

管花鹿药中 2 个新的甾体皂苷

张 欣, 刘媛媛, 李玉泽, 张东东, 姜 祎, 宋小妹, 王 薇, 邓 翀*

陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

摘要: 目的 研究管花鹿药 *Maianthemum henryi* 中的甾体皂苷类成分及其细胞毒活性。方法 采用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶 LH-20 柱色谱以及半制备高效液相色谱等方法分离, 根据 MS、IR、NMR 和 GC 等数据鉴定化合物的结构, MTT 法测定化合物的细胞毒活性。结果 从管花鹿药乙醇提取物的正丁醇部位分离鉴定了 2 个甾体皂苷类化合物, 分别鉴定为 (23S,24S)-螺甾-5,25(27)-二烯-1 β ,3 β ,23,24-四醇 1-O- α -L-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-呋糖苷 (1) 和 (23S,24S)-螺甾-5,25(27)-二烯-1 β ,3 β ,21,23,24-五醇 1-O- α -L-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-呋糖苷 (2), 化合物 1 和 2 对 2 种肿瘤细胞的细胞毒活性的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值均大于 100 μ mol/L。结论 化合物 1 和 2 为新化合物, 分别命名为管花鹿药皂苷 K (1) 和管花鹿药皂苷 L (2); 两者均未表现出细胞毒活性。

关键词: 管花鹿药; 甾体皂苷; 细胞毒性; 管花鹿药皂苷 K; 管花鹿药皂苷 L

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)20-6375-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.009

Two new steroidal saponins from the roots and rhizomes of *Maianthemum henryi*

ZHANG Xin, LIU Yuan-yuan, LI Yu-ze, ZHANG Dong-dong, JIANG Yi, SONG Xiao-mei, WANG Wei, DENG Chong

School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: **Objective** To study the steroidal saponins from the roots and rhizomes of *Maianthemum henryi* and their cytotoxicity. **Methods** The chemical constituents were studied by chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC, and the structures were elucidated on the basis of spectroscopic methods, including MS, IR, NMR and GC data analysis. The cytotoxicity was studied by MTT method. **Results** Two new steroidal saponins were obtained from *n*-butanol fraction of ethanol extract of *M. henryi* and namely (23S,24S)-spirost-5,25(27)-diene-1 β ,3 β ,23,24-tetraol 1-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fuopyranoside (1) and (23S,24S)-spirost-5,25(27)-diene-1 β ,3 β ,21,23,24-pentaol-1-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fuopyranoside (2), and compounds 1 and 2 showed cytotoxicity against two cancer cell lines with IC₅₀ values greater than 100 μ mol/L. **Conclusion** Compounds 1 and 2 were new compounds named henryioside K and henryioside L which possessed no cytotoxicity.

Key words: *Maianthemum henryi* (Baker) LaFrankie; steroidal saponins; cytotoxicity; henryioside K; henryioside L

管花鹿药 *Maianthemum henryi* (Baker) LaFrankie 为天门冬科 (Asparagusaceae) 舞鹤草属 *Maianthemum* Web. 植物管花鹿药的根及根茎^[1], 其为甘、苦, 性温, 又称偏头七、竹叶菜等, 主要分布于陕西、湖北和云南等地^[2-4]。文献报道其主要化学成分为甾体皂苷类、黄酮类和有机酸等, 具有抗肿瘤和抗氧化等药理作用^[5-7]。其中甾体皂苷类成分是管花鹿药

抗肿瘤的主要活性成分, 受到国内外学者的重点关注^[4-8]。目前关于管花鹿药的化学成分研究并不系统, 为进一步明确其化学成分, 本研究基于前期的研究基础^[8-10], 继续对管花鹿药醇提取物进行系统研究, 从中共鉴定了 2 个新化合物分别为管花鹿药皂苷 K (1) 和管花鹿药皂苷 L (2), 细胞毒活性测试结果显示 2 个化合物均未表现出抑制作用。

收稿日期: 2022-06-23

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基础研究计划项目 (2021JQ-742); 陕西中医药大学研究生创新项目 (2021CX19); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-YL12)

作者简介: 张 欣 (1985—), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质及制剂研究。Tel: (029)38185165 E-mail: 277102745@qq.com

*通信作者: 邓 翀 (1978—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中草药药效物质基础及炮制机制。Tel: (029)38185165 E-mail: 393494971@qq.com

1 仪器与材料

Bruker-AVANCE400 型核磁共振仪 (布鲁克公司); HH-2 恒温水浴锅 (青岛聚创环保集团有限公司); Sephadex LH-20 (GE 公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂); 色谱乙腈 (阿德马斯试剂公司); 甲醇、二氯甲烷、正丁醇、石油醚等均为分析纯 (天力化学试剂有限公司), 水为娃哈哈纯净水; 人肝癌 HepG2 细胞和人结直肠癌 SW620 细胞购于中国科学院上海细胞库。

管花鹿药于 2017 年 8 月购于陕西省眉县, 经陕西中医药大学药学院王薇教授鉴定为天门冬科舞鹤草属植物管花鹿药 *M. henryi* (Baker) LaFrankie 的根及根茎, 药材标本 (SH-201708) 保存于陕西中医药大学药学院中药标本馆。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥的管花鹿药根及根茎 6.6 kg, 粉碎后以 80%乙醇回流提取 3 次, 各 2、2 和 1 h。减压回收乙醇, 干燥至浸膏, 分散于水中, 分别用石油醚和水饱和正丁醇萃取 3 次, 得到石油醚部位 9.0 g 和正丁醇部位 130.2 g。取正丁醇部位 130 g, 经硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇-水 (100:0:0~60:40:10) 梯度洗脱, 合并相同流分, 分别得到 6 个组分 Fr. 1~6。Fr. 4 (19.1 g) 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇-水 (100:10:0~70:30:5) 梯度洗脱, 得到 6 个组分 Fr. 4-1~4-6。Fr. 4-2 (1.4 g) 经葡聚糖凝胶色谱, 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, 合并相同流分后再经高效液相色谱 (HPLC), 乙腈-水 (65:35) 洗脱得到化合物 **1** (8.2 mg, $t_R=41$ min) 和 **2** (13.1 mg, $t_R=47$ min)。

2.2 酸水解实验

化合物 **1** 和 **2** 各 5 mg, 采用课题组前期水解和衍生化方法得到糖的衍生物^[14-15], 经 Agilent 7890B 气相色谱仪分析, 色谱柱: HP-5 ms, 60 m×0.25 mm×0.25 μm; 程序升温: 起始温度 140 °C, 5 °C/min 升温至 240 °C, 1 °C/min 升温至 260 °C, 保温 10 min, 2 °C/min 升温至 280 °C, 保温 5 min; 进样温度 240 °C; 载气: 氮气。测得各类单糖的保留时间分别为 *D*-呋糖: 35.39 min, *L*-呋糖: 35.63 min, *L*-鼠李糖: 36.08 min, *D*-鼠李糖: 36.20 min。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20}-42.8$ (c 0.08, 甲醇); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3438 (羟基), 2929, 1641 (双键),

1453, 1157, 1072, 914, 636。HR-ESI-MS m/z 751.392 0 [M-H]⁻ (计算值 751.390 5), 结合 1D-NMR 推测化合物 **1** 的分子式为 C₃₉H₆₀O₁₄。¹H-NMR (400 MHz, pyridin-*d*₅) 谱图中显示 3 个甲基信号 δ_H 1.03 (s, H-18), 1.40 (s, H-19) 和 1.09 (d, $J=7.0$ Hz, H-21), 1 组环外双键信号 δ_H 5.11 (brs, H-27a), 5.02 (brs, H-27b), 1 组三取代烯烃质子信号 δ_H 5.56 (d, $J=5.5$ Hz, H-6)。以上氢谱特征, 结合 ¹³C-NMR (100 MHz, pyridin-*d*₅) 谱图中信号 δ_C 112.7 (C-22) 季碳信号, δ_C 84.3 (C-1)、68.3 (C-3)、169.6 (C-23) 和 74.2 (C-24) 连氧碳信号, 推测化合物 **1** 的母核可能为螺甾-5,25(27)-二烯-1,3,23,24-四醇^[11-12]。结合 ¹H-¹H COSY 相关信号 (图 1): H-1/H-2/H-3/H-4、H-6/H-7/H-8/H-9/H-11/H-12、H-8/H-14/H-15/H-16/H-17/H-20 和 HMBC 相关信号 (图 1): H-19/C-1、C-5、C-9、C-10, H-18/C-12、C-13、C-14、C-17, H-21/C-17、C-20、C-22 以及 H-27/C-24、C-25、C-26, 进一步证明化合物的母核为螺甾-5,25(27)-二烯-1,3,23,24-四醇^[13]。在 NOESY 谱图中, NOE 相关信号 (图 1): H-3/H-1/H-9/H-14/H-16/H-21/H-17, H-19/H-8/H-18, 说明 3-OH、1-OH 为 β 构型。由于 $J_{23,24}=3.5$ Hz, 所以 C-23 和 C-24 位绝对构型均为 *S*^[11-13]。此外在 ¹H-NMR 中 δ_H 4.68 (d, $J=7.5$ Hz, Fuc-H-1) 和 6.39 (brs, Rha-H-1), 分别为 β -呋糖和 α -鼠李糖的端基质子信号, 结合 δ_H 1.53 (d, $J=6.3$ Hz, Fuc-H-6) 和 1.74 (d, $J=6.1$ Hz, Rha-H-6) 糖上甲基信号, 进一步验证苷元上连有 2 个脱氧吡喃糖。通过酸水解衍生化结合 GC 分析确定 2 种糖分别为 *D*-呋糖 ($t_R=35.40$ min) 和 *L*-鼠李糖 ($t_R=36.09$ min)^[14-15]。在 HMBC 谱图中发现 H-1'/C-1 相关, H-1''/C-2' 相关, 说明鼠李糖连接在呋糖的 C-2 位, 呋糖连接在甾体母核的 C-3 位。以上数据通过和已知化合物 (23*S*,24*S*)-spirost-5,25(27)-diene-1 β ,3 β ,23,24-tetrol 1-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-acetyl- β -*D*-fucopyranoside^[11]对比发现, 除了化合物 **1** 在呋糖的 C-4 位无乙酰基取代外, 其它实验数据基本一致, 因此化合物 **1** 的结构鉴定为 (23*S*,24*S*)-螺甾-5,25(27)-二烯-1 β ,3 β ,23,24-四醇 1-*O*- α -*L*-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -*D*-呋糖苷, 命名为管花鹿药皂苷 K, 具体化合物结构见图 1, NMR 数据见表 1。

化合物 **2**: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20}-39.4$ (c 0.26, 甲醇), IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3411, 2940, 1633, 1455, 1162, 1070, 893。HR-ESI-MS m/z 791.381 5 [M+Na]⁺ (计算值

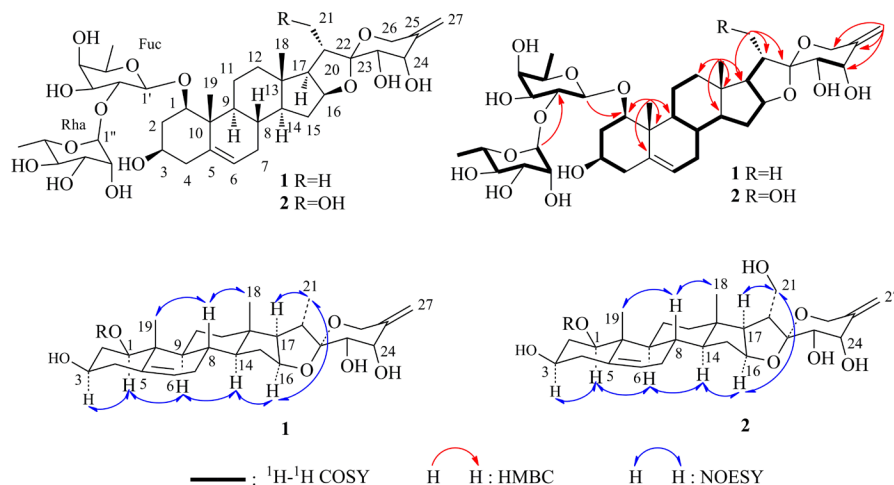


图 1 化合物 1 和 2 的结构及主要的 ^1H - ^1H COSY、HMBC 和 NOESY 相关信号

Fig. 1 Structures and key ^1H - ^1H COSY, HMBC and NOESY correlations of compounds 1 and 2

表 1 化合物 1 和 2 的 ^1H (400 MHz, pyridine- d_5) 和 ^{13}C -NMR 数据 (100 MHz, pyridine- d_5)

Table 1 ^1H (400 MHz, pyridine- d_5) and ^{13}C -NMR (100 MHz, pyridine- d_5) data of compounds 1 and 2

碳位	1		2	
	δ_{C} (type)	δ_{H}	δ_{C} (type)	δ_{H}
1	84.3 (CH)	3.77 (m)	84.9 (CH)	3.75 (m)
2a	38.0 (CH ₂)	2.43 (m)	38.5 (CH ₂)	2.42 (m)
2b		2.69 (m)		2.68 (m)
3	68.3 (CH)	3.86 (m)	68.8, (CH)	3.85 (m)
4a	43.8 (CH ₂)	2.58 (m)	44.3, (CH ₂)	2.58 (m)
4b		2.69 (overlapped)		2.67 (overlapped)
5	139.6 (C)		140.2 (C)	
6	124.7 (CH)	5.56 (d, $J = 5.5$ Hz)	125.3 (CH)	5.56 (d, $J = 5.3$ Hz)
7a	32.0 (CH ₂)	1.33 (m)	32.6 (CH ₂)	1.35 (m)
7b		1.86 (m)		1.81 (m)
8	33.0 (CH)	1.52 (overlapped)	33.6 (CH)	1.54 (overlapped)
9	50.6 (CH)	1.57 (m)	51.1 (CH)	1.56 (m)
10	42.8 (C)		43.4 (C)	
11a	24.0 (CH ₂)	1.60 (m)	24.5 (CH ₂)	1.59 (m)
11b		2.98 (overlapped)		2.94 (overlapped)
12a	40.7 (CH ₂)	1.46 (m)	41.0 (CH ₂)	1.42 (m)
12b		1.82 (m)		1.78 (m)
13	40.7 (C)		41.0 (C)	
14	57.3 (CH)	1.22 (overlapped)	57.9 (CH)	1.23 (overlapped)
15a	32.3 (CH ₂)	1.41 (m)	33.1 (CH ₂)	1.40 (m)
15b		1.97 (m)		2.01 (m)
16	83.3 (CH)	4.68 (m)	84.2 (CH)	4.67 (m)
17	61.5 (CH)	1.88 (m)	62.7 (CH)	1.89 (m)
18	17.0 (CH ₃)	1.03 (s)	17.6 (CH ₃)	1.10 (s)
19	15.0 (CH ₃)	1.40 (s)	15.5 (CH ₃)	1.37 (s)
20	37.0 (CH)	3.00 (d, $J = 6.9$ Hz)	46.4 (CH)	2.94 (m)
21	14.6 (CH ₃)	1.09 (d, $J = 7.0$ Hz)	62.8 (CH ₂)	4.20 (m), 3.91 (m)
22	112.7 (C)		112.9 (C)	

续表 1

碳位	1		2	
	δ_{C} (type)	δ_{H}	δ_{C} (type)	δ_{H}
23	69.6 (CH)	3.94 (d, $J = 3.5$ Hz)	71.5 (CH)	3.97 (d, $J = 3.6$ Hz)
24	74.2 (CH)	4.71 (overlapped)	74.6 (CH)	4.70 (overlapped)
25	146.4 (C)		146.8 (C)	
26a	60.8 (CH ₂)	4.03 (d, $J = 12.2$ Hz)	61.3 (CH ₂)	4.04 (d, $J = 12.3$ Hz)
26b		4.85 (d, $J = 12.2$ Hz)		4.88 (d, $J = 12.3$ Hz)
27a	112.4 (CH ₂)	5.11 (brs)	113.0 (CH ₂)	5.06 (brs)
27b		5.02 (brs)		4.97 (brs)
Rha-1	101.6 (CH)	6.39 (s)	102.1 (CH)	6.35 (s)
2	72.5 (CH)	4.77 (m)	72.8 (CH)	4.75 (m)
3	72.7 (CH)	4.63 (m)	72.9 (CH)	4.62 (m)
4	74.3 (CH)	4.34 (t, $J = 9.4$ Hz)	74.4 (CH)	4.31 (t, $J = 9.4$ Hz)
5	69.6 (CH)	4.93 (m)	68.7 (CH)	4.85 (m)
6	19.0 (CH ₃)	1.74 (d, $J = 6.1$ Hz)	19.5 (CH ₃)	1.69 (d, $J = 6.1$ Hz)
Fuc-1	100.5 (CH)	4.68 (d, $J = 7.4$ Hz)	100.9 (CH)	4.72 (d, $J = 7.4$ Hz)
2	76.8 (CH)	4.55 (m)	77.1 (CH)	4.52 (m)
3	74.6 (CH)	4.12 (m)	74.9 (CH)	4.11 (m)
4	73.3 (CH)	4.90 (m)	73.6 (CH)	4.90 (m)
5	69.3 (CH)	3.87 (m)	69.8 (CH)	3.85 (m)
6	17.2 (CH ₃)	1.53 (d, $J = 6.3$ Hz)	17.7 (CH ₃)	1.50 (d, $J = 6.3$ Hz)

791.383 0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 结合 1D-NMR 推测化合物 **2** 的分子式为 $\text{C}_{39}\text{H}_{60}\text{O}_{15}$ 。对比化合物 **1** 和 **2** 的 1D-NMR 数据发现, 化合物 **2** 比 **1** 减少 1 个甲基信号, 结合 HSQC、 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 谱图发现化合物 **1** 中 C-21 甲基在化合物 **2** 中被羟甲基所取代, 因此判断化合物 **2** 为化合物 **1** 的 21-OH 取代的衍生物。以上推测在 HMBC、 ^1H - ^1H COSY 和 NOESY 谱图(图 1)中得到了验证, 此外根据 HR-ESI-MS 谱图确定化合物 **2** 的分子式比化合物 **1** 的分子式多出 1 个氧原子, 也验证了以上推断结果。通过酸水解衍生化结合 GC 分析确定化合物 **2** 中 2 种糖分别为 *D*-呋糖 ($t_{\text{R}}=35.42$ min) 和 *L*-鼠李糖 ($t_{\text{R}}=36.10$ min) ^[14-15]。因此鉴定化合物 **2** 的结构为 (23*S*,24*S*)-螺甾-5, 25(27)-二烯-1 β ,3 β ,21,23,24-五醇 1-*O*- α -*L*-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -*D*-呋糖苷, 命名为管花鹿药皂苷 L 具体化合物结构见图 1, NMR 数据见表 1。

4 细胞毒实验

根据课题组前期研究^[8-10], 采用 MTT 法分别测定化合物 **1** 和 **2** 对人肝癌 HepG2 细胞和人结直肠癌细胞 SW620 的细胞毒活性。结果化合物 **1** 和 **2** 对两种肿瘤细胞的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值均大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

5 讨论

本实验从管花鹿药中共分离鉴定了 2 个新的甾体皂苷类化合物, 分别命名为管花鹿药皂苷 K 和管花鹿药皂苷 L, 进一步丰富了管花鹿药的化学成分。但体外细胞毒活性研究表明二者均未显示出对 HepG2 和 SW620 细胞的抑制活性, 关于 2 个新化合物的其他活性还有待于进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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, 1978: 35.
- [2] 高天慧, 樊浩, 梁卓菲, 等. 鹿药属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(12): 45-54.
- [3] 林洁, 王国全, 白璐, 等. 鄂西鹿药甾体化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 3987-3991.
- [4] Zhang X, Su Y F, Chen L, *et al*. Steroidal saponins from the rhizomes of *Smilacina henryi* [J]. *Helve Chim Acta*, 2013, 96(3): 478-487.
- [5] 常晓薇. 鄂西鹿药化学成分研究 [J]. 中南药学, 2017, 15(6): 762-764.
- [6] 张娇, 张欢, 杨帆, 等. 偏头七的研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报, 2017, 40(5): 120-122.

- [7] 张肖. 鄂西鹿药根茎甾体皂苷类成分研究 [D]. 天津: 天津大学, 2013.
- [8] Chen Z L, Xue X J, Zhang S, *et al.* Steroidal components from the roots and rhizomes of *Smilacina henryi* and their cytotoxic activities [J]. *Rec Nat Prod*, 2020, 14(3): 225-230.
- [9] Zhang X, Sun J, Zhang S, *et al.* Two new cholestanol glycosides from the roots and rhizomes of *Smilacina henryi* [J]. *Rec Nat Prod*, 2019, 13(6): 499-505.
- [10] Zhang X, Sun J, Zhang X F, *et al.* Cytotoxic steroidal saponins from the roots and rhizomes of *Maianthemum henryi* [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(11): 1808-1815.
- [11] Lin J, Wang G Q, Bai L, *et al.* Two new steroidal saponins from *Maianthemum henryi* and their cytotoxic activity against human HepG2 tumor cells [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(24): 3551-3558.
- [12] Mimaki Y, Inoue T, Kuroda M, *et al.* Steroidal saponins from *Sansevieria trifasciata* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(6): 1325-1331.
- [13] Luo Y, Shen H Y, Zuo W J, *et al.* A new steroidal saponin from dragon's blood of *Dracaena cambodiana* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(4): 409-414.
- [14] Song X M, Zhang D D, He H, *et al.* Steroidal glycosides from *reineckia carnea* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 105: 240-245.
- [15] Zhang D D, Wang W, Li Y Z, *et al.* Two new pregnane glycosides from *Reineckia carnea* [J]. *Phytochem Lett*. 2016, 15: 142-146.

[责任编辑 王文倩]