

台湾拟金发藓二苯甲酮类化学成分及其细胞毒活性研究

刘丽娜¹, 张学文³, 侯芳洁², 段绪红^{2,3*}, 赵建成^{3*}, 陈玉玲³

1. 衡水市人民医院 药学部, 河北 衡水 053000

2. 河北中医学院药学院, 河北省中药炮制技术创新中心, 河北 石家庄 050200

3. 河北师范大学生命科学院, 河北 石家庄 050016

摘要: 目的 对台湾拟金发藓 *Polytrichastrum formosum* 全草的化学成分及其细胞毒活性开展研究, 为其进一步开发提供科学依据。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 凝胶、MCI-Gel 树脂柱色谱、半制备型 RP-HPLC 等多种色谱技术进行分离纯化, 运用波谱方法对所分离的化合物进行结构鉴定, 采用 MTT 法测试化合物对人肝癌 HepG2 细胞和人胰腺癌 PANC-1 细胞的细胞毒活性。结果 从台湾拟金发藓植物中分离得到 4 个化合物, 分别鉴定为 2''-(1-苯甲酰基-2-羟基-4-苯氧基)-N-(2'''-羟基-乙基)-乙酰胺 (1)、(2-羟基-4-甲氧基-苯基)-苯基-甲酮 (2)、(2,4-二甲氧基-苯基)-苯基-甲酮 (3)、(2,4-二羟基-苯基)-苯基-甲酮 (4); 部分化合物显示出了一定的细胞毒活性。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为金发藓酮 B; 化合物 2~4 为新天然产物, 首次从金发藓科植物中分离得到; 化合物 1 对人肝癌 HepG2 细胞具有较强的细胞毒活性, 其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值为 38.14 μmol/L。

关键词: 金发藓科; 台湾拟金发藓; 二苯甲酮; 金发藓酮 B; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)03-0667-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.003

Benzophenones from endohydric moss *Polytrichastrum formosum* and their cytotoxic activities

LIU Li-na¹, ZHANG Xue-wen³, HOU Fang-jie², DUAN Xu-hong^{2,3}, ZHAO Jian-cheng³, CHEN Yu-ling³

1. Department of Pharmacy, Hengshui People's Hospital, Hengshui 053000, China

2. Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center of Hebei Province, School of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

3. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

Abstract: **Objective** To investigate the chemical constituents and cytotoxic activity of the whole plant of *Polytrichastrum formosum*, and provide scientific basis for its further development. **Methods** Various chromatographic techniques such as silica gel, Sephadex LH-20 gel, MCI-Gel resin column chromatography and semi-preparative RP-HPLC were used for separation and purification. Their structures were elucidated by spectroscopic data analyses. The cytotoxicity of compounds for HepG2 and PANC-1 cells line was also evaluated by using the MTT method. **Results** Four compounds were isolated and identified as 2''-(1-benzoyl-2-hydroxy-4-phenoxy)-N-(2'''-hydroxy-ethyl)-acetamide (1), (2-hydroxy-4-methoxy-phenyl)-phenyl-methanone (2), (2,4-dimethoxy-phenyl)-phenyl-methanone (3), and (2,4-dihydroxy-phenyl)-phenyl-methanone (4). Some compounds showed certain cytotoxic activity. **Conclusion** Compound 1 is a new compound named pogonatone B; Compounds 2~4 are new natural products, and isolated from Polytrichaceae species for the first time; Compound 1 also displays the high cytotoxicity on HepG2 cell with IC₅₀ values of 38.14 μmol/L.

Key words: Polytrichaceae; *Polytrichastrum formosum* (Hedw.) G.L.Sm.; benzophenones; pogonatone B; cytotoxic activity

收稿日期: 2021-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31070184); 河北中医学院博士科研基金资助项目 (BSZ2021020); 全国中药特色技术传承人才培养项目 (T20194828003)

作者简介: 刘丽娜 (1974—), 副主任中药师, 研究方向为中药鉴定及制剂开发。E-mail: 18631811807@163.com

*通信作者: 段绪红 (1982—), 博士, 副主任中药师, 研究方向为中药化学与炮制。E-mail: duanxuhong@126.com

赵建成 (1956—), 教授, 博士生导师, 研究方向为藓类植物化学与分类。E-mail: zhaojiancheng@mail.hebtu.edu.cn

台湾拟金发藓为金发藓科拟金发藓属植物台湾拟金发藓 *Polytrichastrum formosum* (Hedw.) G. L. Sm. 的干燥全草。广泛分布于我国四川、云南、贵州等西南省区。常生长于林下潮湿土壁, 植株体相对较大。金发藓科植物因植株较高大、容易被识别与采集、药用历史记载悠久而备受关注, 近年来, 陆续有学者对该科植物的化学成分及药理活性开展了系列研究, 从中得到了一系列结构新颖的活性化合物^[1-5]。课题组前期也从该植物中分离得到了部分生物活性较好的化合物^[6], 为了进一步开发利用该植物资源, 本实验继续对台湾拟金发藓植物进行了化学成分研究, 从中分离得到了 4 个二苯甲酮类化合物 (图 1), 分别鉴定为 2''-(1-苯甲酰基-2-羟基-4-苯氧基)-N-(2'''-羟基-乙基)-乙酰胺 [2''-(1-benzoyl-2-hydroxy-4-phenoxy)-N-(2'''-hydroxy-ethyl)-acetamide, **1**]、(2-羟基-4-甲氧基-苯基)-苯基-甲酮 [(2-hydroxy-4-methoxy-phenyl)-phenyl-methanone, **2**]、(2,4-二甲氧基-苯基)-苯基-甲酮 [(2,4-dimethoxy-phenyl)-phenyl-methanone, **3**]和 (2,4-二羟基-苯基)-苯基-甲酮 [(2,4-dihydroxy-phenyl)-phenyl-methanone, **4**]。经 Scifinder 检索, 发现化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2~4** 为新天然产物, 首次从金发藓科植物中分离得到。初步药理结果显示, 化合物 **1** 对人肝癌 HepG2 细胞具有较强的细胞毒活性, 其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值为 38.14 μmol/L。化合物 **2~4** 对 HepG2 细胞和人胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖均无显著影响。

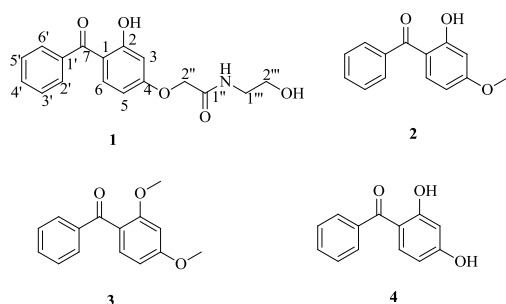


图 1 化合物 1~4 的化学结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—4

1 仪器与材料

Agilent 6530B Q-TOF 质谱仪 (美国 Agilent 公司); X-5A 显微熔点测定仪 (巩义市科瑞仪器有限公司); Bruker AV-500 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); 二氧化碳培养箱 (上海 BPN-240CRH 公司);

SYNERGY 多功能酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); R-1020 旋转蒸发仪 (郑州长城科工贸有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 柱色谱用硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); GF₂₅₄ 预制硅胶板 (青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); ODS 柱色谱材料 (YMC 公司); MCI 柱色谱材料 (MCI-gel CHP-20P, 日本三菱公司); 安捷伦 1200 型半制备 HPLC 分析仪器 (高效液相色谱仪); 制备用色谱柱: Zorbax Prep HT GF (250 mm×21.2 mm, 7 μm); 色谱乙腈和色谱甲醇 (国药集团化学试剂有限公司); 水 (自制, Milli-Q 型超纯水机); 其他试剂为分析纯 (天津市科密欧化学试剂有限公司); HepG2 细胞、PANC-1 细胞细胞株 (美国 ATCC)。

台湾拟金发藓样品 2019 年 10 月采于贵州梵净山国家级自然保护区, 标本经河北师范大学生命科学学院赵建成教授鉴定为金发藓科拟金发藓属植物台湾拟金发藓 *P. formosum* (Hedw.) G. L. Sm. 的全草。凭证标本 (HBSD2019110401) 保存于河北师范大学生命科学学院系统与进化实验室。

2 提取与分离

称取台湾拟金发藓晒干植株 1.3 kg, 粉碎成粗粉后过 30 目筛, 并用 95% 乙醇浸泡提取 5 次 (每次溶剂用量 5 L, 提取时间 3 d), 过滤后合并提取液, 减压浓缩成稠浸膏 (39.1 g)。将粗提物用热水分散后, 依次用石油醚 (30~60 °C)、二氯甲烷、醋酸乙酯和正丁醇萃取。各极性部位萃取液再减压浓缩, 得萃取物。其中二氯甲烷萃取物 (7.5 g), 上 MCI 凝胶柱, 用甲醇-水溶剂系统梯度洗脱, 90% 甲醇洗脱部分减压浓缩得浸膏 (3.1 g), 该浸膏用 5 g 硅胶 (100~200 目) 湿法拌样, 烘干, 干法上样, 过 150 g 硅胶 (200~300 目) 柱色谱, 采用石油醚-丙酮 (10:1、5:1、3:1、3:2、1:1) 梯度洗脱, 分成 5 个馏份 Fr. 1~5。Fr. 2 (850 mg) 通过 ODS 柱 (依次用 30%、60%、90% 甲醇洗脱) 得到 7 个亚组分 Fr. 2.1~2.7。将 Fr. 2.2 用适量甲醇溶解, 采用反相色谱柱法, 以 60% 乙腈-水溶液为流动相, 体积流量为 15 mL/min 进行制备液相分离, 收集 17.5 min 色谱峰, 得化合物粗品, 粗品再经 Sephadex LH-20 柱纯化后得化合物 **1** (7.1 mg); Fr. 2.3 经制备柱色谱 (甲醇-水 53:47, 8 mL/min) 得到 Fr. 2.3.1~2.3.5, 再将 Fr. 2.3.3 经半制备柱色谱得到化合物 **3** (9.2 mg, *t_R*=31.4 min, 乙腈-水 21:79)。

Fr. 2.5 经制备柱色谱 (甲醇-水 40:60, 8 mL/min) 得到 Fr. 2.5.1~2.5.4, 将 Fr. 2.5.1 经半制备柱色谱得到化合物 **2** (8.8 mg, t_R =17.3 min, 乙腈-水 32:78)。将 Fr. 2.5.3 经半制备柱色谱得到化合物 **4** (5.9 mg, t_R =42.6 min, 乙腈-水 18:82)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末 (氯仿); HR-ESI-MS m/z : 316.118 2 $[M+H]^+$ (计算值 316.117 9), 推测其分子式为 $C_{17}H_{17}O_5N$, 不饱和度为 10。紫外光谱在 241 (1.50)、284 (2.35)、325 (1.33) nm 处显示出了吸收峰。红外光谱提示结构中含有羟基 (3319 cm^{-1}), 羰基 (1898 cm^{-1}), 苯环 (3058 、 1640 、 1503 cm^{-1}) 等基团。 ^1H -、 ^{13}C -NMR (表 1) 显示化合物中存在 17 个碳和 17 个氢原子。其中低场区显示有 8 个芳香氢信号; δ_H 7.63 (1H, d, J =8.6 Hz, H-6), 6.47 (1H, dd, J =8.6 1.4 Hz, H-5), 6.60 (1H, d, J =1.4 Hz, H-3) 信号显示存在 1 个 1,2,4-三取代苯环偶合系统; 同时还存在 1 个单取代苯环结构片段 δ_H 7.70 (2H, d, J =7.4 Hz, H-2', 6'), 7.56 (2H, d, J =7.4 Hz, H-3', 5'), 7.62 (1H, dd, J =7.4, 1.2 Hz, H-4'); 高场区氢信号显示存在 1 个连氧亚甲基信号 δ_H 4.63 (2H, s, H-2''); 1 个连氧乙基信号 δ_H 3.60 (2H, m, H-1'''), 3.85 (2H, m, H-2''')。 ^{13}C -NMR 谱中给出了 17 个碳信号, 结合 DEPT 和 HSQC 谱, 可以推断含有 1 个连氧亚甲基碳信号 (δ_C 66.7)、1 个连氧乙基碳信号 (δ_C 61.6, 41.5)、8 个次甲基碳信号 (δ_C 102.3, 106.2, 128.4, 128.4, 127.9, 127.9, 131.3, 135.2) 和 6 个季碳信号 (δ_C 113.9, 137.6, 162.7, 165.6, 167.6, 199.7), 并对直接相连的 ^1H - 和 ^{13}C -NMR 信号进行了准确归属 (表 1)。通过文献报道^[6]比对, 发现该化合物与 2-(4-benzoyl-3-hydroxyphenoxy)-*N*-propylacetamide 的 NMR 信号非常相似, 主要不同之处在于少了 1 个甲基信号。同时在 HMBC (图 2) 中, H-2'、H-6' 与 C=O (δ_C 199.7) 的相关信号以及 H-3'、H-5' 与 C-1' (δ_C 137.6) 的相关信号证实了 B 环为单取代, 且 C-1' 与羰基相连; H-6 (δ_H 7.63) 与 C-1 (δ_C 113.9)、C-4 (δ_C 165.6) 和 C-7 (δ_C 199.7) 存在相关信号, H-3 (δ_H 6.61) 与 C-1 (δ_C 113.9)、C-5 (δ_C 106.2) 存在相关信号, 同时 δ_H 4.63 与 δ_C 165.6 (C-4) 的相关信号表明乙氧基侧链与 C-4 相连, 充分印证了 A 环为 ABX 偶合系统; 也提示上述 A、B 环构成了 1 个二苯甲酮的结构片段; δ_H 4.63 与 δ_C 167.6 (C-1'') 的相关信号表明连氧亚甲基与羰基直接相连; H-1''' (δ_H 3.60)

表 1 化合物 **1** 的 NMR 数据 (500/125 MHz, CDCl_3)

Table 1 NMR data (500/125 MHz, CDCl_3) for compound **1**

碳位	δ_C	δ_H
1	113.9 (s)	
2	162.7 (s)	
3	102.3 (d)	6.60 (1H, d, J =1.4 Hz)
4	165.6 (s)	
5	106.2 (d)	6.47 (1H, dd, J =8.6, 1.4 Hz)
6	135.2 (d)	7.63 (1H, d, J =8.6 Hz)
2-OH		12.63 (1H, s)
NH		7.01 (1H, brs)
7	199.7 (s)	
1'	137.6 (s)	
2', 6'	128.4 (d)	7.70 (2H, d, J =7.4 Hz)
3', 5'	127.9 (d)	7.56 (2H, d, J =7.4 Hz)
4'	131.3 (d)	7.62 (1H, dd, J =7.4, 1.2 Hz)
1''	167.6 (s)	
2''	66.7 (t)	4.63 (2H, s)
1'''	41.5 (t)	3.60 (2H, m)
2'''	61.6 (t)	3.85 (2H, m)

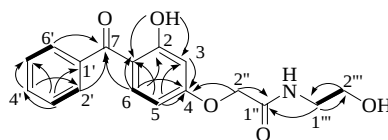


图 2 化合物 **1** 的主要 COSY (—) 及 HMBC (↷) 相关
Fig. 2 Key COSY (—) and HMBC (↷) correlations of compound **1**

与 C-2''' (δ_C 61.6)、H-2''' (δ_H 3.85) 与 C-1''' (δ_C 41.5) 的相关信号, H-1''' 与 H-2''' 的 COSY 相关信号印证了乙基结构片段的的存在; δ_H 3.61 与 δ_C 167.6 (C-1'') 的远程相关信号, -NH (δ_H 7.01) 与 H-1''' 的 COSY 相关信号提示乙基连接在酰胺基团的 N 原子上。至此, 化合物 **1** 的结构确定为 2''-(1-苯甲酰基-2-羟基-4-苯氧基)-*N*-(2'''-羟基-乙基)-乙酰胺, 经 Scifinder 检索, 化合物 **1** 为 1 个新化合物, 命名为金发藓酮 B。

化合物 **2**: 淡黄色结晶 (甲醇), mp 65~67 °C; ESI-MS m/z : 229.2 $[M+H]^+$; ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.61 (1H, s, 2-OH), 7.56 (2H, d, J =7.5 Hz, H-2', 6'), 7.50 (1H, dd, J =7.5, 1.5 Hz, H-4'), 7.47 (1H, d, J =8.9 Hz, H-6), 7.41 (2H, d, J =7.5 Hz, H-3', 5'), 6.45 (1H, d, J =2.0 Hz, H-3), 6.33 (1H, dd, J =8.9, 2.0 Hz, H-5), 3.79 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 200.0 (C=O), 166.3 (C-2), 166.2 (C-4), 138.2 (C-1'), 135.2 (C-6), 131.4 (C-4'), 128.8 (C-2', 6'), 128.2

(C-3', 5'), 113.1 (C-1), 107.3 (C-5), 101.0 (C-3), 55.6 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **2** 为 (2-羟基-4-甲氧基-苯基)-苯基-甲酮, 经 Scifinder 检索, 为首次从天然产物中分离得到。

化合物 **3**: 淡黄色结晶 (甲醇), mp 86~88 °C; ESI-MS m/z : 243.3 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.69 (2H, d, J = 7.5 Hz, H-2', 6'), 7.45 (1H, dd, J = 7.5, 1.5 Hz, H-4'), 7.35 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-6), 7.33 (2H, d, J = 7.5 Hz, H-3', 5'), 6.48 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3), 6.43 (1H, dd, J = 8.9, 2.0 Hz, H-5), 3.79 (3H, s, -OCH₃), 3.62 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 195.5 (C=O), 163.3 (C-2), 159.6 (C-4), 138.8 (C-1'), 132.3 (C-6), 132.1 (C-4'), 129.6 (C-2', 6'), 127.9 (C-3', 5'), 121.5 (C-1), 104.5 (C-5), 98.8 (C-3), 55.6 (-OCH₃), 55.5 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为 (2,4-二甲氧基-苯基)-苯基-甲酮, 经 Scifinder 检索, 为首次从天然产物中分离得到。

化合物 **4**: 白色结晶 (甲醇), mp 142~143 °C; ESI-MS m/z : 215.2 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.64 (2H, d, J = 7.5 Hz, H-2', 6'), 7.59 (1H, dd, J = 7.5, 1.5 Hz, H-4'), 7.53 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-6), 7.51 (2H, d, J = 7.5 Hz, H-3', 5'), 6.49 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3), 6.37 (1H, dd, J = 8.9, 2.0 Hz, H-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 200.3 (C=O), 166.1 (C-2), 162.9 (C-4), 138.2 (C-1'), 136.2 (C-6), 131.6 (C-4'), 128.9 (C-2', 6'), 128.4 (C-3', 5'), 113.6 (C-1), 107.7 (C-5), 103.7 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **4** 为 (2,4-二羟基-苯基)-苯基-甲酮, 经 Scifinder 检索, 为首次从天然产物中分离得到。

4 抗肿瘤活性测定

参考文献方法^[10], 采用 MTT 法检测化合物 **1**~**4** 对 HepG2 细胞和 PANC-1 细胞的体外细胞毒活性。结果表明, 化合物 **1** 可显著抑制 HepG2 细胞的增殖, 抑制作用表现出了剂量相关性, 50 μ mol/L 的抑制率达到 62%, IC₅₀ 值为 38.14 μ mol/L, 显示出了较强的细胞毒活性。而化合物 **2**~**4** 对 HepG2 和 PANC-1 细胞增殖无显著影响。

5 讨论

本实验对台湾拟金发藓 95% 乙醇水浸提物的二氯甲烷萃取部位进行分离纯化, 得到 4 个二苯甲酮类化合物, 其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2**~**4** 为新天然产物。体外细胞毒活性实验表明, 化合物

1 对 HepG2 细胞具有较好的细胞毒活性。

前期研究发现, 金发藓科金发藓属植物金发藓^[11]和小金发藓属植物东亚小金发藓^[12]均含有二苯甲酮类, 与拟金发藓属台湾拟金发藓植物具有高度相似性, 说明该科上述三个属植物的亲缘关系较近, 这也与三者植物形态上具有相似性相吻合, 可以从化学分类学角度对金发藓科植物分类提供一定的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chobot V, Kubicová L, Nabbout S, *et al.* Evaluation of antioxidant activity of some common mosses [J]. *Zeitschrift Naturforschung C*, 2008, 63(7/8): 476-482.
- [2] Fu P, Lin S, Shan L, *et al.* Constituents of the moss *Polytrichum commune* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(7): 1335-1337.
- [3] Zheng G Q, Chang C J, Stout T J, *et al.* Ohioensins: novel benzonaphthoxanthones from *Polytrichum ohioense* [J]. *J Org Chem*, 1993, 58(2): 366-372.
- [4] Zheng G Q, Ho D K, Elder P J, *et al.* Ohioensins and pallidisetins: Novel cytotoxic agents from the moss *Polytrichum pallidisetum* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(1): 32-41.
- [5] Cheng X X, Xiao Y P, Wang X B, *et al.* Anti-tumor and pro-apoptotic activity of ethanolic extract and its various fractions from *Polytrichum commune* L. ex Hedw in L1210 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(1): 49-56.
- [6] Duan X H, Zhang X W, Qin M, *et al.* Two new benzophenones from the endohydric moss *Polytrichastrum formosum* [J]. *Nat Prod Commun*, 2021, 16(3): 1-4.
- [7] Hansen P E. Substituent effects on deuterium isotope effects on nuclear shielding of intramolecularly hydrogen-bonded aromatic ketones, aldehydes and esters [J]. *Magn Reson Chem*, 1993, 31(1): 23-37.
- [8] Yamada T, Mishima E, Ueki K, *et al.* Phenyltellanyl triflate (PhTeOTf) as a powerful tellurophilic activator in the Friedel-Crafts reaction [J]. *Chem Lett*, 2008, 37(6): 650-651.
- [9] Sharghi H, Hosseini-Sarvari M, Eskandari R. Direct acylation of phenol and naphthol derivatives in a mixture of graphite and methanesulfonic acid [J]. *ChemInform*, 2006, 37(41): 2047-2052.
- [10] 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.
- [11] Duan X H, Zhao J C, Li L, *et al.* Two new benzophenones from endohydric moss *Polytrichum Commune* [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(19): 2750-2754.
- [12] 段绪红, 何培, 秦梦, 等. 东亚小金发藓中 1 个新的二苯甲酮类化合物 [J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1291-1293.

[责任编辑 王文倩]