

# 广东石豆兰中的噁庚英和联苳类化合物

吴 斌<sup>1</sup>, 陈坚波<sup>2</sup>, 何 山<sup>1</sup>, 潘远江<sup>1</sup>

(1. 浙江大学化学系, 杭州 310027; 2. 金华职业技术学院医学院, 金华 321000)

**摘要** 从兰科植物广东石豆兰(*Bulbophyllum kwangtungense* Schlecht.) 的乙酸乙酯部分分离得到了 2 个新的芪类化合物 5-(2,3-二甲氧苯乙基)-6-甲基苯并[*d*][1,3]二氧戊环(**1**)和 10,11-二氢-2,7-二甲氧基-3,4-亚甲二氧基二苯并[*b, f*]噁庚英(**2**)。药理活性实验结果证明, 化合物 **2** 对体外培养的 Hela 细胞有较强的抑制作用。

**关键词** 广东石豆兰; 二氢二苯噁庚英; 联苳类化合物

中图分类号 O629.9

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)02-0305-04

广东石豆兰(*Bulbophyllum kwangtungense* Schlecht.) 附生于岩石上, 是华南地区的民间草药, 主治风热咽痛、肺热咳嗽、风湿痹痛和跌打损伤<sup>[1]</sup>等症。广东石豆兰分布于浙江、福建、广东及广西等地。前期研究中发现广东石豆兰的乙酸乙酯和正丁醇部位具有一定的杀伤肿瘤细胞的作用<sup>[2]</sup>。从该属植物中发现<sup>[3-6]</sup>芪类多酚类、三萜类、甾类及糖苷类等化合物。

我们曾从广东石豆兰中分离出 3 个二氢二苯噁庚英类化合物<sup>[7]</sup>。本文进一步从该植物的乙酸乙酯提取物中分离得到了 2 个新的芪类化合物: 5-(2,3-二甲氧苯乙基)-6-甲基苯并[*d*][1,3]二氧戊环(**1**)和 10,11-二氢-2,7-二甲氧基-3,4-亚甲二氧基二苯并[*b, f*]噁庚英(**2**)。其英文名称分别为 5-(2,3-Dimethoxyphenethyl)-6-methylbenzo[*d*][1,3]dioxole(**1**)和 10,11-Dihydro-2,7-dimethoxy-3,4-methylenedioxy dibenzo[*b, f*]oxepine(**2**)。药理活性实验结果证明, 化合物 **2** 对体外培养的 Hela 细胞有较强的抑制作用。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

X4 型显微熔点仪; CarloErba EA1110 型元素分析仪; Nicolet 470 FTIR 型红外光谱仪, KBr 压片; JASCO V530 型紫外光谱仪; Bruker Esquire-3000plus 型质谱仪; Bruker Apex III 傅里叶变换高分辨质谱仪; Bruker AM-500 型核磁共振仪。

柱层析和薄层层析硅胶(200 ~ 300 目)为青岛海洋化工厂生产。植物样品采自浙江省遂昌县, 由南京中医药大学吴德康教授鉴定。

### 1.2 实验过程

1.2.1 提取和分离 将 500 g 广东石豆兰地上部分粉碎后, 用体积分数为 90% 的乙醇加热回流提取 3 次。过滤, 浓缩, 得粗提物 30 g。用乙酸乙酯萃取得到乙酸乙酯部分, 经浓缩得到 15 g 乙酸乙酯粗提物。乙酸乙酯粗提物经硅胶拌样进行硅胶柱层析, 用氯仿-丙酮(体积比 20:1)洗脱, 得乙酸乙酯细部位。该细部位经反复硅胶柱层析得到化合物 **1**(13 mg)和化合物 **2**(10 mg)。

化合物 **1** 为白色粉末, 产率 0.0026%; m. p. 221 ~ 223 °C; UV-Vis (Methanol),  $\lambda_{\max}/\text{nm}(\lg \epsilon)$ : 215 (4.60), 250(3.02), 271(3.86); <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据见表 1。ESI-MS,  $m/z$ : 323.3 [M + Na]<sup>+</sup>; 高分辨 FT-ICR-MS,  $m/z$ : 323.1250 [M + Na]<sup>+</sup>。

收稿日期: 2007-07-10。

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20472073)资助。

联系人简介: 潘远江, 男, 博士, 教授, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: cheyjpan@zju.edu.cn

化合物 **2** 为无色针晶, 产率 0.0020%; m. p. 215 ~ 217 °C; UV-Vis (Methanol),  $\lambda_{\max}/\text{nm}(\lg \epsilon)$ : 217(4.81), 254(2.59), 279(3.25);  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据见表 1; ESI-MS,  $m/z$ : 323.1 [M + Na] $^+$ ; 高分辨 FT-ICR-MS,  $m/z$ : 323.0893 [M + Na] $^+$ .

Table 1  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data for compounds **1** and **2** at 500 MHz NMR in  $\text{CDCl}_3$

Compound 1				Compound 2			
Position	$\delta_{\text{H}}(J/\text{Hz})$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC(H→C)	Position	$\delta_{\text{H}}(J/\text{Hz})$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC(H→C)
1		141.6		1	6.25s	107.9	C2, C3, C12, C13
2		136.4		2		139.8	
3	6.19s	113.5	C1, C2, C4, C5	3		134.7	
4		140.6		4		139.3	
5		135.2		5			
6	6.40s	109.6	C1, C2, C4, C <sub>a</sub>	6	6.64d(3.1)	115.4	C7, C8, C14, C15
1'		128.7		7		152.1	
2'		144.8		8	6.67dd(8.2, 3.1)	113.9	C6, C7, C9, C15
3'		141.6		9	7.10d(8.2)	121.8	C7, C8, C14, C15
4'	6.74dd(7.5, 2.2)	115.0	C2', C2', C6	10	3.04m	31.4	C9, C14, C15, C12
5'	6.87t(7.5)	125.5	C3', C1'	11	3.08m	30.8	C1, C12, C13, C15
6'	6.62dd(7.5, 2.2)	121.9	C4', C1', C <sub>a</sub> '	12		126.9	
a	2.42m	31.4	C1, C2, C6, C1'	13		136.2	
a'	2.42m	31.9	C1, C1', C2', C4'	14		151.0	
2'-OCH <sub>3</sub>	3.89s	51.8	C2'	15		132.8	
3'-OCH <sub>3</sub>	3.84s	57.6	C3'	16	3.84s	57.0	C2
OCH <sub>2</sub> O	6.00s	103.4	C4, C5	17	3.75s	55.7	C7
CH <sub>3</sub>	2.42s	24.3	C1, C3	18	5.99s	102.2	C3, C4

1.2.2 抗肿瘤活性测定 取处于对数生长期的 HeLa 细胞, 加入适量的 Trypsin 液消化, 使贴壁细胞脱落, 用 10 mL 含质量分数为 10% 的新生牛血清的 RPMI1640 培养液配成单细胞悬液. 计数后, 用完全培养液稀释成  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液. 取 96 孔板, 每孔加上述细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ , 在含体积分数为 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中, 于 37 °C 培养 24 h. 依次加入 6 个浓度的化合物 **1**, **2** 和二甲亚砜 (DMSO), 每个浓度 4 孔. 在 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中, 于 37 °C 继续培养 48 h. 培养终止前 2 h, 每孔加入 1 mg/mL 噻唑兰 (MTT) 100  $\mu\text{L}$ , 继续温育 4 h. 吸去上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  酸性 DMSO, 摇匀, 用酶标仪于 570 nm 处测定每孔的 OD 值. 重复 3 次实验, 用 Bliss 法求出  $\text{IC}_{50}$  [8,9].

## 2 结果与讨论

### 2.1 化合物 **1** 的结构鉴定

化合物 **1** 为白色粉末, 高分辨 FT-ICR-MS 给出 [M + Na] $^+$  峰: 323.1250, 确定其分子式为  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_4$  (计算值 323.1254). 其结构如图 1 所示.

IR 光谱中出现芳香特征吸收峰 (1615, 1497, 1356  $\text{cm}^{-1}$ ); UV 谱显示苯环特征吸收带 215 (4.60), 250 (3.02), 271 (3.86) nm.

$^1\text{H}$  NMR 谱显示, 分子中存在 5 个芳香质子信号, 其中明显有 3 个 1, 2, 3 偶合的芳香质子  $\delta_{\text{H}}$  6.74

(dd,  $J=7.5, 2.2$  Hz, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  6.87(t,  $J=7.5$  Hz, 1H) 和  $\delta_{\text{C}}$  6.62(dd,  $J=7.5, 2.2$  Hz, 1H); 2 个孤立的芳香质子  $\delta_{\text{H}}$  6.19(s, 1H) 和  $\delta_{\text{H}}$  6.40(s, 1H). 在  $^1\text{H}$  NMR 谱中还可以观察到一个亚甲二氧基  $\delta_{\text{H}}$  6.00(s, 2H); 2 个甲氧基  $\delta_{\text{H}}$  3.89(s, 3H) 和 3.84(s, 3H); 2 个亚甲基  $\delta_{\text{H}}$  3.08(m, 4H) 以及一个甲基基团  $\delta_{\text{H}}$  2.42(s, 3H). 由  $^{13}\text{C}$  NMR 谱和 DEPT 谱显示, 分子中存在 2 个苯环. 从 2 个亚甲基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  31.4 和 31.9 以及分子中存在 2 个苯环可以推测, 该化合物具有联苯母体结构. 由于 2 个苯环上除了存在 7 个取代位置外, 在氢谱中还观察到 5 个芳香质子信号, 由此也可以排除是二氢二苯噻庚英类化合物的可能性. 依据上述分析确定该化合物为一个联苯类化合物. 在天然物中很少发现苯环上有甲基

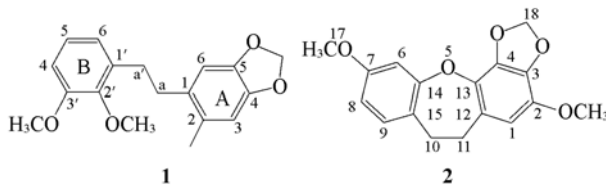


Fig. 1 Structures of compounds **1** and **2**

取代的联苳化合物。

从 HMBC 谱(图 2)可以发现, 甲基质子信号  $\delta_{\text{H}} 2.42(\text{s}, 3\text{H})$  与 1 位碳信号  $\delta_{\text{C}} 141.6(\text{s})$  和 3 位的碳信号  $\delta_{\text{C}} 113.5(\text{d})$  有相关关系, 说明该化合物中唯一的甲基应连接在 2 位碳上。由于  $^1\text{H}$  NMR 中存在 2 个孤立的芳香质子, 亚甲二氧基有可能连接在 4 位和 5 位碳上。在 HMBC 谱中, 孤立芳香质子  $\delta_{\text{H}} 6.62(\text{dd}, J=7.5, 2.2 \text{ Hz}, 1\text{H})$  与 2 个携氧碳信号  $\delta_{\text{C}} 140.6(\text{s})$  和  $\delta_{\text{C}} 135.2(\text{s})$  有远程相关关系, 进一步证明了亚甲二氧基连接在 4 位和 5 位碳位上。由于分子中存在 3 个 1, 2, 3 偶合的芳香质子体系, 因此位于 A 环上的 2 个甲氧基必然位于 2'位和 3'位上。

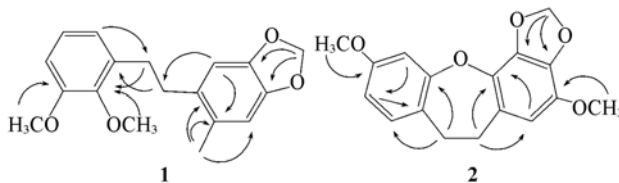


Fig. 2 Key HMBC correlations of compounds 1 and 2

从 HMBC 谱还可以发现, 甲氧基质子  $\delta_{\text{H}} 3.89(\text{s}, 3\text{H})$  与碳信号  $\delta_{\text{C}} 144.8(\text{s})$  有远程相关关系, 说明这个甲氧基连接在这个碳上。而 a' 位的亚甲基质子与这个碳信号  $\delta_{\text{C}} 144.8(\text{s})$  有相关关系, 说明一个甲氧基位于 2'位上, 另一个甲氧基  $\delta_{\text{H}} 3.84(\text{s}, 3\text{H}), \delta_{\text{C}} 57.6(\text{q})$  必然位于 3'位上。

综合上述分析, 该化合物为一个新的联苳类化合物, 命名为 5-(2, 3-Dimethoxyphenethyl)-6-methylbenzo[*d*][1,3]dioxole。

## 2.2 化合物 2 的结构鉴定

化合物 2 为无色针状结晶, FT-ICR-MS 给出  $[M + \text{Na}]^+$  峰: 323.0893, 确定其分子式为  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$  (计算值 323.0890)。结构如图 1 所示。在红外光谱中出现芳香特征吸收峰 ( $1620, 1503, 1353 \text{ cm}^{-1}$ ); UV 谱图显示苯环特征吸收带 217(4.81), 254(2.59), 279(3.25) nm。化合物 2 的  $^1\text{H}$  NMR 谱显示 1,3,4-取代的苯环结构 [ $\delta_{\text{H}} 6.64(1\text{H}, \text{d}, J=3.1 \text{ Hz}, \text{H}_6), 6.67(1\text{H}, \text{dd}, J=8.2, 3.1 \text{ Hz}, \text{H}_8), 7.10(1\text{H}, \text{d}, J=8.2 \text{ Hz}, \text{H}_9)$ ]; 1 个孤立的芳香质子信号  $\delta_{\text{H}} 6.25(1\text{H}, \text{s}, \text{H}_1)$ ; 6 个甲氧基质子信号  $\delta_{\text{H}} 3.84$  和  $3.75(6\text{H}, 2\text{s}, \text{Me-16 和 17})$ ; 2 个亚甲二氧基质子信号  $\delta_{\text{H}} 5.99(2\text{H}, \text{s}, \text{H}_{18})$ ; 4 个互相偶合的苳位亚甲基信号  $\delta_{\text{H}} 3.04(2\text{H}, \text{m}, \text{H}_{10})$  和  $3.08(2\text{H}, \text{m}, \text{H}_{11})$ 。

$^{13}\text{C}$  NMR 谱显示 17 个碳信号, 其中 12 个碳原子位于高场区, 说明该分子中含有 2 个苯环结构。从分子式  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$  可以计算出化合物 2 含有 10 个不饱和度, 所以分子中除了含 2 个苯环之外, 还应该具有 2 个环体系。从分子中含有 7 个携氧碳(5 个芳香碳和 2 个脂肪族碳)却只有 5 个氧原子来分析, 结构中应该至少存在 2 个环醚。化合物 2 的碳和氢的归属是通过分析该化合物的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC 和 HMBC 谱(图 2)来确定的。两个互相偶合的亚甲基通过  $^3J$  偶合与苯环上两个携氧碳有相关关系, 说明化合物中含有一个二氢二苳噁庚英的基本骨架。从  $^1\text{H}$  NMR 谱和  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 相关谱的分析可以得出 3 个芳香氢原子位于同一个苯环上, 这个苯环上还有一个位置必然被甲氧基取代。从上述分析可以确定, 余下的一个芳氢、另一个甲氧基和亚甲二氧基位于另一个苯环上。接下来确定甲氧基的亚甲二氧基的位置, 就可以确定化合物 2 的结构。

在 HMBC 相关谱中可以观察到, 孤立芳香质子信号  $\delta_{\text{H}} 6.25(\text{s}, \text{H}_1)$  与苳位亚甲基碳信号  $\delta_{\text{C}} 30.8(\text{t}, \text{C}_{11})$  具有  $^3J$  偶合相关关系, 说明孤立芳香质子位于苳位亚甲基  $\text{C}_{11}$  的间位, 即 1 位碳上。亚甲基质子  $\delta_{\text{H}} 3.04(\text{m}, \text{H}_{10}), 3.08(\text{m}, \text{H}_{11})$  和孤立芳香质子  $\delta_{\text{H}} 6.25(\text{s}, \text{H}_1)$  与苯环碳信号  $\delta_{\text{C}} 126.9(\text{s}, \text{C}_{12})$  有相关关系说明, 其中一个亚甲基连接在其中一个苯环的 12 位上。两个亚甲二氧基质子信号  $\delta_{\text{H}} 5.99(\text{s}, \text{H}_{18})$  与剩下的携氧芳香碳信号  $\delta_{\text{C}} 134.7(\text{s}, \text{C}_3)$  和  $139.3(\text{s}, \text{C}_4)$  具有相关关系, 说明亚甲二氧基连接在  $\text{C}_3$  和  $\text{C}_4$  位。由于孤立芳香质子信号  $\delta_{\text{H}} 6.25(\text{s}, \text{H}_1)$  与连接亚甲二氧基的一个碳原子  $\delta_{\text{C}} 134.7(\text{s}, \text{C}_3)$  有相关关系, 所以可以把这两个碳信号区别开来。甲氧基质子信号  $\delta_{\text{H}} 3.84(\text{s}, \text{H}_{16})$  与芳香碳原子  $\delta_{\text{C}} 139.8(\text{s}, \text{C}_2)$  有相关关系, 说明这个甲氧基连接在 2 位碳原子上, 而孤立芳氢质子  $\delta_{\text{H}} 6.25(\text{s}, \text{H}_1)$  与 2 位碳原子有相关关系, 说明甲氧基只能连接在 1 位的邻位, 即 2 位碳原子上。

通过上述分析, 化合物 2 被确定为 10,11-Dihydro-2,7-dimethoxy-3,4-methylenedioxy dibenzo[*b,f*]oxepine。

### 2.3 生物活性

生物活性实验结果表明, 化合物 **2** 对 HeLa 细胞显示中等强度的体外抑制活性, 最大抑瘤率在 95% 以上,  $IC_{50} = 47.2 \mu\text{g/mL}$ .

### 参 考 文 献

- [ 1 ] YI Yi-Pei(易绮斐), XING Fu-Wu(邢福武). Journal of Tropical and Subtropical Botany(热带亚热带植物学)[J], 2005, **13**: 65—69
- [ 2 ] WU Bin(吴斌), WU De-Kang(吴德康). Journal of Nanjing University of TCM, Natural Science Edition(南京中医药大学学报, 自然科学版)[J], 2004, **20**: 114—115
- [ 3 ] Majumder P. L., Roychowdhury M., Chakraborty S.. Phytochemistry[J], 1997, **44**: 167—172
- [ 4 ] Leong Y. W., Kang C. C., Harrison P., et al.. Phytochemistry[J], 1997, **44**: 157—166
- [ 5 ] Majumder P. L., Lahiri S., Pal S. J. Indian Chem. Soc. [J], 1994, **71**: 645—648
- [ 6 ] Majumder P. L., Pal S.. Phytochemistry[J], 1993, **32**: 1561—1566
- [ 7 ] Wu B., He S., Pan Y.. Planta Medica[J], 2006, **72**: 1244—1247
- [ 8 ] WANG Xiao-Hong(王晓红), WANG Li-Min(王立敏). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(1): 17—20
- [ 9 ] XIONG Yi(熊轶), WANG Kui-Wu(王奎武), PAN Yuan-Jiang(潘远江), et al.. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(11): 2101—2105

## Oxepine and Bibenzyl Compounds from *Bulbophyllum kwangtungense*

WU Bin<sup>1</sup>, CHEN Jian-Bo<sup>2</sup>, HE Shan<sup>1</sup>, PAN Yuan-Jiang<sup>1\*</sup>

(1. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

2. College of Medicine, Jinhua College of Profession and Technology, Jinhua 321000, China)

**Abstract** Phytochemical investigation of the EtOAc extract of leaves and stems of *Bulbophyllum kwangtungense* Schlecht., belonging to the orchid family was carried out. Two new stilbenoids were isolated by repeat column chromatography and characterized: one is bibenzyl compound, 5-(2,3-dimethoxyphenethyl)-6-methylbenzo[*d*][1,3]dioxole (**1**), and the other dibenz[*b, f*]oxepine, 10,11-dihydro-2,7-dimethoxy-3,4-methylene-dioxy dibenzo[*b, f*]oxepine (**2**). Their structures were established on the basis of analyses of spectroscopic evidence, particularly by two-dimensional NMR spectroscopic analysis. Bibenzyl compound with a methyl group in the benzene ring is rarely found from natural sources. Natural oxepines are very rare, and most of them were reported to have good anti-tumor activities. In addition, anti-tumor activities of the new compounds were also evaluated. Among the compounds isolated, compound **2** showed anti-tumor activities with  $IC_{50}$  value of  $47.2 \mu\text{g/mL}$  *in vitro* against cultures of HeLa cells.

**Keywords** *Bulbophyllum kwangtungense*; Oxepine; Bibenzyl compound

(Ed.: H, J, Z)