

黄杨宁原料中生物碱的分离与鉴定

刘 洁, 杭太俊, 张正行*

(中国药科大学 药物分析教研室, 南京 江苏 210009)

摘要:目的 分离鉴定黄杨宁原料中的生物碱, 为黄杨宁及其制剂质量控制提供依据。方法 用高效液相色谱法分析并分离纯化黄杨宁中各主要生物碱成分, 通过理化方法及光谱分析鉴定化学结构。结果 黄杨宁中主要含环维黄杨星 D, 另外两个次要成分分别为环黄杨碱 D 和环常绿黄杨碱 C。结论 经色谱分析、分离和光谱鉴定, 确证黄杨宁主要由具有相同骨架结构的同系生物碱组成。环维黄杨星 D 单体不易由传统的柱色谱或重结晶分离等方法制得。

关键词: 黄杨宁生物碱; 环维黄杨星 D; 环黄杨碱 D; 环常绿黄杨碱 C

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)11-1614-05

Isolation and identification of two related alkaloids in Huangyangning

LIU Jie, HANG Tai-jun, ZHANG Zheng-xing

(Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** To isolate and elucidate the structures of alkaloids in Huangyangning. **Methods** Alkaloids of Huangyangning were separated with preparative HPLC. The molecular structures were elucidated on the basis of chemical evidences and spectral analyses (UV, IR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, DEPT, HMQC, and HMBC). **Results** Cyclovirobuxine D is the major component in Huangyangning and cyclobuxine D and cyclovirobuxine C are the two related alkaloids. **Conclusion** It is demonstrated that all the Huangyangning alkaloids have the same structural frame with only minor differences in substitution through chromatographic and spectral analyses. Therefore, it is not easy to purify cyclovirobuxine D by using usual column, re-crystallization, or chemical approaches for the existence of the related alkaloids.

Key words: Huangyangning alkaloids; cyclovirobuxine D; cyclobuxine D; cyclovirobuxine C

环维黄杨星 D 为自黄杨木中提取、分离、精制得到的具有良好药理活性的生物碱, 临床上已长期用于与气滞血瘀所致的胸痹心痛、脉结代等症候相关的冠心病、心律失常等心血管病的治疗^[1,2]。然而, 现行标准中的高氯酸非水滴定法和酸性染料比色法测定, 均是测定黄杨宁总生物碱; 环维黄杨星 D 中有关生物碱的 TLC 检查法不能有效实现有关生物碱的分离和控制其限度。笔者曾采用 HPLC-UV 法测定了目前市售环维黄杨星 D 原料中环维黄杨星 D, 在 55%~85%, 而非单体, 实际为有效部位黄杨宁生物碱。

本实验采用高效液相制备色谱技术对黄杨宁进行分析, 确认其主要含环维黄杨星 D 两个有关生物碱分别为环黄杨碱 D(cyclobuxine D) 和环常绿黄杨碱 C(cyclovirobuxine C)。

1 材料与仪器

黄杨宁、环维黄杨星 D 由南京小营制药厂提供。甲醇、正己烷、氯仿、磷酸盐等均为分析纯(南京化学试剂厂); 水为二次重蒸水。

VG ZAB-HS 质谱仪, PE Lambda2 UV/Vis 光谱仪, NICOLET incompact 410 FT-IR; Bruker AV-500 NMR。

2 分离与纯化

黄杨宁是从黄杨木中提取精制得到的总生物碱。在优化条件的基础上, 建立了高效液相制备色谱的色谱条件: Lichrospher SiO₂ 色谱柱(250 mm×18 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-环己烷-丙酮-乙二胺(100:50:50:2); ELSD 检测器。用此条件分离纯化得到环维黄杨星 D 及另外两个主要有关生物碱。制备液相典型色谱见图 1。

收稿日期: 2006-03-28

基金项目: 江苏省科技厅科技攻关项目(BE2003608)

* 通讯作者 张正行 Tel: (025)83271256 E-mail: Zhangzx@cpu.edu.cn; hangtj@cpu.edu.cn

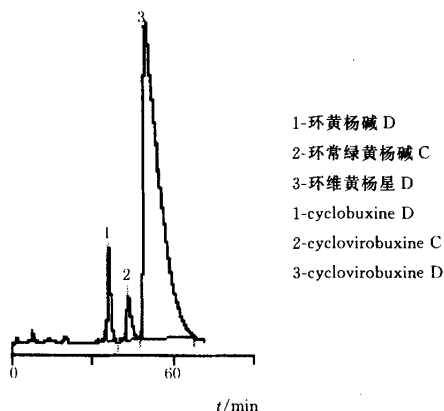


图 1 黄杨宁的制备型色谱图

Fig. 1 Preparative chromatogram of Huangyangning

3 纯度检测方法

研究建立了环维黄杨星 D 定量测定及有关生物碱检查的 HPLC-UV 法: Lichrospher NH₂ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 的磷酸氢二钾缓冲液 (70:30), 柱温 35℃, 体积流量 1 mL/min, 检测波长 210 nm。黄杨宁的典型图谱见图 2-A。环维黄杨星 D 对照品及其两个主要有关生物碱样品的纯度 (峰面积归一化法计算) 分别为 99.1% (图 2-B)、97.4% (图 2-C) 和 96.2% (图 2-D)。

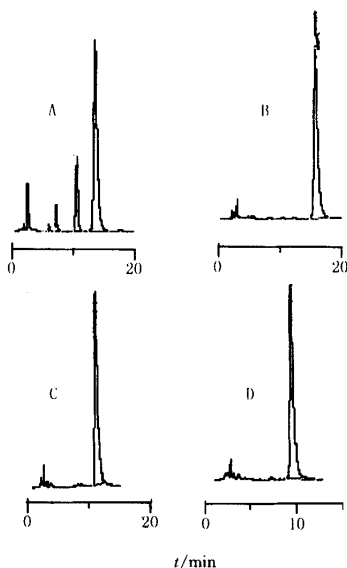


图 2 黄杨宁(A)、环维黄杨星 D (B)、环黄杨碱 D (C) 和环常绿黄杨碱 C (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of Huangyangning (A), cycloviobuxine (B), cyclobuxine D (C), and cycloviobuxine C (D)

4 有关生物碱结构鉴定

市售黄杨宁原料用高氯酸滴定法测定, 其质量分数达 99% 以上。亦可用酸性染料比色法测定, TLC 法检查可分出与碘化铋钾试剂呈色的杂质斑点。证明黄杨宁中有关物质主要为其有关生物碱, 并且所含碱基单元和相对分子质量与环维黄杨星 D 相近。

与图 2-A 色谱图中 t_R 11.89 min 峰相应的有关生物碱为类白色结晶性粉末, 氯仿中易溶, 水中不溶。其 EI-MS 质谱中, 最高质量区的离子峰 m/z : 386, 为偶数, 分子结构中含有偶数个氮原子。高分辨质谱得到其相对分子质量为 386.36, 分子式为 $C_{26}H_{42}N_2O$, 与环维黄杨星 D 相比相对分子质量减少 16, 即相差 CH_4 。甲醇中 UV 光谱分析表明仅有末端吸收 ($\lambda_{max} = 206.8$ nm), 表明分子结构中无共轭体系, 只有杂原子胺基和羟基或未共轭的一个双键。KBr 压片 IR 光谱中在 3 414~3 100, 1 147.5 和 1 032 cm^{-1} 有 -NH 及 -OH 特征吸收; 3 092.2 和 3 035.1 cm^{-1} 及 1 642.8 和 1 605.4 cm^{-1} 有与孤对双键 (=C-H) 相应的吸收。CDCl₃ 中 NMR 光谱分析, 测得 δ_H 4.58/ δ_H 4.81 的烯氢及其 HSQC 偶合的 CH_2 烯碳 (δ_C 100.6) 及 HMBC 相关的烯季碳 (δ_C 153.6) 证明与 t_R 11.89 min 峰相应的有关生物碱结构中含有一个双键。NMR 谱全面分析确证该生物碱为环黄杨碱 D, 分子结构见图 3, 与环维黄杨星 D 核磁共振化学位移归属比较见表 1。

与图 2-A 色谱图中 t_R 9.45 min 峰相应的有关

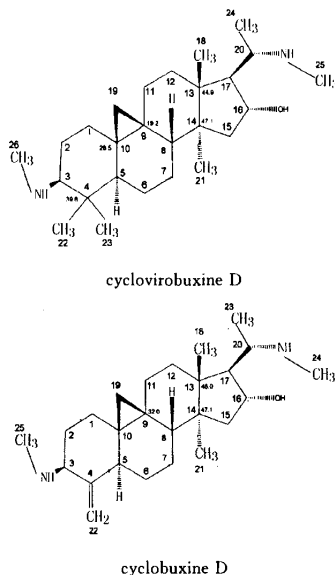


图 3 环维黄杨星 D 和环黄杨碱 D 化学结构式

Fig. 3 Chemical structures of cycloviobuxine D and cyclobuxine D

表 1 环维黄杨星 D 和环黄杨碱 D 的 NMR 数据和 ¹³C-¹H 相关 (CDCl₃)
Table 1 NMR Data and ¹³C-¹H correlations of cyclovirobuxine D and cyclobuxine D (in CDCl₃)

环维黄杨星 D				环黄杨碱 D			
δ _C	DEPT	¹ H- ¹³ C HSQC δ _H	location	δ _C	DEPT	¹ H- ¹³ C HSQC δ _H	location
78.3	CH	4.09 (1H,m)	16	153.6	CH ₀		4
68.4	CH	1.96 (d-d)	3	100.6	CH ₂	4.58/4.81 (d-d)	22
						<i>J</i> =0.23 Hz	
61.7	CH	1.60	17	78.1	CH	4.13	16
58.6	CH	2.50	20	63.4	CH	2.89 (d-d)	3
48.3	CH	1.33	5	61.3	CH	1.66	17
47.7	CH	1.44	8	58.6	CH	2.56	20
47.1	CH ₀		14	47.4	CH	1.52	8
44.9	CH ₀		13	47.1	CH ₀		14
44.5	CH ₂	1.39 (1H,d-d)	15	45.0	CH ₀		13
39.6	CH ₀		4	44.6	CH ₂	1.42/1.89 (d-t)	15
35.4	CH ₃	2.44	26	44.2	CH	1.40	5
33.5	CH ₃	2.44	25	34.3	CH ₃	2.49	25
32.4	CH ₂	1.48/1.24 (d-m)	1	34.2	CH ₂	1.18/2.12 (d-d)	1
31.5	CH ₂	1.65,1.50 (2H,m)	12	33.1	CH ₃	2.46	24
30.0	CH ₂	0.30/0.53 (d-d)	19	32.0	CH ₀		9
26.6	CH ₂	1.92/1.23 (H,m)	2	31.6	CH ₂	1.52	12
26.5	CH ₀		10	31.5	CH ₂	1.70/1.31	11
25.9	CH ₂	2.04/1.11 (1H,m)	11	27.5	CH ₂	0.06/0.28 (d-d)	19
25.9	CH ₂	1.32,1.13 (2H,m)	7	26.5	CH ₂	2.09	2
25.5	CH ₂	0.95 (3H,s)	23	25.7	CH ₂	1.33/1.16	6
21.1	CH ₂	1.62,0.77	6	23.5	CH ₂	1.53/1.12	7
20.6	CH ₃	1.13 (3H)	21	22.8	CH ₀		10
19.2	CH ₀		9	20.5	CH ₃	1.13	21
18.9	CH ₃	0.97 (3H,s)	18	18.8	CH ₃	0.97	18
18.2	CH ₃	1.10 (3H,s)	24	18.0	CH ₃	1.11	23
14.8	CH ₃	0.75 (3H,s)	22				

生物碱为类白色结晶性粉末。在氯仿和水中均不溶。本品 EI-MS 质谱中,最高质量区的离子峰 *m/z* 416,为偶数,分子结构中含有偶数个氮原子。由高分辨质谱得到其相对分子质量 *Mr* 416.37,分子式为 C₂₇H₄₈N₂O,与环维黄杨星 D 相比相对分子质量增加 14,即在环维黄杨星 D 分子结构上增加了一个甲基取代基。根据其 EI-MS 谱特征裂解碎片离子峰 *m/z* 71(基峰)、*m/z* 58 和 *m/z* 346 峰,并与环维黄杨星 D 比较证明,增加的 CH₃ 在 20-位仲胺基上,鉴定为环常绿黄杨碱 C。分子结构式见图 4,特征碎片离子质谱裂解过程见图 5。

5 讨论

有文献报道了“环维黄杨星 D 分离方法改进”^[3]。根据对环维黄杨星 D 分离提纯工艺及质量的系统研究,对该文提出以下二点质疑。(1)文献报道^[3]的结果未对环维黄杨星 D 实际样品存在的有

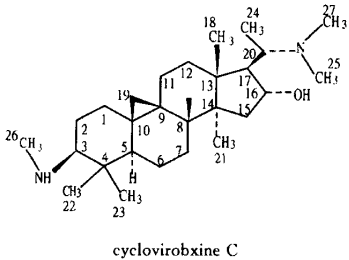


图 4 环常绿黄杨碱 C 的结构式

Fig. 4 Structure of cyclovirobuxine C

关生物碱进行分离鉴定。仅根据文献作出了“黄杨宁中存在的有关生物碱结构中的 20-位均为叔胺结构,而不被乙酰化,从而与可被乙酰化的环维黄杨星 D 分离”的结论。而本研究表明环维黄杨星 D 原料中主要有关生物碱为环黄杨碱为环黄杨碱 D(cyclobuxine D),该成分及环维黄杨星 D 结构中的 3 和 20-位均是仲胺,与其设想的 3 个有关生物碱结

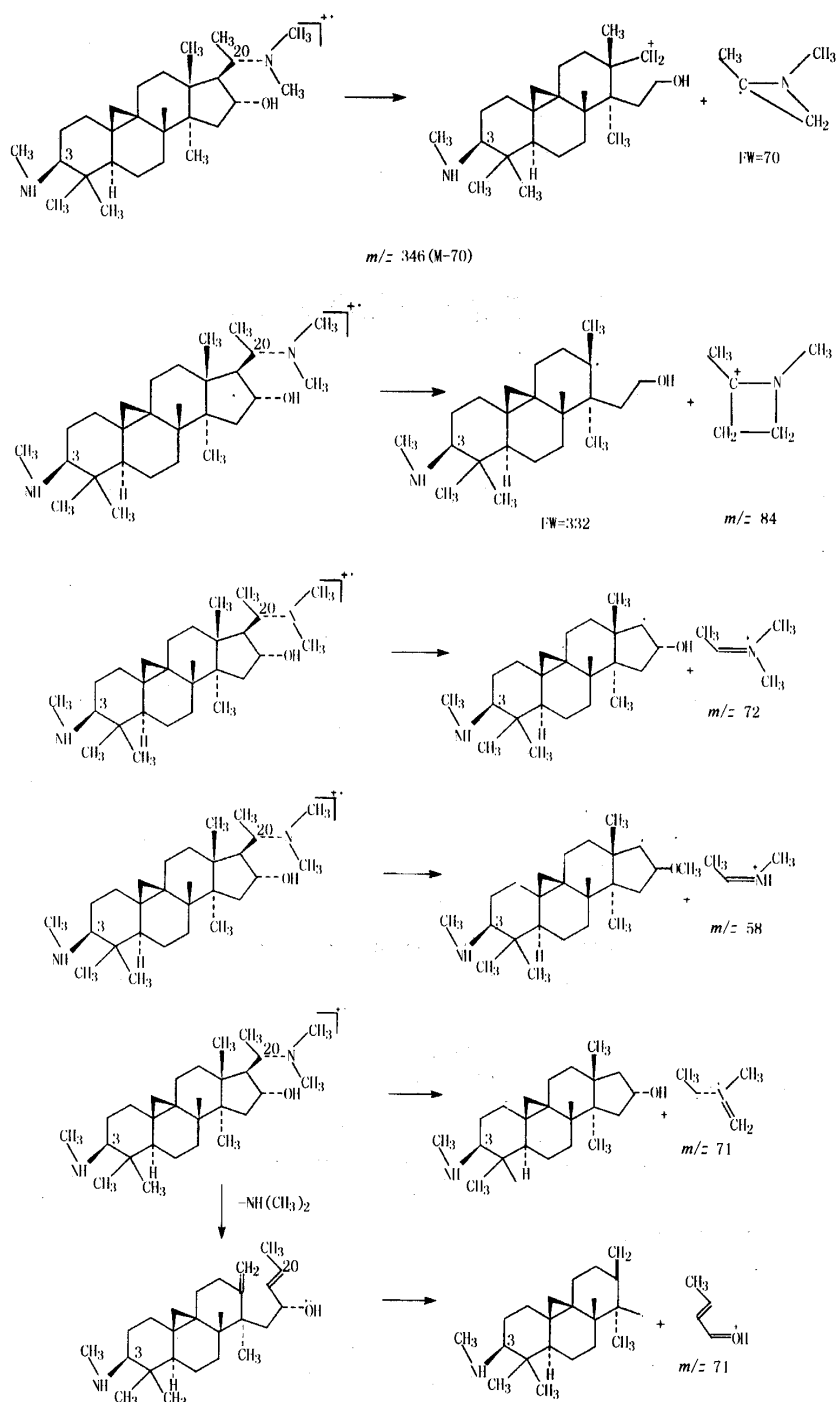


图 5 环常绿黄杨碱 C 的 EI-MS 裂解碎片

Fig. 5 EI-MS Fragmentation route of cyclovirobuxine C

构特征不同。因此其设计的乙酰化提纯原理不成立。
(2)既然是“环维黄杨星 D 分离方法改进”，应提供

分离前后主成分和有关生物碱的测定结果，及分离鉴定的对照图谱。文献仅以不灵敏且分离度较差的

TLC 法监控纯化结果, 准确度值得讨论。

研究表明, 黄杨宁有关生物碱与主成分的结构极其相似, 不可能用一般重结晶和选择性反应方法分离提纯。

References:

[1] Liu R Y. Clinical application of Huangyangning Tablet [J].

J Clin Med (临床内科学杂志), 1997, 14(2): 112.

[2] Zhang K S, Wu Y Y. Summarization of clinical application of Huangyangning Tablets [J]. *Prim J Chin Mater Med* (基层中药杂志), 2000, 14(4): 52-53.

[3] Hu G Q, Xu Q T, Zhang B G, et al. An improved separation method of cyclovirobuxine D from the total alkaloids of *Buxus* [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2(3): 155-156.

龙葵全草皂苷类化学成分研究

周新兰¹, 何祥久², 周光雄², 叶文才², 姚新生^{1,2*}

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510630)

摘要:目的 研究龙葵 *Solanum nigrum* 全草的皂苷类化学成分。方法 采用硅胶、反相 ODS 开放柱色谱及反相 HPLC 等手段分离化合物, 运用波谱技术分析确定化学结构。结果 龙葵全草 60% 乙醇提取物经 D-101 大孔树脂柱吸附, 获得的 60% 乙醇洗脱部分再经分离得到 8 个化合物。利用理化及波谱分析确定这些化合物结构分别为 uttroside B (I), uttroside A (II), 22 α , 25R-26-O- β -D-吡喃葡萄糖基-22-羟基-呋甾- Δ^5 -3 β , 26-二醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-吡喃半乳糖基(III), 22 α , 25R-26-O- β -D-吡喃葡萄糖基-22-甲氧基-呋甾- Δ^5 -3 β , 26-二醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-吡喃半乳糖基(IV), 5 α , 22 α , 25R-26-O- β -D-吡喃葡萄糖基-22-羟基-呋甾-3 β , 26-二醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-吡喃半乳糖基(V), 5 α , 22 α , 25R-26-O- β -D-吡喃葡萄糖基-22-甲氧基-呋甾-3 β , 26-二醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-吡喃半乳糖基(VI), dumoside (VII), 5 α , 20S-3 β , 16 β -二醇-孕甾-22-羧酸-(22, 16)-内酯-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-吡喃半乳糖基(VIII)。结论 化合物 III~VII 为首次从该属植物中分离得到。

关键词: 龙葵; 化学成分; 甾体皂苷

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)11-1618-04

Steroidal glycosides from *Solanum nigrum*

ZHOU Xin-lan¹, HE Xiang-jiu², ZHOU Guang-xiong², YE Wen-cai², YAO Xing-sheng^{1,2*}

(1. College of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: **Objective** To study the steroidal glycosides from the whole herb of *Solanum nigrum*. **Methods** Compounds I—VIII were isolated by silica gel, ODS chromatographies, and preparative HPLC. Their structures were determined by spectral technique. **Results** Eight compounds were isolated from the whole herb of *S. nigrum*. Their structures were identified as: uttroside B (I), uttroside A (II), 22 α , 25R-26-O- β -D-glucopyranosyl-22-hydroxy-furost- Δ^5 -3 β , 26-diol-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-glucopyranoside (III), 22 α , 25R-26-O- β -D-glucopyranosyl-22-methoxy-furost- Δ^5 -3 β , 26-diol-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-galactopyranoside (IV), 5 α , 22 α , 25R-26-O- β -D-glucopyranosyl-22-hydroxy-furost-3 β , 26-diol-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-galactopyranoside (V), 5 α , 22 α , 25R-26-O- β -D-glucopyranosyl-22-methoxy-furost-3 β , 26-diol-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- β -glu-

收稿日期: 2006-03-16

作者简介: 周新兰(1978—), 女, 湖南省新邵县人, 在读博士研究生, 主要从事天然产物活性成分研究。

Tel: (020)85223553 E-mail: zhouxinlan_student@sina.com

* 通讯作者 姚新生 Tel: (020)85225849 Fax: (020)85221559 E-mail: yaosxs@sz.tsinghua.edu.cn