

文章编号:1001-6880(2014)3-0305-04

甲基京尼平差向异构体的拆分与结构确证

王美瑜,邹茜茜,刘珂,许卉,范华英,车鑫*

烟台大学药学院,烟台 264005

摘要:采用制备型高效液相色谱分离纯化 C-1 位甲基京尼平,运用核磁共振技术确定 R、S-甲基京尼平的结构。成功分离得到甲基京尼平差向异构体的单体,经鉴定为 R、S-甲基京尼平,并首次对其¹H NMR 进行了报道,成功的发现了新型京尼平衍生物。

关键词:梔子;京尼平苷;甲基京尼平;差向异构体;结构确证

中图分类号:R914

文献标识码:A

Isolation and Structural Identification of Epimers of Methyl Genipin

WANG Mei-yu, ZOU Qian-qian, LIU Ke, XU Hui, FAN Hua-ying, CHE Xin*

School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: The aims of this study were to isolate epimers of methyl genipin and to identify their structures. Preparative liquid chromatography was used for the separation. The structures of separated compounds were determined by NMR spectral analysis. Two new epimers were successfully isolated and were identified as R-methyl genipin and S-methyl genipin. This is the first report of the isolation of R,S-methyl genipin and the elucidation of their absolute configurations. The ¹H NMR data of R,S-methyl genipin were also reported for the first time.

Key words: Fructus Gardeniae; geniposide; methyl genipin; epimer; structural identification

梔子为茜草科植物梔子(*Gardenia jasminoides* Ellis)的干燥成熟果实。其性味苦,寒,归心、肺、三焦经^[1]。具有保肝利胆^[2]、保护神经细胞^[3]、抗抑郁^[4]、抗炎^[5]、抗肿瘤^[6]、降血糖^[7]、抗氧化、抗高血压、抗血栓以及抗骨质疏松^[8]等作用。梔子果实的化学成分很多,主要包括藏红花素类、环烯醚萜类、有机酸等^[9],其中环烯醚萜类的活性最高的成分为京尼平苷^[10]。京尼平苷是一种单环环烯醚萜苷类化合物,无毒,易溶于水。《伤寒论》中记载的梔子豉汤,主治“心烦不得眠,心中懊恼”,现代研究证实其中的京尼平苷具有明显的抗抑郁作用^[11]。但有文献报道,大剂量应用京尼平苷可导致明显的肝、肾病理学改变,京尼平苷是梔子肝、肾毒性的主要物质基础。京尼平苷产生毒性的原因是其在肠道内细菌的作用下水解成京尼平,京尼平与体内氨基酸结合生成具有较强生物活性的梔子蓝,梔子蓝可能为其导致肝肾毒性的直接物质基础^[12,13]。

为寻找化学和代谢稳定性良好、生物利用度高、

毒性较小的新型京尼平衍生物。本课题合成了新型京尼平衍生物:甲基京尼平,并发现甲基京尼平的肝毒性明显小于京尼平苷。甲基京尼平是在京尼平苷的基础上甲基化制备而得,在反应的同时发现甲基京尼平为一对异构体的混合物,同时含有 R、S-甲基京尼平(图 1)。本实验经过制备型高效液相色谱同时分离得到 R、S-甲基京尼平,为药效的研究提供物质基础。

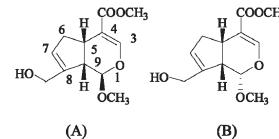


图 1 R-甲基京尼平(A)及 S-甲基京尼平(B)的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of R,S-methyl genipin

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪、岛津 SIL-20A 自动进样器(日本岛津);R205 旋转蒸发仪(上海禾汽玻璃仪器有限公司);varian210 制备型高效液相色谱(美国 varian);岛津 UV-2550 紫外光谱测定仪(日本岛津);Bruker AV400 MHz 核磁共振仪(以 TMS

为内标)(美国布鲁克);Diamonsil C18 反相液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 中国迪马公司)、Waters Bondapak C₁₈色谱柱(19 mm × 200 mm, 20 μm)。

1.2 试药

京尼平苷(购自四川泰康有限公司,含量>95%);甲醇(色谱纯,Oceanpak),无水甲醇(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);浓硫酸(分析纯,烟台市双双化工有限公司);石油醚(分析纯,天津市化学试剂一厂);乙酸乙酯(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氯仿(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);水(市售纯净水)。

2 实验方法

2.1 甲基京尼平的合成

取1.0 g 京尼平苷于50 mL圆底烧瓶中,量取1 mol/L 硫酸-甲醇10.0 mL,65 ℃加热回流4 h。用NaOH中和以后减压蒸去溶剂,加水、氯仿(1:2)萃取3次,氯仿层蒸干溶剂后,硅胶柱层析采用石油醚、乙酸乙酯梯度洗脱分离得到甲基京尼平,其¹H NMR数据与文献报道一致^[14],结果见表1。液相验证纯度时发现产物为一对异构体的混合物(见图2)。

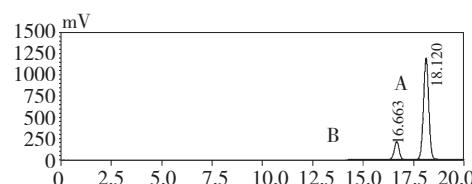


图2 甲基京尼平 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of methyl genipin

A:R-甲基京尼平;B:S-甲基京尼平

A:R-methyl genipin;B:S-methyl genipin

2.2 (R)-甲基京尼平、(S)-甲基京尼平的拆分

取上述方法制备得到的甲基京尼平加甲醇制成30 mg/mL 的溶液作为供试品溶液,经制备型高效液相色谱分离,合并相同的馏分,50 ℃减压蒸干,得到化合物A 80 mg、化合物B 15 mg。制备液相的色谱条件如下:流动相为甲醇-水(15:85),流速为10.0 mL/min,检测波长为238 nm,进样量2 mL,柱温30 ℃。分析型液相验证条件如下:流动相为乙腈-水(25:75),流速为1.0 mL/min,检测波长为238 nm,柱温30 ℃,进样量为20 μL。经验证化合物A 和化合物B 的纯度分别为98%、95%(见图3),可以用于结构鉴定。

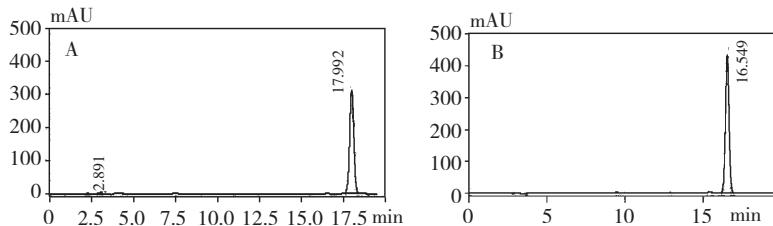


图3 纯化的 R-甲基京尼平(A)及 S-甲基京尼平(B) HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of purified R-methyl genipin (A) and S-methyl genipin (B)

3 结果与讨论

3.1 (R)-甲基京尼平、(S)-甲基京尼平、甲基京尼平的结构测定

以CDCl₃为溶剂,在400 MHz的核磁下对化合物A 和B 进行了氢谱、NOESY 谱测试。

化合物A 黄色油状固体,分析化合物A 的¹H NMR 和NOESY 谱数据,归属¹H NMR 信号(表1),比较化合物A 与甲基京尼平差向异构体的混合物的¹H NMR,发现大部分氢信号一致,说明为甲基京尼平的差向异构体之一,结构中的1位绝对构型由

NOESY 决定,NOESY 发现H-1位与H-5、H-9均不相关(见图4),证明化合物A 为R-甲基京尼平。

化合物B 黄色油状固体,分析化合物B 的¹H NMR 和NOESY 谱数据,归属¹H NMR 信号(表1),比较化合物B 与甲基京尼平差向异构体混合物的¹H NMR,发现氢信号有部分不完全一致,认为可能是由于其在混合物中所占的比例小的缘故,但仍可以推测为甲基京尼平的差向异构体之一,结构中的1位绝对构型由NOESY 谱决定,NOESY 发现H-1位与H-5、H-9 均有相关(见图4),证明化合物B 为S-甲基京尼平。

表 1 R-甲基京尼平、S-甲基京尼平、甲基京尼平的¹H NMR 信号Table 1 ¹H NMR data of R-methyl genipin, S-methyl genipin and methyl genipin

质子序号 No.	R-甲基京尼平 R-methyl genipin	S-甲基京尼平 S-methyl genipin	甲基京尼平 Methyl genipin
1	δ4.50(1H,d,J=8 Hz)	δ5.06(1H,d,J=4 Hz)	δ4.48(1H,d,J=8 Hz)
3	δ7.52(1H,s)	δ7.46(1H,s)	δ7.52(1H,s)
4	δ2.61(1H,t)	δ2.23(1H,m)	δ2.61(1H,t)
5	δ2.91(1H,m)	δ3.06(1H,m)	δ3.44(1H,s)
6	δ2.07(1H,m)	δ2.12(1H,m)	δ2.08(1H,m)
6	δ2.89(1H,m)	δ2.78(1H,m)	δ2.89(1H,m)
7	δ5.83(1H,s)	δ5.80(1H,s)	δ5.84(1H,s)
9	δ3.20(1H,m)	δ3.17(1H,m)	δ3.20(1H,m)
10	δ4.25(2H,s)	δ4.18(1H,m) δ4.27(1H,m)	δ4.25(2H,d)
COOCH ₃	δ3.59(3H,s)	δ3.44(3H,s)	δ3.59(3H,s)
OCH ₃	δ3.73(3H,s)	δ3.73(3H,s)	δ3.73(3H,m)

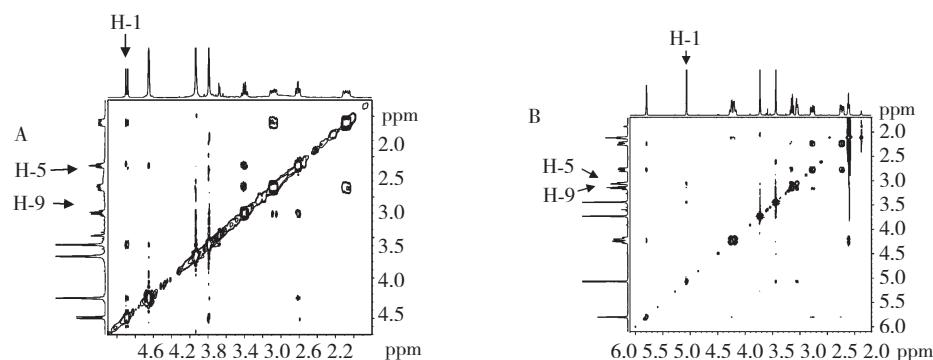


图 4 R-甲基京尼平(A)与 S-甲基京尼平(B)的 NOESY 图谱

Fig. 4 NOESY spectra of R-methyl genipin (A) and S-methyl genipin (B)

3.2 讨论

由于 S-甲基京尼平的含量较低,约为 R-甲基京尼平的 1/6,因此在拆分甲基京尼平的过程中,R-甲基京尼平易得到,而 S-甲基京尼平不易获到纯度较高的单体。实验过程中先后考察了甲醇-水 28:72、25:75、20:80、15:85,结果发现甲醇-水为 15:85 时效果最佳,能够得到较好的分离。

4 结论

本实验成功地合成了甲基京尼平,并且采用制备型高效液相色谱,成功的分离得到了 R、S-甲基京尼平,并对其结构进行了归属。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会).

Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010.

- 2 Takeuchi S, Goto T, Mikami K, et al. Genipin prevents fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality through the suppression of TNF- α production. *Hepatol Res*, 2005, 33: 298-305.
- 3 Yamazaki M, Chiba K, Mohri T, et al. Cyclic GMP-dependent neurite outgrowth by genipin and nerve growth factor in PC12h cells. *Euro J Pharmacol*, 2004, 488:35-43.
- 4 Tian JS, Cui YL, Hu LM, et al. Antidepressant-like effect of genipin in mice. *Neurosci Lett*, 2010, 479:236-239.
- 5 Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103:496-500.
- 6 Wang SW, Lai CY, Wang CJ. Inhibitory effect of geniposide

- on aflatoxin B1-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. *Cancer Lett*, 1992, 65:133-137.
- 7 Xie WL(谢文利), Li HJ(李宏捷), Jin YZ(晋玉章). Studies on the effects of geniposide in the lowering blood sugar of rat diabetic model. *Acta Aeadee Med CPAF*(武警医学院学报), 2008, 17:580-581.
- 8 Ha H, Ho J, Shin S, et al. Effects of eucommiae cortex on osteoblast-like cell proliferation and osleoclast inhibition. *Arch Pharm Res*, 2003, 26:929-936.
- 9 Xu Y(徐燕), Cao J(曹进), Wang YM(王义明), et al. Simultaneous determination of 3 kinds of components in *Gardenia* by high performance liquid chromatography under different UV-vis wave length. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, 38:543-546.
- 10 Kitano A, Saika S, Yamanaka O, et al. Genipin suppression of fibrogenic behaviors of the alpha-TN4 lens epithelial cell line. *J Cataract Refract Surg*, 2006, 32:1727-1735.
- 11 Gao F(高芳). Experimental study on treating the depression with decoction of capejasmine and fermented soybean. Fuzhou: Fujian College of Traditional Chinese Medicine(福建中医学院), PhD. 2007.
- 12 Yamano T, Tsujimoto Y, Noda T, et al. Hepatotoxicity of *Gardenia* yellow color in rat. *Toxicol Lett*, 1988, 44:177-182.
- 13 Cheng L(成龙), Yang HJ(杨洪军), Liang RX(梁日欣), et al. Pharmacokinetics of geniposide and its metabolite in rats. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32:161-163.
- 14 Yu Q(余琴), Zhao Q(赵庆), Zou CH(邹澄), et al. Preparation of structure modifying intermediate of geniposide. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med*(云南中医学院学报), 2008, 31(4):29-30.