

[文章编号] 1674-8115(2011)04-0406-05

· 论著 ·

山莨菪碱 4 个异构体的分离及其抗胆碱活性比较

孙 凯, 谢一凡, 崔永耀, 陈红专, 陆 阳, 杨丽敏

(上海交通大学 医学院药学系, 上海 200025)

[摘要] 目的 探讨山莨菪碱立体异构与生物活性的关系。方法 采用 MDS-5 型反相制备色谱柱直接分离山莨菪碱得到外消旋体 I 和 II, 用手性半制备高效液相色谱柱分离 I 和 II 得到山莨菪碱的 4 个单一异构体, 通过抗卡巴胆碱致大鼠气管收缩效应实验考察 4 个异构体的抗胆碱活性。结果 由 ^1H NMR 谱和比旋光度值确定了山莨菪碱 4 个异构体的绝对构型, 不同的立体构型对卡巴胆碱诱导的大鼠气管平滑肌收缩表现出不同程度的抑制作用, 效应强度为 $(6S, 2'S) > (6S, 2'R) > (6R, 2'S) > (6R, 2'R)$ 。结论 山莨菪碱莨菪烷母核上的 S 构型在抗胆碱活性上发挥更重要的作用。

[关键词] 山莨菪碱; 立体异构体; 气管平滑肌

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.04.005

[中图分类号] R962

[文献标志码] A

Separation of four stereoisomers of anisodamine and comparison of their anticholinergic activity

SUN Kai, XIE Yi-fan, CUI Yong-yao, CHEN Hong-zhuan, LU Yang, YANG Li-min

(Department of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between stereoisomerism and pharmacological activity of anisodamine. **Methods** Two racemates of anisodamine (I and II) were separated from synthetic anisodamine using MDS-5 column, and four stereoisomers of anisodamine were separated from I and II by high performance liquid chromatography using CHIRALPAK AD-H. The anticholinergic activities of four stereoisomers were compared by their inhibitory effects on carbachol-induced contractions of isolated rat tracheal smooth muscle. **Results** The absolute configurations of four stereoisomers were assigned using ^1H NMR chemical shifts and specific rotation values. The difference of anticholinergic activities was observed among the four isomers of anisodamine. The order of potency was $(6S, 2'S) > (6S, 2'R) > (6R, 2'S) > (6R, 2'R)$. **Conclusion** (S) configuration at the tropane ring plays more important role in the anticholinergic activity of anisodamine.

[Key words] anisodamine; stereoisomers; tracheal smooth muscle

山莨菪碱(anisodamine)在药理学上与阿托品等莨菪烷类药物同属于 M 胆碱受体拮抗剂, 由于其中枢副作用弱而成为临幊上常用的外周抗胆碱药, 其化学结构为莨菪酸 6β -羟基- 3α -莨菪酯。天然山莨菪碱是从茄科植物唐古特山莨菪(*Scopolia tangutica Maxim.*)根中提取的一种生物碱, 其绝对构型为 $(6S, 2'S)^{[1]}$ 。因自然资源稀缺, 临幊上使用的是合成品, 合成山莨菪碱为两对对映体并存的外消旋体, 由 4 个异构体组成(图 1)^[2]。其中除了 $(6S, 2'S)$ 为天然山莨菪碱外, $(6R, 2'S)$ 异构体也曾从茄科植物中得到^[3]。多年来的药理学研究和临幊应用研究^[4-5]发现, 山莨菪碱的药理作用广泛, 除了对乙

酰胆碱受体的阻断作用外, 还具有稳定细胞膜、抗氧化、扩张血管和抗血栓等作用。

为了深入探讨山莨菪碱的立体异构与生物活性的关系, 优化其药理学性能, 为临幊合理用药提供理论依据和实验基础, 我们探索了从山莨菪碱中分离制备其 4 个异构体的方法, 并对它们的抗胆碱活性进行了比较。

本研究采用反相柱色谱结合高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)手性半制备分离山莨菪碱, 得到 4 个异构体, 鉴定其立体构型, 并比较它们对卡巴胆碱所致大鼠离体气管平滑肌收缩的抑制作用。

[基金项目] 上海市教委基金(06BZ009)和上海市科委基金(06DZ19001)(Shanghai Education Committee Foundation, 06BZ009; Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 06DZ19001)。

[作者简介] 孙 凯(1984—), 女, 硕士生; 电子信箱: wwwsunkai@163.com。

[通信作者] 杨丽敏, 电子信箱: hxyanglm@shsmu.edu.cn。

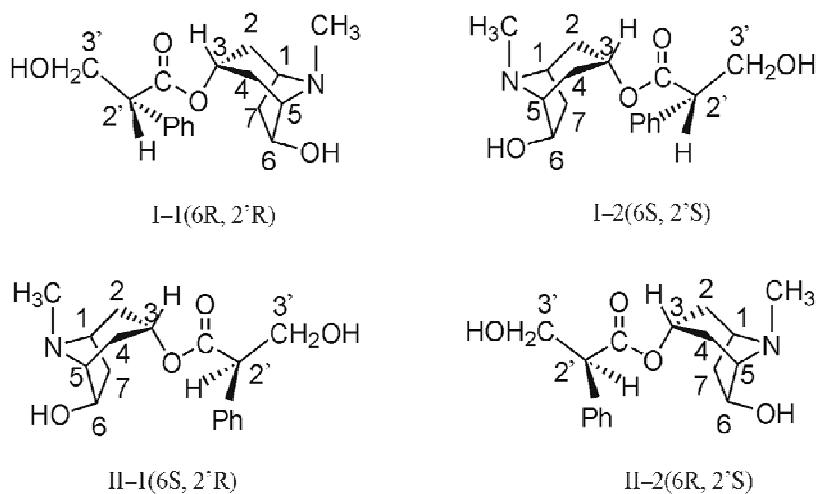


图 1 山莨菪碱的 4 个立体异构体的结构

Fig 1 Structure of four stereoisomers of anisodamine

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

SD 大鼠[体质量 220 g, 中国科学院上海实验动物中心提供; 动物生产许可证号: SCXK(沪)2008-0016, 使用许可证号: SYXK(沪)2008-0050]; 卡巴胆碱(Sigma), 山莨菪碱(杭州民生药业集团有限公司); 甲醇(分析纯, 上海大合化学品有限公司), 无水乙醇(分析纯, 上海振兴化工一厂), 乙腈、异丙醇(色谱纯, Tedia); MDS-5 型反相柱色谱填料(100~200 目, 北京麦迪生新技术开发中心); HPLC 仪(1100 Series, Agilent); 旋光仪(P-1030, Jasco); 磁共振仪(AV 500, Bruker); 圆二色谱仪(J-810, Jasco), PowerLab 数据采集和分析系统(ADI Instruments)。K-H 液组成(mmol/L): NaCl 118.3, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, 葡萄糖 5.5, CaCl₂ 2.5, EDTA-Na₂ 5.0; pH 7.4。

1.2 实验方法

1.2.1 MDS-5 型反相色谱柱的制备 取适量 MDS-5 型反相柱色谱填料于烧杯中, 加 1 mol/L 的盐酸浸没, 搅拌 24 h 后倒入布氏漏斗中抽滤, 用蒸馏水反复洗涤至中性, 然后转移至另一干燥的烧杯中, 加入适量甲醇搅拌, 待用。将上述处理过的填料倒入玻璃层析柱, 待填料逐渐沉淀后, 用甲醇冲洗几次, 再用流动相冲洗后即可使用。

1.2.2 山莨菪碱外消旋体 I 和 II 的分离 称取山莨菪碱 500 mg, 用少量甲醇溶解后上 MDS-5 型反相

色谱柱, 以甲醇-水(1:1)洗脱, 流出液用 HPLC 跟踪检测, 分别收集外消旋体 I 和 II, 浓缩后得到 I(141 mg) 和 II(79 mg)。

1.2.3 山莨菪碱对映体的分离 采用手性 HPLC 分离 I 和 II。色谱条件为 CHIRALPAK AD-H 半制备柱(250 mm × 10 mm, 5 m), 以乙腈-异丙醇-二乙胺(97:3:0.1)为流动相, 流速 1.8 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 235 nm。用适量的乙腈-异丙醇(97:3)溶解外消旋体, 以 50 μL 注射进样, 根据出峰时间收集组分, 浓缩后即得到各个异构体。由 I 分离得到一对对映体 I-1 和 I-2; 由 II 分得另一对对映体 II-1 和 II-2。

1.2.4 大鼠气管平滑肌标本制备 对大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛 1 200 mg/kg 进行麻醉, 剪开胸腔和颈, 迅速游离气管, 置于 Krebs-Henseleit(K-H)溶液中漂洗。小心剪除气管周围的脂肪, 将气管剪成 1 cm 左右的气管环备用。

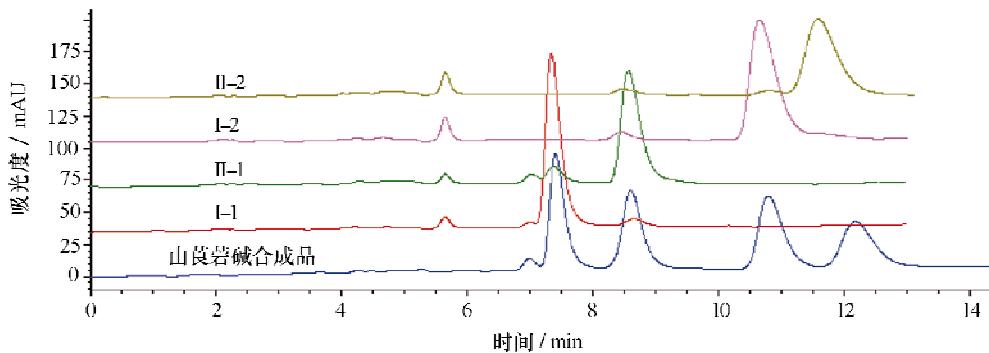
1.2.5 大鼠气管平滑肌张力测定 将大鼠离体气管平滑肌标本悬挂于盛有 10 mL K-H 液的浴槽内, 通过张力换能器连接 PowerLab 数据采集和分析系统, 调节张力至 2.0 g 左右, 在 37 °C 下平衡 1 h, 期间每 15 min 换营养液 1 次。用 1×10^{-5} mol/L 的卡巴胆碱刺激气管收缩, 待气管收缩幅度达到最大时, 以累积剂量法每隔 5 min 加药, 使营养液中的山莨菪碱浓度分别达 3×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 3×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol/L, 空白组加入等体积的超纯水作为对照, 以加药后的气管张力幅度与卡巴胆碱诱发最大收缩幅度之间的比值反映气管张力的变化。

2 结果

2.1 山莨菪碱立体异构体的鉴定

采用手性 HPLC 分析方法检测山莨菪碱异构体^[6],4 个异构体的色谱图如图 2 所示,其 ee 值分别为 99.46% (I - 1)、99.45% (I - 2)、99.23% (II - 1) 和 99.32% (II - 2)。异构体的¹H (500 MHz) 和¹³C (100 MHz) NMR 谱见表 1 和表 2,结果显示立体异构的山莨菪碱¹³C NMR 谱无差异,而杂环母核上的¹H NMR 数据在对映体之间无差异,但在差向异构体之间有明显不同,这种差异在理论上可以得到合理的解释。由于 2 个分子内氢键 (N … HO-C6 和 C = O … HO-C3') 的形成^[7],山莨菪碱 4 个异构体的优势构象如图 3 所示。这些构象中,苯环都位于杂环母核的下方,且偏向于环的一侧。由于苯环的磁各向异性效

应,杂环两侧的氢核受到的屏蔽作用不同。在 (6S, 2'S) 和 (6R, 2'R) 异构体中 H2endo、H2exo、H1、H7endo 和 H7exo 处于苯环的屏蔽区,共振信号移向高磁场,化学位移值减小;而在 (6S, 2'R) 和 (6R, 2'S) 异构体中, H4endo、H4exo、H5 和 H6 处于苯环的屏蔽区,化学位移值减小。由此可区别山莨菪碱差向异构体,其中对映体 I - 1 和 I - 2 的化学位移值与天然山莨菪碱一致,因此 I 为 (6S, 2'S) 和 (6R, 2'R) 构成的外消旋体;对映体 II - 1 和 II - 2 的化学位移值与天然来源的 (6R, 2'S) 异构体一致^[7],故 II 为 (6R, 2'S) 和 (6S, 2'R) 构成的外消旋体。根据圆二色谱图(图 4)和比旋光度测试结果(表 3),结合文献^[8]报道山莨菪碱 (6S, 2'S) 为左旋体 ($[\alpha]_D = -13.0$), (6R, 2'S) 为右旋体 ($[\alpha]_D = +1.2$),确定 4 个异构体的构型(表 4)。



注: 色谱条件为 Chiralpak AD-H 分析柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈 - 异丙醇 - 二乙胺 97:3:0.1 为流动相, 流速 0.9 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 235 nm。

图 2 山莨菪碱的 4 个立体异构体的色谱图
Fig 2 Chromatograms of four isomers of anisodamine

表 1 山莨菪碱异构体的¹H NMR 数据

Tab 1 ¹H NMR chemical shifts of isomers of anisodamine

¹ H 核	I - 1	I - 2	II - 1	II - 2
1	3.17	3.16	3.27	3.28
2-endo	2.00	2.00	2.12	2.12
2-exo	1.41	1.41	1.62	1.62
3	4.94	4.94	4.94	4.94
4-endo	2.12	2.11	2.08	2.08
4-exo	1.75	1.75	1.54	1.54
5	3.01	3.00	2.91	2.92
6	4.51	4.51	3.74	3.74
7-endo	1.95	1.95	2.41	2.41
7-exo	1.75	1.75	1.91	1.91
2'	3.77	3.77	3.78	3.78
3'-exo	3.74	3.74	3.76	3.76
3'-endo	4.13	4.13	4.14	4.14
Ph	7.31	7.31	7.31	7.31
N-Me	2.50	2.49	2.49	2.50

表 2 山莨菪碱异构体的¹³C NMR 数据

Tab 2 ¹³C NMR chemical shifts of isomers of anisodamine

¹³ C 核	I - 1	I - 2	II - 1	II - 2
1	61.62	61.62	61.75	61.75
2	34.60	34.60	34.75	34.75
3	69.61	69.61	69.49	69.49
4	33.39	33.39	33.17	33.17
5	68.79	68.79	68.71	68.71
6	76.68	76.68	76.46	76.46
7	39.02	39.02	39.22	39.22
1'	173.36	173.36	173.45	173.45
2'	56.46	56.46	56.48	56.48
3'	64.91	64.91	64.95	64.95
Ph	137.61,	137.61,	137.76,	137.76,
	130.23(2 C),	130.23(2 C),	130.22(2 C),	130.22(2 C),
	129.51(2 C),	129.51(2 C),	129.47(2 C),	129.47(2 C),
			129.11	129.11
N-Me	40.26	40.26	40.21	40.21

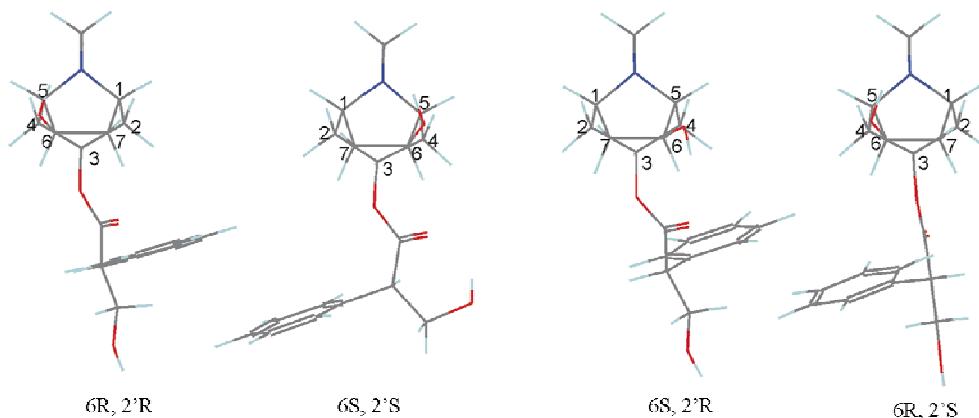


图 3 山莨菪碱 4 个异构体的优势构象

Fig 3 The lowest energy conformations of four isomers of anisodamine

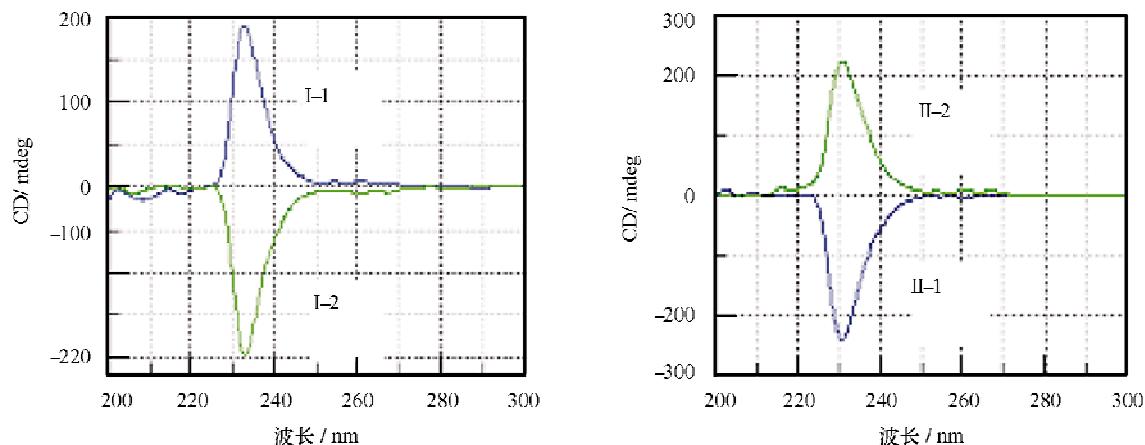


图 4 山莨菪碱异构体的圆二色谱图

Fig 4 CD spectra of isomers of anisodamine

表 3 山莨菪碱异构体的比旋光度

Tab 3 Specific rotations of isomers of anisodamine

I - 1	I - 2	II - 1	II - 2
[α] _D ²⁶ +9.310 1	-12.162 5	-2.395 8	+2.650 9

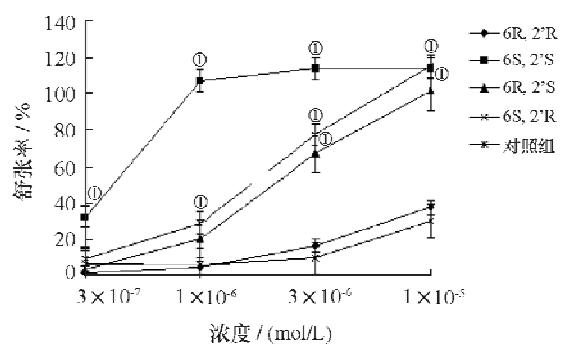
表 4 山莨菪碱异构体的构型鉴定

Tab 4 Configuration identification of isomers of anisodamine

I - 1	I - 2	II - 1	II - 2
6R, 2'R	6S, 2'S	6S, 2'R	6R, 2'S

2.2 山莨菪碱异构体抗卡巴胆碱诱导的大鼠离体气管平滑肌收缩效应

结果如图 5 所示,与空白对照组相比,山莨菪碱的 4 个异构体对卡巴胆碱诱导的大鼠气管平滑肌收缩有不同程度的抑制作用,舒张气管效应强弱为:(6S, 2'S) > (6S, 2'R) > (6R, 2'S) > (6R, 2'R),其中前 3 个异构体的舒张作用比较差异有统计学意义($P < 0.05$),(6R, 2'R)异构体舒张作用很弱(图 5)。

图 5 山莨菪碱异构体对卡巴胆碱所致大鼠离体气管平滑肌收缩的抑制作用($n = 6, \bar{x} \pm s$)Fig 5 Inhibitory effects of isomers of anisodamine on carbachol-induced contractions of rat tracheal smooth muscle ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

3 讨 论

山莨菪碱 4 个异构体的分离方法目前主要有毛细管电泳法^[9]和 HPLC 法^[6]。这两种方法主要用于分析和检测,不适用于制备单一异构体。中国科学

院药物研究所曾采用合成法^[10]成功制备了山莨菪碱的4个异构体,但是合成步骤繁琐。本研究采用MDS-5型反相制备色谱柱直接分离山莨菪碱得到异构的外消旋体Ⅰ和Ⅱ,再用手性HPLC半制备柱分离这两个外消旋体得到山莨菪碱的4个单一异构体,制备方法简便,易于操作。

曾有研究^[10]报道,单一构型的天然山莨菪碱对平滑肌的解痉作用稍强,而4个异构体混旋的合成品对抗震颤素镇痛及扩瞳和抑制唾液分泌的作用略强。合成品的小鼠半数致死量稍大^[11],在治疗美尼尔氏综合征及突发性耳聋疾病上剂量也稍大^[12]。采用^{[3]H}-QNB配体受体结合实验、抗乙酰胆碱对豚鼠回肠纵肌条收缩效应、抗毛果芸香碱流涎及扩瞳效应为指标比较山莨菪碱4个异构体与M胆碱受体的相互作用,效应强度为(6S, 2'R) ≈ (6S, 2'S) >> (6R, 2'S) > (6R, 2'R)^[13]。本实验的结果表明,山莨菪碱4个异构体对大鼠离体气管的舒张效应强弱有明显的不同:(6S, 2'S) > (6S, 2'R) > (6R, 2'S) > (6R, 2'R)。此结果进一步证实山莨菪碱莨菪烷母核上的S构型在与M受体的结合上发挥重要作用。山莨菪碱立体异构体药理活性的差别还有待于进一步的研究。

〔参考文献〕

- [1] 中国医学科学院药物研究所植物化学研究室. 山莨菪碱的化学研究[J]. 化学学报, 1976, 34(1): 39-43.
- [2] 谢晶曦, 周瑾, 贾效先, 等. 山莨菪碱的全合成[J]. 药学学报, 1980, 15(7): 403-408.
- [3] Ishimaru K, Shimomura K. *7β-Hydroxyhyoscyamine from Duboisia myoporoides-D. leichhardtii hybrid and Hyoscyamus albus* [J]. *Phytochem*, 1989, 28(12): 3507-3509.
- [4] Pouplko JM, Baskin SI, Moore E. The pharmacological properties of anisodamine[J]. *J Appl Toxicol*, 2007, 27(2): 116-121.
- [5] Zhang XP, Liu DR, Shi Y. Study progress in therapeutic effects of traditional Chinese medicine monomer in severe acute pancreatitis [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2007, 8(2): 147-152.
- [6] Yang LM, Xie YF, Chen HZ, et al. Diastereomeric and enantioselective high-performance liquid chromatographic separation of synthetic anisodamine[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(3): 905-909.
- [7] Muñoz MA, Joseph-Nathan P. DFT-GIAO ¹H and ¹³C NMR prediction of chemical shifts for the configurational assignment of 6β-hydroxyhyoscyamine diastereoisomers [J]. *Magn Reson Chem*, 2009, 47(7): 578-584.
- [8] Muñoz MA, Muñoz O, Joseph-Nathan P. Absolute configuration of natural diastereoisomers of 6-hydroxyhyoscyamine by vibrational circular dichroism[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(9): 1335-1340.
- [9] 林梅, 张正行, 陈怡, 等. 山莨菪碱合成品的毛细管电泳手性拆分及其组成分析[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(8): 580-583.
- [10] 郑长胜, 谢晶曦. 山莨菪碱四个光学异构体的合成和分离[J]. 药学学报, 1991, 26(2): 96-102.
- [11] 北京友谊医院儿科. 山莨菪碱治疗急性微循环障碍性疾病原理探讨[J]. 中华医学杂志, 1973, 53(5): 259-263.
- [12] 北京市儿鼻咽喉科研究所. 爆发性耳聋 77 例治疗经验初步总结[J]. 中华医学杂志, 1974, 54(4): 238-241.
- [13] Niu XY, Ren ZH, Xie L. Potencies of four stereoisomers of anisodamine on muscarinic receptor[J]. *J Chin Pharm Sci*, 1992, 1(2): 84-85.

〔收稿日期〕 2010-10-27

〔本文编辑〕 周珠凤