

南美蟛蜞菊中二萜化学成分的定性与定量分析研究

贾永霞¹, 任慧^{1,2}, 周忠玉¹, 徐信兰¹, 谭建文^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了解南美蟛蜞菊 [*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski] 植物的化学成分, 从其全株乙醇提取物中分离得到 8 个二萜类化合物。经光谱分析, 分别鉴定为 *ent*-16 β ,17-dihydroxy-9(11)-kauren-19-oic acid (**1**)、cussovantonin B (**2**)、*ent*-16-kauren-19-oic acid (**3**)、*ent*-3 β -hydroxy-16-kauren-19-oic acid (**4**)、16 α -hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (**5**)、2 β ,16 α -dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (**6**)、3 α -angeloyloxypterokaurene L₃ (**7**) 和 pterokaurene L₃ (**8**)。化合物 **4** 为首次从蟛蜞菊属植物中分离获得, 化合物 **1**、**2** 和 **6** 为首次从南美蟛蜞菊中分离得到。化合物 **3** 具有显著的抗菌活性和显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性。采用五氟苄溴进行底物五氟苄基衍生化并结合 GC-MS 分析表明, 化合物 **3** 在南美蟛蜞菊茎和叶中的含量分别为 (1.00 \pm 0.21) mg g⁻¹ FW 和 (0.78 \pm 0.04) mg g⁻¹ FW。

关键词: 南美蟛蜞菊; 二萜化合物; 抗菌; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 定量分析

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.06.016

Qualitative and Quantitative Analysis of Diterpenoid Compounds in *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

JIA Yong-xia¹, REN Hui^{1,2}, ZHOU Zhong-yu¹, XU Xin-lan^{1,2}, TAN Jian-wen^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to understand the chemical constituents of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, eight diterpenoids were isolated from the ethanol extract of its whole plants. On the basis of spectral data, they were identified as *ent*-16 β ,17-dihydroxy-9(11)-kauren-19-oic acid (**1**), cussovantonin B (**2**), *ent*-16-kauren-19-oic acid (**3**), *ent*-3 β -hydroxy-16-kauren-19-oic acid (**4**), 16 α -hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (**5**), 2 β ,16 α -dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (**6**), 3 α -angeloyloxypterokaurene L₃ (**7**) and pterokaurene L₃ (**8**). Compound **4** were isolated from genus *Sphagneticola* for the first time, and compounds **1**, **2** and **6** were isolated from *S. trilobata* for the first time. Compound **3** showed strong antibacterial activity against several bacteria and further inhibited significantly α -glucosidase activity *in vitro*. Based on structural derivation with pentafluorobenzyl bromide coupled with GC-MS techniques, the contents of compound **3** in the stem and leaves of *S. trilobata* were (1.00 \pm 0.21) mg g⁻¹ FW and (0.78 \pm 0.04) mg g⁻¹ FW, respectively.

Key words: *Sphagneticola trilobata*; Diterpenoids; Antibacterial; α -Glucosidase inhibitor; Quantitative analysis

南美蟛蜞菊 [*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski] 别名三裂叶蟛蜞菊、地锦花、穿地龙, 为菊科 (Compositae) 蟛蜞菊属多年生草本植物, 原产于热

带美洲, 现在广泛分布在全球热带、亚热带地区。南美蟛蜞菊因具有强的入侵扩张能力, 已被列为“世界 100 种恶性外来入侵生物”之一^[1-2]。南美蟛

收稿日期: 2015-02-05

接受日期: 2015-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270406); 广东省自然科学基金项目(2014A030313742); 中国科学院仪器功能开发项目(YG2012050)资助
作者简介: 贾永霞, 女, 高级工程师, 主要从事色谱仪器分析工作。E-mail: jyx@scbg.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: jwntan@scbg.ac.cn

蜈蚣自 20 世纪 70 年代作为地被植物引入我国,很快便逸生为园圃杂草,目前已对华南很多地区的农田、果园等造成显著危害,严重破坏了森林景区的生态环境,威胁着华南地区的物种多样性,并造成较大的经济损失^[3]。

据文献报道,南美蜈蚣菊在加勒比海和中美洲地区被民间用作传统药物,医治蛇伤、感冒、腰痛、肌肉痉挛、风湿病、褥疮、关节炎等多种疾病^[2,4]。目前已报道的南美蜈蚣菊化学成分主要有倍半萜、二萜、三萜等类型,其中部分化合物已被揭示具有抗疟疾、抗菌、抗肿瘤或抗病毒等活性^[2-9]。为进一步揭示南美蜈蚣菊的生物活性化学物质基础,我们对南美蜈蚣菊全株的化学成分进行了系统研究。

本文报道其二萜化合物的分离鉴定及其抗菌和抑制 α -葡萄糖苷酶方面的活性,同时采用五氟苯基衍生化结合 GC-MS 分析技术对强活性二萜化合物 **3** 在南美蜈蚣菊茎和叶中的含量进行测试分析。

1 材料和方法

1.1 材料

用于二萜成分提取分离的南美蜈蚣菊 [*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski] 全株材料于 2011 年 9 月采自中国科学院华南植物园科研生活区,经中国科学院华南植物园邢福武研究员鉴定,标本保存于中国科学院华南植物园生物有机化学实验室。2014 年 11 月又在同地采集南美蜈蚣菊茎和叶用于分析化合物 **3** 的含量。

正相层析硅胶为青岛海洋化工有限公司产品(80~100 目, 200~300 目);反相层析硅胶 YMC ODS-A (50 μm) 为日本 YMC 公司生产;薄层色谱正相硅胶板(HFGF₂₅₄)为山东烟台江友硅胶开发有限公司产品;凝胶 Sephadex LH-20 为瑞典 Amersham Biosciences 公司生产;氘代试剂为 Sigma 公司产品。显色方法包括紫外荧光显色(254 nm)、碘蒸气显色和喷洒硫酸-乙醇溶液(10:90, V/V)加热显色。

1.2 仪器

电喷雾质谱(ESIMS)采用美国应用生物系统公司 MDS SCIEX API 2000LC/MS/MS 仪;¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱采用 Bruker Avance 600 和 Bruker Avance HD 500 核磁共振仪,并以四甲基硅烷为内标;中压半制备使用北京创新通恒科技有限公

司的 HPLC 半制备系统,泵型号 P3000,检测器为 UV3000 UV-VIS,反相色谱柱(400 mm \times 25 mm i.d.);减压浓缩采用日本东京理化公司 N-1000 旋转蒸发器、CCA-1110 循环式冷却箱和 SB-1000 电热恒温水浴锅;GC-MS 分析采用 Shimadzu 公司 GCMS-QP2010Plus 仪,色谱柱为 HP-5MS (30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm film.)。

1.3 提取和分离

南美蜈蚣菊全株(干重 8 kg)粉碎后用 95% 的乙醇在室温浸泡提取 3 次,每次 2 d,合并提取液;经减压浓缩将提取液中乙醇抽干后加适量水使其成为混悬液,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,各萃取 4 次;减压浓缩后分别得到石油醚部分(180 g)、乙酸乙酯萃取部分(140 g)。

石油醚萃取部分经正相硅胶柱层析(200~300 目),以石油醚-丙酮 50:1~0:1, V/V, 每次 10 L)梯度洗脱,检测合并主点相同的流分,得到 P₁~P₁₂ 共 12 个组分。组分 P₅ (18.8 g)用石油醚-丙酮(10:1)洗脱,经正相硅胶柱层析(200~300 目)以石油醚-乙酸乙酯(40:1~1:1)梯度洗脱,检测合并主点相同的流分,得到 P_{5,1}~P_{5,5} 共 5 个组分。P_{5,3} (8.9 g)经 ODS 反相硅胶柱层析(50 μm),以甲醇-水(60:40~100:0)梯度洗脱,检测合并主点相同的流分,得到 P_{5,3,1}~P_{5,3,6} 共 6 个亚组分。P_{5,3,1} (0.11 g)、P_{5,3,3} (0.08 g)分别经 Sephadex LH-20 柱层析,以氯仿:甲醇(1:4)洗脱,得到化合物 **8** (13.6 mg)和 **4** (7.5 mg)。P₈ 组分(4.2 g)用石油醚-丙酮(2:1)洗脱,经 ODS 反相硅胶柱层析(50 μm),以甲醇-水(50:50~100:0)梯度洗脱,检测合并主点相同的流分,得到 P_{8,1}~P_{8,5} 共 5 个组分。P_{8,4} (0.4 g)经正相硅胶柱层析(200~300 目),以石油醚-乙酸乙酯(5:1)梯度洗脱,得到化合物 **7** (8.9 mg)和 **5** (9.4 mg)。

乙酸乙酯萃取部分(140 g)经正相硅胶柱层析(200~300 目),以氯仿-甲醇(50:1~0:1, 每次 9 L)梯度洗脱,检测合并主点相同的流分,得到 E₁~E₁₁ 共 11 个组分。E₂ 组分(17.6 g)用氯仿-甲醇(50:1)洗脱,经正相硅胶柱层析(200~300 目),以石油醚-乙酸乙酯(20:1~2:1)梯度洗脱,检测合并主点相同的流分,得到 E_{2,1}~E_{2,5} 共 5 个组分。E_{2,1} (0.12 g)经 Sephadex LH-20 柱层析,以氯仿:甲醇(1:4)洗脱,得到化合物 **3** (25.0 mg)。E₃ 组分(26.7 g)用氯仿-甲醇(25:1)洗脱,经正相硅胶柱层析(200~300 目)以氯仿-甲

627 [2M + Na]⁺, 325 [M + Na]⁺, 303 [M + H]⁺, ESI-MS (-) *m/z*: 603 [2M-H]⁻, 301 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 4.78 (1H, s, H-17a), 4.72 (1H, s, H-17b), 2.62 (s, 1H, H-13), 1.22 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 184.7 (C-19), 156.1 (C-16), 103.2 (C-17), 57.3 (C-5), 55.4 (C-9), 49.2 (C-15), 44.5 (C-4), 44.1 (C-13), 44.0 (C-8), 41.5 (C-7), 40.9 (C-1), 39.9 (C-10, C-14), 38.0 (C-3), 33.3 (C-12), 29.2 (C-18), 22.1 (C-6), 19.3 (C-2), 18.7 (C-11), 15.8 (C-20)。上述光谱数据与文献[12]报道一致。

ent-3β-hydroxy-16-kauren-19-oic acid (4)

白色粉末; 分子式为 C₂₀H₃₀O₃; ESI-MS (-) *m/z*: 317 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 4.82 (1H, s, H-17a), 4.76 (1H, s, H-17b), 4.59 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.2 Hz, H-3), 1.30 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 180.3 (C-19), 155.5 (C-16), 103.4 (C-17), 78.9 (C-3), 56.5 (C-5), 55.3 (C-9), 48.9 (C-15), 48.2 (C-4), 44.1 (C-8), 43.9 (C-13), 41.1 (C-7), 39.6 (C-14), 39.5 (C-1), 38.9 (C-10), 33.2 (C-12), 27.9 (C-2), 24.1 (C-18), 21.7 (C-6), 18.7 (C-11), 15.5 (C-20)。上述光谱数据与文献[13]报道一致。

16α-Hydroxy-ent-kauran-19-oic acid (5)

白色粉末; 分子式为 C₂₀H₃₂O₃; ESI-MS (+) *m/z*: 664 [2M + Na]⁺, 343 [M + Na]⁺, ESI-MS (-) *m/z*: 639 [2M-H]⁻, 319 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, C₅D₅N): δ 2.49 (1H, d, *J* = 13.0 Hz, H-3), 2.31 (1H, m, H-2), 2.23 (1H, m, H-6), 2.14 (1H, br s, H-13), 1.97 (1H, d, *J* = 13.7 Hz, H-15), 1.90 (1H, d, *J* = 12.7 Hz, H-1), 1.78 (1H, d, *J* = 12.8 Hz, H-7), 1.69 (1H, d, *J* = 13.7 Hz, H-15), 1.58 (3H, s, H-17), 1.36 (3H, s, H-18), 1.22 (3H, s, H-20), 0.88 (1H, m, H-1); ¹³C NMR (150 MHz, C₅D₅N): δ 180.7 (C-19), 78.5 (C-16), 59.1 (C-15), 57.6 (C-5), 56.9 (C-9), 49.7 (C-13), 46.1 (C-8), 44.5 (C-4), 43.2 (C-7), 41.6 (C-1), 40.6 (C-10), 39.3 (C-3), 38.6 (C-14), 29.9 (C-18), 27.8 (C-12), 25.6 (C-17), 23.4 (C-6), 20.4 (C-2), 19.2 (C-11), 16.6 (C-20)。上述光谱数据与文献[14]报道一致。

2β,16α-Dihydroxy-ent-kauran-19-oic acid (6)

白色粉末; 分子式为 C₂₀H₃₂O₄; ESI-MS (+) *m/z*: 695 [2M + Na]⁺, 359 [M + Na]⁺, ESI-MS (-) *m/z*: 671 [2M-H]⁻, 335 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 4.10 (1H, ddd, *J* = 11.4, 6.9, 4.7 Hz, H-2), 1.34 (3H,

s, H-17), 1.25 (3H, s, H-18), 0.99 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 181.0 (C-19), 79.8 (C-16), 65.0 (C-2), 58.4 (C-15), 57.5 (C-5), 57.3 (C-9), 50.6 (C-1), 49.5 (C-13), 47.7 (C-3), 46.3 (C-8), 45.8 (C-4), 43.1 (C-7), 42.1 (C-10), 38.5 (C-14), 29.4 (C-18), 27.8 (C-12), 24.4 (C-17), 23.0 (C-6), 19.4 (C-11), 17.3 (C-20)。上述光谱数据与文献[15]报道一致。

3α-Angeloyloxypterokaurene L₃ (7) 白色粉末; 分子式为 C₂₅H₃₆O₅; ESI-MS (+) *m/z*: 439 [M + Na]⁺, 417 [M+H]⁺, ESI-MS (-) *m/z*: 831 [2M-H]⁻, 415 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.04 (1H, qd, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-3'), 4.79 (1H, s, H-17a), 4.75 (1H, s, H-17b), 4.62 (1H, dd, *J* = 12.2, 4.7 Hz, H-3), 1.95 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-4'), 1.85 (3H, t, *J* = 1.5 Hz, H-5'), 1.28 (3H, s, H-18), 1.15 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 180.1 (C-19), 167.9 (C-1'), 154.9 (C-16), 138.2 (C-3'), 129.0 (C-2'), 103.7 (C-17), 78.6 (C-3), 77.6 (C-9), 49.4 (C-5), 49.2 (C-8), 48.2 (C-4), 43.9 (C-10), 43.9 (C-15), 42.4 (C-13), 40.5 (C-14), 36.1 (C-7), 34.7 (C-12), 30.8 (C-1), 30.2 (C-11), 24.3 (C-18), 24.1 (C-2), 21.6 (C-6), 20.9 (C-5'), 17.4 (C-20), 15.9 (C-4')。上述光谱数据与文献[6]报道一致。

Pterokaurene L₃ (8) 白色粉末; 分子式为 C₂₀H₃₀O₃; ESI-MS (+) *m/z*: 659 [2M + Na]⁺, 341 [M + Na]⁺, ESI-MS (-) *m/z*: 635 [2M-H]⁻, 317 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 4.78 (1H, s, H-17a), 4.75 (1H, s, H-17b), 1.23 (3H, s, H-18), 1.08 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 184.4 (C-19), 155.2 (C-16), 103.3 (C-17), 77.8 (C-9), 50.2 (C-5), 49.3 (C-8), 44.1 (C-10), 44.0 (C-15), 44.0 (C-4), 42.3 (C-13), 40.6 (C-7), 37.6 (C-3), 36.2 (C-1), 34.5 (C-14), 32.3 (C-12), 29.6 (C-11), 29.2 (C-18), 21.8 (C-6), 19.1 (C-2), 17.6 (C-20)。上述光谱数据与文献[16]报道一致。

2 抗菌活性

采用刃天青显色法^[17]和96孔稀释滴度技术, 测定化合物 **1-8** 对4种病原菌, 即金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、萎蔫短小杆菌(*Curtobacterium flaccumfaciens*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Shigella dysenteriae*)的最低抑

菌浓度(MIC)。先将 100 μL 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的刃天青溶液放置到无菌的 96 孔板上的第 11 列板孔里; 取 7.5 mL 的指示剂溶液与 5 mL 的待测菌溶液 (10^6 CFU mL^{-1}) 混合; 接着转移 100 μL 到第 1 至第 10 列以及第 12 列所有测试孔中; 待测样品 (1 mg mL^{-1}) 溶液 100 μL 加入到第一列板孔中; 这时再从第一列取出 100 μL 的溶液转移到第二列, 然后接下列用同样的方法(倍增稀释)到第 10 列, 再从第 10 列取出 100 μL 弃掉以保证每一列的孔中的溶液均为 100 μL 。最后, 将加好样品的孔板放入到恒温培养箱, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5~6 h, 直到孔板的

染色变成生长色: 粉红色。检测活性标准: 若颜色无变化仍为蓝色表示有活性, 颜色从蓝色变为粉红色, 表示无抑菌活性; 发生的颜色变化的最低稀释浓度被认为是待测化合物的最低抑菌浓度(MIC)。一个 96 孔板可同时测量 6 个样品、1 个阳性对照和 1 个阴性对照, 每个处理重复 3 次, 以硫酸卡那霉素作为阳性对照。测试结果可见化合物 **3** 具有与阳性对照硫酸卡那霉素接近或相当的体外抑制 4 种测试菌的活性, 化合物 **4** 仅有较弱的抑菌活性(MIC 值 $\geq 25 \mu\text{g mL}^{-1}$), 而其他化合物则不显示明显的抗菌活性(MIC 值 $>100 \mu\text{g mL}^{-1}$)(表 1)。

表 1 化合物 1~8 对 4 种细菌的最小抑菌浓度 MIC 值($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Table 1 MICs ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of compounds 1~8 against four bacterial strains

细菌 Bacteria	化合物 Compounds				硫酸卡那霉素 Kanamycin sulfate
	1~2	3	4	5~8	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	>100	6.25	25	>100	3.125
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	>100	12.5	50	>100	6.25
萎蔫短小杆菌 <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	>100	12.5	>100	>100	3.125
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	>100	3.125	25	>100	3.125

3 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

采用比色法^[17]在 96 孔细胞培养板中对二萜化合物 1~8 进行抑制 α -葡萄糖苷酶活性的分析。先将供试化合物及阿卡波糖用 DMSO 溶解, 然后将 20 μL 的 α -葡萄糖苷酶(0.8 U)加入到样品孔中, 将测试样品溶液用磷酸缓冲液按一定比例稀释, 每孔加入样品溶液 120 μL , 使测试样品的最终浓度分别为 500、250、125、62.5、31.25、15.625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 最后再加入 20 μL 反应底物 4-硝基酚- α -D-吡喃葡

萄糖苷(5 mmol L^{-1}), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 15 min 后, 每个样品孔中加入 80 μL 的 NaCO_3 溶液(0.2 mol L^{-1}) 终止反应, 在 405 nm 波长处比色测定。阴性对照为溶解样品溶液按测试样品的最终浓度用磷酸缓冲液稀释加入反应, 空白对照以相同体积的磷酸缓冲液代替酶溶液, 阴性空白以缓冲溶液代替样品测试溶液加入反应孔中, 样品空白以相同体积的磷酸缓冲液代替酶溶液, 采用阿卡波糖做阳性对照。抑制率计算公式如下:

$$\text{化合物的抑制率 (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{阴性空白}}) - (\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{样品空白}})}{(\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{阴性空白}})} \times 100\%$$

测试化合物对 α -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度 (IC_{50}) 由剂量效应曲线得到。结果表明, 仅化合物 **3**、**4** 和 **8** 对 α -葡萄糖苷酶有抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为 (0.112 ± 0.003)、(0.349 ± 0.030) 和 (0.432 ± 0.006) mmol L^{-1} , 阳性对照阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的 IC_{50} 为 (0.409 ± 0.006) mmol L^{-1} , 而其他

化合物均不显示明显的抑制活性 ($\text{IC}_{50} > 100 \text{ mmol L}^{-1}$)。

4 茎和叶中化合物 3 的含量

采用五氟苄溴对底物分子进行五氟苄基化衍生并结合 GC-MS 分析的方法测定化合物 **3** 在南

美蟛蜞菊茎和叶中的含量。化合物 **3** 为具有一个羧基官能团的二萜化合物分子, 此类有机化合物分子于 55℃ 在三乙胺等有机碱催化下能与五氟苄溴反应, 迅速并较完全 (>99%) 地转化为羧基被五氟苄基化的衍生物, 此类羧基被五氟苄基化的衍生物在 GC-MS 分析中能呈现 $[M]^+$ 以及 $m/z=[M-181]^+$ 和 181 的特征离子峰, 可进行定性和定量分析检测(图 2)。首先构建化合物 **3** 的标准曲线(方程), 准确称量 5 个质量的化合物 **3** 分别放入 5 个 2 mL 样品瓶中, 各自分别加入 10 μL 三乙胺和 10 μL 五氟苄溴后置于 55℃ 封盖反应 30 min, 然后氮气吹干反应溶剂, 用对应适量的二氯甲烷溶液定容, 分别配制成 10、5、2、1、0.5 mg mL^{-1} 的溶液并转移至 GC-MS 样品瓶进行 GC-MS 分析, 分析条件为: 进样口温度 280℃, 离子源温度 300℃, 传输线温度 300℃, 质量扫描范围是 30~550 aum ; 色谱柱分析条件是初始温度 150℃, 保持 1 min, 然

后以 20℃ min^{-1} 的速度升到 280℃, 保持 10 min, 依据化合物 **3** 样品浓度和 GC-MS 呈现的特征峰值($t_R=9.676$ min)构建化合物 **3** 的标准曲线, 方程为 $Y=278285.1X$; $R=0.99955$, $R^2=0.99911$ 。依据上述条件测定茎和叶中化合物 **3** 的含量, 分别准确称取茎和叶新鲜组织约 1 g, 液氮下磨粉后迅速转移至离心管用正己烷[体积 = 材料鲜重(g)×15 mL]提取 3 次, 离心取上清液合并浓缩至干, 称量提取物质量。提取物中加入 30 μL 三乙胺和 30 μL 五氟苄溴后置于 55℃ 封盖反应 20 min, 氮气吹干反应溶剂后, 用二氯甲烷定容使得提取物浓度为 10 mg mL^{-1} , 转移至 GC-MS 样品瓶进行 GC-MS 分析, 依据 GC-MS 呈现化合物 **3** 的特征峰值并结合标准曲线(方程)计算茎和叶中化合物 **3** 的含量, 实验重复 3 次取平均值。结果表明, 化合物 **3** 在南美蟛蜞菊新鲜茎和叶中的含量分别为 (1.00 ± 0.21) mg g^{-1} 和 (0.78 ± 0.04) mg g^{-1} 。

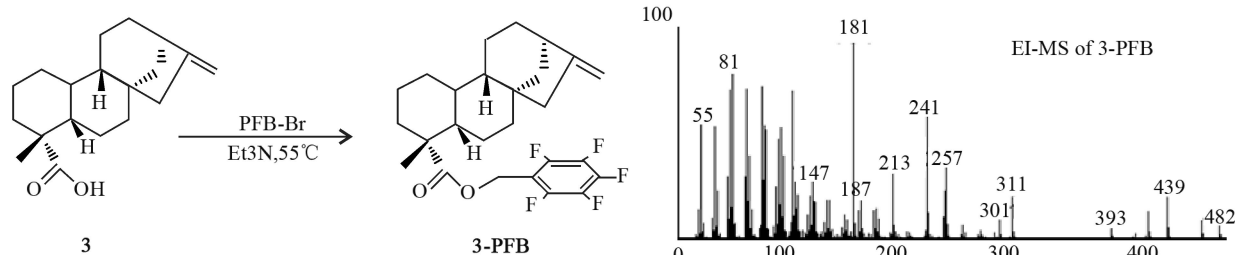


图 2 化合物 **3** 的结构衍生化及衍生化合物 **3-PFB** 的 GC-MS 分析特征质谱图

Fig. 2 Structural derivation of compound **3** and characteristic MS spectral of the derivative of **3-PFB** in GC-MS analysis

5 结论和讨论

本文对南美蟛蜞菊植物的化学成分进行了研究, 从其全株乙醇提取物中分离得到 8 个二萜化合物, 分别鉴定为 *ent*-16 β ,17-dihydroxy-9(11)-kauren-19-oic acid (**1**)、*cussovantonin B* (**2**)、*ent*-16-kauren-19-oic acid (**3**)、*ent*-3 β -hydroxy-16-kauren-19-oic acid (**4**)、16 α -hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (**5**)、2 β ,16 α -dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (**6**)、3 α -angeloyloxypterokaurene L₃ (**7**)和 pterokaurene L₃ (**8**)。其中化合物 **4** 为首次从蟛蜞菊属中分离获得, 化合物 **1**、**2** 和 **6** 为首次从南美蟛蜞菊中分离得到。

利用刃天青染色法对化合物 **1**~**8** 进行了抗 4 种病原菌的活性测试, 结果表明, 化合物 **3** 对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、萎蔫短小杆菌和鼠伤寒沙门氏菌菌株的最低抑菌浓度(MIC 值分别为 6.25、

12.5、12.5 和 3.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$)与阳性对照品硫酸卡那霉素接近或相当(MIC 值为 3.125~6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 化合物 **4** 显示弱的抗菌活性(MIC 值 ≥ 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$)。

采用比色法测试了 8 个二萜化合物抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 结果表明, 化合物 **3** 对 α -葡萄糖苷酶具有比阳性对照阿卡波糖[IC₅₀ 为 (0.409 ± 0.006) mmol L^{-1}]强约 4 倍[IC₅₀ 为 (0.112 ± 0.003) mmol L^{-1}]的抑制活性, 化合物 **4** 和 **8** 显示对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制活性, 但它们的抑制活性都显著弱于化合物 **3**。 α -葡萄糖苷酶抑制剂是治疗 II 型糖尿病的一类重要药物, 化合物 **3** 在作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂用于预防或辅助治疗糖尿病方面具有潜在重要的利用价值。

化合物 **3** 是在抗菌和抑制 α -葡萄糖苷酶方面均具有强生物活性的二萜化合物。采用五氟苄溴对底物进行五氟苄基衍生化并结合 GC-MS 分析

的技术,首次对化合物 **3** 在南美蟛蜞菊茎和叶中的含量进行了分析,结果表明,化合物 **3** 在南美蟛蜞菊新鲜的茎和叶中的含量分别为 (1.00 ± 0.21) mg g⁻¹和 (0.78 ± 0.04) mg g⁻¹,显示南美蟛蜞菊具备直接作为原材料用于化合物 **3** 提取的应用开发潜力。

本研究结果进一步丰富了南美蟛蜞菊的药理活性化学物质基础,揭示了二萜化合物 **3** 显著的抗菌和抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,及其在南美蟛蜞菊植物茎和叶中的含量分布特征,对于促进南美蟛蜞菊植物基于功能活性物质发掘的开发利用具有极其重要的意义。

参考文献

- [1] Lu Q G, Gan H Z. 100 of the world's worst invasive alien species [J]. *World Environ*, 2001(4): 42–44.
陆庆光, 干海珠. 世界100种恶性外来入侵生物 [J]. *世界环境*, 2001(4): 42–44.
- [2] Wu M L, Zhang D Z. Progress of researches on the invasive plant *Wedelia trilobata* [J]. *Pharm Today*, 2008, 18(6): 21–23.
武美兰, 张德志. 入侵植物三裂蟛蜞菊研究进展 [J]. *今日药学*, 2008, 18(6): 21–23.
- [3] Li Y T, Hao X J, Li S F, et al. Eudesmanolides from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. as potential inducers of plant systemic acquired resistance [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(16): 3884–3890.
- [4] Balekar N, Katkam N G, Nakpheng T, et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(3): 817–824.
- [5] Wu M L, Zhang D Z, Xu Q J, et al. Chemical constituents of *Wedelia trilobata* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 2010, 41(5): 681–685.
武美兰, 张德志, 徐庆军, 等. 三裂蟛蜞菊化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 681–685.
- [6] Bohlmann F, Ziesche J, King R M, et al. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an *ent*-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(4): 751–756.
- [7] Ma B J, Wen C N, Gao Y, et al. *ent*-Kaurane diterpenoids from the plant *Wedelia trilobata* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2013, 3(3): 107–111.
- [8] Qiang Y, Du D L, Chen Y J, et al. *ent*-Kaurane diterpenes and further constituents from *Wedelia trilobata* [J]. *Helv Chim Acta*, 2011, 94(5): 817–823.
- [9] That Q T, Jossang J, Jossang A, et al. Wedelolides A and B: Novel sesquiterpene δ -Lactones, (9*R*)-Eudesman-9,12-olides, from *Wedelia trilobata* [J]. *J Org Chem*, 2007, 72(19): 7102–7105.
- [10] Anjaneyulu A S R, Rao V L. Ceriopsins F and G, diterpenoids from *Ceriops decandra* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(8): 1207–1211.
- [11] Harinantenaina L, Kasai R, Yamasaki K. *ent*-Kaurane diterpenoid glycosides from a Malagasy endemic plant, *Cussonia vantsilana* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(4): 367–372.
- [12] Qiang Y, Du D L, Chen Y J, et al. *ent*-Kaurane diterpenes and further constituents from *Wedelia trilobata* [J]. *Helv Chim Acta*, 2011, 94(5): 817–823.
- [13] Silva D M, Costa E V, Nogueira P C D, et al. *ent*-Kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopia laevigata* (Annonaceae) [J]. *Quim Nova*, 2012, 35(8): 1570–1576.
- [14] Duan H Q, Takaishi Y, Momota H, et al. Immunosuppressive diterpenoids from *Tripterygium wilfordii* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(11): 1522–1525.
- [15] Kim Y H, Hyun S H, Kim H S, et al. Microbial transformation of bioactive diterpenoids from *Acanthopanax koreanum* by *Fusarium oxysporum* [J]. *J Microb Biotechn*, 1992, 2(2): 92–97.
- [16] do Nascimento A M, de Oliveira D C R. Kaurene diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. [J]. *J Braz Chem Soc*, 2001, 12(4): 552–555.
- [17] Wang J, Xu Q L, Zheng M F, et al. Bioactive 30-noroleanane triterpenes from the pericarps of *Akebia trifoliata* [J]. *Molecules*, 2014, 19(4): 4301–4312.