

椿根皮中生物碱及苦木素类化合物的分离与鉴定

齐鑫, 陈智华, 高璐, 徐丽丽, 于波*, 杨红

辽宁师范大学生命科学学院 辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 辽宁 大连 116029

摘要: 目的 利用色谱法分离与鉴定椿根皮 *Ailanthus altissima* 的化学成分。方法 采用乙醇提取法对椿根皮进行回流提取, 应用制备液相色谱法对椿根皮粗提物进行分离纯化, 分离化合物的结构由质谱和核磁共振氢谱、碳谱鉴定。结果 分离纯化得到臭椿苦酮(1)、臭椿辛内酯 A(2) 和一新化合物铁屎米酮糖酯(3), 且质量分数均在 95% 以上, 化合物 3 为一个新的 β -卡波琳生物碱。结论 该法可以快速、准确地对椿根皮中含量较低的化合物进行提取与鉴定。

关键词: 椿根皮; 苦木素; β -卡波琳生物碱; 铁屎米酮糖酯; 高效液相制备色谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1057-04

Isolation and structure identification of alkaloid and quassinoids from root bark of *Ailanthus altissima*

QI Xin, CHEN Zhi-hua, GAO Lu, XU Li-li, YU Bo, YANG Hong

Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery, College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

Abstract: Objective Isolation and identification of chemical components from the root bark of *Ailanthus altissima* by HPLC method.

Methods Crude products which were extracted with ethanol were separated and purified by preparative HPLC, and the structures of the compounds were identified by mass spectrometry (MS), $^1\text{H-NMR}$, and $^{13}\text{C-NMR}$. **Results** Under the above conditions, ailanthone (1), shingulactone A (2), and a new β -carboline alkaloid (3) were successfully obtained, and the purities of the compounds are all above 95%. **Conclusion** A rapid and simple method is set up to isolate and identify lower content components from *A. altissima*.

Key words: the root bark of the *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle; quassinoid; β -carboline alkaloid; carboline alkaloid; preparative HPLC

臭椿 *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, 又名椿树和木砮树, 苦木科樗树属落叶乔木, 因叶基部腺点散发臭味而得名。臭椿喜光、耐寒、抗病虫害, 有化感物质分泌^[1]。臭椿树皮、根皮、果实均可入药, 具有清热燥湿、止泻止血之功效, 用于治疗胃及十二指肠溃疡等病症^[2-3]。近年来, 椿根皮中化合物的药理研究表明, 该植物还具有一定的抗癌活性和抑菌活性^[4-5]。

文献报道椿根皮的化学成分多为生物碱、三萜类化合物, 其中三萜类化合物多为苦木素类化合物, 同时, 从该植物中也分离出一些黄酮类化合物^[6]。据报道生物碱和苦木素类化合物的药用价值较高, 临床作用明确, 疗效确切, 分别具有抗癌活性和抗病毒活性, 是椿根皮成分中研究的重点对象。提取椿根皮中化合物多采用硅胶柱色谱法, 但此类方法操

作繁琐。本实验采用高效液相制备色谱, 对椿根皮粗提物中含量低的弱极性成分进行分离纯化, 操作简便、产物纯度高。通过此法, 得到了 3 种高纯度化合物, 经鉴定为臭椿苦酮(1)、臭椿辛内酯(2)和一种新的生物碱(铁屎米酮糖酯, 简称 CGF, 3)。 β -卡波琳类生物碱分布于自然界中具有广泛的药用价值, 近年来对 β -卡波琳生物碱的活性研究多集中在抗肿瘤、抗血小板凝聚和抗病毒等方面, 如新发现的具有抗菌、抗肿瘤和 HIV 逆转录酶抑制作用的 lavendamyne、具有抗肿瘤活性的骆驼蓬碱等^[7]。本实验新发现的 β -卡波琳生物碱为药物活性的研究和制剂的质量控制提供了物质基础, 本研究也为新化合物的发现提供了新的技术方法。

1 仪器与试剂

Waters2695 分析型高效液相色谱仪(美国 Waters

收稿日期: 2010-12-17

基金项目: 大连市科技局科技计划项目(2008E11SF162)

作者简介: 齐鑫, 硕士。Tel: (0411)82159113 E-mail: killerthis@163.com

公司), 制备型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Waters2996 二级管阵列检测器, Quattro Micro 质谱仪(美国 Waters 公司), SZ—97 自动三重蒸馏水器(上海亚荣生化仪器厂), 高速冷冻离心机(Microfuge® 22R Centrifuge, Beckman Coulter, 德国), D101 型大孔树脂, VarioELCHNS—O 元素分析仪(德国 Elementar 公司)。500 MHz 超导核磁共振仪(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)(AVANCE 500 MHz 型, 瑞士 Bruker 公司)。

HPLC 所用甲醇、乙腈均为色谱纯(Honeywell), 乙醇、甲酸为分析纯(天津市凯信化学工业有限公司), 水为自制三蒸水。

药材购于吉林省仙草医药药材有限公司, 经大连医科大学药学院刁云鹏鉴定为椿根皮 *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle。

2 方法

2.1 椿根皮粗提物制备

椿根皮药材充分干燥, 粉碎(过 100 目筛), 得椿根皮粉末 1 kg。每 30 g 加 200 mL 95%乙醇水浴回流提取 12 h, 合并提取液, 旋转蒸发浓缩成浸膏 56.4 g, 待用。

将预处理的 D-101 型大孔吸附树脂湿法装柱(树脂量为 250 mL, 径高比为 1:12), 乙醇清洗至洗出液无白色浑浊, 蒸馏水洗柱至无醇味, 备用。

称取椿根皮浸膏 30 g, 加入少量乙醇溶解后加 200 mL 三蒸水, 超声溶解 20 min, 旋转蒸发至无醇味, 得到的椿根皮溶液经 D-101 型大孔树脂分离, 按 30%、50%、70%、100%甲醇梯度洗脱, 接收各洗脱流分, 减压浓缩至浸膏, 真空干燥得深棕色粉末, 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 样品处理

将上述各流份以色谱流动相溶解, 超声 30 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 制成待测样品。

2.3 色谱条件

将处理好的样品按如下色谱条件分析: 分析型 HPLC XTerra C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm), 流动相 A-0.2%甲酸水溶液、B-乙腈, 梯度洗脱: 0~40 min, 3%~30%B; 40~50 min, 30%~100%B; 体积流量为 0.2 mL/min, 检测波长为 240~600 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。

根据分析型 HPLC 所测结果确定所要分离的粗提物, 按如下色谱条件制备: 制备型 HPLC XTerra C₁₈ 色谱柱(150 mm×19 mm, 5 μm), 流动相 A-0.1%

甲酸水溶液、B-0.1%甲醇溶液; 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~25% B; 10~20 min, 25%~35% B; 20~40 min, 35%~50% B; 40~45 min, 50%~100% B; 45~50 min, 100%B; 体积流量为 10 mL/min; 检测波长为 245、375 nm, 柱温为室温, 进样量为 800 μL。将制备后收集的各组分经旋转蒸发浓缩(温度 50 °C), 真空干燥(温度 50 °C, 压力 900 Pa), 得到化合物 1、2、3, 待测。

2.4 质谱条件

电喷雾离子源 ESI⁺模式; 载气为 N₂, 体积流量为 500 mL/min, 温度为 300 °C; 锥孔电压为 25 V; 毛细管电压为 3 kV; 源温度为 120 °C; 质谱扫描范围 *m/z* 为 50~1 000。

3 结果

3.1 椿根皮粗提物制备方法的选择

本实验旨在研究椿根皮中含量低的强极性化合物, 对经 D-101 大孔树脂分离后收集的各流份采用“2.3”项的条件进行 HPLC 检测, 确定 50%甲醇洗脱流份即为待分离的椿根皮粗提物。

3.2 制备型 HPLC 分离纯化结果

将“2.1”项所得椿根皮样品溶液按照“2.2”项所述步骤进行分离, 分别收集 14~15、23~25、44~46 min 的流份, 得到化合物 1~3, 制备色谱如图 1 所示。

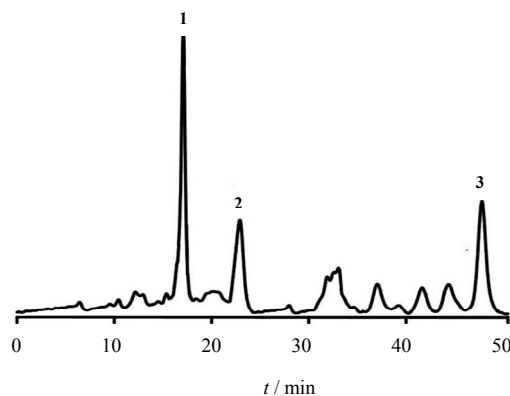


图 1 椿根皮粗提物制备色谱图

Fig. 1 Preparative chromatogram of crude extract from *A. altissima*

3.3 质量分数测定

分别取化合物 1~3, 以分析色谱流动相溶解配制成 1 μg/mL 待测液, 按照“2.3”项所建立的色谱分析条件检测, 其出峰时间分别为 17.28、23.72、36.23 min, 面积归一化法测得 3 种化合物的相对质量分数为 97.89%、99.28%、98.22%。

3.4 结构鉴定

化合物 **1**: 无色粉末, $C_{20}H_{24}O_7$, ESI-MS m/z : 376。 1H -NMR (C_5D_5N , 500 MHz) δ : 4.58 (1H, s, H-1), 6.13 (1H, br s, H-3), 3.12 (1H, br d, $J = 12.3$ Hz, H-5), 2.22 (1H, br d, $J = 15.3$ Hz, H-6 α), 2.03 (1H, br dd, $J = 15.3, 12.3$ Hz, H-6 β), 4.66 (1H, br s, H-7), 3.58 (1H, s, H-9), 4.49 (1H, s, H-12), 2.86 (1H, dd, $J = 13.5, 5.7$ Hz, H-14), 3.73 (1H, dd, $J = 18.5, 13.5$ Hz, H-15 α), 2.94 (1H, dd, $J = 18.5, 5.5$ Hz, H-15 β), 1.77 (3H, br s, H-18), 1.56 (3H, s, H-19), 4.13 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-20 α), 3.68 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-20 β), 5.29 (1H, br s, H-21 α), 5.20 (1H, s, H-21 β); ^{13}C -NMR (C_5D_5N , 100 MHz) δ : 84.4 (C-1), 197.4 (C-2), 126.2 (C-3), 162.2 (C-4), 424.8 (C-5), 26.2 (C-6), 78.6 (C-7), 45.7 (C-8), 48.0 (C-9), 45.6 (C-10), 110.4 (C-11), 80.7 (C-12), 147.5 (C-13), 42.5 (C-14), 35.3 (C-15), 169.5 (C-16), 22.4 (C-18), 10.3 (C-19), 72.2 (C-20), 118.1 (C-21)。依据以上数据, 可初步推断该化合物为苦木内酯类化合物, 其 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 与文献报道^[8]基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为臭椿苦酮。

化合物 **2**: 无色菱片状结晶, $C_{20}H_{26}O_7$, ESI-MS m/z : 378。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 3.31 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1), 3.82 (1H, br s, H-2), 5.37 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-3), 2.20 (1H, br s, H-5), 1.85 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-6 α), 1.8 (1H, dd, $J = 15.0, 2.1$ Hz, H-6 β), 4.49 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, H-7), 2.50 (1H, br s, H-9), 3.67 (1H, s, H-12), 2.72 (1H, dd, $J = 13.5, 5.3$ Hz, H-14), 2.87 (1H, dd, $J = 18.2, 13.1$ Hz, H-15 α), 2.46 (1H, dd, $J = 18.5$ Hz, H-15 β), 1.61 (3H, s, H-18), 1.09 (3H, s, H-19), 3.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-20 α), 3.25 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-20 β), 5.02 (1H, br s, H-21 α), 5.04 (1H, br s, H-21 β); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 82.3 (C-1), 71.1 (C-2), 125.8 (C-3), 133.6 (C-4), 43.5 (C-5), 25.0 (C-6), 78.0 (C-7), 44.5 (C-8), 40.3 (C-9), 40.8 (C-10), 108.8 (C-11), 79.1 (C-12), 146.5 (C-13), 46.0 (C-14), 34.2 (C-15), 169.1 (C-16), 20.8 (C-18), 9.59 (C-19), 71.2 (C-20), 117.6 (C-21)。依据以上数据, 其 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 与文献报道^[9]基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为臭椿辛内酯 A。

化合物 **3**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 542, 元素分析实验值 (%): C 47.08, H 53.39, N 4.227。根据质量分数与元素分析值可判断出化合物 **3** 分子

式为 $C_{26}H_{26}N_2O_{11}$ 。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 8.70 (1H, s, H-2), 8.55 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 8.44 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-11), 8.13 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4), 7.76 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-9), 7.61 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-10), 6.87 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 149.41 (C-1), 134.22 (C-2), 139.29 (C-4), 125.59 (C-5), 159.31 (C-6), 115.96 (C-8), 129.87 (C-9), 125.65 (C-10), 125.12 (C-11), 122.87 (C-12), 117.01 (C-13), 130.48 (C-14), 132.64 (C-15), 137.84 (C-16)。以上核磁信息可推断该化合物为苦木科特征化合物, 生物碱类化合物的一种, 为铁屎米-6 酮型化合物, 其中铁屎米-6 为该化合物的母核^[10]。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 5.47 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-2'), 4.37 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-6'), 4.05 (1H, m, H-3'), 3.81 (1H, m, H-5'), 3.55 (1H, t, $J = 8.25$ Hz, H-4'), 3.41 (2H, t, $J = 8.00$ Hz, H-7'); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 100.45 (C-2'), 75.96 (C-3'), 73.24 (C-4'), 69.61 (C-5'), 73.99 (C-6'), 62.90 (C-7')。以上信息可推出葡萄糖基 (glucosyl group) 结构的存在, 且以 2'-1 与 cantin-6-one 连接。根据 1H -NMR δ : 2.50~2.23 (H-2'', 4''), 1.15 (3H, s, 3''-CH₃); ^{13}C -NMR δ : 170.36 (C-1'', 5''), 45.96 (C-2'', 4''), 68.81 (C-3''), 27.72 (3''-CH₃) 推测结构中含有脂肪酸侧链, 且以 1''位上的羧酸与葡萄糖环 7'上的羟基发生酯化反应形成糖脂。将以上核磁信息与文献报道^[11]进行对比, 确定此化合物为一新化合物, 命名为 1-{6-[(4, 6-dihydroxy-4-methylhepta-dien-2-yloxy)methyl]-thetrahydro-3,4,5-trihydroxy-2H-pyran-2-yloxy}-6H-indolo [3,2,1-*ij*] [1, 5] naphthyridin-6-one。其结构见图 2, 命名为铁屎米酮糖脂。

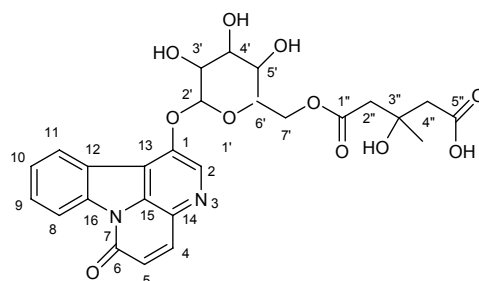


图2 化合物 **3** 的结构图

Fig. 2 Structures of compound **3**

4 结论

硅胶柱色谱法等传统分离技术操作繁琐、周期长, 适于纯化高含量的化合物, 纯度检测使用薄层

色谱法, 此法灵敏度低、展开剂选择复杂、难以准确测定目标峰纯度, 高效液相制备色谱有效弥补了上述方法的缺陷, 其操作快速简便、易于自动化、溶剂消耗少, 可以提取含量很少的目标峰, 且一次纯化就可得到高纯度的化合物。

本实验采用乙醇回流法对椿根皮进行提取, 经大孔树脂初步分离, 用高效液相色谱制备。该实验的路线优点为: 提取效率高、消耗时间少、产物纯度高。利用此路线得到了 3 种高纯度的化合物, 经质谱和核磁联合鉴定为臭椿苦酮、臭椿辛内酯 A 和铁屎米酮糖酯, 其中铁屎米酮糖酯为首次发现的新化合物。本研究采取的实验方法适用于天然产物中微量化合物的提取分离, 为椿根皮药用基础研究提供了新的质量标准。

参考文献

- [1] De Feo V, DeMartino L, Quaranta E. Isolation of phytotoxic compounds from tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* Swingle) [J]. *Agric Food Chem*, 2003, 51(5): 1177-1180.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [3] Pascual-Villalobos M J, Robledo A. Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants [J]. *Ind Crops Prod*, 1998, 8(3): 183-194.
- [4] 全国中草药汇编组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [5] Shkila R, Narihiko F, Masayoshi O. Anti-tuber-culosis activity of quassinoids [J]. *Chem Pharm Bull*, 1997, 45(9): 1527-1529.
- [6] Yu R M, Lin S X, Zhang W C. Progress in studies on bitter principles during 1985—1993 [J]. *Chin Med Chem*, 1994, 4(5): 224-232.
- [7] 蒙奇森, 梁洁, 吴贵凡, 等. 生物碱类化合物药理研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2003, 14(11): 700-702.
- [8] Kubota K, Fukamiya N, Hamada T, et al. Two new quassinoids, ailantinols A and B, and related compounds from *Ailanthus altissima* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(7): 683-686.
- [9] Tattfushi M, Ioshi H. Structure determination of bitter principles in *Ailanthus altissima*. Structure of ahinjulaction A and revised structure of ailanthone [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 1983, 56(12): 3694-3698.
- [10] Li H Y, Kolke K, Ohmoto T. Studies on the alkaloids of *Picrasma quaassoides* Bennet. Part 11. New alkaloids, pic-rasidines W, X, and Y from *Picrasma quaassoides* and X-ray crystallographic analysis of picrasidine Q [J]. *Chen Pharm Bull*, 1993, 41(10): 1807-1811.
- [11] Yoshimura S, Ishibashi M, Tsuyuki T. Constituents of seeds of *Ailanthus altissima* Swingle. Isolation and structures of shinjuglycosides A, B, C, and D [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 1984, 57(9): 2496-2501