

• 化学成分分离 •

莲子心总生物碱的提取分离及药效学初步研究

张京梅, 李鹏跃, 王 岚, 边宝林*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 从药材莲子心中提取生物碱类活性成分, 对主要成份进行分离鉴定, 并对其抗心律失常药效进行初步研究。方法: 莲子心药材选用酸性乙醇搅拌提取; 采用柱层析的方法分离、纯化; 初步对结扎冠状动脉诱导的大鼠的心律失常活性作用进行探讨。结果: 从莲子心药材提取的总生物碱中分离得到 3 个生物碱类成分, 为莲心碱(LIE)、异莲心碱(ISOLIE)、甲基莲心碱(NEF); 药效试验表明: 莲子心总生物碱大、中剂量组明显延长室速发生时间及降低室速持续时间。结论: 莲子心总生物碱具有抗结扎冠状动脉诱导的大鼠心律失常的作用。

[关键词] 莲子心总生物碱; 提取; 分离; 抗心律失常

[中图分类号] R284.2; R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)06-0026-03

莲子心为睡莲科植物莲的成熟种子中的干燥幼叶及胚根^[1]。莲子心为常用中药, 传统医学认为其具有清心安神、交通心肾、涩精止血之功效。现代研究表明, 莲子心治疗心血管疾病的有效部位为生物碱类成分。其中甲基莲心碱、异莲心碱、莲心碱等 3 种双苄基异喹啉类生物碱具有显著的抗心律失常、抗心肌缺血、降压等药理活性, 已成为现代中医药研究的热点之一。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, 体重 200~250 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK(京)2006-0006。

1.2 试剂与药物 地奥心血康胶囊(批号 0203073), 四川成都地奥集团; 层析用硅胶, 青岛海洋化工有限公司生产; 除甲醇为 Fisher 公司产, 其余所用试剂均为分析纯, 北京化工厂生产。莲子心药材于 2007 年 11 月购自湖南湘潭, 经中国中医科学院中药所生药室何希荣主管技师鉴定。莲子心总生物碱溶液: 取总生物碱提取物, 加水及少量吐温 80 溶解, 分别制成 5.0, 10.0, 20.0 mg·mL⁻¹ 的溶液。

1.3 仪器 质谱仪: VG-250 气质联用仪, (英国 TRACE-EFMS); NEXUS-FTIR 型红外分光光度仪 (Nicolet 公司生产); HP 1100 型高效液相色谱仪; AL-400 核磁共振波谱仪 (JEOL 公司生产)。Biopac MP-100 生理多用仪, 美国; HB-140B 型动物呼吸机 (浙江医科大学医学仪器厂)。

2 实验方法与结果

2.1 莲子心总生物碱的提取 取莲子心粉末 50 kg, 加入含 1% 盐酸的 80% 乙醇溶液 500 L, 浸泡 1 h, 搅拌 1 h, 第 2 次加入 400 L 溶剂, 搅拌 1 h, 第 3 次同样加入 400 L 溶剂, 搅拌 30 min, 过滤, 回收乙醇至无醇味, 离心, 取上清液, 加 2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调 pH 值 8~9, 离心, 取沉淀, 干燥, 得到莲子心总生物碱约 500 g。

2.2 莲子心总生物碱的分离及结构鉴定

2.2.1 分离纯化 取上述干燥至恒重的总生物碱 100 g, 进行硅胶柱层析, 三氯甲烷-二乙胺梯度洗脱, 99:1 梯度下得到化合物 I, 97:3 梯度下得到化合物 II, 95:5 梯度下得到化合物 III。

取化合物 I 粗品 1 g 溶于 1% 盐酸, 三氯甲烷反复萃取, 取酸水层用氨水调节 pH 值至 8~9, 三氯甲烷萃取, 回收三氯甲烷, 残渣用无水乙醇反复重结晶得到淡黄色无定形粉末: 化合物 I (180 mg)。

取化合物 II 粗品 500 mg, 溶于热的无水乙醇, 加入稍过量的 4% 盐酸, 放置析晶。将结晶溶于 3% 氢氧化钠溶液, 加入氯化铵直到析出乳白色沉淀为止, 用三氯甲烷反复提取, 蒸馏水洗涤, 无水硫酸钠脱水, 得松散的黄白色无定形粉末: 化合物 II (98 mg)。

取化合物 III 粗品 1 g, 溶于适量的无水乙醇中, 微热溶解, 在冰水冷却下, 滴加稍过量的 70% 高氯酸, 使溶液呈酸性, 置冰箱过夜, 析出黄色颗粒状结晶, 过滤, 用冷却无水乙醇洗涤得白色颗粒状结晶: 化合物 III 的高氯酸盐。取该高氯酸盐溶于 3% NaOH 溶液中, 加入适量固体氯化铵, 直到析出乳白色沉淀为止, 依次用三氯甲烷、水提取洗涤, 无水硫酸钠干

[收稿日期] 2009-02-25

[通讯作者] * 边宝林, Tel: (010) 64021008

燥,得松散的白色无定形粉末:化合物 III(100 mg)。

2.2.2 莲子心各生物碱结构的有关数据及其鉴定

化合物 I:淡黄色无定形粉末,mp59~61 °C,改良碘化铯钾显色为阳性,UV(MeOH) λ_{\max} nm: 283.0; IR(KBr, cm^{-1}): 3400(OH), 2937(C-H), 2835, 2792(O-CH₃ 或 N-CH₃), 1612, 1510(苯环骨架振动), 1464(δ_{as} CH₃), 1248, 1227, 1018; EI-MS 显示基峰为 206, 主要碎片离子有 m/z625(M+1)。¹HNMR: δ 3.64(1H, m, 1-H), δ 2.50(3H, s, 2-NCH₃), δ 2.75(1H, m, 3-H), δ 3.16(1H, m, 3-H), δ 2.57(1H, m, 4-H), δ 2.81(1H, m, 4-H), δ 6.50(1H, s, 5-H), δ 3.71(3H, s, 6-OCH₃), δ 6.62(1H, s, 8-H), δ 2.67(1H, m, 9-H), δ 3.09(1H, m, 9-H), δ 6.89(1H, d, J=8.6, 11-H), δ 6.68(1H, d, J=8.7, 12-H), δ 6.68(1H, d, J=8.7, 14-H), δ 6.89(1H, d, J=8.6, 15-H), δ 3.51(3H, s, 13-OCH₃), δ 3.64(1H, m, 1'-H), δ 2.47(3H, s, 2'-NCH₃), δ 2.75(1H, m, 3'-H), δ 3.16(1H, m, 3'-H), δ 2.63(1H, m, 4'-H), δ 2.81(1H, m, 4'-H), δ 5.98(1H, s, 5-H), δ 3.78(3H, s, 6'-OCH₃), δ 6.36(1H, s, 8'-H), δ 2.78(1H, m, 9'-H), δ 3.00(1H, dd, J=5.3, 13.9, 9'-H), δ 6.53(1H, d, j=1.9, 11'-H), δ 6.84(1H, d, J=8.2, 14'-H), δ 6.69(1H, dd, J=2.0, 7.7, 15'-H)。¹³CNMR 中, δ 64.35(C-1), δ 42.57(C₂-NCH₃), δ 46.54(C-3), δ 24.99(C-4), δ 55.42(C₆-OCH₃), δ 40.56(C-9), δ 55.06(C₁₃-OCH₃), δ 64.74(C-1'), δ 42.31(C₂-NCH₃), δ 47.11(C-3'), δ 25.99(C-4'), δ 55.82(C₆-OCH₃), δ 55.68(C₇-OCH₃), δ 39.82(C-9') 光谱数据与文献报道相一致^[2-3]。故确定为甲基莲心碱(Neferine)。

化合物 II:白色无定形粉末,mp70~72 °C,改良碘化铯钾显色为阳性,UV(MeOH) λ_{\max} nm: 284.0; IR(KBr, cm^{-1}): 3400(OH), 2937, 1612, 1512(苯环骨架振动); 1248, 1120(-CO); EI-MS 显示基峰为 192, 主要碎片离子有 m/z609(M-1); ¹HNMR 和 ¹³CNMR(CDCl₃): ¹HNMR 中 δ 3.70(1H, t, J=6.2, 1-H), δ 2.41(3H, s, 2-NCH₃), δ 2.82(1H, m, 3-H), δ 3.14(1H, m, 3-H), δ 2.52(1H, m, 4-H), δ 2.74(1H, m, 4-H), δ 6.30(1H, s, 5-H), δ 3.73(3H, s, 6-OCH₃), δ 6.33(1H, s, 8-H), δ 2.78(1H, m, 9-H), δ 2.97(1H, dd, J=5.3, 14.1, 9-H), δ 6.90(1H, d, J=8.6, 11-H), δ 6.70(1H, d, J=8.6, 12-H), δ 6.70(1H, d, J=8.6, 14-H), δ 6.90(1H, d, J=8.6, 15-H), δ 3.79(3H, s, 13-OCH₃), δ 3.60(1H, t, J=5.8, 1'-H), δ 2.52(3H, s, 2'-NCH₃), δ 2.69(1H, m, 3'-

H), δ 3.12(1H, m, 3'-H), δ 2.66(1H, m, 4'-H), δ 2.87(1H, m, 4'-H), δ 6.46(1H, s, 5'-H), δ 3.81(3H, s, 6'-OCH₃), δ 6.46(1H, s, 8'-H), δ 2.74(1H, m, 9'-H), δ 3.08(1H, m, 9'-H), δ 6.64(1H, s, 11'-H), δ 6.82(1H, d, J=8.2, 14'-H), δ 6.74(1H, dd, j=1.7, 8.2, 15'-H)。¹³CNMR 中, δ 63.95(C-1), δ 42.09(C₂-NCH₃), δ 46.05(C-3), δ 24.75(C-4), δ 54.74(C₆-OCH₃), δ 40.10(C-9), δ 55.39(C₁₃-OCH₃), δ 64.13(C-1'), δ 42.03(C₂-NCH₃), δ 46.84(C-3'), δ 25.48(C-4'), δ 55.54(C₆-OCH₃), δ 38.81(C-9') 以上光谱数据与文献报道相一致^[2-3]。故确定为异莲心碱(ISO Liensinine)。

化合物 III 白色无定形粉末,mp96~98 °C,改良碘化铯钾显色为附陞,UV(MeOH) λ_{\max} nm: 282.0; IR(KBr, cm^{-1}) 3420(OH), 1612, 1514(苯环骨架振动); 1255, 1119(-CO)。EI-MS 显示基峰为 206, 主要碎片离子有 m/z609(M-1)⁺。¹HNMR 和 ¹³CNMR(CDCl₃): ¹HNMR 中 δ 3.68(1H, dd, j=2.7, 9.9, 1-H), δ 2.51(3H, s, 2-NCH₃), δ 2.98(1H, m, 3-H), δ 3.40(1H, m, 3-H), δ 2.64(1H, m, 4-H), δ 2.94(1H, m, 4-H), δ 5.73(1H, s, 5-H), δ 3.42(3H, s, 6-OCH₃), δ 6.36(1H, s, 8-H), δ 3.13(1H, dd, J=2.7, 9.9, 9-H), δ 3.64(1H, m, 9-H), δ 6.92(1H, d, J=8.3, 11-H), δ 6.75(1H, d, J=8.2, 12-H), δ 6.75(1H, d, J=8.2, 14-H), δ 6.92(1H, d, J=8.3, 15-H), δ 3.52(1H, dd, J=2.3, 9.3, 1'-H), δ 2.54(3H, s, 2'-NCH₃), δ 2.74(1H, m, 3'-H), δ 3.19(1H, m, 3'-H), δ 2.81(2H, m, 4'-H), δ 6.54(1H, s, 5'-H), δ 3.85(3H, s, 6'-OCH₃), δ 3.82(3H, s, 7'-OCH₃), δ 6.66(1H, s, 8'-H), δ 2.71(1H, m, 9'-H), δ 3.16(1H, m, 9'-H), δ 6.75(1H, d, J=2.0, 11'-H), δ 6.72(1H, d, J=8.1, 14'-H), δ 6.41(1H, dd, J=1.9, 8.2, 15'-H)。¹³CNMR 中 δ 64.54(C-1), δ 42.42(C₂-NCH₃), δ 44.45(C-3), δ 21.98(C-4), δ 55.33(C₆-OCH₃), δ 42.15(C-9), δ 65.11(C-1'), δ 40.51(C₂-NCH₃), δ 47.60(C-3'), δ 26.20(C-4'), δ 55.88(C₆-OCH₃), δ 55.71(C₇-OCH₃), δ 39.71(C-9') 以上光谱数据与文献报道相一致^[2-3]。故确定为莲心碱(Liensinine)。

2.3 莲子心总生物碱抗结扎冠脉诱发的心律失常活性的初步探讨

2.3.1 实验分组

40 只大鼠,随机分为 5 组:模型对照组;莲子心总生物碱溶液大(100 mg/kg)、中(50 mg/kg)、小(25 mg/kg)剂量组;地奥心血康胶囊(地奥)270 mg/kg 组;各组预防灌胃给药 7 d,每天 1 次;

第 8 天进行实验,于实验前 1 h 灌胃给药 1 次。

2.3.2 实验方法 实验动物用戊巴比妥钠麻醉(30 mg·kg⁻¹ iv)。气管切开,接人工呼吸机进行人工呼吸。呼吸频率 45~50 次/分。暴露左颈总动脉,插动脉插管以监测血压(BP)。于胸骨左缘 3~4 肋间,打开胸腔及心包膜,暴露心脏;在肺动脉圆锥与左心耳下缘之间经左冠状动脉下浅层心肌穿一丝线,线的两端穿过一条直径 2 mm 的聚乙烯塑料管,其末端用一小动脉夹固定。通过打开和夹紧动脉夹造成冠状动脉的阻断与再通,阻断 30 min,再通 120 min。连续记录冠状动脉结扎前后及再通后 II 导心电图。观察是否有心律失常发生、心律失常出现的时间及持续时间。

2.3.3 实验结果 莲子心总生物碱大、中剂量组明显延长室速发生时间,并降低室速的持续时间,与模型组相比,均有显著性差异。结果见表 1。

表 1 总碱对心律失常发生出现时间及持续时间的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	室速发生时间(s)	室速持续时间(s)
模型组	—	63.5 ± 10.7	303.7 ± 98.3
地奥心血康组	270	346.0 ± 55.8 ²⁾	47.3 ± 17.4 ²⁾
莲子心总生物碱组	100	354.0 ± 117.5 ²⁾	28.7 ± 21.2 ²⁾
	50	179.8 ± 96.2 ¹⁾	61.5 ± 30.4 ²⁾
	25	137.3 ± 1.1	309.5 ± 63.4

注:与模型组相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

本试验使用的莲子心采自湖南湘潭,依据《中国药典》2005 年版一部莲子心项下的测定方法,其甲基莲心碱、异莲心碱、莲心碱的含量分别为 1.06%, 0.37%, 0.22%;提取后的总碱中甲基莲心碱、异莲心碱、莲心碱含量分别为 31.65%, 10.78%, 11.47%。

根据文献报道^[4],甲基莲心碱、异莲心碱、莲心碱对药物及电刺激诱发的动物心律失常有明显对抗作用,可提高药物引起动物出现室性期前收缩、室性心动过速、室颤的剂量,降低室颤发生率及死亡率。本试验中莲子心总碱大、中剂量组在延长室速发生时间、降低室速的持续时间方面有显著作用,并且优于阳性对照组,证实了莲子心总生物碱抗结扎冠脉诱导的心律失常的作用,从而扩展了莲子心总生物碱抗心律失常作用,为进一步的试验研究提供依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005:193.
- [2] 郭毛娣,陈兰贵. 中国大陆莲子心生物碱成分的研究[J]. 中草药,1984,15(7):291.
- [3] 潘扬,杨光明,蔡宝昌. 核磁共振谱分析莲子心中酚性生物碱的结构[J]. 南京中医药大学学报,2005,21(6):371-373.
- [4] 张帆,王嘉陵,钱家庆. 异莲心碱抗实验性心律失常作用及对豚鼠心肌动作电位的影响[J]. 中草药,2000,31(10):753-755.