.95 (s)		5.95 (d)	
					5.94 (s)	101.1	5.94 (d)	101.0
9,10-OCH ₂ O-			6.03 (d, 1.2)		6.02 (s)			
			5.91 (d, 1.2)	100.9 t	5.91 (s)	100.9		
2-OCH ₃	3.95 (s)	56.1	3.94 (s)	56.1 q				
3-OCH ₃	3.89 (s)	55.9	3.90 (s)	55.9 q				
9-OCH ₃	3.94 (s)	61.0					3.94	61.0
10-OCH ₃	3.88 (s)	56.3					3.87	56.3

碳原子级数由 DEPT 及 HSQC 确定

Carbon multiplicities were determined by DEPT and HSQC

异, 但其 A、B 环的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 信号及 2 个甲氧基的化学位移值与化合物 **6** 的一致, 其 C、D 环的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 信号及 1 个亚甲二氧基的化学位移值与化合物 **9** 的一致 (表 1)。因此, 推断化合物 **8** 为 8-三氯甲基-7, 8-二氢表小檗碱, 为一新化合物。

化合物 **12**: 白色固体。EI-MS m/z : 186 [M]⁺; 分子式为 C₁₁H₁₀N₂O。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.47 (1H, brs, H-2), 3.73 (2H, brs, H-3), 3.07 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-4), 7.59 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.14 (1H, t, $J = 8.2, 8.0$ Hz, H-6), 7.29 (1H, t, $J = 8.3, 8.2$ Hz, H-7), 7.49 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-8), 10.20 (1H, s,

H-9); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 163.7 (C-1), 42.2 (C-3), 20.8 (C-4), 120.0 (C-4a), 125.3 (C-4b), 120.2 (C-5), 120.3 (C-6), 125.2 (C-7), 112.7 (C-8), 137.6 (C-8a), 126.3 (C-9a)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **12** 为 1, 2, 3, 4-四氢-1-羰基- β -咔啉。

化合物 **14**: 浅黄色固体。EI-MS m/z : 351 [M]⁺; 分子式为 C₂₀H₁₇NO₅。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.21 (1H, s, H-1), 6.73 (1H, s, H-4), 2.91 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, H-5), 4.29 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, H-6), 7.16 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-11), 7.05 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-12), 6.77 (1H, s, H-13), 3.94 (3H, s, 2-OCH₃), 3.98 (3H, s,

3-OCH₃), 6.21 (2H, s, 9, 10-OCH₂O-); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 107.6 (C-1), 148.4 (C-2), 150.1 (C-3), 110.6 (C-4), 122.3 (C-4a), 28.1 (C-5), 39.2 (C-6), 159.8 (C-8), 110.5 (C-8a), 146.7 (C-9), 146.1 (C-10), 113.9 (C-11), 119.0 (C-12), 131.9 (C-12a), 101.7 (C-13), 135.4 (C-13a), 128.4 (C-13b), 56.2 (2-OCH₃), 56.0 (3-OCH₃), 102.6 (9,10-OCH₂O-)。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **14** 为氧化小檗碱。

化合物 **15**: 白色固体。EI-MS *m/z*: 207 [M]⁺; 分子式为 C₁₁H₁₃NO₃。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.56 (2H, brt, *J* = 6.7 Hz, H-3), 2.93 (2H, t, *J* = 6.7 Hz, H-4), 6.68 (1H, s, H-5), 7.57 (1H, s, H-8), 6.36 (1H, brs, *N*-H), 3.92 (6H, s, 6, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.5 (C-1), 40.5 (C-3), 28.0

(C-4), 132.6 (C-4a), 110.2 (C-5), 152.2 (C-6), 148.0 (C-7), 109.6 (C-8), 121.4 (C-8a), 56.0 (6-OCH₃), 56.1 (7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **15** 为紫堇定。

4.2 细胞毒活性

采用 MTT 法评价了分离得到的 15 个生物碱类化合物对人 NCI-N87 和 Caco-2 肿瘤细胞的细胞毒活性。化合物储备液用 DMSO 配制, DMSO 在培养基中的终体积分数不超过 1%, 未表现出明显的细胞生长抑制作用。空白对照实验表明受试化合物自身 *A* 值在所选波长下未对测定产生干扰。化合物 **1~5**、**7**、**10~15** 的系列实验终浓度为 0.25、2.5、10、25、50、100 μmol/L; 由于溶解度的问题, 化合物 **6**、**8** 和 **9** 的系列实验终浓度为 0.25、2.5、10、25、50 μmol/L。活性测定结果见表 2。

表 2 生物碱 1~15 对 2 种肿瘤细胞系细胞毒活性的 IC₅₀ 值

Table 2 IC₅₀ values for cytotoxicities of alkaloids 1—15 against two kinds of cancer cell lines

化合物	IC ₅₀ 值 / (μmol·L ⁻¹)		化合物	IC ₅₀ 值 / (μmol·L ⁻¹)	
	NCI-N87	Caco-2		NCI-N87	Caco-2
1	18.23±2.29	62.24±6.45	9	>50	>50
2	12.61±2.40	91.18±3.21	10	>100	>100
3	57.95±3.00	>100	11	70.82±5.62	65.25±8.94
4	36.41±2.52	41.46±1.98	12	>100	>100
5	64.59±6.32	>100	13	>100	>100
6	22.01±8.34	>50	14	74.91±4.80	>100
7	>100	>100	15	>100	>100
8	24.54±1.95	>50	长春瑞宾*	12.19±4.33	21.64±6.12

*长春瑞宾为阳性对照药

*Vinorelbine was used as a positive control drug

5 讨论

本研究从左金方 70%乙醇提取物的正丁醇溶性部分分离鉴定了 15 个生物碱, 其中化合物 **8** 为新化合物。根据对单味药吴茱萸^[22]和黄连^[21,23-24]化学成分的研究结果, 以及不同类型化合物具有不同的生物合成途径, 推断吲哚类生物碱 **1~3**、**5** 和 **12** 来源于吴茱萸; 异喹啉类生物碱 **4**、**6~15** 来源于黄连; 化合物 **5** 此前仅见报道从石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 近成熟果实中分离鉴定^[15], 本研究系首次从吴茱萸中得到。

采用 MTT 法评价了分离得到的 15 个生物碱对 NCI-N87 和 Caco-2 肿瘤细胞的细胞毒活性。与 Caco-2 细胞比较, NCI-N87 细胞对受试化合物更为敏感, 并且一定程度上反映了这些化合物的构效关系: 吲哚类生物碱中, 化合物 **1** 和 **2** 活性较强, IC₅₀

值与阳性对照药长春瑞宾接近, 优于化合物 **3**、**5** 和 **12**。有文献报道^[25]吲哚啉类化合物具有的共轭平面结构有利于其嵌入至 DNA 的碱基对之间, 因此, 与化合物 **3**、**5**、**12** 相比, 具有 A~E 5 个完整的环状结构可能是 **1** 和 **2** 活性更好的重要原因之一。异喹啉类生物碱中, 4 个季铵型原小檗碱类生物碱的活性强弱顺序为 **4**>**11**>**7** 和 **10**。此类生物碱抗肿瘤作用机制复杂, 如小檗碱可以通过阻滞细胞分裂周期、刺激 Fas/FasL 信号通路及线粒体/半胱天冬酶通路、抑制拓扑异构酶和 NF-κB 及其他核转录因子等多种途径, 从而引起肿瘤细胞 DNA 损伤、诱导细胞凋亡^[26]。文献报道亚甲二氧基的取代位置影响季铵型原小檗碱类生物碱抑制拓扑异构酶 I 和 II 的选择性, 但有 2 个亚甲二氧基取代的黄连碱却不具有同时抑制拓扑异构酶 I 和 II 的活性^[27]。而在本

实验结果中黄连碱(4)活性最好,因此推测此类生物碱对 NCI-N87 和 Caco-2 的细胞毒作用主要不是通过抑制拓扑异构酶 I 和 II 实现的。化合物 7 和 10 的 C-8 位被三氯甲基取代后分别衍生化为 8 和 6,对 NCI-N87 的细胞毒活性明显增强;而化合物 4 的 C-8 位三氯甲基取代产物 9 活性明显降低,呈现出相反的趋势。化合物 7 的 C-8 位氧化后衍生为化合物 14,其活性增强,但不及三氯甲基取代产物 8。2 个简单异喹啉类生物碱 13 和 15 未表现出细胞毒活性。

分离得到的化合物中,1、2、4 和 11 对 2 种细胞系均呈现出增殖抑制活性,分别是吴茱萸、黄连中的主要和特征性成分^[28-29]。其中化合物 4 和 11 是左金方相关制剂中量较高的 2 个成分,但口服给药后血药浓度较低^[30-31],对其在体内发挥抗肿瘤作用有一定的限制。本研究选择的 NCI-N87 及 Caco-2 细胞模型为癌变的消化道上皮细胞,药物不经吸收过程即可与肿瘤细胞接触而发挥作用。此外,文献报道左金丸总生物碱能延长胃排空^[32],黄连生物碱可被胃黏膜迅速吸附但清除缓慢^[33]。这些作用有利于左金方中的生物碱类成分在胃肠道局部保持较高的作用浓度和较长的作用时间。综上所述,化合物 1、2、4 和 11 具有较好的抑制肿瘤细胞增殖的活性,可能是左金方在胃肠道局部发挥抗肿瘤作用的主要有效成分。

参考文献

- [1] 朱震亨. 丹溪心法 [M]. 北京: 中国书店出版社, 1986.
- [2] 孔维军, 赵艳玲, 山丽梅, 等. 左金丸的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5): 73-77.
- [3] 彭求贤, 杨大坚, 史 珏, 等. 黄连、吴茱萸诱导人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡的配比研究 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(2): 226-229.
- [4] 文 彬, 黄秋凌, 龚艳青, 等. 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(19): 1936-1941.
- [5] 文 彬, 熊旻利, 戴伟怡, 等. 左金丸及反左金丸对实验性大肠癌不同时期甲基转移酶表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(20): 2074-2078.
- [6] Chao D C, Lin L J, Kao S T, et al. Inhibitory effects of Zuo-Jin-Wan and its alkaloidal ingredients on activator protein 1, nuclear factor- κ B, and cellular transformation in HepG2 cells [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(4): 696-703.
- [7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [8] Gong S J, Jin C J, Rha S Y, et al. Growth inhibitory effects of trastuzumab and chemotherapeutic drugs in gastric cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2004, 214(2): 215-224.
- [9] 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 等. 评价抗癌物质活性的改良 MTT 方法 [J]. 中国医药工业杂志, 1993, 24(10): 455-457.
- [10] 张 虎, 杨秀伟, 崔育新. 吴茱萸碱、吴茱萸次碱和去氢吴茱萸碱的碳氢 NMR 信号全指定 [J]. 波谱学杂志, 1999, 16(6): 564-568.
- [11] 杨鑫宝, 刘扬子, 杨秀伟, 等. 磐安延胡索的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2200-2207.
- [12] 左国营, 何红平, 王斌贵, 等. 吴茱萸果实的一种新吲哚啉生物碱-丙酮基吴茱萸碱 [J]. 云南植物研究, 2003, 25(1): 103-106.
- [13] 王奇志, 梁敬钰, 冯 煦. 瑞特西宁的单晶 X-衍射及其 ¹H NMR、¹³C NMR 数据的全归属 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(6): 503-505.
- [14] Yamazaki M, Kawana T. Isolation of hydroxyevodiamine (rhetsinine) from the fruits of *Evodia rutaecarpa* Hook fil. et Thomson [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1967, 87(5): 608-610.
- [15] Jin H Z, Du J L, Zhang W D, et al. A novel alkaloid from the fruits of *Evodia officinalis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(7): 685-688.
- [16] Marek R, Seckarova P, Hulova D, et al. Palmatine and berberine isolation artifacts [J]. *J Nat Prod*, 2010, 66(4): 481-486.
- [17] 秦海林, 李志宏, 王 鹏, 等. 黄连专属性对照物质及其指纹图谱的创建 [J]. 中国医学科学院学报, 2004, 26(6): 622-627.
- [18] 李信炯, 田新虎, 陈燕祥, 等. 黄连中表小檗碱的分离和鉴定 [J]. 中草药, 1986, 17(1): 2-3.
- [19] 唐元清, 冯孝章, 黄 量. 吴茱萸化学成分的研究 [J]. 药学报, 1996, 31(2): 151-155.
- [20] Min Y D, Yang M C, Lee K H, et al. Protoberberine alkaloids and their reversal activity of P-gp expressed multidrug resistance (MDR) from the rhizome of *Coptis japonica* Makino [J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(9): 757-761.
- [21] 王 薇, 张庆文, 叶文才, 等. 黄连中的异喹啉类生物碱 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(5): 348-350.
- [22] Yang X W, Teng J. Chemical constituents of the unripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2007, 16(1): 20-23.
- [23] Kong L D, Cheng C H K, Tan R X. Monoamine oxidase inhibitors from rhizoma of *Coptis chinensis* [J]. *Planta*

- Med*, 2001, 67(1): 74-76.
- [24] Qiu L L, Chen L H, Yan D, *et al.* Simultaneous determination of six quaternary ammonium alkaloids in *Coptidis Rhizoma* by UPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 164-169.
- [25] 吴文娟, 赖 璐, 郑康成, 等. 抗癌性吲哚啉生物碱的定量构效关系 [J]. *物理化学学报*, 2005, 21(1): 28-32.
- [26] Tang J, Feng Y B, Tsao S, *et al.* Berberine and *Coptidis Rhizoma* as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126: 5-17.
- [27] Kobayashi Y, Yamashita Y, Fujii N, *et al.* Inhibitors of DNA topoisomerase I and II isolated from the *Coptis rhizomes* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(5): 414-418.
- [28] Zhao M Y, Yang X W. Optimization of the extraction conditions and simultaneous quantification by RP-LC of six alkaloids in *Evodiae Fructus* [J]. *Chromatographia*, 2008, 67(7/8): 543-550.
- [29] 匡艳辉, 朱晶晶, 王智民, 等. 黄连属药用植物化学成分和质量控制的研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(15): 1121-1125.
- [30] Deng Y T, Liao Q F, Li S H, *et al.* Simultaneous determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study after oral administration of *coptis-evodia herb couple* [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 863(2): 195-205.
- [31] Yuan J, Wang Y, An R, *et al.* Simultaneous determination of six alkaloids and one monoterpene in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and pharmacokinetic study after oral administration of a Chinese medicine Wuji Pill [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 895-896: 154-161.
- [32] 沈祥春, 张贵林, 任光友. 左金丸总生物碱对胃肠功能的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2006, 22(6): 34-36.
- [33] 叶富强, 陈蔚文, 李茹柳, 等. 黄连生物碱在小鼠胃粘膜的动态分布 [J]. *中国医院药学杂志*, 1999, 19(11): 643-645.