

· 药学基础 ·

栀子蓝色素的结构及其对单胺氧化酶B的抑制活性考察

蒋启航¹, 姚广大², 许朝且¹, 徐明明¹, 杨承斌¹, 陶伟伟^{1*}, 赵明^{1*}

(1. 南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,

国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室,

中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 南京 210023;

2. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004)

[摘要] 目的:研究栀子蓝色素的化学结构及其对单胺氧化酶B(MAO-B)的抑制活性,为栀子环烯醚萜类资源性化学成分的合理利用及价值提升寻求潜在可行途径。方法:采用纤维素酶催化水解栀子环烯醚萜苷类化合物得到其苷元,经与氨基酸反应,D101型大孔树脂柱色谱及制备液相色谱分离纯化,获得栀子蓝色素单体,综合运用核磁共振波谱和质谱技术鉴定其结构;以苯甲胺为MAO-B反应底物,与栀子蓝色素单体体外孵育,采用高效液相色谱法检测苯甲胺的代谢产物苯甲醛生成量,以甲醇(A)-50 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液(B,pH 3.2)(2:3)为流动相,检测波长245 nm,以评价栀子蓝色素化合物对MAO-B的抑制效果。结果:合成并鉴定了8种栀子蓝色素(栀子蓝色素A~H)。在MAO-B抑制试验中,与栀子苷比较,栀子蓝色素D、E的抑制活性明显增强($P<0.05$);与6 β -羟基基尼平苷比较,栀子蓝色素G、H的抑制活性明显增强($P<0.05$, $P<0.01$),这4种栀子蓝色素均表现出比原型化合物更好的MAO-B抑制活性。结论:栀子蓝色素为一分子氨基酸与一分子环烯醚萜形成的简单化合物,部分栀子蓝色素具有比原型化合物更好的MAO-B抑制活性,不同底物生产出的栀子蓝色素存在活性差异,可基于试验优选制备高价值栀子蓝色素,扩展栀子蓝色素的应用范围,丰富栀子环烯醚萜类成分的综合利用途径。

[关键词] 中药资源; 栀子; 栀子蓝色素; 环烯醚萜; 神经活性; 单胺氧化酶B; 高效液相色谱法(HPLC)

[中图分类号] R22;R28;O581;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0123-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211749

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210526.1439.003.html>

[网络出版日期] 2021-05-26 18:29

Structure of Gardenia Blue Pigment and Its Inhibitory Activity on Monoamine Oxidase B

JIANG Qi-hang¹, YAO Guang-da², XU Chao-qie¹, XU Ming-ming¹,

YANG Cheng-bin¹, TAO Wei-wei^{1*}, ZHAO Ming^{1*}

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization Under National Administration of Traditional Chinese Medicine, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical structure of gardenia blue pigment and its inhibitory activity against monoamine oxidase B (MAO-B), in order to seek a potential feasible way for rational utilization

[收稿日期] 20210326(005)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873096)

[第一作者] 蒋启航,在读硕士,从事中药化学与分析研究,E-mail:848065954@qq.com

[通信作者] * 赵明,教授,博士生导师,从事中药资源化学与资源循环利用研究,E-mail:mingzhao@njucm.edu.cn;

* 陶伟伟,副教授,硕士生导师,从事中药资源化学与资源循环利用研究,E-mail:taoww@njucm.edu.cn

and value enhancement of iridoids in *Gardeniae Fructus*. **Method:** Iridoid glycosides in *Gardeniae Fructus* were hydrolyzed by cellulase to obtain their aglycones and reacted with amino acids. Then, the products were purified by column chromatography packed with D101 macroporous resin and preparative liquid chromatography to obtain gardenia blue pigments, and the gardenia blue pigments were identified by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS). Benzylamine was used as the reaction substrate of MAO-B and *in vitro* incubated with gardenia blue pigment monomers, high performance liquid chromatography (HPLC) was employed to determine the production of benzaldehyde for evaluating the inhibitory effect of gardenia blue pigments on MAO-B, the mobile phase was methanol (A) -50 mmol·L⁻¹ potassium phosphate buffer (B, pH 3.2) (2:3), and the detection wavelength was 245 nm. **Result:** Eight compounds of gardenia blue pigment A-H were synthesized and identified. In MAO-B inhibition test, compared with geniposide, the inhibitory activity of gardenia blue pigment D and E was significantly enhanced ($P<0.05$). Compared with the 6 β -hydroxygeniposide, the inhibitory activity of gardenia blue pigment G and H was significantly enhanced ($P<0.05$, $P<0.01$). All the four gardenia blue pigments showed better MAO-B inhibitory activity than the prototype compounds. **Conclusion:** Gardenia blue pigment is a simple compound formed by one molecule of amino acid and one molecule of iridoid. Some gardenia blue pigments have better MAO-B inhibitory activity than the prototype compounds. The activity of gardenia blue pigment produced by different substrates is different, and the high-value gardenia blue pigment can be prepared based on experimental optimization, which can expand the application range of gardenia blue pigment and enrich the comprehensive utilization of iridoids from *Gardeniae Fructus*.

[Keywords] Chinese materia medica resources; *Gardeniae Fructus*; gardenia blue pigments; iridoids; neural activity; monoamine oxidase B; high performance liquid chromatography (HPLC)

栀子蓝色素是以栀子果实中的环烯醚萜类成分为原料,利用其水解后的苷元与氨基酸反应而制得的色素类产品。我国于1990年将其列入食品添加剂,用于蛋白质、糖和淀粉等食品染色,特别是在配制酒的生产中,栀子蓝是石榴红等复配色素中不可或缺的成分,具有安全性高、着色力好等优点,在食品加工领域有较广阔的应用范围^[1-2]。目前对于栀子蓝的研究多集中于栀子蓝染料的合成、分离提纯、染色性能和功能价值等方面,但对其物质结构认识仍不清晰。TOUYAMA等^[3-4]及PARK等^[5]利用甲胺作为氨基酸代替物来合成栀子蓝色素,鉴定了多个反应过程中间物质的化学结构,但基于这些研究结果来看,栀子蓝更倾向于是一种混合物;而周庆新^[6]则认为栀子蓝色素是一种相对分子质量在500 kDa附近的聚合物,但聚合方式未知。

另有研究发现,以栀子苷元京尼平和酪氨酸为原料合成的栀子蓝色素具有比底物京尼平和阳性药氟西汀更好的抗抑郁效果^[7],提示栀子蓝色素尚具有治疗神经类疾病的潜在利用价值。而单胺氧化酶(MAO)是结合在线粒体外膜的一种黄素蛋白酶,可以催化机体各种内源性或外源性单胺类物质发生氧化脱氨反应,具有2种亚型(MAO-A和

MAO-B)。MAO-A主要分布在儿茶酚胺能神经元中,可氧化5-羟色胺、去甲肾上腺素和肾上腺素等单胺类物质;MAO-B主要分布在神经胶质细胞和组胺能神经元中,可氧化苯甲胺、多巴胺和 β -苯乙胺等单胺类物质。在临床上,MAO-B被认为是治疗多种神经退行性疾病的重要靶点,其抑制剂常用于治疗帕金森病(PD)和阿尔茨海默病(AD)^[8-9]。基于此,本实验拟以栀子环烯醚萜类成分为原料,与不同氨基酸反应合成不同结构的栀子蓝色素类化合物。通过结构鉴定,诠释栀子蓝色素的基本结构,并通过评价栀子蓝对MAO-B的抑制活性,优选具有神经活性价值的栀子蓝色素,助力开发高价值的药品或保健品,扩展栀子蓝色素的应用范围,丰富栀子环烯醚萜类资源的综合利用途径。

1 材料

BT125D型电子分析天平(德国赛利多斯公司),1300系列A2型超净工作台和MicroCL 21R型微量离心机(美国Thermo公司),Milli-Q Advantage型超纯水系统(美国Millipore公司),R-210型旋转蒸发仪(瑞士Buchi公司),SCI-FS(MX-F)型固定式混匀仪(美国SCIOLOGEX公司),2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),LC-20AR型制备高效液相

色谱仪(日本岛津公司), Triple TOF™ 5600型高分辨质谱系统(美国AB SCIEX公司), NS4000型制备液相色谱系统(江苏汉邦仪器公司), AV500型核磁共振仪(德国Brucker公司)。

甘氨酸(批号C11583452), L-苏氨酸(批号C11584158), L-组氨酸(批号C11583738), L-色氨酸(批号C11475362)和L-半胱氨酸(批号C11768775)均购自上海麦克林生化科技有限公司, 纯度≥99.0%; 苯甲胺盐酸盐(德国默克公司, 批号C10767324), 苯甲醛(国药集团化学试剂有限公司, 批号C10562449), D101型大孔吸附树脂, 纤维素酶和LH-20型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为M0041-500, C8270, S8111), 水为自制超纯水, 甲酸、甲醇均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。栀子药材购于亳州市药材市场, 经南京中医药大学中药资源教研室段金廛教授鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实。

SPF级雄性SD大鼠, 体质量220~250 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号SCXK(沪)2018-0006。动物实验遵循南京中医药大学有关实验动物管理和使用规定, 通过实验动物伦理委员会批准, 申请号202008A004。

2 方法与结果

2.1 栀子蓝合成

2.1.1 底物栀子苷, 6 α -羟基京尼平苷和6 β -羟基京尼平苷的制备 取栀子药材50 kg, 加8倍量75%乙醇回流提取3次, 每次2 h。提取液经旋转蒸发器浓缩至无醇味, 溶解于15 L水中, 依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次, 分别得到石油醚溶解性、乙酸乙酯溶解性、正丁醇溶解性及水溶性样品。利用旋转蒸发器浓缩正丁醇溶解性样品, 得稠浸膏3.1 kg, 加水使溶解, 选用D101型大孔树脂柱分离, 依次用水, 20%乙醇, 40%乙醇, 70%乙醇洗脱, 洗脱液经旋转蒸发器浓缩分别得到水部位浸膏(1 kg), 20%乙醇部位浸膏(500 g), 40%乙醇部位浸膏(1 kg)及70%乙醇部位浸膏(500 g)。取20%乙醇部位浸膏(50 g), 经制备液相色谱系统分离[C₁₈半制备色谱柱; 甲醇-水(1:5)等度洗脱, 流速40 mL·min⁻¹], 得10个组分(Fr₂₀-1~10)。取组分Fr₂₀-10, 经制备高效液相色谱仪纯化[C₁₈半制备色谱柱, 甲醇-水(3:7)等度洗脱, 流速3 mL·min⁻¹], 得化合物1(5 g); 取组分Fr₂₀-8, 经Sephadex LH-20凝胶柱色谱(甲醇洗脱)色谱得到2个亚组分Fr₂₀-8-1

和Fr₂₀-8-2。Fr₂₀-8-1经制备高效液相色谱仪纯化[C₁₈半制备色谱柱; 流动相甲醇-水(1:7)等度洗脱, 流速3 mL·min⁻¹], 得化合物2(600 mg)和化合物3(500 mg)。

2.1.2 栀子苷, 6 α -羟基京尼平苷和6 β -羟基京尼平苷的结构鉴定

化合物1 白色固体, 易溶于甲醇。高分辨电喷雾电离质谱(HR-ESI-MS) m/z 389.148 6 [M+H]⁺ (C₁₇H₂₅O₁₀⁺, 理论值389.144 8)。核磁共振氢谱(¹H-NMR)[500 MHz, 二甲基亚砜(DMSO)-*d*₆] δ_{ppm} : 7.47(1H, d, $J=1.2$ Hz, H-3), 5.68(1H, br s, H-7), 5.12(1H, d, $J=6.9$ Hz, H-1'), 5.07(1H, d, $J=5.3$ Hz, H-1), 4.13(1H, d, $J=14.0$ Hz, H-10a), 3.97(1H, ddd, $J=15.1, 5.6, 2.7$ Hz, H-10b), 3.67(1H, m, H-6'a), 3.64(3H, s, H-OCH₃), 3.41(1H, dt, $J=11.6, 5.7$ Hz, H-6'b), 3.06~3.15(4H, m, H-2'~5'), 2.98(1H, m, H-5), 2.69(1H, dd, $J=16.0, 8.1$ Hz, H-6a), 2.63(1H, t, $J=7.5$ Hz, H-9), 2.05(1H, m, H-6b)。经与文献[10]对照, 数据基本符合, 鉴定该化合物为栀子苷。

化合物2 白色固体, 易溶于甲醇。HR-ESI-MS m/z 403.123 4 [M-H]⁻ (C₁₇H₂₃O₁₁⁻, 理论值403.124 0)。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{ppm} : 7.57(1H, d, $J=1.6$ Hz, H-3), 5.88(1H, d, $J=2.6$ Hz, H-7), 5.12(1H, d, $J=5.1$ Hz, H-1), 5.00(1H, d, $J=4.7$ Hz, H-1'), 4.37(1H, t, $J=5.7$ Hz, H-6), 4.26(1H, m, H-10a), 3.98(1H, m, H-10b), 3.65(3H, s, -OCH₃), 3.64(1H, m, H-6'a), 3.44(1H, m, H-6'b), 3.09~3.17(4H, m, H-2'~5'), 3.00(1H, m, H-9), 2.85(1H, ddd, $J=7.5, 5.9, 1.6$ Hz, H-5); 核磁共振碳谱(¹³C-NMR)(125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{ppm} : 99.65(C-1), 153.03(C-3), 107.35(C-4), 41.02(C-5), 73.10(C-6), 128.82(C-7), 149.30(C-8), 44.52(C-9), 59.76(C-10), 166.89(C-11), 51.00(-OCH₃), 98.81(C-1'), 73.44(C-2'), 77.12(C-3'), 73.10(C-4'), 76.55(C-5'), 60.84(C-6')。经与文献[11]对照, 数据基本符合, 鉴定该化合物为6 α -羟基京尼平苷。

化合物3 白色固体, 易溶于甲醇。HR-ESI-MS m/z 403.124 8 [M-H]⁻ (C₁₇H₂₃O₁₁⁻, 理论值403.124 0)。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{ppm} : 7.37(1H, d, $J=1.1$ Hz, H-3), 5.65(1H, p, $J=1.8$ Hz, H-7), 5.28(1H, d, $J=4.7$ Hz, H-1), 4.46(1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 4.35(1H, dd, $J=5.0, 3.3, 1.6$ Hz, H-6), 4.10(1H, m, H-10a), 3.99(1H, ddd, $J=15.3, 5.6, 1.6$ Hz, H-10b), 3.68(1H, m, H-6'a), 3.65(1H, s, -OCH₃), 3.43

(1H, dt, $J=11.6, 5.7$ Hz, H-6'b), 3.04~3.17(3H, m, H-3'~5'), 3.02(1H, m, H-9), 2.95(1H, m, H-2'), 2.87(1H, ddd, $J=7.4, 3.1, 1.2$ Hz, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} : 94.77(C-1), 151.56(C-3), 109.39(C-4), 42.77(C-5), 79.30(C-6), 128.88(C-7), 145.74(C-8), 45.58(C-9), 58.89(C-10), 167.39(C-11), 51.18(-OCH₃), 98.49(C-1'), 73.17(C-2'), 77.26(C-3'), 69.97(C-4'), 77.26(C-5'), 61.02(C-6')。经与文献[12]对照,数据基本符合,鉴定该化合物为6 β -羟基京尼平苷。

2.1.3 梔子蓝色素A~H(化合物4~11)合成 称取梔子苷1g,6 α -羟基京尼平苷200mg和6 β -羟基京尼平苷200mg,分别加水使溶解,按样品-酶(2:1)的比例分别加入纤维素酶,于40℃水解48h后结束反应,减压浓缩,得浸膏。取梔子苷反应后浸膏,加磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.3,下同)溶解后分成5份,分别加入适量甘氨酸,L-苏氨酸,L-组氨酸,L-色氨酸和L-半胱氨酸,75℃加热搅拌反应5h。取出反应液,分别经D101型大孔树脂柱分离。加水3个柱体积(BV)洗脱,用以除去PBS,加50%乙醇3BV洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发仪浓缩,用制备高效液相色谱仪(C₁₈半制备色谱柱,流速3mL·min⁻¹,下同)对各组分进一步纯化,得梔子蓝色素A(4)[10mg,甲醇-水(1:4)洗脱],梔子蓝色素B(5)[8mg,甲醇-水(1:4)洗脱],梔子蓝色素C(6)[10mg,甲醇-水(1:3)洗脱],梔子蓝色素D(7)[12mg,甲醇-水(1:6)洗脱]和梔子蓝色素E(8)[9mg,甲醇-水(1:2)洗脱]。取6 α -羟基京尼平苷反应后浸膏,加PBS使溶解,加入适量L-苏氨酸,75℃加热搅拌5h。取出反应液,经D101型大孔树脂柱分离。加水3BV洗脱,加50%乙醇3BV洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发仪浓缩,使用制备高效液相色谱仪对组分进一步纯化,得梔子蓝色素F(9)[10mg,甲醇-水(1:4)]。取6 β -羟基京尼平苷反应后浸膏,加PBS使溶解后,将其等分成2份,1份加入适量L-苏氨酸,另一份加入适量的L-色氨酸,75℃加热搅拌5h。取出反应液,经D101型大孔树脂柱分离。加水3BV洗脱,加50%乙醇3BV洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发仪浓缩,使用制备高效液相色谱仪对组分进行进一步纯化,得梔子蓝色素G(10)[10mg,甲醇-水(1:4)洗脱]和梔子蓝色素H(11)[15mg,甲醇-水(3:7)洗脱]。

2.1.4 化合物4~11的结构鉴定 化合物4 蓝色粉末。HR-ESI-MS m/z 266.1027 [M-H]⁻(C₁₃H₁₆NO₅⁻,理论值266.1028)。在¹H-NMR中可观察到1个甲

氧基质子信号3.65(3H, s, 11-OCH₃),3对亚甲基质子信号3.24(1H, dd, $J=12.3, 5.1$ Hz, H-1a),2.76(1H, m, H-1b),2.73(1H, m, H-6a),1.90(1H, dd, $J=16.2, 9.3$ Hz, H-6b)和4.07(1H, d, $J=17.9$ Hz, H-12a),4.00(1H, d, $J=17.9$ Hz, H-12b),以及4个烯氢质子信号7.54(1H, s, H-3),2.99(1H, q, $J=8.2$ Hz, H-5),5.73(1H, s, H-7)和2.62(1H, q, $J=11.0, 8.4$ Hz, H-9)。结合异核单量子相关(HSQC),无畸变极化转移增强(DEPT)及 $^{13}\text{C-NMR}$,可以发现1个甲氧基碳信号51.08(11-OCH₃),4个亚甲基碳信号47.58(C-1),38.65(C-6),59.44(C-10)和56.49(C-12),2个烯碳信号148.36(C-3)和127.30(C-7),2个羰基碳信号172.01(C-11)和174.65(12-COOH)。¹H-¹H相关谱(¹H-¹H COSY)显示4组相关信号,H-1/H-9,H-5/H-6,H-6/H-7和H-5/H-9,结合异核多键相关谱(HMBC)主要相关峰(H-3与C-5,C-12;H-10与C-8,C-9;H-OCH₃与C-11;H-12与C-1,C-COOH),推断出化合物的平面结构。化合物的立体构型通过二维NOE相关谱(NOESY)确定,图谱显示H-5与H-9存在NOE相关,与已知化合物京尼平^[13]的立体构型一致。综上所述,鉴定化合物4为2-[(4a*S*,7a*S*)-7-(hydroxymethyl)-4-(methoxycarbonyl)-1,4a,5,7a-tetrahydro-2H-cyclopenta[*c*]pyridin-2-yl]acetic acid,简称梔子蓝色素A。化合物结构见图1,主要的¹H-¹H COSY和HMBC见图2。运用类似方法,基于各化合物一维、二维NMR数据,其余化合物依次被鉴定为梔子蓝色素B~H,各化合物结构见图1,主要的¹H-¹H COSY和HMBC见图2。

化合物5 蓝色粉末。HR-ESI-MS m/z 308.1125 [M-H]⁻(C₁₅H₁₈NO₆⁻,理论值308.1134)。¹H-NMR [500 MHz, 氘代甲醇(CD₃OD)] δ_{ppm} : 7.58(1H, s, H-3),5.80(1H, dt, $J=3.1, 1.6$ Hz, H-7),4.36(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-1),4.25(1H, m, H-10a),4.18(1H, m, H-10b),4.16(1H, m, H-13),3.65(3H, d, $J=1.4$ Hz, -OCH₃),3.33(1H, d, $J=1.4$ Hz, H-12),3.22(1H, q, $J=8.7$ Hz, H-5),2.80(1H, dd, $J=16.6, 8.3$ Hz, H-6a),2.19(1H, t, $J=8.2$ Hz, H-9),1.87(1H, t, $J=13.4$ Hz, H-6b),1.48(3H, dd, $J=6.1, 1.4$ Hz, 13-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD₃OD) δ_{ppm} : 91.16(C-1),141.40(C-3),101.56(C-4),38.97(C-5),40.43(C-6),127.29(C-7),147.16(C-8),46.92(C-9),61.58(C-10),171.01(C-11),51.22(11-OCH₃),49.85(C-12),173.83(12-COOH),79.38(C-13),19.49(13-CH₃),化合物命名为(2*R*,3*R*,6a*S*,9a*S*,9b*R*)-9-

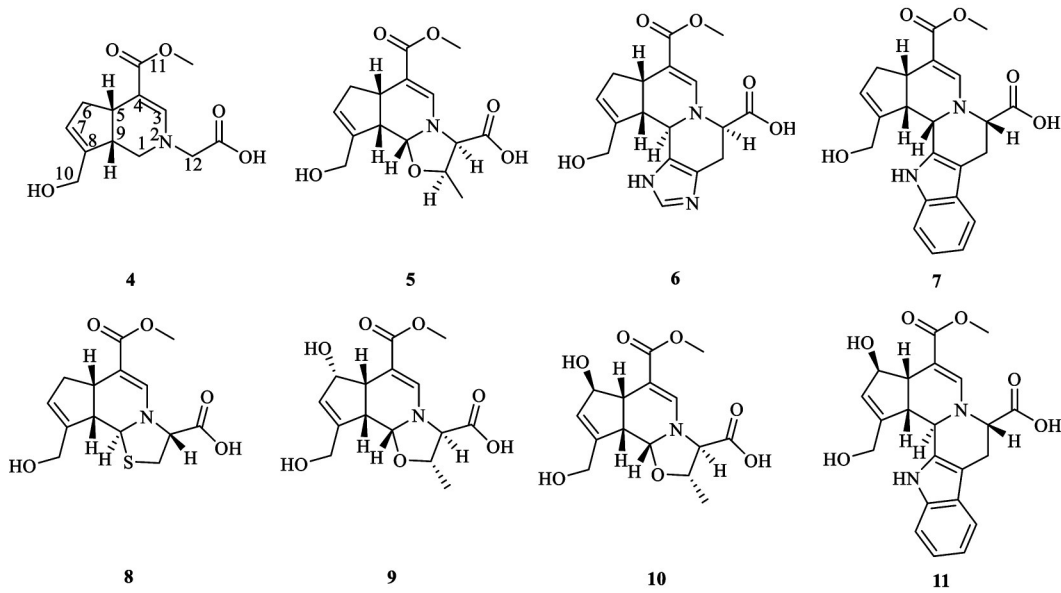


图1 化合物4~11的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 4-11

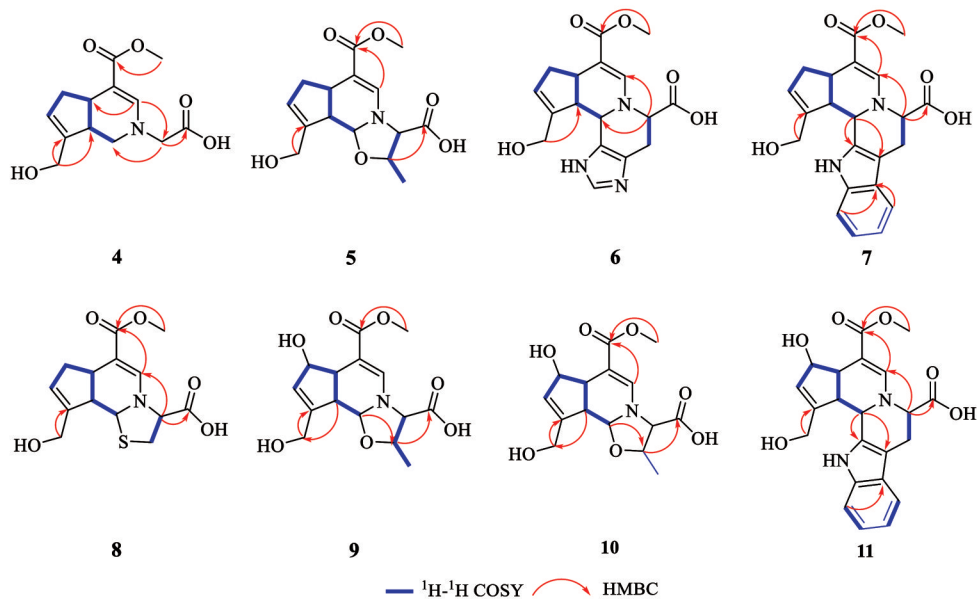


图2 化合物4~11的¹H-¹H COSY和HMBC

Fig. 2 ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compounds 4-11

(hydroxymethyl)-6-(methoxycarbonyl)-2-methyl-2,3,6a,7,9a,9b-hexahydrocyclopenta[*c*]oxazolo[3,2-*a*]pyridine-3-carboxylic acid, 简称栀子蓝色素B。

化合物6 蓝色粉末。HR-ESI-MS m/z 344.124 1 [M-H]⁻(C₁₇H₁₈N₃O₅⁻, 理论值 344.124 6)。¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ_{ppm} : 8.53(1H, s, H-17), 7.60(1H, s, H-3), 6.20(1H, s, H-7), 4.54(1H, m, H-9), 4.43(1H, m, H-12), 4.21(2H, s, H-10), 3.64(3H, d, $J=2.0$ Hz, 11-OCH₃), 3.27(1H, d, $J=16.1$ Hz, H-13a), 3.11(1H, m, H-5), 3.08(1H, m, H-13b), 3.01(1H, d, $J=6.5$ Hz, H-1), 2.75(1H, dd, $J=17.0, 6.8$ Hz, H-6a), 2.19(1H,

d, $J=17.0$ Hz, H-6b); ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ_{ppm} : 45.87(C-1), 148.08(C-3), 102.23(C-4), 36.04(C-5), 38.30(C-6), 132.79(C-7), 141.94(C-8), 48.71(C-9), 59.00(C-10), 171.11(C-11), 51.26(11-OCH₃), 63.64(C-12), 175.95(12-COOH), 23.64(C-13), 126.00(C-14), 126.05(C-15), 132.95(C-17), 化合物命名为(5*R*, 8*aS*, 11*aS*, 11*bR*)-11-(hydroxymethyl)-8-(methoxycarbonyl)-4,5,8*a*,9,11*a*,11*b*-hexahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]imidazo[4,5-*h*]quinolizine-5-carboxylic acid, 简称栀子蓝色素C。

化合物7 蓝色粉末, HR-ESI-MS m/z 393.144 8

[M-H]⁻(C₂₂H₂₁N₂O₅⁻, 理论值 393.145 0)。¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ_{ppm}: 7.74(1H, s, H-3), 7.55(1H, d, J=7.8 Hz, H-19), 7.40(1H, d, J=8.1 Hz, H-22), 7.17(1H, t, J=7.6 Hz, H-21), 7.11(1H, t, J=7.4 Hz, H-20), 6.05(1H, s, H-7), 4.53(1H, d, J=7.9 Hz, H-1), 4.37(1H, d, J=5.4 Hz, H-12), 4.16(1H, d, J=13.5 Hz, H-10a), 3.95(1H, d, J=13.5 Hz, H-10b), 3.65(3H, s, 11-OCH₃), 3.36(1H, d, J=15.2 Hz, H-13a), 3.12(1H, q, J=7.2 Hz, H-5), 3.01(1H, dd, J=15.2, 5.7 Hz, H-13b), 2.78(1H, dd, J=16.2, 8.5 Hz, H-6a), 2.56(1H, t, J=7.4 Hz, H-9), 2.21(1H, dd, J=16.4, 7.7 Hz, H-6b); ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ_{ppm}: 51.17(C-1), 149.65(C-3), 99.26(C-4), 38.99(C-5), 38.74(C-6), 131.78(C-7), 143.74(C-8), 47.41(C-9), 59.93(C-10), 171.83(C-11), 51.09(11-OCH₃), 64.76(C-12), 178.41(12-COOH), 24.19(C-13), 106.84(C-14), 132.79(C-15), 131.78(C-17), 126.43(C-18), 117.94(C-19), 119.39(C-20), 121.65(C-21), 119.65(C-22), 化合物命名为(3aS, 7S, 13bS, 13cS)-1-(hydroxymethyl)-4-(methoxycarbonyl)-3a, 7, 8, 13, 13b, 13c-hexahydro-3H-cyclopenta[a]indolo[3, 2-h]quinolizine-7-carboxylic acid, 简称栀子蓝色素D。

化合物8 蓝色粉末。HR-ESI-MS *m/z* 310.073 2 [M-H]⁻(C₁₄H₁₆NO₅⁻, 理论值 310.074 9)。¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ_{ppm}: 7.70(1H, s, H-3), 5.86(1H, m, H-7), 4.56(1H, dd, J=6.9, 4.1 Hz, H-12), 4.24(2H, m, H-10), 4.17(1H, d, J=9.7 Hz, H-1), 3.67(1H, d, J=1.3 Hz, 11-OCH₃), 3.33(1H, dd, J=11.2, 6.8 Hz, H-13a), 3.18(1H, dd, J=11.1, 4.1 Hz, H-13b), 3.10(1H, q, J=8.4 Hz, H-5), 2.75(1H, m, H-6a), 2.36(1H, m, H-9), 1.94(1H, m, H-6b); ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ_{ppm}: 62.14(C-1), 143.39(C-3), 99.27(C-4), 37.80(C-5), 38.42(C-6), 128.86(C-7), 144.06(C-8), 46.97(C-9), 59.94(C-10), 171.6(C-11), 51.20(11-OCH₃), 68.73(C-12), 177.47(12-COOH), 32.65(C-13), 化合物命名为(3R, 6aS, 9aS, 9bS)-9-(hydroxymethyl)-6-(methoxycarbonyl)-2, 3, 6a, 7, 9a, 9b-hexahydrocyclopenta[c]thiazolo[3, 2-a]pyridine-3-carboxylic acid, 简称栀子蓝色素E。

化合物9 蓝色粉末。HR-ESI-MS *m/z* 326.126 0 [M+H]⁺(C₁₅H₂₀NO₇⁺, 理论值 326.124 0)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{ppm}: 7.58(1H, s, H-3), 5.83(1H, d, J=2.4 Hz, H-7), 4.52(1H, d, J=5.6 Hz, H-6), 4.33(1H, d, J=8.1 Hz, H-1), 4.15(1H, d, J=16.1 Hz,

H-10a), 4.10(1H, dd, J=13.0, 6.3 Hz, H-13), 4.04(1H, d, J=16.1 Hz, H-10b), 3.86(1H, d, J=7.7 Hz, H-12), 3.57(3H, s, 11-OCH₃), 2.81(1H, t, J=6.4 Hz, H-5), 2.00(1H, t, J=7.7 Hz, H-9), 1.38(3H, d, J=6.0 Hz, 13-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{ppm}: 90.74(C-1), 141.55(C-3), 96.09(C-4), 42.47(C-5), 73.27(C-6), 127.91(C-7), 150.77(C-8), 44.59(C-9), 59.72(C-10), 167.64(C-11), 50.24(11-OCH₃), 65.65(C-12), 171.25(12-COOH), 76.83(C-13), 19.08(13-CH₃), 化合物命名为(2S, 3R, 6aS, 7S, 9aS, 9bR)-7-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-6-(methoxycarbonyl)-2-methyl-2, 3, 6a, 7, 9a, 9b-hexahydrocyclopenta[c]oxazolo[3, 2-a]pyridine-3-carboxylic acid, 简称栀子蓝色素F。

化合物10 蓝色粉末。HR-ESI-MS *m/z* 326.125 6 [M+H]⁺(C₁₅H₂₀NO₇⁺, 理论值 326.124 0)。¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ_{ppm}: 7.78(1H, s, H-3), 5.90(1H, d, J=1.7 Hz, H-7), 4.59(1H, m, H-6), 4.45(1H, d, J=8.3 Hz, H-1), 4.40(2H, m, H-10), 4.36(1H, m, H-13), 4.12(1H, d, J=7.3 Hz, H-12), 3.80(3H, s, 11-OCH₃), 3.23(1H, t, J=7.7 Hz, H-5), 2.54(1H, t, J=8.1 Hz, H-9), 1.58(3H, d, J=6.1 Hz, 13-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ_{ppm}: 89.99(C-1), 141.86(C-3), 97.67(C-4), 45.97(C-5), 82.18(C-6), 128.44(C-7), 146.81(C-8), 44.64(C-9), 59.79(C-10), 171.72(C-11), 51.43(11-OCH₃), 66.84(C-12), 174.73(12-COOH), 78.22(C-13), 18.29(13-CH₃), 化合物命名为(2S, 3R, 6aS, 7R, 9aS, 9bR)-7-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-6-(methoxycarbonyl)-2-methyl-2, 3, 6a, 7, 9a, 9b-hexahydrocyclopenta[c]oxazolo[3, 2-a]pyridine-3-carboxylic acid, 简称栀子蓝色素G。

化合物11 蓝色粉末。HR-ESI-MS *m/z* 411.156 3 [M+H]⁺(C₂₂H₂₃N₂O₆, 计算值 411.155 6)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{ppm}: 7.47(1H, d, J=1.1 Hz, H-3), 7.39(1H, m, H-19), 7.30(1H, m, H-22), 7.05(1H, ddd, J=8.2, 7.0, 1.2 Hz, H-21), 6.97(1H, m, H-20), 5.76(1H, t, J=1.9 Hz, H-7), 4.76(1H, d, J=6.8 Hz, H-12), 4.69(1H, m, H-1), 4.41(1H, s), 4.26(1H, d, J=15.0 Hz, H-10a), 4.08(1H, d, J=15.0 Hz, H-10b), 3.58(1H, t, J=4.8 Hz, H-5), 3.55(1H, s, 11-OCH₃), 3.24(1H, d, J=15.6 Hz, H-13a), 2.92(1H, ddd, J=15.6, 6.9, 2.2 Hz, H-13b), 2.73(1H, m, H-9); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{ppm}: 50.01(C-1), 147.13(C-3), 100.90(C-4), 44.70(C-5),

79.24(C-6), 129.20(C-7), 148.17(C-8), 44.15(C-9), 58.59(C-10), 168.06(C-11), 50.49(11-OCH₃), 61.26(C-12), 172.27(12-COOH), 23.43(C-13), 105.38(C-14), 135.99(C-15), 132.63(C-17), 126.62(C-18), 17.63(C-19), 118.68(C-20), 120.99(C-21), 111.28(C-22), 化合物命名为(3*R*, 3*aS*, 7*S*, 13*bR*, 13*cS*)-3-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-4-(methoxycarbonyl)-3*a*, 7, 8, 13, 13*b*, 13*c*-hexahydro-3*H*-cyclopenta [a] indolo [3, 2-*h*] quinolizine-7-carboxylic acid, 简称栀子蓝色素H。

2.2 MAO-B活性抑制试验

2.2.1 色谱条件 选择TNature C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇(A)-50 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液(B, pH 3.2)(2:3)为流动相, 柱温设定35 °C, 流速1 mL·min⁻¹, 进样量20 μL, 检测波长245 nm。

2.2.2 MAO的制备 选取3只SD大鼠, 脱颈致死, 于紫外灭菌的超净台中迅速取出肝脏, 用0.9%生理盐水洗涤3次, 滤纸拭干, 保存于-80 °C冰箱, 备用。取肝组织5 g, 置于175 mL的0.3 mol·L⁻¹蔗糖溶液中匀浆, 将肝匀浆置于高速低温(0~4 °C)冷冻离心机中离心(10 000 r·min⁻¹, 30 min, 离心半径8.5 cm, 下同), 弃去沉淀, 取上清液, 离心, 弃去上清, 取沉淀混悬于4 mL的0.3 mol·L⁻¹蔗糖溶液中, 加入至40 mL的1.2 mol·L⁻¹蔗糖溶液中, 离心(转速设定为10 500 r·min⁻¹, 时间40 min, 离心半径8.5 cm), 弃去上清液, 所得沉淀即为MAO^[9]。用100 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液(pH 7.6)洗涤1次, 加入100 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液40 mL使沉淀混悬, 分装成每支离心管1 mL, 于-80 °C冰箱储存, 备用。

2.2.3 MAO-B抑制药物体外反应^[14-16] 实验分为给药组与空白组。采用100 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液(pH 7.6)将MAO稀释至75 mg·L⁻¹, 以及将MAO抑制药物栀子苷, 6α-羟基京尼平苷, 6β-羟基京尼平苷, 栀子蓝色素A~H配制成浓度为1 mmol·L⁻¹的溶液。给药组精密吸取MAO溶液100 μL置于1.5 mL离心管中, 加入1 mmol·L⁻¹ MAO抑制药物溶液100 μL(空白组为等体积100 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液), 采用固定式混匀仪(周转直径4 mm, 下同)混匀10 s, 于37 °C孵育10 min, 同时加入底物2.5 g·L⁻¹苯甲醛50 μL, 固定式混匀仪再次混匀10 s, 于37 °C孵育60 min, 立即加入甲醇150 μL停止反应, 振摇混匀, 经0.22 μm微孔滤膜过滤, 为待测样品。

2.2.4 MAO-B抑制活性比较 通过计算相对剩余活性大小(给药组苯甲醛与空白组苯甲醛吸收峰面

积的比值, 给药组和空白组药液在酶的作用下生成苯甲醛)来判断药物对MAO-B抑制活性的强弱, 相对剩余活性越小, 酶抑制活性越大, 计算公式为相对剩余活性=给药组的苯甲醛峰面积/空白组苯甲醛峰面积×100%。结果发现在1 mmol·L⁻¹的药物浓度下, 栀子苷的相对剩余活性79.21%, 栀子蓝色素D和E的相对剩余活性分别为71.08%, 68.79%, 相较于其底物栀子苷来说, MAO-B抑制活性明显增强($P<0.05$); 6β-羟基京尼平苷的相对剩余活性74.17%, 栀子蓝色素G和H的相对剩余活性分别为61.83%, 65.96%, 相较于底物6β-羟基京尼平苷来说, MAO-B抑制活性明显增强($P<0.05$, $P<0.01$)。而栀子蓝色素A, B, C的相对剩余活性分别为83.07%, 83.70%, 83.00%, 相较于其底物栀子苷而言差异无统计学意义; 栀子蓝色素F的相对剩余活性78.91%, 相较于其底物6α-羟基京尼平苷(相对剩余活性80.23%)而言差异无统计学意义。

2.2.5 统计学分析 数据用SPSS 22.0进行单因素方差分析, 组间比较采用最小显著性差异法(LSD)多重比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 讨论

目前, 国内外对栀子蓝色素的研究主要集中在栀子蓝染料的合成、分离提纯、染色性能和功能价值等方面。但对于栀子蓝的基础物质结构仍无清晰的认识, 以往的观点认为栀子蓝是原料以不同方式聚合而成的混合物, 且聚合方式未知。本文使用5种氨基酸与3种栀子环烯醚萜类苷元合成了8种栀子蓝色素, 分别为栀子蓝色素A~H, 鉴定其基本结构为一分子氨基酸与一分子环烯醚萜形成的简单化合物, 产物单一、稳定, 而非文献推测的聚合物亦或是多种成分的混合物。实际上, 在进行本研究之前, 笔者已对除脯氨酸以外的19种常见氨基酸进行了筛选, 大部分氨基酸合成的栀子蓝色素成分混杂、颜色各异, 且有紫色物质干扰, 导致栀子蓝色素品质降低。而本研究结果可为栀子蓝工业化生产提供指导, 提示在实际生产过程中有方向性地制备某种栀子蓝色素, 以主成分含量作为评价指标, 更有利于栀子蓝色素产品质量的提升。

此外, 天然色素不仅具有给食品着色的作用, 相当部分天然色素还具有生理活性。通过对上述的8种色素进行MAO-B抑制活性考察, 证实了栀子蓝色素D, E, G, H具有较好的神经活性, 其中以栀子蓝色素G的活性价值最好。可基于此结果深入研究开发神经疾病相关的药品、保健品, 扩大栀子

蓝色素的应用范围,提升栀子蓝色素的产品附加值,助力栀子环烯醚萜类资源的综合利用开发。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 陈峰,陈剑锋. 栀子色素的复配调色研究[J]. 中国调味品,2014,39(3):74-77.
- [2] 毛得奖,朱亚玲. 我国食用天然蓝色素研究进展[J]. 中国食品添加剂,2011(4):149-155.
- [3] TOUYAMA R, TAKEDA Y, INOUE K, et al. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I . Structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments [J]. Chem Pharm Bull, 1994, 42(3): 668-673.
- [4] TOUYAMA R, INOUE K, TAKEDA Y, et al. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II . On the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation [J]. Chem Pharm Bull, 1994, 42(8) : 1571-1578.
- [5] PARK J E, LEE J Y, KIM H G, et al. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia jasminoides* [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(22) : 6511-6514.
- [6] 周庆新. 栀子系列色素的开发与研究[D]. 福州:福建农林大学,2011.
- [7] LI K D, YAN K, WANG Q S, et al. Antidepressant-like effects of dietary gardenia blue pigment derived from genipin and tyrosine [J]. Food Funct, 2019, 10(8) : 4533-4545.
- [8] RAMSAY R R, GRAVESTOCK M B. Monoamine oxidases: to inhibit or not to inhibit [J]. Mini-Rev Med Chem, 2003, 3(2): 129-136.
- [9] YOU DIM M B H, WEINSTOCK M. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation [J]. Neurotoxicology, 2004, 25(1/2): 243-250.
- [10] DAMTOFT S, JENSEN S R, NIELSEN B J, et al. Biosynthesis of the iridoid glucosides cornin, hastatoside, and griselinoid in *Verbena* species [J]. Cheminform, 1983, 14(50): 1943-1948.
- [11] 马河,李方丽,王芳,等. 白花蛇舌草化学成分研究 [J]. 中药材,2016,39(1):98-102.
- [12] ONO M, ISHIMATSU N, MASUOKA C, et al. Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana* [J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55(4) : 632-634.
- [13] PENG K F, YANG L G, ZHAO S Z, et al. Chemical constituents from the fruit of *Gardenia jasminoides* and their inhibitory effects on nitric oxide production [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(4): 1127-1131.
- [14] IVANOVIĆ I D, MAJKIĆ -SINGH N. Determination of platelet monoamine oxidase by new continuous spectrophotometric method [J]. J Clin Chem Clin Biochem, 1988, 26(7): 447-451.
- [15] CHOWDHURY S, KUMAR S. Inhibition of BACE1, MAO-B, cholinesterase enzymes, and anti-amyloidogenic potential of selected natural phytoconstituents: multi-target-directed ligand approach [J]. J Food Biochem, 2021, 45(1): e13571.
- [16] AZAM F, ABODABOS H S, TABAN I M, et al. Rutin as promising drug for the treatment of Parkinson's disease: an assessment of MAO-B inhibitory potential by docking, molecular dynamics and DFT studies [J]. Mol Simulat, 2019, 45(18): 1563-1571.

[责任编辑 刘德文]