

鹿血中甾体化合物的分离与结构鉴定

袁媛, 徐德平*, 吴盼盼

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用乙醇对鹿血的有效成分进行提取, 经 MCI 柱层析粗分, 再经 ODS 反相色谱柱反复分离, 得到 3 个化合物 I、II、III, 通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 等方法鉴定出 I 为 $\Delta^{4,14}$ -雄烯-2 醇-28,30 环戊二烯庚酸酯-3 酮; II 为 $\Delta^{4,14}$ -雄烯-2,19 醇-28,30 环戊二烯庚酸酯-3 酮; III 为 $\Delta^{4,14}$ -雄烯-2 醇-27,29 环戊二烯己醚-3 酮。结果显示, 3 个化合物均为雄性激素衍生物, 这 3 个雄性激素衍生物在鹿血中属首次发现。

关键词: 鹿血; 甾体化合物; 分离; 结构鉴定

中图分类号: Q 956 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)06—0667—05

Extraction and Structural Identification of Steroidal Compounds from Deer Blood

YUAN Yuan, XU Deping*, WU Panpan

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Effective components were extracted from deer blood by ethanol in this study, firstly separated through the MCI column, and then purified by ODS reversed phase chromatographic column, repeated separation. Finally, three kinds of compounds were extracted, their structures were identified by ^1H NMR, ^{13}C NMR et al; the compound I was $\Delta^{4,14}$ -androstene-2 alkanol-28,30 Cyclopentadiene heptanoic acid ester-3 ketone; the compound II was $\Delta^{4,14}$ -androstene-2,19 alkanol-28,30 Cyclopentadiene heptanoic acid ester-3 ketone; the compound III was $\Delta^{4,14}$ -androstene-2 alkanol-27,29 Cyclopentadiene hexyl ether-3 ketone. The results shown that three compounds are all male hormone derivatives, they are all firstly reported in deer blood.

Keywords: deer blood, steroidal compounds, purification, structural identification

鹿血为鹿科动物梅花鹿(*Cervus nippon*)和马鹿(*Cervus elaphus*)的血液, 是传统名贵中药^[1-2]。近年来, 运用现代医学手段, 进行临床研究和动物比较试验, 发现鹿血具有抗衰老、抗疲劳、调节免疫、补血、美容、补肾益精、抗辐射等作用^[3-5], 是一种集预防、医疗、保健作用于一体的滋补品^[6]。据文献报道, 鹿血的化学成分非常复杂^[10-14], 国内外对鹿血具体

化学成分的结构研究还未见报道, 特别是鹿血甾体化合物, 仅有范玉林等在鹿茸中发现过此类物质^[15]。现有文献报道都是用标准品, 利用 HPLC 对鹿血活性成分进行定性、定量研究, 对鹿血中未知的激素并不能测定^[16]。目前, 仅发现其含常见几种甾体化合物, 如睾丸酮(testosterone)、雌二醇(estradiol)^[17-18], 对鹿血甾体化合物的分离、结构鉴定还未见报道。

收稿日期: 2013-09-26

* 通信作者: 徐德平(1965—), 男, 安徽宣城人, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然产物化学的研究。E-mail: xdp1219@sina.com

鉴于以上原因,用乙醇提取,多种色谱柱分离,采用 TLC、 ^1H NMR, 和 ^{13}C NMR 等方法对鹿血化学成分进行研究,以探明鹿血化学成分与功能活性之间的关系,为鹿产品的进一步开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鹿血,安徽五星集团提供;GF₂₅₄ 硅胶板,山东烟台芝罘化工厂产品;MCI 柱,日本三菱化学公司产品;ODS 柱、ODS-A 柱、ODS-B 柱,日本东曹株式会社产品;无水乙醇、丙酮、硫酸、茴香醛、冰醋酸、甲醇、正丁醇均为分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

RE52CS 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂制造;ZF-90 型暗箱式紫外透射仪,上海顾村电光仪器厂制造;CQ-005 型萃取罐,常州市特威电气自动化系统有限公司制造;R-1002 型旋转蒸发仪,上海申顺生物科技有限公司制造;SYB06-100 型恒流泵,BS-100A 自动部分收集器,上海沪西分析仪器厂有限公司制造;HH-4 型数显恒温水浴锅,江苏省金坛市荣华仪器厂制造;SHB-3 型循环水多用真空泵,郑州长城科贸有限公司经销;Bruker AVance500 型核磁共振仪,Bruker 公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 鹿血中有效成分的提取 取 10 L 鹿血原液置于 100 L 的萃取罐中,按料液比 $m(\text{g}):V(\text{mL})=1:5$ 加入体积分数 95%乙醇,常温搅拌提取 3 次,每次 2 d 左右,过滤取滤液。残渣在相同条件下重复提取 2 次,合并 3 次滤液,真空减压蒸馏回收乙醇,即得鹿血醇提物,浓缩干燥,置于冰箱备用。

1.3.2 鹿血醇提物的粗分 取部分鹿血醇提物加少量去离子水,溶解后上样 MCI 柱(5 cm×150 cm),调节柱体积流量为 10 mL/min,依次用去离子水,体积分数 20%、30%、40%、50%、75%、80%乙醇溶液梯度洗脱,用 250 mL 的锥形瓶收集洗脱液,TLC 法跟踪检测,将薄层板上显示相同 R_f 值的洗脱液合并浓缩。将体积分数 80%乙醇洗脱液浓缩至适量,再上样 ODS 柱(5 cm×100 cm),调节体积流量为 8 mL/min,用乙醇溶液梯度洗脱,250 mL 的锥形瓶收集洗脱液,经 TLC 法检测,根据 R_f 值粗分为 A、B、C、D、E、F 6 部分。将这 6 部分全部放入冰箱保存备用。根

据所做抗疲劳实验,得出 C 部分具有明显的抗疲劳作用,而 A、B、D、E、F 这 5 部分的抗疲劳活性不太明显,所以就单独对 C 部分进行进一步分离。

1.3.3 C 部分的分离 将前面得到的 C 部分再次上样 MCI 柱(5 cm×150 cm),调节体积流量为 10 mL/min,依次用去离子水、乙醇溶液梯度洗脱,TLC 法跟踪检测,大致得到 3 部分,分别标记为 C₁、C₂、C₃。

1.3.4 C₁、C₂、C₃ 3 部分分离纯化 将浓缩后的 C₁、C₂、C₃ 3 部分分别上样 ODS-B 柱、ODS-A 柱(5 cm×100 cm),调节体积流量为 8 mL/min,依次用去离子水、乙醇溶液梯度洗脱,用自动部分收集器收集,15 mL/管,经 TLC 跟踪监测,将 R_f 值相同的组分合并减压浓缩,反复上样 ODS-B 柱、ODS-A 柱(5 cm×100 cm),由 TLC 法鉴定纯度,最后分离得到纯化合物 I、II、III。

1.3.5 I、II、III 3 个化合物的结构鉴定 以二甲基亚砜(DMSO)为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标物,将上述 3 个化合物经氢谱(^1H NMR)和碳谱(^{13}C NMR)等光谱数据分析,并结合相关文献确定这 3 种物质的化学结构。

2 结果与讨论

2.1 化合物 I、II、III 的纯度

分离得到的化合物 I、II、III,经点样在展开剂 V(正丁醇):V(乙酸):V(水)=5:4:1 中展开,在暗箱式紫外透射仪和显色后的薄层板上显示均为单一斑点,从左到右依次为 I、II、III 3 种化合物(见图 1),说明纯度达到核磁鉴定分析要求。

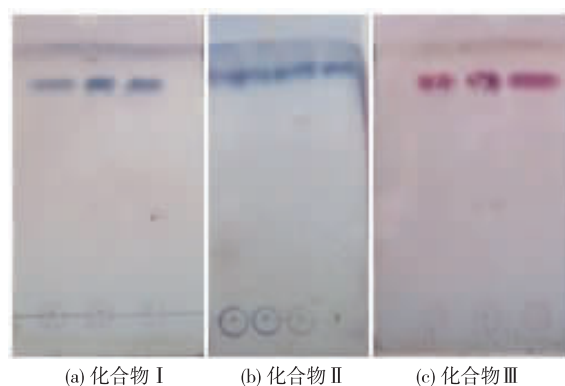


图 1 化合物 I、II、III 的薄层色谱图

Fig. 1 Thin-layer chromatogram of compounds I, II, III

2.2 显色反应

将化合物 I、II、III 分别进行醋酐-浓硫酸和氯仿-浓硫酸的定性试验^[15],结果见表 1。

表 1 化合物 I、II、III 的显色反应

Table 1 Color reaction of compounds I, II, III

组分	醋酐-浓硫酸试验 (Liebermann-Burchard 反应)	氯仿-浓硫酸试验 (Salkowaki 反应)
I	紫红	氯仿层青色荧光, 硫酸层青色
II	紫红	氯仿层绿色荧光, 硫酸层青色
III	紫红	氯仿层绿色荧光, 硫酸层青色

结果表明,化合物 I、II、III 均发生甾体反应,反应呈阳性,初步判定 3 种物质为甾体化合物。

2.3 NMR 分析

2.3.1 化合物 I 白色无定形粉末,可溶解于含水甲醇、乙醇中。

从化合物 I 的 ¹H-NMR 图谱可见,δ7.87 有 1 个单峰 H 信号,这个 H 应为活泼 H,δ5.31、5.20、5.06 各有 1 个单峰 H 信号,表明这 3 个 H 是双键上 H,δ1.73、1.64、1.55、1.23、0.99 各有 1 个单峰甲基信号,即含 5 个甲基。

¹³C-NMR(125 MHz)中可见到 34 个碳信号(见表 2),δ212.5 处有 1 个碳信号,说明有酮基存在;δ172.4、170.1 有 2 个碳信号,δ136.4~123.9 共有 7 个碳信号,应为双键上的碳,推测 170.1 也是双键上的碳,可见有 4 个双键,δ75.3、64.4 为 2 个连氧碳。高场区有 12 个 CH₂,5 个 CH₃,3 个 CH。

从 δ212.5 处的酮基、δ170.1 双键上的碳信号及显色反应来看,化合物 I 应为雄甾烯酮类化合物,根据此类化合物的特征,δ212.5 为 C3 位酮基,δ170.1 为 C5,δ172.4 为连接在 C17 位上的羧基,δ75.3 为 C17 信号。δ64.4 为一连氧信号,表明母环上有羟取代基,综合分析应为 C2 碳信号,即 C2 上有羟基取代,由于 β 效应导致酮基向低场移动。从碳谱中可以见到共有 4 个双键,除 C4、C5 双键,母环上 C14、C15 之间也有一个双键。δ13.9 的甲基为 C18,δ22.4 的甲基为 C19。至此可以得出化合物为雄性激素类似物质。

雄性激素类物质 C17 位上常连有侧链,该化合物也一样,C17 连有羧基,从高场区碳信号来看,δ45.4 有一个 CH 信号,表明侧链有分枝,除母环外,

侧链上有 6 个 CH₂,3 个 CH₃,2 个双键,从双键碳信号性质来看,有 3 个季碳。从这些数据并参照相关文献初步认定化合物 I 为 Δ^{4,14}-雄烯-2 醇-28,30 环戊二烯庚酸酯-3 酮。其化学结构式如图 2(a)所示。

表 2 化合物 I、II、III 的 ¹³CNMR 中的数据(δ)

Table 2 ¹³CNMR chemical shifts of compound I, II, III

C	I	II	III	C	I	II	III
1	48.1	48.0	47.9	18	13.9	14.9	13.7
2	64.4	64.4	64.3	19	22.4	63.0	22.2
3	212.5	212.5	212.1	20	172.4	175.8	61.2
4	123.9	123.9	123.8	21	36.2	36.6	34.7
5	170.1	170.3	170.4	22	28.6	28.7	28.6
6	33.9	34.0	33.9	23	24.8	24.8	24.9
7	31.2	31.7	31.4	24	27.7	27.7	27.7
8	45.6	45.6	45.6	25	28.3	28.4	28.3
9	48.0	48.0	48.6	26	29.0	29.0	29.0
10	38.7	47.9	38.9	27	45.4	45.5	45.4
11	22.0	22.1	22.2	28	134.9	134.9	127.5
12	29.0	29.0	29.0	29	134.5	134.5	129.4
13	47.9	47.9	48.1	30	134.2	134.3	134.6
14	136.4	136.4	136.2	31	123.9	123.9	117.3
15	123.5	124.2	123.7	32	24.5	25.5	15.6
16	43.3	43.2	43.3	33	15.9	15.9	
17	75.3	75.4	75.3	34	15.8	15.6	

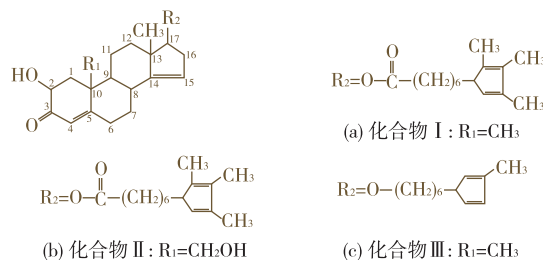


图 2 化合物 I、II、III 的结构图

Fig. 2 Structure of compound I, II, III

2.3.2 化合物 II 白色无定形粉末,可溶解于含水甲醇、乙醇中。

从化合物 II 的 ¹H-NMR 图谱可见,δ7.91 有 1 个单峰 H 信号,这个 H 应为活泼 H,δ5.31、5.20、5.06 各有 1 个单峰 H 信号,表明这 3 个 H 是双键上 H,δ1.93、1.64、1.50、0.89 各有 1 个单峰甲基信号,即含 4 个甲基。

¹³C-NMR(125 MHz)中可见到 34 个碳信号(见表 2),δ212.5 处有 1 个碳信号,说明有酮基存在,δ172.4、170.1 有 2 个碳信号,δ136.4~123.9 共有 7 个

碳信号,应为双键上的碳, $\delta 75.3$ 、 64.4 、 63.0 为3个连氧碳。高场区有12个 CH_2 ,4个 CH_3 ,3个 CH 。

从以上数据来看,化合物Ⅱ与化合物Ⅰ结构相似,不同的是化合物Ⅱ多了一个 $\delta 63.0$ 的连氧碳信号,少了 $\delta 22.4$ 的甲基,表明C19上有羟基取代。从这些数据并参照相关文献初步认定化合物Ⅱ为 $\Delta^{4,14}$ -雄烯-2,19醇-28,30环戊二烯庚酸酯-3酮。其化学结构式如图2(b)所示。

2.3.3 化合物Ⅲ 白色无定形粉末,可溶解于含水甲醇、乙醇中。

从化合物Ⅲ的 ^1H -NMR图谱可见, $\delta 7.92$ 有1个单峰H信号,这个H应为活泼H, $\delta 5.25$ 有1个单峰H信号, 5.17 、 5.07 各有2个单峰H信号,表明这5个H是双键上H。 ^{13}C -NMR(125 MHz)中可见到31个碳信号(见表2), $\delta 212.5$ 处有1个碳信号,说明有酮基存在; $\delta 170.1$ 有1个碳信号, $\delta 136.4\sim 117.3$ 共有7个碳信号, $\delta 170.1$ 碳信号应为双键上的碳,表明与化合物Ⅰ具有相似的烯酮结构。与化合物Ⅰ相比不一样的是少一个 $\delta 172.4$ 的羧基,多一个 $\delta 61.2$ 连氧碳 CH_2 信号,表明C17位上连接的是氧而不是羧基。从 ^{13}C DEPT谱中可以看到, $\delta 136.4\sim 117.3$ 共有5

个 CH 碳信号,说明有5个双键H未被取代,这与 ^1H 谱信号弹相一致,高场区碳信号 $\delta 45.5$ 有一个 CH 信号,表明侧链有分枝,除母环外,侧链上有6个 CH_2 ,3个 CH_3 ,从以上数据来看化合物Ⅲ与化合物Ⅰ虽有不同但母环结构是相似的。经这些数据分析并参照相关文献可知,化合物Ⅲ为 $\Delta^{4,14}$ -雄烯-2醇-27,29环戊二烯己醚-3酮。其化学结构式如图2(c)所示。

3 结 语

利用乙醇对鹿血的有效成分进行提取,经MCI柱层析粗分,再经ODS反相色谱柱反复分离,得到3种化合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ,通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR等方法鉴定出Ⅰ为 $\Delta^{4,14}$ -雄烯-2醇-28,30环戊二烯庚酸酯-3酮;Ⅱ为 $\Delta^{4,14}$ -雄烯-2,19醇-28,30环戊二烯庚酸酯-3酮;Ⅲ为 $\Delta^{4,14}$ -雄烯-2醇-27,29环戊二烯己醚-3酮。结果显示,3个化合物均为雄性激素衍生物,这3种雄性激素衍生物在鹿血中存在属首次报道。采用TLC、 ^1H NMR和 ^{13}C NMR等方法对鹿血化学成分进行研究,以探明鹿血化学成分与功能活性之间的关系,为鹿产品的开发提供理论依据。

参考文献:

- [1] 宋胜利,葛志广,宋文涛,等.鹿血资源的开发及利用前景[J].农牧产品开发,2000(11):5-8.
SONG Shengli, GE Zhiguang, SONG Wentao, et al. The development and utilization prospects of Deer blood resources [J]. *Agriculture and Animal Husbandry Products Development*, 2000(11): 5-8. (in Chinese)
- [2] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2010.
- [3] 袁相恋,博士儒,李庆杰,等.鹿血化学成分和药理作用及其应用研究进展[J].经济动物学报,2011(4):207-211.
YUAN Xianglian, BO Shiru, LI Qingjie, et al. Deer blood chemical components, pharmacological effects and application research progress [J]. *Journal of Economic Animal*, 2011(4): 207-211. (in Chinese)
- [4] 付彩霞.梅花鹿血的蛋白酶水解及水解产物的抗衰老功能研究[D].武汉:华中农业大学 食品科学学院,2009.
- [5] 尹小平,姜红,高晓黎,等.酶解天山马鹿血分离制备抗疲劳肽的研究[J].天然产物研究与开发,2009,21:391-394.
YIN Xiaoping, JIANG Hong, GAO Xiaoli, et al. Prepared and separated anti-fatigue peptides from wapiti velvet antler blood protein [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2009, 21: 391-394. (in Chinese)
- [6] 胡圣爱,阎辉.复方鹿血冻干粉抗缺氧抗疲劳作用的实验研究[J].中华实用中西医杂志,2003,16:1555-1556.
HU Shengai, YAN Hui. Experimental research on oxygen resistance and the anti-fatigue effect of Compound deer blood [J]. *Practical Chinese and Western Medicine Magazine*, 2003, 16: 1555-1556. (in Chinese)
- [7] 刘颖,陈光,胡高飞,等.蒺藜果实中C21甾体类化合物结构解析[J].北京化工大学学报,2010(4):103-107.
LIU Ying, CHEN Guang, HU Gao, et al. C21 steroid compound analysis of Tribulus terrestris fruits [J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology*, 2010(4): 103-107. (in Chinese)
- [8] 周维善,黄维垣.甾体化合物的命名[J].化学通报,1965(10):15-23.
ZHOU Weishan, HUANG Weiyuan. Thenaming of steroid compounds [J]. *Chemistry Bulletin*, 1965(10): 15-23. (in Chinese)
- [9] 束怀德.甾体激素药理学[M].北京:人民卫生出版社,1982.
- [10] 蒋蕾,赵文静,常惟智.鹿血的药理作用及临床应用概况[J].中药研究进展,2006(6):12-13.

- JIANG Lei,ZHAO Wenjing,CHANG Weizhi. Pharmacological action and clinical application of Deer blood [J]. **Traditional Chinese Medicine Research Progress**,2006(6):12-13. (in Chinese)
- [11] Baroni F,Protano G,Riccobono F. Essential and toxic elements in deer blood [J]. **Trace Metals in the Environment**,2000(4):485-505.
- [12] Margaret E Lawton,Sutton J G. Species identification of deer blood by isoelectric focusing [J]. **Journal of the Forensic Science Society**,1982(4):361-366.
- [13] Seal U S,Ozoga J J,Erickson A W,et al. Effects of Immobilization on blood analysis of white-tailed deer [J]. **The Journal of Wildlife Management**,1972,36:1034-1040.
- [14] Wilson P R,Pauli J V. Blood constituents of farmed red deer (*Cervus elaphus*). II :biochemical values [J]. **New Zealand Veterinary Journal**,2012,31:1-3.
- [15] 范玉林. 鹿茸中甾体化合物的研究[J]. 吉林农业大学学报,1987(2):69-71.
FAN Yulin. Steroid compounds in research of velvet antler [J]. **Journal of Jilin Agricultural University**,1987 (2):69-71. (in Chinese)
- [16] 崔丽春. 梅花鹿血液中 3 种抗衰老成分的动力学分析[D]. 哈尔滨:东北林业大学 野生动物资源学院,2004.
- [17] 董万超,赵景辉,潘久如,等. 梅花鹿七种产品的化学成分研究[J]. 特产研究,1994(1):30-43.
DONG Wanchao,ZHAO Jinghui,PAN Jiuru,et al.The seven kinds of chemical composition research of sika deer [J]. **Specialty Research**,1994(1):30-43. (in Chinese)
- [18] James A Wesson,Patrick F Scanlon,Roy L,et al.Influence of chemical immobilization and physical restraint on steroid hormone levels in blood of white-tailed deer[J]. **Can J Zool**,1979,57:768-776.

科技信息

欧盟就铁粉、活性炭等活性物质用于食品接触材料的安全性发布意见

据欧盟食品安全局(EFSA)消息,5月7日欧盟食品安全局就活性物质铁粉、活性炭、煅烧高岭土、氯化钠、交联聚丙烯酸钠盐、氯化钙作为活性系统用于食品接触材料的安全性评估发表科学意见。专家组经过评估得出结论认为,不直接接触液体食物或外部表面水相食物,该活性系统的使用不会迁移,不会对人体健康构成威胁。

[信息来源]Scientific Opinion on the safety assessment of the active substances iron powder, activated carbon, calcined kaolin, sodium chloride, polyacrylic acid, sodium salt, crosslinked and calcium chloride, for use as active system in food contact materials. EFSA Journal 2014;12(5):3649 [9 pp.].

澳新食品标准局发布消费者总膳食研究

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,5月1日澳新食品标准局发布最新澳大利亚总膳食研究,针对的是澳大利亚消费者丙烯酰胺和铝的膳食暴露。

澳新食品标准局称,澳大利亚食品饮料中的丙烯酰胺量低于国际测定值,目前FSANZ正同行业一起研究降低丙烯酰胺量的方法,例如使用酶降低含量;另外大部分澳大利亚国民铝的膳食暴露量低于国际限量。

[信息来源]食品伙伴网. 澳新食品标准局发布消费者总膳食研究 [EB/OL]. (2014-5-9). <http://news.foodmate.net/2014/05/263204.html>

美国FDA禁用DHA、EPA、ALA 3种 ω -3脂肪酸部分营养含量声称

美国FDA于4月25日在联邦公报网站上发布一项最终条例,禁用DHA、EPA、ALA 3种 ω -3脂肪酸部分营养含量声称。该条例使得2007年的一项提案正式生效。

条例禁止在食品(包含食品补充剂)标签上声称该产品富含DHA或EPA,包括使用“high in”,或同义词“rich in” and “excellent source of”等,同时也禁止了ALA的营养含量声称。

[信息来源]U.S. Food and Drug Administration. FDA Finalizes Rule Prohibiting Certain Nutrient Content Claims for DHA, EPA, and ALA Omega-3 Fatty Acids [EB/OL]. (2014-4-25). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3649.htm>