

MS / MS 技术在确定清香桂碱 A 和 A₁ 混晶结构中的应用

邱明华 聂瑞麟* 周俊

(中国科学院昆明植物研究所植物化学开放研究实验室, 昆明 650204)

摘要 清香桂 (*Sarcococca ruscifolia*) 植物中得到一个清香桂碱 A 和 A₁ 的共晶, 我们通过化学及光谱方法确定了清香桂碱 A₁ 及 B 的化学结构, 并用 MS / MS 技术证实了这个混晶的结构。这几个生物碱的结构为, 碱 A (1) 为 $\Delta^{14,16}$ -3 α -二甲胺孕甾二烯; 碱 A₁ (2) 为 Δ^{16} -3 α -甲基甲酰胺孕甾烯; 碱 B (5) 为 Δ^{16} -3 α -二甲胺孕甾烯-20-酮。

关键词 清香桂; 富贵草生物碱; 清香桂碱 A, A₁ 和 B; MS / MS 技术

APPLICATION OF FAB-MS / MS TECHNIQUE IN STRUCTURAL DETERMINATION OF SARCORUCININE A AND A₁

QIU Ming-Hua, NIE Rui-Lin, ZHOU Jun

(Laboratory of Phytochemistry, Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract From *Sarcococca ruscifolia*, the mixed crystal of sarcorucinine A and A₁ were obtained, but was very difficulty in separating. The structure of sarcorucinine A was determined by X-ray analysis for the mixed crystal. Compounds 3 and 4 were isolated from the reduction of mixed crystal with LiAlH₄, and their structures were elucidated on the basis of the interpretation of MS, IR, ¹H, and ¹³C NMR spectra. Thus, the structure of sarcorucinine A₁ could be deduced as Δ^{16} 3 α -dimethylamino-20 α -methylmethylamido-pregnene (2), and was further confirmed by FAB-MS / MS spectra. The structure of the sarcorucinine B was deduced by using the same spectroscopic analysis. The present paper deals with the application of FAB-MS / MS technique in structural elucidation of sarcorucinine A, A₁ and structural elucidation of sarcorucinine B.

Key words *Sarcococca ruscifolia*; Pachysandra alkaloid; Sarcorucinine A, A₁ and B; MS / MS technique

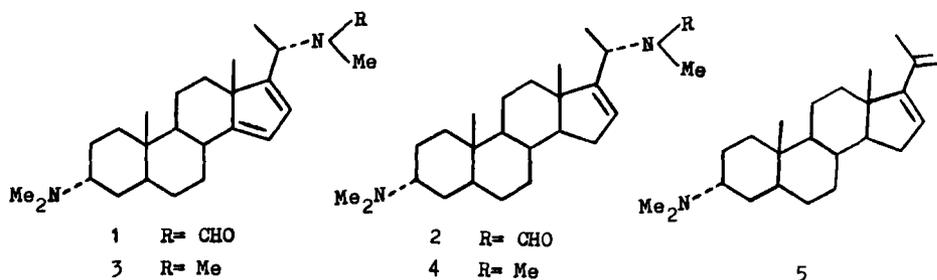
从清香桂 (*Sarcococca ruscifolia* Stapf) 植物中得到的晶体清香桂碱 A, TLC 方

1990年11月收稿, 1991年1月定稿

* 通讯联系人

法检查常为单一斑点, 而 ^{13}C NMR 数据的分析使我们怀疑它是否为饱和和同系物的混晶; 借助于 X-晶体衍射分析, 确定了碱 A 的化学结构. 在前报⁽¹⁾ 我们简要报道了 X-晶体衍射分析的结果. 为了完整归宿碱 A 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱, 我们又进一步对碱 A 混晶作了一些研究. 首先用高压液相色谱分析, 证实了碱 A 中还混有另一个结构相近的化合物, 但因难于分离, 只好将碱 A 用 LiAlH_4 还原, 从反应产物通过 TLC 分离到两个产物 3 和 4. 我们用光谱方法, 并通过与 X-晶体衍射的结果比较, 确定了 3 和 4 两个还原产物的结构. 由此反推, 与碱 A 混晶的生物碱是碱 A_1 (2), 从它们混合的 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱, 可将碱 A 和 A_1 的 ^1H 、 ^{13}C 化学位移数据一一指定. 为了进一步证实碱 A (1) 中混有碱 A_1 (2), 我们取用于 X-晶体衍射的样品, 用 FAB-MS/MS 技术进一步作了证实. 本文将报道混晶碱 A 和 A_1 的光谱分析及另一个生物碱清香桂碱 B 的结构确定, 并介绍 MS/MS 技术在分析这个混晶质谱中的应用.

LiAlH_4 还原物 3, mp 155—159°C. 其质谱出现分子离子峰 m/z 370, 提示分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_2$; 基峰 m/z 84 (100) 及 110 (11), 72 (22), 58 (17) 这些特征的碎片⁽²⁾, 提示 3 为具有 3-NMe₂, 20-NMe₂ 的孕甾生物碱. ^{13}C NMR 中, 烯碳信号 δ 161.00 (C), 117.51 (CH), 156.08 (C), 126.05 (CH) ppm 及 ^1H NMR 中烯氢信号 δ 5.81 (brs), 6.34 (brs) ppm 表明分子中有两个双键, 而 UV 在 λ 261—262 nm 的吸收示环内共轭双键的存在, 与碱 A 的 X-晶体衍射结果比较, 化合物 3 为碱 A 的还原物, 其结构可定为: $\Delta^{14,16}$ -3 α -二甲胺-20 α -二甲胺孕甾二烯 ($\Delta^{14,16}$ -3 α -dimethylamino-20 α -dimethylamino-pregnadiene). 于是可指定出 3 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (表 1).



LiAlH_4 还原物 4, 其质谱出现分子离子峰 m/z 372, 提示分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{N}_2$, 也出现基峰 m/z 84 (100), 110 (15), 72 (24) 这些特征碎片, 指出 4 为具有 3-NMe₂, 20-NMe₂ 型孕甾生物碱; 与 3 比较仅差两个氢原子. ^1H NMR 中, 甲基信号 δ 0.82 (s), 0.85 (s), 1.17 (d, $J=6.7$ Hz) ppm 相应于 19, 18, 21-甲基, 有一烯氢信号出现在 δ 5.65 (brs) ppm. ^{13}C NMR 中烯碳信号 δ 156.24 (C), 126.64 (CH) ppm 提示分子中仅有一个双键, 与质谱结果吻合; 而从化学位移上看, 也可推知双键出现在 16 (17) 位, 从碱 A 与碱 A_1 混晶的情况看, 这个推想也符合这些现象. 因而化合物 4 的结构确定为: Δ^{16} -3 α -二甲基-20 α -二甲胺孕甾烯 (Δ^{16} -3 α -dimethylamino-20 α -dimethylamino-pregnene).

确定了还原物 3 和 4 的化学结构以后, 反过来, 我们可以推想碱 A 中混有少量

表 1 化合物 1—5 的 ¹³C 化学位移
Table 1 ¹³C NMR chemical shifts of compounds 1—5

C	1	2	3	4	5
1	33.48	32.89	33.48	32.86	32.83
2	29.42	29.42	29.52	29.72	31.84
3	61.37	61.58	61.66	62.11	61.57
4	31.87	31.72	31.52	31.77	32.10
5	39.35	39.79	39.39	39.77	39.71
6	28.47	28.41	28.47	28.72	28.60
7	24.99	24.99	24.69	24.90	24.89
8	35.45	35.51	35.66	34.18	33.46
9	58.07	58.29	58.23	57.50	54.73
10	36.37	36.37	36.66	36.40	36.30
11	20.47	20.47	20.76	20.68	20.60
12	36.75	36.01	36.49	31.20	34.80
13	54.24	45.50	53.70	46.96	46.36
14	163.29*	54.73	161.00*	54.69	56.50
15	116.77	36.37	117.51	34.72	31.80
16	128.13	127.83	126.05	124.64	144.12
17	152.63*	152.83	156.08*	156.24	155.67
18	19.08	17.36	19.13	16.40	15.90
19	12.22	12.09	12.29	12.16	12.02
20	50.79	51.00	57.30	59.36	196.51
21	18.52	17.07	18.61	16.11	27.00
20-NMe	25.68	25.68	41.93	42.27	
CHO	162.30	162.10			
3-NMe ₂	43.80	43.80	43.64	43.65	43.76

* 可互换。指定依据 DEPT。

碱 A₁, 这两个生物碱由于结构相近, 形成混晶。从而 X-晶体衍射的结果给出清香桂碱 A (1) 的结构; 而混在其中的少量碱 A₁ (2) 则未引起注意 (也可能单晶挑选中正好 A 被挑出)。以碱 A 和碱 A₁ 的混晶来解释原来让人困惑的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱, 很快就能找到这些信号的归宿了。我们将 ¹H 和 ¹³C NMR 数据完整指定列于实验部分和表 1。

为了证实对混晶认识的可靠性, 我们进一步做了 HRMS 谱及 MS/MS 技术。HRMS 中基峰分子离子碎片 m/z 384.31 指明分子式为: C₂₅H₄₀N₂O。而另一强峰 m/z (%) 386.55 (34) 示分子式为 C₂₅H₄₂N₂O。而对于这个混晶用 MS/MS 技术得到质谱, 则更容易断定碱 A 中混着碱 A₁。图 1a 是碱 A 和 A₁ (1 和 2) 混晶的

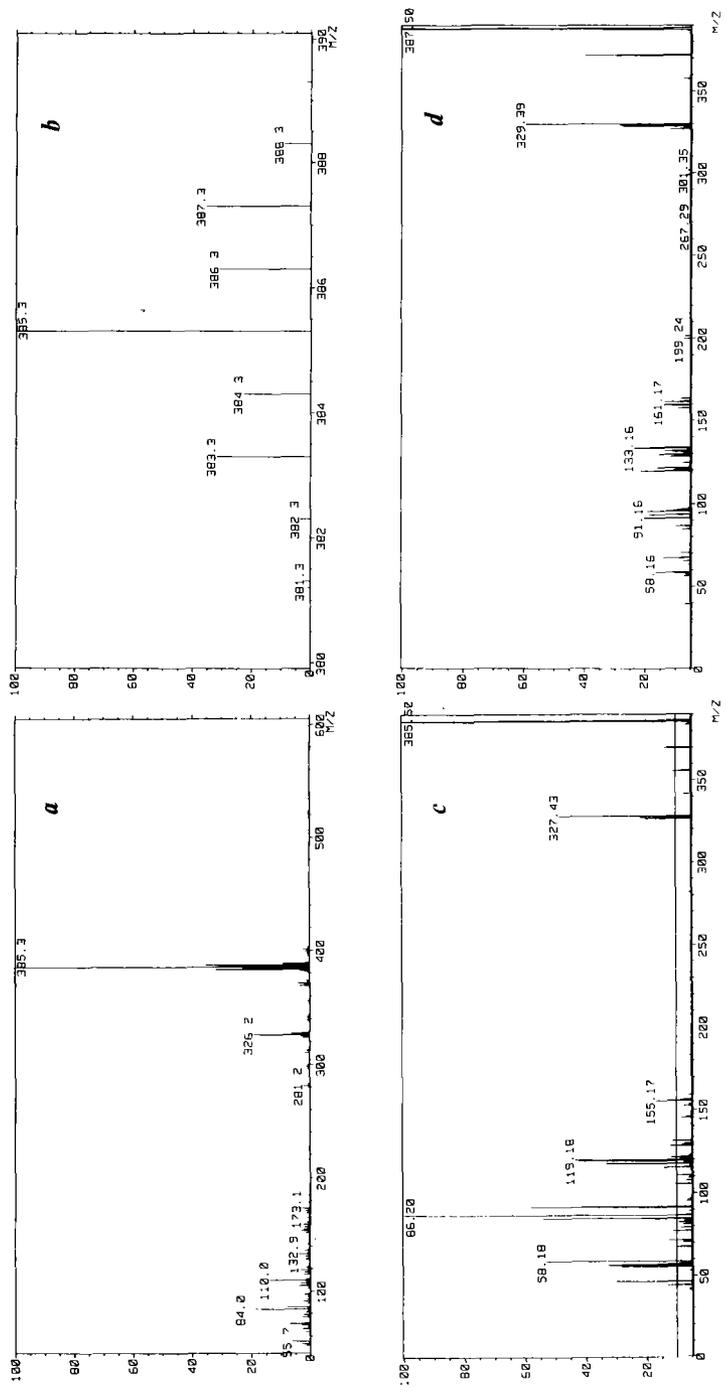


图 1 混晶 (1 和 2) 的 FAB-MS / MS 谱
Fig 1 FAB-MS / MS of mixed crystal (1 and 2)

FAB-MS 谱, 基峰 m/z 385.30 是碱 A 的 $M^+ + 1$ 碎片形成的, 展宽 m/z 380—390 的信号 (图 1b), 就可以看到碱 A₁ 的 $M^+ + 1$ 的碎片峰 m/z 387.30。为便于从碱 A 和 A₁ 的质谱比较这两个化合物结构之间的差别, 我们试图从混晶中碱 A 和碱 A₁ 各自的 $M^+ + 1$ 碎片峰用 MS/MS 技术得到它们的质谱, 从而了解纯碱 A 和碱 A₁ 的分子信息。图 1c 就是混晶中 $M^+ + 1$ 的碎片 m/z 385.30 的 MS/MS 谱, 这个质谱来源于原谱中碱 A 的 $M^+ + 1$ 的 FAB-MS 碎片, 由此失去支链上 $N=(CHO, CH_3)$ 基团就出现强峰 m/z 327.43 (42), 而 MS/MS 谱中有 M^+ 峰, 也出现有 $M^+ - CH_3$ 的峰 m/z 369.39。图 1d 则为原 FAB-MS 谱中碱 A₁ 的 $M^+ + 1$ 峰 m/z 387.50 的 MS/MS 谱, 基峰为 m/z 387.51 ($M^+ + 1$), 强峰 m/z 329.39 是 $M^+ + 1$ 峰失去 $N=(CHO, CH_3)$ 的碎片, 亦出现 M^+ 峰及碎片 m/z 371.38 (47) ($M^+ - CH_3$)。由 MS/MS 谱可比较碱 A 和 A₁ 之间差异仅为两个氢, 而且这个差异出现在甾核上, 这样证实了碱 A 中混有碱 A₁ 的推想。由于 FAB-MS 中的 $M^+ + 1$ 峰再次做质谱, 使得 MS/MS 谱中甾核部分的裂解方式与原分子的裂解方式不尽相同, 仅靠这两个谱图很难找出规律, 我们也不再解析甾核部分裂解的碎片。但总的说来, MS/MS 技术在推测混晶中不同组分的结构是相当有用的。

清香桂碱 B, mp 168—170°C。其质谱出现分子离子峰 M^+ 在 m/z 343, 再结合 ¹³C NMR 和 DEPT 数据, 可推出分子式 C₂₃H₃₇NO, 还出现孕甾生物碱的特征碎片 m/z 110 (40), 84 (100), 58 (9) 提示 3-NMe₂ 基团的存在, 而碎片 m/z 300 则指出是 $M^+ - O=C-CH_3$ 产生的。从 ¹H NMR 看, 有一烯氢在 δ 6.69 (brs) ppm, 而 NMe₂ 出现在 δ 2.31 (s) ppm, 三个甲基单峰 0.88 (s), 0.84 (s), 2.22 (s) ppm, 前两个可指定为 18,19-CH₃, 而后一个只能推测是 21-CH₃。从 ¹³C NMR 数据看出, 有一对烯碳信号为 δ 144.12 (CH), 155.67 (c) ppm, 推测在 16 (17) 位; 另有一个羰基碳信号 δ 196.51 (c) ppm, 可推想是 20-位氧化成羰基后与双键共轭, 使羰基化学位移稍微向高场移动。UV 有吸收在波长 λ_{max} 239.5 nm 证实了碱 B 中 α , β 不饱和酮的存在, 再仔细分析指定 ¹³C NMR 数据, 碱 B 的结构可确定为 5: Δ^{16} -3 α -二甲胺孕甾烯-20-酮 (Δ^{16} -3 α -dimethylamino-pregnene-20-one)。为便于归宿 ¹H 和 ¹³C NMR 数据, 我们做了 ¹H-¹³C HETCOR 谱, 以增加 ¹H 和 ¹³C NMR 数据指定的可靠性。

除清香桂碱 A 已报道过 X-晶体衍射结构外^[1], 清香桂碱 A₁、B 均为首次发表的新天然产物。

实验部分

熔点用显微熔点仪测定, 未校正。IR 用 Perkin-Elmer 577 分光光度计测定。KBr 压片。UV 用 UV-210A 分光光度计测定。¹H NMR 和 ¹³C NMR、DEPT 用 Bruker AM-400 超导核磁共振仪测定, 内标 TMS, 溶剂 CDCl₃, 化学位移 δ (ppm)。MS 用 Finnigan-4510 型质谱仪测定, 电子轰击 (EI): 20eV、HRMS、FAB-MS/MS 用 JEOL JMS-SX 102/SX 102 Tandem Mass Spectrometre 测定。

清香桂地上部分, 1985 年 10 月采自嵩明果东乡。取 70kg, 用工业乙醇温浸提取。浸取液回收乙醇, 浸膏约重 5kg, 用 5% 醋酸水液约 9 升溶解, 除去叶绿素等胶状

物, 酸液用浓氨水碱化, 至 pH10, 放置, 析出大量沉淀, 后用氯仿提取, 回收氯仿, 得其提取物 331g。由此用氧化铝和硅胶反复层析, 得大量清香桂碱 A (其实为混有清香桂碱 A₁ 的混晶), 得率估约 0.1%, 还得到少量清香桂碱 D 500mg, 清香桂碱 B 90mg, 得率分别为 0.0007%, 0.0001%。碱 D 因属另一小类型, 已归类报道^[3]。

清香桂碱 A (混有碱 A₁) (1 和 2 混晶), mp 162–163°C。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$: 261 nm。IR ν_{\max} : 2930, 2850, 1668, 1460, 1370 cm⁻¹。确定了结构后, 光谱可分别指定为, 碱 A (1): C₂₅H₄₀N₂O。MS m/z (%): 384 (M⁺, 4), 369 (M⁺-CH₃), 110 (55), 84 (基峰, 100), 58(9)。¹H NMR δ (ppm): 8.23 (1H, s, CHO), 6.27 (1H, brs, 15-H), 5.79 (1H, brs, 16-H), 4.42 (1H, q, J=5Hz, 20-H), 2.72 (3H, s, NMe), 2.20 (6H, s, NMe₂), 1.24 (3H, d, J=6.5 Hz, 21-CH₃), 0.91 (3H, s, 18-CH₃), 0.89 (3H, s, 19-CH₃)。 ¹³C NMR 数据指定列于表 1。碱 A₁ (2): C₂₅H₄₂N₂O。MS m/z (%): 386 (M⁺, 2.5), 371 (M⁺-CH₃), 110 (55), 84 (基峰, 100), 58 (9)。 ¹H NMR δ (ppm): 8.19 (1H, s, CHO), 5.72 (1H, brs, 16-H), 4.21 (1H, q, J=5 Hz, 20-H), 2.65 (3H, s, NMe), 2.22 (6H, s, NMe₂), 1.28 (3H, d, J=6.5 Hz, 21-CH₃), 0.92 (3H, s, 19-CH₃), 0.80 (3H, s, 18-CH₃)。

取混晶 (1 和 2) 150mg 溶于四氢呋喃溶剂, 加入 300mg LiAlH₄ 粉末, 回流 3 小时, 常法处理得产物, 用 TLC 层析分离, 得以化合物 3 约 110 mg, 4 约 30mg。化合物 3: C₂₅H₄₂N₂。mp 155–159°C。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$: 261 (ϵ 7263) nm。IR ν_{\max} : 2930, 2840, 2800, 2760, 1610 (弱), 1560, 1460, 1360, 1260, 1200, 1075, 1050 cm⁻¹。MS m/z (%): 370 (M⁺, 2), 355 (M⁺-CH₃, 12), 326 (M⁺-NMe₂, 5), 110 (11), 84 (100), 72 (22), 71 (40), 58 (17), 56 (25)。 ¹H NMR δ (ppm): 6.34 (1H, brs, 15-H), 5.81 (1H, brs, 16-H), 2.93 (1H, q, J=5 Hz, 20-H), 2.40 (6H, s, 3-NMe₂), 2.27 (6H, s, 20-NMe₂), 1.31 (3H, s, 21-CH₃), 1.03 (3H, s, 18-CH₃), 0.92 (3H, s, 19-CH₃)。 ¹³C NMR 数据指定列于表 1。化合物 4: C₂₅H₄₄N₂。UV 无吸收。IR ν_{\max} : 2930, 2840, 1580, 1415, 1120, 1050 cm⁻¹。MS m/z (%): 372 (M⁺, 2), 357 (M⁺-CH₃, 15), 110(15), 84 (基峰, 100), 72(24), 71(28), 58(8)。 ¹H NMR δ (ppm): 5.65 (1H, brs, 16-H), 2.93 (1H, q, J=5 Hz, 20-H), 2.33 (6H, s, 3-NMe₂), 2.32 (6H, s, 20-NMe₂), 1.17 (3H, d, J=6.7 Hz, 21-CH₃), 0.85 (3H, s, 18-CH₃), 0.82 (3H, s, 19-CH₃)。 ¹³C NMR 数据列于表 1。

清香桂碱 B (5), C₂₃H₃₇NO。mp 168–170°C。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$: 239.5 (ϵ 8790) nm。IR ν_{\max} : 2960, 2860, 2770, 1663, 1445, 1587, 1456, 1442, 1371, 1228, 1040, 1008 cm⁻¹。MS m/z (%): 343 (M⁺, 12), 328 (M⁺-CH₃, 4), 300 (M⁺-O=C-CH₃, 1), 110 (40), 84 (基峰, 100), 58(8)。 ¹H NMR δ (ppm): 6.69 (1H, brs, 16-H), 2.31 (6H, s, NMe₂), 2.22 (3H, s, 21-CH₃), 0.88 (3H, s, 19-CH₃), 0.84 (3H, s, 18-CH₃)。 ¹³C NMR 数据列于表 1。

致谢 FAB-MS/MS 谱由东京大学农学部生物有机化学研究室中山二郎君测定。

参 考 文 献

- 1 邱明华, 贺存恒, 裴瑞麟等. 清香桂碱 A 的化学结构. 云南植物研究 1990; 12(1): 111–112
- 2 Kikuchi T, Uyeo S, Nishinaga T et al. Mass Spectra of Pachysandra Alkaloids. *Yukugaku Zasshi* 1967; 87:

631—639

3 邱明华, 聂瑞麟, 周俊. 清香桂碱 D 和矮陀陀胺碱 A、B 的结构. 植物学报 1989; 31(7): 535—539

* * * * *

《云南植物研究》植物化学论文作者须知

为使本刊植物化学论文的格式规范化, 除按本刊征稿简则要求外, 另补充如下规定, 务请作者参阅本规定撰写论文。

1. 研究论文及简报的基本格式参照本刊 1991 年 (13 卷) 第 3 期。
2. 植物材料应附正确的拉丁文学名、产地、数量和制备方法。
3. 化学结构图须另页绘制, 基团标注无误, 在文稿内注明插图位置。常见化合物的结构不必给出。表插入文中适当位置, 图表应附相应的英文。

4. 参考文献按出现的先后顺序在文中注明, 著录格式见本刊“征稿简则”, 其中, 英文期刊名的缩写参照 CA, 但不加标点, 不可随意缩写, 如: Phytochem (正确为 Phytochemistry), Tetra (正确为 Tetrahedron)。

5. 实验部分必须简明扼要, 但要使实验化学家能够据此重复出该实验, 可以省略的一些实验细节: (1) 常规衍生物 (如乙酰化物) 的制备方法; (2) 化合物分离的细节, 如: 装柱, TLC 板, 柱子及馏分的大小等; (3) 仪器 (不包括型号) 及化学试剂的商业来源。

6. 新化合物采用 IUPAC 命名规则给出一个完整的系统名, 若有必要可再取一个得体的俗名。文中化合物第一次出现时若注有编号, 下文均以编号代表。

7. 每个化合物尽可能标出得率, 如: 化合物 3 (510 mg; 0.0031%)。结晶须指明所用溶剂如: 白色针晶 (MeOH)。熔点的表示法, 如: mp 259—261℃。液体化合物的折射率表示法, 如: $n_D^{25} 1.653$ 。

8. 元素分析表示法, 如: 已知化合物 (Found: C, 62.9; H, 5.4. Calc. for C₁₃H₁₃ON₄: C, 62.9; H, 5.3%)。新化合物 (Found: C, 62.9; H, 5.4. C₁₃H₁₃ON₄ requires: C, 62.9; H, 5.3%)。

9. 比旋度的表示法: $[\alpha]_D^{25}$ 测定值° (所用溶剂; c 指 100 ml 溶剂里化合物的克数), 如 $[\alpha]_D^{25} +32.2^\circ$ (EtOH; c 0.3210)。

旋光色散谱 (ORD) 可用一系列不同波长下的 $[\alpha]$ 值或分子比旋 $[\theta]$ 值表示。

圆二色散谱 (CD) 可用分子椭圆率值如 $[\theta]_{256} +21780$, $[\theta]_{307} -16113$ 或微分色散吸收值如 $\Delta\epsilon_{253} -1.02$ (MeOH; c 0.164) 表示。

10. NMR 表示为 ¹H NMR 或 ¹³C NMR, 须注明仪器的频率, 溶剂及内标物。化学位移以 δ 值 (对 TMS) 表示, 注明峰形, 如: 单峰 (s), 宽单峰 (brs), 双峰 (d), 双二重峰 (dd), 复峰 (m) 等。 ¹³C NMR 及 ¹H NMR 数据须注明所对应的碳和氢的位置, 采用 IUPAC 定位, 标为 C-1, C-2, H-1, H-2。例如: ¹³C NMR (21.15 MHz, CDCl₃): δ 30.1 (t, C-5), 74.1 (d, C-6), 121.3 (d, C-3), 144.2 (s, C-4)。 ¹H NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 0.681 (3H, s, H-18), 0.884 (6H, d, J=6.0 Hz, H-26 and H-27), 0.901 (3H, d, J=5.0 Hz, H-21), 4.342 (1H, q, J_{6 α} , J_{7 α} =4.5 Hz, J_{6 α} , J_{7 β} =2.0 Hz, H-6), 4.211 (1H, m, W_{1/2}) = 18.0 Hz; H-3 α 。所用仪器频率及溶剂若在实验部分的总论中已注明, 则以下皆可省略。

11. 质谱须注明所用的方法 (EIMS, CIMS, GC-MS, FABMS 等) 及离解能, 只须给出分子离子峰及重要的特征碎片峰 (相对强度), 如: EIMS (70eV) m/z (%): 386[M]⁺ (36), 368[M-H₂O]⁺ (100), 275[M-111]⁺ (35) 等。高分辨质谱 (HRMS) 若有必要可多给一些信息。

12. 紫外光谱表示法, 如: UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm(lge): 203 (4.17)。

(下转 457 页)