

零余子中一个新的吲哚类生物碱

冯卫生^{1,2*}, 郭孟焕^{1,2}, 殷艺阁^{1,2}, 曹彦刚^{1,2}, 杨翠兰^{1,2}, 王洋洋^{1,2},
齐 曼^{1,2}, 张艳丽^{1,2}, 任英杰^{1,2}, 刘晏灵^{1,2}, 郑晓珂^{1,2}

(1. 河南中医药大学药学院, 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: 采用柱色谱技术分离纯化研究零余子 (*bulbils of Dioscorea opposita* Thunb.) 中的化学成分。通过理化性质和波谱数据鉴定了 4 个吲哚类生物碱: 零余子碱 (3,4-dihydro-6-hydroxy-4-methyl-6*H*-pyrido[6,5-*b*]indol-5(1*H*)-one) (**1**)、anoetochine (**2**)、ginsenine (**3**) 和吲哚乳酸酯 (**4**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 命名为: 零余子碱, 化合物 **2~4** 均为首次从该植物中得到。通过 MTT 法评价化合物的细胞毒活性, 这 4 个化合物对人肝癌细胞 HepG2 和乳腺癌细胞 MDA-231 的 IC₅₀ 值均大于 100 μmol·L⁻¹, 均未表现出明显的细胞毒活性。

关键词: 薯蓣属; 零余子; 化学成分; 吲哚类生物碱; 细胞毒

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1131-03

A new indole alkaloid from bulbils of *Dioscorea opposita* Thunb.

FENG Wei-sheng^{1,2*}, GUO Meng-huan^{1,2}, YIN Yi-ge^{1,2}, CAO Yan-gang^{1,2}, YANG Cui-lan^{1,2},
WANG Yang-yang^{1,2}, QI Man^{1,2}, ZHANG Yan-li^{1,2}, REN Ying-jie^{1,2}, LIU Yan-ling^{1,2}, ZHENG Xiao-ke^{1,2}

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

Abstract: This study was designed to study the chemical constituents from bulbil of *Dioscorea opposita* Thunb.. Four compounds were isolated by silica gel column chromatography. On the basis of physic-chemical characters and spectroscopic data analysis, these compounds were identified as lyzalkaloid (3,4-dihydro-6-hydroxy-4-methyl-6*H*-pyrido[6,5-*b*]indol-5(1*H*)-one) (**1**), anoetochine (**2**), ginsenine (**3**), and 2-hydroxy-3-(1*H*-indol-3-yl) propanoic acid methyl ester (**4**). Compound **1** is a new indole alkaloid, named as lyzalkaloid. Compounds **2~4** were isolated from this plant for the first time. The cytotoxic activities were assessed by MTT assay. All compounds exhibited the cytotoxic activity against HepG2 and MDA-231 with IC₅₀ values of over 100 μmol·L⁻¹, respectively. All compounds show no significant cytotoxic activities against HepG2, MDA-231 cancer cell.

Key words: *Dioscorea* L.; bulbils of *Dioscorea opposita* Thunb.; chemical constituent; indole alkaloid; cytotoxic activity

零余子为薯蓣科植物薯蓣 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 叶腋间的珠芽^[1]。据《本草拾遗》记载, 零

余子味甘温、无毒、主补虚、强腰脚、食之不饥, 功能比山药还要强, 还可提高人体免疫功能和抗病能力^[2]。目前, 关于零余子化学成分的研究较少, 因此, 本文采用多种柱色谱技术和手段, 从零余子中分离得到 4 个化合物, 分别是: 3,4-dihydro-6-hydroxy-4-methyl-6*H*-pyrido[6,5-*b*]indol-5(1*H*)-one (**1**)、anoetochine (**2**)、ginsenine (**3**) 和吲哚乳酸酯 (**4**), 其中, 化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2~4** 首次从该植物中分

收稿日期: 2018-05-02; 修回日期: 2018-05-29.

基金项目: 2016 年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”(豫材料[2016]149 号); 河南省重大科技专项-“地黄、山药、牛膝豫产道地药材品质保障关键技术与品质特色研究”(171100310500).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0400

离得到, 结构见图 1。

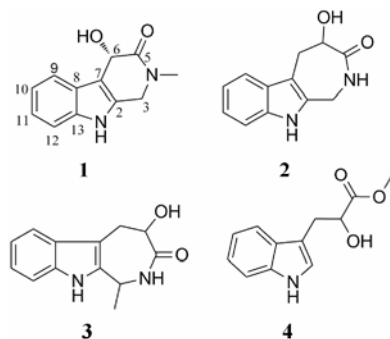


Figure 1 Structures of compounds 1–4

结果与讨论

化合物 **1** 为淡黄色无定形粉末。碘化铋钾试剂反应呈阳性, 推测该化合物可能为生物碱类成分。 $[\alpha]_D^{20}$ -66.0143 (c 0.067, $\text{CH}_3\text{OH} : \text{DMSO} = 14 : 1$); UV 谱在 232、271 和 289 nm 处分别有最大吸收, 提示分子中含有吲哚母环结构。IR 谱显示该化合物结构中含有胺基 (3450 cm^{-1}) 和酰胺羰基 (1660 cm^{-1})。HR-TOF-MS: m/z : 217.0971 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$, 计算值为 217.0968), 提示化合物的分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, 计算不饱和度 $\Omega = 7$ 。在 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 谱中, 在低场区 δ_{H} 10.9 处出现一个活泼质子信号; δ 7.06 (1H, t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, H-10)、6.98 (1H, t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, H-11)、7.31 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-12)、7.43 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-9) 为苯环上的 4 个芳香氢信号; 在 δ_{H} 3.16 (3H, s, N- CH_3 -4) 出现一个 N- CH_3 氢信号; 另外, 在 δ_{H} 4.18 (2H, dd, $J = 15.3, 15.2 \text{ Hz}$, H-3) 出现一个亚甲基氢信号; 在 $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 125 Hz) 谱中有 12 个碳信号, 根据 DEPT 135 谱, 可知包含 5 个季碳、1 个仲碳、一个伯碳; 其余 5 个均为叔碳。在化合物 **1** 的 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱中, 显示出 1 组质子自旋体系: δ_{H} 7.43 (H-9) \leftrightarrow 7.06 (H-10) \leftrightarrow 6.98 (H-11) \leftrightarrow 7.31 (H-12), 证实化合物 **1** 中含有邻位双取代的苯环结构 (图 2)。利用 HSQC、HMBC 谱对化合物 **1** 的 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 谱数据进行了归属 (表 1)。在化合物 **1** 的 HMBC 谱中, δ_{H} 3.64 (H-6) 与 C-7 (δ_{C} 106.6)、C-2 (δ_{C} 127.0)、C-5 (δ_{C} 173.0) 分别有远程相关, 说明-CHOH-连在 C-5 以及 C-7 之间; δ_{H} 3.16 (N- CH_3 -4) 与 C-3 (δ_{C} 40.4)、C-5 (δ_{C} 173.0), δ_{H} 4.18 (H-3) 与 N- CH_3 -4 (δ_{C} 48.6)、C-2 (δ_{C} 127.0) 分别有远程相关 (图 2), 说明化合物 **1** 中含有与吲哚母环相连的吡啶六元环。通过 NOESY 谱确定化合物 **1** 的相对立体构型, 在 NOESY 谱中, H-6 和 N- CH_3 有相关, 经查阅文献^[3–14], 连在氮

上的甲基为 β 构型, 说明 H-6 和 CH_3 为 β 构型。综上所述, 并结合文献 1,2-dihydro-4-hydroxy-2,8-dimethyl-4H-pyrido[4,3-*b*]indol-3(5H)-one 的波谱数据^[3], 最终确定该化合物的结构是 [3,4-dihydro-6-hydroxy-4-methyl-6H-pyrido[6,5-*b*]indol-5(1H)-one], 命名为零余子碱。

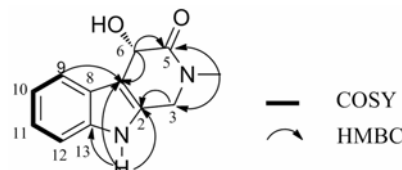


Figure 2 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY and key HMBC correlations of **1**

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

No.	δ_{C}	δ_{H}
1		10.9 (1H, s)
2	127.0	
3	40.4	4.18 (2H, dd, $J = 15.3, 15.2 \text{ Hz}$)
4		
5	173.0	
6	56.5	3.64 (1H, s)
7	106.6	
8	126.2	
9	117.8	7.43 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$)
10	121.3	7.06 (1H, t, $J = 7.5 \text{ Hz}$)
11	118.8	6.98 (1H, t, $J = 7.5 \text{ Hz}$)
12	111.2	7.31 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$)
13	136.2	
N- CH_3	48.6	3.16 (3H, s)

实验部分

Bruker AVANCE III 500 型核磁共振仪 (TMS 内标)、Bruker maxis HD 型飞行时间质谱 (德国布鲁克公司); Rudolph AP-IV 型旋光仪 (美国鲁道夫公司); Thermo Nicolet IS10 红外光谱仪、Thermo EVO300 紫外分光光度计 (美国热电公司); 赛谱锐思 LC50 型高压制备液相色谱仪 (赛谱锐思北京科技有限公司); UV200 型紫外检测器, YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (10 mm \times 250 mm, D.S-5 μm , 12 μm) (日本 YMC 有限公司); Waters e2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 检测器。柱色谱填料 Diaion HP-20、MCI Gel CHP-20 (日本三菱化学公司); Toyopearl HW-40 (日本 TOSOH 公司); Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech 公司), 其他分析纯和色谱纯试剂为北京化工厂和天津第三化学试剂厂生产, 标准品购自上海源叶生物科技有限公司。

零余子为 2017 年 3 月采自河南省温县, 经河南

中医药大学董诚明教授鉴定零余子为薯蓣科多年生草质藤本植物薯蓣 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 叶腋间的珠芽。

1 提取与分离

零余子 60 kg, 50% 丙酮组织破碎提取两次, 提取液减压浓缩成稠浸膏状, 稀释到适当浓度, 上 Diaion HP-20 柱, 依次用水、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70% 乙醇-水梯度洗脱得到 8 个洗脱组分。其中, 10% 组分和 20% 组分用 Toyopearl HW-40、Sephadex LH-20、MCI Gel CHP-20、ODS 等柱色谱技术, 并结合制备液相、HPLC 及重结晶方法, 得到化合物 **1** (6.92 mg)、**2** (6.19 mg)、**3** (2.49 mg) 和 **4** (2.94 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 无定形淡黄色粉末, 碘化铋钾试剂反应呈阳性, 推测该化合物可能为生物碱类成分。[α]_D²⁰ -66.014 3 (*c* 0.067, CH₃OH : DMSO = 14 : 1); UV (MeOH : DMSO = 49 : 1) λ_{\max} (log ϵ): 232 (4.17)、271 (4.16)、289 (4.07) nm; IR (MeOH) ν_{\max} : 3 450、1 660 cm⁻¹; HR-TOF-MS: *m/z*: 217.097 1 [M+H]⁺ (计算值为 217.096 8, C₁₂H₁₂N₂O₂); ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

3 化合物抗肿瘤活性测定

采用 MTT 法, 参照文献^[15], 对 4 个化合物进行了细胞毒活性评价, 结果表明, 所有化合物对人肝癌细胞 HepG2 和乳腺癌细胞 MDA-231 的 IC₅₀ 值均大于 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 无明显细胞毒活性。本研究不仅丰富了零余子化学成分的种类, 也为进一步开发利用零余子提供了实验基础。

References

- [1] Zhao B. New Cultivation Techniques of Chinese Yam (山药栽培新技术) [M]. Beijing: Golden Shield Press, 1998.
- [2] Sheng W, Xue JP, Xie BJ. Study on antioxidant activity of extracts from bulbil of *Dioscorea opposita* [J]. Food Sci, 2009, 30: 92-94.
- [3] Wu TS, Chang FC, Wu PL, et al. Constituents of leaves of *Tefradium glabrifolium* [J]. J Chin Chem Soc, 1995, 42: 929-934.
- [4] Luo JP, Zhang LP, Yang SL, et al. Separation and structure elucidation of alkaloids from Chinese drug buzhuay, Folium Microcos [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2009, 44: 150-153.
- [5] Yamasaki K, Fujita K. Qualitative and quantitative analysis of ephedra alkaloids in Eohedrae Herba by carbon-13 nuclear magnetic resonance [J]. Chem Pharm Bull, 1979; 27: 43-47.
- [6] Lao AN, Tang ZJ, Xu RS. Study on the chemical constituents of *Stephania longa* L. (Menispermaceae) (II) [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 1981, 16: 940-942.
- [7] Hou CY, Xue H. Study on the chemical constituents of *Menispermum dauricum* DC [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 1984, 19: 471-472.
- [8] Lin WH, Cai MS, Ying BP, et al. Study on the chemical constituents of *Croomia japonica* MIQ [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 1993, 28: 202-206.
- [9] Guo YY, Lin LB, Shen J. Study on the chemical constituents of *Tinospora hainanensis* [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 1998, 33: 350-354.
- [10] Chaudhuri PK. Echinosolinone, an alkaloid from *Echinops echinatus* [J]. Phytochemistry, 1987, 26: 587-589.
- [11] Abdjul DB, Yamazaki H, Ukai K, et al. Two new indole derivatives from a marine sponge *Ircinia* sp. collected at Iriomote Island [J]. J Nat Med, 2015, 69: 416-420.
- [12] Wang L, Sun L, Liu HY, et al. Chemical constituents of *Gelsemium elegans* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 2028-2032.
- [13] Zhang DB, Yang Y, Song ZX, et al. Study on alkaloids from *Ervatamia hainanensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 1286-1291.
- [14] Hong B, Li WJ, Zhao CJ. Chemical constituents of *Rauvolfia verticillata* [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2012, 47: 764-768.
- [15] Zhang Z, Wang S, Qiu H, et al. Waltonitine induces human hepatocellular carcinoma cells apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Lett, 2009, 286: 223-231.