

毛果南烛叶中的三萜皂苷化合物及其抗肿瘤活性

滕 杨^{†,a,b,c} 张涵淇^{†,b} 周俊飞^b 李永吉^{*,a} 姚广民^{*,b}^(a) 黑龙江中医药大学药学院 哈尔滨 150040)^(b) 华中科技大学同济医学院药学院 武汉 430030)^(c) 佳木斯大学药学院 佳木斯 1504007)

摘要 利用柱层析和高效液相色谱等分离技术从毛果南烛 *Lyonia ovalifolia* var. *hebecarpa* 的叶中分离得到了 3 个三萜皂苷类化合物, 借助 HRESIMS 和 NMR 等波谱手段以及化学方法鉴定其结构分别 3 β -O- α -L-阿拉伯吡喃糖氧基-齐墩果-12-烯-23,25-二醇(**1**)、3 β -O- α -L-阿拉伯吡喃糖氧基-齐墩果-12-烯-1 β ,23-二醇(**2**)和 25-羟基-3 β -O- β -D-葡萄糖吡喃糖氧基-24 α -O- α -L-阿拉伯吡喃糖氧基-9,10-开环-羊毛脂烷-10-烯-30-酸(**3**)。化合物 **1** 及其苷元是新化合物, 已知化合物 **2** 和 **3** 均为首次从该植物中分离得到。首次对化合物 **2** 及其苷元进行了 NMR 数据归属。同时, 筛选了所得 3 个三萜皂苷化合物 **1**~**3** 的体外抗肿瘤活性, 结果显示化合物 **2** 对五种肿瘤细胞 HL-60、MCF-7、SMMC-7221、A-549 和 SW480 的增殖均有显著的抑制作用, 其半数抑制浓度(IC₅₀)分别为(16.35 $\pm$ 0.25)、(17.05 $\pm$ 0.52)、(17.66 $\pm$ 0.21)、(15.87 $\pm$ 0.26)和(12.30 $\pm$ 0.36) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而且对 MCF-7、A-549 和 SW480 细胞增殖的抑制活性均优于阳性对照药物顺铂。

关键词 毛果南烛; 杜鹃花科; 珍珠花属; 三萜皂苷; 抗肿瘤活性

Triterpenoid Glycosides from the Leaves of *Lyonia ovalifolia* var. *hebecarpa* and Their Antitumor ActivitiesTeng, Yang^{†,a,b,c} Zhang, Hanqi^{†,b} Zhou, Junfei^b Li, Yongji^{*,a} Yao, Guangmin^{*,b}^(a) School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040)^(b) School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)^(c) College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007)

Abstract Three triterpenoid glycosides were isolated from the leaves of *Lyonia ovalifolia* var. *hebecarpa* by separation techniques such as column chromatograph and HPLC, and their structures were determined to be 3 β -O- α -L-arabinopyranosyloxy-olean-12-ene-23,25-diol (**1**), 3 β -O- α -L-arabinopyranosyloxy-olean-12-ene-1 β ,23-diol (**2**), and 3 α -[(β -D-glucopyranosyl)-oxy]-24 α -[(α -L-arabinopyranosyl)-oxy]-25-hydroxy-9,10-*seco*-cycloaran-1(10)-en-30-oic acid (**3**), respectively, by HRESIMS and NMR data analysis, as well as chemical methods. Compound **1** and its aglycone are new compounds, and compounds **2** and **3** were isolated from *Lyonia ovalifolia* var. *hebecarpa* for the first time. This is the first report of the NMR data assignment of compound **2** and its aglycone. The *in vitro* anti-tumor activities of compounds **1**~**3** were evaluated, and compound **2** showed anti-proliferation activities against five cancer cell lines HL-60, MCF-7, SMMC-7221, A-549 and SW480 with IC₅₀ values of (16.35 $\pm$ 0.25), (17.05 $\pm$ 0.52), (17.66 $\pm$ 0.21), (15.87 $\pm$ 0.26) and (12.30 $\pm$ 0.36) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, and showed more potent anti-proliferation than the positive control, *cis*-platin, against MCF-7, A-549, and SW480 cell lines.

Keywords *Lyonia ovalifolia* var. *hebecarpa*; ericaceae; *Lyonia*; triterpenoid glycosides; antitumor activities

杜鹃花科(Ericaceae)珍珠花属(*Lyonia*)植物为落叶灌木或小乔木, 全世界约有 35 种, 主要分布在亚洲东部和北美地区。我国有 6 种和 5 变种, 多分布于东部和西南部^[1]。毛果南烛(*Lyonia ovalifolia* var. *hebecarpa*), 也

称为毛果珍珠花、毛果米饭花, 是珍珠花(*L. ovalifolia*)的一个变种, 生于海拔 1400~3400 m 的阳坡灌丛中, 主要产于江苏、安徽、浙江、广东、广西、四川、云南西北部等地, 茎、叶可药用, 有强筋益气、收敛止泻效用。

* Corresponding authors. E-mail: gyap@mail.hust.edu.cn; liyongji2009@163.com

Received May 3, 2017; revised May 19, 2017; published online May 24, 2017.

Project supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2016YXMS148).

中央高校基本科研业务费基金(No. 2016YXMS148)资助项目。

[†] 共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

文献调研发现, 日本学者早在 1959 年就开始对珍珠花的变种小果珍珠花(*L. ovalifolia* var. *elliptica*)进行了研究^[2~9], 最近几年才开始对原变种珍珠花(*L. ovalifolia* var. *ovalifolia*)^[10~16]进行研究, 从中分离得到了二萜^[6,7,10,12]、三萜^[8,9,11]、木脂素^[2,3,5,13,14,16]、黄酮^[4,15,16]等多种结构类型的化合物, 部分化合物具有显著的抗菌^[10]、抗病毒活性^[11]和神经药理活性^[12]。然而, 对变种毛果南烛(*L. ovalifolia* var. *hebecarpa*)的化学成分研究较少^[17], 仅分离得到了一个新的 megastigmane 型倍半萜苷化合物毛果南烛素甲, 以及 β -谷甾醇和胡萝卜苷, 但未报道其生物活性。为了进一步开发利用毛果南烛, 本文对采自浙江缙云县的毛果南烛(*Lyonia ovalifolia* var. *hebecarpa*)叶子进行了化学成分研究, 从中分离得到了 3 个三萜皂苷类化合物, 借助 HRESIMS 和 NMR 等现代波谱手段以及化学方法鉴定了其结构。其中化合物 **1** 及其苷元 **1a** 是新化合物, 已知化合物 **2** 和 **3** 均为首次从该植物中分离得到, 并首次报道了化合物 **2** 及其苷元 **2a** 的 NMR 数据归属。此外, 筛选了所得 3 个三萜皂苷类化合物 **1~3** 的体外抗肿瘤活性, 结果显示化合物 **2** 对五种肿瘤细胞 HL-60、MCF-7、SMMC-7221、A-549 和 SW480 的增殖均有显著的抑制作用, 且对 MCF-7、A-549 和 SW480 细胞增殖的抑制活性优于阳性对照药物顺铂。本文将报道毛果南烛叶 3 个三萜皂苷类化合物 **1~3** 的提取、分离、结构鉴定和抗肿瘤活性。

1 结果与讨论

毛果南烛叶子用 95%乙醇提取三次, 提取物液合并、减压浓缩后得浸膏, 用温水混悬后, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取得四个部位。氯仿部位经正相硅胶、反相硅胶和 Sephadex LH-20 等反复柱层析, 最后经 HPLC 纯化分离得到 3 个三萜皂苷类化合物 **1~3**, 结构见图 1。

1.1 新化合物 1 的结构鉴定

化合物 **1** 为白色粉末, 易溶于甲醇。化合物 **1** 的高分辨电喷雾质谱(HRESIMS)在 m/z 613.4097 处显示出 $[M+Na]^+$ 离子峰, 结合化合物 **1** 的 ^{13}C NMR 数据推测, 其分子式为 $C_{35}H_{58}O_7$ ($C_{35}H_{58}O_7Na$ 的计算值为 613.4080), 计算其不饱和度为 7。

化合物 **1** 的 1H NMR (表 1)谱图中在 δ_H 5.18 (t, $J=3.3$ Hz, H-12)处显示 1 个烯质子信号, 在 δ_H 0.77 (s, H₃-24), 0.86 (s, H₃-28), 0.88 (s, H₃-29), 0.89 (s, H₃-30), 1.12 (s, H₃-26), 1.17 (s, H₃-27)处显示 6 个单峰甲基信号, 在 δ_H 4.01 (d, $J=12.3$ Hz, H-25a), 4.07 (d, $J=12.3$ Hz, H-25b), 3.29 (d, $J=11.5$ Hz, H-23a), 3.63 (d, $J=11.5$ Hz, H-23b)处显示两组具有 AB 自旋系统的连氧亚甲基信号,

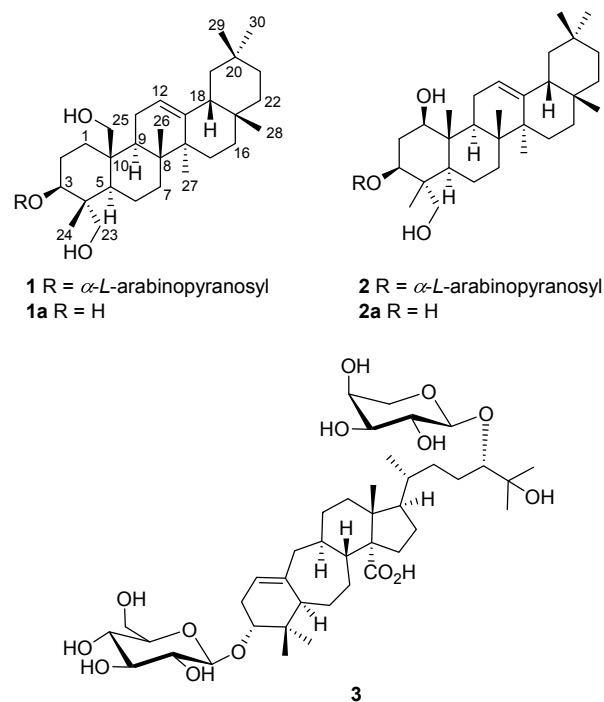


图 1 三萜皂苷化合物 **1~3** 以及化合物 **1** 和 **2** 的苷元 **1a** 和 **2a** 的化学结构

Figure 1 Chemical structures of triterpenoid glycosides **1~3**, and the aglycones **1a** and **2a** of compounds **1** and **2**

在 δ_H 4.33 (d, $J=6.8$ Hz, H-1'), 3.52~3.55 (m, H-2'), 3.51 (d, $J=3.3$ Hz, H-3'), 3.78~3.81 (m, H-4'), 3.55 (dd, $J=12.3, 2.7$ Hz, H₂-5'a), 3.85 (dd, $J=12.3, 2.7$ Hz, H₂-5'b)显示出一组典型的阿拉伯吡喃糖的信号^[10]。

在 ^{13}C NMR (表 2)谱中显示化合物 **1** 有 35 个碳信号, 结合其 DEPT 和 HSQC 谱, 可以将 35 个碳信号归属为 6 个甲基(δ_C 13.8, C-24; 18.2, C-26; 27.2, C-27; 29.1, C-28; 34.0, C-29; 24.2, C-30); 13 个亚甲基, 其中包含 3 个连氧亚甲基(δ_C 62.4, C-25; 65.1, C-23; 66.9, C-5'); 9 个次甲基, 其中包含 5 个连氧次甲基(δ_C 69.9, C-4'; 73.1, C-2'; 74.9, C-3'; 83.7, C-3; 106.6, C-1')和 1 个 sp^2 杂化次甲基(δ_C 124.1, C-12); 7 个季碳, 其中包含 6 个 sp^3 杂化季碳(δ_C 32.1, C-20; 33.7, C-17; 41.4, C-8; 42.1, C-14; 43.3, C-10; 44.0, C-4)和 1 个 sp^2 杂化季碳(δ_C 146.1, C-13)。化合物 **1** 糖部分的 ^{13}C NMR 数据(δ_C 66.9, C-5'; 69.9, C-4'; 73.1, C-2'; 74.9, C-3'; 106.6 C-1')与文献报道的 3 α -[(α -L-arabinopyranosyl)-oxy]-24S-[(α -L-arabinopyranosyl)-oxy]-25-hydroxy-9,10-*seco*-cycloartan-1(10)-en-30-oic acid 的阿拉伯糖部分 ^{13}C NMR 数据基本一致^[11], 初步证实化合物 **1** 的糖部分是阿拉伯吡喃糖。从化合物 **1** 的分子式 $C_{35}H_{58}O_7$ 可知其不饱和度为 7, 分子中还有的一个双键和一个阿拉伯吡喃糖环各占去一个不饱和度, 还剩 5 个不饱和度, 说明分子中还应五个环。因此, 化合物 **1**

表 1 化合物 **1**, **1a**, **2** 和 **2a** 的 ^1H NMR (δ_{H} , J in Hz, 400 MHz, CD_3OD) 波谱数据
Table 1 ^1H NMR (δ_{H} , J in Hz, 400 MHz, CD_3OD) spectroscopic data of compounds **1**, **1a**, **2** and **2a**

No.	1	1a	2	2a
1 α	0.79, dd, 13.1, 4.8	0.79, dd, 13.2, 4.8	3.34, dd, 12.1, 3.4	3.34, dd, 11.8, 3.1
1 β	2.29, dt, 13.1, 3.4	2.30, dt, 13.2, 3.4		
2 α	0.97~1.02, m	0.98~1.02, m	0.98~1.01, m	0.98~1.01, m
2 β	1.84~1.88, m	1.84~1.88, m	1.82~1.88, m	1.82~1.86, m
3 α	3.63, dd, 5.2, 11.3	3.64, dd, 5.1, 11.3	3.66, dd, 5.7, 12.8	3.65, dd, 5.7, 12.9
5 α	1.74~1.79, m	1.69~1.74, m	1.12~1.14, m	1.12~1.14, m
6 α	1.07~1.11, m	1.09~1.11, m	1.08~1.11, m	1.09~1.11, m
6 β	1.35~1.39, m	1.35~1.41, m	1.51~1.54, m	1.51~1.55, m
7 α	1.68, ddd, 16.5, 12.3, 4.8	1.66, ddd, 16.5, 12.3, 4.8	1.62, ddd, 16.2, 12.2, 4.8	1.62, ddd, 16.2, 12.2, 4.5
7 β	1.32, ddd, 16.5, 5.2, 3.4	1.32, ddd, 16.5, 5.2, 3.4	1.31, dt, 12.3, 2.8	1.31, dt, 12.3, 2.8
9 α	1.70, dd, 5.9, 11.9	1.71, dd, 5.4, 11.5	1.82, dd, 11.4, 5.8	1.83, dd, 11.3, 5.9
11 α	2.04, ddd, 16.5, 12.0, 5.7	2.10, ddd, 16.5, 12.0, 5.7	2.07, ddd, 16.6, 12.4, 3.4	2.07, ddd, 14.1, 13.3, 3.4
11 β	2.46, ddd, 16.5, 12.0, 5.7	2.46, ddd, 16.5, 12.0, 5.7	2.47, ddd, 16.6, 12.3, 4.8	2.47, ddd, 14.1, 13.5, 4.4
12	5.18, t, 3.3	5.17, t, 3.4	5.18, t, 3.5	5.18, t, 3.5
15 α	0.97~1.03, m	0.97~1.03, m	0.97~0.99, m	0.97~0.99, m
15 β	2.01~2.07, m	2.01~2.07, m	2.01~2.07, m	2.01~2.07, m
16 α	0.95~1.00, m	0.99~1.11, m	0.97~1.03, m	0.97~1.02, m
16 β	1.80~1.82, m	1.82~1.87, m	1.72~1.77, m	1.76~1.78, m
18 β	1.92, dd, 13.4, 3.6	1.93, dd, 13.4, 3.6	1.92, dd, 12.4, 4.6	1.96, dd, 13.6, 4.0
19 α	0.98~1.01, m	0.97~1.02, m	0.99~1.02, m	1.00~1.03, m
19 β	1.69~1.74, m	1.68~1.73, m	1.71~1.75, m	1.70~1.76, m
21 α	1.09~1.12, m	1.09~1.12, m	1.09~1.13, m	1.10~1.13, m
21 β	1.34~1.40, m	1.34~1.40, m	1.37~1.39, m	1.38~1.42, m
22 α	1.45, dd, 12.7, 3.5	1.45, dd, 12.7, 3.5	1.45, dd, 12.7, 3.4	1.45, dd, 12.7, 3.4
22 β	1.23, dt, 12.7, 3.2	1.23, dt, 12.7, 3.2	1.23, dt, 12.7, 3.2	1.23, dt, 12.7, 3.2
23 α	3.29, d, 11.5	3.29, d, 11.5	3.28, d, 11.2	3.30, d, 11.2
23 β	3.63, d, 11.5	3.53, d, 11.5	3.60, d, 11.2	3.62, d, 11.2
24	0.77, s	0.75, s	0.70, s	0.68, s
25 α	4.01, d, 12.3	3.98, d, 12.6	1.01, s	1.01, s
25 β	4.07, d, 12.3	4.08, d, 12.6		
26	1.12, s	1.11, s	1.03, s	1.02, s
27	1.17, s	1.17, s	1.18, s	1.17, s
28	0.86, s	0.86, s	0.84, s	0.85, s
29	0.88, s	0.88, s	0.88, s	0.88, s
30	0.89, s	0.89, s	0.89, s	0.89, s
1'	4.33, d, 6.8		4.32, d, 6.7	
2'	3.52~3.55, m		3.50~3.54, m	
3'	3.51, d, 3.3		3.51, d, 3.3	
4'	3.78~3.81, m		3.78~3.81, m	
5'a	3.55, dd, 12.3, 2.7		3.55, dd, 12.3, 2.7	
5'b	3.85, dd, 12.3, 2.7		3.85, dd, 12.3, 2.7	

可能是一个五环三萜阿拉伯吡喃糖苷化合物。

除了阿拉伯吡喃糖部分以外, 化合物 **1** 的苷元部分的 NMR 数据与文献报道的 (3 β)-olean-12-ene-3,23-diol^[18] 的 NMR 数据相似, 主要不同之处在于化合物 **1** 中有一个连氧亚甲基 (δ_{H} 4.01, d, $J=12.3$ Hz, H-25a; 4.07, d, $J=12.3$ Hz, H-25b; δ_{C} 62.4, C-25), 取代了已知化合物 (3 β)-olean-12-ene-3,23-diol 中的甲基 (δ_{H} 0.99, s, H₃-25; δ_{C} 16.1, C-25)。化合物 **1** 中的 HMBC 谱图中出现的从 H₂-25 到 C-1 (δ_{C} 34.5), C-5 (δ_{C} 48.2), C-9 (δ_{C} 49.7) 和 C-10 (δ_{C}

43.3) 的交叉峰说明了连氧亚甲基 C-25 确实连在 C-10 上。此外, 化合物 **1** 中出现的阿拉伯吡喃糖的端基质子 H-1' (δ_{H} 4.33, d, $J=6.8$ Hz) 到 C-3 (δ_{C} 83.7) 的 HMBC 相关峰, 以及 H-3 (δ_{H} 3.63, dd, $J=5.2, 11.3$ Hz) 到阿拉伯吡喃糖的端基碳 C-1' (δ_{C} 106.6) 的 HMBC 相关峰说明阿拉伯吡喃糖连接在 C-3 上。综合分析化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY, HSQC 和 HMBC 相关二维谱图 (图 2), 可以确定化合物 **1** 的平面结构为 3-O-阿拉伯吡喃糖氧基-齐墩果-12-烯-23,25-二醇。

表 2 化合物 **1**, **1a**, **2** 和 **2a** 的 ^{13}C NMR 波谱数据(100 MHz, CD_3OD)
Table 2 ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) spectroscopic data of compounds **1**, **1a**, **2**, and **2a**

No.	1	1a	2	2a	No.	1	1a	2	2a
1	34.5	34.5	80.7	80.6	19	48.2	48.2	48.2	48.2
2	33.4	33.7	37.0	38.0	20	32.1	32.1	32.1	32.1
3	83.7	74.0	80.4	71.1	21	36.0	36.0	36.0	36.0
4	44.0	43.5	44.0	44.0	22	38.4	38.4	38.4	38.4
5	48.2	48.1	46.0	46.7	23	65.1	67.4	64.8	66.9
6	18.6	18.9	18.6	18.9	24	13.8	13.1	13.3	13.1
7	27.4	27.4	33.5	33.6	25	62.4	62.3	12.6	12.7
8	41.4	41.4	41.7	41.7	26	18.2	18.2	18.0	18.0
9	49.7	49.9	49.8	49.9	27	27.2	27.2	26.7	26.7
10	43.3	43.3	44.0	43.5	28	29.1	29.1	29.1	29.1
11	26.5	26.5	28.4	28.4	29	34.0	34.0	34.0	34.0
12	124.1	124.0	124.4	124.4	30	24.2	24.2	24.2	24.2
13	146.1	146.1	145.4	145.4	1'	106.6		106.6	
14	42.1	42.3	43.0	42.9	2'	73.1		73.1	
15	28.2	28.1	28.2	28.1	3'	74.9		74.7	
16	27.4	27.4	27.5	27.5	4'	69.9		69.9	
17	33.7	33.7	33.7	33.7	5'	66.9		67.1	
18	48.8	48.7	48.7	48.7					

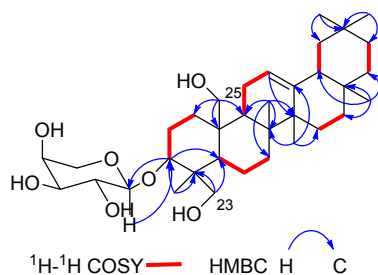


图 2 化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 及关键的 HMBC 相关图
Figure 2 ^1H - ^1H COSY and Key HMBC correlations of compound **1**

化合物 **1** 的相对构型(图 3)是通过偶合常数和 NOESY 谱图分析来确定的. H-3 (δ 3.63, dd)与 H_2 -2 的偶合常数分别为 $J=5.2$ 和 11.3 Hz, 偶合常数较大说明 H-3 处于环己烷椅式构象的直立键(a 键)上. 因此 H-3 应为 α 方向^[18], 相应的 C-3 位氧苷键处在 β 方向. 在化合物 **1** 的 NOESY 谱图中, H-3 与 H-23 (δ_{H} 3.29, d)之间有交叉峰, 说明 H_2 -23 也处在 α 方向, 那么 C-4 上的甲基 24- CH_3 (δ_{H} 0.77, s)就在 β 方向. 24- CH_3 与 H_2 -25 (δ_{H} 4.01, 4.07)存在 NOESY 相关, 说明 H_2 -25 也在 β 方向, 这与经典的齐墩果烷三萜化合物的相对构型一致^[19]. 化合物 **1** 的其它 NOESY 相关信息进一步确定了其相对构型(图 3).

为了确定阿拉伯吡喃糖的绝对构型, 将化合物 **1** (6 mg)进行酸水解, 并进一步分离纯化, 分别得到了苷元 **1a** (1.2 mg)和阿拉伯糖(0.5 mg). 水解得到的阿拉伯糖(0.5 mg)溶于无水吡啶, 在 65°C 下与 2 mg L -半胱氨酸甲酯盐酸盐反应 2 h, 制备阿拉伯糖的手型噻唑啉衍生物. 不经分离, 直接加入 N -三甲基硅咪唑继续反应

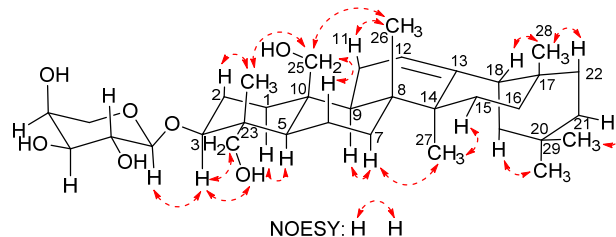


图 3 化合物 **1** 的关键 NOESY 相关图
Figure 3 Key NOESY correlations of compound **1**

1.5 h, 生成阿拉伯糖手型噻唑啉衍生物的三甲基硅醚衍生物. 用同样的方法制备标准 L -和 D -阿拉伯糖的三甲基硅醚衍生物. 之后用气相色谱(GC)在同样条件下分析三种阿拉伯糖的三甲基硅醚衍生物的保留时间. 结果显示, 化合物 **1** 中阿拉伯糖、标准 D -和 L -阿拉伯糖的硅烷化衍生物的保留时间分别为 8.906、9.136 和 8.829 min, 由此可以确定化合物 **1** 中的糖为 L -阿拉伯糖. 化合物 **1** 中阿拉伯吡喃糖端基质子(δ 4.33, d)的偶合常数 $J=6.8$ Hz, 由此可以确定化合物 **1** 中阿拉伯糖的构型为 α - L -阿拉伯吡喃糖.

除了得到阿拉伯糖外, 酸水解化合物 **1** 还得到苷元 **1a**, 通过比较 **1a** 和 (3β) -olean-12-ene-3,23-diol^[18]的 NMR 数据相似, 并经 ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC 和 NOESY 等 2D NMR 数据分析确定其结构为齐墩果-12-烯- $3\beta,23,25$ -三醇. 齐墩果烷类三萜化合物的绝对构型均已确定^[19], 且没有对映-齐墩果烷类三萜化合物报道, 因此, 从生源关系角度可以推测其绝对构型为 $3S^*,4R^*,5R^*,8R^*,9S^*,10S^*,14S^*,17R^*,18R^*$.

综上所述, 化合物 **1** 的结构确定为 3β - O - α - L -阿拉伯

吡喃糖氧基-齐墩果-12-烯-23,25-二醇。

1.2 化合物 2 的结构鉴定

化合物 2 为白色粉末, 易溶于甲醇。HRESIMS 在 m/z : 613.4078 显示该化合物的 $[M+Na]^+$ 为准分子离子峰, 结合化合物的 NMR 数据, 推测其分子式为 $C_{35}H_{58}O_7$ ($C_{35}H_{58}O_7Na$ 理论计算值为 613.4080), 与化合物 1 的分子式一致, 其不饱和度为 7。

考虑到化合物 2 和 1 具有相同的分子式, 化合物 2 应该是化合物 1 的同分异构体, 可能主要是氧化位置不同。化合物 2 的 NMR 数据(表 1 和 2)和化合物 1 的 NMR 数据有一定的相似性, 主要的不同之处在于: (1) 化合物 2 的 1H NMR 中有 1 个甲基信号(δ_H 1.01, s, H_{3-25} ; δ_C 12.6, C-25), 而没有化合物 1 中连氧亚甲基信号(δ_H 4.01, d, $J=12.3$ Hz, H_{25a} ; 4.07, d, $J=12.3$ Hz, H_{25b} ; δ_C 62.4, C-25); (2) 化合物 2 有一个连氧次甲基(δ_H 3.34, dd, H-1; δ_C 80.7, C-1), 而不是化合物 1 的亚甲基(δ_C 34.5, C-1)。因此, 化合物 2 是化合物 1 的 1-OH 衍生物, 且 C-25 为甲基。化合物 2 的 HMBC 谱中, 从 Me-25 到 C-1 (δ_C 80.7), C-5 (δ_C 46.0), C-9 (δ_C 49.8) 和 C-10 (δ_C 44.0) 的相关峰, 说明 25-Me 连在 C-10 季碳上, 且 C-1 位有羟基取代。

酸水解化合物 2 得到阿拉伯糖和苷元 2a。采用化合物 1 中糖部分绝对构型的化学方法, 鉴定了化合物 2 中的阿拉伯糖为 L-阿拉伯吡喃糖。经 NMR 数据分析, 并采用 1H - 1H COSY、HSQC、HMBC 和 NOESY 等二维 NMR 技术, 苷元化合物 2a 的结构为齐墩果-12-烯-1 β ,3 β ,23-三醇。最终确定化合物 2 的结构为 3 β -O- α -L-阿拉伯吡喃糖氧基-齐墩果-12-烯-1 β ,23-二醇。

检索 Scifinder Scholar 数据库发现, 该化合物最早于 1974 年从小果珍珠花 *L. ovalifolia* var. *elliptica*^[9] 中分离得到, 但是文献中仅报道了该化合物的 7 个甲基 1H NMR 信号, 而没有报道其它质子的信号及其归属, 更没有报道其 ^{13}C NMR 数据。本文利用 1D 和 2D NMR 技术, 首次报道了化合物 2 及其苷元 2a 的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据, 数据归属见表 1 和 2。化合物 2 为首次从毛果南烛 *L. ovalifolia* var. *hebecarpa* 中分离得到。

1.3 化合物 3 的结构鉴定

经 1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRESIMS 等波谱方法分

析, 并与文献数据^[11]对照, 确定了化合物 3 的结构为 3 β -O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-24- α -L-阿拉伯吡喃糖基-9,10-开环-羊毛甾-10-烯-25-羟基-30-酸。化合物 3 为首次从毛果南烛 *L. ovalifolia* var. *hebecarpa* 中分离得到。

1.4 抗肿瘤活性研究

本文采用 MTS [3-(4,5-二甲基吡啶-2-基-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑]法^[20], 以顺铂(DDP)为阳性对照, 筛选了从毛果南烛中分离得到的化合物 1~3 对五种肿瘤细胞: HL-60 (人早幼粒白血病细胞)、MCF-7(乳腺癌细胞)、SMMC-7221(人肝癌细胞)、A-549(人肺腺癌细胞)和 SW480(人结肠癌细胞)的抗增殖活性。先在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对化合物进行初步筛选, 如果抑制率 $>50\%$, 再设置 40、8、1.6、0.32、0.064 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 五个浓度梯度复筛, 根据五个浓度下的抑制率计算半数抑制浓度(IC_{50})值。结果(表 3)显示, 化合物 1 和 3 在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对 5 种肿瘤细胞增殖的抑制作用均低于 50%, 未表现出显著的抗增殖活性。而化合物 2 对五种肿瘤细胞株 HL-60、MCF-7、SMMC-7221、A-549 和 SW480 的细胞增殖均有显著的抑制作用, IC_{50} 分别为 (16.35 ± 0.25) 、 (17.05 ± 0.52) 、 (17.66 ± 0.21) 、 (15.87 ± 0.26) 和 $(12.30 \pm 0.36) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。阳性药 DDP 对五种肿瘤细胞株 IC_{50} 值分别为 (3.42 ± 0.17) 、 (35.02 ± 2.17) 、 (13.23 ± 1.17) 、 (28.23 ± 2.95) 和 $(26.90 \pm 1.93) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此, 化合物 2 对 MCF-7、A-549 和 SW480 增殖的抑制作用要强于阳性药 DDP。

化合物 1 和 2 都是齐墩果烷阿拉伯糖苷类化合物, 结构也比较类似, 但是活性却有较大差别。比较二者的结构, 推测 1 β -OH 可能是其活性基团, 不可缺少。这一初步结果为基于齐墩果烷类三萜化合物的抗肿瘤先导化合物的结构修饰提供依据。

2 结论

本文对毛果南烛 *L. ovalifolia* var. *hebecarpa* 叶子的化学成分进行了初步研究, 从中分离得到了 3 个三萜皂苷类化合物。利用现代波谱技术并结合化学方法鉴定了 3 个化合物的结构, 其中化合物 1 为新化合物, 已知化合物 2 和 3 为首次从毛果南烛 *L. ovalifolia* var. *hebe-*

表 3 化合物 1~3 对五种肿瘤细胞株的增殖抑制作用^a

Table 3 Anti-proliferative activities of compounds 1~3 against five cancer cell lines

化合物	白血病 HL-60	乳腺癌 MCF-7	肝癌 SMMC-7221	肺癌 A-549	结肠癌 SW480
1	>40	>40	>40	>40	>40
2	16.35 ± 0.25	17.05 ± 0.52	17.66 ± 0.21	15.87 ± 0.26	12.30 ± 0.36
3	>40	>40	>40	>40	>40
DDP ^b	3.42 ± 0.17	35.02 ± 2.17	13.23 ± 1.17	28.23 ± 2.95	26.90 ± 1.93

^a 半数抑制浓度(IC_{50})采用平均值(mean)±标准方差(SD)表示, 单位: $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 ^b DDP: 阳性对照药顺铂(cisplatin)。

carpa 中分离得到. 并对所得的 3 个化合物进行了体外抗肿瘤活性评价, 发现化合物 **2** 对五种肿瘤细胞株 HL-60、MCF-7、SMMC-7221、A-549 和 SW480 的细胞增殖都表现出了显著的抑制作用, 而且对 MCF-7、A-549 和 SW480 肿瘤细胞增殖的抑制作用超过了阳性对照药物顺铂.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

旋光度由 Rudolph-Autopol IV 型数字旋光仪测定; NMR 由 Bruker AM-400 核磁共振仪测定, ^1H NMR 位移值以氘代溶剂中残存的 CD_3OD (δ_{H} 3.31) 为内标, ^{13}C NMR 位移值以 CD_3OD (δ_{C} 49.15) 为内标, 高分辨电喷雾质谱(HRESIMS)由 Bruker micrOTOF II spectrometer 质谱仪测定; 化合物最终纯化由戴安 P680 高效液相色谱仪, UVD170 紫外检测器, 反向 C-18 柱子(250 mm $\times$ 10 mm, Welch)完成; 糖部分绝对构型鉴定采用 Agilent 7820A 气相质谱仪分析; 活性检测利用多功能酶标仪(Multiskan FC)完成. 层析用硅胶(100~200, 200~300 目)及 TLC 薄层板(HSGF-254)由烟台江友硅胶开发有限公司提供; ODS 填料为 YMC GEL ODS-AS 50 μm , Japan; 凝胶 Sephadex LH-20, GE Healthcare Bioscience AB, Sweden. 色谱甲醇、乙腈, Sigma; 二氯甲烷、石油醚、氯仿、正己烷等各种溶剂均为分析纯, 由国药集团化学试剂有限公司提供.

3.2 植物材料

毛果南烛(*L. ovalifolia* var. *hebecarpa*)叶于 2015 年 6 月采自浙江省缙云县, 由温州大学丁炳杨教授鉴定. 样品标本保存在华中科技大学同济医学院药学院天然药物化学教研室, 编号 2015-0616.

3.3 提取、分离

干燥毛果南烛叶 50 kg 经粉碎, 用 95%乙醇(24 h/次, 220 L, 45 $^{\circ}\text{C}$)提取 3 次, 减压浓缩得到总浸膏 9.15 Kg. 将总浸膏加适量蒸馏水混悬, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 氯仿部位得到萃取物 5.09 kg. 氯仿萃取物用 100~200 目硅胶按照质量 1:1 拌样, 以 CH_2Cl_2 -MeOH ($V:V=50:1\sim0:1$) 进行洗脱, 得到 14 个部分 Fr.1~Fr.14. 经 TLC 薄层色谱检测与本实验室已有的熊果酸和齐墩果酸标准品对比, 发现 Fr.1~Fr.6 的主要成分是熊果酸和齐墩果酸, 薄层色谱(TLC)拖尾严重, 并含有大量叶绿素. 而 Fr.7 部分除了含有熊果酸和齐墩果酸和叶绿素外, TLC 板显示 Fr.7 还含有极性较大的新点. 因此, 在后续分离过程中均以 TLC 薄层色谱检测法为指导, 来分离得到 Fr.7 中极性较大的新点. Fr.7

(43.5 g)经正相硅胶柱层析分离, 以 CH_2Cl_2 -MeOH ($V:V=40:1\sim0:1$)进行梯度洗脱, 得到 9 个组分 Fr.7.1~Fr.7.9. 其中, $V(\text{CH}_2\text{Cl}_2):V(\text{MeOH})=15:1$ 洗脱得到的组分 Fr.7.4 含有极性较大的新点. 所以 Fr.7.4 (6.4 g)经反相 ODS 柱层析分离, 以 MeOH- H_2O ($V:V=10:1\sim100:0$)进行梯度洗脱得到 14 个部分 Fr.7.4.1~Fr.7.4.14. 量较大的组分 Fr.7.4.3 (5 g)经反复正相硅胶、反相硅胶、凝胶 Sephadex LH-20 柱层析进一步细分纯化, 得到组分 Fr.7.4.3.1~Fr.7.4.3.3. Fr.7.4.3.1 (43.0 mg)经半制备 HPLC 进一步分离, 以流动相 MeCN- H_2O ($V:V=75:25$, 流速: 1.5 mL/min), 得到化合物 **1** (12 mg, t_{R} 35.3 min); Fr.7.4.3.2 (4.2 g)也经反复正相硅胶、反相硅胶、凝胶 Sephadex LH-20 纯化, 得到粗品(3.8 g). 取其其中的 150 mg 经 HPLC 纯化, 以流动相 MeCN- H_2O ($V:V=100:0$, 流速: 1.5 mL/min), 得到化合物 **2** (117 mg, t_{R} 25.1 min). Fr.7.4.3.3 (102 mg)经正相硅胶、半制备 HPLC 进一步分离, 以流动相 MeCN- H_2O ($V:V=70:30$, 流速: 1.5 mL/min), 得到化合物 **3** (3.8 mg, t_{R} 38.4 min).

3β -*O*- α -L-阿拉伯吡喃糖氧基-齐墩果-12-烯-23,25-二醇(**1**): 白色粉末, 易溶于甲醇. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}+43$ (c 0.12, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz)和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz)数据见表 1 和 2. HRESIMS calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 613.4080, found 613.4097.

3β -*O*- α -L-阿拉伯吡喃糖氧基-齐墩果-12-烯-1 β ,23-二醇(**2**): 白色粉末, 易溶于甲醇. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}+90$ (c 0.70, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz)和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz)数据见表 1 和 2. HRESIMS calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 613.4080, found 613.4078.

3.4 化合物 1 和 2 的酸水解及苷元 1a 和 2a 的制备

将化合物 **1** (6 mg)溶于 0.2 mL 甲醇中, 加入 3 mol/L 的 HCl 水溶液, 75 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 7 h, 反应液减压蒸干至中性, 加入 1 mL 蒸馏水混匀, 再用 1 mL 乙酸乙酯萃取 3 次. 水层减压浓缩蒸干得到阿拉伯糖(0.5 mg). 乙酸乙酯萃取物合并, 减压浓缩至干得粗苷元, 经半制备 HPLC 纯化(检测波长 205 nm, MeCN- H_2O , $V:V=81:19$, 流速: 1.5 mL/min), 得到纯的齐墩果-12-烯- 3β ,23,25-三醇(**1a**) (1.2 mg, t_{R} 31.3 min)^[11], 白色粉末, 易溶于甲醇. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}+81$ (c 0.16, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz)和 ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz)数据见表 1; HRESIMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 481.3658, found 481.3667.

采用上述方法, 酸水解化合物 **2** (8 mg)得到阿拉伯糖(0.7 mg)和苷元(2.6 mg), 苷元部分经半制备 HPLC 纯化(检测波长 205 nm, MeCN- H_2O , $V:V=100:0$, 流速: 1.5 mL/min), 得到纯的齐墩果-12-烯-1 β , 3β ,23-三醇

(**2a**) (1.6 mg, t_R 41.1 min), 白色粉末, 易溶于甲醇. $[\alpha]_D^{25} + 66$ (c 0.12, MeOH); 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) 和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1 和 2. HRESIMS calcd for $C_{30}H_{50}O_3Na$ $[M+Na]^+$ 481.3658, found 481.3660.

3.5 化合物 1 和 2 中糖的绝对构型的确定

分别向水解化合物 **1** 和 **2** 所得的阿拉伯糖(0.5 mg)、标准 *D*-阿拉伯糖(1 mg)和 *L*-阿拉伯糖(1 mg)中分别加入 2 mg 的 *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐, 0.2 mL 的无水吡啶, 65 °C 下反应 2 h. 随后在混合液中加入 0.2 mL *N*-三甲基硅咪唑, 65 °C 下继续反应 1.5 h, 减压浓缩至干, 加入 1 mL 蒸馏水, 用 0.2 mL 正己烷萃取. 正己烷萃取物用 GC 检测^[11].

GC 检测条件: WM-1 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.5 μm , Welch); 柱温: 230 °C 保留 5 min, 10 °C/min 升温到 270 °C, 进样口温度: 250 °C, 载气: N_2 , 1.0 mL/min, 分流比: 10 : 1; FID 检测器, 检测温度: 250 °C.

化合物 **1** 和 **2** 水解所得阿拉伯糖以及标准 *L*-阿拉伯糖和 *D*-阿拉伯糖的衍生物在同样 GC 条件下的保留时间分别 8.906、8.820、8.829 和 9.136 min, 因此, 化合物 **1** 和 **2** 中的糖为 *L*-阿拉伯糖.

3.6 抗肿瘤活性测试

MTS 为一种全新的 MTT 类似物, 全称为 3-(4,5-二甲基吡啶-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑, 是一种黄颜色的染料. 活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶能够代谢还原 MTS, 生成可溶性的甲臞(Formazan)化合物, 甲臞的含量可以用酶标仪在 492 nm 处进行测定. 在通常情况下, 甲臞生成量与活细胞数成正比, 因此可根据光密度 OD 值推测出活细胞的数目^[20].

本文通过采用 MTS 法^[20]测试化合物 **1**~**3** 对五种肿瘤细胞株 HL-60(人早幼粒白血病细胞)、MCF-7(乳腺癌细胞)、SMMC-7221(人肝癌细胞)、A-549(人肺腺癌细胞)和 SW480(人结肠癌细胞)的抗增殖活性, 从而评价其体外抗肿瘤活性. 主要方法是用含 10%胎牛血清的培养液(DMEM)配成单个细胞悬液, 以每孔 5000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL , 化合物用 DMSO 溶解, 以终浓度 40 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 初筛, 每孔终体积 200 μL , 每种处理均设 3 个复孔. 37 °C 培养 48 h, 弃上清液, 每孔加 20 μL 的 MTS 溶液(MTS 溶液 20 μL 和培养液 100 μL 的混合液), 继续孵育 2~4 h, 使反应充分, 利用多功能酶标仪在 492 nm 处测定光吸收值, 记录结果. 抑制率计算公式: $[1 - (OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$. 在 40 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 浓度下对肿瘤细胞生长抑制率大于 50%

的化合物进入梯度复筛, 设五个浓度 40、8、1.6、0.32 和 0.064 $\mu mol \cdot L^{-1}$, 每孔终体积 200 μL , 设 3 个平行孔, 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(Reed and Muench 法)计算化合物的 IC_{50} 值.

致谢 感谢温州大学丁炳杨教授鉴定植物材料. 华中科技大学分析测试中心测试谱图数据.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **1**、**1a**、**2** 和 **2a** 的 HRESIMS、 1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT、HSQC、HMBC、 1H - 1H COSY、NOESY 及化合物 **1** 和 **2** 经酸水解得到的阿拉伯糖、标准 *L*-阿拉伯糖和 *D*-阿拉伯糖的手性噻唑啉 TSIM 衍生物 GC 分析谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Fang, M.; Fang, R.; He, M.; Hu, L.; Yang, H.; Qin, H.; Min, T.; Chamberlain, D. F.; Stevens, P. F.; Wallace, G. D.; Anderberg, A. Ericaceae. In *Flora of China*, Vol. 14, Eds.: Wu, Z. Y.; Raven, P. H.; Hong, D. Y., Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, **2005**, p. 242.
- [2] Yasue, M.; Kato, Y. *Yakugaku Zasshi* **1959**, *79*, 403.
- [3] Kato, Y. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2302.
- [4] Kato, Y.; Yasue, M. *Shoyakugaku Zasshi* **1983**, *37*, 412.
- [5] Kato, Y.; Kato, N.; Baba, M. *Pharmazie* **1984**, *39*, 425.
- [6] Ohta, T.; Hikino, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 280.
- [7] Sakakibara, J.; Ikai, K.; Yasue, M. *Yakugaku Zasshi* **1974**, *94*, 1534.
- [8] Sakakibara, J.; Hotta, Y.; Yasue, M. *Yakugaku Zasshi* **1975**, *95*, 911.
- [9] Sakakibara, J.; Hotta, Y.; Yasue, M. *Yakugaku Zasshi* **1974**, *94*, 170.
- [10] Lv, X. J.; Li, Y.; Ma, S. G.; Qu, J.; Liu, Y. B.; Li, L.; Wang, R. B.; Yu, S. S. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 776.
- [11] Lv, X. J.; Li, Y.; Ma, S. G.; Qu, J.; Liu, Y. B.; Li, Y. H.; Zhang, D.; Li, L.; Yu, S. S. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2824.
- [12] Wu, Z. Y.; Li, H. Z.; Wang, W. G.; Li, H. M.; Chen, R.; Li, R. T.; Luo, H. R. *Chem. Biodiversity* **2011**, *8*, 1182.
- [13] Kashima, K.; Sano, K.; Yunity, Y. S.; Ina, H.; Kunugi, A.; Inoue, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 191.
- [14] Rahman, M. A.; Katayama, T.; Suzuki, T.; Nakagawa, T. *J. Wood Sci.* **2007**, *53*, 161.
- [15] Subramanian, S. S.; Kotiyal, J. P. *Indian J. Pharm. Sci.* **1978**, *40*, 131.
- [16] Yasue, M.; Sakakibara, J.; Nakagami, J. *Yakugaku Zasshi* **1974**, *94*, 1349.
- [17] Wang, C.; Liu, Y.; Li, C.; Chen, S.; Qin, G. *J. Henan Med. Univ.* **2001**, *36*, 743 (in Chinese). (王彩芳, 刘延泽, 李灿军, 陈绍农, 秦国伟, 河南医科大学学报, **2001**, *36*, 743.)
- [18] Wang, K. W.; Sun, H. X.; Wu, B.; Pan, Y. J. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 990.
- [19] Xiong, J.; Huang, Y.; Tang, N.; You, M.; Hu, J. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1304 (in Chinese). (熊娟, 黄亚, 唐宁, 尤梅, 胡金锋, 有机化学, **2013**, *33*, 1304.)
- [20] Zheng, H.; Chen, Q.; Zhang, M.; Lai, Y.; Lei, L.; Shu, P.; Xue, Y.; Luo, Z.; Zhang, J.; Li, Y.; Yao, G.; Zhang, Y. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 2253.

(Li, L.; Fan, Y.)