

海南暗罗根克罗烷型二萜化学成分研究

李小宝^a 陈光英^a 邵泰明^{a,b} 宋小平^a 韩长日^{*,a,b} 余章昕^a

(^a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)

(^b海南省药食同源植物资源重点实验室 海南科技职业学院化学与材料工程学院 海口 571126)

摘要 对海南暗罗根化学成分进行系统研究, 分离得到 5 个克罗烷型二萜类化合物. 根据它们的 NMR 和 HRMS 数据, 鉴定它们的结构分别为: (4→2)重排-2,13-二甲酰基-克罗烷-2,12E-二双键-15-甲酯(1)、克罗烷-3,12E-二双键-15,16-二甲酸(2)、14,15-降二碳克罗烷-3-双键-2,13-二酮(3)、克罗烷-3,13Z-二双键-15,16-内酯(4)、16-羟基克罗烷-3,13Z-二双键-15,16-内酯(5). 其中化合物 1~2 为新化合物. 化合物 1~5 的体外细胞毒活性筛选结果表明, 它们对 4 种肿瘤细胞株 (Hela、A549、MCF-7 和 HL-60)均显示出了一定的体外生长抑制活性, 其 IC₅₀ 值范围为 13.22~37.16 μmol/L.

关键词 海南暗罗; 克罗烷型二萜; 细胞毒活性

Clerodane Diterpenes from the Roots of *Polyalthia laui*

Li, Xiaobao^a Chen, Guangying^a Shao, Taiming^{a,b} Song, Xiaoping^a
Han, Changri^{*,a,b} Yu, Zhangxin^a

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

(^b Key Laboratory of Medicinal and Edible Plants Resources of Hainan Province, School of Chemical and Material Engineering, Hainan Institute of Science and Technology, Haikou 571126)

Abstract Five clerodane diterpenes were isolated from the roots of *Polyalthia laui* during a systematic phytochemical investigation. Their structures were elucidated by the NMR and HRMS data as methyl (4→2)-abeo-2,13-diformyl-clerodane-2,12E-dien-15-ate (1), (E)-ent-clerodane-3,12-diene-15,16-dioic acid (2), 14,15-dinorclerod-3-ene-2,13-dione (3), solidagolactone (4), and 16-hydroxy-3,13Z-kolavadien-16,15-olide (5). Among them, compounds 1~2 are new clerodane diterpenes. Biological evaluation of compounds 1~5 against human Hela, A549, MCF-7 and HL-60 human cancer cell lines showed that all compounds displayed moderate cytotoxicities against various human cancer cell lines with IC₅₀ ranged from 13.22 to 37.16 μmol/L.

Keywords *Polyalthia laui*; clerodane diterpenes; cytotoxicities

海南暗罗 (*Polyalthia laui*) 为番荔枝科暗罗属 (*Polyalthia*) 植物, 是一种乔木. 该属植物全球大约有 120 余种, 主要分布于从泰国、越南、印度到菲律宾的热带和亚热带地区^[1]. 我国有 17 种, 主要产自与台湾、海南、广东等南部地区. 海南暗罗是海南的特有物种, 一直以来对治疗痛经、梅核气、气滞腹痛等疾病有较好的疗效^[2,3]. 截至目前, 国内外学者已从暗罗属植物中得到二萜类、三萜类、番荔枝内酯类、生物碱等多种化学

成分^[4-6]. 但对海南暗罗的化学成分研究报道还很少, 只有我们课题组前期对其萜类成分进行了报道^[7,8]. 为了探索其代谢产物的多样性以及筛选出具有更好生物活性的天然产物, 我们对海南暗罗根化学成分进行了系统研究, 从中获取了 5 个克罗烷型二萜类化合物(图 1): (4→2)重排-2,13-二甲酰基-克罗烷-2,12E-二双键-15-甲酯(1)、克罗烷-3,12E-二双键-15,16-二甲酸(2)、14,15-降二碳克罗烷-3-双键-2,13-二酮(3)、克罗烷-3,13Z-二双键-

* Corresponding author. E-mail: hchr116@126.com

Received May 23, 2017; revised June 10, 2017; published online June 23, 2017.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81160391, 21362009, 81360478), the International S&T Cooperation Program of China (No. 2014DFA40850), the Program for Innovative Research Team in University (No. IRT-16R19), the Hainan Provincial Natural Science Foundation of Innovative Research Team Project (No. 2016CXTD007) and the Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 20162031).

国家自然科学基金(Nos. 81160391, 21362009, 81360478)、国家国际科技合作专项(No. 2014DFA40850)、创新发展团队(No. IRT-16R19)、海南省自然科学基金创新研究团队(No. 2016CXTD007)及海南省自然科学基金(No. 20162031)资助项目.

15,16-内酯(4)、16-羟基克罗烷-3,13Z-二双键-15,16-内酯(5)。其中化合物1~2为新化合物。化合物1~5的体外细胞毒性筛选结果表明,它们对4种肿瘤细胞株(Hela、A549、MCF-7和HL-60)均显示出了一定的体外生长抑制活性,其 IC_{50} 值为13.22~37.16 $\mu\text{mol/L}$ 。其中化合物2对肺腺细胞(A549)和乳腺癌细胞(MCF-7)的生长抑制活性都强于阳性对照药顺铂。

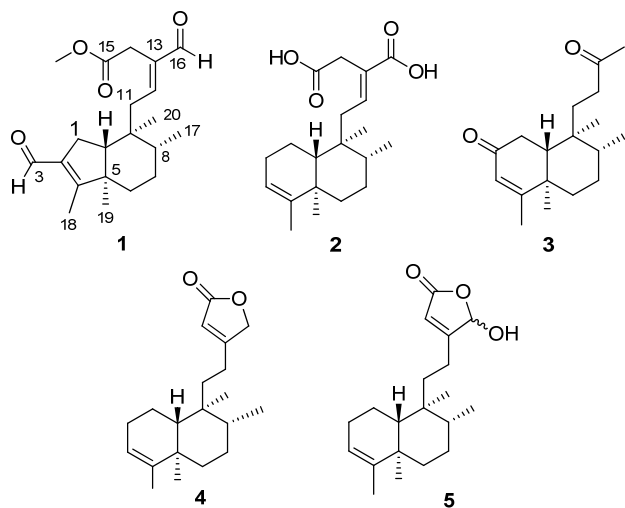


图1 化合物1~5的结构
Figure 1 Structures of compounds 1~5

1 结果与讨论

1.1 化合物1的结构鉴定

化合物1: 无色油状物, 易溶于氯仿。其HR(ESI)MS显示该化合物的分子式为 $C_{21}H_{31}O_4$ ($[M+H]^+$ 347.2216, 计算值为347.2217), 不饱和度为7。IR光谱中, 1691和2923 cm^{-1} 处吸收带显示, 该化合物存在共轭醛官能团。 ^1H NMR谱(表1)给出5个甲基信号(δ_{H} 0.84 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 3.66 (s, 3H)), 2个次甲基信号(δ_{H} 1.41~1.46 (m, 1H)和1.61~1.64 (m, 1H)); 在低场区给出2个醛氢信号(δ_{H} 9.41 (s, 1H)和9.95 (s, 1H)), 1个烯氢信号(δ_{H} 6.76 (t, $J=7.6$ Hz, 1H)), 另外还给出10个质子信号。 ^{13}C NMR和DEPT谱(表1), 共给出21个碳信号, 其中包括2个醛基, 1个羰基, 1个三取代双键, 1个四取代双键及9个 sp^3 碳原子。此外, 9个 sp^3 碳原子分别为2个季碳, 2个次甲基和5个甲基。以上数据表明该化合物是一个重排的克罗烷型二萜类化合物^[9]。分析发现, 其 ^1H NMR和 ^{13}C NMR谱数据与(4 $\rightarrow$ 2)重排-2,13-二甲酰基-克罗烷-2,12E-二双键-14-甲酸^[8]的数据非常相似。主要区别在于化合物1多了一个甲氧基信号(δ_{H} 3.66 (s, 3H)和 δ_{C} 52.3), 推测化合物(4 $\rightarrow$ 2)重排-2,13-二甲酰基-克罗烷-

2,12E-二双键-14-甲酸中的羟基在1中被甲酯化。以上推测通过HMBC谱(图2) H-OCH₃与C-15 (δ_{C} 170.6)的强相关信号得以证实。在NOESY谱(图2)中, CH₃-17/CH₃-19/CH₃-20之间NOE相关确定了CH₃-17, CH₃-19和CH₃-20在同一平面; 其相对构型与(4 $\rightarrow$ 2)重排-2,13-二甲酰基-克罗烷-2,12E-二双键-15-甲酯一致。至此完整确定了该化合物的结构, 命名为(4 $\rightarrow$ 2)重排-2,13-二甲酰基-克罗烷-2,12E-二双键-15-甲酯。

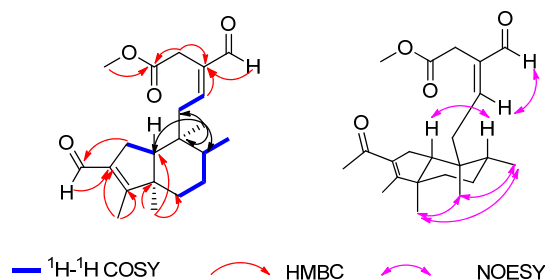


图2 化合物1的主要HMBC、COSY以及NOESY相关信号
Figure 2 Key HMBC, COSY and NOESY correlations of compound 1

1.2 化合物2的结构鉴定

化合物2: 无色油状物, 易溶于甲醇。其HR(ESI)MS给出该化合物的分子式为 $C_{20}H_{31}O_4$ ($[M+H]^+$ 335.2217, 计算值为335.2217), 不饱和度为6。IR光谱中, 1699, 2926和3439 cm^{-1} 处吸收带显示, 该化合物存在 α,β -不饱和羰基官能团。 ^1H NMR谱显示有4个甲基信号(δ_{H} 0.83 (s, 3H), 0.87 (d, $J=6.0$ Hz, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.57 (s, 3H)) (表1); 2个次甲基信号[1.37 (dd, $J=11.6$, 1.2 Hz, 1H)和1.51~1.54 (m, 1H)], 低场区显示2个烯氢信号(δ_{H} 5.16 (br s, 1H), 7.02 (t, $J=8.0$ Hz, 1H)), 另外还给出12个质子信号。在 ^{13}C NMR谱和DEPT谱(表1)中, 共显示20个碳信号。其中包括4个 sp^2 和2个 sp^3 季碳, 2个 sp^2 和2个 sp^3 CH, 6个 sp^3 CH₂以及4个甲基。仔细分析发现, 其 ^1H NMR和 ^{13}C NMR数据与克罗烷-3,12E-二双键-15-甲酸-16-醛基^[10]的数据非常类似。主要区别在于化合物2少了一个醛基信号且分子量比克罗烷-3,12E-二双键-15-甲酸-16-醛基多了16个单位, 推测克罗烷-3,12E-二双键-15-甲酸-16-醛基中的醛基在2中被羧基(δ_{C} 170.7)取代。以上推测通过HMBC谱(图3) H-12和H-14与C-16的相关信号证实。化合物2的相对构型可以通过NOESY相关(图3)与克罗烷-3,12E-二双键-15-甲酸-16-醛基一致。因此, 化合物被确定为克罗烷-3,12E-二双键-15,16-二甲酯。

除新化合物1和2外, 还得到已知化合物3~5, 经 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR分析以及光谱数据与文献对比, 分别鉴定为14,15-降二碳克罗烷-3-双键-2,13-二酮^[11]、克罗烷-

表1 化合物1 (CDCl₃)和2 (CD₃OD)的¹H (400 MHz)和¹³C (100 MHz) NMR 数据
Table 1 ¹H (400 MHz) and ¹³C (100 MHz) NMR data of compounds 1 (CDCl₃) and 2 (CD₃OD)

Position	1		2	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	2.21 t (13.6), 2.31 dd (13.6, 6.0)	26.5 (CH ₂)	1.50~1.54 m, 1.92~1.96 m	19.9 (CH ₂)
2		137.0 (C)	1.98~2.02 m	27.7 (CH ₂)
3	9.95 s	188.7 (CH)	5.16 s	121.6 (CH)
4		171.5 (C)		145.0 (C)
5		51.0 (C)		39.5 (C)
6	1.36~1.39 m, 1.61~1.64 m	33.9 (CH ₂)	1.21~1.24 m, 1.72~1.77 m	37.8 (CH ₂)
7	1.51~1.53 m, 1.55~1.58 m	28.4 (CH ₂)	1.43~1.46 m, 1.47~1.50 m	28.6 (CH ₂)
8	1.41~1.46 m	39.0 (CH)	1.51~1.54 m	38.6 (CH)
9		39.7 (C)		41.6 (C)
10	1.61~1.64 m	55.2 (CH)	1.37 dd (11.6, 1.2)	49.2 (CH)
11	2.36 br d (7.6)	39.7 (CH ₂)	2.35 dd (16.0, 8.0)	38.4 (CH ₂)
12	6.76 t (7.6)	153.3 (CH)	2.24 dd (16.0, 8.0)	143.0 (CH)
13		138.2 (C)	7.02 t (8.0)	128.5 (C)
14	3.32 s	29.8 (CH ₂)	3.35 br s	33.3 (CH ₂)
15		170.6 (C)		174.8 (C)
16	9.41 s	193.7 (CH)		170.7 (C)
17	0.84 d (6.4)	15.7 (CH ₃)	0.87 d (6.0)	16.7 (CH ₃)
18	2.03 s	9.8 (CH ₃)	1.57 s	18.2 (CH ₃)
19	0.94 s	17.0 (CH ₃)	1.02 s	20.3 (CH ₃)
20	0.96 s	17.6 (CH ₃)	0.83 s	18.1 (CH ₃)
OCH ₃	3.66 s	52.3 (CH ₃)		

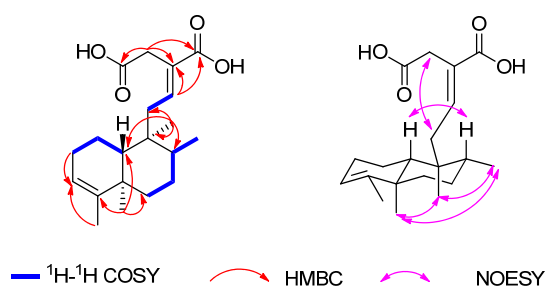


图3 化合物2的主要HMBC、COSY以及NOESY相关信号
Figure 3 Key HMBC, COSY and NOESY correlations of compound 2

3,13Z-二双键-15,16-内酯(4)^[12]、16-羟基克罗烷-3,13Z-二双键-15,16-内酯(5)^[12]。其中化合物3是较为罕见的降碳克罗烷型二萜。

采用噻唑蓝(MTT)比色法^[13]对化合物1~5进行了4种常见的人体肿瘤细胞株的细胞毒性评估,以顺铂为阳性对照药物。结果表明所有化合物都具有一定的细胞毒性,其IC₅₀值为13.22~37.16 μmol/L(表2)。其中化合物2对肺腺细胞(A549)和乳腺癌细胞(MCF-7)的生长抑制活性都强于阳性对照药。

2 结论

运用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、反相柱色谱等分离

表2 化合物1~5细胞毒活性测试结果

Table 2 Cytotoxic activities of compounds 1~5

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)			
	Hela	A549	MCF-7	HL-60
1	33.72	27.81	31.95	25.97
2	27.75	13.22	20.28	25.12
3	22.86	30.45	37.16	37.06
4	33.52	35.20	36.82	27.30
5	32.01	36.84	33.56	35.68
顺铂	12.19	15.37	32.62	2.06

方法,从海南暗罗根中分离得到5个克罗烷型二萜类化合物:(4→2)重排-2,13-二甲酰基-克罗烷-2,12E-二双键-15-甲酯(1)、克罗烷-3,12E-二双键-15,16-二甲酸(2)、14,15-降二碳克罗烷-3-双键-2,13-二酮(3)、克罗烷-3,13Z-二双键-15,16-内酯(4)、16-羟基克罗烷-3,13Z-二双键-15,16-内酯(5)。其中化合物1~2为新化合物,化合物3是较为罕见的降碳克罗烷型二萜。对化合物1~5进行了4种常见人体肿瘤细胞株的细胞毒性筛选,结果表明所有化合物都具有一定的细胞毒性,其IC₅₀值为13.22~37.16 μmol/L。其中化合物2对肺腺细胞(A549)和乳腺癌细胞(MCF-7)的生长抑制活性都强于阳性对照药。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

JASCO DIP-370 型数字式旋光仪; Bio-Rad FTS-135 型红外光谱仪; Bruker AV-400 MHz 型核磁共振仪; LCMS-IT-TOF 超高效液相色谱-高分辨质谱联用仪(日本岛津公司); Thermo Nicolet 6700(美国 Nicolet 公司); 半制备高效液相色谱仪 Agilent 1260 infinity; 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); 色谱试剂均为分析纯。

3.2 植物材料

海南暗罗药材采自海南省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芯副教授鉴定为番荔枝科暗罗属植物海南暗罗(*Polyalthia laui* Merr.), 标本(No. HAN20140418)现存于海南师范大学热带药用植物化学教育部重点实验室。

3.3 提取与分离

海南暗罗根(12.1 kg)用 75% 的乙醇溶液浸泡 3 次, 每次 5 d。收集提取液, 真空浓缩后得到浸膏(721.3 g), 将浸膏分散在水中依次用石油醚/乙酸乙酯等极性溶剂进行多次萃取, 得到乙酸乙酯部位浸膏(182.6 g)。对乙酸乙酯部位浸膏进行硅胶柱层析(100~200 目), 以溶剂 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ($V:V=100:1\sim1:100$) 进行梯度洗脱, 得到 7 个组分(Fr.1~Fr.7)。Fr.2 (32.5 g) 经过硅胶柱层析(200~300 目, 300~400 目)用石油醚/乙酸乙酯($V:V=100:1\sim1:100$) 进行反复分离, 再用反相硅胶 [$V(\text{MeOH}):V(\text{H}_2\text{O})=5:100\sim100:1$] 洗脱, 得到 5 个组分 Fr.2.1~Fr.2.5。Fr.2.1 (1.1 g) 经凝胶柱层析[Sephadex LH-20, $V(\text{CHCl}_3):V(\text{MeOH})=1:1$] 纯化得到化合物 **3** (6.4 mg) 和 **4** (11.2 mg)。Fr.2.2 (5.8 g) 经过反复硅胶柱层析[200~300 目, 300~400 目, $V(\text{CHCl}_3):V(\text{MeOH})=15:1$] 得到 3 个组分 Fr.2.2a~Fr.2.2c。Fr.3.2a (1.5 g) 经反相硅胶柱层析 [$V(\text{MeOH}):V(\text{H}_2\text{O})=1:3$] 纯化后得到化合物 **1** (4.3 mg) 和 **5** (12.4 mg), Fr.3.2b (0.61 g) 经半制备型高效液相色谱仪 Waters XBridge C₁₈ (250 mm×10 mm, 5 μm , 55% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$) 分离得到化合物 **2** (7.8 mg)。

(4 $\rightarrow$ 2)重排-2,13-二甲酰基-克罗烷-2,12E-二双键-15-甲酯(**1**): 无色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +25.8$ (c 0.2, CHCl_3); UV (CH_3OH) λ_{max} [$\log \epsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$]: 234 (2.56) nm; ^1H NMR 和 ^{13}C NMR (400/100 MHz, CDCl_3) 数据见表 1; IR (KBr) ν_{max} : 2923, 1691, 1645, 1552, 1428, 1248, 1135, 758, 472 cm^{-1} ; HRESIMS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

347.2217, found 347.2216.

克罗烷-3,12E-二双键-15,16-二甲酸(**2**): 无色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -21.3$ (c 0.2, CHCl_3); UV (CH_3OH) λ_{max} [$\log \epsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$]: 238 (2.52) nm; ^1H NMR 和 ^{13}C NMR (400/100 MHz, CD_3OD) 数据见表 1; IR (KBr) ν_{max} 3439, 2926, 1699, 1642, 1557, 1385, 1185, 751, 475 cm^{-1} ; HRESIMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 335.2217, found 335.2217.

3.4 活性测试

细胞毒活性采用 MTT 比色法进行测试: 取对数生长期细胞培养于 96 孔培养板内, 每孔 100 μL (含 1000~2000 个肿瘤细胞)。给药组加入含有不同浓度化合物, 每药设 4~5 个剂量组, 每组至少设 3 个平行孔。对照组加入与化合物等体积的溶剂。置于 5% CO_2 培养箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 4 d 后弃去培养液, 每孔加入 200 μL 0.2% MTT 溶液。再在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 4 h, 弃去上清液, 每孔加入二甲亚砜(DMSO) 150 μL 溶解甲臢颗粒, 轻度振荡后, 用酶标仪在参考波长 450 nm、检测波长 570 nm 条件下测定光密度值(OD)。绘制曲线, 计算 IC_{50} 值。

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **1** 和 **2** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、135-DEPT、 ^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC、NOESY 和 HRESIMS 谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Padmaa, M. P.; Khosa, R. L. *J. Pharm. Res.* **2009**, *2*, 594.
- [2] Kirtikar, K. R.; Basu, B. D. *Indian Medicinal Plants*, International Book Distributors, Dehradun, **1995**, 562.
- [3] Goyal, M. M.; Gupta, A. *Indian J. Pharmacol.* **1987**, *19*, 216.
- [4] Panthama, N.; Chang, F. R.; Lee, T. H.; Panthama, N. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1366.
- [5] Phadnis, A. P.; Patwardhan, S. A.; Dhaneshwar, N. N.; Tavale, S. S.; Row, T. N. G. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2899.
- [6] Lee, T. H.; Wang, M. J.; Chen, P. Y.; Wu, T. Y.; Wen, W. C.; Tsai, F. Y. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1960.
- [7] Li, X. B.; Song, X. P.; Chen, G. Y.; Han, C. R.; Chen, W. H.; Zheng, C. J.; Song, X. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1333 (in Chinese). (李小宝, 宋小平, 陈光英, 韩长日, 陈文豪, 郑彩娟, 宋鑫明, 有机化学, **2013**, *33*, 1333.)
- [8] Yu, Z. X.; Fu, Y. H.; Chen, G. Y.; Song, X. P.; Han, C. R.; Li, X. B.; Song, X. M.; Wu, A. Z.; Chen, S. C. *Fitoterapia* **2016**, *111*, 36.
- [9] Bohlmann, F.; Singh, P.; Singh, R. K.; Joshi, K. C.; Jakupovic, J. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1114.
- [10] Kijjoa, A.; Pinto, M. M. M.; Pinto, P. M. M.; Herz, W. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 457.
- [11] He, H. P.; Shen, Y. M.; Zuo, G. Y.; Yang, X. S.; Hao, X. J. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3187.
- [12] Hara, N.; Asaki, H.; Fujimoto, Y.; Gupta, Y. K.; Singh, A. K. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 189.
- [13] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.

(Cheng, F.)