

• 化学成分 •

大八角枝叶中 1 个新的 seco-prezizaane 型倍半萜化合物

方振峰, 张 丽, 刘 欣, 张 涛

江汉大学医学院 药理学系, 湖北 武汉 430056

摘要: 目的 研究大八角 *Illicium majus* 枝叶的化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱、快速制备色谱和制备 HPLC 等技术进行分离和纯化, 通过 HR-ESI-MS、1D-NMR、2D-NMR 等波谱数据鉴定化合物的结构。通过 MTT 法评价了化合物的细胞毒活性。结果 从大八角枝叶提取物中分离得到 1 个 seco-prezizaane 型倍半萜, 命名为大八角酮 (1)。化合物 1 对人结肠癌细胞 HCT-8、人肝癌细胞 Bel-7402、人胃癌细胞 BGC-823 以及人肺癌细胞 A549 的 IC₅₀ 值分别为 42.3、48.5、51.1 和 39.9 μmol/L。结论 化合物 1 为 1 个新的倍半萜类化合物, 未表现出明显的细胞毒活性。

关键词: 八角属; 大八角; 倍半萜; seco-prezizaane 型; 大八角酮; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)16-2803-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.003

A new seco-prezizaane-type sesquiterpenoid from twigs and leaves of *Illicium majus*

FANG Zhen-feng, ZHANG Li, LIU Xin, ZHANG Tao

Department of Pharmacy, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the twigs and leaves of *Illicium majus*. **Methods** The compound was isolated by column chromatography over silica gel, Sephadex HL-20, and flash chromatography coupled with preparative HPLC. The structure was elucidated by spectroscopic analysis including HR-ESI-MS, 1D-NMR, and 2D-NMR. The cytotoxic activities were assessed by MTT. **Results** A new seco-prezizaane-type sesquiterpenoid named majusatone (1) was isolated from the twigs and leaves of *I. majus*. Compound 1 exhibited the cytotoxic activity against HCT-8, Bel-7402, BGC-823, and A549 with IC₅₀ values of 42.3, 48.5, 51.1, and 39.9 μmol/L, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new special seco-prezizaane-type sesquiterpenoid, and shows no significant cytotoxic activities against HCT-8, Bel-7402, BGC-823, and A549.

Key words: *Illicium* Linn.; *Illicium majus* Hook. f. et Thoms.; sesquiterpenoid; seco-prezizaane-type; majusatone; cytotoxic activities

大八角 *Illicium majus* Hook. f. et Thoms. 为八角科 (Magnoliaceae) 八角属 *Illicium* Linn. 植物, 果、树皮均有毒, 主要分布在中国南方各省市^[1]。贵州民间用大八角根、叶治疗胃脘胀痛呕吐, 皮用于驱风除湿、活血止痛, 治疗关节肿痛^[2]。目前, 从大八角中分离得到的倍半萜类成分有 27 个^[3-10], 绝大部分为 seco-prezizaane 型倍半萜, 其中又以 anisatin 和 majucin 两种亚型最多。日本学者最先对大八角中倍半萜的活性进行了研究, 发现其中的毒八角素 (anisatin)^[5]、2-O-6-去羟基新莽草素 (2-oxo-6-dehydroxyneoisatin)^[6]、2-O-新莽草素 (2-oxoneo-anisatin)^[8] 具有类似于苦毒素样的惊厥毒性, 且活性相当, 而新大八角素 (neomajucin)^[4-5]

惊厥毒性较弱。近些年通过对大八角的深入研究, 也发现了一些新的活性, 如牛长山等^[11]发现莽草酸内酯 A (anisactone A)、莽草酸内酯 B (anisactone B) 对脂多糖 (LPS) 刺激小鼠小胶质细胞释放 NO 抑制率分别为 75.31%、53.7%。随着八角属中倍半萜类化合物一些新活性的发现, 如抗乙肝病毒^[12]、柯萨奇病毒 B3 感染选择性作用^[13]等, 科研工作者对八角属植物的研究更加感兴趣。本实验对大八角枝叶 95%乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部位进行研究, 分离得到 1 个新的 seco-prezizaane 型倍半萜, 命名为大八角酮 (majusatone, 1)。利用 MTT 法对化合物 1 进行细胞毒活性研究, 结果表明其对人结肠癌细胞 HCT-8、人肝癌细胞 Bel-7402、人胃癌细胞 BGC-823 以及人

收稿日期: 2016-02-24

基金项目: 江汉大学科研启动经费资助项目 (0600034)

作者简介: 方振峰 (1980—), 湖北人, 博士, 讲师, 从事天然产物活性成分研究。Tel: (027)84225149 E-mail: zhenfengfang@163.com

肺癌细胞 A549 的 IC₅₀ 值分别为 42.3、48.5、51.1、39.9 μmol/L, 均无明显细胞毒性。

1 仪器与材料

Inova 500 MHz 核磁共振仪(美国 Varian 公司); Agilent Technologies 6250Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 型色谱仪、Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Shimadzu LC-6AD 制备型高效液相色谱仪(日本岛津公司); Biotage SP1/SP4z 快速制备色谱(瑞典 Biotage 公司); YMC-Pack ODS-A 反相色谱柱(250 mm×20 mm, 10 μm)、YMC C₁₈ 分析型反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(YMC 公司); RP-C₁₈ 反相硅胶(50 μm, 默克公司); GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶及柱色谱用 100~200 目、200~300 目硅胶(青岛海洋化工厂); Sephadex™ LH-20 葡聚糖凝胶(英国 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司); 色谱纯溶剂(天津科密欧公司); 分析纯试剂(国药集团)。

大八角枝叶购自亳州中药材市场,产地为广西。样品经江汉大学张涛教授鉴定为八角属植物大八角 *Illicium majus* Hook. f. et Thoms. 的枝叶。

2 提取与分离

取干燥大八角枝叶约 6 kg, 粉碎, 用 95%乙醇加热回流提取 3 次(提取时间分别为 3、2、2 h; 溶剂每次 60 L, 共 180 L), 合并提取液, 减压回收溶剂浓缩得 650 g 浸膏, 加适量水使其混悬分散, 分别用石油醚(60~90 °C, 每次溶剂 2 L, 共 7 次)、醋酸乙酯(每次溶剂 2 L, 共 5 次)、正丁醇(每次溶剂 2 L, 共 4 次)等体积萃取, 回收溶剂得到石油醚、醋酸乙酯、正丁醇 3 个萃取部位。取醋酸乙酯萃取部位(180 g)经硅胶柱色谱分离, 依次用二氯甲烷-甲醇(100:1、100:2、100:3、100:5、100:7、100:10、100:20、100:30、100:50、0:100)梯度洗脱, 合并洗脱液得到共 9 个流分 Fr. A~I。Fr. E(约 18 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 50%甲醇洗脱, 得到样品约 12 g, 再经反相快速制备色谱, 依次用甲醇-水(3:97→100:0)梯度洗脱, 共得 10 个流分 Fr. 1~10。Fr. 4(约 2 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得共 5 个流分 Fr. 4-1~4-5。其中 Fr. 4-3(240 mg)经反相制备 HPLC 分离, 乙腈-水(20:80)洗脱, 得到化合物 **1**(6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。[α]_D²⁵ +13.5° (c 0.52,

MeOH); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 206 (3.24); HR-ESI-MS *m/z*: 305.136 0 [M+Na]⁺ (计算值 305.135 9), 确定分子式为 C₁₅H₂₂O₅, 不饱和度为 5。IR 光谱显示存在羟基(3 465 cm⁻¹)、羰基(1 732 cm⁻¹)和双键(1 652 cm⁻¹)。

¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱数据(表 1)及 HSQC 实验中, 可以观察到化合物 **1** 中有 15 个碳信号, 包括 2 个孤立甲基信号 δ_H 1.24 (3H, s, H-12), 1.15 (3H, s, H-13) 和 1 个连次甲基 (-CH-) 的甲基信号 δ_H 0.90 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, H-15); 1 个双键信号 δ_H 5.58 (1H, brs, H-3), δ_C 128.8 (C-3), 146.5 (C-4); 1 个羰基信号 δ_C 210.0 (C-7); 1 个半缩醛(或缩醛)叔碳 (-O-CH-O-) δ_H 5.70 (1H, brs, H-11), δ_C 102.5 (C-11); 1 个连氧叔碳 (-O-CH-) δ_H 4.71 (1H, brs, H-10), δ_C 73.8 (C-10); 1 个连氧季碳 δ_C 79.3 (C-6) 以及 1 个连氧亚甲基 δ_H 3.64 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-14β), 3.55 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-14α), δ_C 69.6 (C-14)。同时 DEPT 谱表明还有 2 个季碳 δ_C 50.6 (C-5), 49.8 (C-9), 2 个仲碳 δ_C 40.3 (C-2), 47.9(C-8)和 1 个叔碳 δ_C 46.1 (C-1)。根据 ¹H-¹H COSY 谱, 可知化合物 **1** 具有 CH₃-CH-CH₂-CH=和-CH-CH-片段(图 1)。以上所推断结构单元和片段, 结合本属植物中已得到倍半萜化合物的结构特点, 可知化合物 **1** 具有 seco-prezizaane 型倍半萜的骨架。从 HMBC 谱(图 2)中可知, H-11 分别和 C-9、C-10、C-14 相关, H-12 分别和 C-5、C-7 相关, 结合 C-11、C-14 表 1 化合物 **1** 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据 (500/125 MHz, CD₃OD)

Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound **1** (500/125 MHz, CD₃OD)

碳位	δ _H	δ _C
1	2.05 (1H, m)	46.1 (CH)
2	2.39 (1H, m, H-2β) 2.20 (1H, m, H-2α)	40.3 (CH ₂)
3	5.58 (1H, brs)	128.8 (CH)
4		146.5 (C)
5		50.6 (C)
6		79.3 (C)
7		210.0 (C)
8	2.61 (1H, d, <i>J</i> = 14.0 Hz, H-8β) 2.46 (1H, d, <i>J</i> = 14.0 Hz, H-8α)	47.9 (CH ₂)
9		49.8 (C)
10	4.71 (1H, brs)	73.8 (CH)
11	5.70 (1H, brs)	102.5 (CH)
12	1.24 (3H, s)	13.9 (CH ₃)
13	1.15 (3H, s)	15.2 (CH ₃)
14	3.64 (1H, d, <i>J</i> = 11.0 Hz, H-14β) 3.55 (1H, d, <i>J</i> = 11.0 Hz, H-14α)	69.6 (CH ₂)
15	0.90 (3H, d, <i>J</i> = 7.5 Hz)	13.3 (CH ₃)

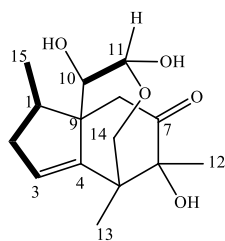


图 1 化合物 1 平面结构及主要 ^1H - ^1H COSY 谱 (—)
Fig. 1 Structure and key ^1H - ^1H COSY correlations (—) of compound 1

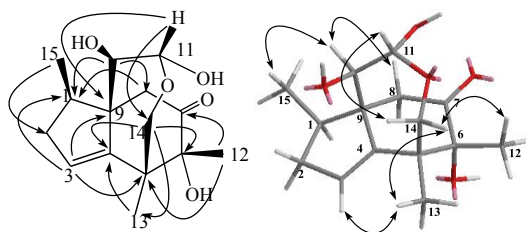


图 2 化合物 1 主要 HMBC 和 NOESY 谱
Fig. 2 Key HMBC and NOESY correlations of compound 1

和 C-7 的化学位移值, 可知 C-11 和 C-14 通过氧原子相连, C-7 为羰基。以上推断结合分子式及化学位移值, 可知 C-6、C-10、C-11 上各连有 1 个羟基, 化合物 1 的平面结构见图 1。化合物 1 结构和 cycloparvifloralone 型倍半萜 merrillianone 的半乙酰化合成物^[14]相比较, 化合物 1 少了 2 个乙酰基片段信号。另外, 化合物 1 的 7 位与 11 位是不相连的, 这与常见的 cycloparvifloralone 型倍半萜母核不同, 表明其是一种特殊的 seco-prezizaane 型倍半萜。在 NOESY 谱 (图 2) 中, H-10 和 H-15、H-8 β 相关, H-11 和 H-14 β 相关, H-14 α 和 H-12、H-13 相关, H-13 和 H-4 相关, 表明 12-CH₃、15-CH₃、10-OH 是处于 β 位, 11-OH 是处于 α 位。由于 Huang 等^[14]对化合物 1 相同母核的 merrillianone 的半乙酰化合成物的绝对构型是通过 X-单晶衍射技术进行确定, 同时化合物 1 结构比较刚性, 因此, 本实验未对化合物 1 的绝对构型进行测定。综上所述, 确定了化合物 1 的结构, 为新化合物, 命名为大八角酮。

4 讨论

本研究利用多种色谱分离手段, 从大八角枝叶 95%乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部位分离得到 1 个新的 seco-prezizaane 型倍半萜大八角酮 (majusatone, 1)。采用 MTT 法对其进行细胞毒活性评价, 结果表明, 化合物 1 对人结肠癌细胞 HCT-8、人肝癌细胞 Bel-7402、人胃癌细胞 BGC-823

以及人肺癌细胞 A549 的 IC₅₀ 值分别为 42.3、48.5、51.1、39.9 $\mu\text{mol/L}$, 未表现出明显的细胞毒活性。本研究结果为大八角的进一步研究开发提供了一定的物质基础和科学依据。

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 [M]. 北京: 北京科学出版社, 1996.
- [2] 张俊瑰, 张连富, 丁先东. 大八角叶精油化学成分的研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 1996, 18(2): 61-62.
- [3] Yang C S, Kouno I, Kawano N. New anisatin-like sesquiterpene lactones from pericarps of *Illicium majus* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1988, 29(10): 1165-1168.
- [4] Kouno I, Baba N, Hashimoto M, et al. A new sesquiterpene lactone and its glucoside from the pericarps of *Illicium majus* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(7): 2427-2430.
- [5] Kouno I, Baba N, Hashimoto M, et al. Isolation of three new sesquiterpene lactones from the pericarps of *Illicium majus* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(9): 2448-2451.
- [6] Yang C S, Hashimoto M, Baba N, et al. A new toxic neoanisatin derivative from the pericarps of *Illicium majus* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(38): 291-292.
- [7] Kouno I, Baba N, Hashimoto M, et al. Sesquiterpene lactones from the pericarps of *Illicium majus*: 2-oxy derivatives of neomajucin and 3, 4-dehydroxynemajucin [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(2): 422-425.
- [8] Kouno I, Hashimoto M, Enjoji S, et al. Isolation of neoanisatin derivatives from the pericarps of *Illicium majus* with other constituents [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(7): 1773-1778.
- [9] Fang Z F, Zhang G J, Chen H, et al. Diterpenoids and sesquiterpenoids from the twigs and leaves of *Illicium majus* [J]. *Plant Med*, 2013, 79(2): 142-149.
- [10] Wang Y D, Zhang G J, Qu J, et al. Diterpenoids and sesquiterpenoids from the roots of *Illicium majus* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(10): 1976-1983.
- [11] 牛长山, 王亚丹, 屈晶, 等. 大八角根化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2689-2692.
- [12] Liu J F, Wang L, Wang Y F, et al. Sesquiterpenes from the fruits of *Illicium jiadifengpi* and their anti-hepatitis B virus activities [J]. *Fitoterapia*, 2015, 104: 41-44.
- [13] Lu H N, Ma S G, Liu Y B, et al. Sesquiterpenes from the roots of *Illicium oligandrum* [J]. *J Asia Nat Prod Res*, 2015, 17(5): 430-438.
- [14] Huang J M, Yang C S, Wang H, et al. Structure of novel sesquiterpenes from the pericarps of *Illicium merrillianum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47(12): 1749-1752.