

异叶三宝木枝叶中一个新的 Stemodane 型二萜类化合物

刘艳萍^{a,b} 张项林^{a,b} 牛海渊^{a,b} 官春艳^{a,b} 孙福康^{a,b}
杨柳萌^c 付艳辉^{*,a,b}

(^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 南药资源产业化关键技术研究海口市重点实验室 海口 571158)

(^c 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室 昆明 650223)

摘要 综合运用硅胶柱色谱、反相硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱以及制备型高效液相色谱等色谱分离技术对大戟科三宝木属植物异叶三宝木 *Trigonostemon heterophyllus* 枝叶中的化学成分进行了系统研究, 从其枝叶的 85% 乙醇提取物中分离得到了 8 个二萜类化合物. 采用多种波谱鉴定技术确定了这些化合物的化学结构. 其中一个化合物为新的罕见的 stemodane 型二萜类化合物, 七个化合物为首次从三宝木属植物中分离得到的化合物. 所有化合物的体外细胞毒活性评价结果表明, 它们对五种肿瘤细胞株(HL-60、A549、SMMC-7721、MCF-7 和 SW480)均显示出了较为显著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的活性相当.

关键词 三宝木属; 异叶三宝木; stemodane 型二萜; 细胞毒活性

A New Stemodane Diterpenoid from the Stems and Leaves of *Trigonostemon heterophyllus*

Liu, Yanping^{a,b} Zhang, Xianglin^{a,b} Niu, Haiyuan^{a,b} Guan, Chunyan^{a,b}
Sun, Fukang^{a,b} Yang, Liumeng^c Fu, Yanhui^{*,a,b}

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

(^b Key Laboratory of Southern Medicinal Plants Resources of Haikou City, Hainan Normal University, Haikou 571158)

(^c Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223)

Abstract A new stemodane diterpenoid, trigoheterone A (**1**), together with seven known diterpenoids, was isolated from the stems and leaves of *Trigonostemon heterophyllus*. Their structures were established on the basis of extensive spectral analyses. All known compounds were isolated from the genus *Trigonostemon* for the first time. The cytotoxicities of all isolated compounds were evaluated against five cancer cell lines (HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7 and SW480). As a result, eight compounds exhibited significant inhibitory effects with IC₅₀ values comparable to those of cisplatin.

Keywords *Trigonostemon*; *Trigonostemon heterophyllus*; stemodane diterpenoid; cytotoxicities

大戟科(Euphorbiaceae)三宝木属(*Trigonostemon*)植物全世界约有 50 种, 分布于亚洲的热带和亚热带地区, 我国有 10 种, 分布于海南、云南以及广西等南部省区^[1]. 三宝木属植物因富含抗肿瘤活性成分和抗人类免疫缺

陷病毒(HIV)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具有显著的生物活性的化合物, 如二萜类、生物碱类以及菲类衍生物等多种结构类型的化合物^[2-9]. 异叶三宝木(*T.*

* Corresponding author. E-mail: fuyanhu80@163.com

Received April 15, 2018; revised June 3, 2018; published online June 29, 2018.

Project supported by the Key Research and Development Project of Hainan Province (No. ZDYF2016221), the Key Research and Development Project of Haikou City (No. 2017050), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21662011, 31660097) and the Program for Innovative Research Team in University (No. IRT-16R19).

海南省重点研发计划(No. ZDYF2016221)、海口市重点研发计划(No. 2017050)、国家自然科学基金(Nos. 21662011, 31660097)和教育部创新发展团队项目(No. IRT-16R19)资助项目.

heterophyllus)为海南特有植物, 关于其化学成分及其药理活性的研究报道较少见. 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, 尤其是从具有海南特色的热带药用植物中发现具有新颖化学结构的抗肿瘤活性物质. 本课题组在前期研究中发现, 海南特有植物异叶三宝木的 85%乙醇提取液对人肺癌细胞株 A549 和人结肠癌细胞株 SW480 表现出了较为显著的生长抑制活性. 其 IC_{50} 值分别为 3.46 和 8.03 $\mu\text{g/mL}$. 为了进一步阐明异叶三宝木的抗肿瘤药效物质基础, 发现化学结构新颖的抗肿瘤活性物质, 本研究对异叶三宝木枝叶的 85%乙醇提取物中的化学成分进行了系统研究, 截止目前已经分离得到了 8 个二萜类化合物, 分别鉴定为 trigoheterone A (**1**)、15(13 $\rightarrow$ 12)abeo-13 β -hydroxystemaran-2-one (**2**)、15(8 $\rightarrow$ 9)abeo-8 β (H)-12 β -hydroxystachan-2-one (**3**)、kravanhin D (**4**)、kaempulchraol S (**5**)、callilongisin C (**6**)、scopariusol K (**7**)和 euolutchuol E (**8**). 其中化合物 **1** 为一个新的罕见的 stemodane 型二萜类化合物, 化合物 **2**~**8** 为首次从三宝木属植物中分离得到的化合物. 此外, 我们对化合物 **1**~**8** 的体外细胞毒活性进行了评价, 结果表明化合物 **1**~**8** 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的生长抑制活性. 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.

1 结果与讨论

化合物 **1** 为白色无定形粉末; 比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ 为 +42.8 (c 0.12, CH_3OH); 化合物 **1** 的 HRESIMS 谱给出化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ (m/z : 303.2320 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd 303.2319), 不饱和度为 6; 在化合物 **1** 的 UV 光谱中, 最大吸收峰 λ_{max} [$\log \varepsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$] 在 228 (3.56) nm 处, 说明化合物 **1** 的结构中含有双键结构单元. 在化合物 **1** 的 IR 光谱中显示出了羟基(3368 cm^{-1})、羰基(1746 cm^{-1})和双键(1646 , 1619 和 1458 cm^{-1})的特征吸收峰. 在化合物 **1** 的 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)谱中, 在低场区存在 1 个烯烃质子信号, δ_{H} 5.27 (br s, 1H); 在较低场区存在 1 个羟甲基氢信号, δ_{H} 3.99 (s, 2H); 在高场区存在三个甲基质子信号, δ_{H} 1.03 (s, 3H), δ_{H} 0.97 (s, 3H)和 δ_{H} 0.87 (s, 3H). 化合物 **1** 的 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱提示化合物 **1** 的结构中含有 20 个碳原子, 包括 3 个 sp^2 杂化碳原子, 3 个 sp^3 杂化季碳原子, 3 个 sp^3 杂化次甲基碳原子, 8 个 sp^3 杂化亚甲基碳原子和 3 个甲基碳原子. 3 个 sp^2 碳原子可以被归属于 1 个三取代的双键结构(δ_{C} 118.5 和 150.6)和 1 个酮羰基结构(δ_{C} 212.7). 上述数据表明化合物 **1** 的结构与已知的二萜类化合物 stemod-12-en-2-one 的结构是极其相似的^[10]. 仔细比较化合物 **1** 与化合物

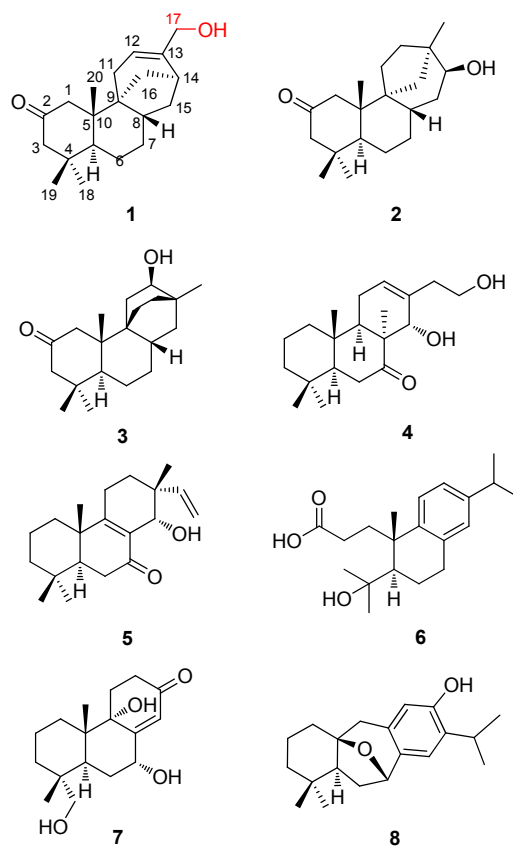


图 1 化合物 **1**~**8** 的化学结构

Figure 1 Chemical structures of compounds **1**~**8**

stemod-12-en-2-one 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据可以发现, 它们的化学结构的主要区别在于, 在化合物 stemod-12-en-2-one 的 C-13 上的取代基是甲基取代基, 而在化合物 **1** 的 C-13 上的取代基是羟甲基取代基^[10], 以上推断是基于在化合物 **1** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱中甲基信号消失以及羟甲基信号的出现而得出的. 此外, H_2 -17 与 C-12 (δ_{C} 118.5)、C-13 (δ_{C} 150.6)和 C-14 (δ_{C} 34.7)的 HMBC 相关以及 H-12 和 H-14 与 C-17 (δ_{C} 64.8)的 HMBC 相关可以进一步证实以上推断. 详细的 2D NMR 相关分析(包括 HSQC、HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 谱)确证了化合物 **1** 的平面结构, 如图 2 所示. 化合物 **1** 的相对构型是由它的 ROESY 相关确定的. 在化合物 **1** 的 ROESY 谱中, H-6 β 和 H_3 -20 与 H-8 和 H_3 -19 的 NOESY 相关, 以及 H-11 β 与 H-8 和 H_3 -20 的 ROESY 相关, 说明 H-8 和 10- CH_3 为 β -取向, 而 H-5 和 H-14 与 H-16 α 和 H-16 β 的 ROESY 相关, 以及 H_3 -18 与 H-5 和 H-6 α 的 ROESY 相关, 说明 H-5、H-14 和 H_2 -16 为 α -取向. 至此, 确定了化合物 **1** 的化学结构, 如图 1 所示, 并将化合物 **1** 命名为 trigoheterone A.

化合物 **2**~**8** 为已知的二萜类化合物, 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

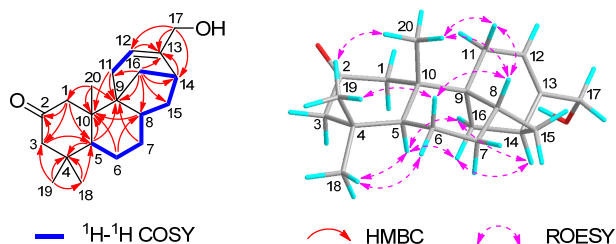


图2 化合物 trigoheterone A (1)的选择性的 2D NMR 相关
Figure 2 Selected 2D NMR correlations for trigoheterone A (1)

表1 化合物 trigoheterone A (1)的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据 (CDCl₃)

Table 1 ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of trigoheterone A (1) (CDCl₃)

Position	δ_{H} (J in Hz) ^a	δ_{C} ^b
1 α	2.63 (d, $J=12.8$ Hz, 1H)	50.3 t
1 β	1.94 (d, $J=12.8$ Hz, 1H)	
2		212.7 s
3 α	2.24 (d, $J=13.0$ Hz, 1H)	56.6 t
3 β	2.08 (overlapped, 1H)	
4		39.3 s
5	1.84 (dd, $J=12.4, 3.6$ Hz, 1H)	44.9 d
6 α	1.73 (overlapped, 1H)	23.2 t
6 β	1.37 (dd, $J=12.8, 4.6$ Hz, 1H)	
7 α	1.70 (overlapped, 1H)	25.1 t
7 β	1.50 (dd, $J=12.8, 5.2$ Hz, 1H)	
8	2.09 (overlapped, 1H)	41.6 d
9		48.7 s
10		45.7 s
11 α	2.44 (br d, $J=15.8$ Hz, 1H)	28.3 t
11 β	2.32 (overlapped, 1H)	
12	5.27 (br s, 1H)	118.5 d
13		150.6 s
14	2.30 (overlapped, 1H)	34.7 d
15 α	2.00 (dd, $J=11.6, 3.8$ Hz, 1H)	38.6 t
15 β	1.07 (dd, $J=11.6, 8.6$ Hz, 1H)	
16 α	1.58 (dd, $J=10.8, 5.6$ Hz, 1H)	35.4 t
16 β	1.22 (d, $J=10.8$ Hz, 1H)	
17	3.99 (s, 2H)	64.8 t
18	1.03 (s, 3H)	33.9 q
19	0.87 (s, 3H)	23.0 q
20	0.97 (s, 3H)	16.7 q

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

别鉴定为 15(13 $\rightarrow$ 12)abeo-13 β -hydroxystemaran-2-one (2)^[11]、15(8 $\rightarrow$ 9)abeo-8 β (H)-12 β -hydroxystachan-2-one (3)^[11]、kravanhin D (4)^[12]、kaempulchraol S (5)^[13]、callilongisin C (6)^[14]、scopariuosol K (7)^[15]和 euolutchuol E (8)^[16]。所有化合物均为首次从三宝木属植物中分离得到。

采用噻唑蓝(MTT)法,以 HL-60、A549、SMMC-7721、MCF-7 和 SW480 等五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 1~8

的体外细胞毒活性进行了评价。实验结果表明化合物 1~8 对这五种肿瘤细胞株均显示出了显著地生长抑制活性,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,对于大多数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 2 所示。

据我们所知,大戟科三宝木属植物中富含骨架类型众多的二萜类化合物,本研究中发现的 8 个具有不同骨架结构类型的二萜类化合物充分体现了三宝木属植物所含二萜类化合物的结构多样性,这些发现可为有机合成工作者提供更多的新颖独特的结构模板。对化合物 1~8 的细胞毒活性评价结果表明,这些被分离得到的二萜类化合物均具有显著的细胞毒活性,这些发现对于研究开发新型抗肿瘤药物可能具有重要意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

JASCO DIP-370 型数字旋光仪; Beckman DU640 分光光度仪; Bio-Rad FTS-135 型红外光谱仪; Bruker AV-400 型核磁共振波谱仪(TMS 为内标); Agilent G3250AA LC/MSD TOF 质谱仪; Waters Micromass Q-TOF Micro System 质谱仪; 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 $\times$ 250 mm), Waters Spherisorb[®] ODS2 制备型色谱柱(5 μm , 20 mm $\times$ 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

异叶三宝木枝叶于 2015 年 11 月采集于海南省三亚市,经海南师范大学生命科学学院钟琼芯教授鉴定为大戟科三宝木属植物异叶三宝木(*T. heterophyllus*)的枝叶,凭证标本(No. TH20151102)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

阴干的异叶三宝木枝叶 26.2 kg,粉碎后用 85%乙醇冷浸提取三次,每次提取一周,提取液减压浓缩得总浸膏。总浸膏加水混悬,依次用石油醚和乙酸乙酯进行萃取,回收溶剂后得石油醚萃取部位(532.3 g)和乙酸乙酯萃取部位(327.9 g)。乙酸乙酯萃取部位(326.0 g)经硅胶(100~200 目)柱色谱分离,石油醚-丙酮($V:V=100:0\sim0:100$)为洗脱剂进行梯度洗脱得到 10 个流分(Fr.1~Fr.10)。Fr.2 (18.7 g)经硅胶(200~300 目)柱色谱分离,石油醚-乙酸乙酯($V:V=100:0\sim0:100$)为洗

表2 化合物1~8对肿瘤细胞的生长抑制活性^a
Table 2 Cytotoxic activities of compounds 1~8^a

化合物	IC ₅₀ ^b /(μmol·L ⁻¹)				
	HL-60	SMMC-7721	A-549	MCF-7	SW480
1	0.98±0.07	1.87±0.10	2.05±0.09	0.86±0.06	1.69±0.08
2	2.34±0.10	5.47±0.15	1.32±0.08	3.39±0.11	6.36±0.16
3	1.78±0.08	2.56±0.13	5.33±0.11	4.65±0.10	5.28±0.07
4	3.29±0.12	1.88±0.11	7.35±0.17	2.56±0.08	8.37±0.14
5	2.84±0.09	3.56±0.12	5.38±0.15	3.27±0.11	5.33±0.10
6	5.38±0.13	6.27±0.18	18.25±0.22	3.32±0.09	1.46±0.08
7	1.65±0.07	2.58±0.10	9.32±0.11	2.95±0.12	6.37±0.13
8	1.41±0.05	13.45±0.22	4.29±0.10	8.36±0.08	2.88±0.16
Cisplatin ^c	1.56±0.06	12.57±0.10	16.65±0.11	21.58±0.12	27.26±0.21

^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 IC₅₀为50%生长抑制浓度。^c 顺铂为阳性对照。

脱剂进行梯度洗脱得到8个亚流分(Fr.2A~Fr.2H)。Fr.2B经Sephadex LH-20凝胶柱色谱纯化后, 经制备型高效液相进行制备, 以甲醇-水(80:20)为流动相, 得到化合物1 (108.9 mg)、4 (64.2 mg)、6 (29.2 mg)和7 (68.3 mg)。Fr.2C经Sephadex LH-20凝胶柱色谱纯化后, 经制备型高效液相进行制备, 以乙腈-水(*V*:*V*=70:30)为流动相, 得到化合物2 (52.7 mg)、3 (32.9 mg)、5 (47.2 mg)和8 (21.8 mg)。

2.4 波谱数据

trigoheterone A (1): 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{25} +42.8$ (*c* 0.12, CH₃OH); UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ [log ϵ /(L·mol⁻¹·cm⁻¹): 228 (3.56) nm; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)和¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)数据见表1; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3368, 2926, 1746, 1646, 1619, 1458, 1382, 1219, 1058, 1021, 926 cm⁻¹; HR-ESI-MS calcd for C₂₀H₃₁O₂ (M+H⁺) 303.2319, found 303.2320。

2.5 活性评价

MTT法评价化合物的抗肿瘤活性^[17]: 取含10%胎牛血清的培养液(DMEM或者RMPI1640)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 μmol/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。37℃培养48 h后, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加MTT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。

辅助材料(Supporting Information) 新化合物1的¹H NMR、¹³C NMR、HSQC、HMBC、¹H-¹H COSY和ROESY

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. 44(2), Science Press, Beijing, 1996, p. 162 (in Chinese). (中国植物志编辑委员会, 中国植物志, Vol. 44(2), 科学出版社, 北京, 1996, p. 162.)
- [2] Jayasuriya, H.; Zink, D. L.; Singh, S. B.; Borris, R. P.; Nanakorn, W.; Beck, H. T.; Balick, M. J.; Goetz, M. A.; Slayton, L.; Gregory, L.; Zakson-Aiken, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4998.
- [3] Hu, X. J.; Wang, Y. H.; Kong, L. Y.; He, H. P.; Gao, S.; Liu, H. Y.; Ding, J.; Xie, H.; Di, Y. T.; Hao, X. J. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2917.
- [4] Tan, C. J.; Di, Y. T.; Wang, Y. H.; Zhang, Y.; Si, Y. K.; Zhang, Q.; Gao, S.; Hu, X. J.; Fang, X.; Li, S. F.; Hao, X. J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2370.
- [5] Dong, S. H.; Liu, H. B.; Xu, C. H.; Ding, J.; Yue, J. M. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2576.
- [6] Allard, P. M.; Martin, M. T.; Dau, M. E. T. H.; Leyssen, P.; Gueritte, F.; Litaudon, M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 342.
- [7] Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Gueritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2183.
- [8] Yang, B.; Chen, G. Y.; Song, X. P.; Yang, L. Q.; Han, C. R.; Wu, X. Y.; Zheng, C. J.; Ran, X.; Tang, R. F. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6434.
- [9] Li, S. F.; Zhang, Y.; Huang, N.; Zheng, Y. T.; Di, Y. T.; Li, S. L.; Cheng, Y. Y.; He, H. P.; Hao, X. J. *Phytochemistry* **2013**, *93*, 216.
- [10] Martin, G. D.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 701.
- [11] Martin, G. D.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 901.
- [12] Yin, H.; Luo, J. G.; Kong, L. Y. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 237.
- [13] Win, N. N.; Ito, T.; Aimaiti, S.; Kodama, T.; Tanaka, M.; Ngwe, H.; Asakawa, Y.; Abe, I.; Morita, H. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2306.
- [14] Liu, Y. W.; Cheng, Y. B.; Liaw, C. C.; Chen, C. H.; Guh, J. H.; Hwang, T. L.; Tsai, J. S.; Wang, W. B.; Shen, Y. C. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 689.
- [15] Jiang, H. Y.; Wang, W. G.; Tang, J. W.; Liu, M.; Li, X. R.; Hu, K.; Du, X.; Li, X. N.; Zhang, H. B.; Pu, J. X.; Sun, H. D. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2026.
- [16] Inaba, Y.; Hasuda, T.; Hitotsuyanagi, Y.; Aoyagi, Y.; Fujikawa, N.; Onozaki, A.; Watanabe, A.; Kinoshita, T.; Takeya, K. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1085.
- [17] Fu, Y. H.; Zhang, Y.; He, H. P.; Hou, L.; Di, Y. T.; Li, S. L.; Luo, X. D.; Hao, X. J. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1987.

(Li, L.; Fan, Y.)