

苦木中3个二聚 β -卡巴林生物碱及其生物活性研究

石国华^{1,2}, 焦伟华², 杨帆², 林厚文^{1,2*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 上海交通大学医学院附属仁济医院 癌基因与相关基因国家重点实验室海洋药物实验室, 上海 200127

摘要: 目的 研究苦木科植物苦木 *Picrasma quassioides* 茎的化学成分。方法 运用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、ODS 柱色谱以及反相 HPLC 等多种色谱分离手段进行分离纯化, 根据理化性质和现代波谱学方法鉴定化合物的结构。通过 MTT 法和 MIC 法分别评价化合物的细胞毒和抗菌活性。结果 从苦木茎 95%乙醇提取物中分离得到了3个 β -卡巴林生物碱成分, 分别鉴定为 picrasidine F (1)、picrasidine G (2) 和 picrasidine S (3)。化合物 1 对人宫颈癌 HeLa 细胞有显著的细胞毒活性, 且选择性较强; 化合物 2 和 3 对人宫颈癌 HeLa 细胞、胃癌 MKN-28 细胞和小鼠黑色素瘤 B-16 细胞具有显著的细胞毒活性。化合物 1~3 对 2 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 和 2 株甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA) 有显著的抑菌活性。结论 首次对化合物 1 的核磁数据进行了全归属。3 个化合物表现出显著的细胞毒活性和抗菌活性。

关键词: 苦木; 生物碱; β -卡巴林; picrasidine F; picrasidine G; picrasidine S; 细胞毒活性; 抗菌活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)06-0803-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.06.004

Three bis- β -carboline alkaloids from *Picrasma quassioides* and their bioactivities

SHI Guo-hua^{1,2}, JIAO Wei-hua², YANG Fan², LIN Hou-wen^{1,2}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Key Laboratory of Marine Drugs, State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the stems of *Picrasma quassioides*. **Methods** The constituents were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, ODS column chromatographies, and preparative HPLC. Their structures were determined on the basis of their physicochemical properties and spectral data. The cytotoxic and antibacterial activities were assessed by MTT and MIC, respectively. **Results** Three β -carboline alkaloids were obtained from the 95% ethanol extract of the stems of *P. quassioides* and identified as picrasidine F (1), picrasidine G (2), and picrasidine S (3). Compound 1 showed selective cytotoxicity to HeLa cell, while compounds 2 and 3 showed the potent cytotoxicity against human HeLa cervical, gastric MKN-28, and mouse melanoma B-16 cancer cells. Compounds 1—3 showed the potent antibacterial activity against two strains of pathogenic bacteria methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and two strains of pathogenic bacteria methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). **Conclusion** The assignments of NMR data of compound 1 are reported in this paper for the first time. Compounds 1—3 show the potent cytotoxic and antibacterial activities.

Key words: *Picrasma quassioides* Bennet; alkaloids; β -carboline; picrasidine F; picrasidine G; picrasidine S; cytotoxicity; antibacterial activity

苦木 *Picrasma quassioides* Bennet 是苦木科 (Simaroubaceae) 苦树属 *Picrasma* Bl. 落叶乔木, 又称苦树, 生长在湿润而肥沃的山坡、山谷和溪边等地, 在我国主要分布在黄河以南各省区, 在印度

东北部、尼泊尔、不丹、朝鲜和日本也有分布^[1]。国内外学者对苦树属植物的化学成分进行了深入的研究, 发现该属植物中主要以生物碱、苦味素及其苷类成分为主, 同时还包含少量的三萜、酚酸以及

收稿日期: 2014-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41476121, 41106127, 81302691, 81172978)

作者简介: 石国华 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。

*通信作者 林厚文 (1967—), 男, 教授。Tel: (021)68383346 E-mail: franklin67@126.com

黄酮类等成分,这些化学成分显示了抗病原微生物、抗肿瘤和降血压的作用^[2]。国内外专家学者也在苦木中发现了一些 β -卡巴林生物碱成分^[3-11]。本课题组从苦木茎 95%乙醇提取物中分离得到了 3 个 β -卡巴林生物碱成分,经波谱学方法以及文献比对分别鉴定为 picrasidine F (**1**)、picrasidine G (**2**) 和 picrasidine S (**3**)。尽管 Koike 在 1986 年已经发表了有关化合物 **1** 的研究^[12],但化合物 **1** 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 仍然未做准确归属。本研究通过对化合物 **1** 核磁数据的分析,首次对该化合物的 ¹HNMR、¹³C-NMR 和 2D NMR 数据进行了全面准确的归属;并对这 3 个化合物进行了抗肿瘤和抗菌活性评价。

1 仪器与材料

Bruker AVANCE 400 超导核磁波谱仪; Finnigan LCQDECA 和 Agilent 6210 LC/MSD TOF 质谱仪; Jasco P-1020 旋光仪; Jasco V-550 紫外光谱仪; Jasco FTIR480 红外光谱仪 (KBr 压片); 东京理化 MPLC 色谱仪; 分析型高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司); PDA-100 二极管阵列检测器; Welch XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 分析型色谱柱和 Welch XB-C₁₈ (250 mm×21.2 mm, 5 μ m) 制备型色谱柱; 薄层色谱用硅胶 G、硅胶 H、柱色谱硅胶 (100~140 目、200~300 目) (青岛海洋化工有限公司); RP-18 高效薄层预制板 (Merck 公司); RP-18 柱色谱材料 (Merck 公司); Sephadex LH-20 (Mitsubishi Kasei 公司); 色谱纯甲醇为山东禹王实业有限公司化工产品,其余色谱用化学试剂均为分析纯,为天津康科德科技有限公司和广州化学试剂厂产品。

苦木药材采自广西壮族自治区,由暨南大学周光雄教授鉴定为苦木科苦树属植物苦木 *Picrasma quassioides* Bennet。标本 (编号 PQ05) 保存于上海交通大学医学院附属仁济医院癌基因与相关基因国家重点实验室海洋药物实验室。

2 提取与分离

苦木茎干质量 5 kg,用 95%乙醇 10 L 加热回流提取 5 次,每次 2 h,提取液减压回收溶剂后得浸膏 18 g,分散在水中,依次用相同体积的氯仿和正丁醇分别萃取 3 次,回收溶剂后得到氯仿萃取物 12 g、正丁醇萃取物 4.5 g。具有抗肿瘤活性的氯仿萃取物经硅胶柱色谱,环己烷-醋酸乙酯 (100:0→0:100) 梯度洗脱,得到 8 个流分 Fr. 1~8。用氯仿-甲醇 (10:1) 展开剂对这 8 个流分进行 TLC 分析,碘化铍钾显色可发现流分 Fr. 7 包含更多的生物碱类化

合物;流分 Fr. 7 (1.2 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱,二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱,得到 5 个流分 Fr. 7A~E。流分 Fr. 7B (242 mg) 经反相中压柱色谱,甲醇-水 (10:90→100:0) 梯度洗脱,得到 4 个流分 Fr. 7B-1~4。流分 Fr. 7B-3 (74 mg) 经半制备型高效液相色谱分离纯化,乙腈-水-三氟乙酸 (45:55:0.05) 洗脱,体积流量 2 mL/min,得到化合物 **1** (3.1 mg, t_R =17.90 min)、**2** (3.5 mg, t_R =14.19 min)、**3** (5.2 mg, t_R =20.81 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色固体。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 和 ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) 数据见表 1。化合物 **1** 的 ¹H-NMR 数据与文献报道基本一致^[12],同时,本实验对化合物 **1** 的 ¹³C-NMR 和 2D NMR 数据进行了补充。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 谱 (表 1) 低场区给出 2 个活泼氢信号 δ_H 13.08 (1H, brs) 和 12.13 (1H, brs), 9 个烯氢信号 δ_H 8.31 (1H, d, J =7.8 Hz), 8.25 (1H, s), 7.84 (1H, d, J =7.8 Hz), 7.79 (1H, d, J =7.8 Hz), 7.78 (1H, s), 7.77 (1H, td, J =7.8, 1.2 Hz), 7.45 (1H, td, J =7.8, 1.2 Hz), 7.23 (1H, t, J =7.8 Hz) 和 7.18 (1H, dd, J =7.8, 1.2 Hz), 1 个连氮次甲基氢信号 δ_H 6.96 (1H, m), 3 个甲氧基氢信号 δ_H 4.07 (3H, s), 4.00 (3H, s) 和 3.98 (3H, s); 高场区给出 6 个亚甲基氢信号 δ_H 3.69 (1H, dd, J =19.2, 6.0 Hz), 3.55 (1H, m), 2.64 (1H, m), 2.56 (1H, m), 1.98 (1H, m) 和 1.76 (1H, m)。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中给出 29 个碳信号,高场区给出 3 个亚甲基信号 δ_C 13.1, 24.3 和 27.1, 3 个甲氧基信号 δ_C 55.6, 56.0 和 57.6, 1 个连氮次甲基信号 δ_C 64.8; 低场区给出 22 个烯碳信号 δ_C 107.9, 112.9, 115.4, 117.6, 117.8, 118.8, 119.7, 119.9, 120.7, 121.1, 121.9, 124.3, 130.1, 130.4, 132.6, 134.1, 135.5, 138.0, 142.3, 146.0, 150.8 和 151.1。根据以上数据,可知化合物 **1** 与 picrasidine G (**2**) 具有相同的骨架,唯一的区别在于化合物 **1** 比 **2** 多 1 个甲氧基。通过 HMQC 相关可将氢与相应的碳连接起来。化合物 **1** 的 COSY 相关和关键的 HMBC 相关已在图 1 中标出。HMBC 中,由 6-OCH₃ 与 C-6 的相关,6'-OCH₃ 与 C-6' 的相关,12'-OCH₃ 与 C-12' 的相关,可确定 3 个甲氧基的连接位置,从而确定化合物 **1** 多出的那个甲氧基连接在 C-12' 上,进而确定了化合物 **1** 为 picrasidine F。其他的 HMBC 相关也验证了化合物 **1** 的结构。

化合物 **2**: 淡黄色固体。¹H-NMR (600 MHz,

表 1 化合物 1~3 的 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 数据
Table 1 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz) NMR data of compounds 1—3 in $\text{DMSO-}d_6$

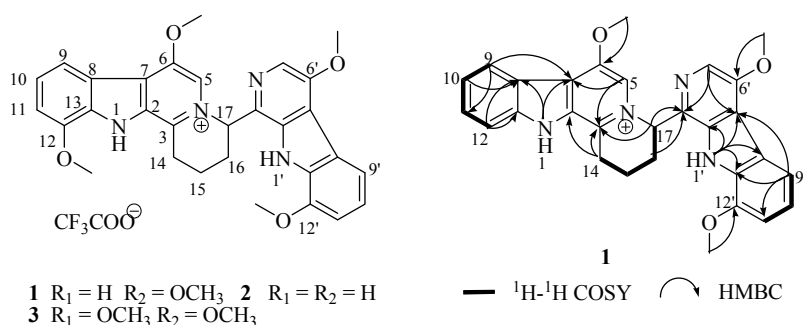
碳位	1			2		3	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC (H→C)	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	13.08, brs		7, 8	12.21, brs		12.15, brs	
2		134.1			137.9		132.8
3		138.0			139.9		139.1
5	8.25, s	117.6	3, 7	8.35, s	117.8	8.18, s	120.0
6		150.8			150.7		151.2
7		119.7			119.8		120.2
8		118.8			118.8		121.2
9	8.31, d ($J=7.8$ Hz)	124.3	7, 8, 11, 13	8.33, d ($J=7.8$ Hz)	124.3	7.84, d ($J=7.8$ Hz)	116.0
10	7.45, td ($J=7.8, 1.2$ Hz)	121.9	8, 12	7.46, td ($J=7.8, 1.2$ Hz)	121.9	7.20, t ($J=7.8$ Hz)	122.8
11	7.77, td ($J=7.8, 1.2$ Hz)	130.1	9, 13	7.79, td ($J=7.8, 1.2$ Hz)	130.4	7.29, d ($J=7.8$ Hz)	110.0
12	7.84, d ($J=7.8$ Hz)	112.9	8, 10	7.86, d ($J=7.8$ Hz)	112.9		146.5
13		142.3			142.3		134.1
14a	3.69, dd ($J=19.2, 6.0$ Hz)	24.3	2, 3, 15, 16	3.69, m	24.2	3.54, dd ($J=19.2, 5.4$ Hz)	24.6
14b	3.55, m		3, 15, 16	3.56, m		3.82, dd ($J=19.2, 5.4$ Hz)	
15a	1.98, m	13.1	3, 14, 17	1.99, m	13.1	2.63, m	13.2
15b	1.76, m			1.70, m		2.52, m	
16a	2.64, m	27.1	14, 15, 3'	2.63, m	26.5	3.82, m	27.1
16b	2.56, m		15	2.69, m		3.15, m	
17	6.96, m	64.8	3, 5, 15, 16, 3'	6.87, m	65.0	6.98, brs	65.0
1'	12.13, brs		2', 7', 8', 13'				
2'		132.6			134.9		130.3
3'		135.5			134.1		135.7
5'	7.78, s	119.9	3', 6', 7'	7.81, s	120.0	7.77, s	117.5
6'		151.1			151.1		150.9
7'		117.8			119.7		120.3
8'		121.1			117.4		118.2
9'	7.79, d ($J=7.8$ Hz)	115.4	11', 13'	8.22, d ($J=7.8$ Hz)	123.3	7.77, d ($J=7.8$ Hz)	115.5
10'	7.23, t ($J=7.8$ Hz)	120.7	8', 12'	7.30, td ($J=7.8, 1.2$ Hz)	119.9	7.20, t ($J=7.8$ Hz)	120.8
11'	7.18, dd ($J=7.8, 1.2$ Hz)	107.9	9', 12', 13'	7.60, td ($J=7.8, 1.2$ Hz)	127.6	7.15, d ($J=7.8$ Hz)	107.9
12'		146.0		7.72, d ($J=7.8$ Hz)	111.7		146.2
13'		130.4			132.6		133.2
6-OCH ₃	3.98, s	57.6	6	4.00, s	57.6	3.95, s	57.6
12-OCH ₃						3.99, s	55.9
6'-OCH ₃	4.00, s	56.0	6'	4.03, s	56.1	4.04, s	56.0
12'-OCH ₃	4.07, s	55.6	12'			4.06, s	55.6

$\text{DMSO-}d_6$) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 数据见表 1。以上数据与文献报道基本一致^[8,12-14], 故鉴定化合物 **2** 为 picrasidine G。

化合物 **3**: 淡黄色固体。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 数据见表 1。以上数据与文献报道基本一致^[8,13], 故鉴定化合物 **3** 为 picrasidine S。

4 生物活性

采取 MTT 法^[15]对化合物 **1~3** 进行人宫颈癌 HeLa 细胞、胃癌 MKN-28 细胞和小鼠黑色素瘤 B-16 细胞的细胞毒活性测试。培养 48 h 后, 发现化合物 **1** 对人宫颈癌 HeLa 细胞有显著的细胞毒活性, IC_{50} 值为 16.65 $\mu\text{mol/L}$, 且选择性较强; 化合物 **2** 和 **3** 对人宫颈癌 HeLa 细胞、胃癌 MKN-28 细胞和小鼠黑色素

图1 化合物1~3的结构及化合物1的主要 1H - 1H COSY和HMBC相关Fig. 1 Structures of compounds 1—3 and key 1H - 1H COSY and HMBC correlations of compound 1

瘤 B-16 细胞具有显著的细胞毒活性, IC_{50} 值在 $4.95 \sim 19.0 \mu\text{mol/L}$; 其中, 化合物 2 对人宫颈癌 HeLa 细胞、化合物 3 对人宫颈癌 HeLa 细胞和胃癌 MKN-28 细胞的细胞毒活性强于阳性对照药 5-氟尿嘧啶; 活性结果见表 2。

根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 标准, 采用 MIC 法^[16]对化合物 1~3 进行抗菌活性测试, 菌株包括 2 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA

P0172 和 MARS H0117) 和 2 株甲氧西林敏感的葡萄球菌 (MSSA P0171 和 MSSA H0180); 药物质量浓度梯度为 $0 \sim 128 \mu\text{g/mL}$ 。37 °C 恒温培养 24 h 后显示, 化合物 1~3 对 2 株 MSSA 菌株的抑制作用较强, MIC_{90} 值在 $4 \sim 8 \mu\text{g/mL}$, 对两株 MRSA 菌株的抑制作用稍弱, MIC_{90} 值在 $8 \sim 16 \mu\text{g/mL}$; 3 个化合物对 4 株菌的抑制作用均比阳性对照药氯霉素稍弱; 活性结果见表 3。

表2 化合物1~3对人宫颈癌HeLa细胞、胃癌MKN-28细胞和小鼠黑色素瘤B-16细胞的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Cytotoxicity of compounds 1—3 to human HeLa cervical and gastric MKN-28, and mouse melanoma B-16 cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	HeLa	MKN-28	B-16
picrasidine F (1)	16.65 ± 1.06	145.50 ± 10.19	95.48 ± 6.49
picrasidine G (2)	7.11 ± 0.44	11.49 ± 0.73	19.00 ± 1.16
picrasidine S (3)	4.95 ± 0.31	8.49 ± 0.68	11.47 ± 0.79
5-氟尿嘧啶	13.45 ± 1.07	9.67 ± 0.82	7.64 ± 0.69

表3 化合物1~3对MRSA(P0172/H0117)和MSSA(P0171/H0180)的抗菌活性

Table 3 Antibacterial activity of compounds 1—3 to MRSA (P0172/H0117) and MSSA (P0171/H0180)

化合物	$MIC_{90}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$			
	MRSA P0172	MRSA H0117	MSSA P0171	MSSA H0180
甲氧西林	128	128	2	2
picrasidine F (1)	16	8	8	4
picrasidine G (2)	8	16	8	8
picrasidine S (3)	8	8	4	8
氯霉素	2	2	2	2

5 讨论

《中国药典》记载, 苦木茎入药, 味苦, 性寒, 有毒; 有清热燥湿、解毒、杀虫等功效。由于苦木的化学成分复杂, 其发挥治疗作用的有效成分及作用机制至今尚未阐明。本研究通过多种现代色谱分

离手段, 对苦木茎中的活性成分进行了分离纯化, 得到了 3 个 β -卡巴林生物碱成分: picrasidine F (1)、picrasidine G (2) 和 picrasidine S (3)。并首次对化合物 1 的 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 2D NMR 数据进行了全面准确的归属。本研究还对这 3 个生物碱进行了

细胞毒和抗菌活性测试,发现它们具有显著的细胞毒活性和抗菌活性,说明苦木中含有大量活性较好的化学成分,这为开发苦木更多的药用价值和深入探讨苦木活性成分的作用机制提供了良好的基础。

参考文献

- [1] 云南省植物研究所. 云南植物志 (第一卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [2] 焦伟华, 李晨阳, 高 昊, 等. 苦树属植物化学成分和生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1419-1424.
- [3] Yoshikawa M, Harada E, Aoki S, *et al.* Indonesian medicinal plants. VI. On the chemical constituents of the bark of *Picrasma javanica* BL. (Simaroubaceae) from flores island. Absolute stereostructures of picrajavanins A and B [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(12): 2101-2105.
- [4] Ohmoto T, Koike K. Studies on the alkaloids from *Picrasma quassioides* Bennet. V. Structures of picrasidines L, M, and P [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(9): 3847-3851.
- [5] Li H Y, Koike K, Ohmoto T. New alkaloids, picrasidines W, X and Y from *Picrasma quassioides* and X-ray crystallographic analysis of picrasidine Q [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(10): 1807-1811.
- [6] Ohmoto T, Koike K. Studies on the alkaloids from *Picrasma quassioides* Bennet. VI. Structures of picrasidines N, O, and Q [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11): 4901-4905.
- [7] Koike K, Ohmoto T. Studies on the alkaloids from *Picrasma quassioides* BENNET. VII. Structures of β -carboline dimer alkaloids, picrasidines-H and-R [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(5): 2090-2093.
- [8] Koike K, Ohmoto T. Studies on the alkaloids from *Picrasma quassioides* Bennet. IX. Structures of two β -carboline dimeric alkaloids, picrasidines-G and -S (Pharmacognosy, Chemical) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(8): 3305-3308.
- [9] Ohmoto T, Koike K, Higuchi T, *et al.* Studies on the alkaloids from *Picrasma quassioides* Bennet. IV. Structures of picrasidines I, J, and K [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(8): 3356-3360.
- [10] Ohmoto T, Koike K. Studies on the alkaloids from *Picrasma quassioides* Bennet. V. Structures of picrasidines L, M, and P [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(9): 3847-3851.
- [11] Koike K, Ohmoto T. Studies on the alkaloids from *Picrasma quassioides* Bennet. VII. Structures of β -carboline dimer alkaloids, picrasidines-H and -R [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(5): 2090-2093.
- [12] Koike K, Ohmoto T, Ogata K. Studies on the alkaloids of *Picrasma quassioides* Bennet. VIII. X-ray crystal structure analysis of picrasidine-F [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(8): 3228-3236.
- [13] 杨峻山, 于德泉, 梁晓天. 苦木双碱甲和苦木双碱乙的结构 [J]. 药学学报, 1988, 23(4): 267-272.
- [14] Liu J, Davidson R S, Howarth O W. Full assignments of proton and carbon signals of picrasidine-G by 1D and 2D NMR methods [J]. *Magn Reson Chem*, 1993, 31(12): 1091-1092.
- [15] Thornburg C C, Thimmaiah M, Shaala L A, *et al.* Cyclic depsipeptides, grassypeptolides D and E and Ibu-epidemethoxylyngbyastatin 3, from a Red Sea *Leptolyngbya cyanobacterium* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(8): 1677-1685.
- [16] Jiao W H, Li J, Liu Q, *et al.* Dysidinoid A, an unusual meroterpenoid with anti-MRSA activity from the south china sea sponge *Dysidea* sp. [J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 18025-18032.