

醋制延胡索中一个新苄基异喹啉二聚体生物碱

夏桂阳^{1#}, 肖标兵^{2#}, 王玲燕², 方冬杰², 夏欢¹, 林生^{1*}

- (1. 北京中医药大学东直门医院, 中医内科学教育部和北京市重点实验室, 北京 100700;
2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 运用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、反相中压柱色谱、半制备高效液相色谱等分离纯化技术, 从醋制延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W.T.Wang) 水煎液乙酸乙酯萃取部位分离获得 1 个新的 C-4~C-7' 位连接的苄基异喹啉类二聚体生物碱, 通过 UV、IR、ESI-MS、HR-ESI-MS、1D NMR 和 2D NMR 等多种波谱分析方法确定其结构, 并命名为 (±)-bicoryanahunine B (**1**)。化合物 **1** 对 PD-1/PD-L1 结合有一定抑制活性, IC_{50} 为 $7.80 \pm 0.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 此外, 化合物 **1** 还可显著抑制脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放 NO, IC_{50} 值为 $4.83 \pm 2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 延胡索; 二聚体生物碱; PD-1/PD-L1; 抗炎

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)02-0553-04

A new dimeric benzyloisoquinoline alkaloid from *Corydalis yanhusuo*

XIA Gui-yang^{1#}, XIAO Biao-bing^{2#}, WANG Ling-yan², FANG Dong-jie², XIA Huan¹, LIN Sheng^{1*}

(1. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education and Beijing, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: (±)-Bicoryanahunine B (**1**), a new dimeric benzyloisoquinoline alkaloid was isolated from the dried tubers of *Corydalis yanhusuo* by various chromatographic methods, including silica gel, Sephadex LH-20, reverse phase C18, and semi-preparative HPLC. Its structure was determined by spectroscopic methods, including UV, IR, ESI-MS, HR-ESI-MS and 1D/2D NMR. (±)-Bicoryanahunine B (**1**) was a moderate PD-1/PD-L1 interaction inhibitor with an IC_{50} value of $7.80 \pm 0.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. In addition, **1** exhibited potent inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW 264.7 macrophages with an IC_{50} value of $4.83 \pm 2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: *Corydalis yanhusuo*; dimeric alkaloid; PD-1/PD-L1; anti-inflammatory

中药延胡索为罂粟科Papaveraceae紫堇属*Corydalis*植物延胡索*Corydalis yanhusuo* W.T.Wang的干燥块茎, 其味辛、苦, 性温, 归肝、脾经, 具有活血散瘀, 理气止痛的功效^[1,2]。现代药理研究表明延胡索及其不同醋制炮制品具有显著的镇痛、镇静作用, 以及对冠心

病、心律失常、心肌缺血、肿瘤、胃溃疡等多种疾病有较好的临床效果^[3,4], 但相关研究主要集中在含量较高的原小檗碱类成分及其镇痛活性方面, 在其他临床应用的药效物质仍不明确。为了充分挖掘延胡索其他新型的活性成分, 本课题组对醋制延胡索的水提取物的化学成分进行了系统研究, 从中发现了一系列新型生物碱类化合物^[5-7], 部分化合物具有选择性抑制羧酸酯酶 2 (hCE2) 活性或具有抑制 PD-1/PD-L1 结合的功能。本论文在前期研究基础上, 继续挖掘醋制延胡索生物活性成分, 从醋制延胡索水煎液的乙酸乙酯萃取部位

收稿日期: 2020-09-29; 修回日期: 2020-10-29.

基金项目: 北京市自然科学基金杰出青年基金项目 (JQ18026); 国家自然科学基金面上项目 (82073978).

*共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-84013404, E-mail: lszn@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1564

分离鉴定了1个新C-4~C-7'位连接的苜蓿异喹啉类二聚体生物碱[(±)-bicoryanahunine B (**1**)]。采用均相时间分辨荧光技术(HTRF, homogeneous time-resolved fluorescence)测定化合物阻止PD-1/PD-L1相互作用的能力,结果表明,(±)-bicoryanahunine B能抑制PD-1/PD-L1的结合,IC₅₀为7.80 ± 0.49 μmol·L⁻¹;此外,采用Griess法考察化合物抑制LPS诱导小鼠巨噬细胞RAW 264.7释放NO能力,结果表明,(±)-bicoryanahunine B可显著抑制LPS诱导小鼠巨噬细胞RAW 264.7释放NO,IC₅₀值为4.83 ± 2.21 μmol·L⁻¹,强于阳性对照药吡啶美辛(IC₅₀为15.0 ± 0.3 μmol·L⁻¹)。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物**1**为淡黄色粉末,碘化铊钾反应显阳性。IR光谱显示存在羟基(3 386 cm⁻¹)和芳香环(1 684, 1 601 cm⁻¹)官能团;(+)-HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 703.300 2 [M-CF₃COO⁻]⁺(Calcd. for C₄₂H₄₃O₈N₂⁺, 703.301 4),此外,(+)-HR-ESI-MS还给出了双电荷准分子离子峰 m/z 352.153 8 [M-CF₃COO⁻+H]²⁺,结合¹H NMR和¹³C NMR数据确定其分子式为C₄₂H₄₃O₈N₂,不饱和度为23。¹H NMR谱中显示7个芳香质子信号、7个甲氧基质子信号和2个甲基质子信号。¹³C NMR谱中共显示42个碳信号,其中29个芳香碳信号、7个甲氧基碳信号、4个次甲基碳信号和2个甲基碳信号。通过对比化合物**1**和bicoryanahunine A的¹H NMR和¹³C NMR数据^[6],两者均含有7-取代脱氢紫堇碱结构片段,主要差别在于阿朴菲生物碱片段的1'、4'与5'位。与bicoryanahunine A相比,化合物**1**的¹H NMR谱中少了4'与5'位相互耦合的芳香氢信号,多了两组相邻亚甲基氢信号δ_H 2.96 (1H, m, H-4'a), δ_H 3.33 (1H, m, H-4'b)和δ_H 3.21 (2H, m, H-5');¹³C NMR谱中少了两个双键碳信号,多了两个亚甲基碳信号(δ_C 24.7, C-4'和δ_C 49.2, C-5'),推测化合物**1**中4'与5'位为两个相邻的亚甲基。此外,化合物**1**的¹³C NMR谱中少了1'位的羰基碳信号,多了

一个连氧芳香碳信号(δ_C 143.8, C-1')和一个甲氧基碳信号(δ_C 59.5, 1'-OMe),推测化合物**1**中1'位为连甲氧基的芳环碳,由此推测化合物**1**中存在7'位取代的二去氢海罂粟碱片段。综上所述,化合物**1**为由脱氢紫堇碱和二去氢海罂粟碱通过C-4-C-7'连接的二聚体生物碱。HMBC谱中,N-Me氢与C-5'和C-6'a相关,H-3'与C-1'、C-4'和C-1'b相关,1'-OMe氢与C-1'相关,H-8'与C-7'相关,H-1与C-4相关(图1),以及(+)-HR-ESI-MS/MS二级质谱中的碎片离子峰 [m/z 350.138 6 (Calcd. for C₂₁H₂₀NO₄⁺, 350.138 7), m/z 353.160 9 (Calcd. for C₂₁H₂₃NO₄⁺, 353.162 2)]证实了上述推测(图2)。由于在HPLC纯化过程中使用了三氟醋酸,最后得到的是化合物**1**的三氟醋酸盐。由此确定了化合物**1**的平面结构,如图1所示。

化合物**1**旋光值为0,且ECD光谱中无明显的Cotton效应,这与bicoryanahunine A消旋体现象一致,同时采用量子化学计算的方法,对比化合物**1**和bicoryanahunine A旋转轴旋转不同角度构象的能量变化(图3),化合物**1**由于N-Me的存在,旋转能垒高于bicoryanahunine A,由此推测化合物**1**也是因轴手性引起的外消旋体混合物,并通过手性HPLC-HR-MS分析(chiralpak IBN-3手性柱, MeCN-H₂O-TFA, 30:70:0.1, t_R = 59.2 min和63.4 min),可观测到两个不完全基线分离的色谱峰,进一步证实了上述推断。但通过较系统的手性HPLC条件摸索,尝试多种不同手性填料色谱柱,在HPLC-UV制备过程中,对映体仍无法得到有效的分离。因此,化合物**1**两个外消旋体的立体构型还有待于进一步确定。

综上所述,确定化合物**1**为一个新的外消旋体苜蓿异喹啉二聚体生物碱,命名为(±)-bicoryanahunine B。

2 化合物活性检测

采用HTRF技术测定化合物阻止PD-1/PD-L1相互作用的能力,结果显示,(±)-bicoryanahunine B可抑制PD-1/PD-L1结合,IC₅₀为7.80 ± 0.49 μmol·L⁻¹,表明(±)-bicoryanahunine B可作为小分子PD-1/PD-L1免疫抑制

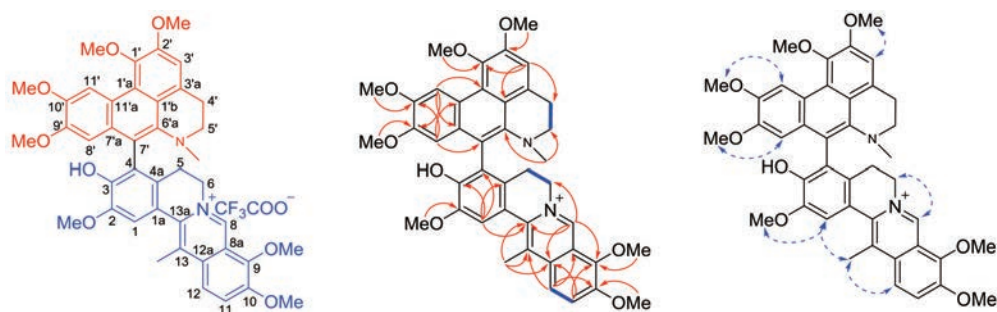


Figure 1 The structure (left), COSY (middle, blue bold lines), key HMBC (middle, red arrows), and Key NOESY (right, blue double arrows) correlations of compound **1**

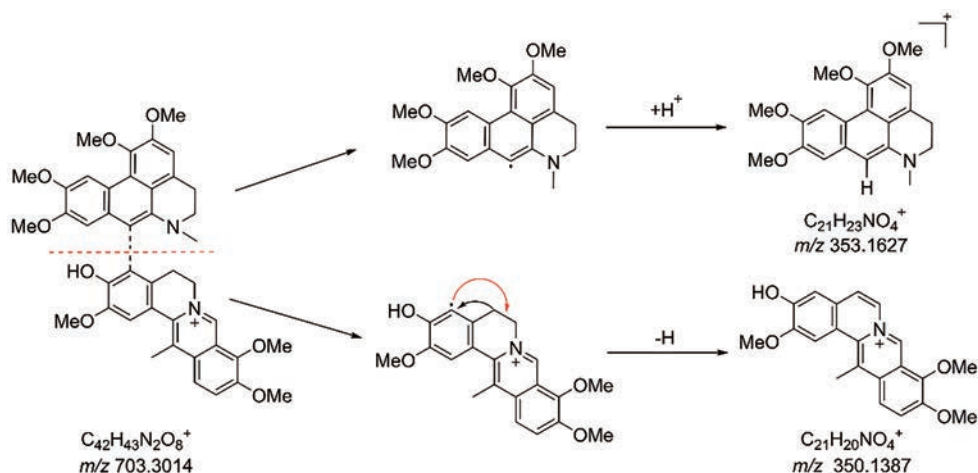


Figure 2 The proposed fragmentation pathway of compound 1

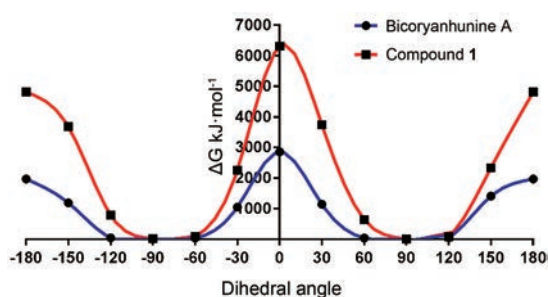


Figure 3 Calculated relative molecular energy scan of bicoryanunine A and compound 1

剂候选化合物做进一步研究;此外,采用 Griess 法考察化合物抑制 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放 NO 能力,结果显示, (±)-bicoryanunine B 可显著抑制 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放 NO, IC_{50} 值为 $4.83 \pm 2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 强于阳性对照药 吲哚美辛 (IC_{50} 为 $15.0 \pm 0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 表明 (±)-bicoryanunine B 具有较强的潜在抗炎活性。

实验部分

JASCOJ-810 紫外可见分光光度仪、JASCO P-2000 旋光测定仪、JASCOJ-810 CD 测定仪 (JASCO); Nicolet impact 5700 型傅里叶变换红外光谱仪 (ThermoFisher Scientific); Inova 600 核磁共振仪 (Varian); 质谱仪 (Agilent 1100 series LC/MSD-Trap-SL 型); 100~200 目硅胶 (青岛胜海化工厂); Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia); 中压液相色谱仪 (Büchi Gradient Former B-687, RpC18, 43~60 μm , Pharmacia); 制备液相色谱仪 (创新通恒 LC3000 高效液相色谱仪); 分析纯试剂 (北京化工厂); 色谱纯试剂 (乙腈、甲醇为美国 Fisher 公司生产)。

醋制延胡索药材于 2015 年购自浙江磐安药材市

Table 1 NMR data of compound 1. ^1H NMR (600 MHz), ^{13}C NMR (150 MHz) in $\text{DMSO}-d_6$

Position	δ_{C}	δ_{H}	Position	δ_{C}	δ_{H}
1	113.8	7.54, s	1'	143.8	
1a	118.1		1'a	127.8	
2	146.1		1'b	119.5	
3	147.4		2'	150.5	
4	124.4		3'	112.4	7.34, s
4a	131.6		3'a	130.5	
5	24.6	2.41, m; 2.71, m	4'	24.7	2.96, m; 3.33, m
6	56.7	4.61, m; 4.71, m	5'	49.2	3.21, m
8	143.6	9.80, s	6'a	141.6	
8a	120.6		7'	121.0	
9	143.9		7'a	124.4	
10	150.0		8'	105.6	6.67, s
11	125.9	8.21, s	9'	148.6	
12	121.3	8.21, s	10'	147.0	
12a	133.2		11'	108.8	9.21, s
13	129.5		11'a	120.9	
13a	136.9		1'-OMe	59.5	3.89, s
2-OMe	56.5	3.99, s	2'-OMe	56.3	3.99, s
9-OMe	62.0	4.07, s	N-Me	41.3	2.45, s
10-OMe	57.0	4.09, s	9'-OMe	55.0	3.58, s
13-Me	18.1	3.10, s	10'-OMe	55.3	3.93, s

场, 经中国中医科学院许海玉研究员鉴定为延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。

1 提取与分离

醋制延胡索干燥块茎 50 kg 粉碎, 蒸馏水浸泡超声提取 3 次, 每次 40 min, 水提后药渣用 95% 乙醇浸泡超声提取 3 次, 每次 40 min。水提取液直接用大孔吸附树脂柱分离, 用水、50% 乙醇、95% 乙醇依次洗脱, 洗脱液减压浓缩; 95% 乙醇提取液浓缩至无醇, 加蒸馏水 2 L, 用等体积乙酸乙酯萃取 5 次, 得乙酸乙酯相和水相。经减压回收有机溶剂后得乙酸乙酯部位 YH-E (250.3 g)。YH-E 进行硅胶柱色谱分离, 用二氯甲烷-甲醇体系梯度洗脱 (200:1, 150:1, 100:1, 50:1, 25:1, 10:1), 流分

经 TLC 检测合并, 最后得 A~I 组分。组分 H (6.9 g) 进行分离, 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 石油醚-二氯甲烷-甲醇 (5:5:1) 等度洗脱, 洗脱液经薄层色谱检测, 合并相同组分, 回收溶剂得到 H1~H6 组分。组分 H3 (3 g) 经反相中压柱色谱, 甲醇-水 (5:95~95:5) 梯度洗脱, 洗脱液经薄层色谱检测, 合并相同组分, 回收溶剂得到 H3-1~H3-6 组分。组分 H3-4 经反相半制备 HPLC 纯化 (Rp C18, 51% 甲醇-水, 0.1% TFA, 280 nm) 得到化合物 **1** (0.9 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色粉末 (MeOH)。 $[\alpha]_D^{20}$ 0.0 (*c* 0.09, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max}/nm (log ϵ): 202 (0.504), 263 (0.790), 284 (0.561), 337 (0.393); IR (KBr) ν_{\max} : 3 386, 2 925, 2 853, 1 684, 1 601, 1 205, 1 134, 1 039 cm^{-1} ; ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1; (+)-HR-ESI-MS m/z : 703.300 2 [M-CF₃COO]⁺, m/z 352.153 8, [M-CF₃COO+H]²⁺ (Calcd. for C₄₂H₄₃O₈N₂ 703.301 4)。

3 活性测定

3.1 抑制 PD-1/PD-L1 结合活性测定 采用 PD-1/PD-L1 HTRF 试剂盒对化合物 **1** 抑制 PD-1/PD-L1 结合活性测定^[8,9]。Tag1-PD-L1 4 μL (终浓度 5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 Tag2-PD1 4 μL (终浓度 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 加入到 384 孔板中, 取不同浓度化合物 **1** 2 μL (终浓度分别为 10、5、2.5、1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 封膜后室温预孵 15 min, 用 Detection Buffer 将 anti-Tag1-Eu K 稀释到 1.83 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, anti-Tag2-XL665 稀释到 66.7 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。取同体积 anti-Tag1-Eu K 和 anti-Tag2-XL665 混合, 384 孔板每孔加入 10 μL 抗体混合液。封膜室温孵育, 分别用酶标仪检测 2 h 的 665 nm 及 620 nm 的吸光度值, 根据 665 nm/620 nm 的值计算每个化合物对 PD-1/PD-L1 结合的抑制率。

3.2 抑制 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放 NO 活性测定 采用 Griess 法考察化合物抑制 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放 NO 能力^[10,11]。取生长状态良好且处于对数生长期的细胞, 将浓度为每孔 1×10^5 个细胞的小鼠巨噬细胞接种于 96 孔板内, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中常规培养 24 h。将培养 24 h 后的细胞板弃去培养基, 加入含有不同药物浓度和 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 的培养基, 每组设 3 个平行孔, 同时设空白组 (只加培养基) 1 组, LPS 组 (加只含 LPS 培养基) 1 组, 平行 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。24 h 后, 取培养基上清, 加入 Griess 试剂 [0.1% *N*-萘乙二胺盐酸盐 (50 μL); 1% 对氨基苯磺酰胺的 H₃PO₄ 溶液 (5%, 50 μL)], 测定 540 nm 处的吸光度。用浓度分别为 1、5、10、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaNO₂

绘制标准曲线, 根据 NaNO₂ 标准曲线计算细胞培养上清液中 NO₂⁻ 的浓度以及对 NO 释放的抑制率。

作者贡献: 林生负责提出研究选题和设计研究方案; 夏桂阳、肖标兵负责实施研究过程和采集整理数据; 王玲燕、方冬杰负责调研发整理文献; 夏桂阳、夏欢负责设计论文框架、起草论文、修订论文; 林生负责获取研究经费、技术或材料支持、指导性支持。

利益冲突: 本研究不存在研究者及与公开研究成果有关的利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 145.
- [2] Han YQ, Xu J, Gong SX, et al. Chemical constituents and mechanism of *Corydalis Rhizoma* based on HPLC-QTOF/MS and G protein-coupled receptor analysis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 1302-1308.
- [3] Yang XB, Liu YZ, Yang XW, et al. Study on chemical constituents from *Corydalis Rhizoma* in Pan'an [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2013, 44: 2200-2207.
- [4] He K, Gao JL, Zhao GS. Advances in studies on chemistry, pharmacology, and quality control of *Corydalis yanhusuo* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药) 2007, 38: 1909-1912.
- [5] Wang LY, Qiu BL, Xia H, et al. Yanhusanines A-F, Isoquinoline-derived alkaloid enantiomers from *Corydalis yanhusuo* and their biological activity [J]. J Nat Prod, 2020, 83: 489-496.
- [6] Xiao BB, Xia GY, Wang LY, et al. (\pm)-Bicyclicanunine A, dimeric benzyloisoquinoline alkaloid atropo-enantiomers from *Corydalis yanhusuo* [J]. Tetrahedron Lett, 2020, 61: 151890.
- [7] Qiu BL, Wang LY, Xia GY, et al. Study on structural conversion of dihydrochelerythrine in different solvents [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43: 3315-3321.
- [8] Basu S, Yang J, Xu B, et al. Design, synthesis, evaluation, and structural studies of C2-symmetric small molecule inhibitors of programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 protein-protein interaction [J]. J Med Chem, 2019, 62: 7250-7263.
- [9] Degorce F, Card A, Soh S, et al. HTRF: a technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications [J]. Curr Chem Genom, 2009, 3: 22-32.
- [10] Wu YQ, Huang YF, Luo D, et al. A new oleanane type triterpenoid from *Viburnum taitoense* Hayata [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1260-1264.
- [11] Xia GY, Sun DJ, Ma JH, et al. (+)/(-)-Phaeocaulin A-D, four pairs of new enantiomeric germacranetype sesquiterpenes from *Curcuma phaeocaulis* as natural nitric oxide inhibitors [J]. Sci Rep, 2017, 7: 43576.