

白首乌体外抑制肿瘤细胞的成分研究

张如松^{1*}, 叶益萍¹, 沈月毛², 梁惠玲²

(1. 浙江省医学科学院药物所, 浙江 杭州 310013; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 目的 从萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight)块根中分离出有细胞毒活性的2种C₂₁甾体苷。方法 用柱色谱和HPLC法分离纯化,通过化学降解及光谱分析(UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HR-FAB MS, FAB MS, HMQC和HMBC)鉴定其化学结构。结果 从白首乌中分离得到白首乌新苷A(I)与B(II),其化学结构分别为:告达庭-3-O-β-D-葡吡喃糖基-(1→4)-β-D-磁麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-夹竹桃吡喃糖基-(1→4)-β-D-磁麻吡喃糖苷;告达庭-3-O-β-D-葡吡喃糖基-(1→4)-β-D-夹竹桃吡喃糖基-(1→4)-β-D-洋地黄毒吡喃糖基-(1→4)-β-D-磁麻吡喃糖苷。结论 白首乌新苷A和B均为新C₂₁甾体苷。

关键词: 白首乌; 白首乌新苷A; 白首乌新苷B; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1; R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)06-0431-07

中药白首乌系萝藦科(Asclepiadaceae)鹅绒藤属植物耳叶牛皮消(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight)、隔山牛皮消(*C. wifordii* Hemsl)及戟叶牛皮消(*C. bungei* Decne)等植物的块根,有养血益肝、固肾益精、强筋健骨、乌黑须发及延年益寿等功效。现代化学研究表明白首乌中含有磷脂类、氨基酸、C₂₁甾体苷、维生素、无机盐及30多种微量元素等成分。陈纪军等^[1]已从耳叶牛皮消的块根中分离得到白首乌苷A, B, C(cynauricosides A, B, C)和

隔山消苷C₃N, C₂N, C₁G, KIN(wilfosides C₃N, C₂N, C₁G, KIN)等7个C₂₁甾体苷。药理实验研究^[2,3]发现从耳叶牛皮消的块根中提取分离得到的白首乌总苷有抗肿瘤和免疫增强作用。为了寻找有效的抗肿瘤药物和抗肿瘤辅助药物,作者用多种人癌细胞株体外筛选,从耳叶牛皮消块根中分离得到2个新的C₂₁甾体苷,分别命名为白首乌新苷A(cynauricoside A, I)和白首乌新苷B(cynauricoside B, II)(图1)。

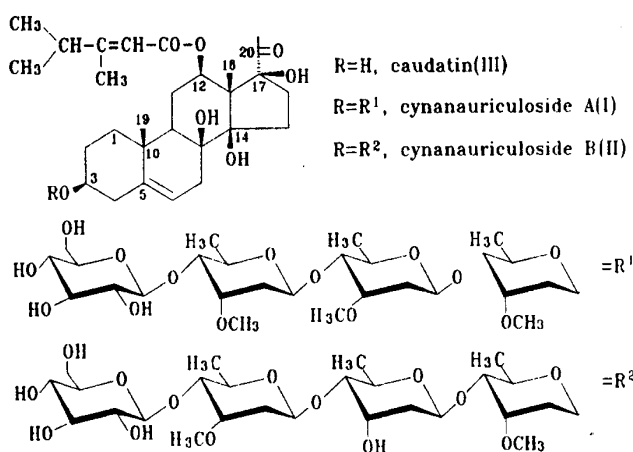


Fig 1 Structures of compounds I, II and III

化合物I和II对Lieberman-Burchard和Keller-Kiliani反应均呈阳性,示皆为含2-去氧糖的甾体化合物。

白首乌新苷A(I) 白色无定型粉末。分子式

收稿日期: 1999-10-18

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(396484)

* Tel: (0571) 8850585, Fax: (0571) 8075447

为 $C_{55}H_{88}O_{21}$ 。 1H NMR: δ 1.98 (3H, s, 18-Me), 1.32 (3H, s, 19-Me), 2.50 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, 21-Me), 2.15 (1H, m, 7 α -H), 3.87 (1H, m, 3 α -H), 5.04 (1H, dd, $J = 4.1, 11.7$ Hz, 12 α -H), 5.26 (1H, br s, 6-H), 及 ^{13}C NMR, DEPT, HMQC^[4] 和 HMBC^[5] 数据(表 1) 示告达庭(caudatin, III) 的存在。其 ^{13}C NMR 显示 4 个糖的端基碳的共振信号 δ : 96.4, 102.0, 98.4, 106.6 及 1H NMR 中有相应的 4 个糖的端基质子的共振信号 δ : 5.26 (1H, br d, $J = 8.0$ Hz), 4.69 (1H, br d, $J = 9.7$ Hz), 5.25 (1H, br d, $J = 7.6$ Hz), 4.93 (1H, br d, $J = 7.7$ Hz), 且知各糖之间均以 β 苷键连接。I 在酸性条件下水解, 再经柱色谱分离得到 III 和糖的混合物, III 的光谱数据与文献^[6]报道的数据一致, 表明 I 的苷元是告达庭。比较告达庭和 I 苷元部分的 ^{13}C NMR 数据, 可见苷化位移效应: C-2 (-1.8), C-3 (+4.5), C-4 (-3.6), 示糖链连接在告达庭的 C-3 羟基上。以 4 个糖的端基质子及 1 个易识别的氧代次甲基质子 (δ 3.68, dd, $J = 2.8, 9.6$ Hz) 作为起始点, 在 HMQC 和 HMBC 图谱中找出糖链上其余质子和碳原子的化学位移值, 从而确定各糖的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据(表 1), 并与文献^[7]数据对照, 确定了糖链中各糖的类型。

内侧糖磁麻吡喃糖 ^{13}C NMR 数据及 1H NMR 数据(表 1) 与文献^[7]数据一致。次内侧糖的 ^{13}C NMR 数据与内侧 D-磁麻吡喃糖的 ^{13}C NMR 数据对照(除了由于不同的化学环境引起端基碳化学位移值不同)基本接近, 但其 S β -H-5 (δ 3.48) 和 D-磁麻吡喃糖的 S α -H-5 (δ 4.21) 比较有明显的差别, 提示同 D-磁麻吡喃糖 S α -C-5 位上的质子比较, 该质子受到了较小的 γ -效应, 因此 S β -H-5 或 S β -C-3 甲氧基处于 e 键上。在常见的 2,6-二去氧糖中, 只有 D-夹竹桃吡喃糖具有上述结构特征。Warashina 等^[8]也报道 D-夹竹桃吡喃糖与 D-磁麻吡喃糖的 5-H 的化学位移值有明显的差异, 故推断该糖为 D-夹竹桃吡喃糖。糖链中第 3 个糖的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据与内侧 D-磁麻吡喃糖接近, 因此指认为 D-磁麻吡喃糖。在 HMBC 中, 末端 D-葡吡喃糖 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据按下列相关找出: S α -H-6 α \rightarrow S α -C-4, S α -C-5, S α -H-6 β \rightarrow S α -C-4; S α -H-3 \rightarrow S α -C-2, S α -C-4; S α -H-1 \rightarrow S α -C-5, 和文献^[7]数据对照, 与 D-葡吡喃糖一致。

HMBC 谱 S α -H-1 δ 5.26 与 C-3 δ 77.7 相关, S β -H-1 δ 4.69 与 S α -C-4 δ 83.6 相关, S α -H-1 δ 5.25 与 S β -C-4 δ 82.7 相关及 S α -H-1 δ 4.93 与 S α -C-4 δ

83.2 相关, 确定了糖链部分的连接顺序为 D-葡吡喃糖-D-磁麻吡喃糖-D-夹竹桃吡喃糖-D-磁麻吡喃糖-告达庭苷元, 而且均为 1 \rightarrow 4 连接。I 的 FAB-MS 碎片特征: m/z 1091 [M + Li]⁺, 911 [M + Li - 180]⁺, 617 [M + 1 - 180 - 144 \times 2]⁺, 473 [M + 1 - 180 - 144 \times 3]⁺ 进一步证实了该糖链的连接顺序。

综上所述, 推断 I 的结构为告达庭-3-O β -D-葡吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-磁麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-夹竹桃吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-磁麻吡喃糖苷。

白首乌新苷 B(II) 白色无定型粉末。分子式为 $C_{54}H_{86}O_{21}$ 。II 在酸性条件下水解, 经硅胶柱色谱分离得到的苷元经 TLC 分析证实其为告达庭(caudatin, III)。经 ^{13}C NMR, 1H NMR, DEPT, HMQC 及 HMBC 分析, 其糖链部分有 4 个糖的端基碳的共振信号 δ : 96.4, 99.8, 101.9, 104.5 和相应的 4 个糖的端基质子的共振信号 δ : 5.46 (1H, br d, $J = 9.2$ Hz), 5.15 (1H, br d, $J = 8.9$ Hz), 4.67 (1H, br d, $J = 9.4$ Hz), 5.10 (1H, br d, $J \approx 10$ Hz), 故推断 II 为告达庭(III)的四糖苷, 且从端基质子的偶合常数得知该糖链均以 β 苷键连接。比较告达庭和 II 的苷元部分的 ^{13}C NMR 数据, 可见苷化位移效应: C-2 (-1.8), C-3 (+4.5), C-4 (-3.5), 示糖链连接在告达庭的 C-3 羟基上。按照 I 的推断方法, 在 HMQC 和 HMBC 图谱中, 以容易识别的 4 个糖的端基质子和 3 个氧代次甲基质子 [δ 3.37 (1H, br d, $J = 7.2$ Hz), 3.50 (1H, br d, $J = 9.5$ Hz), 3.70 (1H, br d, $J = 8.8$ Hz)] 作为起始点, 找出其余质子和碳原子的化学位移值, 从而确定各糖的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据及糖链的连接顺序及连接方式。由 HMBC 可见: δ 5.46 (1H, br d, $J = 9.2$ Hz, β -D-磁麻吡喃糖 1-H) 与 δ 77.7 (苷元 C-3) 相关, δ 5.15 (1H, br d, $J = 8.9$ Hz, β -D-洋地黄毒吡喃糖 1-H) 与 δ 83.1 (β -D-磁麻吡喃糖 C-4) 相关, δ 4.67 (1H, br d, $J = 9.4$ Hz, β -D-夹竹桃吡喃糖 1-H) 与 δ 83.8 (β -D-洋地黄毒吡喃糖 C-4) 相关, 及 δ 5.10 (1H, br d, $J \approx 10$ Hz, β -D-葡吡喃糖 1-H) 与 δ 83.3 (β -D-夹竹桃吡喃糖 C-4) 相关确定了糖链的连接顺序为 D-葡吡喃糖-D-夹竹桃吡喃糖-D-洋地黄毒吡喃糖-D-磁麻吡喃糖-告达庭苷元。II 的 FAB-MS 碎片特征: 1093 [M + Na]⁺, 909 [M + 1 - 162]⁺, 765 [M + 1 - 162 - 144]⁺, 635 [M + 1 - 162 - 144 - 130]⁺, 473 [M + 1 - 162 - 144 - 130 - 144 - 18]⁺ 也证实了该糖链的结构。因此 II 的结构为告达庭-3-O β -D-葡吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-夹竹桃吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-洋

地黄毒吡喃糖基-(1→4)-β-D-磁麻吡喃糖苷。

体外抗肿瘤实验发现白首乌新苷 A $55 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 4 种人癌细胞株—Hce-8693(人大肠癌细胞)、PC₃(人前列腺癌细胞)、Hela(人宫颈癌细胞)、PAA(人肺癌细胞)抑制率分别为 51%, 71%, 68% 和 70%; 白首乌新苷 B $56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 Hce-8693, PC₃, Hela 细胞抑制率分别为 64%, 72% 和 74%。

实 验 部 分

熔点用 Libror AEC-200 型熔点仪测定, 温度未校正。IR 用 Perkin-Elmer 577 型分光光度计测定, 溴化钾压片。UV 用 UV-2200 型分光光度计测定, 乙醇为溶剂。核磁共振谱用 Bruker DRX-500 型仪测定, TMS 为内标物, C₅D₅N 为溶剂。高分辨质谱用 VG Autospec 800 型仪测定。旋光度用 SPEA-3000 型仪测定, 乙醇为溶剂。高效液相色谱在 Shimadzu LC-6A 型仪上进行, ODS 柱(2.1 cm × 25 cm), RID-6A 型折光检测器检测。色谱用青岛海洋化工厂产的 200~300 目硅胶及 Kieselgel 60 F₂₅₄ 薄层板; 10% 硫酸乙醇液为显色剂。白首乌经本所张治国研究员鉴定为耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的块根, 购自四川省。

1 提取分离

白首乌干燥块根 10 kg 粉碎后, 以 MeOH 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得 MeOH 提取物 880 g。该提取物加 CHCl₃ 水浴加热 2 h, 冷却后过滤, 减压回收 CHCl₃, 得 CHCl₃ 提取物 320 g。再将 CHCl₃ 提取物倾入 n-C₆H₁₄ 中, 加热回流 2 次, 每次 30 min, 得 n-C₆H₁₄ 不溶部分, 干燥, 得总苷 305 g。将总苷 280 g 进行柱色谱(硅胶 2.5 kg, CHCl₃-MeOH=49:1→30:1→15:1→5:1) 分离得 Fr1, Fr2, Fr3, Fr4 和 Fr5 5 个流份。各流份经体外抗肿瘤试验, 并与总苷比较, 作用较强的流份 Fr2

(8.0 g) 经 HPLC(MeOH-H₂O 3:1) 分离、纯化, 得 I(250 mg) 和 II(78 mg)。

2 鉴定

白首乌新苷 A(cynauriculoside A, I) 白色无定型粉末。[α]_D²⁸ = 0° (c 0.80, EtOH)。mp 172~176 °C。HRFABMS m/z: 1083.5739([C₅₅H₈₈O₂₁-H]⁻, 理论值 1083.5740)。UVλ_{max} nm (EtOH): 221.5(4.05)。IR(KBr)_{max} cm⁻¹: 3448, 2969, 2935, 1713, 1646, 1226, 1166。FAB-MS: m/z 1091[M+Li]⁺, 911[1091-H₂O-glc]⁺, 617[M+1-H₂O-glc-cym-ole]⁺, 473[617-H₂O-glc-cym-ole-cym]⁺。¹H NMR, ¹³C NMR, HMQC 和 HMBC 数据见表 1。

白首乌新苷 B(cynauriculoside B, II) 白色无定型粉末。[α]_D²⁸ = 11.2° (c 0.50, EtOH)。HRFABMS m/z: 1069.5499([C₅₄H₈₆O₂₁-H]⁻, 理论值: 1069.5583)。UVλ_{max} nm (EtOH): 221.5(4.02)。IR(KBr)_{max} cm⁻¹: 3446, 2971, 2935, 1713, 1646, 1225, 1165。FAB-MS: m/z 1093[M+Na]⁺, 909[M+1-glc]⁺, 765[M+1-glc-cym]⁺, 635[M+1-glc-cym-digit]⁺, 473[M+1-sugar chain-H₂O]⁺。¹H NMR, ¹³C NMR, HMQC 和 HMBC 数据见表 2。

化合物 I 和 II 的酸水解 取化合物 I 和 II 各 30 mg 分别溶于 0.1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 甲醇 3 mL 中, 加热回流 30 min, 减压除去甲醇, 以饱和 Ba(OH)₂ 溶液中和, 过滤, 除去沉淀, 滤液减压浓缩至干, 然后用柱色谱(硅胶 10 g, CHCl₃-MeOH=200:1→100:1→60:1→10:1) 分离, 得到化合物 III 和糖的混合物。化合物 III: UVλ_{max} (EtOH): 221.0(4.20) nm, IR(KBr)_{max}: 3446, 2971, 2935, 1713, 1680, 1646 cm⁻¹, ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 3, 经 TLC 检查化合物 III 与告达庭标准品 R_f 值一致。

Tab 1 ¹H, ¹³C NMR and ¹H-¹³C long range correlation (HMBC) data of compound I

Aglycone moiety			
	¹³ C NMR	¹ H NMR	H M B C
1α	39.0 (t)	1.17, m	C2, C9, C10
1β		1.82, m	C2, C9, C10
2α	29.9 (t)	1.82, m	C10, C1, C3
2β		2.13, m	C10, C1
3	77.7 (d)	3.87, m	Sα-C1
4α	39.3 (t)	1.82, m	C2, C5, C6, C10
4β		2.53, dd(4.7, 12.0)	C2, C5, C6, C10
5	139.4 (s)		
6	119.3 (d)	5.26, br s	C8, C10

Continued

Aglycone moiety			
	¹³ C NMR	¹ H NMR	H MBC
7 α	34.8 (t)	2.15, m	C8, C9, C5, C6
7 β		2.45, m	C8, C9, C5, C6
8	74.3 (s)	[5.07, s(OH)]	C7, C8, C9, C14
9	44.6 (d)	1.75, t(10.5)	C10, C19, C14
10	37.3 (s)		
11 α	25.1 (t)	2.15	C8, C9, C10, C12
11 β		2.20	C8, C9, C10, C12
12	72.6 (d)	5.04, dd(4.1, 11.7)	C11, C13, C17, C18, C'1
13	58.0 (s)		
14	89.5 (s)	[6.13, s(OH)]	C8, C14, C15
15 α	33.9 (t)	2.15, m	C8
15 β		2.45, m	C8
16 α	33.0 (t)	2.13, m	C14, C15, C20
16 β		3.29, m	C14, C15, C20
17	92.4 (s)	[6.45, s(OH)]	C13, C17, C20
18	10.8 (q)	1.98, s	C13, C12, C14, C17
19	18.2 (q)	1.32, s	C1, C5, C9, C10
20	209.5 (s)		
21	27.6 (q)	2.50, d(0.9)	C17, C20
C-1'	166.0 (s)		
C-2'	114.2 (d)	5.58, s	C1', C3', C4', C7'
C-3'	165.4 (s)		
C-4'	38.2 (d)	2.45, m	C3', C5', C6'
C-5'	21.0 (q)	0.93, d(7.6)	C4', C6'
C-6'	20.9 (q)	0.96, d(7.0)	C4', C5'
C-7'	16.5 (q)	2.27, s	C2', C3', C4'
Sugar moiety			
	¹³ C NMR	¹ H NMR	H MBC
D-cym			
S α -C1	96.4 (d)	5.26, br d(8.0)	C3, S α -C2
S α -C2	37.4 (t)	2.33, m; 1.82, m	S α -C1, S α -C3
S α -C3	78.8 (d)	4.25, m	S α -C1, S α -C4, S α -C5
S α -C4	83.6 (d)	3.49, m	S α -C3, S α -C5, S α -C6, S β -C1
S α -C5	69.0 (d)	4.21, m	S α -C1, S α -C4, S α -C6
S α -C6	18.7 (q)	1.43, d(5.9)	S α -C4, S α -C5
S α -3-OCH ₃	57.5 (q)	3.51, d(1.0)	S α -C3
D-ole			
S β -C1	102.0 (d)	4.69, br d(9.7)	S α -C4, S β -C2
S β -C2	37.8 (t)	2.33, m; 1.78, m	S β -C1, S β -C3
S β -C3	78.2 (d)	4.10, m	S β -C1, S β -C4
S β -C4	82.7 (d)	3.47, m	S β -C1, S β -C5, S β -C6, S ϵ -C1
S β -C5	71.8 (d)	3.48, m	S β -C1, S β -C6
S β -C6	18.7 (q)	1.41, d(5.3)	S β -C4, S β -C5
S β -3-OCH ₃	58.7 (q)	3.52, d(1.0)	S β -C3
D-cym			
S ϵ -C1	98.4 (d)	5.25, br d(7.6)	S β -C4, S ϵ -C2
S ϵ -C2	36.8 (t)	2.33, m; 1.78, m	S ϵ -C1, S ϵ -C3
S ϵ -C3	77.9 (d)	4.19, m	S ϵ -C1, S ϵ -C4, S ϵ -C5
S ϵ -C4	83.2 (d)	3.68, dd(2.8, 9.6)	S ϵ -C1, S ϵ -C5, S ϵ -C6, S δ -C1
S ϵ -C5	69.7 (d)	4.28, m	S ϵ -C6, S ϵ -C4, S ϵ -C1
S ϵ -C6	18.7 (q)	1.62, d(6.0)	S ϵ -C4, S ϵ -C5
S ϵ -3-OCH ₃	58.9 (q)	3.56, d(1.0)	S ϵ -C3
D-glc			
S δ -C1	106.6 (d)	4.93, br d(7.7)	S ϵ -C4, S δ -C5
S δ -C2	75.4 (d)	3.98, m	S δ -C1, S δ -C3
S δ -C3	78.5 (d)	4.23, m	S δ -C2, S δ -C4
S δ -C4	71.9 (d)	4.17, m	S δ -C3, S δ -C5, S δ -C6
S δ -C5	78.4 (d)	3.98, m	S δ -C4, S δ -C6
S δ -C6	63.1 (t)	4.40, dd(5.5, 11.6)	S δ -C4, S δ -C5
		4.54, dd(2.1, 11.6)	S δ -C4

Tab 2 ^1H , ^{13}C NMR and $^1\text{H}^{13}\text{C}$ long range correlation (HMBC) data for compound II

Aglycone moiety			
	^{13}C NMR	^1H NMR	HMBC
1 α	39.0 (t)	1.11, m	C2, C9
1 β		1.82, m	C2, C9, C10
2 α	29.9 (t)	1.82, m	C1, C3
2 β		2.12	C1, C3, C10
3	77.7 (d)	3.85, m	S α -C1
4 α	39.3 (d)	1.82, m	C2, C5, C10
4 β		2.25, m	C2, C5, C6, C10
5	139.4 (s)		
6	119.2 (d)	5.26, br s	C8, C10
7 α	34.8 (t)	2.15, m	C5, C6, C8, C9
7 β		2.45, m	
8	74.3 (s)		
9	44.6 (d)	1.72, br d(10.8)	C10, C14, C19
10	37.4 (s)		
11 α	25.1 (t)	2.10, m	C8, C9, C10, C12
11 β		2.13, m	
12	72.6 (d)	5.03, dd(ca.4,12)	C11, C13, C17, C18, C'-1
13	58.0 (s)		
14	89.5 (s)		
15 α	33.8 (t)	2.15, m	C13, C14, C16, C17
15 β		2.45, m	
16 α	33.0 (t)	2.13, m	C13, C14, C15, C17
16 β		3.25, m	
17	92.4 (s)		
18	10.7 (q)	1.97	C12, C13, C14, C17
19	18.7 (q)	1.30, s	C1, C5, C9, C10
20	209.4 (s)		
21	27.6 (q)	2.49, s	C1', C3', C4', C7'
1'	166.0 (s)		
2'	114.2 (d)	5.85, s	C7'
3'	165.4 (s)		
4'	38.2 (d)	2.45, m	C3', C4', C5', C7'
5'	21.0 (q)	0.94, d(6.7)	C3', C4', C6'
6'	20.9 (q)	0.96, d(7.5)	C3', C4', C5'
7'	16.5 (q)	2.26, s	C2', C3', C4'
Sugar moiety			
	^{13}C NMR	^1H NMR	HMBC
D-cym			
S α -C1	96.4 (d)	5.46, br d(9.2)	C-3, S α -C2
S α -C2	36.8 (t)	1.70~1.75, m; 2.42, m	S α -C1, S α -C3
S α -C3	78.2 (d)	3.25~3.75, m	S α -C1, S α -C5
S α -C4	83.1 (d)	3.37, d(7.2)	S α -C3, S α -C5, S α -C6, S β -C1
S α -C5	68.6 (d)	4.29, m	S α -C1, S α -C6
S α -C6	18.7 (q)	1.37, d(4.2)	S α -C4, S α -C5
S α -3-OCH ₃	59.0 (q)	3.52, s	S α -C3
D-digit			
S β -C1	99.8 (d)	5.15, br d(8.9)	S α -C4, S β -C2
S β -C2	38.2 (t)	1.70~1.75, m; 2.32, m	S β -C1, S β -C3
S β -C3	69.1 (d)	4.14~4.20, m	S β -C1, S β -C5
S β -C4	83.8 (d)	3.70, br d(8.8)	S β -C3, S β -C5, S β -C6, S γ -C1
S β -C5	67.5 (d)	4.14~4.20, m	S β -C1, S β -C6
S β -C6	18.9 (q)	1.42, d(5.3)	S β -C4, S β -C5
D-ole			
S γ -C1	101.9 (d)	4.67, br d(9.4)	S β -C4, S γ -C2
S γ -C2	36.8 (t)	1.54~1.62, m; 2.39~2.46, m	S γ -C1, S γ -C3
S γ -C3	79.3 (d)	3.75~4.25, m	S γ -C1, S γ -C5
S γ -C4	83.3 (d)	3.50, br d(9.5)	S γ -C3, S γ -C5, S γ -C6, S δ -C1
S γ -C5	72.1 (d)	3.50, m	S γ -C1, S γ -C6
S γ -C6	18.5 (q)	1.42, d(5.3)	S γ -C4, S γ -C5
S γ -3-OCH ₃	59.0 (q)	3.56	S β -C3
D-glc			
S δ -C1	104.5 (d)	5.10, br d(ca.10)	S γ -C4, S δ -C5
S δ -C2	75.7 (d)	3.93~3.98, m	S δ -C1, S δ -C3
S δ -C3	78.4 (d)	4.14~4.20, m	S δ -C2, S δ -C4
S δ -C4	72.0 (d)	4.14~4.20, m	S δ -C3, S δ -C5
S δ -C5	78.7 (d)	4.14~4.20, m	S δ -C4, S δ -C6
		4.33, m	S δ -C4, S δ -C5
S δ -C6	63.1 (t)	4.51, br d(11.6)	S δ -C4, S δ -C5

Tab 3 ^1H , ^{13}C NMR, $^1\text{H}^1\text{H}$ correlation ($^1\text{H}^1\text{H}$ COSY) and $^1\text{H}^{13}\text{C}$ long-range correlation (HMBC) data of compound III

	^{13}C NMR	^1H NMR	$^1\text{H}^1\text{H}$	HMBC
1 α	39.8 (t)	1.17, m	C-2 H, C-9 H	C2, C9, C10
1 β		1.76, m		C2, C9, C10
2 α	31.7 (t)	1.80, m	C-3 H	C1, C3, C10
2 β		2.32, br d(6.8)		C1, C10
3 α	73.20 (d)	3.51, m	C-2 H	Sa-C1
4 α	42.8 (t)	1.88, m	C-3 H	C2, C5, C6, C10
4 β		2.32, m		C2, C5, C6, C10
5	140.5 (s)			
6	119.2 (d)	5.36, br s	C-7 H	C8, C10
7	34.2 (t)	2.19, m	C-6 H	C5, C6, C8, C9
8	74.9 (s)			C8, C9, C14
9	45.2 (d)	1.57, br d(3.1)	C-11 H	C10, C14, C19
10	38.0 (s)			
11 α	25.5 (t)	1.70 ~ 1.77, m	C-9 H, C-12 H	C8, C9, C10, C12
11 β		1.93 ~ 1.95, m		C8, C9, C10, C12
12	72.6 (d)	4.55, dd(4.3, 11.8)	C-11 H	C11, C13, C17, C18, C'1
13	58.6 (s)			
14	89.9 (s)			
15 α	34.2 (t)	1.93 ~ 1.95, m	C-16 H	C8
15 β		2.00 ~ 2.07, m		C8
16 α	33.3 (t)	1.70 ~ 1.77, m	C-15 H	C14, C15, C20
16 β		2.92, ddd(4.9, 9.7, 12.6)		C14, C15, C20
17	92.9 (s)			C13, C17, C20
18	10.5 (q)	1.55, s		C13, C12, C14, C17
19	18.6 (q)	1.19, s		C1, C5, C9, C10
20	209.0 (s)			
21	27.6 (q)	2.22, s		C20
1'	167.4 (s)			
2'	114.2 (d)	5.58, s	C-7' H	C1', C3', C4', C7'
3'	165.4 (s)			
4'	39.4 (d)	2.46, qq(6.8)	C5', 6' H	C3', C5', C6'
5'	21.3 (q)	2.13, d(6.7)	C-4' H	C4', C6'
6'	21.4 (q)	1.13, d(6.7)	C-4' H	C4', C6'
7'	16.7 (q)	2.16, d(1.2)	C-2' H	C2', C3', C4'

^1H NMR, HMBC and ^{13}C NMR spectra were obtained at 500 MHz and 125 MHz respectively, and recorded in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ at room temperature. Multiplicity by DEPT experiments in parentheses, s, quaternary; d, methine; t, methylene and q, methyl carbons

致谢 本实验的体外抗肿瘤试验部分在本所刘雪莉副研究员、钱伯初研究员指导下完成。

参考文献:

- [1] 陈纪军, 张壮鑫, 周俊. 白首乌苷 A, B 和 C 的结构[J]. 云南植物研究, 1990, 12: 197.
- [2] 赵谨, 韩进红, 王少军. 白首乌总苷抑瘤作用的实验研究[J]. 中国医药学报, 1988, 3: 29.
- [3] 顾立刚, 柳彩环, 龚树生. 白首乌 C_{21} 甾体酯苷对免疫受抑小鼠的调整作用[J]. 中药通报, 1986, 11: 50.
- [4] Bax A, Summers MF. ^1H and ^{13}C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple bond connectivity by 2D multiple quantum NMR[J]. *J Am Chem Soc*, 1986, 108: 2093.
- [5] Takenori K, Takoshi I. HMBC spectrum of strychnine [A]. Koji N. *One-dimensional and two-dimensional NMR spectra by modern pulse techniques* [M]. Tokyo: Kodansha Ltd., 1990. 168 - 169.
- [6] Yamagishi T, Mitsuhashi H. The structure of caudatin [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20: 625.
- [7] Warashina T, Noro T. Steroidal glycosides from the root of *Cynanchum caudatum* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44: 917.
- [8] Warashina T, Noro T. Steroidal glycosides from the root of *Cynanchum caudatum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43: 977.

STUDIES ON THE CYTOTOXIC CONSTITUENTS OF *CYNANCHUM AURICULATUM* ROYLE EX WIGHT

ZHANG Ru Song¹, YE Yi Ping¹, SHEN Yue Mao², LIANG Hui Ling²

(1. Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;
2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

ABSTRACT: **AIM** To isolate and elucidate the chemical structures of two C-21 steroidal glycosides possessing cytotoxic activity from the root of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight (Asclepiadaceae). **METHODS** The glycosides were isolated and purified by column chromatography on silica gel and HPLC. The molecular structures were determined on the basis of chemical evidence and extensive spectral analysis (UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HR-FAB MS, FAB MS, HMQC and HMBC). **RESULTS** Two C-21 steroidal glycosides, named cynanauriculosides A and B, were obtained and their structures were elucidated as caudatin 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropynanosyl-(1→4)-β-D-oleandropyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropynanoside and caudatin 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-oleandropyranosyl-(1→4)-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropynanoside respectively. **CONCLUSION** Cynanauriculosides A and B are new compounds.

KEY WORDS: *Cynanchum auriculatum*; cynanauriculoside A; cynanauriculoside B; cytotoxic activity