

亚麻叶白千层化学成分研究

张 莎, 董春茅, 徐杨蕊, 陈德坤, 周澄杰, 康峰华, 徐康平, 邹振兴*

中南大学湘雅药学院, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 研究亚麻叶白千层 *Melaleuca linariifolia* 枝、叶中的化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20、ODS、以及 Pre-HPLC 等现代分离方法进行系统地分离纯化, 并根据化合物的理化性质和波谱数据进行结构鉴定。采用 CCK8 法初步评价化合物 1~6 对 6 种肿瘤细胞 (人肺腺癌 NCI-H441 细胞、人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞、人肺癌 A549 细胞、人卵巢腺癌 SKOV3 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞和人肾透明细胞癌 caki-1 细胞) 的体外细胞增殖抑制活性。结果 从亚麻叶白千层醋酸乙酯部位分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为 3-O-乙酰熊果酸 (1)、3 β -acetoxy-11-ursen-13 α ,30-olide (2)、betulinal (3)、diospyrolide (4)、3 β -O-(E)-cumaroyl-alphitolinsaeure (5)、3',4'-二羟基肉桂酸白桦脂酸酯 (6)、熊果醇 (7)、白桦脂醇 (8)、豆甾-4-烯-3-酮 (9)、5,7,4'-三羟基黄酮 3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷 (10)、山柰酚-3-O-(6''-没食子酰基)- β -D-葡萄糖苷 (11)、 α -生育酚 (12)、methoxytocopherol (13)、 α -tocopherolquinone (14)、植醇 (15)。CCK8 测试结果显示, 化合物 1、3、5、6 对人类肿瘤细胞显示出中等强度的增殖抑制作用。结论 所有化合物均为首次从该植物中分离得到, 其中化合物 2、4、5、9~11、13、14 为首次从该属植物中分离得到。化合物 1、3、5、6 对人类肿瘤细胞表现出一定的细胞毒活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值在 3.85~25.63 μ mol/L。

关键词: 桃金娘科; 亚麻叶白千层; 五环三萜; 黄酮苷; 生育酚; 3',4'-二羟基肉桂酸白桦脂酸酯; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3180-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.003

Chemical constituents of *Melaleuca linariifolia*

ZHANG Sha, DONG Chun-mao, XU Yang-rui, CHEN De-kun, ZHOU Cheng-jie, KANG Feng-hua, XU Kang-ping, ZOU Zhen-xing

Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from the twigs and leaves of *Melaleuca linariifolia*. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, ODS column chromatography, and preparative HPLC. Their structures were elucidated on basis of spectral data and physicochemical properties. Furthermore, the inhibitory effects of compounds 1—6 on proliferation of six human cancer cell lines (NCI-H441, NCI-H460, A549, SKOV3, HeLa, and caki-1) *in vitro* were tested by CCK8 method. **Results** Fifteen compounds were isolated from the ethyl acetate extract of *M. linariifolia* and identified as 3-O-acetyl ursolic acid (1), 3 β -acetoxy-11-ursen-13 α ,30-olide (2), betulinal (3), diospyrolide (4), 3 β -O-(E)-cumaroyl-alphitolinsaeure (5), pyracrenic acid (6), uvaol (7), betulin (8), stigmast-4-ene-3-one (9), 5,7,4'-trihydroxyl-flavone 3-O- α -L-rhamnopyranoside (10), kaempferol 3-O-(6''-galloyl)- β -D-glucoside (11), α -tocopherol (12), methoxytocopherol (13), α -tocopherolquinone (14), and phytol (15), respectively. CCK8 test results showed that compounds 1, 3, 5, and 6 exhibited moderate antiproliferative activities on six human cancer cells. **Conclusion** All the compounds were isolated from *M. linariifolia* for the first time, in which compounds 2, 4—5, 9—11, and 13—14 are isolated from the plants in genus *Melaleuca* for the first time. Compounds 1, 3, 5, and 6 showed certain cytotoxic activity against human tumor cells with IC₅₀ values ranging from 3.85 to 25.63 μ mol/L.

Key words: Myrtaceae; *Melaleuca linariifolia* CT Musson; pentacyclic triterpenoid; flavonoid glycoside; tocopherol; pyracrenic acid; cytotoxic activity

亚麻叶白千层 *Melaleuca linariifolia* CT Musson L., 该属植物全球约有 290 种, 主要分布在澳大利亚和东南亚。白千层属植物被广泛用作民间药物,

收稿日期: 2020-12-25

基金项目: 中南大学研究生自主探索创新项目 (1053320184128, 2019zzts767)

作者简介: 张 莎 (1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: ad8879789@163.com

*通信作者: 邹振兴, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: zouzhenxing@csu.edu.cn

主要用于感冒、流感以及痛风等疾病的治疗^[1-2],在第二次世界大战中被澳大利亚军队用作急救中的驱虫剂和抗菌剂^[3-4]。因其观赏和药用价值也逐渐引入我国广东、广西、云南等地。国内外研究表明,白千层属植物除了富含精油外,还具有三萜类、黄酮类、木脂素类、糖苷类等^[5]。目前对该属植物化学成分研究最多的是互叶白千层^[6-7],而对于亚麻叶白千层植物的研究仅停留在其精油成分及其抗菌活性成分上^[8-10],对其他活性化学成分研究未见相关报道。前期活性筛选结果发现,亚麻叶白千层醋酸乙酯萃取部位对人类多种肿瘤细胞具有较好的细胞增殖抑制作用,半数抑制浓度(IC₅₀)在14~37 μg/mL。为了进一步挖掘亚麻叶白千层中的天然活性小分子化合物。本课题组选取该部位进行系统的化学成分研究,并从中分离得到15个化合物,分别鉴定为3-O-乙酰熊果酸(3-O-acetyl ursolic acid, **1**)、3β-acetoxy-11-ursen-13α,30-olide (**2**)、betulinal (**3**)、diospyrolide (**4**)、3β-O-(*E*)-cumaroyl-alphitolinsaeure (**5**)、3',4'-二羟基肉桂酸白桦脂酸酯(pyracrenic acid, **6**)、熊果醇(uvaol, **7**)、白桦脂醇(betulin, **8**)、豆甾-4-烯-3-酮(stigmast-4-ene-3-one, **9**)、5,7,4'-三羟基黄酮 3-O-α-L-吡喃鼠李糖苷(5,7,4'-trihydroxyl-flavone 3-O-α-L-rhamnopyranoside, **10**)、山柰酚-3-O-(6''-没食子酰基)-β-D-葡萄糖苷[kaempferol 3-O-(6''-galloyl)-β-D-glucoside, **11**]、α-生育酚(α-tocopherol, **12**)、methoxytocopherol (**13**)、α-tocopherolquinone (**14**)、植醇(phytol, **15**),结构见图1。以上所有化合物均为首次从该植物中分离得到。采用CCK8法对化合物**1**~**6**进行了体外细胞毒活性评价,结果显示化合物**1**、**3**、**5**、**6**对6种人类肿瘤细胞(人肺腺癌NCI-H441细胞、人大细胞肺癌NCI-H460细胞、人肺癌A549细胞、卵巢腺癌SKOV3细胞、人宫颈癌HeLa细胞和人肾透明癌细胞caki-1细胞)表现出一定的增殖抑制活性。

1 仪器与材料

Bruker AV-400/AV-500/AV-600 核磁共振仪(美国布鲁克公司); Agilent 1290 UPLC-6545 accurate mass Q-TOF 色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 科技公司); Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 1.8 μm) 色谱柱; MassHunter 质谱工作站(美国 Agilent 科技公司); Büchi-540 熔点测定仪(瑞士 Büchi 公司); Agilent 1260 分析液相色谱仪(DAD 检测器)、Agilent 1200 制备液相色谱仪(美国安捷伦公司); YMC Pack ODS-A 分析型色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); YMC Pack ODS-A 制备型色谱柱(250 mm×10 mm, 10 μm); 硅胶(60~100、200~300 目, 青岛海洋化工厂); C₁₈ 反向硅胶(40~75 μm, 富士, 日本 Kasugai); Sephadex LH-20 (德国

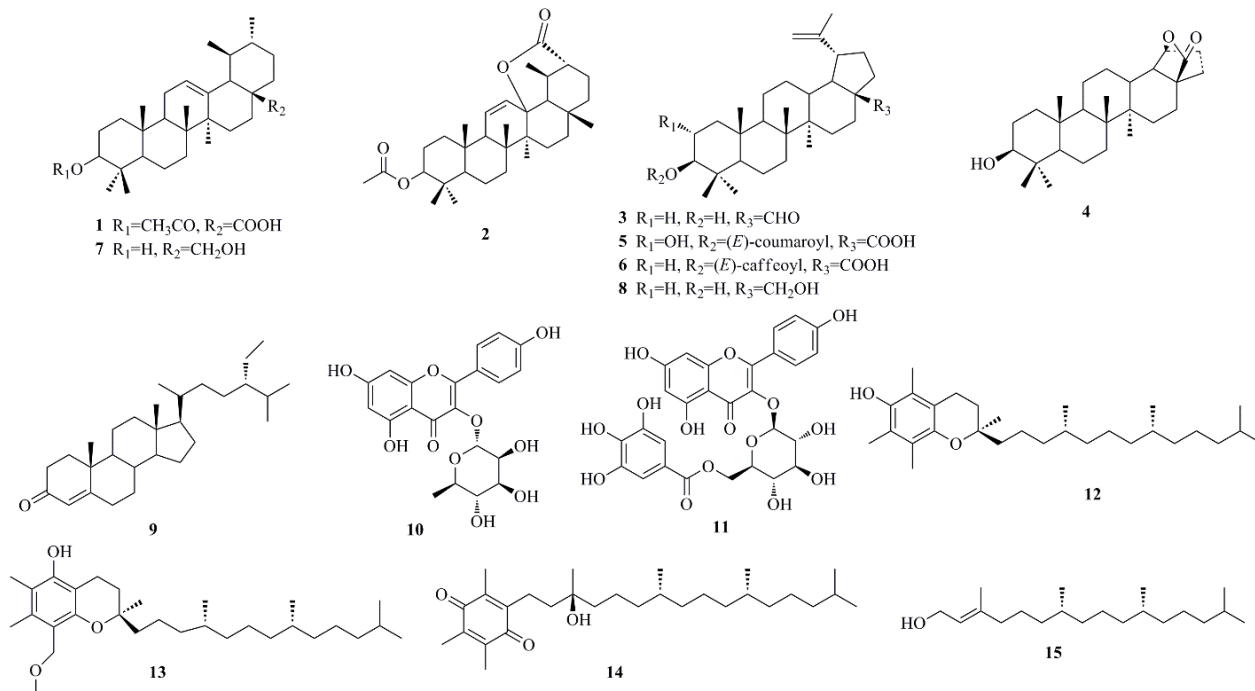


图1 化合物1~15的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—15

Healthcare Uppsala Swedeb); 所有溶剂均为分析纯。

NCI-H441、NCI-H460、A549、SKOV3、HeLa、caki-1 细胞均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

亚麻叶白千层于 2018 年 4 月采集于广州中国科学院华南植物园, 由中国科学院华南植物园谭海波副研究员鉴定为桃金娘科植物亚麻叶白千层 *M. linariifolia* CT Musson。目前该植物干燥枝、叶样品(20180411)保存于中南大学湘雅药学院。

2 提取与分离

亚麻叶白千层干燥枝、叶 10 kg, 粉碎, 用 95% 乙醇冷浸提取, 减压浓缩至无醇味, 得总浸膏, 浸膏进一步用水分散, 依次用石油醚、醋酸乙酯各萃取 3 次, 减压浓缩后分别得石油醚萃取部位(160 g)和醋酸乙酯萃取部位(280 g)。

选取醋酸乙酯萃取部位, 用石油醚-醋酸乙酯-甲醇(100:0:0~0:0:100)体系经硅胶柱色谱得 10 个流分(Fr. 1~10)。Fr. 4(23.2 g)经 ODS 柱色谱分离, 用甲醇-水(50:50~100:0)梯度洗脱得 7 个流分(Fr. 4-1~4-7)。Fr. 4-4(6.5 g)经硅胶柱色谱, 用石油醚-醋酸乙酯(20:1~0:100)梯度洗脱得 6 个流分(Fr. 4-4-1~4-4-6)。Fr. 4-4-3(1.1 g)经 Sephadex LH-20, 用二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱得 3 个流分(Fr. 4-4-3-1~4-4-3-3)。Fr. 4-4-3-1(0.36 g)通过 Prep-HPLC(90%~95%乙腈, 0~5 min, 95%乙腈, 5~30 min, 3 mL/min)得化合物 1(4.8 mg, $t_R=18$ min)、3(3.8 mg, $t_R=24$ min)和 4(2.6 mg, $t_R=26$ min)。Fr. 4-4-3-2(0.13 g)经 Prep-HPLC(90%~95%乙腈, 0~5 min, 95%乙腈, 5~30 min, 3 mL/min)得化合物 7(8.9 mg, $t_R=23$ min)。Fr. 4-5(3.8 g)经硅胶柱色谱, 采用石油醚-醋酸乙酯(20:1~0:100)梯度洗脱得 5 个流分(Fr. 4-5-1~4-5-5)。Fr. 4-5-3(1.4 g)再经硅胶柱色谱, 采用石油醚-二氯甲烷-甲醇(10:1:0~0:0:100)梯度洗脱得 6 个流分(Fr. 4-5-3-1~4-5-3-6)。Fr. 4-5-3-1(0.21 g)经 Prep-HPLC(75%~95%乙腈, 0~20 min, 95%乙腈, 20~40 min, 3 mL/min)得化合物 9(6.5 mg, $t_R=13$ min)、8(4.9 mg, $t_R=18$ min)、2(5.7 mg, $t_R=29$ min)和 15(3.3 mg, $t_R=31$ min)。Fr. 6(16.9 g)经硅胶柱色谱, 用石油醚-二氯甲烷-甲醇(20:1:0~0:0:100)洗脱得 9 个流分(Fr. 6-1~6-9)。Fr. 6-6(4.1 g)经 ODS 柱色谱, 甲醇-水(60:40~100:0)梯度

洗脱得到 6 个流分(Fr. 6-6-1~6-6-6)。Fr. 6-6-4(0.98 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得到 2 个流分(Fr. 6-6-4-1~6-6-4-2)。Fr. 6-6-4-1 经 Prep-HPLC(75%~85%乙腈, 0~40 min, 3 mL/min)得到化合物 5(18.5 mg, $t_R=26$ min)和 6(11.3 mg, $t_R=28$ min)。Fr. 6-6-4-2 经 Prep-HPLC(60%~80%乙腈, 0~30 min, 3 mL/min)得化合物 12(12.9 mg, $t_R=13$ min)、13(5.6 mg, $t_R=15$ min)、14(7.3 mg, $t_R=24$ min)。Fr. 6-6-5(1.2 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 甲醇洗脱得 3 个流分(Fr. 6-6-5-1~6-6-5-3)。Fr. 6-6-5-2(0.4 g)经 Prep-HPLC(30%~40%乙腈, 0~40 min, 3 mL/min)得到化合物 10(6.4 mg, $t_R=23$ min)、11(5.8 mg, $t_R=16$ min)。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色固体。ESI-MS m/z : 499.376 8 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.24(1H, t, $J=3.5$ Hz, H-12), 4.51(1H, dd, $J=9.0, 5.5$ Hz, H-3), 2.20(1H, d, $J=11.5$ Hz, H-18), 2.06(3H, s, -COCH₃), 1.08(3H, s, H-27), 0.97(3H, s, H-23), 0.97(3H, s, H-26), 0.96(3H, d, $J=8.0$ Hz, H-30), 0.88(3H, s, H-25), 0.87(3H, d, $J=9.0$ Hz, H-29), 0.78(3H, s, H-24); ^{13}C -NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ : 36.9(C-1), 23.3(C-2), 81.0(C-3), 38.3(C-4), 55.3(C-5), 18.2(C-6), 32.8(C-7), 39.5(C-8), 48.0(C-9), 36.7(C-10), 23.6(C-11), 125.6(C-12), 137.9(C-13), 41.9(C-14), 28.0(C-15), 24.0(C-16), 47.5(C-17), 52.5(C-18), 39.0(C-19), 38.8(C-20), 30.6(C-21), 37.7(C-22), 28.1(C-23), 15.5(C-24), 16.7(C-25), 17.0(C-26), 23.6(C-27), 184.1(C-28), 17.1(C-29), 21.2(C-30), 171.1(CO), 21.3(CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 1 为 3-O-乙酰熊果酸。

化合物 2: 白色固体。ESI-MS m/z : 497.351 8 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.95(1H, d, $J=10.0$ Hz, H-11), 5.54(1H, dd, $J=10.0, 3.0$ Hz, H-12), 4.50(1H, dd, $J=11.0, 5.5$ Hz, H-3), 2.06(3H, s, -COCH₃), 1.16(3H, s, H-27), 1.05(3H, s, H-25), 1.00(3H, d, $J=6.0$ Hz, H-29), 0.93(3H, s, H-23), 0.93(3H, s, H-26), 0.86(3H, s, H-28), 0.86(3H, s, H-24); ^{13}C -NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.0(C-1), 23.3(C-2), 80.7(C-3), 37.9(C-4), 54.8(C-5), 17.6(C-6), 31.3(C-7), 41.7(C-8), 53.0(C-9), 36.3(C-10), 133.3(C-11), 128.9(C-12), 89.7(C-13), 41.9(C-14), 24.7

(C-15), 30.8 (C-16), 45.1 (C-17), 40.3 (C-18), 38.1 (C-19), 60.6 (C-20), 22.8 (C-21), 31.2 (C-22), 27.7 (C-23), 16.1 (C-24), 19.2 (C-25), 18.9 (C-26), 16.1 (C-27), 18.0 (C-28), 17.9 (C-29), 180.0 (C-30), 171.1 (CO), 21.3 (CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **2** 为 3 β -acetox-11-ursen-13 α ,30-olide。

化合物 **3**: 白色晶体 (甲醇)。mp 163~166 °C。ESI-MS m/z : 441.367 2 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.70 (1H, d, J = 1.5 Hz, CHO), 4.77 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-29a), 4.65 (1H, m, H-29b), 3.21 (1H, dd, J = 11.0, 4.5 Hz, H-3), 1.72 (3H, s, H-30), 1.00 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-25), 0.84 (3H, s, H-26), 0.77 (3H, s, H-24); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 38.9 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 34.3 (C-7), 40.9 (C-8), 50.5 (C-9), 37.2 (C-10), 20.8 (C-11), 25.6 (C-12), 38.7 (C-13), 42.6 (C-14), 28.8 (C-15), 29.9 (C-16), 59.3 (C-17), 48.1 (C-18), 47.6 (C-19), 149.7 (C-20), 29.3 (C-21), 33.2 (C-22), 28.0 (C-23), 15.4 (C-24), 15.9 (C-25), 16.2 (C-26), 14.3 (C-27), 206.7 (C-28), 110.2 (C-29), 19.0 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **3** 为 betulinal。

化合物 **4**: 白色针晶 (甲醇)。mp 265~267 °C。ESI-MS m/z : 415.321 7 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 4.63 (1H, s, H-19), 3.19 (1H, dd, J = 11.4, 4.2 Hz, H-3), 0.97 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-26), 0.86 (3H, s, H-27), 0.84 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 38.9 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.9 (C-4), 55.4 (C-5), 18.2 (C-6), 34.2 (C-7), 40.6 (C-8), 50.9 (C-9), 37.3 (C-10), 20.7 (C-11), 22.2 (C-12), 34.3 (C-13), 40.6 (C-14), 28.9 (C-15), 28.2 (C-16), 51.2 (C-17), 55.0 (C-18), 79, 3 (C-19), 29.7 (C-21), 29.6 (C-22), 28.0 (C-23), 15.4 (C-24), 16.4 (C-25), 15.7 (C-26), 13.2 (C-27), 179.5 (C-28)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **4** 为 diospyrolide。

化合物 **5**: 白色固体。ESI-MS m/z : 619.399 8 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.08 (1H, s, COOH), 9.98 (1H, s, 4'-OH), 7.55 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 7.52 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'), 6.80 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.40 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'), 4.71 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-29a), 4.58 (1H, s, H-29b), 4.53 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-3), 3.68 (1H, m,

H-2), 2.97 (1H, m, H-19), 1.67 (3H, s, H-30), 0.97 (3H, s, H-27), 0.88 (3H, s, H-26), 0.88 (3H, s, H-25), 0.84 (3H, s, H-24), 0.78 (3H, s, H-23); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 48.2 (C-1), 65.4 (C-2), 84.0 (C-3), 39.3 (C-4), 55.0 (C-5), 18.3 (C-6), 34.2 (C-7), 40.8 (C-8), 50.2 (C-9), 38.0 (C-10), 21.1 (C-11), 25.5 (C-12), 38.2 (C-13), 42.5 (C-14), 29.7 (C-15), 32.2 (C-16), 55.9 (C-17), 49.0 (C-18), 47.1 (C-19), 150.8 (C-20), 30.6 (C-21), 37.0 (C-22), 28.8 (C-23), 18.1 (C-24), 17.6 (C-25), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27), 177.7 (C-28), 110.1 (C-29), 19.4 (C-30), 125.7 (C-1'), 130.6 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 160.1 (C-4'), 144.5 (C-7'), 115.6 (C-8'), 167.2 (C-9')。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **5** 为 3 β -O-(*E*)-cumaroyl-alphitolinsaeure。

化合物 **6**: 白色固体。ESI-MS m/z : 619.400 1 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.44 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'), 7.04 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.99 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.75 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.23 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'), 4.70 (1H, brs, H-29a), 4.57 (1H, brs, H-29b), 4.49 (1H, dd, J = 11.0, 4.5 Hz, H-3), 2.97 (1H, m, H-19), 1.65 (3H, s, H-30), 0.96 (3H, s, H-23), 0.89 (3H, s, H-26), 0.87 (3H, s, H-24), 0.83 (3H, s, H-23), 0.80 (3H, s, H-27); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.3 (C-1), 24.0 (C-2), 80.2 (C-3), 38.0 (C-4), 55.2 (C-5), 18.2 (C-6), 34.2 (C-7), 40.7 (C-8), 50.2 (C-9), 36.9 (C-10), 21.0 (C-11), 25.5 (C-12), 38.1 (C-13), 42.5 (C-14), 29.7 (C-15), 32.2 (C-16), 55.9 (C-17), 49.0 (C-18), 47.1 (C-19), 150.8 (C-20), 30.6 (C-21), 37.2 (C-22), 28.2 (C-23), 16.4 (C-24), 17.0 (C-25), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27), 177.9 (C-28), 110.1 (C-29), 19.4 (C-30), 125.9 (C-1'), 114.9 (C-2'), 146.1 (C-3'), 148.9 (C-4'), 115.3 (C-5'), 121.8 (C-6'), 145.3 (C-7'), 116.2 (C-8'), 166.8 (C-9')。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **6** 为 3',4'-二羟基肉桂酸白桦脂酸酯。

化合物 **7**: 白色固体。ESI-MS m/z : 443.388 7 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.12 (1H, t, J = 4.0 Hz, H-12), 3.55 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-28a), 3.15 (1H, dd, J = 11.2, 4.8 Hz, H-3), 3.03 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-28b), 1.13 (3H, s, H-27), 1.04 (3H, s, H-25), 0.98 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-29), 0.83 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-30), 0.79

(3H, s, H-24); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 38.7 (C-1), 26.5 (C-2), 78.3 (C-3), 37.8 (C-4), 55.3 (C-5), 18.1 (C-6), 32.6 (C-7), 39.9 (C-8), 47.3 (C-9), 36.6 (C-10), 22.7 (C-11), 124.9 (C-12), 138.8 (C-13), 41.8 (C-14), 25.7 (C-15), 22.5 (C-16), 38.5 (C-17), 54.2 (C-18), 39.3 (C-19), 39.5 (C-20), 35.2 (C-21), 30.4 (C-22), 27.3 (C-23), 14.8 (C-24), 15.1 (C-25), 15.9 (C-26), 23.1 (C-27), 68.8 (C-28), 16.5 (C-29), 20.4 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **7** 为熊果醇。

化合物 **8**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 443.387 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 4.68 (1H, s, H-29a), 4.58 (1H, s, H-29b), 3.80 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-28a), 3.33 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-28b), 3.19 (1H, dd, $J = 11.5, 5.0$ Hz, H-3), 1.68 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-23), 0.97 (3H, s, H-25), 0.82 (3H, s, H-26), 0.76 (3H, s, H-24); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.9 (C-4), 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 34.2 (C-7), 40.9 (C-8), 50.4 (C-9), 37.2 (C-10), 20.8 (C-11), 25.2 (C-12), 37.3 (C-13), 42.7 (C-14), 27.0 (C-15), 29.2 (C-16), 47.8 (C-17), 48.8 (C-18), 47.8 (C-19), 150.5 (C-20), 29.8 (C-21), 34.0 (C-22), 28.0 (C-23), 15.4 (C-24), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 14.8 (C-27), 60.5 (C-28), 109.7 (C-29), 19.1 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **8** 为白桦脂醇。

化合物 **9**: 浅黄色油状。ESI-MS m/z : 413.377 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.75 (1H, s, H-4), 1.20 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 0.85 (3H, q, $J = 7.2$ Hz, H-21), 0.85 (3H, q, $J = 7.2$ Hz, H-26), 0.85 (3H, q, $J = 7.2$ Hz, H-27), 0.73 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 35.6 (C-1), 34.0 (C-2), 199.8 (C-3), 123.7 (C-4), 171.8 (C-5), 33.0 (C-6), 32.0 (C-7), 35.7 (C-8), 53.8 (C-9), 38.6 (C-10), 21.0 (C-11), 39.6 (C-12), 42.4 (C-13), 55.9 (C-14), 24.2 (C-15), 28.2 (C-16), 56.0 (C-17), 11.9 (C-18), 17.4 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.8 (C-22), 26.0 (C-23), 45.8 (C-24), 29.7 (C-25), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 23.0 (C-28), 12.0 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **9** 为豆甾-4-烯-3-酮。

化合物 **10**: 黄色晶体 (二氯甲烷-甲醇)。mp 211~213 $^{\circ}\text{C}$ 。ESI-MS m/z : 433.100 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.77 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.95 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.37 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-1''), 0.92 (3H, d, $J = 5.5$ Hz, H-6''); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 159.3 (C-2), 136.2 (C-3), 179.6 (C-4), 158.6 (C-5), 95.0 (C-6), 166.6 (C-7), 100.1 (C-8), 163.2 (C-9), 105.8 (C-10), 122.6 (C-1'), 131.9 (C-2', 6'), 116.6 (C-3', 5'), 161.7 (C-4'), 103.5 (C-1''), 72.1 (C-2''), 72.2 (C-3''), 72.0 (C-4''), 73.2 (C-5''), 17.7 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[20], 故鉴定化合物 **10** 为 5,7,4'-三羟基黄酮 3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖苷。

化合物 **11**: 淡黄色固体。ESI-MS m/z : 601.116 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.93 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, s, H-2'', 6''), 6.73 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.20 (1H, m, H-1''), 4.28 (2H, m, H-6''), 3.46 (4H, m, H-2''~5''); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 158.5 (C-2), 135.3 (C-3), 179.4 (C-4), 162.9 (C-5), 100.0 (C-6), 166.1 (C-7), 95.0 (C-8), 159.6 (C-9), 105.6 (C-10), 122.7 (C-1'), 132.2 (C-2', 6'), 116.0 (C-3', 5'), 161.5 (C-4'), 104.4 (C-1''), 75.8 (C-2'', 5''), 71.5 (C-4''), 64.3 (C-6''), 121.3 (C-1'''), 110.2 (C-2''', 6'''), 146.4 (C-3''', 5'''), 139.8 (C-4'''), 168.1 (C-7''')。以上数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定化合物 **11** 为山柰酚-3-*O*-(6''-没食子酰基)- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **12**: 黄色油状物。ESI-MS m/z : 431.384 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 2.54 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4), 2.11 (3H, s, H-7a), 2.06 (3H, s, H-5a), 2.04 (3H, s, H-8a), 1.73 (2H, m, H-3), 1.18 (3H, s, H-2a), 0.87 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-12'a), 0.86 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-13'), 0.85 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-4'a), 0.84 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-8'a); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 73.9 (C-2), 31.7 (C-3), 20.5 (C-4), 120.4 (C-5), 144.7 (C-6), 121.6 (C-7), 122.9 (C-8), 145.3 (C-9), 116.7 (C-10), 22.9 (C-2a), 10.6 (C-5a), 11.6 (C-7a), 11.0 (C-8a), 39.4 (C-1'), 20.7 (C-2'), 37.3 (C-3'), 32.6 (C-4'), 37.3 (C-5'), 24.2 (C-6'), 37.2 (C-7'), 32.5 (C-8'), 37.1 (C-9'), 24.6 (C-10'), 39.2 (C-11'), 27.8 (C-12'), 21.9 (C-13'), 19.0 (C-4'a), 19.0 (C-8'a), 22.0 (C-12'a)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **12** 为 α -生育酚。

化合物 **13**: 黄色油状物。ESI-MS m/z : 461.394 2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.66 (2H, s, H-8a), 3.44 (3H, s, -OCH₃), 2.60 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-4), 2.15 (3H, s, H-7a), 2.11 (3H, s, H-6a), 1.77 (2H, m, H-3), 1.26 (3H, s, H-2a), 0.87 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-13', 12'a), 0.84 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-4'a, 8'a); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 74.4 (C-2), 31.4 (C-3), 20.0 (C-4), 144.7 (C-5), 123.1 (C-6), 115.9 (C-7), 125.8 (C-8), 147.3 (C-9), 115.4 (C-10), 23.7 (C-2a), 11.9 (C-6a), 11.7 (C-7a), 69.8 (C-8a), 58.1 (-OCH₃), 39.8 (C-1'), 21.0 (C-2'), 37.5 (C-3'), 32.8 (C-4'), 37.5 (C-5'), 24.5 (C-6'), 37.4 (C-7'), 32.7 (C-8'), 37.3 (C-9'), 24.8 (C-10'), 39.4 (C-11'), 28.0 (C-12'), 22.6 (C-13'), 19.8 (C-4'a), 19.7 (C-8'a), 22.7 (C-12'a)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **13** 为 methoxytocopherol。

化合物 **14**: 黄色油状物。ESI-MS m/z : 447.373 8 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.56 (2H, m, H-1'), 2.05 (3H, s, H-6a), 2.02 (6H, s, H-3a, 4a), 1.25 (3H, s, H-3'a), 0.88 (9H, d, J = 7.0 Hz, H-7'a, 16', 15'a), 0.86 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-11'a); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 144.5 (C-1), 187.7 (C-2), 140.2 (C-3), 140.5 (C-4), 187.3 (C-5), 140.4 (C-6), 12.3 (C-3a), 12.4 (C-4a), 12.0 (C-6a), 21.4 (C-1'), 39.4 (C-2'), 72.7 (C-3'), 42.3 (C-4'), 21.3 (C-5'), 29.9 (C-6'), 32.8 (C-7'), 37.6 (C-8'), 24.5 (C-9'), 37.4 (C-10'), 32.8 (C-11'), 37.3 (C-12'), 24.8 (C-13'), 40.3 (C-14'), 28.0 (C-15'), 22.7 (C-16'), 26.6 (C-3'a), 19.8 (C-7'a), 19.7 (C-11'a), 22.6 (C-15'a)。以上数据与文献报道基本一致^[23], 故鉴定化合物 **14** 为 α -

tocopherolquinone。

化合物 **15**: 无色油状物。ESI-MS m/z : 314.341 3 $[M+NH_4]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.43 (1H, t, J = 5.5 Hz, H-2), 4.18 (2H, d, J = 7.0 Hz, H-1), 2.01 (2H, m, H-4), 1.69 (3H, s, H-17), 1.54 (1H, m, H-15), 0.88 (6H, d, J = 7.0 Hz, H-16, 20), 0.87 (6H, d, J = 6.5 Hz, H-18, 19); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 59.4 (C-1), 123.1 (C-2), 140.3 (C-3), 39.9 (C-4), 25.1 (C-5), 36.7 (C-6), 32.7 (C-7), 37.4 (C-8), 24.5 (C-9), 37.4 (C-10), 32.8 (C-11), 37.3 (C-12), 24.8 (C-13), 39.4 (C-14), 28.0 (C-15), 22.6 (C-16), 16.2 (C-17), 19.7 (C-18), 19.8 (C-19), 22.7 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致^[24], 故鉴定化合物 **15** 为植醇。

3.2 细胞毒活性评价

以星形孢菌素 (staurosporine, STS) 为阳性对照, 采用 CCK8 法检测化合物 **1~6** 对 6 种人肿瘤细胞 (NCI-H441、NCI-H460、A549、SKOV3、Hela、caki-1) 的细胞毒活性。首先将上述 6 种癌细胞以 3×10^3 /孔的浓度悬浮在 96 孔板中的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 并在 5% CO₂、37 °C 条件下孵育 24 h。然后, 每组添加不同浓度的测试样品 (0.39~50 μ mol/L, 2 倍梯度稀释), 同时设立不加化合物的对照组和加 STS 的阳性对照组, 培养 72 h 后, 将含有 CCK8 试剂 (10%) 的新鲜培养基 (100 μ L) 加入各孔中, 并再培养 2 h。最后, 在 450 nm 下测定溶液的吸光度 (A) 值, 并根据公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

并用 Graph Pad Prism 软件拟合化合物的 IC₅₀ 值。所有结果均平行测试 3 次, 取平均值。CCK8 结果见表 1。

表 1 化合物 **1~6** 对 6 种肿瘤细胞的细胞毒活性
Table 1 Cytotoxic activity of compounds **1~6** on six tumor cells

化合物	IC ₅₀ /(μ mol·L ⁻¹)					
	NCI-H441	NCI-H460	A549	SKOV3	HeLa	caki-1
1	15.15±2.05	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	18.50±3.21	12.11±2.17	3.85±0.98	11.59±1.64	15.36±2.35	13.47±2.26
4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5	8.60±2.35	16.43±1.73	11.63±1.08	10.34±0.72	18.39±1.44	25.63±0.67
6	11.50±1.34	20.96±1.03	12.34±2.28	9.10±1.66	23.62±0.89	18.23±2.53
STS	0.40±0.05	0.20±0.03	0.30±0.06	0.45±0.05	0.30±0.04	0.50±0.06

N/A: 没有活性; STS: 阳性对照星形孢菌素

N/A: no active; STS: staurosporine used as a positive control

4 讨论

本研究从亚麻叶白千层醋酸乙酯部位中共分离得到 15 个化合物, 主要包括三萜类化合物 9 个, 黄酮苷类化合物 2 个, 生育酚类以及其他化合物 4 个。体外活性实验表明化合物 1、3、5、6 对 6 种人类肿瘤细胞均有不同程度的增殖抑制作用, 提示三萜类成分可能是亚麻叶白千层抗肿瘤主要药效物质基础, 其分子作用机制还有待我们进一步深入研究。本研究结果丰富了白千层属的化学成分, 也能为该植物综合药用开发利用提供一定的科学和实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Packer J, Brouwer N, Harrington D, et al. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the Yaegl Aboriginal community in northern New South Wales, Australia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(1): 244-255.
- [2] Nguyen M T, Awale S, Tezuka Y, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(9): 1414-1421.
- [3] Lis-Balchin M, Hart S L, Deans S G. Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or Manuka and *Kunzea ericoides* or Kanuka), originating in Australia and New Zealand [J]. *Phytother Res*, 2000, 14(8): 623-629.
- [4] Sharifi-Rad J, Salehi B, Salehi B, et al. Plants of the *Melaleuca* genus as antimicrobial agents: From farm to pharmacy [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(10): 1475-1494.
- [5] 沈丹, 杨学东. 白千层属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 970-980.
- [6] 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.
- [7] 柴玲, 陈明生, 卢文杰, 等. 互叶白千层化学成分及其抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(3): 581-587.
- [8] Southwell I A, Stiff I A. Differentiation between *Melaleuca alternifolia* and *M. linariifolia* by monoterpenoid comparison [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(11): 3529-3533.
- [9] Butcher P A, Matheson A C, Slee M U. Potential for genetic improvement of oil production in *Melaleuca alternifolia* and *M. linariifolia* [J]. *New For*, 1996, 11(1): 31-51.
- [10] Southwell I A, Maddox C D, Zalucki M P. Metabolism of 1,8-cineole in tea tree (*Melaleuca alternifolia* and *M. linariifolia*) by pyrgo beetle (*Paropsisterna tigrina*) [J]. *J Chem Ecol*, 1995, 21(4): 439-453.
- [11] Song Y L, Zhang L, Gao J M, et al. Speciosaperoxide, a new triterpene acid, and other terpenoids from *Chaenomeles speciosa* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(3/4): 217-222.
- [12] Tanaka N, Duan H Q, Takaishi Y, et al. Terpenoids from *Tripterygium doianum* (Celastraceae) [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(1): 93-98.
- [13] Barthel A, Stark S, Csuk R. Oxidative transformations of betulinol [J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(39): 9225-9229.
- [14] Kuo Y H, Chang C I, Kuo Y H. A novel trisnorlupane, diospyrolide, from *Diospyros maritima* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1997, 45(7): 1221-1222.
- [15] Tian M Q, Dai H F, Li X M, et al. Chemical constituents of marine medicinal mangrove plant *Sonneratia caseolaris* [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2009, 27(2): 288-296.
- [16] 张中奇, 郑彩娟, 陈光英, 等. 海南天料木茎化学成分和抗菌活性的研究 [J]. *中成药*, 2015, 37(10): 2203-2208.
- [17] Zhang J Y, Li N, Hu A, et al. Chemical constituents from processed seeds of *Strychnos nux-vomica* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2012, 21(2): 187-191.
- [18] 何小汝, 王雅琪, 徐柳云, 等. 猴子瘰袋化学成分研究 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(7): 1639-1642.
- [19] 邵泰明, 宋小平, 陈光英, 等. 大果榕茎化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(16): 2208-2212.
- [20] 何红平, 朱伟明, 沈月毛, 等. 小叶臭黄皮的黄酮甙成分 [J]. *云南植物研究*, 2001, 23(2): 256-260.
- [21] 林倩, 贾凌云, 孙启时. 菟丝子的化学成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2009, 26(12): 968-971.
- [22] Seo K H, Lee D Y, Nam T G, et al. New tocopherol analogue with radical-scavenging activity from the peels of *Citrus unshiu* Marcovich [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2013, 56(6): 747-750.
- [23] 张茂娟, 刘冰, 安彦峰, 等. 白钩藤的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 175-180.
- [24] 魏涵, 吴光华, 杨娴, 等. 华南毛蕨叶的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(17): 2354-2357.

[责任编辑 王文倩]