

三花枪刀药中萜类和甾体成分研究

邓振涛^{1,2}, 冯维扬², 丁林芬², 苏佳¹, 宋流东^{2*}, 吴兴德^{1*}¹中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204;²昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500

摘要: 采用正相硅胶和 Sephadex LH-20 等柱层析及半制备 HPLC 色谱法, 从三花枪刀药的 95% 乙醇提取物中分离到 15 个化合物, 运用现代波谱技术分别鉴定为 6-羟基-9,13 环大柱烷-4,9 (13)-二烯-3-酮(1)、3 β -羟基- β -紫罗酮(2)、3 α -羟基-大柱烷-4,7E 二烯-9-酮(3)、3 α -羟基-5 α ,6 α -环氧-7E-大柱烷-7-烯-9-酮(4)、黑麦草内酯(5)、pisiferadinol(6)、24-methylenecycloartanol(7)、 α -香树脂醇(8)、3 β -羟基-乌苏烷-11-烯-28,13 β -内酯(9)、羽扇豆醇(10)、achilleol A(11)、6 β -甲氧基麦角甾烷-7,22E-二烯-3 β ,5 α -二醇(12)、6 β -乙氧基麦角甾烷-7,22E-二烯-3 β ,5 α -二醇(13)、豆甾烷-4-烯-3,6-二酮(14)、豆甾烷-4,22E-二烯-3,6-二酮(15)。化合物 1 为新天然产物, 化合物 2~15 为首次从该植物中分离得到。化合物 6、12、15 对人乳腺癌 MDA-MB-468、人胃癌 AGS、人结肠癌 HCT116、人宫颈瘤 Hela 和人乳腺癌 MDA-MB-231 肿瘤细胞株具有显著的细胞毒活性。

关键词: 三花枪刀药; 化学成分; 萜类; 甾体; 细胞毒活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.8.009

Terpenoids and Steroids from *Hypoestes triflora*DENG Zhen-tao^{1,2}, FENG Wei-yang², DING Lin-fen², SU Jia¹, SONG Liu-dong^{2*}, WU Xing-de^{1*}¹State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Kunming 650204, China; ²School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Abstract: In this study, 15 compounds were isolated and purified from the 95% EtOH extract from *Hypoestes triflora* by column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 and HPLC. Their structures were elucidated as 6-hydroxy-9,13-cyclomegastigma-4,9 (13)-dien-3-one (1), 3 β -hydroxy- β -ionone (2), 3 α -hydroxy-megastigma-4,7E-dien-9-one (3), 5 α ,6 α -epoxy-3 α -hydroxy-megastigma-7E-en-9-one (4), lolilide (5), pisiferadinol (6), 24-methylenecycloartanol (7), α -amyrin (8), 3 β -hydroxyurs-11-en-28,13 β -olide (9), lupeol (10), achilleol A (11), 6 β -methoxyergosta-7,22E-dien-3 β ,5 α -diol (12), 6 β -ethoxyergosta-7,22E-dien-3 β ,5 α -diol (13), stigmast-4-en-3,6-dione (14), stigmast-4,22E-dien-3,6-dione (15), by modern spectroscopic methods. Compound 1 was isolated from nature resources for the first time, and compounds 2-15 were obtained from *H. triflora* for the first time. Compounds 6, 12, 15 showed significant cytotoxic activities against MDA-MB-468, AGS, HCT116, Hela, and MDA-MB-231 cells.

Key words: *Hypoestes triflora*; chemical constituent; terpenoid; steroid; cytotoxic activity

三花枪刀药 [*Hypoestes triflora* (Forssk.) Roem. et Schult.] 为爵床科 (Acanthaceae) 枪刀药属 (*Hypoestes*) 植物, 多年生草本, 主产我国云南的昆明、嵩明、蒙自及勐海等地, 在尼泊尔和不丹等国家也有分布^[1]。《中华本草》记载三花枪刀药的全草具有清热解毒、止咳化痰、止血生肌的功效, 此外该植物的

根具有祛风湿、强腰膝、活血消肿的功能^[2]。目前对该植物的化学成分研究较少, 从中仅报道苯甲酸、尿囊素及甾醇类等少数几个化合物^[3]。文献报道尿囊素具有促进伤口、皮肤溃疡面愈合的作用, 为该植物的传统应用提供了重要的化学物质基础^[4]。为进一步阐明三花枪刀药药用的物质基础, 本研究对三花枪刀药的 95% 乙醇提取物中化学成分进行系统研究, 分离鉴定了 15 个化合物, 包括 5 个倍半萜: 6-羟基-9,13 环大柱烷-4,9 (13)-二烯-3-酮(1)^[5]、3 β -羟基- β -紫罗酮(2)^[6]、3 α -羟基-大柱烷-4,7E-二烯-9-酮(3)^[7]、3 α -羟基-5 α ,6 α -环氧-7E-大

投稿日期: 2017-04-17 接受日期: 2017-06-08

基金项目: 国家自然科学基金(21402212); 云南省应用基础研究计划(2015FB173)

* 通信作者 Tel: 86-871-65223013; E-mail: wuxingde@mail.kib.ac.cn; ynsld@126.com

柱烷-7-烯-9-酮(4)^[8]、黑麦草内酯(5)^[9]; 1个二萜: pisiferadinol(6)^[10]; 5个三萜: 24-methylenecycloartanol(7)^[11]、 α -香树脂醇(8)^[12]、 3β -羟基-乌苏烷-11-烯-28,13 β -内酯(9)^[13]、羽扇豆醇(10)^[14]、achilleol A(11)^[15]; 4个甾体: 6β -甲氧基麦角甾烷-7,22E-二烯-3 β ,5 α -二醇(12)^[16]、 6β -乙氧基麦角甾烷-7,22E-二烯-3 β ,5 α -二醇(13)^[17]、豆甾烷-4-烯-3,6-二酮(14)^[18]、豆甾烷-4,22E-二烯-3,6-二酮

(15)^[19]。化合物1为新天然产物, 化合物2~15为首次从该植物中分离得到。采用MTT测试了所有分离得到化合物对人乳腺癌(MDA-MB-468), 人胃癌(AGS), 人结肠癌(HCT116), 人宫颈癌(Hela)和人乳腺癌(MDA-MB-231)肿瘤细胞株体外细胞毒活性, 结果显示化合物6、12、15具有显著的细胞毒活性。

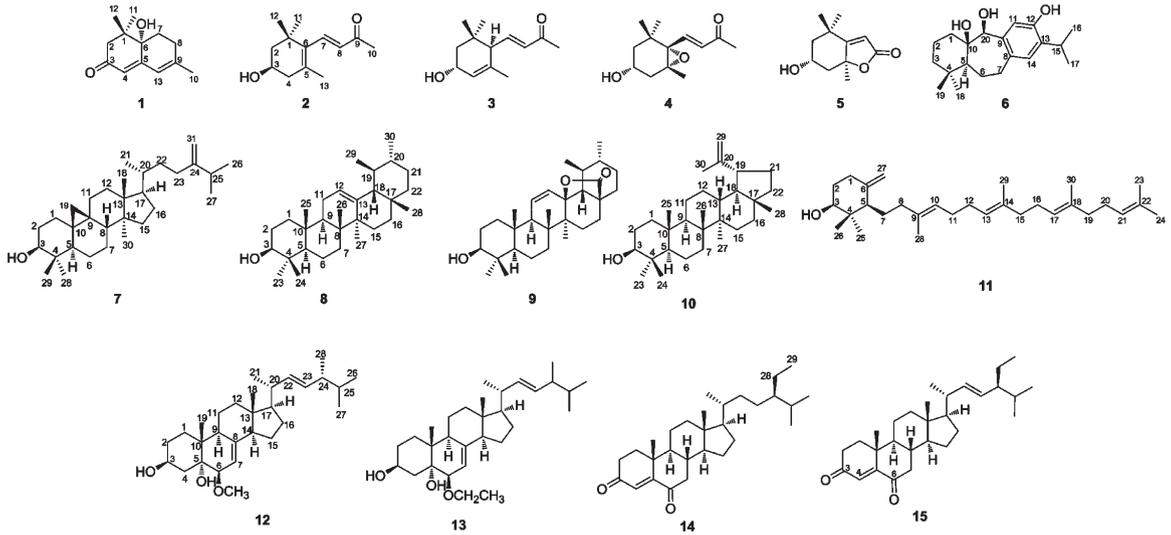


图1 化合物1~15的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-15

1 仪器与材料

旋光由 Jasco P-1020 型全自动数字旋光仪测得; 红外 Bruker Tensor-27 傅立叶变换中红外光谱仪测得, 用溴化钾压片; 紫外由 Shimadzu UV 2401 PC 紫外可见分光光度仪测定; 1D 和 2D NMR 由 Bruker AV-400 MHz, Bruker DRX-500 MHz, Bruker Avance III 600 MHz 和 Bruker AV-800 MHz 核磁共振仪测定, 用四甲基硅烷作为内标, 化学位移(δ)单位为 ppm; ESI-MS 用 Agilent 1290 UPLC/6540 Q-TOF 型 UPLC/Q-ToF 液质联用质谱仪测定; 高分辨质谱用 Agilent G 6230 飞行时间质谱仪测定; 半制备高效液相色谱为 Agilent 1260 高效液相色谱仪, 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ (9.6 × 150 mm, 5 μ m); 柱层析用硅胶(100~200, 200~300目)由青岛海洋化工厂生产; 柱层析馏分收集通过薄层色谱监测, 薄层色谱所用硅胶板为 GF254 型, 由青岛海洋化工厂生产, 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液, 喷洒后适当加热; 所有溶剂均为工业溶剂重蒸后使用。

三花枪刀药于 2014 年 9 月采自于中国科学院昆明植物研究所, 并由中国科学院昆明植物研究所成晓副研究员鉴定。标本保存在昆明植物研究所植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室。

2 提取与分离

干燥三花枪刀药全草 23 kg, 粉碎后, 用 95% 乙醇浸泡提取三次, 每次 48 h, 合并提取液, 减压蒸馏回收乙醇并浓缩得浸膏 1.2 kg, 经正相硅胶柱层析, 用石油醚: 丙酮(1:0~0:1)进行梯度洗脱, 经 TLC 检测合并为三段(Fr 1~Fr 3)。

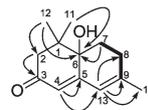
Fr 1(310 g)部分经正相硅胶柱层析, 以石油醚: 丙酮(95:5~1:1)洗脱分为五段: Fr 1.1~Fr 1.5。Fr 1.1 再次经正相硅胶柱层析以石油醚: 乙酸乙酯(9:1~1:1)洗脱分为两段 Fr 1.1.1~Fr 1.1.2。Fr 1.1.1 经半制备 HPLC(甲醇/水, 83:17)制备得化合物 14(3.2 mg, t_R = 15 min), Fr 1.1.2 经半制备 HPLC(甲醇/水, 78:22)制备得化合物 7(6.5 mg, t_R = 13 min)、6(2.4 mg, t_R = 22 min)。Fr 1.2 经正相

硅胶柱层析石油醚/丙酮(9:1~6:4)洗脱分为三段 Fr 1.2.1~Fr 1.2.3。Fr 1.2.1 经正相硅胶柱层析石油醚/丙酮(8.5:1.5)纯化得化合物 **8** (6.8 mg), Fr 1.2.2 经正相硅胶柱层析氯仿/丙酮(100:1~9:1)得化合物 **11** (5.2 mg)。Fr 1.2.3 经正相硅胶柱层析石油醚/丙酮(8:2)纯化得化合物 **12** (3.7 mg)。Fr 1.3 经半制备 HPLC(乙腈/水, 85:15)制备得化合物 **9** (3.1 mg, $t_R = 7$ min)、**13** (11.5 mg, $t_R = 15$ min)、**15** (1.1 mg, $t_R = 19$ min)。Fr 1.4 经正相硅胶柱层析以石油醚:乙酸乙酯(9:1~7:3)洗脱得化合物 **10** (20.5 mg)。Fr 2(218 g)部分经正相硅胶柱层析以石油醚:丙酮(9:1~6:4)分段(Fr 2.1~Fr 2.4)。Fr 2.2 经半制备 HPLC 纯化(甲醇/水, 68:32)得化合物 **4** (4 mg, $t_R = 9$ min)、**2** (2 mg, $t_R = 15$ min)。Fr 2.3 用半制备 HPLC 纯化(甲醇/水, 70:30)得化合物 **5** (5.8 mg, $t_R = 18$ min)。Fr 2.4 经半制备 HPLC 纯化(甲醇/水, 80:20)得化合物 **3** (5.1 mg, $t_R = 11$ min)。Fr 3(42 g)部分经反复正相硅胶柱层析, Sephadex LH-20(甲醇)纯化得到化合物 **1** (5.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 白色粉末, HRESI-MS: m/z 207.1379 $[M+H]^+$ ($C_{13}H_{18}O_2$, calc. 207.1380), 计算出不饱和度为 5。 $[\alpha]_D^{25.4} - 18.2$ (c 0.13, MeOH); 紫外吸收 UV(MeOH) λ_{max} (log ϵ): 296 (3.86) nm。红外光谱 IR(KBr 压片法) ν_{max} 3418、1657、1625 cm^{-1} 的强吸收, 表明该分子中存在羟基、羰基和双键。

分析氢谱和碳谱可知, 化合物 **1** 中存在三个甲基 [δ_H 1.00 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.93 (3H, s); δ_C 22.9 (q), 24.3 (q)], 三个亚甲基 [δ_C 49.0 (t), 27.4 (t), 27.5 (t)], 两个 sp^2 杂化的次甲基 [δ_H 5.67 (1H, s), 6.01 (1H, s); δ_C 122.0 (d), 123.4 (d)] 和五个季碳 [包括一个酮基 δ_C 199.8 (s), 两个 sp^2 杂化季碳 δ_C 149.9 (s), 154.0 (s)]。与 blumenol B^[20] 的氢谱和碳谱数据相比较, 发现两个化合物的部分数据相似, 化合物 **1** 含有与 blumenol B 相同的六元环结构。化合物 **1** 中, 1 个羰基和 2 对双键占 3 个不饱和度, 提示除了与 blumenol B 中相同的六元环外, 化合物 **1** 还存在 1 个环。HMBC 谱中 δ_H 6.01 (s, H-13) 与 δ_C 27.4 (C-8), 149.9 (C-9), 24.3 (C-10) 相关, δ_H 5.67 (s, H-4) 与 δ_C 154.0 (C-5), 123.4 (C-13) 相关, 说明化合物 **1** 的 9, 13 位成



— 1H - 1H COSY \curvearrowright HMBC

图 2 化合物 **1** 1H - 1H COSY、HMBC 的关键相关信号

Fig. 2 Key 1H - 1H COSY, HMBC correlations of compound **1**

表 1 化合物 **1** 的 1H (600 MHz) 和 ^{13}C (150 MHz) NMR 数据 (CDCl₃)

Table 1 1H (600 MHz) and ^{13}C (150 MHz) NMR data of **1** in CDCl₃

No.	δ_C	δ_H
1	39.8 (s)	
2	49.0 (t)	2.88 (d, 16.5), 2.07 (d, 16.5)
3	199.8 (s)	
4	122.0 (d)	5.67 (s)
5	154.0 (s)	
6	71.3 (s)	
7	27.5 (t)	2.46, ddd (17.8, 11.9, 3.5) 2.16, dd (17.8, 5.1)
8	27.4 (t)	1.97, dd (13.8, 3.5) 1.74, ddd (13.8, 11.9, 5.1)
9	149.9 (s)	
10	24.3 (q)	1.93 (s)
11	22.9 (q)	1.13 (s)
12	24.3 (q)	1.00 (s)
13	123.4 (d)	6.01 (s)

环, 并在 9, 13 位形成双键。最终确定化合物的结构为 6-羟基-9, 13 环大柱烷 4, 9 (13)-二烯-3-酮 [6-hydroxy-9, 13-cyclomegastigma-4, 9 (13)-dien-3-one]。化合物 **1** 是全合成 3, 4, 7, 8-tetrahydro-4, 4, 7-trimethylnaphthalen-2(6H)-one 的中间体^[5], 这是首次从天然资源中获得该化合物, 为新天然产物, 并且首次报道其 ^{13}C NMR 数据。

化合物 2 黄色油状液体 ($C_{13}H_{20}O_2$); 1H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.20 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.11 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 4.01 (1H, m, H-3), 2.30 (3H, s, H-10), 1.78 (3H, s, H-13), 1.11 (3H, s, H-12), 1.10 (3H, s, H-11); ^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 36.9 (s, C-1), 48.4 (t, C-2), 64.5 (d, C-3), 42.7 (t, C-4), 132.2 (s, C-5), 135.6 (s, C-6), 142.3 (d, C-7), 132.4 (d, C-8), 198.5

(s, C-9), 27.3 (q, C-10), 30.1 (q, C-11), 28.6 (q, C-12), 21.6 (q, C-13)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **2** 为 3β -羟基- β -紫罗酮[3β -Hydroxy- β -ionone]。

化合物 3 淡黄色油状液体($C_{13}H_{20}O_2$); ESI-MS m/z 231 [M + Na]⁺, 247 [M + K]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 800 MHz) δ : 6.54 (1H, dd, $J = 16.0$, 9.9 Hz, H-7), 6.10 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 5.63 (1H, br s, H-4), 2.25 (3H, s, H-10), 1.63 (3H, s, H-13), 1.03 (3H, s, H-11), 0.88 (3H, s, H-12); ¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ : 33.9 (s, C-1), 43.8 (t, C-2), 65.5 (d, C-3), 125.8 (d, C-4), 135.5 (s, C-5), 54.2 (d, C-6), 147.1 (d, C-7), 133.6 (d, C-8), 198.0 (s, C-9), 27.2 (q, C-10), 29.3 (q, C-11), 24.7 (q, C-12), 22.7 (q, C-13)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **3** 为 3α -羟基-大柱烷-4,7E-二烯-9-酮[3α -Hydroxy-megastigma-4,7E-dien-9-one]。

化合物 4 无色油状液体($C_{13}H_{20}O_3$); ESI-MS m/z 247 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.16 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7), 6.16 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-8), 3.74 (1H, m, H-3), 2.28 (3H, s, H-10), 1.18 (3H, s, H-13), 1.17 (3H, s, H-12), 0.95 (3H, s, H-11); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 36.1 (s, C-1), 47.6 (t, C-2), 64.4 (d, C-3), 41.3 (t, C-4), 68.8 (s, C-5), 70.8 (s, C-6), 145.4 (d, C-7), 133.8 (d, C-8), 200.2 (s, C-9), 27.4 (q, C-10), 29.8 (q, C-11), 25.1 (q, C-12), 20.0 (q, C-13)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **4** 为 3α -羟基- $5\alpha,6\alpha$ -环氧-7E-大柱烷-7-烯-9-酮[$5\alpha,6\alpha$ -Epoxy- 3α -hydroxy-megastigma-7E-en-9-one]。

化合物 5 白色晶体($C_{11}H_{16}O_3$); ESI-MS m/z 197 [M + H]⁺, 219 [M + Na]⁺, 235 [M + K]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 5.74 (1H, s, H-7), 4.21 (1H, m, H-3), 1.76 (3H, s, H-13), 1.46 (3H, s, H-11), 1.27 (3H, s, H-12); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 37.2 (s, C-1), 47.9 (t, C-2), 67.2 (d, C-3), 46.4 (t, C-4), 88.93 (s, C-5), 174.4 (s, C-6), 113.3 (d, C-7), 185.6 (s, C-8), 26.9 (q, C-11), 31.0 (q, C-12), 27.4 (q, C-13)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **5** 为黑麦草内酯[Loliolide]。

化合物 6 白色粉末($C_{29}H_{48}O_3$); ESI-MS m/z 341 [M + Na]⁺, 357 [M + K]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.24 (1H, s, H-11), 6.87 (1H, s, H-14), 4.48 (1H, br s, H-20), 1.20 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-16), 1.19 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17), 0.91 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 34.2 (t, C-1), 18.3 (t, C-2), 42.5 (t, C-3), 34.5 (s, C-4), 56.2 (d, C-5), 24.4 (t, C-6), 34.9 (t, C-7), 133.8 (s, C-8), 136.0 (s, C-9), 76.6 (s, C-10), 113.2 (d, C-11), 152.7 (s, C-12), 132.3 (s, C-13), 126.2 (d, C-14), 26.4 (d, C-15), 22.5 (q, C-16), 23.0 (q, C-17), 32.5 (q, C-18), 21.9 (q, C-19), 79.9 (d, C-20)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **6** 为 Pisiferadinol。

化合物 7 白色粉末($C_{31}H_{52}O$); EI-MS m/z 440 [M⁺] (30), 422 (60), 407 (62), 300 (50); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 4.71 (1H, br s, H-31a), 4.66 (1H, br s, H-31b), 3.28 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-26), 1.02 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-27), 0.96 (3H, s, H-29), 0.91 (3H, s, H-28), 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.81 (3H, s, H-30), 0.55 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-19a), 0.33 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-19b); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 32.0 (t, C-1), 30.4 (t, C-2), 78.9 (d, C-3), 40.5 (s, C-4), 47.1 (d, C-5), 21.1 (t, C-6), 26.1 (t, C-7), 48.0 (d, C-8), 20.0 (s, C-9), 26.1 (s, C-10), 26.5 (t, C-11), 32.9 (t, C-12), 45.3 (s, C-13), 48.8 (s, C-14), 35.6 (t, C-15), 28.2 (t, C-16), 52.3 (d, C-17), 18.3 (q, C-18), 29.9 (t, C-19), 36.1 (d, C-20), 18.2 (C-21), 35.0 (t, C-22), 31.3 (t, C-23), 157.0 (s, C-24), 33.8 (q, C-25), 22.0 (q, C-26), 21.9 (q, C-27), 25.5 (q, C-28), 14.2 (q, C-29), 19.3 (q, C-30), 105.9 (t, C-31)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **7** 为 24-Methylenecycloartanol。

化合物 8 白色粉末($C_{30}H_{50}O$); EI-MS m/z 426 [M⁺] (30), 219 (28), 218 (100); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 5.13 (1H, m, H-12), 3.22 (1H, dd, $J = 10.2, 4.3$ Hz, H-3), 1.16 (3H, s, H-27), 1.02 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-23), 0.96 (3H, s, H-25), 0.88 (6H, s, H-29, 30), 0.84 (3H, s, H-28), 0.81 (3H, s, H-24); ¹³C NMR (CDCl₃, 125

MHz) δ : 38.8 (t, C-1), 27.3 (t, C-2), 79.1 (d, C-3), 38.8 (s, C-4), 55.2 (d, C-5), 18.4 (t, C-6), 32.9 (t, C-7), 40.0 (s, C-8), 47.7 (d, C-9), 36.9 (s, C-10), 23.4 (t, C-11), 124.4 (d, C-12), 139.6 (s, C-13), 42.1 (s, C-14), 28.8 (t, C-15), 26.6 (t, C-16), 33.8 (s, C-17), 59.1 (d, C-18), 39.6 (d, C-19), 39.7 (d, C-20), 31.3 (t, C-21), 41.5 (t, C-22), 28.1 (q, C-23), 15.7 (q, C-24), 15.6 (q, C-25), 16.9 (q, C-26), 23.4 (q, C-27), 28.1 (q, C-28), 17.5 (q, C-29), 21.4 (q, C-30)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **8** 为 α -香树脂醇 [α -Amyrin]。

化合物 9 白色粉末 ($C_{30}H_{46}O_3$); ESI-MS m/z 455 [M + H]⁺, 477 [M + Na]⁺, 493 [M + K]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 5.95 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-12), 5.53 (1H, dd, J = 10.3, 3.1 Hz, H-11), 3.22 (1H, dd, J = 11.5, 4.8 Hz, H-3), 1.14 (3H, s, H-27), 1.05 (3H, s, H-26), 1.00 (3H, d, J = 5.3 Hz, H-29), 0.99 (3H, s, H-23), 0.92 (3H, d, J = 5.4 Hz, H-30), 0.91 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-24); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 38.1 (t, C-1), 22.8 (t, C-2), 78.8 (d, C-3), 38.9 (s, C-4), 54.7 (d, C-5), 17.7 (t, C-6), 30.8 (t, C-7), 41.9 (s, C-8), 53.0 (d, C-9), 36.4 (s, C-10), 128.8 (d, C-11), 133.5 (d, C-12), 89.7 (s, C-13), 41.7 (s, C-14), 25.5 (t, C-15), 27.0 (t, C-16), 45.1 (s, C-17), 60.6 (d, C-18), 38.1 (d, C-19), 40.3 (d, C-20), 31.2 (t, C-21), 31.3 (t, C-22), 27.8 (q, C-23), 14.9 (q, C-24), 17.9 (q, C-25), 18.9 (q, C-26), 16.1 (q, C-27), 180.0 (s, C-28), 17.8 (q, C-29), 19.2 (q, C-30)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **9** 为 3 β -Hydroxyurs-11-en-28,13 β -olide。

化合物 10 白色粉末 ($C_{30}H_{50}O$); EI-MS: m/z 426 [M⁺] (84), 411 (26), 218 (100), 207 (81), 189 (88); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 4.69 (1H, s, H-29a), 4.56 (1H, s, H-29b), 3.18 (1H, dd, J = 10.8, 4.7 Hz, H-3), 1.69 (3H, s, H-30), 1.04 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-23), 0.97 (3H, s, H-27), 0.84 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-28), 0.77 (3H, s, H-24); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 38.7 (t, C-1), 27.4 (t, C-2), 79.0 (d, C-3), 38.8 (s, C-4), 55.3 (d, C-5), 18.3 (t, C-6), 34.2 (t, C-7), 40.8

(s, C-8), 50.4 (d, C-9), 37.1 (s, C-10), 20.9 (t, C-11), 25.1 (t, C-12), 38.0 (d, C-13), 42.8 (s, C-14), 27.4 (t, C-15), 35.6 (t, C-16), 43.0 (s, C-17), 48.3 (d, C-18), 48.0 (d, C-19), 151.0 (s, C-20), 29.8 (t, C-21), 40.0 (t, C-22), 28.0 (q, C-23), 15.4 (q, C-24), 16.1 (q, C-25), 16.0 (q, C-26), 14.5 (q, C-27), 18.0 (q, C-28), 109.3 (t, C-29), 19.3 (q, C-30)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **10** 为羽扇豆醇 [Lupeol]。

化合物 11 白色粉末 ($C_{30}H_{50}O$); ESI-MS m/z 449 [M + Na]⁺, 465 [M + K]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.09 (4H, s, H-10, 13, 17, 21), 4.87 (1H, br s, H-27a), 4.60 (1H, br s, H-27b), 3.41 (1H, dd, J = 10.0, 4.3 Hz, H-3), 1.69 (6H, s, H-23, 25), 1.60 (9H, s, H-24, 26, 28), 1.03 (3H, s, H-29), 0.72 (3H, s, H-30); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 32.2 (t, C-1), 33.1 (t, C-2), 77.4 (d, C-3), 40.6 (s, C-4), 50.9 (d, C-5), 147.2 (s, C-6), 23.7 (t, C-7), 38.6 (t, C-8), 134.9 (s, C-9), 124.3 (d, C-10), 26.7 (t, C-11), 26.8 (t, C-12), 124.3 (d, C-13), 135.2 (s, C-14), 39.7 (t, C-15), 28.3 (t, C-16), 124.4 (d, C-17), 135.5 (s, C-18), 39.9 (t, C-19), 28.3 (t, C-20), 124.4 (d, C-21), 131.3 (s, C-22), 25.7 (q, C-23), 17.7 (q, C-24), 25.9 (q, C-25), 26.7 (q, C-26), 108.4 (t, C-27), 15.5 (q, C-28), 16.1 (q, C-29), 16.1 (q, C-30)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **11** 为 Achilleol A。

化合物 12 白色粉末 ($C_{29}H_{48}O_3$); ESI-MS m/z 467 [M + Na]⁺, 483 [M + K]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.40 (1H, m, H-7), 5.23 (1H, dd, J = 15.8, 7.0 Hz, H-23), 5.17 (1H, dd, J = 15.8, 7.7 Hz, H-22), 4.05 (1H, m, H-3), 3.39 (3H, s, OMe), 3.17 (1H, d, J = 5.0 Hz, H-6), 1.01 (3H, d, J = 7.6 Hz, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-28), 0.84 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-26), 0.82 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-27), 0.60 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 32.8 (t, C-1), 31.0 (t, C-2), 67.9 (d, C-3), 39.6 (t, C-4), 76.4 (s, C-5), 82.5 (d, C-6), 115.1 (d, C-7), 143.7 (s, C-8), 43.9 (d, C-9), 37.3 (s, C-10), 22.2 (t, C-11), 39.4 (t, C-12), 43.9 (s, C-13), 55.0 (d,

C-14), 23.0 (t, C-15), 28.0 (t, C-16), 56.0 (d, C-17), 12.4 (q, C-18), 18.5 (q, C-19), 40.5 (d, C-20), 21.2 (q, C-21), 135.5 (d, C-22), 132.2 (d, C-23), 42.9 (d, C-24), 33.2 (d, C-25), 20.0 (q, C-26), 19.7 (q, C-27), 17.7 (q, C-28), 58.4 (q, OMe)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **12** 为 6 β -甲氧基麦角甾烷-7, 22 E -二烯-3 β , 5 α -二醇 [6 β -Methoxyergosta-7, 22 E -dien-3 β , 5 α -diol]。

化合物 13 白色粉末 (C₃₀H₅₀O₃); ESI-MS m/z 481 [M + Na]⁺, 497 [M + K]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.34 (1H, m, H-7), 5.20 (2H, m, H-22, 23), 4.09 (1H, m, H-3), 3.44 (2H, OCH₂CH₃), 1.31 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, OCH₂CH₃), 1.01 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, H-21), 1.00 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-28), 0.81 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-27), 0.80 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26), 0.63 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 33.7 (t, C-1), 31.7 (t, C-2), 68.4 (d, C-3), 40.7 (t, C-4), 77.0 (s, C-5), 82.0 (d, C-6), 117.0 (d, C-7), 143.9 (s, C-8), 44.7 (d, C-9), 38.2 (s, C-10), 23.0 (t, C-11), 40.7 (t, C-12), 44.7 (s, C-13), 56.0 (d, C-14), 24.0 (t, C-15), 29.2 (t, C-16), 57.4 (d, C-17), 11.9 (q, C-18), 18.9 (q, C-19), 41.9 (d, C-20), 21.7 (q, C-21), 137.0 (d, C-22), 133.2 (d, C-23), 44.4 (d, C-24), 34.4 (d, C-25), 20.1 (q, C-26), 20.5 (q, C-27), 18.2 (q, C-28), 66.7 (t, OCH₂CH₃), 16.1 (q, OCH₂CH₃)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **13** 为 6 β -乙氧基麦角甾烷-7, 22 E -二烯-3 β , 5 α -二醇 [6 β -ethoxyergosta-7, 22 E -dien-3 β , 5 α -diol]。

化合物 14 白色粉末 (C₂₉H₄₆O₂); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.16 (1H, s, H-4), 1.22 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 0.85 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H-29), 0.84 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26), 0.82 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.72 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 35.5 (t, C-1), 34.0 (t, C-2), 202.4 (s, C-3), 125.5 (d, C-4), 161.1 (s, C-5), 199.6 (s, C-6), 46.8 (t, C-7), 39.1 (d, C-8), 50.9 (d, C-9), 39.1 (s, C-10), 20.8 (t, C-11), 39.8 (t, C-12), 42.5 (s, C-13), 55.9 (d, C-14), 23.9 (t, C-15), 30.2 (t, C-16), 56.5 (d, C-17), 11.9 (q, C-18), 17.5 (q, C-19), 35.8 (d, C-

20), 18.6 (q, C-21), 33.6 (t, C-22), 26.1 (t, C-23), 45.8 (d, C-24), 29.1 (d, C-25), 20.2 (q, C-26), 18.2 (q, C-27), 23.1 (t, C-28), 11.9 (q, C-29)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **14** 为 豆甾烷-4-烯-3, 6-二酮 [Stigmast-4-en-3, 6-dione]。

化合物 15 白色粉末 (C₂₉H₄₄O₂); ESI-MS m/z 425 [M + H]⁺, 447 [M + Na]⁺, 463 [M + K]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.17 (s, 1H, H-4), 5.15 (1H, dd, $J = 15.6, 8.0$, H-23), 5.04 (1H, dd, $J = 15.6, 7.8$, H-22), 1.17 (3H, s, H-19), 1.04 (3H, d, $J = 7.0$, H-21), 0.85 (3H, d, $J = 6.5$, H-27), 0.81 (3H, t, $J = 7.0$, H-29), 0.80 (3H, d, $J = 6.5$, H-26), 0.74 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 35.5 (t, C-1), 34.0 (t, C-2), 202.4 (s, C-3), 125.4 (d, C-4), 161.1 (s, C-5), 199.5 (s, C-6), 46.8 (t, C-7), 34.2 (s, C-8), 51.2 (d, C-9), 39.0 (s, C-10), 20.8 (t, C-11), 39.0 (t, C-12), 42.5 (s, C-13), 55.7 (d, C-14), 24.0 (t, C-15), 28.7 (t, C-16), 56.6 (d, C-17), 12.1 (q, C-18), 17.5 (q, C-19), 40.4 (d, C-20), 21.0 (q, C-21), 137.8 (d, C-22), 129.7 (d, C-23), 51.0 (d, C-24), 31.8 (d, C-25), 21.1 (q, C-26), 19.0 (q, C-27), 24.0 (t, C-28), 12.2 (q, C-29)。通过比对已知化合物的物理数据以及波谱数, 确定化合物 **15** 为 豆甾-4, 22 E -二烯-3, 6-二酮 [Stigmast-4, 22 E -dien-3, 6-dione]。

4 细胞毒活性测试

用含 10% 胎牛血清的培养液 (DMEM) 配成单个细胞悬液, 以每孔 10000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μ L, 贴壁细胞提前 12 h 接种培养。粗筛浓度 40 μ M 初筛, 在该浓度对肿瘤细胞生长抑制在 50% 附近的化合物设 5 个浓度进入梯度复筛, 每孔终体积 200 μ L, 每种处理均设 3 个复孔。37 摄氏度培养 48 h 后, 每孔加 MTT 溶液 20 μ L。继续孵育 4 h, 终止培养, 吸弃孔内培养上清液每孔加 200 μ L 的 SDS 溶液 (10%), 过夜孵育 (温度 37 $^{\circ}$ C), 使结晶物充分融解。选择 595 nm 波长, 酶联免疫检测仪 (Bio-Rad Imark) 读取各孔光吸收值, 记录结果, 以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法 (Reed and Muench 法^[21]) 计算化合物的 IC₅₀ 值。

细胞毒活性筛选显示, 化合物 **6** 对人胃癌 (AGS) 和人宫颈癌 (Hela) 体外具有选择性的细胞毒活性, 化合物 **12** 和 **15** 对人乳腺癌 (MDA-MB-

468), 人胃癌 (AGS), 人结肠癌 (HCT116), 人宫颈癌 (Hela) 和人乳腺癌 (MDA-MB-231) 肿瘤细胞株体外均具有显著细胞毒活性 (表 2)。

表 2 化合物 **6**、**12**、**15** 对五株肿瘤细胞的细胞毒活性 (IC₅₀ μM)

Table 2 Cytotoxicities of compounds **6**, **12** and **15** against five cancer cell lines (IC₅₀ μM)

化合物编号 No.	人乳腺癌细胞 MDA-MB-468	人胃癌细胞 AGS	人结肠癌细胞 HCT116	人宫颈癌细胞 Hela	人乳腺癌细胞 MDA-MB-231
6	>40	38.10	>40	39.12	>40
12	28.17	21.32	31.46	27.63	37.84
15	18.67	26.49	19.11	18.93	25.35
紫杉醇 ^a Paclitaxel	0.020	0.013	0.079	0.002	0.011

^a阳性对照. Positive control.

参考文献

- Editorial Committee of Flora of China (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China (中国植物志), Beijing: Science Press, 2002. Vol 70, 248.
- Editorial Committee of Chinese Bencao (中华本草编辑委员会). Chinese Bencao (中华本草). Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999. Vol 20, 464-465.
- Jiang B (姜北), Zhao QS (赵勤实), Lin ZW (林中文), *et al.* Chemical constituents of *Hypoestes triflora*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2001, 13: 12-15.
- Gu WZ (顾文珍), Qin WZ (秦万章). The effect of allantoin and their clinica. *Chin J New Drugs Clin Rem* (新药与临床), 1990, 9: 232-234.
- Ito N, Etoh T, Hagiwara H, *et al.* Novel synthesis of degradation products of carotenoids, megastigmatrienone analogues and blumenol A. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 1997, 1571-1580.
- DellaGreca M, Marino CD, Zarrelli A, *et al.* Isolation and phytotoxicity of apocarotenoids from *Chenopodium album*. *J Nat Prod*, 2004, 67: 1492-1495.
- Peng WW (彭文文), Song WW (宋卫武), Huang MB (黄茂波), *et al.* Monoterpenes and sesquiterpenoids from *Clausena excavate*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 1620-1624.
- Yang MC, Lee KH, Kim KH, *et al.* Lignan and terpene constituents from the aerial parts of *Saussurea pulchella*. *Arch Pharm Res*, 2007, 30: 1067-1074.
- Kim MR, Lee SK, Kim CS, *et al.* Phytochemical constituents of *carpesium macrocephalum* F_R. et S_{AV}. *Arch Pharm Res*, 2004, 27: 1029-1033.
- Hasegawa S, Kojima T, Hirose Y. Terpenoids from the seed of *Chamaecyparis pisifera*: the structures of six diterpenoids. *Phytochemistry*, 1985, 24: 1545-1551.
- Yan XT, Lee SH, Li W, *et al.* Terpenes and sterols from the

- fruits of *Prunus mume* and their inhibitory effects on osteoclast differentiation by suppressing tartrate-resistant acid phosphatase activity. *Arch Pharm Res*, 2015, 38: 186-192.
- Raga DD, Herrera AA, Shen CC, *et al.* Triterpenes from *ardisia cf. elliptica* (subgenus tinus) limit vascular density and promote von willebrand factor expression on duck chorioallantoic membrane. *Pharm Chem J*, 2015, 49: 24-29.
- Pereira SI, Freire CSR, Neto CP, *et al.* Chemical composition of the epicuticular wax from the fruits of *Eucalyptus globulus*. *Phytochem Anal*, 2005, 16: 364-369.
- Reynolds WF, McLean S, Poplawski J, *et al.* Total assignment of ¹³C and ¹H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ¹H chemical shifts in structural investigations of complex natural products. *Tetrahedron*, 1986, 42: 3419-3428.
- Barrero AF, Alvarez-Manzaneda R. EJ, Alvarez-Manzaneda R. R. Achilleol A: a new monocyclic triterpene skeleton from *achillea odorata* L. *Tetrahedr Lett*, 1989, 30: 3351-3352.
- Gao H, Hong K, Zhang X, *et al.* New steryl esters of fatty acids from the mangrove fungus *Aspergillus awamori*. *Helv Chim Acta*, 2007, 90: 1165-1178.
- Wu J, Suzuki T, Choi JH, *et al.* An unusual sterol from the mushroom *Stropharia rugosoannulata*. *Tetrahedr Lett*, 2013, 54: 4900-4902.
- Gaspar EMM, Neves HJC. Steroidal constituents from mature wheat straw. *Phytochemistry*, 1993, 34: 523-527.
- Sandjo LP, Rincheval, V, Ngadjui, BT, *et al.* Cytotoxic effect of some pentacyclic triterpenes and hemisynthetic derivatives of stigmasterol. *Chem Nat Compd*, 2011, 47: 731-734.
- Matsunami K, Hideaki O, Takeda Y, *et al.* Reinvestigation of the absolute stereochemistry of megastigmene glucoside, icaraside B₅. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58: 1399-1402.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, 27: 493-497.