

互叶白千层化学成分及其抗肿瘤活性研究

柴玲, 陈明生, 卢文杰, 林霄*, 刘布鸣*

广西中医药研究院 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西 南宁 530022

摘要: 目的 研究互叶白千层 *Melaleuca alternifolia* 茎皮中的化学成分及其抗肿瘤活性。方法 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、重结晶、高效制备液相色谱法等现代分离方法和技术对其化学成分进行分离纯化, 并根据理化性质和波谱数据进行结构鉴定。采用 CCK-8 法, 以人非小细胞肺癌 PC-9 细胞、人结肠直肠癌 HT-29 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞为模型, 对所分离鉴定的部分化合物进行初步的体外细胞毒性活性评价。结果 从互叶白千层茎皮中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为乌苏酸-3-O- β -顺式-咖啡酸酯 (1)、乌苏酸-3-O- β -反式-咖啡酸酯 (2)、阿魏酸三十酯 (3)、3-O-乙酰基-11(12)-烯-乌苏-28,13 β -二酯 (4)、3-O-乙酰基乌苏酸 (5)、咖啡酸三十酯 (6)、乌苏酸 (7)、正二十九烷醇 (8)、乌苏-12(13)-烯-3-酮-28-羧酸 (9)、3 β -O-乙酰基-11 α ,12 α -环氧-齐墩果烷-28,13 β -内酯 (10)、白桦脂醇 (11)。结论 化合物 1 与 2 互为顺反异构体, 为首次从天然产物中分离得到的新化合物; 除化合物 11 外, 其余化合物均为首次从该植物中分离得到; 化合物 1 的细胞毒性活性较其异构体 (2) 强, 对 3 种肿瘤细胞增殖具有中等强度的抑制作用。

关键词: 互叶白千层; 乌苏酸-3-O-顺式-咖啡酸酯; 乌苏酸-3-O-反式-咖啡酸酯; 乌苏酸; 抗肿瘤

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0581-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.005

Chemical constituents of *Melaleuca alternifolia* and its antitumor activities

CHAI Ling, CHEN Ming-sheng, LU Wen-jie, LIN Xiao, LIU Bu-ming

Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents of the barks and stems of *Melaleuca alternifolia* and its antitumor activities. **Methods** The chemical constituents were separated and purified consecutively by silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography, recrystallization as well as preparative HPLC. Their structures were determined by physicochemical properties and spectral analyses. Furthermore, the cytotoxicity of some compounds against PC-9 (human non-small cell lung cancer cell line), HT29 (human colon cancer cell line) and MCF-7 (human breast cancer cell line) were tested by CCK8 method. **Results** Eleven compounds were isolated and identified as ursolic acid 3-O- β -cis-caffeate (1), ursolic acid 3-O- β -trans-caffeate (2), tricontyl ferulates (3), 3-O-acetyl-11(12)-en-urs-28,13 β -olide (4), 3-O-acetyl-ursolic acid (5), tricontyl caffeate (6), ursolic acid (7), *n*-nonacosanol (8), urs-12(13)-en-3-one-28-oic acid (9), 3 β -O-acetyl-11 α ,12 α -epoxy-oleanane-28,13 β -olide (10), and betulin (11). **Conclusion** Compound 1 and 2 are *cis-trans* isomers. Compound 1 is isolated from natural product for the first time, all the compounds are isolated from this plant for the first time except for compound 11. Compound 1 exhibited moderate inhibited effect on the proliferation of three human cancer cell lines.

Key words: *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel; ursolic acid 3-O-*cis*-caffeate; ursolic acid 3-O-*trans*-caffeate; ursolic acid; antitumor activities

互叶白千层 *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel 是 1 个常绿树种, 20 世纪 90 年代从 澳大利亚引种到中国, 已经在我国广东、广西、福建等地形成一定的种植规模。从互叶白千层枝叶中

收稿日期: 2019-10-09

基金项目: 互叶白千层植物的药学基础研究 (滚动支持) (2014GXNSFBB118004); 广西中药壮瑶药研发人才队伍建设 (桂科 AD16380013); 桂澳中药质量研究联合实验室建设 (桂科 AD17195002); 广西中药质量标准研究重点实验室系统性研究课题 (桂中重系 201305)

作者简介: 柴玲 (1986—), 女, 副研究员, 主要研究方向为天然产物化学成分及质量标准研究工作。E-mail: cicichai001@163.com

*通信作者 林霄 (1981—), 男, 副研究员, 主要研究方向为天然产物化学成分及其活性。E-mail: linxiaolegend@163.com

刘布鸣 (1956—), 男, 研究员, 从事中药、天然药化学成分与质量标准研究工作。E-mail: liubuming@aliyun.com

提取出的挥发油称为茶树油,被广泛地用于抗菌、抗病毒和烧伤、疼痛的治疗^[1]。然而,国内外关于互叶白千层的研究主要集中于茶树油,有关其非挥发性成分的研究较少。目前,国外仅有 Vieira 等^[2]从互叶白千层中分离鉴定出 3,3'-O-二甲氧基鞣花酸及 5 个已知的五环三萜类化合物的研究。本课题组前期从互叶白千层枝叶中分离得到槲皮素、没食子酸等 11 个黄酮、酚酸、甾醇类化合物^[3]。

五环三萜特别是有齐墩果烷、乌苏烷、羽扇烷骨架的结构,是天然产物中发现最多的三萜类化合物,且具有多种显著的药理活性。其中,熊果酸及其衍生物由于其具有能通过多种信号通路调节肿瘤细胞的生存和延续的能力,被认为是具有潜力的抗癌促进剂^[4]。为进一步开发利用互叶白千层资源,本实验在前期研究的基础上,进一步研究互叶白千层茎皮的化学成分和抗肿瘤活性。通过系统化学成分研究,从互叶白千层茎皮石油醚和醋酸乙酯部位

分离得到 11 个化合物,分别鉴定为乌苏酸-3-O- β -顺式-咖啡酸酯(ursolic acid 3-O- β -*cis*-caffeate, **1**)、乌苏酸-3-O- β -反式-咖啡酸酯(ursolic acid 3-O- β -*trans*-caffeate, **2**)、阿魏酸三十酯(tricontyl ferulates, **3**)、3-O-乙酰基-11(12)-烯-乌苏-28,13 β -二酯[3-O-acetyl-11(12)-en-urs-28,13 β -olide, **4**]、3-O-乙酰基乌苏酸(3-O-acetyl-ursolic acid, **5**)、咖啡酸三十酯(tricontyl caffeate, **6**)、乌苏酸(ursolic acid, **7**)、正二十九烷醇(*n*-nonacosanol, **8**)、乌苏-12(13)-烯-3-酮-28-羧酸[urs-12(13)-en-3-one-28-oic acid, **9**]、3 β -O-乙酰基-11 α ,12 α -环氧-齐墩果烷-28,13 β -二酯(3 β -O-acetyl-11 α ,12 α -epoxy-oleanane-28,13 β -olide, **10**)、白桦脂醇(betulin, **11**)。结构见图 1。通过 CCK-8 法检测,化合物 **1** 对人肺腺癌 PC-9 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞具有细胞毒活性。

1 仪器与材料

Finnigan Trace DSQ 四级杆质谱仪(美国赛默

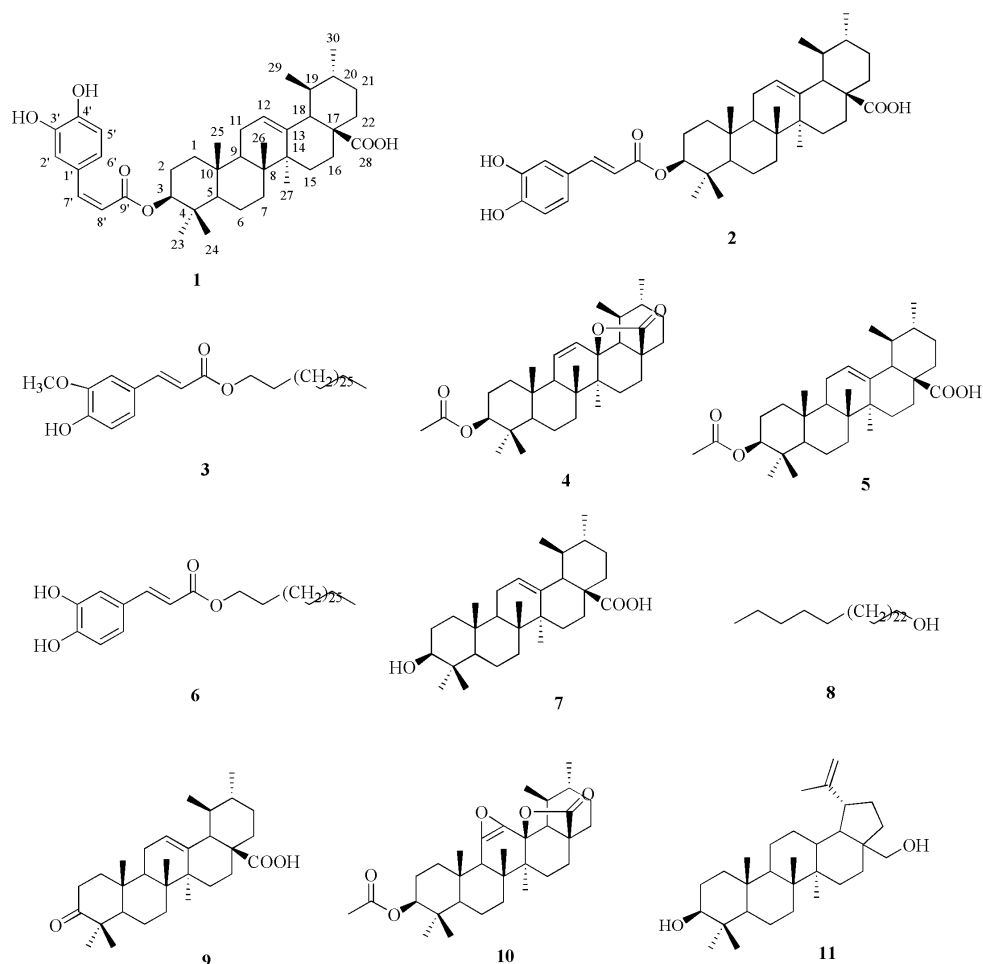


图 1 化合物 1~11 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—11

飞世尔科技公司); Thermo Fisher Q Exactive Focus 高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); Bruker AV-400、Dre-500、AVANCE-800 MHz 核磁共振仪(美国布鲁克公司); Agilent DD2 600 MHz 核磁共振仪(德国安捷伦科技有限公司); Waters 1525-2998 高效制备液相色谱仪(美国沃特世公司); TENSOR27 红外光谱仪(美国布鲁克公司); 岛津 UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 鲁道夫 Autopol VI 旋光仪(美国鲁道夫公司)。柱色谱硅胶为青岛海洋化工厂生产, Sephadex LH-20 凝胶为 Pharmacia 公司生产, ODS 填料为德国默克公司生产, EnantioPack AD 半制备色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μ m) 为瑞典 EKA Chemicals 公司生产。石油醚、氯仿、醋酸乙酯、95%乙醇等试剂为分析纯。环己烷、异丙醇为色谱纯。

互叶白千层于2013年8月采集于广西钦州, 经广西中医药研究院中药资源研究所赖茂祥研究员鉴定为桃金娘科植物互叶白千层 *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel。

2 提取与分离

互叶白千层茎皮粗粉 3.0 kg, 用 95%乙醇做溶剂回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并乙醇提取液, 减压回收乙醇溶剂, 得乙醇提取物(286 g)。依次用石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)、氯仿、醋酸乙酯溶剂萃取, 按部位分别合并及回收溶剂后, 得石油醚部位 14.5 g、三氯甲烷部位 76 g、醋酸乙酯部位 87.5 g。

醋酸乙酯部位(87.5 g)经硅胶柱色谱(100~200 目)分离, 氯仿-甲醇(100:0 $\rightarrow$ 50:50)梯度洗脱, 接收了 188 个子流分。Fr. 52 经反复硅胶柱色谱、中压制备液相色谱(甲醇-水 85:15)及高效制备液相色谱(环己烷-异丙醇 80:20, 体积流量 5 mL/min)分离, 得到化合物 **1**(10 mg, t_R =12.0 min)、**2**(20 mg, t_R =9.0 min); Fr. 4~5 经反复硅胶柱色谱(300~400 目)及 Sephadex LH20 凝胶色谱分离得化合物 **3**(13 mg)、**4**(20 mg); Fr. 8 经反复硅胶柱色谱(300~400 目)分离得化合物 **5**(40 mg); Fr. 31~34 经反复硅胶柱色谱(300~400 目)分离得化合物 **6**(23 mg)、**7**(30 mg)。

将石油醚部位(14.5 g)通过硅胶柱色谱(100~200 目)分离, 石油醚-醋酸乙酯(95:5 $\rightarrow$ 80:20)梯度洗脱, 接收了 328 个子流分。其中, Fr. 15~17 经石油醚-醋酸乙酯重结晶后得化合物 **8**(15 mg); Fr. 116~129 在石油醚-醋酸乙酯系统下分别

(300~400 目)分离得化合物 **9**(26 mg); Fr. 195~205 在石油醚-醋酸乙酯系统下经硅胶柱色谱(300~400 目)、Sephadex LH20 凝胶色谱、ODS-HG 反相色谱分离得化合物 **10**(20 mg); Fr. 265~271 经重结晶得到化合物 **11**(20 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末。ESI-MS m/z : 641 $[M+Na]^+$ 。HR-ESI-MS m/z 641.381 4 $[M+Na]^+$ (理论值 641.381 8, $C_{39}H_{54}O_6Na$) 和 NMR 数据推测该化合物分子式为 $C_{39}H_{54}O_6$, 不饱和度为 3。UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 328 (4.2)。 $[\alpha]_D^{20} +62.0^{\circ}$ (c 0.10, CH_3OH)。IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 544, 1 695, 1 600, 1 521, 1 453, IR 光谱显示化合物 **1** 中存在羟基(3 544 cm^{-1})、羰基(1 695 cm^{-1})、苯环 C-H 伸缩振动(1 453~1 600 cm^{-1}) 等特征官能团信号峰。 1H -NMR 谱(表 1) 数据显示 7 个甲基信号 δ_H 0.76 (3H, s, H-26), 0.78 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, overlapped, H-23), 0.83 (3H, overlapped, H-29), 0.91 (3H, overlapped, H-25), 0.91 (3H, overlapped, H-30), 1.06 (3H, s, H-27); 1 个烯质子信号 δ_H 5.13 (1H, t, J = 3.8 Hz, H-12); 3 个芳环质子信号 δ_H 7.32 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 7.00 (1H, dd, J = 8.3, 2.1 Hz, H-6'), 6.70 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'); 以及 1 对顺式双键质子信号 δ_H 6.75 (1H, d, J = 12.9 Hz, H-7') 和 5.73 (1H, d, J = 12.8 Hz, H-8')。 ^{13}C -NMR 谱(表 1) 和 DEPT 谱显示有 39 个碳信号, 其中 12 个甲基, 9 个亚甲基, 12 个次甲基包括 1 个连氧次甲基 δ_C 80.0 (C-3) 和 11 个季碳包括 2 个羰基碳信号 δ_C 178.3 (C-28), 165.9 (C-9')。上述数据表明化合物 **1** 是 1 个典型的乌苏烷型三萜。化合物 **1** 的 1H - 和 ^{13}C -NMR 谱数据与乌苏酸-3-O- β -反式-咖啡酸酯(**2**)^[5]非常相似, 不同之处在于 H-7' 和 H-8' 的偶合常数表明此双键为顺式构型。进一步的 2D NMR (HSQC、HMBC、 1H - 1H COSY) 谱数据分析证实化合物 **1** 的平面结构如图 2 所示。相应的立体化学构型可以从 NOESY 谱的偶合常数及相关推断出来, 其中 H-3 (δ_H 4.45) 与 H-1 α (δ_H 1.04)、H-23 (δ_H 0.82)、H-5 (δ_H 0.86), H-25 (δ_H 0.91) 与 H-24 (δ_H 0.78)、H-26 (δ_H 0.76), H-9 (δ_H 1.54) 与 H-5 (δ_H 0.86)、H-27 (δ_H 1.06), H-27 (δ_H 1.06) 与 H-19 (δ_H 1.31), H-18 (δ_H 2.11) 与 H-20 (δ_H 0.92) 相关, 证实 H-3、H-23、H-5、H-9、H-27 以及 H-19 同面且为 α 构型, 而 H-24、H-25、H-26、H-18 和 H-20 为 β 构型。H-7' 和 H-8' (12.8 Hz) 的邻位偶合

表1 化合物1的 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据(600/150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 1 (600/150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	1.62 (m), 1.04 (m)	37.8	21	1.43 (overlapped), 1.28 (overlapped)	30.2
2	1.61 (m)	23.2	22	1.58 (overlapped), 1.51 (overlapped)	36.4
3	4.45 (dd, $J = 10.4, 5.5$ Hz)	80.0	23	0.82 (s)	27.9
4		37.3	24	0.78 (s)	16.7
5	0.86 (overlapped)	54.7	25	0.91 (overlapped)	15.2
6	1.48 (m), 1.33 (m)	17.8	26	0.76 (s)	16.9
7	1.48 (overlapped), 1.27 (overlapped)	32.6	27	1.06 (s)	23.3
8		39.1	28		178.3
9	1.54 (overlapped)	46.8	29	0.83 (overlapped)	17.1
10		36.5	30	0.91 (overlapped)	21.1
11	1.86 (m), 1.61 (m)	22.9	1'		126.1
12	5.13 (t, $J = 3.8$ Hz)	124.5	2'	7.32 (d, $J = 2.1$ Hz)	117.7
13		138.3	3'		144.6
14		41.7	4'		147.2
15	1.81 (m), 1.00 (m)	27.6	5'	6.70 (d, $J = 8.2$ Hz)	115.0
16	1.94 (m), 1.53 (m)	23.8	6'	7.00 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz)	123.4
17		46.9	7'	6.75 (d, $J = 12.9$ Hz)	143.1
18	2.11 (d, $J = 11.3$ Hz)	52.4	8'	5.73 (d, $J = 12.9$ Hz)	115.9
19	1.31 (overlapped)	38.5	9'		165.9
20	0.92 (overlapped)	38.5			

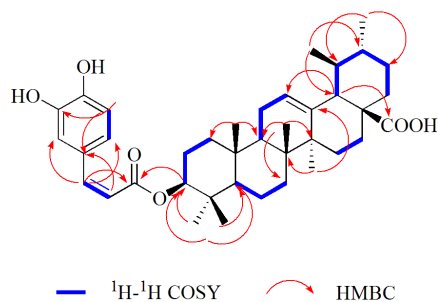


图2 化合物1的重要 ^1H - ^1H COSY、HMBC相关
Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 1

常数证实化合物1为3-O-咖啡酸酯片段的Z式构型。化合物1的绝对构型通过旋光度值进一步确定为与乌苏酸(乌苏酸 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +62.0^\circ$, c 0.10 CH_3OH)骨架相同。故鉴定化合物1为乌苏酸-3-O- β -顺式-咖啡酸酯。

化合物2: 无色针晶(甲醇), mp 250~252 $^\circ\text{C}$ 。EI-MS m/z : 618 $[\text{M}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, Pyridine- d_6) δ : 8.03 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-3'), 7.67 (1H, s, H-5'),

7.23 (2H, m, H-8', 9'), 6.69 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-2'), 5.47 (1H, brs, H-12), 4.88 (1H, dd, $J = 11.5, 4.7$ Hz, H-3), 7个角甲基信号 1.24 (3H, s, H-27), 1.02 (6H, overlapped, H-25, 30), 0.96 (9H, overlapped, H-23, 24, 29), 0.85 (3H, s, H-26); ^{13}C -NMR (125 MHz, Pyridine- d_6) δ : 38.4 (C-1), 23.6 (C-2), 80.5 (C-3), 38.2 (C-4), 55.7 (C-5), 18.5 (C-6), 33.4 (C-7), 40.0 (C-8), 47.9 (C-9), 37.1 (C-10), 24.2 (C-11), 125.5 (C-12), 139.3 (C-13), 42.6 (C-14), 28.7 (C-15), 24.9 (C-16), 48.1 (C-17), 53.6 (C-18), 39.5 (C-19), 39.5 (C-20), 31.1 (C-21), 37.5 (C-22), 28.3 (C-23), 17.4 (C-24), 15.6 (C-25), 17.2 (C-26), 24.0 (C-27), 79.9 (C-28), 17.5 (C-29), 21.5 (C-30), 167.4 (C-1'), 115.9 (C-2'), 145.7 (C-3'), 127.1 (C-4'), 116.8 (C-5'), 149.5 (C-6'), 147.8 (C-7'), 115.7 (C-8'), 122.1 (C-9')。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物2为乌苏酸-3-O- β -反式-咖啡酸酯。

化合物3: 白色粉末固体, 易溶于醋酸乙酯、氯仿, 微溶于甲醇、水。EI-MS m/z : 614 $[\text{M}]^+$ 。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_6) δ : 8.04 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.37 (1H, brs, H-2), 7.31 (1H, dd, J = 8.2, 1.9 Hz, H-6), 7.24 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.74 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 4.35 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-1'), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 0.88 (3H, t, J = 6.9 Hz, H-30'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Pyridine- d_6) δ : 127.1 (C-1), 112.1 (C-2), 151.6 (C-3), 149.5 (C-4), 117.3 (C-5), 124.1 (C-6), 145.9 (C-7), 116.0 (C-8), 168.0 (C-9), 65.0 (C-1'), 56.4 (OCH₃), 14.7 (C-30')。结合上述波谱数据及文献报道^[6], 鉴定化合物 **3** 为阿魏酸三十酯。

化合物 **4**: 白色粉末固体, mp 230~233 °C, 易溶于醋酸乙酯、氯仿, 微溶于甲醇、水。EI-MS m/z : 496 [M]⁺, 452 [M - CO₂]⁺。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.94 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-11), 5.53 (1H, dd, J = 10.3, 3.0 Hz, H-12), 4.49 (1H, dd, J = 10.8, 5.6 Hz, H-3), 2.05 (3H, s, H-2'), 1.15 (3H, s, H-27), 1.04 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-29), 0.94 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-30), 0.93 (3H, s, H-25), 0.86 (6H, s, H-23/24); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl₃) δ : 37.9 (C-1), 23.3 (C-2), 80.6 (C-3), 38.2 (C-4), 54.9 (C-5), 17.6 (C-6), 31.4 (C-7), 41.7 (C-8), 53.0 (C-9), 36.3 (C-10), 133.3 (C-11), 129.0 (C-12), 89.6 (C-13), 42.0 (C-14), 25.6 (C-15), 22.8 (C-16), 45.1 (C-17), 60.6 (C-18), 38.0 (C-19), 40.3 (C-20), 30.8 (C-21), 31.2 (C-22), 27.7 (C-23), 16.1 (C-24), 16.0 (C-25), 18.9 (C-26), 18.0 (C-27), 179.8 (C-28), 17.8 (C-29), 19.1 (C-30), 21.2 (COCH₃), 170.9 (COCH₃)。结合上述波谱数据及文献报道^[7], 鉴定化合物 **4** 为 3-O-乙酰基-11(12)-烯-乌苏烷-28,13 β -二酯。

化合物 **5**: 白色粉末固体, 易溶于醋酸乙酯、氯仿, 微溶于甲醇、水。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 2 961, 2 855, 1 720, 1 460, 1 368, 1 271。EI-MS m/z : 498 [M]⁺。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.23 (1H, brs, H-12), 4.50 (1H, dd, J = 9.7, 6.2 Hz, H-3), 2.17 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-18), 2.03 (3H, s, CO-CH₃), 1.07 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-25), 0.96 (3H, s, H-30), 0.85 (3H, s, H-29), 0.84 (6H, overlapped, H-23, 24), 0.76 (3H, s, H-26); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl₃) δ : 38.3 (C-1), 23.6 (C-2), 81.0 (C-3), 37.7 (C-4), 55.3 (C-5), 18.2 (C-6), 32.9 (C-7), 39.5 (C-8), 47.5 (C-9), 36.9 (C-10), 23.3 (C-11), 125.8 (C-12), 138.0 (C-13), 41.9 (C-14), 28.0 (C-15), 24.1 (C-16), 48.0 (C-17), 52.6

(C-18), 39.0 (C-19), 38.8 (C-20), 30.6 (C-21), 6.7 (C-22), 28.1 (C-23), 16.7 (C-24), 15.5 (C-25), 17.0 (C-26), 23.6 (C-27), 183.3 (C-28), 17.1 (C-29), 21.1 (C-30), 21.3 (CO-CH₃), 170.95 (CO-CH₃)。结合上述波谱数据及文献报道^[8], 鉴定化合物 **5** 为 3-O-乙酰基乌苏酸。

化合物 **6**: 白色粉末固体, 可溶于氯仿、甲醇, 微溶于水。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 493, 3 320 (-OH 伸缩振动), 1 688 (C = O 伸缩振动)。EI-MS m/z : 600 [M]⁺。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_6) δ : 8.05 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.67 (1H, brs, H-2), 7.24 (2H, m, H-6), 6.69 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 4.31 (2H, t, J = 6.7 Hz, H-1'), 1.76~1.63 (2H, m, H-2'), 0.88 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-30'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Pyridine- d_6) δ : 127.4 (C-1), 115.6 (C-2), 150.8 (C-3), 148.1 (C-4), 117.1 (C-5), 122.4 (C-6), 146.1 (C-7), 116.2 (C-8), 167.9 (C-9), 64.8 (C-1'), 14.6 (C-30')。结合上述波谱数据及文献报道^[9], 鉴定化合物 **6** 为咖啡酸三十酯。

化合物 **7**: 白色粉末固体, mp 250~252 °C, 可溶于氯仿、甲醇, 微溶于水。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 438 (-OH 伸缩振动), 2 940 (-CH₃ 伸缩振动), 1 693 (C = O 伸缩振动)。EI-MS m/z : 456 [M]⁺。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.18 (1H, t, J = 3.4 Hz, H-12), 3.14 (1H, dd, J = 11.6, 4.8 Hz, H-3), 2.11 (1H, d, J = 11.1 Hz, H-18), 1.19 (3H, s, H-27), 1.02 (3H, s, H-26), 0.92 (3H, s, H-23), 0.86 (3H, s, H-30), 0.79 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-29), 0.74 (3H, s, H-25), 0.71 (3H, s, H-24); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl₃) δ : 38.6 (C-1), 26.8 (C-2), 78.8 (C-3), 38.8 (C-4), 55.2 (C-5), 18.2 (C-6), 32.9 (C-7), 39.4 (C-8), 47.5 (C-9), 36.8 (C-10), 24.1 (C-11), 125.4 (C-12), 138.1 (C-13), 42.0 (C-14), 29.5 (C-15), 23.2 (C-16), 47.7 (C-17), 52.7 (C-18), 39.0 (C-19), 38.8 (C-20), 30.6 (C-21), 36.7 (C-22), 28.0 (C-23), 15.3 (C-24), 15.4 (C-25), 16.8 (C-26), 23.4 (C-27), 180.5 (C-28), 16.8 (C-29), 21.0 (C-30)。结合上述波谱数据及文献报道^[10], 鉴定化合物 **7** 为乌苏酸。

化合物 **8**: 白色针状结晶, mp 94~96 °C, 易溶于石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯, 可溶于丙酮、甲醇、乙醇, 不溶于水。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 316 (-OH 伸缩振动), 2 918, 2 849 (-CH₃ 和 -CH₂ 伸缩振动), 1 464 (-CH₃ 和 -CH₂ 弯曲振动), 1 062 (C-O 键的伸缩振动和 O-H 面内弯曲振动), 720 (提示含 4 碳以上的脂肪链)。EI-MS m/z : 424 [M]⁺, 396 [M - C₂H₄]⁺, 368

$[M-2 \times C_2H_4]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.60 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, $-CH_2OH$), 1.20 (46H, brs, CH_2), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $-CH_3$)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 63.3 (C-1), 33.9~22.9 (多个亚甲基碳信号), 14.3 (CH_3)。结合上述波谱数据及文献报道^[11], 鉴定化合物 **8** 为正二十九烷醇。

化合物 **9**: 白色颗粒状结晶(石油醚-醋酸乙酯), $mp > 270$ °C, 易溶于醋酸乙酯、丙酮, 可溶甲醇、乙醇, 不溶于水。IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}): 1 730 (C=O 伸缩振动), 1 705 (羧酸 C=O 伸缩振动), 1 645 (C=C 伸缩振动), 1 370, 1 320, 1 275, 1 238, 1 145, 970。EI-MS m/z : 454 $[M]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.27 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12), 1.10 (3H, s, CH_3), 1.09 (3H, s, CH_3), 1.06 (3H, s, CH_3), 1.03 (3H, s, CH_3), 0.95 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH_3), 0.87 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3), 0.84 (3H, s, CH_3)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 39.7 (C-1), 34.3 (C-2), 217.9 (C-3), 47.6 (C-4), 55.5 (C-5), 19.7 (C-6), 32.7 (C-7), 39.5 (C-8), 46.9 (C-9), 36.8 (C-10), 23.7 (C-11), 125.8 (C-12), 138.2 (C-13), 42.3 (C-14), 28.2 (C-15), 24.3 (C-16), 48.2 (C-17), 52.9 (C-18), 39.2 (C-19), 39.0 (C-20), 30.8 (C-21), 36.9 (C-22), 26.7 (C-23), 21.6 (C-24), 15.4 (C-25), 17.2 (C-26), 23.6 (C-27), 182.5 (C-28), 17.2 (C-29), 21.3 (C-30)。结合上述波谱数据及文献报道^[12], 鉴定化合物 **9** 为乌苏-12(13)-烯-3-酮-28-羧酸。

化合物 **10**: 无色针状结晶(氯仿-甲醇), $mp > 270$ °C, 易溶于醋酸乙酯、氯仿, 不溶于水。EI-MS m/z : 512 $[M]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.52 (1H, dd, $J = 11.1, 5.3$ Hz, H-3), 3.03 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-12), 3.01 (1H, dd, $J = 3.8, 1.5$ Hz, H-11), 2.06 (3H, s, $-O=C-CH_3$), 1.09 (3H, s, H-27), 1.06 (3H, s, H-26), 1.04 (3H, s, H-25), 0.99 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, s, H-30), 0.87 (3H, s, H-23), 0.87 (3H, s, H-24); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.8 (C-1), 23.1 (C-2), 80.4 (C-3), 37.8 (C-4), 54.6 (C-5), 17.4 (C-6), 31.0 (C-7), 41.3 (C-8), 50.5 (C-9), 36.3 (C-10), 52.6 (C-11), 57.0 (C-12), 87.5 (C-13), 40.4 (C-14), 26.9 (C-15), 21.2 (C-16), 43.8 (C-17), 49.5 (C-18), 37.7 (C-19), 31.4 (C-20), 34.2 (C-21), 26.6 (C-22), 27.7 (C-23), 16.2 (C-24), 17.2 (C-25), 20.0 (C-26), 18.8 (C-27), 179.4 (C-28), 33.2 (C-29), 23.6 (C-30), 21.3 (C-31), 170.9 (C-32)。结合上述波谱数据及文献报道^[13], 鉴定化合物 **10** 为 3 β -O-乙酰基-11 α ,12 α -环

氧-齐墩果烷-28,13 β -二酯。

化合物 **11**: 白色粉末固体, mp 230~232 °C, 易溶于氯仿, 微溶于石油醚、甲醇、水。EI-MS m/z : 442 $[M]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.68 (1H, brs, H-29b), 4.58 (1H, brs, H-29a), 3.80 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, H-28b), 3.33 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-28a), 3.18 (1H, dd, $J = 11.4, 4.6$ Hz, H-3), 1.68 (3H, s, CH_3), 1.02 (3H, s, CH_3), 0.98 (3H, s, CH_3), 0.97 (3H, s, CH_3), 0.82 (3H, s, CH_3), 0.76 (3H, s, CH_3)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.9 (C-1), 27.7 (C-2), 79.2 (C-3), 39.0 (C-4), 55.5 (C-5), 18.5 (C-6), 34.4 (C-7), 41.1 (C-8), 50.6 (C-9), 37.3 (C-10), 21.0 (C-11), 25.4 (C-12), 37.5 (C-13), 42.9 (C-14), 27.2 (C-15), 29.3 (C-16), 48.0 (C-17), 48.9 (C-18), 48.0 (C-19), 150.6 (C-20), 29.9 (C-21), 34.1 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 116.3 (C-25), 16.1 (C-26), 4.9 (C-27), 60.7 (C-28), 109.8 (C-29), 19.2 (C-30)。结合上述波谱数据及文献报道^[14], 鉴定化合物 **11** 为白桦脂醇。

4 体外抗肿瘤活性

采用 CCK-8 法检测化合物 **1** 和 **2** 对人非小细胞肺癌 PC-9 细胞、人结直肠腺癌 HT-29 细胞和人乳腺癌 MCF-7 细胞的细胞毒活性。PC-9、HT-29 和 MCF-7 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基(100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素)中, 于 37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育至对数生长期。收集对数生长期细胞, 以 3 000 个/孔密度接种于 96 孔板, 将培养板放在 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 吸除培养基, 加入不同浓度(0.1~40 μ mol/L)的受试药物 100 μ L 于 37 °C 继续培养 48 h, 然后向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液于 37 °C 继续培养 2.0 h, 用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度(A)值。根据测得的 A 值计算抑制率, 并用 Graphpad Prism 8 软件拟合化合物的 IC_{50} 值。

实验结果显示, 化合物 **1** 对 PC-9、HT-29 和 MCF-7 细胞均具有中等强度细胞毒活性, IC_{50} 分别为 17.55、31.46、30.79 μ mol/L, 化合物 **2** 对上述 3 种细胞增殖无明显抑制($IC_{50} > 50$ μ mol/L)。

参考文献

- [1] Carson C F, Hammer K A, Riley T V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1): 50-62.

- [2] Vieira T R, Barbosa L C A, Maltha C R A, *et al.* Constituintes químicos de *melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) [J]. *Quim Nova*, 2004, 27(4): 536-539.
- [3] 刘布鸣, 董晓敏, 黄 艳, 等. 互叶白千层的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(7): 1282-1284.
- [4] Katai M, Terai T, Meguri H. Triterpenoids of the bark of *Pieris japonica* D. Don (Japanese name: asebi). II. Carbon13 nuclear magnetic resonance of the γ -lactones of ursane-and oleanane-type triterpenes [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 29(1): 261-264.
- [5] Jeong W, Hong S S, Kim N, *et al.* Bioactive triterpenoids from *Callistemon lanceolatus* [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(6): 845-849.
- [6] David J P, Meira M, David J M, *et al.* Triterpenos E ferulatos de alquila de *Maprounea guianensis* [J]. *Quim Nova*, 2004, 27(1): 62-65.
- [7] Tan M L, Wang Y, Zhou L G, *et al.* Pentacyclic triterpenes from *Eucalyptus globulus* Labill. fruit [J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(2): 232-234.
- [8] Cao J, Liu Z L, Du S S, *et al.* Feeding deterrents from the tubers of *Boschniakia himalaica* against the red flour beetle [J]. *Tribolium Castaneum*, 2012, 6(18): 3506-3511.
- [9] Saha M M, Mallik U K, Mallik A K. A chromenoflavanone and two caffeic esters from *Pongamia glabra* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(11): 3834-3836.
- [10] 李火云, 焦 珂, 张 鹏, 等. 拟缺香茶菜化学成分研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 154-160.
- [11] 刘培培. 北美刺人参叶化学成分的研究 [J]. *中国现代中药*, 2010, 12(4): 19-20.
- [12] 赖作企, 董 勇. 中药路路通化学成分研究 (II) [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 1996, 35(S2): 44-48.
- [13] 周洪波, 王 峰, 房志坚. 金钮扣中三萜类化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(15): 2096-2098.
- [14] 黄 艳, 李齐修, 刘 元, 等. 簇花清风藤的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(6): 765-769.