

手性色谱柱用于天冬中甾体皂苷类似物的分离

高琳^{1,2}, 王贝², 庞旭², 张蒙蒙^{1,2}, 张洁², 陈晓娟², 马百平^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 天冬是一味以甾体皂苷为主要活性成分的常用中药。由于其甾体皂苷同系物及同分异构体的存在, 在采用正相硅胶与反相 ODS 柱色谱相结合的方法进行分离时, 有些同系物无法有效分离。本实验系统地筛选了不同分离机制的色谱柱, 意外地发现纤维素类型的手性色谱柱能够有效分离这些成分, 并应用该类型色谱柱对 3 个混合物进行分离, 得到 6 个单体化合物 (1~6)。结构鉴定结果显示, 这些较难分离的同系物在结构上的共同差异仅在于 C-3 位糖链中一个末端糖基的不同 (木糖或鼠李糖), 并且分离得到的化合物 4、6 为两个新甾体皂苷。由于在分离纯化天然产物时被分离化合物的结构未知, 很少使用手性色谱柱进行分离。该研究提示对于常规难以分离的天然产物, 手性色谱柱也是一个重要选择。

关键词: 天冬; 甾体皂苷; 分离; 手性色谱柱

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)06-1245-06

Chiral column for separation of steroidal saponin analogs in *Asparagus cochinchinensis*

GAO Lin^{1,2}, WANG Bei², PANG Xu², ZHANG Meng-meng^{1,2}, ZHANG Jie²,
CHEN Xiao-juan², MA Bai-ping^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: *Asparagus cochinchinensis* is a commonly used traditional Chinese medicine with steroidal saponins as its main active ingredients. Due to the structural similarity and size of the steroidal saponins, these compounds cannot always be effectively separated by a combination of normal phase silica gel column chromatography and reversed phase ODS column chromatography. In this experiment, chromatographic columns with different separation mechanisms were systematically screened, and it was found that a chiral chromatographic cellulose column could effectively separate these components. This column was used to separate 3 mixtures to obtain 6 single compounds (1–6). Structural identification showed that the singular structural difference between these poorly separated components resides in a terminal glycosyl group (xylose or rhamnose) in the C-3 glycosyl chain, and compounds 4 and 6 are two new steroidal saponins. Since the structures of compounds are often unknown during the isolation and purification of natural products, chiral columns are rarely used. This study suggests that chiral chromatographic columns are a valuable option for natural products that are difficult to separate by conventional means.

Key words: *Asparagus cochinchinensis*; steroidal saponin; separation; chiral chromatographic column

中药活性成分是新药研究开发的重要源泉。中药的化学成分比较复杂, 含有多种结构类型, 理化性

质差异大, 又含有大量同系物和同分异构体, 这使得在分离纯化时存在很大困难。如何有效提取分离并得到中药中具有活性的单体化合物是当前中药研究的一项重要内容。中药天冬为百合科 (Liliaceae) 植物天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的干燥块根, 为

收稿日期: 2020-01-14; 修回日期: 2020-02-20.

*通讯作者 Tel: 86-10-66930265, E-mail: mabaiping@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0043

中医临床常用中药,具有降血糖^[1]、抗炎^[2]、抗衰老^[3]及抗肿瘤^[4]等多种药理作用。本课题组查阅以往相关文献并利用液质联用技术对天冬的化学成分进行分析,发现目前天冬化学成分研究尚不充分。甾体皂苷是天冬中主要活性成分,因同分异构体和结构近似同系物的存在,其分离纯化仍有较大的难度,很大程度上制约了天冬的质量标准及药效物质基础研究。因此对天冬中甾体皂苷类化合物进行深入研究十分必要。

甾体皂苷是一类由螺甾/呋甾烷类母核与糖链连接而成的糖苷类化合物,在植物中分布广泛^[5]。随着分离技术与方法的发展,甾体皂苷化学发展迅速,但由于其结构复杂性,系统的有效分离仍是一项挑战。甾体皂苷类化合物分离纯化的常规方法包括溶剂萃取法、重结晶及色谱分离法等。其中色谱分离法包括以硅胶柱色谱为主的正相色谱、以ODS柱色谱为代表的反相色谱、大孔吸附树脂柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱以及制备薄层色谱法等。对于甾体皂苷类化合物的分离纯化,正相与反相柱色谱相结合的分段应用最为广泛。分离过程中可先根据目标化合物的性质,选择合适的溶剂进行提取,再选择溶剂依次用溶剂萃取法或大孔吸附树脂柱进行粗分。然后根据目标组分的极性,依次进行硅胶柱色谱、开放ODS柱色谱以及高压制备液相色谱分离,直至得到单体化合物。如上所述,由于在分离过程中化合物的具体结构未知,难以从理论上选择相应色谱柱进行分离,一般是经验性的依据组分的理化性质选择分离方法,很少使用手性色谱柱分离。

本实验在系统分离天冬中甾体皂苷类成分时,发现有3个混合物始终无法使用上述方法得到有效分离。针对这些混合物,本实验系统地筛选了不同分离机制的色谱柱,最终利用纤维素类型的手性色谱柱对其有效分离,得到6个单体化合物(1~6),结构见图1。结构鉴定显示,化合物4和6为新的甾体皂苷,化合物3为首次从天冬中分离得到的甾体皂苷。本文主要介绍化合物1~6的分离纯化及新化合物的结构鉴定过程。

结果与讨论

天冬药材经60%乙醇回流提取,减压浓缩后得总提物。总提物经AB-8大孔吸附树脂柱分离,依次用水、10%乙醇、45%乙醇、70%乙醇和90%乙醇进行梯度洗脱,得到5个部分。其中45%乙醇洗脱部分经MCI和硅胶柱色谱以及C₁₈高效液相制备分离,得到3个难以有效分离的混合物M1、M2和M3,质谱信息提示三者均为由2个相差14 Da的化合物组成的混合物。

本研究首先考察不同型号、规格的C₁₈色谱柱对M1的分离效果。3种C₁₈色谱柱对M1均有一定的分离,但无法达到基线分离的效果。理论上讲,使用填料粒径更细的色谱柱分离效果会更好。但对于M1来说,在填料粒径为2.6 μm的C₁₈色谱柱上,当保留时间已经到了60 min的条件下仍无法达到较好的分离,这提示M1中的2个成分很难应用C₁₈色谱柱达到理想的分离效果。

在C₁₈色谱柱难以有效分离M1的情况下,尝试使用正相分离机制的酰胺类型色谱柱对M1进行分离。酰胺类型色谱柱XAmide(4.6 mm×250 mm, 5 μm)为中性酰胺键合相类型色谱柱,使用高比例乙腈-水做流动相对强极性化合物应有较好的分离效果。在此色谱柱基础上通过变换流动相体系、调整流动相比例进行分离条件优化,但该色谱柱仍未能有效分离M1,如图2A所示。另一个酰胺类型的色谱柱DCpak®PTZ(4.6 mm×150 mm, 3 μm),它以Poly N-(1H-tetrazole-5-yl)-methacrylamide作为选择剂,具有较强的保留性和分离选择性,适用于高亲水性化合物的分离。用此色谱柱进行条件优化时发现其对M1也无分离趋势,如图2B所示。

鉴于以上情况,本实验尝试通过筛选手性色谱柱来优化M1的分离条件。手性色谱柱包括多糖衍生物类键合型手性色谱柱和涂敷型反手性色谱柱。在筛选了15种不同的手性色谱柱后,发现纤维素类型的手性色谱柱CHIRALPAK® IC(4.6 mm×250 mm, 5 μm)以

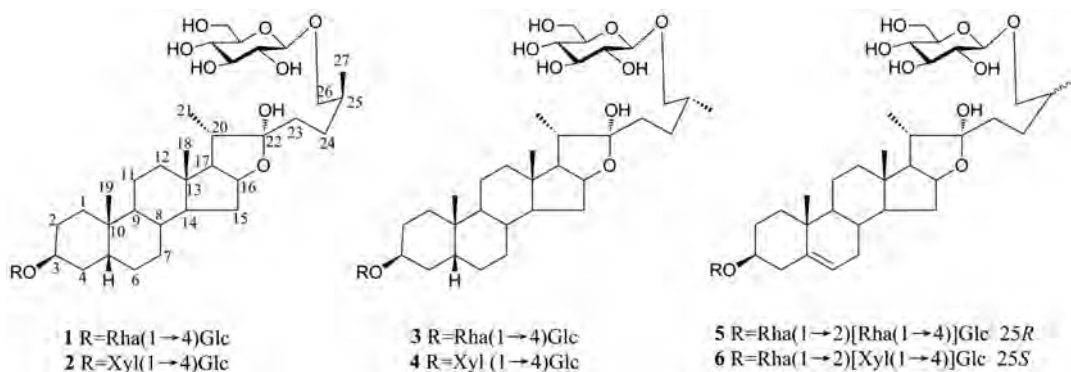


Figure 1 Structures of compounds 1–6

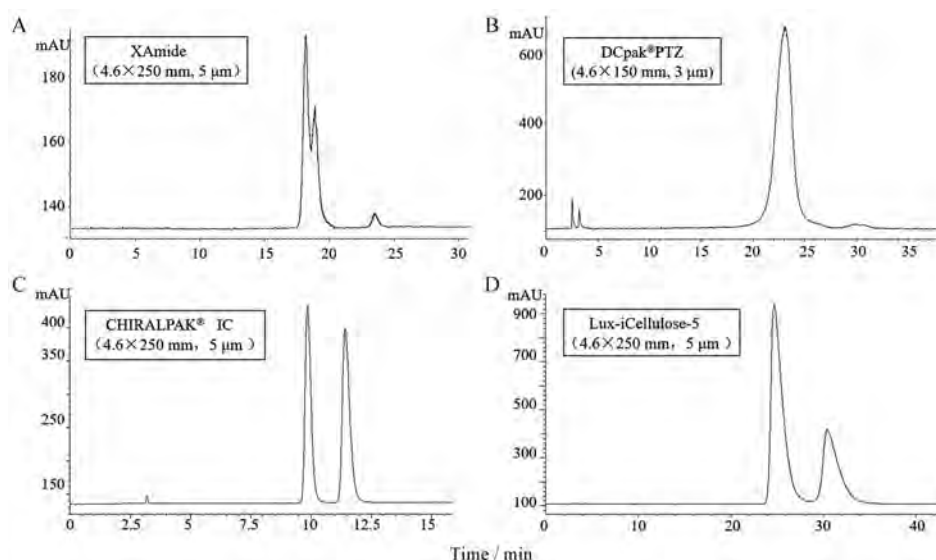


Figure 2 Column screening process of M1 and corresponding HPLC chromatograms

25% 乙腈作为流动相时, 可有效分离 M1, 如图 2C 所示。纤维素类型手性色谱柱 Lux-i-Cellulose-5 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 同样具有良好的分离效果, 如图 2D 所示。

应用上述分离过程对 M2 和 M3 的分离条件进行了优化, 发现纤维素类型的手性色谱柱也可实现它们的有效分离。综上, 对于 M1、M2、M3 的分离, 本实验首先选用不同规格的 C₁₈ 色谱柱进行条件优化, 在 C₁₈ 无法有效分离的情况下, 使用了类似正相分离机制色谱柱也无法有效分离。于是筛选了一系列手性色谱柱, 并优化了流动相的种类和比例条件, 最终使用纤维素类型的手性色谱柱 CHIRALPAK® IC (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 和 Lux-i-Cellulose-5 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 25% 乙腈为流动相, 达到了良好的分离效果。然后利用色谱柱 CHIRALPAK® IC (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 对 M1、M2 和 M3 进行分离制备, 得到 6 个化合物 (1~6), 其中化合物 4 和 6 为两个新的甾体皂苷。通过与文献报道的化合物的核磁数据详细对比, 已知化合物被鉴定为 aspacochioside A (1)^[6]、(2*S*)-26-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-呋甾-3β,22α,5β,26-三醇-3-*O*-β-*D*-吡喃木糖基-(1→4)-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 (2)^[7]、(2*S*)-26-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-呋甾-3β,22α,5β,26-三醇-3-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→4)-*D*-吡喃葡萄糖苷 (3)^[8] 和 protodioscin (5)^[9]。新化合物结构鉴定过程如下:

化合物 4 白色无定形粉末。HR-ESI-MS (negative) 显示 m/z 889.502 4 [M-H]⁻ (Calcd. for C₄₄H₇₃O₁₈, 889.502 8), 推导其分子式为 C₄₄H₇₄O₁₈。HR-ESI-MS (positive) 显示的中性丢失碎片离子峰 m/z 873.7092 [M+H-H₂O]⁺、741.631 9 [M+H-H₂O-132]⁺、579.537 2 [M+H-H₂O-132-162]⁺ 和 417.439 1 [M+H-H₂O-132-

162-162]⁺, 提示该化合物含有 2 个六碳糖和 1 个五碳糖, 酸水解实验可以进一步确认化合物 4 中的六碳糖为 *D*-葡萄糖, 五碳糖为 *D*-木糖。¹H NMR 谱中可见 4 个特征的甾体皂苷甲基氢信号 δ 0.90 (3H, s, CH₃-18)、0.87 (3H, s, CH₃-19)、0.99 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, CH₃-21) 和 1.36 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, CH₃-27) 以及 3 个特征的糖端基氢信号 δ 4.83 (1H, d, *J* = 7.7 Hz)、4.92 (1H, d, *J* = 7.8 Hz) 和 5.17 (1H, d, *J* = 7.7 Hz)。¹³C NMR 谱中共可见 44 个碳信号, 其中 27 个归属于甾体皂苷的苷元, 17 个归属于 3 个糖基。详细对比化合物 4 与 aspacochioside A^[10] 的碳谱数据, 可知二者苷元平面结构相同。¹H NMR 谱中特征的 dd 峰 δ 3.64 (Hb-26) 进一步提示化合物 4 的 C-25 位为 *R* 构型^[11]。C-22 化学位移值 (δ 110.6) 提示 C-22 位上的羟基应为 α 构型 (对于 C-22 上的羟基, 当其为 β 构型时, C-22 化学位移值一般在 114.0 左右)^[12,13]。此外, 根据化合物 4 与 aspacochioside A 苷元完全相同的碳谱数据, 可以确定对于处在刚性环状结构上的 3-OH 和 5-H、18-CH₃ 和 19-CH₃ 均应为 β 构型。从特征的糖端氢信号出发, 通过 ¹H-¹H COSY 相关信号, 进而再结合 HSQC 相关信号, 可以归属化合物 4 结构中的 3 个糖碳氢信号。3 个糖的 *J*_{1,2} 均大于 7 Hz, 提示 3 个糖的苷键构型均为 β。HMBC 谱可见 δ 4.92 (H-1') 与 δ 74.6 (C-3) 相关、δ 5.17 (H-1'') 和 δ 81.0 (C-4') 相关以及 δ 4.83 (H-1''') 与 δ 75.4 (C-26) 相关, 证明了结构中苷化位置在 C-3 和 C-26, 以及 C-3 位糖链的组成和连接顺序 (图 3)。结合 HSQC、HMBC、¹H-¹H COSY 谱分析, 将化合物 4 的核磁数据进行归属 (表 1)。综上所述, 化合物 4 的结构鉴定为 (2*S*)-26-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-5β-呋甾-3β, 22α, 26-三醇-3-*O*-β-*D*-吡喃木糖基-(1→4)-

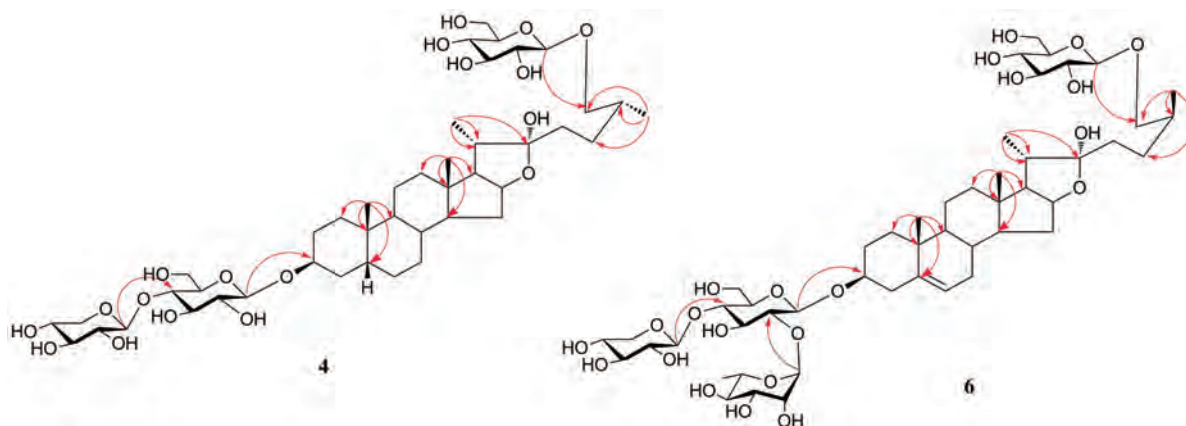


Figure 3 Key HMBC (H→C) correlations of compounds 4 and 6

β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物6 白色无定形粉末。HR-ESI-MS (negative) 显示 m/z 1 033.605 5 $[M-H]^-$ (Calcd. for $C_{50}H_{81}O_{22}$, 1 033.606 0), 推导其分子式为 $C_{50}H_{82}O_{22}$ 。HR-ESI-MS (positive) 显示的中性丢失碎片离子峰 m/z 1 017.793 6 $[M+H-H_2O]^+$ 、855.705 0 $[M+H-H_2O-162]^+$ 、709.604 6 $[M+H-H_2O-162-146]^+$ 、577.525 0 $[M+H-H_2O-162-146-132]^+$ 和 415.426 3 $[M+H-H_2O-162-146-132-162]^+$, 提示化合物6含有2个六碳糖、1个甲基五碳糖和1个五碳糖, 酸水解实验进一步确认上述六碳糖、甲基五碳糖和五碳糖分别为D-葡萄糖、L-鼠李糖和D-木糖。 1H NMR谱可见4个特征的甾体皂苷甲基氢信号 δ 0.90 (3H, s, CH_3 -18)、1.08 (3H, s, CH_3 -19)、1.34 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -21) 和 1.04 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -27) 以及4个糖的端基氢信号 δ 4.95 (1H, d, $J = 7.1$ Hz)、 δ 4.83 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)、 δ 5.56 (1H, s) 和 δ 5.05 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)。 ^{13}C NMR谱中共可见50个碳信号, 其中27个归属于甾体皂苷的苷元, 23个归属于2个葡萄糖、1个鼠李糖和1个木糖。详细比对化合物6与(25S)-26-O- β -D-吡喃葡萄糖基- $\Delta^{5(6)}$ -烯-呋甾-3 β ,22 α ,26-三醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)]- β -D-吡喃葡萄糖苷^[12]的碳谱数据, 可知二者苷元具有相同的平面结构。 1H NMR谱中特征的dd峰 δ 3.51 (Hb-26) 可进一步提示化合物6的C-25构型为S。详细比对化合物6与Ophiopogonin J^[14]核磁数据, 发现二者具有相同的C-3糖基结构。HMBC谱中 δ 4.99 (H-1') 与 δ 78.2 (C-3) 相关、 δ 6.29 (H-1'') 和 δ 77.5 (C-2') 相关、 δ 5.05 (H-1''') 和 δ 81.5 (C-4') 相关以及 δ 4.86 (H-1''') 与 δ 75.4 (C-26) 相关, 可进一步证明结构中苷化位置 (C-3和C-26位) 以及C-3位糖链的组成和连接顺序 (图3)。综合分析HSQC、HMBC、 1H - 1H COSY谱, 对化合物6的结构进行了最终确认, 并对其核磁数

据进行归属 (表1)。综上所述, 化合物6的结构鉴定为(25S)-26-O- β -D-吡喃葡萄糖基- $\Delta^{5(6)}$ -烯-呋甾-3 β ,22 α ,26-三醇-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)-[β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)]- β -D-吡喃葡萄糖苷。

综上, 针对天冬中较难分离的3个混合物M1、M2和M3, 本实验系统筛选了一系列不同分离机制的色谱柱并对其分离条件进行优化, 发现纤维素类型的手性色谱柱CHIRALPAK[®] IC (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 和Lux-i-Cellulose-5 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 在流动相为25%乙腈时可达到较好的分离效果。最终利用CHIRALPAK[®] IC色谱柱对这3个混合物进行分离制备, 得到6个单体化合物。从结构上来看, 每一个混合物中的两个单体化合物在分子量上均相差14 Da ($-CH_2$), 其中一个C-3位糖链末端为木糖, 另一个则为鼠李糖, 但2种糖基的连接位置均相同, 这使得分离难度增加, 又因为其为非手性异构体, 使得研究者们难以想到使用手性色谱柱进行分离。本实验通过色谱柱系统筛选, 意外发现使用纤维素类型手性色谱柱可以有效分离这类混合物, 且具有规律性, 为此类甾体皂苷类似物的分离纯化提供了方法参考。

手性色谱柱往往被用于手性化合物的拆分, 分离度较高, 但在分离天然产物得到单体化合物和鉴定结构之前, 一般不知难以分离的组分是否为对应的手性混合物, 所以很少使用手性色谱柱分离。本实验利用手性色谱柱实现了非手性异构体的有效分离, 使得手性色谱柱不仅仅局限于手性化合物的拆分。这对于天然产物的分离纯化起到一定提示作用。在分离纯化天然产物时, 对于采用常规方法难以分离的化合物, 可尝试使用手性色谱柱进行分离, 可能会有较好的分离效果。

实验部分

ESI-MS用Waters SYNAPT G1 MS质谱仪测定; 核

Table 1 NMR data of **4** and **6** (600 MHz for ^1H NMR, 150 MHz for ^{13}C NMR; pyridine- d_5)

No.	4		No.	6	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)		δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	30.5	1.46 m, 1.70 m	1	37.5	1.69 m, 0.95 m
2	27.0	1.54 m, 1.70 m	2	30.2	2.06 m, 1.69 m
3	74.6	4.25 m	3	78.2	3.98 m
4	30.9	1.88 m, 1.77 m	4	39.0	2.83 m, 2.72 m
5	37.0	1.45 m	5	140.7	
6	27.0	1.89 m, 1.67 m	6	121.9	5.28 br s
7	26.8	1.53 m, 1.28 m	7	31.7	1.51 m
8	35.5	1.48 m	8	32.4	1.82 m
9	40.4	0.95 m	9	50.4	0.86 m
10	35.2		10	37.2	
11	21.2	1.75 m, 1.26 m	11	21.1	1.41 m
12	40.4	1.12 m, 1.24 m	12	39.9	1.09 m, 1.73 m
13	41.2		13	40.7	
14	56.4	1.07 m	14	56.6	1.06 m
15	32.4	2.03 m, 1.38 m	15	32.5	1.44 m
16	81.2	4.98 m	16	81.1	4.98 m
17	64.2	1.95 m	17	63.9	1.94 m
18	16.7	0.90 s	18	16.5	0.90 s
19	23.9	0.87 s	19	19.4	1.08 s
20	40.7	2.22 m	20	40.7	2.21 dq (6.5, 7.5)
21	16.5	0.99 d (6.7)	21	16.5	1.34 d (6.8)
22	110.6		22	110.7	
23	37.1	2.08 m, 1.94 m	23	37.1	2.04 m, 1.95 m
24	28.3	2.07 m, 1.70 m	24	28.3	1.74 m, 2.00 m
25	34.4	1.90 m	25	34.5	1.91 m
26	75.4	3.64 dd (9.6, 6.1), 3.94 overlap	26	75.4	3.51 dd (9.2, 7.1), 4.06 m
27	17.5	1.36 d (7.1)	27	17.5	1.04 d (6.6)
3-O-Glc-1'	103.0	4.92 d (7.8)	3-O-Glc-1'	100.1	4.95 d (7.1)
2'	75.1	5.01 m	2'	77.5	4.25 m
3'	76.5	4.26 m	3'	77.3	4.26 m
4'	81.0	4.26 m	4'	81.5	4.23 m
5'	76.6	4.27 m	5'	76.3	3.86 m
6'	61.9	4.53 m, 4.47 m	6'	61.7	4.54 m, 4.47 m
4'-O-Xyl-1''	105.6	5.17 d (7.7)	2'-O-Rha-1''	102.0	6.29 br s
2''	75.0	4.06 m	2''	72.5	4.77 m
3''	78.5	4.26 m	3''	72.8	4.55 m
4''	70.8	4.19 m	4''	74.2	3.32 t (9.2)
5''	67.4	4.36 m, 4.30 m	5''	69.6	4.78 m
26-O-Glc-1'''	105.0	4.83 d (7.7)	6''	18.7	1.80 d (6.2)
2'''	75.3	4.07 m	4'-O-Xyl-1'''	105.8	5.05 d (7.7)
3'''	78.6	4.13 m	2'''	75.0	4.00 m
4'''	71.7	4.26 m	3'''	78.4	3.89 m
5'''	78.4	3.97 m	4'''	70.8	4.18 m
6'''	62.6	4.58 m, 4.42 m	5'''	67.4	4.30 dd (11.3, 5.3), 3.70 t (10.8)
			26-O-Glc-1''''	105.2	4.83 d (7.8)
			2''''	75.3	4.07 m
			3''''	78.6	4.13 m
			4''''	71.7	4.26 m
			5''''	78.5	3.97 m
			6''''	62.8	4.58 m, 4.42 m

磁用 Bruker AVANCE III 600 型核磁共振仪测定; 分析型液相色谱仪用 Agilent 1100 系统 (配备 Alltech ELSD 检测器) 和 Thermo Vanquish Flex 系统 (配备 CAD 检测器); 制备型液相色谱仪用江苏汉邦科技 NP-7000N 泵配备 Shodex RI-101 示差折光检测器; 分析型色谱柱使 Venusil XBP C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm , Agela

Technologies), Venusil ASB C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm , Agela Technologies), SilGreen HPLC C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm , SilGreen), XAmide (4.6 mm×250 mm, 5 μm , Acchrom), Kinetex EVO C_{18} (2.1 mm×100 mm, 2.6 μm , Phenomenex), Kinetex[®] C_{18} (4.6 mm×150mm, 2.6 μm , Phenomenex), DC pak[®] PTZ (4.6 mm×150 mm,

3 μm , DAICEL), CHIRALPAK[®] IC (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , Daicel), Lux-i-Cellulose-5 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , Phenomenex); 制备型色谱柱使用 Venusil XBP C₁₈ (10 mm \times 250 mm, 5 μm , Agela Technologies), SilGreen HPLC C₁₈ (10 mm \times 250 mm, 5 μm , SilGreen), SilGreen HPLC C₁₈ (20 mm \times 250 mm, 5 μm , SilGreen), 动态轴向液压系统 (DAC-HB150, 江苏汉邦科技有限公司); 可剪裁型硅胶 GF₂₅₄ 薄层色谱板 (天津思利达科技有限公司); 200~300 目柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 日本三菱生产 MCI 树脂; 天津浩聚树脂科技有限公司生产 AB-8 树脂; 日本 YMC 生产柱色谱用 ODS 填料; 所有试剂均为分析纯或色谱纯。

天冬药材购自贵州省黔东南苗族侗族自治州施秉县, 经中国医学科学院药用植物研究所郭宝林研究员鉴定为百合科天门冬属植物天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的块根。

1 提取与分离

天冬药材 100 kg 用 8 倍量 60% 的乙醇加热回流提取 3 次 (每次 1 h), 提取液合并浓缩至无醇味, 离心后将上清液用 AB-8 大孔吸附树脂柱色谱分离, 依次用水、10% 乙醇、45% 乙醇、70% 乙醇和 90% 乙醇进行梯度洗脱。45% 乙醇部位进行 MCI 柱色谱分离 (150 mm 动态轴向压缩系统), 用 25% 乙腈等度洗脱得到 Fr.1~Fr.11, 再用 80% 乙腈洗脱得到 Fr.12。Fr.4、Fr.5 和 Fr.10 分别用直径 150 mm 动态轴向压缩系统进行 C₁₈ 柱色谱分离, 用 23% 乙腈恒定洗脱依次得到组分 Fr.4-1~Fr.4-12、Fr.5-1~Fr.5-11 和 Fr.10-1~Fr.10-8。其中, Fr.10-7 利用硅胶柱色谱, 使用氯仿-甲醇 (4:1、3.5:1、3:1、2:1、1:1) 梯度洗脱, TLC 检查指导合并组分, 得到 Fr.10-7-1~8。Fr.10-7-5 利用反相 C₁₈ 色谱柱分离得到混合物 M1 和 M2。M1 利用手性色谱柱 CHIRALPAK[®] IC (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 经半制备高效液相色谱分离, 得到化合物 **1** (5.3 mg) 和 **2** (12.4 mg)。M2 利用同样方法分离得到化合物 **3** (11.1 mg) 和 **4** (9.8 mg)。Fr.10-5 利用反相 C₁₈ 色谱柱得到混合物 M3, M3 再利用手性柱 CHIRALPAK[®] IC (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 经半制备高效液相色谱分离得到化合物 **5** (9.0 mg) 和 **6** (10.0 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **4** 白色无定形粉末; C₄₄H₇₄O₁₈; [α]_D²⁰ -64.8 (*c* 0.053, CH₃OH); ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz 和 ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, 150 MHz) 数据见表 1; HR-ESI-MS: *m/z* 889.502 4 [M-H]⁻ (Calcd. for C₄₄H₇₃O₁₈, 889.502 8)。

化合物 **6** 白色无定形粉末; C₅₀H₈₂O₂₂; [α]_D²⁰ -27.8 (*c* 0.054, CH₃OH); ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, 150 MHz) 数据见表 1; HR-

ESI-MS (negative): *m/z* 1 033.605 5 [M-H]⁻ (Calcd. for C₅₀H₈₁O₂₂, 1 033.606 0)。

致谢: 感谢大赛璐药物手性技术 (上海) 有限公司在手性色谱柱筛选过程中提供的帮助。

References

- [1] Chen HY, Yang XB, Wang JH, et al. Effects of *Asparagus cochinchinensis* capsule on blood biochemical parameters of alloxan mice [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2005, 12: 22-23.
- [2] Kim HM, Lee EH, Lim TG, et al. Inhibitory effect of *Asparagus cochinchinensis* on tumor necrosis factor-alpha secretion from astrocytes [J]. Int J Immunopharmacol, 1998, 20: 153-162.
- [3] Li M, Fei Y, Wang JP. Studies pharmacologic effects of Radix asparagi [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2005, 16: 580-582.
- [4] Liagre B, Bertrand J, Lger DY, et al. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF-kappa B binding [J]. Int J Mol Med, 2005, 16: 1095-1101.
- [5] Wang YY, Kou YK. Extraction, separation and structure of steroidal saponins [J]. Huazhong Norm Univ J Postgraduates (华中师范大学研究生学报), 2007, 14: 143-147.
- [6] Yang YC, Huang SY, Shi JG, et al. Two new furostanol glycosides from *Asparagus cochinchinensis* [J]. Chin Chem Lett, 2002, 13: 1185-1188.
- [7] Tenji K, Junzo S. Studies on the constituents of Asparagi Radix. I. on the structures of furostanol oligosides of *Asparagus cochinchinensis* (Loureio) Merrill [J]. Chem Pharm Bull, 1979, 27: 3086-3094.
- [8] Dawid C, Hofmann T. Structure of sensory characterization of bitter tasting steroidal saponins from asparagus spears (*Asparagus officinalis* L.) [J]. Agric Food Chem, 2012, 60: 11889-11900.
- [9] Hu K, Dong AJ, Yao XS, et al. A furostanol glycoside from rhizomes of *Dioscorea colletii* var. *hypoglaucua* [J]. Phytochemistry, 1997, 44: 1339-1342.
- [10] Shi JG, Li GQ, Huang SY, et al. Furostanol oligoglycosides from *Asparagus cochinchinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2004, 6: 99-105.
- [11] Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. Phytochemistry, 1992, 31: 3307-3330.
- [12] Zou K, Wang JZ, Du M, et al. A pair of diastereoisomeric steroidal saponins from cytotoxic extracts of *Tupistra chinensis* Rhizomes [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54: 1440-1442.
- [13] Dini I, Tenore GC, Trimarco E, et al. Furostanol saponins in *Allium caepa* L. var. *tropeana* seeds [J]. Food Chem, 2005, 93: 205-214.
- [14] Zhang T, Kang LP, Yu HS, et al. Steroidal saponins from the tuber of *Ophiopogon japonicus* [J]. Steroids, 2012, 77: 1298-1305.