

马钱子发酵品中生物碱化学成分研究

潘 扬^{1,2}, 张 弦¹, 刘亮镜³, 蒋亚平¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029

2. 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210029

3. 芜湖市中医医院 制剂科, 安徽 芜湖 241000

摘 要: **目的** 研究马钱子经朱红栓菌固体发酵产物(发酵品)的生物碱成分。**方法** 采用溶剂提取、硅胶柱色谱等方法对马钱子发酵品的生物碱成分进行分离纯化, 根据化合物的理化常数和波谱数据鉴定其结构。**结果** 从马钱子发酵品中共分离得到 10 个生物碱成分, 分别鉴定为士的宁(1)、马钱子碱(2)、伪士的宁(3)、16-甲氧基士的宁(4)、番木鳖次碱(5)、士的宁氮氧化物(6)、马钱子碱氮氧化物(7)、士的宁氯甲氧化物(8)、马钱子碱氯甲氧化物(9)和喜树次碱(10)。**结论** 马钱子发酵品的大部分化学成分仍然是吲哚类生物碱, 其中仅有 10 是单萜吡啶生物碱, 为首次从该种植物中分离得到; 化合物 4 是首次从该植物的种子中分离得到; 化合物 8 和 9 可能为氯仿提取过程中产生的人工加合物。迄今未见朱红栓菌中含有上述生物碱的报道。与生品相比, 马钱子发酵品中生物碱成分发生了一定的变化, 其中化合物 4、6、7 和 10 可能为发酵品新增成分, 这些生物碱成分的鉴定为马钱子发酵“去毒存效”原理提供了理论依据。

关键词: 马钱子; 发酵品; 朱红栓菌; 生物碱; 去毒存效

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0452-06

Alkaloids from fermentation product in *Strychni Semen*

PAN Yang^{1,2}, ZHANG Xian¹, LIU Liang-jing³, JIANG Ya-ping¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China

3. Pharmacy Division, Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine of Anhui Province, Wuhu 241000, China

Key words: *Strychni Semen*; fermentation products; *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Fr.; alkaloids; detoxification and efficiency-deposited

马钱子出自《本草纲目》, 又名番木鳖, 为马钱科(Loganiaceae)植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子, 收载于《中国药典》^[1], 味苦、性温, 有剧毒, 具有通络止痛、散结消肿的功效, 用于治疗风湿顽痹、麻木瘫痪、跌打损伤和痈疽肿痛等疾病。其原植物产于印度、斯里兰卡、缅甸、泰国、越南、老挝、马来西亚、印度尼西亚和菲律宾等国。生于深山老林中, 喜热带湿润性气候, 怕霜冻, 以石灰质壤土或微酸性黏壤土生长较好。我国台湾、福建、广东、海南、广西和云南南部等地亦有栽培^[2]。马钱子在中医临床上应用广泛, 疗效确切, 由于其毒性大, 因此在使用前须采用砂烫、油炸等方法对其进行炮制, 达到减毒的目的。20 世纪 90 年代本课题组首创中药“双向固体发酵”技术,

经过多年的探索, 已发现中药发酵品比原药材更加高效、低毒^[3], 可作为毒性中药炮制减毒的新方法^[4-5]。在此技术的指导下, 利用真菌朱红栓菌 *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Fr. 对马钱子进行“双向固体发酵”, 证明其发酵产物的毒性明显降低, 但镇痛和抗炎作用保持不变^[6]。因此, 有必要对马钱子发酵品的化学成分进行深入研究, 为阐明发酵“去毒存效”的原理提供依据。

本实验采用溶剂提取、硅胶柱色谱等方法, 从马钱子发酵品中共分离得到 10 个生物碱成分, 经鉴定分别为士的宁(strychnine, 1)、马钱子碱(brucine, 2)、伪士的宁(pseudostrychnine, 3)、16-甲氧基士的宁(16-methoxy-strychnine, 4)、番木鳖次碱(vomicine, 5)、士的宁氮氧化物(strychnine *N*-oxide,

收稿日期: 2011-09-12

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(08KJD360007); 南京中医药大学科技重点培育项目(09XPY03); “青蓝工程”项目(2008 年)

作者简介: 潘 扬(1964—), 男, 江苏扬州人, 博士, 研究员, 从事中药化学和生物技术研究工作。

Tel: 13605192035 E-mail: ypan@njutcm.edu.cn; y.pan2006@163.com

6)、马钱子碱氮氧化物 (brucine *N*-oxide, 7)、土的宁氯甲氯化物 (strychnine chloromethochloride, 8)、马钱子碱氯甲氯化物 (brucine chloromethochloride, 9) 和喜树次碱 (venoterpine, 10)。其中 10 系单萜吡啶生物碱, 为首次从该植物中分离得到; 4 是首次从该植物的种子中分离得到; 8 和 9 可能为氯仿提取过程中产生的人工加合物。经文献比对^[7]并通过 HPLC 色谱分析, 与生品相比, 化合物 4、6、7 和 10 可能为发酵品中新增的成分。迄今也未见朱红栓菌中含有上述生物碱的报道^[8]。

1 仪器与材料

Buchi B-540 熔点测定仪; Bruker AV-500 核磁共振波谱仪, TMS 为内标; Waters—Micromass Q-TOF 质谱仪; Varian R-100 红外光谱仪; Shimadzu UV-2401 PC 紫外/可见分光光度计; 岛津 LC-10 AT 型高效液相色谱仪; LC-10 AT (双) 泵, 7725i 手动进样阀, CBM-10A 系统控制器和 CLASS-LC 10 化学色谱工作站, SPD-10 A 紫外检测器, ERC-3415α 在线脱气机, AutoScience AT-530 柱温箱, 岛津 UV 2401 紫外分光光度计; 薄层色谱硅胶 G 和柱色谱硅胶 (200~300 目) 为青岛海洋化工厂产品; PhecdTM C₁₈ 色谱柱 (300 mm×4.6 mm, 5 μm) 为淮安汉邦科技公司产品, 批号 P1810405.25; Sephadex LH-20 (40~120 μm) 购自美国 BioShorp 公司; 显色剂为改良碘化铋钾试剂。

马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子 (马钱子) 于 2006 年 10 月采自云南省山区。植物果实成熟后取出种子, 洗净附着的果肉, 晒干。药材标本经南京中医药大学陈建伟教授鉴定, 存放于南京中医药大学药学院标本室。取马钱子 (生品) 1 000 g, 粉碎成粗粒, 加 2 倍量水湿润约 4 h, 等份填装于 500 mL 培养瓶中, 高压灭菌后, 接种本室冷冻保藏并在 PDA 斜面培养基上复壮的朱红栓菌 *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Fr. 菌块, 26~28 °C 培养约 40 d 后取出, 60 °C 下低温干燥, 作为马钱子发酵品。

2 提取与分离

取马钱子发酵品 700 g, 粉碎 (过 10 目筛), 加 70~80 mL 石灰乳拌匀, 低温烘干。用 7 000 mL 氯仿置索氏提取器中回流提取 10 h, 提取液减压浓缩后得浸膏约 32 g。将其溶解于适量氯仿中, 滤过, 滤液加 5% 硫酸溶液萃取 3~4 次, 酸水液滤过后加 10% 氢氧化钠水溶液调至 pH 值为 10, 沉淀, 静置过夜, 再用氯仿萃取 3~4 次, 萃取液减压浓缩至干,

得到粗生物碱 (灰白色固体) 19 g。

取粗生物碱 10 g, 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇洗脱, 按 1% 甲醇的梯度增加, 依次洗脱, 每个梯度 5 L, 紫外灯下检视薄层板, 改良碘化铋钾试剂显色, 合并相同流分后, 分成 3%~4% 甲醇、6%~7% 甲醇、4%~5% 甲醇和 7%~15% 甲醇 4 个洗脱部位, 再反复进行硅胶或 Sephadex LH-20 柱色谱分离、重结晶, 得到化合物 1 (2 g)、2 (200 mg)、3 (500 mg)、4 (80 mg)、5 (30 mg)、6 (50 mg)、7 (40 mg)、8 (30 mg)、9 (50 mg)、10 (6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色砂晶 (二氯甲烷-甲醇), mp 283~285 °C, C₂₁H₂₂N₂O₂。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.18 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1), 7.10 (1H, td, *J* = 7.5, 0.9 Hz, H-2), 7.26 (1H, td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, H-3), 8.10 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-4), 3.88 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, H-8), 3.14 (1H, dd, *J* = 17.4, 8.5 Hz, H-11α), 2.68 (1H, dd, *J* = 17.4, 3.4 Hz, H-11β), 4.29 (1H, dt, *J* = 11.5, 3.4 Hz, H-12), 1.30 (1H, dt, *J* = 10.6, 2.8 Hz, H-13), 3.18 (1H, brs, H-14), 1.50 (1H, d, *J* = 13.2 Hz, H-15α), 2.38 (1H, dt, *J* = 14.6, 4.3 Hz, H-15β), 4.04 (1H, brs, H-16), 1.92 (2H, d, *J* = 5.1 Hz, 17-CH₂), 2.91 (1H, dd, *J* = 19.9, 10.6 Hz, H-18α), 3.30 (1H, m, H-18β), 2.80 (1H, d, *J* = 16.7 Hz, H-20α), 3.76 (1H, d, *J* = 13.6 Hz, H-20β), 5.95 (1H, brs, H-22), 4.06 (1H, dd, *J* = 14.0, 6.2 Hz, H-23α), 4.16 (1H, dd, *J* = 13.8, 6.8 Hz, H-23β); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 122.3 (C-1), 124.4 (C-2), 128.8 (C-3), 116.4 (C-4), 143.2 (C-5), 135.4 (C-6), 51.6 (C-7), 60.4 (C-8), 170.5 (C-10), 42.5 (C-11), 77.7 (C-12), 48.2 (C-13), 31.6 (C-14), 26.7 (C-15), 60.0 (C-16), 42.7 (C-17), 50.4 (C-18), 52.7 (C-20), 141.5 (C-21), 127.5 (C-22), 64.6 (C-23)。其波谱数据与文献报道一致^[9-10], 故鉴定化合物 1 为土的宁。

化合物 2: 白色晶体 (二氯甲烷-甲醇), mp 267~270 °C, C₂₃H₂₆N₂O₄。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.81 (1H, s, H-1), 3.90 (3H, s, 2-OCH₃), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃), 6.66 (1H, s, H-4), 3.82 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H-8), 3.10 (1H, dd, *J* = 17.4, 8.6 Hz, H-11α), 2.62 (1H, dd, *J* = 17.4, 3.4 Hz, H-11β), 4.28 (1H, dt, *J* = 8.6, 3.4 Hz, H-12), 1.26 (1H, dt, *J* = 10.4, 3.2 Hz, H-13), 3.13 (1H, brs, H-14), 1.45 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H-15α), 2.35 (1H, dt, *J* = 14.4, 4.3 Hz, H-15β), 3.84 (1H, brs, H-16), 1.86 (1H, qd, *J* = 12.5, 7.3, 6.1 Hz,

H-17 α), 1.85 (1H, dd, J = 6.1, 1.5 Hz, H-17 β), 2.83 (1H, ddd, J = 11.7, 10.1, 6.9 Hz, H-18 α), 3.16 (1H, dd, J = 9.2, 7.0 Hz, H-18 β), 2.70 (1H, d, J = 14.6 Hz, H-20 α), 3.68 (1H, d, J = 15.0 Hz, H-20 β), 5.88 (1H, brt, H-22), 4.06 (2H, qd, J = 11.2, 7.0, 5.8 Hz, 23-CH₂); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 107.2 (C-1), 146.0 (C-2), 56.2 (2-OCH₃), 148.6 (C-3), 55.9 (3-OCH₃), 100.7 (C-4), 135.7 (C-5), 124.5 (C-6), 51.5 (C-7), 60.1 (C-8), 168.6 (C-10), 41.8 (C-11), 77.0 (C-12), 47.7 (C-13), 31.0 (C-14), 26.5 (C-15), 59.3 (C-16), 42.1 (C-17), 49.9 (C-18), 52.3 (C-20), 140.9 (C-21), 126.5 (C-22), 63.8 (C-23)。其波谱数据与文献报道一致^[10-11], 故鉴定化合物 **2** 为马钱子碱。

化合物 **3**: 白色针晶 (二氯甲烷-甲醇), C₂₁H₂₂N₂O₃。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.88 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1), 7.07 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-2), 7.24 (1H, t, J = 8.2 Hz, H-3), 8.12 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-4), 3.83 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-8), 3.12 (1H, dd, J = 17.4, 8.6 Hz, H-11 α), 2.64 (1H, dd, J = 17.4, 3.6 Hz, H-11 β), 4.27 (1H, dt, J = 8.6, 3.4 Hz, H-12), 1.38 (1H, dt, J = 10.4, 3.4 Hz, H-13), 3.28 (1H, brs, H-14), 1.81 (1H, d, J = 14.4 Hz, H-15 α), 2.24 (1H, dt, J = 14.0, 4.9 Hz, 15 β), 2.30 (1H, td, J = 12.6, 7.4 Hz, H-17 α), 1.84 (1H, dd, J = 12.5, 6.1 Hz, H-17 β), 2.85 (1H, m, H-18 α), 3.20 (1H, dd, J = 9.4, 7.6 Hz, H-18 β), 2.84 (1H, d, J = 14.6 Hz, H-20 α), 3.85 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-20 β), 5.93 (1H, brt, H-22), 4.10 (2H, qd, J = 13.7, 6.8, 6.2 Hz, 23-CH₂); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 127.1 (C-1), 124.2 (C-2), 128.4 (C-3), 115.8 (C-4), 142.3 (C-5), 131.9 (C-6), 56.7 (C-7), 60.0 (C-8), 169.0 (C-10), 42.4 (C-11), 77.6 (C-12), 47.2 (C-13), 33.4 (C-14), 35.2 (C-15), 91.7 (C-16), 39.6 (C-17), 47.2 (C-18), 52.4 (C-20), 138.9 (C-21), 126.9 (C-22), 64.8 (C-23)。其波谱数据与文献报道一致^[10,12-13], 故鉴定化合物 **3** 为伪土的宁。

化合物 **4**: 白色针晶 (二氯甲烷-甲醇), C₂₂H₂₄N₂O₃。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.79 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-1), 7.04 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-2), 7.22 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-3), 8.11 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4), 3.81 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-8), 3.11 (1H, dd, J = 17.4, 8.5 Hz, H-11 α), 2.64 (1H, dd, J = 17.1, 3.6 Hz, H-11 β), 4.28 (1H, dt, J = 8.2, 3.6 Hz, H-12), 1.38 (1H, dt, J = 10.4, 3.7 Hz, H-13), 3.29 (1H, brs, H-14), 1.46 (1H, d,

J = 13.1 Hz, H-15 α), 2.49 (1H, dt, J = 13.7, 4.8 Hz, H-15 β), 3.33 (3H, s, 16-OCH₃), 2.21 (1H, td, J = 11.9, 7.4 Hz, H-17 α), 1.76 (1H, dd, J = 12.5, 6.4 Hz, H-17 β), 2.86 (1H, m, H-18 α), 3.20 (1H, dd, J = 9.2, 7.6 Hz, H-18 β), 2.95 (1H, d, J = 15.0 Hz, H-20 α), 3.74 (1H, d, J = 15.0 Hz, H-20 β), 5.89 (1H, brt, H-22), 4.10 (2H, qd, J = 13.6, 6.7, 6.1 Hz, 23-CH₂); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 128.0 (C-1), 124.0 (C-2), 128.2 (C-3), 115.7 (C-4), 142.3 (C-5), 132.0 (C-6), 57.3 (C-7), 60.2 (C-8), 169.0 (C-10), 42.4 (C-11), 77.5 (C-12), 48.2 (C-13), 33.2 (C-14), 35.2 (C-15), 95.0 (C-16), 47.2 (16-OCH₃), 40.0 (C-17), 48.2 (C-18), 53.7 (C-20), 139.2 (C-21), 126.1 (C-22), 64.8 (C-23)。其波谱数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **4** 为 16-甲氧基土的宁。

化合物 **5**: 白色结晶 (二氯甲烷-甲醇), mp 260~261 °C, C₂₂H₂₄N₂O₄。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.35 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1), 6.82 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-2), 7.06 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-3), 11.64 (1H, s, 4-OH), 4.38 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-8), 3.25 (1H, dd, J = 18.0, 8.6 Hz, H-11 α), 2.76 (1H, dd, J = 18.3, 2.8 Hz, H-11 β), 4.31 (1H, dt, J = 8.6, 3.0 Hz, H-12), 1.75 (1H, dt, J = 11.2, 2.6 Hz, H-13), 3.52 (1H, brs, H-14), 2.55 (1H, dd, J = 17.7, 5.2 Hz, H-15 α), 2.67 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-15 β), 2.96 (1H, td, J = 14.0, 3.6 Hz, H-17 α), 2.19 (1H, dd, J = 14.0, 4.9 Hz, H-17 β), 2.71 (1H, m, H-18 α), 1.64 (2H, dd, J = 13.7, 3.6 Hz, H-18 β), 3.14 (1H, d, J = 13.2 Hz, H-20 α), 3.23 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-20 β), 6.02 (1H, brt, H-22), 4.07 (1H, dd, J = 14.6, 5.5 Hz, H-23 α), 4.26 (1H, dd, J = 14.3, 7.0 Hz, H-23 β); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 117.4 (C-1), 117.9 (C-2), 130.4 (C-3), 145.5 (C-4), 136.4 (C-5), 126.5 (C-6), 54.9 (C-7), 60.0 (C-8), 168.6 (C-10), 40.7 (C-11), 77.1 (C-12), 47.1 (C-13), 35.4 (C-14), 43.0 (C-15), 193.3 (C-16), 45.6 (C-17), 48.1 (C-18), 39.4 (19-NCH₃), 62.5 (C-20), 141.5 (C-21), 130.4 (C-22), 65.3 (C-23)。其波谱数据与文献报道一致^[10,14], 故鉴定化合物 **5** 为番木鳖次碱。

化合物 **6**: 白色晶体 (二氯甲烷-甲醇), C₂₁H₂₂N₂O₃。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.50 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1), 7.14 (3H, t, J = 7.3 Hz, H-2), 7.29 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-3), 7.94 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4), 4.03 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-8), 2.95 (1H, dd, J = 17.4, 8.6 Hz, H-11 α), 2.62 (1H, dd, J = 17.4, 2.6

Hz, H-11 β), 4.33 (1H, m, H-12), 1.40 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-13), 3.23 (1H, brs, H-14), 1.52 (1H, d, J = 15.0 Hz, H-15 α), 2.66 (1H, dt, J = 15.2, 4.0 Hz, 15 β), 4.33 (1H, brt, H-16), 2.39 (1H, td, J = 13.1, 7.6 Hz, H-17 α), 2.05 (1H, dd, J = 12.5, 5.5 Hz, H-17 β), 3.54 (1H, dd, J = 12.2, 7.3 Hz, H-18 α), 3.84 (1H, td, J = 13.2, 5.8 Hz, H-18 β), 4.04 (1H, d, J = 13.4 Hz, H-20 α), 3.93 (1H, d, J = 13.4 Hz, H-20 β), 6.29 (1H, brt, H-22), 4.13 (2H, qd, J = 14.2, 6.7, 5.4 Hz, 23-CH₂); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 123.0 (C-1), 124.3 (C-2), 129.2 (C-3), 125.4 (C-4), 135.8 (C-5), 130.7 (C-6), 52.7 (C-7), 58.2 (C-8), 169.1 (C-10), 41.6 (C-11), 76.3 (C-12), 46.9 (C-13), 29.6 (C-14), 24.5 (C-15), 82.3 (C-16), 38.8 (C-17), 67.7 (C-18), 71.4 (C-20), 141.8 (C-21), 133.2 (C-22), 63.6 (C-23)。其波谱数据与文献报道一致^[10,14], 故鉴定化合物 **6** 为士的宁氮氧化物。

化合物 **7**: 灰白色晶体 (二氯甲烷-甲醇), C₂₃H₂₆N₂O₅。 ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.06 (1H, s, H-1), 3.79 (3H, s, 2-OCH₃), 3.73 (3H, s, 3-OCH₃), 7.63 (1H, s, H-4), 3.96 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-8), 2.92 (1H, dd, J = 17.0, 8.4 Hz, H-11 α), 2.57 (1H, dd, J = 14.9, 4.0 Hz, H-11 β), 4.32 (1H, dt, J = 8.4, 3.4 Hz, H-12), 1.38 (1H, dt, J = 10.8, 2.9 Hz, H-13), 3.20 (1H, brs, H-14), 1.51 (1H, d, J = 14.9 Hz, H-15 α), 2.59 (1H, dt, J = 17.2, 3.2 Hz, 15 β), 4.18 (1H, brs, H-16), 2.36 (1H, td, J = 13.0, 7.4 Hz, H-17 α), 1.94 (1H, dd, J = 12.6, 5.6 Hz, H-17 β), 3.36 (1H, dd, J = 12.0, 7.2 Hz, H-18 α), 3.80 (2H, d, J = 12.6 Hz, H-18 β , 20 β), 3.91 (1H, d, J = 12.8 Hz, H-20 α), 6.24 (1H, brs, H-22), 4.12 (2H, qd, J = 14.0, 6.8, 5.6 Hz, 23-CH₂); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 106.7 (C-1), 146.2 (C-2), 56.1 (2-OCH₃), 149.3 (C-3), 55.9 (3-OCH₃), 100.7 (C-4), 135.3 (C-5), 121.6 (C-6), 52.8 (C-7), 58.4 (C-8), 168.5 (C-10), 41.4 (C-11), 76.5 (C-12), 47.0 (C-13), 29.7 (C-14), 24.5 (C-15), 82.4 (C-16), 38.4 (C-17), 67.9 (C-18), 71.2 (C-20), 136.3 (C-21), 132.5 (C-22), 63.5 (C-23)。其波谱数据与文献报道一致^[10,14-15], 故鉴定化合物 **7** 为马钱子碱氮氧化物。

化合物 **8**: 白色晶体 (甲醇), mp 390~397 °C, C₂₂H₂₄ClN₂O₂·Cl。 ESI-TOF MS m/z : 383 [M]⁺, 385 [M+2]⁺, [M]⁺ 与 [M+2]⁺ 的丰度比约为 3 : 1, 判断分子中含 1 个氯原子。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 210.8, 254; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 411, 2 962, 1 683, 1 476, 1 386。

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.74 (1H, d, J = 7.1, H-1), 7.18 (1H, t, J = 7.5, H-2), 7.34 (1H, t, J = 7.3, H-3), 7.94 (1H, d, J = 8.2, H-4), 4.19 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-8), 2.96 (1H, dd, J = 17.0, 8.4 Hz, H-11 α), 2.67 (1H, dd, J = 17.0, 3.1 Hz, H-11 β), 4.38 (1H, m, H-12), 1.52 (1H, dt, J = 11.0, 3.1 Hz, H-13), 3.35 (1H, brs, H-14), 1.72 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-15 α), 2.71 (1H, dt, J = 15.8, 4.2 Hz, 15 β), 4.62 (1H, brs, H-16), 2.33 (1H, td, J = 13.6, 7.3 Hz, H-17 α), 2.24 (1H, dd, J = 13.6, 6.0 Hz, H-17 β), 3.62 (1H, td, J = 13.2, 6.0 Hz, H-18 α), 3.98 (1H, dd, J = 13.2, 7.3 Hz, H-18 β), 5.86, 5.83 (各 1H, d, J = 9.3 Hz, 19-NCH₂Cl), 4.30 (1H, d, J = 13.0 Hz, H-20 α), 4.03 (1H, d, J = 13.0 Hz, H-20 β), 6.47 (1H, brs, H-22), 4.23 (1H, dd, J = 14.6, 6.6 Hz, H-23 α), 4.17 (1H, dd, J = 14.6, 5.6 Hz, H-23 β); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 123.7 (C-1), 124.1 (C-2), 129.7 (C-3), 115.4 (C-4), 141.7 (C-5), 129.2 (C-6), 52.4 (C-7), 58.4 (C-8), 169.0 (C-10), 41.0 (C-11), 75.7 (C-12), 46.1 (C-13), 29.1 (C-14), 25.0 (C-15), 73.1 (C-16), 38.9 (C-17), 58.4 (C-18), 69.5 (19-NCH₂Cl), 60.7 (C-20), 131.9 (C-21), 136.7 (C-22), 63.3 (C-23)。其波谱数据与文献报道的一致^[16], 故鉴定化合物 **8** 为士的宁氯甲氯化物。

化合物 **9**: 白色晶体 (甲醇), mp 350~356 °C, C₂₄H₂₈ClN₂O₄·Cl。 ESI-TOF MS m/z : 443 [M]⁺, 445 [M+2]⁺, [M]⁺ 与 [M+2]⁺ 的丰度比约为 3 : 1, 判断分子中含 1 个氯原子。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 215.4, 264.2, 301.2; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 505, 2 928, 1649, 1 503, 1 451。 ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.46 (1H, s, H-1), 3.80 (3H, s, 2-OCH₃), 3.74 (3H, s, 3-OCH₃), 7.64 (1H, s, H-4), 4.13 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-8), 2.92 (1H, dd, J = 17.1, 8.2 Hz, H-11 α), 2.64 (1H, dd, J = 17.1, 3.8 Hz, H-11 β), 4.38 (1H, m, H-12), 1.48 (1H, dt, J = 10.8, 3.0 Hz, H-13), 3.34 (1H, brs, H-14), 1.72 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-15 α), 2.70 (1H, dt, J = 15.6, 3.5 Hz, H-15 β), 4.59 (1H, brs, H-16), 2.36 (1H, td, J = 13.6, 7.5 Hz, H-17 α), 2.16 (1H, dd, J = 13.3, 5.7 Hz, H-17 β), 3.96 (1H, dd, J = 13.3, 7.6 Hz, H-18 α), 3.58 (2H, dd, J = 13.3, 5.8 Hz, H-18 β), 5.87 (1H, s, 19-NCH₂Cl), 4.37 (1H, d, J = 13.0 Hz, H-20 α), 4.00 (1H, d, J = 13.0 Hz, H-20 β), 6.46 (1H, brs, H-22), 4.23 (1H, dd, J = 14.5, 6.4 Hz, H-23 α), 4.15 (1H, dd, J = 14.5, 5.3 Hz, H-23 β); ¹³C-NMR (125

MHz, DMSO- d_6) δ : 108.1 (C-1), 146.1 (C-2), 56.6 (2-OCH₃), 149.8 (C-3), 55.8 (3-OCH₃), 100.5 (C-4), 135.6 (C-5), 119.8 (C-6), 52.5 (C-7), 58.6 (C-8), 168.5 (C-10), 40.9 (C-11), 75.9 (C-12), 46.2 (C-13), 29.0 (C-14), 24.9 (C-15), 73.0 (C-16), 38.3 (C-17), 58.1 (C-18), 63.3 (19-NCH₂Cl), 60.5 (C-20), 131.9 (C-21), 136.6 (C-22), 63.3 (C-23)。其波谱数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **9** 为马钱子碱氯甲氯化物。

化合物 **10**: 淡黄色晶体 (乙醚), mp 128~131 °C, C₉H₁₁NO, 放置过程中结晶逐渐变为紫色。ESI-TOF MS m/z : 150 [M+H]⁺。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 8.43 (1H, s, H-1), 8.42 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-3), 7.22 (1H, d, J = 4.9 Hz, H-4), 3.14 (1H, dd, J = 16.8, 4.9 Hz, H-5 α), 2.95 (1H, dd, J = 17.0, 2.2 Hz, H-5 β), 4.59 (1H, td, J = 5.3, 2.6 Hz, H-6), 3.27 (1H, m, H-7), 1.4 (3H, d, J = 7.1 Hz, H-10); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 145.2 (C-1), 147.6 (C-3), 120.5 (C-4), 41.1 (C-5), 75.4 (C-6), 42.7 (C-7), 150.6 (C-8), 141.6 (C-9), 11.9 (C-10)。根据以上信息, 可以确定化合物 **10** 的结构为喜树次碱, 其波谱数据与文献报道的一致^[17-18]。

4 发酵前后马钱子生物碱的 HPLC 分析

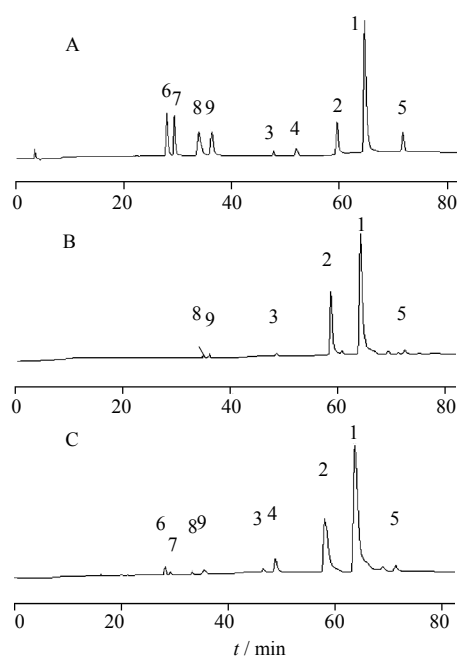
建立 RP-HPLC 梯度洗脱法, 对上述获得的 9 种马钱子生物碱进行分离, 并对发酵前后马钱子中的生物碱氯仿提取物进行定性分析。

色谱条件: Phecda™ C₁₈ 色谱柱 (300 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 20 mmol/L 甲酸和 22 mmol/L 三乙胺的乙腈溶液 (A)-20 mmol/L 甲酸和 22 mmol/L 三乙胺的水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 5%→15% A, 10~40 min, 15%→26% A, 40~80 min, 26%→50% A, 80~90 min, 50%→5% A; 体积流量: 1 mL/min; 检测波长为 260 nm; 柱温: 30 °C。

在此条件下, 9 种马钱子生物碱类成分得到良好分离, 且发现化合物 **4**、**6** 和 **7** 可能为发酵品新增的化合物。样品分离色谱图见图 1。

5 讨论

朱红栓菌是一种多孔菌科的高等真菌, 具有清热、解毒、消炎之功效。其主要有效成分集中在多糖部分, 并未见有上述生物碱成分存在的报道^[19]。在前期研究中, 对马钱子经朱红栓菌发酵前后毒性及镇痛、抗炎作用进行了观察, 结果表明: 与模型空白相比, 马钱子生品和发酵品均有较好的镇痛和抗炎作用 ($P < 0.05$, 0.01), 但二者的镇痛和抗炎



A-混合生物碱对照品 B-生马钱子 C-马钱子发酵品
1~9 分别代表上述化合物 1~9

A-reference substances of mixed alkaloids B-crude *Strychni Semen*
C-fermentation products of *Strychni Semen* 1—9-compounds 1—9

图 1 发酵前后马钱子生物碱的 HPLC 色谱分离

Fig. 1 HPLC separation of alkaloids from *Strychni Semen* before and after fermentation

作用之间并未见显著性差异, 提示马钱子经发酵后保持了其原有的镇痛和抗炎作用; 而与马钱子生品相比, 发酵品的 LD₅₀ 上升率为 29.7%, 可见马钱子经发酵后毒性明显降低。

本实验共得到 10 种生物碱, 均属于单萜吲哚类化合物, 结构和生源上由色胺与裂环土的宁的重排衍生物缩合而成。其中化合物 **1**~**9** 属于同一类的柯南因-土的宁类生物碱, 可在同一 HPLC 条件下分析; 而化合物 **10** 与上述 9 种生物碱结构不完全一样, 最大紫外吸收和色谱行为也不同, 故在上述 HPLC 图中未能出峰。化合物 **8** 和 **9** 为两个马钱子季铵生物碱, 即土的宁氯甲氯化物和马钱子碱氯甲氯化物。二者均不是新化合物, 而是在马钱子生物碱用氯仿提取的过程中, 由其中土的宁和马钱子碱分别与溶剂中的杂质二氯甲烷反应生成的人工加合物^[16]。

国内报道从珙桐科乔木喜树 *Camptotheca acuminata* Decne 中发现过喜树次碱^[20], 它与抗癌成分喜树碱 (camptothecin) 同时存在且化学结构相似; 但未见从马钱子中分得此化合物。有人在 1970~1971 年通过比较喜树碱与喜果昔 (vincoside-lactam)

结构的相似性,提出二者有生源关系并为随后的示踪实验所证实^[21]。由此断定,本实验分得的喜树次碱化学结构看似属于单萜吡啶类生物碱,但生源关系上却可能是由马钱子中吲哚生物碱经发酵衍生而来。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第61卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [3] 庄毅, 潘扬, 谢小梅, 等. 药用真菌“双向发酵”起源发展、优势与潜力 [J]. 中国食用菌, 2006, 26(2): 3-6.
- [4] 涂霞, 潘扬. 双向发酵——毒性中药炮制减毒的新途径 [J]. 菌物研究, 2010, 8(1): 52-56.
- [5] 孙静, 马琳, 吕斯瑜, 等. 中药发酵技术研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 49-52.
- [6] 陈龙, 曹亮, 蒋亚平, 等. 六种真菌发酵对马钱子“降毒保效”作用的初步研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 476-480.
- [7] 刘锡葵, 李薇. 马钱子果化学成分研究 [J]. 中草药, 1998, 29(7): 435-438.
- [8] 黄年来, 林志彬, 陈国良, 等. 中国食药菌学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2010.
- [9] 潘扬, 商晶, 刘亮镜, 等. 两种不同极性溶剂对土的宁¹H-NMR谱学的影响 [J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(1): 30-32.
- [10] 蔡宝昌, 吴皓, 杨秀伟, 等. 马钱子中16个生物碱类化合物¹³C谱的数据分析 [J]. 药学学报, 1994, 29(1): 44-48.
- [11] Bisset N G, Phillipson J D. The African species of *Strychnos* II. The alkaloids [J]. *Lloydia*, 1971, 34(1): 1-60.
- [12] Bisset N G, Das B C, Parello J. Alkaloids from the leaves of *Strychnos icajia* Baill [J]. *Tetrahedron*, 1973, 29: 4137-4148.
- [13] Philippe G, De Mol P, Zeches-Hanrot M, et al. Indolomonoterpenic alkaloids from *Strychnos icajia* roots [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(4): 623-629.
- [14] Cai B C, Hattori M, Namba T. Processing of *nux vomica*. II. Composition of the seeds of *Strychnos nux-vomica* in alkaloids on traditional drug processing [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(5): 1295-1298.
- [15] 陈东军, 刘亮镜, 刘学湘, 等. 马钱子发酵物中马钱子碱氮氧化物的 NMR 数据解析 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2009, 25(2): 125-128.
- [16] Phillipson J D, Bisset N G. Quaternisation and oxidation of strychnine and brucine during plant extraction [J]. *Phytochemistry*, 1972, 11: 2547-2553.
- [17] Ray A B, Chatterjee A. Venoterpine, a new monoterpenoid alkaloid from the fruits of *Alstonia venenata* R. Br. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1968, 23: 2763-2766.
- [18] 杨尚军, 吴知行, 任海红. 川续断中生物碱的研究 [J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(5): 281-282.
- [19] 徐锦堂. 中国药用真菌学 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和药科大学联合出版社, 1997.
- [20] 林隆泽, 赵志远, 徐任生. 抗癌植物喜树化学成分的研究 I. 喜树根的化学成分 [J]. 化学学报, 1977, 35(3/4): 227-231.
- [21] Heckendorf A H, Hutchinson C R. Biosynthesis of camptothecin II. Confirmation that isovincoside, not vincoside, is the penultimate biosynthetic precursor of indole alkaloids [J]. *Tetrahedron Lett*, 1977, 18: 4153-4154.