

• 化学成分 •

牛皮消中 1 个新 C₂₁ 甾体化合物李召广¹, 吴 军², 湛顺清², 朱 璐², 江 茹¹, 蔡由生^{2*}

1. 江苏吉贝尔药业股份有限公司, 江苏 镇江 212009

2. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430071

摘要: 目的 研究牛皮消 *Cynanchum auriculatum* 的化学成分及其活性。方法 采用多种柱色谱对牛皮消乙醇提取物进行分离纯化; 通过波谱数据对化合物进行结构鉴定; 采用 SRB 法对所得化合物的进行细胞毒性测试。结果 从牛皮消的乙醇提取物中分离得到 2 个甾体类化合物, 分别鉴定为 3-甲酰氧基-萝藦昔元 (1) 和萝藦昔元 (2)。结论 化合物 1 为新化合物, 活性测试结果表明 2 个甾体化合物没有明显的细胞毒活性 (IC₅₀>10 μmol/L)。

关键词: 牛皮消; C₂₁ 甾体; 细胞毒活性; 3-甲酰氧基-萝藦昔元; 萝藦昔元

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)23-5921-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.001

One new C₂₁ steroid from *Cynanchum auriculatum*LI Zhao-guang¹, WU Jun², CHEN Shun-qing², ZHU Lu², JIANG Ru¹, CAI You-sheng²

1. Jiangsu Jibeier Pharmaceutical Co., Ltd, Zhenjiang 212009, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of *Cynanchum auriculatum*. **Methods** Compounds were isolated and purified by multiple column chromatography on silica gel column and Sephadex LH-20 gel column. The structures of the obtained compounds were elucidated by analysis of their NMR and HRESIMS data. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by SRB methods. **Results** Two compounds were obtained from ethanol extraction of *C. auriculatum* and identified as 3-formyloxy-metaplexigenin (1) and metaplexigenin (2). **Conclusion** Compound 1 is a new C₂₁ steroid, named 3-formyloxy-metaplexigenin and showed weak cytotoxicity.

Key words: *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight; C₂₁ steroid; cytotoxicity; 3-formyloxy-metaplexigenin; metaplexigenin

牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 为萝藦科 (Asclepiadaceae) 鹅绒藤属 *Cynanchum* Linn. 植物, 别名飞来鹤、隔山消等, 药用部位为其块根, 在民间多用于治疗胃胀、腹胀、消化不良等, 在我国已有 1 000 多年的药用历史, 始载于宋朝《开宝本草》^[1-2]。牛皮消为著名中药白首乌的正品之一, 其资源丰富, 主要分布于我国华中地区及河北、陕西、甘肃、台湾、四川、贵州、云南各省, 山东、江苏已有有人工栽培品^[1]。

牛皮消含有多种化学成分, 主要包括 C₂₁ 甾体苷类、多糖类、磷脂类、苯酮类、氨基酸类等^[3-6]。

现代药理实验研究表明, 耳叶牛皮消中的 C₂₁ 甾体及其苷类成分具有抗肿瘤活性^[7-10]。为深入开发牛皮消的药用价值, 本课题组对其化学成分特别是针对具有细胞毒活性的甾体进行了研究, 分离得到 2 个 C₂₁ 甾体, 经鉴定分别为 3-甲酰氧基-萝藦昔元 (3-formyloxy-metaplexigenin, 1) 和萝藦昔元 (metaplexigenin, 2), 结构见图 1。其中化合物 1 为新化合物。

1 仪器与材料

Avance 400 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); LC-3000 高效液相色谱仪; 岛津 UV-2600 紫外光谱

收稿日期: 2020-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973201); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2042019kf0228)

作者简介: 李召广, 博士, 从事药物活性分子筛选、合成、工艺开发以及药物申报。Tel: (0511)85580560 E-mail: 109221544@qq.com

*通信作者 蔡由生, 副教授, 研究方向为天然药物化学。Tel: 15623752985 E-mail: cysh2002@whu.edu.cn

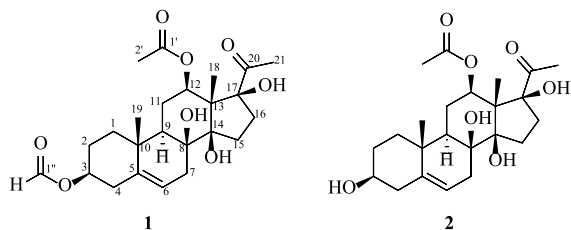


图 1 化合物 1 和 2 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1 and 2

仪; Perkin-Elmer 341 旋光仪 (美国 Perkin-Elmer 公司); Nicolet Nexus 470 FT-IR 红外光谱仪; 柱色谱硅胶 (200~300、300~400 目, 青岛海洋化工厂、安徽良臣硅源材料有限公司); RP-18 反相硅胶 (Merck 公司); MCI 树脂 (CHP20P, 75~150 μm , Mitsubishi Chemical Industries LTD) 和 Sephadex LH-20 凝胶 (Pharmacia 公司); 薄层色谱硅胶 GF254 板 (安徽良臣硅源材料有限公司); 色谱试剂 (武汉市中天化工有限责任公司、武汉市申试化工有限公司)。

牛皮消块根采集于贵州省安顺市, 经武汉大学药学院杨升平教授鉴定为牛皮消 *C. auriculatum* Royle ex Wight 的块根。标本 (CA-2014-7-1Y) 现存放于武汉大学药学院。

2 提取与分离

将干燥的牛皮消块根 (约 3 kg) 粉碎之后, 用 95% 乙醇提取 (7 d \times 3 次), 减压蒸馏回收乙醇得到牛皮消的块根粗提物, 将粗提物分散水中 (3 L), 用等体积醋酸乙酯溶液萃取 3 次, 合并萃取液减压蒸馏回收溶剂得到醋酸乙酯浸膏 (约 180 g)。将醋酸乙酯浸膏用大孔树脂分离, 甲醇-水 (3:10 \rightarrow 1:1) 梯度洗脱, 得到 7 个部分 A~G, 各个部分采用硅胶柱色谱 [石油醚-醋酸乙酯 (10:1 \rightarrow 1:1)、石油醚-异丙醇 (10:1 \rightarrow 1:1)、石油醚-丙酮 (10:1 \rightarrow 1:1)、三氯甲烷-甲醇 (50:1 \rightarrow 1:1)、石油醚-醋酸乙酯-甲酸 (10:1:0.1% \rightarrow 1:1:0.1%)、石油醚-异丙醇-甲酸 (10:1:0.1% \rightarrow 1:1:0.1%)], Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 [三氯甲烷-甲醇 (1:1)、甲醇], RP-18 反相硅胶柱色谱 (20%~100% 甲醇) 和高效液相色谱 (甲醇-水) 等分离手段对大孔树脂分离得到的几个部分进行进一步的细分与纯化。

E 部分用正相硅胶柱色谱分离, 依次以石油醚-异丙醇 (25:1、15:1、10:1、5:1、1:1) 为流动相进行梯度洗脱, 得到 E1 (3.524 g)、E2 (1.594 g)、E3 (1.425 g)、E4 (2.069 g)。E4 采用正相硅

胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (10:1、5:1、3:1) 依次洗脱, 得到 E4a (821 mg)、E4b (23 mg)、E4c (54 mg)、E4d (51 mg)、E4e (65 mg)。E4a 继续进行正相硅胶柱色谱分离, 以石油醚-异丙醇体系 (15:1、7.5:1、1:1) 洗脱, 分别获得 4 个部分 E4a1~E4a4。E4a2 组分通过进一步 Sephadex LH-20 柱色谱纯化, 得到化合物 2 (21 mg)。

F 部分 (27.5 g), 用正相硅胶柱色谱进行粗分, 三氯甲烷-甲醇 (50:1、25:1、20:1、10:1、5:1、1:1) 进行梯度洗脱, 采用 TLC 检测合并成 7 个部分: F1 (0.25 g)、F2 (0.37 g)、F3 (1.95 g)、F4 (0.95 g)、F5 (3.43 g)、F6 (5.21 g)、F7 (4.15 g)。F6 采用正相硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯-甲酸 (1:1:0.1 \rightarrow 1:2:0.1) 梯度洗脱, 将 F6 分成 3 个部分, F6a (1.2 g)、F6b (2.8 g)、F6c (1.1 g)。F6b 过正相硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (10:1、5:1、2:1、1:1、1:2) 洗脱, TLC 检测合并成 F6b1 (20 mg)、F6b2 (22 mg)、F6b3 (96 mg)、F6b4 (185 mg)、F6b5 (120 mg)、F6b6 (2.1 g)。F6b3 经过 Sephadex LH-20 柱色谱进行分离, 三氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, 得到化合物 1 (10 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20} +12.5$ (c 0.05, MeOH)。通过化合物 1 的高分辨质谱负离子 HR-ESI-MS m/z : 449.219 0 $[M-H]^-$ (计算值为 449.217 5), 得出其分子式为 $C_{24}H_{34}O_8$, 含有 8 个不饱和度。紫外最大吸收波长 λ_{max} 277 (3.43) nm 和 λ_{max} 206 (4.21) nm 显示双键的吸收信号。红外光谱在 3 410 cm^{-1} 处有强而宽的吸收峰说明有羟基, 1 740 cm^{-1} 附近有双吸收峰说明至少有 2 个羰基, 1 619 cm^{-1} 处的吸收显示有双键, 1 094 cm^{-1} 处的吸收显示碳氧键的存在。

化合物 1 的 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 数据显示出 4 个单峰甲基信号, 分别对应 2 个角甲基 C-18 (δ_{H} 1.48, s) 和 C-19 (δ_{H} 1.17, s), 2 个乙酰甲基 C-21 (δ_{H} 2.24, s) 和 C-2' (δ_{H} 1.91, s)。低场区 1 个单峰氢信号 δ_{H} 8.06, 对应的是 3 号位甲酰氧基。此外, 氢谱中 δ_{H} 4.4~5.4 有 3 组信号分别对应 3 个次甲基氢: H-12 (δ_{H} 4.47 dd, $J = 11.7, 4.1$ Hz)、H-3 (δ_{H} 4.67, m) 和 H-6 (δ_{H} 5.37, brs)。化合物 1 的 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) 数据显示出 24 个碳信号 (表 1), 包括 1 个乙酰氧基 (δ_{C} 170.5, 19.5) 和甲酰氧基 (δ_{C} 161.2), 特征的角甲基信号 C-18 (δ_{C} 8.9) 和 C-19 (δ_{C}

17.1), 以及 C-21 (δ_C 26.4), 符合 C_{21} 甾体碳谱特征, 可以确定该化合物的基本骨架。通过分析该化合物的二维核磁共振谱 (COSY, HSQC, HMBC), 并与已知甾体萝藦昔元 (metaplexigenin, **2**) 的核磁数据^[1]进行对比分析, 推测该化合物是萝藦昔元甲酰基取代衍生物。¹H-¹H COSY 谱图能够得出 4 个氢-氢自旋体系 (图 2), 分别为 C-1/C-2/C-3/C-4, C-6/C-7, C-9/C-11/C-12 和 C-15/C-16。结合 HMBC 相关, 把上述 4 个自旋体系与 7 个季碳 (C-5、C-10、C-8、C-13、C-14、C-17、C-20) 以及 3 个甲基 (C-18、C-19、C-21) 连接成 C_{21} 甾体母核 (图 2)。H-2' 与 C-12 的碳氢远程相关 (HMBC) 可以确定乙酰基连接在 C-12 上, 此外, 甲酰基 H-1'' 与 C-3 和 H-3 与

C-1'' 有 HMBC 相关, 可以确证甲酰基连接在 C-3 上。综上所述, 化合物 **1** 结构确定为 3-甲酰基-萝藦昔元 (3-formyloxy-metaplexigenin) (图 1)。NOESY 谱图显示 H₃-19 与 H₃-18、H₃-2' 在空间上有 NOE 相关, 表明 2 个角甲基和 C-12 位乙酰基处在 β 位; H-9 [1.53 (dd, $J = 13.3, 3.1$ Hz)] 与 H-12 (δ_H 4.47, dd, $J = 11.7, 4.1$ Hz) 相互之间有强的 NOE 相关, 表明 H-9 处在 α 位。另外, 结合 C_{21} 甾体化合物生源以及已知化合物对比核磁、旋光等数据, 推断新化合物 **1** 与已知甾体化合物 **2** 具有相同的立体化学关系^[1], 即甾核稠合方式是反/反/顺, 最终确定新甾体化合物 **1** 的相对和绝对构型与萝藦昔元 (metaplexigenin, **2**) 一致, 见图 1。

表 1 化合物 1 的 ¹H-NMR (400 MHz) 和 ¹³C-NMR (100 MHz) 核磁数据

Table 1 ¹H-NMR (400 MHz) and ¹³C-NMR (100 MHz) data of compound 1 in CD₃OD

碳位	δ_H	δ_C	碳位	δ_H	δ_C
1	1.24 (m), 0.87 (m)	38.0	13		57.2
2	1.82 (m), 1.70 (m)	26.9	14		88.5
3	4.67 (m)	73.7	15	2.00 (m), 1.86 (m)	32.8
4	2.38 (m), 1.83 (m)	37.7	16	2.82 (ddd, $J = 14.9, 12.5, 4.6$ Hz), 1.71 (m)	31.7
5		137.8	17		91.7
6	5.37 (brs)	119.4	18	1.48 (s)	8.9
7	2.14 (dd, $J = 8.0, 3.4$ Hz)	37.8	19	1.17 (s)	17.1
8		73.5	20		210.9
9	1.53 (dd, $J = 13.3, 3.1$ Hz)	43.6	21	2.24 (s)	26.4
10		36.6	1'		170.5
11	1.85 (m), 1.73 (m)	23.8	2'	1.91 (s)	19.5
12	4.47 (dd, $J = 11.7, 4.1$ Hz)	73.0	1''	8.06 (s)	161.2

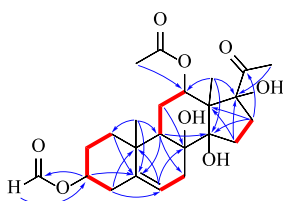


图 2 化合物 1 的 ¹H-¹H COSY (粗线) 和部分 HMBC (箭头) 相关信号

Fig. 2 ¹H-¹H COSY (red bold) and key HMBC (blue arrows) correlations of compound 1

化合物 **2**: 白色粉末, 低分辨质谱 LR-ESI-MS m/z : 423.3 $[M+H]^+$ 结合核磁数据确定其分子式为 $C_{23}H_{34}O_7$ 。¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.49 (3H, s, 19-Me), 1.16 (3H, s, 18-Me), 2.25 (3H, s, 21-Me), 1.92 (3H, s, 2'-Me), 3.23 (1H, m, H-7), 3.88 (1H, m, H-3), 4.51 (1H, dd, $J = 11.6, 4.2$ Hz, H-12), 5.33 (1H, brs, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.7 (C-1),

30.8 (C-2), 71.8 (C-3), 41.9 (C-4), 140.9 (C-5), 117.5 (C-6), 34.1 (C-7), 74.5 (C-8), 43.5 (C-9), 37.0 (C-10), 24.2 (C-11), 72.5 (C-12), 57.6 (C-13), 88.2 (C-14), 32.6 (C-15), 27.4 (C-16), 91.7 (C-17), 9.3 (C-18), 18.8 (C-19), 209.5 (C-20), 32.1 (C-21), 170.4 (C-1'), 20.8 (C-2')。以上数据与文献对比一致^[12], 故鉴定化合物 **2** 为萝藦昔元。

4 生物活性

采用 SRB 法^[13-14], 测试了 2 个化合物对乳腺癌 MCF-7 细胞和肺癌 A549 细胞的生长抑制作用, 结果表明, 牛皮消中 2 个甾体化合物对这 2 种细胞无明显细胞毒活性 ($IC_{50} > 10 \mu\text{mol/L}$)。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.

(下转第 5933 页)

- 研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2826-2831.
- [11] 李述日, 杨慧, 谭彩, 等. 琼岛染木树茎的乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(12): 1017-1020.
- [12] 孙文婷, 蔡由生, 杨升平. 芫花根的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(23): 49-54.
- [13] 冯宝民, 裴月湖, 韩冰. 瑞香狼毒中的黄酮类化合物 [J]. 中草药, 2001, 32(1): 14-15.
- [14] 黄积武, 李剑军, 杨敬芝, 等. 三七叶的化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4381-4386.
- [15] Baba K, Taniguchi M, Kozawa M. A third spirobiflavonoid genkwanol C from *Daphne genkwa* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 33(4): 913-916.
- [16] 冯宝民. 瑞香狼毒和柚皮抗癫痫活性成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2002.
- [17] 赵震宇, 罗宁, 陈晨, 等. 单针藻的化学成分及其体外抗菌、抗氧化活性研究 [J]. 中国药房, 2017, 28(4): 465-468.
- [18] 刘玉波, 成向荣, 覃江江, 等. 毛红椿的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2011(2): 115-119.
- [19] 崔祥龙, 邓玲玲, 黄胜阳. 箭叶淫羊藿三氯甲烷部位化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 101-103.
- [20] 贺兰云, 黄海疆. 绣球化学成分研究 [J]. 中国当代医药, 2014, 21(22): 59-61.
- [21] 扈晓佳, 金慧子, 苏娟, 等. 长白瑞香的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2008, 6(6): 411-414.
- [22] 石钺, 石任兵, 刘斌, 等. 银翘散抗流感病毒有效部位群中黄酮类成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(5): 320-322.

(上接第 5923 页)

- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [3] 郑威. 耳叶牛皮消的化学成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. 健康研究, 2010, 30(6): 465-467.
- [4] 何江波, 贾静, 句红萍, 等. 耳叶牛皮消化学成分研究 [J]. 中药材, 2015, 38(11): 2318-2320.
- [5] 郭娜, 李晓鹏, 许枏, 等. 耳叶牛皮消中 C₂₁ 甾类化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(1): 28-33.
- [6] 余黎微, 郑威, 唐婷, 等. 耳叶牛皮消化学成分的研究 [J]. 健康研究, 2015, 35(6): 627-628.
- [7] 郑威. 耳叶牛皮消的化学成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. 健康研究, 2010, 30(6): 465-467.
- [8] 张如松, 叶益萍, 刘雪莉. 白首乌甾体总苷的体外抗肿瘤作用 [J]. 中草药, 2000, 31(8): 599-601.
- [9] Shan L, Zhang W D, Zhang C, et al. Antitumor activity of crude extract and fractions from root *Tuber of Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(3): 259-261.
- [10] 王冬艳, 张洪泉, 李心. 白首乌 C₂₁ 甾体苷诱导肝癌细胞凋亡的作用及其机制 [J]. 药学报, 2007, 42(4): 366-370.
- [11] Hiroshi M, Taro N. Structure of metaplexigenin and benzoylramanone [J]. *Chem Pharm Bull*, 1963, 11(10): 1333-1336.
- [12] 陈纪军, 张壮鑫, 周俊. 白首乌的化学成分 [J]. 云南植物研究, 1989, 11(3): 358-360.
- [13] 姜念, 宋长伟, 魏凌凯, 等. 佩兰乙醇提取物对结肠癌 RKO 细胞的抑制作用研究 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(16): 32-35.
- [14] 袁瑞璞, 卓玛东智, 韦玉璐, 等. 迷迭香中 2 个新松香烷型二萜化合物 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4853-4858.