

桂花叶的化学成分及抗肿瘤活性研究

尹伟¹, 郁阳², 马秋丽¹, 陈婷¹, 张国升^{3*}

(1. 安徽新华学院药学院, 合肥 230088; 2. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201; 3. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230031)

摘要: 为了解桂花(*Osmanthus fragrans*)叶片的化学成分, 应用多种色谱分离手段从桂花叶醇提溶液分离得到 13 个化合物, 经波谱分析分别鉴定为香橙素 (1)、染料木黄酮 (2)、lupinalbin A (3)、齐墩果酸甲酯 (4)、3-羧基齐墩果酸 (5)、fouquierol (6)、19 α -羟基-3-O-乙酰熊果酸 (7)、白桦脂醇 (8)、豆甾-3,5-二烯-7-酮 (9)、刺五加酮 (10)、对羟基苯乙酮 (11)、3,16 α -二羟基对映贝壳杉烷 (12)和 trigoflavidone A (13)。所有化合物均为首次从桂花中分离得到。采用 MTT 法检测抗肿瘤活性表明, 化合物 2、3、10 均有一定的抗肿瘤活性, 且对 4 种肿瘤细胞株的活性检测为首次报道。

关键词: 桂花; 叶片; 化学成分; 结构鉴定; 抗肿瘤活性

doi: 10.11926/jtsb.3786

Study on Chemical Constituents and Antitumor Activities of Leaves of *Osmanthus fragrans*

YIN Wei¹, YU Yang², MA Qiu-li¹, CHEN Ting¹, ZHANG Guo-sheng^{3*}

(1. Department of Pharmacology, Xinhua College of Anhui, Hefei 230088, China; 2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; 3. Department of Pharmacology, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

Abstract: In order to understand the chemical constituents of *Osmanthus fragrans* leaves, thirteen compounds were isolated from the 95% ethanol extract. On the basis of spectral data, their structures were identified as aromadendrin (1), genistein (2), lupinalbin A (3), methyl oleanolate (4), 3-ketooleanolic acid (5), fouquierol (6), 19 α -hydroxyl acetylursolic acid (7), betulin (8), stigmasta-3,5-dien-7-one (9), ciwujiatone (10), *p*-hydroxyacetophenone (11), entkaurane-3,16 α -diol (12), and trigoflavidone A (13). All of compounds are isolated from the leaves of *O. fragrans* for the first time. The compounds 2, 3, 10 showed significant antitumor activities, and their activity determination to 4 kinds of tumor cells was reported for the first time.

Key words: *Osmanthus fragrans*; Leaf; Chemical constituent; Structure identification; Antitumour activity

桂花(*Osmanthus fragrans*)为木犀科(Oleaceae)木犀属植物, 产于中国西南部等地。桂花味辛, 以花、果实及根入药, 有研究表明^[1], 桂花能够疏肝理气、祛痰止咳等。本文作者前期在对其花、果实、根化学成分的研究基础上^[2-4], 进一步对桂花叶的

成分进行探讨, 旨在发现具有生理活性的化学成分, 为完善木犀科植物的药用价值奠定基础。

从桂花叶醇提溶液中共分离出了 13 个化合物(图 1), 分别鉴定为香橙素 (1)、染料木黄酮 (2)、lupinalbin A (3)、齐墩果酸甲酯 (4)、3-羧基齐墩果

收稿日期: 2017-07-03 接受日期: 2017-09-01

基金项目: 安徽省教育厅重点自然科学基金项目(KJ2015A307); 国家大学生创新创业训练项目(201612216011)资助

This work was supported by the Projects for Key Natural Science in Anhui Provincial Department of Education (Grant No. KJ2015A307); and the Training Program for Undergraduate Innovation and Entrepreneurship (Grant No. 201612216011).

作者简介: 尹伟(1983~), 副教授, 博士, 研究方向为天然药物化学。E-mail: weiy2015@mail.ustc.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 306044634@qq.com

酸 (5)、fouquierol (6)、19 α -羟基-3-*O*-乙酰熊果酸 (7)、白桦脂醇 (8)、豆甾-3,5-二烯-7-酮 (9)、刺五加酮 (10)、对羟基苯乙酮 (11)、3,16 α -二羟基-对映贝壳杉烷 (12)和 trigoflavidone A (13)。所有化合物均为首次从桂花叶中分离得到。本文报道这些化合物的分离鉴定和对肿瘤细胞的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

桂花(*Osmanthus fragrans*)叶采自安徽合肥,由安徽中医药大学张国升教授鉴定。Hela (宫颈癌细胞), HepG2 (人肝癌细胞), 4T1 (小鼠乳腺癌细胞)和 A549 (人肺癌细胞)(中国科学技术大学生命科学院,中国科学院软物质化学重点实验室提供)。H22 小鼠(携带肝癌细胞的 BALB/c 小鼠)、BALB/c 小鼠,清洁级,6~7周(中国科学技术大学生命科学院,实验动物中心提供); RPMI-1640 培养液(碧云天生物技术有限公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, 碧云天生物技术有限公司); 环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司); 二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司)。硅胶和薄层色谱硅胶均为青岛海洋化工厂生产。

1.2 仪器

质谱由英国 Micromass 公司产 VG Auto-Spec-3000 质谱仪测定; ^1H 、 ^{13}C NMR 用 Bruker DRX-500 MHz 超导核磁共振仪测定; 制备型 MPLC 仪器为 Büchi 公司生产(Büchifraction collector C-660, Büchi pump module C-605 and manager C-615); HPLC 为 Agilent 1100, Zorbax SB-C-18 column (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); Sephadex LH-20 为瑞士 Amershan Biosciences 公司生产; 酶标板分析仪(BXS01-ELX-800, 美国宝特酶标仪); 熔点由科翔仪器仪表有限公司生产的 HR-3C 型显微熔点仪测定。

1.3 提取和分离

桂花叶干燥粉末约 4.0 kg, 用 95% 乙醇浸提, 减压浓缩至无醇味, 加水悬浮, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇依次萃取, 浓缩得石油醚部分 55.0 g、氯仿部分 63.0 g、乙酸乙酯部分 112.0 g 和正丁醇部分 158.0 g。

氯仿萃取部分经硅胶柱色谱[石油醚-丙酮 9:1~5:5, 石油醚-乙酸乙酯 8:2~5:5, (V/V,

下同)]溶剂, 进行梯度洗脱, 分别得到化合物 4 (19.0 mg)、8 (23.8 mg)、12 (16.9 mg)和 13 (19.3 mg)。乙酸乙酯萃取部分经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 10:0~50:50), 得 6 个部分(Fr.1~Fr. 6), Fr.2 浓缩得浅黄色浸膏, 通过反复硅胶柱分离(氯仿-甲醇 9:1~5:5, 石油醚-丙酮 9:1~5:5), 经中压制备(MPLC) (30%~100%乙腈, 流速为 1 mL min $^{-1}$), 同时用 Sephadex LH-20 凝胶柱(氯仿-甲醇 1:1)纯化, 得化合物 5 (14.9 mg)、11 (22.7 mg)和 2 (30.3 mg); Fr.3 经减压浓缩得棕色浸膏, 反复经硅胶色谱(氯仿-甲醇 9:1~6:4), 最后用 Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇)纯化, 得化合物 6 (25.4 mg)和 3 (27.5 mg); Fr.4 经减压浓缩得深褐色浸膏, 依次经中压制备(MPLC) (30%~100%乙腈, 流速为 1 mL min $^{-1}$), 反复硅胶色谱(石油醚-乙酸乙酯 8:2~4:6, 氯仿-甲醇 9:1~5:5, 氯仿-丙酮 9:1~4:6), 用 Sephadex LH-20 凝胶柱(氯仿-甲醇 1:1)纯化, 得化合物 1 (20.5 mg)、7 (17.7 mg)、10 (28.6 mg)和 9 (21.5 mg)。

1.4 结构鉴定

化合物 1 针状结晶(甲醇); ^1H NMR (500 MHz, CD $_3$ OD): δ 5.00 (1H, d, J = 12.3 Hz, H-2), 4.57 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-3), 5.90 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-6), 5.91 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 7.36 (2H, d, J = 8.6, H-2', 6'), 6.85 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD $_3$ OD): δ 85.1 (C-2), 73.7 (C-3), 198.7 (C-4), 165.4 (C-5), 97.5 (C-6), 168.8 (C-7), 96.6 (C-8), 164.6 (C-9), 102.0 (C-10), 129.2 (C-1'), 130.6 (C-2', 6'), 116.4 (C-3', 5'), 159.3 (C-4')。以上数据与文献[5]报道的数据一致, 确定该化合物为香橙素。

化合物 2 黄色针晶(丙酮); EI-MS m/z : 270 [M] $^+$, 241, 213, 197。 ^1H NMR (500 MHz, CD $_3$ COCD $_3$): δ 13.00 (OH-4'), 6.31 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.44 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 7.44 (2H, dd, J = 2.2, 6.2 Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, dd, J = 2.5, 6.7 Hz, H-3', 5'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD $_3$ COCD $_3$): δ 154.2 (C-2), 124.2 (C-3), 181.4 (C-4), 163.7 (C-5), 99.9 (C-6), 164.8 (C-7), 94.6 (C-8), 159.1 (C-9), 106.4 (C-10), 123.3 (C-1'), 131.3 (C-2'), 116.1 (C-3'), 158.3 (C-4'), 116.1 (C-5'), 131.4 (C-6')。以上数据与文献[6]报道的数据一致, 确定该化合物为染料木黄酮。

化合物 3 白色粉末(甲醇); EI-MS m/z : 284 [M] $^+$, 255, 228, 214。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):

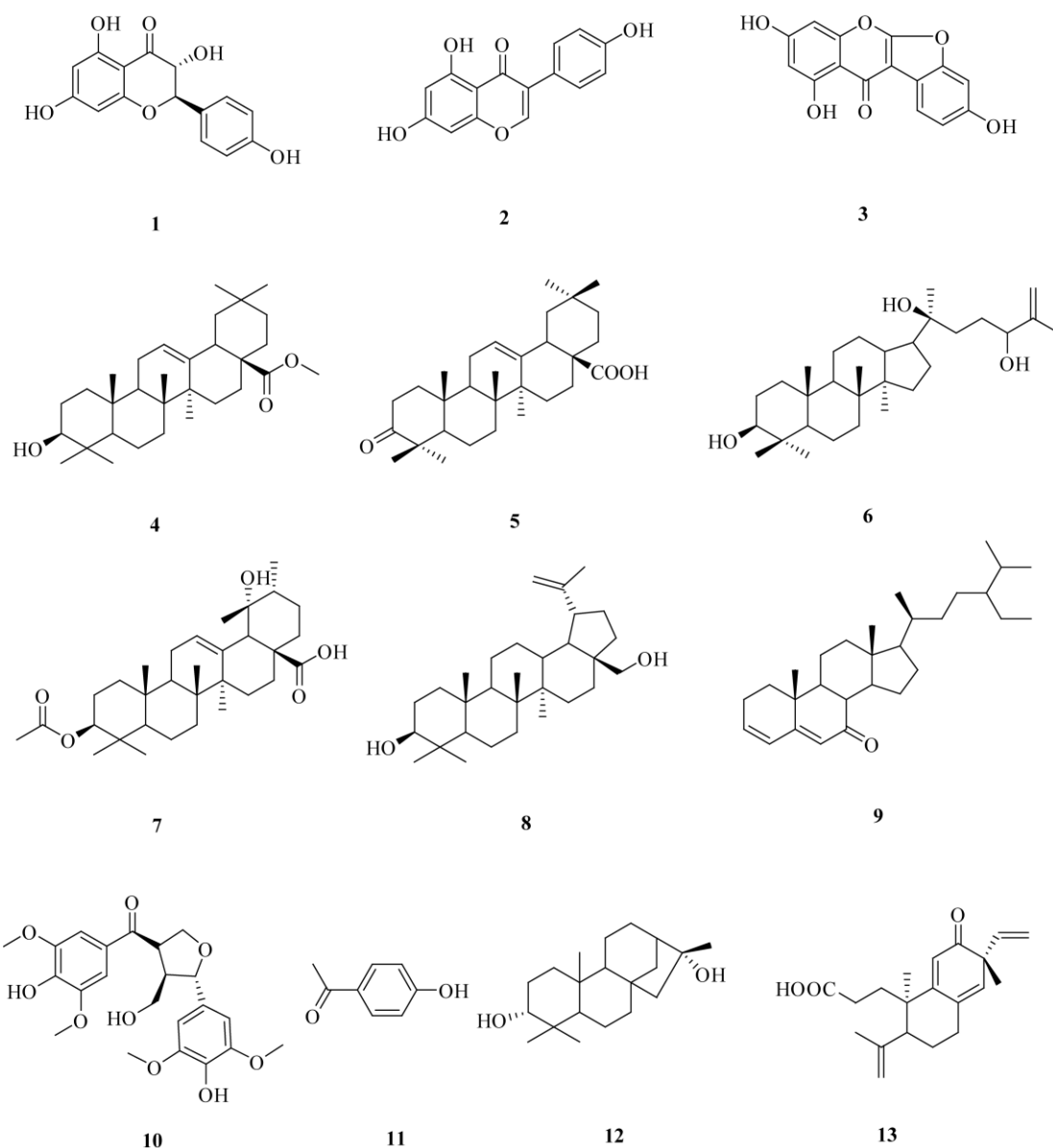


图1 化合物 1~13 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-13

δ 6.32 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.56 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 7.05 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 6.95 (1H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, H-5'), 7.74 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6')。 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 165.2 (C-2), 100.2 (C-3), 179.1 (C-4), 163.6 (C-5), 100.6 (C-6), 164.6 (C-7), 96.4 (C-8), 155.6 (C-9), 104.2 (C-10), 114.2 (C-1'), 151.2 (C-2'), 98.4 (C-3'), 157.3 (C-4'), 115.2 (C-5'), 122.5 (C-6')。以上数据与文献[7]报道的数据一致, 确定该化合物为 lupinalbin A。

化合物 4 白色粉末(氯仿); mp 257°C ~ 259°C。ESI-MS m/z : 493 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 ,

500 MHz): δ 4.22 (1H, m, H-3), 5.16 (1H, br s, H-12), 0.82, 0.90, 0.91, 0.92, 1.01, 1.02, 1.17 (each 3H, s, H-23~27, 29, 30), 3.64 (3H, s, 28-OCH₃); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 39.0 (C-1), 28.1 (C-2), 78.8 (C-3), 38.6 (C-4), 55.6 (C-5), 18.9 (C-6), 33.1 (C-7), 39.3 (C-8), 47.2 (C-9), 37.2 (C-10), 23.5 (C-11), 122.3 (C-12), 144.6 (C-13), 41.9 (C-14), 28.7 (C-15), 23.8 (C-16), 46.8 (C-17), 42.1 (C-18), 46.2 (C-19), 30.8 (C-20), 33.6 (C-21), 31.7 (C-22), 28.4 (C-23), 16.3 (C-24), 15.1 (C-25), 17.3 (C-26), 25.9 (C-27), 178.1 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30), 54.9 (COOCH₃)。以

上数据与文献[8]报道的数据一致, 确定该化合物为齐墩果酸甲酯。

化合物 5 白色粉末(氯仿), mp 288°C ~ 291°C; ESI-MS m/z : 477 [M + Na]⁺。 ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 5.20 (1H, br s, H-12), 2.81 (1H, dd, $J = 13.3, 4.1$ Hz, H-18), 0.71, 0.79, 0.90, 0.93, 1.03, 1.05, 1.41 (each 3H, s, H-23~27, 29, 30); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 39.0 (C-1), 34.0 (C-2), 217.7 (C-3), 47.4 (C-4), 55.5 (C-5), 19.3 (C-6), 32.1 (C-7), 39.1 (C-8), 46.5 (C-9), 37.0 (C-10), 23.0 (C-11), 122.5 (C-12), 143.6 (C-13), 41.8 (C-14), 27.8 (C-15), 23.6 (C-16), 46.3 (C-17), 41.1 (C-18), 46.2 (C-19), 31.0 (C-20), 33.8 (C-21), 32.4 (C-22), 26.5 (C-23), 21.2 (C-24), 15.1 (C-25), 17.2 (C-26), 26.1 (C-27), 183.6 (C-28), 32.3 (C-29), 23.9 (C-30)。以上数据与文献[9]报道的数据一致, 确定该化合物为3-羰基齐墩果酸。

化合物 6 白色粉末(氯仿); mp 193°C ~ 194°C; ESI-MS m/z : 483 [M + Na]⁺。 ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 3.21 (1H, m, H-3), 1.76 (1H, m, H-17), 1.00 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 1.11 (3H, s, H-21), 4.06 (1H, m, H-24), 4.97 (1H, br s, H-26a), 4.83 (1H, m, H-26b), 1.71 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, s, H-28), 0.81 (3H, s, H-29), 0.90 (3H, s, H-30); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 39.0 (C-1), 27.3 (C-2), 79.1 (C-3), 38.7 (C-4), 55.5 (C-5), 18.1 (C-6), 35.0 (C-7), 40.0 (C-8), 50.8 (C-9), 37.1 (C-10), 21.3 (C-11), 24.6 (C-12), 42.1 (C-13), 50.4 (C-14), 31.2 (C-15), 27.4 (C-16), 50.2 (C-17), 15.7 (C-18), 16.3 (C-19), 75.0 (C-20), 25.4 (C-21), 36.2 (C-22), 29.9 (C-23), 76.1 (C-24), 147.7 (C-25), 111.0 (C-26), 18.1 (C-27), 28.3 (C-28), 15.4 (C-29), 16.5 (C-30)。以上数据与文献[10]报道的数据一致, 确定该化合物为fouquierol。

化合物 7 白色粉末(氯仿), mp 218°C ~ 221°C。 ESI-MS m/z : 537 [M + Na]⁺。 ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 4.52 (1H, m, H-3), 5.30 (1H, br s, H-12), 2.57 (1H, s, H-18), 0.67, 0.86, 0.99, 1.17, 1.24, 1.25 (each 3H, s, H-23~27, 29), 0.81 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-30), 2.05 (3H, s, CH₃CO-); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 38.5 (C-1), 23.5 (C-2), 80.6 (C-3), 37.9 (C-4), 55.1 (C-5), 18.2 (C-6), 32.6 (C-7), 40.2 (C-8), 47.1 (C-9), 37.3 (C-10), 23.8 (C-11), 128.9 (C-12), 138.1 (C-13), 41.0 (C-14), 28.3 (C-15), 25.6 (C-16), 47.9 (C-17), 53.0 (C-18), 73.2 (C-19), 41.4 (C-20), 25.5 (C-21),

37.2 (C-22), 28.2 (C-23), 16.6 (C-24), 15.0 (C-25), 17.2 (C-26), 24.3 (C-27), 183.2 (C-28), 27.1 (C-29), 16.0 (C-30), 21.1 (CH₃CO), 171.2 (CH₃CO)。以上数据与文献[11]报道的数据一致, 确定该化合物为19 α -羟基-3-*O*-乙酰熊果酸。

化合物 8 白色粉末(氯仿); mp 251°C ~ 253°C。 ESI-MS m/z : 465 [M + Na]⁺。 ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 3.16 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-3), 2.32 (1H, m, H-19), 0.75, 0.80, 0.99, 1.01, 1.07 (each 3H, s, H-23~27), 3.77 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-28a), 3.25 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-28b), 4.71 (1H, br s, H-29a), 4.58 (1H, br s, H-29b), 1.63 (3H, s, H-30); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 39.2 (C-1), 27.5 (C-2), 78.7 (C-3), 39.1 (C-4), 55.5 (C-5), 18.2 (C-6), 34.3 (C-7), 40.6 (C-8), 50.5 (C-9), 37.2 (C-10), 20.6 (C-11), 25.1 (C-12), 37.3 (C-13), 42.4 (C-14), 27.5 (C-15), 28.6 (C-16), 47.4 (C-17), 47.5 (C-18), 48.4 (C-19), 150.4 (C-20), 29.6 (C-21), 34.2 (C-22), 28.3 (C-23), 15.6 (C-24), 15.6 (C-25), 16.4 (C-26), 14.7 (C-27), 60.8 (C-28), 109.6 (C-29), 19.3 (C-30)。以上数据与文献[12]报道的数据一致, 确定该化合物为白桦脂醇。

化合物 9 白色粉末(氯仿); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.28 (1H, m, H-3), 6.17 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 5.65 (1H, s, H-6), 0.70 (3H, s, H-18), 1.18 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-21), 0.83 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27), 0.81 (3H, t, $J = 8.1$ Hz, H-29); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 33.1 (C-1), 23.8 (C-2), 136.4 (C-3), 124.8 (C-4), 161.3 (C-5), 127.6 (C-6), 202.1 (C-7), 46.5 (C-8), 49.7 (C-9), 36.7 (C-10), 21.7 (C-11), 39.4 (C-12), 43.6 (C-13), 51.1 (C-14), 26.8 (C-15), 29.0 (C-16), 55.0 (C-17), 12.4 (C-18), 16.5 (C-19), 36.7 (C-20), 19.3 (C-21), 33.8 (C-22), 26.5 (C-23), 46.2 (C-24), 29.5 (C-25), 19.0 (C-26), 20.2 (C-27), 23.3 (C-28), 12.3 (C-29)。以上数据与文献[13]报道的数据一致, 确定该化合物为豆甾-3,5-二烯-7-酮。

化合物 10 黄色粉末(甲醇); ESI-MS m/z : 457 [M + Na]⁺, ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 7.40 (1H, s, H-2), 7.37 (1H, s, H-6), 4.25 (1H, m, H-8), 4.19 (1H, m, H-9), 6.73 (1H, s, H-6'), 4.66 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7'), 2.64 (1H, m, H-8'), 3.63 (1H, m, H-9'), 3.91 (6H, s, 3,5-OCH₃), 3.81 (6H, s, 3',5'-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 128.3 (C-1), 108.1 (C-2),

149.3 (C-3), 142.7 (C-4), 149.0 (C-5), 105.4 (C-6), 200.1 (C-7), 50.3 (C-8), 71.7 (C-9), 133.1 (C-1'), 105.4 (C-2'), 149.5 (C-3'), 136.5 (C-4'), 149.6 (C-5'), 105.4 (C-6'), 85.5 (C-7'), 55.0 (C-8'), 61.2 (C-9'), 57.1 (3,5-OCH₃), 56.7 (3',5'-OCH₃)。以上数据与文献[14]报道的数据一致, 确定该化合物为刺五加酮。

化合物 11 白色针晶(甲醇); ESI-MS m/z : 137 [M + Na]⁺。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10.53 (1H, s, OH-2), 7.80 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3, 5), 2.52 (3H, s, COCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 128.2 (C-1), 130.6 (C-2, 6), 115.1 (C-3, 5), 162.0 (C-4), 196.0 (C-7), 26.4 (C-8)。以上数据与文献[15]报道的数据一致, 确定该化合物为对羟基苯乙酮。

化合物 12 白色细针晶(丙酮); ¹H NMR (500 MHz, CD₃COCD₃): δ 3.23 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, 3-OH), 3.01 (1H, s, 16-OH), 0.75 (2H, m, H-2), 3.06 (1H, dt, $J = 5.3, 11.2$ Hz, H-3), 0.81 (1H, m, H-9), 1.62 (2H, m, H-15), 1.10 (3H, s, H-17), 0.68 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃COCD₃): δ 37.3 (t, C-1), 27.1 (C-2), 78.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.3 (C-5), 18.0 (C-6), 39.6 (C-7), 37.0 (C-8), 51.3 (C-9), 33.5 (C-10), 23.3 (C-11), 38.1 (C-12), 23.9 (C-13), 27.2 (C-14), 57.7 (C-15), 70.1 (C-16), 30.1 (C-17), 27.9 (C-18), 15.5 (C-19), 13.8 (C-20)。以上数据与文献[16]报道的数据一致, 确定该化合物为 3,16 α -二羟基-对映贝壳杉烷。

化合物 13 白色晶体(甲醇); ¹H NMR (500 MHz, CD₃COCD₃): δ 5.68 (1H, s, H-11), 6.03 (1H, s, H-14), 5.91 (1H, m, H-15), 5.13 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-16 α), 4.90 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-16 β), 1.52 (3H, s, H-17), 5.22 (1H, m, H-18 α), 5.22 (1H, m, H-18 β), 1.31 (3H, s, H-19), 1.79 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃COCD₃): δ 34.3 (C-1), 37.1 (C-2), 178.2 (C-3), 146.5 (C-4), 56.7 (C-5), 28.1 (C-6), 36.5 (C-7), 140.0 (C-8), 155.6 (C-9), 44.2 (C-10), 122.8 (C-11), 190.2 (C-12), 51.1 (C-13), 121.0 (C-14), 138.3 (C-15), 112.1 (C-16), 23.3 (C-17), 105.3 (C-18), 17.4 (C-19), 23.1 (C-20)。以上数据与文献[17]报道的数据一致, 确定该化合物为 trigoflavidone A。

1.5 化合物体外抗肿瘤活性试验^[18]

称取适量化合物 1~13, 二甲亚砜溶解(浓度小

于培养液中最大体积分数的 3%), 超声 20 min, 冰箱冷藏备用。采取 MTT 方法进行体外抗肿瘤活性试验。将对数生长期的 HeLa、HepG2、4T1 和 A549 细胞, 稀释成 1×10^4 cells mL⁻¹ 细胞悬液, 接种至 96 孔板, 每孔 100 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 吸取孔中培养液, 加入不同浓度的化合物, 继续培养 48 h, 每组 3 个复孔。在检测前每孔加入 5 mg mL⁻¹ MTT 30 μ L, 孵育 3 h。在酶联免疫检测仪上测定吸光度(A, 490 nm 波长)。其中, 抑制率(%) = $(1 - OD_{\text{试验组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$, 计算各化合物对各肿瘤细胞的增殖抑制情况, 得出 50% 肿瘤细胞增殖抑制率对应的各化合物浓度(IC₅₀ 值)。采用 SPSS 18.0 软件进行数据的统计分析, 数据以平均数 \pm 标准差(M \pm SD)表示, 采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。化合物 1~13 对肿瘤细胞的抑制率和化合物 2、3、10 的 IC₅₀ 值见表 1。

1.6 化合物体内抗肿瘤活性试验^[19]

无菌条件下抽取接种 5 d 的 H22 小鼠腹水, PBS 稀释至 1×10^7 mL⁻¹, 种至 BALB/c 小鼠腹部皮下(每只 100 μ L), 接种 48 h 后, 随机分 5 组, 即对照组(PBS, 200 mL kg⁻¹)、环磷酰胺(20 mg kg⁻¹)、化合物 2 (5 mg kg⁻¹)组、化合物 3 (5 mg kg⁻¹)组、化合物 10 (5 mg kg⁻¹)组。灌胃给药, 每次 1 日, 连续给药 10 d, 在最后给药 1 d 后, 处死小鼠, 称取各组肿瘤质量。抑瘤率(%) = $[1 - (\text{给药组平均肿瘤重量} / \text{对照组平均肿瘤重量})] \times 100\%$ 。试验数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析。从表 2 可见, 化合物 2、3、10 和环磷酰胺处理的肿瘤质量的差异显著, 化合物 2、3、10 的体内肿瘤抑制率分别为 54.34%、39.05% 和 29.41%, 均小于环磷酰胺的(67.23%)。

2 结果和讨论

本研究利用硅胶柱、RP-18、Sephadex LH-20 等多种材料对桂花叶醇提溶液进行分离纯化, 分离得到 13 个化合物, 分别为香橙素 (1)、染料木黄酮 (2)、lupinalbin A (3)、齐墩果酸甲酯 (4)、3-羧基齐墩果酸 (5)、fouquierol (6)、19 α -羟基-3-*O*-乙酰熊果酸 (7)、白桦脂醇 (8)、豆甾-3,5-二烯-7-酮 (9)、刺五加酮 (10)、对羟基苯乙酮 (11)、3,16 α -二羟基-对映贝壳杉烷 (12) 和 trigoflavidone A (13)。所有化

表1 化合物1~13对肿瘤细胞的抑制率和化合物2、3、10的IC₅₀值Table 1 Inhibition rate of compounds 1-13 to tumour cells and IC₅₀ of compounds 2, 3 and 10

化合物 Compound	浓度 Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			IC ₅₀		浓度 Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			IC ₅₀	
	1	10	50			1	10	50		
Hela	1	4.53 ± 0.48	8.44 ± 0.16	28.32 ± 0.19	-	HepG2	3.49 ± 0.21	7.90 ± 0.27	32.31 ± 0.24	-
	2	9.19 ± 1.24	23.42 ± 1.27	92.49 ± 1.99	36.75		5.69 ± 0.47	22.39 ± 1.31	87.48 ± 2.48	38.76
	3	11.42 ± 1.00	24.55 ± 2.03	94.45 ± 2.47	37.9		7.34 ± 0.27	24.84 ± 1.21	80.83 ± 0.66	36.9
	4	3.49 ± 0.24	7.80 ± 0.06	24.94 ± 2.15	-		4.52 ± 0.11	9.32 ± 0.65	22.34 ± 2.14	-
	5	2.87 ± 0.54	8.40 ± 0.24	30.42 ± 1.58	-		3.24 ± 0.13	8.94 ± 1.04	29.53 ± 2.01	-
	6	5.87 ± 0.21	10.39 ± 1.07	32.49 ± 1.69	-		1.03 ± 0.05	3.45 ± 0.07	24.59 ± 1.03	-
	7	2.98 ± 0.34	5.30 ± 0.68	35.94 ± 2.09	-		5.78 ± 0.06	9.39 ± 0.31	32.39 ± 0.28	-
	8	3.21 ± 0.28	7.95 ± 0.54	32.49 ± 0.89	-		2.43 ± 0.03	6.79 ± 0.47	19.59 ± 0.32	-
	9	2.48 ± 0.11	5.29 ± 0.38	28.49 ± 1.47	-		2.49 ± 0.29	5.69 ± 0.21	21.43 ± 1.07	-
	10	8.56 ± 0.08	19.45 ± 0.54	87.45 ± 2.08	31.24		9.49 ± 0.15	25.59 ± 0.99	90.39 ± 0.68	39.13
	11	4.52 ± 0.16	8.49 ± 1.34	29.49 ± 1.24	-		3.49 ± 0.01	5.93 ± 0.24	19.49 ± 1.11	-
	12	1.49 ± 0.35	4.95 ± 0.25	21.94 ± 0.97	-		3.30 ± 0.28	5.69 ± 0.74	18.53 ± 1.21	-
	13	4.34 ± 0.10	7.83 ± 0.39	29.44 ± 2.58	-		4.58 ± 0.90	7.58 ± 0.35	15.50 ± 1.24	-
4T1	1	2.19 ± 0.06	5.82 ± 0.32	33.49 ± 1.24	-	A549	1.84 ± 0.02	6.53 ± 1.02	35.92 ± 2.14	-
	2	8.48 ± 0.87	33.49 ± 1.21	86.62 ± 2.31	37.83		10.49 ± 0.47	35.51 ± 2.13	90.52 ± 2.15	36.42
	3	6.83 ± 0.55	18.48 ± 1.31	90.12 ± 3.01	29.22		4.82 ± 0.21	28.38 ± 1.22	92.43 ± 2.89	28.45
	4	3.92 ± 0.12	7.43 ± 0.36	39.41 ± 1.47	-		4.35 ± 0.08	8.59 ± 0.22	24.59 ± 2.15	-
	5	3.45 ± 0.28	9.48 ± 0.54	37.84 ± 2.31	-		5.39 ± 0.14	9.29 ± 0.51	39.59 ± 2.35	-
	6	4.29 ± 0.65	8.52 ± 0.78	18.94 ± 2.33	-		3.69 ± 0.41	8.48 ± 0.22	40.59 ± 2.14	-
	7	4.90 ± 0.22	11.23 ± 0.51	34.90 ± 2.14	-		4.92 ± 0.32	26.59 ± 2.14	40.49 ± 2.14	-
	8	3.49 ± 0.01	11.49 ± 1.02	28.45 ± 2.01	-		4.29 ± 0.15	12.49 ± 0.58	24.38 ± 0.55	-
	9	4.53 ± 0.24	7.45 ± 0.96	18.45 ± 1.02	-		4.48 ± 0.22	9.38 ± 0.97	25.58 ± 0.65	-
	10	11.39 ± 0.88	29.49 ± 0.74	89.49 ± 0.49	30.31		9.49 ± 0.77	34.59 ± 1.04	93.49 ± 3.28	38.54
	11	4.59 ± 0.28	9.49 ± 0.44	41.39 ± 2.58	-		2.19 ± 0.65	7.49 ± 1.28	38.54 ± 3.17	-
	12	4.52 ± 0.33	8.48 ± 0.54	15.49 ± 0.89	-		3.28 ± 0.23	6.84 ± 1.31	24.42 ± 0.95	-
	13	3.85 ± 0.12	4.58 ± 0.22	22.48 ± 2.03	-		5.38 ± 0.24	10.43 ± 0.27	28.48 ± 0.47	-

表2 化合物2、3、10体内抗肿瘤活性

Table 2 Antineoplastic activities *in vivo* of compounds 2, 3 and 10

化合物 Compound	剂量 Dosage (mL kg^{-1})	瘤重 Weight of tumour (g)	抑制率 Inhibition rate /%
PBS	200	1.32 ± 0.35	0
环磷酰胺 Cyclophosphamide	20	0.39 ± 0.32 [*]	67.23
2	5	0.55 ± 0.21 [*]	54.34
3	5	0.79 ± 0.45 [*]	39.05
10	5	0.81 ± 0.51 [*]	29.41

*: $P < 0.05$

合物均为首次从桂花叶中分离得到。此外, 抗肿瘤活性研究表明, 化合物2、3、10均有一定的抗肿瘤活性。

参考文献

- [1] LIU L C, XIANG Q B. Research progress on *Osmanthus* genus [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci), 2003, 27(2): 84-88. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2003.02.0200.
- [2] YIN W, LIU J Q, ZHANG G S. Chemical constituents of *Osmanthus fragrans* fruits [J]. China J Chin Mat Med, 2013, 38(24): 4329-4334. doi: 10.4268/cjcm20132427.
- [3] YIN W, SONG Z R, LIU J Q, et al. Chemical constituents of *Osmanthus fragrans* [J]. China J Chin Mat Med, 2015, 40(4): 679-685. doi: 10.4268/cjcm20150420.
- [4] YIN W, LIU J Q. The flavonoids of chemical constituents of

刘龙昌, 向其柏. 木犀属植物的研究进展 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2003, 27(2): 84-88. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2003.02.020.

尹伟, 刘金旗, 张国升. 桂花果实的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4329-4334. doi: 10.4268/cjcm20132427.

尹伟, 宋祖荣, 刘金旗, 等. 桂花的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 679-685. doi: 10.4268/cjcm20150420.

尹伟, 宋祖荣, 刘金旗, 等. 桂花的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 679-685. doi: 10.4268/cjcm20150420.

[4] YIN W, LIU J Q. The flavonoids of chemical constituents of

- Osmanthus fragrans* roots [J]. *J Chin Med Mat*, 2016, 39(7): 1551–1554. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.07.024.
- 尹伟, 刘金旗. 桂花树根中黄酮类化学成分研究 [J]. *中药材*, 2016, 39(7): 1551–1554. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.07.024.
- [5] SHEN Z B, THEANDER O. Flavonoid glycosides from needles of *Pinus massoniana* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(1): 155–158. doi: 10.1016/S0031-9422(00)80826-2.
- [6] WANG J, FAN X, CEN Y Z. Studies on the antitumor constituents in *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2013, 25(10): 1315–1319, 1361. doi: 10.16333/j.1001-6880.2013.10.013.
- 王娇, 范贤, 岑颖洲. 千斤拔的抗肿瘤活性成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(10): 1315–1319, 1361. doi: 10.16333/j.1001-6880.2013.10.013.
- [7] LI H, YANG M H, MA X J. Flavonoids from roots of *Flemingia philippinensis* [J]. *China J Chin Mat Med*, 2009, 34(6): 724–726. doi: 10.3321/j.issn:1001-5302.2009.06.021.
- 李华, 杨美华, 马小军. 千斤拔黄酮类化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(6): 724–726. doi: 10.3321/j.issn:1001-5302.2009.06.021.
- [8] FU Y, BAI Y, DAWA Z M, et al. Chemical constituents of *Incarvillea younghusbandii* [J]. *China J Chin Mat Med*, 2010, 35(1): 58–62. doi: 10.4268/cjcm20100112.
- 傅予, 白央, 达娃卓玛, 等. 藏波罗花的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(1): 58–62. doi: 10.4268/cjcm20100112.
- [9] DU J J, WU B F, YANG J, et al. Triterpenes constitutes in *Serissa serissoides* [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 2008, 19(2): 341–342. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2008.02.042.
- 都姣娇, 武冰峰, 杨娟, 等. 白马骨中三萜类成分研究 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(2): 341–342. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2008.02.042.
- [10] PAKHATHIRATHIEN C, KARALAI C, PONGLIMANONT C, et al. Dammarane triterpenes from the hypocotyls and fruits of *Ceriops tagal* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(12): 1787–1789. doi: 10.1021/np0502793.
- [11] WANG S X, YIN S, WU L J, et al. A study on the chemical constituents of *Ligustrum lucidum* Ait. (II) [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 1995, 12(1): 25–28. doi: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.1995.01.008.
- 王素贤, 尹双, 吴立军, 等. 女贞子化学成分的研究(II) [J]. *沈阳药科大学学报*, 1995, 12(1): 25–28. doi: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.1995.01.008.
- [12] SUN J M, YANG J S. Studies on chemical constituents of *Jasminum lanceolarium* [J]. *Chin Pharm J*, 2007, 42(7): 489–491. doi: 10.3321/j.issn:1001-2494.2007.07.003.
- 孙佳明, 杨峻山. 破骨风化学成分的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(7): 489–491. doi: 10.3321/j.issn:1001-2494.2007.07.003.
- [13] BALDÉ A M, APERS S, de BRUVNE T E, et al. Steroids from *Harrisonia abyssinica* [J]. *Planta Med*, 2000, 66(1): 67–69. doi: 10.1055/s-2000-11120.
- [14] WU L J, ZHENG J, JIANG B H, et al. Chemical constituents of the stems and leaves of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms [J]. *Acta Pharm Sin*, 1999, 34(4): 294–296. doi: 10.3321/j.issn:0513-4870.1999.04.013.
- 吴立军, 郑健, 姜宝虹, 等. 刺五加茎叶化学成分 [J]. *药学报*, 1999, 34(4): 294–296. doi: 10.3321/j.issn:0513-4870.1999.04.013.
- [15] LI Y P, ZHOU Y Z, CHEN G, et al. Isolation and identification of phenols from *Cynanchum paniculatum* [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2014, 31(6): 444–447. doi: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2014.06.005.
- 李翼鹏, 周玉枝, 陈刚, 等. 徐长卿中酚类成分的分离与鉴定 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2014, 31(6): 444–447. doi: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2014.06.005.
- [16] HOU A J, JIANG B, YANG H, et al. Three new *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon xerophilus* [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2000, 22(2): 197–200. doi: 10.3969/j.issn.2095-0845.2000.02.014.
- 侯爱君, 姜北, 杨辉, 等. 旱生香茶菜中三个新的对映-贝壳杉烷型二萜 [J]. *云南植物研究*, 2000, 22(2): 197–200. doi: 10.3969/j.issn.2095-0845.2000.02.014.
- [17] QIN Q C. Study on chemical compositions of an endemic medicinal plant in Guangxi: *Trigonostemon lutescens* [D]. Nanning: Guangxi University, 2014.
- 覃其昶. 广西特有药用植物黄花三宝木的化学成分研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- [18] WU G H, WEI A H, CAI Y L, et al. Chemical constituents of *Macrothelypteris oligophlebia* and their antitumor activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Pharm J*, 2011, 46(5): 330–333.
- 吴光华, 魏安华, 蔡亚玲, 等. 针毛蕨的化学成分及其体内外抗肿瘤活性研究 [J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(5): 330–333.
- [19] YANG J, WU L J, TASHINO S I, et al. Reactive oxygen species and nitric oxide regulate mitochondria-dependent apoptosis and autophagy in evodiamine-treated human cervix carcinoma HeLa cells [J]. *Free Radic Res*, 2008, 42(5): 492–504. doi: 10.1080/10715760802112791.