

小花草玉梅的三萜皂苷成分鉴定及抗肿瘤活性研究^Δ

王啸洋^{1*}, 吴君², 皇甫龙韬³, 刘红¹, 李雪梅¹, 汤海峰^{4#}, 张艳华¹ (1. 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所药剂科恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142; 2. 北京大学口腔医院特诊科, 北京 100081; 3. 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所胃肠转化研究室恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142; 4. 空军军医大学药理学系/中药与天然药物学教研室, 西安 710032)

中图分类号 R284; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0602-09
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.16



摘要 目的 研究银莲花属植物小花草玉梅 *Anemone rivularis* var. *flore-minore* 的三萜皂苷类化合物及其抗肿瘤活性。方法 对该植物根茎的70%乙醇提取物正丁醇萃取部位进行分离, 采用正相硅胶柱色谱、反相ODS柱色谱、Sephadex LH-20凝胶柱色谱以及半制备高效液相色谱等手段分离纯化三萜皂苷类化合物; 根据波谱(核磁共振谱、质谱)数据及理化性质鉴定化合物结构; 采用MTT法检测化合物对5种人源肿瘤细胞(HL-60细胞、A549细胞、HepG2细胞、HeLa细胞和U87MG细胞)的增殖抑制活性; 通过流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染试验, 评估化合物7对U87MG细胞的诱导凋亡作用。结果 共分离得到16个三萜皂苷类化合物, 分别为3 β -O- β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖-齐墩果酸-28-O- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖酯苷(1)、3 β -O- α -L-吡喃阿拉伯糖-齐墩果酸-28-O- β -D-吡喃葡萄糖酯苷(2)、saponin B(3)、齐墩果酸-3 β -O- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷(4)、HN-saponin F(5)、clematoside S(6)、prosapogenin CP4(7)、cussonside B(8)、白头翁皂苷C(9)、clemastanoside D(10)、3 β -O- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖-常春藤皂苷元-28-O- β -D-吡喃葡萄糖酯苷(11)、刺五加皂苷C3(12)、刺五加皂苷A1(13)、huzhangoside D(14)、刺楸皂苷B(15)和hederacolchiside E(16)。化合物3、4、6~9表现出不同程度的抑制肿瘤细胞增殖活性, 并以化合物7的活性最强; 化合物7能诱导U87MG细胞凋亡从而抑制肿瘤细胞增殖, 并呈一定时间依赖趋势。结论 分离所得的16个化合物均为齐墩果烷型三萜皂苷, 其中化合物1为新化合物; 苷元C-3位连糖基且C-28位为游离羧基的皂苷抗肿瘤活性较强。

关键词 小花草玉梅; 三萜皂苷; 鉴定; 抗肿瘤活性; 齐墩果烷型三萜皂苷

Identification of triterpenoid saponins from *Anemone rivularis* var. *flore-minore* and study on their antitumor activities

WANG Xiaoyang¹, WU Jun², HUANGFU Longtao³, LIU Hong¹, LI Xuemei¹, TANG Haifeng⁴, ZHANG Yanhua¹ [1. Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Dept. of Pharmacy, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China; 2. Dept. of VIP Dental Service, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China; 3. Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Division of Gastrointestinal Cancer Translational Research Laboratory, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China; 4. Dept. of Chinese Materia Medica and Natural Medicines/School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the triterpenoid saponins from *Anemone rivularis* var. *flore-minore* and their antitumor activities. **METHODS** The *n*-butanol extract of 70% ethanol extract from rhizome of the plant was separated. The triterpenoid saponins were separated and purified by normal silica gel column chromatography, reversed phase ODS column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography and semi-preparation high performance liquid chromatography. The structures of these saponins were identified by spectral analysis (NMR and MS) and physical and chemical properties. MTT assay was used to test the proliferation inhibitory activity of the compounds against five kinds of human tumor cells (HL-60 cells, A549 cells, HepG2 cells, HeLa cells and U87MG cells). The apoptosis inducing effect of compound 7 on U87MG cells was evaluated by flow

^Δ 基金项目: 北京市属医院科研培育计划项目(No.PZ2021025); 北京大学肿瘤医院科学研究基金项目(No.2021-26)

* 主管药师, 博士。研究方向: 天然药物活性成分与药理作用。电话: 010-88196960。E-mail: wangxiaoyang@bjmu.edu.cn

通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 天然药物化学和中药、海洋药物开发。电话: 029-84711551。E-mail: tanghaifeng71@163.com

cytometric Annexin V-FITC/PI staining test. **RESULTS** Sixteen triterpenoid saponins were obtained and identified as 3 β -O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-oleanolic acid-28-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (1), 3 β -O- α -L-arabinopyranosyl-oleanolic acid-28-O- β -D-glucopyranoside (2), saponin B (3), oleanolic acid-3 β -O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabino-

pyranoside (4), HN-saponin F (5), clematoside S (6), prosapogenin CP4 (7), cussonside B (8), pulsatilla saponin C (9), clemastanoside D (10), 3- β -O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -L-arabinopyranosyl-hederagenin-28-O- β -D-glucopyranoside (11), ciwujianoside C3 (12), ciwujianoside A1 (13), huzhangoside D (14), kalopanaxsaponin B (15) and hederacolchiside E (16). Compounds 3, 4, 6-9 displayed inhibitory activities on the proliferation of tumor cells to different extent, and compound 7 had the strongest activity; compound 7 induced the apoptosis of U87MG cell so as to inhibit the proliferation of cancer cells in a time-dependent manner. **CONCLUSIONS** The obtained 16 saponins are all identified as oleanolane-type, among which compound 1 is a new compound. The monodesmosidic saponins, the sugar chain of which attached at C-3 and a free carboxyl at C-28, possess stronger antitumor activity than others.

KEYWORDS *Anemone rivularis* var. *flore-minore*; triterpenoid saponin; identification; antitumor activities; oleanane-type triterpenoid saponins

毛茛科银莲花属植物在世界范围内分布广泛,我国产52种,其中部分品种已作药用,如两头尖(多被银莲花的根茎)、蜈蚣三七(林荫银莲花的根茎)、九节菖蒲(阿尔泰银莲花的根茎)等^[1-2]。小花草玉梅 *Anemone rivularis* var. *flore-minore* 属于银莲花属传统药用植物,分布于山西、河北、陕西、内蒙古、甘肃、四川等地,据《全国中草药汇编》记载,该植物的根或全草药用名称为“破牛膝”,用于肝炎、阴疽、痈肿作痛等症^[3]。研究表明,银莲花属植物富含五环三萜类皂苷成分,是发挥药效的主要活性成分^[4-5]。本课题组前期已对包括小花草玉梅在内的多种银莲花属植物进行了化学成分的分离鉴定及其活性研究,得到大量三萜皂苷类化合物,其中部分有显著抗肿瘤药理活性^[6-14]。为进一步探索本属植物抗肿瘤活性成分,本研究以小花草玉梅的根茎为研究对象,进一步开展系统研究,对其70%乙醇提取物正丁醇萃取部位进行分离、纯化,根据化合物波谱数据和理化性质鉴定其化学结构,得到16个三萜皂苷类化合物,其中包含1个新化合物(1);同时,采用MTT法检测了上述化合物抑制5种人源肿瘤细胞增殖的活性,并采用流式细胞术评价了化合物7对人脑星形胶质母细胞瘤U87MG细胞的促凋亡作用,为进一步阐明本属植物抗肿瘤活性的物质基础及后续相关研究提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器与色谱柱

本研究所用主要仪器包括Perkin-Elmer 341型旋光仪(美国Perkin-Elmer公司), Bruker AVANCE-500型核磁共振(NMR)仪(瑞士Bruker公司), Micromass Quattro型质谱仪(美国Waters公司), Finnigan Voyager型气相色谱仪(美国Finnigan公司), Dionex P680型液相色谱仪(美国Dionex公司), SW-CJ-1D型超净工作台(苏州净化设备有限公司), M680型酶标仪(美国Bio-Rad公司), Avanti J30型低温高速离心机(美国Beckman公司), FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司)。L-Chirasil-Val气相色谱柱(25 m \times 0.32 mm, 0.25 μ m)购自美国Agilent公司, YMC-Pack R&D ODS-A制备型液相色谱柱(20 mm \times 250 mm, 5 μ m)购自日本YMC公司。

1.2 主要药品与试剂

小花草玉梅药材采自秦岭山脉的陕西太白县太白

山区域,经陕西中医药大学药学院王继涛教授鉴定为毛茛科银莲花属植物小花草玉梅 *A. rivularis* var. *flore-minore*, 标本存于陕西中医药大学药学院中药标本室。正相柱色谱硅胶(规格100~140目、200~300目)购自青岛海洋化工厂;反相ODS-A硅胶(规格50 μ m)购自日本YMC公司;Sephadex LH-20凝胶(规格40~70 mm)购自瑞典GE公司;胰蛋白酶(批号1930154)、胎牛血清(批号1814986)均购自美国Gibco公司;DMEM培养基(批号AD21573271)购自美国Hyclone公司;二甲基亚砜(DMSO,批号RNBC1433,纯度99.7%)、L-半胱氨酸甲酯盐酸盐(批号410209,纯度98%)、N-(三甲基硅基)咪唑(批号394847,供气相色谱衍生用)、MTT试剂(批号M2128,纯度98%)、多柔比星(批号D1515,纯度98%)、尼莫司汀(批号L5918,纯度98%)均购自美国Sigma公司;Annexin V-FITC/PI试剂盒(批号7312394)购自美国BD公司;色谱纯甲醇购自天津市科密欧化学试剂有限公司,其他分析纯试剂均购自天津市富宇精细化工有限公司,水为纯净水。

1.3 细胞株

本研究所用人急性早幼粒白血病HL-60细胞、人肺癌A549细胞、人肝癌HepG2细胞、人宫颈癌HeLa细胞和人脑星形胶质母细胞瘤U87MG细胞均购自中国科学院上海细胞保存库。

2 方法与结果

2.1 提取分离

取小花草玉梅干燥根茎5 kg,打成粗粉,加入5倍量(L/kg)70%乙醇回流提取3次(每次2 h),合并提取液,过滤浓缩得1.1 kg醇提物浸膏。醇提物浸膏用10 L水分散后,加入等体积石油醚(10 L)萃取3次;水层再加入等体积正丁醇(10 L)萃取3次,合并正丁醇层,浓缩得正丁醇部位浸膏230 g。取正丁醇浸膏120 g,采用正相硅胶柱色谱进行粗分离,用三氯甲烷-甲醇-水(10:1:0.04 \rightarrow 6:4:0.7)进行梯度洗脱,得8个片段Fr.1~Fr.8。

Fr.1~Fr.5采用正相硅胶柱色谱分离,用三氯甲烷-甲醇-水(8:2:0.05 \rightarrow 6:4:0.7)进行梯度洗脱,分别得亚片段Fr.1.1~Fr.1.3、Fr.2.1~Fr.2.3、Fr.3.1~Fr.3.6、Fr.4.1~Fr.4.3和Fr.5.1~Fr.5.6。所有亚片段均经Sephadex LH-20凝胶柱色谱除杂,再采用半制备高效液相色谱纯化得到

以下化合物:化合物2[24 mg,流动相为甲醇-水(89:11, *V/V*),Fr.1.2]、化合物3[22 mg,流动相为甲醇-水(88:12, *V/V*),Fr.2.2]、化合物4[22 mg,流动相为甲醇-水(85:15, *V/V*),Fr.2.3]、化合物5[24 mg,流动相为甲醇-水(75:25, *V/V*),Fr.3.1]、化合物6[31 mg,流动相为甲醇-水(80:20, *V/V*),Fr.3.4]、化合物7[33 mg,流动相为甲醇-水(77:23, *V/V*),Fr.3.6]、化合物8[33 mg,流动相为甲醇-水(77:23, *V/V*),Fr.4.3]、化合物9[25 mg,流动相为甲醇-水(80:20, *V/V*),Fr.5.1]、化合物10[20 mg,流动相为甲醇-水(70:30, *V/V*),Fr.5.5]、化合物11[17 mg,流动相为甲醇-水(68:32, *V/V*),Fr.5.6]。

Fr.6~Fr.8采用反相ODS柱色谱进行分离,用甲醇-水(3:7→9:1)进行梯度洗脱,分别得亚片段Fr.6.1~Fr.6.5、Fr.7.1~Fr.7.6和Fr.8.1~Fr.8.5。其中Fr.6.1、Fr.7.6、Fr.8.2和Fr.8.3再次经反相ODS柱色谱分离,用甲醇-水(4:6→9:1)进行梯度洗脱,获得Fr.6.1.1~Fr.6.1.3、Fr.7.6.1~Fr.7.6.6、Fr.8.2.1~Fr.8.2.3和Fr.8.3.1~Fr.8.3.4,采用半制备高效液相色谱纯化得到以下化合物:化合物12[15 mg,流动相为甲醇-水(72:28, *V/V*),Fr.6.1.2]、化合物13[56 mg,流动相为甲醇-水(72:28, *V/V*),Fr.6.1.2]、化合物1[35 mg,流动相为甲醇-水(75:25, *V/V*),Fr.6.2]、化合物14[15 mg,流动相为甲醇-水(70:30, *V/V*),Fr.7.6.1]、化合物15[15 mg,流动相为甲醇-水(58:42, *V/V*),Fr.8.2.3]、化合物16[12 mg,流动相为甲醇-水(55:45, *V/V*),Fr.8.3.2]。

2.2 酸水解、糖基衍生及气相色谱分析

取待分析化合物5 mg,加入5 mL三氟醋酸溶液(2 mol/L),置于密闭容器中加热8 h(110 °C);反应完毕后放冷至室温,加入20 mL纯净水,用乙酸乙酯等体积萃取3次;水层浓缩蒸干,向残留物加1 mL L-半胱氨酸甲酯盐酸盐的吡啶溶液(2 mg/L),水浴(60 °C)反应1 h,氮气吹干;向残留物加入0.2 mL *N*-(三甲基硅基)咪唑和2 mL吡啶,水浴(60 °C)反应1 h,氮气吹干;残留物用水分散,用环己烷等体积萃取3次,合并萃取液,蒸干即得化合物糖基的三甲基硅醚化衍生物^[15-16]。采用L-Chirasil-Val气相色谱柱进行气相色谱分析,程序升温:初始柱温140 °C,保持5 min后,以2 °C/min的速度加温至180 °C,保持5 min后,以10 °C/min的速度加温至320 °C,保持10 min;检测器温度设定为280 °C;气化温度设定为250 °C;载气为氮气;进样量为1 μL。标准糖采用同样方法进行衍生和分析。根据样品峰面积以及与标准糖保留时间的比对,可确定化合物的糖基比例和种类。

2.3 结构鉴定

根据化合物波谱数据和理化性质鉴定化合物结构,化合物1~16的化学结构见图1。

化合物1:白色无定形粉末。高分辨电喷雾离子质谱(HR-ESI-MS)显示质荷比 *m/z* 实测值为1 213.597 8

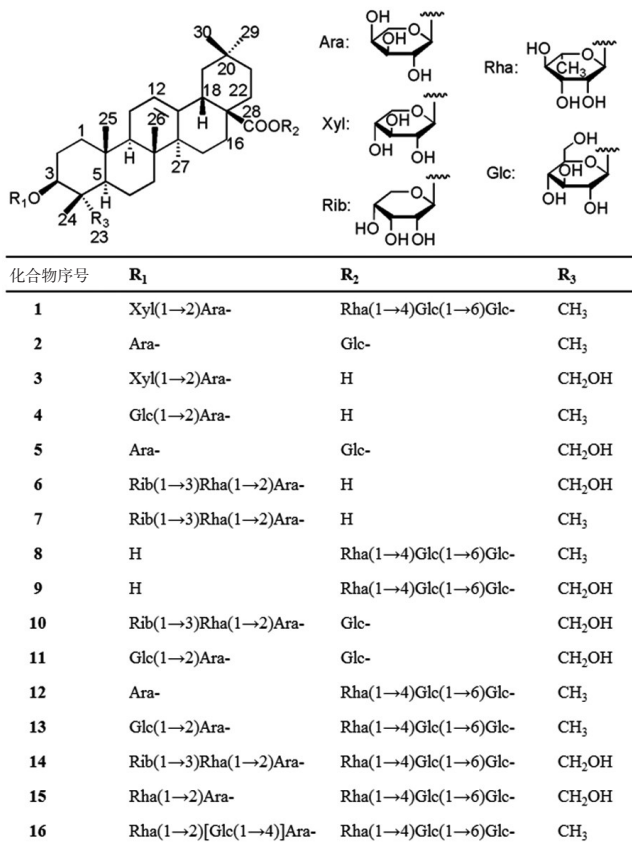


图1 化合物1~16的化学结构

[M+Na]⁺(计算值1 213.598 2, C₅₈H₉₄O₂₅Na),确定化合物1的分子式为C₅₈H₉₄O₂₅。分析¹H-NMR(500 MHz, C₅D₅N)中可观察到7个甲基质子信号:δ_H 0.91(s, 3H), 0.92(s, 6H, 2×CH₃), 1.09(s, 3H), 1.12(s, 3H), 1.26(s, 3H)和1.27(s, 3H); 5个糖端基质子信号:δ_H 4.89(d, *J*=6.3 Hz), 5.00(d, *J*=7.8 Hz), 5.09(d, *J*=7.4 Hz), 5.86(s)和6.25(d, *J*=8.1 Hz); 1个烯氢信号:δ_H 5.43(br s)。结合无畸变极化转移增强碳谱(DEPT, 135°)和碳氢近程相关谱(HSQC),在¹³C-NMR(125 MHz, C₅D₅N)中可观察到7个甲基碳信号:δ_C 15.5, 16.3, 17.4, 23.6, 25.9, 27.8和33.0; 5个糖端基碳信号:δ_C 95.5, 102.6, 104.7, 105.0和106.6; 2个烯碳信号:δ_C 122.7和144.0;在低场区存在1个羰基碳信号:δ_C 176.4。以上均为齐墩果烷型三萜皂苷特征波谱信号,通过对比文献波谱数据^[17-18],确定化合物1的苷元为齐墩果酸;综合分析2D-NMR,包括同核质子相关谱(¹H-¹H COSY)、碳氢远程相关谱(HMBC)、HSQC、氢氢空间相关谱(NOESY)和氢氢全相关谱(TOCSY)对苷元碳氢信号进行了全归属(表1)。根据δ_C 88.8(C-3)和δ_C 176.4(C-28),可知化合物1为在C-3和C-28位均连有寡糖基单元的双糖链皂苷。

按照“2.2”项下所述方法,对化合物1进行酸水解,并制备糖基的三甲基硅醚化衍生物,进行气相色谱分析,与标准糖进行对比。结果表明,化合物1中含有4种糖基单元,分别为2种五碳糖:L-吡喃阿拉伯糖(Ara)和

表1 化合物1的¹H-NMR(500 MHz, C₅D₅N)和¹³C-NMR(125 MHz, C₅D₅N)数据

C	δ _c	δ _H mult.(J/Hz)	C	δ _c	δ _H mult.(J/Hz)
1	38.7	0.92, 1.52 m	2	81.4	4.56 m
2	26.5	1.87, 2.13 m	3	73.7	4.15 m
3	88.8	3.28 dd(4.2, 11.6)	4	68.5	4.36 m
4	39.5	-	5	65.2	3.80, 4.31 m
5	55.8	0.78 d(11.4)	Xyl		
6	18.4	1.32, 1.48 m	1	106.6	5.09 d(7.4)
7	33.0	1.11, 1.33 m	2	76.0	4.11 m
8	39.8	-	3	78.2	4.12 m
9	47.9	1.64 m	4	70.9	4.22 m
10	36.9	-	5	67.3	3.60, 4.34 m
11	23.7	1.92, 2.08 m	28-O-sugar		
12	122.7	5.43 br s	Glc I		
13	144.0	-	1	95.5	6.25 d(8.1)
14	42.0	-	2	73.7	4.14 m
15	28.1	1.21, 2.32 m	3	78.6	4.23 m
16	23.2	1.91, 2.08 m	4	70.7	4.34 m
17	46.9	-	5	78.0	4.12 m
18	41.5	3.20 dd(4.0, 13.6)	6	69.0	4.63, 4.31 m
19	46.1	1.25, 1.75 m	Glc II		
20	30.6	-	1	104.7	5.00 d(7.8)
21	33.9	1.11, 1.32 m	2	75.2	3.95 m
22	32.4	1.75, 1.85 m	3	76.5	4.11 m
23	27.8	1.27 s	4	78.2	4.42 m
24	16.3	1.09 s	5	77.1	3.67 m
25	15.5	0.92 s	6	61.1	4.22, 4.11 m
26	17.4	1.12 s	Rha		
27	25.9	1.26 s	1	102.6	5.86 s
28	176.4	-	2	72.4	4.69 m
29	33.0	0.92 s	3	72.6	4.57 m
30	23.6	0.91 s	4	73.8	4.34 m
3-O-sugar			5	70.2	4.97 m
Ara			6	18.5	1.71 d(6.2)
1	105.0	4.89 d(6.3)			

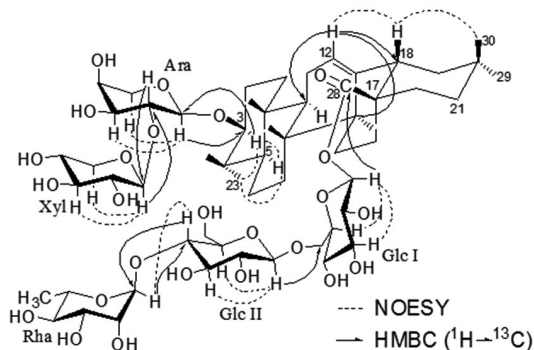


图2 化合物1的主要NOESY及HMBC相关信号

化合物2:白色无定形粉末。电喷雾离子化质谱(ESI-MS)显示 m/z 749 $[M-H]^-$, 综合其1D-NMR数据分析, 推测其分子式为 $C_{41}H_{66}O_{12}$ 。¹H-NMR(500 MHz, C₅D₅N)显示7个甲基质子信号: δ_H 0.86, 0.88, 0.90, 0.94, 1.11, 1.24, 1.25(each 3H, s, CH₃); 2个糖端基质子信号: δ_H 4.75(1H, d, $J=7.1$ Hz, Ara H-1)和6.31(1H, d, $J=8.1$ Hz, Glc H-1); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.19(1H, dd, $J=3.6, 13.9$ Hz, H-3), 3.32(1H, dd, $J=4.3, 11.8$ Hz, H-18), 5.42(1H, br s, H-12)。¹³C-NMR(125 MHz, C₅D₅N)中 δ_c: 38.7(C-1), 26.0(C-2), 88.6(C-3), 39.4(C-4), 55.8(C-5), 18.5(C-6), 33.1(C-7), 39.8(C-8), 48.0(C-9), 36.9(C-10), 23.7(C-11), 122.9(C-12), 144.1(C-13), 42.1(C-14), 28.1(C-15), 23.3(C-16), 46.9(C-17), 41.7(C-18), 46.2(C-19), 30.7(C-20), 33.9(C-21), 32.5(C-22), 28.1(C-23), 16.9(C-24), 15.5(C-25), 17.4(C-26), 26.0(C-27), 176.4(C-28), 33.3(C-29), 23.6(C-30), Ara C-1~C-5(107.5, 72.9, 74.6, 69.5, 66.8), Glc C-1~C-6(95.7, 74.1, 78.9, 71.1, 79.3, 62.1)。对比参考文献波谱数据^[19], 鉴定该化合物为3β-O-α-L-吡喃阿拉伯糖-齐墩果酸-28-O-β-D-吡喃葡萄糖酯苷。

化合物3:白色无定形粉末。ESI-MS显示 m/z 759 $[M+Na]^+$, 综合其1D-NMR数据分析, 推测其分子式为 $C_{40}H_{64}O_{12}$ 。¹H-NMR(500 MHz, C₅D₅N)显示6个甲基质子信号: δ_H 0.93, 0.95, 0.96, 1.04, 1.07, 1.23(each 3H, s, CH₃); 2个糖端基质子信号: δ_H 5.09(1H, d, $J=7.4$ Hz, Xyl H-1)和5.11(1H, d, $J=6.3$ Hz, Ara H-1); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.30(1H, dd, $J=3.3, 13.6$ Hz, H-18), 5.48(1H, br s, H-12)。¹³C-NMR(125 MHz, C₅D₅N)中 δ_c: 39.2(C-1), 26.2(C-2), 81.3(C-3), 43.6(C-4), 47.7(C-5), 18.5(C-6), 32.8(C-7), 39.7(C-8), 48.1(C-9), 36.9(C-10), 23.8(C-11), 122.6(C-12), 144.8(C-13), 42.1(C-14), 28.3(C-15), 23.6(C-16), 46.6(C-17), 41.9(C-18), 46.4(C-19), 30.9(C-20), 34.2(C-21), 33.2(C-22), 63.9(C-23), 14.0(C-24), 16.0(C-25), 17.4(C-26), 26.1(C-27), 180.1(C-28), 33.2(C-29), 24.1(C-30), Ara C-1~C-5(104.4, 82.0, 74.0, 68.8, 65.9), Xyl

D-吡喃木糖(Xyl); 1种去氧六碳糖:L-吡喃鼠李糖(Rha); 1种六碳糖:D-吡喃葡萄糖(Glc)。4种糖含量比例为1:1:1:2。综合分析2D-NMR, 进行寡糖基碳氢信号的全归属(表1)。寡糖基与苷元的连接位点和各糖基的连接次序, 由HMBC谱确定(图2)。根据Xyl H-1/Ara C-2和Ara H-1/C-3的HMBC相关信号, 可推断苷元C-3位糖链为Xyl(1→2)Ara-; 根据Rha H-1/Glc II C-4、Glc II H-1/Glc I C-6和Glc I H-1/C-28的HMBC相关信号, 可推断苷元C-28位糖链为Rha(1→4)Glc(1→6)Glc-。通过糖端基氢的耦合常数Ara(6.3 Hz)、Xyl(7.4 Hz)和Glc(7.8和8.1 Hz), 判断其端基相对构型分别为α、β和β; 而Rha端基氢信号为单峰, 可通过其C-3、5位的δ_c值判断其端基相对构型为α。苷元3位C-O键的β构型由NOESY谱图中H-3、H₃-23、H-5的NOESY相关信号推导而来, 化合物1的主要HMBC及NOESY相关信号见图2。基于上述分析和推导, 鉴定化合物1的结构为3β-O-β-D-吡喃木糖-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖-齐墩果酸-28-O-α-L-吡喃鼠李糖-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖-(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖酯苷, 经查询SciFinder数据库, 该化合物为新化合物。

C-1~C-5(106.8, 76.2, 78.3, 71.0, 67.4)。对比参考文献波谱数据^[20], 鉴定该化合物为 saponin B。

化合物 4: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 773 $[M+Na]^+$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{41}H_{66}O_{12}$ 。 1H -NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 7 个甲基质子信号: δ_H 0.81, 0.94, 0.97, 0.99, 1.01, 1.20, 1.26(each 3H, s, CH_3); 2 个糖端基质子信号: δ_H 4.94(1H, d, $J=6.6$ Hz, Ara H-1) 和 5.21(1H, d, $J=7.7$ Hz, Glc H-1); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.19(1H, dd, $J=4.4, 11.7$ Hz, H-3), 3.28(1H, dd, $J=4.0, 13.7$ Hz, H-18), 5.45(1H, br s, H-12)。 ^{13}C -NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 38.8(C-1), 26.6(C-2), 88.8(C-3), 39.5(C-4), 55.8(C-5), 18.4(C-6), 33.1(C-7), 39.7(C-8), 48.0(C-9), 37.0(C-10), 23.7(C-11), 122.5(C-12), 144.8(C-13), 42.1(C-14), 28.3(C-15), 23.7(C-16), 46.7(C-17), 42.0(C-18), 46.5(C-19), 30.9(C-20), 34.2(C-21), 33.2(C-22), 28.2(C-23), 16.7(C-24), 15.4(C-25), 17.4(C-26), 26.1(C-27), 180.2(C-28), 33.3(C-29), 23.7(C-30), Ara C-1~C-5(104.8, 81.0, 73.4, 68.3, 65.7), Glc C-1~C-6(106.0, 76.4, 78.1, 71.5, 78.1, 62.5)。对比参考文献波谱数据^[21], 鉴定该化合物为齐墩果酸-3 β -*O*- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷。

化合物 5: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 765 $[M-H]^-$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{41}H_{66}O_{13}$ 。 1H -NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 6 个甲基质子信号: δ_H 0.86, 0.86, 0.91, 0.94, 1.11, 1.16(each 3H, s, CH_3); 2 个糖端基质子信号: δ_H 4.95(1H, d, $J=7.2$ Hz, Ara H-1) 和 6.32(1H, d, $J=8.1$ Hz, Glc H-1); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.17(1H, dd, $J=4.1, 13.7$ Hz, H-18), 5.41(1H, br s, H-12)。 ^{13}C -NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 38.8(C-1), 26.0(C-2), 81.9(C-3), 43.5(C-4), 47.6(C-5), 18.2(C-6), 32.8(C-7), 39.9(C-8), 48.2(C-9), 36.9(C-10), 23.8(C-11), 122.9(C-12), 144.1(C-13), 42.1(C-14), 28.3(C-15), 23.3(C-16), 47.0(C-17), 41.6(C-18), 46.1(C-19), 30.7(C-20), 33.9(C-21), 32.5(C-22), 64.5(C-23), 13.6(C-24), 16.2(C-25), 17.5(C-26), 26.0(C-27), 176.4(C-28), 33.1(C-29), 23.7(C-30), Ara C-1~C-5(106.7, 73.1, 74.7, 69.6, 67.0), Glc C-1~C-6(95.7, 74.1, 78.9, 71.1, 79.3, 62.1)。对比参考文献波谱数据^[22], 鉴定该化合物为 HN-saponin F。

化合物 6: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 905 $[M+Na]^+$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{46}H_{74}O_{16}$ 。 1H -NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 6 个甲基质子信号: δ_H 0.90, 0.92, 0.97, 1.00, 1.10, 1.23(each 3H, s, CH_3); 3 个糖端基质子信号: δ_H 6.33(1H, br s, Rha H-1), 5.95(1H, d, $J=4.4$ Hz, Rib H-1) 和 5.00(1H, d, $J=6.8$ Hz, Ara H-1); Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.61(3H, d, $J=$

6.1 Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.26(1H, dd, $J=4.1, 13.8$ Hz, H-18), 5.41(1H, br s, H-12)。 ^{13}C -NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 39.0(C-1), 26.4(C-2), 81.3(C-3), 43.6(C-4), 47.7(C-5), 18.1(C-6), 32.8(C-7), 39.8(C-8), 48.2(C-9), 36.8(C-10), 23.7(C-11), 122.6(C-12), 144.7(C-13), 42.1(C-14), 28.3(C-15), 23.6(C-16), 46.6(C-17), 41.9(C-18), 46.4(C-19), 30.9(C-20), 34.2(C-21), 33.2(C-22), 64.0(C-23), 14.1(C-24), 16.0(C-25), 17.4(C-26), 26.1(C-27), 180.1(C-28), 33.2(C-29), 23.7(C-30), Ara C-1~C-5(104.7, 75.3, 75.0, 69.7, 66.3), Rha C-1~C-6(101.1, 72.2, 81.1, 72.4, 69.7, 18.2), Rib C-1~C-5(104.5, 72.8, 70.3, 68.7, 65.3)。对比参考文献波谱数据^[23], 鉴定该化合物为 clematocide S。

化合物 7: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 865 $[M-H]^-$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{46}H_{74}O_{15}$ 。 1H -NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 7 个甲基质子信号: δ_H 0.81, 0.90, 0.94, 0.97, 1.02, 1.10, 1.23(each 3H, s, CH_3); 3 个糖端基质子信号: δ_H 6.31(1H, br s, Rha H-1), 5.92(1H, d, $J=4.6$ Hz, Rib H-1) 和 4.94(1H, d, $J=6.8$ Hz, Ara H-1); Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.61(3H, d, $J=6.1$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.22(1H, dd, $J=4.1, 12.7$ Hz, H-3), 3.28(1H, dd, $J=4.1, 13.9$ Hz, H-18), 5.42(1H, br s, H-12)。 ^{13}C -NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 38.8(C-1), 26.6(C-2), 88.8(C-3), 39.5(C-4), 55.9(C-5), 18.5(C-6), 33.2(C-7), 39.7(C-8), 48.0(C-9), 37.0(C-10), 23.7(C-11), 122.4(C-12), 144.8(C-13), 42.1(C-14), 28.3(C-15), 23.7(C-16), 46.7(C-17), 42.0(C-18), 46.5(C-19), 30.9(C-20), 34.2(C-21), 33.2(C-22), 28.2(C-23), 16.7(C-24), 15.4(C-25), 17.4(C-26), 26.1(C-27), 180.3(C-28), 33.3(C-29), 23.7(C-30), Ara C-1~C-5(105.2, 75.4, 74.7, 69.3, 65.7), Rha C-1~C-6(101.3, 71.9, 81.2, 72.5, 69.6, 18.4), Rib C-1~C-5(104.5, 72.8, 70.2, 68.6, 65.2)。对比参考文献波谱数据^[24], 鉴定该化合物为 prosapogenin CP4。

化合物 8: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 949 $[M+Na]^+$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{48}H_{78}O_{17}$ 。 1H -NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 7 个甲基质子信号: δ_H 0.86, 0.88, 0.91, 1.00, 1.11(each 3H, s, CH_3), 1.21(6H, s, $2\times CH_3$); 3 个糖端基质子信号: δ_H 5.86(1H, br s, Rha H-1), 6.24(1H, d, $J=8.1$ Hz, Glc I H-1) 和 4.68(1H, d, $J=7.9$ Hz, Glc II H-1); Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.69(3H, d, $J=6.2$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.20(1H, dd, $J=3.5, 13.6$ Hz, H-18), 5.42(1H, br s, H-12)。 ^{13}C -NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 39.0(C-1), 28.1(C-2), 78.0(C-3), 39.4(C-4), 55.8(C-5), 18.8(C-6), 33.1(C-7), 39.9(C-8), 48.1(C-9), 37.4(C-10), 23.8

(C-11), 122.9 (C-12), 144.1 (C-13), 42.1 (C-14), 28.3 (C-15), 23.4 (C-16), 47.0 (C-17), 41.7 (C-18), 46.2 (C-19), 30.7 (C-20), 34.0 (C-21), 32.5 (C-22), 28.8 (C-23), 16.5 (C-24), 15.6 (C-25), 17.5 (C-26), 26.1 (C-27), 176.5 (C-28), 33.1 (C-29), 23.7 (C-30), Glc I C-1~C-6(95.7, 73.8, 78.8, 70.8, 78.1, 69.2), Glc II C-1~C-6(104.9, 75.3, 76.5, 78.2, 77.2, 61.3), Rha C-1~C-6(102.7, 72.6, 72.8, 74.0, 70.3, 18.5)。对比参考文献波谱数据^[25], 鉴定该化合物为 *cussonside B*。

化合物 9: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 941 $[M-H]^-$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{48}H_{78}O_{18}$ 。¹H-NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 6 个甲基质子信号: δ_H 0.84, 0.86, 0.99, 1.04, 1.12, 1.15(each 3H, s, CH_3); 3 个糖端基质子信号: δ_H 5.84(1H, br s, Rha H-1), 6.22(1H, d, $J=8.1$ Hz, Glc I H-1) 和 4.97(1H, d, $J=7.8$ Hz, Glc II H-1); Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.67(3H, d, $J=6.2$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.16(1H, dd, $J=4.1, 13.7$ Hz, H-18), 5.41(1H, br s, H-12)。¹³C-NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 38.8 (C-1), 27.7 (C-2), 73.4 (C-3), 42.9(C-4), 48.1(C-5), 18.5(C-6), 32.5(C-7), 39.9 (C-8), 48.5 (C-9), 37.2 (C-10), 23.8 (C-11), 122.9 (C-12), 144.1 (C-13), 42.1 (C-14), 28.3 (C-15), 23.3 (C-16), 47.0 (C-17), 41.7 (C-18), 46.2 (C-19), 30.7 (C-20), 33.9 (C-21), 32.5 (C-22), 67.8 (C-23), 13.1 (C-24), 161.0 (C-25), 17.6 (C-26), 26.0 (C-27), 176.5 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30), Glc I C-1~C-6(95.6, 73.8, 78.7, 70.8, 78.0, 69.2), Glc II C-1~C-6(104.9, 75.3, 76.5, 78.2, 77.1, 61.3), Rha C-1~C-6(102.7, 72.6, 72.7, 74.0, 70.3, 18.6)。对比参考文献波谱数据^[22], 鉴定该化合物为白头翁皂苷 C。

化合物 10: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 1 067 $[M+Na]^+$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{52}H_{84}O_{21}$ 。¹H-NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 6 个甲基质子信号: δ_H 0.86, 0.87, 0.94, 1.10, 1.12, 1.18(each 3H, s, CH_3); 4 个糖端基质子信号: δ_H 6.32(1H, br s, Rha H-1), 6.31(1H, d, $J=8.2$ Hz, Glc H-1), 5.95(1H, d, $J=4.5$ Hz, Rib H-1) 和 5.04(1H, d, $J=6.8$ Hz, AraH-1); Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.53(3H, d, $J=6.2$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.17(1H, dd, $J=4.1, 13.7$ Hz, H-18), 5.40(1H, br s, H-12)。¹³C-NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 39.1 (C-1), 26.2(C-2), 81.2(C-3), 43.6(C-4), 47.7(C-5), 18.2 (C-6), 32.8(C-7), 39.8(C-8), 48.2(C-9), 36.8(C-10), 23.7(C-11), 122.9(C-12), 144.0(C-13), 42.1(C-14), 28.3 (C-15), 23.6 (C-16), 46.6 (C-17), 41.7 (C-18), 46.2 (C-19), 30.8 (C-20), 34.0 (C-21), 32.5 (C-22), 63.9 (C-23), 14.2 (C-24), 16.2 (C-25), 17.5 (C-26), 26.1 (C-27), 176.4 (C-28), 33.2 (C-29), 23.7 (C-30), Ara

C-1~C-5(104.7, 75.4, 75.2, 69.9, 66.3), Rha C-1~C-6(101.3, 72.0, 81.1, 72.8, 69.8, 18.2), Rib C-1~C-5(104.7, 72.8, 70.3, 68.9, 65.3), Glc C-1~C-6(95.7, 74.1, 79.3, 71.1, 78.9, 62.2)。对比参考文献波谱数据^[26], 鉴定该化合物为 *clemastanoside D*。

化合物 11: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 951 $[M+Na]^+$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{47}H_{76}O_{18}$ 。¹H-NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 6 个甲基质子信号: δ_H 0.86, 0.87, 0.94, 1.01, 1.15, 1.18(each 3H, s, CH_3); 3 个糖端基质子信号: δ_H 6.31(1H, $J=8.1$ Hz, 28-O-Glc H-1), 5.16(1H, d, $J=7.6$ Hz, 3-O-Glc H-1) 和 5.15(1H, d, $J=5.8$ Hz, Ara H-1); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.18(1H, dd, $J=4.1, 13.7$ Hz, H-18), 5.42(1H, br s, H-12)。¹³C-NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 38.8 (C-1), 26.1(C-2), 82.1(C-3), 43.5(C-4), 47.0(C-5), 18.3(C-6), 32.6 (C-7), 40.0 (C-8), 48.2 (C-9), 36.9 (C-10), 23.4 (C-11), 122.9 (C-12), 144.2 (C-13), 42.2 (C-14), 28.3 (C-15), 23.4 (C-16), 47.0 (C-17), 41.8 (C-18), 46.2 (C-19), 30.8 (C-20), 34.0 (C-21), 32.5 (C-22), 64.9 (C-23), 13.5 (C-24), 16.2 (C-25), 17.6 (C-26), 26.1 (C-27), 176.5 (C-28), 33.1 (C-29), 23.7 (C-30), Ara C-1~C-5(104.0, 81.4, 73.7, 68.4, 65.1), 3-O-Glc C-1~C-6(106.0, 76.3, 78.4, 71.4, 78.3, 62.6), 28-O-Glc C-1~C-6(95.8, 74.2, 79.0, 71.2, 79.4, 62.3)。对比参考文献波谱数据^[27], 鉴定该化合物为 3β -O- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖-常春藤皂苷元-28-O- β -D-吡喃葡萄糖酯苷。

化合物 12: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 1 081 $[M+Na]^+$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{53}H_{86}O_{21}$ 。¹H-NMR(500 MHz, C_5D_5N) 显示 7 个甲基质子信号: δ_H 0.85, 0.85, 0.86, 0.92, 1.05, 1.20, 1.22(each 3H, s, CH_3); 4 个糖端基质子信号: δ_H 4.73(1H, d, $J=6.9$ Hz, Ara H-1), 5.81(1H, br s, Rha H-1), 6.19(1H, d, $J=8.0$ Hz, Glc I H-1) 和 4.92(1H, d, $J=7.8$ Hz, Glc II H-1); Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.68(3H, d, $J=6.1$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.11(1H, m, H-3), 3.30(1H, dd, $J=3.1, 11.2$ Hz, H-18), 5.38(1H, br s, H-12)。¹³C-NMR(125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 38.7(C-1), 26.4(C-2), 88.6(C-3), 39.4(C-4), 55.7(C-5), 18.4(C-6), 33.0(C-7), 39.8(C-8), 48.0(C-9), 36.9(C-10), 23.7(C-11), 122.8 (C-12), 144.0 (C-13), 42.0 (C-14), 28.1 (C-15), 23.2 (C-16), 46.9 (C-17), 41.5 (C-18), 46.1 (C-19), 30.6 (C-20), 33.9 (C-21), 32.4 (C-22), 28.1 (C-23), 16.8 (C-24), 15.5 (C-25), 17.4 (C-26), 26.0 (C-27), 176.4 (C-28), 33.0(C-29), 23.6(C-30), Ara C-1~C-5(107.4, 72.8, 74.5, 69.4, 66.6), Glc I C-1~C-6(95.5, 73.7, 78.6, 70.7, 77.9, 69.0), Glc II C-1~C-6(104.7, 75.2, 76.4,

78.1, 77.0, 61.1), Rha C-1~C-6 (102.6, 72.4, 72.6, 73.8, 70.2, 18.5)。对比参考文献波谱数据^[28], 鉴定该化合物为刺五加皂苷C3。

化合物 13: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 1 219 $[M-H]^-$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{59}H_{96}O_{26}$ 。¹H-NMR (500 MHz, C_5D_5N) 显示 7 个甲基质子信号: δ_H 0.84, 0.85, 0.85, 1.01, 1.06, 1.18, 1.19 (each 3H, s, CH_3); 5 个糖端基质子信号: δ_H 4.90 (1H, d, $J=6.2$ Hz, Ara H-1), 5.15 (1H, d, $J=7.9$ Hz, 3-*O*-Glc H-1), 5.82 (1H, br s, Rha H-1), 6.21 (1H, d, $J=8.1$ Hz, Glc I H-1) 和 4.92 (1H, d, $J=7.8$ Hz, Glc II H-1); Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.68 (3H, d, $J=6.2$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.15 (1H, m, H-18), 5.38 (1H, br s, H-12)。¹³C-NMR (125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 38.7 (C-1), 26.4 (C-2), 88.7 (C-3), 39.4 (C-4), 55.7 (C-5), 18.5 (C-6), 33.1 (C-7), 39.8 (C-8), 48.0 (C-9), 36.9 (C-10), 23.7 (C-11), 122.8 (C-12), 144.0 (C-13), 42.0 (C-14), 28.1 (C-15), 23.3 (C-16), 47.0 (C-17), 41.6 (C-18), 46.2 (C-19), 30.7 (C-20), 33.9 (C-21), 32.5 (C-22), 28.1 (C-23), 16.8 (C-24), 15.5 (C-25), 17.4 (C-26), 26.0 (C-27), 176.4 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30), Ara C-1~C-5 (104.7, 80.9, 73.4, 68.2, 64.9), 3-*O*-Glc C-1~C-6 (105.9, 76.3, 78.2, 71.5, 78.0, 62.5), Glc I C-1~C-6 (95.6, 73.8, 78.6, 70.8, 78.0, 69.1), Glc II C-1~C-6 (104.8, 75.3, 76.4, 78.2, 77.1, 61.2), Rha C-1~C-6 (102.7, 72.5, 72.7, 73.9, 70.2, 18.5)。对比参考文献波谱数据^[29], 鉴定该化合物为刺五加皂苷A1。

化合物 14: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 1 351 $[M-H]^-$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{64}H_{104}O_{30}$ 。¹H-NMR (500 MHz, C_5D_5N) 显示 6 个甲基质子信号: δ_H 0.83, 0.86, 0.97, 1.02, 1.10, 1.13 (each 3H, s, CH_3); 6 个糖端基质子信号: δ_H 4.94 (1H, d, $J=7.0$ Hz, Ara H-1), 5.95 (1H, d, $J=4.6$ Hz, Rib H-1), 6.31 (1H, s, 3-*O*-Rha H-1), 5.81 (1H, br s, 28-*O*-Rha H-1), 6.21 (1H, d, $J=8.0$ Hz, Glc I H-1) 和 4.97 (1H, d, $J=7.9$ Hz, Glc II H-1); 3-*O*-Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.67 (3H, d, $J=6.2$ Hz); 28-*O*-Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.68 (3H, d, $J=6.1$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.22 (1H, dd, $J=3.8, 13.7$ Hz, H-18), 5.41 (1H, br s, H-12)。¹³C-NMR (125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 39.0 (C-1), 26.2 (C-2), 81.0 (C-3), 43.5 (C-4), 47.7 (C-5), 18.1 (C-6), 32.7 (C-7), 39.9 (C-8), 48.1 (C-9), 36.8 (C-10), 23.8 (C-11), 122.8 (C-12), 144.0 (C-13), 42.1 (C-14), 28.3 (C-15), 23.3 (C-16), 47.1 (C-17), 41.6 (C-18), 46.1 (C-19), 30.7 (C-20), 33.9 (C-21), 32.4 (C-22), 63.9 (C-23), 13.9 (C-24), 16.1 (C-25), 17.5 (C-26), 26.1 (C-27), 176.5 (C-28), 33.2 (C-29), 23.7 (C-30), Ara C-1~C-5 (104.6, 75.3, 75.0, 69.7, 66.4), 3-*O*-Rha C-1~C-6 (101.2, 71.9,

81.1, 72.8, 69.8, 18.4), Rib C-1~C-5 (104.5, 72.4, 69.7, 69.0, 65.1), Glc I C-1~C-6 (95.5, 73.8, 78.7, 70.7, 77.8, 69.1), Glc II C-1~C-6 (104.6, 75.2, 76.5, 78.1, 77.1, 61.2), 28-*O*-Rha C-1~C-6 (102.6, 72.4, 72.5, 73.9, 70.1, 18.3)。对比参考文献波谱数据^[24], 鉴定该化合物为 huzhangoside D。

化合物 15: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 1 219 $[M-H]^-$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{59}H_{96}O_{26}$ 。¹H-NMR (500 MHz, C_5D_5N) 显示 6 个甲基质子信号: δ_H 0.81, 0.85, 0.95, 1.05, 1.12, 1.16 (each 3H, s, CH_3); 5 个糖端基质子信号: δ_H 5.09 (1H, d, $J=6.4$ Hz, Ara H-1), 6.25 (1H, s, 3-*O*-Rha H-1), 5.85 (1H, br s, 28-*O*-Rha H-1), 6.32 (1H, d, $J=8.2$ Hz, Glc I H-1) 和 4.97 (1H, d, $J=7.9$ Hz, Glc II H-1); 3-*O*-Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.62 (3H, d, $J=6.2$ Hz); 28-*O*-Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.69 (3H, d, $J=6.2$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.12 (1H, dd, $J=3.6, 13.7$ Hz, H-18), 5.34 (1H, br s, H-12)。¹³C-NMR (125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 39.1 (C-1), 26.2 (C-2), 81.1 (C-3), 43.5 (C-4), 47.8 (C-5), 18.2 (C-6), 32.7 (C-7), 40.0 (C-8), 48.2 (C-9), 36.8 (C-10), 23.8 (C-11), 122.9 (C-12), 144.1 (C-13), 42.2 (C-14), 28.4 (C-15), 23.3 (C-16), 47.1 (C-17), 41.7 (C-18), 46.1 (C-19), 30.7 (C-20), 33.9 (C-21), 32.5 (C-22), 63.9 (C-23), 13.8 (C-24), 16.2 (C-25), 17.4 (C-26), 26.0 (C-27), 176.5 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30), Ara C-1~C-5 (104.3, 75.6, 74.7, 69.3, 65.7), 3-*O*-Rha C-1~C-6 (101.7, 72.3, 72.5, 74.1, 69.7, 18.5), Glc I C-1~C-6 (95.6, 73.9, 78.7, 70.8, 77.9, 69.2), Glc II C-1~C-6 (104.8, 75.3, 76.5, 78.2, 77.1, 61.2), 28-*O*-Rha C-1~C-6 (102.7, 72.5, 72.7, 74.0, 70.3, 18.5)。对比参考文献波谱数据^[30], 鉴定该化合物为刺楸皂苷B。

化合物 16: 白色无定形粉末。ESI-MS 显示 m/z 1 389 $[M+Na]^+$, 综合其 1D-NMR 数据分析, 推测其分子式为 $C_{65}H_{106}O_{30}$ 。¹H-NMR (500 MHz, C_5D_5N) 显示 7 个甲基质子信号: δ_H 0.87, 1.08, 1.09, 1.15, 1.22 (each 3H, s, CH_3), 0.86 (6H, s, $2 \times CH_3$); 6 个糖端基质子信号: δ_H 4.75 (1H, d, $J=6.2$ Hz, Ara H-1), 5.15 (1H, d, $J=7.9$ Hz, 3-*O*-Glc H-1), 6.17 (1H, s, 3-*O*-Rha H-1), 5.85 (1H, br s, 28-*O*-Rha H-1), 6.28 (1H, d, $J=8.2$ Hz, Glc I H-1), Glc II H-1 (overlapped); 3-*O*-Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.62 (3H, d, $J=6.2$ Hz); 28-*O*-Rha 的甲基质子信号: δ_H 1.66 (3H, d, $J=6.1$ Hz); 苷元部分特征质子信号: δ_H 3.16 (1H, dd, $J=4.0, 11.5$ Hz, H-18), 5.39 (1H, br s, H-12)。¹³C-NMR (125 MHz, C_5D_5N) 中 δ_C : 38.8 (C-1), 26.5 (C-2), 88.6 (C-3), 39.4 (C-4), 55.8 (C-5), 18.5 (C-6), 33.0 (C-7), 39.7 (C-8), 47.9 (C-9), 36.9 (C-10), 23.8 (C-11), 122.8 (C-12), 144.0 (C-13), 42.0 (C-14), 28.1 (C-15), 23.3 (C-16), 47.0 (C-17), 41.5 (C-18), 46.1 (C-19), 30.7

(C-20), 33.9 (C-21), 32.4 (C-22), 28.0 (C-23), 16.9 (C-24), 15.6 (C-25), 17.4 (C-26), 25.9 (C-27), 176.4 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30), Ara C-1~C-5(104.9, 76.3, 74.0, 79.6, 64.5), 3-*O*-Rha C-1~C-6(101.7, 72.3, 72.5, 74.0, 69.8, 18.6), 3-*O*-Glc C-1~C-6(106.4, 75.5, 78.5, 71.2, 78.8, 62.5), Glc I C-1~C-6(95.6, 73.8, 78.7, 70.8, 78.0, 69.2), Glc II C-1~C-6(104.9, 75.3, 76.5, 78.2, 77.1, 61.2), 28-*O*-Rha C-1~C-6(102.7, 72.5, 72.7, 74.0, 70.3, 18.5)。对比参考文献波谱数据^[30], 鉴定该化合物为 hederacolchiside E。

2.4 抗肿瘤活性研究

2.4.1 抑制肿瘤细胞增殖活性 采用MTT法检测所得化合物对HL-60细胞、A549细胞、HepG2细胞、HeLa细胞和U87MG细胞增殖的抑制作用。收集对数生长期的上述细胞, 置于96孔板中, 调整细胞密度至 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个/孔, 每孔200 μL , 加待测化合物(浓度分别为0、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{mol/L}$), 以多柔比星和尼莫司汀为阳性对照, 各浓度设3个复孔, 在培养箱内培养72 h后, 每孔加20 μL MTT试剂染色, 继续培养4 h; 弃上层培养液, 每孔加入150 μL DMSO, 振荡10 min, 在酶标仪490 nm波长下检测吸光度, 计算半数抑制浓度(IC_{50})。结果如表2所示, 化合物3、4、6~9均表现出不同程度的抑制肿瘤细胞增殖活性; 其中化合物7活性最强, 抑制细胞增殖的 IC_{50} 为8.21~16.82 $\mu\text{mol/L}$ 。而其余化合物未显示对测试细胞株有增殖抑制活性。

表2 化合物1~16抑制5种人源肿瘤细胞增殖的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{mol/L}$)

化合物 ^a	HL-60	HepG2	A549	HeLa	U87MG
3	22.32±0.78	31.85±0.96	25.10±1.02	36.98±1.45	24.17±0.87
4	22.43±1.12	25.98±1.02	32.62±1.53	29.62±1.45	19.06±0.65
6	13.87±0.87	17.61±0.32	19.12±0.85	21.04±0.69	19.60±0.69
7	8.21±0.34	10.05±0.46	16.82±0.58	14.22±0.83	8.64±0.21
8	34.57±1.16	55.22±2.14	43.08±1.49	49.51±1.52	64.83±3.22
9	57.20±1.82	84.98±2.59	>100	>100	57.24±2.15
多柔比星	0.35±0.05	0.50±0.04	0.68±0.10	0.66±0.07	-
尼莫司汀	-	-	-	-	0.72±0.03

a: 化合物1、2、5、10~16未显示细胞增殖抑制活性, 略去

2.4.2 流式细胞术检测细胞凋亡 根据抑制肿瘤细胞增殖活性实验结果, 选取化合物7作用于U87MG细胞, 采用Annexin V-FITC/PI试剂盒检测其对U87MG细胞凋亡的影响。细胞生长至对数增殖期, 设2个实验组(24 h组、72 h组)和空白对照组, 去除原培养液, 实验组加入药物浓度为8.6 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液, 空白对照组加入空白培养液, 培养一定时间后, 用胰酶消化吹打为细胞悬液, 调整细胞密度至 5×10^5 个/mL, 取1 mL离心(2 000 r/min, 5 min), PBS洗涤2次, 再离心(2 000 r/min, 5 min), 加入300 μL Binding Buffer重悬; 加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI(碘化丙啶), 混匀, 室温避光培养15 min, 加入

200 μL Binding Buffer, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。试验重复3次。结果显示, 24 h组和72 h组中U87MG细胞产生明显凋亡现象, 24 h组的早期和中晚期凋亡细胞分别占8.0%和21.7%, 72 h组该占比分别为18.7%和39.6%, 呈一定时间依赖趋势。结果见图3。

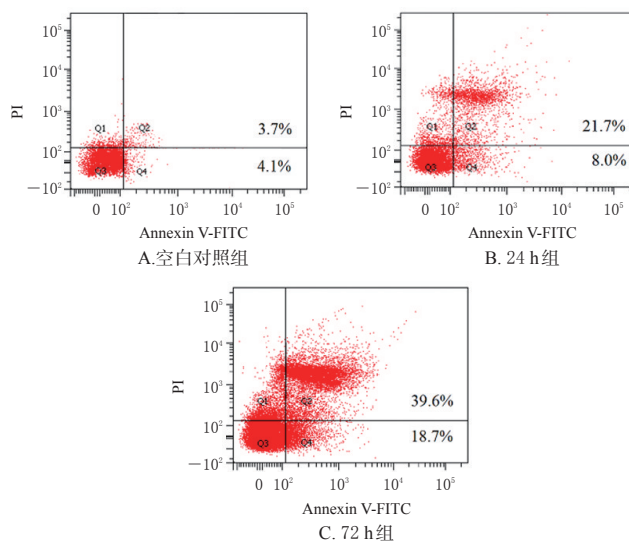


图3 化合物7对U87MG细胞凋亡率的影响

3 讨论

本研究采用多种色谱技术, 从小花草玉梅根茎中分离纯化得到16个化合物, 根据波谱数据和理化性质鉴定了它们的化学结构, 所得化合物均为齐墩果烷型三萜皂苷, 包含2种苷元: 齐墩果酸型皂苷元和常春藤型皂苷元。经系统文献检索, 化合物1为新化合物。通过MTT法检测所得化合物对5种人源肿瘤细胞(HL-60细胞、A549细胞、HepG2细胞、HeLa细胞和U87MG细胞)的增殖抑制活性, 结果显示所有双糖链皂苷均无活性, 且在苷元C-28位连糖基的单糖链皂苷(化合物8、9)活性亦较弱, 提示这类三萜皂苷结构中苷元C-3位连糖基且C-28位为游离羧基是具备活性的必要条件。苷元C-3位糖链存在Rha(1→2)Ara-结构片段的皂苷(化合物6、7)活性较强; 糖链结构相同的皂苷(化合物6、7), 齐墩果酸型皂苷元皂苷活性强于常春藤型皂苷元皂苷, 推测苷元C-23位羟基对活性存在削弱作用。以上结论验证了已报道的有关齐墩果烷型三萜皂苷抗肿瘤的构效关系^[31-33]。此外, 通过流式细胞术Annexin V-FITC/PI双染试验, 发现化合物7能诱导U87MG细胞凋亡, 且呈一定时间依赖趋势, 可以推测其通过促进肿瘤细胞的凋亡来抑制肿瘤细胞生长, 但细胞凋亡机制较为复杂, 需要通过进一步的研究明确该化合物促凋亡的调节因子及相关信号通路。

综上所述, 本研究丰富了银莲花属植物三萜皂苷类活性成分的物质基础, 并为其抗肿瘤活性的进一步开发提供了参考和依据。

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:第十四卷[M].北京:科学出版社,1980:24.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:175.
- [3] 王国强.全国中草药汇编:卷三[M].3版.北京:人民卫生出版社,2014:781.
- [4] 刘雨,刘磊,田从魁,等.银莲花属植物化学成分及药理研究进展[J].中国中药杂志,2019,44(5):912-919.
- [5] HAO D C, GU X J, XIAO P G. *Anemone* medicinal plants: ethnopharmacology, phytochemistry and biology[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(2):146-158.
- [6] 李慧,汤海峰,王啸洋,等.太白银莲花地上部分化学成分的研究[J].中南药学,2015,13(3):263-266.
- [7] 王夏茵,汤海峰,涂宏海,等.打破碗花花根茎化学成分研究[J].中南药学,2015,13(2):128-132.
- [8] WANG Y, KANG W, HONG L J, et al. Triterpenoid saponins from the root of *Anemone tomentosa*[J]. *J Nat Med*, 2013, 67(1):70-77.
- [9] 丁愉,刘丹,赵璠,等.小花草玉梅化学成分研究[J].现代生物医学进展,2011,11(8):1569-1572.
- [10] DING Y, TIAN X R, TANG H F, et al. Two new glycosides from the whole plant of *Anemone rivularis* var. *flore-minore*[J]. *Phytochem Lett*, 2012, 5(3):668-672.
- [11] JI C C, TANG H F, HU Y Y, et al. Saponin 6 derived from *Anemone taipaiensis* induces U87 human malignant glioblastoma cell apoptosis via regulation of Fas and Bcl-2 family proteins[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1):380-386.
- [12] 王元刚,汤海峰,张赟,等.太白银莲花皂苷B对胶质瘤细胞生长抑制的研究[J].现代生物医学进展,2014,14(15):2812-2815.
- [13] WANG X Y, WANG M C, XU M, et al. Cytotoxic oleanane-type triterpenoid saponins from the rhizomes of *Anemone rivularis* var. *flore-minore*[J]. *Molecules*, 2014, 19(2):2121-2134.
- [14] WANG X Y, GAO H, XIE X J, et al. Triterpenoid saponins from *Anemone rivularis* var. *flore-minore* and their anti-proliferative activity on HSC-T6 cells[J]. *Molecules*, 2018, 23(2):E491.
- [15] FU Q, ZAN K, ZHAO M B, et al. Triterpene saponins from *Clematis chinensis* and their potential anti-inflammatory activity[J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(7):1234-1239.
- [16] LI L, GOU M L, HE Y X. Mandshunosides C-E from the roots and rhizomes of *Clematis mandshurica*[J]. *Phytochem Lett*, 2013, 6(4):570-574.
- [17] XU T H, XU Y J, LI H X, et al. Two new triterpenoid saponins from *Pulsatilla cernua* (thunb.) bercht. et opiz[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(6/7/8):705-711.
- [18] SEEBACHER W, SIMIC N, WEIS R, et al. Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives[J]. *Magn Reson Chem*, 2003, 41(8):636-638.
- [19] ALVES DE CARVALHO G J, DE CARVALHO M G, BRAZ-FILHO R. A triterpenoid saponin isolated from *Lafloensia glyptocarpa*[J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(8):1617-1619.
- [20] 何仰清,高黎明,魏小梅,等.八月扎化学成分的研究[J].西北师范大学学报(自然科学版),2004,40(3):38-42.
- [21] 王长福,孙世芹,王有志,等.朝鲜白头翁抗炎有效部位化学成分研究[J].中草药,2013,44(18):2508-2514.
- [22] 廖循,李伯刚,丁立生,等.复伞银莲花中的三萜皂甙[J].有机化学,2001,21(4):299-304.
- [23] 赵美,马宁,海文利,等.粗齿铁线莲的化学成分研究[J].中南药学,2011,9(5):338-342.
- [24] 廖循,李伯刚,王明奎,等.草玉梅中的化学成分[J].高等学校化学学报,2001,22(8):1338-1341.
- [25] 张庆文,叶文才,车镇涛,等.安徽银莲花的化学成分研究[J].中国中药杂志,2001,26(9):612-614.
- [26] YAN L H, XU L Z, LIN J, et al. Triterpenoid saponins from the stems of *Clematis parviloba*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(4):332-338.
- [27] ABDEL KHALIK S M, MIYASE T, EL-ASHAAL H A, et al. Triterpenoid saponins from *Fagonia cretica*[J]. *Phytochemistry*, 2000, 54(8):853-859.
- [28] ZHANG W, WANG X Y, TANG H F, et al. Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* and their cardioprotective activities[J]. *Fitoterapia*, 2013, 84:326-331.
- [29] 廖循,李伯刚,丁立生,等.卵叶银莲花全草中的新三萜皂苷[J].药学学报,2000,35(11):821-825.
- [30] 廖循,陈耀祖,丁立生,等.冻地银莲花的化学成分[J].天然产物研究与开发,1999,11(4):1-6.
- [31] 罗颖颖,严新,谢欣序,等.白头翁总皂苷及其主要成分抗肿瘤药效及其构效关系的研究[J].中国现代中药,2018,20(7):791-796.
- [32] XU K, SHU Z, XU Q M, et al. Cytotoxic activity of *Pulsatilla chinensis* saponins and their structure-activity relationship[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(6):680-686.
- [33] YOKOSUKA A, SANO T, HASHIMOTO K, et al. Triterpene glycosides from the whole plant of *Anemone hupehensis* var. *japonica* and their cytotoxic activity[J]. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 2009, 57(12):1425-1430.

(收稿日期:2021-10-14 修回日期:2022-01-18)

(编辑:曾海蓉)