

盆架树中 1 个新单萜吲哚生物碱

曾 婷¹, 李小年², 李丽梅^{1*}

1. 成都医学院 科研实验中心, 四川 成都 610500

2. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 研究盆架树 *Winchia calophylla* 树皮的生物碱成分。方法 采用硅胶和 Sephadex LH-20 柱色谱等方法进行分离和纯化, 通过 MS、NMR 等波谱数据以及 X-射线单晶衍射分析进行结构鉴定, 采用 MTT 法测试化合物对 7 种人体肿瘤细胞(肺癌 A549, 乳腺癌 MCF-7, 前列腺癌 PC-3, 神经胶质瘤 U87MG, 多发性骨髓瘤 U266、MM1.S、MM1.R)增殖的抑制作用。结果 从盆架树树皮乙醇提取物的总生物碱部分分离得到 1 个新单萜吲哚生物碱, 命名为盆架树碱 B (1)。结论 化合物 1 为新化合物, 该化合物对 7 种人体肿瘤细胞株无增殖抑制作用。

关键词: 夹竹桃科; 盆架树; 单萜吲哚生物碱; X-射线单晶衍射分析; 盆架树碱 B

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)05-0629-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.003

A new monoterpenoid indole alkaloid from *Winchia calophylla*

ZENG Ting¹, LI Xiao-nian², LI Li-mei¹

1. Research Center, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To investigate the alkaloid constituents from the trunk barks of *Winchia calophylla*. **Methods** The constituents were isolated and purified by column chromatography over silica gel and Sephadex LH-20 columns. The structure of the isolated compound was elucidated by MS and NMR spectra, and then confirmed by a single-crystal X-ray crystallographic analysis. The isolated compound was also evaluated for its *in vitro* cytotoxicity against the proliferation of seven kinds of human cancer cell lines (lung cancer: A549, breast cancer: MCF-7, prostate cancer: PC-3, glioma: U87MG, multiple myeloma: U266, MM1.S, and MM1.R). **Results** A new monoterpenoid indole alkaloid, identified as calophylline B (1), was isolated from the ethanol extract of the trunk barks of *W. calophylla*. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, which shows no cytotoxicity against the proliferation of the above human tumor cells.

Key words: Apocynaceae; *Winchia calophylla* A. DC.; monoterpenoid indole alkaloid; single-crystal X-ray crystallographic analysis; calophylline B

盆架树 *Winchia calophylla* A. DC. 属夹竹桃科 (Apocynaceae) 盆架树属 *Winchia* A. DC. 植物, 分布于中国、印度、缅甸、越南和印度尼西亚等地, 在我国主要分布于云南和海南。该植物有止咳、平喘和祛痰的功效, 西双版纳民间用其治疗慢性气管炎, 亦用于治疗外伤^[1-2]。研究表明, 盆架树中主要含有三萜、单萜及其苷类等非生物碱成分^[3-7]和单萜吲哚生物碱成分^[8-12], 其中单萜吲哚生物碱为其特

征成分, 主要具有抗支气管扩张活性^[10]及抗肿瘤活性^[11]等。本课题组曾对采自云南西双版纳的盆架树树皮的生物碱成分及其抗肿瘤活性进行过研究, 发现其中部分生物碱成分具有抑制肿瘤细胞增殖作用^[12]。在此基础上, 为了得到更多结构新颖的单萜吲哚生物碱成分并研究其抗肿瘤活性, 本实验对盆架树树皮的生物碱成分进行了进一步研究, 分离鉴定出一个新单萜吲哚生物碱, 命名为盆架树碱 B, 其对肺

收稿日期: 2014-11-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21172024); 教育部科学技术研究重点项目 (212151); 四川省科技计划项目青年基金 (2014JQ0049)

作者简介: 曾 婷 (1988—), 女, 硕士在读, 研究方向为天然药物化学。Tel: (028)62739161 E-mail: tt_yy111@163.com

*通信作者 李丽梅, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事天然药物化学研究。Tel: (028)62739161 E-mail: limeiligy@gmail.com

癌 (A549)、乳腺癌 (MCF-7)、前列腺癌 (PC-3)、神经胶质瘤 (U87MG)、多发性骨髓瘤 (U266、MM1.S、MM1.R) 等 7 种人体肿瘤细胞的增殖无明显抑制作用。

1 仪器与材料

X-6 精密显微熔点测定仪 (北京华业寰宇化工有限公司); Perkin-Elmer 341 旋光仪 (美国 PerkinElmer 公司); Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR 红外光谱仪 (美国 PerkinElmer 公司); Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS 紫外分光光度计 (美国 PerkinElmer 公司); Bruker MicrO TOF QII 质谱仪 (德国 Bruker 公司); Bruker Avance 600 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); Xcalibur E X 射线单晶衍射仪 (英国 Oxford 公司); BioTek SynergyTM 2 酶标仪 (美国 BioTek 公司); AxioCam ERc 5s 显微镜 (德国 Zeiss 公司); CO₂ 培养箱 (上海齐欣科学仪器有限公司)。柱色谱硅胶 (200~300 目) 和薄层色谱硅胶板 (GF₂₅₄, 100 mm×5 mm) 均由青岛海洋化工厂生产; Sephadex LH-20 为 Amersham Biosciences 公司产品; DMEM、RPMI 1640 培养基、胎牛血清均为美国 Hyclone 公司生产; 胰蛋白酶由美国 Gibco 公司生产; MTT 试剂、DMF、DMSO 和阿霉素为美国 Sigma 公司生产; 肺肿瘤细胞 A549、乳腺肿瘤细胞 MCF-7、前列腺肿瘤细胞 PC-3、神经胶质瘤细胞 U87MG、多发性骨髓瘤细胞 U266、MM1.S、MM1.R 均来源于美国 ATCC 公司。其他试剂均为分析纯或色谱纯。

盆架树 *Winchia calophylla* A. DC. 树皮采自云南西双版纳勐腊县, 由中国科学院成都生物研究所彭玉兰副研究员鉴定。

2 提取与分离

干燥盆架树树皮 (1.4 kg) 粉碎, 室温下用 5 L 95%乙醇浸提 3 次, 每次 7 d, 减压蒸馏回收乙醇得到浸膏, 将浸膏溶于 1 mol/L 稀盐酸水溶液, 调至 pH 值为 3, 用 2 L 醋酸乙酯萃取 3 次, 再用氢氧化钠调 pH 值为 10, 用 2 L 氯仿萃取 4 次, 得总生物碱 39 g。将总生物碱部分经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇 (20:1→1:1) 梯度洗脱, 薄层色谱检测, 合并组成相似的流分得到 9 个部分 Fr. 1~9。其中 Fr. 4 (0.2 g) 经 Sephadex LH-20 色谱 (氯仿-甲醇 1:1) 分离纯化, 再经硅胶柱色谱 (醋酸乙酯-甲醇 8:1), 得到化合物 **1** (8 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色针晶 (甲醇), mp 165.9~168.7

℃; 碘化铋钾试剂显橙红色。[α]_D²⁰ -50° (c 0.001, MeOH); UV 光谱在 205、236、293 nm 显示特征的二氢吲哚环吸收峰; IR 光谱中 3 322 和 3 221 cm⁻¹ 为多个羟基的伸缩振动吸收峰; 1 732 cm⁻¹ 是羰基伸缩振动吸收峰。HR-ESI-MS *m/z*: 399.228 3 [M-Cl]⁺ (计算值 399.227 8, C₂₃H₃₁N₂O₄), 推断相对分子质量为 434, 分子式为 C₂₃H₃₁N₂O₄Cl。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) 数据 (表 1) 显示二氢吲哚片断的特征信号 δ_H 7.84 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-9), 6.81 (1H, dd, *J* = 7.4, 7.8 Hz, H-10), 7.13 (1H, dd, *J* = 7.4, 7.0 Hz, H-11), 6.78 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-12); δ_C 147.3 (C-13), 129.7 (C-8), 129.0 (C-11), 126.9 (C-9), 120.1 (C-10), 110.7 (C-12)。上述信息提示化合物 **1** 可能是单萜吲哚生物碱类化合物。由于化合物 **1** 和 echitaminic acid^[13] 具有非常相似的核磁数据, 说明化合物 **1** 是 echitamine 型吲哚生物碱。进一步比较两者数据, 发现化合物 **1** 比 echitaminic acid 多了 1 个甲基碳 (δ_C 13.1) 和 1 个连氧亚甲基碳 (δ_C 61.4), 其他碳的化学位移相差不大。在 ¹H-NMR 谱中, 化合物 **1** 比 echitaminic acid 多了 2 组氢, 分别为 δ_H 4.34 (m), 4.28 (m) 和 δ_H 1.36 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 由此推测化合物 **1** 比 echitaminic acid 多了 1 个乙氧基。HMBC 谱中, 不但 -OCH₂CH₃ 的甲基氢 (δ_H 1.36) 与连氧亚甲基碳 (δ_C 61.4) 相关, 而且 -OCH₂CH₃ 的连氧亚甲基氢 (δ_H 4.34, 4.28) 与 C-22 (δ_C 172.3) 相关 (图 1), 说明该乙氧基与羰基碳相连, 同时, N-CH₃ (δ_H 3.39) 与 C-2 (δ_C 100.2), C-21 (δ_C 65.8), C-5 (δ_C 62.6) 相关, H-14 (δ_H 2.71, 1.66) 与 C-20 (δ_C 132.2) 相关, H-18 (δ_H 1.88) 与 C-20 (δ_C 132.2) 相关, H-17 (δ_H 3.97, 3.31) 与 C-22 (δ_C 172.3) 相关, 也进一步证实了化合物 **1** 比 echitaminic acid 多 1 个乙氧基。

另外, X-射线单晶衍射实验证明该化合物属于离子型单萜吲哚生物碱, 结合质谱及提取过程中使用的试剂和溶剂, 通过最后精修, 确认主分子附近 1 个很重的 Q 峰为氯离子, 另 2 个离主分子稍远的较重 Q 峰分别为氧和碳 (甲醇分子)。因此, 化合物 **1** 的结构最终鉴定为 ethyl echitamate chloride, 命名为盆架树碱 B (图 1)。由于提取过程使用了乙醇和盐酸, 所以该化合物有可能是人工产物。但是, 该离子型生物碱的分离和鉴定提示按通常的生物碱提取分离流程得到的生物碱可能是游离态的, 也可能是离子态, 而游离态与不同的离子态的波谱数据是

表1 化合物1与 echitaminic acid 的 ^1H -NMR (600/400 Hz, CD_3OD) 和 ^{13}C -NMR (150/100 Hz, CD_3OD) 数据
Table 1 ^1H -NMR (600/400 Hz, CD_3OD) and ^{13}C -NMR (150/100 Hz, CD_3OD) data of compound 1 and echitaminic acid

碳位	δ_{C}		δ_{H}	
	echitaminic acid	1	echitaminic acid	1
2	101.9 (s)	100.2 (s)	—	—
3	71.6 (d)	69.5 (d)	4.56 (1H, m)	4.48 (1H, m)
5	64.4 (t)	62.6 (t)	3.44 (2H, brd, $J = 8.8$ Hz)	3.53 (2H, m)
6	43.6 (t)	41.4 (t)	3.12 (1H, dd, $J = 15.0, 5.9$ Hz) ^a	2.50 (1H, m), 2.20 (1H, m)
7	63.3 (s)	61.3 (s)	—	—
8	133.1 (s)	129.7 (s)	—	—
9	128.7 (d)	126.9 (d)	7.78 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	7.84 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)
10	121.2 (d)	120.1 (d)	6.74 (1H, dt, $J = 7.7, 1.4$ Hz)	6.81 (1H, dd, $J = 7.4, 7.8$ Hz)
11	129.6 (d)	129.0 (d)	7.06 (1H, dt, $J = 7.7, 1.4$ Hz)	7.13 (1H, dd, $J = 7.4, 7.0$ Hz)
12	111.6 (d)	110.7 (d)	6.73 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	6.78 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)
13	148.3 (s)	147.3 (s)	—	—
14	33.6 (t)	31.6 (t)	2.77 (1H, ddd, $J = 14.7, 10.9, 5.3$ Hz)	2.71 (1H, m)
			1.64 (1H, ddd, $J = 14.7, 5.9, 1.0$ Hz)	1.66 (1H, dd, $J = 14.5, 6.5$ Hz)
15	38.6 (d)	35.1 (d)	4.03 (1H, brd, $J = 5.3$ Hz)	4.06 (1H, brs)
16	55.5 (s)	56.0 (s)	—	—
17	67.7 (t)	64.9 (t)	3.78 (1H, d, $J = 12.0$ Hz)	3.97 (1H, d, $J = 11.9$ Hz)
			3.09 (1H, d, $J = 12.0$ Hz)	3.31 (1H, d, $J = 9.5$ Hz)
18	15.0 (q)	14.3 (q)	1.86 (3H, dd, $J = 7.0, 2.1$ Hz)	1.88 (3H, dd, $J = 7.0, 2.2$ Hz)
19	130.4 (d)	130.3 (d)	5.80 (1H, brq, $J = 7.0$ Hz)	5.84 (1H, m)
20	135.5 (s)	132.2 (s)	—	—
21	67.7 (t)	65.8 (t)	4.55 (1H, d, $J = 12.0$ Hz)	4.56 (1H, d, $J = 14.3$ Hz)
			3.99 (1H, d, $J = 12.0$ Hz)	4.07 (1H, d, $J = 10.2$ Hz)
22	179.2 (s)	172.3 (s)	—	—
N-CH ₃	50.2 (q)	49.4 (q)	3.37 (3H, s)	3.39 (3H, s)
OCH ₂ CH ₃	—	61.4 (t)	—	4.34 (1H, m), 4.28 (1H, m)
OCH ₂ CH ₃	—	13.1 (q)	—	1.36 (3H, t, $J = 7.1$ Hz)

^a 参照化合物中未见 $\delta_{\text{H-6b}}$

^a $\delta_{\text{H-6b}}$ was unavailable in reference

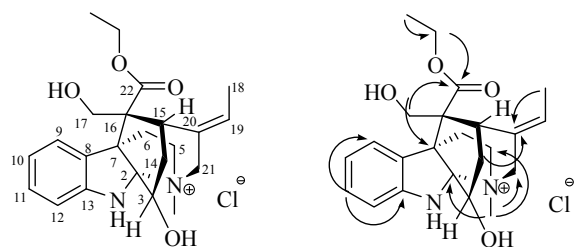


图1 化合物1的结构与重要 HMBC 相关

Fig. 1 Structure and key HMBC correlations of compound 1

有差别的^[14-15]。因此,在报道生物碱结构时,除了提供常规的波谱数据外,最好能够给出 X-射线单晶衍射分析结果,以进一步确定生物碱的真实状态,从而为

后续研究提供较全面科学的参考。

化合物1的 X-射线单晶衍射分析(单晶编号: CCDC 1020844): 无色方晶(甲醇), X-衍射实验用晶体大小为 $0.25\text{ mm} \times 0.20\text{ mm} \times 0.15\text{ mm}$, 属斜方晶系, 晶胞参数: $a = 1.087\text{ 1(3) nm}$, $b = 1.429\text{ 1(3) nm}$, $c = 1.492\text{ 3(5) nm}$, $\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 90.00^\circ$, $\gamma = 90.00^\circ$, 晶胞体积: $V = 2.318\text{ 4(11) nm}^3$, $T = 293\text{ (2) K}$, 空间群为 $P212121$, 晶胞内分子数 $Z = 4$, 吸收系数 $\mu(\text{MoK}\alpha) = 0.203\text{ mm}^{-1}$, 可观察点为 13 350 个, 独立衍射点为 4 733 ($R_{\text{int}} = 0.024\text{ 2}$)。经计算与绝对构型相关的 Flack 系数为 -0.02 (9) , 表明分子

的绝对构型可以被确定^[16]。化合物 **1** 的 X-射线单晶衍射分析结构见图 2。

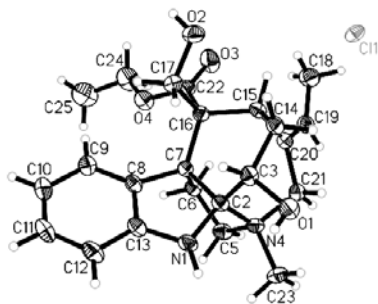


图 2 化合物 **1** 的 X-射线单晶衍射图

Fig. 2 Single-crystal X-ray diffractogram of compound **1**

4 抗肿瘤活性

采用 MTT 方法^[17]检测化合物 **1** 对 7 种人体肿瘤细胞（肺肿瘤 A549，乳腺肿瘤 MCF-7，前列腺肿瘤 PC-3，神经胶质瘤 U87MG，多发性骨髓瘤 U266、MM1.S、MM1.R）增殖的抑制作用。将上述肿瘤细胞于 96 孔板中培养，细胞密度为 40~60 个/mL，放入孵箱培养 12 h（5% CO₂，37 ℃），使细胞在加药前贴壁并保持活性。以阿霉素为阳性对照，分别用 5、10、20、50 μmol/L 的化合物 **1** 处理细胞，每个浓度设 3 个复孔。加药处理 48 h 后，每孔加入 20 μL MTT 试剂，于 37 ℃ 孵育 4 h 后，用 20% SDS-50% DMF 裂解细胞，再用酶标仪于 570 nm 检测吸光度（A）值，最后用 Graphed Prism 软件计算化合物 **1** 的半数抑制浓度（IC₅₀）。结果显示化合物 **1** 对各肿瘤细胞的 IC₅₀ 均 > 50 μmol/L，提示其对上述肿瘤细胞增殖无明显抑制作用。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [2] 西双版纳傣族自治州民族医药调研办. 西双版纳傣药志 (第 3 卷) [M]. 西双版纳: 西双版纳傣族自治州卫生局, 1980.
- [3] 朱伟明, 李顺林, 赵庆, 等. 药用植物盆架树中的缩醛 [J]. 云南植物研究, 2007, 29(6): 708-712.
- [4] Zhu W M, Lu C H, Wang Y, *et al.* Monoterpenoids and their glycosides from *Winchia calophylla* [J]. *J Asia Nat Prod Res*, 2004, 6(3): 193-198.
- [5] Zhu W M, Wang B G, Kang W Y, *et al.* Two new monoterpene diglycosides from *Winchia calophylla* A. DC. [J]. *Chin Chem Lett*, 2003, 14(10): 1029-1032.
- [6] Zhu W M, Shen Y M, Hong X, *et al.* Triterpenoids from the Dai medicinal plant *Winchia calophylla* [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(3): 354-358.
- [7] 朱伟明, 何红平, 王跃虎, 等. 药用植物盆架树中的马钱子苷及其衍生物 [J]. 云南植物研究, 2004, 26(6): 683-686.
- [8] Chen W M, Zhang P L, Rucker G. *N*_b-Demethyl-echitamine *N*-oxide from roots of *Winchia calophylla* [J]. *Planta Med*, 1988, 54(5): 480-481.
- [9] 郭峰, 郁建平, 张于, 等. 盆架树中单萜吲哚生物碱成分的分离与结构鉴定 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(3): 361-363.
- [10] Zhu W M, He H P, Fan L M, *et al.* Components of stem barks of *Winchia calophylla* A. DC. and their bronchodilator activities [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(7): 892-896.
- [11] Gan L S, Yang S P, Wu Y, *et al.* Terpenoid indole alkaloids from *Winchia calophylla* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(1): 18-22.
- [12] Li L M, Yang T, Liu J, *et al.* Calophylline A, a new rearranged monoterpene indole alkaloid from *Winchia calophylla* [J]. *Org Lett*, 2012, 14(13): 3450-3453.
- [13] Salim A A, Garson M J, Craik D J. New indole alkaloids from the bark of *Alstonia scholaris* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(9): 1591-1594.
- [14] 宁永成. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2000.
- [15] 荣国斌. 波谱数据表——有机化合物的结构解析 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2002.
- [16] Flack H D. On enantiomorph-polarity estimation [J]. *Acta Cryst*, 1983, A39(6): 876-881.
- [17] Alley M C, Scudiero D A, Monks A, *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay [J]. *Cancer Res*, 1988, 48(3): 589-601.