

• 化学成分 •

千年健萜类化学成分及其细胞毒活性研究

杨仁勇¹, 王云涛¹, 王梦然¹, 田露¹, 刘晓菡¹, 杜玉庆¹, 姜艳¹, 王春华¹, 马丽^{2*}, 赵峰^{1*}

1. 滨州医学院药学院, 国家中医药管理局方剂效应与临床评价重点实验室, 山东烟台 264003

2. 烟台市口腔医院, 山东烟台 264001

摘要: 目的 研究千年健 *Homalomena occulta* 根茎的萜类化学成分及其细胞毒活性。方法 应用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、半制备型反相高效液相色谱和制备型薄层色谱等方法进行分离和纯化, 通过 MS、1D 和 2D NMR 等波谱数据以及单晶 X-射线衍射鉴定化合物的结构, 采用 MTT 法测试化合物对 3 株人肝癌 HepG2、SMMC-7721 和 QGY-7703 细胞的细胞毒活性。**结果** 从千年健干燥根茎乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部位得到 11 个萜类化合物, 包括 2 个单萜: 千年健烯 A (1)、3,7-二甲基-1-辛烯-3,6-二醇 (2); 9 个倍半萜: 4(15)-eudesmene-1 β ,6 α -diol (3)、菠萝香藤素 (4)、1 β ,4 α -dihydroxy-11,12,13-trinor-8,9-eudesmen-7-one (5)、1 β ,4 β ,7 α -trihydroxyeudesmane (6)、mucrolidin (7)、bullatantriol (8)、cadinane-4 β ,5 α ,10 α -triol (9)、4 α -hydroxy-homalomenol C (10)、(1R,4S,5S,6S,7S,10R)-isodauc-6,7,10-triol (11)。**结论** 化合物 1 为新化合物, 化合物 2 为新天然产物, 化合物 3~5 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 10 为首次从该植物分离得到, 并首次报道化合物 11 的单晶结构。化合物 5~7 和 9~11 显示出细胞毒活性, 化合物 10 的活性最好, 对 3 种肿瘤细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 (37.56 $\pm$ 6.73)、(33.39 $\pm$ 2.75) 和 (44.24 $\pm$ 5.15) μ mol/L。

关键词: 千年健; 千年健属; 单萜; 倍半萜; 抗肿瘤活性; 千年健烯 A; 菠萝香藤素; 4 α -hydroxy-homalomenol C; (1R,4S,5S,6S,7S,10R)-isodauc-6,7,10-triol

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)11-3167-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.001

Terpenoids from rhizomes of *Homalomena occulta* and their cytotoxic activities

YANG Ren-yong¹, WANG Yun-tao¹, WANG Meng-ran¹, TIAN Lu¹, LIU Xiao-han¹, DU Yu-qing¹, JIANG Yan¹, WANG Chun-hua¹, MA Li², ZHAO Feng¹

1. Key Laboratory of Prescription Effect and Clinical Evaluation of State Administration of Traditional Chinese Medicine of China, School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

2. Yantai Stomatological Hospital, Yantai 264001, China

Abstract: **Objective** To investigate the terpenoids from the rhizomes of *Homalomena occulta* and their cytotoxic activities. **Methods** The constituents were isolated and purified by using a combination of chromatographic techniques including column chromatography over silica gel and Sephadex LH-20, reverse-phase HPLC, and preparative thin layer chromatography. The structures were identified by analysis of the spectroscopic data and single crystal X-ray diffraction. The cytotoxic activities of the obtained compounds against human cancer cell lines HepG2, SMMC-7721, and QGY-7703 were evaluated by MTT method. **Results** Eleven terpenoids were isolated from the EtOAc partition of the ethanolic extract of the rhizomes of *H. occulta*, including two monoterpenoids: homalomene A (1), and 3,7-dimethyl-1-octene-3,6-tetraol (2), and nine sesquiterpenoids: 4(15)-eudesmene-1 β ,6 α -diol (3), ananosmin (4), 1 β ,4 α -dihydroxy-11,12,13-trinor-8,9-eudesmen-7-one (5), 1 β ,4 β ,7 α -trihydroxyeudesmane (6), mucrolidin (7), bullatantriol (8), cadinane-4 β ,5 α ,10 α -triol (9), 4 α -hydroxy-homalomenol C (10), and (1R,4S,5S,6S,7S,10R)-isodauc-6,7,10-triol (11). **Conclusion** Compound 1 is a new monoterpenoid, compound 2 is a new natural product, compounds

收稿日期: 2021-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703391); 山东省医药卫生科技发展计划 (2015WS0496); 山东省大学生创新创业训练计划 (S201910440053)

作者简介: 杨仁勇 (1996—), 硕士研究生, 研究方向为工业药学。E-mail: 1922363074@qq.com

*通信作者: 赵峰 (1982—), 副教授, 博士, 研究方向为天然药物化学。E-mail: zhaofeng2015@163.com

马丽 (1983—), 副主任医师, 硕士, 研究方向为牙周再生。E-mail: marli2020@163.com

3—5 是从属 *Homalomena* 属首次分离得到, 化合物 **10** 是从该植物首次分离得到, 且化合物 **11** 的单晶结构首次报道。化合物 5—7 和 9—11 显示弱细胞毒活性, 且化合物 **10** 对测试的 3 种人肝癌细胞系具有最佳抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为 (37.56 ± 6.73) , (33.39 ± 2.75) , 和 $(44.24 \pm 5.15) \mu\text{mol/L}$, 分别。

Key words: *Homalomena occulta* (Lour.) Schott.; *Homalomena* Schott.; monoterpene; sesquiterpene; cytotoxic activity; homalomenene A; ananosmin; 4 α -hydroxy-homalomenol C; (1R,4S,5S,6S,7S,10R)-isodauc-6,7,10-triol

千年健 *Homalomena occulta* (Lour.) Schott. 为天南星科千年健属植物, 本属植物约 140 种, 分布于热带亚洲和美洲, 我国有 3 种, 主要分布于广东、广西、云南和海南。千年健的干燥根茎入药, 为瑶族群众所习用, 治疗风湿腰腿痛、类风湿关节炎、胃痛、肠胃炎、骨折、外伤出血等症^[1]。自 2000 年收录入《中国药典》, 用于祛风湿、壮筋骨, 治疗风寒湿痹、腰膝冷痛、拘挛麻木、筋骨痿软^[2]。据报道, 该植物的主要次级代谢产物为挥发油和倍半萜, 以及少量的生物碱、酚酸和三萜类成分。挥发油主要含芳樟醇、松油烯-4-醇、 α -松油醇等单萜类, 显示出抗氧化和杀线虫活性^[3-4]。近年来从千年健中发现了 10 余种骨架类型的倍半萜, 包括杜松烷型、桉烷型、愈创木烷型、isodaucane 型, 以及天然来源较为少见的 oplopanane、oppositane 和 axane 等结构类型的倍半萜, 它们显示出细胞毒和抑菌活性, 尤其是能促进成骨细胞的增殖和分化, 抑制脂多糖诱导巨噬细胞释放炎症因子一氧化氮 (NO)、环氧化酶 2 (cyclooxygenase, COX-2) 和前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE_2), 具有潜在的抗骨质疏松和抗炎活性, 是千年健的主要有效成分^[5-12]。为了继续研究千年健的活性成分, 本实验应用多种色谱学方法, 从千年健乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部位得到 11 个萜类化合物 (图 1), 包括 2 个单萜: 千年健烯 A (homalomenene A, **1**)、3,7-二甲基-1-辛烯-

3,6-二醇 (3,7-dimethyl-1-octene-3,6-tetraol, **2**); 5 个桉烷型倍半萜: 4(15)-eudesmene-1 β ,6 α -二醇 (**3**)、菠萝香藤素 (ananosmin, **4**)、1 β ,4 α -二氢氧-11,12,13-三萜-8,9-eudesmen-7-one (**5**)、1 β ,4 β ,7 α -三氢氧-eudesmane (**6**)、mucrolidin (**7**); 1 个 oppositane 型倍半萜: bullatantriol (**8**); 1 个杜松烷型倍半萜: cadinane-4 β ,5 α ,10 α -三醇 (**9**); 和 2 个 isodaucane 型倍半萜: 4 α -hydroxy-homalomenol C (**10**)、(1R,4S,5S,6S,7S,10R)-isodauc-6,7,10-triol (**11**)。其中, 化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 为新天然产物, 化合物 **3**~**5** 为首次该属植物分离得到, 化合物 **10** 为首次从该植物分离得到。通过单晶 X-射线衍射技术进一步确定了化合物 **11** 的立体构型。化合物 **5**~**7** 和 **9**~**11** 显示出中等强度或弱细胞毒活性, 其中化合物 **10** 的活性最好, 对测试的 3 种人肝癌肿瘤细胞株 HepG2、SMMC-7721 和 QGY-7703 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 (37.56 ± 6.73) 、 (33.39 ± 2.75) 和 $(44.24 \pm 5.15) \mu\text{mol/L}$ 。

1 仪器与材料

Avance III 500 MHz 或 Avance III HD 600 MHz 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); iS50 红外光谱仪、Q Exactive Focus 高分辨质谱仪 (美国赛默飞世尔公司); 安捷伦 1100 Series LC-MSD-Trap-SL 或 Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 型质谱仪 (美国安捷伦公司); Autopol III 型旋光仪 (美国 Rudolph

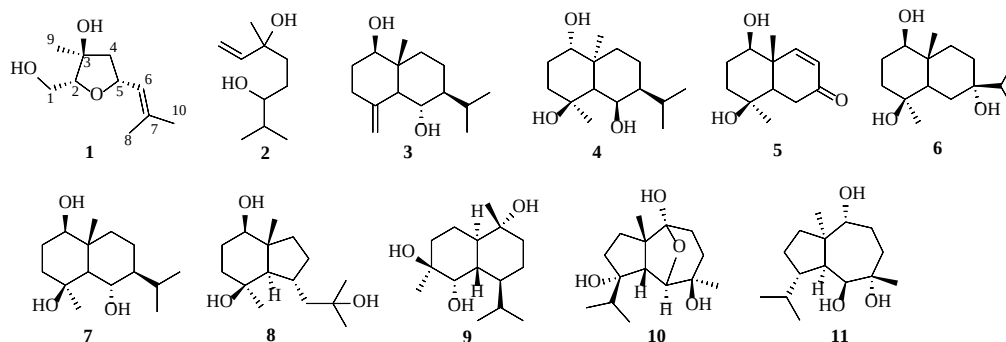


图 1 千年健中萜类化合物的结构

Fig. 1 Structures of terpenoids from *H. occulta*

公司); Synergy H1 酶标仪(美国 Bio Tek 公司); Waters 600 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂); 制备及分析薄层色谱板(烟台江友硅胶发展有限公司); 凝胶 Sephadex LH-20 (GE Pharmacia 公司, 美国); Rp C₁₈ 色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm, 北京慧德易科技有限责任公司); 盐酸阿霉素(大连美仑生物技术有限公司, 批号 S0702A); 所用试剂均为分析纯或色谱纯(广东汕头西陇科学股份有限公司)。

千年健药材购自河北省安国中药市场, 经滨州医学院中西医结合学院王樱霖教授鉴定为千年健 *H. occulta* (Lour.) Schott, 标本(S-QNJ-2010)保存于滨州医学院药学院。

2 方法

2.1 提取与分离

取干燥的千年健根 9 kg, 粉碎, 用 95%乙醇室温超声波辅助提取 3 次, 提取液减压蒸干得浸膏 400 g。浸膏加适量蒸馏水, 充分分散后, 用醋酸乙酯萃取 3 次, 减压蒸干得到醋酸乙酯萃取部分 198 g。

醋酸乙酯萃取部分用硅胶(100~200 目)柱色谱分离, 石油醚-丙酮(10:0、10:0.5、10:1、2:1、1:1)梯度洗脱, 得到 6 个部分(Fr. 1~6)。Fr. 3 (45.5 g) 用硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯(10:1、10:2、2:1、1:1、0:1)洗脱, 得到 4 个部分 Fr. 3-1~3-4。Fr. 3-3 用丙酮重结晶得到化合物 **8** (2.1 g)。Fr. 4 (23 g) 用硅胶柱色谱进一步纯化, 石油醚-丙酮(100:0→0:100)梯度洗脱, 得到 20 个部分 Fr. 4-1~Fr. 4-20。Fr. 4-3 (0.15 g) 用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 石油醚-氯仿-甲醇(5:5:1)洗脱, 得到 10 个部分。Fr. 4-3-7 用制备薄层色谱纯化, 氯仿-丙酮(3:1)作展开剂, 得到化合物 **4** (20 mg)。Fr. 4-4 (0.2 g) 用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 石油醚-氯仿-甲醇(5:5:1)洗脱, 得到 10 个部分。Fr. 4-4-5 用丙酮重结晶得到化合物 **7** (9.1 mg)。Fr. 4-4-6 用制备薄层色谱纯化, 氯仿-丙酮(4:1)作展开剂, 得到化合物 **1** (3 mg)。Fr. 4-4-10 用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱纯化, 石油醚-氯仿-甲醇(5:5:1)洗脱, 得到化合物 **11** (18 mg)。Fr. 4-6 (1.2 g) 用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 石油醚-氯仿-甲醇(5:5:1)洗脱, 得到 5 个部分。Fr. 4-6-2 用液相色谱纯化, 甲醇-水(70:30, 2 mL/min)洗脱得到化合物 **10** (9.7 mg)。Fr. 4-6-5 用制备薄层色谱纯化, 氯仿-丙酮(3:

1) 作展开剂, 得到化合物 **3** (2 mg)。Fr. 4-9 (2 g) 用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 石油醚-氯仿-甲醇(5:5:1)洗脱, 得到 9 个部分。Fr. 4-9-5 用半制备型液相色谱纯化, 甲醇-水(70:30, 2 mL/min)洗脱得到化合物 **9** (8 mg)。Fr. 4-9-6 用半制备型液相色谱纯化, 甲醇-水(65:35, 2 mL/min)洗脱得到化合物 **2** (5 mg) 和 **5** (8 mg)。Fr. 4-9-8 经丙酮重结晶得到化合物 **6** (1.1 g)。

2.2 抗肿瘤活性评价

参照文献报道方法^[13], 应用 MTT 法测试了化合物对 3 株人肝癌 HepG2、SMMC-7721 和 QGY-7703 细胞的细胞毒活性。肿瘤细胞复苏后, 用含 10%胎牛血清、1%双抗的 DMEM 培养基传代, 取对数生长期的细胞用于实验。用无血清培养基稀释药物浓度为 100、50、25、12.5、6.25、3.13 μmol/L。取生长状态良好的细胞, 按照 2×10⁴ 个/孔、每孔 100 μL 种板; 培养 12 h 后, 弃上清, 将各浓度药物按每孔 100 μL 体积加入细胞中, 每浓度设置 3 个复孔; 对照组加含 1% DMSO 的培养基。加药培养 24 h 后, 弃上清, 每孔加 100 μL 无血清培养基配制的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 弃上清, 每孔加 DMSO 150 μL, 于微孔板振荡器上震荡 10 min 后, 用酶标仪测得 570 nm 处的吸光度(A)值并按照公式计算细胞存活率。实验重复 3 次, 采用 GraphPad Prism 5 软件计算 IC₅₀ 值。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 无色胶状物, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 33.0$ (c 0.15, MeOH)。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 209.114 9 $[M+Na]^+$ (计算值 209.114 8, C₁₀H₁₈O₃Na), 提示其分子式为 C₁₀H₁₈O₃, 不饱和度为 2。红外光谱显示有羟基(3396 cm⁻¹)和双键(1681 cm⁻¹)的特征吸收峰。¹H-NMR 谱(表 1)显示 1 个烯氢信号 δ_{H} 5.20 (1H, dq, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-6), 结合 ¹³C-NMR 给出的 10 个碳信号以及不饱和度, 提示化合物 **1** 可能是单环单萜。¹H-NMR 谱还给出 2 个与烯键相连的甲基双峰信号 δ_{H} 1.70 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, CH₃-8), 1.73 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 7-CH₃), 1 个甲基单峰信号 δ_{H} 1.30 (3H, s, 3-CH₃), 以及 4 个与氧原子相连的碳上的质子信号 δ_{H} 3.46 (1H, dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz, H-1a), 3.57 (1H, dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz, H-1b), 3.70 (1H, dd, $J = 6.0, 4.2$ Hz, H-2), 4.88 (1H, m, H-5)。其中, 甲基与烯氢

表 1 化合物 1 的氢谱和碳谱数据 (600/150 MHz, CD₃OD)Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound 1 (600/150 MHz, CD₃OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	3.57 (1H, dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz), 3.46 (1H, dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz)	62.2
2	3.70 (1H, dd, $J = 6.0, 4.2$ Hz)	88.0
3		78.8
4	1.95 (1H, dd, $J = 13.2, 6.0$ Hz), 1.61 (1H, dd, $J = 13.2, 10.2$ Hz)	47.0
5	4.88 (1H, m)	74.3
6	5.20 (1H, dq, $J = 8.4, 1.2$ Hz)	125.5
7		135.5
8	1.73 (3H, d, $J = 1.2$ Hz)	24.5
9	1.30 (3H, s)	21.5
10	1.70 (3H, d, $J = 1.2$ Hz)	16.8

质子间较小的耦合常数 ($J = 1.2$ Hz), 提示为烯丙位 $4J$ 远程耦合, 是连在双键上的偕二甲基, 结构中存在 $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$ -片段。¹³C-NMR 谱共显示 10 个碳信号, 结合 HSQC 谱, 确定为 3 个甲基、2 个亚甲基 (1 个连氧)、2 个连氧次甲基、1 个连氧季碳和 2 个烯碳, 并对直接相连的 ¹H 和 ¹³C 信号进行了准确归属。化合物 1 的 ¹H-¹H COSY 谱显示 2 个偶合系统, 分别是 H₂-1/H-2 和 H₂-4/H-5/H-6/H-8 (H-10), 二者通过连氧季碳 (C-3, δ_{C} 78.8) 相连, 该连接方式经 HMBC 谱给出的远程相关信息进一步确证。HMBC 谱中 (图 2), H-1 与 C-2 (δ_{C} 88.0)、C-3 (δ_{C} 78.8) 相关, H-9 与 C-2、C-3、C-4 (δ_{C} 47.0) 相关, H-4 与 C-2、C-3、C-5 (δ_{C} 74.3)、C-9 (δ_{C} 21.5) 相关, H-6 与 C-4、C-8 (δ_{C} 24.5)、C-10 (δ_{C} 16.8) 相关, H-8 和 H-10 与 C-6 (δ_{C} 125.5)、C-7 (δ_{C} 135.5) 相关。H-2 与 C-5 间的 HMBC 远程相关表明 C-2 与 C-5 通过氧原子相连形成四氢呋喃环结构, 可能是由月桂烷型无环单萜的 2-OH 与 5-OH 脱水缩合形成。化合物 1 的相对构型经 NOESY 谱确证, NOESY 谱中 (图 3), H-1 与 H-9 相关, H-9 与 H-4a 相关,

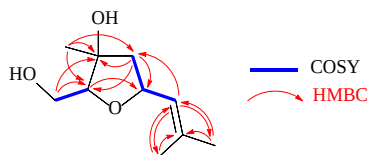
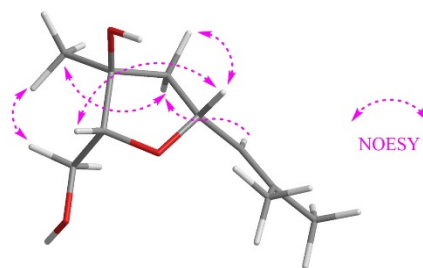
图 2 化合物 1 的主要 ¹H-¹H COSY 和 HMBC 相关Fig. 2 Key ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compound 1

图 3 化合物 1 的主要 NOESY 相关

Fig. 3 Key NOESY correlations of compound 1

H-4a 与 H-6 相关, 说明它们在四氢呋喃环平面的同侧, 推测为 α 构型。H-2 与 H-5 相关, H-5 与 H-4b 相关, 提示他们为 β 构型。因此, 鉴定化合物 1 的结构如图 1 所示, 命名为千年健烯 A。

化合物 2: 无色胶状物, 10% 硫酸-乙醇溶液显灰黄色, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -19.8^\circ$ (c 0.09, MeOH)。ESI-MS m/z : 173.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, acetone- d_6) 谱给出 1 组单取代末端双键的质子信号 δ_{H} 4.95 (1H, dd, $J = 10.7, 1.8$ Hz, H-1a), 5.20 (1H, dd, $J = 17.6, 1.8$ Hz, H-1b), 5.92 (1H, dd, $J = 17.6, 10.7$ Hz, H-2), 其中 H-2 呈 dd 峰, 说明 C-2 与季碳相连。氢谱还给出 1 个连氧次甲基的质子信号 δ_{H} 3.24 (1H, ddd, $J = 10.5, 6.5, 4.4$ Hz, H-2), 1 组偕甲基双峰信号 δ_{H} 1.10 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, H-8, 10), 1 个甲基单峰信号 δ_{H} 1.23 (3H, s, H-9)。¹³C-NMR (125 MHz, acetone- d_6) 谱共显示 10 个碳信号, 包括与氢谱信号相对应的烯碳 δ_{C} 146.2 (C-2), 110.3 (C-1), 连氧次甲基 δ_{C} 72.0 (C-6), 5 个不连氧的脂肪碳, 以及与末端双键相连的连氧季碳 δ_{C} 78.7 (C-3)。结合相对分子量及上述结构片段, 确定其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$, 是月桂烷型无环单萜。连氧次甲基的质子信号呈 ddd 峰, 说明 1 个羟基应取代在 C-6 位, 是 H-6 与 H-5a、H-5b、H-7 偶合裂分形成。另一个羟基取代在 C-3 位形成季碳。¹H-NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ : 1.10 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, H-8, 10), 1.23 (3H, s, H-9), 1.28~1.85 (5H, m, H-4, 5, 7), 3.24 (1H, ddd, $J = 10.5, 7.05, 4.4$ Hz, H-6), 4.95 (1H, dd, $J = 10.7, 1.8$ Hz, H-1a), 5.20 (1H, dd, $J = 17.6, 1.8$ Hz, H-1b), 5.92 (1H, dd, $J = 17.6, 10.7$ Hz, H-2); ¹³C-NMR (125 MHz, acetone- d_6) δ : 110.3 (C-1), 146.2 (C-2), 78.7 (C-3), 72.0 (C-6), 39.8, 33.5, 27.6, 25.8, 25.1, 24.0 (C-4, 5, 7~10)。化合物 2 的 ¹H-NMR 数据与文献报道基本一致^[14], 结合其化学位移和偶合裂分信息, 鉴定化合物 2 为 3,7-二甲基-1-辛烯-3,6-二醇。

化合物 **3**: 白色无定形粉末, 10%硫酸-乙醇溶液显紫色。ESI-MS m/z : 239.1 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 0.66 (3H, s, H-14), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-12), 0.95 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-13), 1.72 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-5), 3.49 (1H, dd, $J = 11.5, 3.9$ Hz, H-1), 3.81 (1H, dd, $J = 10.8, 9.5$ Hz, H-6), 4.77 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-15a), 4.94 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-15b); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 79.5 (C-1), 32.4 (C-2), 35.5 (C-3), 146.8 (C-4), 56.3 (C-5), 67.5 (C-6), 49.8 (C-7), 18.7 (C-8), 36.7 (C-9), 42.2 (C-10), 26.4 (C-11), 16.6 (C-12), 21.7 (C-13), 12.1 (C-14), 108.4 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **3** 为 4(15)-eudesmene-1 β ,6 α -diol。

化合物 **4**: 白色无定形粉末, 10%硫酸-乙醇溶液显紫色。ESI-MS m/z : 257.1 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 4.35 (1H, dd, $J = 11.4, 4.5$ Hz, H-6), 3.27 (1H, dd, $J = 9.8, 4.6$ Hz, H-1), 1.71 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-5), 1.30 (3H, s, H-15), 1.11 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-12), 0.93 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-13); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 78.7 (C-1), 28.3 (C-2), 35.9 (C-3), 72.1 (C-4), 50.3 (C-5), 72.6 (C-6), 47.2 (C-7), 22.6 (C-8), 35.9 (C-9), 40.7 (C-10), 25.2 (C-11), 21.8 (C-12), 24.0 (C-13), 13.6 (C-14), 23.2 (C-15)。以上数据经 DEPT 谱和 HMBC 谱进行了准确归属, 与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **4** 为菠萝香藤素。

化合物 **5**: 白色无定形粉末, 10%硫酸-乙醇溶液显灰黄色。ESI-MS m/z : 211.1 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 7.34 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-9), 5.84 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-8), 3.44 (1H, dd, $J = 11.7, 4.2$ Hz, H-1), 2.69 (1H, dd, $J = 17.8, 14.2$ Hz, H-6a), 2.49 (1H, ddd, $J = 17.8, 3.8, 0.7$ Hz, H-6b), 1.82 (1H, dd, $J = 14.2, 3.8$ Hz, H-5), 1.24 (3H, s, H-14), 1.17 (3H, s, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 75.1 (C-1), 27.7 (C-2), 40.1 (C-3), 71.3 (C-4), 49.5 (C-5), 35.8 (C-6), 203.6 (C-7), 126.7 (C-8), 161.5 (C-9), 43.6 (C-10), 13.8 (C-14), 29.2 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **5** 为 1 β ,4 α -dihydroxy-11,12,13-trinor-8,9-eudesmen-7-one。

化合物 **6**: 白色无定形粉末, 10%硫酸-乙醇溶液显紫色。ESI-MS m/z : 257.1 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 3.20 (1H, dd, $J = 12.3, 4.5$

Hz, H-1), 1.08 (3H, s, H-15), 1.00 (3H, s, H-14), 0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-12), 0.93 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-13); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 78.9 (C-1), 27.2 (C-2), 40.0 (C-3), 70.3 (C-4), 44.8 (C-5), 28.8 (C-6), 72.3 (C-7), 29.4 (C-8), 34.6 (C-9), 38.9 (C-10), 39.3 (C-11), 16.5 (C-12), 16.6 (C-13), 11.1 (C-14), 29.4 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[18,19], 故鉴定化合物 **6** 为 1 β ,4 β ,7 α -trihydroxyeudesmane。

化合物 **7**: 白色无定形粉末, 10%硫酸-乙醇溶液显紫色。ESI-MS m/z : 257.1 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 3.88 (1H, dd, $J = 12.8, 9.6$ Hz, H-6), 3.13 (1H, dd, $J = 11.4, 4.5$ Hz, H-1), 1.02 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-5), 1.45 (3H, s, H-15), 1.01 (3H, s, H-14), 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-12), 0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-13); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 78.4 (C-1), 27.2 (C-2), 41.5 (C-3), 71.1 (C-4), 56.9 (C-5), 68.5 (C-6), 51.9 (C-7), 18.4 (C-8), 37.9 (C-9), 40.8 (C-10), 25.7 (C-11), 20.7 (C-12), 15.3 (C-13), 12.7 (C-14), 34.1 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **7** 为 mucrolidin。

化合物 **8**: 无色方晶, mp 179.1~181 $^{\circ}\text{C}$, 10%硫酸-乙醇溶液显灰黄色。ESI-MS m/z : 257.2 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 4.19 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, 1-OH), 3.97 (1H, s, OH), 3.66 (1H, s, OH), 3.11 (1H, ddd, $J = 11.4, 4.4, 4.4$ Hz, H-1), 1.91 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H-5), 1.15 (3H, s, H-15), 1.10 (3H, s, H-12), 1.09 (3H, s, H-13), 0.89 (3H, s, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 78.7 (C-1), 40.5 (C-2), 41.5 (C-3), 70.3 (C-4), 59.2 (C-5), 32.1 (C-6), 51.8 (C-7), 32.5 (C-8), 28.5 (C-9), 47.1 (C-10), 70.6 (C-11), 31.8 (C-12), 30.6 (C-13), 15.2 (C-14), 30.5 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **8** 为 bullatantriol。

化合物 **9**: 白色无定形粉末, 10%硫酸-乙醇溶液显紫色。ESI-MS m/z : 257.2 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 3.49 (1H, brs, H-5), 2.07 (1H, m, H-11), 1.22 (3H, s, H-15), 1.09 (3H, s, H-14), 0.95 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-12), 0.81 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-13); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 43.5 (C-1), 19.79 (C-2), 32.2 (C-3), 71.1 (C-4), 72.2 (C-5), 39.2 (C-6), 41.6 (C-7), 20.7 (C-8), 41.6 (C-9), 71.9 (C-10), 25.0 (C-11), 14.2 (C-12), 20.7 (C-13), 20.2 (C-14), 27.0 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化

合物 **9** 为 cadinane-4 β ,5 α ,10 α -triol。

化合物 **10**: 白色无定形粉末, 10%硫酸-乙醇溶液显紫色。ESI-MS m/z : 271.2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ : 3.39 (1H, brs, H-6), 2.32 (1H, t, J = 1.6 Hz, H-5), 1.34 (3H, d, J = 0.5 Hz, H-15), 1.24 (3H, s, H-14), 0.98 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-12), 0.92 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-13); ^{13}C -NMR (125 MHz, acetone- d_6) δ : 53.1 (C-1), 33.4 (C-2), 37.7 (C-3), 87.1 (C-4), 58.5 (C-5), 81.0 (C-6), 68.4 (C-7), 33.4 (C-8), 32.8 (C-9), 105.4 (C-10), 33.1 (C-11), 17.3 (C-12), 16.3 (C-13), 22.6 (C-14), 26.1 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **10** 为 4 α -hydroxy-homalomenol C。

化合物 **11**: 白色无定形粉末, 10%硫酸-乙醇溶液显紫色。ESI-MS m/z : 257.1 $[M+H]^+$ 。前期已报道该化合物的 HRESIMS、 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HMBC 和 NOESY 数据, 通过与同时得到的化合物的旋光值和核磁数据比对, 鉴定化合物 **11** 为 (1R,4S,5S,6S,7S,10R)-isodauc-6,7,10-triol^[9,21]。化合物 **11** 与其对映异构体的碳谱仅 C-5、C-6、C-7、C-10 和 C-15 的化学位移稍有不同, 为了排除二者仅部分手性碳构型不同的可能性, 应用氯仿-甲醇 (1:1) 反复重结晶得到了化合物 **11** 的无色块状晶体, 以 Cu K α 辐射为光源, 经单晶 X-射线衍射法确证其立体构型与前期鉴定的一致 (图 4)。化合物 **11** 的单晶数据已上传至 CCDC, CCDC 号为 1051601。

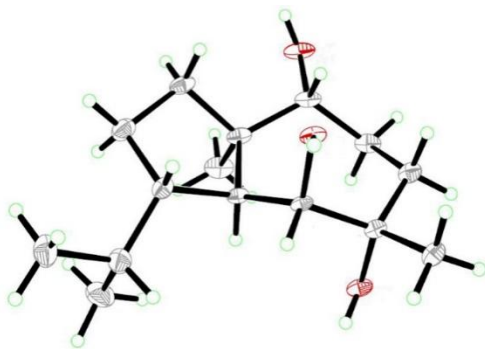


图 4 化合物 **11** 的单晶 ORTEP 图

Fig. 4 X-ray ORTEP drawing of compound **11**

化合物 **11** 的单晶结构: 分子式 $2C_{15}H_{28}O_3 \cdot CH_3OH$, 含 2 分子化合物 **11** 和 1 分子甲醇; 相对分子质量 $M_R=544.79$, 单斜晶系, $P2_1$ 空间群; 晶胞参数 $a=0.715\ 55(3)$ nm, $b=2.042\ 45(15)$ nm, $c=1.159\ 28(6)$ nm, $\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta=97.164(2)^\circ$; $V=1\ 681.3(7)$ nm³,

$T=293(2)$ K, 晶胞内分子数 $Z=2$, $D_c=1.076$ mg/cm³, $F(000)=604$ 。晶胞的衍射点数 5907 ($3.84 \leq \theta \leq 66.12$), 可观测的衍射点数 4470 [$I>2\sigma(I)$], 可观测衍射点的 R 为 0.053 5, 可观测衍射点的 R_w 为 0.148 7, S 为 1.052, Flack 因子是 0.0(3)。

3.2 细胞毒活性结果

在浓度为 100 μ mol/L 时, 化合物 **1**~**4**、**8** 对 3 株人肝癌 HepG2、SMMC-7721 和 QGY-7703 细胞的抑制率均小于 20%, 无明显的细胞毒作用。其他化合物表现出中等强度或弱细胞毒活性 (表 2), 且有一定的选择性, 仅 isodaucane 型倍半萜 **10**、**11** 对 QGY-7703 显示出抑制作用。对 HepG2 和 SMMC-7721 显示抑制活性的化合物中, 化合物 **10** 和 **11** 的活性最好, 其 IC_{50} 值为 29.38~37.56 μ mol/L。

表 2 化合物 **5**~**7** 和 **9**~**11** 的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Cytotoxic activities of compounds **5**—**7** and **9**—**11** ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	HepG2	SMMC-7721	QGY-7703
5	45.37 ± 8.78	38.55 ± 5.61	>100
6	60.46 ± 11.05	39.35 ± 5.37	>100
7	41.47 ± 9.40	>100	>100
9	59.04 ± 11.24	41.04 ± 6.58	>100
10	37.56 ± 6.73	33.39 ± 2.75	44.24 ± 5.15
11	33.22 ± 6.25	29.38 ± 8.49	62.98 ± 7.91
盐酸阿霉素	6.21 ± 3.81	1.72 ± 0.20	1.93 ± 0.18

4 讨论

千年健富含萜类成分, 主要为低沸点的单萜挥发油和氧化度较高的倍半萜。倍半萜类成分显示出更为多样的骨架类型和能代表千年健传统药效的生物学活性, 目前已报道 10 余种骨架类型的倍半萜, 它们对 NO、COX-2 和 PGE₂ 等炎症因子的分泌具有显著的抑制作用, 能够促进成骨细胞的增殖和分化, 可能是千年健的药效物质基础。本研究从千年健根茎分离得到 2 个单萜和 9 个倍半萜类化合物, 其中化合物 **1** 为新化合物, 结构中有 1 个四氢呋喃环, 可能是由月桂烷型无环单萜的 2-OH 与 5-OH 脱水缩合形成, 该类氧化环合形式的天然单萜报道较少。化合物 **2** 为月桂烷型新天然单萜。化合物 **3**~**5** 为首次从该属植物分离得到的桉烷型倍半萜, 其中化合物 **5** 是降三碳倍半萜。通过单晶-X 射线衍射技术进一步确证了化合物 **11** 的立体结构。初步的体

外抗肿瘤活性评价中, 桉烷型倍半萜(5~7)、杜松烷型倍半萜(9)和 isodaucane 型倍半萜(10、11)显示出一定的细胞毒活性。研究结果进一步丰富了千年健的化学物质组成和生物学活性, 为千年健的开发应用提供研究基础和依据。

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部委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 49.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 34.
- [3] Liu X C, Bai C Q, Liu Q Z, et al. Evaluation of nematocidal activity of the essential oil of *Homalomena occulta* (Lour.) Schott rhizome and its major constituents against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood [J]. *J Entomol Zool Stud*, 2014, 2(4): 182-186.
- [4] Zeng L B, Zhang Z R, Luo Z H, et al. Antioxidant activity and chemical constituents of essential oil and extracts of *Rhizoma Homalomenae* [J]. *Food Chem*, 2011, 125(2): 456-463.
- [5] 张思炎. 千年健和红豆杉的化学成分及药理活性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [6] Elbandy M, Lerche H, Wagner H, et al. Constituents of the rhizome of *Homalomena occulta* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2004, 32(12): 1209-1213.
- [7] Hu Y M, Liu C, Cheng K W, et al. Sesquiterpenoids from *Homalomena occulta* affect osteoblast proliferation, differentiation and mineralization in vitro [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(12): 2367-2373.
- [8] Xie X Y, Wang R, Shi Y P. Sesquiterpenoids from the rhizomes of *Homalomena occulta* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(10): 1010-1014.
- [9] Zhao F, Sun C, Ma L, et al. New sesquiterpenes from the rhizomes of *Homalomena occulta* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 109: 113-118.
- [10] Yang J L, Dao T T, Hien T T, et al. Further sesquiterpenoids from the rhizomes of *Homalomena occulta* and their anti-inflammatory activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29(10): 1162-1167.
- [11] 叶静, 肖美添, 咎珂, 等. 瑶族药材千年健倍半萜类成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14): 2655-2659.
- [12] Tian X Y, Zhao Y, Yu S S, et al. BACE1 (beta-secretase) inhibitory phenolic acids and a novel sesquiterpenoid from *Homalomena occulta* [J]. *Chem Biodivers*, 2010, 7(4): 984-992.
- [13] Yao B R, Li N, Wang C H, et al. Novel asymmetric 3, 5-bis(arylidene)piperidin-4-one derivatives: Synthesis, crystal structures and cytotoxicity [J]. *Acta Crystallogr C Struct Chem*, 2018, 74(Pt 6): 659-665.
- [14] Wolinsky J, Bedoukian R H. Hydroboration of monoterpene alcohols [J]. *J Org Chem*, 1976, 41(2): 278-281.
- [15] Kitajima J, Suzuki N, Satoh M, et al. Sesquiterpenoids of *Torilis japonica* fruit [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(8): 811-815.
- [16] 邹澄, 浦湘渝, 周俊. 菠萝香藤的倍半萜成分 [J]. 云南植物研究, 1993, 15(2): 196-200.
- [17] Henchiri H, Bodo B, Deville A, et al. Sesquiterpenoids from *Teucrium ramosissimum* [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(11/12): 1435-1441.
- [18] Sung T V, Steffan B, Steglich W, et al. Sesquiterpenoids from the roots of *Homalomena aromatica* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(10): 3515-3520.
- [19] de Menezes J E, Machado F E, Lemos T L, et al. Sesquiterpenes and a phenylpropanoid from *Cordia trichotoma* [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2004, 59(1/2): 19-22.
- [20] 侯蕾, 王亚玲, 王文锦, 等. 益智仁化学成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 315-320.
- [21] Zhang Q, Ma L, Qu Z X, et al. Purification, characterization, crystal structure and NO production inhibitory activity of three new sesquiterpenoids from *Homalomena occulta* [J]. *Acta Crystallogr C Struct Chem*, 2018, 74(Pt 11): 1440-1446.

[责任编辑 王文倩]