

吴茱萸总生物碱化学成分及抗单胺氧化酶活性研究

赵俊文, 杨中锋*, 赵维花, 仇艳丽

兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050

摘要: 对吴茱萸(*Evodia rutaecarpa*)总生物碱化学成分进行抗单胺氧化酶活性的跟踪分离研究。应用柱色谱、半制备高效液相色谱、制备 TLC、凝胶色谱及重结晶等从吴茱萸中共分离纯化得到 7 个化合物, 借助 IR、MS、¹H NMR、¹³C NMR 等波谱学方法, 分别鉴定化合物为: 柠檬苦素(1)、Wuchuyamide(2)、吴茱萸碱(3)、吴茱萸次碱(4)、双吴茱萸碱(5)、Evodol(6)、Evodiagenine(7)。此外, 对单体化合物进行了抗单胺氧化酶(monoamine oxidase MAO)活性的测定。研究表明: 1、2、4、6 和 7 对单胺氧化酶抑制作用很低, 而 3 和 5 在终浓度为 167 μg/mL 时抑制率能达到 80%, 故进一步测定了其抑制浓度(IC₅₀), 分别为 55 μg/mL、68 μg/mL。

关键词: 吴茱萸; 柠檬苦素; 生物碱类成分; 单胺氧化酶抑制剂

中图分类号: R914.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.006

Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Total Alkaloids from *Evodia rutaecarpa*

ZHAO Jun-wen, YANG Zhong-duo*, ZHAO Wei-hua, QIU Yan-li

School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

Abstract: Seven compounds were isolated and purified from *Evodia rutaecarpa* by silica gel column chromatography, MCI column chromatography, Sephadex (LH-20), HPLC and recrystallization etc. The structures of these compounds were determined based on NMR and ESI-MS spectral data, as well as comparing with previous literature data. Seven compounds were determined as limonoid (1), wuchuyamide (2), evodiamine (3), rutaecarpin (4), dievodiamine (5), evodol (6), Evodiagenine (7). In the next step, all compounds were screened for their anti-monoamine oxidase activities. Compounds 3 and 5 showed MAO inhibitory activities with IC₅₀ values of 55 μg/mL, 68 μg/mL, respectively, at the concentration of 167 μg/mL.

Key words: Fructus Evodiae; limonin; alkaloid components; monoamine oxidase inhibitors

吴茱萸干燥果实是一种传统中药, 已经用于治疗头痛、腹痛、四肢寒颤、产后出血、痛经、腹泻、恶心呕吐、高血压病等, 药用果实来源于芸香科吴茱萸, 另外还有其变种石虎吴茱萸、疏毛吴茱萸^[1]。药理研究显示其有镇痛、镇静、抗菌、抗心肌缺氧、抗高血压作用。本课题组前期, 从多种中草药提取物中筛选单胺氧化酶抑制剂时, 发现吴茱萸提取物显示出一定的抗单胺氧化酶活性, IC₅₀ 为 81.0 μg/mL^[2]。本研究在此研究的基础之上, 对吴茱萸中的活性成分进行了跟踪分离, 希望发现高活性的单体化合物, 为以后的单胺氧化酶抑制剂药物的研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 试剂和材料

柱层析硅胶(200 ~ 300 目), 薄层层析硅胶(GF₂₅₄), 硅胶 G 板, MCI-GEL CHP 20P(75 ~ 150 μm, 日本三菱化学公司), 大孔树脂(HPD-100, 河北沧州宝恩化学有限公司)。香草醛(化学纯, 天津市天新精细化工开发中心), 4-氨基安替吡啉、辣根过氧化物酶(分析纯, 阿拉丁试剂上海有限公司), 碘化硫代乙酰胆碱(ATCI, Sigma), 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB, Sigma)、磷酸异丙烟肼(东京化工有限公司)。氘代试剂: D₂O、氘代氯仿、氘代甲醇、氘代丙酮、氘代吡啶(北京崇熙科技孵化器有限公司)其他化学试剂均为分析纯。

吴茱萸(*Evodia rutaecarpa*)干燥果实(购于甘肃省兰州市黄河药材市场安宁医药公司复兴厚药

收稿日期: 2017-02-20 接受日期: 2017-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(21262022); 兰州市科技发展计划(2014-1-151); 甘肃省科技支撑计划(1604FKCA084)。

* 通信作者 E-mail: yangzhongduo@126.com

房),由兰州理工大学生命科学与工程学院杨林副教授鉴定为吴茱萸(*Evodia rutaecarpa*)。

1.2 仪器

酶标板 96 孔(美国 CorningCostar 公司);BrukerAm-400(核磁共振仪);酶标仪(Elx 808, BioTek, USA);高效液相色谱输液泵 Waters 510 (Milford, USA);高效液相色谱紫外检测器 Waters 2478 双波长检测器;高效液相 ODS-A 柱 250 × 10 mm, 5 μm (YMC-Pack, USA)。

2 实验方法

2.1 吴茱萸总生物碱的提取

将干吴茱萸(5 kg)粉碎,用 95% 的工业乙醇回流提取两次,每次 2.5 h。然后用滤布过滤提取物,合并滤液,弃药渣。滤液减压蒸馏浓缩,得到提取物浸膏。然后将浸膏用蒸馏水悬浮溶解,再加入(2 mol/L)盐酸溶液,用 pH 计测定 pH 为 2~3 即可,静置 12 h;将未溶解物质过滤除去;再加入 NaOH 溶液(4 mol/L)测定 pH 至 10~11(注意有沉淀析出),然后用等体积氯仿萃取至有机相无色即可,将有机相浓缩除去溶剂,获得吴茱萸总生物碱浸膏(19 g)。

2.2 吴茱萸总生物碱中抗单胺氧化酶成分的跟踪分离

将吴茱萸总生物碱浸膏用 25% 的乙醇溶液溶解,大孔树脂(100~200 目)装柱,湿法上样,依次用水和 30%、50%、70%、95% 乙醇梯度洗脱,用薄层层析法(TLC),以硫酸乙醇为显色剂检测合并,得到 5 个粗组分:wzy-d1(2.0 g)、wzy-d2(8.0 g)、wzy-d3(3.0 g)、wzy-d4(4.0 g)、wzy-d5(2.0 g),其中,部分收集物有结晶,从 wzy-d2(8.0 g)中重结晶得到化合物 1,从 wzy-d3(3.0 g)中重结晶得到化合物 3、4。

将组分 wzy-d1 至 wzy-d5 分别配置成浓度为 1000 μg/mL 的样品,用酶标法测定其 MAO 抑制活性,抑制率分别如下:60.00%、61.57%、74.02%、45.31%、50.68%。由以上数据可以确定其活性顺序为:wzy-d3 > wzy-d2 > wzy-d1 > wzy-d5 > wzy-d4,故此可根据测定的活性大小确定分离顺序为 wzy-d3 > wzy-d2 > wzy-d1 > wzy-d5 > wzy-d4。

采用 MCI 色谱柱对 wzy-d1 进行分离,将 2.0 g 样品用少量甲醇溶解后湿法上样,以甲醇-水系统为流动相,进行梯度洗脱。浓缩组分用 TLC 检测合并,得到 wzy-d1-m1 至 wzy-d1-m8 等八个组分。

将所得组分配置成浓度为 1000 μg/mL 的样品

测定其 MAO 抑制活性,wzy-d1-m1 至 wzy-d1-m8 的抑制率分别为 25.58%、55.33%、60.19%、61.94%、50.11%、59.54%、43.00%、48.00%。

采用硅胶柱色谱对 wzy-d1-m4 进行分离,将样品(402 mg)干法上样,用氯仿-甲醇体系为流动相进行梯度洗脱,梯度为 40:1、20:1、15:1、10:1、5:1、2:1 每 100 mL 收集浓缩一次,TLC 检测合并馏分,得到块状结晶化合物 7。

采用 MCI 柱色谱对 wzy-d2(5.0 g)进行分离,将样品用少量甲醇溶解后湿法上样,用甲醇-水梯度洗脱(洗脱梯度为水、20%、40%、60%、80%、甲醇)。水洗脱组分弃去,每 500 mL 收集浓缩一次。浓缩组分用 TLC 检测合并。其中 20% 梯度洗脱馏分 4~26 瓶合并(181 mg)采用硅胶柱层析法,以氯仿-甲醇体系洗脱,60% 洗脱组分 5-6 瓶中重结晶得到化合物 2;馏分 20-24 瓶中为白色固体,合样后,用硅胶柱层析法,以石油醚-乙酸乙酯洗脱,选用 4:1 和 2:1 两个梯度,得到化合物 6 和化合物 1。

采用硅胶柱色谱对 wzy-d3(3.0 g)进行分离,以石油醚:丙酮体系为流动相,用 40:1、30:1、15:1、10:1、2:1 梯度进行洗脱。其中梯度 15:1 洗脱馏分中得到化合物 4(5 mg),梯度 10:1 洗脱馏分中得到化合物 3,梯度 2:1 中,馏分 6~9 瓶合并,甲醇中得到化合物 2,馏分 23~27 瓶中重结晶得到化合物 5。

2.3 化合物单胺氧化酶抑制活性的测定

2.3.1 单胺氧化酶的制备

将雌性 Wistar 大鼠(180~250 g)用颈椎脱臼法处死,用剪刀将肝脏从小鼠腹腔内取出,用冰冷的 PBS(pH = 7.6)将其表面冲洗干净并剪碎,用蔗糖溶液冲洗数次之后,加入匀浆器中,在冰水浴中缓慢研细至无可见肝粒,加入离心管中(50 mL),再加蔗糖溶液至离心管的一般刻度,1000 rpm 离心 10 min,弃沉淀,1200 rpm 离心 15 min,取上清液,再在 10000 rpm 的速度下离心 30 min,白色沉淀物为线粒体粗体物即所提单胺氧化酶。加入 4 mL PBS 缓冲液分装至 EP 管中-20 °C 冷藏备用,每 400 μL/份(注意分装前摇匀)冷藏备用^[2]。

2.3.2 单胺氧化酶活性测定方法

采用酶标法测定样品对单胺氧化酶的抑制率,反应原理如下:单胺氧化酶催化氧化胺类物质产生副产物 H₂O₂,H₂O₂ 在过氧化物酶的存在下氧化 4-氨基安替吡啉,生成的氧 4-氨基安替吡啉再与香草酸反应,观察到红色产物,测定 490 nm 吸光度值。

反应后的颜色越深,样品抑制单胺氧化酶能力越强,测到的吸光度值大。通过吸光度值的不同来检测物质抑制单胺氧化酶的能力^[3]。

活性测定:在96孔酶标板中,分别设3个空白组,3个完全抑制组,3个阳性药样品组,1个阳性药本底组,3个样品组,1个样品本底组。空白组及完全抑制组依次加入40 μL酶,40 μL PBS缓冲溶液(pH 7.6);阳性药组及其本底组依次加入40 μL酶,40 μL阳性药(磷酸异丙烟肼浓度分别为25、20、15、10、7.5、5 μg/mL)样品组及其本底组加入40 μL酶,40 μL样品(1 mg/mL)。37 °C下孵育20 min,再向各组加120 μL底物;各本底组加120 μL PBS,所有待测样品中加40 μL显色液。37 °C孵育90 min后,在490 nm下用酶标仪测定其吸光度值。计算抑制率,所有样品同样的方法重复3次,结果取平均值。

待反应完成后,在490 nm下用酶标仪测定酶标板中吸光度值。根据下式计算抑制率:

抑制率(%) =

$$\frac{(\text{空白对照组} - \text{完全抑制组}) - (\text{样品组} - \text{样品本底})}{\text{空白对照组} - \text{完全抑制组}}$$

3 实验结果

3.1 化合物结构鉴定

运用¹H NMR, ¹³C NMR等现代波谱技术,并结合文献比对的方法对分离得到的7个化合物进行了结构鉴定,波谱数据如下:

化合物 1 白色固体(氯仿);¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 4.04(1H, brs, H-1), 2.68(1H, dd, J = 17.2 Hz, H-2α), 2.98(1H, dd, J = 17.4 Hz, H-2β), 2.25(1H, dd, J = 15.3 Hz, H-5), 2.47(1H, dd, J = 14.3 Hz, H-6α), 2.86(1H, dd, J = 15.1 Hz, H-6β), 2.57(1H, dd, J = 12.3 Hz, H-9), 4.04(1H, s, H-15), 5.47(1H, s, H-17), 1.17(3H, s, H-18), 4.45(1H, d, J = 13.0 Hz, H-19α), 4.75(1H, d, J = 13.0 Hz, H-19β), 7.41(1H, s, H-21), 6.38(1H, d, H-22), 7.40(1H, d, H-23), 1.30(3H, s, H-28), 1.18(3H, s, H-29), 1.07(3H, s, H-30), 以上氢谱数据与文献^[4]一致,故鉴定为 limonin。

化合物 2 无色结晶(氯仿);¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 4.01(1H, m, H-5a), 4.17(1H, m, H-5b), 2.25(1H, m, H-6a), 2.47(1H, m, H-6b), 7.32(1H, d, J = 8.0 Hz, H-9), 7.10(1H, t, J = 8.0 Hz, H-

10), 7.28(1H, t, J = 8.0 Hz, H-11), 7.25(1H, d, J = 8.0 Hz, H-12), 6.81(1H, d, J = 8.0 Hz, H-16), 7.72(1H, t, J = 8.0 Hz, H-17), 6.87(1H, t, J = 8.0 Hz, H-18), 8.04(1H, d, J = 8.0 Hz, H-19), 3.57(3H, s, H-22), 以上氢谱数据与文献^[5]中数据一致,故鉴定为 wuchuyamide。

化合物 3 无色针状结晶(氯仿);¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 5.92(1H, s, H-3), 4.88(1H, dt, J = 12.4 Hz, H-5α), 3.27-3.29(1H, m, H-5β), 2.95 ~ 2.98(2H, m, H-6), 8.13(1H, d, J = 8.0 Hz, H-12), 7.14 ~ 7.60(7H, m, H-9, 10, 11, 16, 17, 18, 19), 2.50(3H, s, -CH₃), 8.25(1H, brs, -NH), 以上氢谱数据与文献报道的吴茱萸碱一致^[6]的,故鉴定为吴茱萸碱(Evodiamine)。

化合物 4 淡黄色结晶(氯仿);¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 4.58(2H, t, J = 6.4 Hz, H-5), 3.22(2H, t, J = 6.4 Hz, H-6), 8.34(1H, d, J = 8.0 Hz, H-12), 7.15 ~ 7.72(7H, m, J = 8.0 Hz, H-9, 10, 11, 16, 17, 18, 19), 9.65(1H, brs, -NH); 以上数据与文献报道一致^[6], 鉴定为吴茱萸次碱。

化合物 5 无色针状结晶(氯仿); ESIMS: m/s 603.2 [M + H]⁺, ¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 3.05(1H, dt, J = 12.6, 4.5, 5.1 Hz, H-5ax), 4.86(1H, dd, J = 12.6, 3.9, 3.7 Hz, H-5eq), 2.76(1H, dt, J = 11.1, 3.7, 4.5 Hz, H-6ax), 2.95(1H, dd, J = 11.1, 3.9, 5.1 Hz, H-6eq), 7.55(1H, d, J = 7.8 Hz, H-9), 7.10(1H, t, J = 7.8 Hz, H-10), 7.16(1H, t, J = 7.5 Hz, H-11), 7.36(1H, d, J = 8.1 Hz, H-12), 7.10(1H, d, J = 8.1 Hz, H-16), 7.24(1H, t, J = 7.5 Hz, H-17), 7.00(1H, t, J = 7.5 Hz, H-18), 7.74(1H, d, J = 7.5 Hz, H-19), 2.50(3H, s, N-CH₃), 11.30(1H, bra, N-H), 6.30(1H, d, J = 16.0 Hz, H-5'), 6.60(1H, d, J = 16.0 Hz, H-6'), 7.64(1H, d, J = 8.1 Hz, H-9'), 7.10(1H, t, J = 8.1, 7.2 Hz, H-10'), 7.20(1H, t, J = 8.1, 7.2 Hz, H-11'), 7.41(1H, d, J = 8.1 Hz, H-12'), 7.45(1H, t, J = 8.4 Hz, H-16'), 7.88(1H, t, J = 8.4, 7.8 Hz, H-17'), 7.60(1H, t, J = 6.6, 7.8 Hz, H-18'), 8.16(1H, d, J = 6.6 Hz, H-19'), 3.26(3H, s, H-22'), 11.93(1H, bra, N-H'); ¹³C NMR:(CDCl₃, 100 MHz) δ_C: 131.0(C-2), 76.8(C-3), 38.9(C-5), 20.7(C-6), 112.0(C-7), 125.7(C-8), 119.8(C-9), 119.9(C-10), 122.9(C-11), 111.9(C-12), 136.8(C-13), 149.7(C-15),

122.8 (C-16), 133.2 (C-17), 123.6 (C-18), 127.9 (C-19), 124.8 (C-20), 163.5 (C-21), 39.1 (C-22), 130.1 (C-2'), 155.3 (C-3'), 128.5 (C-5'), 121.9 (C-6'), 116.0 (C-7'), 125.0 (C-8'), 120.0 (C-9'), 121.0 (C-10'), 124.2 (C-11'), 111.9 (C-12'), 136.9 (C-13'), 141.6 (C-15'), 116.0 (C-16'), 134.0 (C-17'), 126.3 (C-18'), 127.0 (C-19'), 120.0 (C-20'), 168.7 (C-21'), 37.1 (C-22')。以上氢谱数据因溶剂不同略有差异,碳谱数据和质谱数据与文献^[7]一致,故鉴定为 Dievodiamine。

化合物 6 白色针状结晶(氯仿); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 4.08 (1H, brs, H-1), 2.85 (1H, dd, *J* = 17.2 Hz, H-2_α), 2.97 (1H, dd, *J* = 17.4 Hz, H-2_β), 2.67 (1H, dd, *J* = 15.3 Hz, H-9), 4.12 (1H, s, H-15), 5.44 (1H, s, H-17), 1.05 (3H, s, H-18), 4.64 (2H, d, *J* = 13.0 Hz, H-19), 7.40 (1H, s, H-21), 6.33 (1H, d, H-22), 7.40 (1H, d, H-23), 1.55 (3H, s, H-28), 1.50 (3H, s, H-29), 1.16 (3H, s, H-30), 以上氢谱数据与文献^[4]一致,故鉴定为 Evodol。

化合物 7 白色针状结晶(氯仿); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 8.23 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-5), 7.48 (1H, d, *J* = 5.4 Hz, H-6), 8.80 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-9), 7.65 (1H, t, *J* = 7.4 Hz, H-10), 7.48 (1H, t, *J* = 7.4 Hz, H-11), 7.99 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-12), 8.11 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-16), 7.13 (1H, t, *J* = 7.3 Hz, H-17), 7.54 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-18), 7.20 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-19), 3.53 (3H, s, N-CH₃) 上述数据与文献^[7]一致,鉴定为 Evodiagenine。

3.2 化合物抗单胺氧化酶活性测定结果

通过酶标法对 7 个化合物的单胺氧化酶抑制活性进行了测定,化合物终浓度为 167 μg/mL,测定结果化合物 1、2、4、6、7 对单胺氧化酶抑制作用很弱,化合物 3 和 5 在终浓度为 167 μg/mL 时进一步测定了其抑制浓度(IC₅₀)分别为 55、68 μg/mL。

4 讨论

本文对吴茱萸的化学成分做了较为系统的研究,通过运用各种色谱法及重结晶方法,从吴茱萸中分离纯化得到 7 个化合物。分析化合物理化性质和波谱数据,并结合文献比对的方法鉴定了化合物,其中得到了含量较高的柠檬苦素、吴茱萸次碱、吴茱萸碱、Wuchuyamide、Evodol、Evodiagenine,还有含量较少的二聚化合物 Dievodiamine。由活性测定可知,

单体化合物对单胺氧化酶有不同程度的抑制作用,而化合物 1、化合物 2、化合物 4、化合物 6 和化合物 7 抑制率较低,其中化合物 1 和化合物 6 为柠檬苦素类物质,说明柠檬苦素类物质对单胺氧化酶几乎无抑制作用。查阅文献发现,柠檬苦素对昆虫有拒食作用,还有降低免血糖、抗菌、抗疟、抗肿瘤、抗病毒等其他生物活性^[8]; Lam 等^[9]在体外实验中发现,柠檬苦素及其类似物能够激发肝脏和小肠粘膜上谷胱甘酞转移酶(GST)活性,唐莉莉等^[10]发现柠檬苦素类化合物能够抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长,综上可见柠檬苦素有较好的抗肿瘤活性,能够有效抑制患病大鼠内肿瘤细胞生长;吴茱萸碱、吴茱萸次碱等生物碱成分是吴茱萸中主要有效成分,作用于心血管系统、消化道系统、中枢神经系统等,具有舒张血管^[11]、镇痛、抗溃疡、利尿、抗缺氧、抗血小板聚集^[12]、肛门括约肌松弛^[13]等多种药理作用。

但是,吴茱萸中单体化合物有关抗单胺氧化酶活性方面的研究本文为首次报道,研究发现生物碱类物质在抑制单胺氧化酶活性过程中发挥主要作用。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 118-119.
- 2 Qiu Y (裘月), Du GH (杜冠华), Zhang JT (张均田). The relationship between monoamine oxidase and disease. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1994, 29: 596-598.
- 3 Information Office of the Ministry of health (卫生部新闻办公室). The third national cause of death investigation. *China Cancer* (中国肿瘤), 2008, 5: 344-345.
- 4 Sugimoto T, Miyase T, Kuroyanagi M, et al. Limonoids and quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa* Benth. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36: 4453-4461.
- 5 Yang XW, Teng J. Chemical constituents of the unripe fruits of *Evodia rutaecarpa*. *J Chin Pharm Sci*, 2007, 16(1): 20-23.
- 6 Yang XW (杨秀伟). Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of evodiamine, rutaecarpine and dehydroevodiamine. *Chin J Magnet Reson* (波谱学杂志), 1999, 16: 564-568.
- 7 Wang QZ, Liang JY, Feng X. Evodiagenine (I) and dievodiamine (II), two new indole alkaloids from *Evodia rutaecarpa*. *Chin Chem Lett*, 2010, 21: 596-599.