

矮紫堇中1个新的异喹啉生物碱分离与鉴定

沙娜·吾肯¹, 尹旭¹, 米久^{1,2}, 焦顺刚¹, 张和新歌¹, 周晓春¹, 屠鹏飞¹,
柴兴云^{1*}, 刘春生^{1*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029; 2. 西藏藏医药大学, 拉萨 850000)

[摘要] 藏族特色药材矮紫堇为罂粟科植物尼泊尔黄堇 *Corydalis hendersonii* 的干燥全草, 具有清热止痛、降压等功效。作为系统阐明矮紫堇防治缺血性心脏病药效物质的内容之一, 本研究通过反相硅胶柱(ODS), 羟丙基葡聚糖凝胶 LH-20 (Sephadex LH-20) 及半制备 HPLC 等色谱方法从其乙醇提取物中分离得到 1 个新的异喹啉生物碱, 其结构经 MS, NMR 等波谱方法鉴定, 定名为矮紫堇碱 G (hendensine G, 1)。矮紫堇碱 G 可视为四氢小檗碱与琥珀酸的缩合产物, 为新的结构骨架, 但因为获得量少且结构复杂, 目前没有确定其立体构型。本研究丰富了矮紫堇的药效物质研究内容, 也为该药材中新颖结构分子的进一步挖掘提供了一定启示。

[关键词] 矮紫堇; 异喹啉生物碱; 矮紫堇碱 G; 藏族药; 琥珀酸; 抗心肌缺血; 药效物质

[中图分类号] R22; R28; R93; O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0172-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190949

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190116.0946.004.html>

[网络出版时间] 2019-01-17 11:15

Isolation and Elucidation of a Novel Isoquinoline Alkaloid from *Corydalis hendersonii*

WUKEN Sha-na¹, YIN Xu¹, MI Jiu^{1,2}, JIAO Shun-gang¹, ZHANG He-xin-ge¹, ZHOU Xiao-chun¹,
TU Peng-fei¹, CHAI Xing-yun^{1*}, LIU Chun-sheng^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
2. Tibetan Traditional Medical College, Lhasa 850000, China)

[Abstract] As part of systematic research of *Corydalis hendersonii*, a typical traditional Tibetan herbal medicine with clearing heat, relieving pain, and lowering blood pressure effects, a novel isoquinoline alkaloid, named hendensine G was isolated from the ethanol extract of the whole plant by various chromatographic techniques, including silica gel column, reverse phase column (ODS), Sephadex LH-20, and semi-preparative HPLC. Its structure was elucidated by MS, NMR and other spectroscopic data analysis. Hendensine G can be regarded as a condensation product of a tetrahydroberberine and a succinic acid, however, its absolute configuration has not been determined due to its structural complexity and less obtained amount. This present study provides an inspiration for further exploration of novel molecules from *C. hendersonii*.

[Key words] *Corydalis hendersonii*; isoquinoline alkaloid; hendensine G; Tibetan medicine; succinic acid; anti-myocardial ischemia; pharmacodynamic substances

矮紫堇为罂粟科紫堇属植物尼泊尔黄堇的干燥全草, 藏名“日袞孜玛”“日棍”等, 主要分布于西藏

[收稿日期] 20181206(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774001, 81473426)

[第一作者] 沙娜·吾肯, 在读硕士, 从事民族药研究, E-mail: shana216@163.com

[通信作者] *柴兴云, 研究员, 从事防治缺血性心脏病的民族药药效物质研究, Tel/Fax: 010-64286350, E-mail: xingyunchai@yeah.net;

*刘春生, 教授, 从事药用植物与分子生药学研究, Tel/Fax: 010-64286180, E-mail: max_liucs@263.net

海拔 4 200 ~ 5 200 m 的区域,其味苦性凉,具有清热止痛、降压等功效^[1]。据《晶珠本草》记载,矮紫堇可清血热、解血毒,传统用于治疗“木布”病,临床用于治疗高山多血症、高血压、血管炎、肝炎以及慢性疼痛等^[2]。以矮紫堇为主药之一的复方查触散具有独特的活血化瘀、凉血降压等功效^[3]。当前的研究报道显示,矮紫堇主要含有原阿片碱类、原小檗碱类、异喹啉类生物碱及部分黄酮类成分,并显示解热镇痛、抗炎、抗肿瘤及保护肝损伤等药理作用^[4-8]。

基于矮紫堇用于高山多血症等传统功效的启发,本课题组研究了矮紫堇乙醇提取物的抗心肌缺血作用,结果发现其可显著降低急性心肌梗死小鼠心脏的左室舒张末期内径(LVED),左室收缩末期内径(LVDS),提高左室射血分数(EF)和短轴缩短率(FS),并且其还可通过核转录因子- κ B(NF- κ B)和酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导子和转录激活子 3(JAK2-STAT3)信号通路减轻炎症和纤维化^[9]。同时以 LC-MS 导向分离得到了结构新颖的异喹啉生物碱(\pm)-hendersonine A^[10]和一系列类似的生物碱 hendersonines B ~ F^[11]。作为阐明矮紫堇抗心肌缺血药效物质系统研究的一部分,本实验报道 1 个新的异喹啉类生物碱,经波谱分析等方法鉴定其结构并命名为矮紫堇碱 G(hendersonine G, 1)。

1 材料

Inova-500 型核磁共振仪(美国 Varian 公司), Autopol V 型旋光仪(美国 Rudolph 公司), LCMS-IT-TOF 型高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱仪和 LC-20AT 型半制备液相色谱系统(日本岛津公司), 2535 型制备液相色谱系统(美国 Waters 公司), 半制备色谱柱和反相硅胶柱(ODS)均购自日本 YMC 公司, J-815 型圆二色光谱仪(日本 Jasco 公司)。羟丙基葡聚糖凝胶 LH-20(Sephadex LH-20, 瑞典 Pharmacia 公司), C₁₈ 反相填料(40 ~ 63 μ m, 德国 Merck 公司), 柱色谱用硅胶(200 ~ 300 目)及薄层色谱用 GF₂₅₄ 硅胶预制板(青岛海洋化工厂), 提取和分离实验所需溶剂均购自北京化工厂。

矮紫堇药材于 2016 年 6 月采自西藏山南市,经北京中医药大学张媛教授鉴定为罂粟科紫堇属植物尼泊尔黄堇 *Corydalis hendersonii* Hemsl., 药材标本(编号 CH201606)存放于北京中医药大学中药学院中药现代研究中心。

2 提取分离

称取矮紫堇药材 9.5 kg, 粉碎(过一号筛)后加 95% 酸性乙醇 50 L 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提

取液, 减压浓缩得浸膏 1.235 kg。浸膏加水分散, 加浓盐酸调节溶液 pH 2.0, 用二氯甲烷萃取, 回收溶剂得浸膏 228 g, 水层用氨水调节 pH 8.0, 继续用正丁醇萃取, 回收溶剂得浸膏 398 g。

正丁醇部位(约 380 g)采用硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇-0.1% 二乙胺(20:1:0.01 ~ 0:1:0.01), 甲醇-水-0.1% 二乙胺(1:1:0.01)洗脱, 得到 11 个流分(CH1 ~ 11)。CH5(30.1 g)经反相硅胶色谱以乙酸乙酯-甲醇(5:1 ~ 0:1)洗脱, 得到 9 个流分(E1 ~ E9)。E5(301.2 mg)经 Sephadex LH-20 柱色谱甲醇洗脱, 得到 5 个子流分(E5a ~ E5e)。E5a 经半制备型 RP-HPLC 处理, 使用 10% 甲醇作为流动相纯化, 得化合物 1(3.0 mg, $t_R = 12.0$ min)。

3 结构鉴定

化合物 1 粉红色无定形粉末; 高分辨率电喷雾质谱(HR-ESI-MS)给出准分子离子峰 $[M + H]^+$ 450.081 2(计算值 450.082 0), $[M - H]^-$ 448.066 0(计算值 448.067 4), $[\alpha]_D^{25}: 0$ ($c = 0.1$, CH₃OH)。结合 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₂₃H₁₅NO₉, 不饱和度 17, 可能为一外消旋体。¹H-NMR[二甲基亚砜(DMSO)-*d*₆, 500 MHz]数据分析显示分子中存在 6 个芳香氢信号, 其中两组为邻位芳香氢, 分别为 $[\delta_H 8.01(1H, d, J = 6.5 \text{ Hz}, H-5), 8.81(1H, d, J = 6.5 \text{ Hz}, H-6)]$ 和 $[\delta_H 6.91(1H, d, J = 8.0 \text{ Hz}, H-11), 7.12(1H, d, J = 8.0 \text{ Hz}, H-12)]$, 一组为对位芳香氢 $[\delta_H 9.39(1H, s, H-1), 7.61(1H, s, H-4)]$ 。另外 $\delta_H 6.40(H-19a)/6.38(H-19b)$ 和 $6.15(H-20a)/6.10(H-20b)$, 显示化合物 1 的分子中存在 2 个亚甲二氧基, 其可能与苯环上 2 个芳香碳形成 2 个五元环结构。此外, ¹H-NMR 中观察到 3 个次甲基信号 $\delta_H 6.56(H-8), 3.39(H-15)$ 和 $2.98(H-16)$, 结合氢-氢化学位移相关谱(COSY)中 H-8/H-15/H-16 这一偶合系统, 表明化合物 1 的分子中有 -CH-CH-CH- 片段, 见图 1。

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 125 MHz)中 172.5 ~ 102.1 有 19 个信号峰, 包括 2 个羰基碳信号 $\delta_C 172.5(C-17)$ 和 $172.0(C-18)$; $\delta_C 103.8$ 和 102.1 两信号, 结合异核单量子相关谱(HSQC), 可推断为 2 个亚甲二氧基碳; 另有 15 个芳香碳 $[\delta_C 155.6(C-14), 154.8(C-3), 150.3(C-2), 146.9(C-10), 141.2(C-9), 139.4(C-4a), 134.0(C-12a), 133.4(C-6), 121.7(C-5), 121.5(C-14a), 116.3(C-12), 114.7(C-8a), 107.7(C-11), 104.1(C-1), 103.5(C-4)]$, 结合 ¹H-NMR, 提示结构中含有 1 个异喹啉片段及

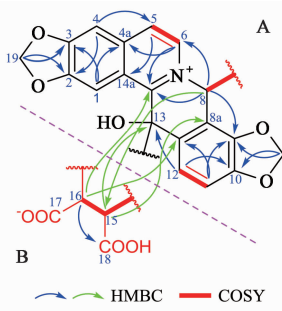


图 1 化合物 1 的关键异核多键相关谱 (HMBC) 和 COSY
Fig. 1 Key HMBC and COSY correlations of compound 1

另 1 个苯环;高场区 δ_c 80.5 在 HSQC 谱无信号,确定为连氧季碳; δ_c 62.0, 48.7, 48.4 为 -CH-CH-CH-碳。上述信号经详细的 HSQC 和 HMBC 分析归属,结果见表 1。

表 1 化合物 1 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500/125 MHz) 数据

Table 1 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500/125 MHz) data of compound 1

No.	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	No.	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	9.39(s)	104.1	11	6.91(d, 8.0 Hz)	107.7
2	-	150.3	12	7.12(d, 8.0 Hz)	116.3
3	-	154.8	12a	-	134.0
4	7.61(s)	103.5	13	-	80.5
4a	-	139.4	14	-	155.6
5	8.01(d, 6.5 Hz)	121.7	14a	-	121.5
6	8.81(d, 6.5 Hz)	133.4	15	3.39(br s)	48.4
7	-	-	16	2.98(br d)	48.7
8	6.56(br s)	62.0	17	-	172.5
8a	-	114.7	18	-	172.0
9	-	141.2	19	6.40(s)/6.38(s)	103.8
10	-	146.9	20	6.15(s)/6.10(s)	102.1

由图 1 可知,化合物 1 的 H-1 与 C-3, C-4a, H-4 与 C-2, C-5, H-5 与 C-14a, H-6 与 C-4a, C-14 远程相关, H₂-19 与 C-2, C-3 远程相关,表明结构中含 1 个不饱和度为 8 的异喹啉片段。H-8 与 C-6, C-9, C-14, H-11 与 C-9, C-12a, H-12 与 C-10, C-13, H-16 与 C-12a, C-14 远程相关, H₂-20 与 C-9, C-10 远程相关,提示化合物 1 中还包含 1 个不饱和度为 6 的异喹啉片段,且 2 个异喹啉环片段通过 N-7 与 C-14 位稠合。H-8 与 C-15, H-15 与 C-8a, C-13 远程相关,结合 COSY 中 H-8/H-15/H-16 这一偶合系统,表明化合物 1 中 C-15, C-16 与 C-8, C-13 之间形成 1 个

桥环。以上特征并结合化学位移和分子总不饱和度信息,确定化合物 1 中另有 1 个羧基和 1 个羧酸根基团存在,位置可能分别与 C-15 和 C-16 连接。

羧酸与羧酸根基团的连接位置,可借鉴文献信息确定。有报道显示,羧酸根中羰基碳的化学位移约 175 ppm,而羧酸中羰基碳的化学位移约 172 ppm^[12-15]。化合物 1 中 2 个羰基碳的化学位移分别为 172.0 ppm 和 172.5 ppm,结合 HMBC 中 H-16 与 C-18 远程相关信息,可判定羧基基团 C-18 与 C-15 连接,而羧酸根基团 C-17 与 C-16 连接。观察此分子结构, C-13 位有羟基取代,其可能与 C-17 羧酸根形成分子内氢键,构成 1 个稳定的六元环结构,见图 2,由于羟基的作用,羧酸根的羰基碳正电性增加,化学位移向低场移动。至此化合物 1 的平面结构确定为 1 个以内盐形式存在的结构新颖的异喹啉生物碱,命名为矮紫堇碱 G (hendersine G)。遗憾的是由于化合物 1 获得量低且在后续外消旋体拆分纯化过程中逐渐变少,加之结构复杂,目前暂未确定其立体构型。

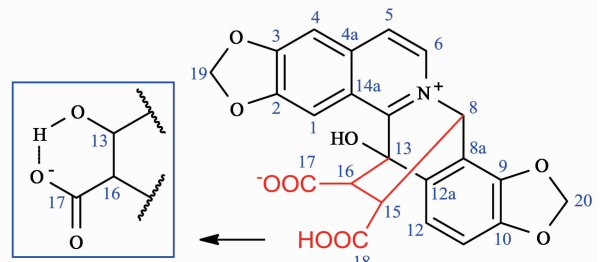


图 2 化合物 1 的结构式和六元环片段
Fig. 2 Structure of compound 1 and its six-membered ring fragment

4 讨论与展望

民族医药作为中华医药体系中重要的一部分,因其完整的医学理论体系指导、丰富多样的诊疗手段,包括特有生境中的药材,在疾病治疗和健康维护方面发挥了重要作用。民族医药是现代传承与创新药物研究的资源宝库,日渐受到研究和产业界的广泛关注,但是也受到生态环境脆弱、生长缓慢、资源日渐匮乏等条件限制,规模性的研究和开发也受到相应制约,如以矮紫堇、红景天、绿绒蒿为代表的特色藏族药材等。以矮紫堇的物质基础研究为例,一方面,因为当前研究不足,需要积累数据以提升基础研究;另一方面,其资源的稀缺性使得通过加大原材料投料量的传统分离提取模式难以为继,而借助于 $^1\text{H-NMR}$ 或 LC-MS 多维/联用方法的建立与应用,是此类药物化学成分辨识的模式之一,同时结合

传统药效学评价、生物信息学手段等,可达到阐明药效物质的目的。

紫堇属中多含有原阿片碱类、原小檗碱类、螺苜异喹啉类、苜基异喹啉类等类型生物碱,其中以原阿片碱类为主。除了原阿片碱母体分子外,还偶见与琥珀酸,5-(羟甲基)-2,3-二氢咪喃-2-酮片断加合生成骨架新颖的化合物,如(±)-hendersonine A^[10]和 decumbensine^[16]等,这些化合物对心肌细胞损伤有潜在的保护作用。另外结合此前系列报道发现,生物碱是其特征性成分,但总体含量偏小,非生物碱类成分占比更大。基于矮紫堇显著的抗心肌缺血作用,化学成分研究的关注点可向矮紫堇中非生物碱类成分倾斜,或有助于全面阐述矮紫堇的药效物质。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 32 卷[M]. 北京:科学出版社,1999:362.

[2] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草(藏文)[M]. 北京:民族出版社,1986:374.

[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草·藏药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:344-345.

[4] 高燕萍,吴强,梁健,等. 矮紫堇生物碱成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(17):67-70.

[5] 高燕萍,吴强,梁健,等. 藏族药矮紫堇化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(18):60-63.

[6] 舒花,马学燕,李鑫,等. 矮紫堇总生物碱的含量测定及其抗炎活性研究[J]. 西北药学杂志,2015,30(5):602-604.

[7] 尹旭,张倩,张和新歌,等. 藏族药矮紫堇的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(9):1758-1763.

[8] 魏春华,程虹毓,高燕萍,等. 藏药矮紫堇解热镇痛抗炎作用的研究[J]. 中国新药杂志,2017,26(3):337-342.

[9] BAI R, YIN X, FENG X, et al. *Corydalis hendersonii* Hemsl. protects against myocardial injury by attenuating inflammation and fibrosis via NF- κ B and JAK2-STAT3 signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 207: 174-183.

[10] YIN X, BAI R F, GUO Q, et al. Hendersonine A, a novel isoquinoline alkaloid from *Corydalis hendersonii* [J]. Tetrahedron Lett, 2016, 57(43):4858-4862.

[11] YIN X, ZHAO F, FENG X, et al. Four new spirobenzylisoquinoline *N*-oxide alkaloids from the whole plant of *Corydalis hendersonii* [J]. Fitoterapia, 2018, 128:31-35.

[12] GUO Q, YANG H, LIU X, et al. New zwitterionic monoterpene indole alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* [J]. Fitoterapia, 2018, 127:47-55.

[13] YUAN D, MA B, WU C, et al. Alkaloids from the leaves of *Uncaria rhynchophylla* and their inhibitory activity on NO production in lipopolysaccharide-activated microglia [J]. J Nat Prod, 2008, 71(7):1271-1274.

[14] LI B, ZHOU M, ZHANG G. Four new alkaloids from *Hypocoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms [J]. Indian J Chem B, 2001, 40B(12):1215-1218.

[15] ZHOU J Y, TONG X J, LIAN W Y, et al. Chemical study on the alkaloids of *Corydalis hsuehowensis* [J]. Planta Med, 1991, 57(2):156-158.

[16] CHANG J, CHU Z B, SONG J, et al. Two novel isoquinoline alkaloids from the seedling of *Corydalis decumbens* [J]. Tetrahedron Lett, 2014, 56(1):225-228.

[责任编辑 刘德文]