

高速逆流色谱法分离鉴定苗药三两银中的甾体生物碱

何康, 王进喜, 杜江*
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 研究苗药三两银中的生物碱类成分。方法: 应用高速逆流色谱法, 以正己烷-乙酸乙酯-无水乙醇-水 (6:1.2:7.1:1) 上相为固定相, 下相为流动相, 组成溶剂系统对苗药三两银中的总碱进行分离纯化及鉴定。结果: 从其总碱部分分离得到 3 个甾体类生物碱, 根据理化性质和光谱数据鉴定为: 海南野扇花碱 D (sarcovagine D, **1**)、富贵草碱 G (physamine G, **2**) 和富贵草碱 H (physamine H, **3**)。结论: 首次从该种植物中分离得到化合物 **2,3**。

[关键词] 高速逆流; 甾体生物碱; 羽脉野扇花

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)11-0137-03

[doi] 10.11653/syjf2013110137

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1410.010.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:10

Steroidal Alkaloids from *Sarcococca hookeriana* by High-speed Countercurrent Chromatography

HE Kang, WANG Jin-xi, DU Jiang*

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. **Method:** High-speed counter-current chromatography (HSCCC) was employed first to separate and purify compounds. A biphasic solvent system composed of *n*-hexane-EtAc-dehydrated alcohol-water (6:1.2:7.1:1) was used. **Result:** Three steroidal alkaloids were isolated from the total alkaloids and their structure were identified as: sarcovagine D (**1**), physamine G (**2**) and physamine H (**3**). **Conclusion:** Compounds **2** and **3** were isolated from this plant for the first time.

[Key words] high-speed countercurrent chromatography; steroidal alkaloids; *Sarcococca hookeriana*

苗药三两银为黄杨科野扇花属植物^[1]。该属植物在民间多用于治疗胃病、解毒敛疮、头晕心悸等。研究表明其化学成分主要为孕甾烷型甾体生物碱^[2-3]。该类型的生物碱成分具有乙酰胆碱酯酶的抑制、抗菌、抗癌等活性, 大部分都对胆碱酯酶有较显著的抑制活性^[4-8], 是一类潜在抗老年痴呆的候

选药物分子。

国外学者从分子对接、动力学以及三维构效关系等多方面对该类型生物碱的胆碱酯酶抑制活性做了深入的研究^[9-10]。为从我国产野扇花属植物中寻找该类型抗老年痴呆甾体生物碱成分, 本文运用了 HSCCC 法对黔产苗药三两银中的甾体生物碱类成分进行了研究。

1 材料

1.1 仪器与试剂 TBE-1000A 型高速逆流色谱仪 (上海同田生化技术有限公司), INOVA 型 400 MHz 超导核磁共振波谱仪 (美国瓦里安公司), 5973 型 MSD 质谱仪 (安捷伦公司), VECTOR22 型傅立叶变换红外光谱仪 (KBr 压片, 德国 BRUKER 仪器公

[收稿日期] 20121214(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30960529); 贵阳中医学院博士启动基金项目 (201208)

[第一作者] 何康, 副教授, 民族药与天然药物化学, Tel: 0851-3840100, E-mail: hekang0851@163.com

[通讯作者] * 杜江, 教授, 从事民族医药研究, Tel: 0851-5652586, E-mail: dujiang_gz@163.com

司), Jasco model 1020 型旋光仪 (Horiba, Tokyo, Japan), XT-4 型双目显微熔点测定仪 (未校正, 北京泰克仪器有限公司, TMS 为内标)。J209A-4 型植物粉碎机 (河南黄骅齐家务科学仪器厂), 薄层色谱板和各种规格的柱色谱硅胶均来自于青岛海洋化工厂。显色剂为改良碘化铋甲试剂, 其他试剂均为分析纯。

1.2 样品准备 样品采集于贵州省贵阳市近郊, 标本由贵州省科学院生物研究所陈谦海研究员鉴定为羽脉野扇花 *Sarcococca hookeriana* Baill.。药材粗粉 4 kg, 加入药材 3 倍体积量的乙醇, 水浴回流提取 3 次 (3, 2, 2 h)。过滤、合并滤液、回收至无醇味, 用蒸馏水分散悬浮后缓慢加入氨水调 pH 10, 再用氯仿萃取 3 次至氯仿无色, 氯仿萃取液减压浓缩得到总碱 80 g。

2 方法

2.1 两相溶剂系统及样品溶液的制备 高速逆流色谱 (HSCCC) 溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-无水乙醇-水 (6:1.2:7.1:1), 按其比例分别将各种溶剂加入分液漏斗中, 振荡使溶液充分混合, 静置分层, 使用前分别取溶剂系统的上、下相, 超声脱气 30 min 后备用。取样品约 1 g, 溶于 100 mL 下相中使之完全溶解, 以备 HSCCC 制备^[11-12]。

2.2 HSCCC 分离纯化过程 先将上相 (固定相) 泵入 HSCCC 螺旋管, 待分离柱中充满固定相后, 开启主机, 调整螺旋管转速为 530 r·min⁻¹ (正转), 同时以 5 mL·min⁻¹ 的流速泵入流动相。待溶剂系统在分离柱中建立了两相间的动态平衡后, 将样品通过进样阀注入分离螺旋管, 温度为 25 °C, 开启 UV 检测器于 254 nm 采集数据、记录色谱图, 并根据色谱图手动收集各色谱峰组分。在 140 ~ 170 min 段收集流份, 减压回收溶剂, 用甲醇溶解重结晶得化合物 3; 在 170 ~ 210 min 段收集流份, 减压浓缩后用甲醇溶解重结晶得化合物 1; 在 220 ~ 260 min 段收集流份, 浓缩后用甲醇溶解重结晶得化合物 2。

2.3 HSCCC 操作条件的优化

2.3.1 分配系数的测定 以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水, 正己烷-乙酸乙酯-无水乙醇-水体系为溶剂系统的考察对象, 上相为固定相、下相为流动相洗脱。用正己烷-乙酸乙酯-甲醇/无水乙醇-水配成不同比例的溶剂系统, 分别精密量取上相、下相溶液各 10.0 mL, 混合后加入 5 mg 的总碱浸膏, 超声 10 min, 精密量取上相, 下相各 3.0 mL, 以 0.1% 磷酸二氢钾-乙腈为溶剂系统用高效液相分析, 以上相的峰

面积除以下相的峰面积计算其分配系数。分析结果显示, 当正己烷-乙酸乙酯-无水乙醇-水的体积比为 6:1.2:7.1:1 较为适合, 分配系数为 1.63, 且两个溶剂体系固定相保留较好, 固定相保留率为 75%。

2.3.2 流速对分离效果的影响 在溶剂系统, 进样量、转速相同的情况下, 对化合物在 3, 5, 8 mL·min⁻¹ 分别进行了考察, 结果当流速过低时, 出峰时间变长, 流速过快时, 固定相保留率不好, 分离度不好。综合比较后确定流速 5 mL·min⁻¹ 时分离效果最好。

2.3.3 转速对分离度的影响 在溶剂系统, 进样量、流速、流速相同的情况下, 对 450, 500, 530, 560 r·min⁻¹ 分别考察, 结果显示转速过快时分离度不好, 转速过低时峰与峰的间距变大, 且峰形变宽, 出峰时间变长, 综合比较确定转速在 530 r·min⁻¹ 时分离效果最好。

3 结构鉴定

化合物 1 无色结晶; TLC 碘化铋钾试剂显桔红色; mp 171 ~ 173 °C; $[\alpha]_D^{25} + 34.5^\circ$ (c 0.07, CHCl₃)。¹H-NMR (CHCl₃, 500 MHz) δ : 8.19 (1H, s, NH), 7.67 (1H, dd, $J = 6.8, 2.6$ Hz, H-2), 6.51 (1H, q, $J = 6.9$ Hz, H-2'), 2.18 (6H, s, NMe \times 2), 1.90 (3H, s, H-4'), 1.79 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-3'), 0.88 (3H, br s, 21-CH₃), 0.87 (3H, s, 19-CH₃), 0.66 (3H, s, 18-CH₃)。¹³C-NMR 谱数据参见表 1。以上数据与文献[13]报道基本一致, 故鉴定为 3-顺芷酰胺基-20 α -二甲氨基-5 α -孕甾-2(3)-烯-4-酮, 又名海南野扇花碱 D (sarcovagine D)。

化合物 2 无色结晶; TLC 碘化铋钾试剂显桔红色; mp 203 ~ 205 °C, $[\alpha]_D^{25} + 21.4^\circ$ (CHCl₃)。¹H-NMR (CHCl₃, 500 MHz) δ : 6.39 (1H, q, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 5.53 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, NH), 2.13 (6H, s, NMe \times 2), 1.82 (3H, s, H-4'), 1.74 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3'), 0.86 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, 21-CH₃), 0.80 (3H, s, 19-CH₃), 0.64 (3H, s, 18-CH₃)。¹³C-NMR 谱数据参见表 1。以上数据与文献[14]对照基本一致, 故鉴定为 20 α -二甲氨基-3 β -惕洛酰胺基-5 α -孕甾烷 (20 α -dimethylamino-3 β -tigloylamino-5 α -pregnane), 又名富贵草碱 G (pachysamine G)。

化合物 3 无色结晶; TLC 碘化铋钾试剂显桔红色; mp 151 ~ 152 °C, $[\alpha]_D^{25} + 67.2^\circ$ (CHCl₃); EI-MS m/z : 464 (M^+), 449 ($M^+ - CH_3$), 105 (15), 72 (100)。¹H-NMR (CHCl₃, 500 MHz) δ : 7.37 (5H,

表1 化合物(1~3) ^{13}C 核磁数据 (125 MHz, CDCl_3)

No.	化合物 1	化合物 2	化合物 3
1	39.1	37.5	35.6
2	126.2	28.7	26.0
3	131.9	49.0	40.00
4	196.6	35.5	32.6
5	54.9	45.4	41.7
6	20.6	28.9	28.7
7	30.6	32.0	31.9
8	34.7	35.5	35.6
9	54.0	54.3	54.9
10	39.9	35.5	35.4
11	20.8	21.2	21.1
12	39.5	39.8	40.0
13	41.7	41.7	41.7
14	56.3	56.6	56.6
15	24.0	24.1	24.1
16	27.7	27.7	27.7
17	54.9	54.9	54.9
18	12.4	12.4	12.4
19	13.4	12.4	12.4
20	61.1	61.2	61.1
21	9.9	9.9	9.9
NMe ₂	39.5	39.8	39.8
C = O	167.7	168.7	172.0
1'	-	-	137.9
2'	132.2	132.2	128.6
3'	131.5	130.2	126.2
4'	13.4	12.5	129.2
5'	12.3	13.9	126.2
6'	-	-	128.6

br s, C_6H_5), 2.97 (3H, s, NMe), 2.15 (6H, s, NMe \times 2), 0.84 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, 21- CH_3), 0.77 (3H, s, 19- CH_3), 0.63 (3H, s, 18- CH_3)。 ^{13}C -NMR 谱数据参见表1。以上数据与文献[7]对照基本一致,故鉴定为20 α -二甲氨基-3 α -苯甲酰甲胺基-5 α -孕甾烷(20 α -dimethylamino-3 α -*N*-methyl, benzoylamino-5 α -pregnane),又名富贵草碱H(pachysamine H)。

4 结论

实验过程中对溶剂系统和参数条件进行系统的优化后,一次性分离纯化得3个甾体生物碱类化合物,分别鉴定为海南野扇花碱D(sarcovagine D, 1)、富贵草碱G(physamine G, 2)和富贵草碱H(physamine H, 3),其中化合物2和3为首次从该种植物中分离得到。另外,本文还为该属植物中甾体

生物碱类化学成分的制备提供了新的快捷的制备方法。

[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. 第45卷[M]. 北京:科学出版社, 1988: 51.
- [2] 何康, 杜江. 野扇花属植物的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(7): 71.
- [3] He K, Du J. Two new steroidal alkaloids from the roots of *Sarcococca ruscifolia* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12: 233.
- [4] Yan Y X, Sun Y, Chen J C, et al. Cytotoxic steroids from *Sarcococca saligna* [J]. Planta Med, 2011, 77: 1725.
- [5] Atta-ur-Rahman S, Atia tul W, Choudhary M I. Discovery of leishmanicidal agents from medicinal plants [J]. Pure Appl Chem, 2008, 80: 1783.
- [6] Devkota K P, Lenta B N, Choudhary M I, et al. Cholinesterase inhibiting and antiplasmodial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana* [J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55: 1397.
- [7] Attaur R, Anjum S, Farooq A, et al. Antibacterial steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna* [J]. J Nat Prod, 1998, 61: 202.
- [8] 吕霞, 于盱, 郭青, 等. 黄杨生物碱的研究新进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 315.
- [9] Zaheerul H, Uddin R, Yuan H, et al. Receptor-based modeling and 3D-QSAR for a quantitative prediction of the butyrylcholinesterase inhibitors based on genetic algorithm [J]. J Chem Inf Model, 2008, 48: 1092.
- [10] Devkota K P, Choudhary M I, Ranjit R, et al. Structure-activity relationship studies on antileishmanial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana* [J]. Nat Prod Res, 2007, 21: 292.
- [11] 林治鑫, 顾雪竹, 刘珺. 高速逆流色谱结合 UNIFAC 数学模型分离纯化淡竹叶中的槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 23.
- [12] 时东方, 郑梅竹, 赵立春, 等. 白鲜皮中白鲜碱的分离及抗炎活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 128.
- [13] 庾石山, 邹忠梅, 郑捷, 等. 海南野扇花中甾体生物碱的化学研究 [J]. 药学学报, 1997, 32(11): 852.
- [14] 邱明华, 裴瑞麟, 李忠荣, 等. 金丝矮陀陀的三个新甾体生物碱 [J]. 植物学报, 1990, 32(3): 626.

[责任编辑 邹晓翠]