

## 从光皮木瓜中分离得到一个新的生物碱

冯卫生<sup>1,2\*</sup>, 张志广<sup>1,2</sup>, 李孟<sup>1,2</sup>, 张靖柯<sup>1,2</sup>, 赵璇<sup>1,2</sup>, 司彦坡<sup>1,2</sup>,  
白志尧<sup>1,2</sup>, 吕锦锦<sup>1,2</sup>, 郑晓珂<sup>1,2</sup>

(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046)

**摘要:** 采用 Diaion HP-20、Toyopearl HW-40、ODS、Sephadex LH-20、硅胶及半制备液相等多种色谱方法从光皮木瓜 50% 丙酮提取物分离得到 3 个吲哚类生物碱, 利用 MS、IR、UV、1D 和 2D NMR 等波谱技术对其结构进行鉴定, 分别为: 木瓜新碱 A (**1**)、Ginsenine (**2**) 和 (1S,3S)-1-甲基-1,2,3,4-四氢- $\beta$ -咔啉-3-羧酸 (**3**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 和 **3** 为首次从光皮木瓜中分离得到。采用 MTT 法检测化合物 **1**~**3** 对  $\beta$  淀粉样蛋白 25~35 ( $A\beta_{25-35}$ ) 诱导大鼠嗜铬细胞瘤细胞 (PC-12) 细胞损伤的保护作用, 结果显示化合物 **2** 和 **3** 对 PC-12 细胞具有显著的保护作用。

**关键词:** 光皮木瓜; 吲哚类生物碱; 化学成分; PC-12 细胞保护作用

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 06-0976-04

## Chaenomelesalkaloid A, a new alkaloid from the fruits of *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne

FENG Wei-sheng<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Zhi-guang<sup>1,2</sup>, LI Meng<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing-ke<sup>1,2</sup>, ZHAO Xuan<sup>1,2</sup>,  
SI Yan-po<sup>1,2</sup>, BAI Zhi-yao<sup>1,2</sup>, LÜ Jin-jin<sup>1,2</sup>, ZHENG Xiao-ke<sup>1,2</sup>

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment and Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** The chemical constituents of the fruits of *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne were investigated using chromatographic methods, including Diaion HP-20, Toyopearl HW-40, MCI Gel CHP-20, ODS, Silica gel chromatography and semi-preparative-HPLC. Three compounds were isolated and their structures were elucidated with spectral data and physicochemical properties, which were identified as chaenomeles alkaloid A (**1**), ginsenine (**2**) and 1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (**3**). Among those, compound **1** is a new alkaloid, compound **2** and **3** were isolated from this plant for the first time. To investigate the protective effect of compounds **1**~**3** on Rat adrenal pheochromocytoma (PC-12) injury induced by the  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta_{25-35}$ ). The results show that compounds **2** and **3** have a significant protective effect on the PC12 cells exposed to  $A\beta_{25-35}$ .

**Key words:** *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne; indole alkaloids; chemical constituents; protective effect on the PC-12 cells

光皮木瓜为 [*Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne] 为蔷薇科植物, 又名榲桲、木李、海棠等, 广泛分布于陕西、山东、河南、湖北、安徽等地。光皮木瓜成熟果实又称为榲桲, 果皮干燥后仍光滑, 不皱缩, 故有光皮木瓜之称<sup>[1]</sup>。光皮木瓜的记载始于

收稿日期: 2018-03-12; 修回日期: 2018-03-30.

基金项目: 中央引导地方科技发展专项: 河南道地大宗药材种质评价及集约化种植与示范 (14204349).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-371-60190296, E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0211

《本草经集注》, 其果实味酸、涩, 性平, 具有和胃舒筋、祛风湿、消痰止渴的功效<sup>[2]</sup>。目前, 从光皮木瓜中分离得到的化合物主要为三萜类、黄酮类、木脂素类等化合物。现代药理研究表明, 光皮木瓜具有抗氧化、抗炎、抗菌、降血糖、抗癌、抗老年痴呆等药理活性<sup>[3]</sup>。为了进一步明确光皮木瓜中的化学成分, 本实验采用 Diaion HP-20、Toyopearl HW-40、ODS、Sephadex LH-20、硅胶及半制备高效液相等多种色谱方法从光皮木瓜 50% 含水丙酮提取物中分离得到 3 个吲哚类生物碱, 利用 MS、IR、UV、1D 和 2D NMR 等波谱技术对其结构进行鉴定, 分别为木瓜新碱 A (**1**)、ginsenine (**2**) 和 (1*S*, 3*S*)-1-甲基-1,2,3,4-四氢- $\beta$ -咔啉-3-羧酸 (**3**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 和 **3** 为首次从光皮木瓜中分离得到, 结构见图 1。采用 MTT 法检测化合物 **1**~**3** 对  $\beta$  淀粉样蛋白 25-35 (A $\beta$ <sub>25-35</sub>) 诱导大鼠嗜铬细胞瘤细胞 (PC-12) 细胞损伤的保护作用, 结果显示化合物 **2** 和 **3** 对 PC-12 细胞具有显著的保护作用。

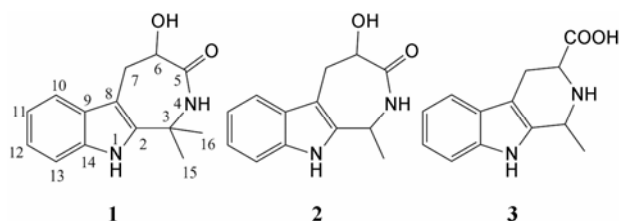


Figure 1 Structures of compounds 1-3

## 结果与讨论

化合物 **1** 白色粉末 (甲醇)。[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -6.975 (*c* 0.69, CH<sub>3</sub>OH); HR-TOF-MS 给出分子离子峰 *m/z*: 267.1100 [M+Na]<sup>+</sup> (Calcd. C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 267.1103), 提示化合物的分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH)/nm (log $\epsilon$ ): 221 (3.37)、270 (2.20)、280 (2.10)、289 (1.62), 说明结构中存在吲哚结构片段<sup>[4]</sup>。在 <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 谱中,  $\delta$  11.1 (1H, s, H-1) 是一个活泼氢信号; 在 6~8 之间, 共有 4 个氢信号, 分别为  $\delta$  7.41 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-10)、7.30 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-13)、7.08 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-12) 和 7.00 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-11), 说明结构中存在一个邻位取代苯环的结构片段<sup>[5]</sup>;  $\delta$  3.76 (1H, dd, *J* = 11.9, 4.5 Hz, H-6) 提示结构中有一个 -CH, 且与吸电子基团相连;  $\delta$  3.12 (1H, dd, *J* = 16.0, 4.5 Hz, 7a) 和 2.76 (1H, dd, *J* = 16.0, 11.9 Hz, H-7b) 说明结构中存在 1 个 -CH<sub>2</sub>;  $\delta$  1.70 (3H, s, H-15) 和 1.60 (3H, s, H-16) 提示结构中

含有 2 个 -CH<sub>3</sub>。在 <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 谱中, 共给出 14 个碳信号, 结合 DEPT135 谱可知, 化合物中有 5 个季碳 [ $\delta$ <sub>C</sub> 170.2 (-CO)、136.9 (C-14)、136.3 (C-2)、126.2 (C-9)、54.6 (C-3)], 其中  $\delta$ <sub>C</sub> 170.2 (C-5) 是酰胺的特征信号; 5 个叔碳信号 [ $\delta$ <sub>C</sub> 121.4 (C-12)、118.8 (C-10)、118.2 (C-11)、111.3 (C-13)、53.7 (C-6)]; 1 个仲碳信号 [ $\delta$ <sub>C</sub> 23.8 (C-7)] 以及 2 个伯碳信号 [ $\delta$ <sub>C</sub> 26.2 (C-15, 16)]。在 HSQC 谱中,  $\delta$ <sub>H</sub> 3.76 (H-6) 与  $\delta$ <sub>C</sub> 53.7 (C-6) 相关,  $\delta$ <sub>H</sub> 3.12 (H-7a)、2.76 (H-7b) 均与  $\delta$ <sub>C</sub> 23.8 (C-7) 相关,  $\delta$ <sub>H</sub> 1.70 (H-15)、1.60 (H-16) 均与  $\delta$ <sub>C</sub> 26.2 (C-15, 16) 相关, 进一步确定了 C-H 的数据归属。在 HMBC 谱中 (图 2), H-1 与 C-14、C-2、C-9、C-7 有远程相关, 并根据碳的化学位移值, 可确定该化合物具有吲哚生物碱母核<sup>[6]</sup>; H-6 与 C-7、C-5 有远程相关, 推测化合物结构中存在 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CONH- 的结构片段①; H-7a、7b 与 C-8 有相关信号, 说明片段①与 C-8 相连; H-15、16 均与 C-2、C-3 有远程相关, 结合碳原子的化学位移, 表明结构中存在 -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-NH- 的结构片段②, 且与 C-2 相连。结合化合物的分子式, 推测片段①和②通过酰胺键相连, 说明该化合物是吲哚母核骈七元内酰胺的结构骨架 (图 2)<sup>[7]</sup>。通过 NOESY 谱确定化合物 **1** 的相对立体构型。在 NOESY 谱中, H-1 与 H-15 有相关, 说明 H-1/15 为  $\beta$  构型; H-6 和 CH<sub>3</sub>-16 有相关, 说明 H-6/CH<sub>3</sub>-16 为  $\alpha$  构型 (图 3)。综上所述, 化合物 **1** 的结构确定为新化合物, 命名为木瓜新碱 A。其 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据见表 1。

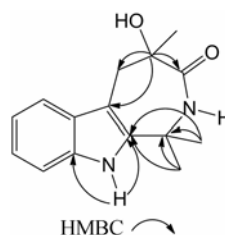


Figure 2 Key HMBC of compound 1

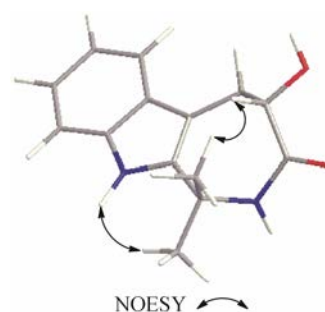
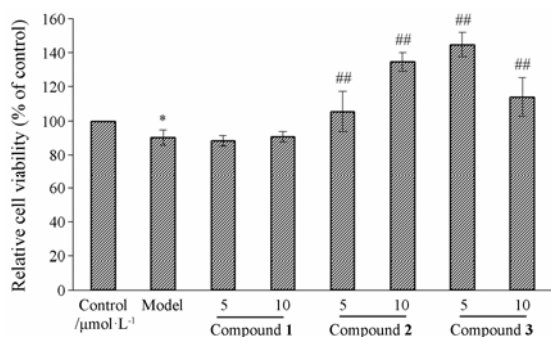


Figure 3 Key NOESY of compound 1

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

No.	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	No.	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	11.1 (1H, s)		9	–	126.2
2	–	136.3	10	7.41 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	118.8
3	–	54.6	11	7.00 (1H, t, $J = 7.6$ Hz)	118.2
5	–	170.2	12	7.08 (1H, t, $J = 7.6$ Hz)	121.4
6	3.76 (1H, dd, $J = 11.9, 4.5$ Hz)	53.7	13	7.30 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	111.3
7a	3.12 (1H, dd, $J = 16.0, 4.5$ Hz)	23.8	14	–	136.9
7b	2.76 (1H, dd, $J = 16.0, 11.9$ Hz)	23.8	15	1.70 (3H, s)	26.2
8	–	105.4	16	1.60 (3H, s)	26.2

采用 MTT 法检测化合物 **1**~**3** 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导 PC-12 细胞损伤的保护作用。结果显示化合物 **2**、**3** 在浓度 5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 可显著提高  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导 PC-12 损伤的细胞活力, 说明化合物 **2** 和 **3** 对 PC-12 细胞具有显著的保护作用 (图 4)。



**Figure 4** The effect of compounds **1**–**3** on the viability of PC-12 cells exposed to  $\text{A}\beta_{25-35}$ .  $n=4$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \* $P<0.05$  vs control group; ## $P<0.01$  vs model group

## 实验部分

Bruker AVANCE III 500 核磁共振仪, TMS 为内标; LC50 型高压制备液相色谱仪 [赛谱锐思 (北京) 科技有限公司, 紫外检测器为 (UV200), 色谱柱为 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm $\times$ 10 mm. D. S-5  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ ); Bruker maxis HD 型飞行时间质谱仪 (德国); 柱色谱所用硅胶 H (160~200 目) 为青岛海洋化工厂生产, 所用分析纯和色谱纯试剂为天津市恒兴化学试剂制造有限公司和天津市四友精细化学品有限公司生产, 柱色谱填充剂所用 Diaion HP-20、MCI Gel CHP-20、Toyopearl HW-40 为日本三菱化学公司生产, Sephadex LH-20 为 Pharmacia Biotech 公司生产。

本实验所用的光皮木瓜, 采自河南南阳方城县, 经河南中医药大学董诚明教授鉴定为蔷薇科植物光皮木瓜 [*Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne] 的新鲜成熟果实。

## 1 提取与分离

光皮木瓜鲜品 30 kg, 用 50% 含水丙酮组织破碎提取 3 次, 提取液减压浓缩得总浸膏 2.67 kg, 后用 80% 乙醇进行醇沉, 得到上层澄清溶液, 减压浓缩, 得浸膏 1.26 kg。将其水溶离心、过滤, 上大孔吸附树脂 Diaion HP-20, 依次用水、10% 乙醇、20% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇洗脱, 得到的各个部位。其中 10% (37.68 g) 乙醇洗脱部位通过 Toyopearl HW-40 柱色谱, 梯度洗脱 [甲醇-水 (0:100 $\rightarrow$ 10:90 $\rightarrow$ 20:80 $\rightarrow$ 30:70 $\rightarrow$ 100:0, v/v)], 共得到 5 个组分 (Fr.1~Fr.5)。Fr. 1 通过 Toyopearl HW-40 和 Sephadex LH-20 柱色谱, 等度洗脱 [甲醇-水 (50:50, v/v)], 得到 Fr.1-1~Fr.1-3。Fr.1-2 通过 ODS 柱色谱进行甲醇-水 (0:100 $\rightarrow$ 10:90 $\rightarrow$ 20:80 $\rightarrow$ 30:70 $\rightarrow$ 40:60 $\rightarrow$ 100:0, v/v) 梯度洗脱, 得到 Fr.1-2-1~Fr.1-2-6。Fr.1-2-3 (0.53 g) 经半制备液相 [甲醇-水 (23:77, v/v)] 分离纯化得到化合物 **1** (6.93 mg)、**2** (3.61 mg) 和 **3** (8.15 mg)。

## 2 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末 (甲醇)。[ $\alpha$ ] $_{\text{D}}^{20}$  -6.975 ( $c$  0.69,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )/nm ( $\log\epsilon$ ): 221 (1.76)、270 (0.34)、280 (0.33)、289 (0.26); IR  $\nu_{\text{max}}$ / $\text{cm}^{-1}$ : 3 604、3 165、2 728、2 460、1 614、1 456、1 385、1 315、1 084、992、805、738、700 等; HR-TOF-MS 给出分子离子峰  $m/z$ : 267.1100 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (Calcd.  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ , 267.1103);  $^1\text{H}$ NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) 和  $^{13}\text{C}$ NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) 数据见表 1。

化合物 **2** 白色粉末 (甲醇)。ESI-MS  $m/z$ : 267.1109 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ 。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 11.03 (1H, s, -NH), 7.43 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-10), 7.32 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-13), 7.08 (1H, t,  $J = 7.7$  Hz, H-12), 7.00 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-11), 4.47 (1H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-3), 3.58 (1H, dd,  $J = 11.8, 4.6$  Hz, H-7a), 3.13 (1H, dd,  $J = 16.0, 4.1$  Hz, H-7b), 2.75 (1H, m, H-6), 1.58 (3H, s, H-15);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ :

169.6 (C-5), 136.3 (C-14), 132.5 (C-2), 126.2 (C-9), 121.2 (C-12), 118.8 (C-11), 117.9 (C-10), 111.2 (C-13), 106.8 (C-8), 57.6 (C-6), 48.9 (C-3), 23.4 (C-7), 17.1 (C-15)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道的 ginsenine 基本一致。

化合物 **3** 白色粉末 (甲醇)。ESI-MS  $m/z$ : 255.1109 [M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 7.47 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-9), 7.33 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-12), 7.12 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-10), 7.03 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-11), 4.69 (1H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-3), 3.94 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.5$  Hz, H-5), 3.43 (1H, dd,  $J = 16.3, 4.4$  Hz, H-6a), 3.02 (1H, t,  $J = 13.1$  Hz, H-6b), 1.73 (3H, s, H-14); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 173.1 (-COOH), 138.6 (C-13), 131.5 (C-2), 127.5 (C-8), 123.3 (C-9), 120.5 (C-12), 119.2 (C-10), 112.3 (C-11), 107.9 (C-7), 59.8 (C-5), 51.1 (C-3), 24.4 (C-6), 17.2 (-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道的 (1*S*,3*S*)-1-甲基-1,2,3,4-四氢- $\beta$ -咔啉-3-羧酸基本一致。

### 3 化合物 1~3 对 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导 PC-12 细胞损伤的保护作用

将处于对数生长期 PC-12 细胞按每孔  $4 \times 10^4$  个细胞、每孔 200  $\mu$ L 接种于 96 孔培养板内, 24 h 后, 分为正常组、模型组 (20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> A $\beta$ <sub>25-35</sub>) 及化合物不同浓度 (20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> A $\beta$ <sub>25-35</sub> + 5、10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 化合物) 给药组。继续培养 24 h, MTT 法检测细胞活力<sup>[10]</sup>。

## References

- [1] Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. The Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1974: 350.
- [2] Zhang DS, Gao HY, Wu LJ. Advances in the study of *Chaenomeles sinensis* [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2007, 24: 721-725.
- [3] Yin ZH, Zhao C, Zhang JJ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Chaenomeles sinensis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学), 2017, 23: 234-242.
- [4] Huang L, Yu DQ. Application of Ultraviolet Spectrum in Organic Chemistry (紫外光谱在有机化学中的应用) [M]. Part II. Beijing: Science Press, 1998: 132-137.
- [5] Zhang HC, Zhang TT, Du B, et al. Chemical constituents of *Celosia cristata* L [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2014, 36: 122-125.
- [6] Wei W, Fan CL, Wang GY, et al. Chemical constituents from *Ficus pumila* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 615-621.
- [7] Wang TY, Zhao JP, Li XR, et al. New alkaloids from green vegetable soybeans and their inhibitory activities on the proliferation of concanavalin A-activated lymphocytes [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64: 1649-1656.
- [8] Wang JY, Li XG, Yang XW. Ginsenine, a new alkaloid from the berry of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. J Asian Nat Prod Res, 2006, 8: 605-608.
- [9] Yang BY, Song DD, Han H, et al. Chemical constituents from roots of *Sambucus williamsii* (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 1367-1372.
- [10] Wang YL, Song TY, Lu M, et al. Setting up Alzheimer disease cell apoptosis model with PC-12 cell induced by A $\beta$ <sub>25-35</sub> [J]. J Xi'an Med Univ (西安医科大学学报), 2002, 23: 129-132.