

苦豆子种子生物碱类化学成分及细胞毒活性

姚雯¹, 孙培环¹, 徐晓敏¹, 李雅娟¹, 袁呈山², 王振华^{1,3*}

(1. 石河子大学 药学院/新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002;

2. 兰州大学 功能有机分子化学国家重点实验室, 兰州 730000;

3. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

[摘要] 目的:研究苦豆子种子的化学成分并对其抗肿瘤活性进行测试。方法:采用常规的硅胶柱层析(CC),葡聚糖(Sephadex LH-20)柱层析,和重结晶等实验手段对其进行了分离纯化,利用波谱技术(¹H-NMR, ¹³C-NMR)及与文献数据对照,对分离的化合物进行了结构鉴定;并采用 MTT 测定部分生物碱单体化合物体外对 C6 肿瘤细胞的细胞毒活性。结果:共分离出 7 个生物碱类化合物,分别鉴定为:苦参碱(1),氧化苦参碱(2),槐果碱(3),9 α -羟基槐果碱(4),氧化槐果碱(5),9 α -羟基槐胺碱(6),(-)-13,14-去氢槐定碱(7),1 个非生物碱化合物 3-吡啶甲醛(8)。结论:化合物 8 为首次从该属植物中分离得到。细胞毒活性测试结果表明,化合物 1~3 和 5 对鼠脑胶质瘤 C6 细胞显示了较强的生长抑制活性。

[关键词] 苦豆子; 化学成分; 生物碱; 结构鉴定; 细胞毒活性

[中图分类号] R284.2;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)22-0095-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220095

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.1019.011.html>

[网络出版时间] 2014-10-10 10:19

Alkaloids Constituents of *Sophora alopecuroides* Seed and Their Cytotoxic Activity

YAO Wen¹, SUN Pei-huan¹, XU Xiao-min¹, LI Ya-juan¹, YUAN Cheng-shan², WANG Zhen-hua^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

3. School of Life Science of Yantai University, Yantai 264005, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the chemical constituents in seed of *Sophora alopecuroides* and to determine their antitumor activities *in vitro*. **Method:** Compounds were isolated and purified by means of silica gel and Sephadex LH-20 gel column chromatography, and recrystallization etc. Their structures were elucidated using spectroscopic analysis including ¹H-NMR, ¹³C-NMR and spectral data. The cytotoxic activities of the alkaloids compounds on C6 cell *in vitro* were evaluated by MTT method. **Result:** Seven compounds were isolated from the ethanol extract of the seed of *S. alopecuroides*. Their structures were identified as (+)-matrine (1), (+)-oxymatrine (2), (-)-sophocarpine (3), (-)-9 α -hydroxysophocarpine (4), (+)-oxysophocarpine (5), (-)-9 α -hydroxysophoramine (6), (-)-13, 14-dehydrosophoridine (7), and a non-alkaloid named indolyl-3-carbaldehyde (8). **Conclusion:** The compound 8 was isolated from the genus *sophora* for the first time. Compounds 1-3 and 5 showed significant inhibitory activity towards C6 glioma cells.

[Key words] *Sophora alopecuroides*; chemical constituent; alkaloids; structural elucidation; cytotoxicity

[收稿日期] 20140220(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(11175222);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-10-0967)

[第一作者] 姚雯, 硕士, 从事研究天然产物化学和药理学研究, Tel:13677556377, E-mail: yw881010@163.com

[通讯作者] *王振华, 副教授, 研究生导师, 从事肿瘤细胞及分子药理研究, Tel:18506382875, E-mail: zhenhuawang@tom.com

苦豆子系豆科多年生草本植物,别名苦豆根、苦甘草,是中国西北及华北地区的一种重要植物资源,对其化学成分和生物活性研究主要集中在生物碱和黄酮成分,其地上部分种子的成分未系统性报道,且已有研究表明苦参碱对大鼠脑胶质瘤细胞有明显的增殖抑制和诱导分化作用^[1-4],但关于其余同属四环的喹啉啶(quinolizidine)类的苦参碱类生物碱对胶质瘤的作用报道较少。故本实验对苦豆子种子的化学成分进行系统的分离鉴定并采用 MTT 法测定主要单体成分对鼠脑胶质瘤 C6 细胞的增殖抑制作用,为苦豆子在医药保健等领域的应用奠定基础。

1 材料

Mecury-300BB, Mecury-400BB 超导核磁共振仪(Varian),MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱(三洋电器有限公司),BCM-1000 型生物净化工作台(苏州净化设备有限公司),MK3 酶标仪(上海雷勃分析有限公司)。柱色谱硅胶(200~300 目),薄层色谱硅胶(硅胶 H, GF 254)均为青岛海洋化工厂出品。氨水及萃取用石油醚(沸程 30~60℃),乙酸乙酯和正丁醇均为天津化学试剂有限公司出品,柱层析用石油醚(60~90℃)、三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、丙酮和甲醇均为重蒸工业试剂,葡聚糖凝胶(Sephedex HL-20),薄层(TLC)检测用 ZF-1 三用紫外灯(254, 365 nm)。显色剂为:Dragendorff 试剂(35 mL 碘化铋钾制备液溶于 350 mL 水及 70 mL 冰乙酸中),5% 的硫酸-乙醇溶液加热显色。活性试验所用材料:DMEM 细胞培养基(Gibco 公司),MTT, DMSO(Sigma 公司),FBS(浙江天杭生物科技有限公司)。鼠脑胶质瘤 C6 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库,在含有体积分数 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,于体积分数 5% CO₂、湿度 90% 以上 37℃ 温箱中培养。化合物于 4℃ 避光保存备用,给药前以二甲基亚砜(DMSO)溶解,再以无血清 DMEM 稀释至所需体积分数(DMSO 终体积分数不高于 0.1%)。

化学位移值(δ , ppm)以溶剂残留峰(CD₃OD: δ_H 3.31, δ_C 49.0; DMSO-*d*: δ_H 2.50, δ_C 39.5)为参照,用 CDCl₃ 作溶剂时以四甲基硅烷(TMS)为内标。

苦豆子于 2012 年 8 月采于新疆维吾尔自治区石河子市,由兰州大学化学化工学院袁呈山副教授鉴定为豆科植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* 种子。植物标本现存于兰州大学化学化工学院天然有机研究室。

2 提取与分离

苦参的种子(15.0 kg),用体积分数为 95% 的乙醇 60℃ 加热回流提取 3 次,每次 2 h,第 3 次加热至溶剂沸腾,浸出液滤过经减压蒸除溶剂得浸膏 1 000 g。所得浸膏加适量水后混悬,用石油醚(1 500 mL×3)萃取,弃去石油醚层,得水相部位 110 g。将所得的水相用大孔树脂进行柱色谱^[5-6],分别用柱体积 90%, 60%, 30% 的甲醇和水进行洗脱,用薄层法检测洗脱效果相同的流份进行合并,得到 4 个组分 Fr. a, Fr. b(55 g), Fr. c(35 g), Fr. d。分离和鉴定过程中发现,Fr. a 洗脱液较黏稠,有甜味,纯甲醇点板,硫酸显色为黑褐色,经碘化铋钾显色为橙红色,可能为连糖生物碱,因极性较大,放置未进一步分离。Fr. d 为一些黑色残渣,经薄层色谱检测多为极性很大的化合物,溶解性较差,故放置未进一步分离鉴定。Fr. b(55 g)洗脱液的生物碱的斑点颜色最深,以 60 g(200~300 目)硅胶拌样,挥干溶剂后以 600 g 硅胶湿法装柱,用三氯甲烷-甲醇(50:1, 25:1, 10:1, 5:1, 2:1, 0:1)6 个极性段(A-F)梯度洗脱(28% 浓氨水在整个洗脱过程保持占溶剂总体积的 1%),每 600 mL 为一馏分,经薄层色谱检测合并相同馏分后分别进行 Sephadex LH-20 柱色谱,接下来用 MCI 凝胶色谱,用水-甲醇(10:1~1:5)进行梯度洗脱,合并相同流份,最后分别进行反复硅胶(300~400 目)柱色谱得到化合物 2(80 mg),化合物 3(70 mg)和化合物 5(150 mg);Fr. c(35 g)以 50 g 硅胶拌样,60 g 硅胶湿法装柱,以二氯甲烷-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱得到 Fc-1~Fc-3 三部分。Fc-1 经硅胶(200~300 目)柱色谱后,析出固体,用石油醚-丙酮重结晶,得 8(5 mg);Fc-2 先用葡聚糖洗脱除去色素等杂质后,再用 MCI 凝胶色谱以水-甲醇洗脱(1:0→0:1)洗脱分段,然后用反相硅胶(RP-18)以水-甲醇洗脱(5:0~0:3)得到化合物 1(28 mg),化合物 4(30 mg),化合物 6(5.8 mg),Fc-3 用硅胶柱以二氯甲烷-乙酸乙酯-丙酮为洗脱剂反复洗脱最终得到化合物 7(13 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 白色针状晶体(三氯甲烷),在 254, 365 nm 紫外灯下均无荧光,用 5% 的硫酸-乙醇溶液加热不显色,Dragendorff 反应呈阳性,推断其可能为生物碱类化合物。结合¹H-NMR, ¹³C-NMR 波谱数据确定化合物 1 的分子式为 C₁₅H₂₄N₂O, 不饱和度为 5。C₁₅H₂₄N₂O(248), mp 75~77℃; [α]_D²⁰ 37.9°(c=0.11, CH₃OH)。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃)

δ : 4.41 (1H, dd, $J = 12.8, 4.4$ Hz, H-17 α), 3.83 (1H, m, H-11), 3.06 (1H, t, $J = 12.8$ Hz, H-17 β), 2.82 (2H, m, H-2 β , 10 β), 2.43 (1H, dt, $J = 16.8, 4.0$ Hz, H-14 β), 2.27 (1H, dd, $J = 10.8, 5.6$ Hz, H-14 α), 2.06 ~ 2.12 (2H, br s, H-6, 7), 1.88 ~ 1.99 (3H, m, H-2 α , 8 β , 10 α), 1.23 ~ 1.86 (12H, m)。 ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 57.2 (t, C-2), 21.1 (t, C-3), 27.0 (t, C-4), 35.3 (d, C-5), 63.8 (d, C-6), 41.4 (d, C-7), 26.4 (t, C-8), 20.7 (t, C-9), 57.2 (t, C-10), 53.1 (d, C-11), 27.0 (t, C-12), 18.9 (t, C-13), 32.8 (t, C-14), 169.4 (s, C-15), 43.2 (t, C-17)。经查阅文献[4,7-8]与(+)-matrine(苦参碱)的波谱数据对照,基本一致,因此该化合物的结构被确定为(+)-matrine(苦参碱)。

化合物 2 白色针状晶体(三氯甲烷),紫外 254,365 nm 下均无荧光,用 5% 的硫酸-乙醇溶液加热不显色,Dragendorff 反应呈阳性,推测其可能为生物碱类化合物。结合 ^{13}C -NMR 和 ^1H -NMR 确定化合物 2 的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$, 不饱和度为 5。1 位 N 上连氧,由于配位键氧的电负性产生诱导效应,使(β 位向低场位移而 α 位向高场位移造成。 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ (264), mp 165 ~ 166 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} - 89^{\circ}$ ($c = 0.10$, CH_3OH)。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.93 (1H, s, H-11), 4.38 (1H, dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, H-17 α), 4.03 (1H, t, $J = 12.4$ Hz, H-17 β), 3.09 ~ 3.24 (5H, m, H-2 α , 2 β , 6, 10 α , 10 β), 2.51 ~ 2.72 (2H, m, H-3 β , 9 β), 2.42 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-14 β), 2.13 ~ 2.27 (2H, m, H-14 α , H-12 β), 2.02 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, H-8 β), 1.53 ~ 1.87 (9H, m), 1.23 (1H, m, H-12 α)。 ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 69.1 (t, C-2), 17.2 (t, C-3), 25.9 (t, C-4), 34.4 (d, C-5), 67.3 (d, C-6), 42.6 (d, C-7), 24.5 (t, C-8), 17.3 (t, C-9), 68.8 (t, C-10), 53.1 (d, C-11), 28.6 (t, C-12), 18.9 (t, C-13), 32.8 (t, C-14), 169.4 (s, C-15), 41.4 (t, C-17)。对照文献[4,7-8]数据与氧化苦参碱数据均一致,所以化合物 2 鉴定为(+)-oxymatrine(氧化苦参碱)。

化合物 3 无色菱形晶体(丙酮),紫外 254,365 nm 下有暗棕色荧光,用 5% 的硫酸-乙醇溶液加热不显色,Dragendorff 反应呈阳性,推测其可能为生物碱类化合物。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 确定化合物 3 的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$, 不饱和度为 6。 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ (246), mp 53 ~ 54 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} - 15^{\circ}$ ($c =$

0.10, CH_3OH)。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.43 (1H, m, H-13), 5.85 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-14), 4.09 (1H, dd, $J = 12.8, 4.4$ Hz, H-17 α), 3.95 (1H, dd, $J = 16.8, 9.6$ Hz, H-11), 3.13 (1H, t, $J = 12.8$ Hz, H-17 β), 2.78 (2H, br t, $J = 13.6$ Hz, H-2 β , 10 β), 2.58 (1H, dt, $J = 18.0, 5.2$ Hz, H-6), 2.17 (1H, m), 2.07 (1H, br s), 1.35 ~ 2.00 (12H, m)。 ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 57.2 (t, C-2), 21.0 (t, C-3), 27.7 (t, C-4), 34.6 (d, C-5), 63.4 (d, C-6), 41.5 (d, C-7), 26.5 (d, C-8), 20.7 (t, C-9), 57.2 (t, C-10), 51.4 (d, C-11), 27.3 (t, C-12), 137.4 (d, C-13), 124.5 (d, C-14), 165.7 (s, C-15), 41.9 (t, C-17)。经与文献[8]数据比较,确定其为 13,14-去氢苦参碱,即(-)-sophocarpine(槐果碱)。

化合物 4 无色细针晶(丙酮),紫外 254 nm 下可观察到暗棕色荧光,5% 的硫酸-乙醇溶液加热不显色,遇 Dragendorff 试剂呈阳性反应,推测其可能为生物碱类化合物。其 ^1H -NMR 与化合物 3 很相似, ^{13}C -NMR 发现没有化合物 3 的 C-9(或 3)共振峰,而在 $\delta 55 \sim 65$ ppm 多出一信号,而且 C-8(或 4)和 C-10(或 2)的信号发生了 7 ~ 10 ppm 左右的低场位移,表明 B 环的 9 位或者 A 环的 3 位连有羟基。结合 ^{13}C -NMR 和 ^1H -NMR 确定化合物 4 的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$, 不饱和度为 6。 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (262), mp 120 ~ 121 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} - 49^{\circ}$ ($c = 0.10$, CH_3OH)。 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.47 (1H, m, H-13), 5.88 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-14), 4.12 (1H, dd, $J = 13.2, 4.8$ Hz, H-17 α), 3.81 (2H, m, H-8 β , 11), 3.13 (1H, br s, 9-OH), 3.04 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-17 β), 3.01 (1H, br d, H-10 β), 2.82 (1H, br d, H-2 β), 2.66 (1H, dt, $J = 18.0, 5.4$ Hz, H-12 α), 2.25 (1H, m, H-6), 1.45 ~ 2.08 (10H, m), 1.34 (1H, m)。 ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 56.9 (t, C-2), 20.6 (t, C-3), 27.2 (t, C-4), 34.0 (d, C-5), 62.4 (d, C-6), 42.1 (d, C-7), 35.4 (t, C-8), 62.7 (d, C-9), 64.2 (t, C-10), 52.0 (d, C-11), 27.5 (t, C-12), 137.4 (d, C-13), 124.4 (d, C-14), 165.5 (s, C-15), 41.9 (t, C-17)。经与文献[9]数据对照,该化合物被确定为(-)-9 α -羟基槐果碱[(-)-9 α -hydroxysophocarpine]。

化合物 5 白色片状结晶(丙酮),紫外 254,365 nm 下均有暗棕色荧光,用 5% 的硫酸-乙醇溶液加热不显色,Dragendorff 反应呈阳性,推测其可能为生物碱类化合物。结合 ^{13}C -NMR 和 ^1H -NMR 确定化

合物 **5** 的分子式为 $C_{15}H_{22}N_2O_2$, 不饱和度为 6。 $C_{15}H_{22}N_2O_2$ (262), mp 202 ~ 204 °C; $[\alpha]_D^{20}$ 61.5° ($c = 0.12$, CH_3OH)。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.32 (1H, m, H-13), 5.71 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-14), 4.81 (1H, m, H-11), 3.83 ~ 3.95 (2H, m, H-17 α , H-17 β), 2.92 ~ 3.03 (5H, m, H-2 α , 2 β , 6, 10 α , 10 β), 2.38 ~ 2.55 (3H, m), 1.85 ~ 2.14 (2H, m), 1.77 (2H, m), 1.33 ~ 1.54 (5H, m)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 68.5 (t, C-2), 17.0 (t, C-3), 25.9 (t, C-4), 33.1 (d, C-5), 66.6 (d, C-6), 40.5 (d, C-7), 24.5 (t, C-8), 16.9 (t, C-9), 68.8 (t, C-10), 51.5 (d, C-11), 29.1 (t, C-12), 137.6 (d, C-13), 124.6 (d, C-14), 166.3 (s, C-15), 42.4 (t, C-17)。经查阅文献[10]与之比较数据后,说明该化合物和化合物 **2** 一样属于 1 位 N 上连氧,是 13,14-去氢氧化苦参碱,即 (+)-oxysophocarpine(氧化槐果碱)。

化合物 **6** 无色细针晶(丙酮),紫外 254 nm 下有亮荧光,5% 的硫酸-乙醇溶液加热不显色,遇 Dragendorff 试剂呈阳性反应,推测其可能为生物碱类化合物。 ^{13}C -NMR 较化合物 **3** 增加了 1 对双键碳 δ_c : 147.6 (C, C-11) 和 103.3 (CH, C-12),多了 1 个连氧叔碳 δ_c : 63.5 (CH),少了 1 个 CH_2 信号(C-9)。此外在低场区出现了 δ_H : 3.72 (1H, m, H-9) 以及 3.09 (1H, s, 9-OH),结合 ^{13}C -NMR 和 1H -NMR 确定化合物 **6** 的分子式为 $C_{15}H_{20}N_2O_2$, 不饱和度为 7。 $C_{15}H_{20}N_2O_2$ (260), mp 230 ~ 231 °C; $[\alpha]_D^{20} - 128^\circ$ ($c = 0.12$, CH_3OH)。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.27 (1H, m, H-13), 6.46 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-14), 6.33 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-12), 4.18 (1H, dd, $J = 15.2$, 6.4 Hz, H-17 α), 3.79 (1H, br t, $J = 13.6$ Hz, H-17 β), 3.72 (1H, m, H-9), 3.09 (1H, s, H-6), 2.99 (1H, dd d, $J = 6.4$, 4.4, 2.0 Hz, H-7), 2.84 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-8 β), 2.62 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-8 α), 2.09 (1H, td, $J = 12.8$, 3.2 Hz, H-10 β), 1.50 ~ 1.99 (9H, m)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 56.7 (t, C-2), 19.9 (t, C-3), 26.9 (t, C-4), 31.4 (d, C-5), 59.4 (d, C-6), 38.7 (d, C-7), 37.0 (t, C-8), 63.5 (d, C-9), 63.6 (t, C-10), 147.6 (s, C-11), 103.3 (d, C-12), 138.4 (d, C-13), 116.7 (d, C-14), 164.0 (s, C-15), 43.3 (t, C-17)。经查阅文献[10]与 (-)-9 α -hydroxysophoramine [(-)-9 α -羟基槐胺碱] 基本一致,为 9 位羟基取代的苦参碱型生物碱,化合物 **6** 确定为 (-)-9 α -hydroxysophoramine。

化合物 **7** 白色片晶(石油醚),在 254,365 nm 紫外灯下均无荧光,用 5% 的硫酸-乙醇溶液加热不显色,Dragendorff 反应呈阳性,推测其可能为生物碱类化合物。结合 1H -NMR, ^{13}C -NMR 发现化学位移值与槐定碱^[7]相应信号接近,较槐定碱在低场部分多了 2 个烯碳信号,且内酰胺羰基信号发生一定的高场位移 ($\Delta\delta - 5.6$ ppm),因此推测为槐定碱的 13,14-不饱和衍生物。 $C_{15}H_{22}N_2O$ (246); mp 83 ~ 84 °C; $[\alpha]_D^{20} - 39^\circ$ ($c = 0.10$, $MeOH$)。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.44 (1H, dd d, $J = 8.8$, 4.8, 3.6 Hz, H-13), 5.94 (1H, dt, $J = 9.6$, 1.6 Hz, H-14), 3.74 (1H, dd, $J = 13.2$, 4.8 Hz, H-17 β), 3.56 (1H, td, $J = 10.0$, 6.4 Hz, H-11), 3.18 (1H, t, $J = 11.6$ Hz, H-17 α), 2.88 (1H, br d, $J = 11.6$ Hz, H-2 β), 2.79 (1H, m, H-10 β), 2.55 (1H, dt, $J = 18.0$, 5.2 Hz, H-6), 2.12 ~ 2.20 (3H, m), 2.04 (1H, m), 1.97 (1H, m), 1.80 ~ 1.87 (3H, m), 1.69 (1H, m), 1.46 ~ 1.58 (4H, m), 1.12 (1H, m)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 56.1 (t, C-2), 23.9 (t, C-3), 28.8 (t, C-4), 32.3 (d, C-5), 63.4 (d, C-6), 39.6 (d, C-7), 21.9 (d, C-8), 21.7 (t, C-9), 50.7 (t, C-10), 53.5 (d, C-11), 29.9 (t, C-12), 136.9 (d, C-13), 125.1 (d, C-14), 164.4 (s, C-15), 45.4 (t, C-17)。将 1H -NMR 数据与 13,14-去氢槐定碱^[11]对照,结果吻合,所以化合物 **7** 鉴定为 (-)-13,14-去氢槐定碱 [(-)-13,14-dehydrosophoridine]。

化合物 **8** 针状透明晶体(乙酸乙酯),体积分数为 10% 的硫酸乙醇溶液显黄色。 1H -NMR (400 MHz, DMSO) 9.61 (1H, s) 为醛上质子;芳香质子信号 δ_H : 7.76 (1H), 7.48 (1H), 7.17 (2H, m) 表明分子中有邻二取代苯环;将波谱数据与文献对照^[12],确定此化合物的结构为 3-吲哚甲醛 (indolyl-3-carbaldehyde)。 C_9H_7NO (145); mp 198 ~ 199 °C。 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ : 8.17 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.0 Hz), 8.10 (1H, s), 7.26 (1H, dd d, $J = 15.0$, 8.0, 1.0 Hz), 7.30 (1H, dd d, $J = 15.0$, 8.0, 1.0 Hz), 7.49 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.0 Hz), 9.89 (1H, s)。 ^{13}C -NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 186.0 (s, CHO), 138.2 (s, C-2), 118.7 (d, C-3), 121.0 (d, C-6), 123.6 (d, C-4), 122.2 (d, C-5), 111.7 (s, C-7), 124.3 (d, C-8), 137.5 (s, C-9)。

4 单体化合物的生物活性

用 MTT 法测定部分化合物 **1** ~ **3**, **5** 对 C6 增殖的影响,取对数生长期 C6 细胞,计数后用完全培养

基制成细胞悬液,以细胞数 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中(100 μ L/孔),48 h 后分别给予不同质量浓度(0.01 ~ 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的苦参碱(matrine, mat),氧化苦参碱(oxymatrine, oxy),槐果碱(sophocarpine, SC),氧化槐果碱(oxysophocarpine, OSC)。每组设 4 个平行孔,另设空白对照组,对照组除未加药物外,其余条件完全一致。置于 CO_2 培养箱中继续培养 24 h 后,置于显微镜下观察每孔细胞形态。作用 24 h 后加入 MTT 使终质量浓度达 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,吸取上清液,加入二甲基亚砷 150 μL ,待甲臌结晶充分溶解后全自动酶标仪震荡 10 min 后于 570, 630 nm 处测定吸光度(A)。每孔做 4 个复孔以上,

重复 3 次。以细胞存活率公式计算实验组细胞存活率。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 t 检验进行组间统计学差异比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

存活率 = $A_{\text{给药孔}} - A_{\text{空白}} / A_{\text{正常}} - A_{\text{空白}} \times 100\%$

细胞毒活性结果表明化合物 **1** ~ **3**, **5** 对鼠源胶质瘤 C6 细胞的增殖抑制作用很明显,并呈现一定的剂量关系,在 0.01 ~ 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 化合物 **1** 的抑制作用明显比化合物 **3** 强,去氢使生物碱对 C6 细胞增殖抑制作用减弱,化合物 **3** 槐果碱为苦参碱单脱氢产物。化合物 **2** 的抑制作用比化合物 **1** 强,化合物 **5** 的抑制作用比化合物 **3** 强,氧化使生物碱对 C6 细胞增殖抑制作用增强。见表 1。

表 1 化合物 1,2,3,5 对 C6 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Alkaloids 质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%			
	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 5
空白	-	-	-	-
0.01	93.90 $\pm$ 0.026 ¹⁾	86.40 $\pm$ 0.033 ²⁾	98.30 $\pm$ 0.019	89.90 $\pm$ 0.017 ¹⁾
0.1	88.75 $\pm$ 0.017 ¹⁾	83.03 $\pm$ 0.011 ²⁾	92.13 $\pm$ 0.004 ¹⁾	82.68 $\pm$ 0.000 ²⁾
0.3	84.97 $\pm$ 0.006 ²⁾	80.68 $\pm$ 0.002 ²⁾	89.38 $\pm$ 0.005 ¹⁾	78.88 $\pm$ 0.003 ²⁾
0.5	76.65 $\pm$ 0.008 ²⁾	72.39 $\pm$ 0.008 ²⁾	89.29 $\pm$ 0.007 ¹⁾	77.02 $\pm$ 0.009 ²⁾
0.8	63.62 $\pm$ 0.008 ²⁾	67.95 $\pm$ 0.018 ²⁾	85.14 $\pm$ 0.009 ²⁾	72.79 $\pm$ 0.006 ²⁾
1.0	60.88 $\pm$ 0.006 ²⁾	53.64 $\pm$ 0.001 ²⁾	79.71 $\pm$ 0.006 ²⁾	62.67 $\pm$ 0.001 ²⁾

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

5 结论

本文以苦豆子种子为实验材料进行系统的性质和结构的分析,经大孔树脂,葡聚糖柱层析,硅胶柱层析等多种方法分离,得到了 7 种主要生物碱类物质,通过核磁共振分析,并与相关文献对照,鉴定其结构。其中化合物 **8** 为非生物碱,为首次从该属植物中分得。胶质瘤列于中枢神经系统中致死性肿瘤的首位,严重威胁人类的健康,本文采用 MTT 法对分离的部分化合物首次测定其对 C6 细胞增殖的影响,发现氧化苦参碱对 C6 细胞的增殖抑制作用最明显,次之为苦参碱,说明生物碱单体产物之间对 C6 细胞的活性也不同,其作用机制及构效关系均有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 杨巧丽,顾政一,黄华. 中药苦豆子的研究进展[J]. 西北药学杂志,2011,26(3):232.
[2] 高红英,李国玉,王航宇,等. 新疆苦豆子种子中生物碱类化学成分的研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2011,29(1):75.
[3] Zhang S, Qi J, Sun L, et al. Matrine induces programmed cell death and regulates expression of relevant genes based on PCR array analysis in C6 glioma cells[J]. Mole Biol Rep, 2009, 36(4):791.

[4] 张淑君,戚基萍,成秉林,等. 苦参碱引起 C6 胶质瘤细胞凋亡及其对 TRADD 表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(4):643.
[5] 秦学功,元英进. 用大孔吸附树脂吸附分离苦豆子生物碱[J]. 中国中药杂志,2002,27(6):428.
[6] 叶学军,李力,杨晋. 大孔吸附树脂法纯化苦豆子渣总黄酮工艺的研究[J]. 食品科技,2012,(1):210.
[7] Zhang L Z, Li J S, Peter H, et al. Studies on alkaloids from the seeds of *Sophora alopecuroides* [J]. Ch J Chi Mat Med, 1997, 22(12):740.
[8] Atta-ur-Rahman, Choudhary M I, Parvez K, et al. Quinolizidine alkaloids from *Sophora alopecuroides* [J]. J Nat Prod, 2000, 63(2):190.
[9] Xiao P, Kubo H, Komiya H, et al. Lupin alkaloids from seeds of *Sophora viciifolia*. [J]. Phytochemistry, 1999, 50(1):189.
[10] Saito Kazuki, Arai Noriko, Sekine Toshikazu, et al. (-)-5 α -hydroxysophocarpine, a new lupine alkaloid from the seeds of *Sophora flavescens* var. *angustifolia* [J]. Planta Medica, 1990, 56(5), 487.
[11] 丁佩兰. 山豆根和苦参化学成分的比较研究[D]. 上海:复旦大学, 2004
[12] 李志峰,王琦,冯育林,等. 黄连的化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(7):1273.

[责任编辑 邹晓翠]