

• 化学成分 •

补阳还五汤中生物碱类化合物的分离与结构鉴定

吴 军,屠鹏飞*,赵玉英

(北京大学中医药现代研究中心,药学院,北京 100083)

摘要:目的 研究补阳还五汤的抗血栓有效部位及其活性成分。方法 用多种色谱、核磁共振波谱和单晶 X-衍射方法对补阳还五汤水煎液的生物碱类化合物进行了系统的分离和结构鉴定。结果 分离并鉴定了 4 个生物碱类化合物,分别为 *N*-(3'-马来酰亚胺)-5-羟甲基-2-吡咯甲醛(I)、4-氨甲酰基-2-吡咯甲酸(II)、*N*-(1'-*D*-去氧木糖醇基)-6,7-二甲基-1,4-二氢-2,3-喹啉二酮(III)及 2,3,4,9-四氢-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吲哚-3-羧酸(IV)。结论 以上化合物均首次从补阳还五汤中分离得到且化合物 I~III 为新化合物。

关键词:补阳还五汤;生物碱;*N*-(3'-马来酰亚胺)-5-羟甲基-2-吡咯甲醛;4-氨甲酰基-2-吡咯甲酸;*N*-(1'-*D*-去氧木糖醇基)-6,7-二甲基-1,4-二氢-2,3-喹啉二酮

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)07-0965-04

Alkaloids isolated from Buyang Huanwu Decoction and their structure identification

WU Jun, TU Peng-fei, ZHAO Yu-ying

(Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To study the antithrombotic compounds and bioactive fraction from Buyang Huanwu Decoction (BHD). **Methods** Four alkaloids have been isolated from BHD by repeated chromatographies. Their structures were elucidated by means of spectral and single-crystal X-ray diffraction analysis. **Results** They are *N*-(3'-maleimidyl)-5-hydroxymethyl-2-pyrrole formaldehyde (I), 4-carbamoyl-2-pyrrole carboxylic acid (II), *N*-(1'-*D*-deoxyxylitolyl)-6,7-dimethyl-1,4-dihydro-2,3-quinoxalinedione (III), and 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido [3,4-*b*] indole-3-carboxylic acid (IV). **Conclusion**

All these compounds are isolated from BHD for the first time and compounds I - III are new alkaloids.

Key words: Buyang Huanwu Decoction (BHD); alkaloids; *N*-(3'-maleimidyl)-5-hydroxymethyl-2-pyrrole formaldehyde; 4-carbamoyl-2-pyrrole carboxylic acid; *N*-(1'-*D*-deoxyxylitolyl)-6,7-dimethyl-1,4-dihydro-2,3-quinoxalinedione

补阳还五汤为清代名医王清任《医林改错》中的名方,由黄芪、当归、赤芍、地龙、川芎、桃仁、红花组成,具有补气、活血、通络的功效,主治中风后半身不遂、口眼歪斜诸证。现代临床主要用于治疗缺血性脑血管病。为阐明其活性成分,本实验对补阳还五汤水煎液的醋酸乙酯和正丁醇萃取部位的生物碱类化合物进行了分离和结构鉴定,分别为 *N*-(3'-马来酰亚胺)-5-羟甲基-2-吡咯甲醛(I)及 4-氨甲酰基-2-吡咯甲酸(II);从其正丁醇萃取部位分离鉴定了 2 个生物碱类化合物,分别为 *N*-(1'-*D*-去氧木糖醇基)-

6,7-二甲基-1,4-二氢-2,3-喹啉二酮(III)及 2,3,4,9-四氢-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吲哚-3-羧酸(IV)。以上化合物均首次从补阳还五汤中分离得到,且化合物 I~III 为新化合物。

1 仪器和材料

XT_{4A}型显微熔点仪,KYKY-ZHP-5#质谱仪(FAB-MS)和 AEI-MS-50 质谱仪(EI-MS),AL-300 核磁共振仪。Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶为 Pharmacia 公司产品,薄层色谱及柱色谱硅胶为青岛海洋化工厂产品。补阳还五汤中各单味药均

收稿日期:2004-10-11

基金项目:国家“九五”攀登项目(970211018)

作者简介:吴 军,博士研究生,2001 年毕业,现工作单位为中国科学院南海海洋研究所广东省海洋药物重点实验室。

E-mail:wwjun68@163.com

* 通讯作者 屠鹏飞

选用地道药材,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根,购于山西省浑源县医药公司;当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,购于甘肃省岷县医药公司;赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,购于内蒙古自治区多伦医药公司;地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体,购于广东省药材公司;川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,购于成都荷花池药材市场;桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子,购于安国药材市场;红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,购于新疆药材公司。以上药材均由北京大学药学院生药教研室蔡少青教授鉴定和提供,生药标本保存在该教研室。

2 提取和分离

补阳还五汤各单味药按原处方量配伍共 47.5 kg,粉碎后用 6 倍量水煎煮提取 3 次,共得干膏 7 kg。取其中 1 kg 分别用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取。醋酸乙酯萃取物(25 g)经硅胶柱色谱分离,CHCl₃-CH₃OH(100:1~1:2)梯度洗脱得 120 个流份。Fr. 51~57 经硅胶(200~300 目)柱色谱分离,环己烷-氯仿-甲醇-冰醋酸(4:6:1:0.02)洗脱及 Sephadex LH-20(80%MeOH)纯化得化合物 I (10.0 mg)。Fr. 46~50 经硅胶(200~300 目)柱色谱分离,环己烷-氯仿-甲醇-冰醋酸(5:5:1:0.02)洗脱及 Sephadex LH-20(90%MeOH)纯化得化合物 II (8.0 mg)。其正丁醇萃取部分(118 g)经 D-101 大孔吸附树脂柱色谱分离,水、30%乙醇、50%乙醇、80%乙醇梯度洗脱,收集醇洗脱部分浓缩得干膏 85 g。醇洗脱部分经硅胶柱色谱分离,CHCl₃-CH₃OH-H₂O(7:1:0~6:4:1.5)梯度洗脱得 80 个流份。Fr. 19~26 经硅胶(200~300 目)柱色谱分离,CHCl₃-MeOH-H₂O(7:3:0.3)洗脱得 52 个流份,后经 Sephadex LH-20 纯化及 Rp-18 低压柱色谱分离(50%MeOH 洗脱)得化合物 III (100 mg)和 IV (100 mg)。

3 结构鉴定

化合物 I:针状晶体,mp 186~188 °C,分子式 C₁₀H₁₀O₄N₂。EI-MS: *m/z*(M⁺222)。由 EI-MS 结合 ¹³C-NMR 和 ¹H-NMR 分析得出化合物 I 的分子式 C₁₀H₁₀O₄N₂。¹H-NMR δ: 2.67(1H, dd, *J*=17.7, 6.9 Hz), 3.10(1H, dd, *J*=17.9, 9.0 Hz), 5.65(1H, t,

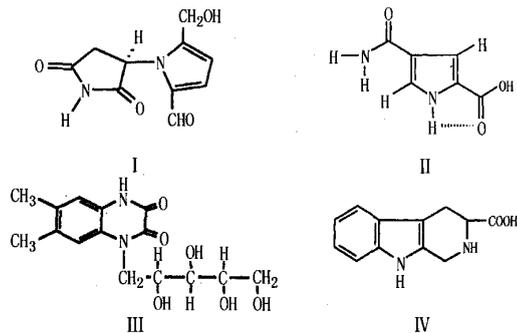


图 1 化合物 I~IV 的结构

Fig. 1 Structures of compounds I - IV

J=8 Hz),为呈 NHCHCH₂ 方式连接的 3 个质子信号;11.34(1H, s)为二酰亚胺环氮上的活泼质子。结合 ¹³C-NMR δ: 37.28 为酯碳;54.80 为与 N 相连叔碳信号,175.32 和 175.19 两个羰基碳可推断化合物中有一丁二酰亚胺环。4.54(2H, d, *J*=5.1 Hz),为呈 -CH₂-O- 方式连接的 2 个质子信号,5.41(1H, t, *J*=5.1 Hz)为邻偶的羟基质子,故化合物 I 存在 CH₂OH 结构片段;6.28(1H, d, *J*=3.9 Hz), 7.13(1H, d, *J*=3.9 Hz)为五元杂环上两个邻偶的烯氢质子;结合 ¹³C-NMR δ: 109.74 和 125.84 为两个连有单个质子的烯碳,131.25 和 144.91 为两个烯季碳,179.04 为醛基碳可推断此化合物中存在 5-羟甲基-2-吡咯甲醛。¹³C-NMR 结合 DEPT 谱证实此化合物共有 10 个碳,其中 54.80 为 NCH 和 -CH₂OH 两个的重叠峰。由于二酰亚胺环上碳 δ54.80 可推断此环通过此碳连接在吡咯环的氮上。以上推断为 ¹H-¹H COSY、HMQC 和 HMBC 谱所进一步证实。

由 HMBC 谱可以看出:H-3'与 C-2、C-5、C-2'、C-4'有远程相关;H-3、H-4 与 C-2、C-5 均有远程相关;醛基氢(H-6)与 C-2 有远程相关;两个 H-7 质子与 C-4、C-5 有远程相关;两个 H-4' 质子与 C-5' 羰基碳和 C-3' 均有远程相关;故此化合物确定为 *N*-(3'-马来酰亚胺)-5-羟甲基-2-吡咯甲醛。此化合物的立体构型最终由单晶 X 衍射确定。

化合物 I 的晶体结构分析:晶体呈无色透明块状,衍射实验用晶体大小为 0.10 mm×0.10 mm×0.20 mm,属单斜晶系,空间群为 P2₁/a,晶胞参数:a=7.752(1), b=12.237(1), c=1.047 6(1) nm, β=90.036°(3),晶胞体积为:V=0.993 77(18) nm³,晶胞内分子数 Z=4。

用 MAC DIP-2030K 面探测仪收集衍射强度数据,MoK α 辐射,石墨单色器,晶体与 IP 板距离 *d*=100 mm,管压 50 kV,管流 90 mA,ω 扫描,最大 2θ

为 50.0° , 扫描范围为 $0^\circ \sim 180^\circ$, 回摆角度为 5° , 间隔为 5° , 扫描速度为 $1.5^\circ/\text{min}$, 每个画面扫描 2 次, 总计摄取 36 幅图象, 独立衍射点为 1 612 个, 可观察点 ($|F|^2 \geq 8\sigma|F|^2$) 为 1 600 个。

在微机上用直接法 (SHELXS-86) 解析晶体结构, 从 E 图上获得全部 16 个非氢原子位置, 使用最小二乘法计算, 并修正结构参数和判别原子种类, 用几何计算法和差值 Fourier 法迭选计算获得全部氢原子位置, 最终可靠因子 $R_f = 0.070$, $R_w = 0.064$ ($w = 1/\sigma^2 |F|$), $S = 4.399$ (Δ/σ) $_{\max} = 0.233$, ($\Delta\rho$) $_{\min} = -3.1 \times 10^{-4} \text{ e/nm}^3$, ($\Delta\rho$) $_{\max} = 4.5 \times 10^{-4} \text{ e/nm}^3$ 。最终确定不对称单位化学计量式为 $C_{10}H_{10}O_4N_2$, 其计算相对分子质量是 222.2, 计算晶体密度是 1.485 g/cm^3 。

结果表明: 化合物 I 是含氮杂环类化合物。晶态下呈外消旋结构, 该分子由 A、B 两个五元杂环组成。其中 A 环(丁二酰亚胺环)为信封式, B 环(吡咯环)为平面环。两个环的二面角为 77.63° 。近于垂直。分子内存在氢键联系: $O_9 \cdots O_6 (x, y, z) 0.284 08 \text{ nm}$, 分子间的氢键联系: $N_1 \cdots O_7 (x + 1/2, 3/2 - y, z) 0.290 79 \text{ nm}$ 。晶体状态下以氢键作用力和范德华力维系其在空间的稳定排列。

化合物 II: 白色粉末, mp $278 \sim 280^\circ \text{C}$, 分子式 $C_6H_6O_3N_2$ 。P-FAB-MS m/z : $177[M + Na]^+$ 。HR-P-FAB-MS (m/z): 理论值 $155.045 114 0[M + 1]^+$, 实测值 $155.045 112 3[M + 1]^+$, 实测值与理论值吻合, 得出分子式 $C_6H_6N_2O_3$ 。 $^{13}\text{C-NMR}$ 给出 6 个碳信号, DEPT 表明其中 $\delta 168.66, 160.51, 125.95$ 和 118.15 为季碳: $\delta 110.58$ 和 122.46 为两个连有单个质子的烯碳。 $^1\text{H-NMR}$ 中 $\delta 6.90(1\text{H}, s), 7.03(1\text{H}, s)$ 为两个烯氢信号, HMQC 谱显示它们分别连接在 110.58 和 122.46 两个烯碳上。HMBC 谱显示 $\delta 6.90(1\text{H}, s)$, 质子与碳 $\delta 118.15, 122.46$ 和 125.95 有远程相关; $7.03(1\text{H}, s)$, 质子与碳 $\delta 118.15, 110.58$ 和 125.95 有远程相关。以上说明化学位移为 $110.58, 118.15, 122.46, 125.94$ 的 4 个烯碳组成环状的 $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{C}-$ 片断, 结合碳谱数据推断为吡咯环系。

$^1\text{H-NMR}$ 上 $\delta 8.28(1\text{H}, \text{br. s}), 8.60(1\text{H}, \text{br. s})$ 为典型酰胺基上的 2 个不等价活泼质子; HMBC 谱显示 $\delta 8.28(1\text{H}, \text{br. s})$ 与碳 $\delta 160.51, 118.15$ 有远程相在。以上信息表明酰胺基通过碳 $\delta 118.15$ 与吡咯环相连。

$^1\text{H-NMR}$ 上 $\delta 12.3(1\text{H}, \text{br. s}$ 为羧基活泼质子), $17.0(1\text{H}, \text{br. s})$ 活泼质子信号为与羰基共轭且形成分子内氢键的结果。故确定此化合物为 4-氨基酰基-2-吡咯甲酸。

化合物 III: 淡黄色粉末, mp $240 \sim 242^\circ \text{C}$, 分子式 $C_{15}H_{20}N_2O_6$ 。FAB-MS m/z : $325[M + 1]^+$ 。HR-P-FAB-MS m/z : 理论值 $325.139 6[M + 1]^+$, 实测值 $325.139 4[M + 1]^+$, 实测值与理论值吻合, 得出分子式 $C_{15}H_{20}N_2O_6$ 。从氢谱和碳谱可以看出此化合物由芳香母核和多元醇两部分组成, 且多元醇部分为五碳醇。

芳香母核部分: 氢谱中可见 $2.18, 2.21$ 两个甲基单峰信号, 对应甲基碳的化学位移分别为 $18.7, 19.3$, 说明它们为连接在芳香母核上的甲基。由碳谱可见芳香母核共 8 个碳信号, 结合 DEPT 谱知其中有 2 个叔碳和 6 个季碳, 且此 8 个碳信号可明显划分为化学位移值相近的两组峰, 推测母核为对称结构。 $\delta 155.7$ 和 153.8 为 2,3-哌嗪二酮的两个羰基信号。 $10.87(1\text{H}, s)$ 为 2,3-哌嗪二酮氮上的活泼氢信号。HMQC 结合 HMBC 进一步推定芳香母核为 6,7-二甲基-1,4-二氢-2,3-喹啉二酮。

表 1 化合物 III 的多元醇部分及木糖醇的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据
Table 1 $^{13}\text{C-NMR}$ data of compound III polyhydric alcohol fragment and xylitol

碳位	多元醇部分 (DMSO)	多元醇部分 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	木糖醇 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)
1	44.6	46.4	65.9
2	68.1	71.3	75.2
3	72.7	75.2	73.9
4	73.6	74.5	75.2
5	63.5	65.1	65.9

多元醇部分: $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 结合 HMQC 谱可推定多元醇部分为 1 位氮取代去氧四羟基-五碳醇。将此部分碳信号与木糖醇文献碳谱数据^[1]对照(表 1), 1 位碳向高场位移 $\delta 19.5$, 2 位碳向高场位移 3.9 , 3 位碳向低场位移 1.3 , 符合氮苷苷化位移规律, 故确定为 1 位氮取代去氧木糖醇。根据多元醇 $\delta 44.5$ 的碳信号可进一步推断多元醇部分是通过碳氮键与芳香母核相连的。由 HMBC 谱可以看出: H-5 与 C-6、C-4a、C-6- CH_3 有远程相关; H-8 与 C-7、C-8a、C-7- CH_3 有远程相关; C-7- CH_3 与 C-6、C-7、C-8 有远程相关; C-6- CH_3 与 C-6、C-7、C-5 有远程相关; H-1' 与 C-8a、C-2' 有远程相关; C-2'-OH 与 C-2'、C-3' 有远程相关; C-4'-OH 与 C-4 有远程相关。根据以上数据及 2D-NMR 相关谱推断化合物 III 的结构为 *N*-(1'-*D*-去氧木糖醇基)-6,7-二甲基-1,4-二氢-2,3-喹啉二酮。

化合物 *N*: 黄色粉末, mp 285~289 °C, 分子式 $C_{12}H_{12}N_2O_2$ 。EI-MS、 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据与文献报道^[2]完全一致, 且氢谱与标准图谱吻合很好, 故此化合物鉴定为 2,3,4,9-四氢-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吲哚-3-羧酸。

4 讨论

本实验分离得到的生物碱因其量较低而没有对它们进行来源分析。笔者初步认为它们应该来源于单味药材。因生物碱类化合物水溶性较好, 在复方各单味药合煎时溶出率较高, 且合煎时不同类物质之间存在相互促进作用。这一观点基本上符合中医复方思想, 同时也说明单味药醇提物较难分离得到以

上单体化合物。

致谢: 核磁共振波谱测定由本校医药分析中心乔良老师完成; 质谱测定由中国科学院化学研究所质谱室完成; 单晶 X 衍射由中国医学科学院药物研究所 X 衍射室完成。补阳还五汤各药材均由北京大学药学院生药教研室蔡少青教授鉴定和提供。

References:

- [1] Khetwal K S, Mani N, Pant N. Constituents of high altitude Himalayan herbs: Part XI—Xylitol and lignan from *Bupleurum tenue* [J]. *Indian J Chem*, 2000, 39B: 448-450.
- [2] Peng J P, Qiao Y Q. Nitrogen-containing compounds from *Allium macrostemon* Bunge. and *Allium chinese* G Don. [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1995, 5(2): 134-139.

Non-alkaloids in *Hippeastrun vittatum*

WANG Guang-shu¹, ZHAO Mei-rong², YANG Xiao-hong^{1*}, XU Jing-da¹

(1. College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Third Institute of Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective To investigate the non-alkaloid constituent of *Hippeastrun vittatum* (Amaryllidaceae). **Methods** Solvent extraction and column chromatography were used to isolate the non-alkaloid constituents, and physicochemical constants and spectroscopic analysis were employed for structural elucidation. **Results** Five glycosphingolipids were isolated, and their structures were elucidated to be (2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*Z*)-2-[(2*R*-2-hydroxyhexadecanoyl) amido]-4, 8-octadecadiene-1, 3-diol 1-*O*-β-*D*-glucopyranoside (I), (2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*E*)-2-[(2*R*-2-hydroxyhexadecanoyl) amido]-4, 8-octadecadiene-1, 3-diol 1-*O*-β-*D*-glucopyranoside (II), (2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*Z*)-2-[(2*R*-2-hydroxyoctadecanoyl) amido]-4, 8-octadecadiene-1, 3-diol 1-*O*-β-*D*-glucopyranoside (III), (2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*E*)-2-[(2*R*-2-hydroxyoctadecanoyl) amido]-4, 8-octadecadiene-1, 3-diol 1-*O*-β-*D*-glucopyranoside (IV), (2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*Z*)-2-[(2*R*-2-hydroxyicosadecanoyl) amido]-4, 8-octadecadiene-1, 3-diol 1-*O*-β-*D*-glucopyranoside (V), respectively. **Conclusion** They are all isolated from the fresh bulbs of *H. vittatum* for the first time.

Key words: Amaryllidaceae; *Hippeastrun vittatum* (L'Herit.) Herb.; glycosphingolipids

花朱顶红中非生物碱类成分研究

王广树¹, 赵美蓉², 杨晓虹^{1*}, 徐景达¹

(1. 吉林大学药学院, 长春 130021; 2. 吉林大学三院, 长春 130021)

摘要: 目的 研究石蒜科植物花朱顶红中非生物碱类成分。**方法** 采用大孔树脂、硅胶、ODS 柱色谱分离纯化, 理化常数、光谱学方法鉴定结构。**结果** 分离得到了 5 个葡糖鞘脂类成分, 其结构分别鉴定为 (2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*Z*)-2-[(2*R*-2-羟基十六酰)氨基]-4, 8-十八二烯-1, 3-二醇 1-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 (I)、(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*E*)-2-[(2*R*-2-羟基十六酰)氨基]-4, 8-十八二烯-1, 3-二醇 1-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 (II)、(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*Z*)-2-[(2*R*-2-羟基十八酰)氨基]-4, 8-十八二烯-1, 3-二醇 1-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 (III)、(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*E*)-2-[(2*R*-2-羟基十八酰)氨基]-4, 8-十八

收稿日期: 2004-10-05

作者简介: 王广树(1963-), 男, 山东汶上人, 教授, 主要从事天然药物的研究。

Tel: (0431)5648631 E-mail: wangguangshu1001@163.com

* 通讯作者 杨晓虹 Tel: (0431)5619706