

千金藤碱中的微量生物碱杂质

陈江¹, 滕荣伟¹, 刘晨江², 王庆端², 杨崇仁^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204;

2. 河南省医学科学研究所药理室, 郑州 450052)

摘要: 纯度达 99.5% 的千金藤碱经氧柱层析反复分离纯化, 得到其中的微量杂质成分, 通过波谱鉴定为 (+)-千金藤碱 2'-β-N-氧化物 (1)。

关键词: 千金藤碱; (+)-千金藤碱 2'-β-N-氧化物

中图分类号: R284.1; Q946.91

Minor Alkaloid Impurity of a Cepharanthine Preparation

CHEN Jiang tao¹, TENG Rong-wei¹, LIU Chen-jiang², WANG Qing-duan², YANG Chong-ren^{1*}

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 2. Laboratory of Pharmacology, Henan Institute of Medicinal Sciences, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: By means of repeatedly column chromatographies, a minor alkaloid was isolated from a cepharanthine preparation which content is more than 99.5%. The structure of this impurity was identified as (+)-cepharanthine 2'-β-N-oxide by spectral data.

Key words: cepharanthine; (+)-cepharanthine 2'-β-N-oxide; NMR data

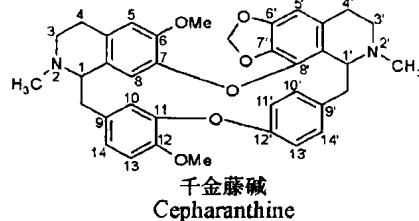
千金藤碱 (cepharanthine) 为防己科千金藤属 (*Stephania*) 植物中的一种双苄基异喹啉型生物碱, 具有多方面的生理活性^[1]。早年, 日本将头花千金藤 (金线钓乌龟) (*S. cepharantha* Hayate) 根中分离到的千金藤碱粗品用于治疗肺结核, 80 年代开发为升白细胞的免疫调节剂和生发剂。80 年代初云南和贵州从地不容 (*S. delavayi* Diels) 根部提取主要含千金藤碱的有效部位用于矽肺, 肺脓疡和升白。近年发现千金藤碱还具有抗病毒, 抗癌等生理活性。

从地不容提取到生物碱粗品, 经反复纯化得到纯度为 99.5% 以上的千金藤碱, 可作为原料药开发新制剂。为保证产品的安全性和稳定性, 有必要对其杂质成分作进一步的研究, 为此, 本文对其中的微量杂质进行分离和鉴定。

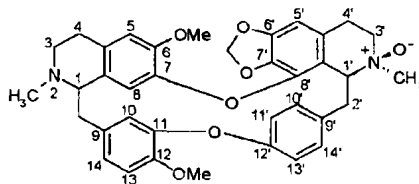
1 实验部分

1.1 仪器

紫外光谱用 Shimadzu UV-210A 仪测定。¹H 和



千金藤碱
Cepharanthine



化合物 1
Cepharanthine 2'-N-oxide (1)

¹³C NMR 谱用 Bruker DRX-500 NMR 谱仪, 以 TMS 为内标和 CDCl₃ 为溶剂。质谱用 VG Autospec 3000 质谱仪测定。

1.2 试剂

纯度达 99.5% 的千金藤碱由本实验室从地不容根提取分离和反复精制得到。柱层析用硅胶 (青岛美高集团有限公司, 200~300 目) 和氧化铝 (上海五四化学试剂厂, 中性, 100~200 目)。化学试剂氯

收稿日期: 2004-10-11 接受日期: 2005-01-12

* 通讯作者 Tel: 86 871 5223424; E-mail: cryang@mail.ac.cn

仿和甲醇(天津化学试剂有限公司,分析纯)。硅胶薄层层析H板(青岛海洋化工厂),氯仿和甲醇为展开剂,碘或 Dragendorff 试剂显色。

1.3 分离纯化

纯度达 99.5% 的千金藤碱 500 g, 经氧化铝反复柱层析, 氯仿和氯仿-甲醇反复洗脱, 分段接收, 得到杂质段。用硅胶柱层析纯化杂质段, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 小心截取微量杂质富积的部位, 再反复柱层析纯化, 得到化合物 1。

1.4 HPLC 条件

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司) CLC-CN 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: MeOH: H₂O: NH₄OH (97.5: 2.5: 0.2)。流速: 0.8 mL/min。波长: 282 nm。柱温: 25 °C。

1.5 液相色谱-质谱联用条件

MDS SCIEX QSTAR 型液相色谱-质谱联用色谱仪(美国 ABI 公司), Agilent 1100 型液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。流动相: MeOH: H₂O: NH₄OH (97.5: 2.5: 0.2)。流速: 0.5 mL/min。波长: 283 nm。ESI 电离(电压+ 3800 eV), 离子源温度 350 °C。

2 物理常数及波谱数据

化合物 1 C₃₇H₃₈N₂O₇, 红色粉末, UVλ_{max}^{EtOH} (nm): 208, 284; EFMS (m/z, %): 622 (M⁺, 50), 606 ([M-16]⁺, 100), 379 (75), 365 (56), 190 (93), 174 (48)。NMR 数据见表 1, 2。

表 1 千金藤碱、千金藤碱 2'-β-氮氧化物^[2] 及化合物 1 的 ¹H NMR 数据 (500 MHz, CDCl₃)

Table 1 ¹H NMR data of cepharanthine, (+)-cepharanthine 2'-β-N-oxide, and compound 1 (500 MHz, CDCl₃)

H Proton	千金藤碱 Cepharanthine	化合物 1 Compound 1	千金藤碱 2'-β-氮氧化物 ^[2] (+)-Cepharanthine 2'-β-N-oxide
1	3.60(m)	3.69(m)	3.64(m)
2 N-Me	2.56(s)	2.62(s)	2.58(s)
6 OMe	3.73(s)	3.76(s)	3.71(s)
12 OMe	3.88(s)	3.91(s)	3.89(s)
-O-CH ₂ -O	5.59(brs)	5.66(brs)	5.71(d, l)
	5.54(brs)	5.58(brs)	5.66(d, l)
1'	4.17(m)	4.71(m)	4.63(m)
2' N-Me	2.64(s)	3.39(s)	3.31(s)

表 2 千金藤碱及化合物 1 的 ¹³C NMR 数据(125 MHz, CDCl₃)
Table 2 ¹³C NMR data of cepharanthine and compound 1 (125 MHz, CDCl₃)

碳原子 Carbon	千金藤碱 Cepharanthine	化合物 1 Compound 1	碳原子 Carbon	千金藤碱 Cepharanthine	化合物 1 Compound 1
G-1	64.2	63.2	G-1'	61.8	75.6
NMe	43.9	44.1	NMe	42.3	56.5
G-3	51.2	50.4	G-3'	45.3	59.0
G-4	28.9	29.0	G-4'	25.8	27.0
G-4a	130.8	130.4	G-4a'	132.8	125.2
G-5	111.1	111.6	G-5'	102.2	103.3
G-6	148.7	149.2	G-6'	147.0	150.8
G-7	141.8	148.2	G-7'	136.1	137.0
G-8	117.8	118.5	G-8'	137.0	137.0
G-8a	128.0	129.0	G-8a'	126.4	122.5
G-9	37.8	37.5	G-9'	40.3	40.9
G-9	132.3	131.8	G-9'	138.1	137.0
G-10	116.8	115.8	G-10'	131.7	131.6
G-11	148.8	149.2	G-11'	120.9	121.8
G-12	147.6	148.2	G-12'	152.4	151.8
G-13	110.8	111.2	G-13'	122.2	122.5
G-14	123.8	123.9	G-14'	128.3	130.4
6-O-Me	55.0	54.9	-	-	-
12-O-Me	55.9	55.8	-	-	-
O-CH ₂ -O	100.4	100.9	-	-	-

3 结果与讨论

纯度达 99.5% 的千金藤碱, 经过氧化铝柱层析及硅胶柱层析反复纯化, 得到微量杂质化合物 1。经硅胶薄层层析和 HPLC 检测表明, 化合物 1 为单一化合物, 且 HPLC 保留时间与千金藤碱中的杂质峰对应(图 1)。

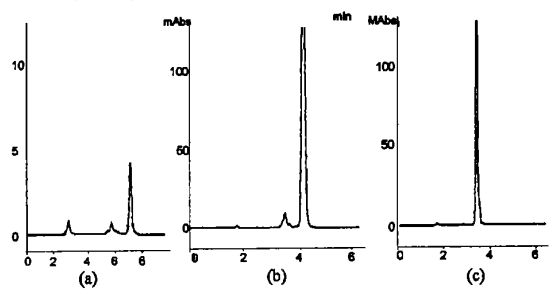


图 1 高效液相色谱[CLC-CN 色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm), 流动相: MeOH: H₂O: NH₄OH (97.5: 2.5: 0.2)。流速: 0.8 mL/min。波长: 282 nm]

(a) 千金藤碱粗品; (b) 99.5% 千金藤碱; (c) 千金藤碱 N-氧化物
Fig. 1 HPLC of (a) crude alkaloids from *S. delavayi* Diels; (b) cepharanthine (99.5%) and (c) (+)-cepharanthine 2'-β-N-oxide [CLC-CN column (4.6 × 250 mm, 5 μm), mobile phase: MeOH: H₂O: NH₄OH (97.5: 2.5: 0.2), speed: 0.8 mL/min, wavelength: 282 nm]

化合物 1 的 EFMS 谱给出分子离子峰 (m/z 622 [M^+]), 基峰 m/z 606 ($[M - O]^+$, 100%), 为氮氧化物的特征裂解碎片; 其余碎片离子峰 (m/z 379, 365, 190, 174 等) 大多与千金藤碱的质谱碎片相似。

化合物 1 的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱也与千金藤碱相似。除 1H NMR 中, N-2' 上的甲基信号由 δ 2.64 向低场位移到 δ 3.39 外, N-2 [δ 2.62 (3H, s)], C-6 [δ 3.69] 和 C-12 [δ 3.91 (3H, s)] 甲基, 以及 C-6 [δ 5.58] 和 C-7 [δ 5.52] 次甲二氧基等的化学位移均与千金藤碱相似 (见表 1)。在 ^{13}C NMR 谱中, 2'-NMe 信号由 δ 42.3 向低场位移到 δ 56.5, 同时 C-1 和 C-3 的信号分别由 δ 61.8 和 δ 45.3 向低场位移到 δ 75.6 和 δ 59.0。此外, 还引起异喹啉母核上与之相邻的其他碳信号有不同程度的位移 (表 2)。

为了进一步确证该微量杂质的结构, 进行了高分辨 HPLC-TOFMS 谱的联机分析。在相应的保留时间

范围内检测到杂质成分, 其准分子离子峰为 m/z : 621.3657 [$M(C_{37}H_{38}N_2O_7) - H]^+$ 。TOFMS 谱图的碎片裂解规律与 EIMS 谱有较大的差异。主要碎片离子峰有: m/z 593 [$M - 28 - H]^+$, 550 [$M - 16 - 28 - H]^+$ 和 297 [$M - C_{19}H_{21}NO_4 - H]^+$ 。在同样条件下给出的千金藤碱 TOFMS 谱图, 碎片离子的裂解规律与之相类似 (图 2)。

综上所述, 纯度达 99.5% 的千金藤碱的主要杂质鉴定为 (+)-千金藤碱 2'- β -N 氧化物 [(+)-cepharanthine 2'- β -N oxide], 该生物碱系首次报道极微量存在于地不容中。该化合物作为微量生物碱曾从泰国产的同属植物 *S. suberosa* Foman 中分离到^[2]。

以上结果表明, 通过细心的柱层析分离, 富积并分离纯化主要化合物中的微量成分, 鉴定其化学结构, 在中成药的二次开发和新药研制的质量控制中有广阔的应用前景。

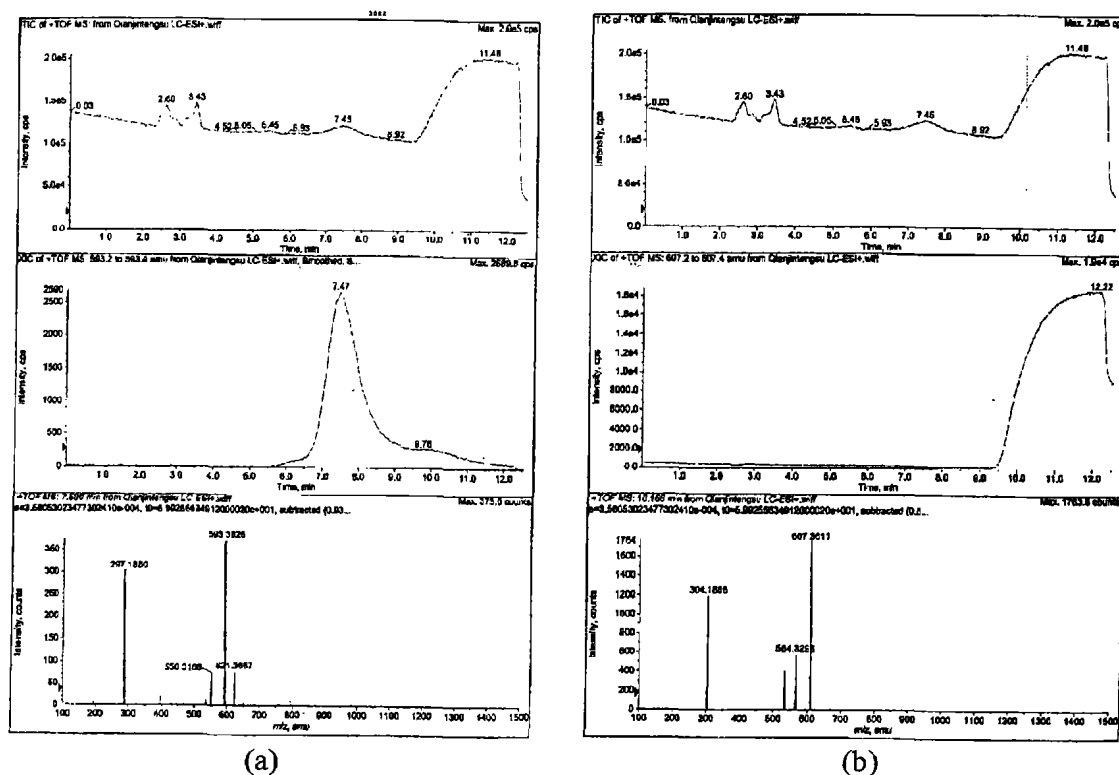


图 2 HPLC-MS 图谱 (a) 千金藤碱 N 氧化物; (b) 千金藤碱

Fig. 2 HPLC-MS of (a) (+)-cepharanthine 2'- β -N oxide and (b) cepharanthine

参考文献

1 Yang HM (杨鹤鸣), Luo XR (罗献瑞). Botanical and pharmaceutical studies of the Chinese drug "Sharr wur gui". *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1980, 15: 674-683

2 Amarendra Patra, Alan J Freyer, Helene Guinaudeau, *et al.* The bisbenzylisoquinoline alkaloids of *Stephania suberosa*. *J Nat Products*, 1986, 49: 424-427