

鸡骨常山中的一个新生物碱

位翠杰^{1,2}, 谢静^{1,2}, 李紫薇^{1,2}, 张建^{1,2}, 张晓琦^{1,2*}, 叶文才^{1,2}

(1. 暨南大学药学院中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学广东省现代工程技术研究中心, 广东 广州 510632)

摘要: 采用硅胶、碳十八烷基反相键合硅胶 (ODS)、Sephadex LH-20、HPLC 等色谱方法进行分离纯化, 从夹竹桃科植物鸡骨常山枝叶的总生物碱部位中分离并鉴定了 4 个生物碱类化合物, 根据理化性质与波谱数据分别鉴定为 *N*₄-甲基脱氧阿枯明 (*N*₄-methylpseudoakuammigine, **1**)、脱氧阿枯明 (pseudoakuammigine, **2**)、维诺林 (vinorine, **3**)、匹克拉林碱 (picraline, **4**)。其中化合物 **1** 为一个新的生物碱类化合物。

关键词: 夹竹桃科; 鸡骨常山; 生物碱; *N*₄-甲基脱氧阿枯明

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)02-0294-04

A new alkaloid from *Alstonia yunnanensis*

WEI Cui-jie^{1,2}, XIE Jing^{1,2}, LI Zi-wei^{1,2}, ZHANG Jian^{1,2}, ZHANG Xiao-qi^{1,2*}, YE Wen-cai^{1,2}

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangdong Engineering Research Center for Modernization of TCM, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Four alkaloids were isolated from the total alkaloids of the twigs and leaves of *Alstonia yunnanensis* (Apocynaceae) by using silica gel, ODS, Sephadex LH-20, and HPLC chromatography. Structures were determined by physical, chemical and spectroscopic methods and identified as *N*₄-methylpseudoakuammigine (**1**), pseudoakuammigine (**2**), vinorine (**3**), picraline (**4**). Among them, compound **1** is a new monoterpene indole alkaloid.

Key words: Apocynaceae; *Alstonia yunnanensis*; alkaloids; *N*₄-methylpseudoakuammigine

鸡骨常山 (*Alstonia yunnanensis*) 为夹竹桃科 (Apocynaceae) 鸡骨常山属植物, 为直立灌木, 主要产于云南、贵州和广西等地区的海拔 1 100~2 400 米的山坡或沟谷地带。其根可供药用, 用于治疗高血压、发热、发炎、头痛等症^[1]。生物碱类成分为该种植物特征性成分且具有多种药理活性, 其中化合物 vinorine 和 vellosimine 对大鼠 W₂₅₆、小鼠 Lewis 肺癌和 B₁₆ 黑色素瘤有一定的活性^[2,3]; 化合物 alstiyunnanenine D 和 E 以及 alstoniascholarine I 对骨肉瘤细胞株表现出明显的细胞毒活性^[4]; perakine *N*₄-oxide、raucafrinoline *N*₄-oxide

和 vinorine *N*₄-oxide 化合物对 Cox-2 具有选择性抑制 (>85%) 作用^[5], 以及抗神经阻断作用^[6]。为寻找结构新颖、活性良好的生物碱类成分, 本实验利用正、反相硅胶柱以及 HPLC 等多种分离手段从鸡骨常山枝叶中分离并鉴定了 4 个生物碱类化合物 (图 1), 分别为: *N*₄-甲基脱氧阿枯明 (*N*₄-methylpseudoakuammigine, **1**)、脱氧阿枯明 (pseudoakuammigine, **2**)、维诺林 (vinorine, **3**)、匹克拉林碱 (picraline, **4**)。其中化合物 **1** 为新的柯南因-土的宁型生物碱类化合物。

结果与讨论

化合物 **1** 淡黄色粉末。[α]_D²⁵ +148.5 (c 0.66, CH₃OH), UV λ_{max} (CH₃OH): 205、239、286 nm 有最大吸收峰; IR (KBr) 光谱中显示含羰基 (1 675 cm⁻¹) 和苯环 (1 582 和 1 470 cm⁻¹) 的特征吸收峰; HR-ESI-MS *m/z*

收稿日期: 2019-10-12; 修回日期: 2019-10-29.

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1703802); 国家自然科学基金广东联合基金 (U1801287); 广东省科技计划项目 (2018B020207008).

*通讯作者 Tel: 86-20-85223994, E-mail: tzhxq01@jnu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0805

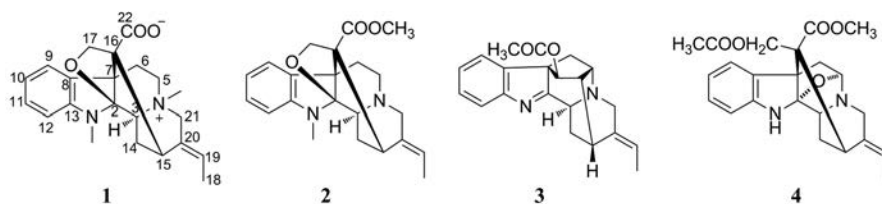


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-4

367.201 0 [M+H]⁺ (Calcd. for C₂₂H₂₇N₂O₃, 367.201 6), 可确定该化合物的分子式为 C₂₂H₂₆N₂O₃, 不饱和度为 11。

¹H NMR 谱中, 在低场区有 1 组芳香氢的自旋耦合质子信号 [δ_{H} 7.57 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-9), 7.15 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-11), 6.81 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-10), 6.74 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-12)], 1 个烯烃氢信号 δ_{H} 5.71 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, H-19); 在高场区给出 2 个氮甲基质子信号 [δ_{H} 3.22 (1H, s, N₄-CH₃), 2.85 (1H, s, N₁-CH₃)], 以及 1 个甲基质子信号 [δ_{H} 1.82 (3H, dd, $J = 7.0, 2.2$ Hz, H-18)]. ¹³C NMR 中, 显示有 22 个碳信号, 提示其中包括 1 个羰基碳信号 [δ_{C} 176.6 (COO⁻)]; 1 组邻二取代苯环碳信号 [δ_{C} 152.1 (C-13), 140.2 (C-8), 128.9 (C-11), 124.9 (C-9), 122.1 (C-10) 和 111.9 (C-12)]; 1 组双键碳信号 [δ_{C} 133.0 (C-20), 126.0 (C-19)]; 2 个氮甲基碳信号 [δ_{C} 57.9 (N₄-CH₃), 29.9 (N₁-CH₃)]; 1 个甲基碳信号 [δ_{C} 14.1 (C-18)]. 化合物 1 的 NMR、MS 数据与已知化合物 2 比较只是少了 1 个甲氧基碳信号, 多了 1 个氮甲基碳信号, 同时 HMBC 谱中可见 δ_{H} 3.22 (3H, s) 与 δ_{C} 68.1 (C-3)、62.8 (C-5) 有远程相关 (图 2), 从而可知化合物 1 的 N₄ 位被甲基取代。借助于 1D 和 2D NMR 数据, 对化合物 1 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 信号进行了全归属 (表 1)。在化合物 1 的 NOESY 谱中可观察到 H-3 与 H-21 α , H-21 α 与 H-15 有 NOE 相关, 确定 H-3 和 H-15 为 α -H; 通过 H-15 与 H-18 的 NOE 相关确定 C-19~C-20 位双键为 E 构型。因此可以确定化合物 1 的相对构型。

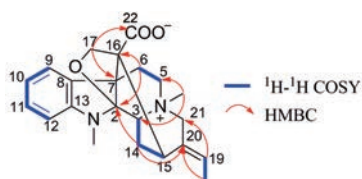


Figure 2 ¹H-¹H COSY and key HMBC correlations of compound 1

为了进一步确定化合物 1 的绝对构型, 对化合物进行 ECD 测试并与已知化合物 2 进行比较分析, 两者的 ECD 图谱非常相似 (图 3)。从而确定了化合物 1 的绝对构型为 2S,3S,7S,15S,16R。

综上所述, 确定化合物 1 为一个新的单萜吡啶类生物碱, 命名为 N₄-甲基脱氧阿枯明 (N₄-methylpseudo-

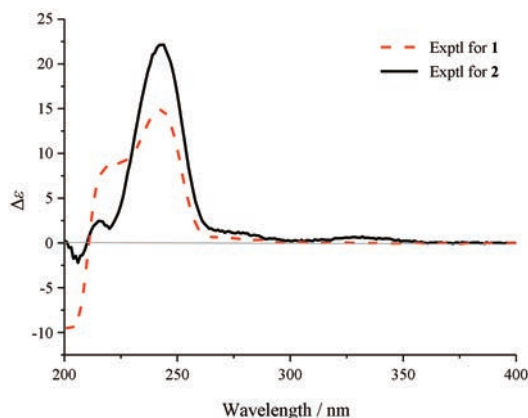


Figure 3 Experimental ECD spectra of 1 and 2

akuammigine), NMR 数据见表 1。

实验部分

JASCO P-2000 旋光仪、Jasco V-550 紫外/可见光谱仪和 Jasco FI/IR-480 Plus Fourier Transform 型红外光谱仪 (KBr 压片) (日本 Jasco 公司); Chirascan 分光仪 (英国应用光物理公司); Finnigan LCQ Advantage MAX 型质谱仪 (Thermo Finnigan 公司); Agilent 6210 ESI/TOF 质谱仪、Agilent 1260 分析型高效液相色谱仪和 Agilent 1260 制备型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Bruker AV-600/400 型核磁共振仪 (美国 Bruker 公司); 柱色谱用硅胶 (100~200, 200~300) 目, 青岛海洋化工厂; 硅胶 GF₂₅₄ 薄层预制板 (烟台化学工业研究所); ODS 柱色谱材料 (Merck 公司); Sephadex LH-20 (美国 Amersham Biosciences Swede 公司); 所用试剂均为市售分析纯或色谱纯。

实验用药材鸡骨常山枝叶于 2017 年 8 月采自云南昆明, 由暨南大学周光雄教授鉴定为鸡骨常山 (*Alstonia yunnanensis*) 干燥枝叶。标本 (No. CP2017082001) 保存于暨南大学药学院。

1 提取与分离

鸡骨常山干燥枝叶 20.0 kg, 粉碎成粗粉, 用 95% 乙醇在室温下渗漉提取 3 次, 减压浓缩得总浸膏 2.0 kg, 加水混悬后, 用 10% HCl 调 pH 值到 2~3, 氯仿萃取, 酸水层用氨水调 pH 值到 9~10, 氯仿萃取, 萃取液减

Table 1 NMR data of compounds **1** (CD₃OD) and **2** (CDCl₃) (δ in ppm, J in Hz)

Position	1			2	
	δ_{H} (600 MHz)	δ_{C} (150 MHz)	HMBC	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (100 MHz)
2	–	103.9 C	–	–	104.0 C
3	4.49 s	68.1 CH	C-2, 5, 7 <i>N</i> ₄ -CH ₃	4.18 s	52.7 CH
5	α 3.35 m	62.8 CH ₂	C-3, 7, 21 <i>N</i> ₄ -CH ₃	2.57 m	50.8 CH ₂
	β 4.07 t (16.8, 4.6)			3.54 d (6.0)	
6	α 3.85 m	29.6 CH ₂	C-2, 8, 16	2.33 d (13.8)	28.1 CH ₂
	β 1.67 dd (16.8, 4.6)			2.06 d (13.8)	
7	–	52.6 C	–	–	53.8 C
8	–	140.2 C	–	–	142.2 C
9	7.57 d (7.7)	124.9 CH	C-7, 11, 13	7.07 d (7.7)	122.5 CH
10	6.81 t (7.7)	122.1 CH	C-8, 12	6.73 t (7.7)	120.0 CH
11	7.15 t (7.7)	128.9 CH	C-9, 13	7.12 t (7.7)	127.5 CH
12	6.74 d (7.7)	111.9 CH	C-8, 10	6.63 d (7.7)	110.0 CH
13	–	152.1 C	–	–	151.9 C
14	α 2.58 d (15.0)	26.7 CH ₂	C-2, 16, 20	3.31 dd (15.0, 5.8)	31.3 CH ₂
	β 2.32 d (15.0)			1.46 dd (15.0, 5.8)	
15	3.72 s	39.2 CH	C-3, 7, 19	3.48 d (4.9)	41.1 CH
16	–	60.5 C	–	–	58.5 C
17	a 3.97 d (7.8)	77.0 CH ₂	C-1, 2, 7, 15	3.91 d (7.3)	74.5 CH ₂
	b 3.60 d (7.8)			3.59 d (7.3)	
18	1.82 dd (7.0, 2.2)	14.1 CH ₃	C-19	1.52 d (7.0)	13.1 CH ₃
19	5.71 q (7.0)	126.0 CH	C-15, 21	5.41 q (7.0)	118.5 CH
20	–	133.0 C	–	–	139.4 C
21	α 3.90 d (15.3)	66.9 CH ₂	C-3, 15, 19	2.84 d (10.8)	54.6 CH ₂
	β 4.33 d (15.3)			3.94 d (10.8)	
22	–	176.6 C	–	–	172.3 C
<i>N</i> ₁ -CH ₃	2.85 s	29.9 CH ₃	C-2, 13	2.83 s	29.1 CH ₃
<i>N</i> ₄ -CH ₃	3.22 s	57.9 CH ₃	C-3, 5	–	–
OCH ₃	–	–	–	3.81 s	52.0 CH ₃

压浓缩得到粗总碱 55.3 g。粗总碱部位经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇系统 (100:0~0:100) 梯度洗脱, 得到 14 个流份 (Fr. 1~14)。Fr. 9 经凝胶柱色谱 (氯仿-甲醇 1:1) 分离得到 6 个部分 (Fr. 9A~F), 其中 Fr. 9B 经 Sephadex LH-20 (甲醇)、及 HPLC 分析制备得到化合物 **3** (5.9 mg)、**4** (21.0 mg)。Fr. 10 经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1)、ODS (甲醇-水, 20:80~0:100), 以及 HPLC 分析制备得到化合物 **1** (7.38 mg)、**2** (10.6 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色粉末, 改良碘化铯钾反应显阳性。[α]_D²⁵ +148.48 (c 0.66, CH₃OH); HR-ESI-MS m/z 367.201 0 [M+H]⁺ (Calcd. for C₂₂H₂₇N₂O₃, 367.201 6), 可确定该化合物的分子式为 C₂₂H₂₆N₂O₃; UV λ_{max} (CH₃OH): 205、239、286 nm; IR (KBr): 3 429、2 963、1 675、1 582、1 470、1 455、1 384、765 cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) 数据见表 1。

化合物 **2** 淡黄色粉末, 改良碘化铯钾反应显阳性。HR-ESI-MS m/z : 367.200 9 [M+H]⁺ (Calcd. for C₂₂H₂₇N₂O₃, 367.201 6); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 和 ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表 1。以上数据与文献^[7]报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为脱氧阿枯明

(pseudoakummine)。

化合物 **3** 黄色粉末, 改良碘化铯钾反应显阳性。UV λ_{max} (CH₃OH): 212、261 nm; IR (KBr): 3 412、1 740、1 593、1 447、1 375、1 234、750 cm⁻¹; HR-ESI-MS m/z : 335.175 0 [M+H]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.57 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-9), 7.56 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-12), 7.43 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-11), 7.29 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-10), 5.40 (1H, q, J = 6.8 Hz, H-19), 5.10 (1H, d, J = 0.9 Hz, H-17), 4.21 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-3), 3.65 (1H, m, H-21 α), 3.53 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-21 β), 3.48 (1H, t, J = 4.8 Hz, H-5), 3.31 (1H, s, H-15), 2.87 (1H, dd, J = 12.1, 4.8 Hz, H-6 α), 2.55 (1H, t, J = 6.2 Hz, H-16), 2.19 (3H, s, OCOCH₃), 2.01 (2H, m, H-14), 1.70 (3H, dd, J = 6.8, 1.2 Hz, H-18), 1.60 (1H, d, J = 12.1 Hz, H-6 β); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 185.5 (C-2), 57.1 (C-3), 59.2 (C-5), 38.1 (C-6), 65.8 (C-7), 137.5 (C-8), 125.4 (C-9), 127.3 (C-10), 129.9 (C-11), 121.4 (C-12), 156.7 (C-13), 26.8 (C-14), 28.5 (C-15), 50.1 (C-16), 78.6 (C-17), 12.9 (C-18) 117.3 (C-19), 138.2 (C-20), 54.6 (C-21), 171.7 (C-22), 20.9 (OCOCH₃)。以上数据与文献^[8]报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为维诺林 (vinorine)。

化合物 **4** 黄色粉末, 改良碘化铯钾反应显阳性。

UV λ_{\max} (CH₃OH): 206、287 nm; IR (KBr): 3 437、1 737、1 615、1 459、1 241、1 039、754 cm⁻¹; ESI-MS m/z : 411.192 9 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.37 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9), 7.04 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-11), 6.78 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-10), 6.73 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-12), 5.47 (1H, q, $J = 7.2$ Hz, H-19), 4.72 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-5), 4.57 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-17a), 3.89 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-17b), 3.75 (1H, dd, $J = 10.0, 5.9$ Hz, H-21 α), 3.70 (3H, s, COOCH₃), 3.54 (1H, t, $J = 5.3$ Hz, H-3), 3.40 (1H, s, H-15), 3.27 (1H, d, $J = 14.2$ Hz, H-6 α), 3.23 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-21 β), 2.36 (1H, dd, $J = 14.2, 2.8$ Hz, H-6 β), 2.05 (2H, m, H-14), 1.63 (3H, dd, $J = 7.2, 2.1$ Hz, H-18), 1.54 (3H, s, COCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 108.8 (C-2), 52.7 (C-3), 88.0 (C-5), 45.1 (C-6), 53.9 (C-7), 135.0 (C-8), 128.4 (C-9), 121.3 (C-10), 128.9 (C-11), 111.9 (C-12), 150.6 (C-13), 22.6 (C-14), 36.5 (C-15), 57.4 (C-16), 68.2 (C-17), 13.6 (C-18), 122.5 (C-19), 137.8 (C-20), 46.9 (C-21), 173.6 (C-22), 51.9 (OCH₃), 171.8 (OCOCH₃), 20.2 (OCOCH₃)。以上数据与文献^[9]报道基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为匹克拉林碱 (picraline)。

References

- [1] Editorial Committee of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences. Flora of China Volume 63 (中国植物志·第63卷) [M]. Beijing: Beijing Science Press, 1977: 92.
- [2] Chen WM, Yan YP, Ma XM. Isolation and identification of the alkaloids from the stems and leaves of *Alstonia yunnanensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1986, 21: 187-190.
- [3] Chen WM, Yan YP, Wang YJ, et al. Isolation and identification of three new alkaloids from roots of *Alstonia yunnanensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1985, 20: 906-912.
- [4] Li CJ, Chen S, Sun C, et al. Cytotoxic monoterpene indole alkaloids from *Alstonia yunnanensis* Diels [J]. Fitoterapia, 2017, 117: 79-83.
- [5] Cao P, Liang Y, Gao X, et al. Monoterpene indole alkaloids from *Alstonia yunnanensis* and their cytotoxic and anti-inflammatory activities [J]. Molecules, 2012, 17: 13631-13641.
- [6] Liang HG, Luo T. Pharmacological study on the alkaloid of *Alstonia yunnanensis* — a kind of ganglion blocker [J]. J Jinan Univ (暨南大学学报), 1980, 2: 4-35.
- [7] Hu WL, Zhu JP, Hesse M. Indole alkaloids from *Alstonia angustifolia* [J]. Planta Med, 1989, 55: 463-466.
- [8] Wang QX. Studies on the Chemical Constituents of *Podocarpus nagi*, *Cosmos bipinnata* and *Rauvolfia verticillata* (竹柏、秋英和萝芙木三种植物化学成分的研究) [D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2018.
- [9] Yamauchi T, Abe F, Chen RF, et al. Alkaloids from the leaves of *Alstonia scholaris* in Taiwan, Thailand, Indonesia and the Philippines [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 3547-3552.