

荷包地不容生物碱成分研究及 3 种阿朴菲类生物碱的毒性初步评价

晏菲^{1,2}, 马云淑^{1*}, 汪波¹, 陈成¹, 王辉¹

¹ 云南中医学院药学院, 昆明 650500; ² 陕西中医药大学药学院, 西安 712046

摘要: 采用硅胶柱色谱分离技术, 结合 TLC、紫外光谱、NMR、MS 等方法对荷包地不容 (*Stephania dicentrinifera* H. S. Lo & M. Yang) 中生物碱成分进行研究。采用小鼠尾静脉注射法进行同亚属植物中所得三种阿朴菲类 (Aporphine, AP) 生物碱的急性毒性试验, 用 Bliss 法计算半数致死量 (LD₅₀) 并比较几种 AP 类生物碱的毒性与结构的关系。结果分离和鉴定了 3 个生物碱成分, 分别为 AP 型的荷包牡丹酮 (Dicentrinone, Dico) 和荷包牡丹碱 (Dicentrine, Dic), 以及原小檗碱 (Protoberberine, PBB) 型的四氢巴马汀 (Tetrahydropalmatine, Tet)。其中 Dico 为首次从荷包地不容中分离出来, 其 LD₅₀ = 7.266 mg/kg, Dic 的 LD₅₀ = 26.802 mg/kg, 异可利定 (Isocorydine, Isoc) 的 LD₅₀ = 32.167 mg/kg。

关键词: 荷包地不容; 阿朴菲类生物碱; 荷包牡丹酮; 荷包牡丹碱; 异可利定; LD₅₀

中图分类号: R28

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.001

Isolation and Preliminary Toxicity Evaluation of Alkaloids from *Stephania dicentrinifera* H. S. Lo & M. Yang

YAN Fei^{1,2}, MA Yun-shu^{1*}, WANG Bo¹, CHEN Cheng¹, WANG Hui¹

¹ College of Pharmacy, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

² College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

Abstract: In this study, aporphine (AP)-type alkaloids were isolated from *Stephania dicentrinifera* H. S. Lo & M. Yang by silica gel column chromatography. Their structures were identified by TLC, UV, NMR, MS, etc. The acute toxicity of 3 obtained alkaloids [Dicentrinone (Dico) and Dicentrine (Dic) of AP-type alkaloids, Tetrahydropalmatine (Tet) of Protoberberine (PBB)-type alkaloids] was then investigated using the method of tail vein injection in mice, their LD₅₀s were calculated by Bliss method. The experimental results showed that the LD₅₀ values of Dico, Dic and Isocorydine (Isoc) were 7.266 mg/kg, 26.802 mg/kg and 32.167 mg/kg, respectively. Dico was separated from *S. dicentrinifera* for the first time, and its acute toxicity was higher than Dic and Isoc.

Key words: *Stephania dicentrinifera* H. S. Lo & M. Yang; aporphine alkaloids; dicentrinone; dicentrine; isocorydine; LD₅₀

荷包地不容 (*Stephania dicentrinifera* H. S. Lo & M. Yang) 是防己科千金藤属 (*Stephania*) 山乌龟亚属 (*Subgen Tuberiphania* Lo et M. Yang) 的一个种。山乌龟亚属植物在云南分布广泛, 其块根发达, 俗称山乌龟, 主含生物碱。胡之壁等^[1] 从荷包地不容块根中分得到的山乌龟碱, 即左旋荷包牡丹碱 (*L*-Dicentrine, Dic), 实验表明其具有一定的镇痛、镇静活性。

云南地区临床上广泛用于治疗头痛、腰痛、牙痛、小手术后疼痛及神经衰弱等。闵之大等^[2] 对荷包地不容进行了分离, 获得了 6 种生物碱, 经鉴定为荷包牡丹碱、去氢荷包牡丹碱 (Dehydrodicentrine)、千金藤碱 (Cepharanthine)、异紫堇定 (Isocorydine, Isoc)、青风藤碱 (Sinoacutine) 和青藤碱 (Sinomenine)。

前期马云淑等^[3] 对部分山乌龟亚属植物中的阿朴菲类 (Aporphine, AP) 生物碱进行研究, 从云南地不容等植物中提取分离得到多种 AP 类生物碱: 克班宁 (Crebanine, Cre)、Dic、Isoc 等。Cre 对多种动物实验性心律失常有较强对抗作用, 且起效迅速, 维

持时间长^[4]。但研究发现其有效剂量 5 mg/kg, 与 LD₅₀ (9.382 mg/kg)^[5] 接近, 毒性较大。前期研究中, 已对与荷包地不容同亚属的部分植物进行提取分离, 并得到多种天然阿朴菲 (AP) 类成分。本实验旨在提取分离荷包地不容中的 AP 类成分, 与前期研究中获得的 Cre、Dic、Isoc 等天然阿朴菲成分进行毒性比较, 并为后续的药理实验与构效关系分析提供剂量等参考数据。

1 仪器与材料

Buchi 旋转蒸发仪 (瑞士步琪有限公司); SK250HP 超声机 (上海科导超声仪器有限公司); 电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器厂); DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); Sartorius BT25S 电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; Bruker AM-500 核磁共振波谱仪 (TMS 为内标); MATLQC 电喷雾质谱仪 (美国 Finigan 公司); YRT-3 熔点仪 (天津市天大天发科技有限公司)。所用试剂均为分析纯, 由天津市大茂化学试剂厂生产, 改良碘化铋钾试剂为实验室配制; 四氢巴马汀, 荷包牡丹碱 (Dic, 纯度 99.29%), 荷包牡丹酮 (Dico, 纯度 98.23%), 异可立定 (Isoc, 纯度 99.68%, 采用 HPLC 峰面积归一化法测得纯度)。

实验药材山乌龟亚属植物荷包地不容采自云南开远地区, 经云南中医学院马云淑教授鉴定为荷包地不容 (*Stephania. dicentrinifera* H. S. Lo & M. Yang)。

昆明种小白鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重 22 ~ 25 g。购自成都达硕生物科技有限公司, 许可证号: SCXK(川)2008-24, 批号: 0000269, 0017192。

2 实验方法

2.1 提取与分离

取荷包地不容药材, 粉碎成粗粉, 称取 10 kg, 甲醇多次冷浸, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得到甲醇浸膏 125.8 g, 甲醇浸膏用 10% HCl 捏溶得到酸不溶部分 Fa 和酸溶部分 Fb。Fa 部分经硅胶柱层析 (200 ~ 300 目), 以三氯甲烷-甲醇系统 (200:1 ~ 25:1) 梯度洗脱, 得 Fa1 ~ Fa5 5 个部分, Fa3 部分 (6.4 g) 以三氯甲烷-甲醇系统 (100:1 ~ 10:1) 梯度洗脱, 得到化合物 1 (120 mg)、2 (400 mg)。Fb 部分加 1% ~ 2% NaOH 调 pH9 ~ 10, 用氯仿萃取, 得浸膏 32 g,

加饱和 NaOH 调 pH, 得 pH8 ~ 9 浸膏 20 g 和 pH > 10 浸膏, pH8 ~ 9 浸膏经硅胶柱层析 (200 ~ 300 目), 以氯仿-乙酸乙酯 (100:1 ~ 5:1) 梯度洗脱, 得 Fb1 ~ Fb4 4 个馏分, Fb1 部分 (1.2 g) 经三氯甲烷-乙酸乙酯系统 (50:1 ~ 10:1) 梯度洗脱, 得到化合物 3 (18 mg)。

2.2 小鼠急性毒性试验研究

2.2.1 预试验

Isoc、Dic、Dico 3 种化合物分别以雌雄各半 20 只小鼠进行预试验, 随机分成 5 组, 每组 4 只, 尾静脉注射给药, 组间剂量比为 1:0.8, 观察给药后 4 h 内小鼠的死亡情况, 找出引起小鼠 0% (Dn) 和 100% (Dm) 死亡的剂量。

2.2.2 正式试验

根据 3 种化合物的 Dn 和 Dm 分别计算正式试验的组距, 设置剂量组, 每组 10 只小鼠, 观察给药后小鼠的反应和 4 h 内的死亡情况, 采用 Bliss 法计算 LD₅₀。

3 实验结果

3.1 结构鉴定

从荷包地不容中分离、鉴定了 3 个生物碱的结构, 分别为荷包牡丹酮、荷包牡丹碱和四氢巴马汀 (图 1)。

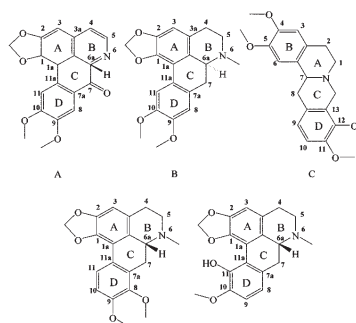


图 1 荷包牡丹酮 (A)、荷包牡丹碱 (B)、四氢巴马汀 (C)、克班宁 (D) 和异可利定 (E) 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of dicentrinone (A), dicentrine (B), tetrahydropalmatine (C), crebanine (D) and isocorydine (E)

化合物 1 黄色细针晶或粉末 (CHCl₃), 不溶于水, 可溶于吡啶和氯仿, 微溶于甲醇、丙酮等有机溶剂, 遇改良的碘化铋钾试剂显橘红色。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-CD₃OD) δ: 6.03 (1H, s, 3-H), 7.55 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-4), 8.38 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-5),

7.56(1H, s, H-8), 7.61(1H, s, H-11), 3.78(3H, s, 9-OCH₃), 3.83(3H, s, 10-OCH₃), 6.20(2H, s, -OCH₂O-); ¹³C NMR(125 MHz, CDCl₃-CD₃OD) δ: 152.3(C-1), 107.7(C-1a), 122.3(C-1b), 147.7(C-2), 102.4(C-3), 136.4(C-3a), 124.1(C-4), 142.9(C-5), 143.6(C-6a), 180.2(C-7), 124.9(C-7a), 108.8(C-8), 149.2(C-9), 153.8(C-10), 108.6(C-11), 127.5(C-11a), 55.5(9-OCH₃), 55.9(10-OCH₃), 102.7(-O-CH₂-O-)。结合高分辨质谱得分子量为335.0798,推断其分子式仅有一种为C₁₉H₁₃NO₅。以上波谱数据与文献^[6]报道对照基本一致,故确定为荷包牡丹酮(Dicentrinone)。

化合物2 淡黄色针晶(CH₃OH),不溶于水,易溶于有机溶剂,遇改良的碘化铋钾试剂显橘黄色, Mp. 166 ~ 168 °C。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ: 7.66(s, 1H, 11-H), 6.78(s, 1H, 8-H), 6.52(s, 1H, 3-H), 6.08(d, J = 1.4 Hz, 1H, -OCH₂O-), 5.93(d, J = 1.5 Hz, 1H, -OCH₂O-), 3.92(d, J = 1.4 Hz, 6H, 9-OCH₃, 10-OCH₃), 3.70(q, J = 7.0 Hz, 1H, 6a-H), 3.18-3.02(m, 4H, 5-H₂, 7-H₂), 2.64(t, J = 13.9 Hz, 2H, 4-H₂), 2.55(s, 3H, N-CH₃), 2.52(t, J = 10.3 Hz, 1H); ¹³C NMR(125 MHz, CDCl₃) δ: 141.8(s, C-1), 116.6(s, C-1a), 126.7(s, C-1b), 146.6(s, C-2), 106.8(d, C-3), 126.7(s, C-3a), 29.2(t, C-4), 53.6(t, C-5), 62.4(d, C-6a), 34.2(t, C-7), 128.4(s, C-7a), 110.4(d, C-8), 147.7(s, C-9), 148.2(s, C-10), 111.2(d, C-11), 123.5(s, C-11a), 100.7(t, -OCH₂O-), 56.1(q, 9-OCH₃), 55.9(q, 10-OCH₃), 44.0(q, N-CH₃)。以上波谱数据与文献^[7]报道对照基本一致,故鉴定化合物2为荷包牡丹碱(Dicentrine),分子式为C₂₀H₂₁NO₄。

化合物3 浅黄色至无色片晶(CH₃OH),不溶于水,易溶于有机溶剂,遇改良的碘化铋钾显橘红

色。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 6.88(d, J = 8.4 Hz, 1H, 12-H), 6.79(d, J = 8.4 Hz, 1H, 11-H), 6.73(s, 1H, 4-H), 6.61(s, 1H, 1-H), 4.24(d, J = 15.7 Hz, 1H, 13a-H), 3.89(s, 3H, 10-OCH₃), 3.87(s, 3H, 9-OCH₃), 3.85(s, 6H, 2-OCH₃, 3-OCH₃), 3.54(dd, J = 9.5, 6.2 Hz, 2H, 8-H₂), 3.27(dd, J = 15.8, 3.7 Hz, 1H, 6-Ha), 2.83(dd, J = 15.7, 11.5 Hz, 1H, 13-Ha), 3.20(ddd, J = 11.3, 7.8, 4.0 Hz, 1H, 6-Hb), 3.13(dd, J = 16.6, 5.1 Hz, 1H, 13-Hb), 2.67(d, J = 15.1 Hz, 1H, 5-Ha), 2.63(dd, J = 11.0, 3.2 Hz, 1H, 5-Hb); ¹³C NMR(125 MHz, CDCl₃) δ: 108.2(C-1), 129.4(C-1a), 147.0(C-2), 147.3(C-3), 111.4(C-4), 126.5(C-4a), 28.9(C-5), 51.2(C-6), 53.8(C-8), 127.4(C-8a), 150.0(C-9), 148.9(C-10), 110.5(C-11), 123.4(C-12), 128.1(C-12a), 36.0(C-13), 59.1(C-13a), 55.6(2-OCH₃), 56.1(3-OCH₃), 58.9(9-OCH₃), 60.1(10-OCH₃)。以上波谱数据与文献^[8]报道对照基本一致,经薄层色谱(三氯甲烷:甲醇 = 50:1)对照,故鉴定化合物3为四氢巴马汀(Tetrahydropalmatine),分子式为C₂₁H₂₅NO₄。

3.2 小鼠急性毒性试验结果

3.2.1 预实验

Isoc: Dn = 23 mg/kg, Dm = 45 mg/kg; Dic: Dn = 20 mg/kg, Dm = 40 mg/kg; Dico: Dn = 5 mg/kg, Dm = 12 mg/kg。

3.2.2 正式试验

3.2.2.1 Isoc 在小鼠体内的急性毒性试验

在Dn = 23 mg/kg, Dm = 45 mg/kg间设7个剂量组,每组10只小鼠,组间给药剂量比为1:0.9。小鼠注射Isoc后,立即出现心动过速,跳跃、竖尾和惊厥、全身僵直,唾液分泌过多,甚至小便失禁,个别口腔出血。结果见表1。

表1 小鼠尾静脉注射异可立定的剂量与死亡率

Table 1 Dose and mortalities of tail vein Isoc-injected mouse

剂量 Dose (mg/kg)	对数剂量 Logarithmic dose(x)	动物数 Number of animals(n)	死亡数 Deaths (n)	死亡百分率 Death percentage(%)	实验机率 Experimental probability(Y)	回归机率单位 Return probability unit(Y)
45.0	1.6532	10	10	100	-	7.5406
40.5	1.6075	10	9	90	6.2817	6.7432
36.45	1.5617	10	9	90	6.2817	5.9459
32.81	1.516	10	6	60	5.2529	5.1497
29.52	1.4701	10	2	20	4.1585	4.35
26.57	1.4244	10	1	10	3.7183	3.5532

23. 91 1. 2786 10 0 0 - 2. 755

回归方程 y (Probit) = -21. 267 + 17. 425Log (D); LD₅₀ = 32. 167 mg/kg; LD₅₀ (Feiller 校正) 95% 的可信限 = 30. 308-34. 124 mg/kg; LD₅ = 25. 883 mg/kg; LD₉₅ = 39. 977 mg/kg。

3. 2. 2. 2 Dic 在 小鼠体内的急性毒性试验

在 Dn = 20 mg/kg, Dm = 40 mg/kg 间设 6 个剂量组, 每组 10 只小鼠, 组间给药剂量比为 1: 0. 85。小鼠反应同 Isoc。结果见表 2。

表 2 小鼠尾静脉注射荷包牡丹碱的剂量与死亡率
Table 2 Dose and mortalities of tail vein Dic-injected mouse

剂量 Dose (mg/kg)	对数剂量 Logarithmic dose(x)	动物数 Number of animals(n)	死亡数 Deaths (n)	死亡百分率 Death percentage(%)	实验机率 Experimental probability(Y)	回归机率单位 Return probability unit(Y)
40	1. 6021	10	10	100	-	7. 4643
34	1. 5315	10	9	90	6. 2817	6. 4641
28. 9	1. 4609	10	7	70	5. 524	5. 4638
24. 57	1. 3904	10	3	30	4. 476	4. 4649
20. 88	1. 3197	10	1	10	3. 7183	3. 4633
20	1. 301	10	0	0	-	3. 1983

回归方程 y (Probi) = -15. 239 + 14. 171Log (D); LD₅₀ = 26. 802 mg/kg; LD₅₀ (Feiller 校正) 95% 的可信限 = 24. 837-29. 118 mg/kg; LD₅ = 20. 516 mg/kg; LD₉₅ = 35. 014 mg/kg。

在 Dn = 5 mg/kg, Dm = 12 mg/kg 间设 6 个剂量组, 每组 10 只小鼠, 组间给药剂量比为 1: 0. 88。小鼠注射 Dico 后, 出现行动迟缓, 呼吸困难或费力, 喘息, 强直性抽搐, 瞳孔扩大, 严重者出现角弓反张, 小便失禁。结果见表 3。

3. 2. 2. 3 Dico 在 小鼠体内的急性毒性试验

表 3 小鼠尾静脉注射荷包牡丹酮的剂量与死亡率
Table 3 Dose and mortalities of tail vein Dico-injected mouse

剂量 Dose (mg/kg)	对数剂量 Logarithmic dose(x)	动物数 Number of animals(n)	死亡数 Deaths (n)	死亡百分率 Death percentage(%)	实验机率 Experimental probability(Y)	回归机率单位 Return probability unit(Y)
10. 904	1. 0376	10	10	100	-	7. 6774
9. 5951	0. 98205	10	9	90	6. 2817	6. 8341
8. 4437	0. 92653	10	9	90	6. 2817	5. 9909
7. 4305	0. 87102	10	6	60	5. 2529	5. 1476
6. 5388	0. 8155	10	3	30	4. 476	4. 3043
5. 7542	0. 75998	10	0	0	-	3. 4611

回归方程 y (Probit) = -8. 0827 + 15. 189Log (D); 半数致死量 LD₅₀ = 7. 2661 mg/kg; LD₅₀ (Feiller 校正) 95% 的可信限 = 6. 7392-7. 7914 mg/kg; LD₅ = 5. 6625 mg/kg; LD₉₅ = 9. 3238 mg/kg。

镇痛、镇静等作用^[4,9-12]。通常抗心律失常药物的治疗范围较窄, 部分药物有致心律失常作用, 剂量不当则可能致死。为比较该 4 种成分的毒性-结构关系, 本文对前期获得的 Isoc、本次获得的 Dic 和 Dico 进行了小鼠的急性毒性试验, 并在检索范围内首次报道三者的 LD₅₀ 值, 而克班宁的 LD₅₀ 参考课题组前期报道^[5]。Cre、Dic、Dico 和 Isoc 的 LD₅₀ 大小依次为: 9. 382、26. 802、7. 266、32. 167 mg/kg。

4 讨论与结论

如前文所示, 与前期获得的抗心律失常疗效较好、毒性较大的 Cre 相比较, Dic、Isoc 这两种生物碱与其具有相同的母核结构, 而 Dico 为氧化阿朴菲型结构。且有报道前三者均有具有显著抗心律失常、

Cre 的毒性大于 Dic, 二者取代基团的相似处在于 A 环上 C-1, 2 位连接二氧亚甲基, 且都有 D 环上

的两个-OMe 取代;区别在于 Cre 是 C-8,9 位的取代,Dic 是 C-9,10 位的取代。Cre 的 C-8 取代在所研究的 4 种 AP 生物碱中是唯一的,推测 C-8 位的-OMe 取代使其毒性有增强的趋势,尚有待更多类似结构类型的 AP 类生物碱实验验证。Isoc 的 LD₅₀ 在 4 种 AP 类生物碱中最大,即毒性最小。与其他 3 种阿朴菲类生物碱不同的是,Isoc A 环上 C-1,2 位二氧亚甲基断开,推测二氧亚甲基的断裂可能会降低其毒性,尚有待实验证实。Dico 的 LD₅₀ 小于其它 3 种阿朴菲型生物碱,Dico 是氧化阿朴菲型,脂溶性较强,实验结果提示,氧化阿朴菲型的毒性大于阿朴菲型。Dico 的毒性较强还有可能与其空间立体优势结构有关,A、B、C、D 环同处一个平面,且其 B 环上 N-6 位无-CH₃ 取代。C-9 位和 C-10 位的-OMe 分别位于环平面两侧,增加了脂溶性基团插入细胞膜磷脂链中的几率。

上述结果与文献分析一致^[13]:阿朴菲类生物碱的亚甲基二氧环基团对其细胞毒性有重要意义,同时生物碱的极性大小也对其细胞毒性具有重要影响,如强极性的季氨类生物碱表现出较小的细胞毒性。阿朴菲类生物碱极性比氧化阿朴菲生物碱较小,毒性亦相对较小。

参考文献

- Hu ZB(胡之璧),Xu RS(徐任生),Chen GJ(陈光娟),*et al.* Structure identification and pharmacological of mountains tortoise alkaloids. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志),1979,14(3):110-111.
- Min ZD(闵知大),Zheng XZ(郑学忠). Studies on chemical composition of *Stephania dicentrifera* H. S. Lo& M. Yang. *China Tradit Herb Drugs*(中草药),1984,15:8.
- Wang B(汪波). Preliminary study on chemical compositions of *Stephania yunnanensis*. Lo and structure-antiarrhythmic activity relationship of Aporphine type alkaloids. Kunming;

Yunnan University of Traditional Chinese Medicine(云南中医学院). MSc. 2013.

- Yu ZP(淤泽溥),Ma YS(马云淑),Zhao ZX(赵子仙),*et al.* Antiarrhythmic effect of Crebanine. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),1992,17:685-687.
- Ma YS(马云淑),Wu HP(武鸿萍),Zhang ZL(张壮丽). Acute toxicity and antiarrhythmia effect of Crebanine. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学),2005,22(5):18-19.
- Zhou BN,Johnson RK,Mattern MR,*et al.* Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. *J Nat Prod*,2000,63:217-221.
- Li L(李莉),Zuo AX(左爱学),Rao GX(饶高雄). Alkaloidal constituents of Bobohan. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med*(云南中医学院学报),2012,35(3):14-19.
- He L(何丽),Zhang YH(张援虎),Tang LJ(唐丽佳),*et al.* Alkaloids in stems and leaves of *Stephania cepharantha*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2010,35:1272-1275.
- Lin Q(林青),Yang L(杨莲),Duan XH(段小花),*et al.* Studies on site of action and mechanisms of analgesic in Crebanine. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2011,23:341-344.
- Xiao SH(肖顺汉),Qian YL(钱永龄),Ye ZQ(叶宗勤). Preliminary study on the pharmacological effects of L-Dicentrine. *Sichuan J Physiol Sci*(四川生理科学杂志),1988,10(4):50-51.
- Li HL(李惠兰),Li M(李牧),Su SG(苏善国). Antiarrhythmia effect of L-dicentrine. *Acad J Kunming Med Coll*(昆明医学院学报),2001,23(1):49-52.
- Li LH(李立恒),Yang L(杨烈),Zhang MJ(张孟君),*et al.* Antiarrhythmia effect of isocorydine on rabbits. *J Yunnan Tradit Chin Med*(云南中医杂志),1990,12(4):37-38.
- Chen JJ,Ishikawa T,Duh CY,*et al.* New dimeric aporphine alkaloids and cytotoxic constituents of *Hernandi anymphaeifolia*. *Planta Med*,1996,62:528-533.