

桑悬浮培养细胞中 2 个新的 Diels-Alder 型加合物

杜文玉^{1,2}, 苏聪², 孙佳玮², 刘继梅², 王春梅¹, 戴均贵^{1,2*}

1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

摘要: **目的** 从桑 *Morus alba* 悬浮培养细胞中分离 Diels-Alder 型加合物。**方法** 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、C₁₈ 柱色谱以及半制备高效液相等多种色谱方法进行分离纯化, 结合其理化数据和 NMR、MS、ECD 等波谱数据鉴定化合物结构。**结果** 从桑悬浮培养细胞 78%乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部分中共分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为蒙桑素 H (1)、川桑素 J (2)、蒙桑素 F (3)、桑呋喃 G (4)、artoinin D (5)、桑酮 R (6)、川桑素 C (7) 及桑呋喃 E (8)。**结论** 化合物 1~8 均为 Diels-Alder 型加合物, 具有中等细胞毒活性, 其中 1 和 2 为新化合物。

关键词: 桑; 悬浮培养细胞; Diels-Alder 型加合物; 细胞毒活性; 蒙桑素 H; 川桑素 J

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2345-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.015

Two new Diels-Alder type compounds from cell cultures of *Morus alba*

DU Wen-yu^{1,2}, SU Cong², SUN Jia-wei², LIU Ji-mei², WANG Chun-mei¹, DAI Jun-gui^{1,2}

1. College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To investigate the Diels-Alder adducts from cell suspension cultures of *Morus alba*. **Methods** A variety of column chromatography (CC) including silica gel CC, Sephadex LH-20 CC, C₁₈ CC, and semi-preparative HPLC were used to separate Diels-Alder adducts from cell cultures of *M. alba*. Their structures were identified by physicochemical properties and various spectroscopic experiments, including MS, NMR, and ECD. **Results** Eight Diels-Alder adducts were obtained from the ethyl acetate extract of *M. alba*, and determined as mongolicin H (1), morbilisin J (2), mongolicin F (3), mulberrofuran G (4), artoinin D (5), kuwanon R (6), morbilisin C (7), and mulberrofuran E (8). **Conclusion** Compounds 1—8 are all Diels-Alder adducts and show medium cytotoxic activity, and compounds 1 and 2 are new compounds.

Key words: *Morus alba* L.; cell suspension cultures; Diels-Alder adduct; cytotoxicity; mongolicin H; morbilisin J

桑属植物桑 *Morus alba* L. 始载于《神农本草经》, 用药历史悠久, 其根皮、枝、叶、果实均可入药, 均具有较好的药理活性。其根皮即为中药“桑白皮”, 为泻肺平喘、利水消肿的常用药; 桑枝具有祛风湿、通经络、行水气的功效; 桑叶可疏散风热、清肝明目; 桑葚可滋阴养血、生津润肠^[1-4]。

20 世纪 90 年代, 日本科学家从桑根皮及其悬浮培养细胞中分离鉴定出多个 Diels-Alder 型加合物, 这类化合物不仅结构新颖且具有多种显著生物活性, 一度引起广泛关注^[5-7]。本课题组前期从桑悬

浮培养细胞中已分离鉴定多个具有抗炎活性的 Diels-Alder 型加合物^[8-9], 为获得更多且结构新颖的该类化合物, 本研究继续对桑悬浮培养细胞 78%乙醇提取物的醋酸乙酯部分进行了化学成分研究, 共分离得到 8 个 Diels-Alder 型加合物, 分别鉴定为蒙桑素 H (mongolicin H, 1)、川桑素 J (morbilisin J, 2)、蒙桑素 F (mongolicin F, 3)、桑呋喃 G (mulberrofuran G, 4)、artoinin D (5)、桑酮 R (kuwanon R, 6)、川桑素 C (morbilisin C, 7) 和桑呋喃 E (mulberrofuran E, 8)。其中化合物 1 和 2

收稿日期: 2018-01-19

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (CIFMS-2016-I2M-3-012)

作者简介: 杜文玉 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用天然产物的生物合成与生物催化。Tel: 13683161467 E-mail: duwenyu1994@163.com

*通信作者 戴均贵, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药用天然产物的生物合成与生物催化。Tel: (010)63165195 E-mail: jgdai@imm.ac.cn

为新化合物,命名为蒙桑素H和川桑素J。体外活性评价表明,化合物1~8均显示出中等的细胞毒活性,其半数抑制浓度(IC_{50})值为2.09~63.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

1 仪器与材料

Cyberscan 510 精密酸度计(新加坡 Eutech Instruments 公司);PYB 普通摇床(中国科学院武汉科学仪器厂);AVFCB-2N 无菌操作台(北京森茂康达净化技术有限公司);YXQWF8612-1 型压力蒸汽消毒锅(衡阳医疗器械厂);YMC 正相半制备色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm ; 日本 YMC 公司);反相半制备色谱柱 Shiseido C_{18} (250 mm×10 mm, 5 μm ; 日本 Shiseido 公司);Shimadzu LC-20AD 型高效液相色谱仪, RID-10A 型示差检测器(日本 Shimadzu 公司);HRESIMS Spectrometer 6520 (美国 Agilent Technologies 公司);Eyela-1000 型旋转蒸发仪(上海 Eyela Instruments 公司);LCQ-Fleet Ion Trap MS (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Bruker AVIIIHD-400 MHz 核磁共振波谱仪、Bruker AVIIIHD-600 MHz 核磁共振波谱仪(美国 Bruker 公司);Perkin-Elmer Model-343 旋光测试仪(美国 Perkin-Elmer 公司);Jasco P-815 型圆二色谱仪(日本 Jasco 公司);柱色谱用硅胶(60~100、200~300 目)和 GF₂₅₄ 硅胶板为青岛海洋化工厂生产; C_{18} 柱色谱硅胶(S-50 μm , 日本 YMC 公司);Sephadex LH-20 凝胶(瑞典 Amersham Bioscience 公司);实验所用试剂均为北京化工厂生产的分析纯试剂。

本研究所用桑悬浮培养细胞来自本课题组^[8],于(25±1)℃黑暗条件下110 r/min 的摇床上培养3周后抽滤得细胞培养物,于50℃下烘干至恒定质量。

人肝癌细胞株(HepG2)、人髓母细胞瘤细胞株(Daoy)、人肺癌细胞株(NCI-H460)、人结肠癌细胞株(HCT116)和人胃癌细胞株(BGC823)均来源于中国医学科学院药物研究所王楠课题组传代。

2 方法

2.1 提取与分离

桑悬浮细胞培养物(干质量1.8 kg)用78%乙醇加热提取冷凝回流3次,每次约4 h,合并提取液并利用旋转蒸发仪回收浓缩得到总提取物1.5 kg。将提取物用水分散制成混悬液,用醋酸乙酯进行萃取。减压浓缩得到醋酸乙酯浸膏869.7 g。后经硅胶柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇(50:1→1:1)梯度洗脱,得到17个流分(Fr. 1~17)。Fr. 7经硅胶柱色谱,石油醚-醋酸乙酯(20:1→1:1)梯度洗脱,

得到13个流分(Fr. 7a~7m)。Fr. 7h经Sephadex LH-20柱色谱,甲醇洗脱,得到9个流分(Fr. 7h1~7h9)。Fr. 7h8经反相半制备高效液相色谱分离纯化(甲醇-水32:68)得到化合物2(37.1 mg, t_R =15.1 min)、3(15.3 mg, t_R =24.1 min)。Fr. 8经 C_{18} 柱色谱,甲醇-水(30:60→100:0)梯度洗脱,得到11个流分(Fr. 8a~8k)。Fr. 8e经Sephadex LH-20柱色谱,甲醇为流动相等度洗脱,得到5个流分(Fr. 8n1~8n5)。Fr. 8n4经反相半制备高效液相色谱分离纯化(乙腈-水10:90)得到化合物6(4.7 mg, t_R =24.0 min)。Fr. 9~12合并,经硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇(20:1→1:1)梯度洗脱,得到11个流分(Fr. 9a~9k)。Fr. 9g经 C_{18} 柱色谱,乙腈-水(40:60→100:0)梯度洗脱得到9个流分(Fr. 9g1~9g9)。Fr. 9g4经Sephadex LH-20柱色谱,甲醇洗脱纯化得到化合物7(10.1 mg),Fr. 9g2经Sephadex LH-20柱色谱,甲醇等度洗脱纯化得到化合物8(20.4 mg)。Fr. 9j经反复硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇(10:1→1:1)梯度洗脱,最后用Sephadex LH-20柱色谱,甲醇洗脱纯化得到化合物5(13.8 mg)。Fr. 14经硅胶柱色谱,正己烷-丙酮(10:1→0:1)梯度洗脱,得到10个流分(Fr. 14a~14j),Fr. 14i经Sephadex LH-20柱色谱,甲醇等度洗脱纯化得到化合物4(9.3 mg),Fr. 14g经反复硅胶柱色谱,正己烷-丙酮(20:1→0:1)梯度洗脱,最后经过正相半制备高效液相色谱分离纯化(正己烷-异丙醇40:60)得到化合物1(1.7 mg, t_R =20.9 min)。

2.2 活性测定

收集生长良好的肿瘤细胞,用含10%小牛血清的RPMI 1640培养基配制成10 000个/mL细胞悬液,于96孔培养板内接种,每孔100 μL (含1 000个肿瘤细胞),置37℃、5% CO_2 温箱内培养24 h后加药,实验设空白对照,受试样品设3个质量浓度(0.1、1、10 $\mu\text{g/mL}$),每个质量浓度3个平行孔,置37℃、5% CO_2 温箱内培养4 d。弃去培养液,每孔加入MTT溶液(0.4 mg/mL, RPMI 1640 配制)100 μL ,37℃孵育4 h。弃上清液,每孔加入DMSO 150 μL ,溶解Fomazan颗粒,轻度振荡后,用550型酶标仪在检测波长540 nm,参考波长405 nm下测定吸光度(A)值。结果以药物的不同质量浓度及对细胞的增殖抑制率作图可得到剂量反应曲线,从中求出 IC_{50} 。

3 结构鉴定

化合物1:黄色无定形粉末。根据HR-ESI-MS m/z :

665.241 9 $[M+H]^+$ (计算值 665.238 1, $C_{39}H_{37}O_{10}$), 1H -NMR (600 MHz, Acetone- d_6) 波谱 (表 1) 显示 1 确定其分子式为 $C_{39}H_{36}O_{10}$, 具有 22 个不饱和度。对邻位耦合的芳香质子 δ_H 6.25 (1H, d, $J = 9.0$ Hz,

表 1 化合物 1 和 2 的 NMR 数据

Table 1 NMR data of compounds 1 and 2

碳位	1 ^a		2 ^b	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2		155.3		154.7
3	6.93 (1H, brs)	101.8	7.01 (1H, brs)	102.4
3a		122.6		122.5
4	7.35 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	121.8	7.38 (1H, d, $J = 10.0$ Hz)	122.0
5	6.77 (1H, brs)	113.0	6.79 (1H, dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz)	113.2
6		156.6		156.8
7	6.93 (1H, brs)	98.3	6.97 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	98.3
7a		156.5		156.7
1'		130.9		131.1
2'	6.77 (1H, brs)	104.8	7.00 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	104.9
3'		157.7		153.4
4'		116.5		113.0
5'		157.7		157.8
6'	6.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	104.8	6.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	105.9
1''		133.9		133.8
2''	5.78 (1H, brs)	124.3	6.47 (1H, d, $J = 6.0$ Hz)	122.5
3''	4.11 (1H, brs)	33.1	3.67 (1H, brs)	35.4
4''	4.65 (1H, t, $J = 4.0, 14.0$ Hz)	47.7	3.13 (1H, dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz)	37.2
5''	3.75 (1H, brs)	36.3	3.01 (1H, m)	28.5
6''	2.50 (1H, m), 2.20 (1H, m)	32.1	2.73 (1H, dd, $J = 21.5, 6.5$ Hz), 2.05 (1H, m)	36.0
7''	1.94 (3H, s)	23.8	1.78 (3H, s)	23.8
8''		209.8		103.9
9''		113.0		117.6
10''		164.6		155.0
11''		108.7		111.4
12''		161.2		156.6
13''	6.25 (1H, d, $J = 9.0$ Hz)	109.4	6.21 (1H, d, $J = 11.0$ Hz)	108.1
14''	8.44 (1H, d, $J = 9.0$ Hz)	131.8	7.24 (1H, d, $J = 11.0$ Hz)	128.5
15''		121.7		117.3
16''		156.4		152.9
17''	6.52 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	103.4	6.39 (1H, d, $J = 3.5$ Hz)	103.9
18''		157.9		158.0
19''	6.52 (1H, dd, $J = 10.0, 3.0$ Hz)	110.3	6.52 (1H, dd, $J = 10.0, 3.0$ Hz)	110.3
20''	6.99 (1H, d, $J = 10.0$ Hz)	128.7	7.15 (1H, d, $J = 10.0$ Hz)	127.9
21''	2.50 (1H, m), 2.80 (1H, m)	26.1	6.69 (1H, d, $J = 13.0$ Hz)	117.0
22''	3.75 (1H, m)	68.8	5.59 (1H, d, $J = 13.0$ Hz)	129.4
23''		79.3		76.5
24''	1.22 (3H, s)	21.3	1.35 (3H, s)	28.1
25''	1.31 (3H, s)	25.7	1.33 (3H, s)	28.3
10''-OH	8.48 (1H, s)			

^a 氘代丙酮中测试得到的数据; ^b 氘代甲醇中测试得到的数据

^a data (δ) were measured in acetone- d_6 ; ^b data (δ) were measured in methanol- d_4

H-13'') 和 8.44 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-14''); 1 组非常典型的 2-(3', 5'-二羟基) 苯基-6-羟基-苯并呋喃质子 δ_{H} 6.93 (1H, brs, H-3), 7.35 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 6.77 (1H, brs, H-5), 6.93 (1H, brs, H-7), 6.77 (1H, brs, H-2') 和 6.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6'); 3 个甲基质子 δ_{H} 1.94 (3H, s, 7''-CH₃), 1.22 (3H, s, 24''-CH₃) 和 1.31 (3H, s, 25''-CH₃); ¹³C-NMR 和 DEPT 谱上显示有 39 个碳信号, 包括 28 个芳香碳、3 个甲基碳、2 个亚甲基碳、4 个次甲基碳和 2 个季碳。结合 ¹H-¹H COSY、HSQC 和 HMBC 等波谱数据, 确定了化合物 1 的氢谱和碳谱信号归属 (表 1), 其为典型的 Diels-Alder 型加合物, 与化合物 chalconmoracin^[10] 相似。进一步核磁数据比较发现化合物 1 较 chalconmoracin 少了 2 个与 sp² 杂化碳相连的甲基 (δ_{H} 1.66 和 δ_{H} 1.54) 和 1 个烯烃质子 (δ_{H} 5.10), 多了 2

个与 sp³ 杂化碳相连的甲基 (δ_{H} 1.22, 1.31) 和 1 个与氧相连的次甲基 (δ_{H} 3.75), 其 ¹³C-NMR 波谱上显示少了 2 个烯烃碳信号 (δ_{C} 123.6, 131.8), 而多了 2 个与氧相连的碳信号 (δ_{C} 68.8, 79.3), 结合化合物 1 的不饱和度, 推测结构中存在 chalconmoracin 异戊烯基侧链与 12''-OH 环合形成吡喃环结构单元; 在 HMBC 谱中, 10''-OH (δ_{H} 8.48) 与 C-9'' (δ_{C} 113.0) 和 C-10'' (δ_{C} 164.6) 相关, 进一步证实了上述推测。此外结合其分子式及 H-22'' (δ_{H} 3.75) 和 C-22'' (δ_{C} 68.8) 的化学位移, 显示 C-22'' 连有羟基基团。在 HMBC 谱中, 质子 H-21'' (δ_{H} 2.50) 与 C-10'' (δ_{C} 164.6) 相关; 质子 H-22'' (δ_{H} 3.75) 与 C-24'' (δ_{C} 21.3) 和 C-25'' (δ_{C} 25.7) 均相关; 质子 H-24'' (δ_{H} 1.22) 和 H-25'' (δ_{C} 1.31) 均与 C-22'' (δ_{C} 68.8) 相关。通过以上数据综合解析, 确定了化合物 1 的平面结构 (图 1)。

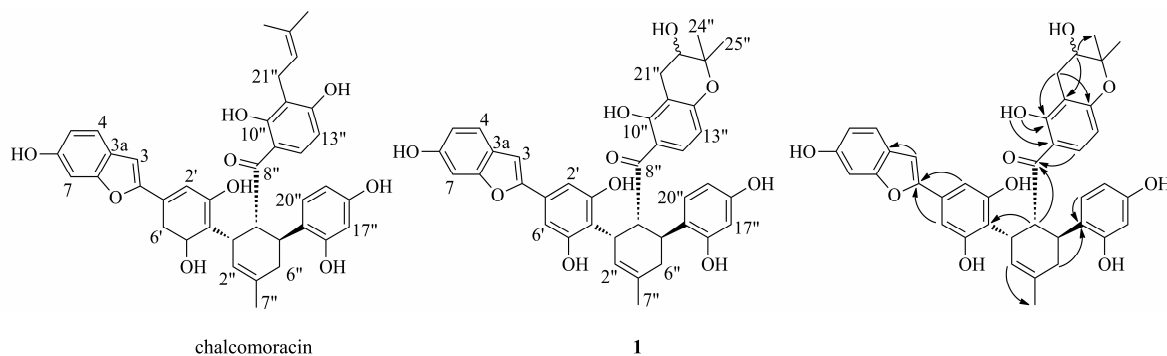


图 1 Chalconmoracin、化合物 1 的结构及关键 HMBC 相关

Fig. 1 Structures and key HMBC correlations of chalconmoracin and compound 1

根据 ¹H-NMR 波谱中 H-3''、H-4''和 H-5''的偶合常数 ($J_{3'',4''} = 4.0$ Hz, $J_{4'',5''} = 14.0$ Hz), 确定其相对构型为 3'',4''-cis、4'',5''-trans。根据文献报道^[11], Diels-Alder 加合物的 CD 光谱在 300 nm 附近显示正 Cotton 效应或旋光值为正, 即可确定其甲基环己烯的相对构型为顺反型, 绝对构型为 C-3'' (S)、C-4'' (R)、C-5'' (S)。化合物 1 的 CD 光谱在 313 nm 出现了正 Cotton 效应, 且其旋光值为正, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +54.7^\circ$ (c 0.33, MeOH), 因此确定其绝对构型为 C-3'' (S)、C-4'' (R)、C-5'' (S), 而其 C-22'' 的构型还有待于确证。该化合物为新化合物, 命名为蒙桑素 H。

化合物 2: 棕黄色树脂状物质。根据 HR-ESI-MS m/z : 629.219 4 [M+H-H₂O]⁺ (计算值 629.219 9, C₃₉H₃₃O₈), 确定其分子式为 C₃₉H₃₄O₉, 具有 23 个不饱和度。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) 波谱中显示其含有 1 对邻位偶合的芳香质子 δ_{H} 6.21 (1H, d,

$J = 11.0$ Hz, H-13'') 和 7.24 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-14''); 1 组非常典型的 2-(3', 5'-二羟基) 苯基-6-羟基-苯并呋喃质子 δ_{H} 7.01 (1H, brs, H-3), 7.38 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4), 6.79 (1H, dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz, H-5), 6.97 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-7), 7.00 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2') 和 6.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6'); 2 个相互偶合的烯烃质子 δ_{H} 6.69 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-21'') 和 5.59 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-22''); 3 个甲基质子 δ_{H} 1.78 (3H, s, CH₃-7''), 1.35 (3H, s, CH₃-24'') 和 1.33 (3H, s, CH₃-25''); ¹³C-NMR 和 DEPT 波谱上显示有 39 个碳信号, 包括 30 个芳香碳、3 个甲基碳、1 个亚甲基碳、3 个次甲基碳、2 个季碳。结合 ¹H-¹H COSY、HSQC 和 HMBC 等波谱数据, 确定了化合物 2 的碳氢信号归属 (表 1), 其为典型的 Diels-Alder 型加合物, 与化合物 morbilisin C^[12] 相似。将其 NMR 数据 (表 1) 与 morbilisin C 对比,

发现主要在 C-11''侧链上存在不同,进一步分析其 NMR 数据,发现 C-21''和 C-22''的亚甲基质子被氧化成 *E* 式双键 ($J_{21'',22''} = 13.0$ Hz),在 HMBC 波谱上,质子 H-21'' ($\delta_{\text{H}} 6.69$) 与 C-10'' ($\delta_{\text{C}} 155.0$) 相关;质子 H-22'' ($\delta_{\text{H}} 5.59$) 与 C-24'' ($\delta_{\text{C}} 28.1$) 和 C-25'' ($\delta_{\text{C}} 28.3$) 相关;质子 H-24'' ($\delta_{\text{H}} 1.35$) 和 H-25'' ($\delta_{\text{H}} 1.33$) 均与 C-22'' ($\delta_{\text{C}} 129.4$) 相关,这些数据进一步说明在 C-11''侧链上存在 C_{21''}-C_{22''}的 *E* 式双键。通过以上数据综合解析,确定了化合物

2 的平面结构 (图 2)。

根据 ¹H-NMR 波谱中 H-3'', H-4''和 H-5''的耦合常数 ($J_{3'',4''} = 7.5$ Hz, $J_{4'',5''} = 14.5$ Hz),确定其相对构型为 3'',4''-*cis*、4'',5''-*trans*。化合物 2 的 CD 光谱在 313 nm 出现了正 Cotton 效应,且其旋光值为正 ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} +72.0^{\circ}$ (c 0.09, MeOH)),因此确定其绝对构型为 C-3'' (*S*)、C-4'' (*R*)、C-5'' (*S*),而其 C-8''的构型还有待于确证。该化合物为新化合物,命名为川桑素 J。

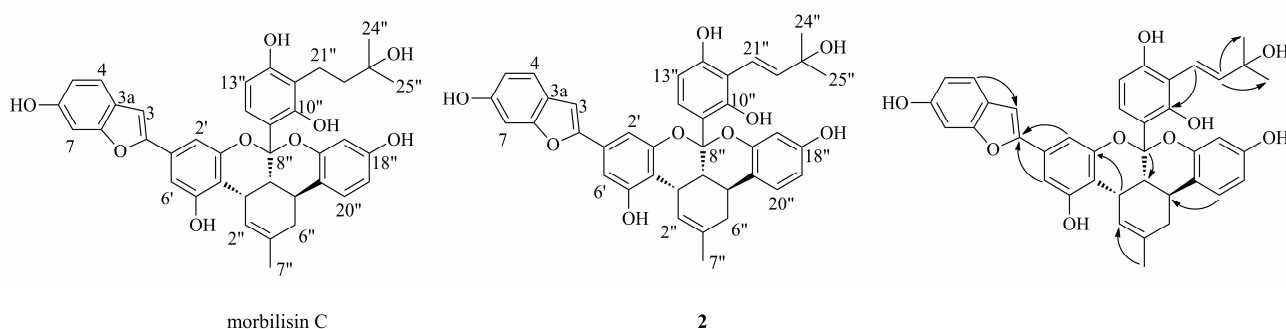


图2 Morbilisin C、化合物 2 的结构及关键 HMBC 相关

Fig. 2 Structures and key HMBC correlations of morbilisin C and compound 2

化合物 3: 黄色粉末,分子式为 $\text{C}_{39}\text{H}_{36}\text{O}_9$ 。ESI-MS m/z : 649.24 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 7.59 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-14''), 7.34 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 6.90 (2H, overlapped, H-7, 20''), 6.83 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-3), 6.81 (1H, brs, H-6'), 6.76 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-5), 6.63 (1H, brs, H-2'), 6.21 (1H, brs, H-17''), 6.08 (2H, overlapped, H-13'', 19''), 5.37 (1H, brs, H-2''), 5.03 (1H, m, H-22''), 4.92 (1H, brs, H-4''), 4.53 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3''), 3.71 (1H, brs, H-5''), 3.09 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21''), 2.86 (1H, brs, H-6'' α), 2.17 (1H, brs, H-6'' β), 1.75 (3H, s, 7''-CH₃), 1.62 (3H, s, 24''-CH₃), 1.51 (3H, s, 25''-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ : 155.4 (C-2), 101.7 (C-3), 121.8 (C-4), 113.1 (C-5), 154.8 (C-6), 98.3 (C-7), 122.5 (C-3a), 156.6 (C-7a), 130.5 (C-1'), 103.7 (C-2'), 155.4 (C-3'), 115.8 (C-4'), 156.5 (C-5'), 103.7 (C-6'), 134.2 (C-1''), 125.1 (C-2''), 38.9 (C-3''), 46.6 (C-4''), 38.9 (C-5''), 38.9 (C-6''), 23.4 (C-7''), 209.9 (C-8''), 117.3 (C-9''), 163.4 (C-10''), 114.6 (C-11''), 162.0 (C-12''), 107.4 (C-13''), 130.5 (C-14''), 122.5 (C-15''), 156.7 (C-16''), 104.6 (C-17''), 157.2 (C-18''), 107.0 (C-19''), 131.0

(C-20''), 22.1 (C-21''), 123.3 (C-22''), 131.1 (C-23''), 25.7 (C-24''), 17.7 (C-25'')。以上数据与文献报道基本一致^[13],故鉴定化合物 3 为蒙桑素 F。

化合物 4: 黄色粉末,分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{O}_8$ 。ESI-MS m/z : 563.16 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 7.39 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 7.23 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-14''), 7.13 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-20''), 7.03 (1H, s, H-3), 6.96 (3H, overlapped, H-2', 6', 7), 6.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.49 (1H, dd, $J = 2.4, 8.2$ Hz, H-19''), 6.43 (2H, overlapped, H-2'', 11''), 6.37 (1H, s, H-17''), 6.22 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-13''), 3.49 (1H, s, H-3''), 3.33 (1H, m, H-4''), 2.97 (1H, m, H-5''), 2.68 (1H, dd, $J = 5.0, 16.8$ Hz, H-6'' α), 2.06 (1H, dd, $J = 11.0, 16.8$ Hz, H-6'' β), 1.77 (3H, s, 7''-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 160.0 (C-10''), 158.4 (C-18''), 157.9 (C-12''), 157.7 (C-6), 157.2 (C-2), 156.8 (C-5'), 155.7 (C-3'), 154.9 (C-16''), 153.6 (C-7a), 133.9 (C-1''), 131.5 (C-1'), 130.6 (C-14''), 128.0 (C-20''), 123.3 (C-2''), 123.1 (C-3a), 122.0 (C-4), 118.2 (C-4'), 117.3 (C-15''), 113.9 (C-9''), 133.2 (C-5), 110.0 (C-19''), 107.0 (C-13''), 105.4 (C-6'), 105.0 (C-2'), 104.5 (C-11''), 104.1 (C-17''), 103.1

(C-8''), 102.1 (C-3), 98.5 (C-7), 37.6 (C-3''), 36.7 (C-6''), 35.4 (C-5''), 28.8 (C-4''), 23.9 (C-7'')。以上数据与文献报道基本一致^[14-15], 故鉴定化合物 **4** 为桑呋喃 G。

化合物 **5**: 黄色粉末, 分子式为 $C_{40}H_{36}O_9$ 。ESI-MS m/z : 661.24 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 8.36 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-14''), 8.14 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H- β), 7.84 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'), 7.71 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H- α), 7.64 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-6), 6.95 (1H, $J = 8.4$ Hz, H-20''), 6.55 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-21''), 6.49 (2H, overlapped, H-3, 17''), 6.42 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 6.34 (1H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-5'), 6.29 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz, H-19''), 6.24 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-13''), 5.66 (1H, s, H-2''), 5.63 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-22''), 4.65 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, H-4''), 4.18 (1H, s, H-3''), 3.78 (1H, m, H-5''), 2.51 (1H, m, H-6'' α), 2.25 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-6'' β), 1.92 (3H, s, 7''-CH₃), 1.39 (3H, s, 24''-CH₃), 1.36 (3H, s, 25''-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 209.7 (C-8''), 193.3 (C = O), 165.7 (C-4'), 163.5 (C-2'), 162.3 (C-4), 160.9 (C-10''), 160.8 (C-12''), 159.9 (C-2), 157.9 (C-18''), 156.4 (C-16''), 140.9 (C- β), 135.0 (C-1'), 133.8 (C-14''), 131.7 (C-6), 130.7 (C-6'), 129.1 (C-22''), 128.9 (C-20''), 123.2 (C-2''), 121.7 (C-15''), 117.4 (C- α), 116.1 (C-3'), 115.9 (C-21''), 115.2 (C-1), 114.1 (C-1'), 114.0 (C-9''), 109.8 (C-5'), 109.6 (C-11''), 109.1 (C-5), 108.9 (C-13''), 107.5 (C-19''), 103.5 (C-3), 103.5 (C-17''), 78.5 (C-23''), 47.6 (C-4''), 36.1 (C-5''), 32.8 (C-6''), 32.8 (C-3''), 28.5 (C-24''), 28.4 (C-25''), 23.8 (C-7'')。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **5** 为 artonin D。

化合物 **6**: 黄色粉末, 分子式为 $C_{40}H_{38}O_9$ 。ESI-MS m/z : 663.25 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 8.37 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-14''), 7.92 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'), 7.76 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H- β), 7.68 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2, 6), 7.67 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H- α), 6.96 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-20''), 6.89 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-17''), 6.43 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-13''), 6.35 (1H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-5'), 6.30 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-19''), 5.67 (1H, s, H-2''), 5.15 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-22''), 4.66 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-4''), 4.13 (1H, s,

H-3''), 3.78 (1H, m, H-5''), 3.25 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21''), 2.49 (1H, d, $J = 18.6$ Hz, H-6'' α), 2.21 (1H, d, $J = 18.6$ Hz, H-6'' β), 1.93 (3H, s, 7''-CH₃), 1.70 (3H, s, 25''-CH₃), 1.36 (3H, s, 24''-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 209.4 (C-8''), 192.9 (C = O), 165.8 (C-4'), 164.6 (C-10''), 163.7 (C-12''), 163.7 (C-4'), 163.7 (C-2'), 160.9 (C-4), 157.9 (C-18''), 156.4 (C-16''), 145.0 (C- β), 134.8 (C-1'), 132.1 (C-14''), 131.7 (C-2), 131.7 (C-6), 131.5 (C-23''), 131.0 (C-6'), 128.7 (C-20''), 127.5 (C-1), 123.3 (C-22''), 123.1 (C-2''), 121.6 (C-15''), 118.4 (C- α), 116.6 (C-3), 116.6 (C-5), 116.1 (C-11''), 115.8 (C-3'), 113.9 (C-1'), 113.3 (C-9''), 110.0 (C-5'), 108.1 (C-13''), 107.5 (C-19''), 103.4 (C-17''), 47.4 (C-4''), 36.4 (C-5''), 32.6 (C-3''), 32.4 (C-6''), 25.8 (C-25''), 23.8 (C-7''), 22.1 (C-21''), 17.8 (C-24'')。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **6** 为桑酮 R。

化合物 **7**: 黄色粉末, 分子式为 $C_{39}H_{36}O_9$ 。ESI-MS m/z : 649.24 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.30 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 7.08 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-20''), 6.98 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-14''), 6.89 (1H, s, H-3), 6.86 (2H, overlapped, H-7, 2'), 6.80 (1H, brs, H-6'), 6.69 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-5), 6.43 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-2''), 6.38 (1H, brd, $J = 5.0$ Hz, H-2''), 6.32 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-17''), 6.21 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-13''), 3.49 (1H, s, H-3''), 3.00 (2H, m, H-4'', 5''), 2.65 (3H, m, H-21'', 6''), 2.01 (1H, m, H- α), 1.77 (3H, s, 7''-CH₃), 1.18 (3H, s, 24''-CH₃), 1.15 (3H, s, 25''-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 158.4 (C-18''), 158.0 (C-5'), 157.9 (C-12''), 157.3 (C-6), 156.9 (C-7a), 155.6 (C-10''), 155.4 (C-2), 153.1 (C-16''), 154.2 (C-3'), 134.0 (C-1''), 131.5 (C-1'), 128.0 (C-20''), 126.4 (C-14''), 123.1 (C-2''), 123.1 (C-3a), 122.0 (C-4), 118.8 (C-11''), 117.9 (C-15''), 117.9 (C-9''), 113.3 (C-4'), 111.4 (C-5), 110.4 (C-19''), 107.3 (C-13''), 105.9 (C-6'), 105.1 (C-2'), 104.2 (C-17''), 104.1 (C-8''), 102.2 (C-3), 98.5 (C-7), 71.9 (C-23''), 43.1 (C-22''), 37.9 (C-4''), 36.5 (C-6''), 35.8 (C-3''), 29.2 (C-24''), 29.2 (C-25''), 29.0 (C-5''), 23.9 (C-7''), 19.2 (C-21'')。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为川桑素 C。

化合物 **8**: 黄色粉末, 分子式为 $C_{39}H_{36}O_8$ 。

ESI-MS m/z : 633.24 $[M+H]^+$. 1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 7.88 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-14"), 7.35 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 7.19 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-16", 20"), 6.92 (2H, s, H-2', 6'), 6.78 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5), 6.76 (2H, brs, H-3, 7), 6.73 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-19", 17"), 6.50 (1H, brd, $J = 9.0$ Hz, H-13"), 5.74 (1H, brd, $J = 2.4$ Hz, H-2"), 5.13 (1H, m, H-22"), 4.44 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-4"), 4.33 (1H, brd, $J = 6.0$ Hz, H-3"), 3.63 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-5"), 3.22 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21"), 2.50 (1H, m, H-6"α), 2.26 (1H, m, H-6"β), 1.90 (3H, s, 7"-CH₃), 1.68 (3H, s, 25"-CH₃), 1.56 (3H, s, 24"-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 207.9 (C-8"), 164.3 (C-10"), 162.7 (C-12"), 157.9 (C-3'), 157.8 (C-5'), 156.6 (C-18"), 156.5 (C-6), 155.3 (C-2), 155.3 (C-7a), 136.5 (C-15"), 135.0 (C-1"), 131.4 (C-23"), 131.0 (C-1'), 130.7

(C-14"), 129.1 (C-16"), 129.1 (C-20"), 123.9 (C-22"), 123.1 (C-2"), 122.6 (C-3a), 121.9 (C-4), 115.9 (C-4'), 115.9 (C-17"), 115.9 (C-19"), 115.6 (C-11"), 114.0 (C-9"), 113.1 (C-5), 108.2 (C-13"), 104.6 (C-2'), 104.6 (C-6'), 101.9 (C-3), 98.3 (C-7), 50.2 (C-4"), 40.7 (C-5"), 35.2 (C-6"), 33.6 (C-3"), 25.8 (C-25"), 23.8 (C-7"), 22.2 (C-21"), 17.8 (C-24"). 以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **8** 为桑呋喃 E。

4 药理活性

采用 MTT 法^[18-19], 测定化合物 **1**~**8** 对 HepG2、Daoy、NCI-H460、HCT116 和 BGC823 细胞的细胞毒活性, 阳性对照药为紫杉醇, 结果见表 2。化合物 **3** 对 HCT116 和 BGC823 细胞表现出中等的细胞毒活性, IC₅₀ 值分别为 9.64 和 8.07 μmol/L; 化合物 **7** 对 NCI-H460 细胞表现出中等的细胞毒活性, IC₅₀ 值为 7.27 μmol/L; 化合物 **8** 对 HCT116、NCI-H460、

表 2 化合物 **1**~**8** 的细胞毒活性
Table 2 Cytotoxicities of compounds **1**—**8**

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)				
	HCT116	NCI-H460	BGC823	Daoy	HepG2
1	43.50	63.20	40.90	48.30	22.30
2	44.10	23.20	22.30	29.20	14.20
3	9.64	10.50	8.07	23.30	12.70
4	22.40	29.90	22.40	40.40	41.60
5	23.70	22.90	32.30	37.60	28.50
6	39.70	23.30	28.10	38.70	33.50
7	14.00	7.27	16.40	24.00	14.50
8	7.06	2.09	5.19	22.70	4.93
紫杉醇	5.63 × 10 ⁻⁴	1.00	2.50 × 10 ⁻⁴	1.71 × 10 ⁻³	0.0244

BGC823 和 HepG2 细胞均表现出较强的细胞毒活性, IC₅₀ 值分别为 7.06、2.09、5.19 和 4.93 μmol/L。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [3] 徐立. 桑树植物化学成分及活性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [4] 顾关云. 桑的化学成分和生物活性研究进展 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(1): 12-17.
- [5] Hano Y, Kohno H, Itoh M, *et al.* Structures of three new 2-arylbenzofuran derivatives from the Chinese crude drug "Sang-Bai-Pi" (*Morus* root bark) [J]. *Chem Pharm Bull*,

1985, 33(12): 5294-5300.

- [6] Ueda S, Matsumoto J, Nomura T. Four new natural Diels-Alder type adducts, mulberrofuran E, kuwanon Q, R, and V from callus culture of *Morus alba* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(1): 350-353.
- [7] 康洁, 陈若芸, 于德泉. 蒙桑茎皮中 Diels-Alder 型加合物化学成份的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 976-979.
- [8] 陶小宇, 张德武, 陈日道, 等. 桑树细胞培养物的化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3738-3742.
- [9] Zhang D W, Tao X Y, Yu L Y, *et al.* New 2-arylbenzofuran metabolite from cell cultures of *Morus alba* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(6): 683-688.

- [10] Takasugi M, Nagao S, Masamune T, *et al.* Chalconoracine, a natural Diels-Alder adduct from diseased mulberry [J]. *Chem Lett*, 1980, 9(12): 1573-1576.
- [11] Hano Y, Suzuki S, Nomura T, *et al.* Absolute configuration of natural Diels-Alder type adducts from the *Morus* root bark [J]. *Heterocycles*, 1988, 27(10): 2315-2325.
- [12] Wang M, Gao L X, Wang J, *et al.* Diels-Alder adducts with PTP1B inhibition from *Morus notabilis* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 109(3): 140-146.
- [13] Kang J, Chen R Y, Yu D Q, *et al.* Five new Diels-Alder type adducts from the stem and root bark of *Morus mongolica* [J]. *Planta Med*, 2005, 72(5): 52-59.
- [14] Fukai T, Hano Y, Hirakura K, *et al.* Structures of two natural hypotensive Diels-Alder type adducts, mulberrofurans F and G, from the cultivated mulberry tree (*Morus lhou* Koidz.) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(8): 3195-3204.
- [15] 耿长安, 姚淑英, 薛多清, 等. 桑白皮中 1 个新的异戊二烯基取代黄酮 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1560-1565.
- [16] Hano Y, Aida M, Nomura T. Two new natural Diels-Alder-type adducts from the root bark of *Artocarpus heterophyllus* [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(2): 391-395.
- [17] Phung T X B, Tran T H H, Dan T T H, *et al.* Chalcone-derived Diels-Alder adducts as NF- κ B inhibitors from *Morus alba* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(6): 596-600.
- [18] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [19] Carmichael J, Gazdar A F. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing [J]. *Cancer Res*, 1987, 47(4): 936-942.