毛叶鹰爪花中一个新颖的裂环多氧取代环己烯类化合物

刘艳萍^a 黄丽刚^a 汪晓翠^a 文成全^a 许莎莎^a
 宋小平^a 韩长日^a 陈光英^{*,a,b} 付艳辉^{*,a}

(^a 海南师范大学热带药用植物化学教育部重点实验室 海口 571158)

(^b 海南师范大学化学与化工学院 海口 571158)

摘要 综合运用多种现代色谱学分离方法对毛叶鹰爪花中的化学成分进行了研究, 从其枝叶的乙醇提取物中分离得到了3个裂环多氧取代环己烯类化合物, 采用多种现代波谱技术确定了这些化合物的化学结构, 分别鉴定为 artapilosol A (**1**), microcarpin A (**2**)和 uvarisubol B (**3**). 其中化合物 **1** 为一个新化合物, 化合物 **2** 和 **3** 为首次从鹰爪花属植物中分离得到的化合物. 化合物 **1**~**3** 的体外细胞毒性筛选结果表明它们对5种肿瘤细胞株(HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7和SW480)均显示出了较强的体外生长抑制活性, 它们的细胞毒活性与抗肿瘤阳性对照药顺铂相当.

关键词 鹰爪花属; 毛叶鹰爪花; artapilosol A; 细胞毒活性

A New Polyoxygenated Seco-cyclohexene Derivative from *Artabotrys pilosus*

Liu, Yanping^a Huang, Ligang^a Wang, Xiaocui^a Wen, Chenquan^a Xu, Shasha^a
 Song, Xiaoping^a Han, Changri^a Chen, Guangying^{*,a,b} Fu, Yanhui^{*,a,b}

(^a Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Ministry of Education,
 Hainan Normal University, Haikou 571158)

(^b College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158)

Abstract A new polyoxygenated seco-cyclohexene derivative, artapilosol A (**1**), together with two known polyoxygenated seco-cyclohexene derivatives, microcarpin A (**2**) and uvarisubol B (**3**), was isolated from the stems and leaves of *Artabotrys pilosus*. Their structures were established on the basis of extensive spectral data. This is the first report that polyoxygenated seco-cyclohexene derivatives were isolated from the genus *Artabotrys*. Cytotoxicities of compounds **1**~**3** were tested against five cancer cell lines (HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7 and SW480). Results showed that compounds **1**~**3** exhibited significant inhibitory effects with IC₅₀ values comparable to those of cisplatin.

Keywords *Artabotrys*; *Artabotrys pilosus*; artapilosol A; cytotoxicity

番荔枝科鹰爪花属(*Artabotrys*)在全世界约有100种植物, 主要分布于热带和亚热带地区, 我国出产四种, 即毛叶鹰爪花(*A. pilosus*)、狭瓣鹰爪花(*A. hainanensis*)、鹰爪花(*A. hexapetalus*)和香港鹰爪花(*A. hongkongensis*), 主要分布于海南、广东和广西等省区^[1]. 鹰爪花属植物

因富含抗肿瘤活性成分而受到国内外学者的广泛关注, 截至目前已从该属多种植物中分离鉴定了大量并具有显著生物活性的化合物, 如生物碱类^[2~5]、萜类^[6~8]、丁内酯类^[9]以及黄酮类^[10,11]等多种类型化合物. 毛叶鹰爪花(*A. pilosus*)为海南特有植物, 截至目前为止, 未发现

* E-mail: fuyanhu80@163.com; chgying123@163.com

Received May 5, 2015; revised May 25 2015; published online May 29, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31360069, 21162009), the Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 214027), the International S&T Cooperation Program of China (No. 2014DFA40850), the Major Technology Project of Hainan (No. ZDXM2015063), the Scientific Research Project of Hainan Colleges and Universities (No. HNKY2014-41) and the National Undergraduate Innovation Training Programs (Nos. 201411658031, 3010151053).

国家自然科学基金(Nos. 31360069, 21302181)、海南省自然科学基金(No. 214027)、国际科技合作与交流专项(No. 2014DFA40850)、海南省应用技术研发与示范推广专项(No. ZDXM2015063)、海南省高校科研(No. HNKY2014-41)和国家大学生创新训练计划(Nos. 201411658031, 3010151053)资助项目.

任何关于其化学成分及其药理活性的研究报道。本课题组一直致力于从热带药用植物中发现新的抗肿瘤活性物质,尤其是从海南特有的热带药用植物中发现结构新颖的抗肿瘤活性物质。在我们的前期研究中,对多种海南特有植物的抗肿瘤活性进行了初步筛选,筛选结果发现毛叶鹰爪花枝叶的乙醇提取物对 A549, SMMC-7721 和 SW480 等人肿瘤细胞株表现出了显著的生长抑制活性。对 A549, SMMC-7721 和 SW480 人肿瘤细胞株的生长抑制活性的 IC_{50} 值分别为 18.66, 8.23 和 23.28 $\mu\text{g/mL}$ 。为进一步阐明毛叶鹰爪花的抗肿瘤药效物质基础,并发现结构新颖的抗肿瘤活性物质,本研究对毛叶鹰爪花枝叶乙醇提取物的化学成分进行了系统研究,截止目前已经分离得到了 3 个裂环多氧取代环己烯类化合物,分别鉴定为 artapilosol A (**1**), microcarpin A (**2**) 和 uvarisubol B (**3**)(图 1)。其中化合物 **1** 为新化合物,化合物 **2** 和 **3** 为首次从鹰爪花属植物中分离得到的化合物。值得一提的是,据我们所知,裂环多氧取代环己烯类化合物是一类极其罕见的化合物类型,分布植物类群极其狭窄,主要分布于番荔枝科紫玉盘属植物中,截至目前为止仅报道 7 个该类型化合物^[12-15],本研究首次从鹰爪花属植物中发现这类罕见的裂环多氧取代环己烯类化合物,在植化分类学方面具有重要意义。此外,对化合物 **1~3** 的体外抗肿瘤活性进行了评价,结果表明化合物 **1~3** 对 HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7 和 SW480 等 5 种人肿瘤细胞株均表现出了显著地生长抑制活性。本文旨在报道这些化合物的提取分离、结构鉴定以及它们的细胞毒活性。

图 1 化合物 **1~3** 的分子结构

Figure 1 Molecular structures of compounds **1~3**

1 结果与讨论

化合物 **1** 为白色无定形粉末,易溶于氯仿,微溶于

甲醇; $[\alpha]_D^{25} -18.6$ (c 0.11, CH_3OH); 其 HR-ESIMS 给出该化合物分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_7$ (m/z : 411.1448 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. 411.1444), 不饱和度为 13; 在化合物 **1** 的 UV 光谱中,最大吸收峰 λ_{max} [$\lg[\epsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})]$] 分别在 205 (4.08), 228 (4.68), 275 (3.82) 和 282 (3.12) nm, 说明分子结构中存在着共轭体系。在 IR 光谱中显示出了单取代苯环 ($1593, 1453$ 和 708 cm^{-1}) 和酯羰基 (1728 和 1708 cm^{-1}) 的特征吸收峰。在 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 谱中,低场区存在 10 个芳香质子信号 [δ_{H} 7.45~8.06 (10H)], 说明分子中存在两个单取代苯环,结合在 ^{13}C NMR 谱 (100 MHz, CDCl_3) 低场区存在的 14 个 sp^2 杂化碳信号进行分析,提示分子中存在 2 个苯甲酰基结构; 在 ^1H NMR 谱低场区还存在 2 个相互耦合的烯烃质子信号 [δ_{H} 6.02 (dd, $J=15.7, 6.1\text{ Hz}$, 1H) 和 5.67 (dd, $J=15.7, 7.4\text{ Hz}$, 1H)], 推测分子中存在 1 个双键结构,且 ^{13}C NMR 谱和 DEPT 谱中两个低场区碳信号 (δ_{C} 130.8 和 129.7) 进一步支持了以上推断; 在 ^1H NMR 谱中 1 个甲基质子信号 [δ_{H} 2.10 (s, 3H)] 的存在以及在 ^{13}C NMR 谱中 2 个碳信号 (δ_{C} 170.0 和 21.0) 的存在,提示分子中存在 1 个乙酰基结构。此外,在 ^1H NMR 谱的高场区还存在 7 个质子信号,结合 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱进行分析,提示分子中还存在 2 个连氧的亚甲基和 3 个连氧的次甲基结构,由以上结构信息推断该化合物为裂环多氧取代环己烯类化合物^[15]。由于该化合物含有 13 个不饱和度,其中 2 个苯甲酰基、1 个乙酰基以及 1 个双键的存在解释了其中存在的 12 个不饱和度,因此结构中还应该存在 1 个环状结构。

综合分析 HSQC 谱和 ^1H - ^1H COSY 谱可以确定分子中 C(1)-C(7) 之间连接方式,剩下的关键问题是确定 2 个苯甲酰基和 1 个乙酰基的连接位置以及 1 个环状结构的存在。在 HMBC 谱中, $\text{H}_2(1)$ 与 C(7') (δ_{C} 166.1) 相关, $\text{H}_2(7)$ 与 C(7'') (δ_{C} 166.2) 相关,说明 2 个苯甲酰基分别连接在 C(1) 和 C(7) 位上; $\text{H}(2)$ 与 C(1'') (δ_{C} 170.0) 相关,说明乙酰基连接在 C(2) 上; 和 microcarpin A (**2**) 相比,化合物 **1** 的 C(5) 和 C(6) 在 ^{13}C NMR 谱中处于较高场,它们的化学位移值分别为 δ_{C} 55.3 [C(5)] 和 57.4 [C(6)], 说明 C(5) 和 C(6) 上的两个羟基通过脱水生成环氧结构,同时 $\text{H}(5)$ 与 C(3) (δ_{C} 129.7), C(4) (δ_{C} 130.8), C(6) 和 C(7) (δ_{C} 64.3) 的 HMBC 相关以及 $\text{H}(6)$ 与 C(4), C(5) (δ_{C} 55.3) 和 C(7) 的 HMBC 相关进一步证实了以上推断^[15], 如图 2 所示。 $\text{H}(3)$ 和 $\text{H}(4)$ 之间的偶合常数 (J) 为 15.8 Hz, 说明双键 ($\text{C}_3=\text{C}_4$) 为 *E* 式构型; $\text{H}(5)$ 和 $\text{H}(6)$ 之间的相对构型可由 $\text{H}(5)$ 和 $\text{H}(6)$ 之间的偶合常数 ($J=2.2\text{ Hz}$) 得以确定^[16], 而且,在化合物 **1** 的 ROESY 谱中, $\text{H}(4)$ 和 $\text{H}(6)$ 的 ROESY 相关以及 $\text{H}(5)$ 和 $\text{H}_2(7)$ 的 ROESY 相关进一步说明 $\text{H}-5$ 和 $\text{H}(6)$ 之间的反式构型关系^[17], 如图 3 所示。然而,由

于该类型化合物的化学键存在着自由旋转的性质, 该类化合物很难结晶, 尚未得到该类化合物的晶体数据. 因此, 根据目前已有的数据尚不能确定 C(2), C(5)和 C(6)的绝对构型. 至此, 确定了化合物 **1** 的化学结构, 如图 1 所示, 并命名为 artapilosol A.

图 2 化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY (—) 相关和关键的 HMBC (→) 相关

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

图 3 化合物 **1** 的关键的 ROESY (---) 相关

Figure 3 Key ROESY (---) correlations for compound **1**

化合物 **2** 和 **3** 为已知的裂环多氧取代环己烯类化合物, 经波谱分析与文献中相应化合物的波谱数据进行对照, 将它们分别鉴定为 microcarpin A (**2**)^[15] 和 uvarisubol B (**3**)^[13].

采用 MTS 法, 以 HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7 和 SW480 等 5 种常见人肿瘤细胞株为活性评价细胞株, 以顺铂为阳性对照药物, 对化合物 **1**~**3** 的体外抗肿瘤活性进行了评价. 实验结果表明化合物 **1**~**3** 对这 5 种肿瘤细胞株均显示出了显著的生长抑制活性, 它们对这些肿瘤细胞株的细胞毒活性与阳性对照药顺铂的活性相当, 而且, 对于某些细胞株的细胞毒活性强于阳性对照药物顺铂的活性, 具体活性数据如表 1 所示.

表 1 化合物 **1**~**3** 对肿瘤细胞的生长抑制活性^a

Table 1 Cytotoxic activities of compounds **1**~**3**

Compd.	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})^b$				
	HL-60	SMMC-7721	A-549	MCF-7	SW480
1	1.32 ± 0.12	6.37 ± 0.22	8.32 ± 0.12	12.20 ± 0.16	5.88 ± 0.06
2	12.26 ± 0.23	28.15 ± 0.48	19.22 ± 0.26	24.78 ± 0.21	10.29 ± 0.24
3	8.69 ± 0.18	16.33 ± 0.22	18.64 ± 0.21	6.68 ± 0.13	18.22 ± 0.19
Cisplatin ^c	1.64 ± 0.08	12.67 ± 0.18	16.88 ± 0.21	21.32 ± 0.21	26.48 ± 0.56

^a 所有结果用平均值±标准差来表示, 每组实验平行测定三次. ^b IC_{50} 为 50% 生长抑制浓度. ^c 顺铂为阳性对照.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Bruker AV-400 型核磁共振波谱仪(TMS 为内标); Agilent G3250AA LC/MSD TOF 质谱仪; Waters Micro-mass Q-TOF Micro System 质谱仪; JASCO DIP-370 型数字旋光仪; Bio-Rad FTS-135 型红外光谱仪; Beckman DU640 分光光度仪; Waters 600 半制备型高效液相色谱仪, Waters Spherisorb® ODS2 分析型色谱柱(5 μm , 4.6 mm×250 mm), Waters Spherisorb® ODS2 制备型色谱柱(5 μm , 20 mm×250 mm); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(安法玛西亚技术(上海)有限公司); 反相硅胶 RP-18 (Merck 公司); 柱层析硅胶和薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂).

2.2 植物标本

毛叶鹰爪花枝叶于 2014 年 4 月采集于海南省昌江县霸王岭国家森林公园, 经海南师范大学钟琮忠教授鉴定为番荔枝科鹰爪花属植物毛叶鹰爪花(*Artabotrys pilosus*). 凭证标本(标本号: FU20140418)保存于海南师范大学热带药用植物化学教育部重点实验室标本室.

2.3 提取与分离

将阴干的毛叶鹰爪花枝叶(40 kg)粉碎后, 用 95%乙醇冷浸提取, 每次提取一周, 提取四次, 提取液于 50 $^{\circ}\text{C}$ 温度下减压回收乙醇, 浓缩至棕黑色固体浸膏, 约得总浸膏 2.8 kg. 将总浸膏用水分散后, 依次用石油醚和乙酸乙酯进行萃取, 回收有机溶剂, 得石油醚部位 260 g 和乙酸乙酯部位 780 g. 乙酸乙酯部位经硅胶柱层析分离, 以石油醚-丙酮($V:V=1:19\sim1:1$)为洗脱剂进行梯度洗脱, 合并相同流份, 得到 10 个洗脱流份(Fr.1~Fr.10), Fr.2 进一步经反相硅胶柱层析分离, 以甲醇-水($1:1\sim1:0$)为洗脱剂进行梯度洗脱, 合并相同流份, 得到 5 个流份(Fr.2A~Fr.2F), Fr.2B 经 Sephadex-LH-20 柱色谱(甲醇)进一步纯化后, 经制备型高效液相色谱($\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, $V:V=75:25$)制备得到化合物 **1** (88.6 mg), **2** (26.8 mg) 和 **3** (33.9 mg).

表2 化合物1的NMR数据(CDCl₃)
Table 2 NMR spectral data of compound 1 (CDCl₃)

Position	δ_{H}^a	δ_{C}^b
1a	4.48 (dd, $J=11.8, 3.8$ Hz, 1H)	65.1 (t)
1b	4.36 (dd, $J=11.8, 6.9$ Hz, 1H)	
2	5.70 (1H, overlap)	70.9 (d)
3	6.02 (dd, $J=15.7, 6.1$ Hz, 1H)	129.7 (d)
4	5.67 (dd, $J=15.7, 7.4$ Hz, 1H)	130.8 (d)
5	3.42 (dd, $J=7.2, 2.2$ Hz, 1H)	55.3 (d)
6	3.24~3.16 (m, 1H)	57.4 (d)
7a	4.63 (dd, $J=12.3, 3.1$ Hz, 1H)	64.3 (t)
7b	4.25 (dd, $J=12.3, 5.7$ Hz, 1H)	
1'		129.6 (s)
1''		129.6 (s)
2', 6'	8.06 (d, $J=7.5$ Hz, 2H)	129.7 (d)
2'', 6''	8.02 (d, $J=7.5$ Hz, 2H)	129.8 (d)
3', 5'	7.46 (dd, $J=7.5, 7.5$ Hz, 2H)	128.5 (d)
3'', 5''	7.45 (dd, $J=7.5, 7.5$ Hz, 2H)	128.5 (d)
4'	7.58 (m, 1H)	133.3 (d)
4''	7.57 (m, 1H)	133.3 (d)
7'		166.1 (s)
7''		166.2 (s)
1'''		170.0 (s)
2'''	2.10 (s, 3H)	21.0 (q)

^a Measured at 400 MHz. ^b Measured at 100 MHz.

2.4 波谱数据

Artapilosol A (1): 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -18.6$ (c 0.11, CH₃OH); UV (CH₃OH) λ_{max} [$\lg \epsilon / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$]: 205 (4.08), 228 (4.68), 275 (3.82), 282 (3.12) nm; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)和¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)数据见表2; IR (KBr) ν_{max} : 3027, 2936, 2849, 1728, 1708, 1593, 1453, 1322, 1276, 1121, 1083, 708 cm⁻¹; HR-ESIMS calcd for C₂₃H₂₃O₇ (M+H)⁺ 411.1444, found 411.1448.

2.5 活性筛选

MTS 法评价化合物的抗肿瘤活性: 取含 10%胎牛血清的培养液(DMEM 或者 RPMI1640)配成单个细胞悬液, 以每孔 5000~10000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL , 加入待测化合物溶液(固定浓度 40 $\mu\text{mol/L}$ 初筛, 在该浓度对肿瘤细胞生长抑制率在 50%以上的化合物设 5 个浓度进入梯度复筛, 每孔终体积 200 μL , 每种处理均设 3 个复孔^[18]. 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加 MTS 溶液 20 μL 以及培养液 100 μL . 继

续孵育 1~4 h, 使反应充分进行. 选择 490 nm 波长, 酶联免疫检测仪(Bio-Rad 680)读取各孔光吸收值, 记录结果, 以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法计算化合物的 IC₅₀ 值^[19].

辅助材料(Supporting Information) 新化合物 1 的 ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HSQC, HMBC 和 ¹H-¹H COSY 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Flora Reipublicae Popularis Sinicae Editorial Board *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, Vol. 30, Science Press, Beijing, **1979**, p. 121 (in Chinese). (中国科学院中国植物志编委会, 中国植物志, 30 卷, 科学出版社, 北京, **1979**, p. 121.)
- [2] Zhou, Q.; Fu, Y. H.; Li, X. B.; Chen, G. Y.; Wu, S. Y.; Song, X. P.; Liu, Y. P.; Han, C. R. *Phytochem. Lett.* **2015**, *11*, 296.
- [3] Sichaem, J.; Ruksilp, T.; Worawalai, W.; Siripong, P.; Khumkratok, S.; Tip-pyang, S. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 422.
- [4] Hsieh, T. J.; Chang, F. R.; Chia, Y. C.; Chen, C. Y.; Lin, H. C.; Chiu, H. F.; Wu, Y. C. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1157.
- [5] Hsieh, T. J.; Chen, C. Y.; Kuo, R. Y.; Chang, F. R.; Wu, Y. C. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1192.
- [6] Gupta, C.; Prasad, S.; Sahai, M.; Asai, T.; Hara, N.; Fujimoto, Y. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 1925.
- [7] Zhang, L.; Zhou, W. S.; Xu, X. X. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 523.
- [8] Liang, X. T.; Yu, D. Q.; Wu, W. L.; Deng, H. C. *Acta Chim. Sinica* **1979**, *37*, 215 (in Chinese). (梁晓天, 于德泉, 吴伟良, 邓槐春, 化学学报, **1979**, *37*, 215.)
- [9] Wong, H. F.; Brown, G. D. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 99.
- [10] Li, T. M.; Yu, J. G. *Chin. Chem. Lett.* **1997**, *8*, 43.
- [11] Singh, A. P.; Sahai, M. *Planta Med.* **1996**, *62*, 192.
- [12] Chen, Z.; Liu, Y. L.; Xu, Q. M.; Liu, J. Y.; Duan, H. Q.; Yang, S. L. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2013**, *15*, 53.
- [13] Zhang, C. R.; Wu, Y.; Yue, J. M. *Chin. J. Nat. Med.* **2010**, *8*, 84.
- [14] Wang, S.; Chen, R. Y.; Yu, S. S.; Yu, D. Q. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2003**, *5*, 17.
- [15] Lu, Y. P.; Mu, Q.; Zheng, H. L.; Li, C. M. *Chin. Chem. Lett.* **1995**, *6*, 775.
- [16] Li, X. D.; Miao, F. P.; Ji, N. Y. *Molecules* **2011**, *16*, 8646.
- [17] Funel, C.; Berrue, F.; Roussakis, C.; Fernandez, R. R.; Amade, P. J. *Nat. Prod.* **2004**, *67*, 491.
- [18] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
- [19] Reed, L. J.; Muench, H. *Am. J. Hyg.* **1938**, *27*, 493.

(Zhao, C.)