

## 角果木中两个新的 Dolabrane 型二萜类化合物

张晓慧, 申 丽\*, 吴 军\*

暨南大学药学院海洋药物研究中心, 广州 510632

**摘要:**对海南红树植物角果木(*Ceriops tagal*)的正己烷层萃取物进行了化学成分研究。借助正、反相硅胶柱层析以及 HPLC 等手段进行分离制备,得到了两个化合物 **1** 和 **2**。通过波谱数据解析(HR-ESI-MS、1D NMR、2D NMR)确定了均为新的 dolabrane 型二萜,分别命名为角果木二萜 D 和角果木二萜 E。

**关键词:**红树植物;角果木;dolabrane 型二萜;角果木二萜 D;角果木二萜 E

中图分类号:R93

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.4.002

Two New Dolabrane-Type Diterpenes from *Ceriops tagal*

ZHANG Xiao-hui, SHEN Li\*, WU Jun\*

Marine Drugs Research Center, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract:** Chemical constituents of the *n*-hexane extract of the Hainan mangrove, *Ceriops tagal*, were investigated. Compounds **1** and **2** were isolated and purified by silica gel, RP C<sub>18</sub> column chromatography and preparative HPLC. Based on the spectroscopic data(HR-ESI-MS, 1D NMR, 2D NMR), these compounds were identified as two new dolabranes, and named as tagalditerpenes D and E.

**Key words:** mangrove; *Ceriops tagal*; dolabrane; tagalditerpene D; tagalditerpene E

角果木属植物(*Ceriops*)为红树科真红树植物,广泛分布在非洲沿海、南亚及南太平洋诸岛<sup>[1-3]</sup>。该属植物在我国仅有角果木(*C. tagal*)一个种,主要分布于海南岛<sup>[4]</sup>。该属植物富含鞣质和萜类化合物,其中萜类是其主要的次生代谢产物<sup>[5,6]</sup>。近年来,角果木的化学成分及生物活性研究得到国内外学者的重视。研究表明角果木中的 dolabrane 型二萜类化合物具有显著的抗肿瘤活性<sup>[7,8]</sup>,例如,化合物 tagalsin C 对多种人体癌的耐药细胞系(A549/T、KB/VCR、K562/Adr、MCF/Adr、HCT-8/V 及 PATU-8988/FU)均有很好的抑制作用(RF 值 0.5 ~ 1.51)。这些化合物可以为研发具有新作用机理或新靶点的抗肿瘤药物提供药物先导结构<sup>[7]</sup>。为探索结构新颖的 dolabrane 型二萜类化合物,本文对采自海南岛角果木的地上部分进行了化学成分研究,从其正己烷萃取物中分离鉴定了两个新颖的 dolabrane 型二萜化合物(**1**~**2**,结构见图 1)。

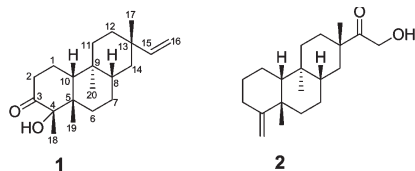


图 1 化合物 1 和 2 的化学结构

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

## 1 仪器与材料

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司) Waters 2695Q、2535Q 型泵和 2998 二极管阵列检测器。AVANCE III 400 型核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司),6210 型 ESI-TOF 高分辨质谱仪(美国 Agilent 公司),正相硅胶(青岛海洋化工厂),C<sub>18</sub>反相硅胶(日本 YMC 公司),YMC C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm × 10 mm, 5 μm),色谱纯乙腈、甲醇(德国 Merck 公司),分析纯丙酮、甲醇、正己烷、乙酸乙酯等溶剂均重蒸。

本文的实验材料为 2011 年 11 月采自中国海南岛角果木 *Ceriops tagal* (Perr.) C. B. Robinson 的地上部分。由暨南大学海洋药物研究中心吴军教授鉴定。标本(CT-03)保存于暨南大学药学院海洋药物

收稿日期:2016-11-24 接受日期:2017-03-02

基金项目:国家自然科学基金(U1501221,81302693);珠江科技新星(201506010023)

\* 通讯作者 Tel:86-20-85222377; E-mail:wwujun68@163.com

研究中心。

## 2 提取与分离

干燥的角果木地上部分(60.0 kg)粉碎后,用95%乙醇室温下提取5次(40 L/次),得到粗提物(3.5 kg)。将粗提物用水混悬,加入正己烷萃取5次(25 L/次),得到正己烷萃取物78.6 g。萃取物经正相硅胶(100~200目)柱色谱分离,正己烷-乙酸乙酯(100:0→1:3)梯度洗脱,共得到320个流份。TLC和HPLC分析后,合并第80~143流份(15.2 g)。并经反相硅胶柱色谱分离,丙酮-水(55:45→100:0)梯度洗脱,得到100个流份。其中,流份35和36进行多次HPLC制备,分别得到化合物**1**(2.0 mg)和**2**(9.0 mg)。

## 3 结构鉴定

化合物**1** 白色无定形粉末;  $[\alpha]_D^{25}$ -6.84 (c 0.1, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>); UV (MeOH)<sub>λmax</sub> (log ε) 203 (3.06) nm。由高分辨质谱(HR-ESI-MS)给出的准分子离子峰  $m/z$  327.2301 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>Na, 327.2295)。结合<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C NMR谱确定该化合物的分子式为C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, 不饱和度为5。根据<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR(表1)可知其中2个不饱和度

分别来自一个酮羰基和一个末端双键[ $\delta_H$  5.80 (dd,  $J = 17.5, 10.8$  Hz, H-15), 4.91 (d,  $J = 17.5$  Hz, H<sub>a</sub>-16), 4.85, (d,  $J = 10.8$  Hz, H<sub>b</sub>-16);  $\delta_C$  108.8, 151.2], 因此化合物含有3个环系。由<sup>13</sup>C NMR和DEPT135谱可知化合物**1**含有4个甲基、8个亚甲基、3个次甲基和5个季碳。核磁共振波谱数据对照发现,该化合物的氢、碳数据与dolabrane型二萜tagalsin E<sup>[9]</sup>相似。主要区别在于化合物**1**中缺少了C4=C18的双键( $\delta_H$  5.92 brs, 5.24 brs;  $\delta_C$  152.5 qC, 116.5 CH<sub>2</sub>), 而多了一个甲基( $\delta_H$  2.22;  $\delta_C$  28.2)和一个连氧的季碳信号( $\delta_C$  90.4)。结合HMBC谱,该甲基信号与C-3位的羰基( $\delta_C$  212.5)、19位甲基( $\delta_C$  23.4)以及季碳信号( $\delta_C$  90.4)均有强烈的相关。由此可知该甲基为18-CH<sub>3</sub>, 且季碳( $\delta_C$  90.4)为羟基取代的C-4。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY和其它HMBC(图2)相关证实了以上的推测。化合物**1**的相对构型通过NOE谱(图2)确定。由H<sub>3</sub>-19/H-10, H-10/H-11 $\beta$ , H-11 $\beta$ /H<sub>3</sub>-17, H<sub>3</sub>-17/H-8, 以及H<sub>3</sub>-18/H<sub>3</sub>-19之间的NOE相关信号可以确定H<sub>3</sub>-18, H<sub>3</sub>-19, H-10, H-8和H<sub>3</sub>-17为 $\beta$ 构型; 而H<sub>3</sub>-20/H-6 $\alpha$ 之间的NOE相关表明H<sub>3</sub>-20为 $\alpha$ 构型。由以上数据判断化合物**1**的结构如图1所示。经SciFinder检索为新化合物,命名为角果木二萜D。

表1 化合物**1**和**2**的<sup>1</sup>H NMR(400 MHz)和<sup>13</sup>C NMR(100 MHz)波谱数据(CDCl<sub>3</sub>)

Table 1 <sup>1</sup>H NMR(400MHz) and <sup>13</sup>C NMR(100 MHz) data for compounds **1** and **2** in CDCl<sub>3</sub>

Position	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
1 $\alpha$	1.71 m <sup>a</sup>	24.5, CH <sub>2</sub>	1.83 m(2H)	
1 $\beta$	1.97 m		20.7, CH <sub>2</sub>	
2 $\alpha$	2.20 m	35.6, CH <sub>2</sub>	1.73 m <sup>a</sup>	
2 $\beta$	1.70 m <sup>a</sup>		1.58 m	
3 $\alpha$		212.5, C	2.16 m	
3 $\beta$			2.48 m	
4		90.4, C		153.8, C
5		49.9, C		40.0, C
6 $\alpha$	1.61 m <sup>a</sup>	28.0, CH <sub>2</sub>	1.30 m	
6 $\beta$	0.98 m		2.21 m	
7 $\alpha$		24.4, CH <sub>2</sub>	1.46 m	
7 $\beta$	1.59 m <sup>a</sup> (2H)		1.06 m <sup>a</sup>	
8	1.56 m <sup>a</sup>	31.9, CH	1.32 m	
9		35.7, C		38.41, C
10	1.54 m	56.9, CH	1.17 m <sup>a</sup>	
11 $\alpha$	1.47 m <sup>a</sup>	38.6, CH <sub>2</sub>	1.74 m <sup>a</sup>	
11 $\beta$	1.20 m		1.07 m <sup>a</sup>	
12 $\alpha$	1.47 m <sup>a</sup>	32.1, CH <sub>2</sub>	1.75 m <sup>a</sup>	
12 $\beta$	1.18 m <sup>a</sup>		1.37 m	

Position	1		2	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
13		36.5, C		45.7, C
14 $\alpha$	1.16 m <sup>a</sup>	40.1, CH <sub>2</sub>	1.62 m	35.2, CH <sub>2</sub>
14 $\beta$	1.16 m <sup>a</sup>		1.17 m <sup>a</sup>	
15	5.80, dd(17.5 Hz, 10.8 Hz)	151.2, CH		215.7, C
16	4.91 d(17.5 Hz); 4.85 d(10.8 Hz)	108.8, CH <sub>2</sub>	4.37 s(2H)	64.0, CH <sub>2</sub>
17	1.00 s	22.4, CH <sub>3</sub>	1.20 s	20.5, CH <sub>3</sub>
18	2.22 s	28.2, CH <sub>3</sub>	4.73 m(2H)	106.0, CH <sub>2</sub>
19	1.14 s	23.4, CH <sub>3</sub>	1.14 s	32.9, CH <sub>3</sub>
20	0.84 s	13.1, CH <sub>3</sub>	0.88 s	15.7, CH <sub>3</sub>
4 $\alpha$ -OH	3.01 br s			

注:<sup>a</sup> 重叠氢信号由 HSQC 和 HMBC 最终确定。

Note: <sup>a</sup> overlapped signals assigned by HSQC and HMBC spectra without designating multiplicity.

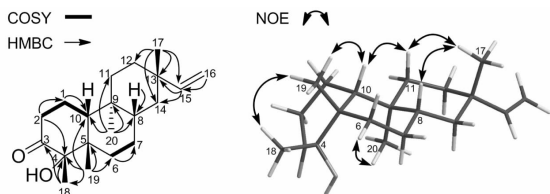


图2 化合物1的主要 HMBC、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、NOE 相关

Fig. 2 Key HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and NOE correlations of compound 1

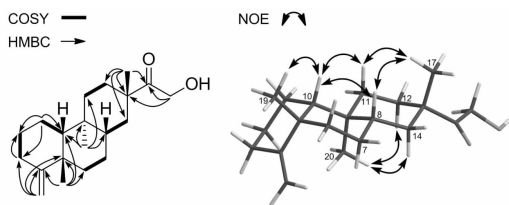


图3 化合物2的主要 HMBC、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、NOE 相关

Fig. 3 Key HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and NOE correlations of compound 2

化合物 2 透明油状物; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> +1.26 (c 0.3, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>); UV (MeCN)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (3.72) nm。由高分辨质谱 (HR-ESI-MS) 给出的准分子离子峰  $m/z$  327. 2296 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>Na, 327. 2295), 结合<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C NMR 波谱数据确定化合物的分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>、不饱和度为 5。由<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C NMR 波谱数据可知其中 2 个不饱和度分别来自一个酮羰基 ( $\delta_{\text{C}}$  215.7 qC) 和一个双键 [ $\delta_{\text{H}}$  4.73 (m, 2H);  $\delta_{\text{C}}$  153.8 qC, 106.0 CH<sub>2</sub>], 因此该化合物含有 3 个环系。由<sup>13</sup>C NMR 和 DEPT 135 谱可知化合物 2 含有 3 个甲基、10 个亚甲基 (包括 1 个末端

双键碳, 1 个与氧相连的碳  $\delta_{\text{C}}$  64.0)、2 个次甲基、5 个季碳 (包括 1 个羰基碳和 1 个双键碳)。该化合物的核磁波谱数据与从该植物中分离得到的 dolabrane 二萜 *ent*-5 $\alpha$ -dolabr-4 (18)-ene-15S, 16-diol<sup>[10,11]</sup> 很相似; 不同之处在于化合物 2 中缺少 C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  81.4) 连氧次甲基信号, 而多了一个酮羰基碳 ( $\delta_{\text{C}}$  215.7) 信号。由 HMBC 谱中 H<sub>3</sub>-17 ( $\delta_{\text{H}}$  1.20, s) 和 H<sub>2</sub>-16 ( $\delta_{\text{H}}$  4.37, s) 与该羰基碳信号的强烈相关可知该酮羰基为 C-15。因此该化合物的平面结构为 C-15 是羰基的 *ent*-5 $\alpha$ -dolabr-4 (18)-ene-15S, 16-diol 类似物。化合物 2 的相对构型通过 NOE 谱 (图 3) 确定。H<sub>3</sub>-17/H-8, H-8/H-10, H-10/H<sub>3</sub>-19, H-10/H-11 $\beta$  之间的 NOE 相关信号表明 H-8, H-10, H<sub>3</sub>-19 和 H<sub>3</sub>-17 为  $\beta$  构型; 而 H<sub>3</sub>-20/H-12 $\alpha$ , H<sub>3</sub>-20/H-14 $\alpha$  之间的 NOE 相关信号表明它们均为  $\alpha$  构型。由以上数据确定了该化合物 2 的结构如图 1 所示。经 SciFinder 为新化合物, 命名为角果木二萜 E。

## 4 抗肿瘤活性

化合物 2 针对六种人癌细胞株 (乳腺癌 MD-MBA-231、黑色素瘤 A375、肺癌 A549、卵巢癌 A2780、结肠直肠癌 HCT-8 与 HCT-8/T) 采用 MTT 法进行了细胞毒性试验。所有的细胞均在 DMEM 培养基中置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中呈单层贴壁生长, 培养基中加入了 10% 的胎牛血清, 苜青霉素 (50 kU/L) 和链霉素 (50 mg/L)。待培养至适宜浓度, 加入适量胰蛋白酶消化并使细胞悬浮至细胞悬液的最终浓度为 5 × 10<sup>4</sup>/mL。各取细胞悬液 100  $\mu$ L 均匀地加入 96 孔板中 (每孔中的细胞数为 5

$\times 10^3$ )。用不同浓度的化合物 **2** 处理指定的孔, 72 h 后, 向每个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  的 MTT 溶液 (5 mg/mL), 进一步孵育 4 h, 待活细胞将黄色的 MTT 还原成深蓝色的甲瓚晶体, 再将甲瓚晶体溶于 100  $\mu\text{L}$  的 DMSO 中。使用酶标仪在 490 nm 测定每个孔中的吸光度值。用 Bliss 法的细胞毒性曲线计算抑制 50% 细胞生长所需的浓度 ( $\text{IC}_{50}$  值)。顺铂用作阳性对照药, 对 MD-MBA-231、A375、A549、A2780、HCT-8 与 HCT-8/T 的增殖的抑制  $\text{IC}_{50}$  值分别为 6.25、18.12、12.13、8.54、15.43、21.98  $\mu\text{M}$ 。

抗肿瘤活性筛选结果表明化合物 **2** 对乳腺癌 MD-MBA-231、结肠直肠癌 HCT-8 与 HCT-8/T 的细胞增殖有较弱的抑制作用;  $\text{IC}_{50}$  值分别为 91.3、88.4 和 59.6  $\mu\text{M}$ 。而在 100  $\mu\text{M}$  浓度下, 化合物 **2** 对黑色素瘤 A375、人卵巢癌 A2780、肺癌 A549 的细胞增殖无明显抑制作用。

#### 参考文献

- 1 Sheue CR, Liu HY, Tsai CC, *et al.* Comparison of *Ceriops pseudodecandra* sp. nov. (Rhizophoraceae), a new mangrove species in Australasia, with related species. *Bot Stud*, 2010, 51:237-248.
- 2 Tsai CC, Li SJ, Su YY, *et al.* Molecular phylogeny and evidence for natural hybridization and historical introgression between *Ceriops* species (Rhizophoraceae). *Biochem Syst Ecol*, 2012, 43:178-191.
- 3 Wang H, Li MY, Wu J. Chemical constituents and some bio-

logical activities of plants from the genus *Ceriops*. *Chem Biodivers*, 2012, 9(1):1-11.

- 4 Lin P(林萍), Fu Q(付勤). Environmental Ecology and Economic Utilization of Mangroves in China (中国红树林环境生态及经济利用). Beijing: Higher Education Press, 1995. 1-95.
- 5 Wu J, Xiao Q, Xu J, *et al.* Natural products from ture mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. *Nat Prod Rep*, 2008, 25:955-981.
- 6 Nebula M, Harisankar HS, Chandramohanakumar N. Metabolites and bioactivities of Rhizophoraceae mangroves. *Nat Prod Bioprospect*, 2013, 3:207-232.
- 7 Yang Y, Zhang Y, Liu D, *et al.* Dolabrane-type diterpenes from the mangrove plant *Ceriops tagal* with antitumor activities. *Fitoterapia*, 2015, 103:277-282.
- 8 Neumann J, Yang Y, Kohler R, *et al.* Mangrove dolabrane-type of diterpenes tagalsins suppresses tumor growth via ROS-mediated apoptosis and ATM/ATR-Chk1/Chk2-regulated cell cycle arrest. *Int J Cancer*, 2015, 137:2739-2748.
- 9 Zhang Y, Deng ZW, Gao TX, *et al.* Tagalsin A-H, dolabrane-type diterpenes from the mangrove plant, *Ceriops tagal*. *Phytochemistry*, 2005, 66:1465-1471.
- 10 Ansell SM, Pegel KH, Taylor DAH. Diterpenes from the timber of *Erythroxylum pictum*. *Phytochemistry*, 1993, 32:945-952.
- 11 Zhang Y(张炎), Deng ZW(邓志威), Gao TX(高天翔), *et al.* Chemical constituents from the mangrove plant *Ceriops tagal*. *Acta Pharm Sin(药学学报)*, 2005, 40:935-939.

(上接第 647 页)

- 14 Flavin R, Peluso S, Loda M, *et al.* Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*, 2010, 6:551-562.
- 15 Tian WX, Hsu RY, Wang YS. Studies on the reactivity of the essential sulfhydryl groups as a conformational probe for the fatty acid synthetase of chicken liver. *Biol Chem*, 1985, 260:11375-11387.
- 16 Mao SC(毛水春), Gu QQ(顾谦群), Cui ChB(崔承彬), *et al.* Phenolic compounds from *Sargentodoxacuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils. and their antitumor activities. *Chin J Med Chem(中国药物化学杂志)*, 2004, 14:326-330.
- 17 Dong WX(董文雪), Shu YZ(舒永志), Liu Y(刘意), *et al.* Research progress on chemical constituents in plants of *KadsuraKaempf. Ex Juss.* And their pharmacological activi-

ties. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2014, 45:1938-1957.

- 18 Cheng DM(程东美), Hu MY(胡美英). Research advances in the research on *Rhododendron Molle G. DON*. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 1999, 11:109-113.
- 19 SiTu ZQ(司徒镇强), Wu JZ(吴军正). Cell Culture(细胞培养). Xian: Xian World Publishing Corporation, 2003. 135-155.
- 20 RyuSY, Lee CO, Choi SU. *In vitro* cytotoxicity of tanahinones from *Salviamiltiorrhiza*. *Planta Med*, 1997, 63:339-344.
- 21 Shioh YW. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappa Band cell transformation by extracts of strawberries (*FragariaananassaDuch*). *J Agric Food Chem*, 2005, 53:4187-4193.