

黄花三宝木茎中 1 个新颖木脂素类化合物

张大鹏^{1,2}, 周小雷³, 马国需⁴, 宋海龙², 石磊岭^{2*}, 魏鸿雁^{2*}

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

2. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

3. 广西药用植物所, 广西 南宁 530023

4. 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 研究黄花三宝木 *Trigonostemon lutescens* 茎中的化学成分。方法 采用硅胶柱色谱法, 半制备高效液相色谱等方法进行分离纯化, 结合 NMR、IR、MS 等波谱技术对其结构进行鉴定, 并运用 MTT 法测定化合物 1~4 对人肺癌 A549 细胞、宫颈癌 HeLa 细胞和乳腺癌 MCF-7 细胞的细胞毒活性。结果 从黄花三宝木茎中分离得到 4 个木脂素类化学成分, 分别鉴定为 5,5'-二甲氧基木香酚 A (1)、丁香脂素 (2)、里立脂素 B 二甲醚 (3)、木香酚 A (4)。结论 化合物 1 为新化合物, 化合物 2~4 为首次从该属植物中分离得到。化合物 1~4 对 A549、HeLa 和 MCF-7 细胞具有一定的细胞毒活性。
关键词: 黄花三宝木; 细胞毒活性; 5,5'-二甲氧基木香酚 A; 丁香脂素; 里立脂素 B 二甲醚; 木香酚 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)14-3633-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.004

A new lignan from stems of *Trigonostemon lutescens*

ZHANG Da-peng^{1,2}, ZHOU Xiao-lei³, MA Guo-xu⁴, SONG Hai-long², SHI Lei-ling², WEI Hong-yan²

1. School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Wulumuqi 830046, China

2. Xinjiang Institute of Chinese and Ethnic Medicine, Wulumuqi 830002, China

3. Guangxi Institute of Medicinal Plant, Nanning 530023, China

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

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents in the stems of *Trigonostemon lutescens*. **Methods** Silica gel column chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography were used for separation and purification. The structures were identified by NMR, IR, MS and other spectral techniques. Toxicity of compounds 1—4 on human lung cancer A549 cells, cervical cancer Hela cells and breast cancer MCF-7 cells was determined by the MTT method. **Results** Four lignans were isolated from the stems of *T. lutescens*. The structures were identified as 5,5'-dimethoxyclemaphenol A (1), syringaresinol (2), lirioresinol B dimethyl ether (3) and clemaphenol A (4). **Conclusion** Compound 1 is a new compound, and compounds 2—4 are isolated from this genus for the first time. Compounds 1—4 have certain cytotoxic activity on A549, HeLa and MCF-7 human tumor cells.

Key words: *Trigonostemon lutescens* Y. T. Chang et J. Y. Liang; cytotoxic activity; 5,5'-dimethoxyclemaphenol A; syringaresinol; lirioresinol B dimethyl ether; clemaphenol A

黄花三宝木 *Trigonostemon lutescens* Y. T. Chang et J. Y. Liang 为大戟科 (Euphorbiaceae) 三宝木属 *Trigonostemon* Bl. 植物, 是广西特有的三宝木属药

用植物, 分布于广西田阳、崇左、宁明等地, 生长于石灰岩山地的灌木林中。三宝木属植物全世界有 50 余种, 主要分布于亚洲的热带与亚热带地区;

收稿日期: 2019-11-10

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (81860759); 中央本级重大增减支项目 (2060302)

作者简介: 张大鹏 (1994—) 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。Tel: 18610651447 E-mail: zdp88888@yeah.net

*通信作者 石磊岭 (1977—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事天然药物化学研究。Tel: 13659911138 E-mail: shileiling@sina.com

魏鸿雁 (1969—), 女, 研究员, 硕士生导师, 主要从事天然药物化学研究。Tel: 13899908672 E-mail: whywlmq@sina.com

我国三宝木属植物有 10 种, 多为灌木, 主要分布于广西、云南、海南等地区^[1]。三宝木属有多种植物做为民间常用的草药, 在东南亚及我国广西等地区, 常用于解蛇毒、消炎、祛痰、润肠通便以及外用防腐等^[2]。现代化学及药理活性研究表明, 该属植物含有多种活性成分, 如萜类^[3]、生物碱^[4]、香豆素^[3]、菲类^[5]等, 具有抗肿瘤^[3]、抗病毒^[6]、杀虫^[7]、抑菌^[8]等广泛的药理活性。为了进一步研究黄花三宝木中的药效物质基础, 课题组对黄花三宝木的茎进行化学成分研究, 对其 95%乙醇提取物的二氯甲烷部位进行了系统分离, 得到 4 个木脂素类化合物, 分别鉴定为 5,5'-二甲氧基木香酚 A (5,5'-dimethoxyl-clemaphenol A, **1**)、丁香脂素 (syringaresinol, **2**)、里立脂素 B 二甲醚 (lirioresinol B dimethyl ether, **3**)、木香酚 A (clemaphenol A, **4**)。化合物 **1** 为新的化合物 (图 1), 化合物 **2**~**4** 为首次从该属植物中分离得到。并测定化合物 **1**~**4** 对 3 株人肿瘤细胞的体外细胞毒活性, 化合物 **3** 对人肺癌 A549 细胞的细胞毒活性最好, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 35.69 μg/mL; 化合物 **1** 对宫颈癌 HeLa 细胞的细胞毒活性最好, IC₅₀ 值为 22.58 μg/mL; 化合物 **2** 对乳腺癌 MCF-7 细胞的细胞毒活性最好, IC₅₀ 值为 54.76 μg/mL。

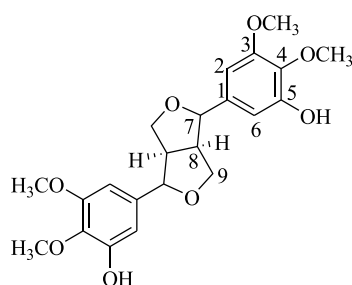


图 1 化合物 **1** 的结构

Fig. 1 Structure of compound **1**

1 仪器与材料

BrukerAvance III 600 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); 赛默飞世尔 Thermo Fisher LTQ-Orbitrap XL 液质联用仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 柱色谱硅胶和薄层色谱用硅胶 G、H、GF₂₅₄ (青岛海洋化工有限公司); HW-40C 凝胶 (Toyopearl 公司); MCI (日本三菱化学公司), 常规试剂均为分析纯 (北京化学试剂厂)。

黄花三宝木药材于 2018 年 7 月采自广西省南宁市, 经广西药用植物研究所副研究员周小雷鉴定为

黄花三宝木 *Trigonostemon lutescens* Y. T. Chang et J. Y. Liang 的茎枝, 标本 (TLGX-20180724-1) 保存于新疆大学生命科学与技术学院。

2 提取与分离

取黄花三宝木茎 7.6 kg, 阴干, 粉碎, 用体积分数 95%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收溶剂, 浓缩后得到总浸膏 547.0 g。总浸膏用水分散后, 依次用石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯各萃取 3 次, 萃取液减压浓缩至干, 最终得到石油醚部位浸膏 29.1 g、二氯甲烷部位浸膏 35.6 g、醋酸乙酯部位浸膏 45.1 g。取二氯甲烷部位浸膏 (35.6 g) 经硅胶柱 (100~200 目) 柱色谱, 石油醚-二氯甲烷 (1:1→0:1)、二氯甲烷-甲醇 (80:1→0:1) 梯度洗脱得到 11 个流分 Fr. 1~11。Fr. 4 (1.9 g) 经硅胶柱 (200~300 目) 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (60:1→0:1) 梯度洗脱得到 5 个流分 Fr. 4.1~4.5。Fr. 4.2 经半制备型 HPLC (YMC-Pack ODS-A, 250 mm×10 mm, 5 μm, 45%甲醇) 得到化合物 **3** (3.6 mg, *t_R*=28.7 min)、**4** (3.3 mg, *t_R*=27.3 min)。Fr. 4.3 经半制备型 HPLC (YMC-Pack ODS-A, 250 mm×10 mm, 5 μm, 40%甲醇) 得到化合物 **1** (4.2 mg, *t_R*=33.4 min)、**2** (4.4 mg, *t_R*=29.3 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色粉末 (甲醇)。HR-ESI-MS *m/z*: 441.152 5 [M+Na]⁺ (计算值 441.153 1), 确定分子式为 C₂₂H₂₆O₈, 化合物 **1** 的 IR 吸收表明存在羟基 (3 443 cm⁻¹) 官能团。紫外光谱在 244 nm 和 283 nm 处显示出最大吸收峰, 结合 ¹³C-NMR 和 ¹H-NMR 推断出该化合物为对称结构。

在 ¹H-NMR (表 1) 谱显示 24 个质子信号, 其中包括 1 个 AB 系统的 2 个芳香质子信号 δ_H 7.16 (2H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2, 2'), 7.22 (2H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6, 6'), 2 个甲氧基信号 δ_H 3.97 (6H, s, H-3, 3'), 3.91 (6H, s, H-4, 4'), 2 个次甲基氢信号 δ_H 4.74 (2H, d, *J* = 4.2 Hz, H-7, 7'), 6 个连氧氢信号 δ_H 3.11 (2H, t, *J* = 4.2 Hz, H-8, 8'), 4.25 (2H, dd, *J* = 9.0, 7.2 Hz, H-9a, 9'a), 3.87 (2H, dd, *J* = 9.0, 4.2 Hz, H-9b, 9'b)。根据 ¹³C-NMR、APT 谱中, 可见有 11 个碳信号, 1 个亚甲基 (δ_C 71.8)、4 个次甲基 (δ_C 103.8, 109.0, 86.0, 54.3)、4 个季碳 (δ_C 132.8, 152.4, 132.1, 146.2) 和 2 个甲氧基 (δ_C 56.2, 61.2), 表明该化合物为 C-3、4、5 有取代基的木脂素类化合物^[9]。进一步分析核磁数据发现该化合物和丁香脂素结构基本相似, 不同

之处在于化合物 **1** 多了 1 个甲氧基取代, 该不同进一步被 HMBC 谱证实。

在 HMBC 谱中(图 2), 2 个甲氧基 δ_{H} 3.97 (H-3, 3'), 3.91 (H-4, 4') 分别与 δ_{C} 152.4 和 146.2 存在相关, 提示甲氧基分别连在 C-3、C-4 位上, δ_{H} 7.16 (H-2, 2') 和 δ_{C} 152.4 (C-3), δ_{C} 146.2 (C-4) 存在相关, δ_{C} 149.0 (C-5) 为连氧季碳, 结合分子式和 δ_{C} 149.0 (C-5) 的化学位移, 显示 C-5 位存在羟基取代, 上述信息表明化合物 **1** 由 2 个 5-羟基-3,4-二甲氧基苯基单元组成。NOESY 谱中, 提示两者可能处于反式构象; 其中, 偶合常数 $J_{7-8} = 4.2$ Hz, 表明 H-7 和 H-8 为反式。因为化合物 **1** 为双四氢呋喃木脂素, 故相对构型和绝对构型一致, 均处于 α 位, 有 4 个手性碳原子^[9-10]。

综上所述, 化合物的结构如图 1 所示, 为 1 个新的木脂素类化合物, 命名为 5,5'-二甲氧基木香酚 A。

表 1 化合物 **1** 的核磁共振波谱数据 (600/150 MHz, CDCl_3)
Table 1 NMR data of compound **1** (600/150 MHz, CDCl_3)

碳位	δ_{C}	δ_{H}
1,1'	132.8	
2,2'	103.8	7.16 (d, $J = 1.8$ Hz)
3,3'	152.4	
4,4'	146.2	
5,5'	149.0	
6,6'	109.0	7.22 (d, $J = 1.8$ Hz)
7,7'	86.0	4.74 (d, $J = 4.2$ Hz)
8,8'	54.3	3.11 (t, $J = 4.2$ Hz)
9,9'	71.8	4.25 (dd, $J = 9.0, 7.2$ Hz)
9,9'		3.87 (dd, $J = 9.0, 4.2$ Hz)
3,3'-OCH ₃	56.2	3.97 (s)
4,4'-OCH ₃	61.2	3.91 (s)

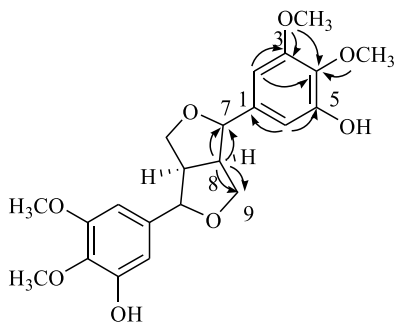


图 2 化合物 **1** 主要 HMBC 相关

Fig. 2 Key HMBC correlations of compound **1**

化合物 **2**: 淡黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 441 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。结合 ^1H -NMR、APT 谱确定分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.58 (4H, s, H-2, 2', 6, 6'), 4.73 (2H, d, $J = 4.2$ Hz, H-7, 7'), 3.10 (2H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8, 8'), 4.29 (2H, dd, $J = 9.0, 6.6$ Hz, H-9, 9'), 3.85 (2H, dd, $J = 9.0, 1.8$ Hz, H-9, 9'), 3.90 (12H, s, 3, 3', 5, 5'-OCH₃), 5.52 (2H, s, 4, 4'-OH); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 134.3 (C-1, 1'), 102.7 (C-2, 2', 6, 6'), 147.3 (C-3, 3', 5, 5'), 132.2 (C-4, 4'), 86.2 (C-7, 7'), 54.5 (C-8, 8'), 71.9 (C-9, 9'), 56.5 (3, 3', 5, 5'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **2** 为丁香脂素。

化合物 **3**: 淡黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 469 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。结合 ^1H -NMR、APT 谱确定分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_8$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.58 (4H, s, H-2, 2', 6, 6'), 4.73 (2H, d, $J = 4.2$ Hz, H-7, 7'), 3.50 (2H, d, $J = 4.8$ Hz, H-8, 8'), 4.29 (2H, dd, $J = 9.0, 7.2$ Hz, H-9, 9'), 3.87 (2H, dd, $J = 9.0, 4.8$ Hz, H-9, 9'), 3.90 (3, 3', 4, 4', 5, 5'-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 132.2 (C-1, 1'), 103.3 (C-2, 2', 6, 6'), 147.3 (C-3, 3', 5, 5'), 134.4 (C-4, 4'), 86.3 (C-7, 7'), 52.6 (C-8, 8'), 72.0 (C-9, 9'), 54.5 (3, 3', 5, 5'-OCH₃), 56.5 (4, 4'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **3** 为里立脂素 B 二甲醚。

化合物 **4**: 淡黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 381 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。结合 ^1H -NMR、APT 谱确定分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.20 (2H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2, 2'), 6.93 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5, 5'), 6.68 (2H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, H-6, 6'), 4.78 (2H, d, $J = 4.2$ Hz, H-7, 7'), 3.14 (2H, d, $J = 1.2$ Hz, H-8, 8'), 4.30 (2H, dd, $J = 9.0, 7.2$ Hz, H-9, 9'), 3.93 (2H, dd, $J = 9.0, 1.2$ Hz, H-9, 9'), 5.70 (2H, s, 3, 3'-OH), 3.94 (6H, s, 4, 4'-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 132.4 (C-1, 1'), 109.0 (C-2, 2'), 147.3 (C-3, 3'), 146.8 (C-4, 4'), 114.4 (C-5, 5'), 119.0 (C-6, 6'), 86.2 (C-7, 7'), 56.5 (C-8, 8'), 71.9 (C-9, 9'), 56.5 (OCH₃-4,4')。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **4** 为木香酚 A。

4 细胞毒性测定

使用 MTT 测定方法, 经过适当改进, 测定化合物 **1**~**4** 对 3 种肿瘤细胞 A549、HeLa 和 MCF-7 的细胞毒活性。用胰蛋白酶将培养皿对数生长的细胞系消化, 并按 200 μL /孔 (3×10^4 个/mL) 接种于 96 孔板中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h

后, 向孔里分别加入 100 μL 化合物 1~4 样品, 质量浓度梯度为 100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56 $\mu\text{g/mL}$, 紫杉醇为阳性对照组, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h, 然后将 20 μL MTT 溶液 (20 $\mu\text{g/mL}$) 直接加入所有孔中, 培养 4 h, 使用分光光度计测量其在 570 nm

处的吸光度, 实验重复 3 次, 计算 IC_{50} 值。

结果表明(表 2), 化合物 1~4 均对 A549、HeLa 和 MCF-7 细胞具有一定的细胞毒性, 其中化合物 3 对 A549 的细胞毒活性最好, IC_{50} 值为 35.69 $\mu\text{g/mL}$; 化合物 1 对 HeLa 的细胞毒活性最好, IC_{50} 值为 22.58

表 2 化合物 1~4 对 3 种人肿瘤细胞的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Cytotoxic activity of compounds 1—4 in three human tumor cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		
	A549	HeLa	MCF-7
1	36.42 $\pm$ 2.30	22.58 $\pm$ 3.20	58.48 $\pm$ 1.80
2	42.78 $\pm$ 3.30	26.74 $\pm$ 3.60	54.76 $\pm$ 2.20
3	35.69 $\pm$ 2.50	29.46 $\pm$ 2.40	57.87 $\pm$ 1.50
4	44.48 $\pm$ 3.60	25.68 $\pm$ 2.80	56.73 $\pm$ 2.90
紫杉醇	0.05 $\pm$ 0.00	10.23 $\pm$ 2.50	11.25 $\pm$ 0.06

$\mu\text{g/mL}$; 化合物 2 对 MCF-7 的细胞毒活性最好, IC_{50} 值为 54.76 $\mu\text{g/mL}$ 。但与阳性对照紫杉醇相比, 化合物 1~4 在 A549 细胞和 MCF-7 细胞系中表现出较弱的活性, 对 HeLa 肿瘤细胞显示一定的细胞毒活性, 最优 IC_{50} 值为 22.58 $\mu\text{g/mL}$ 。

参考文献

- [1] 余海谦, 白红进, 梅文莉, 等. 黄花三宝木枝条的化学成分研究 II [J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(3): 323-328.
- [2] Kanchanapoom T, Kasai R, Chumsri P, et al. Lotthanongine, an unprecedented flavonoidal indole alkaloid from the roots of Thai medicinal plant, *Trigonostemon reidioides* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(16): 2941-2943.
- [3] Yang B, Meng Z Q, Li Z L, et al. Three daphnane diterpenoids from *Trigonostemon xyphophylloides* [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 11(1): 270-274.
- [4] Li S F, Zhang Y, Li Y, et al. β -Carboline alkaloids from the leaves of *Trigonostemon lii* Y. T. Chang [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(6): 2296-2299.
- [5] Zhu Q, Tang C P, Ke C Q, et al. Constituents of *Trigonostemon chinensis* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(1): 40-44.
- [6] Zhang L, Luo R H, Wang F, et al. Daphnane diterpenoids isolated from *Trigonostemon thyrsoideum* as HIV-1 antivirals [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(16): 1879-1883.
- [7] Jayasuriya H, Zink D L, Borris R P, et al. Redioides B-E, potent insecticides from *Trigonostemon reidioides* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 228-231.
- [8] 覃其昶, 何 翊, 黄光影, 等. 黄花三宝木化学成分研究 [J]. 医药导报, 2014, 33(10): 1299-1302.
- [9] 何 明, 张静华, 胡昌奇. 威灵仙化学成分的研究 [J]. 药理学学报, 2001, 36(4): 278-280.
- [10] Tsukamoto H, Hisada S, Nishibe S. Lignans from bark of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* and *F. japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(11): 4482-4489.
- [11] Huang Y Y, Xie Y G, Zhu S L, et al. Chemical constituents of *Dolomiaea berardioidea* [J]. *Chem Nat Compd*, 2019, 55(2): 1-2.
- [12] 梅枝意, 罗会畏, 邹大江, 等. 玉兰花蕾双四氢呋喃型木脂素成分研究 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2014, 4(48): 525-527.
- [13] Choi S U, Yang M C, Lee K H, et al. Lignan and terpene constituents from the aerial parts of *Saussurea pulchella* [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(9): 1067-1074.