

白及中 1 个新颖含氯甾体化合物

仰 莲¹, 彭 成¹, 杨雨婷¹, 王亚男², 郭 力¹, 戴 鸥^{1*}

1. 成都中医药大学药学院 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

摘 要: 目的 研究白及 *Bletilla striata* 的低极性化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱和制备薄层色谱等分离纯化方法, 结合高分辨质谱和核磁共振波谱分析鉴定化合物的结构; 运用 MTT 法测定化合物的生物活性。结果 在白及化学成分研究过程中分离得到 1 个新的含氯甾体化合物, 其结构为 4-氯- β -谷甾酮 (1); 细胞毒活性实验表明, 该化合物对正常的 293A 人胚肾细胞具有一定的毒性。结论 该新化合物为人工产物, 为白及甾体化合物在三氯甲烷中经过长时间的强阳光照射后产生, 反应机制推测为强光诱导下的自由基取代反应。

关键词: 白及; 甾体化合物; 4-氯- β -谷甾酮; 肾毒性; 自由基取代反应

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)03-0325-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.003

A new chlorinated-steroid isolated during study on chemical constituents from *Bletilla striata*

YANG Lian¹, PENG Cheng¹, YANG Yu-ting¹, WANG Ya-nan², GUO Li¹, DAI Ou¹

1. State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To study the low polar chemical constituents from the tubers of *Bletilla striata*. **Methods** Silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography, and preparative thin layer chromatography were used for the isolation and purification, the chemical structure was identified by the methods of high resolution mass spectrometry (HRMS) and NMR spectroscopic analyses, and the bioactivity of the compound was examined by the method of MTT. **Results** A new chlorinated-steroid was obtained during the study on the chemical constituents of *B. striata*, its structure is 4-chloro- β -sitosterone (1). In addition, the compound showed potential toxicity to 293A cells of human. **Conclusion** Further analysis finds that the new compound may be an artifact which is produced by exposing a steroid to strong sunlight in chloroform for a long time, and the reaction mechanism is speculated as the radical substitution reactions induced by strong light.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f.; steroids; 4-chloro- β -sitosterone; nephrotoxicity; radical substitution reactions

白及为兰科 (Orchidaceae) 珍稀植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. 的干燥根茎, 又名苕根、白根、白芨等。据文献报道, 白及的化学成分主要为联苕类^[1-2]、菲类^[3-4]、苹果酸异丁酯类^[5]等。此外, 白及中还含有一定量的甾体类化合物^[6], 如 β -谷甾醇^[7]、胡萝卜苷、bletilnoside A 和 bletilnoside B^[8], 而本课题组此前对白及的化学成分研究中发现了特殊的 C-31、

C-32 环菠萝蜜烷型三萜^[9], 在已报道的甾体和三萜化合物中, C-3 位均被氧化为羟基或羰基。本实验进一步对白及醋酸乙酯部位的低极性成分进行研究, 意外发现 1 个新的氯代甾体人工产物: 4-氯- β -谷甾酮, 产生原因可能为含有 α, β -不饱和酮结构的甾体化合物长时间放置于三氯甲烷溶剂中, 经强光照射诱导自由基取代反应产生的^[10]。本实验运用高分辨质谱和

收稿日期: 2014-11-27

基金项目: 国家科技支撑计划 (2011BAI13B05)

作者简介: 仰 莲, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: yanglian080910@163.com

*通信作者 戴 鸥, 硕士, 讲师, 从事中药药理药效研究。Tel: (028)61800045 E-mail: haiou0505@126.com

核磁共振波谱鉴定出新化合物的结构, 并对该化合物的生物活性进行测定, 发现其对正常的 293A 人胚肾细胞具有一定的毒性。

1 仪器与材料

Bruker AVIIIHD-600 核磁共振波谱仪, Waters Synapt G₂ 高分辨质谱仪。薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶 (200~300 目), 制备薄层预制板均为青岛海洋化工厂生产。Sephadex LH-20 为瑞典 Amershan Pharmacia 公司生产。酶标仪 (Thermo 3001) 为 Thermo Fisher Scientific 公司生产; 超净台 [MCV-B161F (T)] 为日本 SANYO 公司生产; 显微镜 (Primo Vert, AxioCam ERc 5s) 为 ZEISS 公司生产; CO₂ 培养箱 (HH. CP-T) 为上海齐欣科学仪器有限公司生产。DMEM、RPMI 1640 培养基、胎牛血清均为 Hyclone 公司生产; 胰蛋白酶由美国 Gibco 公司生产; MTT 为美国 Amresco 公司生产; DMSO 为美国 Sigma 公司生产。所用其他试剂均为分析纯。肺癌细胞 A549、黑素瘤细胞 A375、人肝癌细胞 HEPG-2、人非小细胞肺癌细胞 H1975、人胚肾细胞 293A 均来源于美国 ATCC 公司。

白及药材于 2012 年 8 月采自四川省内江市, 经成都中医药大学李敏教授鉴定为白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. 的块茎。

2 提取与分离

干燥的白及药材粗粉 (3 kg), 以 95% 乙醇回流提取 3 次 (30 L×3), 每次 2 h。乙醇提取液经减压浓缩干燥得半固体流浸膏 510 g, 将流浸膏混悬于水中, 以醋酸乙酯萃取, 回收溶剂得醋酸乙酯部位 160 g。醋酸乙酯部位以硅胶柱色谱进行分离, 石油醚-丙酮 (0:1→1:0) 进行梯度洗脱, 洗脱液经薄层色谱法检测, 合并得 25 个洗脱部分 Fr. 1~25。Fr. 7 部分经 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 石油醚-三氯甲烷-甲醇 (5:5:1) 为洗脱剂, 共洗脱得到 4 个洗脱部分 Fr. 7-1~7-4。Fr. 7-4 部分再经过反复的硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 0:1→1:0)、Sephadex LH-20 柱色谱 (石油醚-三氯甲烷-甲醇 5:5:1)、制备薄层色谱 (石油醚-醋酸乙酯 15:1) 等进行分离, 制备薄层板刮板后以重蒸三氯甲烷溶剂洗脱, 得到化合物 **1** (3 mg)。在此分离纯化过程中, 均使用了大量的三氯甲烷溶剂, 并在强阳光照射下进行过储存。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色针状结晶 (三氯甲烷), 从质谱图中可以明显看到 m/z 447 的准分子离子峰及其

m/z 449 的同位素峰, 推测该化合物分子结构中可能含有氯原子。进一步经高分辨质谱 HR-ESI-MS 表明分子式为 C₂₉H₄₇OCl (m/z 447.339 7 [M+H]⁺, 计算值为 C₂₉H₄₈OCl, 447.339 4), 不饱和度为 6。化合物 **1** 的 ¹H-NMR 显示 2 个单峰甲基信号 (δ_{H} 0.71, 1.23)、3 个双峰甲基信号 (δ_{H} 0.81, $J=6.6$ Hz; 0.84, $J=7.2$ Hz; 0.92, $J=6.6$ Hz)、1 个三重峰甲基信号 (δ_{H} 0.85, $J=7.2$ Hz) 以及多个脂肪族亚甲基和次甲基信号。化合物的 ¹³C-NMR 显示 29 个碳信号, 其中 δ_{C} 191.1, 165.4 和 127.4 的 ¹³C-NMR 信号表明分子中可能存在 1 个 α,β -不饱和酮片段。综合以上 MS 和 NMR 信息, 推测化合物 **1** 为 β -谷甾酮的类似物^[11]。仔细比较两者的 ¹H-NMR 信号, 发现化合物 **1** 低场区未见 β -谷甾酮在 δ 5.72 附近的特征性烯氢单峰信号, 而且在 ¹³C-NMR 和 DEPT 谱中, 化合物 **1** 的双键均为季碳信号, 表明化合物 **1** 的 C-4 位被取代。进一步结合 δ_{C} 127.4 的双键季碳化学位移以及化合物的元素组成, 推断化合物 **1** 为 4-氯- β -谷甾酮。

为确证化合物 **1** 的结构, 进行了 2D NMR 测试。根据 HSQC 谱推断氢与相邻碳原子之间的连接关系。另外, 在化合物的 HMBC 谱中, 18-CH₃ 与 C-12、C-13、C-14、C-17 相关; 19-CH₃ 与 C-1、C-5、C-9、C-10 相关; 21-CH₃ 与 C-17、C-20、C-22 相关; 26-CH₃ 和 27-CH₃ 同时与 C-24、C-25 相关; 29-CH₃ 与 C-24、C-28 相关; H-8 与 C-6、C-7、C-9、C-10、C-11、C-13、C-14、C-15 相关; H-17 与 C-13、C-14、C-15、C-16、C-18、C-20、C-21、C-22 相关。以上信号证实化合物 **1** 具有谷甾烷骨架。此外, HMBC 谱中显示 H-1 与 C-2、C-3、C-5、C-10、C-19 相关; H-2 与 C-1、C-3、C-4、C-10 相关; H-6 与 C-4、C-5、C-7、C-8、C-10 相关 (图 1), 表明 α,β -不饱和酮片段位于 C-3、C-4 和 C-5 位。综合以上 NMR 信息, 确定化合物 **1** 的结构为 4-氯- β -谷甾酮。具体核磁数据见表 1。

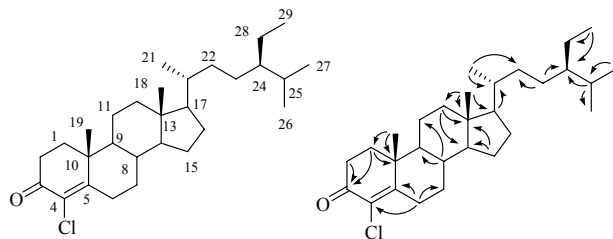


图 1 化合物 **1** 的化学结构和主要的 HMBC 相关图
Fig. 1 Structure and key HMBC correlations of compound **1**

表1 化合物1的¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) 和¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) 数据
Table 1 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) data of compound 1

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	1.98 (m), 1.70 (m)	34.6	16	1.84 (m), 1.24 (m)	28.4
2	2.53 (m), 1.32 (m)	34.3	17	1.08 (m)	56.2
3	—	191.1	18	0.71 (s)	12.1
4	—	127.4	19	1.23 (s)	17.9
5	—	165.4	20	1.33 (m)	36.3
6	3.22 (ddd, $J=15.0, 3.6, 2.4$ Hz), 2.15 (dt, $J=15.0, 5.4$ Hz)	29.3	21	0.92 (d, $J=6.6$ Hz)	18.9
7	1.88 (m), 1.02 (m)	31.4	22	1.01 (m)	34.1
8	1.51 (m)	35.4	23	1.13 (m)	26.3
9	0.94 (m)	54.2	24	0.89 (m)	46.0
10	—	41.6	25	1.63 (m)	29.4
11	1.51 (m), 1.46 (m)	21.3	26	0.84 (d, $J=7.2$ Hz)	19.1
12	2.01 (m), 1.14 (m)	39.8	27	0.81 (d, $J=6.6$ Hz)	19.9
13	—	42.6	28	1.24 (m)	23.3
14	0.96 (m)	56.0	29	0.85 (t, $J=7.2$ Hz)	12.2
15	1.59 (m), 1.09 (m)	24.3			

4 细胞毒活性实验

分别取处于对数生长期、状态良好的 A549、A375、HEPG-2、H1975 肿瘤细胞和 293A 人胚肾细胞, 制成单个细胞悬液, 使细胞密度为 3×10^3 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔加入细胞悬液 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养 24 h。然后将 1 mg 样品溶于 10 μL 的 DMSO 溶液中, 以培养基稀释样品, 再以质量浓度为 50、25、12 $\mu\text{g/mL}$ 每孔加药 100 μL , 每个质量浓度设 3 个复孔。阴性对照组为含有适量 DMSO 的培养基溶液, 空白对照组为不含细胞的培养基和溶媒。72 h 后, 避光条件下每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 15 μL , 继续温育培养 4 h 后, 弃掉上清, 每孔加入 100 μL DMSO, 置于摇床上慢速振摇 10 min, 使甲臜充分溶解后, 用酶标仪测量 570 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 按下列公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}})$$

结果表明, 化合物 1 对 4 种肿瘤细胞 A549、A375、HEPG-2、H1975 无明显抑制活性, 但在 50、25 和 12 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, 对正常人胚肾细胞 293A 具有抑制作用, 抑制率分别为 50%、40% 和 29%, 表明该化合物具有一定的肾毒性。

5 讨论

在对中药化学成分进行研究时, 从原药材到获

得具有固定化学性质和物理性质的化合物, 期间经历了各种物理和化学环境的变化, 尤其在化学溶剂和试剂的作用下, 一些中药成分就不可避免发生变化, 产生人工产物。

正如本实验结果一样, 新人工产物 4-氯- β -谷甾酮的生成也有其必然的原因: (1) 白及药材中含有一定量的甾体类化合物, 在三氯甲烷中溶解性很好。(2) 三氯甲烷不稳定, 在长时间强阳光照射和氧气存在下易被氧化分解为氯化氢和剧毒的光气 (COCl_2)。 (3) 三氯甲烷经强光照射产生的自由基与白及中的 α, β -不饱和甾酮化合物发生了自由基取代反应^[10]。由于本实验中使用了大量三氯甲烷, 而且在该溶剂中进行过长时间的强光下放置。因此, 可以初步确定该新化合物应为人工产物, 其在白及中的原始天然成分应为 β -谷甾酮。

本研究的发现表明: (1) 在天然药物研究中要注意溶剂的使用和样品的贮存, 以避免样品被破坏。尤其是在氯仿作为提取分离溶剂时, 更应注意避光等操作; (2) 在天然成分提取分离过程中, 应避免高温、强光、强氧化等条件。(3) 若样品因一些客观原因发生了变化, 也不能忽视变质后的人工产物。因为可能在某些未知因素下, 一些化合物因结构改变而变得有价值或者产生毒性, 进一步影响药材的作用; (4) 本实验还提示含氯的甾体化合物可能对

正常的肾细胞有毒性,在甾体化合物的结构修饰时应注意。

参考文献

- [1] Takagi S, Yamaki M, Inoue K. Antimicrobial agents from *Bletilla striata* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(4): 1011-1015.
- [2] 韩广轩,王立新,张卫东,等. 中药白及化学成分研究(II) [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(9): 1029-1031.
- [3] Yamaki M, Bai L, Inoue K, *et al.* Benzylphenanthrenes from *Bletilla striata* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(7): 2285-2287.
- [4] Yamaki M, Kato T, Bai L, *et al.* Phenanthrene glucosides from *Bletilla striata* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(2): 535-537.
- [5] Feng J Q, Zhang R J, Zhao W M. Novel bibenzyl derivatives from the tubers of *Bletilla striata* [J]. *Helv Chim Acta*, 2008, 91(3): 520-525.
- [6] Yamaki M, Honda C, Kato T, *et al.* The steroids and triterpenoids from *Bletilla striata* [J]. *Nat Med*, 1997, 51(5): 493.
- [7] 韩广轩,王立新,王麦莉,等. 中药白及化学成分的研究 [J]. 药学实践杂志, 2001, 19(6): 360-361.
- [8] Park J E, Woo K W, Choi S U, *et al.* Two new cytotoxic spirostane-steroidal saponins from the roots of *Bletilla striata* [J]. *Helv Chim Acta*, 2014, 97(1): 56-63.
- [9] Yang L, Meng C W, Peng C, *et al.* A new macrolide and six cycloartane triterpenoids from the tubers of *Bletilla striata* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 57: 238-241.
- [10] 闻 韧. 药物合成反应 [M]. 第3版. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [11] Prachayasittikul S, Suphamong S, Worachartcheewan A, *et al.* Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. [J]. *Molecules*, 2009, 14(2): 850-867.