

山橙中生物碱类化学成分的研究

李 瑞¹, 方忠莹¹, 杨梓依², 方 磊^{2*}, 周 洁^{1,2*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 济南大学生物科学与技术学院, 山东 济南 250022

摘 要: 目的 研究山橙 *Melodinus suaveolens* 茎乙醇提取物氯仿部位中的生物碱类成分。方法 采用酸溶碱沉法富集, 运用正相硅胶柱色谱、半制备高效液相色谱等多种色谱方法进行分离和纯化, 并利用一维和二维核磁共振波谱、高分辨质谱以及圆二色谱等技术鉴定化合物的结构。结果 从山橙乙醇提取物氯仿部位分离得到 12 个生物碱类成分, 分别鉴定为美乐苏胺 A (1)、柳叶水甘草碱 (2)、3-羰基柳叶水甘草碱 (3)、白坚木胺 (4)、 Δ^{14} -长春布宁 (5)、 Δ^{14} -vincamenine (6)、3-羰基-11-甲氧基柳叶水甘草碱 (7)、alstoyunine G (8)、pachysiphine (9)、洛柯宁碱 (10)、土波台文碱 (11)、venalstonine (12)。初步的抗肿瘤活性评价实验表明, 化合物 2、8~10 显示出不同程度的肿瘤细胞增殖抑制活性。结论 化合物 1 为 1 个新的单萜吲哚类生物碱, 化合物 4、11 和 12 首次从该植物中分离得到; 化合物 10 对人肺癌 A549、人肝癌 HepG2 和人前列腺癌 PC-3 肿瘤细胞具有显著的增殖抑制活性, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 分别为 7.11、0.84 和 3.78 $\mu\text{mol/L}$ 。

关键词: 夹竹桃科; 山橙属; 山橙; 生物碱; 美乐苏胺 A; 白坚木胺; 土波台文碱; venalstonine

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)05-1362-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.002

Chemical constituents of alkaloids from *Melodinus suaveolens*

LI Rui¹, FANG Zhong-ying¹, YANG Zi-yi², FANG Lei², ZHOU Jie^{1,2}

1. School of Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Biological Science and Technology University of Jinan, Jinan 250022, China

Abstract: **Objective** To study the alkaloids from the chloroform fraction of the ethanolic extract of the stems of Shancheng (*Melodinus suaveolens*). **Methods** The compounds were isolated and purified by acid extraction and alkaline precipitation method, silica gel column chromatography, semi-preparative high performance liquid chromatography, and other chromatographic methods. Their structures including absolute configurations were elucidated from a combination of NMR and HRESIMS data, as well as circular dichroism calculation. **Results** Twelve alkaloids were isolated and characterized from the ethanolic extract of the stems of *M. suaveolens*. Their structures were identified as melosuavine A (1), tabersonine (2), 3-oxotabersonine (3), quebrachamine (4), Δ^{14} -vincamone (5), Δ^{14} -vincamenine (6), 3-oxo-11-methoxytabersonine (7), alstoyunine G (8), pachysiphine (9), lochnerinine (10), tubotaiwine (11) and venalstonine (12). Compounds 2, 8—10 showed significant cytotoxicities against all the tested tumor cell lines. **Conclusions** Compound 1 is a new alkaloid, and compounds 4, 11 and 12 are isolated from *M. suaveolens* for the first time. Compound 10 displayed significant antiproliferation activity against A549, HepG2, and PC-3 cells with IC_{50} values of 7.11, 0.84 and 3.78 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

Key words: Apocynaceae; *Melodinus* J. R. et G. Forst; *Melodinus suaveolens* Champ. ex Benth.; alkaloids; melosuavine A; quebrachamine; tubotaiwine; venalstonine

山橙 *Melodinus suaveolens* Champ. ex Benth. 为 Forst 木质藤本植物。山橙属植物全世界约有 53 种, 夹竹桃科 (Apocynaceae) 山橙属 *Melodinus* J. R. et G. 主要分布于亚洲热带、亚热带地区及大西洋地区。

收稿日期: 2022-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22077049); 济南市《关于促进高校和科研院所协同创新和成果产业化的若干政策 (试行)》项目 (2020GXRC060)

作者简介: 李 瑞, 女, 硕士研究生, 主要从事中药资源及质量控制研究。E-mail: lrrui0929@163.com

*通信作者: 方 磊, 教授, 主要从事中草药活性成分研究。E-mail: bio_fangl@ujn.edu.cn

周 洁, 教授, 主要从事中药资源研究。E-mail: bio_zhouj@ujn.edu.cn

我国有 11 种,主产于广西、云南、贵州以及台湾等地区^[1]。山橙属植物在我国民间应用历史悠久,常用于治疗小儿疝气、小腹痛、睾丸炎、小儿脑膜炎、骨折和风湿性心脏病等^[2]。山橙属植物中的化学成分丰富,包括生物碱、三萜、木脂素类等^[3-6]。其中,生物碱类成分是该属植物最重要的活性成分,其结构复杂多样,具有多样的生物活性,如抗炎、抗肿瘤等^[7-10]。目前,从山橙中分离得到 40 余个生物碱,结构类型包括单萜吲哚生物碱、单萜喹啉生物碱、双吲哚生物碱等,其中单萜吲哚生物碱多具有显著的抗肿瘤活性,具有较大的研究和开发价值^[11-14]。本研究采用酸溶碱沉法富集山橙茎的乙醇提取物氯仿部位中的生物碱类成分,进一步运用正相硅胶柱色谱、半制备高效液相色谱等多种色谱方法从中分离得到 12 个生物碱类成分,利用一维和二维核

磁共振波谱、高分辨质谱以及圆二色谱等技术分别鉴定为 melosuavine A (**1**)、柳叶水甘草碱 (tabersonine, **2**)、3-羰基柳叶水甘草碱 (3-oxotabersonine, **3**)、白坚木胺 (quebrachamine, **4**)、 Δ^{14} -长春布宁 (Δ^{14} -vincamone, **5**)、 Δ^{14} -vincamenine (**6**)、3-羰基-11-甲氧基柳叶水甘草碱 (3-oxo-11-methoxytabersonine, **7**)、alstoyunine G (**8**)、pachysiphine (**9**)、洛柯宁碱 (lochnerinine, **10**)、土波台文碱 (tubotaiwine, **11**)、venalstonine (**12**)。结构见图 1。其中,化合物 **1** 为新化合物,命名为美乐苏胺 A。化合物 **4**、**11** 和 **12** 首次从该植物中分离得到。采用 MTT 法评价了所得化合物的肿瘤细胞增殖抑制活性,化合物 **2**、**8**~**10** 显示出不同程度的肿瘤细胞增殖抑制活性,其中化合物 **10** 活性最强。

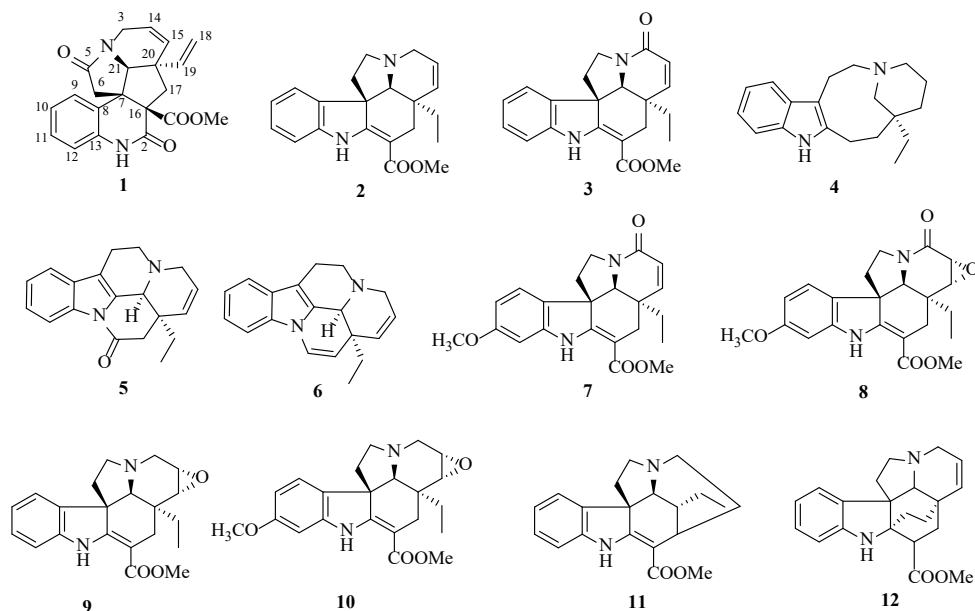


图 1 化合物 1~12 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—12

1 仪器与材料

Bruker Avance DRX600 型核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司), Agilent 6250 Accurate-Mass Q-TOF 高分辨质谱仪 (美国 Agilent 公司), Agilent 1260-6460 Triple Quad 液质联用仪 (美国 Agilent 公司), Chirascan 圆二色谱仪 (英国 Applied Photophysics 公司), Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), TBE-300C 高速逆流色谱仪 (上海同田生物技术有限公司), EYELA R-100 型旋转蒸发仪 (日本 EYELA 公司), YMC-Pack ODS-A 型半制备色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μ m,

日本 YMC 公司), 正相柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂), 多功能酶标仪 (美国赛默飞公司), BP221S 型电子分析天平 (北京赛多利斯天平有限公司), Milli-Q 纯水仪 (美国 Millipore 公司), 所用试剂为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司) 或色谱纯 (瑞典 Oceanpak 公司)。DMEM 培养基、1640 培养基、胎牛血清、胰酶溶液均购自美国 Gibco 公司, MTT 购自 Solabio 公司, 顺铂 (Pt 65%, 上海麦克林生化科技股份有限公司)。人肺癌 A549 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人前列腺癌 PC-3 细胞购于中国科学院上海细胞库。

山橙采自云南普洱, 经山东中医药大学李佳教授鉴定为夹竹桃科植物山橙 *M. Suaveolens* Champ. ex Benth. 的枝叶, 样品标本 (201512TM03) 保存于济南大学生物科学与技术学院标本室。

2 提取与分离

山橙药材 (16.8 kg) 粉碎后, 用 8 倍体积 95% 乙醇渗漉提取 3 次, 合并滤液, 减压浓缩得到乙醇浸膏。将乙醇浸膏加水分散, 用稀盐酸调节 pH 为 1~2, 用醋酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 减压浓缩得到非生物碱相。水相用氨水调节 pH 为 9~10, 用氯仿萃取 5 次, 合并氯仿相, 减压浓缩得到氯仿相即总生物碱相 (149 g)。然后将总生物碱相进行硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (200:1~5:1) 为流动相梯度洗脱, 经 TLC 分析后合并为 6 个部位 (Fr. 1~6)。

Fr. 3 利用高速逆流色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水为溶剂体系, 经 HPLC 分析合并得到 6 个组分 Fr. 3.1~3.6。Fr. 3.1 经半制备 HPLC (甲醇-水 85:15) 分离得到化合物 **2** (12.0 mg, $t_R=20$ min); Fr. 3.2 利用 Sephadex LH-20 (甲醇) 进行分离, 进一步通过半制备 HPLC (甲醇-水 65:35) 得到化合物 **3** (5.2 mg, $t_R=22$ min)、**7** (10.4 mg, $t_R=25$ min) 和 **8** (2.6 mg, $t_R=30$ min); Fr. 3.3 经硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 30:1~1:1) 进行分离, 进一步通过半制备 HPLC (甲醇-水 83:17) 得到化合物 **9** (2.5 mg, $t_R=20$ min) 和 **10** (12.1 mg, $t_R=25$ min); Fr. 3.4 利用硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 30:1~1:1) 进行分离, 进一步通过半制备 HPLC (甲醇-水 80:20) 得到化合物 **11** (4.0 mg, $t_R=20$ min) 和 **12** (1.1 mg, $t_R=25$ min); Fr. 3.5 利用 Sephadex LH-20 (甲醇) 分离后, 通过半制备 HPLC (甲醇-水 90:10) 分离纯化到化合物 **4** (2.0 mg, $t_R=16$ min)。

Fr. 4 以石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水为溶剂体系, 使用高速逆流色谱进行分离, 经 HPLC 分析合并得到 6 个组分 Fr. 4.1~4.6。Fr.4.2 经硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 30:1)、Sephadex LH-20 (甲醇) 分离后, 进一步通过半制备 HPLC (甲醇-水 65:35) 纯化得到化合物 **1** (2.0 mg, $t_R=20$ min)。

Fr. 5 利用石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水为溶剂体系, 通过高速逆流色谱分离得到 6 个组分 Fr. 5.1~5.6。Fr. 5.2 进一步通过硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 20:1)、Sephadex LH-20 (甲醇) 分离后, 然后

利用半制备 HPLC (甲醇-水 80:20) 纯化得到化合物 **6** (1.7 mg, $t_R=35$ min); Fr. 5.3 经 Sephadex LH-20 (甲醇)、半制备 HPLC (甲醇-水 75:35) 分离纯化到化合物 **5** (1.0 mg, $t_R=23$ min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末 (甲醇); HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 365.1497 (计算值 365.1496), 结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 确定其分子式为 $C_{21}H_{20}N_2O_4$, 不饱和度为 13。 1H -NMR 谱 (表 1) 可以明显看出一组 1, 2-二取代苯环信号 δ_H 6.72 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-12), 7.14 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-11), 7.24 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-9), 7.25 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-10); 2 组烯烃信号 δ_H 5.65 (1H, dt, $J=10.0, 2.0$ Hz, H-14), 5.69 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-15) 和 δ_H 5.00 (1H, d, $J=10.9$ Hz, H-18a), 4.94 (1H, d, $J=17.6$ Hz, H-18b), 5.72 (1H, dd, $J=17.6, 10.9$ Hz, H-19); 1 组连氮亚甲基信号 δ_H 4.50 (1H, dd, $J=18.0$, 表 1 化合物 **1** 的 1H -和 ^{13}C -NMR 数据 (600/150 MHz, $CDCl_3$)

碳位	δ_H	δ_C	DEPT
2		166.8	C
3a	4.50 (ddd, $J=18.0, 4.5, 2.0$ Hz)	39.1	CH ₂
3b	3.39 (dd, $J=18.0, 2.0$ Hz)		
5		170.6	C
6a	3.08 (d, $J=18.6$ Hz)	45.1	CH ₂
6b	2.62 (d, $J=18.6$ Hz)		
7		53.4	C
8		126.6	C
9	7.24 (d, $J=7.8$ Hz)	126.8	CH
10	7.25 (t, $J=7.8$ Hz)	128.8	CH
11	7.14 (t, $J=7.8$ Hz)	124.6	CH
12	6.72 (d, $J=7.8$ Hz)	115.8	CH
13		134.3	C
14	5.65 (ddd, $J=10.0, 4.5, 2.0$ Hz)	121.5	CH
15	5.69 (d, $J=10.0$ Hz)	130.7	CH
16		63.9	C
17a	3.00 (d, $J=13.9$ Hz)	42.9	CH ₂
17b	2.50 (d, $J=13.9$ Hz)		
18a	5.00 (d, $J=10.9$ Hz)	116.2	CH ₂
18b	4.94 (d, $J=17.6$ Hz)		
19	5.72 (dd, $J=17.6, 10.9$ Hz)	140.7	CH
20		47.9	C
21	3.92 (s)	76.6	CH
CO ₂ CH ₃		169.5	C
CO ₂ CH ₃	3.65 (s)	53.4	CH ₃

4.5 Hz, H-3a), 3.39 (1H, dd, $J = 18.0, 2.0$ Hz, H-3b); 2 组脂肪族亚甲基信号 δ_{H} 3.08 (1H, d, $J = 18.6$ Hz, H-6a), 2.62 (1H, d, $J = 18.6$ Hz, H-6b) 和 3.00 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-17a), 2.50 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-17b), 1 个连氮次甲基信号 δ_{H} 3.92 (1H, s, H-21), 1 个甲氧基信号 δ_{H} 3.65 (3H, s, OCH₃)。¹³C-NMR 数据 (表 1) 中, 除了与上述基团对应的碳信号外, 还显示 2 个芳香族季碳信号 δ_{C} 126.6 (C-8), 134.3 (C-13), 3 个脂肪族季碳信号 δ_{C} 53.4 (C-7), 63.9 (C-16), 47.9 (C-20) 以及 3 个羰基碳信号 δ_{C} 166.8 (C-2), 170.6 (C-5), 169.5 (CO₂CH₃), 见图 1。

¹H-¹H COSY 谱显示化合物 **1** 中存在 3 个自旋偶合系统 H-9/H-10/H-11/H-12、H-3/H-14/H-15 和 H-18/H-19, 结合 HMBC 谱中显示的远程相关信号: H-3/C-5, C-21、H-6/C-7, C-8、H-9/C-8, C-7、H-12/C-13、H-15/C-20, C-21、H-17/C-2, C-16、H-19/C-17, C-20 和 H-21/C-7, C-16, 可推断出 **1** 与已知化合物 scandine 具有相同的结构骨架^[15]。进一步通过 HMBC 远程关信号 H-3, H-6/C-5 和高分辨质谱推断出, **1** 与 scandine 相比, 5 位亚甲基碳变为羰基碳, 由此确定了化合物 **1** 的平面结构。在 ROESY 谱中, 通过 H-9/H-21、H-6/H-OCH₃ 以及 H-21/H-19 的相关信号, 表明 H-6/H-OCH₃、H-21/H-19 位于同侧, 与 scandine 型生物碱的相对构型一致^[16]。以上 2D-NMR 谱中主要相关信号见图 2。

化合物 **1** 的绝对构型是通过通过计算 ECD 和实验 ECD 比较来确定的。化合物 **1** 可能存在 **1a** 和 **1b** 两种绝对构型, 通过比较其 ECD 实验谱图与计算 ECD 的数据确定 **1** 的绝对构型 (图 3)。实验表明, 化合物 **1** 的实验 ECD 谱 (MeOH) 在 207 nm ($\Delta\epsilon +37.5$) 和 257 nm ($\Delta\epsilon +7.3$) 处有正性 Cotton 效应, 与 **1a** 的计算 ECD 的谱图 (MeOH) 基本吻合, 从而确定了 **1** 的绝对构型与 **1a** 一致, 为 7*S*,16*R*,20*R*,21*S*, 命名为美乐苏胺 A (melosuavine A)。

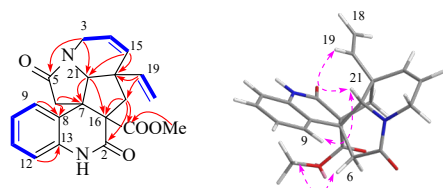


图 2 化合物的关键 ¹H-¹H COSY (—)、HMBC (—) 和 ROESY (—) 相关信号

Fig.2 Key COSY (—), HMBC (—), and ROESY (—) correlations of compound 1

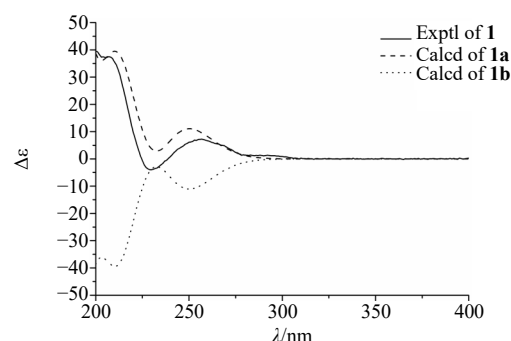
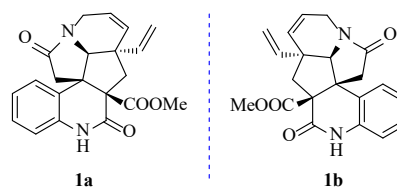


图 3 化合物 **1** 的 2 种可能绝对构型及其实验和计算 ECD 谱
Fig. 3 Two possible absolute configurations and experimental and calculated ECD spectra of compound **1**

化合物 **2**: 白色粉末; ESI-MS m/z 337.1 [$M+H$]⁺。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.99 (1H, s, NH), 7.23 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-9), 7.14 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-10), 6.82 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-12), 6.87 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-11), 5.79 (1H, m, H-14), 5.71 (1H, m, H-15), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.46 (1H, m, H-3a), 3.19 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-17a), 3.05 (1H, m, H-3b), 2.71 (1H, m, H-5a), 2.68 (1H, s, H-21), 2.55 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-17b), 2.44 (1H, m, H-6a), 2.07 (1H, m, H-5b), 1.80 (1H, m, H-6b), 0.99 (1H, m, H-19a), 0.86 (1H, m, H-19b), 0.64 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 167.0 (C-2), 51.1 (C-3), 50.7 (C-5), 44.7 (C-6), 55.3 (C-7), 138.2 (C-8), 121.6 (C-9), 120.7 (C-10), 127.8 (C-11), 109.4 (C-12), 43.3 (C-13), 125.0 (C-14), 133.3 (C-15), 92.3 (C-16), 27.1 (C-17), 7.6 (C-18), 28.6 (C-19), 41.5 (C-20), 70.2 (C-21), 51.1 (COOCH₃), 169.2 (COOCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **2** 为柳叶水甘草碱。

化合物 **3**: 无色油状物; ESI-MS m/z 373.1 [$M+Na$]⁺。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 9.04 (1H, s, NH), 7.23 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-11), 7.23 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-9), 6.95 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-10), 6.89 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-12), 6.45 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-15), 5.96 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-14), 4.31 (1H, m, H-5a), 3.98 (1H, s, H-21), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.38 (1H, m, H-5b), 2.62 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-17a), 2.07 (1H, d,

$J = 15.5$ Hz, H-17b), 1.95 (1H, m, H-6a), 1.89 (1H, m, H-6b), 1.09 (1H, m, H-19a), 1.00 (1H, m, H-19b), 0.72 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 165.5 (C-2), 161.6 (C-3), 43.5 (C-5), 43.5 (C-6), 56.8 (C-7), 135.7 (C-8), 128.8 (C-9), 121.4 (C-10), 121.6 (C-11), 110.0 (C-12), 143.0 (C-13), 123.0 (C-14), 145.3 (C-15), 90.3 (C-16), 26.1 (C-17), 7.5 (C-18), 27.3 (C-19), 40.6 (C-20), 66.7 (C-21), 51.4 (COOCH_3), 168.5 (COOCH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **3** 为 3-羧基柳叶水甘草碱。

化合物 **4**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 305.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.70 (1H, s, NH), 7.48 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-9), 7.29 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-12), 7.07 (1H, m, H-10), 7.07 (1H, m, H-11), 3.25 (1H, m, H-3a), 2.94 (1H, m, H-6a), 2.84 (1H, m, H-6b), 2.74 (1H, m, H-16a), 2.68 (1H, m, H-16b), 2.45 (1H, s, H-21a), 2.44 (1H, m, H-5a), 2.33 (1H, m, H-5b), 2.25 (1H, s, H-21b), 1.92 (1H, m, H-17a), 1.61 (1H, m, H-17b), 1.59 (1H, m, H-15a), 1.50 (1H, m, H-3b), 1.30 (1H, m, H-14a), 1.23 (1H, m, H-15b), 1.22 (1H, m, H-19a), 1.15 (1H, m, H-19b), 1.12 (1H, m, H-14b), 0.85 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 140.0 (C-2), 56.8 (C-3), 53.4 (C-5), 22.1 (C-6), 108.8 (C-7), 129.1 (C-8), 117.5 (C-9), 118.8 (C-10), 120.3 (C-11), 110.1 (C-12), 134.9 (C-13), 34.9 (C-14), 22.9 (C-15), 22.6 (C-16), 33.6 (C-17), 8.0 (C-18), 32.2 (C-19), 37.3 (C-20), 55.2 (C-21)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **4** 为白坚木胺。

化合物 **5**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 293.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.20 (1H, m, H-12), 7.44 (1H, m, H-9), 7.25 (1H, m, H-10), 7.26 (1H, m, H-11), 5.61 (1H, m, H-14), 5.55 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-15), 4.23 (1H, s, H-21), 3.51 (1H, m, H-3a), 3.43 (1H, m, H-5a), 3.36 (1H, m, H-5b), 3.13 (1H, m, H-3b), 3.07 (1H, m, H-6a), 2.96 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-17a), 2.68 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-17b), 2.56 (1H, m, H-6b), 1.98 (1H, m, H-19a), 1.74 (1H, m, H-19b), 1.03 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 134.2 (C-2), 44.7 (C-3), 50.2 (C-5), 17.1 (C-6), 133.9 (C-7), 131.5 (C-8), 119.2 (C-9), 125.3 (C-10), 125.0 (C-11), 116.8 (C-12), 135.5

(C-13), 127.7 (C-14), 128.6 (C-15), 169.1 (C-16), 43.8 (C-17), 8.6 (C-18), 34.6 (C-19), 42.2 (C-20), 57.2 (C-21)。以上数据与文献报道基本一致^[20], 故鉴定化合物 **5** 为 Δ^{14} -长春布宁。

化合物 **6**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 277.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.45 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 7.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-12), 7.17 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-10), 7.09 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-11), 6.95 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-16), 5.52 (1H, m, H-15), 5.35 (1H, m, H-14), 4.97 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-17), 4.38 (1H, s, H-21), 3.49 (1H, m, H-3a), 3.37 (1H, m, H-3b), 3.10 (1H, m, H-5a), 2.66 (1H, m, H-6a), 2.55 (1H, m, H-5b), 2.18 (1H, m, H-6b), 1.76 (1H, m, H-19a), 1.75 (1H, m, H-19b), 1.04 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 133.8 (C-2), 43.6 (C-3), 50.6 (C-5), 16.8 (C-6), 113.4 (C-7), 129.2 (C-8), 108.8 (C-9), 113.2 (C-10), 121.9 (C-11), 107.4 (C-12), 133.7 (C-13), 122.8 (C-14), 127.6 (C-15), 118.6 (C-16), 120.1 (C-17), 9.3 (C-18), 33.6 (C-19), 39.0 (C-20), 64.6 (C-21)。以上数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定化合物 **6** 为 Δ^{14} -vincamenine。

化合物 **7**: 白色粉末; ESI-MS m/z 403.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 9.00 (1H, s, NH), 7.11 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-14), 6.46 (1H, dd, $J = 7.8, 2.0$ Hz, H-10), 6.45 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9), 6.43 (1H, brs, H-12), 6.00 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-15), 4.30 (1H, m, H-5a), 3.93 (1H, s, H-21), 3.80 (3H, s, COOCH_3), 3.78 (3H, s, OCH_3), 3.35 (1H, m, H-5b), 2.60 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-17a), 2.05 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-17b), 1.93 (1H, m, H-6a), 1.86 (1H, m, H-6b), 1.09 (1H, m, H-19a), 1.01 (1H, m, H-19b), 0.72 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 166.0 (C-2), 161.6 (C-3), 43.6 (C-5), 43.4 (C-6), 56.2 (C-7), 128.1 (C-8), 123.0 (C-9), 105.7 (C-10), 160.8 (C-11), 97.3 (C-12), 144.3 (C-13), 123.0 (C-14), 145.3 (C-15), 90.6 (C-16), 26.0 (C-17), 7.5 (C-18), 27.3 (C-19), 40.7 (C-20), 66.8 (C-21), 55.7 (OCH_3), 51.5 (COOCH_3), 168.5 (COOCH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **7** 为 3-羧基-11-甲氧基柳叶水甘草碱。

化合物 **8**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 419.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.95 (1H, s, NH), 7.10 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 6.48 (1H, d, $J =$

2.1 Hz, H-12), 6.43 (1H, dd, $J = 8.0$, 2.1 Hz, H-10), 4.43 (1H, m, H-5a), 3.81 (3H, s, COOCH₃), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.62 (1H, s, H-21), 3.61 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-14), 3.47 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-15), 3.20 (1H, m, H-5b), 2.66 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-17a), 1.85 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-17b), 1.73 (1H, m, H-6a), 1.68 (1H, m, H-6b), 1.28 (1H, m, H-19a), 1.09 (1H, m, H-19b), 0.78 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 166.3 (C-2), 164.8 (C-3), 43.4 (C-5), 41.9 (C-6), 56.7 (C-7), 127.5 (C-8), 121.8 (C-9), 105.5 (C-10), 160.7 (C-11), 97.2 (C-12), 143.9 (C-13), 51.1 (C-14), 57.1 (C-15), 88.9 (C-16), 22.2 (C-17), 7.2 (C-18), 26.2 (C-19), 40.6 (C-20), 63.3 (C-21), 55.5 (11-OCH₃), 51.2 (COOCH₃), 168.2 (COOCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[23], 故鉴定化合物 **8** 为 alstoyunine G。

化合物 **9**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 353.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.93 (1H, s, NH), 7.14 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-10), 7.14 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-11), 6.86 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-9), 6.81 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-12), 3.79 (3H, s, COOCH₃), 3.75 (1H, m, H-5a), 3.56 (1H, m, H-3a), 3.51 (1H, m, H-14), 3.49 (1H, m, H-5b), 3.48 (1H, m, H-15), 3.11 (1H, s, H-21), 2.88 (1H, m, H-17a), 2.85 (1H, m, H-3b), 2.48 (1H, m, H-17b), 1.94 (1H, m, H-6a), 1.71 (1H, m, H-6b), 1.13 (1H, m, H-19a), 0.89 (1H, m, H-19b), 0.74 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 167.8 (C-2), 50.3 (C-3), 51.2 (C-5), 44.9 (C-6), 54.1 (C-7), 137.6 (C-8), 121.6 (C-9), 120.8 (C-10), 127.9 (C-11), 109.6 (C-12), 143.1 (C-13), 50.8 (C-14), 50.3 (C-15), 90.8 (C-16), 23.4 (C-17), 7.4 (C-18), 24.5 (C-19), 41.2 (C-20), 67.7 (C-21), 51.3 (COOCH₃), 169.0 (COOCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[24], 故鉴定化合物 **9** 为 pachysiphine。

化合物 **10**: 白色粉末; ESI-MS m/z 383.0 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.90 (1H, s, NH), 7.01 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-12), 6.40 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9), 6.38 (1H, dd, $J = 8.1$, 2.2 Hz, H-10), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.77 (3H, s, COOCH₃), 3.50 (1H, m, H-3a), 3.49 (1H, m, H-14), 3.48 (1H, m, H-15), 3.11 (1H, m, H-3b), 2.87 (1H, m, H-5a), 2.86 (1H, m, H-17a), 2.85 (1H, s, H-21), 2.57 (1H, m, H-5b), 2.45 (1H, m, H-6a), 2.44 (1H, m, H-17b), 1.92 (1H, m,

H-6b), 1.14 (1H, m, H-19a), 0.75 (1H, m, H-19b), 0.74 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 168.3 (C-2), 50.8 (C-3), 51.3 (C-5), 44.9 (C-6), 54.1 (C-7), 130.1 (C-8), 121.9 (C-9), 105.1 (C-10), 160.2 (C-11), 97.0 (C-12), 144.3 (C-13), 54.4 (C-14), 57.4 (C-15), 91.0 (C-16), 23.3 (C-17), 7.4 (C-18), 24.5 (C-19), 41.2 (C-20), 67.8 (C-21), 57.4 (OCH₃), 50.8 (COOCH₃), 169.0 (COOCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[25], 故鉴定化合物 **10** 为洛柯宁碱。

化合物 **11**: 白色粉末; ESI-MS m/z 325.2 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.85 (1H, s, NH), 7.13 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-9), 7.09 (1H, m, H-11), 6.87 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-10), 6.79 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-12), 3.79 (1H, m, H-21), 3.76 (3H, s, COOCH₃), 3.03 (1H, m, H-17), 3.01 (1H, m, H-5a), 2.94 (1H, m, H-6a), 2.89 (1H, m, H-3a), 2.83 (1H, m, H-5b), 2.44 (1H, m, H-3b), 1.96 (1H, m, H-20), 1.79 (1H, m, H-6b), 1.78 (1H, m, H-14a), 1.77 (1H, m, H-14b), 0.81 (2H, m, H-19), 0.69 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 170.9 (C-2), 45.4 (C-3), 54.2 (C-5), 44.2 (C-6), 55.3 (C-7), 137.4 (C-8), 119.7 (C-9), 121.1 (C-10), 127.3 (C-11), 109.8 (C-12), 143.8 (C-13), 28.7 (C-14), 95.8 (C-16), 31.1 (C-17), 11.7 (C-18), 24.1 (C-19), 41.4 (C-20), 65.8 (C-21), 51.3 (COOCH₃), 169.1 (COOCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[26], 故鉴定化合物 **11** 为土波台文碱。

化合物 **12**: 白色粉末; ESI-MS m/z 337.2 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.08 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-12), 7.02 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-10), 6.75 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-11), 6.70 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9), 5.72 (1H, m, H-14), 5.70 (1H, m, H-15), 3.74 (3H, s, COOCH₃), 3.46 (2H, m, H-3), 3.09 (1H, m, H-5a), 2.89 (1H, m, H-5b), 2.88 (1H, m, H-16), 2.71 (1H, s, H-21), 2.68 (1H, m, H-17a), 2.57 (1H, m, H-6a), 1.90 (1H, m, H-18a), 1.66 (1H, m, H-17b), 1.35 (1H, m, H-6b), 1.33 (1H, m, H-19a), 1.25 (1H, m, H-19b), 1.23 (1H, m, H-18b); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 66.7 (C-2), 49.3 (C-3), 50.1 (C-5), 36.5 (C-6), 56.3 (C-7), 149.3 (C-8), 111.2 (C-9), 126.8 (C-10), 119.4 (C-11), 121.4 (C-12), 139.9 (C-13), 127.1 (C-14), 132.8 (C-15), 43.6 (C-16), 31.7 (C-17), 34.3 (C-18), 29.7 (C-19), 35.3 (C-20), 67.0 (C-21),

51.9 (COOCH₃), 174.1 (COOCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[27], 故鉴定化合物 **12** 为 venalstonine。

4 细胞毒活性

采用 MTT 法^[10]评价了化合物 **1**~**12** 对 3 种人源型肿瘤细胞 (A549、HepG2 和 PC-3) 的体外细胞增殖抑制活性, 以顺铂为阳性对照。结果表明, 化合物 **1**、**3**~**7**、**11** 和 **12** 均无活性; 化合物 **2**、**8**~**10** 显示出不同程度的肿瘤细胞增殖抑制活性 (表 2); 化合物 **10** 对 A549、HepG2 和 PC-3 肿瘤细胞具有显著的增殖抑制活性, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 分别为 7.11、0.84、3.78 μmol/L。

表 2 抗肿瘤活性评价 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Anti-tumor screening results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)		
	A549	HepG2	PC-3
2	60.80±3.68	26.74±3.68	25.07±2.71
8	28.94±3.47	1.18±0.34	2.44±1.72
9	40.67±10.14	9.45±2.96	19.42±3.85
10	7.11±0.99	0.84±0.80	3.78±1.83
顺铂	57.26±3.34	14.35±0.85	40.75±9.58

5 讨论

本研究运用多种色谱手段, 从山橙属植物山橙茎的乙醇提取物氯仿部位中分离得到 12 个生物碱类成分, 其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **4**、**11** 和 **12** 首次从该植物中分离得到, 并对以上化合物进行了细胞毒活性测试。化合物 **2**、**8**~**10** 显示出不同程度的肿瘤细胞增殖抑制活性, 又以化合物 **10** 抗肿瘤活性最强, 推测 14、15 位的环氧结构、11 位的甲氧基和 20 位的乙基是这类生物碱具备显著活性的必要条件, 上述推测需获得更多该类成分进行验证。综上, 本研究进一步丰富了山橙属植物生物碱类化学成分, 为此类成分进一步的抗肿瘤作用研究提供了参考和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 方忠莹, 杜思雨, 蔡晓青, 等. 山橙属植物生物碱类成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 218-225.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 63 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2004, 63: 24-25.
- [3] Feng T, Cai X H, Li Y, et al. Melohenines A and B, two unprecedented alkaloids from *Melodinus henryi* [J]. *Org*

Lett, 2009, 11(21): 4834-4837.

- [4] Fang L, Fang Z Y, Zhou P, et al. Anti-inflammatory lignans from *Melodinus suaveolens* [J]. *Phytochem Lett*, 2018, 26: 134-137.
- [5] 李玉洁, 李娟, 谢澜, 等. 山橙茎中非生物碱类化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 1884-1890.
- [6] Feng T, Cai X H, Liu Y P, et al. Melodinines A—G, monoterpenoid indole alkaloids from *Melodinus henryi* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(1): 22-26.
- [7] Shao S, Zhang H, Yuan C M, et al. Cytotoxic indole alkaloids from the fruits of *Melodinus cochinchinensis* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 116: 367-373.
- [8] Li F R, Liu L, Liu Y P, et al. HRESIMS-guided isolation of aspidosperma-scandine type bisindole alkaloids from *Melodinus cochinchinensis* and their anti-inflammatory and cytotoxic activities [J]. *Phytochemistry*, 2021, 184: 112673.
- [9] Liu Y P, Yue G G L, Lee J K M, et al. Melodinine V, an antitumor bisindole alkaloid with selective cytotoxicity from *Melodinus henryi* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(20): 4895-4898.
- [10] Fang Z Y, Ren Y D, Du S Y, et al. Melosuavine I, an apoptosis-inducing bisindole alkaloid from *Melodinus suaveolens* [J]. *Fitoterapia*, 2019, 133: 175-179.
- [11] Liu Y P, Li Y, Cai X H, et al. Melodinines M—U, cytotoxic alkaloids from *Melodinus suaveolens* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(2): 220-224.
- [12] Li Y, Zhao Y L, Zhou X, et al. Cytotoxic indole alkaloid 3α-acetyltabersonine induces glioblastoma apoptosis via inhibition of DNA damage repair [J]. *Toxins*, 2017, 9(5): 150.
- [13] Liu Y P, Zhao Y L, Feng T, et al. Melosuavines A—H, cytotoxic bisindole alkaloid derivatives from *Melodinus suaveolens* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(12): 2322-2329.
- [14] Lu F, Liu P, Yin S S, et al. Two new alkaloids from *Melodinus suaveolens* [J]. *Nat Prod Commun*, 2014, 9(10): 1934578X1400901.
- [15] 李朝明, 郑惠兰, 吴曙光, 等. 景东山橙茎皮中的喹啉山橙碱 [J]. 云南植物研究, 1994, 16(3): 315-317.
- [16] Zhang J, Yun D, Huang X J, et al. Melohemsines A—I, *Melodinus*-type alkaloids from *Melodinus hemsleyanus* [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(95): 92218-92224.
- [17] 王世平, 李玲, 吴艳俊, 等. 雷打果中生物碱成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2356-2357.
- [18] Zeches M, Lounkokobi J, Richard B, et al. Alkaloids of *melodinus guillauminii* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(1): 171-174.
- [19] Deutsch H F, Evenson M A, Drescher P, et al. Isolation and biological activity of aspidospermine and

- quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1994, 12(10): 1283-1287.
- [20] Pegnyemb D E, Ghogomu R T, Sondengam B L. Minor alkaloids from the seeds of *Voacanga africana* [J]. *Fitoterapia*, 1999, 70(4): 446-448.
- [21] Cai X H, Li Y, Su J, *et al.* Novel indole and quinoline alkaloids from *Melodinus yunnanensis* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2011, 1(1): 25-28.
- [22] 陈未名, 阎雅平, 马雪梅. 鸡骨常山茎叶中生物碱的分离和鉴定 [J]. *药学报*, 1986, 21(3): 187-190.
- [23] Feng T, Li Y, Cai X H, *et al.* Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia yunnanensis* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(10): 1836-1841.
- [24] Wenkert E, Hagaman E W. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances. XXXIX. Apramycin. Application of amine protonation parameters [J]. *J Org Chem*, 1976, 41(4): 701-703.
- [25] Moza B K, Trojánec J, Bose A K, *et al.* The structure of lochnericine and lochnerinine [J]. *Tetrahedron Lett*, 1964, 5(37): 2561-2566.
- [26] Yamauchi T, Abe F, Padolina W G, *et al.* Alkaloids from leaves and bark of *Alstonia scholaris* in the Philippines [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(10): 3321-3325.
- [27] Das B, Biemann K, Chatterjee A, *et al.* The alkaloid of the bark of *Alstonia venenata* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1965, 6(27): 2239-2244.

[责任编辑 王文倩]