

绞股蓝中4个新达玛烷型三萜皂苷的分离鉴定

杨光^{1,2}, 梁海珍², 张洁², 陈晓娟², 郭宝林³, 马百平^{1,2*}

(1. 广东药科大学, 广东广州 510006; 2. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850;
3. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 本文对广西产绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino] 中达玛烷型三萜皂苷成分进行研究, 综合使用 D101 大孔吸附树脂、硅胶和 C18 柱色谱以及制备型高效液相色谱等分离手段, 从中分离得到 4 个达玛烷型三萜皂苷类化合物, 利用 MS、NMR 和圆二色谱 (CD) 等波谱技术鉴定其结构, 分别为 3 β ,12 β -二羟基-25-过氧氢基达玛烷-20,23-二烯-3-*O*-[β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -D-吡喃葡萄糖苷 (1)、3 β ,12 β ,24*S*-三羟基达玛烷-20,25-二烯-3-*O*-[β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -D-吡喃葡萄糖苷 (2)、3 β ,20 α -二羟基-24-烯-12 β ,22*S*-环氧达玛烷-3-*O*-[β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -D-吡喃葡萄糖苷 (3)、3 β ,12 β ,20*S*-三羟基达玛烷-24-烯-3-*O*-[6-*O*-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -D-吡喃葡萄糖基]-20-*O*- β -D-吡喃木糖基(1 \rightarrow 3)- α -L-吡喃鼠李糖基(1 \rightarrow 6)]- β -D-吡喃葡萄糖苷 (4)。化合物 1~4 均为新化合物。

关键词: 葫芦科; 绞股蓝; 三萜皂苷; 分离; 结构鉴定

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)08-2288-07

Four new dammarane-type triterpenoid saponins from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino

YANG Guang^{1,2}, LIANG Hai-zhen², ZHANG Jie², CHEN Xiao-juan²,
GUO Bao-lin³, MA Bai-ping^{1,2*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: Damarane-type triterpene saponins are the main active ingredients in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino. By using D101 macroporous adsorption resin and silica gel open-columns, C18 medium-pressure column chromatography, and preparative high performance liquid chromatography, we isolated four compounds from the leaves of *G. pentaphyllum* planted in Guangxi Zhuang Autonomous Region. Their structures were determined by comprehensive analyses of MS, NMR data and circular dichroism spectroscopy and identified as (3 β ,12 β)-dihydroxy-25-peroxyhydrodammarane-20,23-diene-3-*O*-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (1), (3 β ,12 β ,24*S*)-trihydroxydammarane-20,25-diene-3-*O*-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (2), (3 β ,20 α)-dihydroxy-24-en-12 β ,22*S*-epoxydammarane-3-*O*-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (3), (3 β ,12 β ,20*S*)-trihydroxydammarane-24-en-3-*O*-[6-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl]-20-*O*- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranoside (4). Compounds 1-4 are new dammarane-type triterpene saponins.

Key words: Cucurbitaceae; *Gynostemma pentaphyllum*; triterpenoid saponin; isolation; structural elucidation

收稿日期: 2024-02-05; 修回日期: 2024-04-30.

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0119

绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino] 又名天堂草、小苦药等, 是葫芦科 (Cucurbitaceae) 绞股蓝属 (*Gynostemma* Blume) 草质攀援植物, 多生长于疏林、草丛及灌丛地区等阴湿温和的气候环境中。在我国广泛分布于陕西南部 and 长江以南等地区。绞股蓝属植物是我国重要的植物资源, 其应用历史最早可追溯至春秋战国时期^[1]。目前, 在国内应用最广泛的是来自秦巴山区的药用长梗绞股蓝 (*G. longipes* C.Y.Wu)^[2] 以及来自福建、广西、云南等地的茶用的绞股蓝。绞股蓝中的达玛烷型三萜皂苷又被称为绞股蓝皂苷, 是其主要化学成分, 是绞股蓝发挥药理作用的主要物质基础。目前已从绞股蓝属植物中分离得到 445 种达玛烷型三萜皂苷^[2-14], 其化学结构具有多样性。此外, 现代药理研究表明, 绞股蓝具有降血糖、降血脂、抗衰老、抗疲劳等作用^[14-17]。绞股蓝皂苷具有较广的应用领域和重要使用价值。

本课题组前期已对陕西、福建、云南、广西等主要产区绞股蓝进行了 UPLC-QTOF/MS 分析, 发现各个产地的绞股蓝中三萜皂苷结构特征明显不同, 其中广西产绞股蓝含有原人参二醇型皂苷, 在报道如此多绞股蓝皂苷结构的情况下, 广西产绞股蓝中仍然存在未报道的皂苷结构。因此, 本文利用多种分离方法和波谱技术对广西产绞股蓝中的成分进行分离、鉴定, 最终从中分离得到 4 个新化合物 (1~4), 结构见图 1。本文主要介绍 4 个新化合物的分离鉴定。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 1 白色无定形粉末, 易溶于吡啶、甲醇、乙腈。TLC 10% 硫酸乙醇溶液显色, 呈紫红色。 $[\alpha]_D^{25} +2.00$ (c 0.05, MeOH), (-)-HR-ESI-MS: 分子离子峰

m/z 797.470 0 $[M-H]^-$ ($C_{42}H_{69}O_{14}$ 计算值: 797.468 7), 因此, 推测分子式为 $C_{42}H_{70}O_{14}$ 。 1H NMR (pyridine- d_5 , 500 MHz) 出现 δ_H 1.56 (6H, overlap)、1.31 (3H, s)、1.13 (3H, s)、1.06 (3H, s)、0.97 (3H, s)、0.84 (3H, s) 苷元上 7 个甲基质子信号, 另有 δ_H 4.95 (d, $J=7.6$ Hz)、5.40 (d, $J=7.6$ Hz) 共 2 个糖端基质子信号。根据酸水解实验结果可知, 其糖基为 *D*-吡喃葡萄糖基, 此外, 根据偶合常数可判断, 苷键为 β 构型。 ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz) 提示 δ_C 154.5、137.3、128.9、109.7 为 4 个烯烃碳信号, 89.0、81.2、72.4 为苷元上 3 个含氧取代碳信号。综合分子量、糖酸水解实验和碳谱中 42 个碳信号可知: 该化合物为连接有两个 β -*D*-葡萄糖吡喃基的三萜皂苷。在 HMBC 谱中 (图 2), 由 δ_H 4.95 (H-1') 与 δ_C 89.0 (C-3), δ_H 5.40 (H-1'') 与 δ_C 83.5 (C-2') 存在相关, 可以确定糖基分别连接在 C-3 与 C-2'。H-21 (δ_H 4.99, 5.15) 与 δ_C 48.0 (C-17)/ δ_C 37.4 (C-22), H-22 (δ_H 3.06, 3.20) 与 δ_C 154.5 (C-20) 有 HMBC 相关信号, 表明 C-20、C-21 位成双键, C-21 为末端烯烃碳; 此外, H-21 (δ_H 4.99, 5.15) 磁不等价有 2 个氢信号, 也可快速推测 C-21 为末端烯烃碳。在 1H - 1H COSY 谱中 (图 2), δ_H 6.01 (H-23) 与 H-22 (δ_H 3.06, 3.20)/ δ_H 6.01 (H-24) 存在相关信号, 推测 C-22、C-23、C-24 依次连接形成的丙烯片段; δ_H 6.01 (H-23) 与 δ_C 81.2 (C-25) 存在相关信号; δ_H 6.01 (H-24) 与 δ_C 25.2 (C-26)/ δ_C 25.3 (C-27), δ_H 1.56 (H-26) 与 δ_C 81.2 (C-25) 存在 HMBC 相关信号, 可证明 C-23、C-24 位成烯。化合物 1 和 gypenoside GD₅^[18] 在 C-22 到 C-27 侧链的碳谱数据相似, 尤其是被过氧氢基取代的 C-25 位信号 (δ_C 81.2) 与 C-25 位被羟基取代的 gypenoside LX (δ_C 70.2) 相比^[19], 其化学位移明显向低场移动, 同时在化合物 1 氢谱中观察到 δ_H 12.90 (1H, s) 的氢信号, 与已知化合物 gypenoside GD₅ 的氢谱一致

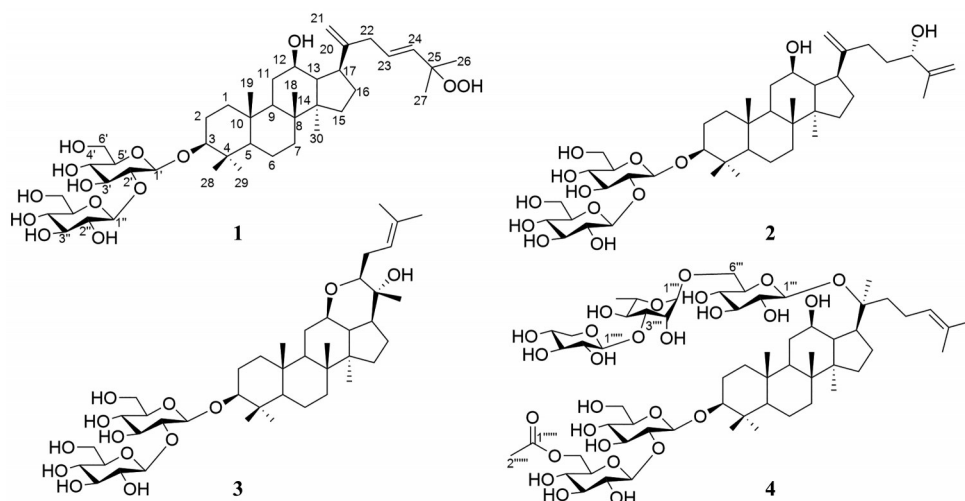


Figure 1 The structures of compounds 1-4

$[\delta_{\text{H}} 12.87(1\text{H}, \text{s})]$; 此外, C-25的过氧氢基取代也对应了化合物 **1** 元素组成中的两个氧原子。根据 NOESY 谱 (图3) $\delta_{\text{H}} 3.31$ (H-3) 与 $\delta_{\text{H}} 0.70$ (H-5 α), $\delta_{\text{H}} 3.91$ (H-12) 与 $\delta_{\text{H}} 2.88$ (H-17) 存在相关信号, 说明 C-3 和 C-12 均连接 β -OH, H-17 位 α 构型。综上, 化合物 **1** 鉴定为 $3\beta, 12\beta$ -二羟基-25-过氧氢基达玛烷-20,23-二烯-3- O - $[\beta$ -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -D-吡喃葡萄糖苷, 结构式见图1, 确定为新化合物。 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 信号归属见表1。

化合物 2 白色无定形粉末, 易溶于吡啶、甲醇、乙腈。TLC 提示 10% 硫酸乙醇溶液显色, 呈紫红色。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +25.00$ (c 0.1, MeOH), (-)-HR-ESI-MS: 分子离子峰 m/z 781.473 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{O}_{13}$, 计算值: 781.473 8), 因此, 推测分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$ 。 ^1H NMR (pyridine- d_5 , 500 MHz) 提示 $\delta_{\text{H}} 1.91$ (3H, s), 1.31 (3H, s), 1.12 (3H, s), 1.02 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.81 (3H, s) 苷元上 6 个甲基质子信号, 另有 $\delta_{\text{H}} 4.95$ (overlap), 5.40 (d, $J=7.8$ Hz) 共 2 个糖端基质子信号。根据酸水解实验结果可知, 其糖基为 D -吡喃葡萄糖基, 此外, 根据偶合常数可判

断苷键为 β 构型。 ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz) 提示 $\delta_{\text{C}} 155.9$ 、149.9、110.1、108.0 为 4 个烯烃碳信号, 88.9、74.9、72.5 为苷元上 3 个含氧取代碳信号。对比化合物 **1** 与化合物 **2** 的碳谱数据基本一致, 只是在苷元侧链部分有不同, 因此判断化合物 **2** 同样为连接有两个 β -D-葡萄糖吡喃糖基的三萜皂苷并且糖基分别连接在 C-3 与 C-2'。由 ^1H - ^1H COSY 谱 (图2), H-23 ($\delta_{\text{H}} 2.08, 2.16$) 与 $\delta_{\text{H}} 2.63$ (H-22)/ $\delta_{\text{H}} 4.47$ (H-24) 的相关信号可得 C-22、C-23、C-24 依次连接。H-21 ($\delta_{\text{H}} 4.97, 5.18$) 与 $\delta_{\text{C}} 48.5$ (C-17)/ $\delta_{\text{C}} 30.0$ (C-22), $\delta_{\text{H}} 2.63$ (H-22) 与 $\delta_{\text{C}} 48.5$ (C-17), H-23 ($\delta_{\text{H}} 2.08, 2.16$) 与 $\delta_{\text{C}} 149.9$ (C-25)/ $\delta_{\text{C}} 155.9$ (C-20)/ $\delta_{\text{C}} 74.9$ (C-24), H-26 ($\delta_{\text{H}} 4.95, 5.27$) 与 $\delta_{\text{C}} 18.2$ (C-27)/ $\delta_{\text{C}} 74.9$ (C-24) 存在 HMBC 相关信号 (图2), 表明 C-20、C-21、C-25、C-26 位成烯; C-21、C-26 为末端烯烃碳; C-24 被羟基取代。根据 NOESY 谱 (图3), $\delta_{\text{H}} 3.31$ (H-3) 与 $\delta_{\text{H}} 0.68$ (H-5 α), $\delta_{\text{H}} 3.91$ (H-12) 与 $\delta_{\text{H}} 2.87$ (H-17) 存在相关信号, 说明 C-3 和 C-12 均连接 β -OH, H-17 位 α 构型。关于 C-24 位构型的确定, 文献^[20]报道, 可利用圆二色

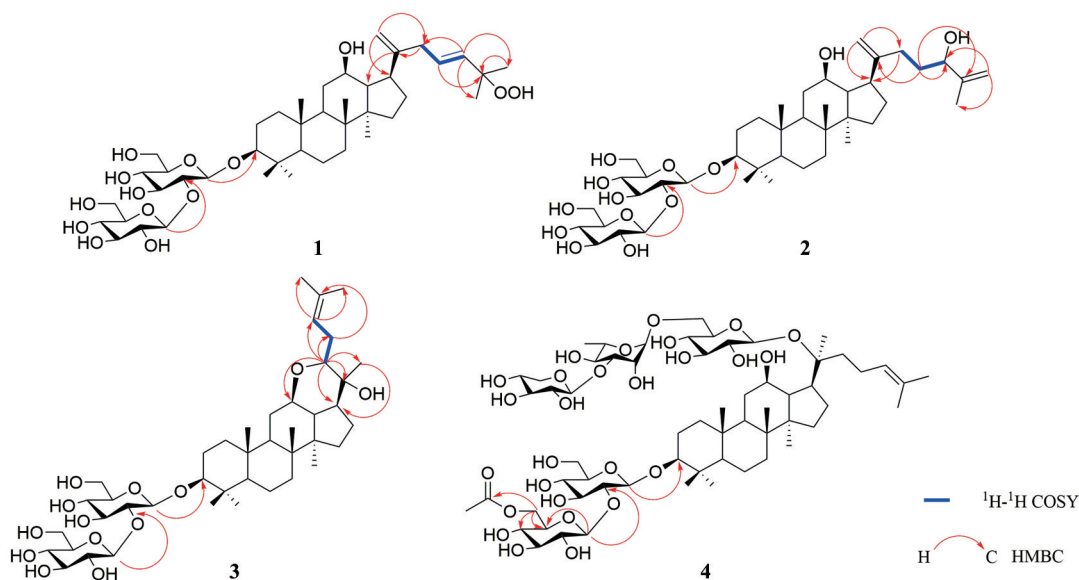


Figure 2 The key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of 1-4

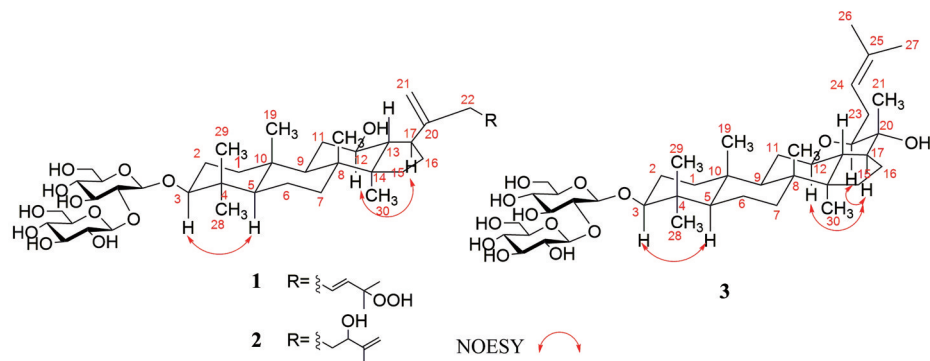


Figure 3 The key NOESY correlations of compounds 1-3

Table 1 NMR data of **1–3** in pyridine- d_5 (150 MHz for ^{13}C NMR, 600 MHz for ^1H NMR, J in Hz)

Position	1		2		3	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	39.3	0.77 m, 1.51 m	39.3	0.76 m, 1.51 m	39.7	0.82 m, 1.49 m
2	26.8	1.84 m, 2.22 m	26.8	1.83 m, 2.21 m	26.8	1.83 m, 2.26 m
3	89.0	3.31 dd (11.7, 4.2)	88.9	3.31 dd (11.7, 4.5)	88.8	3.27 dd (11.8, 4.4)
4	39.8		39.7		39.7	
5	56.4	0.70 d (11.7)	56.4	0.68 d (11.8)	56.5	0.68 d (11.8)
6	18.5	1.39 o, 1.50 o	18.5	1.36 o, 1.50 o	18.4	1.37 o, 1.49 o
7	35.4	1.25 m, 1.47 o	35.4	1.25 m, 1.47 o	36.2	1.23 m, 1.51 o
8	40.2		40.2		40.8	
9	50.9	1.40 m	50.9	1.40 m	51.7	1.33 m
10	37.0		37.0		37.5	
11	32.8	1.42 o, 1.96 m	32.8	1.42 o, 1.94 m	32.3	1.11 o, 1.57 o
12	72.4	3.91 m	72.5	3.91 m	77.0	3.39 m
13	52.4	2.10 m	52.2	2.16 m	50.1	1.42 o
14	51.3		51.2		48.2	
15	32.6	1.11 m, 1.72 m	32.6	1.08 m, 1.70 m	39.7	0.82 o, 1.49 o
16	30.8	1.59 m, 2.08 m	30.8	1.61 m, 2.06 m	28.6	1.33 m, 1.89 m
17	48.0	2.88 m	48.5	2.87 m	49.0	2.21 m
18	15.9	1.06 s	15.8	1.02 s	16.4	0.99 s
19	16.5	0.84 s	16.5	0.81 s	16.6	0.82 s
20	154.5		155.9		73.5	
21	109.7	4.99 s, 5.15 s	108.0	4.97 s, 5.18 s	15.7	1.43 s
22	37.4	3.06 m, 3.20 m	30.0	2.63 m	87.6	3.42 d (10.5)
23	128.9	6.01 o	34.6	2.08 m, 2.16 o	28.0	2.40 m, 3.09 m
24	137.3	6.01 o	74.9	4.47 m	124.6	5.74 t (6.9)
25	81.2		149.9		131.6	
26	25.2	1.56 o	110.1	4.95 o, 5.27 s	26.0	1.74 s
27	25.3	1.56 o	18.2	1.91 s	18.0	1.71 s
28	28.1	1.31 s	28.1	1.31 s	28.1	1.29 s
29	16.6	1.13 s	16.6	1.12 s	16.7	1.12 s
30	17.0	0.97 s	17.0	0.96 s	17.3	0.93 s
1'	105.2	4.95 d (7.6)	105.2	4.95 o	105.1	4.92 d (7.6)
2'	83.5	4.27 o	83.5	4.26 m	83.5	4.26 m
3'	78.4	4.34 o	78.4	4.34 o	78.4	4.34 o
4'	71.7	4.37 m	71.6	4.36 m	71.7	4.36 m
5'	78.2	3.95 m	78.2	3.95 m	78.1	4.27 o
6'	62.7	4.37 m, 4.50 o	62.7	4.37 m, 4.50 o	62.7	4.37 m, 4.50 o
1''	106.1	5.40 d (7.6)	106.1	5.40 d (7.8)	106.1	5.39 d (7.6)
2''	77.2	4.15 m	77.2	4.15 m	77.2	4.15 m
3''	78.3	4.34 o	78.3	4.34 o	78.3	4.34 o
4''	71.7	4.17 m	71.6	4.17 o	71.7	4.16 m
5''	78.0	4.27 o	78.0	4.15 o	78.0	4.27 o
6''	62.9	4.50 o, 4.59 m	62.9	4.50 o, 4.59 m	62.9	4.50 o, 4.60 m

谱 (CD) 来确定绞股蓝皂苷中 24 位 R/S 差向异构体的绝对构型, 当 CD 谱图出现 cotton 正效应时 C-24 位为 R 构型, 呈负效应时则为 S 构型, 通过测定发现化合物 **2** 的 CD 谱图呈现为 cotton 负效应, 因此确定其 C-24 位为 S 构型。综上, 化合物 **2** 鉴定为 $3\beta, 12\beta, 24S$ -三羟基达玛烷-20,25-二烯-3- O -[β - D -吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β - D -吡喃葡萄糖苷, 结构式见图 1, 确定为新化合物。 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 信号归属见表 1。

化合物 3 白色无定形粉末, 易溶于吡啶、甲醇、乙腈。TLC 10% 硫酸乙醇溶液显色, 呈紫红色。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -11.00$ (c 0.09, MeOH), (-)-HR-ESI-MS: 分子离子峰 m/z 781.471 4 [M-H] $^-$ ($\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{O}_{13}$ 计算值: 781.473 8), 因此, 推测分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$ 。 ^1H NMR (pyridine- d_5 ,

500 MHz) 提示 δ_{H} 1.74 (3H, s)、1.71 (3H, s)、1.43 (3H, s)、1.29 (3H, s)、1.12 (3H, s)、0.99 (3H, s)、0.93 (3H, s)、0.82 (3H, s) 共 8 个苷元上甲基质子信号, 另有 δ_{H} 4.92 (d, $J = 7.6$ Hz) 和 5.39 (d, $J = 7.6$ Hz) 2 个糖端基质子信号。根据酸水解实验结果可知, 其糖基为 D -吡喃葡萄糖基, 此外, 根据偶合常数可判断苷键为 β 构型。 ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz) 提示 δ_{C} 131.6、124.6 为 2 个烯碳信号, 88.8、87.6、77.0、73.5 为苷元上 4 个含氧取代碳信号。化合物 **1** 与化合物 **3** 的碳谱数据仅苷元侧链部分有不同, 可知化合物 **3** 同连有 2 个 β - D -吡喃葡萄糖基, 并分别连接在 C-3 与 C-2'。根据 ^1H - ^1H COSY 谱 (图 2), H-23 (δ_{H} 2.40, 3.09) 与 δ_{H} 3.42 (H-22)/ δ_{H} 5.74 (H-24) 存在相关信号, 证明 C-22、C-23、C-24 依

次连接。 δ_{H} 3.42 (H-22) 与 δ_{C} 77.0 (C-12)/ δ_{C} 49.0 (C-17)/ δ_{C} 73.5 (C-20)/ δ_{C} 15.7 (C-21)/ δ_{C} 28.0 (C-23)/ δ_{C} 124.6 (C-24), H-23 (δ_{H} 2.40, 3.09) 与 δ_{C} 124.6 (C-24)/ δ_{C} 131.6 (C-25), δ_{H} 5.74 (H-24) 与 δ_{C} 26.0 (C-26)/ δ_{C} 18.0 (C-27) 存在 HMBC 相关 (图 2), 表明 C-12、C-13、C-17、C-20、C-22 形成一个吡喃环, C-24、C-25 成烯。 δ_{H} 3.27 (H-3) 与 δ_{H} 0.68 (H-5 α), δ_{H} 2.21 (H-17) 与 δ_{H} 3.39 (H-12)/ δ_{H} 3.42 (H-22) 具有 NOESY 相关 (图 3), H-21 与 H-17 无相关信号, 说明 C-3 和 C-12 均连接 β -OH、C-20 连接 α -OH, C-22 位为 *S* 构型。综上, 化合物 **3** 鉴定为 3β , 20α -二羟基-24-烯-12 β , $22S$ -环氧达玛烷-3-*O*-[β -*D*-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-吡喃葡萄糖苷, 结构式见图 1, 确定为新化合物。 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 信号归属见表 1。

化合物 4 白色无定形粉末, 易溶于吡啶、甲醇、乙腈。TLC 10% 硫酸乙醇溶液显色, 呈紫红色。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -9.00 (*c* 0.08, MeOH), (-)-HR-ESI-MS: 分子离子峰 m/z 1 265.651 0 [M-H] $^-$ (C₆₁H₁₀₁O₂₇ 计算值: 1 265.653 0), 因此, 推测分子式为 C₆₁H₁₀₂O₂₇。碳谱数据与 gypenoside XCIV^[21] 对比, 发现二者数据一致。但由于两个葡萄糖基化学环境的相似, 乙酰基的取代位置尚不明确。根据 HMBC 谱 (图 2), H-6'' (δ_{H} 4.81, 4.94) 与 δ_{C} 171.0 (C-1''''')/ δ_{C} 71.0 (C-4'')/ δ_{C} 75.4 (C-5'') 存在相关信号, 由此可以确定乙酰基取代位置为葡萄糖基 C-6'' 羟基; δ_{H} 5.33 (H-1'') 与 δ_{C} 75.4 (C-5'')/ δ_{C} 84.4 (C-2') 存在相关信号, 说明被乙酰基取代的 C-6'' 位的羟基位于 2'-*O*- β -*D*-葡萄糖基。综上, 化合物 **4** 鉴定为 3β , 12β , $20S$ -三羟基达玛烷-24-烯-3-*O*-[6-*O*-乙酰基- β -*D*-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-吡喃葡萄糖基]-20-*O*- β -*D*-吡喃木糖基(1 \rightarrow 3)- α -*L*-吡喃鼠李糖基(1 \rightarrow 6)]- β -*D*-吡喃葡萄糖苷, 确定为新化合物, 结构式见图 1。 $^1\text{H NMR}$ 和 $^{13}\text{C NMR}$ 信号归属见表 2。

2 讨论

本文在课题组的前期研究基础上, 通过一系列分离纯化方法及结构鉴定技术, 从广西产绞股蓝中分离得到 4 个达玛烷型三萜皂苷新化合物, 均含有 2 个及以上的糖基取代, 且 C-17 侧链结构呈现多样性。化合物 **1** 与 **2** 在侧链拥有少见的 C-20 和 21 位双键; 此外, 化合物 **1** 的 C-23 和 24 位成双键, C-25 位被过氧氢基取代; 化合物 **2** 的 C-24 位被羟基取代, C-25 和 26 位成双键; 化合物 **3** 的 C-17 位侧链与 C-12 形成一个吡喃环, 化合物 **2** 与化合物 **3** 互为一对同分异构体; 化合物 **4** 含有五个糖基, 与已有报道的化合物区别在于糖基上乙酰基取代位置不同。本研究获得的 4 个新三萜皂苷的结构, 不仅对达玛烷型三萜皂苷的多样性有了进一步认识, 也加深了对广西产绞股蓝中三萜皂苷组成的认识,

Table 2 NMR data of **4** in pyridine-*d*₅ (150 MHz for $^{13}\text{C NMR}$, 600 MHz for $^1\text{H NMR}$, *J* in Hz)

Position	δ_{C}	δ_{H}	Position	δ_{C}	δ_{H}
1	39.2	0.73 m, 1.58 m	2'	84.4	4.15 o
2	26.8	1.85 o, 2.23 o	3'	78.2	3.93 o
3	89.3	3.27 dd (11.5, 3.8)	4'	71.5	4.15 o
4	39.8		5'	78.6	4.30 m
5	56.5	0.68 d (2.0)	6'	62.9	4.34 m, 4.56 o
6	18.5	1.39o, 1.58 o	1''	106.3	5.33 d (7.7)
7	35.2	1.20 m, 1.49 m	2''	76.8	4.14 o
8	40.1		3''	78.0	4.23 o
9	50.3	1.38 o	4''	71.0	4.21 o
10	37.0		5''	75.4	4.02 o
11	30.9	1.38 o, 1.98 o	6''	64.8	4.81 m, 4.94 m
12	70.2	4.23 m	1''''	171.0	
13	49.5	1.99 o	2''''	20.9	2.05 s
14	51.5		1'''	98.1	5.13 d (7.7)
15	30.7	0.97 o, 1.53 m	2'''	75.0	3.98 o
16	26.9	1.85 o, 2.23 o	3'''	79.6	4.21 o
17	51.4	2.62 m	4'''	71.9	4.76 m
18	16.1	0.96 s	5'''	76.8	4.02 o
19	16.3	0.84 s	6'''	68.0	4.66 m, 4.02 o
20	83.5		1''''	102.2	5.45 br s
21	22.0	1.68 s	2''''	72.0	3.92 o
22	36.1	1.78 m, 2.41 m	3''''	83.4	4.57 m
23	23.0	2.40 m, 2.66 m	4''''	73.1	4.43 t (9.4)
24	126.1	5.31 o	5''''	69.7	4.34 m
25	131.1		6''''	18.6	1.58 d (6.0)
26	25.8	1.60 s	1'''''	107.5	5.27 d (7.6)
27	17.9	1.68 s	2'''''	75.7	4.06 o
28	28.0	1.68 s	3'''''	78.5	4.15 o
29	16.5	1.13 s	4'''''	71.2	4.14 o
30	17.5	1.00 s	5'''''	67.4	4.35 m, 3.68 t (10.5)
1'	104.9	4.91 d (7.7)			

为后续广西产绞股蓝药效物质基础的研究以及药材质量分析奠定了化合物基础。

实验部分

Vanquish Flex UHPLC 液相色谱仪连接 CAD 电雾式检测器 (美国 ThermoFisher 公司); Waters ACQUITY I-Class UPLC 系统连接 VION-Q-TOF/MS、Waters HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm), 美国 Waters 公司; 中高压纯化系统 Pure C-850 (瑞士 BUCHI 公司); Hannon New style NP700 Serial Pump (汉邦科技有限公司); 示差折光检测器 Shodex RI-102 (日本 Showa Denko Group); Bruker Avance III 600 型核磁共振仪 (德国布鲁克公司); 亚荣 SHZ-III 型循环水真空泵、亚荣 RE-2020A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; BP-211D 型十万分之一天平 (德国 Sartorius 公司); Chirascan 圆二光谱仪 (英国应用光物理公司); Anton Paar MCP 200 旋光光谱仪 (奥地利安东帕公司); HH-W2S 型水浴锅 (上海锦赋实验仪器设备有限公司)。

X Union C18 (250 mm \times 20 mm, 5 μm), 华谱新创

科技有限公司; Chrom Core Phenyl (250 mm × 10 mm, 5 μm), 纳谱分析技术(苏州)有限公司; 5C18-MS-II (250 mm × 10 mm, 5 μm), 日本 Nacalai Tesque 公司; BUCHI Flash Pure C18 柱 (50 μm, 220 g), 瑞士 BUCHI 公司; D101 大孔吸附树脂填料 (天津浩聚树脂科技有限公司); 硅胶填料 300~400 目 (青岛海洋化工有限公司); 可裁剪薄层层析板 (天津思利达科技有限公司); 甲醇、乙醇、三氯甲烷、无水吡啶 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 色谱甲醇、色谱乙腈、三氟乙酸 (美国 ThermoFisher 公司); *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐、*D*-木糖、*L*-鼠李糖 (麦克林生化科技股份有限公司); *D*-葡萄糖、邻甲苯异硫氰酸酯 (北京百灵威科技有限公司); 纯净水 (娃哈哈集团有限公司); 蒸馏水 (屈臣氏集团)。

本实验所用药材为绞股蓝叶, 采自广西壮族自治区桂林市, 经中国医学科学院药用植物研究所郭宝林研究员鉴定为葫芦科绞股蓝属植物绞股蓝 *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino。

1 提取与分离

绞股蓝叶 10 kg, 水煎煮提取 3 次 (16 倍水提 10 h, 重复 3 次), 浓缩后用 90% 乙醇沉淀, 弃去沉淀, 上清液浓缩至无醇味, 分 3 次进行 D-101 大孔吸附树脂 (5 kg) 柱层析, 分别用水洗脱未沉淀掉的寡糖、黄酮类物质, 再分别用 20%、70%、85% 乙醇洗脱, 浓缩干燥后得到 20% 乙醇洗脱部位 (D1, 220 g)、70% 乙醇洗脱部位 (D2, 1 110 g)、85% 乙醇洗脱部位 (D3, 40 g)。对 D3 (40 g) 进行硅胶开放柱色谱分离, 以三氯甲烷-甲醇-水 (95:5:0.5→90:10:1→85:15:1.5→80:20:6 下层→75:25:7.5 下层→70:30:9 下层→甲醇) 体系进行洗脱。经 TLC 检识合并后得到 Fr.1~Fr.18 共 18 个组分。其中 Fr.9、Fr.11 使用 BUCHI Flash Pure C18 柱 (50 μm, 220 g) 以甲醇-水 (40%→50%→60%→70%→75%→80%→85%→90%→100% 甲醇) 为流动相体系进行梯度洗脱 Fr.9 得到 14 个组分, Fr.9-1 到 Fr.9-14, Fr.11 得到 15 个组分: Fr.11-1 到 Fr.11-15。选择 Fr.9-7 使用 X Union C18 (250 mm × 20 mm, 5 μm) 色谱柱, 73% 甲醇分离得到 8 个组分: Fr.9-7-8 使用 5C18-MS-II (250 mm × 10 mm, 5 μm) C18 色谱柱以 38% 乙腈水为流动相分离得到化合物 1 ($t_R = 27.0$ min, 2.7 mg); Fr.9-7-7 使用 5C18-MS-II (250 mm × 10 mm, 5 μm) C18 色谱柱以 38% 乙腈水为流动相分离得到化合物 2 ($t_R = 18.0$ min, 3.1 mg); Fr.9-7-4 使用 5C18-MS-II C18 色谱柱以 38% 乙腈水为流动相分离得到化合物 3 ($t_R = 19.0$ min, 3.9 mg); 选择 Fr.11-6 使用 Chrom Core Phenyl 苯基色谱柱以 35% 乙腈水为流动相分离得到化合物 4 ($t_R = 13.2$ min, 6.5 mg)。

2 糖绝对构型的确定

将化合物 1~4 (各 1.0 mg) 溶解在 6 mol·L⁻¹ 三氟乙酸 (1 mL) 中, 在 90 °C 下水浴加热 2 h, 冷却至室温。用三氯甲烷萃取三次, 浓缩水层, 得到含糖残基。将得到的残基与单糖对照品用无水吡啶 (200 μL) 溶解, 加入 *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐 (1 mg), 60 °C 水浴加热 1 h。再分别加入邻甲苯异硫氰酸酯 10 μL, 在 60 °C 水浴下加热 1 h。反应结束后, 冷却至室温, 过滤上清液, 使用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱进行 UPLC 分析。

UPLC-CAD 分析条件: Vanquish Flex UPLC 液相色谱仪连接 CAD 电雾式检测器 (ThermoFisher, 美国); Waters ACQUITY™ UPLC HSS T3 色谱柱; 梯度洗脱: 0.1% 甲酸水 (A), 乙腈 (B), 0~8 min, 20%~30% B; 柱温 40 °C; 流速 0.6 mL·min⁻¹, 雾化温度 35 °C; 滤波 1 s。通过与单糖对照品衍生化产物的保留时间对比, 确定各糖基的绝对构型。*D*-葡萄糖 (4.5 min)、*D*-木糖 (4.9 min)、*L*-鼠李糖 (6.3 min)。

3 结构鉴定

化合物 1 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{25} +2.00$ (c 0.05, MeOH), HR-ESI-MS (-): m/z 797.470 0 [M-H]⁻, 分子式为 C₄₂H₇₀O₁₄ (C₄₂H₆₉O₁₄ 计算值: 797.468 7)。¹H NMR (pyridine-*d*₅, 500 MHz) 和 ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, 150 MHz) 数据见表 1。

化合物 2 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{25} +25.00$ (c 0.10, MeOH), CD (MeOH): 225.0 ($\Delta\epsilon$ +0.48) nm, HR-ESI-MS (-): m/z 781.473 2 [M-H]⁻, 分子式为 C₄₂H₇₀O₁₃ (C₄₂H₆₉O₁₃ 计算值: 781.473 8)。¹H NMR (pyridine-*d*₅, 500 MHz) 和 ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, 150 MHz) 数据见表 1。

化合物 3 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{25} -11.00$ (c 0.09, MeOH), HR-ESI-MS (-): m/z 781.471 4 [M-H]⁻, 分子式为 C₄₂H₇₀O₁₃ (C₄₂H₆₉O₁₃ 计算值: 781.473 8)。¹H NMR (pyridine-*d*₅, 500 MHz) 和 ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, 150 MHz) 数据见表 1。

化合物 4 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{25} -9.00$ (c 0.08, MeOH), HR-ESI-MS (-): m/z 1 265.651 0 [M-H]⁻, 分子式为 C₆₁H₁₀₂O₂₇ (C₆₁H₁₀₁O₂₇ 计算值: 1 265.653 0)。¹H NMR (pyridine-*d*₅, 500 MHz) 和 ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, 150 MHz) 数据见表 2。

作者贡献: 杨光负责实验实施、数据分析及撰写稿件; 梁海珍参与数据分析及稿件修改; 张洁和陈晓娟协助实施部分实验; 郭宝林负责药材鉴定; 马百平对研究工作进行设计、监督、指导以及稿件的修改, 承担研究工作各方面的责任。

利益冲突: 本文无任何利益冲突。

References

- [1] Bao FX, Tao LX, Zhang HY. Research progress on pharmacological effects of *Gynostemma pentaphyllum* active ingredients [J]. Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志), 2018, 37: 11-17.
- [2] Nguyen NH, Ha TKQ, Yang JL, et al. Triterpenoids from the genus *Gynostemma*: chemistry and pharmacological activities [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113574.
- [3] Li Q, Pang X, Lu PX, et al. Four new dammarane-type triterpenoid saponins from *Gynostemma longipes* C. Y. Wu [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 1670-1676.
- [4] Li Q. Studies on the Chemical Constituents of the Polar Fraction of *Gynostemma longipes* (长梗绞股蓝大极性部位化学成分研究) [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2022.
- [5] Zhang HX, Wang ZZ, Du ZZ, et al. Sensory-guided isolation and identification of new sweet-tasting dammarane-type saponins from Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*) herbal tea [J]. Food Chem, 2022, 388: 132981.
- [6] Dinh TTT, Nguyen TT, Ngo HT, et al. Dammarane-type triterpenoids from *Gynostemma compressum* X. X. Chen & D. R. Liang (Cucurbitaceae) and their AMPK activation effect in 3T3-L1 cells [J]. Phytochemistry, 2022, 200: 113218.
- [7] Wang J, Wang CB, Meng XH, et al. Cytotoxic dammarane triterpenoids from the hydrolyzate of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Phytochem Lett, 2021, 46: 136-142.
- [8] Huang YP, Wang YS, Liu BW, et al. Dammarane-type saponins with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitory activity from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Phytochemistry, 2022, 194: 113005.
- [9] Lou YY, Zheng X, Huang YP, et al. New dammarane-type triterpenoid saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their Sirt1 agonist activity [J]. Bioorg Chem, 2021, 116: 105357.
- [10] Zhai XF, Zu ML, Wang YR, et al. Protective effects of four new saponins from *Gynostemma pentaphyllum* against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells [J]. Bioorg Chem, 2021, 106: 104470.
- [11] Wang J, Meng XH, Wang WF, et al. Dammarane triterpenoids with rare skeletons from *Gynostemma pentaphyllum* and their cytotoxic activities [J]. Fitoterapia, 2022, 162: 105280.
- [12] Huang YP, Wang YS, Liu YY, et al. Chemical characterization and atherosclerosis alleviation effects of gypenosides from *Gynostemma pentaphyllum* through ameliorating endothelial dysfunction via the PCSK9/LOX-1 pathway [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70: 11944-11957.
- [13] Liu Y, Yang Y, Wang H, et al. Dammarane-type triterpenoid saponins isolated from *Gynostemma pentaphyllum* ameliorate liver fibrosis via agonizing PP2Ca and inhibiting deposition of extracellular matrix [J]. Chin J Nat Med, 2023, 21: 599-609.
- [14] Liang HZ, Lu PX, Chu LL, et al. Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their anti-aging activities via up-regulating mitochondria related proteins [J]. Phytochemistry, 2023, 213: 113744.
- [15] Yin MJ, Zhang JJ, Wang LZ, et al. Ten new dammarane-type saponins with hypolipidemia activity from a functional herbal tea-*Gynostemma pentaphyllum* [J]. Molecules, 2020, 25: 3737.
- [16] Norberg Å, Hoa NK, Liepinsh E, et al. A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum* [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 41361-41367.
- [17] Long BB. Experimental research on the anti-fatigue effect of extraction of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Mod Prev Med (现代预防医学), 2009, 36: 712-713.
- [18] Lee C, Lee JW, Jin QH, et al. Isolation and characterization of dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their inhibitory effects on IL-6-induced STAT3 activation [J]. J Nat Prod, 2015, 78: 971-976.
- [19] Takemoto T, Arihara S, Yoshikawa K, et al. Studies on the constituents of Cucurbitaceae plants. XIV: on the saponin constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. Yakugaku Zasshi, 1986, 106: 664-670.
- [20] Liu H, Xin SF, Cui WY, et al. A novel dammarane-type saponin from *Gynostemma pentaphyllum* and its neuroprotective effect [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 380-387.
- [21] Weng X, Lou YY, Wang YS, et al. New dammarane-type glycosides from *Gynostemma pentaphyllum* and their lipid-lowering activity [J]. Bioorg Chem, 2021, 111: 104843.