

文章编号 :1009-038X(2002)02-0176-03

白首乌中 C_{21} 甾元 的分离与结构鉴定

宋俊梅¹, 陶冠军², 汤 坚², 丁霄霖²

(1. 山东轻工业学院 食品科学与工程系, 山东 济南 250100 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要:进行了白首乌中 C_{21} 甾元的分离和结构鉴定. 首先从白首乌中提取了 C_{21} 甾元, 通过酸解和进一步提取得到 C_{21} 总甾元. 总甾元再经色谱分离和制备, 得两种甾元, 通过红外、质谱、核磁共振谱分析, 确定两种甾元分别为告达庭甾元和开德甾元.

关键词:白首乌, C_{21} 甾元, 分离, 鉴定

中图分类号: O 629

文献标识码: A

Isolation and Characterization of C_{21} steroidal aglycones from *Cynanchum auriculatum*

SONG Jun-mei, TAO Guan-jun, TANG Jian, DING Xiao-lin

(1. Department of Food Science and Technology, Shangdon Institute of Light Industry Jinan 250100, China; 2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The C_{21} steroidal aglycones in Baishouwuw were isolated and characterized. The C_{21} steroidal glycosides extracted in advance from Baishouwuw were acidolyzed and the general aglycones were extracted. Two kinds of aglycones were obtained after chromatography analysis and preparation. The two kinds of aglycones were determined as caudatin and kidjolanin by infrared spectroscopy, mass spectroscopy, and nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Key words: *Cynanchum auriculatum*; C_{21} steroidal aglycones; separation; determination

白首乌(*Cynanchum auriculatum*)是临床常用的补益和抗衰老中药,自古以来就被视为摄生防老、益精养颜的珍品.现代科学研究表明, C_{21} 甾元是其主要的活性成分^[1~3].虽对 C_{21} 甾元的结构已有初步的研究报道^[4],但至今未见其相应的图谱.为了深入探讨 C_{21} 甾元的药理作用机制,对白首乌中的 C_{21} 甾元进行了提取,并对其 C_{21} 甾元进行了分离与结构鉴定.

1 材料与方法

1.1 C_{21} 甾元的提取

取滨海首乌制品厂生产的首乌饮片 500 g,磨碎,用 1.5 L 95% 的工业乙醇加热回流 3 h,过滤,得滤液.滤渣再用工业乙醇提取两次,分别得滤液.3 次提取所得的滤液合并,减压浓缩.浓缩物进行冷冻干燥,得 95% 乙醇回流提取物(A) 62.89 g.分别取少许进行 Liebermann-Burchard 反应和 Keller-

收稿日期 2001-09-28; 修订日期 2001-12-28.

作者简介:宋俊梅(1964-),女,山东临邑人,工学博士,副教授.

万方数据

Kiliani 反应试验,均为极弱的阳性。将此提取物溶于 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})$ 为 9:1 的溶液中,用石油醚振荡脱脂 3 次,萃取液减压浓缩回收甲醇,然后再加足量的蒸馏水,以氯仿进行多次萃取。将氯仿萃取液合并,浓缩至小体积后滴加于石油醚中,搅拌分散析出沉淀物,经过滤干燥得总甾元(B)11.85 g。取少许进行 Liebermann-Burchard 反应试验,呈强阳性,反应呈现红色→棕红色→灰紫色→蓝紫色→蓝色→蓝绿色→污绿色的颜色变化,说明含有甾体母核。另取少许进行 Keller-Kiliani 反应试验,也呈强阳性,反应体系上层淡蓝色,下层棕色,界面呈现紫色→蓝色→草绿色的颜色变化,说明含有 2-去氧糖。因而指示白首乌总甾中具有甾元类。通过两次甾元特征性反应强度的比较得知,提取物 A 中甾元含量较低,而经过溶剂处理后的提取物 B 则甾元含量明显升高,具有显著的甾元特征反应^[5~7]。

1.2 C_{21} 甾元的酸解与两种甾元的分离

1.2.1 C_{21} 甾元的酸解及总甾元的获得 取总甾元(B)6.000 g 溶于 50 mL 甲醇中,加入 0.1 mol/L 的硫酸溶液 15 mL,水浴回流 40 min,加入预热的蒸馏水 50 mL,再继续加热回流 10 min,减压浓缩,回收甲醇。析出的沉淀用乙醚溶解,水相再用乙醚萃取多次,合并所有乙醚液,用 5% 的碳酸氢钠溶液冲洗脱酸,再用蒸馏水洗至中性,经无水硫酸钠干燥,蒸去溶剂得总甾元(C)2.197 g。经试验, Liebermann-Burchard 反应阳性, Keller-Kiliani 反应阴性,提示白首物甾元的 2-去氧糖部分已经酸解除去,提取物 C 为白首乌甾元^[8]。

1.2.2 C_{21} 甾元的柱层析分离 取青岛海洋化工厂生产的柱层析用硅胶(pH 6.1,粒度 100~200 目)过 100 目筛的筛下物再过 120 目筛,取筛上物,得 100~120 目的硅胶。120 °C 烘箱中活化 24 h,以 $V(\text{石油醚}):V(\text{氯仿})$ 为 1:1 的溶液混合硅胶装柱于直径 2.5 cm,长 40 cm 的玻璃层析管中。再以此溶液冲柱平衡 3 h。取总甾元 C 2.000 g 溶于少量氯仿中与 3 倍量硅胶混合,常压除去溶剂,待完全干燥装于柱顶,行硅胶柱层析。依次用 $V(\text{石油醚}):V(\text{氯仿})=1:1$,氯仿, $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=99:1$ 、98:2、95:5、9:1 和甲醇共 7 个梯度进行洗脱。体积流量为 1.25 mL/min,每梯度洗脱剂 250 mL,每流份 25 mL 进行部分收集。

1.2.3 洗脱液的薄层检查及甾元的取得 取江苏福山生化试剂厂生产的硅胶 G 薄层层析预制板(10 cm×20 cm),对柱层析取得的各流份分别进行薄层检查。展开剂为 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=19:1$,显

色剂为 20% 的硫酸乙醇溶液。测量计算各流份斑点的比移值 R_f ,合并相同流份,分别进行减压浓缩,真空烘箱干燥。各干燥品经 Liebermann-Burchard 反应测得一目的物 P,质量为 0.204 g,在展开剂 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=19:1$ 中的 R_f 值为 0.276,由洗脱液 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=98:2$ 的部分取得。

1.3 柱层析样品的高压液相(HPLC)分析及甾元单体的制备

1.3.1 仪器组成 Waters 510 泵,Waters 490 多波长 UV 检测器;Waters U6K 进样器(进样环为 2 mL);HP3396A 积分仪。

1.3.2 分析条件

1) 分析实验

流动相组成: $V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇})=85:15$;色谱柱:Lichrosorb 4.6 mm×250 mm;体积流量:1 mL/min;检测波长 228 nm。

2) 制备实验

流动相组成: $V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇})=90:10$;色谱柱: μ PORASIL 7.9 mm×300 mm;体积流量:3 mL/min;检测波长 228 nm。

1.3.3 实验方法 以柱层析取得的目物 P 首先进行 HPLC 分析实验。将收集的各峰进行质谱鉴定,得可能甾元 D 和 E。进一步进行 HPLC 制备实验,得化合物 D 和 E。

1.4 两种甾元的结构鉴定

1.4.1 质谱条件 Finnigan MAT 4610,美国菲尼根公司产品;进样方式:DEP 0~1 000 mA,500 mA/s;电离方式 EI;电子能量 50 eV;质量范围 33~480 amu。

1.4.2 红外光谱条件 Bio-Rad FTS175 傅立叶红外分光光度计,美国伯乐公司产品。

1.4.3 核磁共振条件 FX90Q 核磁共振仪,日本电子公司产品;氢谱 90 MHz,谱宽 900 Hz。

2 结果与讨论

2.1 化合物 D

IR 3460,2965,1712,1643,1465,1390,1352,1226,1170,1051,985 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ,TMS 内标 $\chi \times 10^{-6}$): δ 1.07(6 H,d,J=7 Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$),1.16(3 H,s, $\text{C}_{19}-\text{CH}_3$),1.42(3 H,s, $\text{C}_{18}-\text{CH}_3$),2.13(3 H,s, $=\text{C}-\text{CH}_3$),2.18(3 H,s, $\text{C}_{21}-\text{CH}_3$),3.60(1 H,m, $\text{C}_3-\alpha\text{H}$),4.57(1 H,t,J=7.5 Hz, $\text{C}_{12}-\alpha\text{H}$),5.38(1 H,br, $\text{C}_6=\text{CH}$),5.53(1 H,s, $-\text{CH}=\text{C}$);MS m/z :447(M^+-COMe),429

(447 - H₂O), 411(429 - H₂O), 362(M⁺ - H₂O - Ikem), 344(362 - H₂O), 326(344 - H₂O), 319(362 - COMe), 301(319 - H₂O), 283(301 - H₂O), 265 (283 - H₂O), 181, 175, 161, 145, 121, 111(基峰, Ikem) 43. 据以上波谱数据推断, 并与文献[4]对照, 确定化合物 D 为告达甾元(caudatin).

2.2 化合物 E

IR(KBr): 3454, 2932, 1711, 1639, 1579, 1450, 1173, 1047, 982, 770 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃, TMS 内标)(× 10⁻⁶): δ 1. 17(3H, s, C₁₉-CH₃), 1. 49 (3H, s, C₁₈-CH₃), 2. 22(3H, s, C₂₁-CH₃), 3. 52 (1H, m, C₃-αH), 4. 72(1H, t, J = 7. 5 Hz, C₁₂-αH) 5. 40(1H, br, C₆ = CH), 6. 31(1H, d, J = 16 Hz, -CH=), 7. 64(1H, d, J = 16 Hz, -CH=), 7. 27~7. 56(5H, m, 芳香氢); MS m/z : 467(M⁺ - COMe) 431(449 - 2H₂O), 362(M⁺ - H₂O - Cin), 344(362 - H₂O), 319(362 - COMe), 301(319 - H₂O), 283(301 - H₂O), 265(283 - H₂O), 181, 145, 131(基峰, C_{in}), 103(131 - CO) 43. 由以上波谱数

据推断, 并与文献[4]对照, 确定化合物 E 为开德甾元(kidjolanin).

3 结 论

以上两种化合物的结构如图 1 所示.

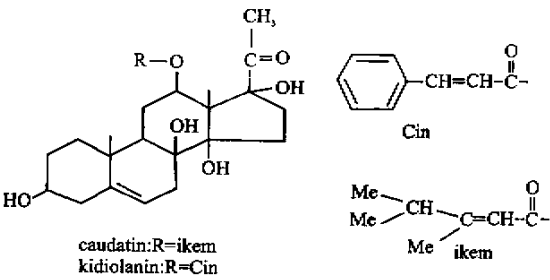


图 1 两种 C₂₁甾元的结构

Fig.1 Structures of two kinds of C₂₁ steroidal-aglycones

白首乌中的 C₂₁甾元至少有两种甾元, 一种为告达甾元(caudatin), 另一种为开德甾元(kidjolanin).

参考文献 :

[1] 刘成娣, 龚树生. 抗衰老中药白首乌研究的进展[J]. 北京中医学院学报, 1990, 13(1): 45 - 47.
[2] 宋俊梅, 丁霄霖. 白首乌对超氧阴离子自由基清除作用的研究[J]. 食品科学, 1997, 18(9): 61 - 64.
[3] 宋俊梅, 丁霄霖. 白首乌中 C₂₁甾元及甾元清除羟自由基的功能[J]. 无锡轻工大学学报, 1998, 17(2): 43 - 46.
[4] 龚树生, 刘成娣, 刘锁兰等. 白首乌化学成分的研究[J]. 药学学报, 1988, 23(4): 276 - 280.
[5] 姜红祥, 李锐, 朱廷儒等. 华北白前中的 C₂₁甾体类成分[J]. 药学学报, 1992, 27(8): 595 - 602.
[6] KEIJI WADA, KOJI HAYASHI, HIROSHI MITSUHASHI, et al. Two new oligoglycosides, cynanchoside C₂ and cynanchoside C₁, from *Cynanchum caudatum* max[J]. Chem Pharm Bull, 1982, 30(10): 3500-3504.
[7] KO SSUGAMA, KOJI HAYASHI, HIROSHI MITSUHASHI, et al. The structures of three new glycosides, cynapanosides A, B, and C, from the Chinese drug "Xu-Chang-Qing"[J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(11): 4500 - 4507.
[8] 罗思齐, 徐光漪, 易大年等. 通光藤中一个新 C₂₁甾族化合物的化学结构测定[J]. 化学学报, 1982, 40(4): 321 - 324.

(责任编辑 朱 明)