

文章编号: 1006-2858(2007)10-0611-04

蟾酥中强心甙类化学成分分离与鉴定

乔莉, 段文娟, 姚遥, 陈欢, 刘涛, 裴月湖

(沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 对蟾酥的氯仿提取物进行化学成分分离与鉴定。方法 以3倍量氯仿索氏提取, 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、高效液相色谱等手段对氯仿提取物进行分离纯化, 根据其理化性质和波谱数据($^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$)进行结构鉴定。结果 从蟾酥的氯仿提取物中分离得到6个强心甙类化合物, 经光谱数据分析, 鉴定其结构分别为脂蟾毒配基(resibufagenin, 1)、华蟾毒精(cinobufagin, 2)、蟾毒灵(bufalin, 3)、华蟾毒它灵(cinobufatalin, 4)、12-羟基华蟾毒精(12-hydroxylcinobufagin, 5)、1-羟基华蟾毒精(1-hydroxylcinobufagin, 6)。结论 化合物6为一新的天然产物。

关键词: 药物化学; 结构鉴定; 柱色谱法; 蟾酥; 氯仿提取物

中图分类号: R 914 **文献标志码:** A

蟾蜍属(*Bufo*)动物有250余种, 分布于世界各地。我国有蟾蜍属动物13种(亚种), 资源丰富。蟾酥(Venenum Bufonis)为中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans* Cantor)或黑框蟾蜍(*Bufo melanostictus* Schneider)的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液, 经加工干燥而成, 主要功用为解毒、消肿、强心、止痛。蟾酥耳后腺及皮肤腺中主要含多种强心甙体化合物, 总称蟾酥毒素, 即指未被分解的天然化合物。由于腺分泌液在加工干燥制备蟾酥过程中被分解, 故蟾酥中所含成分多系分解产物。蟾酥的脂溶性成分约占20%^[1]。近年来, 人们对蟾酥中强心甙类化合物的抗肿瘤活性进行了一系列的深入研究, 部分化合物具有较好的开发利用前景^[1-3]。对于这类化合物的研究具有重要的意义。

作者对蟾酥的氯仿提取物进行了化学成分的研究, 从中分离得到了6个强心甙类化合物, 利用 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 以及文献数据对照等手段, 鉴定了这些化合物的结构, 分别为脂蟾毒配基(resibufagenin, 1)、华蟾毒精(cinobufagin, 2)、蟾毒灵(bufalin, 3)、华蟾毒它灵(cinobufatalin, 4)、12-羟基华蟾毒精(12-hydroxylcinobufagin, 5)、1-羟基华蟾毒精(1-hydroxylcinobufagin, 6)。其中化合物6为一新天然产物。

1 仪器与材料

Bruker AX-300 核磁共振波谱仪(TMS为内

标, 瑞士Bruker公司), LC-8A 高效液相色谱仪(制备型, 20 mm × 250 mm, 15 μm, 日本Shimadzu公司)。

Sephedex LH-20 葡聚糖凝胶(美国Pharmacia公司), 柱色谱用硅胶(50 ~ 71 μm, 青岛海洋化工有限公司)。

色谱用试剂(色谱纯, 市售), 其他试剂(分析纯, 市售)。

蟾酥药材购自河北安国药材市场, 经沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定为蟾蜍属动物中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans* Cantor)的耳后腺分泌物。

2 提取分离

蟾酥500 g在研钵中研细, 将细沙淘洗干净, 过462 μm筛, 二者混匀置于索氏提取器中, 用适量氯仿回流24 h, 重复3次, 合并提取液蒸干得到棕黄色黏稠液体, 挥干后得到干燥浸膏150 g。所得浸膏经硅胶柱色谱梯度洗脱(石油醚-丙酮, 体积比100:1~1:1)、凝胶柱色谱和高效液相色谱纯化分别得到化合物1~6。结构式见图1。

3 结构鉴定

化合物1: 无色片状结晶(丙酮), 硫酸显蓝绿色。mp 118、119 °C, UV: max(MeOH) 298.0 nm, 提示有、不饱和六元内酯环结构。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.14 (brs, 1H) 表明有1个仲

收稿日期: 2006-12-06

作者简介: 乔莉(1979-), 女(汉族), 河北石家庄人, 博士研究生, E-mail: ql200207@yahoo.com.cn; 裴月湖(1954-), 男(汉族), 山西翼城人, 教授, 主要从事天然药物化学研究, Tel: 024-23986483, E-mail: peiyueh@vip.163.com。

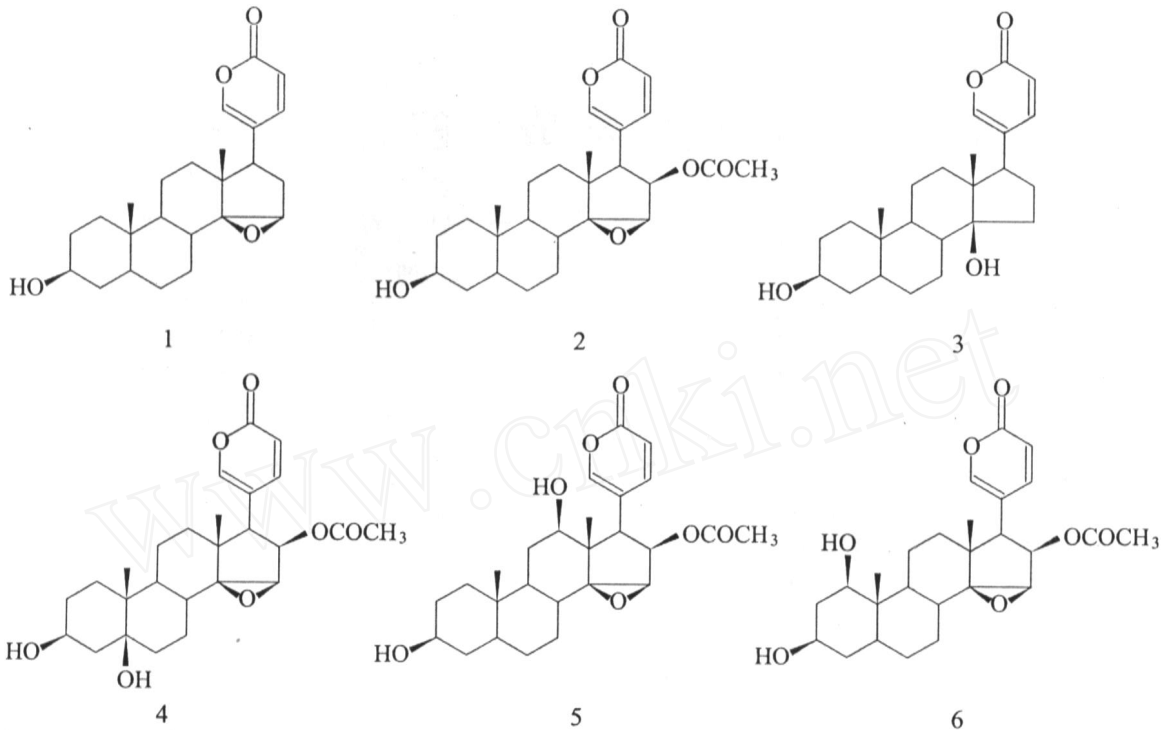


Fig. 1 Structures of compounds 1-6

醇基, 3.46(1H,d)为受14、15含氧环影响的C位-H信号, 7.78(1H,dd, $J=9.8, 2.7$ Hz)为C-22氢信号, 7.24(1H,d, $J=2.7$ Hz)为C-21氢信号, 6.24(1H,d, $J=9.8$ Hz)为C-23氢信号,

0.78(3H,s)和1.25(3H,s)表明有2个角甲基。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 16.8为18位角甲基碳信号, 23.7为19位角甲基碳信号,

66.8为3位连羟基的碳信号, 74.7、59.8是14、15位含氧环上碳信号, 122.2、149.5为20、21位顺式双键碳信号, 146.9、115.3为22、23位顺式双键碳信号, 162.0为内酯环羰基碳信号,表明该化合物为蟾蜍甾烯类化合物。该化合物的熔点、NMR数据及TLC鉴定结果均与文献[4]记载的脂蟾毒配基相符,鉴定为脂蟾毒配基。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.78(1H,dd, $J=9.8, 2.7$ Hz, H-22)、7.24(1H,d, $J=2.7$ Hz, H-21)、6.24(1H,d, $J=9.8$ Hz, H-23)、4.14(1H, brs, H-3)、3.46(1H,d, $J=4.5$ Hz, H-15)、2.46(2H,m, H-16)、0.78(3H,s, 18- CH_3)、1.25(3H,s, 19- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 162.0(C-24)、149.5(C-21)、146.9(C-22)、122.2(C-20)、115.3(C-23)、74.7(C-14)、66.8(C-3)、59.8(C-15)、47.7(C-17)、45.2(C-13)、39.4(C-12)、39.3(C-9)、35.9(C-10)、35.5(C-5)、33.2(C-4)、32.4(C-8)、29.7(C-1)、29.5(C-16)、27.8(C-2)、

25.7(C-6)、23.7(C-19)、21.1(C-11)、20.7(C-7)、16.8(C-18)。

化合物2:无色棱晶(丙酮), mp 215、216, UV: λ_{max} (MeOH) 298.0 nm,为、不饱和六元内酯环结构。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.15(brs, 1H)表明有1个仲醇基, 3.55(s, 1H)表明有受14、15氧环影响的C-15氢信号, 7.82(dd, 1H, $J=9.8, 2.7$ Hz)为C-22氢信号, 7.15(d, 1H, $J=2.7$ Hz)为C-21氢信号, 6.25(d, 1H, $J=9.8$ Hz)为C-23氢信号, 1.90(s, 3H)表明有连在羰基上的甲基, 5.45(d, 1H, $J=9.5$ Hz)为C-16氢信号, 2.80(d, 1H, $J=9.5$ Hz)为C-17氢信号,进一步表明乙酰氧基连接在C-16位上;

0.78(s, 3H)为19位角甲基质子信号, 0.99(s, 3H)为18位角甲基质子信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 17.2为18位角甲基碳信号, 23.6为19位角甲基碳信号, 66.5为连羟基的3位碳信号, 76.9、59.8是14、15位环氧环上碳信号, 74.6为连乙酰氧基的16位碳信号, 116.1、151.2为20、21位顺式双键碳信号, 148.3、113.2为22、23位顺式双键碳信号, 161.4为内酯环羰基碳信号, 170.1为乙酰氧基的羰基碳信号, 20.5为乙酰氧基上的甲基碳信号。该化合物的熔点、NMR数据及TLC鉴定结果均与文献[4]报道的华蟾毒精相符,鉴定为华蟾毒精。 $^1\text{H-NMR}$

(300 MHz, CDCl_3) : 7.82 (1H, dd, $J = 9.8$ 、2.7 Hz, H-22)、7.15 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-21)、6.25 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-23)、5.45 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-16)、4.15 (1H, brs, H-3)、3.55 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-15)、2.80 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-17)、0.78 (3H, s, 18- CH_3)、0.99 (3H, s, 19- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : 170.1 (C-16)、161.4 (C-24)、151.2 (C-21)、148.3 (C-22)、116.1 (C-20)、113.2 (C-23)、76.9 (C-14)、74.6 (C-16)、66.5 (C-3)、59.8 (C-15)、49.8 (C-17)、45.2 (C-13)、40.4 (C-12)、38.8 (C-8)、37.4 (C-9)、35.5 (C-10)、35.4 (C-5)、33.2 (C-4)、29.7 (C-1)、27.9 (C-2)、25.7 (C-6)、23.6 (C-19)、20.9 (C-11)、20.6 (C-7)、20.5 (C-16)、17.2 (C-18)。

化合物 3: 无色棱晶 (丙酮), mp 242 ~ 244。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 0.70 (s) 为 18 位角甲基氢信号, 0.95 (s) 为 19 位角甲基氢信号, 2.46 (1H, dd, $J = 9.53$ 、6.8 Hz) 为 C-17 氢信号, 4.14 (brs, 1H) 为连羟基的 C-3 位氢信号, 6.26 (1H, d, $J = 9.8$ Hz) 为 C-23 氢信号, 7.23 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 为 C-21 氢信号, 7.84 (1H, dd, $J = 9.8$ 、2.3 Hz) 为 C-22 氢信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : 16.5 为 18 位角甲基碳信号, 23.7 为 19 位角甲基碳信号, 66.7 为连羟基的 3 位碳信号, 85.2 为连羟基的 14 位碳信号, 122.7、148.4 为 20、21 位顺式双键碳信号, 146.9、115.1 为 22、23 位顺式双键碳信号, 162.4 为内酯环羰基碳信号。以上数据均与文献 [4] 对照一致, 鉴定为蟾毒灵。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 7.84 (1H, dd, $J = 9.8$ 、2.3 Hz, H-22)、7.23 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-21)、6.26 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-23)、4.14 (1H, brs, H-3)、2.49 (1H, m, H-17)、0.70 (3H, s, 18- CH_3)、0.95 (3H, s, 19- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : 162.4 (C-24)、148.4 (C-21)、146.9 (C-22)、122.7 (C-20)、115.1 (C-23)、85.2 (C-14)、66.7 (C-3)、50.9 (C-17)、47.8 (C-13)、42.0 (C-8)、40.7 (C-12)、35.6 (C-5)、35.2 (C-10)、35.0 (C-9)、33.4 (C-4)、32.4 (C-15)、29.6 (C-1)、28.5 (C-16)、27.7 (C-2)、26.5 (C-6)、23.7 (C-19)、21.3 (C-11)、21.2 (C-7)、16.7 (C-18)。

化合物 4: 白色粒状结晶 (甲醇), $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : 4.16 (brs, 1H) 为 3 位连氧碳上氢信号, 0.82 (s)、0.98 (s) 为 18、19 位角

甲基质子信号, 3.63 (s, 1H) 为 15 位连氧碳上质子信号, 且 14、15 位有氧桥。1.86 (s, 3H) 为连羰基的甲基质子信号, 7.22 (d)、7.90 (dd)、6.23 (d) 为不饱和内酯环上的烯氢质子信号, 5.45 为 16 位连乙酰氧基碳上的氢信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : 17.0、16.6 为 18、19 位角甲基碳信号, 65.5 为 3 位碳信号, 74.4 为 5 位连羟基的季碳信号, 72.1、59.6 是 14、15 位连氧桥的碳信号, 74.9 为 16 位连乙酰氧基的碳信号, 116.6、151.6 是 20、21 位双键碳信号, 148.9、113.3 是 22、23 双键碳信号, 161.8 为内酯环羰基碳信号, 170.2 为乙酰氧基上的羰基碳信号。与文献 [5]³⁷⁻³⁸ 对照, 鉴定为华蟾毒它灵。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : 7.90 (1H, dd, $J = 9.6$ 、2.1 Hz, H-22)、7.22 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-21)、6.23 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-23)、5.45 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-16)、4.16 (1H, brs, H-3)、3.63 (1H, s, H-15)、2.80 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-17)、1.86 (3H, s, H-16)、0.98 (3H, s, 19- CH_3)、0.82 (3H, s, 18- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : 170.2 (C-16)、161.8 (C-24)、151.6 (C-21)、148.9 (C-22)、116.6 (C-20)、113.3 (C-23)、74.9 (C-16)、74.4 (C-5)、72.1 (C-14)、65.5 (C-3)、59.6 (C-15)、49.9 (C-17)、45.0 (C-13)、42.8 (C-9)、40.2 (C-12)、40.5 (C-10)、34.7 (C-6)、33.2 (C-4)、32.5 (C-8)、27.9 (C-2)、24.7 (C-1)、22.6 (C-7)、20.9 (C-11)、20.5 (C-16)、17.0 (C-18)、16.6 (C-19)。

化合物 5: 无色片状晶体 (甲醇), $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 3.88 (brs, 1H) 表明有 1 个仲醇基, 3.55 (1H, s) 表明有受 14、15 氧环影响的 C-15 氢, 7.84 (1H, dd, $J = 9.8$ 、2.4 Hz) 为 C-22 氢信号, 7.36 (1H, d, $J = 2.4$ Hz) 为 C-21 氢信号, 6.24 (1H, d, $J = 9.8$ Hz) 为 C-23 氢信号, 1.92 (3 H, s) 表明有连在羰基上的甲基信号, 5.44 (1H, d, $J = 9.5$ Hz) 为 C-16 氢信号, 3.35 (1H, d, $J = 9.5$ Hz) 为 C-17 氢信号, 0.89 (3H, s) 为 19 位角甲基质子信号, 0.61 (s, 3H) 为 18 位角甲基质子信号。其碳谱信号与华蟾毒精相比, C-11 (29.2) 与 C-13 (50.6) 分别向低场位移 8.9 和 6.2, 而 18- CH_3 (11.3) 则向高场位移了 5.3, 证明有羟基在 12 位取代。将核磁数据与文献 [5]⁶⁷⁻⁶⁸ 对照, 鉴定为 12-羟基华蟾毒精。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : 3.88 (1H, brs, H-3)、5.44 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-16)、3.55 (1H,

s, H 15)、3.35 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H 17)、1.92 (3H, s, H 16)、0.61 (3H, s, H 18)、0.89 (3H, s, H 19)、7.36 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H 21)、7.84 (1H, dd, $J = 9.8, 2.4$ Hz, H 22)、6.24 (1H, dd, $J = 9.8, 2.4$ Hz, H 23)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 169.4 (C-16)、160.7 (C-24)、152.0 (C-21)、148.5 (C-22)、116.2 (C-20)、112.9 (C-23)、74.6 (C-16)、73.4 (C-12)、71.0 (C-14)、64.5 (C-3)、59.2 (C-15)、50.6 (YY-13)、44.6 (C-17)、35.5 (C-5)、34.6 (C-10)、33.3 (C-9)、33.0 (C-4)、31.8 (C-8)、29.4 (C-1)、29.2 (C-11)、27.4 (C-2)、25.4 (C-6)、23.5 (C-19)、20.3 (C-16)、20.1 (C-7)、11.6 (C-18)。

化合物6:白色粉末。化合物6的碳谱信号与华蟾毒精对照^{[5]67-68},在71.7处多了1个连氧碳信号,该碳与19位甲基氢(0.97)有远程相关,且19-甲基碳信号明显向高场位移(-5.0),为效应的特征,提示羟基取代在C-1位。C-3受其影响向低场位移至66.6。以上数据表明此化合物为1-羟基华蟾毒精,其核磁数据与文献[6]对照一致。化合物6为一新的天然产物,张薇等^[6]曾报道通过对华蟾毒精进行生物转化得到该化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 7.92 (1H, dd, $J = 9.6, 2.1$ Hz, H 22)、7.36 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H 21)、6.17 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H 23)、5.45 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H 16)、4.05 (1H, s, H 3)、3.76 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H 15)、2.84 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H 17)、1.90 (3H, s, H 16)、0.97

(3H, s, 19- CH_3)、0.79 (3H, s, 18- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 169.1 (C-16)、160.6 (C-24)、152.1 (C-21)、148.3 (C-22)、116.0 (C-20)、112.9 (C-23)、74.6 (C-16)、71.8 (C-14)、71.7 (C-1)、66.6 (C-3)、59.4 (C-15)、48.9 (C-17)、44.7 (C-13)、40.5 (C-10)、39.3 (C-9)、38.2 (C-12)、33.0 (C-4)、32.5 (C-8)、29.9 (C-5)、31.8 (C-2)、25.0 (C-6)、18.7 (C-19)、20.5 (C-11)、20.1 (C-7)、20.0 (C-16)、16.9 (C-18)。

参考文献:

- [1] 金向群. 蟾蜍化学与药理作用的研究 [J]. 中草药, 1996, 27(4): 38-40.
- [2] 陈小义, 徐瑞成, 陈莉. 蟾蜍灵对人胃癌细胞系 MGC-803 的细胞毒作用 [J]. 中草药, 2000, 31(2): 920-922.
- [3] 陈小义, 呼文亮, 徐瑞成. 蟾蜍灵对肝癌细胞 SMMC7721 的细胞毒作用及生长相关基因表达的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(4): 293-296.
- [4] VERPOORTE R, PHAN Q K, BAERHEIM S A. Chemical constituents of vietnamese toad venom, collected from *Bufo Melanostictus schneider*. Part II The bufadienolides [J]. J Nat Prod, 1980, 43: 347-352.
- [5] 叶敏. 植物细胞悬浮培养体系和微生物对华蟾毒精和蟾毒灵的生物转化 [D]. 北京: 北京大学, 2003.
- [6] ZHANG Wei, YE Min, QU Gui-qin, et al. Microbial hydroxylation of cinobufagin by *Mucor spinosus* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2005, 7: 225-229.

Isolation and identification of bufadienolides from traditional Chinese drug Venenum Bufonis

QIAO Li, DUAN Wen-juan, YAO Yao, CHEN Huan, LIU Tao, PEI Yue-hu
(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents from the traditional Chinese drug Venenum Bufonis. **Methods** The compounds were separated by column chromatography and their structures were elucidated based on chemical and spectral analysis. **Results** Six compounds were isolated from the chloroform extracts of Venenum Bufonis. Their structures were determined as resibufagenin (1), cinobufagin (2), bufalin (3), cinobufatalin (4), 12-hydroxylcinobufagin (5) and 1-hydroxylcinobufagin (6). **Conclusions** Compound 6 is a new natural product.

Key words: medicinal chemistry; structural identification; column chromatography; Venenum Bufonis; chloroform extracts