

蛇足石杉生物碱成分的研究

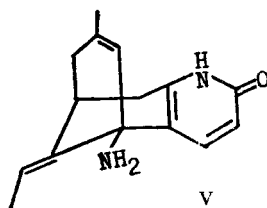
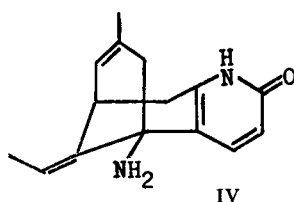
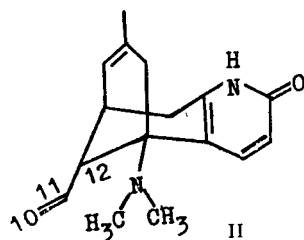
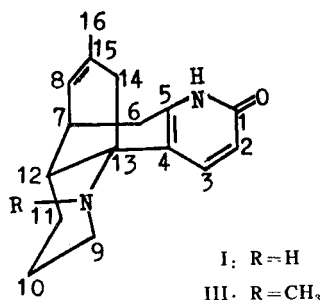
袁珊琴 魏同泰

(军事医学科学院, 北京)

提要 从石杉科植物蛇足石杉中分离出三个生物碱(I~III)。经光谱数据和衍生物的制备证明: 生物碱(I)和(III)分别为石杉碱乙(I)和N-甲基石杉碱乙(III); 生物碱(II)为新化合物。命名为蛇足石杉碱(huperzine)。本文报告碱(II)的结构测定。(II)的生物活性正在研究中。

关键词 蛇足石杉; 石杉碱乙; 蛇足石杉碱; N-甲基石杉碱乙

蛇足石杉为蕨类植物, 属于石杉科(Huperziaceae)石杉属植物(*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.), 又名蛇足草, 千层塔, 金不换。民间用于治疗痈疔肿毒、跌打损伤等⁽¹⁾。我们曾从该植物和同科植物华南马尾杉中分离出一个很强的胆碱酯酶抑制剂福定碱⁽²⁾, 与刘嘉森⁽³⁾从千层塔中分得的石杉碱甲为同一化合物。经临床证明对重症肌无力有效率达99%⁽⁴⁾, 对老年性健忘症和痴呆症也有一定疗效⁽⁵⁾。为综合利用此植物资源, 进一步寻找生物活性成分, 采用柱层析和制备性薄层层析等方法, 从中又分离出三个生物碱(I~III)。光谱数据和衍生物的制备证明: 生物碱I和III分别为已知的石杉碱乙⁽³⁾和N-甲基石杉碱乙⁽⁶⁾; 生物碱II为一新成分, 命名为蛇足石杉碱(huperzine, II)。生物碱I同石杉碱甲一样, 具有很强的抑制胆碱酯酶活性⁽⁷⁾和提高学习记忆效率的功能⁽⁸⁾, III也有一定的抑制胆碱酯酶活性。II的生物活性正在研究中。



生物碱II为白色细针状结晶, 分子式C₁₇H₂₉N₂O, 分子量270.1728, $[\alpha]_D^{25} -25.3^\circ$ (c 0.1456, 氯仿)。IR(KBr)cm⁻¹ (3100, 1670, 1615, 1555); UV_{max}^{EtOH}nm (231.8, 311.2) 和 ¹HNMR(δ 7.66, 6.46 each 1H, d, J=9.3 Hz)表明分子中存在邻位双取代 α -吡啶酮

环。从¹³CNMR显示有四个 sp²季碳，四个 sp²叔碳和一个 sp²仲碳以及 UV (202 nm)，表明分子中除 α-吡啶酮外尚含两个孤立双键，进而判定该分子为三环结构。MS 测得分子离子及主要碎片离子有 270(M⁺, 100), 255(38), 229(92), 227(17), 215(7), 189(40)等，根据碎片离子 255, 229, 215 并综合以上光谱数据，推断其结构与 selagine(IV)类似^(9,10)。但两者 NMR 有一明显差异。在结构 IV 中，呈现二个双键甲基 (CH₃-C=和 CH₃-CH=) 信号，而 II 只显示一个双键 (15-C) 甲基 (CH₃-C=) 信号 (δ 1.54, 3 H, s)，没有亚乙基 (CH₃-CH=) 信号。根据 IRKBr cm⁻¹(920, 1840) 以及¹³CNMR 中 sp²仲碳信号 (δ 116.33, t, J=154.1) 表明，结构 II 在 12 位上的侧链含有一末端乙烯基 (-CH=CH₂)。¹HNMP 出现的信号 (δ 5.20, 1 H, d, J=16.6; δ 5.05, 1 H, d, J=10.3; δ 5.96, 1 H, ddd, J=16.6, 10.3, 10.3) 证实了这一点。另外，结构 IV 中环内双键烯质子位于 14-C 并为单峰，而结构 II 却显示出同福定碱(V) 8-C 位移相似的双峰信号 (δ 5.37, 1 H, d, J=4.1)，表明 II 的环内烯质子同 V 一样，有一邻位质子偶合并应定位于 8-C 而不是在 14-C 上。这一推定用去偶实验得到了证实：当照射 7-H 时，烯质子 (8-H)、次甲基质子 (6-H) 以及亚甲基质子 (12-H) 同时分别去偶成单峰、AB 峰和双峰。此外，根据¹³CNMR 信号 (δ 39.50, q, J=136.4) 表明，结构 II 中另一个氮原子上连有一个甲基，结合¹HNMR 分析，δ 2.43 (6 H, s) 信号的存在，显示可能是二个氮甲基。当加入 2 滴三氟醋酸后，在 δ 41.60, 38.37 (each q) 出现了二个氮甲基信号 (表 2)，在¹HNMR 中做同样实验后，在 δ 3.14, 2.87 (each

Tab 1. ¹H NMR spectral data for alkaloid (II)**

No-H	CDCl ₃	CDCl ₃ +TFA
2-H	6.46 (1H, d, J _{2,3} =9.3)	6.92 (1H, d, J _{2,3} =9.3)
3-H	7.66 (1H, d, J _{3,2} =9.3)	8.21 (1H, d, J _{3,2} =9.3)
6-H _A	2.98 (1H, dd, J _{6A,6B} =18 J _{6A,7} =4.9)	3.17* (1H, dd, J _{6A,7} =4.9)
6-H _B	2.43*(1H)	2.64 (1H, dd, J _{6B,6A} =18 J _{6B,7} ≈0)
7-H	2.43*(1H)	2.74 (1H, br. d, J _{7,8} =4)
8-H	5.37 (1H, br. d, J _{8,7} =4)	5.51* (1H, br. d)
10-H _A	5.05 (1H, d, J _{10A,11} =10.3)	5.47 (1H, d, J _{10A,11} =10.3)
10-H _B	5.20 (1H, d, J _{10B,11} =16.6)	5.53* (1H, d)
11-H	5.96 (1H, ddd, J _{11,10B} =16.6, J _{11,10A} =J _{11,12} =10.3)	5.90 (1H, ddd, J _{11,10B} =16.6, J _{11,10A} =J _{11,12} =10.3)
12-H	2.86 (1H, dd, J _{12,11} =10.3, J _{12,7} =3.9)	3.03 (1H, dd, J _{12,11} =10.3, J _{12,7} =3.9)
14-H (endo)	2.79 (1H, d, J _{14,14} =17.6)	2.98 (1H, d, J _{14,14} =17.1)
14-H (exo)	1.62 (1H, br. d, J _{14,14} =17.6)	2.34 (1H, d, J _{14,14} =17.1)
16-H	1.54 (3H, s)	1.63 (3H, s)
N /CH ₃	2.43* (6H)	3.14* (3H, s, N-CH ₃ A)
NH	13.22*** (1H, br. s)	2.87 (3H, s, N-CH ₃ B)

* Overlapped. ** Chemical shifts in ppm units; Coupling constant in Hz units. *** Disappear after adding D₂O

3H, s)也显示出二个氮甲基信号(表1)。由此证实了生物碱II的结构。

Tab 2. ^{13}C NMR spectral data for alkaloid(II)*

No-C	CDCl_3	CDCl_3+TFA
1-C	165.20 (s)	163.94 (s)
2-C	117.63 (d) $J_{\text{CH}}=167.3$ Hz	117.88 (d) $J_{\text{CH}}=173.1$ Hz
3-C	140.14 (d) $J_{\text{CH}}=152.6$ Hz	142.67 (d) $J_{\text{CH}}=161.4$ Hz
4-C	118.64 (s)	116.98 (s)
5-C	142.96 (s)	145.66 (s)
6-C	29.10 (t) $J_{\text{CH}}=130.6$ Hz	28.82 (t) $J_{\text{CH}}=133.5$ Hz
7-C	38.73 (d) $J_{\text{CH}}=133.5$ Hz	37.69 (d) $J_{\text{CH}}=140.9$ Hz
8-C	124.47 (d) $J_{\text{CH}}=155.5$ Hz	124.09 (d) $J_{\text{CH}}=151.1$ Hz
10-C	116.33 (t) $J_{\text{CH}}=154.1$ Hz	121.83 (t) $J_{\text{CH}}=155.5$ Hz
11-C	142.36 (d) $J_{\text{CH}}=158.4$ Hz	134.63 (d) $J_{\text{CH}}=154.0$ Hz
12-C	45.76 (d) $J_{\text{CH}}=129.1$ Hz	43.62 (d) $J_{\text{CH}}=135.0$ Hz
13-C	59.95 (s)	68.48 (s)
14-C	44.38 (t) $J_{\text{CH}}=129.1$ Hz	41.45 (t) $J_{\text{CH}}=130.6$ Hz
15-C	134.21 (s)	132.41 (s)
16-C	22.87 (q) $J_{\text{CH}}=126.2$ Hz	22.17 (q) $J_{\text{CH}}=126.1$ Hz
N-(CH ₃) _A	39.50**(q) $J_{\text{CH}}=136.4$ Hz	41.60 (q) $J_{\text{CH}}=143.8$ Hz
N-(CH ₃) _B	39.50**(q) $J_{\text{CH}}=136.4$ Hz	38.37 (q) $J_{\text{CH}}=143.8$ Hz
		$J_{\text{C}_8\text{H}_A}=10\text{Hz}$

* Chemical shifts in ppm units; ** Overlapped.

I为白色柱晶, 分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$, 分子量 256.2。根据 IR, UV, ^1H NMR 等光谱表明分子中具有与结构 II 相同的邻位双取代 α -吡啶酮环。 ^{13}C NMR 显示有七个 sp^2 碳原子以及 UV(202 nm)表明分子中尚有一个孤立双键, 从 ^1H NMR(δ 1.54, 3H, s; δ 5.46, 1H, d)判定为环内双键。根据 MS 测得的碎片离子 173(M^+-83), 201(M^+-55), 241(M^+-15)并综合以上光谱, 推断其具有 lycodine 型的四环结构^(10,11)。本品用碘甲烷甲基化, 得 N-甲基化物, 表明另一个氮以仲胺形式存在。根据理化性质和光谱数据推定结构为 I 式, 与文献报道⁽³⁾的石杉碱乙数据相符。

III 为粗针状结晶, 分子式 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$, 分子量 270.1728, 根据光谱分析提示有与结构 I 及 II 相同的 α -吡啶酮环和环内双键。其 MS 主要碎片, ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 与 I 相类似, 但在 ^1H NMR(δ 2.65 ppm)和 ^{13}C NMR(δ 37.63 ppm)处均出现一个 N-甲基峰。经与从 I 制得的 N-甲基化物对照, 其 mp(混合 mp 不下降), MS, ^1H NMR 一致, IR 谱重叠, 由此确证 III 即为 N-甲基石杉碱乙。

实 验

熔点用 MP-53 型微量熔点测定器测定, 温度计未加校正。比旋度用 P-E 243 B 旋光计测定。紫外光谱用岛津 UV-260 型分光光度计测定, 无水乙醇为溶剂。红外光谱用 Nicolet SDX 型仪测定, 溴化钾压片。核磁共振谱用超导傅里叶变换 JNM-GX-400 型仪测定; 工作频率 ^1H NMR 400 Hz, ^{13}C NMR 100 Hz(CDCl_3 , CDCl_3 和 TFA 为溶剂, 四甲基硅为内标)。质谱用 MAT-711 型仪测定。柱层析和薄层层析所用的硅胶为青岛海洋化工厂出品。

生物碱 I 生药粗粉用 2% 盐酸渗滤, 滤出液用阳离子交换树脂分离, 所得的总碱以硅胶(粒度 10~40 μ)为固定相, 乙醇-冰醋酸(100:7)为流动相低压洗脱, 按色带收集分成

六部分。取第四部分用不同 pH 磷酸缓冲液抽提,在 pH 7~8 部位得到一结晶,用无水乙醇—丙酮重结晶,mp 272~3°C。元素分析: $C_{16}H_{20}N_2O$ (%) C 75.15, H 8.04, N 10.67, 计算值 C 75.00, H 7.81, N 10.93。UV λ_{max} nm 202.6(ϵ 11197), 231.2(ϵ 10040), 312.2(ϵ 7725)。IR(KBr) cm^{-1} 3440(m), 3100(m), 2620(s), 1670(s), 1610(s), 1555(m), 1455(s), 1430(s), 1310(m), 1130(s), 920(m), 840(s)。 1H NMR(δ ppm): 7.89, 6.50(各 1 H, AB 型, $J=9.3$ Hz, 3—H, 2—H), 5.46(1H, d, 8—H, $J=4$), 1.54(3 H, s, 16—CH₃)。 ^{13}C NMR(δ ppm): 164.91(s, 1—C), 117.65(d, 2—c), 140.12(d, 3—C), 116.99(s, 4—c), 143.33(s, 5—C), 29.00(t, 6—C), 33.78(d, 7—C), 125.63(d, 8—C), 46.82(t, 9—C), 24.56(t, 10—C), 26.74(t, 11—C), 39.46(d, 12—C), 53.62(s, 13—C), 41.06(t, 14—C), 131.68(s, 15—C), 22.54(q, 16—C)。MS m/z 256.2(M^+ , $C_{16}H_{20}N_2O$), 241(M^+-15), 227(M^+-29), 213(M^+-43), 201(M^+-55), 187(M^+-69), 173(M^+-83)。

生物碱 II 上述第四部分最后用 5% 盐酸提取, 所得的弱碱部位用粗硅胶进行干柱逆向层析, 用乙酸乙酯—甲醇—氨水 (15:1.5:0.15) 为展开剂, 大体均等地切割成 8 组分, 从第 5 组分中得到两个色点的混合结晶, 再采用制备薄层层析法分离, 以氯仿—甲醇—冰醋酸—水 (70:20:16:3) 为展开剂, 分别得到两个单体。上面一单体用氯仿—丙酮重结晶, 得白色细针状结晶, mp 251~3°C。UV λ_{max} nm 202.4(ϵ 12965), 231.8(ϵ 9756), 311.2(ϵ 7489)。IR(KBr) cm^{-1} 3100(m), 2900(s), 1670(s), 1615(s), 1555(m), 1315(s), 920(s), 840(w)。 1H NMR 数据见表 1, ^{13}C NMR 数据见表 2。高分辨质谱 m/z (%) 270.1728(M^+ , $C_{17}H_{22}N_2O$, 100), 255(M^+-15 , 38), 229(M^+-41 , 92), 227(M^+-43 , 17), 226(M^+-44 , 31), 215(M^+-55 , 7), 201(M^+-69 , 17), 202(M^+-68 , 45), 189(M^+-81 , 40), 176(M^+-94 , 20), 175(M^+-95 , 29)。

生物碱 III 上述用制备薄层层析分得的下面一个单体用氯仿—丙酮重结晶, 得白色粗针状结晶, mp 273~4°C。UV λ_{max} nm 202.4(ϵ 13447), 231.4(ϵ 10324), 312.8(ϵ 8100)。IR(KBr) cm^{-1} 3260(w), 3230(w), 3090(m), 2925(s), 1670(s), 1310(s), 1560(m), 1460(m), 1425(m), 1310(m), 1100(m), 920(m), 830(m), 800(m)。 1H NMR(δ ppm) 12.91(1H, br.s, N—H), 7.84, 6.42(各 1 H, AB 型, $J=9$ Hz, 3—H, 2—H), 5.40(1 H, d, $J=4.9$, 8—H), 2.65(3 H, s, N—CH₃), 1.54(3 H, s, 16—CH₃)。 ^{13}C NMR(δ ppm) 165.27(s, 1—C), 117.49(d, 2—C), 141.35(d, 3—c), 120.20(s, 4—c), 142.82(s, 5—c), 29.39(t, 6—C), 32.65(d, 7—C), 124.96(d, 8—c), 50.58(t, 9—c), 20.11(t, 10—c), 25.73(t, 11—C), 34.22(d, 12—C), 56.86(s, 13—C), 43.07(t, 14—C), 132.43(s, 15—C), 23.10(q, 16—C)。MS m/z 270.1728(M^+ , $C_{17}H_{22}N_2O$), 255(M^+-15), 241(M^+-29), 229(M^+-41), 227(M^+-43), 215(M^+-55), 201(M^+-69), 199(M^+-71), 187(M^+-83)。

N-甲基石杉碱乙 取 100 mg I 溶于 40 ml 甲醇—丙酮 (1:1) 混合液中, 再加碘甲烷 1 ml, 于水浴加热回流 4 h, 减压蒸干, 用板层制备分离主要色点, 以氯仿—丙酮重结晶, 得白色针晶 70 mg。mp 273~4°C。 1H NMR(δ ppm) 12.97(1 H, br.s, N—H) 7.85, 6.43(各 1 H, AB 型, $J=9.3$ Hz, 3—H, 2—H), 5.41(1 H, d, $J=5.37$, 8—H), 2.66(3 H, s, N—CH₃), 1.54(3 H, s, 16—CH₃)。MS m/z : 270(M^+), 255, 241, 229, 227, 215, 201, 199, 187。IR(KBr) cm^{-1} 3260, 3230, 3090, 2925, 1670, 1610, 1560, 1460, 1425, 1310, 1100, 920, 830, 800。与 III 完全重叠。

致谢 本文承顾国明付研究员审阅; 原植物由本室马其云鉴定; 红外和紫外由我所刘荫堂、金素琴分别

代测; 质谱、旋光和元素分析均由本院仪器中心代测。

参 考 文 献

1. 浙江药用植物编写组. 浙江药用植物志(上册). 杭州: 浙江科技出版社, 1980; 7:51.
 2. 徐择邻, 等. 福定碱的结构测定. 解放军医学杂志 1985; 10: 263.
 3. 刘嘉森, 等. 石杉碱甲和石杉碱乙的化学研究. 化学学报 1986; 44: 1035.
 4. 程源深, 等. 石杉碱甲治疗重症肌无力症 128 例. 新药与临床 1986; 5: 197.
 5. 张慈禄. 石杉碱治疗老年性记忆功能减退. 同上 1986; 5: 260.
 6. 李军, 等. 千层塔生物碱的研究(摘要). 中草药 1987; 18: 2.
 7. 王月娥, 等. 石杉碱甲的抗胆碱酯酶作用. 中国药理学报 1986; 7: 110.
 8. 唐希灿, 等. 石杉碱甲对大鼠辨别学习和再现过程的影响. 中国药理学报 1986; 7:507.
 9. Walenta Z. et al. The structure of selagine *Tetrahedron lett* 1960; 10: 26.
 10. Maclean DB. Lycopodium Alkaloids XIII. Mass spectra of representative Alkaloids *Can J Chem* 1963; 41: 2654
 11. Anet FAL, et al. Lycodine a new alkaloid of *Lycopodium annotinum*. *Ibid.* 1958; 36: 902.
- IR=HIIIR=CH₃IIIVV

STUDIES ON THE ALKALOIDS OF *HUPERZIA SERRATA* (THUNB.) TREV.

SQ Yuan and TT Wei

(Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT Three alkaloids were isolated from *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. Two of them were identified as known alkaloids huperzine B(I) and N-methyl huperzine B(III), respectively. The third alkaloid II was found to be a new compound named huperzinine. Its structure was confirmed on the basis of chemical and spectral data (UV, IR, NMR, MS).

Key words *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.; Huperzine B; Huperzinine; N-Methyl huperzine B.