海南暗罗根中一个新的克罗烷型二萜

李小宝 宋小平* 陈光英* 韩长日
陈文豪 郑彩娟 宋鑫明

(海南师范大学化学与化工学院 热带药用植物化学教育部重点实验室 海口 571158)

摘要 采用硅胶柱层析, 制备薄层层析等色谱方法, 从海南暗罗根中分离得到 8 个二萜类化合物, 分别鉴定为 polyalimide A (1), kolavenic acid (2), 2-oxo-kolavenic acid (3), 2-oxo-14,15-bisnor-3,11E-kolavadien-13-one (4), 3,4-dihydroxyclerodan-13E-en-15-oic acid (5), longimide B (6), 16-oxocleroda-3,13E-dien-15-oic acid (7), solidagonal acid methyl ester (8). 其中化合物 1 为新化合物, 化合物 5 首次从番荔枝科分离得到, 所有化合物首次从该植物中分离得到. 化合物 2 和 3 对人肿瘤细胞 SPCA-1, SGC-7901 和 K-562 显示微弱的细胞毒性.

关键词 暗罗属; 海南暗罗; polyalimide A

A New Clerodane Diterpenoid from the Roots of *Polyalthia laui* Merr.

Li, Xiaobao Song, Xiaoping* Chen, Guangying* Han, Changri
Chen, Wenhao Zheng, Caijuan Song, Xinming

(Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158)

Abstract Eight clerodane-type compounds were isolated from the roots of *Polyalthia laui* and purified by silica gel column chromatography and preparative thin layer chromatography (TLC). Their structures were elucidated as polyalimide A (1), kolavenic acid (2), 2-oxo-kolavenic acid (3), 2-oxo-14,15-bisnor-3,11E-kolavadien-13-one (4), 3,4-dihydroxyclerodan-13E-en-15-oic acid (5), longimide B (6), 16-oxocleroda-3,13E-dien-15-oic acid (7), and solidagonal acid methyl ester (8). Compound 1 was a novel compound and compound 5 was isolated from this family for the first time, and all compounds were isolated for the first time from this plant material. Compounds 2 and 3 showed weakly inhibitory activities against SPC-A-1, SGC-7901 and K-562 human tumor cells.

Keywords *Polyalthia*; *Polyalthia laui* Merr.; polyalimide A

海南暗罗 (*Polyalthia laui* Merr.) 为番荔枝科 (Annonaceae) 暗罗属 (*Polyalthia*) 植物, 为海南特有种. 在印度民间, 暗罗属植物被用作传统退烧药、堕胎药、治疗高血压等药物^[1]. 在海南民间, 该属植物被用于治疗气滞腹痛、痛经、梅核气等疾病. 国内外学者从暗罗属植物中得到生物碱类、二萜类、三萜类等多种化学成分^[1]. 本课题组对海南暗罗根进行了抗肿瘤活性筛选, 结果发现其乙醇提取物对人肿瘤细胞 SPCA-1, SGC-7901 和 K562 具有良好的抑制效果 (SPCA-1 IC_{50} 值为 44.3 $\mu\text{g/mL}$, SGC-7901 IC_{50} 值为 6.74 $\mu\text{g/mL}$, K562 IC_{50} 值为 94.7 $\mu\text{g/mL}$)^[2]. 为深入探讨海南暗罗根的生物活性

成分, 本研究对海南暗罗根的化学成分进行了系统研究, 从中分离得到 8 个二萜类化合物: polyalimide A (1), kolavenic acid (2), 2-oxo-kolavenic acid (3), 2-oxo-14,15-bisnor-3,11E-kolavadien-13-one (4), 3,4-dihydroxy-clerodan-13E-en-15-oic acid (5), longimide B (6), 16-oxocleroda-3,13E-dien-15-oic acid (7), solidagonal acid methyl ester (8). 其中化合物 1 为新化合物, 化合物 5 首次从番荔枝科分离得到, 所有化合物首次从该植物中分离得到. 化合物 2, 3 对肿瘤细胞 SPCA-1, SGC-7901 和 K-562 具有微弱的抑制作用.

* E-mail: sxp628@126.com

Received May 15, 2013; revised May 28, 2013; published online June 4, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81160391, 21166009 and 21162009), the 973 Research Program of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2011CB512010).

国家自然科学基金 (Nos. 81160391, 21166009, 21162009) 和科技部 973 计划前期研究专项 (No. 2011CB512010) 资助项目.

图1 化合物1~8的结构

Figure 1 Structures of compounds 1~8

1 结果与讨论

1.1 结构鉴定

化合物 **1** 为白色粉末状固体, 易溶于氯仿, 254 nm 紫外灯下有暗斑, 与浓硫酸显黑色, $[\alpha]_D^{25} -25.4$ (c 0.036, CHCl_3). IR 在 1631 和 1650 cm^{-1} 处显示羰基和烯键的吸收信号, 3400 cm^{-1} 处显示 NH 信号.

HR-ESIMS [calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ 329.20603, found 329.20609] 推出该化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_3$, 不饱和度为 8. ^1H NMR 谱在高场区给出 4 个甲基信号 [δ_{H} 1.86 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.82 (d, 3H) 和 0.77 (s, 3H)]; 2 个次甲基信号 [δ_{H} 1.83 (dd, $J=10.8, 4.8\text{ Hz}$, 1H, H-10) 和 1.47 (m, 1H, H-8)], 在低场区给出 1 个活泼氢信号 [δ_{H} 10.72 (NH)] 和 2 个烯氢信号 [δ_{H} 6.50 (s, 1H) 和 5.62 (s, 1H)], 另外还给出 10 个质子信号. 在 ^{13}C NMR 谱中, 共给出 20 个碳信号, 其中包括 3 个羰基碳信号 (δ_{C} 198.7 为酮羰基碳信号, δ_{C} 172.4 和 170.2 为 2 个酰胺碳信号), 2 个双键碳信号 [δ_{C} 173.0 (C) 和 124.8 (CH); 150.4 (C) 和 127.1 (CH)], 4 个甲基碳信号 [δ_{C} 18.6 (C-18), 18.0 (C-19), 17.4 (C-20) 和 15.6 (C-17)] 另外还包括 9 个碳信号 (δ_{C} 45.1, 39.6, 38.4, 35.4, 34.8, 34.4, 26.5 和 18.2). 根据以上 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱数据 (表 1), 推测化合物 **1** 为克罗烷型二萜类化合物, 且侧链连接在 C-9 位. 化合物 **1** 侧链的结构是通过 ^1H - ^1H COSY, HSQC 和 HMBC 确定的. 在 ^1H - ^1H COSY 谱中 (图 2) H-11 和 H-12 有相关信号. 在 HMBC 谱中 (图 2), H-14 与 C-15, C-16 和 C-12 相关确定了顺丁烯二酰亚胺部分的结构, 且此部分结构与 C-12 相连. 该化合物的相对构型是通过耦合常数和 NOESY 谱确定. 在 ^1H NMR 谱中, $J_{10-1ax}=10.8\text{ Hz}$ 和 $J_{10-1eq}=4.8\text{ Hz}$ 确定 AB 环为反式连接. 化合物 **1** 的相对构型是通过与该物种中分离获得的已知克罗烷型二萜类化合物的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱数据比较以及 NOESY 谱确定

表 1 化合物 **1** 的核磁共振谱图数据 (400/100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
Table 1 NMR spectroscopic data (400/100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) for compound **1**

Position	^1H NMR (J in Hz)	^{13}C NMR
1	2.22, dd (16.8, 4.8) 2.40, dd (16.8, 10.8)	34.7, CH_2
2		198.7, $\text{C}=\text{O}$
3	5.62, s	124.8, CH
4		173.0, C
5		39.6, C
6	1.73~1.76, m	34.5, CH_2
7	1.44~1.50, m	26.5, CH_2
8	1.44~1.50, m	35.4, CH
9		38.4, C
10	1.83, dd (10.8, 4.8)	45.1, CH
11	1.44~1.50, m	34.5, CH_2
12	1.99~2.04, m	18.2, CH_2
13		150.4, C
14	6.50, s	127.1, CH
15		172.4, $\text{C}=\text{O}$
16		170.2, $\text{C}=\text{O}$
17	0.82, d (8.8)	15.6, CH_3
18	1.86, s	18.6, CH_3
19	1.06, s	18.0, CH_3
20	0.77, s	17.4, CH_3
NH	10.72, s

图 2 化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY (——) 相关和主要的 HMBC (→) 相关

Figure 2 ^1H - ^1H COSY (——) and key HMBC (→) correlations for compound **1**

的. 在 NOESY 谱中 (图 3), H-17 与 H-19 和 H-20 有相关,

图3 化合物1的NOESY相关

Figure 3 NOESY correlations of 1

与 H-10 和 H-8 没有相关信号, 说明 H-17, H-19 和 H-20 在 α 位, H-10 与 H-8 在 β 位. 至此确定化合物 1 的结构为 polyalimide A.

已知化合物 kolavenic acid (2)^[3], 2-oxo-kolavenic acid (3)^[4], 2-oxo-14,15-bisnor-3,11E-kolavadien-13-one (4)^[5], 3,4-dihydroxycycloclerodan-13E-en-15-oic acid (5)^[6], longimide B (6)^[7], 16-oxocleroda-3,13E-dien-15-oic acid (7)^[8], solidagonal acid methyl ester (8)^[9,10] 的结构是通过与文献数据比较确定的.

1.2 抗肿瘤活性测试

MTT 法评价化合物 1~4 对肿瘤细胞增殖抑制作用. 将对数生长期的 SPCA-1(人肺癌细胞)、SGC-7901(人胃癌细胞)和 K-562(人白血病细胞)配制细胞悬液, 分别接种于 96 孔培养板; 细胞贴壁后分别加入用 PBS 配制的浓度梯度的(0.1, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 六个浓度) 20 μL 化合物 1~4. 每组设 5 个复孔, 同时设空白对照和溶媒(DMSO)对照, 置于 37.0 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下, 培养 44 h 后, 每孔加入 50 μL MTT 溶液(1 mg/mL, PBS 配制), 作用 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 10 min, 在酶联免疫检测仪上选择 570 nm 波长处测吸光 A 值, 抑制率(%)=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值 $\times 100\%$, 结果表明化合物 2~3 对三种肿瘤细胞有微弱的增殖抑制作用(表 2).

表2 化合物 1~4 对肿瘤细胞的抑制活性
Table 2 Cytotoxic activities of compounds 1~4

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		
	SPCA-1	SGC-7901	K-562
1	94.5	96.76	62.73
2	15.6	17.2	18.9
3	49.0	38.0	26.9
4	>200	>200	>200
丝裂霉素 C ^a	1.68	3.61	16.56

^a 丝裂霉素 C 为阳性对照.

2 结论

运用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、制备薄层色谱等分离方法, 从海南暗罗根中分离得到 8 个二萜类化合物: polyalimide A (1), kolavenic acid (2), 2-oxo-kolavenic acid

(3), 2-oxo-14,15-bisnor-3,11E-kolavadien-13-one (4), 3,4-dihydroxycycloclerodan-13E-en-15-oic acid (5), longimide B (6), 16-oxocleroda-3,13E-dien-15-oic acid (7), solidagonal acid methyl ester (8). 其中化合物 1 为新化合物, 化合物 5 首次从番荔枝科分离得到, 所有化合物首次从该植物中分离得到. 化合物 2 和 3 对人肿瘤细胞 SPCA-1, SGC-7901 和 K-562 显示微弱的细胞毒性.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker AV-400 MHz 型核磁共振仪; EYELA N-1001 旋转蒸发仪; EYELA COOLACE CA-III 冷却水循环装置; YOKO-ZX 紫外分析暗箱; 薄层硅胶 GF₂₅₄; 柱色谱硅胶 200~300 目; 色谱柱(各种规格普通玻璃加压柱); 色谱试剂均为分析纯. 海南暗罗药材采自海南昌江县霸王岭自然保护区, 经海南师范大学生命科学学院钟琼蕊副教授鉴定为番荔枝科暗罗属植物 *Polyalthia plagioneura*. 标本现存于海南师范大学省部共建教育部热带药用植物化学重点实验室.

3.2 实验方法

海南暗罗根 15 kg 用 75% 的乙醇浸泡, 加热回流两小时, 过滤, 滤液 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至棕色干浸膏 1.2 kg. 将浸膏混悬于水中, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯进行萃取, 回收溶剂, 得石油醚部位 200 g, 氯仿部位 431 g, 乙酸乙酯部位 120 g.

石油醚部位浸膏(200 g), 进行硅胶柱层析, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 合并相同流份, 得到石油醚洗脱部分(Fr.1~Fr.10), Fr.4 经硅胶柱层析, 石油醚-乙酸乙酯($V:V=20:1\sim 0:1$)洗脱得到化合物 2 (27.6 mg), 3 (3.5 mg) 和 5 (5.5 mg). 氯仿部位(431 g)进行硅胶柱层析, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 合并相同流份, 得到氯仿洗脱部分(Fr.A~Fr.J). Fr.E 用氯仿-乙酸乙酯梯度洗脱得到三个组分, 用氯仿-乙酸乙酯($V:V=8:1$)进行洗脱得到化合物 1 (6.3 mg), 用氯仿-乙酸乙酯($V:V=6:1$)为展开剂进行薄层层析, 得到化合物 6 (3.3 mg) 和 8 (5.6 mg); Fr.F 用氯仿-甲醇($V:V=100:1\sim 15:1$)洗脱得到 2 个组分, 组分 1 经制备薄层层析, 氯仿-甲醇($V:V=1:10$)为展开剂, 得到化合物 7 (6.1 mg). 乙酸乙酯部位(120 g)进行硅胶柱层析, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 合并相同流份, 得到氯仿洗脱部分(Fr.1~Fr.10), Fr.5 用氯仿-乙酸乙酯($V:V=10:0\sim 0:1$)洗脱得到化合物 4 (3.6 mg).

References

- [1] Padmaa, M. P.; Khosa, R. L. *J. Pharm. Res.* **2009**, 2(4), 594.

- [2] Yuan, Y.; Huang, G. J.; Wang, T. S.; Chen, G. Y. *Phytother. Res.* **2010**, 27, 1.
- [3] Salah, M. A.; Bedir, E. *J. Agric Food Chem.* **2003**, 51(26), 7607.
- [4] Avila, D.; Medina, J. D. *Phytochemistry* **1991**, 30(10), 3474.
- [5] Kabir, S.; Rahman, M. S.; Sarwaruddin, A. M. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, 5(10), 1543.
- [6] Cavin, A. L.; Hay, A. E.; Marston, A.; Evans, H. S. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69(5), 768.
- [7] Sashidhara, K. V.; Singh, S. P.; Kant, R.; Maulik, P. R.; Sarkar, J. *Bioorg. Med. Lett.* **2010**, 20(19), 5767.
- [8] Kijjoa, A.; Pinto, M. M. M.; Pinto, P. M. M.; Herz, W. *Phytochemistry* **1993**, 34(2), 457.
- [9] Bohlmann, F.; Singh, P.; Singh, R. K.; Joshi, K. C.; Jakupovic, J. *Phytochemistry* **1985**, 24(5), 1114.
- [10] Tori, M.; Katto, A.; Sono, M. *Phytochemistry* **1999**, 52(3), 487.

(Cheng, F.)