海州常山茎正丁醇部位的化学成分及体外抗肿瘤活性研究Δ

李林珍[1,2,3*]，张　宇[1,2,3]，陈　亮[1,2,3]，岑银芝[1,2,3]，涂杨丽[1,2,3]，杨小生[2#]，李勇军[3]（1.贵州医科大学药学院，贵阳 550025；2.贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室，贵阳　550004；3.贵州医科大学民族药中药开发应用教育部研究工程中心，贵阳　550004）

中图分类号　R917；R284；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）21-2578-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.21.04

摘　要　目的　分离、鉴定海州常山茎正丁醇部位的化学成分，并考察其体外抗肿瘤活性。**方法**　使用85%乙醇回流提取海州常山的干燥茎得到其乙醇提取物。将所得乙醇提取物用水分散后，依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取，减压浓缩后分别得到各萃取部位浸膏。采用D101大孔树脂柱层析以及包括硅胶、羟丙基葡聚糖凝胶和Toyopearl HW-40F大孔树脂等在内的各种色谱技术对海州常山茎正丁醇部位进行分离纯化，并结合化合物的物理、化学性质以及质谱、核磁共振谱等波谱技术确定其结构。采用MTT法检测所得化合物对4种人源肿瘤细胞K562、MCF-7、A549和HepG2的增殖抑制活性。**结果**　从海州常山茎85%乙醇提取物的正丁醇部位共分离鉴定出14个化合物，分别鉴定为teuvincenone B（1）、钩大青酮（2）、villosin C（3）、丁香脂素（4）、丁香脂素-4′-*O*-*β*-葡萄糖（5）、3，12-*O*-*β*-D-二吡喃葡萄糖基-11，16-二羟基松香醇-8，11，13-三烯（6）、五叶山小橘苷C（7）、角胡麻苷（8）、异地黄苷（9）、2-（4-hydroxyphenyl）ethanol-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-（1→2）-*O*-*β*-D-glucopyranoside（10）、3，4-二甲氧基苯基-1-*O*-*β*-D-呋喃芹糖基-（1→2）-*β*-D-葡萄糖苷（11）、2，6-二甲氧基-4-羟苯基-1-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷（12）、腺苷（13）和肉苁蓉苷F（14）。体外抗肿瘤活性研究表明，化合物1～3具有一定的抗肿瘤活性，其中化合物2对MCF-7、A549和HepG2细胞的增殖抑制活性最强，半数抑制浓度（IC_{50}）分别为25.00、22.34、12.50 μmol/L；化合物3对K562细胞的增殖抑制活性较强，IC_{50}为28.41 μmol/L。**结论**　化合物10～13为首次从该属植物中分离得到，化合物4、5、14为首次从该植物中分离得到；松香烷型二萜类化合物（化合物1～3）对上述4种肿瘤细胞株的增殖抑制活性较好。

关键词　海州常山；茎；正丁醇部位；化学成分；结构鉴定；抗肿瘤活性

Chemical constituents of the *n*-butanol fraction from the stems of *Clerodendrum trichotomum* and their antitumor activities *in vitro*

LI Linzhen[1,2,3], ZHANG Yu[1,2,3], CHEN Liang[1,2,3], CEN Yinzhi[1,2,3], TU Yangli[1,2,3], YANG Xiaosheng[2], LI Yongjun[3]
[1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To separate and identify the chemical constituents of the *n*-butanol fraction from the stems of *Clerodendrum trichotomum*, and to investigate their antitumor activities *in vitro*. **METHODS** The ethanol extracts were obtained with 85% ethanol from dried stems of *C. trichotomum*. After dispersed with water, ethanol extracts were distributed by petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol in turn, then concentrated under reduced pressure to obtain the fractions of each extraction part. The *n*-butanol fraction from the stems of *C. trichotomum* was isolated and purified by macroporous resin D101 column chromatography and various chromatographic techniques including silica gel, hydroxypropyl glucan gel and Toyopearl HW-40F macroporous resin and so on. The structures of them were identified by physical and chemical properties, MS and NMR. All these compounds were evaluated for cytotoxic activities against 4 kinds of human tumor cells such as cultured K562, MCF-7, A549 and HepG2, using the MTT assay. **RESULTS** Fourteen chemical constituents were isolated and identified as teuvincenone B (1), uncinatone (2), villosin C (3), syringaresinol (4), syringaresinol-4′-*O*-*β*-glucopyranoside (5), 3,12-*O*-*β*-D-diglucopyranosyl-11,16-dihydroxyabieta-8,11,13-triene (6), glypentoside C (7), martynoside (8), isomartynoside (9), 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-(1→2)-*O*-*β*-D-glucopyranoside (10), 3,4-dimethoxyphenyl-1-*O*-*β*-D-apiofuranosyl (1→2)-*β*-D-glucopyranoside (11), 2,6-dimethoxy-4-hydroxy-1-*O*-*β*-D-glucopyranoside (12), adenosine (13) and cistanoside F (14). *In vitro* anti-tumor activity studies showed that compounds 1-3 showed certain inhibitory activities against tumor cell

Δ **基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.81860689）；贵州省科技合作计划项目（No.黔科合LH字〔2015〕7359）

＊ **第一作者**　副教授，博士。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：lilinzhen9@163.com

＃ **通信作者**　研究员，博士生导师，博士。研究方向：天然药物化学及药食用生物资源综合利用。E-mail：yang_xiaosheng@yahoo.com

proliferation, among which compound 2 displayed the strongest inhibitory activity against MCF-7, A549 and HepG2 cells, and their IC_{50} values were 25.00, 22.34 and 12.50 μmol/L respectively; only compound 3 showed stronger inhibitory activity against K562 cell with IC_{50} of 28.41 μmol/L. **CONCLUSIONS** Among them, compounds 10 to 13 are isolated from genus *Clerodendrum* for the first time, compounds 4, 5, 14 were isolated from *C. trichotomum* for the first time. The abietane diterpenoids (compounds 1-3) have better inhibitory activities against above four tumor cell lines.

KEYWORDS *Clerodendrum trichotomum*; stem; *n*-butanol fraction; chemical constituents; structural identification; antitumor activities

海州常山 *Clerodendrum trichotomum* Thunb. 属于马鞭草科大青属多年生落叶灌木或小乔木，始载于《图经本草》，且在《本草纲目拾遗》《中国药用植物志》《中华本草》《中药大辞典》等著作中均有记载。海州常山株高1.5～10 m，又名后庭花、矮桐子、臭梧桐、香楸、追骨风等。海州常山根、茎、叶、花和果实均可入药[1]，广泛分布于我国的中南、西南、华东、华北各省，且在日本、朝鲜以及菲律宾北部也有分布。其味苦、微辛，性平[2]，具有祛风除湿、解毒杀虫、平肝降压的功效，多用于治疗风湿痹痛、高血压、哮喘、偏头痛、疟疾、痢疾等疾病[3]。海州常山的化学成分类型主要有萜类、苯丙素类、黄酮类和甾体化合物等，具有抗炎、镇痛、降压、抗病毒、抗肿瘤和抗氧化等生物活性[4－10]。Nagao 等[11]研究了海州常山茎和叶的甲醇提取物的抗肿瘤活性，发现海州常山茎中抗肿瘤活性成分（acteoside 和 isoacteoside）的含量比叶高。本课题组前期研究发现，海州常山茎85% 乙醇提取物的出膏率较高且具有较好的抗肿瘤活性，并且本课题组前期对该提取物的乙酸乙酯部位进行了系统的化学成分研究，分离得到的部分化合物具有良好的抗肿瘤活性[12－14]。本研究拟在前期研究基础上，继续对海州常山茎85% 乙醇提取物的正丁醇部位进行分离纯化，并采用MTT 法考察分离所得化合物对 4 种人源肿瘤细胞（K562、MCF-7、A549 和 HepG2）的增殖抑制活性，为进一步阐明海州常山茎的抗肿瘤活性物质基础及后续相关研究提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有 JEOL-ECS400 型核磁共振波谱仪（日本 JEOL 公司）、QTOF 型质谱仪（美国 Agilent 公司）、N-1300D-WB 型旋转蒸发仪[埃朗科技国际贸易（上海）有限公司]、HH.CP-01 型 CO_2 培养箱（上海申贤恒温设备厂）、Mettler EL204 型电子天平[梅特勒托利多科技（中国）有限公司]、L530 型高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）、通用 680 型酶标仪（美国 Bio Tek 公司）、TS-100 型倒置显微镜（日本 Nikon 公司）。

1.2 主要药品与试剂

实验用海州常山茎于 2016 年 11 月采自江苏省南京市，经江苏省中国科学院植物研究所姚淦研究员鉴定为马鞭草科大青属植物海州常山 *C. trichotomum* Thunb.，标本存放于贵州医科大学民族药中药开发应用教育部研究工程中心实验室。

提取分离实验用到的主要耗材有 Toyopearl HW-40F 型大孔树脂、ODS 反相材料（日本 Tosoh 公司），薄层色谱（TLC）、柱色谱硅胶以及硅胶薄层层析板（中国青岛海洋化工有限公司），羟丙基葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20（瑞典 GE Healthcare 公司），MCI 填料（日本 Mitsubishi Chemical 公司），D101 型大孔树脂（天津市海光化工有限公司）；甲醇、丙酮、二氯甲烷、石油醚等试剂均为分析纯。

体外抗肿瘤活性实验用到的主要试剂有盐酸阿霉素（批号 SB8020，纯度 99%）、青链霉素混合液（批号 20210119）、二甲基亚砜（北京索莱宝科技有限公司），胎牛血清（浙江天杭生物科技股份有限公司），MTT 试剂（美国 Sigma 公司，批号 9170051），DMEM 高糖培养基、0.25% 胰蛋白酶（美国 Gibco 公司）。

1.3 细胞株

人白细胞 K562、人乳腺癌细胞 MCF-7、人肺癌细胞 A549 和人肝癌细胞 HepG2 均由贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室提供。

2 方法与结果

2.1 细胞培养

将 4 种细胞分别接种在含 10% 胎牛血清和 1% 双抗（含青霉素和链霉素）的 DMEM 完全培养基中，置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，每隔 1 天换液 1 次。当细胞增殖到 80%～90% 时进行传代，选用对数生长期的细胞用于实验。

2.2 海州常山茎化学成分的提取与分离

称取干燥的海州常山茎 15 kg，铡片，粉碎，以 85% 乙醇加热回流提取 3 次（每次 50 L，提取 3 h）。合并提取液，减压浓缩成浸膏（出膏率 15%）。将浸膏用水分散后，用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次萃取，浓缩后分别得到石油醚部位 50 g、乙酸乙酯部位 70 g 和正丁醇部位 470 g。取正丁醇部位 470 g，用 D101 大孔树脂吸附，依次用水和 30% 乙醇、60% 乙醇、95% 乙醇梯度洗脱，分别得到水段、30% 乙醇段（116 g）、60% 乙醇段（80 g）和 95% 乙醇段（10 g）洗脱物。取 95% 乙醇段洗脱物，经反复硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱以及结晶、重结晶等方法处理，从中分离得到化合物 1（3 mg）、化合物 2

（400 mg）、化合物3（25 mg）和化合物4（20 mg）。取60%乙醇段洗脱物，经MCI柱层析，以甲醇-水[1∶9→7∶3，*V*/*V*（下同）]梯度洗脱，得到8个组分（Fr.1～Fr.8）；将Fr.5组分经Sephadex LH-20柱色谱分离，以甲醇-水（1∶1）洗脱，然后经ODS柱色谱[甲醇-水（0∶100→100∶0）]、硅胶柱色谱[乙酸乙酯-甲醇（30∶1→5∶1）]、Sephadex LH-20柱色谱[甲醇-水（1∶1）]及Toyopearl HW-40F（甲醇）柱色谱等分离纯化得到化合物5（16 mg）、化合物6（89 mg）、化合物7（15 mg）和化合物8（20 mg）。将Fr.7用ODS柱色谱[甲醇-水（1∶9→1∶1）]、Toyopearl HW-40F（甲醇）柱色谱洗脱得到化合物9（20 mg）。取30%乙醇段洗脱物，上样MCI柱色谱，以甲醇-水（1∶9→1∶1）进行洗脱，通过TLC分析合并后得到6个组分（Fr.9～Fr.14）。将Fr.11组分经Sephadex LH-20柱色谱[甲醇-水（1∶1）]、硅胶柱色谱[乙酸乙酯-甲醇（30∶1→10∶1）]、ODS柱色谱[甲醇-水（1∶9→7∶3）]、Toyopearl HW-40F（甲醇）柱色谱洗脱，不断纯化后得到化合物10（8 mg）、化合物11（10 mg）、化合物12（6 mg）和化合物13（40 mg）。将Fr.13组分经Sephadex LH-20柱色谱[甲醇-水（1∶1）]分离得到4个亚组分Fr.13.1～Fr.13.4。取Fr.13.1组分过硅胶柱色谱，以乙酸乙酯-甲醇（30∶1→10∶1）梯度洗脱、Toyopearl HW-40F柱色谱（甲醇）分离纯化，得到化合物14（55 mg）。

2.3 海州常山茎化学成分的结构鉴定

根据化合物电喷雾电离质谱（electrospray ionization mass spectrometry，ESI-MS）、核磁共振氢谱（^{1}H-nuclear magnetic resonance，^{1}H-NMR）、核磁共振碳谱（^{13}C-nuclear magnetic resonance，^{13}C-NMR）等波谱数据和理化性质鉴定化合物1～14的结构。

化合物1为橙黄色晶体，ESI-MS *m*/*z*为345[M+H]$^{+}$，分子式为$C_{20}H_{24}O_5$。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：6.92（1H，s，6-OH），5.12（1H，m，H-16），4.71（1H，s，11-OH），3.37（1H，dd，*J*=15.6、8.8 Hz，H-15a），3.03（1H，m，H-1b），2.86（1H，dd，*J*=15.2、7.6 Hz，H-15b），1.64（3H，s，H-20），1.51（3H，d，*J*=6.0 Hz，H-17），1.42（3H，s，H-18），1.41（3H，s，H-19）。^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：30.0（C-1），17.9（C-2），36.5（C-3），36.7（C-4），141.7（C-5），144.1（C-6），183.0（C-7），106.9（C-8），139.7（C-9），42.0（C-10），130.9（C-11），153.6（C-12），110.8（C-13），154.8（C-14），34.6（C-15），83.4（C-16），22.2（C-17），28.2（C-18），22.2（C-19），27.3（C-20）。以上数据与文献[15－16]报道的基本一致，故鉴定化合物1为teuvincenone B。

化合物2为橙黄色针晶，ESI-MS *m*/*z*为327[M+H]$^{+}$，分子式为$C_{20}H_{22}O_4$。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：6.20（1H，s，H-6），5.10（1H，m，H-16），4.71（1H，s，11-OH），3.39（1H，dd，*J*=15.2、8.8 Hz，H-15a），3.20（1H，ddd，*J*=13.6、5.6、1.6 Hz，H-1a），2.87（1H，dd，*J*=15.2、7.2 Hz，H-15b），1.89（3H，s，H-19），1.86（3H，s，H-18），1.51（3H，d，*J*=6.4 Hz，H-17），1.48（3H，s，H-20）。^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：29.4（C-1），30.5（C-2），140.7（C-3），125.5（C-4），165.5（C-5），118.7（C-6），190.4（C-7），109.5（C-8），136.4（C-9），39.8（C-10），131.1（C-11），153.9（C-12），111.2（C-13），154.4（C-14），34.7（C-15），83.3（C-16），22.3（C-17），20.9（C-18），15.2（C-19），22.2（C-20）。以上数据与文献[17]报道的基本一致，故鉴定化合物2为钩大青酮。

化合物3为白色针晶，ESI-MS *m*/*z*为361[M+H]$^{+}$，分子式为$C_{20}H_{24}O_6$。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：6.90（1H，s，6-OH），5.10（1H，m，H-16），3.90（1H，dd，*J*=12.4、3.2 Hz，H-17a），3.80（1H，dd，*J*=12.4、6.8 Hz，H-17b），3.30（1H，dd，*J*=15.6、9.6 Hz，H-15a），3.03（1H，dd，*J*=15.2、7.2 Hz，H-15b），3.03（1H，m，H-1a），1.99（1H，m，H-1b），1.63（3H，s，H-20），1.42（3H，s，H-19），1.41（3H，s，H-18）。^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：28.9（C-1），17.9（C-2），42.1（C-3），36.4（C-4），144.6（C-5），141.7（C-6），183.1（C-7），107.3（C-8），140.3（C-9），36.8（C-10），130.9（C-11），153.4（C-12），110.6（C-13），154.5（C-14），30.0（C-15），86.6（C-16），65.0（C-17），28.1（C-18），27.3（C-19），27.5（C-20）。以上数据与文献[18]报道的基本一致，故鉴定化合物3为villosin C。

化合物4为无色晶体，ESI-MS *m*/*z*为417[M-H]$^{-}$，分子式为$C_{22}H_{26}O_8$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.65（4H，s，H-2，2′，6，6′），4.71（2H，d，*J*=4.0 Hz，H-7，7′），4.26（2H，dd，*J*=9.0、7.2 Hz，H-9a，9′a），3.88（2H，m，H-9b，9′b），3.84（12H，s，3，3′，5，5′－OCH_3），3.13（2H，m，H-8，8′）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：133.3（C-1，1′），104.6（C-2，2′，6，6′），149.5（C-3，3′，5，5′），136.3（C-4，4′），87.8（C-7，7′），55.7（C-8，8′），72.9（C-9，9′），56.9（3，3′，5，5′－OCH_3）。以上数据与文献[19]报道的基本一致，故鉴定化合物4为丁香脂素。

化合物5为白色粉末，ESI-MS *m*/*z*为579[M-H]$^{-}$，分子式为$C_{28}H_{36}O_{14}$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.67（2H，s，H-2′，6′），6.61（2H，s，H-2，6），4.82（1H，d，*J*=7.2 Hz，H-1″），4.72（1H，d，*J*=4.0 Hz，H-7），4.67（1H，d，*J*=4.4 Hz，H-7′），4.23（2H，m，H-9a，9′a），3.86（2H，m，H-9b，9′b），3.81（6H，s，3，5－OCH_3），3.79（6H，s，3′，5′－OCH_3），3.73（1H，dd，*J*=12.0、2.4 Hz，H-6″a），3.61（1H，dd，*J*=12.0、5.2 Hz，H-6″b），3.36～3.44（3H，m，H-2″，3″，4″），3.15（1H，m，H-5″），3.08（2H，m，H-8，8′）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：133.2（C-1），104.9（C-2，6），149.5（C-3，5），136.3（C-4），87.3（C-7），55.9（C-8），73.0（C-9），56.9（3，5－OCH_3），139.7（C-1′），104.5（C-2′，6′），154.5（C-3′，5′），135.6（C-4′），87.7（C-7′），55.6（C-8′），73.0（C-9′），57.2（3′，5′－OCH_3），105.4（C-1″），75.8（C-2″），78.5（C-3″），71.4（C-4″），77.9（C-5″），62.7（C-6″）。以上数据

与文献[20]报道的基本一致，故鉴定化合物5为丁香脂素-4′-*O*-*β*-葡萄糖。

化合物6呈白色胶状，ESI-MS *m/z*为657[M-H]$^-$，分子式为$C_{32}H_{50}O_{14}$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）*δ*：6.34（1H，s，H-14），4.36（1H，d，*J*=7.6 Hz，H-1″），4.31（1H，d，*J*=7.6 Hz，H-1′），3.17～3.88（m，糖质子H，H-1b，3，15，16），2.73（1H，m，H-7），2.01（1H，m，H-2a），1.80（1H，m，H-2b），1.75（1H，m，H-6a），1.53（1H，m，H-6b），1.27（3H，s，H-20），1.16（1H，m，H-5），1.10（3H，d，*J*=6.8 Hz，H-17），1.07（3H，s，H-18），0.91（3H，s，H-19）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）*δ*：36.0（C-1），28.1（C-2），90.9（C-3），40.9（C-4），54.8（C-5），20.1（C-6），34.1（C-7），135.3（C-8），134.6（C-9），40.3（C-10），149.3（C-11），143.2（C-12），136.5（C-13），118.3（C-14），35.0（C-15），69.3（C-16），18.5（C-17），17.6（C-18），29.2（C-19），20.0（C-20），107.8（C-1′），75.7（C-2′），79.1（C-3′），71.6（C-4′），78.0（C-5′），63.1（C-6′），107.0（C-1″），75.8（C-2″），78.3（C-3″），71.7（C-4″），77.7（C-5″），62.8（C-6″）。以上数据与文献[21]报道的基本一致，故鉴定化合物6为3，12-*O*-*β*-D-二吡喃葡萄糖基-11，16-二羟基松香醇-8，11，13-三烯。

化合物7为白色粉末，ESI-MS *m/z*为787[M-H]$^-$，分子式为$C_{38}H_{44}O_{18}$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）*δ*：7.63（1H，d，*J*=16.0 Hz，H-7‴），7.13（1H，s，H-3），7.10（1H，s，H-2‴），6.98（1H，s，H-2″″），6.86（1H，d，*J*=7.6 Hz，H-6″″），6.81（1H，d，*J*=8.4 Hz，H-5″″），6.64（1H，d，*J*=8.4 Hz，H-6），6.51（1H，m，H-5），6.29（1H，d，*J*=16.4 Hz，H-8‴），5.60（1H，d，*J*=6.8 Hz，H-7‴），5.52（1H，d，*J*=1.2 Hz，H-1″），3.93（3H，s，2－OCH_3），3.85（3H，s，3‴－OCH_3），3.84（3H，s，3″″－OCH_3）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）*δ*：142.9（C-1），149.4（C-2），103.4（C-3），152.7（C-4），109.6（C-5），116.2（C-6），56.5（2－OCH_3），102.1（C-1′），79.0（C-2′），78.5（C-3′），71.8（C-4′），78.2（C-5′），62.7（C-6′），110.6（C-1″），78.8（C-2″），79.3（C-3″），75.5（C-4″），67.7（C-5″），129.8（C-1‴），113.8（C-2‴），146.0（C-3‴），152.2（C-4‴），131.1（C-5‴），119.4（C-6‴），147.2（C-7‴），115.6（C-8‴），168.8（C-9‴），56.9（3‴－OCH_3），134.2（C-1″″），110.8（C-2″″），149.3（C-3″″），147.9（C-4″″），116.4（C-5″″），120.0（C-6″″），90.0（C-7″″），54.8（C-8″″），64.7（C-9″″），56.6（3″″－OCH_3）。以上数据与文献[22]报道的基本一致，故鉴定化合物7为五叶山小橘苷C。

化合物8为淡黄色无定形粉末，ESI-MS *m/z*为651[M-H]$^-$，分子式为$C_{31}H_{40}O_{15}$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）*δ*：7.63（1H，d，*J*=16.0 Hz，H-7‴），7.15（1H，d，*J*=2.0 Hz，H-2‴），7.02（1H，dd，*J*=8.4、2.0 Hz，H-6‴），6.78（1H，d，*J*=8.4 Hz，H-5‴），6.69（1H，d，*J*=2.4 Hz，H-2），6.66（1H，d，*J*=8.0 Hz，H-5），6.61（1H，dd，*J*=8.0、2.0 Hz，H-6），6.38（1H，d，*J*=16.0 Hz，H-8‴），5.17（1H，d，*J*=1.6 Hz，H-1″），4.33（1H，d，*J*=8.0 Hz，H-1′），3.89（3H，s，3‴－OCH_3），3.75（3H，s，4－OCH_3），2.80（2H，t，*J*=7.6 Hz，H-7），1.25（3H，d，*J*=6.0 Hz，H-6″）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）*δ*：133.0（C-1），113.0（C-2），147.7（C-3），147.5（C-4），117.2（C-5），121.3（C-6），36.7（C-7），72.2（C-8），56.6（4－OCH_3），104.4（C-1′），76.3（C-2′），81.7（C-3′），70.5（C-4′），76.2（C-5′），62.5（C-6′），103.1（C-1″），72.3（C-2″），72.5（C-3″），73.9（C-4″），70.7（C-5″），18.6（C-6″），133.0（C-1‴），111.8（C-2‴），147.7（C-3‴），149.7（C-4‴），116.8（C-5‴），124.7（C-6‴），148.2（C-7‴），114.9（C-8‴），168.5（C-9‴），56.5（3‴－OCH_3）。以上数据与文献[23]报道的基本一致，故鉴定化合物8为角胡麻苷。

化合物9为黄色油状，ESI-MS *m/z*为651[M-H]$^-$，分子式为$C_{31}H_{40}O_{15}$。^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）*δ*：7.60（1H，d，*J*=15.6 Hz，H-7‴），7.10（1H，s，H-2‴），6.98（1H，d，*J*=8.0 Hz，H-6‴），6.77（1H，d，*J*=8.0 Hz，H-5‴），6.68（1H，s，H-2），6.63（1H，d，*J*=8.4 Hz，H-5），6.58（1H，d，*J*=8.4 Hz，H-6），6.36（1H，d，*J*=16.0 Hz，H-8‴），5.20（1H，s，H-1″），4.50（1H，d，*J*=11.2 Hz，H-6′a），4.38（1H，dd，*J*=11.6、6.0 Hz，H-6′b），4.33（1H，d，*J*=7.6 Hz，H-1′），4.03（1H，m，H-5″），3.92（1H，m，H-2″），3.82（3H，s，3‴－OCH_3），3.75（2H，m，H-7），3.72（3H，s，4－OCH_3），3.70（1H，overlapped，H-3″），3.68（1H，overlapped，H-5′），2.78（2H，t，*J*=7.6 Hz，H-8），1.27（3H，d，*J*=6.0 Hz，H-6″）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）*δ*：132.6（C-1），112.7（C-2），147.5（C-3），147.3（C-4），117.1（C-5），121.2（C-6），36.8（C-7），72.3（C-8），104.4（C-1′），75.8（C-2′），83.9（C-3′），70.5（C-4′），75.4（C-5′），64.7（C-6′），102.8（C-1″），72.4（C-2″），72.4（C-3″），74.0（C-4″），70.1（C-5″），18.0（C-6″），127.1（C-1‴），111.4（C-2‴），149.6（C-3‴），151.7（C-4‴），116.7（C-5‴），124.6（C-6‴），147.4（C-7‴），114.8（C-8‴），169.3（C-9‴），56.4（4，3‴－OCH_3）。以上数据与文献[24]报道的基本一致，故鉴定化合物9为异地黄苷。

化合物10为白色粉末，ESI-MS *m/z*为461[M-H]$^-$，分子式为$C_{20}H_{30}O_{12}$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）*δ*：7.03（2H，d，*J*=8.4 Hz，H-3，5），6.64（2H，d，*J*=8.4 Hz，H-2，6），4.57（1H，d，*J*=7.6 Hz，H-1′），4.40（1H，d，*J*=7.6 Hz，H-1″），3.17～4.02（m，糖质子H，H-8），2.77（2H，m，H-7）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）*δ*：130.9（C-1），131.2（C-2，6），116.2（C-3，5），156.9（C-4），36.5（C-7），72.3（C-8），103.1（C-1′），82.9（C-2′），78.3（C-3′），71.5（C-4′），77.8（C-5′），62.8（C-6′），104.9（C-1″），76.1（C-2″），78.0（C-3″），71.5（C-4″），77.9（C-5″），62.8（C-6″）。以上数据与

文献[25]报道的基本一致，故鉴定化合物10为2-(4-hydroxyphenyl)ethanol-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-(1→2)-*O*-*β*-D-glucopyranoside。

化合物11为淡黄色无定形固体，ESI-MS *m/z*为493[M+HCOO]$^-$，分子式为$C_{19}H_{28}O_{12}$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）*δ*：6.79（1H，d，*J*=2.8 Hz，H-2），6.72（1H，d，*J*=8.8 Hz，H-5），6.58（1H，dd，*J*=8.8、2.8 Hz，H-6），5.49（1H，d，*J*=1.6 Hz，H-1″），4.83（1H，d，*J*=7.6 Hz，H-1′），4.13（1H，d，*J*=9.6 Hz，H-4″b），3.99（1H，d，*J*=1.6 Hz，H-2″），3.85（3H，s，3－OCH_3），3.83（3H，s，4－OCH_3），3.37～3.93（m，糖质子H），3.62（2H，s，H-5″）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）*δ*：152.9（C-1），103.7（C-2），149.4（C-3），143.0（C-4），116.2（C-5），109.9（C-6），56.9（4－OCH_3），56.5（3－OCH_3），102.5（C-1′），78.9（C-2′），78.7（C-3′），71.7（C-4′），78.2（C-5′），62.7（C-6′），110.9（C-1″），78.1（C-2″），80.9（C-3″），75.6（C-4″），66.2（C-5″）。以上数据与文献[26]报道的基本一致，故鉴定化合物11为3，4-二甲氧基苯基-1-*O*-*β*-D-呋喃芹糖基-(1→2)-*β*-D-葡萄糖苷。

化合物12为淡黄色糖浆状，ESI-MS *m/z*为331[M-H]$^-$，分子式为$C_{14}H_{20}O_9$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）*δ*：6.13（2H，s，H-3，5），4.67（1H，d，*J*=7.2 Hz，H-1′），3.79（6H，s，2，6－OCH_3），3.73（1H，m，H-2′），3.63（1H，m，H-3′），3.63（1H，m，H-3′），3.33～3.43（4H，m，H-4′，5′，6′）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）*δ*：129.7（C-1），154.9（C-2，6），94.6（C-3，5），156.2（C-4），56.9（2，6－OCH_3），106.3（C-1′），75.8（C-2′），77.9（C-3′），71.4（C-4′），78.4（C-5′），62.7（C-6′）。以上数据与文献[27]报道的基本一致，故鉴定化合物12为2，6-二甲氧基-4-羟苯基-1-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷。

化合物13为白色粉末，ESI-MS *m/z*为266[M-H]$^-$，分子式为$C_{10}H_{13}N_5O_4$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）*δ*：8.33（1H，s，H-2），8.15（1H，s，H-8），7.24（2H，s，－NH_2），5.89（1H，d，*J*=6.0 Hz，H-1′），5.33（2H，m，2′，5′-OH），5.09（1H，d，*J*=4.0 Hz，3′-OH），4.62（1H，dd，*J*=10.8、5.2 Hz，H-2′），4.17（1H，m，H-3′），3.98（1H，dd，*J*=6.8、3.6 Hz，H-4′），3.69（1H，dt，*J*=12.0、3.6 Hz，H-5′a），3.58（1H，m，H-5′b）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）*δ*：152.3（C-2），149.1（C-4），119.3（C-5），156.1（C-6），139.8（C-8），87.9（C-1′），73.4（C-2′），70.5（C-3′），85.8（C-4′），61.6（C-5′）。以上数据与文献[28]报道的基本一致，故鉴定化合物13为腺苷。

化合物14为白色固体，ESI-MS *m/z*为487[M-H]$^-$，分子式为$C_{21}H_{28}O_{13}$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）*δ*：7.55（1H，d，*J*=16.0 Hz，H-7），7.02/7.01（1H，d，*J*=2.0 Hz，H-2），6.90/6.91（1H，dd，*J*=8.0、2.4 Hz，H-6），6.73（1H，d，*J*=8.0 Hz，H-5），6.24/6.23（1H，d，*J*=16.0 Hz，H-8），5.08（1H，d，*J*=2.4 Hz，H-1″），4.52/4.92（各0.5H，d，*J*=8.0 Hz，H-1′），3.23～4.03（m，糖质子H，H-2，3，5，6），1.05（3H，d，*J*=6.4 Hz，H-6″）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）*δ*：127.7（C-1），115.3（C-2），146.9（C-3），149.8/149.9（C-4），116.6（C-5），123.4（C-6），148.0/148.1（C-7），114.7/114.9（C-8），168.5/168.4（C-9），94.1/98.2（C-1′），76.1/77.4（C-2′），79.3/81.8（C-3′），70.7/70.8（C-4′），74.7（C-5′），62.4/62.5（C-6′），103.1/103.2（C-1″），72.1/72.4（C-2″），71.3（C-3″），73.8（C-4″），70.5（C-5″），18.6（C-6″）。以上数据与文献[29]报道的基本一致，故鉴定化合物14为肉苁蓉苷F。

2.4 海州常山茎化学成分的体外抗肿瘤活性研究

采用MTT法检测海州常山茎中分离所得化合物对4种人源肿瘤细胞（K562、MCF-7、A549和HepG2）的增殖抑制作用。实验设置空白组、阳性对照组（以阿霉素为阳性药物）和化合物1～14给药组。取对数生长期的各细胞株，用培养基培养成密度为4×10^4个/mL的细胞悬液，按100 μL/孔加入96孔板中，在5%CO_2、37 ℃条件下培养24 h，然后加入相应药物[化合物1～14给药组的浓度均为0（空白）、2、4、8、16、32、64 μmol/L，阳性对照组阿霉素的浓度为0（空白）、0.25、0.5、1、2、4、8 μmol/L，浓度均依据细胞增殖抑制预实验结果设置]，每个浓度设3个复孔。在培养箱内培养48 h后，每孔加20 μL MTT试剂，继续培养4 h；弃上层培养液，每孔加入150 μL二甲基亚砜，振荡10 min，在酶标仪490 nm波长下检测各孔吸光度（OD），按下式计算细胞的增殖抑制率：细胞增殖抑制率（%）=（$OD_{空白组}$－$OD_{给药组}$）/$OD_{空白组}$×100%。采用Graphpad Prism 5.0软件计算化合物1～14对4种肿瘤细胞的半数抑制浓度（half inhibit concentration，IC_{50}）。实验重复3次。结果见表1。

表1 化合物1～3对4种肿瘤细胞的IC_{50}测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，μmol/L）

化合物[a]	K562细胞	MCF-7细胞	A549细胞	HepG2细胞
1	>100.00	43.18±3.23	>100.00	29.74±2.07
2	>100.00	25.00±0.44	22.34±1.37	12.50±0.45
3	28.41±3.15	>100.00	>100.00	31.35±1.22
阿霉素	5.56±0.19	0.45±0.02	4.37±0.28	0.24±0.00

a：化合物4～14未显示出细胞增殖抑制活性，故数据未展示

由表1所示，化合物1～3均表现出一定的抗肿瘤活性，其中化合物2抑制MCF-7、A549和HepG2细胞增殖的活性最强，IC_{50}分别为25.00、22.34、12.50 μmol/L；仅有化合物3对K562细胞的增殖具有抑制活性，IC_{50}为28.41 μmol/L；化合物1对MCF-7和HepG2细胞有一定的增殖抑制活性，IC_{50}分别为43.18、29.74 μmol/L；其余化合物（包括苯丙素类及所有苷类）对4种测试细胞株均未显示出增殖抑制活性（IC_{50}>100.00 μmol/L）。

3 讨论

本研究采用多种色谱技术对海州常山茎85%乙醇提取物的正丁醇部位进行分离纯化，并综合运用现代波谱技术对所得化合物进行结构鉴定，得到了14个化合物。在所得的14个化合物中，除了化合物1～4为苷元外，其他化合物均为苷类，具体包括4个二萜类（其中1个为二萜苷）——teuvincenone B（1）、钩大青酮（2）、villosin C（3）、3，12-*O*-*β*-D-二吡喃葡萄糖基-11，16-二羟基松香醇-8，11，13-三烯（6），4个苯丙素类（其中3个为苯丙素苷）——丁香脂素（4）、丁香脂素-4′-*O*-*β*-葡萄糖（5）、五叶山小橘苷C（7）和肉苁蓉苷F（14），3个苯乙醇苷类——角胡麻苷（8）、异地黄苷（9）和2-（4-hydroxyphenyl）ethanol-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-（1→2）-*O*-*β*-D-glucopyranoside（10），3个酚苷及其他苷类——3，4-二甲氧基苯基-1-*O*-*β*-D-呋喃芹糖基-（1→2）-*β*-D-葡萄糖苷（11）、2，6-二甲氧基-4-羟苯基-1-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷（12）和腺苷（13）。其中，化合物10～13为首次从大青属植物中分离得到，化合物4、5、14为首次从海州常山中分离得到。

通过MTT法检测14个化合物对4种人源肿瘤细胞（K562、MCF-7、A549和HepG2）的增殖抑制活性发现，二萜类化合物（化合物1～3）对4种肿瘤细胞均表现出了一定的增殖抑制活性，苯丙素类化合物及所有苷类化合物均无此活性（IC_{50}＞100.00 μmol/L，视为无活性[30]）。化合物1～3均为松香烷型二萜类化合物，说明其可能是海州常山抗肿瘤药效的物质基础。结合本课题组前期研究成果[12－14]并进行构效关系分析发现：抗肿瘤活性较好的化合物均为17（15→16）重排型松香烷二萜，即具有苯并二氢呋喃结构片段（15、16位没有双键）；部分化合物虽然没有发生17（15→16）重排，但是其C-17位的羟基与C-12位的羟基有环合成呋喃环的可能，也表现出了良好的抗肿瘤活性；部分化合物虽然发生了17（15→16）重排，但是其15、16位有双键存在，使其没有表现出潜在的抗肿瘤活性。从以上分析可以推断，松香烷型二萜类化合物中苯并二氢呋喃结构片段（或该片段开环）可能是该类化合物抗肿瘤药效的必需基团。

综上所述，本研究从海州常山茎中分离鉴定了14个化合物，其中4个化合物为首次从该属中分离得到，3个化合物为首次从该植物中分离得到。体外抗肿瘤活性研究结果表明，松香烷型二萜类化合物对4种肿瘤细胞株的抑制活性较好。本研究在一定程度上丰富了海州常山茎的化学成分，并为其抗肿瘤活性的进一步研究开发提供了参考依据。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草：第6卷[M].上海：上海科学技术出版社，1999：576-579.

[2] 裴鉴，陈守良.中国植物志：第65（1）卷：马鞭草科[M].北京：科学出版社，1982：186-187.

[3] CRAGG G M，BOYD M R，KHANNA R，et al. Natural product drug discovery and development[M]. New York：Springer US，1999：1-29.

[4] PARK M A，KIM H J. Anti-inflammatory constituents isolated from *Clerodendron trichotomum* Tunberg Leaves（CTL）inhibits pro-inflammatory gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages by suppressing NF-kappaB activation[J]. Arch Pharm Res，2007，30（6）：755-760.

[5] KANG D G，LEE Y S，KIM H J，et al. Angiotensin converting enzyme inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*[J]. J Ethnopharmacol，2003，89（1）：151-154.

[6] 刘璐，张宇，魏茜，等.臭梧桐子化学成分研究[J].中药材，2020，43（7）：1622-1625.

[7] XU R L，WANG R，DING L，et al. New cytotoxic steroids from the leaves of *Clerodendrum trichotomum*[J]. Steroids，2013，78（7）：711-716.

[8] KIM H J，WOO E R，SHIN C G，et al. HIV-1 integrase inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*[J]. Arch Pharm Res，2001，24（4）：286-291.

[9] CHAE S，KANG K A，KIM J S，et al. Antioxidant activities of acetylmartynosides from *Clerodendrum trichotomum*[J]. J Appl Biol Chem，2007，50：270-274.

[10] 张宇，岑银芝，陈亮，等.海州常山茎的化学成分研究：Ⅱ[J/OL].中药材，2022（4）：863-867.[2022-10-08]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=ZYCA2022042600F&uniplatform=NZKPT&v=2SOwXHPFKqs7VVY6JRVbhttrh8kI60HmZ7Npk-cdaBLzhwZ47H3mkCZ-D7lRAVVz.

[11] NAGAO T，ABE F，OKABE H. Antiproliferative constituents in the plants 7. leaves of *Clerodendron bungei* and leaves and bark of *C. trichotomum*[J]. Biol Pharm Bull，2001，24（11）：1338-1341.

[12] LI L Z，WANG M H，SUN J B，et al. Abietane diterpenoids and other constituents from *Clerodendrum trichotomum*[J]. Biochem Syst Ecol，2014，56：218-220.

[13] 李林珍，魏茜，刘璐，等.海州常山茎的化学成分研究[J].中国药科大学学报，2019，50（5）：544-548.

[14] LI L Z，WU L，WANG M H，et al. Abietane diterpenoids from *Clerodendrum trichotomum* and correction of NMR data of villosin C and B[J]. Nat Prod Commun，2014，9（7）：907-910.

[15] CARREIRAS M C，RODRIGUEZ B，DE LA TORRE M C，et al. Rearranged abietane diterpenoids from the root of *Teucrium polium* Subsp. vincentinum[J]. Tetrahedron，1990，46（3）：847-860.

（下转第2589页）