

• 实验研究 •

6 种黄槿倍半萜类成分的衍生化改造和体外抗肿瘤活性研究

王灿红¹, 孙照翠², 马国需², 魏建和^{1,2}, 陈德力^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所海南分所 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南 海口 570311

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 对黄槿中 6 种天然倍半萜类成分进行衍生化改造, 并对所得衍生物进行体外抗肿瘤活性评价, 分析其构效关系。方法 选取各种芳胺对黄槿中发现的 6 种倍半萜成分进行席夫碱修饰, 采用噻唑蓝 (MTT) 法考察合成的目标化合物对 HeLa、HepG2 和 MCG-803 细胞的体外抗增殖活性。结果 衍生改造了 19 个不同的倍半萜类衍生物, 结合 ¹H-NMR、¹³C-NMR、HR-MS 确定其结构, 其中 17 个衍生物首次得到。部分衍生物表现出良好的抗肿瘤活性, 苄胺基团对此类骨架化合物的结构修饰能够较好地提高其抗肿瘤活性。结论 部分衍生物表现出良好的抗肿瘤活性, 特别对 HepG2 细胞活性有较大的提高, 化合物 12、22、23 具有进一步研究价值。

关键词: 黄槿; 倍半萜; 衍生化; 抗肿瘤; 构效关系

中图分类号: R284.2; R966

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2022)03-0445-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.03.001

Modify and *in vitro* antitumor activity evaluation of six sesquiterpenoid components derivatives from *Hibiscus tiliaceus*WANG Can-hong¹, SUN Zhao-cui², MA Guo-xu², WEI Jian-he^{1,2}, CHEN De-li¹

1. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Hainan Branch Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Haikou 570311, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To modify derivatives of 6 natural sesquiterpenoids from *Hibiscus tiliaceus* Linn., evaluate their *in vitro* antitumor activities, and reveal the structure-activity relationship. **Methods** A series of amines from *H. tiliaceus* were used to synthesize the gossypol Schiff base of the 6 sesquiterpenoids. Their antitumor activities *in vitro* were evaluated for HeLa, HepG2, and MCG-803 by MTT assay. **Results** Nineteen derivatives were synthesized, seventeen of which was reported for the first time, and their structures were characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and HR-MS. MTT assay showed some sesquiterpenoid derivatives exhibited good antitumor activity against HeLa, HepG2, and MCG-803 cell, and benzylamine modification could enhance antitumor activity of these sesquiterpenoid skeletons. **Conclusion** Some derivatives show promising antitumor activities, especially for the HepG2 cell lines, and compound 12, 22, and 23 are worth further studying.

Key words: *Hibiscus tiliaceus* Linn.; sesquiterpenoid; modify; antitumor activity; structure-activity relationship

黄槿 *Hibiscus tiliaceus* Linn. 属锦葵科木槿属, 物, 广泛分布于我国、越南、柬埔寨、缅甸、印度、是一种具有重要药用、生态和观赏价值的半红树植 印度尼西亚、马来西亚、菲律宾、老挝等热带地区,

收稿日期: 2022-01-04

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目 (219MS101); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (重大协同创新项目) (2021-I2M-1-032)

作者简介: 王灿红 (1986—), 女, 山东费县人, 助理研究员, 主要从事中药药效活性成分评价及作用机制研究。E-mail: xinzhuangjianpo@163.com

*通信作者: 陈德力 (1987—), 男, 湖北随州人, 副研究员, 研究方向为天然产物及其结构修饰改造。E-mail: chendeli9999@163.com

我国主产于海南、广西、台湾、广东、福建等省区，具有清热止咳、解毒消肿的功效^[1-2]。黄槿中含有多种高度氧化倍半萜类成分^[3]，如棉酚^[4]、parvifloral A^[5]，其中棉酚是一种具有多种生物活性的杜松烷型倍半萜二聚体天然产物，以醋酸棉酚的形式已经得到广泛使用，用于治疗男子节育、妇科疾病、子宫肌瘤等。近年来研究发现黄槿及其提取部位具有多种生物活性，如抗炎镇痛^[6]、抗肿瘤^[7-9]、抗氧化^[10-11]，其中的倍半萜类单体成分具有显著的抗菌作用^[12]、抗肿瘤作用^[13-14]、抗病毒活性^[15]，但此类倍半萜结构刚性结构、较差的溶解性等问题限制其新药开发。肿瘤发病率高、致死率高，是目前危害人类健康的最严重疾病之一，Kinghorn 等^[16]分析了小分子抗肿瘤药物来源，其中 79.8% 的小分子抗肿瘤药物来源于天然产物，但是只有 17% 的药物与天然产物具有相同的药效团，13% 的药物是天然产物的类似物。因此天然产物是小分子抗肿瘤药物的主要源头，对天然产物进行结构优化以提高活性、溶解性等是发现抗肿瘤药物的有效方式。基于黄槿中分离得到的 5 种倍半萜单倍体和 1 种二聚体成分（图 1），本研究对二聚体骨架棉酚进行结构修饰和构效关系研究，根据药效团结果对黄槿中发现的其他倍半萜成分 parvifloral A、syriacusin A、isohemigossypol-1-methyl ether 等进行修饰，期望得到此类杜松烷型倍半萜骨架抗肿瘤活性的构效关系，为后续的药物开发奠定基础。

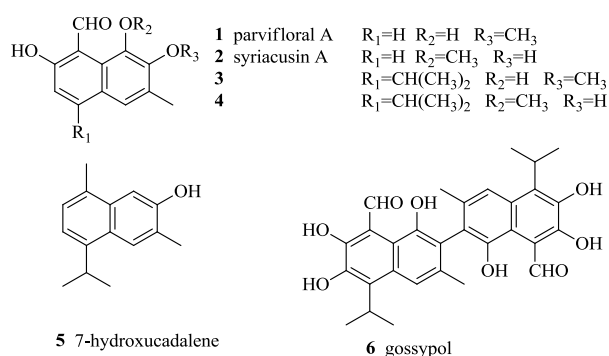


图 1 黄槿中杜松烷型倍半萜类化合物

Fig. 1 Cadinane-type sesquiterpenoid components of *H. tiliaceus*

1 仪器与试剂

薄层色谱板 GF₂₅₄（烟台化工厂）；柱色谱用硅胶（200~300 目，青岛海洋化工厂）；Bruker AV III 600 核磁共振仪[布鲁克（北京）科技有限公司]；

Waters SYNAPT G2 HDMS 高分辨质谱仪[沃特世科技（上海）有限公司]；IKA 磁力搅拌器/IKA 旋转蒸发仪（德国艾卡仪器设备有限公司）。

醋酸棉酚（批号 200818-1，质量分数 98%）、环戊胺（批号 201015-1，质量分数 98%）、正丁胺（批号 201120-1，质量分数 98%）、糠胺（批号 201015-1，质量分数 98%）、氮甲基哌嗪（批号 200912-1，质量分数 98%）、对甲氧基苄胺（批号 200411-1，质量分数 98%）、苄胺（批号 201010-1，质量分数 98%）、苯乙胺（批号 200104-1，质量分数 98%）、3,4,5-三氟苯乙胺（批号 200711-1，质量分数 98%）、4-氟苯乙胺（批号 200611-1，质量分数 98%）、对甲基苯乙胺（批号 200615-1，质量分数 98%）、2-(2-吡啶基)乙胺（批号 200507-1，质量分数 98%）均购于北京偶合科技有限公司；其余试剂均为分析纯，购于北京市通广精细化工有限公司；黄槿药材于 2018 年 7 月采集于海南省儋州市海头镇海港，经中国医学科学院药用植物研究所海南分所李榕涛副研究员鉴定为黄槿 *Hibiscus tiliaceus* Linn., parvifloral A (1)、syriacusin A (2)、gossypvertin (3)、isohemigossypol-1-methyl ether (4)、7-hydroxycadalene (5)、棉酚 (6) 均为黄槿提取分离制备获得。顺铂（货号 MKCG2946）购自 Sigma 公司，HeLa、HepG2、MGC-803 细胞均购自赛百慷（上海）生物科技股份有限公司。

2 方法和结果

2.1 棉酚衍生物的合成路线

首先对棉酚的醛基进行席夫碱衍生化反应，共设计合成了 11 种目标化合物 7~17，包括不同取代的芳环类、芳杂环、饱和杂环类、短链类化合物，见图 2。

2.2 棉酚衍生物的合成方法和结构确证

以化合物 7 为例，根据文献报道方法^[17]进行合成：将醋酸棉酚（58 mg，0.1 mmol）溶于无水乙醇（3 mL）中，待溶解后滴加环戊胺（41 mg，0.25 mmol），80 °C 回流搅拌，反应 12 h。TLC 检测反应完全后停止反应，冷却后经布氏漏斗抽滤，得黄色固体粗品，用乙醇-丙酮重结晶得化合物 7，收率 80.4%。化合物 8~17 也采用同样的合成方法。

化合物 7：黄色粉末，收率 80.4%，mp 170.5~171.5 °C。¹H-NMR（600 MHz，CDCl₃） δ ：13.47（broad s，2H），9.69（s，1H），9.67（s，1H），8.00~7.99（m，2H），7.59（s，2H），5.57（s，2H），3.90

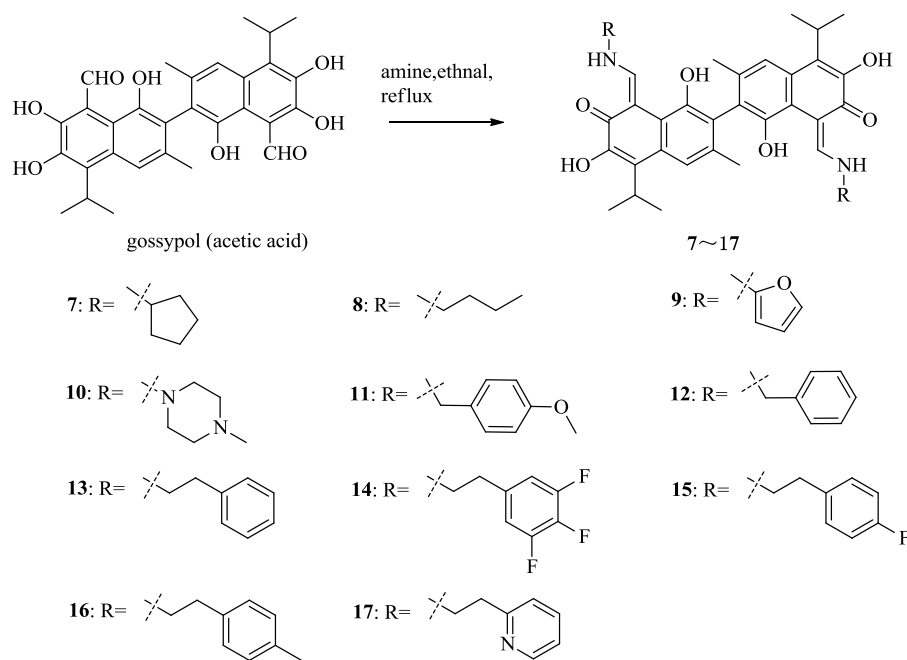


图2 棉酚衍生物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of gossypol derivatives

(broad s, 2H), 3.73~3.71 (m, 2H), 2.11 (s, 6H), 2.05 (dd, $J=12.8, 6.6$ Hz, 4H), 1.83 (dd, $J=9.2, 5.8$ Hz, 4H), 1.78 (ddd, $J=7.0, 5.0, 1.5$ Hz, 4H), 1.68 (dd, $J=9.2, 5.2$ Hz, 4H), 1.53 (t, $J=6.8$ Hz, 12H). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 172.16, 161.31, 148.88, 147.23, 131.63, 128.88, 127.08, 118.17, 118.16, 115.60, 114.76, 102.95, 61.75, 33.92, 31.25, 27.43, 23.68, 20.40, 20.35, 20.06. HR-MS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_6$: 651.343 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$; found: 651.338 7.

化合物 **8**: 黄色粉末, 收率 75.3%, mp 166.9~167.9 °C. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 13.27~13.28 (broad s, 2H), 9.65 (dd, $J=3.8, 3.3$ Hz, 2H), 8.09 (broad s, 2H), 7.61 (s, 2H), 5.57 (s, 2H), 3.74~3.72 (m, 2H), 3.51~3.49 (m, 4H), 2.12 (s, 6H), 1.69~1.67 (m, 4H), 1.53 (t, $J=7.0$ Hz, 12H), 1.43 (m, 4H), 0.94 (d, $J=7.4$ Hz, $2\times 3\text{H}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 171.86, 171.84, 163.16, 163.12, 163.08, 148.94, 148.92, 148.91, 147.15, 131.80, 131.79, 129.04, 129.02, 129.00, 128.97, 127.73, 127.71, 118.22, 115.67, 115.66, 114.74, 114.72, 103.18, 103.17, 100.00, 50.63, 32.53, 27.48, 20.40, 20.39, 20.33, 20.32, 20.06, 19.76, 13.56. HR-MS (ESI) m/z : calcd. for

$\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_6$: 627.343 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$, found: 627.339 1.

化合物 **8** 的波谱数据与文献报道数据一致^[17].

化合物 **9**: 黄色粉末, 收率 51.5%, mp 160.5~161.6 °C. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 13.47 (s, 2H), 9.70 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.92 (broad s, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.38 (s, 2H), 6.32~6.31 (m, 4H), 5.57 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.72 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 2.11 (s, 6H), 1.52 (t, $J=6.3$ Hz, 12H). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 173.25, 162.77, 149.17, 149.02, 147.08, 143.27, 132.05, 129.14, 127.72, 118.27, 115.84, 114.62, 114.59, 110.64, 108.75, 103.59, 46.92, 27.45, 20.36, 20.30, 20.05. HR-MS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_8$: 675.270 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$, found: 675.265 6.

化合物 **10**: 黄色粉末, 收率 66.3 %, mp 180.6~182.0 °C. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 15.17~14.04 (broad s, 2H), 9.62 (s, 2H), 7.66 (s, 2H), 7.05 (s, 2H), 5.61 (s, 2H), 3.83~3.81 (m, 2H), 3.11~3.10 (m, 6H), 2.56~2.54 (m, 6H), 2.31 (s, 4H), 2.12 (s, 4H), 1.54 (d, $J=7.2$ Hz, 12H). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 178.87, 157.26, 157.25, 151.13, 149.92, 145.20, 132.17, 129.71, 126.73, 114.59, 114.56, 105.93, 54.12, 53.41, 45.77, 20.58, 20.53, 20.51, 20.26. HR-MS (ESI) m/z :

calcd. for $C_{40}H_{51}N_6O_6$: 711.387 0 $[M-H]^-$, found: 711.382 1.

化合物 **11**: 黄色粉末, 收率 64.8%, mp 182.5~183.5 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.53 (broad s, 2H), 9.71 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 7.95 (broad s, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.21 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 5.57 (s, 2H), 4.59 (s, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.71~3.70 (m, 2H), 2.11 (s, 6H), 1.52 (t, $J=6.7$ Hz, 12H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.91, 162.68, 159.56, 148.98, 147.15, 131.90, 129.03, 128.84, 128.19, 127.44, 118.24, 115.76, 114.68, 114.45, 103.36, 55.34, 53.97, 27.44, 20.37, 20.33, 20.07。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{46}H_{47}N_2O_6$: 755.333 2 $[M-H]^-$; found: 751.327 4。

化合物 **12**: 黄色粉末, 收率 74.8%, mp 155.0~156.0 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.58 (broad s, 2H), 9.73 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 7.94 (s, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.35 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 7.33~7.28 (m, 6H), 5.58 (s, 2H), 4.66 (s, 4H), 3.72 (m, 2H), 2.11 (s, 6H), 1.52 (d, $J=6.8$ Hz, 12H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.08, 162.96, 148.99, 147.13, 136.24, 131.96, 129.09, 129.06, 128.24, 127.56, 127.36, 118.31, 118.29, 118.27, 115.78, 114.65, 103.44, 54.48, 27.45, 20.36, 20.31, 20.06。HR-MS (ESI) m/z : calcd. for $C_{44}H_{43}N_2O_6$: 695.312 1 $[M-H]^-$, found: 695.307 0。化合物 **12** 的波谱数据与文献报道的数据一致^[17]。

化合物 **13**: 黄色粉末, 收率 82.5%, mp 163.5~165.0 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.37 (broad s, 2H), 9.53 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 7.98 (s, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.28 (t, $J=7.5$ Hz, 4H), 7.20 (d, $J=7.3$ Hz, 6H), 5.47 (s, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.00 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 2.09 (s, 6H), 1.53 (d, $J=6.7$ Hz, 12H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.77, 162.84, 148.89, 147.14, 137.37, 131.75, 128.96, 128.84, 128.79, 127.29, 126.92, 115.67, 114.63, 103.15, 52.23, 37.30, 27.43, 20.40, 20.34, 20.02。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{46}H_{47}N_2O_6$: 723.343 4 $[M-H]^-$, found: 723.338 0。

化合物 **14**: 黄色粉末, 收率 54.8%, mp 158.5~159.5 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.59 (broad s, 2H), 9.66 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 7.85 (s,

2H), 7.60 (s, 2H), 6.92 (m, 4H), 5.56 (s, 2H), 4.59 (d, $J=4.9$ Hz, 4H), 3.88~3.59 (m, 2H), 2.14 (d, $J=28.8$ Hz, 6H), 1.53 (d, $J=5.2$ Hz, 12H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.77, 162.81, 149.01, 146.99, 132.85, 132.38, 129.35, 128.28, 115.93, 114.34, 111.43, 111.40, 111.32, 111.29, 103.85, 100.00, 53.09, 20.30, 20.26, 20.05。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{44}H_{37}F_6N_2O_6$: 803.255 6 $[M-H]^-$, found: 803.249 7。

化合物 **15**: 黄色粉末, 收率 77.5%, mp 173.5~174.5 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.36 (broad s, 2H), 9.48 (s, 1H), 9.46 (s, 1H), 7.97 (s, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.26 (s, 4H), 6.96 (t, $J=8.3$ Hz, 4H), 5.48 (s, 2H), 3.69 (d, $J=5.0$ Hz, 6H), 2.96 (t, $J=6.7$ Hz, 4H), 2.08 (m, 6H), 1.53 (d, $J=6.0$ Hz, 12H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.82, 162.92, 162.70, 161.08, 148.88, 147.12, 133.06, 133.04, 131.83, 130.37, 130.32, 128.97, 127.39, 118.22, 118.20, 115.76, 115.68, 115.61, 114.56, 103.15, 52.24, 36.45, 27.44, 20.42, 20.39, 20.33, 19.98。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{46}H_{45}F_2N_2O_6$: 759.324 6 $[M-H]^-$, found: 759.318 7。

化合物 **16**: 黄色粉末, 收率 70.1%, mp 146.0~147.0 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.36 (broad s, 2H), 9.53 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 7.99 (s, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.07 (q, $J=8.0$ Hz, 8H), 5.46 (s, 2H), 3.69~3.68 (m, 6H), 2.95 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 2.27 (s, 6H), 2.09 (s, 6H), 1.53 (d, $J=6.9$ Hz, 12H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.70, 162.86, 148.90, 147.16, 136.48, 134.27, 131.73, 131.71, 129.50, 128.94, 128.66, 127.23, 118.16, 118.15, 115.65, 114.67, 103.12, 100.00, 52.32, 36.86, 27.43, 20.99, 20.40, 20.34, 20.02。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{48}H_{51}N_2O_6$: 751.374 7 $[M-H]^-$; found: 751.370 2。

化合物 **17**: 黄色粉末, 收率 77.5%, mp 151.5~152.5 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.80~12.81 (broad s, 2H), 9.58 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.54 (s, 2H), 7.98~7.97 (broad s, 2H), 7.79~7.41 (m, 4H), 7.18~6.90 (m, 4H), 3.95 (s, 4H), 3.72~3.69 (m, 2H), 3.17 (t, $J=6.8$ Hz, 4H), 2.09 (s, 6H), 1.52 (d, $J=6.9$ Hz, 12H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.71, 162.93, 157.34,

149.71, 148.92, 147.16, 136.67, 131.68, 128.91, 127.17, 123.67, 121.91, 118.12, 118.10, 115.70, 114.70, 103.14, 50.00, 38.84, 27.41, 20.39, 20.33, 20.02。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{44}H_{45}N_4O_6$: 725.333 9 [M-H], found: 725.328 9。

2.3 倍半萜类成分 1~5 衍生物的合成路线

根据棉酚的结构修饰结果, 实验对黄槿中单倍半萜成分化合物 1~5 进行芳环类片段的衍生化, 得到各单倍半萜类成分的衍生物化合物 18~25, 合成路线见图 3。

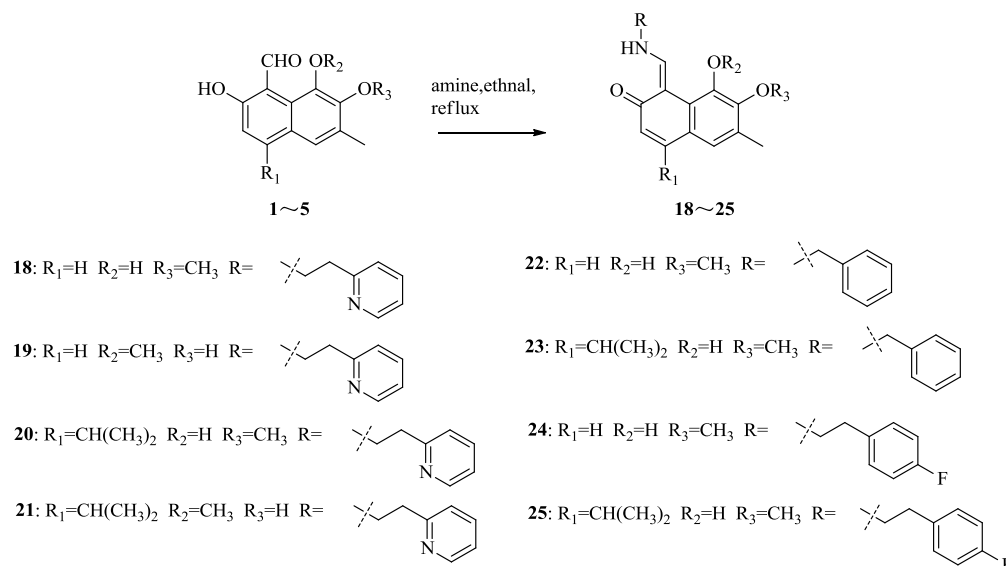


图3 单倍半萜成分衍生物的合成路线

Fig. 3 Synthetic route of sesquiterpenoid components derivatives

2.4 倍半萜类成分 1~5 衍生物的合成方法和结构确证

化合物 1~5 和相应的胺作为原料, 参照化合物 7 的合成方法合成化合物 18~25。

化合物 18: 棕黄色粉末, 收率 64.8%, mp 131.5~132.5 °C。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 9.82 (s, 1H), 8.57 (d, $J=4.5$ Hz, 1H), 7.77 (td, $J=7.7$, 1.7 Hz, 1H), 7.55 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J=7.2$, 5.2 Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.62 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 4.03 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.24 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, MeOD) δ : 181.14, 162.88, 157.67, 148.92, 138.67, 137.39, 125.49, 124.16, 124.13, 124.10, 122.08, 121.89, 121.87, 121.85, 121.07, 106.2, 59.48, 49.90, 38.02, 14.46。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{20}H_{19}N_2O_3$: 335.139 6 [M-H], found: 335.138 5

化合物 19: 棕黄色粉末, 收率 70.5%, mp 133.3~134.5 °C。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 9.42 (s, 1H), 8.56 (dd, $J=4.9$, 0.7 Hz, 1H), 7.76 (td, $J=7.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.54 (d, $J=9.3$ Hz,

1H), 7.38 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.29 (ddd, $J=7.4$, 5.0, 0.8 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.52 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 4.04 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.24 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.27 (s, 3H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, MeOD) δ : 181.08, 161.50, 157.74, 149.60, 148.92, 140.60, 139.09, 137.40, 126.63, 125.38, 124.20, 122.12, 121.89, 120.83, 104.69, 57.55, 50.24, 38.13, 14.54。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{20}H_{19}N_2O_3$: 335.139 6 [M-H] $^-$, found: 335.137 4。

化合物 20: 棕黄色粉末, 收率 66.9 %, mp 157.5~158.5 °C。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 9.39 (s, 1H), 8.55~8.54 (m, 1H), 7.75 (td, $J=7.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.36 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.28 (ddd, $J=7.5$, 5.0, 0.9 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.00 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.51 (s, 3H), 3.22 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.21~3.20 (dt, $J=13.6$, 6.8 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.30 (d, $J=6.8$ Hz, 6H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, MeOD) δ : 180.89, 161.02, 157.76, 156.15, 149.07, 148.90, 141.16, 137.39, 126.28, 124.19, 122.10, 121.76,

121.65, 121.48, 119.37, 118.22, 103.79, 57.59, 50.10, 38.21, 28.51, 22.00, 15.03。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{23}H_{25}N_2O_3$: 377.186 5 $[M-H]^-$, found: 377.184 2。

化合物 21: 棕黄色粉末, 收率 55.7%, mp 158.5~159.7 °C。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 9.80 (s, 1H), 8.55 (m, 1H), 7.77 (td, $J=7.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.38 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.32~7.28 (m, 2H), 6.64 (s, 1H), 4.00 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.51 (dt, $J=13.6$, 6.8 Hz, 1H), 3.22 (dd, $J=11.7$, 5.0 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.31 (s, 3H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, MeOD) δ : 183.08, 162.56, 157.69, 155.44, 148.89, 137.43, 125.04, 124.19, 122.83, 122.10, 120.32, 120.29, 117.03, 59.48, 38.10, 28.57, 22.03, 14.94。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{23}H_{25}N_2O_3$: 377.1865 $[M-H]^-$, found: 377.184 8。

化合物 22: 黄色粉末, 收率 69.5%, mp 153.6~154.6 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.32 (s, 1H), 7.49 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.39~7.37 (m, 2H), 7.33~7.35 (m, 3H), 7.13 (s, 1H), 6.69 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 2.31 (s, 3H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.02, 180.02, 180.00, 179.98, 160.99, 148.39, 139.87, 138.34, 136.63, 129.06, 128.16, 127.98, 127.22, 124.89, 123.38, 121.38, 121.05, 105.38, 58.64, 54.92, 15.54。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{20}H_{18}NO_3$: 320.128 7 $[M-H]^-$, found: 320.126 6。

化合物 23: 黄色粉末, 收率 73.1%, mp 155.7~156.7 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.30 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.38 (dd, $J=10.0$, 4.6 Hz, 2H), 7.34~7.32 (m, 3H), 6.69 (s, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.44 (dq, $J=13.5$, 6.9 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.32 (s, 2H), 1.31 (s, 3H), 1.31 (s, 3H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.11, 160.50, 155.10, 147.85, 140.39, 136.92, 129.01, 128.06, 127.85, 125.75, 122.46, 120.41, 120.21, 119.82, 104.42, 58.67, 54.77, 28.90, 22.97, 16.03。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{23}H_{24}NO_3$: 362.175 6 $[M-H]^-$, found: 362.173 2。

化合物 24: 黄色粉末, 收率 75.5%, mp 146.7~147.7 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.11 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.24~7.22 (m, 1H), 7.00

(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J=9.6$, 1.9 Hz, 1H), 6.89 (td, $J=8.5$, 2.4 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 3.74 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.01 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.30 (s, 3H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.73 (s), 163.01 (d, $J_{C-F}=246.4$ Hz), 160.58 (s), 155.04 (s), 147.92 (s), 140.55 (d, $J_{C-F}=7.5$ Hz), 140.40 (s), 130.26 (d, $J_{C-F}=8.5$ Hz), 125.70 (s), 124.77 (d, $J_{C-F}=3.2$ Hz), 122.41 (s), 120.56 (s), 120.16 (s), 119.59 (s), 115.74 (d, $J_{C-F}=21.2$ Hz), 113.72 (d, $J_{C-F}=21.0$ Hz), 104.06 (s), 58.52 (s), 53.21 (s), 37.16 (s), 28.90 (s), 22.98 (s), 16.06 (s)。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{24}H_{25}FNO_3$: 394.181 8 $[M-H]^-$, found: 394.179 4。

化合物 25: 黄色粉末, 收率 77.9%, mp 148.9~149.9 °C。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.13 (s, 1H), 7.48 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.23 (td, $J=7.9$, 6.2 Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.99 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 6.88 (td, $J=8.4$, 2.3 Hz, 1H), 6.71 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 3.76 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.01 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.31 (s, 3H)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.62 (s), 163.01 (d, $J_{C-F}=246.4$ Hz), 161.14 (s), 148.48 (s), 140.45 (d, $J_{C-F}=7.5$ Hz), 139.87 (s), 138.26 (s), 130.29 (d, $J_{C-F}=8.5$ Hz), 127.18 (s), 124.78 (s), 123.12 (s), 121.36 (s), 121.22 (s), 115.74 (d, $J_{C-F}=21.2$ Hz), 113.76 (d, $J_{C-F}=21.0$ Hz), 105.01 (s), 58.50 (s), 53.39 (s), 37.07 (s), 15.57 (s)。HR-MS (ESI): m/z calcd. for $C_{21}H_{19}FNO_3$: 352.134 9 $[M-H]^-$, found: 352.132 6。

2.5 抗肿瘤活性

采用 MTT 法, 以顺铂为阳性对照药, 测试化合物对 HeLa、HepG2、MGC-803 细胞的作用, 实验室根据细胞培养操作方法自行培养、冻存, 用于体外抗肿瘤活性。

取对数生长期的 HeLa、HepG2、MGC-803 细胞, 加无血清培养基调整细胞浓度为 $3 \times 10^5/mL$, 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL 。37 °C、5% CO_2 培养 12 h, 吸出培养基, 取 20 mg/mL WM-AC DMSO 溶液, 加无血清培养基稀释后加待测化合物和阳性对照药物 (6.25、12.5、25、50、100 $\mu g/mL$), 每个浓度设置 3 个复孔。继续培养 24 h, 吸出含药培养基, 每孔加入无血清培养基 100 μL 、5 mg/mL

MTT 溶液 20 μL , 培养箱中孵育 4 h, 弃去培养基, 每孔加 100 μL DMSO 充分震荡后, 570 nm 处读取吸光度 (A) 值, 所有化合物每个浓度均平行测试 3 次, 计算被测药物对肿瘤细胞的抑制率。采用非线性回归模型绘制 S 型剂量效应曲线, 用 OriginPro 软件计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

$$\lg \text{IC}_{50} = X_m - I[P - (3 - P_m - P_n) / 4]$$

X_m 为 $\lg$ 最大剂量; I 为 $\lg$ (最大剂量/相邻剂量); P 为

抑制率之和; P_m 为最大抑制率; P_n 为最小抑制率

棉酚及其衍生物的体外抗肿瘤活性结果见表 1。可以看到, 棉酚席夫碱衍生物取代基为环戊胺 (化合物 7)、氮甲基哌嗪 (化合物 10)、3,4,5-三氟苯乙基 (化合物 14)、对氟苯乙基 (化合物 15)、2-乙基吡啶 (化合物 17) 基团时, 抗肿瘤活性较好。

根据棉酚的活性结果, 对黄槿中 6 个倍半萜进行衍生化和对 HeLa、HepG2、MGC-803 细胞的体外抗肿瘤活性实验结果见表 1。

表 1 6 种倍半萜及其衍生物的体外抗肿瘤活性

Table 1 *In vitro* antitumor effect of six sesquiterpenoid components derivatives

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$			化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	HeLa	HepG2	MCG-803		HeLa	HepG2	MCG-803
1	26.03 $\pm$ 0.52	70.66 $\pm$ 2.39	30.59 $\pm$ 0.93	14	20.81 $\pm$ 2.02	—	—
2	50.37 $\pm$ 0.47	>100	>100	15	16.75 $\pm$ 0.39	32.55 $\pm$ 3.71	38.05 $\pm$ 2.75
3	22.11 $\pm$ 0.51	85.41 $\pm$ 3.38	50.28 $\pm$ 1.79	16	62.55 $\pm$ 1.80	—	—
4	30.66 $\pm$ 0.27	>100	71.80 $\pm$ 0.72	17	23.54 $\pm$ 0.69	40.69 $\pm$ 1.68	20.65 $\pm$ 0.89
5	51.63 $\pm$ 0.49	>100	80.68 $\pm$ 1.78	18	40.55 $\pm$ 1.33	22.48 $\pm$ 0.30	34.61 $\pm$ 0.22
6	13.20 $\pm$ 0.24	43.61 $\pm$ 1.87	>100	19	35.17 $\pm$ 0.46	>100	>100
7	18.55 $\pm$ 3.11	—	—	20	33.57 $\pm$ 0.19	31.63 $\pm$ 1.69	45.67 $\pm$ 3.05
8	>100	—	—	21	>100	83.90 $\pm$ 2.11	80.98 $\pm$ 2.62
9	40.20 $\pm$ 2.47	—	—	22	37.41 $\pm$ 2.40	18.52 $\pm$ 0.74	25.34 $\pm$ 1.75
10	24.20 $\pm$ 0.79	—	—	23	41.77 $\pm$ 0.49	14.88 $\pm$ 1.77	30.59 $\pm$ 1.60
11	>100	—	—	24	30.73 $\pm$ 0.64	32.17 $\pm$ 0.29	55.33 $\pm$ 2.48
12	25.44 $\pm$ 0.64	38.78 $\pm$ 0.77	26.83 $\pm$ 0.66	25	26.48 $\pm$ 0.70	28.01 $\pm$ 1.14	40.44 $\pm$ 2.88
13	>100	—	—	顺铂	8.55 $\pm$ 2.39	15.01 $\pm$ 0.55	12.81 $\pm$ 0.45

“—”表示未测定

“—” means not determined

2.6 构效关系总结

(1) 对杜松烷型倍半萜二聚体棉酚结构修饰, 得到的化合物 7、15、17 表现出最好的体外抗肿瘤活性。

(2) 其他骨架的化合物 1~5 对 3 种肿瘤细胞活性比较而言, 化合物 1、3 表现出最好的活性, 7 位、8 位分别为羟基、甲氧基时活性较好, 后续对化合物 1~5 的衍生化重点考察了化合物 1、3 的结构修饰。化合物 1、3 的衍生物 18、20、22~25 具有较好的抗肿瘤活性, 特别是对 HepG2 细胞表现出一定的选择性, 跟棉酚相比活性有较大的提高。杜松烷型倍半萜单倍体类化合物和衍生物以及二聚体类的棉酚相比同样具有较好的抗肿瘤活性。

(3) 比较 3 种芳环类胺 (对氟苯乙胺、2-乙胺

吡啶、苄胺) 对化合物 1~4、6 的结构修饰结果可以看到, 3 种药效团对每个骨架化合物的 MCG-803 胃癌细胞活性有普遍性提高, 如化合物 12、15、17 和棉酚 (化合物 6) 相比, 化合物 18、22 与化合物 1 相比, 化合物 20、23 与化合物 3 相比, 活性均有一定提高。此外苄胺的修饰对 HepG2 细胞的活性提高显著。综合其他 2 种肿瘤细胞的活性结果, 苄胺对此骨架化合物的席夫碱类结构修饰能够较好地提高其抗肿瘤活性。

3 讨论

棉酚是一种男用避孕药, 研究发现其作为靶向 Bcl-2 用于治疗复发难治性恶性肿瘤, 已成为著名的药物分子进入临床 I/II 期试验, 被科研工作者广泛关注。但二聚的杜松烷型倍半萜结构不易获得,

杜松烷型倍半萜抗肿瘤活性构效关系并不明确,因此对二聚的棉酚和不同类型的杜松烷型倍半萜进行结构修饰能够发现活性较好的苗头化合物,改善天然产物的溶解性等理化性质。

苄胺席夫碱衍生化对杜松烷型倍半萜的肝癌细胞毒活性显著提高,化合物 **12**、**22**、**23** 值得后续进一步研究,也提示后续可对杜松烷型倍半萜天然产物结构改造和进行深入的抗肝癌活性研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第 49 卷(2) [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 66.
- [2] 陈焕镛. 海南植物志 [M]. 第 2 卷. 北京: 科学出版社, 1965: 100.
- [3] 张小坡, 裴月湖, 张俊清, 等. 黄槿化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(6): 434-438.
- [4] Keshmiri-Neghab H, Goliaei B. Therapeutic potential of gossypol: An overview [J]. *Pharm Biol*, 2014, 52(1): 124-128.
- [5] Wongsan N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, et al. Parviflorals A-F, trinorcadalenes and bis-trinorcadalenes from the roots of *Decaschistia parviflora* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 95: 368-374.
- [6] 谭银丰, 李志峰, 张彩云, 等. 黄槿抗炎活性部位的初探 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(27): 77-78.
- [7] Sunilson A J, Mohan S, Mohamed M A, et al. Anti-tumor activity of *Hibiscus tiliaceus* Linn. roots [J]. *Iranian J Pharmacol Ther*, 2008, 7(1): 123-125.
- [8] Chen J J, Huang S Y, Dun C Y, et al. A new cytotoxic amide from the stem wood of *Hibiscus tiliaceus* [J]. *Planta Med*, 2006, 72(10): 935-938.
- [9] Matsumoto T, Imahori D, Achiwa K, et al. Chemical structures and cytotoxic activities of the constituents isolated from *Hibiscus tiliaceus* [J]. *Fitoterapia*, 2020, 142: 104524.
- [10] Kumar S, Kumar D, Prakash O. Evaluation of antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents of *Hibiscus tiliaceus* flowers [J]. *EJEAFCh*, 2008, 7(4): 2863-2871.
- [11] Ramproshad S, Afroz T, Mondal B, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of leaves of medicinal plant *Hibiscus tiliaceus* L [J]. *Pharmacol Online*, 2012, 3: 82-87.
- [12] Boonsri S, Karalai C, Ponglimanont C, et al. Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Thespesia populnea* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(7): 1173-1177.
- [13] Egas V, Collado J A, Collado J A, et al. Effect of natural and semi-synthetic cadinanes from *Heterotheca inuloides* on NF- κ B, Nrf2 and STAT3 signaling pathways and evaluation of their in vitro cytotoxicity in human cancer cell lines [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(12): 3135-3147.
- [14] Dao V T, Gaspard C, Mayer M, W, et al. Synthesis and cytotoxicity of gossypol related compounds [J]. *Eur J Med Chem*, 2000, 35(9): 805-813.
- [15] Royer R E, Deck L M, Martinez F J, et al. Synthesis and anti-HIV activity of 1,1'-dideoxygossypol and related compounds [J]. *J Med Chem*, 1995, 38(13): 2427-2432.
- [16] Kinghorn A D. Review of anticancer agents from natural products [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(9): 2315-2315.
- [17] Li L, Li Z, Wang K, et al. Synthesis and antiviral, insecticidal, and fungicidal activities of gossypol derivatives containing alkylimine, oxime or hydrazine moiety [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(3): 474-483.

[责任编辑 解学星]