

刘怀,叶向荣,过七根,等.旱莲皂苷的溶血活性及构效关系研究[J].江西师范大学学报(自然科学版),2023,47(6):594-598.
LIU Huai, YE Xiangrong, GUO Qigen, et al. The study on hemolytic activities and structure-activity relationships of eclalbasaponins from *Eclipta alba* [J]. Journal of Jiangxi Normal University(Natural Science), 2023, 47(6): 594-598.

文章编号:1000-5862(2023)06-0594-05

旱莲皂苷的溶血活性及构效关系研究

刘 怀¹, 叶向荣¹, 过七根², 张炳火^{2*}

(1.九江学院附属医院,江西 九江 300201;2.九江学院药学与生命科学学院,江西 九江 332005)

摘要:从旱莲草中分离到 7 个单体化合物,经波谱数据分析,鉴定为旱莲皂苷 eclalbasaponins I ~ VI (缩写为 E-I ~ E-VI) 和 β -香树素,其中 E-I ~ E-V 有溶血活性,活性强弱依次为 E-II > E-IV > E-V > E-I > E-III. 构效关系分析结果表明:C-28 位的游离羧基对旱莲皂苷的溶血活性强弱至关重要,C-3 位葡萄糖基的数量或硫酸酯化对其溶血活性也有影响.

关键词:旱莲草;旱莲皂苷;溶血活性;构效关系

中图分类号:Q 946 **文献标志码:**A **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2023.06.06

0 引言

三萜皂苷基本母核(苷元)由 30 个碳原子组成,具有抗肿瘤、抗菌、驱虫杀虫、抗炎症、抗氧化、护肝、抗高血糖和镇痛等多种生物活性^[1].与甾体皂苷类似,许多三萜皂苷具有溶血作用,这限制了其在医药上的应用^[2].因此,阐明三萜皂苷的结构与溶血活性之间的构效关系对其在医药上的应用具有重要意义.

齐墩果烷型三萜皂苷 C-28 位的化学基团在其溶血活性中起着重要作用,该位置的糖基化^[3-5]和甲酯化^[6-7]都可导致其溶血活性发生巨大变化,糖基类型和数目对其溶血活性也有重要影响^[3,5-6].此外,C-3 位的糖基种类和数目^[2,3,6,8-9]、C-4,6,12,16,20,23 和 24 位连接的化学基团^[3,9]也对其溶血活性产生影响.

菊科植物旱莲草(也称墨旱莲)(*Eclipta alba*, 或者 *Eclipta prostrata*)广泛生长在亚热带和热带地区中,是一种重要的药用植物^[10-11].旱莲草含有许多三萜皂苷和皂苷元,如 E-I ~ E-XII^[10,12-14]、eclalbatin、 α -香树素、齐墩果酸^[15]、刺囊酸^[16]等.然而,迄今为

止,鲜有关于旱莲皂苷溶血活性及构效关系的研究^[17].本文根据旱莲皂苷的显色特征,跟踪分离在旱莲草提取物中的三萜皂苷类化合物,并解析其结构,检测其体外溶血活性,分析其构效关系,为旱莲皂苷在医药上的开发应用提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

旱莲草采自江西省九江市郊区,由九江学院药学与生命科学学院张炳火教授鉴定,标本存放于九江学院药学与生命科学学院标本馆内.材料在采集后去除枯枝烂叶,在干燥后粉碎,在室温下保存.

1.2 血样准备

由九江学院附属医院检验科采用真空采血器 BD Medical Pleltal(含柠檬酸钠)从人体肘静脉采集 2 份血样,1 份直接用生理盐水稀释 50 倍,得到稀释全血;1 份在 2 000 rpm 下离心 5 min,去除血浆,血细胞沉淀用 10 倍血液体积的生理盐水洗涤 3 次,然后用 50 倍血液体积的生理盐水重悬获得重悬血细胞.

收稿日期:2023-04-28

基金项目:国家自然科学基金(31660096)资助项目.

作者简介:刘 怀(1965—),男,江西九江人,副主任技师,主要从事临床医学检验工作.E-mail: 80544331@qq.com

通信作者:张炳火(1968—),男,江西九江人,教授,博士,主要从事天然产物开发与研究.E-mail: binghuozh@126.com

1.3 早莲皂苷提取、分离与鉴定

取干燥早莲草全草粉末 6 000 g,用 v (去离子水): v (甲醇): v (乙醇): v (乙酸乙酯)=1:1:1:1的混合溶剂反复浸泡提取,合并提取液,在 50 ℃下减压蒸馏除去溶剂,得到膏状提取物.采用正相硅胶柱对提取物进行分离纯化,洗脱溶剂为 v (氯仿): v (甲醇)=1:0→20:1→15:1→10:1→5:1→3:1→0:1,用自动收集器收集,用 anis 显色剂^[18]显色各收集组分(早莲皂苷在薄层层析硅胶板上呈现紫红色),根据迁移率(R_f 值)和显色特征并样,将目标组分继续用正相硅胶柱分离,洗脱溶剂系统均为不同比例的氯仿/甲醇混合液,直至获得单体化合物.根据¹³C NMR(Bruker DRX-500 MHz,以四甲基硅烷为内标)、DEPT 和质谱(Agilent G6230 TOF MS)数据,结合文献,鉴定化合物化学结构.

1.4 溶血活性试验

采用玻片法确定化合物有无溶血活性,红细胞破裂和消失说明样品有溶血活性^[17].采用分光光度法检测化合物溶血率.简述如下:将 20 μL 皂苷样品溶液(溶剂为二甲亚砜)、980 μL 生理盐水和 1 mL 稀释血样混合均匀,36 ℃水浴 5 min,20 ℃、10 000 rpm离心 1 min,取上清,在 545 nm 下参比(将上述 20 μL 皂苷样品溶液用等体积二甲亚砜代替,经过同样处理后,以上清作为参比)调零后测吸光度.取 1 mL 血样,在 20 ℃、2 000 rpm 下离心 5 min,弃上清,血细胞沉淀加入 2 mL 去离子水,在经上述同样处理后,以去离子水为参比调零,测吸光度,作为阳性对照.皂苷溶血率计算公式为溶血

率/%= $A_t/A_p\times 100\%$,其中 A_t 和 A_p 分别为皂苷样品试验组和阳性对照组的吸光度.

1.5 数据处理

所有溶血试验重复 3 次,数据采用平均值±标准偏差表示,利用单因素方差对相关数据进行分析, $P<0.05$ 表示在统计学意义上差异显著.

2 结果与分析

2.1 化合物的分离与鉴定

从提取物中分离到 7 个化合物(编号为 1~7),均为白色或无色粉末性结晶,其中化合物 1 5 400 mg,化合物 2 1 100 mg,其他化合物 100~200 mg.质谱 ESI-MS, m/z : 795 [M_1-H]⁻、633 [M_2-H]⁻、957 [M_3-H]⁻、795 [M_4-H]⁻、713 [M_5-H]⁻、875 [M_6-H]⁻表明化合物 1~6 的相对分子质量分别为 796、634、958、796、714 和 876,分别与 E-I~E-VI 的相对分子质量相同,¹³C NMR 和 DEPT 数据(见表 1)显示它们的甲基、亚甲基、次甲基和季碳的数量与化学位移均与 E-I~E-VI 的一致^[10,13-14],故将它们分别鉴定为 E-I~E-VI(见图 1).质谱 EI-MS m/z 408 [M_7-H_2O]⁺、426 [M_7]⁺表明化合物 7 的相对分子质量为 426,其¹³C NMR(以 CDCl₃ 为内标)数据(15.5,15.6,16.8,18.4,23.5,23.7,26.0,26.2,26.9,27.2,28.1,28.4,31.1,32.5,32.7,33.4,34.7,37.0,37.2,38.6,38.8,39.8,41.7,46.8,47.2,47.6,55.2,79.0,121.7 和 145.2)与 β-香树素基本一致^[19],因此确认该化合物为 β-香树素(见图 1).

表 1 化合物 E-I~E-VI 的¹³C NMR(溶剂:dimethylsulfoxide- d_6 ;500 MHz)数据

C	E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V	E-VI	C	E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V	E-VI
1-CH ₂	38.7	38.6	38.8	38.7	38.3	38.7	25-CH ₃	15.7	15.7	15.8	15.7	15.4	15.8
2-CH ₂	26.0	24.6	26.1	26.1	25.6	25.9	26-CH ₃	17.1	17.3	17.1	17.3	17.3	17.2
3-CH	88.3	88.3	89.0	88.7	88.7	89.1	27-CH ₃	26.8	26.0	26.9	26.9	26.6	26.9
4-C	39.2	39.2	39.1	39.1	38.8	39.1	28-C	174.9	180.1	174.8	178.7	179.8	175.0
5-CH	55.6	55.5	55.7	55.6	55.2	55.5	29-CH ₃	33.0	33.0	33.0	33.1	33.0	33.0
6-CH ₂	18.2	18.2	18.2	18.3	17.9	18.2	30-CH ₃	24.6	26.8	24.6	24.6	24.7	24.6
7-CH ₂	33.2	33.3	33.3	33.3	32.9	33.3	1-CH	105.8	105.8	104.1	104.1	102.9	103.1
8-C	39.5	39.4	39.3	39.4	39.1	39.5	2-CH	74.4	74.4	81.8	81.7	79.4	79.7
9-CH	46.8	46.6	48.1	46.9	46.4	46.6	3-CH	78.2	77.3	77.1	77.3	76.6	76.9
10-C	36.7	36.7	36.7	36.8	36.4	36.7	4-CH	70.6	70.6	70.4	70.5	70.2	70.5
11-CH ₂	23.3	23.3	23.3	23.3	23.0	23.4	5-CH	77.1	77.0	76.8	76.8	76.3	76.7
12-C	121.8	121.6	121.8	121.7	120.9	121.8	6-CH ₂	61.6	61.6	61.5	61.4	61.2	61.5

表 1(续)

C	E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V	E-VI	C	E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V	E-VI
13-C	144.0	144.4	144.1	144.5	144.6	144.1	1'-CH			104.3	104.3		
14-C	41.4	40.5	41.4	41.5	41.2	41.4	2'-CH			75.7	75.7		
15-CH ₂	35.4	35.6	35.1	35.1	34.8	35.2	3'-CH			77.0	77.0		
16-CH	73.0	73.4	73.0	73.4	73.3	73.0	4'-CH			70.3	70.4		
17-C	48.1	47.7	49.1	47.8	47.7	48.2	5'-CH			76.6	76.6		
18-CH	40.5	41.4	40.6	40.5	40.4	40.6	6'-CH ₂			61.3	61.5		
19-CH ₂	46.6	46.8	46.6	46.6	46.7	46.9	1-CH	94.5		94.6		94.6	94.6
20-C	30.6	30.7	30.6	30.7	30.4	30.6	2-CH	72.9		72.9		72.9	72.9
21-CH ₂	35.1	35.1	35.5	35.6	35.4	35.5	3-CH	77.3		78.2		78.2	78.2
22-CH ₂	31.2	31.9	31.3	31.9	31.1	31.3	4-CH	69.9		70.0		70.0	70.0
23-CH ₃	28.1	28.1	28.0	28.0	27.7	28.0	5-CH	77.0		77.3		77.1	77.2
24-CH ₃	17.0	16.9	16.6	16.6	16.4	16.8	6-CH ₂	61.0		61.1		61.0	61.0

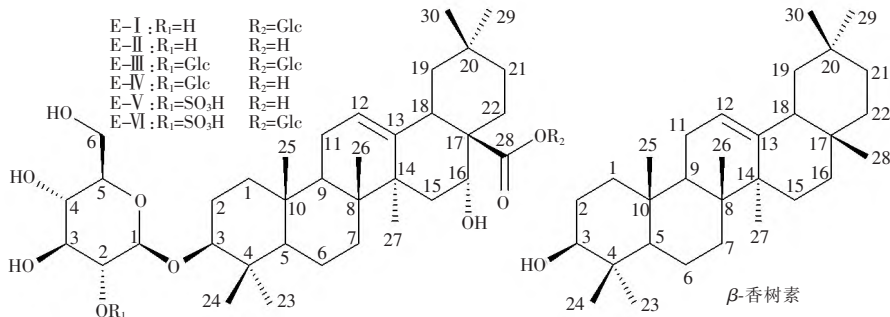


图 1 早莲皂苷 E-I~E-VI 和 β-香树素的化学结构

2.2 化合物的溶血活性

2.2.1 玻片溶血活性 玻片试验结果显示:除 β-香树素和 E-VI 外,其余 5 个早莲皂苷均有溶血活性,其中 E-III 溶血活性最弱,当其物质的量浓度为 16 mmol · L⁻¹ 时 3 min 后才出现微弱的溶血现象,当其物质的量浓度为 32 mmol · L⁻¹ 时 3 min 左右红细胞才全部消失;当 E-I 物质的量浓度小于 0.2 mmol · L⁻¹ 时没有出现凝血和溶血现象,当 E-I 物质的量浓度为 1.13 mmol · L⁻¹ 时先使红细胞凝集成团,然后才逐渐出现溶血现象,溶血率随着时间的延长而增加(见图 2).因此,该化合物在较高浓度下具有凝血和溶血双重活性;E-II、E-IV 和 E-V 均未见凝血活性,但它们的溶血活性均很强,在物质的量浓度为 0.05 mmol · L⁻¹ 时均会导致红细胞迅速溶解.

2.2.2 E-I、E-II、E-IV 和 E-V 的溶血率 分光光度法试验结果(见图 3)显示:当物质的量浓度为 0.1~0.4 mmol · L⁻¹ 时,E-I 对重悬血细胞的溶血率比稀释全血的溶血率高 2.2%~68.3%(P<

0.05, P<0.01);但当物质的量浓度 ≥ 0.5 mmol · L⁻¹ 时,E-I 对重悬血细胞和稀释全血的溶血率没有显著差异,均接近 100%(见图 3(a)).E-II 的溶血活性显著强于 E-IV 和 E-V,当物质的量浓度为 18 μmol · L⁻¹ 时,将导致重悬血细胞全部溶解(见图 3(b)),而 E-IV 和 E-V 在该浓度下对重悬血细胞没有溶血活性(见图 3(d)).与 E-I 类似,E-II 对稀释全血的溶血率显著低于重悬血细胞(P<0.01),只有在物质的量浓度 ≥ 33 μmol · L⁻¹ 时溶血率才能达到 100%(见图 3(c)).

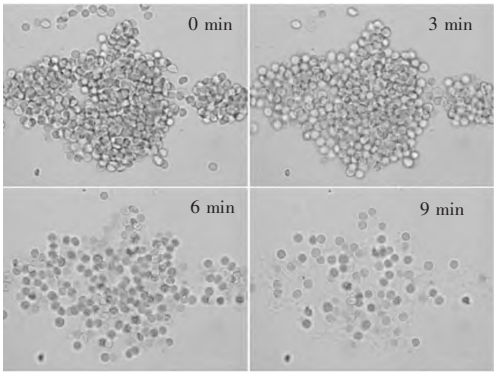
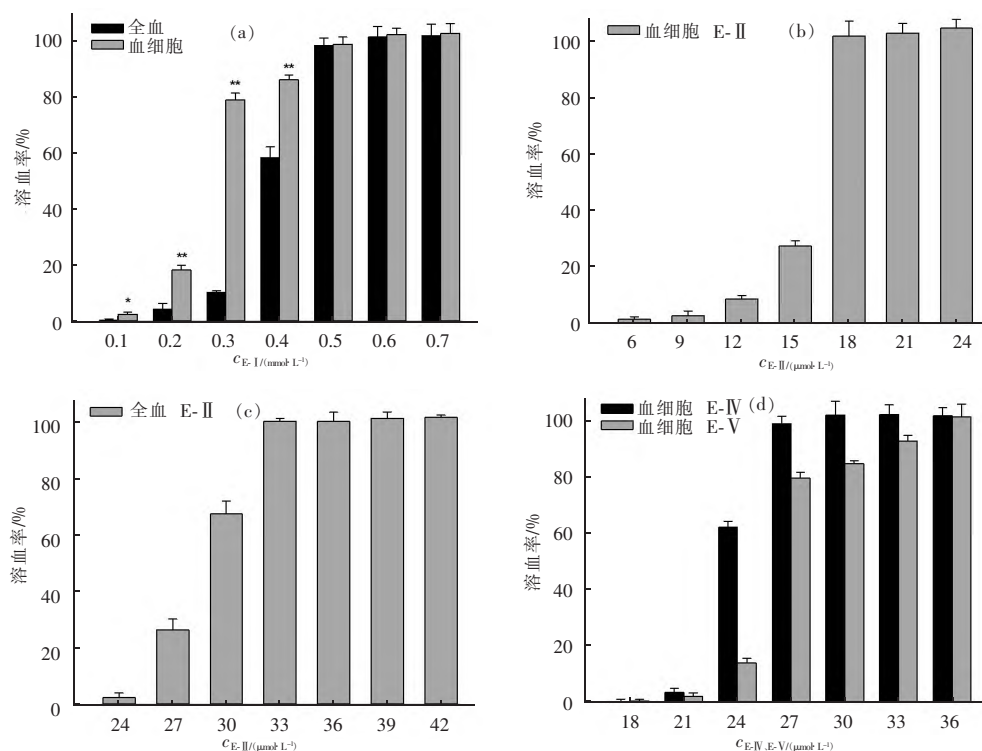


图 2 E-I 的凝血和溶血活性



注: * 和 ** 分别表示重悬血细胞与稀释全血的溶血率在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 的水平上差异显著。

图3 E-I、E-II、E-IV和E-V的溶血率与浓度关系

3 讨论

在通常情况下,皂苷与在红细胞膜上的胆固醇结合形成水不溶性复合物,使膜穿孔并溶血^[1]。胆固醇是血浆组成成分之一,重悬血细胞充分去除了血浆成分,无游离胆固醇,而稀释全血含有完整的血浆成分,有游离胆固醇,能够中和一定浓度的皂苷,降低其有效浓度和溶血率。这应该是溶血早莲皂苷对重悬血细胞溶血率显著高于对稀释全血溶血率的主要原因。

早莲皂苷主要包括齐墩果烷型和异齐墩果烷型^[10,12-14],其中E-I~E-VI均为齐墩果烷型。常春藤型三萜皂苷为齐墩果烷型皂苷,其C-28位的糖基化^[3-4]导致溶血活性下降,这与早莲皂苷E-I~E-VI类似,但早莲皂苷在C-28糖基化(见图1)后溶血活性下降幅度更大(见图3),这说明C-28游离羧基是齐墩果烷型早莲皂苷具有强溶血活性的关键基团之一。

α -常春藤皂苷的溶血活性远强于常春藤素^[3],这说明C-3位糖基化大大加强了其溶血活性。与此类似,刺囊酸只有微弱的溶血活性^[3],但其C-3位在葡萄糖基化后则形成了具有强溶血活性的早莲皂苷E-II、E-IV和E-V,因此,C-3位的葡萄糖基化是早莲皂苷具有溶血活性的重要条件之一。E-I和E-

II的溶血活性分别强于E-III和E-IV,这说明C-3位葡萄糖基数目的增加会导致其溶血活性降低,这与分离自*Platycodon grandiflorum*的齐墩果烷型皂苷类似^[8]。E-I和E-II的溶血活性分别强于E-VI和E-V,这说明C-3位葡萄糖基的C-2位硫酸酯化会导致溶血活性降低;E-IV和E-III的溶血活性分别高于E-V和E-VI,这说明与C-3位葡萄糖基的C-2位继续葡萄糖基化相比,该位置的硫酸酯化对溶血活性的降低作用更强。

总之,齐墩果烷型早莲皂苷C-28位游离羧基是其具有强溶血活性的重要条件,在该羧基与葡萄糖形成酯键后,会导致溶血活性极显著下降甚至丧失;而C-3位相连的糖苷键、葡萄糖基的数目及葡萄糖基的硫酸酯化均对其溶血活性产生不同影响。皂苷类化合物往往具有良好的抗肿瘤等多种生物活性,但溶血活性限制了其在抗肿瘤等药物研制中的应用。本研究对利用早莲皂苷研制低溶血活性的高效抗肿瘤等药物具有重要的参考价值。

4 参考文献

- [1] SPARG S G, LIGHT M E, STADEN J V. Biological activities and distribution of plant saponins [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 94(2): 219-243.

- [2] TONG Xiaohang, HAN Li, DUAN Huaqing, et al. The derivatives of *Pulsatilla* saponin A, a bioactive compound from *Pulsatilla chinensis*; their synthesis, cytotoxicity, haemolytic toxicity and mechanism of action [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 129: 325-336.
- [3] VO N N Q, FUKUSHIMA E O, MURANAKA T. Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogenins [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2017, 71(1): 50-58.
- [4] TOP H, SARIKAHYA N B, NALBANTSOY A, et al. Immunomodulatory, hemolytic properties and cytotoxic activity potent of triterpenoid saponins from *Cephalaria balansae* [J]. *Phytochemistry*, 2017, 137: 139-147.
- [5] VOUTQUENNE L, LAVAUD C, MASSIOT G, et al. Structure-activity relationships of hemolytic saponins [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2002, 40(4): 253-262.
- [6] TAKECHI M, TANAKA Y. Structure-activity relationships of the saponin α -hederin [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(2): 451-452.
- [7] CHWALEK M, LALUN N, BOBICHON H, et al. Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides; haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction [J]. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, 2006, 1760(9): 1418-1427.
- [8] SUN Hongxiang, CHEN Liqing, WANG Juanjuan, et al. Structure-function relationship of the saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* for hemolytic and adjuvant activity [J]. *International Immunopharmacology*, 2011, 11(12): 2047-2056.
- [9] HU Mei, KONOKI K, TACHIBANA K. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Lipids and Lipid Metabolism*, 1996, 1299(2): 252-258.
- [10] YAHARA S, DING Ning, NOHARA T. Oleanane glycosides from *Eclipta alba* [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1994, 42(6): 1336-1338.
- [11] DHAKA N, KOTHARI S L. Micropropagation of *Eclipta alba* (L.) hassk: an important medicinal plant [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant*, 2005, 41(5): 658-661.
- [12] YAHARA S, DING Ning, NOHARA T, et al. Taraxastane glycosides from *Eclipta alba* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(1): 131-135.
- [13] ZHANG Mei, CHEN Yayan. Isolation and identification of ecliptasaponin A and ecliptasaponin B from *Eclipta alba* (L.) Hassk [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 1996, 5(4): 177-181.
- [14] 赵越平, 汤海峰, 蒋永培, 等. 中药墨旱莲中的三萜皂苷 [J]. *药学报*, 2001, 36(9): 660-663.
- [15] UPADHYAY R K, PANDEY M B, JHA R N, et al. Eclalbatin, a triterpene saponin from *Eclipta alba* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2001, 3(3): 213-217.
- [16] HAN Lifeng, ZHAO Jing, ZHANG Yi, et al. Chemical constituents from dried aerial parts of *Eclipta prostrata* [J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2013, 5(4): 313-316.
- [17] 陈锐, 许群, 陈昱, 等. 旱莲草凝血和溶血活性成分的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(8): 1161-1164.
- [18] 张炳火, 张玉琴, 李汉全, 等. 链霉菌 JXJ-402 产生的抗生素 JXJ-402-1 的研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2007, 32(5): 280-281, 299.
- [19] 叶冠, 范明松, 黄成钢, 等. 抱茎苦蕒菜化学成分研究 [J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(21): 1613-1615.

The Study on Hemolytic Activities and Structure-Activity Relationships of Eclalbasaponins from *Eclipta alba*

LIU Huai¹, YE Xiangrong¹, GUO Qigen², ZHANG Binghuo^{2*}

(1. Affiliated Hospital, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi 332001, China;

2. College of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi 332005, China)

Abstract: Seven compounds are isolated from *Eclipta alba*. These compounds are identified as eclalbasaponins I ~ VI (abbreviated for E-I ~ E-VI) and β -amyrin based on the spectral data. Five compounds, namely E-I ~ E-V, show hemolytic activities that the decreasing order is E-II > E-IV > E-V > E-I > E-III. Analysis of structure-activity relationships indicates that free carboxyl at C-28 plays a crucial role in the hemolytic activities of eclalbasaponins. Both the amount and the sulfation of the glucosyl at C-3 also influence the hemolytic activities of eclalbasaponins.

Key words: *Eclipta alba*; eclalbasaponins; hemolytic activity; structure-activity relationships

(责任编辑: 刘显亮)