

一个具有生物活性的新紫杉烷类似物 ——紫杉次碱的分离及结构测定[△]

四川省中药研究所(成都 610041) 徐学民* 袁崇均

摘要 从采集于四川省木里县的云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* 的树皮中分得一个具有较强生物活性的新紫杉烷类似物,命名为紫杉次碱(taxoline, I)。测定其化学结构通过解析其¹H-NMR、¹³C-NMR、FABMS、DEPT 谱及¹H-¹H-COSY 二维谱与化学方法。I 经本所药理室用³H-TDR 掺入法测定,对 P₃₈₈淋巴细胞白血病 DNA 合成的抑制强度比作为对照品的紫杉醇大 6.5 倍(I 的 IC₅₀ 为 1.12 μg/mL,紫杉醇为 7.4 μg/mL)。进一步的抗癌活性正在评价中。

关键词 紫杉次碱 云南红豆杉 P₃₈₈淋巴细胞白血病

在我们系统地调查研究四川省红豆杉资源的过程中,发现采集于四川省木里县的云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* 树皮中不但含有大量的紫杉醇,且存在有不少紫杉烷类似物,我们致力于分离出其中具有抗肿瘤活性的新类似物。通过深入研究,从中分离得到一微量成分 I,它具有较强的抗肿瘤活性,我们命名其为紫杉次碱(taxoline)。经本所药理室用³H-TDR 掺入法测定,该化合物对 P₃₈₈淋巴细胞白血病 DNA 合成的抑制强度比平行操作的对照品紫杉醇大 6.5 倍(I 的 IC₅₀ 为 1.12 μg/mL,紫杉醇为 7.4 μg/mL)。红豆杉属植物在全世界存在有 11 个种^[1],由于所含紫杉醇优良的抗癌作用,使得该属植物成为天然产物化学家的研究热点,迄今为止共分离出 170 多种紫杉烷类似物,仅在近 6 年间就分离出 115 种^[2]。但药理学家证明:在众多的类似物中,具有生物活性的仅为分子中含有 C₅, C₄, C₂₀ 位的环氧丙烷结构的 10 余种^[1],其中紫杉醇(taxol)活性最强^[1]。我们分出的新紫杉烷类似物被药理初步证明其对白

血病的活性高于紫杉醇,此非常不易。尽管近年来大量的新紫杉烷类似物被分出,但大都没有活性,尤其是活性高于紫杉醇的新类似物国内外未见报道。本文将详述该新类似物的分离纯化及结构解析。

云南红豆杉树皮的乙醇提取物用石油醚、二氯甲烷萃取,将二氯甲烷萃取物进行硅胶柱层析与干柱层析获得该新化合物,mp 184 °C~186 °C,白色结晶性粉末,其 IR 谱显示有羟基(3 450 cm⁻¹),酯酮羰基(1 730, 1 715 cm⁻¹),酰胺基(1 660 cm⁻¹)以及双键(1 605 cm⁻¹)的特征吸收。FABMS 谱显示很强的分子离子峰为 834(MH⁺),结合其¹H 和¹³C-NMR 谱数据分析证明其分子式为 C₄₅H₅₅NO₁₄(具有 17 个不饱和度),DEPT 实验数据证明分子中所有的氢质子除有 4 个未与碳相连外,其余均直接和碳原子相连接。¹³C-NMR 谱有 165.21 ppm 的仲酰胺羰基的碳信号,结合 IR 与 DEPT 数据分析证明分子中应含有 1 个仲酰胺基和 3 个羟基。又根据¹H 与¹³C-NMR 谱分析(δ_c127 ppm~133

* Address: Xu Xuemin, Sichuan Provincial Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu

徐学民 男,研究员,享受政府津贴专家。1982 年华西医科大学药学院研究生毕业,硕士。1990 至 1992 年在美国依阿华大学化学系做访问学者,专攻真菌的活性代谢产物的分离纯化和化学结构测定。已从事中药化学研究 20 余年,国内外发表论文多篇。曾承担国家级、省部级及国际合作项目 5 项,获奖 3 项。近年来主持研究川产紫杉醇的注射剂及其原料药于今年初获得卫生部颁发的新药证书。

[△] 卫生部出国留学回国人员基金资助

ppm 和 δ_{H} 7.4 ppm~8.18 ppm) 证明分子内含有 2 个单取代苯基(详见表 1、2)。 ^{13}C NMR 谱中唯一的 202.43 ppm 信号表明分子中含有 1 个脂环羰基(C_9), 另 172.65, 175.15 ppm 谱线应为 2 个乙酰基的羰基碳信号, 而 168.77 与 169.73 ppm 处的信号表明存在有 2 个酯羰基, 139.46 与 139.65 ppm 谱线应为一个双键的 2 个 SP^2 杂化碳原子信号。 ^1H -NMR 谱 4.98 (dd, $J=2.0, 9.5$) ($\text{H}-5$) 和 4.25, 4.35 ppm (dd, $J=0.5, 8.5$) (H_2-20) 的 3 个氢质子信号和 ^{13}C NMR 谱中的 83.56 (C_5)、74.51 (C_{20}), 80.32 ppm (C_4) 均证明分子中存在有一个环氧丙烷结构。 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱数据及 DEPT 实验结果指出: 化合物存在有 6 个甲基(CH_3) δ_{C} 值分别为 13.87, 9.76, 26.73, 22.35, 11.65, 17.49 ppm; 4 个次甲基(CH_2); 9 个亚甲基(CH); 4 个季碳。以上所有的光谱数据及所获得的结构信息同已知化合物 cephalomannine (II) (三尖杉磷碱) 的几乎一致^[3,4], 所不同的是: (I) 的 FABMS 所测出的分子量比 (II) 恰巧大 2 个质量单位, 且 ^1H 谱上缺乏如 (II) 那样的支链上的 $\text{CH}=\text{C}$ 质子信号以及 ^{13}C NMR 谱未出现支链上双键的碳信号。取而代之的是: ^1H 和 ^{13}C NMR 谱出现一个 $-\text{CH}_2-$ (δ_{H} 1.37, 1.62, δ_{C} 26.19 ppm) 及一个 $-\text{CH}-$ (δ_{H} 2.22, δ_{C} 41.19 ppm) 信号, 最为明显的是在 (I) 的 ^1H NMR 谱上, (II) 中原连在末端双键上的 2 个甲基的 δ_{H} 值大大移向高场 (1.72 ppm~0.93 ppm, 1.81 ppm~1.15 ppm)。以上数据均清晰地说明: 化合物 (I) 是 (II) 的支链上的末端双键被饱和了的产物。它们之间的结构差异仅在于支链上是否存在有一个双键。根据 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 实验结果, 也充分证明了此事实: 即 H_3-8' 与 H_2-7' 以及 H_3-9' 与 $\text{H}-6'$ 有明显的交互作用, 且 H_2-7' 与 $\text{H}-6'$ 也有强烈的交互作用关系。从生源学的角度看, 应由 (I) 脱去 2 个 H 转化成 (II), (I) 是 (II) 的前体。综上所述信息, 紫杉次碱的结构应确定为 (I)。另外, 将 (I) 和 (II) 在相同条件下温

和水解, 从二者水解产物中均检出了主要部分巴苦亭 III (bacactin III) (III), 此证明二者的母核和立体化学等是完全相同的, 结构差异仅在支链上, 此和光谱解析的结论是完全一致的。化合物 I~III 的化学结构式见图 1。

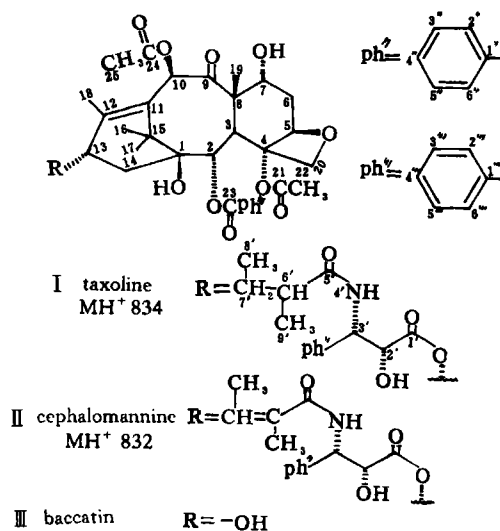


图 1 化合物 I~III 的化学结构式

1 仪器和试剂

熔点按照中国药典 1995 版一部附录 33 页第一法测定, 温度计已校正。红外光谱使用岛津 IR-480 型红外光谱仪和 ALpha Centauri 付里叶红外光谱仪, KBr 压片法。UV 使用日立 UV-3000 型光谱仪, 旋光测定使用 WXZ-1 光学度盘旋光仪。 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱以及 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 二维谱使用 Bruker AMX-400 核磁共振仪, CDCl_3 作溶剂, TMS 作内标。FABMS 谱使用 JMS-SX102 质谱仪; 高效液相色谱分析使用 Waters 840 型高效色谱仪, 5/ μ Nucleoer C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm), 甲醇-水 (65 : 35), 流速 1 mL/min, λ_{max} 227 nm。层析用硅胶为 300 目, 干柱层析使用薄层层析用硅胶 H (青岛海洋化工厂出品), 薄层层析用 5% 磷钼酸乙醇液显色。

云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* 树皮采自四川省木里县, 由本所生药研究室鉴定。

2 提取和分离

将 10 kg 经干燥后的云南红豆杉树皮粉

碎,过 20 目筛。用 95%乙醇渗漉至渗出液近无色。减压回收乙醇后得浸膏状物,以等体积的水稀释,用石油醚(bp 60℃~90℃)萃取(2 L×3),继用二氯甲烷萃取(2 L×4)。合并二氯甲烷萃取液,以无水硫酸钠脱水,回收溶剂,得二氯甲烷提取物(稠膏状)70 g。将此稠膏溶解于 100 mL CHCl₃ 中,置于 1 kg 硅胶(300 目)柱的柱顶,进行柱层析。以 CHCl₃-EtOH(99:1)→(90:10)梯度洗脱,收集洗脱液中含紫杉醇和三尖杉磷碱部分(以 TLC 监控)。回收溶剂后得残余物 10 g。将此样品溶解于 50 mL 氯仿中,挥去部分溶剂后用 30 g 硅胶拌和,挥干溶剂后上于 800 g 薄层层析用硅胶 H 干柱柱顶,以乙酸乙酯-环己烷(3:4)展开。待溶剂展开至柱底后,将柱床中的硅胶 H 轻轻抖出,切割成 10 段。其中的 3、4 段分别用丙酮洗脱,各洗脱物分别再进行一次干柱层析(300 g 硅胶 H),用 50%乙醇结晶,分别获得(Ⅱ)601 mg,(Ⅰ)140 mg。

3 结构鉴定

化合物 Ⅰ:白色结晶性粉末,mp 184℃~186℃,TLC Rf 值为 0.42(环己烷-乙酸乙酯 2:3 作展开剂);呈蓝黑色(磷钼酸乙醇液显色)。 $[\alpha]_D^{20} - 79.48^\circ(c, 0.5148, MeOH)$; $UV\lambda_{max}(MeOH): 230(\log\epsilon, 4.21), 274(\log\epsilon, 3.01) nm$;IR 谱:3 450,2 990,1 730,1 715,1 660,1 630,1 605,1 480,1 250,1 070,980,810 cm^{-1} ; 1H 与 ^{13}C NMR 谱数据见表 1、2。FABMS 谱 $m/z: 834(MH^+)(rel, int\ 26\%), 813(0.5), 788(0.5), 774(3.0), 756(15), 569(12), 551(5.0), 509(22), 491(2.0), 467(1.5), 404(1.0), 388(4.0), 370(6.0), 281(20), 266(55), 248(45), 220(50), 190(17), 105(100), 79(20)$ 。

4 高效液相色谱分析

将紫杉醇,三尖杉磷碱及紫杉次碱各准确称取约 4 mg,合并后置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀后用注射器吸取 10 μL ,注入 HPLC 仪,按前述条件进行 HPLC 分析。3 个成分获得了很好的分离,其

保留时间(t_R)分别是:三尖杉磷碱 16.51 min,紫杉次碱 17.43 min,紫杉醇 19.23 min。

表 1 taxoline 1H NMR 谱解析结果

质子序号	化学位移(ppm)	多重性	质子数	相应基团
2	5.65	d(J=7.2)	1	-CH-O-
3	3.83	d(J=7.1)	1	-CH-
5	4.98	dd(J=2.0,9.5)	1	-CH-O-
	1.87	m		
6	2.60	ddd(6.6,9.8,15)	2	-CH ₂ -
7	4.43	dd(J=6.6,10.5)	1	-CH-O-
10	6.34	s	1	-CH-O-
13	6.25	br. t(J=8.2)	1	-CH-O-
14	2.38	m	2	-CH ₂
16	1.33	s	3	-CH ₃
17	1.22	s	3	-CH ₃
18	1.89	s	3	-CH ₃
19	1.76	s	3	-CH ₃
20	4.25,4.35	dd(J=8.5,8.5)	2	-CH ₂ -O-
22	2.32	s	3	COCH ₃
25	2.41	s	3	COCH ₃
2'	4.75	d(J=7.5)	1	-CH-O-
3'	5.80	d(J=8.8)	1	-CH-N-
4'	6.25	d(J=8.8)	1	-NH-
6'	2.22	m	1	-CH-
7'	1.37,1.62	m	2	-CH ₂ -
8'	0.93	t(J=8.5)	3	-CH ₃ -
9'	1.15	d(J=9.0)	3	-CH ₃ -
Ar-H	7.46	m	5	
Ar-H	7.60	m	2	
Ar-H	7.68	t(J=7.0)	1	
Ar-H	8.18	d(J=7.5)	2	

表 2 taxoline ^{13}C NMR 谱解析结果

碳序号	化学位移(ppm)	碳序号	化学位移(ppm)
1	76.76	23	169.73
2	75.34	24	175.15
3	42.99	25	21.27
4	80.32	1'	168.77
5	83.56	2'	73.51
6	34.71	3'	54.68
7	70.03		
8	57.44	5'	165.21
9	202.43	6'	41.19
10	74.82	7'	26.19
11	139.65	8'	11.65
12	139.46	9'	17.49
13	70.45	1''	133.29
14	36.55	2''	129.58
15	46.14	3''	128.19
16	26.72	4''	127.07
17	22.35	5''	128.19
18	13.87	6''	129.58
19	9.76	1'''	129.58
20	74.51	2'''	128.69
21	172.65	3'''	127.07
22	20.68	4'''	133.38
		5'''	127.07
		6'''	128.69

5 紫杉次碱的水解反应

将紫杉次碱 30 mg 溶解于 4 mL 1% NaHCO₃ 的甲醇-水(3:1)的混合液中,室温放置 5 h。用等量蒸馏水稀释,氯仿萃取(10

mL×4),有机相用水洗2次,无水硫酸钠脱水,蒸干溶剂后残余物溶解于5 mL 甲醇中备用。三尖杉磷碱30 mg 同样用此法水解。共获两种水解物样品。分别取此样品10 μL 注入HPLC 仪,以巴苦亭Ⅲ(bacactin Ⅲ)为对照品(进样浓度为0.5 mg/mL),确定两个水解样品中的巴苦亭Ⅲ的存在。结果证明,(I)和(II)的水解产物中均检出大量的巴苦亭Ⅲ(t_R 为11.24 min),含量分别为水解样品的16.31%和18.21%。此表明,化合物(I)和(II)含有完全相同的母核(包括立体

化学),其结构差异仅在边链上。

致谢: ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱及 ^1H - ^1H COZY,FABMS 均由军事医学科学院仪器测试中心代测;植物样品的采集和鉴定均由本所生药研究室完成。

参考文献

- 1 陈未名. 药学报,1990;25(3):27
- 2 J Z Zhang. 药学报,1995;30(11):862
- 3 Roger W M, et al. J Org Chem,1981;46:1469
- 4 陈未名,等. 药学报,1991;26(10):747

(1997-04-14 收稿)

Isolation and Structural Elucidation of a Bioactive Novel Taxane Taxoline

Xu Xuemin and Yuan Chongjun(Sichuan Institute of Chinese Materia Medica,Chendu 610041)

Abstract A novel taxane,with more potent bioactivity,was isolated from *Taxus yunnanensis*,collected in Molin county,Sichuan Province. It is named taxoline (I). The chemical structure was determined by ^1H NMR, ^{13}C NMR,FABMS,DEPT, ^1H - ^1H COZY spectra and chemical methods. Its inhibition of P_{388} leukaemic lymphocyte was 6.5 times that paclitaxel (IC_{50} 1.2 $\mu\text{g/mL}$ for I ;7.4 $\mu\text{g/mL}$ for paclitaxel). Further estimation of antitumor activity for I is ongoing.

Key Words *Taxus yunnanensis* taxoline .paclitaxel

莲心碱的波谱解析

同济医科大学(武汉 430030) 吴继洲* 阮汉利 王嘉陵
中国科学院昆明植物研究所 孙汉董

摘 要 莲心碱系睡莲科莲属植物莲 *Nelumbo nucifera* 的莲子心中的主要生物碱,具有广泛的抗心率失常作用。过去曾用化学降解法推定其结构,迄今未见对莲心碱结构作详细的波谱解析。为求结构的准确性,作者用2D-NMR 等现代波谱技术,对莲心碱的结构作了详细的解析,其结论与文献所记载的莲心碱的结构完全吻合。

关键词 莲心 莲心碱 结构解析 2D-NMR

莲子心系睡莲科莲属植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 成熟种子的胚芽,具有清心火、固精血之功效,药理作用主要为降压^[1]。据文献报道,中国大陆产莲子心除含有异莲

心碱(isoliensinine)、甲基莲心碱(neferine)等其它生物碱以外,主要含有莲心碱(liensinine)。

关于莲心碱的结构研究,1962 年赵志远

* Address: Wu Jizhou, Tongji University of Medical Sciences, Wuhan

吴继洲 男,1977 年毕业于中国药科大学药学专业,1992~1994 年在日本京都大学药学部作访问学者,获药理学博士学位。1995 年晋升为教授,现为同济医科大学药学院天然药物化学教研室主任,硕士。1979 年至今主要从事中药贝母资源的开发研究,曾获国家中医药局科技进步二、三等奖,湖北省政府科技进步二等奖,卫生部科技进步三等奖;并曾获中国药学会青年科技奖、吴阶平-保罗·杨森医药学研究植物化学专业二等奖。在国内外杂志发表学术论文 30 余篇。1992 年起享受国务院政府特殊津贴。