

• 化学成分 •

积雪草皂苷酸水解产物中 1 个新苷元的分离和鉴定

曹家庆^{1,3}, 周 康¹, 时圣明², 赵余庆^{1,3*}

1. 沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 研究积雪草 *Centella asiatica* 皂苷水解产物的化学成分, 以期发现新的三萜皂苷元。方法 通过硅胶、凝胶柱色谱对积雪草皂苷酸水解产物进行分离, 经核磁共振、质谱、红外光谱、紫外光谱等波谱手段对化合物的结构进行鉴定。并对部分化合物的体外抗肿瘤活性进行了测试。结果 从积雪草皂苷酸水解产物中分离得到 4 个单体苷元化合物, 鉴定为 2 α ,3 β ,23-三羟基乌苏-6,12-二烯-28-酸 (1)、积雪草酸 (2)、6 β -羟基积雪草酸 (3)、terminolic acid (4)。结论 化合物 1 为 1 个新的乌苏烷型苷元, 命名为积雪草-6-烯, 并且其对所测试的肿瘤细胞 HL-60、A549、U873 无抑制活性。

关键词: 积雪草; 酸水解; 乌苏烷型苷元; 积雪草酸; 6 β -羟基积雪草酸; 积雪草-6-烯; 2 α ,3 β ,23-三羟基乌苏-6,12-二烯-28-酸
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)18-3155-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.002

Isolation and identification of a new aglycone from acid hydrolysis products of saponin in *Centella asiatica*CAO Jia-qing^{1,3}, ZHOU Kang¹, SHI Sheng-ming², ZHAO Yu-qing^{1,3}

1. School of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Key Laboratory of Structure-Based Drug Design and Discovery, Shenyang Pharmaceutical University, Ministry of Education, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of the acid hydrolysis products, in order to find some new aglycones from the hydrolysate of the saponin of *Centella asiatica*. **Methods** The acid hydrolytic product was separated by repeated silica gel, Sephadex LH-20 chromatography. The cytotoxic activities *in vitro* of some compounds isolated were evaluated. Their structures isolated were identified by analysis of their spectral data of NMR, MS, IR, and UV. **Results** Four aglycones, 2 α ,3 β ,23-trihydroxyurs-6,12-dien-28-oic acid (1), asiatic acid (2), 6 β -hydroxy asiatic acid (3), terminolic acid (4), were isolated from the hydrolysis product. **Conclusions** Compound 1, named centella-6-ene, was a new ursane-type aglycone and it showed no cytotoxic activities against the tested cancer cell lines.

Key words: *Centella asiatica* (L.) Urban; acid hydrolysis; ursane-type aglycone; asiatic acid; 6 β -hydroxy asiatic acid; centella-6-ene; 2 α ,3 β ,23-trihydroxyurs-6,12-dien-28-oic acid

积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 为伞形科 (Umbelliferae) 积雪草属 *Centella* L. 植物, 其性寒, 味苦、辛, 具有清热利湿、解毒消肿之功效^[1-2]。研究表明, 积雪草中的主要活性成分是乌苏烷型和齐墩果烷型三萜化合物^[3-4], 对多种肿瘤细胞株具有不同程度的抑制活性^[3-7]。植物提取物的酸水解反应可以获得更

多活性天然产物衍生物 (尤其是新皂苷元)。本实验对积雪草皂苷进行酸水解反应, 对水解产物的化学成分进行了分离和结构鉴定。采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱等方法进行分离、纯化, 分离并鉴定了 4 个苷元化合物, 分别为 2 α ,3 β ,23-三羟基乌苏-6,12-二烯-28-酸 (2 α ,3 β ,23-trihydroxyurs-6,12-dien-28-oic acid, 1)、

收稿日期: 2016-04-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273389)

作者简介: 曹家庆 (1975—), 男, 副教授, 沈阳药科大学, 主要从事天然产物研究。Tel: (024)23986522 E-mail: jiaqingcao@163.com

*通信作者 赵余庆 (1957—), 男, 教授, 沈阳药科大学, 主要从事抗肿瘤活性天然产物及食品药理学研究。

Tel: (024)23986521 E-mail: zyq4885@126.com

积雪草酸 (asiatic acid, **2**)、6 β -羟基积雪草酸 (6 β -hydroxy asiatic acid, **3**)、terminolic acid (**4**)。其中, 化合物 **1** 鉴定为新的乌苏烷苷元化合物, 命名为积雪草-6-烯。此外, 本实验还对新化合物的体外抗肿瘤活性进行了测试, 结果显示化合物 **1** 对所测试的肿瘤细胞无抑制活性。

1 仪器与材料

Shimadzu UV-2201 (日本岛津仪器有限公司); Bruker ARX-600 型超导核磁共振仪 (德国布鲁克公司); TOF-Q 质谱仪 (美国布鲁克海文仪器公司); X-4 数字显示显微熔点测定仪 (温度计未校正, 北京华乐达科技有限公司); MIR-253 超低温冰箱 (日本 SANYO 公司); YXQG01 高压蒸汽灭菌锅 (山东新华医疗器械厂); 450 型酶标定量测试仪 (美国 Bio-Rad 公司); BS-124S 精密电子天平 (德国赛多利斯公司)。柱色谱用硅胶 (300~400 目) 和薄层色谱用硅胶 (10~40 μm) 均为青岛海洋化工有限公司生产; Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司出品; 胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司); MTT (美国 Sigma 公司)。所用试剂均为分析纯。

积雪草总皂苷 (批号 20120913), 购于陕西惠科植物开发有限公司, 含总皂苷大于 50%, 含积雪草苷大于 10%。

2 化合物的分离

应用文献报道的方法^[8], 对积雪草总皂苷 200 g 进行水解反应。用醋酸乙酯萃取, 得萃取物 83 g。硅胶柱色谱 (300~400 目) 分离; 石油醚-丙酮 (40:1、20:1、10:1、6:1、4:1、2:1、1:1、0:1) 梯度洗脱, 合并流分后得到 A~J 部分 [A (1.2 g), B (2.3 g), C (4.6 g), D (5.5 g, fractions 21~35), E (3.0 g), F (7.5 g), G (6.7 g), H (8.5 g), I (9.2 g), J (8.2 g)], 再经硅胶柱色谱分离、反复重结晶, 得到 4 个化合物。其中从 H 部分得到化合物 **1** (14 mg) 和 **2** (80 mg); G 部分得到化合物 **3** (130 mg) 和 **4** (230 mg)。

3 体外抗肿瘤活性测试

应用 MTT 法, 对分离得到的化合物 **1** 进行了人白血病细胞株 HL-60、人肺癌细胞株 A549、人脑胶质瘤细胞株 U87 增殖抑制活性的研究^[9]。实验以依托泊苷为阳性对照, 采用 SPSS (16.0) 统计软件进行检验分析, 用 IC₅₀ 值来评估样品抗肿瘤活性^[10]。

4 结构鉴定

化合物 **1**: 无色鳞片状结晶 (甲醇), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +24.4$ 。

(c 0.34, 甲醇)。HR-ESI-TOF-MS 显示准分子离子峰 m/z 509.323 4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (理论值 509.323 7)。结合 NMR 数据推测分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$ 。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 204 (2.14); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 421, 2 925, 1 695, 1 454, 1 380, 1 249, 1 053。

^1H -NMR (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 谱中, 可以看到 6 个甲基质子信号, 其中 δ 0.90 (3H, d, $J = 6.6$ Hz) 和 0.97 (3H, d, $J = 6.8$ Hz) 为乌苏烷典型的 29, 30 位甲基氢信号, 此外还有 4 个甲基单峰 δ 1.06 (3H, s), 1.11 (3H, s), 1.16 (3H, s), 1.26 (3H, s)。氢谱中还显示 4 组连氧碳上的氢信号 δ 3.80 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 4.18 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 4.24 (1H, brd, $J = 12.6$ Hz); 4.34 (1H, m); 3 个连在双键上的氢信号 δ 5.63 (1H, brs); 5.61 (1H, dd, $J = 10.5, 2.4$ Hz); 6.00 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 其中后 2 个氢呈相互偶合关系。该化合物 ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 谱显示了 30 个碳原子信号。羰基碳信号 δ 179.5 以及 2 个烯碳信号 δ 126.4, 139.7, 提示该化合物可能为乌苏酸型苷元衍生物。3 个连氧碳信号 δ 65.8, 68.6, 77.92 为积雪草中常见的 2 $\alpha, 3\beta, 23$ -三羟基乌苏酸的特征碳信号。通过与化合物 **3** (6 β -羟基积雪草酸) 的核磁共振碳谱数据对比^[11], 发现除了 C-5, 6, 7, 8 的化学位移值有很大变化外, 其余的碳谱数据十分接近。在核磁共振碳谱中, 除了 12 和 13 位双键碳外, 尚余 1 组化学位移为 δ 133.8, 126.7 的 sp^2 杂化碳信号, 结合 HSQC 和氢谱, 可知它们为 “-CH = CH-” 片段, 因此, 这个双键可能位于 B 环的 C-6 与 C-7 间。HMBC 谱 (图 1, 表 1)

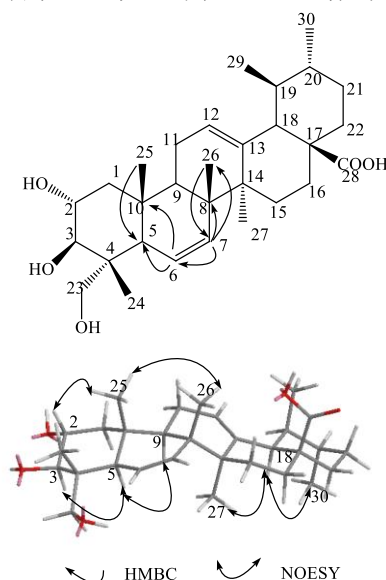


图 1 化合物 **1** 的主要的 HMBC 及 NOESY 相关

Fig. 1 Key HMBC and NOESY correlations of compound **1**

表1 化合物1的¹H-NMR和¹³C-NMR数据Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectral data of compound 1

碳位	δ _C	δ _H	DEPT HMBC (H→C)
1	45.0	2.20 (m), 1.40 (m)	CH ₂ C-2, 3
2	68.6	4.34 (m)	CH C-1, 3
3	77.9	4.24 (brd, <i>J</i> = 12.6 Hz)	CH C-2, 4, 5, 23
4	42.4		C
5	47.0	2.70 (m)	CH C-6, 7, 10
6	133.8	5.61 (dd, <i>J</i> = 10.5, 2.4 Hz)	CH C-5, 7, 10
7	126.7	6.00 (d, <i>J</i> = 10.5 Hz)	CH C-6, 8, 9, 26
8	44.0		C
9	47.5	2.18 (m)	CH C-7, 26
10	36.9		C
11	22.8	1.90 (m), 1.98 (m)	CH ₂ C-8, 12, 13
12	126.4	5.63 (brs)	CH C-13, 18
13	139.7		C
14	43.5		C
15	30.2	1.98 (m), 2.01 (m)	CH ₂ C-14, 27
16	24.4	2.00 (m), 2.18 (m)	CH ₂ C-17
17	48.3		C
18	54.4	2.63 (d, <i>J</i> = 11.6 Hz)	CH C-12, 17, 28
19	38.3	0.98 (m)	CH C-30
20	39.0	1.41 (m)	CH C-19, 29
21	30.6	1.40 (m), 1.45 (m)	CH ₂ C-19
22	36.7	1.92 (m), 1.95 (m)	CH ₂ C-20
23	65.8	3.80 (d, <i>J</i> = 10.2 Hz), 4.18 (d, <i>J</i> = 10.2 Hz)	CH ₂ C-3, 4, 24
24	14.2	1.10 (s)	CH ₃ C-3, 4, 23
25	18.0	1.06 (s)	CH ₃ C-5, 10
26	17.7	1.16 (s)	CH ₃ C-7
27	24.0	1.26 (s)	CH ₃ C-13, 14
28	179.5		C
29	20.9	0.90 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	CH ₃ C-19
30	17.3	0.97 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz)	CH ₃ C-19, 20

显示下列远程相关,证实了C-6、C-7之间双键的存在: H-5 (δ 2.70) 与C-6 (δ 133.8)、C-7 (δ 126.7)、C-10 (δ 36.9); H-6 (δ 5.61) 与C-5 (δ 47.0)、C-7 (δ 126.7)、C-10 (δ 36.9); H-7 (δ 6.00) 与C-6 (δ 133.8)、C-8 (δ 44.0)、C-9 (δ 47.5)、C-26 (δ 17.7); H-9 (δ 2.18) 与C-7 (δ 126.7)。NOESY (图1) 显示H-5与H-3、H-9均相关,说明H-5和H-9均在α位; H₃-25与H-2、

H₃-26均相关,说明H-2在β位。根据以上数据综合分析,化合物1的结构鉴定为2α,3β,23-三羟基乌苏-6,12-二烯-28-酸,为新化合物,命名为积雪草-6-烯。其NMR数据归属见表1。

另外,通过化合物2~4的¹³C-NMR数据(表2)与文献报道对照^[12-14],鉴定化合物2为积雪草酸,化合物3为6β-羟基积雪草酸,化合物4为terminolic acid。

表2 化合物2~4的¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据
Table 2 ¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) spectral data of compounds 2—4

碳位	δ _C		
	2	3	4
1	48.0	48.3	46.3
2	68.8	68.7	68.7
3	77.9	78.0	78.0
4	42.4	44.2	44.2
5	48.1	48.3	48.3
6	18.0	67.2	67.2
7	33.1	39.1	39.2
8	40.4	39.2	40.9
9	48.0	48.3	48.9
10	38.0	37.9	37.9
11	24.2	24.6	24.6
12	126.0	125.7	122.9
13	138.3	138.3	143.9
14	43.6	44.2	42.4
15	28.3	28.3	27.9
16	25.8	25.9	23.4
17	48.2	48.3	42.7
18	53.4	53.3	41.7
19	38.0	37.9	46.3
20	39.1	39.2	30.6
21	30.5	30.8	33.9
22	36.9	37.8	32.9
23	65.8	65.8	65.8
24	15.0	15.7	15.7
25	17.3	17.2	17.2
26	18.0	18.3	18.3
27	23.8	23.6	23.6
28	179.0	179.6	179.6
29	23.4	23.8	32.9
30	21.1	21.0	23.7

5 生物活性研究

采用MTT法,对化合物1进行了HL-60、A549、U873细胞株的增殖抑制活性测试,以依托泊苷为阳性对照。结果表明化合物1对3种肿瘤细胞株的IC₅₀均大于100 μmol/L,显示无细胞毒活性。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [2] 代百东, 张 翠, 王 佳, 等. 积雪草的研究现状 [J]. 上海医药, 2008, 29(2): 88-91.
- [3] 齐红梅, 王冬梅. 积雪草化学成分及药理研究进展 [J]. 中国药业, 2010, 19(16): 89-90.
- [4] 戴卫波, 梅全喜, 孔祥廉. 积雪草的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1566-1568.
- [5] 陈 军, 华维一, 孙宏斌. 积雪草酸及其衍生物的生物活性研究概况 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 458-460.
- [6] 黄云红, 张胜华, 甄瑞贤, 等. 积雪草甙诱导肿瘤细胞凋亡及增强长春新碱的抗肿瘤作用 [J]. 癌症, 2004, 23(12): 1599-1604.
- [7] 孟艳秋, 王 楠, 张良锋. 积雪草酸生物活性的研究进展 [J]. 化学通报, 2013, 76(8): 721-724.
- [8] 陈业高, 吕瑜平, 桂世鸿. 三七叶甙制备原人参二醇及其差向异构体 [J]. 精细化工, 2003, 20(7): 425-426.
- [9] Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, *et al.* The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells [J]. *J Cell Sci*, 1998, 11(16): 2445-2453.
- [10] 赵 斌, 葛金芳, 朱娟娟. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC₅₀ 的计算方法 [J]. 安徽医药, 2007, 11(9): 834-835.
- [11] Sahu N P, Roy S K, Mahato S B. Spectroscopic determination of structures of triterpenoid trisaccharides from *Centella asiatica* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(10): 2852-2854.
- [12] 王锦亮, 李兴从, 熊 江, 等. 云南揭布罗香树脂的化学成分 [J]. 云南植物研究, 1991, 13(3): 335-340.
- [13] Cheung H T, Wong C S. Structures of triterpenes from *Dryobalanops aromatica* [J]. *Phytochemistry*, 1972, 11(5): 1771-1780.
- [14] 李亚楠, 李志辉, 霍丽妮, 等. 积雪草化学成分的研究 [J]. 广西中医药, 2015, 38(2): 78-80.