

穿龙薯蓣中抗血栓活性成分研究

赵娜夏*, 韩英梅*, 张士俊

天津药物研究院 天津市分子设计与药物发现重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 为进一步寻找穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* 抗血栓活性成分, 对其甾体皂苷类化学成分进行了系统的分离。方法 采用正相、反相等色谱分离手段进行分离纯化, 通过物理化学方法, 根据 MS、NMR 谱数据, 对得到的化合物进行结构鉴定。结果 共分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为薯蓣皂苷元 (1)、薯蓣皂苷元-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (2)、薯蓣皂苷元-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖苷 (3)、薯蓣皂苷元-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖苷 (4)、薯蓣皂苷 (5)、纤细皂苷 (6)、伪原薯蓣皂苷 (7)、26-*O*- β -D-葡萄糖基-3 β ,26-二醇-25(*R*)- $\Delta^{5,20(22)}$ -二烯-呋甾-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]-*O*- β -D-葡萄糖苷 (8)、26-*O*- β -D-葡萄糖基-3 β ,26-二醇-25(*R*)- $\Delta^{5,20(22)}$ -二烯-呋甾-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]-*O*- β -D-葡萄糖苷 (9)。结论 化合物 3、4 及 7~9 为首次从该植物中分离得到。大鼠静脉旁路血栓形成试验表明, 化合物 2 和 5 显示出一定的抗血栓活性。

关键词: 穿龙薯蓣; 甾体皂苷; 抗血栓; 薯蓣皂苷元-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖苷; 伪原薯蓣皂苷

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)04-0652-04

Antithrombotic components in *Dioscorea nipponica*

ZHAO Na-xia, HAN Ying-mei, ZHANG Shi-jun

Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Key words: *Dioscorea nipponica* Makino; steroidal saponins; antithrombotic; diosgenin-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside; pseudoprotodioscin

穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 为薯蓣科植物, 其根茎俗称穿山龙, 既是生产治疗心血管疾病药物的主要药源, 又是用于合成多种甾体激素类和避孕类药物的薯蓣皂苷元 (diosgenin) 的重要原料之一。穿龙薯蓣总皂苷具有治疗冠心病、抗动脉粥样硬化、调血脂、平喘、抗炎和抗肿瘤等药理作用^[1], 本课题组设计合成薯蓣皂苷元衍生物, 显示出抗血栓形成活性^[2]。

穿龙薯蓣心血管系统药理作用已得到大量研究, 但目前的研究报道主要集中在对其有效部位的活性研究, 缺乏对其物质基础的认识。为阐明穿龙薯蓣甾体皂苷有效部位的活性物质基础, 本课题组进行了系统的化学成分研究, 并通过对部分单体的抗血栓形成活性评价, 获得了初步的构效关系信息。

从穿龙薯蓣提取物正丁醇可溶部位, 分离得到 9 个化合物。根据理化性质和波谱分析分别鉴定为

薯蓣皂苷元 (1)、薯蓣皂苷元-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (2)、薯蓣皂苷元-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖苷 (3)、薯蓣皂苷元-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖苷 (4)、薯蓣皂苷 (5)、纤细皂苷 (6)、伪原薯蓣皂苷 (7)、26-*O*- β -D-葡萄糖基-3 β ,26-二醇-25(*R*)- $\Delta^{5,20(22)}$ -二烯-呋甾-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]-*O*- β -D-葡萄糖苷 (8)、26-*O*- β -D-葡萄糖基-3 β ,26-二醇-25(*R*)- $\Delta^{5,20(22)}$ -二烯-呋甾-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]-*O*- β -D-葡萄糖苷 (9)。其中化合物 3、4 及 7~9 为首次从该植物中分离得到。

1 材料和仪器

穿龙薯蓣药材购自河北安国, 为河北产, 经韩英梅研究员鉴定为穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino; 核磁共振氢谱碳谱用 Bruker AV-400 型核磁共振仪测定; 质谱用 6310 型 Ion Trap LC-MS 仪 (Agilent 公司) 测定; 制备型高效液相色谱仪为

收稿日期: 2010-06-11

基金项目: 天津市自然科学基金应用基础研究重大项目 (07TCZDJ05300)

作者简介: 赵娜夏 (1979—), 女, 满族, 助理研究员, 主要从事天然产物活性成分研究。Tel: (022)23006959 E-mail: zhaonaxia@tom.com

*通讯作者 韩英梅 E-mail: hanyan@tjipr.com

Waters Model 510 型, 紫外检测器为 SP100 型; 所用柱色谱 (200~300 目)、薄层色谱硅胶 H 及硅胶 G 为青岛海洋化工厂生产; 试剂为药用级或分析级。

2 提取和分离

穿龙薯蓣药材 1 kg, 以 70%乙醇提取 3 次, 乙醇提取液减压浓缩得浸膏 185 g, 以水分散, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取。正丁醇层浓缩得浸膏 82 g, 经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇系统梯度洗脱。以氯仿-甲醇-水系统进行 TLC 检测, 10%硫酸乙醇溶液显色, 合并相同组分, 得到 12 份样品。

组分 9 以氯仿-甲醇-水 (85:15:1) 系统进行低压硅胶柱色谱, 得到化合物 5 (442 mg) 和 6 (550 mg)。从组分 10 中经甲醇重结晶, 得到白色粉末, 为化合物 7 (455 mg)。母液经氯仿-甲醇-水系统低压硅胶柱色谱和进一步的半制备高效液相色谱法制备得 2 个单体化合物, 分别为化合物 8 (52 mg) 和 9 (34 mg)。

组分 4 经石油醚-醋酸乙酯 (7:3) 系统进行进一步的低压硅胶柱色谱, 得到化合物 1 (82 mg)。组分 5 经氯仿-甲醇-水系统的低压硅胶柱色谱和反相 C₁₈ 低压柱色谱, 得化合物 2 (51 mg) 和 3 (29 mg); 采用制备薄层的方法得到化合物 4 (20 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色针晶 (石油醚-醋酸乙酯), Liebermann-Burchard 反应呈阳性。茴香醛试剂反应显黄色, 对盐酸二甲氨基苯甲醛试剂不显色, 提示该化合物为螺甾烷型化合物。正离子 ESI-MS m/z : 437.4 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 0.69 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, CH₃-27), 0.85 (3H, s, CH₃-18), 1.04 (3H, s, CH₃-19), 1.14 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH₃-21), 3.84 (1H, m, H-3), 5.39 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 37.8 (C-1), 32.2 (C-2), 71.3 (C-3), 43.5 (C-4), 142.0 (C-5), 121.0 (C-6), 32.64 (C-7), 31.8 (C-8), 50.4 (C-9), 37.1 (C-10), 21.2 (C-11), 40.0 (C-12), 40.5 (C-13), 56.8 (C-14), 32.34 (C-15), 81.1 (C-16), 62.9 (C-17), 16.4 (C-18), 19.6 (C-19), 42.0 (C-20), 15.1 (C-21), 109.3 (C-22), 31.8 (C-23), 29.3 (C-24), 30.6 (C-25), 66.9 (C-26), 17.3 (C-27)。以上数据与文献报道数据一致^[3], 确定化合物 1 为薯蓣皂苷元。

化合物 2: 白色针晶 (石油醚-醋酸乙酯), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。

茴香醛试剂反应显黄色, 对盐酸二甲氨基苯甲醛试剂不显色, 酸水解检出葡萄糖, 提示该化合物为螺甾烷型皂苷。负离子 ESI-MS m/z : 612.3 $[M+Cl]^-$ 。¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 0.68 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, CH₃-27), 0.82 (3H, s, CH₃-18), 0.90 (3H, s, CH₃-19), 1.13 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH₃-21), 5.04 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, Glc-1), 5.30 (1H, d, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 30.3 (C-2), 78.7 (C-3), 39.4 (C-4), 140.9 (C-5), 102.6 (Glc-1)。以上数据与文献报道数据一致^[4], 确定化合物 2 为薯蓣皂苷元-3-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 3: 白色粉末, Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。茴香醛试剂反应显黄色, 对盐酸二甲氨基苯甲醛试剂不显色, 酸水解检出葡萄糖和鼠李糖, 提示该化合物为螺甾烷型皂苷。正离子 ESI-MS m/z : 745.9 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 0.69 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, CH₃-27), 0.82 (3H, s, CH₃-18), 1.05 (3H, s, CH₃-19), 1.13 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-21), 1.77 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH₃-Rha), 5.04 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, Glc-1), 6.38 (1H, s, Rha-1), 5.30 (1H, d, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 30.2 (C-2), 78.3 (C-3), 39.0 (C-4), 140.9 (C-5), 100.4 (Glc-1), 102.1 (Rha-1)。以上数据与文献报道数据一致^[3,5], 确定化合物 3 为薯蓣皂苷元-3-*O*- $[\alpha$ -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖苷。

化合物 4: 微黄色粉末, Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。茴香醛试剂反应显黄色, 对盐酸二甲氨基苯甲醛试剂不显色, 酸水解检出葡萄糖和鼠李糖, 提示该化合物为螺甾烷型皂苷。正离子 ESI-MS m/z : 745.3 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 0.68 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, CH₃-27), 0.82 (3H, s, CH₃-18), 0.90 (3H, s, CH₃-19), 1.13 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-21), 4.95 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, Glc-1), 5.90 (1H, s, Rha-1), 5.31 (1H, d, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 30.2 (C-2), 78.4 (C-3), 39.3 (C-4), 140.9 (C-5), 102.7 (Glc-1), 102.5 (Rha-1)。以上数据与文献报道一致^[3,6], 确定化合物 4 为薯蓣皂苷元-3-*O*- $[\alpha$ -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖苷。

化合物 5: 白色粉末 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。茴香醛试剂反应显黄色, 对盐酸二甲氨基苯甲醛试剂不显色,

酸水解检出葡萄糖和鼠李糖,提示该化合物为螺甾烷型皂苷。负离子 ESI-MS m/z : 904.0 $[M+Cl]^-$, 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据与文献报道数据一致^[7],确定化合物 **5** 为薯蓣皂苷,结构为薯蓣皂苷元-3- O - $\{[\alpha-L$ -鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]- β - D -鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- β - D -葡萄糖基。

化合物 **6**: 白色粉末(甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。茴香醛试剂反应显黄色,对盐酸二甲氨基苯甲醛试剂不显色,酸水解检出葡萄糖和鼠李糖,提示该化合物为螺甾烷型皂苷。正离子 ESI-MS m/z : 907.7 $[M+Na]^+$, 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据与文献报道数据一致^[7],确定化合物 **6** 为纤细皂苷,结构为薯蓣皂苷元-3- O - $\{[\alpha-L$ -鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]- β - D -葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 3)]- β - D -葡萄糖基。

化合物 **7**: 白色粉末(氯仿-甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。茴香醛试剂反应显黄色,盐酸二甲氨基苯甲醛试剂反应显红色,酸水解检出葡萄糖和鼠李糖,提示该化合物为呋甾烷型皂苷。正离子 ESI-MS m/z : 1053.0 $[M+Na]^+$, 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 0.72 (3H, s, CH_3 -18), 1.01 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH_3 -27), 1.05 (3H, s, CH_3 -19), 1.63 (3H, s, CH_3 -21), 1.62 (3H, d, J = 6.0 Hz, CH_3 -Rha), 1.75 (3H, d, J = 6.3 Hz, CH_3 -Rha), 4.84 (1H, d, J = 7.5 Hz, Glc-1), 4.95 (1H, d, J = 6.6 Hz, Glc-1), 5.31 (1H, d, H-6), 5.83 (1H, s, Rha-1), 6.38 (1H, s, Rha-1)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 30.2 (C-2), 78.1 (C-3), 39.0 (C-4), 140.9 (C-5), 43.5 (C-13), 55.0 (C-14), 34.6 (C-15), 84.6 (C-16), 64.6 (C-17), 14.1 (C-18), 103.7 (C-20), 11.9 (C-21), 152.5 (C-22), 23.8 (C-24), 33.6 (C-25), 75.0 (C-26), 100.3 (Glc-1), 102.1 (Rha-1), 103.0 (Rha-1)。以上数据与文献报道数据一致^[8],确定化合物 **7** 为伪原薯蓣皂苷,结构为 26- O - β - D -葡萄糖基-3 β ,26-二醇-25(R)- $\Delta^{5,20(22)}$ -二烯-呋甾-3- O - $[\alpha-L$ -鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]- O - $\alpha-L$ -鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- β - D -葡萄糖基。

化合物 **8**: 白色疏松粉末, Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。茴香醛试剂反应显黄色,盐酸二甲氨基苯甲醛试剂反应显红色,酸水解检出葡萄糖和鼠李糖,提示该化合物为呋甾烷型皂苷。正离子 ESI-MS m/z : 907.5 $[M+Na]^+$, 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 0.72 (3H, s, CH_3 -18), 1.01 (3H,

d, J = 6.4 Hz, CH_3 -27), 1.06 (3H, s, CH_3 -19), 1.63 (3H, s, CH_3 -21), 1.77 (3H, d, J = 6.0 Hz, CH_3 -Rha), 4.82 (1H, d, J = 7.5 Hz, Glc-1), 5.30 (1H, d, H-6), 6.37 (1H, s, Rha-1)。 ^{13}C -NMR 数据与文献报道数据一致^[8],确定化合物 **8** 为 26- O - β - D -葡萄糖基-3 β ,26-二醇-25(R)- $\Delta^{5,20(22)}$ -二烯-呋甾-3- O - $[\alpha-L$ -鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)]- O - β - D -葡萄糖基。

化合物 **9**: 白色疏松粉末, mp 176~179 $^{\circ}C$ 。 Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。茴香醛试剂反应显黄色,盐酸二甲氨基苯甲醛试剂反应显红色,酸水解检出葡萄糖和鼠李糖,提示该化合物为呋甾烷型皂苷。正离子 ESI-MS m/z : 907.6 $[M+Na]^+$, 1H NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 0.73 (3H, s, CH_3 -18), 0.92 (3H, s, CH_3 -19), 1.01 (3H, d, J = 6.4 Hz, CH_3 -27), 1.64 (3H, s, CH_3 -21), 1.72 (3H, d, J = 6.0 Hz, CH_3 -Rha), 4.83 (1H, d, J = 8.0 Hz, Glc-1), 4.95 (1H, d, J = 8.0 Hz, Glc-1), 5.33 (1H, d, H-6), 5.88 (1H, s, Rha-1)。 ^{13}C -NMR 数据与文献报道数据一致^[8],确定化合物 **9** 为 26- O - β - D -葡萄糖基-3 β ,26-二醇-25(R)- $\Delta^{5,20(22)}$ -二烯-呋甾-3- O - $[\alpha-L$ -鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- O - β - D -葡萄糖基。

4 抗血栓形成活性评价

4.1 实验方法

将 250~300 g 大鼠麻醉(戊巴比妥钠, 54 mg/kg, ip) 仰卧位固定,分离右颈总动脉和左颈外静脉,在聚四氟乙烯管的中段放入一根长 6 cm 的丝线,以肝素生理盐水溶液(50 U/mL)充满聚四氟乙烯管,当聚四氟乙烯管的一端插入左颈外静脉后,由聚四氟乙烯管准确地注入 50 U/kg 的肝素抗凝,然后再将聚四氟乙烯管的另一端插入右颈总动脉。打开动脉夹,血液从右颈总动脉流至聚四氟乙烯管内,返回左颈外静脉。开放血流 15 min 后中断血流,迅速取出丝线称质量,总质量减去丝线质量即得血栓湿质量。

将受试样品每 3 个分为一组,每个受试样品做 3 只动物试验,每日做一个模型,并设一个阳性药阿司匹林。

给药方式: ig 给药 100 mg/kg,连续给药 3 次,末次给药后 1 h 进行试验。

4.2 实验结果

共测试了 5 个螺甾和 1 个呋甾皂苷的抗血栓形成活性。化合物 **2** 和 **5** 显示出一定的活性,作用强

度接近阿司匹林, 结果见表 1。

表 1 穿龙薯蓣甾体皂苷对大鼠动静脉旁路血栓形成的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of steroidal saponins in *D. nipponica* on arterio-venous shut thrombosis of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血栓质量/mg
模型	—	17.8±4.3
阿司匹林	100	10.6±3.7
1	100	17.8±8.3
2	100	12.7±3.4
3	100	15.5±4.7
5	100	12.8±5.6
6	100	17.5±4.2
7	100	16.6±6.3

5 讨论

甾体皂苷类成分是穿龙薯蓣中的主要活性物质, 从化学研究结果可知, 其中主要是薯蓣皂苷元系列衍生物, 以纤细皂苷和薯蓣皂苷为主, 呋甾烷型以伪原薯蓣皂苷为主。

通过对部分成分抗血栓活性的研究, 结果表明糖苷活性强于苷元, 螺甾烷类强于呋甾烷类。螺甾烷母核和 3 位取代是影响活性的重要因素, 且单糖

苷和三糖苷活性较强, 糖的种类和连接位置对活性也有很大的影响。

参考文献

[1] 张克义, 常天辉, 李伯坚, 等. 穿龙冠心宁及水溶性皂苷对小白鼠心肌营养型血流量的影响 [J]. 中国医科大学学报, 1982, 11(3): 10-11.

[2] 付晓丽, 韩英梅, 张士俊. 薯蓣皂苷元衍生物的合成及其抗血栓形成活性 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 46-49.

[3] Agral P K, Jain D C, Gupta R K, et al. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(11): 2479-2496.

[4] 冯 冰, 马百平, 康利平, 等. 新月弯孢霉对重楼皂苷的生物转化 [J]. 中草药, 2005, 36(7): 978-982.

[5] Espejo O, Campos J, Jung H, et al. Spirostanic diosgenin precursors from *Dioscorea composita* tubers [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(2): 413-416.

[6] Watanabe Y, Sanada S, Ida Y, et al. Comparative studies on the *Ophiopogonis* tuber and its congeners [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(10): 3486-3495.

[7] 康利平, 马百平, 王 煜, 等. 穿山龙中甾体皂苷的分离鉴定 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(20): 1539-1541.

[8] 董 梅, 吴立军, 陈 泉, 等. 黄山药中甾体皂苷的分离与鉴定 [J]. 药学学报, 2001, 36(1): 42-45.