

# 柯拉斯那沉香的生物活性成分研究

杨洋<sup>1,2</sup>, 梅文莉<sup>2</sup>, 董文化<sup>2</sup>, 李薇<sup>2</sup>, 王军<sup>2</sup>, 王红妮<sup>2</sup>, 陈志宝<sup>1\*</sup>, 戴好富<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口 571101)

**摘要:** 为了解柯拉斯那(*Aquilaria crassna*)的化学成分, 从其所产沉香中分离得到 10 个化合物, 经波谱分析分别鉴定为: 6,8-羟基-2-(2-苯乙基)色酮 (1), 6,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮 (2), rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-5-(2-phenylethyl)-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (3), rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (4), rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-5-[2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethyl]-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (5), oxidoagarochromone B (6), oxidoagarochromone C (7), (5S,6R,7S,8R)-2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7,8-tetrahydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone (8), 6,7-cis-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydrochromone (9), *N-trans*-feruloyltyramine (10)。化合物 3~5 和 8~10 为首次从柯拉斯那沉香中分离得到。化合物 1, 3, 6, 7, 9 和 10 对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制活性, 化合物 4 对人慢性髓原白血病细胞株 K-562 和人胃癌细胞株 SGC-7901 均具有较小的抑制作用, 化合物 1 和 3 对人肝癌细胞株 BEL-7402 也有抑制活性。

**关键词:** 沉香; 柯拉斯那; 化学成分; 细胞毒活性; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.05.014

## Bioactive Components from Agarwood Originating from *Aquilaria crassna*

YANG Yang<sup>1,2</sup>, MEI Wen-li<sup>2</sup>, DONG Wen-hua<sup>2</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, WANG Hong-ni<sup>2</sup>, CHEN Zhi-bao<sup>1\*</sup>, DAI Hao-fu<sup>2\*</sup>

(1. College of life science and technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Helongjiang, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract:** In order to understand the chemical constituents of *Aquilaria crassna*, ten compounds were isolated from its agarwood. On the basis of spectral data, they were identified as 6,8-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-chromone (1), 6,8-dihydroxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]chromone (2), rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-5-(2-phenylethyl)-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (3), rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (4), rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-5-[2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethyl]-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (5), oxidoagarochromone B (6), oxidoagarochromone C (7), (5S,6R,7S,8R)-2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7,8-tetrahydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone (8), 6,7-cis-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydrochromone (9), *N-trans*-feruloyltyramine (10). Compounds 1~5 and 8~11 were isolated from agarwood of *A. crassna* for the

收稿日期: 2016-05-10 接受日期: 2016-06-08

**基金项目:** 公益性行业(农业)科研专项(201303117); 海南省自然科学基金项目(20168367); 海南省工程技术研究中心建设专项(gczx2015005); 海南省科协青年科技英才学术创新计划项目(HAST201628)资助

This work was supported by Fundamental Research Funds for Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (Grant No. 201303117), the Natural Science Foundation of Hainan Province (Grant No. 20168367), the Special Fund for Engineering Technology Research Center of Hainan Province (Grant No. gczx2015005) and the Young Talents' Science and Technology Innovation Project of Hainan Association for Science and Technology (Grant No. HAST201628).

作者简介: 杨洋(1991~), 女, 硕士研究生, 从事天然产物化学研究。E-mail: yangyang910320@sina.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: daihaofu@itbb.org.cn, chenzhibao\_2000@sina.com

first time. Compounds **1**, **3**, **4**, **6**, **7** and **11** showed inhibitory activities against acetylcholinesterase. Compound **4** had weak inhibitory effect on K-562 and SGC-7901 carcinoma cell lines, and compounds **1** and **3** showed inhibitory activity against BEL-7402 cells.

**Key words:** Agarwood; *Aquilaria crassna*; Chemical constituents; Cytotoxic activity; Acetylcholinesterase inhibitory activity

沉香为瑞香科(Thymelaeaceae)沉香属(*Aquilaria*)植物含有树脂的干燥芯材,是中医常用药,属于名贵南药,有“药中黄金”之称。迄今为止,全世界共报道 23 种沉香属植物,从南亚次大陆的东北部,到印度尼西亚群岛及巴布亚新几内亚群岛均有分布,其中柯拉斯那(*A. crassna*)主要分布于老挝、泰国、越南和柬埔寨<sup>[1]</sup>。柯拉斯那的分布范围虽广,但分布密度低,且由于生态环境的破坏及滥取沉香,柯拉斯那已经被列为“极度濒危”植物<sup>[2]</sup>。沉香味辛、苦,性微温,具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘等功效<sup>[3]</sup>。据报道,沉香的主要成分是多种骨架类型的倍半萜和 2-(2-苯乙基)色酮类化合物。对沉香的药理活性研究表明其具有镇静、抗菌、抗肿瘤、神经保护等作用<sup>[4-9]</sup>。本课题组前期对野生柯拉斯那沉香化学成分进行了研究,发现并报道了一系列 flindersia 类型的 2-(2-苯乙基)色酮类化合物<sup>[10]</sup>。本实验继续对野生柯拉斯那沉香乙醇提取物的石油醚萃取部分和乙酸乙酯萃取部分进行化学成分的研究,目的在于发现柯拉斯那沉香中的生物活性成分,为柯拉斯那沉香的开发利用提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

样品购于老挝,经中国热带农业科学院热带生物技术研究王军博士鉴定,其基源植物为柯拉斯那(*Aquilaria crassna*),标本(No. 20140909)保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究。

### 1.2 仪器和试剂

Bruker AV-500 型青岛海洋超导核磁共振波谱仪(内标为 TMS); Polar-L 型旋光仪(CATACrO Co. Ltd), Autospec300 质谱仪; 旋转蒸发仪(Heidolph Laborota); BSA-100A 自动部分收集器(上海青浦沪西仪器厂); CA-1111 冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司); 高压湿热灭菌锅(Sanyo); CO<sub>2</sub> 培养箱(RS Biotech Ltd.); 凝胶 Sephadex LH-20 和 RP-18

(Merck 公司); ODS (20~45  $\mu$ m)(Fuji 公司); 柱层析用硅胶(200~300 目, 60~80 目)(青岛海洋化工厂); 四甲基偶氮唑盐(MTT)、MEM 和平衡盐溶液 PBS (北京欣经科公司), 紫杉醇(Paclitaxel), 酶标仪(BioTek Instruments, Inc.); 乙酰胆碱酯酶、碘化硫代乙酰胆碱、二硫代二硝基苯甲酸(DNTB)、他克林(Sigma 公司); 分析型高效液相色谱仪(SUMMIT P680A) (DIONEX, USA), 半制备高效液相色谱仪(Agilent 1260) (美国安捷伦科技有限公司), COSMOSIL 色谱柱( $\mu$ NAP, 10ID $\times$ 250 mm)。BEL-7402 (人肝癌细胞)、SGC-7901 (人胃癌细胞)和 K-562 (慢性髓原白血病细胞)均购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

### 1.3 提取和分离

将干燥沉香芯材(2.2 kg)粉碎,并用 95%的乙醇加热回流提取 3 次,每次加入乙醇 10 L,减压回收乙醇至无醇味,得到乙醇浸膏(296.8 g),将乙醇浸膏用水分散成悬浊液,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次,分别浓缩得石油醚浸膏(6.1 g)、乙酸乙酯浸膏(196.0 g)和正丁醇浸膏(71.3 g)。

乙酸乙酯萃取物(191.6 g)经减压柱色谱,以氯仿-甲醇(1:0~0:1)梯度洗脱,得到 11 个流分(Fr.1~Fr.11)。

Fr.3 (6.4 g)经 Sephadex LH-20 (氯仿:甲醇=1:1)凝胶柱色谱,得到 2 个流分(Fr.3-1~Fr.3-2), Fr.3-2 (3.5 g)经 ODS 柱色谱,以甲醇-水(3:7~1:0)梯度洗脱,得到 8 个流分(Fr.3-2-1~Fr.3-2-8)。Fr.3-2-3 (156.3 mg)先经 Sephadex LH-20 (氯仿:甲醇=1:1)凝胶柱色谱,再经硅胶柱色谱(氯仿:甲醇=150:1),得到化合物 **5** (4.5 mg)。

Fr.5 (48.5 g)经减压硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(1:0~0:1)梯度洗脱,得到 7 个亚组分(Fr.5-1~Fr.5-7)。Fr.5-2 (16.9 g)经 ODS 柱色谱,以甲醇-水(5:5~1:0)梯度洗脱,得到 3 个流分(Fr.5-2-1~Fr.5-2-3)。Fr.5-2-3 再经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)洗脱,得到 3 个流分(Fr.5-2-3-1~Fr.5-2-3-3)。Fr.5-

2-3-3 (10.3 mg)使用半制备高效液相色谱仪, 经茚基色谱柱(洗脱梯度: 65%甲醇, 35%水; 流速: 4 mL min<sup>-1</sup>; 检测波长: 210 nm)洗脱, 得到化合物 **1** (2.7 mg, 保留时间: 11.2 min)和 **2** (3.8 mg, 保留时间: 12.5 min)。

Fr.6 (25.0 g)经 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(2: 8~1: 0)梯度洗脱, 得到 8 个亚组分(Fr.6-1~Fr.6-8)。Fr.6-7 (722.3 mg)经甲醇的 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 得到 3 个流分(Fr.6-7-1~Fr.6-7-3)。Fr.6-7-3 (102.3 mg)经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇(100: 1)为洗脱剂, 得到化合物 **6** (13.8 mg)。Fr.6-4 (889.2 mg)先经甲醇的 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 再经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮(10: 1)为洗脱剂, 得到化合物 **7** (5.1 mg)。Fr. 6-5-4 (201.5 mg)经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮(3: 1)为洗脱剂, 得到化合物 **8** (3.0 mg)。

Fr.8 (66.1 g)经 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(5: 5~1: 0)梯度洗脱, 得到 8 个亚组分(Fr.8-1~Fr.8-8)。Fr.8-3 (854.6 mg)经 Sephadex LH-20 (氯仿: 甲醇=1: 1)凝胶柱色谱, 得到 4 个流分(Fr.8-3-1~Fr.8-3-4)。Fr.8-3-3 (171.5 mg)经硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯(4: 1)为洗脱剂, 得到化合物 **10** (9.9 mg)。

Fr.9 (5.0 g)经 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(5: 5~1: 0)梯度洗脱, 得到 7 个亚组分(Fr.9-1~Fr.9-7)。Fr.9-2 (80.7 mg)经 Sephadex LH-20 (氯仿: 甲醇=1: 1)柱色谱洗脱, 得到 3 个流分(Fr.9-2-1~Fr.9-2-3)。Fr.9-2-3 (300.3 mg)经 Sephadex LH-20 (丙酮)柱色谱洗脱, 得到 4 个流分(Fr.9-2-3-1~Fr.9-2-3-4)。Fr.9-2-3-4 (67.6 mg)使用半制备高效液相色谱仪, 经茚基色谱柱(洗脱梯度: 60%甲醇, 40%水; 流速: 4 mL min<sup>-1</sup>; 检测波长: 210 nm)洗脱, 得到化合物 **9** (11.2 mg, 保留时间: 12.3 min)。

石油醚萃取物(6.1 g)经减压柱色谱, 以氯仿-甲醇(1: 0~0: 1)梯度洗脱, 得到 4 个流分(Fr.1~Fr.4)。Fr.2 (963.9 mg)先后经 Sephadex LH-20 柱色谱(氯仿-甲醇=1: 1)、Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)洗脱, 得到 3 个亚组分(Fr.2-1-1~Fr.2-1-3), Fr.2-1-3 (26.1 mg)使用半制备高效液相色谱仪, 经茚基色谱柱(洗脱梯度: 60%甲醇, 40%水; 流速: 4 mL min<sup>-1</sup>; 检测波长: 210 nm)洗脱, 得到化合物 **3** (7.3 mg, 保留时间: 18.3 min)和 **4** (11.2 mg, 保留时间: 20.5 min)。

## 1.4 活性测试

体外细胞毒活性测定 采用 MTT 法<sup>[11]</sup>。试

验设阴性对照组(DMSO 溶剂对照组)、阳性对照组(紫杉醇)和 5 个不同浓度的待测样品, 每个浓度设 2 个平行。收集对数生长期细胞, 血球计数板计数, 按每孔 4500 个癌细胞量接种于 96 孔平底细胞培养板中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、湿度 90%以上、37℃温箱中培养。24 h 后取出加入一定量的待测样品, 继续培养 3 d 后取出置于显微镜下观察每孔细胞形态, 记录细胞形态变化情况, 接着每孔加入 5 mg mL<sup>-1</sup> 的 MTT 溶液(溶于平衡盐溶液 PBS) 50 μL, 37℃反应 4 h 后, 将细胞培养液吸出, 每孔加入 100 μL DMSO 使 Formazane 充分溶解后, 将细胞培养板置于 ELX-800 酶标仪上, 用 490 nm 波长测各孔的吸光度(A), 按下列公式求生长抑制率。而后以样品浓度为横坐标, 以抑制率为纵坐标, 作图并求出抑制率为 50%时样品的浓度(IC<sub>50</sub>), 样品活性以半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)表示。生长抑制率=(1-用药组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%。

体外抗乙酰胆碱酯酶活性测定 采用 Elman 法<sup>[12]</sup>。化合物 **1**~**10** 均用 DMSO 进行溶解。取 110 μL 磷酸缓冲液(pH 8.0)、10 μL 待测样品(50 μg mL<sup>-1</sup>)和 40 μL 乙酰胆碱酯酶(0.02 μg mL<sup>-1</sup>)于 96 孔板中, 温育 20 min (30℃)后, 加入 DTNB (2.48 mg mL<sup>-1</sup>)和碘化硫代乙酰胆碱(1.81 mg mL<sup>-1</sup>)等体积混合液 20 μL, 反应体系总共 200 μL, 30 min 后, 405 nm 处用酶标仪进行检测。阳性对照为他克林, 反应终浓度为 0.08 μg mL<sup>-1</sup>, 阴性对照为 DMSO, 终浓度为 0.1%, 试验重复 3 次。按照(E-S)/E×100%来计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制率(E 为阴性对照平均吸光值, S 为待测样品的平均吸光值)。

## 2 结果和分析

### 2.1 结构鉴定

**6,8-二羟基-2-(2-苯乙基)色酮** [6,8-Dihydroxy-2-(2-phenylethyl)chromone, **1**] 无色针状(CH<sub>3</sub>OH), m.p. 218℃~220℃; ESI-MS *m/z*: 283.2 [M+H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz): δ 6.05 (1H, s, H-3), 6.79 (1H, d, *J*=2.8 Hz, H-5), 6.71 (1H, d, *J*=2.8 Hz, H-7), 7.24 (4H, m, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.16 (1H, m, H-4'), 3.10 (2H, m, H-7'), 3.00 (2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz): δ 170.7 (C-2), 109.6 (C-3), 181.0 (C-4), 98.2 (C-5), 156.5 (C-6), 110.0 (C-7), 150.5 (C-8), 141.5 (C-9), 125.8

(C-10), 143.0 (C-1'), 129.4 (C-2', C-6'), 129.5 (C-3', C-5'), 127.4 (C-4'), 34.0 (C-7'), 37.1 (C-8')。以上波谱数据与文献[13]对照一致, 故鉴定为 6,8-二羟基-2-(2-苯乙基)色酮。

**6,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮 {6,8-Dihydroxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]chromone, 2}** 无色针状(CH<sub>3</sub>OH), m.p. 219 °C ~ 220 °C; ESI-MS  $m/z$ : 313.3 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz):  $\delta$  6.03 (1H, s, H-3), 6.79 (1H, d,  $J$  = 2.5 Hz, H-5), 6.71 (1H, d,  $J$  = 2.5 Hz, H-7), 7.12 (2H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H-2', H-6'), 6.80 (2H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H-5, H-3', H-5'), 3.73 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.01 (2H, m, H-7'), 2.95 (2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz):  $\delta$  170.8 (C-2), 109.6 (C-3), 181.0 (C-4), 98.4 (C-5), 156.5 (C-6), 110.0 (C-7), 150.2 (C-8), 142.9 (C-9), 125.8 (C-10), 133.4 (C-1'), 130.4 (C-2', C-6'), 114.9 (C-3', C-5'), 159.7 (C-4'), 33.2 (C-7'), 37.3 (C-8'), 55.6 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[14]对照基本一致, 故鉴定为 6,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮。

**Rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-5-(2-phenylethyl)-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (3)** 白色无定型粉末(CH<sub>3</sub>OH);  $[\alpha]_D^{25}$  = -21.3 (c 0.25, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS  $m/z$ : 301.3 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz):  $\delta$  6.18 (1H, s, H-3), 3.90 (1H, d,  $J$  = 4.2 Hz, H-5), 3.78 (1H, d,  $J$  = 4.2 Hz, H-6), 4.00 (1H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-7), 4.57 (1H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-8), 7.23~7.18 (3H, m, H-2', H-4', H-6'), 7.27 (2H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-3', H-5'), 3.02 (2H, m, H-7'), 2.96 (2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz):  $\delta$  171.6 (C-2), 114.9 (C-3), 182.7 (C-4), 50.8 (C-5), 56.5 (C-6), 73.1 (C-7), 70.0 (C-8), 161.5 (C-9), 121.5 (C-10), 141.0 (C-1'), 129.4 (C-2', C-6'), 129.6 (C-3', C-5'), 127.6 (C-4'), 33.8 (C-7'), 36.0 (C-8')。以上波谱数据与文献[15]对照基本一致, 故鉴定为 rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-5-(2-phenylethyl)-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one。

**Rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (4)** 白色不定型粉末;  $[\alpha]_D^{25}$  = +16.8 (c 0.30, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS  $m/z$ : 331.3 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz):

$\delta$  6.15 (1H, s, H-3), 3.89 (1H, d,  $J$  = 4.3 Hz, H-5), 3.77 (1H, d,  $J$  = 4.3 Hz, H-6), 3.99 (1H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-7), 4.57 (1H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-8), 7.12 (2H, d,  $J$  = 8.3 Hz, H-2', H-6'), 6.83 (2H, d,  $J$  = 8.3 Hz, H-3', H-5'), 3.74 (4'-OCH<sub>3</sub>), 2.94 (2H, m, H-7'), 2.88 (2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz):  $\delta$  171.8 (C-2), 114.9 (C-3), 182.7 (C-4), 50.8 (C-5), 55.6 (C-6), 73.1 (C-7), 70.0 (C-8), 161.4 (C-9), 121.4 (C-10), 132.9 (C-1'), 130.4 (C-2', C-6'), 115.0 (C-3', C-5'), 159.8 (C-4'), 33.0 (C-7'), 36.3 (C-8'), 56.5 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[15]基本一致, 故鉴定为 rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one。

**Rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-5-[2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethyl]-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one (5)** 棕色不定型粉末;  $[\alpha]_D^{25}$  = +46.7 (c 0.15, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS  $m/z$ : 347.2 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz):  $\delta$  6.17 (1H, s, H-3), 3.91 (1H, d,  $J$  = 4.3 Hz, H-5), 3.78 (1H, d,  $J$  = 4.3 Hz, H-6), 4.00 (1H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-7), 4.58 (1H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-8), 6.68 (1H, d,  $J$  = 2.5 Hz, H-2'), 6.83 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H-5'), 6.63 (1H, dd,  $J$  = 2.5, 8.2 Hz, H-6'), 2.90 (4H, m, H-7', H-8'), 3.88 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz):  $\delta$  171.9 (C-2), 114.9 (C-3), 182.7 (C-4), 50.8 (C-5), 56.5 (C-6), 73.2 (C-7), 70.0 (C-8), 161.5 (C-9), 121.5 (C-10), 133.9 (C-1'), 116.4 (C-2'), 147.8 (C-3'), 147.7 (C-4'), 112.9 (C-5'), 120.5 (C-6'), 33.3 (C-7'), 36.2 (C-8'), 56.5 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[15]基本一致, 故鉴定为 rel-(1aR,2R,3R,7bS)-1a,2,3,7b-tetrahydro-2,3-dihydroxy-5-[2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethyl]-7H-oxireno[f][1]benzopyran-7-one。

**Oxidoagarochromone B (6)** 透明黄色晶体(CHCl<sub>3</sub>); m.p. 142 °C ~ 144 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  = +16.4 (c 0.25, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS  $m/z$ : 313.2 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  6.13 (1H, s, H-3), 4.30 (1H, d,  $J$  = 3.5 Hz, H-5), 3.95 (1H, t,  $J$  = 3.5 Hz, H-7), 3.81 (2H, d,  $J$  = 3.5 Hz, H-6, H-8), 7.07 (2H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-2', H-6'), 6.82 (2H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-3', H-5'), 3.76 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 2.90 (2H, m, H-7'), 2.81 (2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  168.4 (C-2), 114.1 (C-3), 177.7 (C-4), 46.9 (C-5), 46.5 (C-6), 48.7 (C-7), 47.7 (C-8), 161.3 (C-9), 120.7 (C-10),

131.3 (C-1'), 129.2 (C-2', C-6'), 114.1 (C-3', C-5'), 158.3 (C-4'), 32.0 (C-7'), 35.6 (C-8'), 55.3 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[16]一致, 故鉴定为 oxidoagarochromone B。

**Oxidoagarochromone C (7)** 透明黄色晶体 (CHCl<sub>3</sub>); m.p. 69 °C ~ 72 °C;  $[\alpha]_D^{25} = -17.9$  (*c* 0.20, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS *m/z*: 329.2 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 6.15 (1H, s, H-3), 4.33 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H-5), 3.83 (2H, d, *J* = 3.6 Hz, H-6, H-8), 3.97 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-7), 6.75 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.63 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz, H-6'), 5.67 (1H, s, 3'-OH), 3.87 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 2.88 (2H, m, H-7'), 2.82 (2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 168.3 (C-2), 114.3 (C-3), 177.7 (C-4), 47.0 (C-5), 46.6 (C-6), 48.8 (C-7), 47.9 (C-8), 161.3 (C-9), 120.9 (C-10), 132.5 (C-1'), 114.5 (C-2'), 145.9 (C-3'), 145.5 (C-4'), 110.9 (C-5'), 119.8 (C-6'), 32.4 (C-7'), 35.6 (C-8'), 56.1 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[16]一致, 故鉴定为 oxidoagarochromone C。

**(5*S*,6*R*,7*S*,8*R*)-2-[2-(3'-Hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7,8-tetrahydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone (8)** 白色针状结晶 (DMSO); m.p. 190 °C ~ 191 °C;  $[\alpha]_D^{25} = -24.6$  (*c* 0.10, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS *m/z*: 365.2 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz): δ 6.25 (1H, s, H-3), 4.56 (1H, dd, *J* = 6.9, 3.6 Hz, H-5), 3.89 (1H, ddd, *J* = 6.9, 4.5, 4.5 Hz, H-6), 3.98 (1H, ddd, *J* = 6.9, 4.5, 4.5 Hz,

H-7), 4.38 (1H, dd, *J* = 6.9, 4.5 Hz, H-8), 6.66 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.60 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.2 Hz, H-6'), 2.83 (4H, m, H-7', H-8'), 3.72 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 5.40 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, 5-OH), 5.74 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, 6-OH), 5.45 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, 7-OH), 5.85 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, 8-OH), 8.31 (1H, s, 3'-OH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz): δ 169.3 (C-2), 113.6 (C-3), 180.0 (C-4), 68.3 (C-5), 73.4 (C-6), 73.8 (C-7), 70.5 (C-8), 159.1 (C-9), 120.4 (C-10), 132.4 (C-1'), 115.6 (C-2'), 146.4 (C-3'), 146.1 (C-4'), 112.2 (C-5'), 118.7 (C-6'), 31.2 (C-7'), 34.7 (C-8'), 55.6 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[17]一致, 故鉴定为 (5*S*,6*R*,7*S*,8*R*)-2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7,8-tetrahydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone。

**6,7-*cis*-Dihydroxy-2-(2phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydrochromone (9)** 棕色不定型固体 (CH<sub>3</sub>OH);  $[\alpha]_D^{25} = -17.3$  (*c* 0.68, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS *m/z*: 287.1 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz): δ 6.06 (1H, s, H-3), 2.59 (2H, dd, *J* = 5.3, 17.2 Hz, H-5A), 2.54 (2H, dd, *J* = 6.2, 17.2 Hz, H-5B), 3.98 (1H, m, H-6), 4.03 (1H, m, H-7), 2.96 (2H, dd, *J* = 5.0, 10.2 Hz, H-8), 7.19 (2H, m, H-2', H-6'), 7.26 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-3', H-5'), 7.16 (1H, m, H-4'), 2.87 (2H, m, H-7'), 2.78 (2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz): δ 170.6 (C-2), 112.9 (C-3), 181.7 (C-4), 27.0 (C-5), 69.0 (C-6), 68.8 (C-7), 34.0 (C-8), 163.5 (C-9), 119.6 (C-10), 141.3 (C-1'), 129.5 (C-2'), 129.6 (C-3'), 127.5

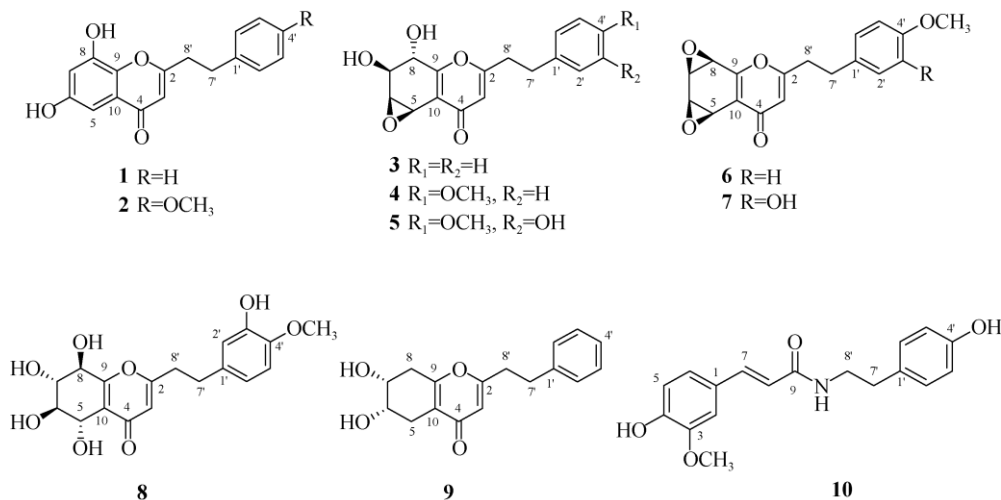


图1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1~10

(C-4'), 129.6 (C-5'), 129.5 (C-6'), 33.9 (C-7'), 36.2 (C-8')。以上波谱数据与文献[18]基本一致, 故鉴定为 6,7-*cis*-dihydroxy-2-(2phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-chromone。

***N-trans-Feruloyltyramine* (10)** 无色油状 (CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS *m/z*: 314.1 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式 C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz): δ 7.09 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 7.00 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, H-6), 7.41 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-7), 6.38 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-8), 7.03 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-2', H-6'), 6.70 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3', H-5'), 2.73 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, H-7'), 3.45 (2H, m, H-8'), 3.85 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz): δ 128.3 (C-1), 111.5 (C-2), 149.3 (C-3), 149.8 (C-4), 116.5 (C-5), 123.2 (C-6), 142.0 (C-7), 118.7 (C-8), 169.2 (C-9), 131.3 (C-1'), 130.7 (C-2'), 116.3 (C-3'), 156.9 (C-4'), 116.3 (C-5'), 130.7 (C-6'), 35.8 (C-7'), 42.5 (C-8'), 56.4 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[19]基本一致, 故鉴定为 *N-trans-feruloyltyramine*。

## 2.2 活性测试

分别采用 Elman 法和 MTT 法测定了化合物 1~10 的乙酰胆碱酯酶抑制活性和体外细胞毒活性。活性测试结果表明, 化合物 1, 3, 6, 7, 9 和 10 对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制活性, 化合物 4 对人慢性髓原白血病细胞株 K-562 和人胃癌细胞株 SGC-7901 均具有较弱的抑制作用, 化合物 1 和 3 对人肝癌细胞株 BEL-7402 也有抑制活性(表 1 和 2)。

表 1 化合物 1~10 (0.05 mg mL<sup>-1</sup>) 的乙酰胆碱酯酶抑制活性

Table 1 Anti-acetylcholinesterase activities of compounds 1–10 (0.05 mg mL<sup>-1</sup>)

| 化合物<br>Compound | 抑制率<br>Inhibition rate (%) |
|-----------------|----------------------------|
| 1               | 11.4±0.4                   |
| 2               | <10                        |
| 3               | 43.9±0.6                   |
| 4               | <10                        |
| 5               | <10                        |
| 6               | 46.1±0.4                   |
| 7               | 47.9±0.6                   |
| 8               | <10                        |
| 9               | 14.4±0.6                   |
| 10              | 27.8±0.4                   |
| 他克林 Tacrine     | 61.2±0.6                   |

表 2 化合物 1, 3 和 4 的细胞毒活性

Table 2 Cytotoxic activities of compounds 1, 3 and 4

| 化合物<br>Compound | IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ) |          |          |
|-----------------|------------------------------------------|----------|----------|
|                 | K-562                                    | SGC-7901 | BEL-7402 |
| 1               | —                                        | —        | 44.68    |
| 3               | —                                        | —        | 42.1     |
| 4               | 44.88                                    | 47.03    | —        |
| 紫杉醇 Taxol       | 1.9                                      | 7.4      | 6.3      |

## 3 讨论

利用多种柱色谱和高效液相色谱方法, 从柯拉斯那野生沉香乙醇提取物的石油醚萃取部分和乙酸乙酯萃取部分分离得到 10 个化合物, 其中 9 个为 2-(2-苯乙基)色酮类(化合物 1~9), 1 个为生物碱类(化合物 10)。体外生物活性测试结果表明, 化合物 1、3、6、7、9 和 10 对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制活性, 化合物 1 和 3 对人肝癌细胞株 BEL-7402 有较弱的抑制活性, 化合物 4 对人慢性髓原白血病细胞株 K-562 和人胃癌细胞株 SGC-7901 也具有一定的抑制作用。

目前, 国内外学者研究的沉香样品主要来源为白木香树(*A. sinensis*)和马来沉香树(*A. malaccensis*), 分离的 2-(2-苯乙基)色酮类化合物按色酮母核的结构特点可分为 4 种类型: flindersia 类型的 2-(2-苯乙基)色酮、单环氧-四氢-2-(2-苯乙基)色酮、双环氧-四氢-2-(2-苯乙基)色酮和 5,6,7,8-四氢-2-(2-苯乙基)色酮。我们从野生柯拉斯那沉香中分离得到了上述 4 种类型的 2-(2-苯乙基)色酮, 由此推测柯拉斯那沉香与国产沉香和马来沉香中的 2-(2-苯乙基)色酮的结构类型没有差异。Yagura 等<sup>[16]</sup>报道从人工柯拉斯那沉香中分离得到 3 个双环氧-四氢-2-(2-苯乙基)色酮类化合物; 我们前期对野生柯拉斯那沉香脂溶性化学成分的研究中, 也报道了一系列 flindersia 类型的 2-(2-苯乙基)色酮类化合物<sup>[10]</sup>。迄今为止, 还未见报道从柯拉斯那沉香中分离得到单环氧-四氢-2-(2-苯乙基)色酮和 5,6,7,8-四氢-2-(2-苯乙基)色酮, 所以, 化合物 3~5 和 8~10 为首次从柯拉斯那沉香中分离得到。

本研究揭示了野生柯拉斯那沉香中 2-(2-苯乙基)色酮的类型及生物活性, 为其品质鉴定及其开发和利用提供了可靠的依据。

## 参考文献

- [1] DAI H F, MEI W L. Culture and Artificial Agarwood Technology of

- Aquilaria* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 16–19.
- 戴好富, 梅文莉. 沉香实用栽培和人工结香技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 16–19.
- [2] JENSEN A, MEILBY H. Assessing the population status of a tree species using distance sampling: *Aquilaria crassna* (Thymelaeaceae) in Northern Laos [J]. *Int J For Res*, 2012, 2012: 265831. doi: 10.1155/2012/265831.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia, Volume I [M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2010: 172–173.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 172–173.
- [4] TIAN Y Z, MI X Y, PIAO X L. Studies on chemical constituents, pharmaceutical effects and clinical application of *Aquilaria sinensis* [J]. *J Minzu Univ China (Nat Sci)*, 2010, 19(1): 77–81. doi: 10.3969/j.issn.1005-8036.2010.01.013.
- 田燕泽, 秘效媛, 朴香兰. 沉香的化学成分、药理活性与临床应用研究进展 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2010, 19(1): 77–81. doi: 10.3969/j.issn.1005-8036.2010.01.013.
- [5] MEI W L, LIU J, LI X N, et al. Study on the chemical constituents from Chinese eaglewood in Hainan [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2010, 18(5): 573–576. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.05.017.
- 梅文莉, 刘俊, 李小娜, 等. 海南国产沉香的化学成分研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2010, 18(5): 573–576. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.05.017.
- [6] CHEN H Q, YANG Y, XUE J, et al. Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees [J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 4884–4896. doi: 10.3390/molecules16064884.
- [7] LI W, CAI C H, DONG W H, et al. 2-(2-Phenylethyl)chromone derivatives from Chinese agarwood induced by artificial holing [J]. *Fitoterapia*, 2014, 98: 117–123. doi: 10.1016/j.fitote.2014.07.011.
- [8] KUMPHUNE S, PROMPUNT E, PHAEBUAW K, et al. Anti-inflammatory effects of the ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* inhibits LPS-induced tumour necrosis factor- $\alpha$  production by attenuating P38 MAPK activation [J]. *Int J Green Pharm*, 2011, 5(1): 43–48. doi: 10.4103/0973-8258.82099.
- [9] LIU J, WU J, ZHAO Y X, et al. A new cytotoxic 2-(2-phenylethyl)chromone from Chinese eaglewood [J]. *Chin Chem Lett*, 2008, 19(8): 934–936. doi: 10.1016/j.cclet.2008.05.034.
- [10] WANG H N, DONG W H, MEI W L, et al. Identification of chemical constituents of agarwood of *Aquilaria crassna* [J]. *J Trop Biol*, 2016, 7(1): 111–116. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2016.01.019.
- 王红妮, 董文化, 梅文莉, 等. 柯拉斯那沉香化学成分分析 [J]. 热带生物学报, 2016, 7(1): 111–116. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2016.01.019.
- [11] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immuno Methods*, 1983, 65(1/2): 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [12] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V J, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2): 88–95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- [13] SHAO H, MEI W L, LI W, et al. Chemical constituents of agarwood originating from *Gyrinods salicifolia* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2015, 27(12): 2046–2049, 2078.
- 邵杭, 梅文莉, 李薇, 等. 柳叶拟沉香所产沉香的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(12): 2046–2049, 2078.
- [14] LIAO G, MEI W L, DONG W H, et al. 2-(2-Phenylethyl)chromone derivatives in artificial agarwood from *Aquilaria sinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 38–43. doi: 10.1016/j.fitote.2016.01.011.
- [15] WU B, KWON S W, HWANG G S, et al. Eight new 2-(2-Phenylethyl)chromone (=2-(2-Phenylethyl)-4H-1-benzopyran-4-one) derivatives from *Aquilaria malaccensis* agarwood [J]. *Helvet Chim Acta*, 2012, 95(9): 1657–1665. doi: 10.1002/hlca.201200069.
- [16] YAGURA T, SHIBAYAMA N, ITO M, et al. Three novel diepoxy tetrahydrochromones from agarwood artificially produced by intentional wounding [J]. *Tetrah Lett*, 2005, 46(25): 4395–4398. doi: 10.1016/j.tetlet.2005.04.072.
- [17] CHEN D, XU Z R, CHAI X Y, et al. Nine 2-(2-Phenylethyl)chromone derivatives from the resinous wood of *Aquilaria sinensis* and their inhibition of LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells [J]. *Eur J Org Chem*, 2012, 2012(27): 5389–5397. doi: 10.1002/ejoc.201200725.
- [18] YAGURA T, ITO M, KIUCHI F, et al. Four new 2-(2-Phenylethyl)chromone derivatives from withered wood of *Aquilaria sinensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(5): 560–564. doi: 10.1248/cpb.51.560.
- [19] KING R R, CALHOUN L A. Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(20): 2468–2473. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.07.014.