

毛华菊中 1 个新的愈创木内酯类化合物

张洪权^{1,2,3}, 王艳丽¹, 董馨语¹, 向涛¹, 周巧巧^{1,2}, 朱世明^{1,2}, 熊校勤^{1,2,3}, 张蕾^{1,2}, 郑平^{1,2*}, 刘杰⁴

1. 湖北第二师范学院化学与生命科学学院, 湖北 武汉 430205

2. 植物抗癌活性物质提纯与应用湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430205

3. 鄂东药用植物资源开发与利用研究中心, 湖北 武汉 430205

4. 武汉恒和达生物医药有限公司, 湖北 武汉 430056

摘要:目的 研究毛华菊 *Chrysanthemum vestitum* 的化学成分及体外肿瘤细胞毒活性。方法 采用溶剂提取法、Diaion HP-20 柱色谱、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱、硅胶柱色谱及制备高效液相色谱等色谱方法, 对毛华菊氯仿部位的化学成分进行分离纯化, 并利用现代波谱技术对已分离得到的化合物进行结构鉴定。MTT 法测定各化合物体外对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制活性。结果 从毛华菊的氯仿部位分离得到 3 个化合物, 分别鉴定为 (1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*)-8-乙酰氧基-愈创木-3,11(13)-二烯-2-酮-12,6-内酯 (1)、(1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*,11*S*)-8-乙酰氧基-愈创木-3-烯-2-酮-12,6-内酯 (2) 和 2 α -(2',4'-hexadiynoyl)-1,6-dioxaspiro [4,5]-deca-3-ene (3)。结论 化合物 2 为 1 个新的愈创木内酯, 命名为毛华菊内酯 A, 其对 HepG2 细胞增殖没有明显的抑制作用; 化合物 1 的氢谱全谱、碳谱以及绝对构型为首次报道, 它对 HepG2 细胞具有较强的体外抑制作用, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值为 (5.95 $\pm$ 0.19) μ mol/L; 化合物 3 为首次从毛华菊中分离得到。关键词: 毛华菊; 愈创木内酯; 肿瘤细胞毒活性; (1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*)-8-乙酰氧基-愈创木-3,11(13)-二烯-2-酮-12,6-内酯; 毛华菊内酯 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4611-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.003

One new guaianolide from *Chrysanthemum vestitum*

ZHANG Hong-quan^{1,2,3}, WANG Yan-li¹, DONG Xin-yu¹, XIANG Tao¹, ZHOU Qiao-qiao^{1,2}, ZHU Shi-ming^{1,2}, XIONG Xiao-qin^{1,2,3}, ZHANG Lei^{1,2}, ZHENG Ping^{1,2}, LIU Jie⁴

1. Department of Chemistry and Life Science, Hubei University of Education, Wuhan 430205, China

2. Hubei Key Laboratory of Purification and Application of Plant Anti-cancer Active Ingredients, Wuhan 430205, China

3. Research Center for Development and Utilization of Medicinal Plants in Eastern Hubei Province, Wuhan 430205, China

4. Wuhan HengHeDa Bio-Pharmaceutical Co., Ltd., Wuhan 430056, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from *Chrysanthemum vestitum* and their anti-tumor activities. **Methods** The chemical constituents from *C. vestitum* were isolated and purified by solvent extraction, Diaion HP-20, Sephadex LH-20, Silica gel and preparative high performance liquid chromatography. Their structures were elucidated based on their spectroscopic data. The antitumor activities of the isolated compounds were evaluated by using MTT assay. **Results** Three compounds were isolated from chloroform extract of *C. vestitum* and identified as (1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*)-2-oxo-8-acetoxy-guaia-3,11(13)-dien-12,6-olide (1), (1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*,11*S*)-2-oxo-8-acetoxy-guaia-3-en-12,6-olide (2) and 2 α -(2',4'-hexadiynoyl)-1,6-dioxaspiro [4,5]-deca-3-ene (3). **Conclusion** Compound 2 is a new guaianolide named as vestitlactone A which had no significant inhibitory effect on the HepG2 cell proliferation; compound 1 exhibited inhibitory activity against HepG2 cell line with IC₅₀ value of (5.95 $\pm$ 0.19) μ mol/L and compound 3 was isolated from this plant for the first time.

Key words: *Chrysanthemum vestitum* (Hemsley) Stapf; guaianolide; cytotoxic activity; (1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*)-2-oxo-8-acetoxy-guaia-3,11(13)-dien-12,6-olide; vestitlactone A

收稿日期: 2021-12-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81903115); 湖北省教育厅科学技术研究项目 (B2017202, B2019183); 湖北省大学生创新创业训练计划项目 (S202114099008); 湖北第二师范学院横向科研项目 (ESHX20210195); 湖北第二师范学院教学研究项目 (X2021003)

作者简介: 张洪权, 男, 硕士, 副教授, 从事中药活性成分研究。E-mail: orgzhq@163.com

*通信作者: 郑平, 男, 教授, 从事中药活性成分研究。E-mail: 727710500@qq.com

毛华菊 *Chrysanthemum vestitum* (Hemsley) Stapf 为菊科(Compositae)菊属 *Dendranthema* (DC.) Des Moul. 植物, 生长于河南、湖北、安徽等地海拔 340~1500 m 低山山坡及丘陵地^[1], 其花入药或代茶饮, 具有清热解毒的功效^[2]。毛华菊是参与菊花起源的重要近缘种^[3], 菊花作为我国传统的一味中药材, 具有散风清热、平肝明目、清热解毒的作用^[4], 其主要的药效成分为黄酮、挥发油和苯丙素类化合物等, 现代药理研究表明, 菊花具有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤和保护肝脏等功效^[5], 但是关于菊花起源的重要近缘种毛华菊的化学成分及药理活性特别是抗肿瘤活性鲜有文献报道。毛华菊甲醇提取物具有抑菌活性^[6], 水提物具有抗氧化活性^[7]。本课题组已经从毛华菊中分离得到了 6 个倍半萜内酯类化合物, 其中 4 个为新的愈创木内酯衍生物^[8]; 另外还分离得到了包括 2 个聚炔类化合物、3 个黄酮类化合物在内的 6 个已知化合物^[9]。为了进一步阐明毛华菊的化学成分, 寻找结构新颖的具有抗肿瘤活性的天然产物, 本课题组继续对采自湖北省大别山的毛华菊化学成分进行研究, 从其氯仿部位分离得到 3 个倍半萜内酯类化合物: (1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*)-8-乙酰氧基-愈创木-3,11(13)-二烯-2-酮-12,6-内酯 [(1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*)-2-*oxo*-8-acetoxyl-guaia-3,11(13)-dien-12,6-olide, **1**]、(1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*,11*S*)-8-乙酰氧基-愈创木-3-烯-2-酮-12,6-内酯 [(1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*,11*S*)-2-*oxo*-8-acetoxyl-guaia-3-en-12,6-olide, **2**]、2 α -(2',4'-hexadiynoyl)-1,6-dioxaspiro [4,5]-deca-3-ene (**3**)。其中化合物 **2** 为 1 个新的愈创木内酯, 命名为毛华菊内酯 A; 结构见图 1。活性筛选显示, 化合物 **1** 对人肝癌 HepG2 细胞增殖具有显著的抑制作用, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值为 (5.95 $\pm$ 0.19) μ mol/L。

1 仪器与材料

AV-400 MHz、AV-600 MHz 型超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Solarix 7.0T 型高分辨傅里叶

变换质谱仪 (德国 Bruker 公司); Nicolet iS50R 型傅里叶变换红外光谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); Autopol IV 旋光仪 (美国 Rudolph 公司); UV-5200PC 型紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); X-6 精密显微熔点测定仪 (北京亚力恩机电技术研究所); 2535 型制备型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 制备高效液相色谱柱 XBridge™ Prep C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 19 mm, 5 μ m, 美国 Waters 公司); Milli-Q Integral 5 型纯水仪 (德国 Merck Millipore 公司); R-210 型旋转蒸发仪 (瑞士 Büchi 公司); miVac Quattro 真空离心浓缩仪 (英国 GeneVac 公司)。氘代试剂: CDCl₃ (美国 CIL 公司); 色谱纯甲醇 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 色谱纯四氢呋喃 (上海星可高纯溶剂有限公司); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (瑞典 GE 公司); Diaion HP-20 型大孔吸附树脂 (日本三菱公司); 200~300 目硅胶 (青岛海洋化工厂); 氯仿和甲醇等均为国产分析纯试剂 (湖北欣申试化工科技有限公司)。

毛华菊于 2017 年 7 月采自于湖北省英山县李家寨 (N 31°1'5.29"; E 116°2'1.67"), 由湖北第二师范学院化学与生命科学学院戴月副教授鉴定为菊科菊属植物毛华菊 *C. vestitum* (Hemsley) Stapf, 原植物标本 (20170725) 现存于湖北第二师范学院化学与生命科学学院植物标本室。

2 提取与分离

毛华菊干燥全草 4.0 kg, 粉碎, 95%乙醇 (20 L) 室温下渗漉提取, 合并提取液, 减压浓缩得总浸膏约 1000 g, 加水混悬, 依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 得石油醚部位 85 g、氯仿部位 134 g、醋酸乙酯部位 82 g, 正丁醇部位 158 g。氯仿部位上 Diaion HP-20 大孔树脂柱, 依次用水及 20%、40%、60%、80%、90%、100% 甲醇-水体系洗脱, 将以上各洗脱液浓缩。Diaion HP-20 80% 甲醇洗脱部分 (25.33 g) 进行正相硅胶柱色谱, 用石油醚-醋酸乙酯 (体积比 100:0、10:1、5:1、3:1、2:1、1:1、1:3、0:1) 梯度洗脱, 薄层色谱 (TLC) 检测合并, 得到 21 个组分 (记作 Fr. 1~21)。将 Fr. 10 (1.004 g) 经葡聚糖凝胶 LH-20 柱, 用石油醚-二氯甲烷-甲醇 (4:5:1) 洗脱, 得到 2 个组分, Fr. a-1 和 Fr. a-2。Fr. a-1 (314.1 mg) 经制备高效液相 (甲醇-四氢呋喃-水 5:5:90, 体积流量 17.0 mL/min) 得到化合物 **1** (3.2 mg, *t_R*=76.0 min)、**2** (9.8 mg, *t_R*=60.0 min)。Diaion HP-20 100% 甲醇

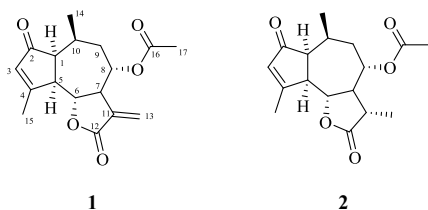


图 1 化合物 **1** 和 **2** 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds **1** and **2**

洗脱部分经 MCI 树脂柱色谱, 以水-乙醇体系梯度洗脱, 其中 80%乙醇洗脱流份经反复硅胶柱色谱和制备型高效液相 (prep HPLC) 等色谱技术分离纯化, 得到化合物 **3** (2.8 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色针状晶体 (正己烷-二氯甲烷), 易溶于氯仿, mp 170~172 °C。[α]_D²⁰ +446.33 (c 0.10, CHCl₃); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 242 (2.37), 308 (2.10)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 2922, 1764, 1748, 1693, 1616, 1228, 1153, 1031, 959; HR-ESI-MS 显示分子式为 C₁₇H₂₀O₅ (计算值 C₁₇H₂₀NaO₅ [M+Na]⁺ 327.120 29, 测量值为 327.120 17), 不饱和度为 8。¹³C-NMR 和 DEPT 谱显示, 该化合物结构中含有 17 个碳信号, 包括 3 个 CH₃、2 个 CH₂、7 个 CH 和 5 个 C (表 1)。IR 光谱中显示出 γ -内酯 (1764 cm⁻¹)、 α 、 β -不饱和羰基 (1693 cm⁻¹) 和双键 (1616 cm⁻¹) 的特征信号^[10]。¹H-NMR 谱中显示的 2 个二重峰信号 [δ_{H} 6.35 (1H, d, J = 3.4 Hz)] 和 [δ_{H} 5.84 (1H, d, J = 3.4 Hz)] 是 α -亚甲基- γ -倍半萜内酯环外亚甲基氢的特征吸收峰^[11]。¹H-NMR 谱还显示有 1 个二重峰甲基氢 [δ_{H} 0.95 (3H, d, J = 7.6 Hz)]、1 个乙烯基甲基氢 [δ_{H} 2.32 (3H,

brs)] 和 1 个烯氢 [δ_{H} 6.08 (1H, brs)] 信号。¹H-¹H COSY 谱中相关信号显示 [δ_{H} 2.77 (1H, dd, J = 7.2, 4.0 Hz, H-1), δ_{H} 3.16~3.20 (1H, m, H-5), δ_{H} 4.37 (1H, dd, J = 10.8, 9.2 Hz, H-6), δ_{H} 3.08~3.14 (1H, m, H-7), δ_{H} 5.14 (1H, td, J = 10.0, 4.4 Hz, H-8), δ_{H} 1.72 (1H, ddd, J = 14.0, 9.6, 2.4 Hz, H-9 α), δ_{H} 2.57~2.65 (1H, m, H-10), δ_{H} 0.95 (3H, d, J = 7.6 Hz, H-14)] 偶合体系 (图 2)。HMBC 图谱中显示下列远程相关信号: δ_{H} 6.35 (H-13) 和 δ_{C} 135.4 (C-11), 49.0 (C-7), 169.0 (C-12); δ_{H} 1.72 (H-9 α) 和 δ_{C} 16.7 (C-14), 71.7 (C-8); δ_{H} 2.27 (H-9 β) 和 δ_{C} 49.0 (C-7), 71.7 (C-8), 53.3 (C-1), 30.7 (C-10); δ_{H} 3.16~3.20 (H-5) 和 δ_{C} 78.3 (C-6), 178.3 (C-4)。这些相关信号表明化合物 **1** 为愈创木烷型的倍半萜骨架。 δ_{H} 6.08 (H-3) 和 δ_{C} 52.4 (C-5), 207.9 (C-2) 之间的远程相关信号表明该化合物为具有 3-烯-2-酮结构的愈创木内酯^[12]。化合物 **1** 的结构中有 1 个乙酰基片段 [δ_{H} 2.14 (s, 3H); δ_{C} 21.2, 169.6], 在 HMBC 谱中, δ_{H} 5.14 (H-8) 与乙酰基羰基碳 δ_{C} 169.6 (C-16) 有相关信号, 且 C-8 出现在低场区 (δ_{C} 71.7), 推测 C-8 与乙酰基通过氧原子相连成酯。这样, 化合物 **1** 的平面结构确定为 8-乙

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据 (400/100 MHz, CDCl₃)
Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectral data of compounds **1** and **2** (400/100 MHz, CDCl₃)

碳位	1		2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	2.77 (dd, J = 7.2, 4.0 Hz)	53.3 (CH)	2.74 (dd, J = 7.2, 4.0 Hz)	53.0 (CH)
2		207.9 (C)		208.3 (C)
3	6.08 (brs)	132.6 (CH)	6.07 (brs)	132.4 (CH)
4		178.3 (C)		178.8 (C)
5	3.16~3.20 (m)	52.4 (CH)	3.09~3.13 (m)	52.5 (CH)
6	4.37 (dd, J = 10.8, 9.2 Hz)	78.3 (CH)	4.41 (dd, J = 10.4, 10.0 Hz)	77.6 (CH)
7	3.08~3.14 (m)	49.0 (CH)	2.55~2.59 (m)	40.2 (CH)
8	5.14 (td, J = 10.0, 4.4 Hz)	71.7 (CH)	5.13 (td, J = 11.2, 4.4 Hz)	72.3 (CH)
9 α	1.72 (ddd, J = 14.0, 10.0, 2.4 Hz)	40.4 (CH ₂)	2.17~2.21 (m)	41.0 (CH ₂)
9 β	2.27 (ddd, J = 14.0, 6.0, 4.4 Hz)		1.71 (ddd, J = 13.6, 11.2, 2.8 Hz)	
10	2.57~2.65 (m)	30.7 (CH)	2.60~2.65 (m)	31.4 (CH)
11		135.4 (C)	2.13~2.18 (m)	54.7 (CH)
12		169.0 (C)		177.4 (C)
13	6.35 (d, J = 3.4 Hz), 5.84 (d, J = 3.4 Hz)	124.9 (CH ₂)	1.35 (d, J = 7.2 Hz)	16.0 (CH ₃)
14	0.95 (d, J = 7.6 Hz)	16.7 (CH ₃)	0.85 (d, J = 7.6 Hz)	15.9 (CH ₃)
15	2.32 (brs)	19.8 (CH ₃)	2.28 (brs)	19.4 (CH ₃)
16		169.6 (C)		169.9 (C)
17	2.14 (s)	21.2 (CH ₃)	2.10 (s)	21.1 (CH ₃)

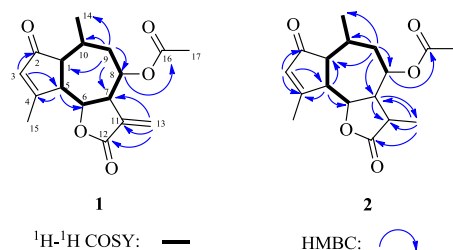


图 2 化合物 1 和 2 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关
Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compounds 1 and 2

酰氧基-愈创木-3,11(13)-二烯-2-酮-12,6-内酯。

化合物 1 的相对构型可以通过 NOESY 谱 (图 3) 进行确认。在化合物 1 的 NOESY 谱中, H_3 -14 与 H-6 和 H-8 有相关信号, H-7 与 H-5、H-5 和 H-1、H-1 和 H-10 有相关信号, 因此 H_3 -14 和 H-6、H-8 在同一侧, H-7、H-1、H-5 和 H-10 在另一侧。由于在天然愈创木内酯类化合物中, H-7 为 α 构型^[10,13-14], 因此 H-1、H-5 和 H-10 为 α 构型, H-6 和 H-8 为 β 构型。因此, 确认化合物 1 为 8 α -乙酰氧基-愈创木-3,11(13)-二烯-1 α ,5 α ,6 β ,7 α ,10 α 氢-2-酮-12,6 α -内酯, 化合物 1 的绝对构型是通过 X-ray 单晶衍射 (图 4) 来确定的, 最终, 化合物 1 鉴定为 (1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*)-8-乙酰氧基-愈创木-3,11(13)-二烯-2-酮-12,6-内酯。经 Scifinder 检索, 化合物 1 的结构有文献报道^[15-17], 但是查阅原始文献后发现: 文献报道的物质 montanone 结构为 11,15-dihydroxy-iphionan-4-one^[15-16], 与本实验的化合物 1 的结构完全不一样; 另外, 文献报道^[17]的化合物 montanone 其平面结构与本实验的化合物 1 的平面结构相同, 但是文献只报道了部分手性碳原子的相对构型^[17], 化合物 1 的氢谱全谱、碳谱以及绝对构型为本研究首次报道。

化合物 1 的 X-射线单晶衍射数据: 在正己烷-

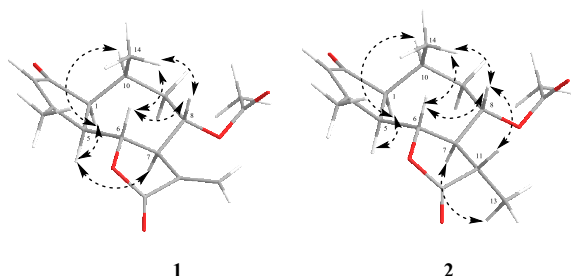


图 3 化合物 1 和 2 的关键 NOESY 相关
Fig. 3 Key NOESY correlations of compounds 1 and 2

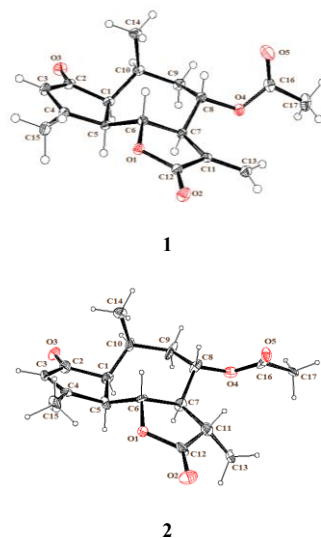


图 4 化合物 1 和 2 的晶体结构
Fig. 4 Crystal structures of compounds 1 and 2

二氯甲烷 (10:1) 中获得晶体, 从中选取一外形大小为 0.4 mm×0.14 mm×0.1 mm 的单晶用于 X-射线衍射实验, 在 XtaLAB AFC12 (RINC): Kappa single 衍射仪上采用 Cu K α 射线 ($\lambda=0.154\ 184\ \text{nm}$) 在 $3.709^\circ\leq\theta\leq73.510^\circ$ 进行扫描, 在 100.00 (10) K 下共收集到 15 615 个反射点, 其中 3006 个为独立可观察反射 [$I\geq2\sigma(I)$], $R_{\text{int}}=0.024\ 1$, $R_{\text{sigma}}=0.014\ 7$ 。化合物 1 属正交晶系, 空间群为 $\text{P}2_12_12_1$, 晶胞参数: $a=0.651\ 852\ (4)\ \text{nm}$, $b=0.971\ 526\ (5)\ \text{nm}$, $c=2.384\ 303\ (13)\ \text{nm}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$, $V=1.509\ 957\ (14)\ \text{nm}^3$; $Z=4$, $D_{\text{calcd}}=1.339\ \text{g/cm}^3$, $\mu\ (\text{Cu K}\alpha)=0.811\ \text{mm}^{-1}$, $F(000)=648.0$ 。晶体结构采用 Olex2^[18]软件, SHELXT 程序包^[19-20]解析, 用最小二乘法对结构参数进行校正, 最终的偏离因子为 $R_{\text{f}}=0.026\ 3$, $wR=0.068\ 2$, 其最大与最小的电子密度峰的高度分别为 190、 $-150\ \text{e nm}^{-3}$, flack 参数为 0.02 (4), Hoof 参数为 0.03 (3)。

化合物 2: 白色针状晶体 (正己烷-二氯甲烷), 易溶于氯仿, mp 217~219 $^\circ\text{C}$ 。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}+320.67\ (c\ 0.10, \text{CHCl}_3)$; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}\ (\text{nm})$: 239 (2.72), 301 (1.97)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}\ (\text{cm}^{-1})$: 2937, 1775, 1736, 1699, 1618, 1245, 1028, 1006, 962; HR-ESI-MS 显示分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (计算值 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NaO}_5\ [\text{M}+\text{Na}]^+329.135\ 94$, 测量值为 329.135 77), 不饱和度为 7。通过对比发现, 化合物 2 和 1 结构类似, 后者仅比前者少了 2 个氢原子, 不饱和度减少了 1; 化合物 2 比 1 多了 1 个甲基氢 [$\delta_{\text{H}}\ 1.35\ (\text{d}, J=7.2\ \text{Hz}, 3\text{H})$] 和 1 个次甲

基氢 [δ_{H} 2.13~2.18 (1H, m)] 信号, 少了 2 个烯氢信号 [δ_{H} 6.35 (d, $J=3.4$ Hz, 1H), 5.84 (d, $J=3.4$ Hz, 1H)], 这 2 个烯氢二重峰信号是 α -亚甲基- γ -倍半萜内酯环外亚甲基氢的特征吸收峰^[11]; 另外, 化合物 **2** 比化合物 **1** 多了 1 个甲基碳 (δ_{C} 16.0) 和 1 个次甲基碳 (δ_{C} 54.7) 信号, 少了 2 个烯碳 (δ_{C} 124.9, 135.4) 信号, 其中 1 个烯碳 (δ_{C} 135.4) 为季碳信号。通过以上分析, 推断化合物 **2** 为化合物 **1** 的 11、13 位碳氢化的代谢产物, HMBC 谱中(图 2)显示 H₃-13 同 C-7/C-11/C-12 相关可以进一步证实这个推断。这样, 化合物 **2** 的平面结构确定为 8-乙酰氧基-愈创木-3-烯-2-酮-12,6-内酯。化合物 **2** 的相对构型可以通过 NOESY 谱(图 3)进行确认。天然愈创木内酯类化合物中, H-7 为 α 构型^[10,13-14], 在 NOESY 谱中, H-7 和 H₃-13 有相关信号, H-11 和 H-8, H-8 和 H-6、H₃-14 有相关信号, 因此 H-11、H-8、H-6 和 H₃-14 在同一侧, 均为 β 构型; H-10 和 H-1, H-1 和 H-5 有相关信号, 因此 H-10、H-1 和 H-5 在同一侧, 均为 α -构型。因此, 化合物 **2** 确认为 8 α -乙酰氧基-愈创木-3-烯-1 α ,5 α ,6 β ,7 α ,8 β ,10 α ,11 β 氢-2-酮-12,6 α -内酯。化合物 **2** 的绝对构型是通过 X-ray 单晶衍射(图 4)来确定的, 最终, 化合物 **2** 鉴定为 (1*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,10*S*,11*S*)-8-乙酰氧基-愈创木-3-烯-2-酮-12,6-内酯, 经 Scifinder 检索, 为 1 个新的愈创木型倍半萜内酯类化合物, 命名为毛华菊内酯 A。NMR 数据见表 1。

化合物 **2** 的 X 射线单晶衍射数据: 在正己烷-二氯甲烷 (10:1) 中获得晶体, 从中选取一外形大小为 0.4 mm×0.18 mm×0.14 mm 的单晶用于 X-射线衍射实验, 在 XtaLAB AFC12 (RINC): Kappa single 衍射仪上采用 Cu K α 射线 ($\lambda=0.154$ 184 nm) 在 $6.51^{\circ}\leq 2\theta\leq 147.98^{\circ}$ 进行扫描, 在 100.00 (10) K 下共收集到 57 937 个反射点, 其中 9411 个为独立可观察反射 [$I\geq 2\sigma(I)$], $R_{\text{int}}=0.045$ 3, $R_{\text{sigma}}=0.020$ 8。化合物 **1** 属单斜晶系, 空间群为 P2₁, 晶胞参数: $a=1.364$ 468 (7) nm, $b=0.711$ 407 (4) nm, $c=2.471$ 512 (13) nm, $\alpha=90^{\circ}$, $\beta=95.708$ 4 (5) $^{\circ}$, $\gamma=90^{\circ}$, $V=2.387$ 18 (2) nm³; $Z=2$, $D_{\text{calcd}}=1.279$ g/cm³, μ (Cu K α)=0.770 mm⁻¹, $F(000)=984.0$ 。晶体结构采用 Olex2^[18]软件, SHELXT 程序包^[19-20]解析, 用最小二乘法对结构参数进行校正, 最终的偏离因子为 $R_{\text{f}}=0.034$ 4, $wR=0.079$ 8, 其最大与最小的电子密度峰的高度分别为 200, -150 e nm⁻³, flack 参数为

-0.01 (6), Hooft 参数为 0.03 (3)。

化合物 **3**: 白色粉末, ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.20 (2H, dd, $J=19.2$, 5.4 Hz, H-6, 7), 4.61 (1H, brs, H-8), 4.12 (1H, ddd, $J=11.9$, 11.9, 2.9 Hz, H-1a), 3.84 (1H, dd, $J=11.4$, 4.2 Hz, H-1b), 2.01 (3H, s, H-14), 1.79~1.82 (2H, m, H-4), 1.65~1.73 (4H, m, H-2, 3); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 64.3 (C-1), 24.4 (C-2), 19.1 (C-3), 32.5 (C-4), 112.9 (C-5), 137.9 (C-6), 126.7 (C-7), 78.6 (C-8), 168.0 (C-9), 80.5 (C-10), 65.1 (C-11), 78.7 (C-12), 70.8 (C-13), 4.8 (C-14)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **3** 为 2 α -(2',4'-hexadiynoyl)-1,6-dioxaspiro [4,5]-deca-3-ene。

4 生物活性测试

采用 MTT 法^[22-23]测试化合物 **1** 和 **2** 对 HepG2 细胞增殖的影响, 并以顺铂作为阳性对照。结果显示, 化合物 **1** 对 HepG2 细胞增殖具有显著的抑制作用, IC₅₀ 值为 (5.95±0.19) μ mol/L, 阳性对照顺铂 IC₅₀ 值为 (6.31±0.33) μ mol/L; 化合物 **2** 对抑制 HepG2 细胞的增殖没有明显作用。

5 讨论

本研究采用多种色谱分离技术及天然产物结构鉴定方法, 从毛华菊中分离得到 3 个愈创木烷型倍半萜内酯, 化合物 **2** 为新化合物, 命名为毛华菊内酯 A; 化合物 **1** 对于 HepG2 细胞株具有较强的体外抑制作用。关于 12,6-愈创木内酯衍生物对于肝癌细胞株的细胞毒活性鲜有文献报道^[24], 本实验结果丰富了 12,6-愈创木内酯衍生物的活性研究, 并且为进一步开发利用毛华菊提供了基础理论依据。

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委员会. 中国植物志 (第五十二卷第二分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 30.
- [2] 訾兴中, 张定成. 大别山植物志 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 1110.
- [3] 戴思兰, 王文奎, 黄家平. 菊属系统学及菊花起源的研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(S1): 234-238.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 323.
- [5] 周衡朴, 任敏霞, 管家齐, 等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4785-4795.
- [6] 黄桂荣, 杜晓英, 徐大高, 等. 三峡地区 20 种植物甲醇提取物的抗真菌活性 [J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(3): 37-41.

- [7] Liu Q J, Liu H F, Yuan Z L, *et al.* Evaluation of antioxidant activity of chrysanthemum extracts and tea beverages by gold nanoparticles-based assay [J]. *Colloid Surface B*, 2012, 92: 348-352.
- [8] 刘文琪, 余嘉祎, 杨英, 等. 毛华菊中倍半萜内酯类化学成分研究 [J]. 有机化学, 2021, 41(7): 2898-2904.
- [9] 刘文琪, 刘雨琪, 江婉秋, 等. 毛华菊氯仿部位的化学成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 化学研究与应用, 2021, 33(10): 2003-2007.
- [10] Hou C C, Lin S J, Cheng J T, *et al.* Antidiabetic dimeric guaianolides and a lignan glycoside from *Lactuca indica* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(5): 625-629.
- [11] Adegawa S, Miyase T, Ueno A, *et al.* Sesquiterpene glycosides from *Crepidiastrum keiskeanum* Nakai [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11): 4906-4911.
- [12] Tan R X, Jakupovic J, Bohlmann F, *et al.* Sesquiterpene lactones and other constituents from *Artemisia xerophytica* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(2): 583-587.
- [13] Hao X C, Zhang J W, Zhan G Q, *et al.* Chemical constituents from *Teucrium viscidum* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 51: 78-82.
- [14] Nishimura K, Miyase T, Ueno A, *et al.* Sesquiterpene lactones from *Lactuca laciniata* [J]. *Phytochemistry*, 1986, 25(10): 2375-2379.
- [15] El-Bassuony A A, Kabbash A M. Montanone, a new sesquiterpene from *Jasonia montana* [J]. *Saudi Pharm J*, 2006, 14(2): 126-128.
- [16] El-Bassuony A A. Montanone, a new sesquiterpene from *Jasonia Montana* [J]. *Rev Latinoamer Quim*, 2005, 33(3): 109-114.
- [17] El-Seedi H R. Sesquiterpenes and triterpenes from *Sonchus oleraceus* (Asteraceae) [J]. *ACGC Chem Res Commun*, 2003, 16: 14-18.
- [18] Dolomanov O V, Bourhis L J, Gildea R J, *et al.* OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program [J]. *J Appl Crystallogr*, 2009, 42(2): 339-341.
- [19] Sheldrick G M. SHELXT - integrated space-group and crystal-structure determination [J]. *Acta Crystallogr A Found Adv*, 2015, 71(Pt 1): 3-8.
- [20] Sheldrick G M. Crystal structure refinement with shelxl [J]. *Acta Crystallogr C Struct Chem*, 2015, 71(Pt 1): 3-8.
- [21] 夏少立, 曹悦, 李庆林, 等. 新疆一枝蒿的化学成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51(13): 3393-3398.
- [22] 梁旭, 杨新洲, 吴超群, 等. 紫茎泽兰中一个新的杜松烷型倍半萜 [J]. 药学学报, 2020, 55(12): 2955-2959.
- [23] 张洪权, 杨英, 余嘉祎, 等. 两种香青属植物挥发油的化学成分及抗肿瘤活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(12): 2087-2092.
- [24] Ma G H, Chen K X, Zhang L Q, *et al.* Advance in biological activities of natural guaiane-type sesquiterpenes [J]. *Med Chem Res*, 2019, 28(9): 1339-1358.

[责任编辑 王文倩]