

香榧叶的化学成分及生物活性研究

段芳芳¹, 贾晓会¹, 贾珊珊¹, 徐润生^{1,2}, 袁珂^{1,2*}, 童品璋³

1. 浙江农林大学, 浙江 临安 311300

2. 浙江农林大学诸暨创新发展研究院, 浙江 诸暨 311800

3. 诸暨市林业局, 浙江 诸暨 311800

摘要: 目的 对香榧 *Torreya grandis* 叶进行化学成分和生物活性研究。方法 采用 MCI-Gel CHP-20、Diaion HP-20、Toyopearl HW-40、Sephadex LH-20、RP₁₈ 及硅胶等柱色谱法对香榧叶中的化学成分进行分离纯化, 根据理化性质和波谱技术 (¹H-NMR、¹³C-NMR、HR-ESI-MS) 鉴定化合物的结构, 采用海虾致死生物活性法和 MTT 法测定部分化合物的细胞毒活性和抗肿瘤活性。结果 从香榧叶醋酸乙酯部位和正丁醇部位共分离鉴定了 10 个化合物, 分别为香榧酯(1)、花柏酚(2)、4-epiagathadial (3)、3,4-二羟基苯甲酸 3-*O*-β-*D*-葡萄糖苷(4)、脱氢松香酸(5)、反式璎珞柏酸(6)、顺式璎珞柏酸(7)、2-甲氧基-1,4-苯二甲醇(8)、松脂素(9)、β-谷甾醇(10)。其中化合物 1~4 具有一定的细胞毒活性, 对海虾的半数致死浓度 (LC₅₀) 值分别为 7.7、8.0、8.8、4.2 μg/mL; 化合物 4 在 10 μg/mL 时对人肝癌细胞 Huh7 和 HepG2 的抑制率最显著, 分别为 67% 和 69%。结论 以上化合物除化合物 10 外均为首次从该植物中分离得到。生物活性测定结果表明, 化合物 1~4 具有一定的细胞毒活性; 化合物 4 具有较强的 Huh7 和 HepG2 细胞抑制活性。

关键词: 香榧; 细胞毒活性; 香榧酯; 花柏酚; 3,4-二羟基苯甲酸 3-*O*-β-*D*-葡萄糖苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)20-4791-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.013

Studies on chemical constituents and bioactivities of leaves of *Torreya grandis*

DUAN Fang-fang¹, JIA Xiao-hui¹, JIA Shan-shan¹, XU Run-sheng^{1,2}, YUAN Ke^{1,2}, TONG Pin-zhang³

1. Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

2. Zhuji Academy of Innovation and Development, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Zhuji 311800, China

3. The Forestry Bureau of Zhuji, Zhuji 311800, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents and bioactivities of leaves of *Torreya grandis*. **Methods** The chemical constituents were isolated by MCI-Gel CHP-20, Diaion HP-20, Toyopearl HW-40, Sephadex LH-20, RP₁₈ and silica gel column chromatographic methods. Their structures were identified on the basis of physicochemical and spectroscopic analysis. The cytotoxic activity and antitumor activity of compounds 1—4 were investigated by lethal-to-prawn larva bioactivity determining method and MTT assay. **Results** Ten compounds were isolated from EtOAc extract and *n*-BuOH of leaves of *T. grandis*. Their structures were identified as torreyagrandate (1), hinokiol (2), 4-epiagathadial (3), 3,4-dihydroxybenzoic acid 3-*O*-β-*D*-glucoside (4), dehydroabietic acid (5), *trans*-communic acid (6), *cis*-communic acid (7), (2-methoxy-1,4-phenylene) dimethanol (8), pinosresinol (9), and β-sitosterol (10). The bioactivity experiment indicated that compounds 1—4 possessed certain cytotoxic activity towards brine shrimp, and LC₅₀ value were 7.7, 8.0, 8.8, and 4.2 μg/mL, respectively. In addition, it was found that compound 4 presented remarkable inhibitory effect on two kinds of cells of human liver cancer cells of Huh7 (67%) and HepG2 (69%) at a dose of 10 μg/mL. **Conclusion** All compounds are isolated from leaves of *T. grandis* for the first time expect compound 10. Compounds 1—4 exhibit certain cytotoxic activity, and compound 4 displays stronger antitumor activity towards Huh7 and HepG2 liver cancer cells.

Key words: *Torreya grandis* Fort. var. *merrillii* Hu; cytotoxic activity; torreyagrandate; hinokiol; 3,4-dihydroxybenzoic acid 3-*O*-β-*D*-glucuronide

收稿日期: 2018-02-15

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY13H280011)

作者简介: 段芳芳 (1990—), 硕士研究生, 研究方向为森林植物活性成分研究。E-mail: 15225191691@163.com

*通信作者 袁珂 (1959—), 教授, 硕士生导师, 主要从事中草药有效成分研究。E-mail: yuan_ke001@163.com

香榧 *Torreya grandis* Fort. var. *merrillii* Hu, 又称中国榧, 属红豆杉科 (Taxaceae) 榧属 *Torreya* Arn. 常绿乔木^[1]。是我国特有的珍贵经济干果类树种之一, 主要分布在长江以南的安徽、江苏、浙江等省区^[2]。文献报道香榧叶中主要含有挥发油、萜类、黄酮类、生物碱、鞣质、皂苷等成分, 香榧叶水提取物、乙醇提取物以及醋酸乙酯和正丁醇萃取物表现出不同程度的镇痛消炎作用^[3]; 长叶榧叶中提取得到的挥发油对医院常见 7 种致病细菌、真菌 (金葡菌、大肠杆菌等) 具有一定的抑菌和杀菌作用^[4]; 另外陈仁通等^[5]发现长叶榧叶中含有可抑制人体 DNA 多聚酶 β 的化学成分。目前, 国内外尚无对香榧叶的化学成分及生物活性筛选进行系统性的研究报道。为探索香榧叶中具有药效活性的物质基础, 为合理开发利用这一植物资源提供依据, 本实验对香榧叶进行化学成分研究, 并对部分单体化合物进行细胞毒活性以及 MTT 抗肿瘤活性筛选测定。采用 75% 乙醇为溶剂对香榧叶进行冷浸提取, 真空浓缩后采用不同极性的溶剂萃取, 得到各萃取部位。对醋酸乙酯部位和正丁醇部位分别采用 MCI-gel CHP-20、Diaion HP-20、Toyopearl HW-40、Sephadex LH-20、RP-18 及其硅胶等进行反复柱色谱分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为香榧酯 (torreyagrandate, 1)、花柏酚 (hinokiol, 2)、4-epiagathadial (3)、3,4-二羟基苯甲酸 3-*O*- β -D-葡萄糖苷酸 (3,4-dihydroxybenzoic acid 3-*O*- β -D-glucuronide, 4)、脱氢松香酸 (dehydroabietic acid, 5)、反式璎珞柏酸 (*trans*-communic acid, 6)、顺式璎珞柏酸 (*cis*-communic acid, 7)、2-甲氧基-1,4-苯二甲醇 [(2-methoxy-1,4-phenylene) dimethanol, 8]、松脂素 (pinoresinol, 9)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, 10)。化合物 1~9 均为首次从该植物中分离得到。生物活性测定结果表明, 化合物 1~4 具有一定的细胞毒活性, 其中化合物 4 具有较强的人肝癌 Huh7 和 HepG2 细胞抑制活性。

1 材料与仪器

1.1 药材

香榧叶于 2014 年 9 月采自浙江省诸暨市, 经浙江省诸暨市林业局童品璋教授鉴定为红豆杉科榧属植物香榧 *Torreya grandis* Fort. var. *merrillii* Hu。标本存于本实验室。自然风干后粉碎成粗粉, 过 40 目筛, 备用。

1.2 细胞

Huh7、HepG2 细胞均购自浙江省医学科学院动

物中心。

1.3 材料及试剂

柱色谱填料 Diaion HP-20、Toyopearl HW-40、MCI-Gel CHP-20 (日本三菱公司)、Sephadex LH-20 凝胶为 Pharmacia Biotech 产品; RP-18 (日本 YMC 公司); 柱色谱用硅胶 (160~200、200~300 目, 青岛海洋化工厂); 薄层色谱用硅胶 G 和 GF₂₅₄ 均系青岛海洋化工厂产品。

丰年虾卵、碳酸氢钠、无碘海盐 (青岛海大百川生物工程有限公司); 人工海水孵化 2 d 得丰年虾 *Artemia cysts* 幼虫; 96 孔板购自南京建成生物科技有限公司; 胎牛血清 (FBS)、高糖 DMEM 培养基、1640 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 青链霉素混合液 (双抗) 试剂 (美国 Hyclone 公司); 四氮唑化合物 (MTT, 美国 Sigma-aldrich 公司); 二甲基亚砜 (DMSO)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司); 95% 乙醇、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇均为分析纯试剂, 购自华东医药股份有限公司。

1.4 仪器

WRS-1B 型数字熔点测定仪 (上海精密科学仪器有限公司); Bruker DPX-400 核磁共振仪 (TMS 为内标), Bruker 公司; Q-TOF Micro 质谱仪 (美国 Waters 公司, HR-ESI-MS); 真空闪蒸浓缩装置^[6]; RV8 型旋转蒸发器 (德国 IKA 公司); SHZ-D (III) 型循环式真空泵; 电子天平; 电热恒温水槽; 冷冻离心机; 电热恒温鼓风干燥器; 三洋高压灭菌器; 医用超声波清洗器; TECAN Infinite 200 系列多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 集团公司); Galaxy 170S 型细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 涡旋混匀器 (上海振荣科学仪器有限公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); NC-1000 型超净工作台 (苏州苏净公司); 真空干燥箱; Centrifuge 5804R 型低温高速台式离心机、Premium U410 超低温冰箱 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 提取与分离

取干燥的香榧叶粗粉 10 kg, 用 75% 乙醇冷浸提取 3 次, 合并提取液。采用真空闪蒸浓缩装置进行减压浓缩至原体积的 1/3, 用适量活性炭脱色, 除去活性炭, 再将原液减压浓缩至无醇味, 得到总浸膏 965 g。将浸膏超声分散于水中, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇依次萃取。将所得各萃取部位用

真空闪蒸浓缩装置进行减压浓缩,得到石油醚部位(120 g),将所得醋酸乙酯萃取部位(110 g)通过硅胶(160~200 目)柱色谱,用石油醚-醋酸乙酯系统(50:0→0:50)梯度洗脱,薄层检识,合并相同流分,反复过 Toyopearl HW-40、Sephadex LH-20、MCI-Gel CHP-20、RP-18、PTLC 色谱分离,得到化合物 **1** (115 mg)、**2** (88 mg)、**4** (85 mg)、**5** (26 mg)、**6** (72 mg)、**10** (100 mg)。将正丁醇萃取部位(412 g)分散于水中,通过大孔吸附树脂 Diaion HP-20 柱色谱,依次用 H₂O 及 10%、30%、50%、70%、100% 甲醇洗脱。其中 Diaion HP-20 柱色谱的 30% 甲醇洗脱部分通过 MCI-Gel CHP-20 柱色谱,以甲醇-水溶剂系统反复分离纯化,从中分离得到化合物 **7** (58 mg)。Diaion HP-20 柱色谱的 50% 甲醇部位通过硅胶柱色谱,用二氯甲烷-甲醇溶剂系统反复洗脱,得到化合物 **3** (70 mg)、**8** (15 mg)、**9** (37 mg)。

2.2 化合物 1~4 海虾致死生物活性测定^[7]

使用改良微孔板法(modified microtiter-plate)^[8],采用丰年虾幼虫作为实验对象。分别称取无碘海盐以及碳酸氢钠各 2 g,加入到 1 000 mL 蒸馏水中,制备成质量分数为 2.5% 的人工海水。取 2~3 g 丰年虾的虾卵放入人工海水中,并给人工海水不间断通氧,28 ℃ 避光孵化 24 h 后,即可得到孵化成功的丰年虾幼虫,备用。化合物 **1**~**4** 分别用(1% DMSO 增溶)人工海水配制成 10、5、2.5 μg/mL 3 个不同质量浓度的待测样品溶液,分别精密量取待测样品溶液 20 μL 于 96 孔板中后,用含有 15~20 只幼虫的海水溶液补足到 200 μL,人工海水作为阴性空白对照,每个样品重复 3 次,28 ℃ 下避光培养 24 h,放大镜下观测海虾死亡数,根据公式计算校正死亡率,采用 SPSS 软件的 Prohibit 模型计算半数致死浓度(LC₅₀)。

$$\text{校正死亡率} = (T - C) / (1 - C)$$

T 为样品致死率, *C* 为阴性空白对照致死率

2.3 化合物 1~4 的 MTT 测定^[9]

2.3.1 细胞培养 将细胞从液氮罐中取出,常规方法^[10-11]复苏:将 Huh7 和 HepG2 细胞从液氮罐中取出,迅速放入 37 ℃ 水浴中,不时摇动,使其在 1 min 内完全融化,在 1 000 r/min 速度下离心 5~10 min,弃去上层液,加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液并接种于培养瓶中,接种浓度 1×10^9 /L, 1~2 d 换液 1 次,均用 0.25% 胰酶胰蛋白酶消化、传代,取状态良好、对数生长期的细胞用于实验。

2.3.2 MTT 检测 分别取对数生长期的 Huh7 和 HepG2 细胞制成密度为 5×10^4 /mL 的细胞悬液,每孔 200 μL 接种于 96 孔板中培养。每组设 6 个平行孔,同时设阴性对照组,细胞贴壁以后,弃去旧的培养液,更换新的培养液,加药组培养液分别含有化合物 **1**~**4** (质量浓度从低到高依次为 0、0.625、1.25、2.5、5、10 μg/mL)。药物作用细胞 24 h 后,取出培养板,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,混匀,继续培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 150 μL DMSO,水平低速震荡 10 min 使结晶充分溶解,酶标仪 490 nm 处测每孔吸光度(*A*)值,计算药物处理后细胞的抑制率,实验重复 3 次以上。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{药物}} / A_{\text{阴性对照}}$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 无色片晶(甲醇), mp 154~156 ℃。FeCl₃-K₃ [Fe(CN)₆] 反应阳性,说明含酚羟基。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 谱中低场区 δ 6.82 (1H, s, H-11), 6.63 (1H, s, H-14) 为苯环的 2 个对位芳氢信号; δ 3.13 (1H, m), 1.24 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.22 (3H, d, *J* = 6.9 Hz) 显示有 1 个异丙基, δ 3.66 (3H, s) 为 -OCH₃ 信号,证明存在 1 个 -COOCH₃ 基团。此外 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 显示存在 21 个碳 δ: 38.0 (C-1), 16.5 (C-2), 36.6 (C-3), 47.7 (C-4), 44.8 (C-5), 18.6 (C-6), 29.3 (C-7), 126.9 (C-8), 147.9 (C-9), 36.9 (C-10), 110.8 (C-11), 150.9 (C-12), 131.7 (C-13), 126.7 (C-14), 26.8 (C-15), 2.5 (C-16), 22.7 (C-17), 21.9 (C-18), 179.3 (C-19), 25.0 (C-20), 52.0 (-OCH₃), 其中 δ 150.9, 147.9, 131.9, 126.9, 126.7, 110.8 为苯环上的碳信号, δ 179.3 为羰基碳信号, δ 52.0 为 -OCH₃ 信号。¹H-NMR、¹³C-NMR 数据与文献报道基本一致^[12],故鉴定化合物 **1** 为香榧酯。

化合物 **2**: 淡绿色片晶(丙酮), mp 212~215 ℃。FeCl₃-K₃ [Fe(CN)₆] 反应阳性,说明含酚羟基。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 谱中显示其芳氢区信号 δ 6.81 (1H, s, H-11), 6.62 (1H, s, H-14) 为苯环的 2 个对位芳氢信号; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 37.3 (C-1), 28.0 (C-2), 78.7 (C-3), 39.0 (C-4), 49.8 (C-5), 19.0 (C-6), 30.0 (C-7), 127.1 (C-8), 147.8 (C-9), 37.3 (C-10), 111.0 (C-11), 150.8 (C-12), 131.7 (C-13), 126.6 (C-14), 26.8 (C-15), 22.5 (C-16), 22.7 (C-17), 15.4 (C-18), 24.8 (C-19), 18.1 (C-20)。以上 ¹H-NMR、¹³C-NMR 与化合物 **1** 的数据相似,推测

二者有相同的基本母核,在 δ 78.7显示存在1个连氧叔碳,提示母核可能有1个羟基取代;对照文献数据^[13-14]确定化合物**2**为花柏酚。

化合物**3**:白色粉末,mp 126~129 °C。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 显示: δ 5.36 (1H, t, J = 6.8 Hz) 有1个烯氢, δ 4.85 (1H, s), 4.50 (1H, s) 为1个环外角甲基烯氢, δ 4.12 (2H, d, J = 6.8 Hz) 显示有1个-CH₂OH基团, δ 3.55 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.38 (1H, d, J = 10.5 Hz) 显示有1个同碳偶合的-CH₂OH基团; δ 1.64 (3H, s), 0.97 (3H, s), 0.64 (3H, s) 显示有3个孤立的-CH₃基团。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 38.7 (C-1), 19.2 (C-2), 38.1 (C-3), 39.3 (C-4), 56.6 (C-5), 24.7 (C-6), 38.3 (C-7), 148.5 (C-8), 56.1 (C-9), 39.0 (C-10), 21.8 (C-11), 38.8 (C-12), 140.6 (C-13), 123.0 (C-14), 59.4 (C-15), 15.2 (C-16), 106.3 (C-17), 16.1 (C-18), 65.4 (C-19), 27.1 (C-20)。¹H-NMR、¹³C-NMR 提示为半日花烷类衍生物。综合以上数据与文献对照^[15-16],确定化合物**3**为4-epiagathadial。

化合物**4**:白色粉末,mp 200~201 °C。遇FeCl₃-K₃[Fe(CN)₆]试剂显蓝色,提示化学结构中含有酚羟基。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 显示芳香区有3个氢质子信号: δ 6.50 (1H, dd, J = 8.0, 2.4 Hz), 6.90 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.38 (1H, d, J = 2.4 Hz) 为苯环三取代的ABX系统。此外,在 δ 4.00~3.00有6个氢质子信号,提示此化合物可能连有1个糖,且 δ 5.21 (1H, d, J = 8.0 Hz) 为端基氢,由其偶合常数判断该糖为 β 构型。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) 显示存在13个碳原子,其中 δ 102.4, 82.6, 73.6, 72.3, 72.0, 69.9一组峰为葡萄糖上碳信号峰,另外7个碳原子分别是1个羰基和1个苯环的信号。羰基峰的化学位移为 δ 166.3,推测应以羧基的形式存在。¹H-NMR 谱芳香区仅有3个氢质子信号,说明分子中含有2个-OH,且其中1个与葡萄糖脱水成苷。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 123.6 (C-1), 116.8 (C-2), 147.1 (C-2), 151.1 (C-4), 114.1 (C-5), 120.3 (C-6), 166.3 (C-7), 102.4 (C-1'), 72.3 (C-2'), 73.6 (C-3'), 72.0 (C-4'), 82.6 (C-5'), 69.9 (C-6')。以上数据与文献对照^[17-18],确定化合物**4**为3,4-二羟基苯甲酸3-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物**5**:类白色结晶性粉末,mp 174~176 °C。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 显示 δ 11.9 (1H, s),提示可能存在-COOH基团, δ 7.26 (1H, d, J = 8.8 Hz), 6.82 (1H, dd, J = 8.8, 2.1 Hz), 6.79 (1H, d, J =

2.1 Hz) 显示有3个苯环氢, δ : 1.24 (3H $\times$ 2, d, J = 2.0 Hz), 1.13 (3H, s), 1.09 (3H, s) 显示有4个孤立的-CH₃基团。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) 显示存在20个碳原子, δ : 38.7 (C-1), 19.2 (C-2), 38.1 (C-3), 39.3 (C-4), 56.6 (C-5), 24.7 (C-6), 38.3 (C-7), 148.5 (C-8), 56.1 (C-9), 39.0 (C-10), 21.8 (C-11), 38.8 (C-12), 140.6 (C-13), 123.0 (C-14), 59.4 (C-15), 15.2 (C-16), 106.3 (C-17), 16.1 (C-18), 65.4 (C-19), 27.1 (C-20)。¹H-NMR、¹³C-NMR 提示为三环二萜类化合物。综合以上数据与文献对照^[19],确定化合物**5**为脱氢松香酸。

化合物**6**:白色针晶(石油醚),mp 101~104 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.34 (1H, dd, J = 10.5, 17.2 Hz, H-14), 5.08 (1H, d, J = 17.8 Hz, H-15 β), 4.91 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-15 α), 4.54 (1H, s, H-17a), 4.75 (1H, s, H-17b), 0.80 (3H, s, H-20), 1.20 (3H, s, H-19), 1.71 (3H, m, H-16), 5.37 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-12), 12.2 (1H, s, -COOH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.4 (C-1), 25.6 (C-2), 36.9 (C-3), 40.2 (C-4), 50.4 (C-5), 24.7 (C-6), 38.3 (C-7), 148.8 (C-8), 56.6 (C-9), 20.1 (C-10), 21.5 (C-11), 122.4 (C-12), 140.8 (C-13), 120.6 (C-14), 113.7 (C-15), 14.3 (C-16), 107.2 (C-17), 185.6 (18-COOH), 16.6 (C-19), 22.5 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[5,20-21],确定化合物**6**为反式瓔珞柏酸。

化合物**7**:胶状物,mp 101~104 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.31 (1H, dd, J = 10.3, 17.1 Hz, H-14), 5.03 (1H, d, J = 17.5 Hz, H-15 β), 4.86 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-15 α), 4.33 (1H, s, H-17a), 4.75 (1H, s, H-17b), 0.82 (3H, s, H-20), 1.23 (3H, s, H-19), 1.70 (3H, m, H-16), 5.34 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-12), 12.1 (1H, s, -COOH)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.1 (C-1), 25.6 (C-2), 36.7 (C-3), 40.1 (C-4), 50.3 (C-5), 24.3 (C-6), 38.0 (C-7), 148.5 (C-8), 56.1 (C-9), 19.8 (C-10), 21.8 (C-11), 122.2 (C-12), 140.7 (C-13), 120.1 (C-14), 113.4 (C-15), 14.2 (C-16), 107.1 (C-17), 185.3 (18-COOH), 16.3 (C-19), 22.4 (C-20)。以上数据与文献比对^[20-21],确定化合物**7**为顺式瓔珞柏酸。

化合物**8**:黄色油状物。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 显示芳香区有3个氢质子信号: δ 6.87 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6), 6.73 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-5), 6.72 (1H, dd, J = 8.0, 2.1 Hz, H-3) 提示存在苯环的ABX系统, δ 3.87 (3H, t, J = 2.1 Hz, H-9) 为-OCH₃的3

个氢原子。 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 显示存在 9 个碳原子 δ 146.7 (C-2), 144.8 (C-4), 131.0 (C-1), 120.5 (C-6), 114.7 (C-5), 110.7 (C-3), 66.0 (C-9), 55.9 (C-7), 49.6 (C-8)。综合以上 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 数据并与文献比对^[22], 确定化合物 **8** 为 2-甲氧基-1,4-苯二甲醇。

化合物 **9**: 白色针状结晶 (甲醇), mp 117~122 °C。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.11 (2H, s, H-8, 8'), 3.64 (2H, dd, J = 9.2, 2.8 Hz, H-9b, 9b'), 4.23 (2H, dd, J = 9.1, 2.3 Hz, H-9a, 9a'), 4.58 (2H, d, J = 3.1, 7.1 Hz, H-7, 7'), 3.81 (6H, s, $2\times\text{-OCH}_3$), 6.81 (2H, dd, J = 8.2, 1.4 Hz, H-6, 6'), 6.76 (2H, dd, J = 8.3, 5.8 Hz, H-5, 5'), 6.90 (2H, d, J = 1.3, 2.2 Hz, H-2, 2')。 ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 54.2 (C-8, 8'), 54.5 ($2\times\text{OCH}_3$), 73.8 (C-9, 9'), 86.6 (C-7, 7'), 111.7 (C-2, 2'), 117.2 (C-5, 5'), 121.3 (C-6, 6'), 132.8 (C-1, 1'), 146.5 (C-3, 3'), 150.2 (C-4, 4')。以上数据与文献报道一致^[23-24], 确定化合物 **9** 为松脂素。

化合物 **10**: 白色粉末, mp 140~142 °C。1% 茴香醛-硫酸显紫色, 提示可能为三萜类或甾体类化合物。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) 显示出典型的甾醇共振信号: δ : 0.68 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19) 分别为 C-18、C-19 位角甲基信号, δ 0.81~0.93 为支链 C-21、C-26、C-27、C-29 的甲基信号; 在低场区有 1 个烯氢质子信号 δ 5.33 (1H, d, J = 3.4 Hz, H-6) 和 1 个连氧碳质子信号 δ 3.56 (1H, m, H-3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 显示存在 29 个碳原子 δ : 37.3 (C-1), 31.7 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 31.9 (C-7), 31.7 (C-8), 50.1 (C-9), 36.2 (C-10), 21.1 (C-11), 28.3 (C-12), 42.3 (C-13), 56.8 (C-14), 24.3 (C-15), 39.8 (C-16), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 19.4 (C-19), 36.5 (C-20), 18.8 (C-21), 33.9 (C-22), 26.1 (C-23), 45.8 (C-24), 23.1 (C-25), 11.9 (C-26), 29.2 (C-27), 19.8 (C-28), 19.0 (C-29)。在低场区有 2 个烯碳信号 δ 140.8 (C-5), 121.7 (C-6)。 δ 71.8 处为羟基取代的碳信号峰。综合以上 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 信息并与文献对照^[25], 确定化合物 **10** 为 β -谷甾醇。

3.2 海虾幼虫致死的生物活性测定结果

海虾致死的生物活性测定是目前最常用的细胞毒活性评价方法之一^[26]。采用此方法测定香榧叶中 4 种化合物的半数致死浓度。参照文献的方法^[27], 将海虾卵孵化为幼虫后, 以每组 20 只幼虫置于配制

好的各浓度组中 (样品以 1% DMSO 增溶, 加有 DMSO 的人工海水溶液为空白对照)。在室温下 24 h 后观察幼虫的存活情况, 计算出死亡率和 LC_{50} , 结果见表 1。结果可知, 化合物 **1~4** 表现出不同程度的海虾致死活性, 化合物 **1~4** 的 LC_{50} 分别为 7.7、8.0、8.8 和 4.2 $\mu\text{g/mL}$, 表明这 4 个化合物均具有一定的海虾致死活性。其中化合物 **4** 为香榧叶中海虾致死活性最高的化合物。

表 1 海虾幼虫致死生物活性测定结果

Table 1 Determination results of lethal-to-prawn larva bioactivity experiment

化合物	致死率/%			$\text{LC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
	2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
1	13	19	65	7.7
2	12	21	59	8.0
3	10	18	53	8.8
4	25	41	89	4.2

3.3 化合物 **1~4** 对 Huh7 和 HepG2 细胞增殖的抑制作用

MTT 法通常用于检测培养的贴壁生长细胞的生长和增殖、细胞毒性实验以及新药筛选等^[28]。本实验采用 MTT 法评估香榧叶化合物 **1~4** 对 Huh7 和 HepG 细胞增殖的抑制作用。由图 1~2 可以看出, 与阴性对照组相比, 不同质量浓度的化合物 **1~4** 分别培养 24 h 后, 对 Huh7 和 HepG2 细胞均有抑制作用并呈现出一定的浓度依赖性。其中化合物 **4** 各质量浓度组对 Huh7 和 HepG2 细胞的抑制作用始终明显高于另外 3 个化合物, 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 化合物 **4**

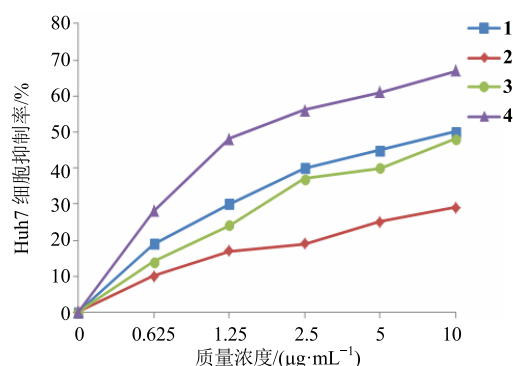


图 1 24 h 后不同质量浓度化合物 **1~4** 对 Huh7 细胞的抑制率 ($n = 3$)

Fig. 1 Inhibition rate of compounds **1~4** with different mass concentration on human hepatoma Huh7 cells after 24 h ($n = 3$)

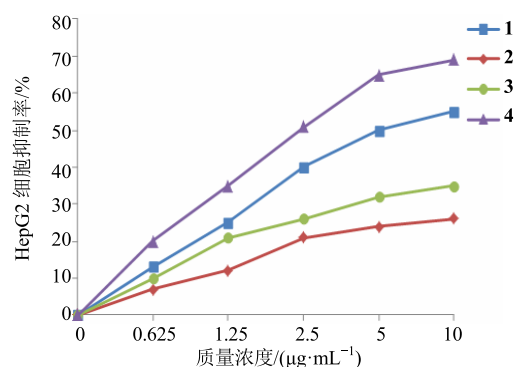


图2 24 h后不同质量浓度化合物1~4对HepG2细胞的抑制率 ($n=3$)

Fig. 2 Inhibition rate of compounds 1—4 with different mass concentration on human hepatoma HepG2 cells after 24 h ($n=3$)

对2种细胞的抑制率最高,分别为67%和69%。

4 讨论

本研究从香榧叶中成功分离、鉴定得到10个化合物,其中化合物1~3以及化合物5~7为二萜类成分,化合物4为糖苷类成分,化合物9为木脂素类成分,化合物10为三萜类成分。由此可知,香榧叶中所含化学成分种类比较丰富。采用海虾幼虫致死性实验对化合物1~4进行海虾致死活性筛选,同时也通过MTT法筛选了化合物1~4对Huh7和HepG2细胞的增殖抑制作用。据相关文献报道^[29],单体化合物的 $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ 和粗提物的 $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ 时,表明实验样品具有明显的细胞毒活性。由结果可知,化合物1~4的 LC_{50} 分别为7.7、8.0、8.8、4.2 $\mu\text{g/mL}$,表明这4个化合物均具有一定的细胞毒活性,其中化合物4细胞毒活性最强。MTT结果显示,化合物4对Huh7和HepG2细胞有显著抑制作用,抑制率分别为67%和69%。以上研究结果为今后进一步研究化合物4的抗肿瘤作用提供参考。此外,化合物4对人体是否安全可靠、是否可以保护损伤的肝细胞及其抗肿瘤机制等一系列相关研究将在今后的研究中进一步探索。

参考文献

[1] Ni Q, Gao Q, Yu W, *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of oils from two *Torreya grandis*, varieties seeds and their physicochemical and antioxidant properties [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 60(2): 1226-1234.

[2] Niu L Y, Bao J F, Mo J C, *et al.* Chemical composition and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of

essential oil extracted from the aril of *Torreya grandis* [J]. *J Essential Oil Bearing Plants*, 2010, 13(5): 594-602.

[3] Saeed M K, Deng Y, Dai R, *et al.* Appraisal of antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and fractions from the leaves of *Torreya grandis* Fort Ex. Lindl [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(2): 414-418.

[4] 陈振德, 田美兰. 长叶榧叶挥发油成分分析及其抗菌作用研究 [J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(2): 150-152.

[5] 陈仁通, 张与欢, 方圣鼎. 长叶榧叶中对人体 DNA 多聚酶 β 的抑制成分 [J]. 中草药, 1997, 28(12): 707-710.

[6] 袁珂, 俞莉. 真空薄膜浓缩装置的研制及应用研究 [J]. 分析化学, 2005, 33(9): 1358-1360.

[7] Rauf S, Javaid A. Antifungal activity of different extracts of *Chenopodium album* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, the cause of onion basal rot [J]. *Inter J Agr Biol*, 2013, 15(2): 367-371.

[8] Brown R F. The effect of some mycotoxins on the brine shrimp (*Artemia salina* L.) [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1969, 46(2): 119.

[9] Vahdatimashhadian N, Jafari M R, Sharghi N, *et al.* Protective effects of vitamin C and NAC on the toxicity of rifampin on HepG2 cells [J]. *Iranian J Pharm Res*, 2013, 12(1): 141-146.

[10] 白冰, 孙世波, 陈宇楠, 等. 鸦胆子油对人肝癌细胞增殖的抑制作用及机制 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(8): 1177-1181.

[11] Freshney R I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Sixth Edition [M]. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

[12] 何关福, 马忠武, 印万芬, 等. 中国特有种植物香榧叶中的一个新二萜成分 [J]. 植物学报, 1985, 27(3): 300.

[13] Sakai T. The composition of the volatile oil obtained from the leaves of *Torreya nucifera* and the structure of torreyol [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 1963, 36(10): 1261-1264.

[14] Shu C K, Lawrence B M, Emjr C. Essential oil of *Torreya taxifolia* Arnott. [J]. *J Essential Oil Res*, 1995, 7(1): 71-72.

[15] Fukushima I, Sayama Y, Kyogoku K, *et al.* Isolation of 6-hydroxydehydroabietinol and hinokiol from the leaves of *Torreya nucifera* Sieb. et Zucc [J]. *Agr Biol Chem*, 1968, 32(9): 1103-1107.

[16] Sayama Y, Kyogoku K, Murayama H. New diterpenes of *Torreya nucifera* Sieb. et Zucc [J]. *Agr Biol Chem*, 2014, 35(7): 1068-1073.

[17] 张孟科, 朱焰, 詹冠群, 等. 照山白花水溶性成分研

- 究 [EB/OL]. [2014-01-28]. <http://www.paper.edu.cn>.
- [18] 冯卫生, 王彦志, 郑晓珂. 中药化学成分结构解析 [M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [19] Ohmoto T, Kanatani K, Yamaguchi K. Constituent of pollen. XIII constituents of *Cedrus deodara* Loud. (2) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(1): 229-234.
- [20] 方圣鼎, 顾云龙, 俞汉钢, 等. 叉子圆柏中的抗肿瘤化学成分 [J]. 植物学报, 1989, 31(5): 60-66.
- [21] Thomas B R, Gatenbeck S, Skansen T, *et al*. The chemistry of the order araucariales. Part 4. The Bled resins of *Agathis australis* [J]. *Acta Chem Scandinav*, 1966, 20(4): 1074-1081.
- [22] 李艳梅, 赵圣印, 王兰英. 有机化学 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [23] 何关福, 马忠武. 香榧树叶精油成分与化学分类 [J]. 植物分类学报, 1986, 24(6): 454-457.
- [24] 周大铮. 香榧中抗艾滋病病毒先导化合物的研究和结构修饰 [D]. 上海: 第二军医大学, 2004.
- [25] 叶江海, 李继新, 徐 君, 等. 黔产细锥香茶菜中化学成分的研究 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 2972-2977.
- [26] Guo F, Yang S X, Liu L, *et al*. Chemical constituents and their toxic activity from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. KY-12, isolated from *Pleioblastus amarus* [J]. *Nat Prod Res Develop*, 2014, 26(9): 1389-1392.
- [27] Christodouleas D C, Fotakis C, Papadopoulos K, *et al*. Evaluation of total reducing power of edible oils [J]. *Talanta*, 2014, 130(5): 233-240.
- [28] 徐吉敏, 张世安, 黄 艳, 等. MTT 法研究酸枣仁皂苷 A 对肝细胞、肝星状细胞和肝癌细胞增殖的影响 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(3): 281-284.
- [29] 郑楠楠, 杨胜祥, 周 慧, 等. 筋欖花椒的化学成分及生物活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 189-193.