

黄芩花化学成分及其抗乙肝病毒作用

张志强¹, 李石飞^{1*}, 张立伟^{1*}, 钞建宾²

1. 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西大学分子科学研究所, 山西 太原 030006

2. 山西大学 大型仪器中心, 山西 太原 030006

摘要: 目的 研究山西黄芩花(河朔堇花 *Wikstroemia chamaedaphne* 的花蕾)中具有抗乙肝病毒(HBV)作用的二萜成分。方法 采用色谱方法分离纯化, 经波谱数据和单晶衍射技术鉴定化合物结构, 采用 MTT 法进行体外细胞毒和抗 HBV 活性测试。结果 从黄芩花中分离鉴定 9 个化合物, 包括 6 个瑞香烷型二萜: 河朔堇花素(1)、pimelotide A(2)、pimelotide C(3)、wikstroelide E(4)、pimelea factor S6(5)、pimelea factor S7(6); 1 个惕各烷型二萜: 6 α ,7 α -epoxy-5 β -hydroxy-12-deoxyphorbol-13-decanoate(7)和 2 个黄酮苷化合物: 木犀草素-4'-O- β -D-葡萄糖苷(8)和异槲皮苷(9)。化合物 1~4 和 7 均显示较强的细胞毒活性, 其半数毒性浓度(TC₅₀)值为 3.24~7.30 μ g/mL, 且化合物 3 显示出显著的抑制 HBsAg 产生的作用, 其 IC₅₀ 为 0.016 μ g/mL, 治疗指数(therapeutic index, TI)值为 355.63。结论 化合物 7 和 8 为首次从该属植物中分离得到, 首次报道了化合物 2 的晶体结构, 首次发现了化合物 3 具有显著的抑制 HBsAg 产生的作用。

关键词: 黄芩花; 瑞香烷型二萜; 惕各烷型二萜; 河朔堇花素; pimelotide C; 抗乙肝病毒

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)07-1292-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.005

Chemical constituents from flowers of *Wikstroemia chamaedaphne* and their anti-hepatitis B virus activity

ZHANG Zhi-qiang¹, LI Shi-fei¹, ZHANG Li-wei¹, CHAO Jian-bin²

1. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Education Ministry, Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Scientific Instrument Center, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To study the anti-hepatitis B virus diterpenoids from flowers of *Wikstroemia chamaedaphne*. **Methods** The chemical constituents of the plant were isolated and purified by column chromatography and their structures were elucidated on the basis of physicochemical properties, X-ray, and spectral data. The antiviral assay was tested by MTT and ELISA methods. **Results** Six daphnane-type diterpenoids and one tiglane-type diterpenoid were obtained and determined as simplexin (1), pimelotide A (2), pimelotide C (3), wikstroelide E (4), pimelea factor S6 (5), pimelea factor S7 (6), and 6 α ,7 α -epoxy-5 β -hydroxy-12-deoxyphorbol-13-decanoate (7), along with two flavonoid glycosides luteolin-4'-O- β -D-glucoside (8) and isoquercitrin (9). Compounds 1—4 and 7 showed certain cytotoxicity on HepG2.2.15 and compound 3 exhibited strong anti-hepatitis B virus activities with IC₅₀ value of 0.016 μ g/mL against HBV surface antigen (HBsAg), with TI (Therapeutic Index) value of 355.63. **Conclusion** Compounds 7 and 8 are isolated from the genus for the first time. And it is the first time to report the X-ray structure of compound 2 and the anti-hepatitis B virus activity of compound 3 (pimelotide C).

Key words: *Wikstroemia chamaedaphne* Meissn.; daphnane-type diterpenoid; tiglane-type diterpenoid; simplexin; pimelotide C; anti-hepatitis B virus

二萜是植物中一类具有重要生物活性的次生代谢产物, 因其结构复杂多样而备受研究者关注。惕

各烷型(tiglane-type)二萜和瑞香烷型(daphnane-type)二萜均为具有 5/7/6 三环体系的萜类, 两者具

收稿日期: 2017-01-04

基金项目: 山西省重点研发计划项目(201603D321024); 山西省面上青年基金项目(201601D021157)

作者简介: 张志强(1992—), 男, 硕士研究生在读, 从事天然产物化学研究。

*通信作者 李石飞(1983—), 男, 博士, 讲师, 从事中药资源和天然产物化学研究。E-mail: lisf@sxu.edu.cn

张立伟(1963—), 男, 博士, 教授, 从事中药资源和天然药物研究。E-mail: lwzhang@sxu.edu.cn

有相同的生源途径,其结构的差异是在13,14,15位是否形成3元环结构。这2类二萜显示出了抗肿瘤、降血糖、杀虫、降低胆固醇、抗病毒等广泛的生物活性^[1-2]。近几年,2类二萜在HIV方面研究已成为天然产物研究的热点,有诸多显示出显著抗HIV作用和特殊作用机制的二萜成分已被报道^[3-4]。尤其是惕各烷型二萜 prostratin 已经美国艾滋病研究联盟批准目前正在进行I期临床研究,有望成为首个以蛋白激酶(PKC)激动剂形式的抗HIV药物^[5]。进一步研究发现2类二萜抑制HIV复制的途径主要是通过竞争性结合病毒表面受体从而实现阻止病毒进入宿主细胞^[6-9]。本课题组推测,2类二萜抗HIV作用可能并非直接作用于病毒本身,而是作用于寄主受体。众所周知,HIV是RNA病毒,变异性很强,实验室研究要求非常严格,基于2类二萜特殊作用机制,且是通过寄主本身发挥作用,那么其特殊的抗病毒作用是否具有广谱性?能否运用容易操作且普遍的HBV病毒进行验证?基于这一思路,本研究以山西资源丰富的瑞香科药材黄芩花作为研究对象,对其二萜和抗HBV活性进行研究。

黄芩花为瑞香科莪花属植物河朔莪花 *Wikstroemia chamaedaphne* Meissn. 的花蕾,花小,黄色,数朵排成顶生伞形聚伞花序,带数个再集成圆锥花序,花蕾粉末为黄绿色。黄芩花性温、味辛,有小毒,在山西、甘肃等省用黄芩花入药主治泻下逐水、通便,用于水肿胀满、痰饮积聚、咳逆喘满、精神分裂症、癫痫等。临床研究表明,河朔莪花叶水提取物有明显镇静作用,河朔莪花能使兴奋性病人安静,抑郁性病人情绪活跃,忧虑性病人有所缓解^[10]。我国传统用药中,河朔莪花作为抗早孕药物使用可使孕酮水平、血清绒毛膜促性腺激素水平降低,效果与前列腺素、米非司酮相当^[11]。关于河朔莪花的化学成分研究目前报道较少,且仅限于二萜和黄酮等成分^[12-13]。本实验对采自山西绛县的黄芩花进行了化学成分研究,从黄芩花醋酸乙酯萃取物中分离得到9个成分,包括6个瑞香烷型二萜:河朔莪花素(simplexin, 1)、pimelotide A (2)、pimelotide C (3)、wikstroelide E (4)、pimelea factor S6 (5)、pimelea factor S7 (6); 1个惕各烷型二萜:6 α ,7 α -epoxy-5 β -hydroxy-12-deoxyphorbol-13-decanoate (7)和2个黄酮苷化合物:木犀草素-4'-O- β -D-葡萄糖苷(luteolin-4'-O- β -D-glucoside, 8)和异槲皮苷(isoquercitrin, 9)。其中化合物7和8为首次从该

属植物分离得到,并首次报道化合物2的晶体结构(图1)。对化合物1~4和7进行了细胞毒和体外抗HBV活性测试,结果显示5个化合物均显示较强的细胞毒活性,其半数毒性浓度(TC₅₀)值为3.24~7.30 μ g/mL,化合物3显示出显著的抑制乙肝表面抗原(HBsAg)产生的作用,其IC₅₀为0.016 μ g/mL, TI值为355.63。

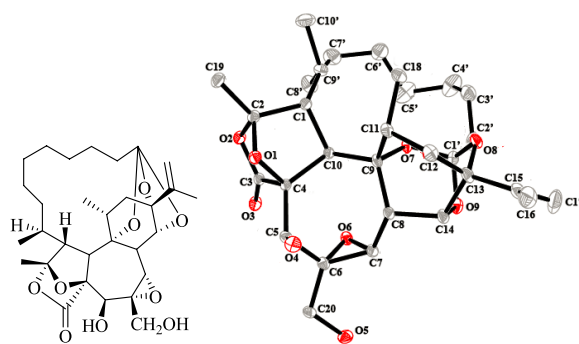


图1 化合物2的化学结构和晶体结构

Fig. 1 Chemical and X-ray structure of compound 2

1 仪器与材料

Bruker-600 超导核磁共振光谱仪(Bruker公司);液质联用仪 Thermo Scientific Q Exactive (Thermo公司);安捷伦1200液相(Agilent公司);X-射线单晶衍射仪 D8 Venture (Bruker公司);硅胶(青岛海洋化工厂,200~300目);ODS-AM (YMC公司);凝胶 Sephadex LH-20 (GE公司);色谱纯甲醇和乙腈(Thermo公司),所用其他试剂均为分析纯。HBsAg和HBeAg ELISA诊断试剂盒(上海实业科华生物技术公司)。

黄芩花于2015年4月采自山西省绛县,经山西大学黄土高原研究所张峰教授鉴定为河朔莪花 *Wikstroemia chamaedaphne* Meissn. 的花蕾,标本(201504012A)存放于山西大学分子科学研究所。

2 提取与分离

黄芩花花蕾5.0 kg,干燥;用10倍量的纯甲醇回流提取2次,每次3 h,滤过,合并提取液,减压浓缩,将所得浸膏加入3~5倍量水,依次用石油醚、醋酸乙酯萃取3次,萃取液回收溶剂,减压浓缩得各萃取物。醋酸乙酯萃取物经正相硅胶柱色谱,石油醚-醋酸乙酯(1:1→1:2)梯度洗脱,并根据TLC色谱合并相似部分,共得到3个组分(A1~A3)。A1用ODS柱色谱(20%~100%甲醇梯度洗脱),得到3个组分(E1~E3)。E1(1.5 g)组分经Sephadex LH-20柱色谱分离,采用氯仿-甲醇(1:1)

洗脱,分为2组分E1-1和E1-2,其中E1-1经半制备高效液相色谱分离纯化(甲醇-水 85:15)得到化合物**4**(200.0 mg),同样,E1-2经半制备高效液相色谱分离纯化(甲醇-水 85:15)得到化合物**5**(50.0 mg)和**6**(20.0 mg)。E2(1.0 g)经Sephadex LH-20柱色谱分离,采用氯仿-甲醇(1:1)洗脱得到2个组分E2-1和E2-2,其中E2-2经半制备高效液相色谱分离纯化(甲醇-水 80:20)得到化合物**2**(20.0 mg)和**3**(11.0 mg)。E3(2.0 g)经ODS柱色谱分离(50%~100%甲醇梯度洗脱)得到3个组分E3-1~E3-3,其中E3-1经半制备高效液相色谱分离纯化(甲醇-水 80:20)得到化合物**1**(210.0 mg),E3-2经半制备高效液相色谱分离纯化(甲醇-水 80:20)得到化合物**7**(82.0 mg)。E3-3经Sephadex LH-20柱色谱分离,采用甲醇洗脱再得2个组分E3-3-1和E3-3-2,其中E3-3-1再经Sephadex LH-20柱色谱分离,采用氯仿-甲醇(1:1)洗脱得到化合物**8**(20.0 mg)和**9**(15.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**:白色粉末;5%浓硫酸-乙醇显黄棕色,HR-ESI-MS m/z : 533.308 1 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{30}H_{44}O_8$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.52 (1H, s, H-1), 4.19 (1H, s, H-5), 3.35 (1H, s, H-7), 2.86 (1H, s, H-8), 3.72 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-10), 2.44 (1H, m, H-11), 1.58 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12), 4.32 (1H, s, H-14), 4.97 (1H, s, H-16a), 4.84 (1H, s, H-16b), 1.73 (3H, s, H-17), 1.10 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-18), 1.73 (3H, d, $J = 4.2$ Hz, H-19), 3.81 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-20a), 3.79 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-20b), 1.89 (2H, m, H-2'), 1.55 (2H, m, H-3'), 1.57 (2H, m, H-4'), 1.56 (2H, m, H-6'a), 1.58 (2H, m, H-6'b), 1.55 (2H, m, H-7'), 1.54 (2H, m, H-8'), 1.53 (2H, m, H-9'), 0.83 (3H, t, $J = 6.0$ Hz, H-10'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 160.7 (C-1), 136.4 (C-2), 209.4 (C-3), 71.1 (C-4), 72.6 (C-5), 60.9 (C-6), 64.1 (C-7), 36.6 (C-8), 78.7 (C-9), 48.1 (C-10), 34.8 (C-11), 36.4 (C-12), 84.0 (C-13), 81.7 (C-14), 146.3 (C-15), 111.0 (C-16), 19.0 (C-17), 20.3 (C-18), 9.9 (C-19), 65.4 (C-20), 119.2 (C-1'), 36.5 (C-2'), 29.6 (C-3'), 29.5 (C-4'), 29.6 (C-5'), 29.5 (C-6'), 23.4 (C-7'), 31.8 (C-8'), 22.6 (C-9'), 14.1 (C-10')。以上数据与文献报道一致^[14],故鉴定化合物**1**为河朔茺花素。

化合物**2**:白色针状晶体, mp 256~260 $^{\circ}C$;

5%浓硫酸-乙醇显棕色,分子式为 $C_{30}H_{42}O_9$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.52 (1H, dd, $J = 10.2$, 3.6 Hz, H-1), 4.97 (1H, s, H-5), 3.49 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7), 3.23 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-8), 2.81 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-10), 1.95 (1H, m, H-11), 2.10 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-12), 4.29 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-14), 4.97 (1H, s, H-16a), 4.29 (1H, s, H-16b), 1.73 (3H, m, H-17), 1.34 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-18), 1.76 (3H, s, H-19), 4.10 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-20a), 4.08 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-20b), 1.81 (2H, m, H-2'), 1.51 (2H, m, H-3'), 1.28 (1H, m, H-4'), 1.71 (1H, m, H-4'), 1.50 (1H, m, H-5'), 1.14 (1H, m, H-5'), 1.50 (1H, m, H-6'), 1.12 (1H, m, H-6'), 1.25 (1H, m, H-7'), 1.50 (1H, m, H-7'), 2.29 (1H, m, H-8'), 1.04 (1H, m, H-8'), 1.25 (1H, m, H-9'), 1.03 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-10'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 54.7 (C-1), 112.0 (C-2), 174.6 (C-3), 86.6 (C-4), 68.6 (C-5), 59.3 (C-6), 59.3 (C-7), 35.4 (C-8), 80.9 (C-9), 55.5 (C-10), 36.1 (C-11), 37.6 (C-12), 83.4 (C-13), 81.4 (C-14), 146.2 (C-15), 111.2 (C-16), 24.2 (C-17), 25.2 (C-18), 26.8 (C-19), 63.2 (C-20), 120.1 (C-1'), 31.0 (C-2'), 18.9 (C-3'), 19.9 (C-4'), 20.0 (C-5'), 22.1 (C-6'), 30.9 (C-7'), 30.9 (C-8'), 31.4 (C-9'), 22.3 (C-10')。以上数据与文献报道一致^[15],此外经X-ray(图1)单晶衍射技术鉴定化合物**2**为pimelotide A。

化合物**3**:白色粉末;5%浓硫酸-乙醇显棕色,HR-ESI-MS m/z : 547.290 9 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{30}H_{42}O_9$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.18 (1H, dd, $J = 10.8$, 7.2 Hz, H-1), 4.89 (1H, s, H-5), 3.41 (1H, s, H-7), 3.14 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 3.02 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-10), 2.48 (1H, m, H-11), 2.06 (1H, m, H-12), 4.26 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-14), 4.98 (1H, s, H-16a), 4.86 (1H, s, H-16b), 1.76 (3H, s, H-17), 1.34 (3H, d, $J = 9.6$ Hz, H-18), 1.78 (3H, s, H-19), 3.62 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-20a), 3.61 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-20b), 1.85 (2H, m, H-2'), 1.51 (2H, m, H-3'), 1.30 (1H, m, H-4'), 1.72 (1H, m, H-4'), 1.50 (1H, m, H-5'), 1.22 (1H, m, H-5'), 1.50 (1H, m, H-6'), 1.24 (1H, m, H-6'), 1.26 (1H, m, H-7'), 1.50 (1H, m, H-7'), 2.06 (1H, m, H-8'), 1.08 (1H, m, H-8'), 2.08 (1H, m, H-9'), 1.07 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-10'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 54.1 (C-1), 112.7 (C-2), 173.1 (C-3), 86.5 (C-4), 67.5 (C-5), 59.7 (C-6), 59.3 (C-7), 35.8 (C-8),

81.1 (C-9), 48.7 (C-10), 37.2 (C-11), 36.8 (C-12), 83.8 (C-13), 81.0 (C-14), 146.1 (C-15), 111.3 (C-16), 18.6 (C-17), 21.1 (C-18), 19.9 (C-19), 63.8 (C-20), 119.4 (C-1'), 31.0 (C-2'), 20.2 (C-3'), 25.8 (C-4'), 24.4 (C-5'), 24.2 (C-6'), 25.8 (C-7'), 25.2 (C-8'), 29.4 (C-9'), 18.8 (C-10')。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **3** 为 pimelotide C。

化合物 **4**: 白色粉末; 5%浓硫酸-乙醇显棕色, HR-ESI-MS m/z : 547.290 9 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{44}O_8$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.10 (1H, m, H-1), 4.10 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-5), 3.43 (1H, s, H-7), 2.88 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 3.31 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-10), 2.61 (1H, m, H-11), 2.20 (1H, dd, $J = 12.0, 7.2$ Hz, H-12a), 1.72 (1H, m, H-12b), 4.34 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-14), 5.01 (1H s, H-16a), 4.90 (1H, s, H-19), 3.89 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-20a), 3.75 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-20b), 0.89 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-10'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 49.0 (C-1), 42.5 (C-2), 219.6 (C-3), 76.0 (C-4), 71.6 (C-5), 60.9 (C-6), 65.2 (C-7), 36.6 (C-8), 80.8 (C-9), 43.0 (C-10), 35.0 (C-11), 36.1 (C-12), 83.4 (C-13), 82.0 (C-14), 146.1 (C-15), 111.0 (C-16), 18.8 (C-17), 21.2 (C-18), 13.4 (C-19), 65.3 (C-20), 119.8 (C-1'), 33.6 (C-2'), 19.5 (C-3'), 27.6 (C-4'), 28.2 (C-5'), 28.4 (C-6'), 28.2 (C-7'), 38.2 (C-8'), 29.4 (C-9'), 12.4 (C-10')。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **4** 为 wikstroelide E。

化合物 **5**: 白色粉末; 5%浓硫酸-乙醇显黄棕色, HR-ESI-MS m/z : 555.291 9 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{44}O_8$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.04 (1H, m, H-1), 2.10 (1H, m, H-2), 4.08 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-5), 3.40 (1H, s, H-7), 2.96 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 3.13 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-10), 2.47 (1H, m, H-11), 1.68 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-12) , 2.22 (1H, m, H-12), 4.28 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-14), 5.01 (1H, s, H-16a), 4.90 (1H, s, H-16b), 1.78 (3H, s, H-17), 1.30 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-18), 1.18 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-19), 3.91 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-20a), 3.75 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-20b), 1.83 (2H, m, H-2'), 1.97 (2H, m, H-3'), 1.28 (2H, m, H-4'), 1.40 (2H, m, H-5'), 1.28 (2H, m, H-6'), 1.55 (2H, m, H-7'), 1.54 (2H, m, H-8'), 2.53 (1H, m, H-9'), 0.98 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, H-10'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 49.9 (C-1), 43.7 (C-2), 219.7 (C-3), 75.8 (C-4), 71.3 (C-5), 60.8 (C-6), 64.4 (C-7), 35.6

(C-8), 81.2 (C-9), 44.4 (C-10), 37.0 (C-11), 36.7 (C-12), 83.9 (C-13), 82.1 (C-14), 146.5 (C-15), 111.2 (C-16), 19.6 (C-17), 19.2 (C-18), 14.2 (C-19), 65.5 (C-20), 119.8 (C-1'), 33.6 (C-2'), 21.3 (C-3'), 24.2 (C-4'), 24.0 (C-5'), 24.7 (C-6'), 25.1 (C-7'), 27.6 (C-8'), 28.7 (C-9'), 18.9 (C-10')。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **5** 为 pimelea factor S6。

化合物 **6**: 白色粉末; 5%浓硫酸-乙醇显黄棕色, HR-ESI-MS m/z : 555.291 9 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{44}O_8$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.01 (1H, m, H-1), 2.10 (1H, m, H-2), 4.11 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-5), 3.53 (1H, s, H-7), 2.88 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 3.32 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-10), 2.38 (1H, m, H-11), 1.68 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-12a) , 2.09 (1H, m, H-12b), 4.35 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-14), 5.01 (1H, s, H-16a), 4.90 (1H, s, H-16b), 1.78 (3H, s, H-17), 1.38 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-18), 1.10 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-19), 3.89 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-20a), 3.77 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-20b), 1.83 (2H, m, H-2'), 1.97 (2H, m, H-3'), 1.28 (2H, m, H-4'), 1.40 (2H, m, H-5'), 1.28 (2H, m, H-6'), 1.55 (2H, m, H-7'), 2.20 (2H, m, H-8'), 2.63 (1H, m, H-9'), 0.90 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, H-10'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 49.1 (C-1), 42.6 (C-2), 219.7 (C-3), 76.0 (C-4), 71.5 (C-5), 61.2 (C-6), 64.3 (C-7), 35.1 (C-8), 80.9 (C-9), 43.1 (C-10), 36.6 (C-11), 36.2 (C-12), 83.4 (C-13), 82.7 (C-14), 146.5 (C-15), 111.0 (C-16), 18.9 (C-17), 20.7 (C-18), 13.4 (C-19), 65.4 (C-20), 119.8 (C-1'), 33.6 (C-2'), 21.3 (C-3'), 28.3 (C-4'), 28.5 (C-5'), 29.5 (C-6'), 24.8 (C-7'), 38.3 (C-8'), 26.5 (C-9'), 12.5 (C-10')。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **6** 为 pimelea factor S7。

化合物 **7**: 白色无定形粉末; 5%浓硫酸-乙醇显棕色, HR-ESI-MS m/z : 535.323 1 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{46}O_8$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.69 (1H, s, H-1), 4.27 (1H, s, H-5), 3.24 (1H, s, H-7), 2.02 (1H, dd, $J = 15.0, 7.3$ Hz, H-8), 3.92 (1H, s, H-10), 1.84 (1H, m, H-11), 1.55 (1H, dd, $J = 15.3, 9.3$ Hz, H-12), 2.82 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-14), 1.18 (3H, s, H-16), 1.07 (3H, s, H-17), 0.91 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-18), 1.76 (3H, brd, $J = 1.2$ Hz, H-19), 3.88 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-20a), 3.75 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-20b), 2.30 (2H, t, $J = 10.8$ Hz, H-2'), 1.62 (2H, m, H-3'),

1.61 (2H, m, H-4'), 1.59 (2H, m, H-5'), 1.60 (2H, m, H-6'), 1.58 (2H, m, H-7'), 1.56 (2H, m, H-8'), 1.55 (2H, m, H-9'), 1.11 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 164.0 (C-1), 134.2 (C-2), 210.0 (C-3), 72.7 (C-4), 71.2 (C-5), 62.1 (C-6), 65.7 (C-7), 36.3 (C-8), 75.4 (C-9), 49.7 (C-10), 38.3 (C-11), 32.0 (C-12), 64.1 (C-13), 31.8 (C-14), 23.8 (C-15), 22.8 (C-16), 15.8 (C-17), 19.0 (C-18), 9.8 (C-19), 64.9 (C-20), 175.5 (C-1'), 34.4 (C-2'), 24.8 (C-3'), 29.1 (C-4'), 29.2 (C-5'), 29.2 (C-6'), 29.4 (C-7'), 31.8 (C-8'), 22.7 (C-9'), 14.1 (C-10')。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **7** 为 6 α ,7 α -epoxy-5 β -hydroxy-12-deoxyphorbol-13-decanoate。

化合物 **8**, 黄色粉末; ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.44 (2H, overlapped, H-2', 6'), 7.38 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.46 (1H, brs, H-8), 6.22 (1H, s, H-6), 4.62 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.20~3.96 (6H, m, H-2''~6''); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 164.7 (C-2), 103.6 (C-3), 182.4 (C-4), 161.8 (C-5), 98.8 (C-6), 164.1 (C-7), 93.7 (C-8), 158.0 (C-9), 104.0 (C-10), 125.8 (C-1'), 113.4 (C-2'), 147.2 (C-3'), 148.6 (C-4'), 116.5 (C-5'), 118.4 (C-6'), 101.8 (C-1''), 73.4 (C-2''), 76.1 (C-3''), 69.9 (C-4''), 77.1 (C-5''), 61.0 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **8** 为木犀草素-4'- O - β -D-葡萄糖苷。

化合物 **9**: 黄色粉末; ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.73 (1H, s, H-2'), 7.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.39 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, s, H-6), 5.25 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.23~3.76 (6H, m, H-2''~6''); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 157.3 (C-2), 133.9 (C-3), 177.8 (C-4), 161.3 (C-5), 98.2 (C-6), 164.4 (C-7), 93.0 (C-8), 156.7 (C-9), 104.0 (C-10), 121.3 (C-1'), 114.3 (C-2'), 144.2 (C-3'), 148.3 (C-4'), 115.9 (C-5'), 121.5 (C-6'), 102.6 (C-1''), 74.0 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.5 (C-4''), 76.7 (C-5''), 60.8 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **9** 为异槲皮苷。

4 细胞毒活性和抗 HBV 活性检测

4.1 细胞毒活性检测

HepG2.2.15 细胞经消化, 制备成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 以 100 μL /孔接种于 96 孔细胞培养板中, 经 48 h 培养后, 加入倍比稀释的不同浓度样品液,

继续培养 9 d (每 3 天换液 1 次), 弃去培养板中培养液, 在每培养孔中加入新培养液 95 μL 和 5 mg/mL 的 MTT 溶液 5 μL , 摇匀, 置 37 $^\circ\text{C}$ 培养 3~4 h, 可见孔内有蓝紫色结晶形成, 小心吸去板内的溶液, 每孔加入 DMSO 100 μL , 震荡, 使结晶充分溶解, 在酶标仪上测定 490 nm 波长处吸光度值, 检测细胞存活率, 确定样品对细胞生长的影响, 计算 TC_{50} (表 1), 并确定细胞存活率 $\geq 90\%$ 的样品浓度用于进一步检测抗 HBV 活性。

表 1 化合物 **1**~**4**、**7** 体外细胞毒活性和抗 HBV 活性测试结果

Table 1 Results on cytotoxicity and anti-HBV of compounds **1**—**4** and **7**

化合物	HepG2.2.15 细胞的 $\text{TC}_{50}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抗 HBV 活性			
		$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	HBsAg 抑制率/%	$\text{IC}_{50}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	HBeAg 抑制率/%
1	3.24	4.88×10^{-3}	20.70	—	0
		2.44×10^{-3}	18.12		
		1.22×10^{-3}	15.56		
		6.10×10^{-4}	12.16		
		3.05×10^{-4}	11.47		
2	6.48	0.019 5	8.41	—	0
		9.77×10^{-3}	4.54		
		4.88×10^{-3}	0.00		
		2.44×10^{-3}	0.00		
		1.22×10^{-3}	0.00		
3	5.69	0.039 1	61.56	0.016	0
		0.019 5	49.87		
		9.77×10^{-3}	44.99		
		4.88×10^{-3}	38.56		
		2.44×10^{-3}	33.84		
4	7.30	7.63×10^{-5}	13.79	—	0
		3.81×10^{-5}	7.16		
		1.91×10^{-5}	2.58		
		9.54×10^{-6}	2.15		
		4.77×10^{-6}	0.00		
7	4.78	7.63×10^{-5}	32.53	—	0
		3.81×10^{-5}	16.44		
		1.91×10^{-5}	16.09		
		9.54×10^{-6}	14.11		
		4.77×10^{-6}	13.71		
拉米夫定 (阳性对照)	>200	200	28.60	—	34.8

4.2 体外抗 HBV 活性检测

HepG2.2.15 细胞经消化, 制备成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 以 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 48 h 后, 加入系列浓度的样品液 (化合物样品用 DMSO 溶解, 配制成 20 mg/mL 母液, 然后用细胞培养液稀释为系列浓度的样品工作液), 同时设不加样品的空白对照, 继续培养 9 d (每 3 天换液 1 次), 收集上清液, 采用 HBsAg 和 e 抗原 (HBeAg) ELISA 诊断试剂盒, 按试剂盒说明书进行操作, 检测 HepG2.2.15 细胞上清中的 HBsAg 和 HBeAg 水平。计算样品对 HBV 抗原的抑制率并对抑制率 $\geq 50\%$ 的样品计算 IC_{50} 和 TI ($\text{TI} = \text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$), 结果见表 1。

由表可见, 所有的化合物均显示出一定的细胞毒活性, 其 TC_{50} 值为 $3.24 \sim 7.30 \mu\text{g/mL}$, 这也是这类化合物目前一个特性^[1-3], 在抗 HBV 测试中, 化合物 3 显示出显著的抑制 HBsAg 的分泌, 其 IC_{50} 值为 $0.016 \mu\text{g/mL}$, 且 TI 高达 355.63。这一结果也表明了瑞香烷二萜在抗病毒方面可能具有广谱性, 验证了开始的推测, 至于这类化合物抗 HBV 的作用机制还需进一步研究。

志谢: 上海复旦大学药学院在抗 HBV 活性测试中提供帮助。

参考文献

- [1] He W D, Cik M, Appendino G, *et al.* Daphnane-type diterpene orthoesters and their biological activities [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2002, 2(2): 185-200.
- [2] Liao S G, Chen H D, Yue J M. Plant orthoesters [J]. *Chem Rev*, 2009, 109(3): 1092-1140.
- [3] Marquez N, Calzado M A, Sanchez-Duffhues G, *et al.* Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(6): 1370-1380.
- [4] Bocklandt S, Blumberg P M, Hamer D H. Activation of latent HIV-1 expression by the potent anti-tumor promoter 12-deoxyphorbol 13-phenylacetate [J]. *Antivir Res*, 2003, 59(2): 89-98.
- [5] Miana G A, Riaz M, Shahzad-ul-Hussan S, *et al.* Prostratin: An Overview [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2015, 15(13): 1122-1130.
- [6] Huang L, Ho P, Yu J, *et al.* Picomolar dichotomous activity of gnidimacrin against HIV-1 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26677.
- [7] Gustafson K R, Cardellina J H, McMahon J B, *et al.* A nonpromoting phorbol from the Samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1 [J]. *J Med Chem*, 1992, 35(11): 1978-1986.
- [8] Bullen C K, Laird G M, Durand C M, *et al.* New *ex vivo* approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2014, 20(4): 425-429.
- [9] Vidal V, Potterat O, Louvel S, *et al.* Library-based discovery and characterization of daphnane diterpenes as potent and selective HIV inhibitors in *Daphne gnidium* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(3): 414-419.
- [10] 吴凤简, 陶成, 赵惠兰, 等. 黄芩花水提物的中枢药理作用 [J]. 中草药, 1993, 24(10): 528-531.
- [11] 王振海, 陈文磊, 应国华. 黄芩花醇液引产机理的探讨 [J]. 中华妇产科杂志, 1979, 14(1-4): 125-126.
- [12] 王成瑞, 黄慧珠, 韩玖, 等. 河朔莪花素的分离与鉴定 [J]. 中国药学杂志, 1981, 16(6): 51-52.
- [13] 康少文, 于永芳, 魏清波, 等. 黄芩花中期引产有效成分的研究 [J]. 承德医学院学报, 1984, 1(1): 5-6.
- [14] Powell R G, Weisleder D, Smith C R. Daphnane diterpenes from *Diarthron vesiculosum*: vesiculosin and isovesiculosin [J]. *J Nat Prod*, 1985, 48(1): 102-107.
- [15] Hayes P Y, Chow S, Somerville M J, *et al.* Pimelotides A and B, diterpenoid ketal-lactone orthoesters with an unprecedented skeleton from *Pimelea elongata* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(12): 2081-2083.
- [16] Abe F, Iwase Y, Yamauchi T, *et al.* Daphnane diterpenoids from the bark of *Wikstroemia retusa* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(4): 643-647.
- [17] 郭洁茹. 两种莪花属药用植物化学成分和生物活性研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [18] 李胜华. 鼠曲草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1373-1377.
- [19] 尹蕾, 张冤, 田海妍, 等. 福寿草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3361-3366.