

安息香化学成分及其体外抗肿瘤活性

张丽¹, 张卿¹, 梁秋明¹, 王斐斐¹, 贤明华^{1,2,3*}, 王峰^{1,2,3*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006; 2. 国家中医药管理局 中药数字化质量评价技术
重点实验室, 广州 510006; 3. 广东高校中药质量工程技术研究中心, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 对安息香化学成分进行体外抗肿瘤细胞的药效筛选,以明确安息香抗肿瘤的物质基础。**方法:** 运用硅胶柱色谱、中压液相制备色谱、制备液相色谱等技术对安息香的 95% 乙醇提取物进行了系统的分离,根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构;通过体外人肝癌细胞 (HepG2),人肺癌细胞 (A549),人宫颈癌细胞 (HeLa),人乳腺癌细胞 (MCF-7),人前列腺癌细胞 (PC-3) 筛选化合物抗肿瘤活性。**结果:** 从安息香醇提取物中分离得到 15 个化合物,分别鉴定为 myricadiol (**1**), 3-keto-oleanonic acid (**2**), (4*E*)-1,5-bis(4-hydroxyphenyl)-1-methoxy-2-(methoxy-methyl)-4-pentene (**3a** 和 **3b**), (*E*)-*p*-coumaryl alcohol γ -*O*-methyl ether (**4**), 芝麻素 (**5**), 5-(3''-benzoyloxypropyl)-7-methoxy-2-(3',4'-methylenedioxy phenyl)-benzofuran (**6**), 邻苯二甲酸二丁酯 (**7**), 香草酸甲酯 (**8**), 对羟基苯甲醛 (**9**), 对羟基苯乙酮 (**10**), 香草乙酮 (**11**), 3-oxo-olean-11,13(18)-dien-28, 19 β -olide (**12**), 香草醛 (**13**), 苯甲酸 (**14**), 娑罗树脂酸 (**15**)。其中,化合物 **1**~**11** 为首次从安息香中分离得到。部分化合物有一定的抗肿瘤活性,其中化合物 **2** 和 **12** 抗肿瘤活性最为显著,对 5 种肿瘤细胞都有显著的抑制作用,显著优于阳性药顺铂。**结论:** 安息香中萜类化合物在抗肿瘤药物的开发、应用上具有良好发展前景。

[关键词] 安息香; 化学成分; 分离鉴定; 抗肿瘤; 醇提取物

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0191-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200415

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191108.1159.001.html>

[网络出版时间] 2019-11-08 14:31

Chemical Constituents of Benzoinum and Its Anti-tumor Activities *in Vitro*

ZHANG Li¹, ZHANG Qing¹, LIANG Qiu-ming², WANG Fei-fei², XIAN Ming-hua^{1,2,3*}, WANG Feng^{1,2,3*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Key Laboratory of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica of State Administration of TCM, Guangzhou 510006, China; 3. Engineering & Technology Research Center for Chinese Materia Medica Quality of the Universities of Guangdong Province, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the active anti-tumor constituents of Benzoinum according to observation of the anti-tumor effect of chemical constituents from Benzoinum *in vitro*. **Method:** The 95% ethanol extract of Benzoinum was systematically separated by silica gel column chromatography, medium pressure liquid preparation chromatography and preparation liquid chromatography, and their structures were identified by physicochemical property and spectral data. Anti-tumor activities of the compounds of Benzoinum were screened by *in vitro* cells including human hepatoma cells in vitro (HepG2), human lung cancer cells (A549), human cervical cancer cells (HeLa), human breast cancer cells (MCF-7) and human prostate cancer cells (PC-3). **Result:** Fifteen

[收稿日期] 20190808(005)

[基金项目] 广东高校省级重点平台和重大科研项目(2017KTSCX101)

[第一作者] 张丽,在读硕士,从事活性天然产物的发现及中药物质基础研究,E-mail:957109764@qq.com

[通信作者] *贤明华,博士,讲师,从事中药心脑血管药理研究,E-mail:xmh360@163.com;

*王峰,博士,副教授,从事活性天然产物的发现及中药物质基础研究,Tel:020-39352181,E-mail:wfeng1230@163.com

compounds were isolated from Benzoinum and identified as myricadiol (**1**), 3-keto-oleanonic acid (**2**), (4*E*)-1, 5-*bis* (4-hydroxyphenyl) -1-methoxy-2- (methoxy-methyl) -4-pentene (**3a** and **3b**), (*E*)-*p*-coumaryl alcohol γ -*O*-methyl ether (**4**), sesamin (**5**), 5- (3''benzoyloxypropyl) -7-methoxy-2- (3', 4'-methylenedioxy phenyl) -benzofuran (**6**), dibutyl phthalate (**7**), methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate (**8**), *p*-hydroxybenzaldehyde (**9**), *p*-hydroxyacetophenone (**10**), acetovanillone (**11**), 3-oxo-olean-11, 13 (18) -dien-28, 19 β -olide (**12**), vanillin (**13**), benzoic acid (**14**), and siarsesinolic acid (**15**). Compounds **1** to **11** were isolated from the resin of *Styrax tonkinensis* for the first time. A part of these compounds had good anti-tumor activities. Among them, compound **2**, **12** showed a strongest activity. **Conclusion:** The chemical constituents of Benzoinum have good prospects for the development and application of anti-tumor drugs.

[**Key words**] Benzoinum; chemical constituents; isolation and identification; anti-tumor activity; ethanol extract

安息香为安息香科植物白花树的干燥树脂。具有开窍醒神、行气活血、止痛的功效^[1]。安息香天然分布于我国的广东、广西、云南、贵州、重庆、江西、湖南以及福建等省(区、市)^[2]。目前,国内外对安息香化学成分的研究较少,主要化学成分有三萜类、木脂素和香脂酸类^[3-4]。2015年版《中国药典》中关于安息香含量测定也仅针对香脂酸类化合物,指标成分单一。现代大部分药理研究表明安息香提取物有显著的抗炎解热^[5],促进血脑屏障^[6],抗动脉粥样硬化^[7],抗肿瘤等药理活性^[8],但很少对其具体的有效成分进行相关研究。课题组前期研究发现安息香部分化合物具有较好的抗肿瘤活性^[9],表明安息香中化学成分具有重要的研究价值。因此,系统研究安息香的化学成分十分必要,不仅能够丰富该属植物中化学成分的结构类型,为后续展开相关生物活性研究提供物质基础,而且能为药材寻找特征性质控指标成分提供科学依据。本实验对安息香乙酸乙酯的部位进行深入的研究,从中分离并鉴定得到 15 个化合物,分别鉴定为 myricadiol (**1**), 3-keto-oleanonic acid (**2**), (4*E*)-1, 5-*bis* (4-hydroxyphenyl) -1-methoxy-2- (methoxy-methyl) -4-pentene (**3a** and **3b**), (*E*)-*p*-coumaryl alcohol γ -*O*-methyl ether (**4**), 芝麻素 (**5**), 5- (3'' benzoyloxypropyl) -7-methoxy-2- (3', 4'-methylenedioxy phenyl) -benzofuran (**6**), 邻苯二甲酸二丁酯(**7**), 香草酸甲酯(**8**), 对羟基苯甲醛(**9**), 对羟基苯乙酮(**10**), 香草乙酮(**11**), 3-oxo-olean-11, 13 (18) -dien-28, 19 β -olide (**12**), 香草醛(**13**), 苯甲酸(**14**), 暹罗树脂酸(**15**)。其中化合物 **1** ~ **11** 为首次从安息香中分离得到,并采用体外肿瘤模型初步评价其抗肿瘤活性。化合物 **2** 和 **12** 对 HepG2, A549, HeLa, MCF-7, PC-3 这 5 种肿瘤细胞均有显著的抑制作用,且都优于阳性药顺铂,表现出

潜在的抗肿瘤活性。

1 材料

安息香树脂购于安徽亳州,经广东药科大学中药学院滕希峰讲师鉴定为白花树 *Styrax tonkinensis* 的干燥树脂。人肝癌细胞株 HepG2,人肺癌细胞株 A549,人宫颈癌细胞株 HeLa,人乳腺癌细胞株 MCF-7,前列腺癌细胞株 PC-3(中科院上海生命科学研究院);CCK-8 试剂盒(东仁化学科技有限公司,批号 NG638),DMEM 基础培养基、胎牛血清(Gibco 公司),顺铂(Macklin 公司,批号 C10271916)。石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇(广东光华科技股份有限公司,分析纯);甲醇(Thermo Fisher,色谱纯);LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20, 25 ~ 100 μ m,美国 GE Healthcare 公司);柱色谱用硅胶(200 ~ 300 目,青岛海洋化工集团公司);RP18 反相硅胶(40 ~ 60 μ m,德国 Merck 公司)。

MP200 型中压快速纯化制备色谱仪(天津博纳艾杰尔科技有限公司),LC-20A 型高效液相色谱仪,CBM-20A 型半制备液相色谱仪(日本岛津公司);ZWF-6 型紫外灯(上海金达生化仪器有限公司);Advance III-600 型核磁共振谱仪(德国 BRUKER 公司),UPLC/Q-Tof 6230 型质谱仪(美国 Agilent 公司)。ELX800 型全自动酶标仪(BicTek Instruments 公司)

2 方法

2.1 提取与分离 安息香干燥树脂加入 95% 乙醇静置提取 3 次,每次 24 h,提取液减压浓缩干燥,得到总提取物,总提取物用温水充分混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯分级萃取,浓缩得极性不同的浸膏。取乙酸乙酯萃取部位浸膏 1 kg,正向硅胶色谱分离,洗脱体系石油醚-乙酸乙酯(100 : 1 ~ 0 : 100)梯度洗

脱,经 TLC,HPLC 分析合并,得 7 个组分(B1~B7)。B2(598 g)经正向硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 40:1~0:100)梯度洗脱分为 7 个组分 B2.1~B2.7。B2.2 经 MCI 柱(甲醇-水 10:90~100:0)梯度洗脱分为 6 个组分(B2.2.1~B2.2.6),其中 B2.2.1 经半制备 HPLC(甲醇-水 35:65)纯化,得到化合物 **8**(13.72 mg)。B2.2.4 经中低压 ODS 柱(甲醇-水 50:50~100:0)梯度洗脱分为 7 个组分(B2.2.4.1~B2.2.4.7),其中 B2.2.4.3 经半制备 HPLC(甲醇-水 75:25)纯化得到化合物 **6**(14.74 mg),其中 B2.2.4.7 用甲醇溶解,静置一夜后有白色絮状物飘在甲醇中间,之后用甲醇反复洗涤,得化合物 **12**(18.54 mg)。B2.2.5 经中低压 ODS 柱(甲醇-水为 70:30~100:0)梯度洗脱分为 3 个组分(B2.2.5.1~B2.2.5.3),B2.2.5.1 经半制备 HPLC(甲醇-水 60:40)纯化,得到化合物 **7**(10.2 mg)。B2.3 经 MCI 柱(甲醇-水 10:90~100:0)梯度洗脱分为 10 个组分(B2.3.1~B2.3.10),其中 B2.3.1 经 ODS 色谱柱(甲醇-水 30:70~100:0)梯度洗脱分为 6 个组分(B2.3.1.1~B2.3.1.6),其中 B2.3.1.6 经半制备 HPLC(甲醇-水 40:60)纯化,得到化合物 **9**(6 mg)。B2.3.2 经半制备 HPLC(甲醇-水 55:45)纯化,得到化合物 **4**(51.4 mg)与 **13**(17.5 mg)。B2.3.3 经半制备 HPLC(甲醇-水 85:15)分离得 **15**(50 mg)。B2.3.7 经半制备 HPLC(甲醇-水 73:27)纯化,得到化合物 **5**(8.6 mg)。B2.3.4 经半制备 HPLC(甲醇-水 90:10)纯化,得到化合物 **1**(3.6 mg)。B2.3.4.3 经半制备 HPLC(甲醇-水 90:10),分离得化合物 **2**(923.5 mg)。B2.4 经 MCI 柱色谱(甲醇-水 10:90~100:0)梯度洗脱分为 3 个组分(B2.4.1~B2.4.3),其中 B2.4.1 经 ODS 色谱柱(甲醇-水 30:70~100:0)梯度洗脱分为 6 个组分(B2.4.1.1~B2.4.1.6)。B2.4.1.2 经半制备液相(甲醇-水 25:75)纯化,得到化合物 **10**(6 mg),B2.4.1.3 经半制备 HPLC(甲醇-水 25:75)纯化,得到化合物 **11**(17.7 mg)。B2.5 经中低压 ODS 柱(甲醇-水 50:50~100:0)梯度洗脱分为 5 个组分(B2.5.1~B2.5.5),其中 B2.5.1 经 Sep-20 凝胶色谱柱分离为 6 个组分(B2.5.1.1~B2.5.1.6),B2.5.1.5 经半制备液相(甲醇-水 30:70)得化合物 **14**(8.1 mg)。B2.5.2 经 MCI 柱(甲醇-水 10:90~100:0)梯度洗脱分为 8 个组分(B2.5.2.1~B2.5.2.8),B2.5.2.3 经 Sephadex LH-20(纯甲醇)洗脱纯化分离分为 7 个组

分(B2.5.2.3.1~B2.5.2.3.7),其中 B2.5.2.3.5 经半制备 HPLC(甲醇-水 55:45)纯化,得到化合物 **3a**(1.5 mg),化合物 **3b**(5.8 mg)。

2.2 抗肿瘤活性检测 采用 CCK-8 法测定细胞的活力^[10]。分别取对数生长期的肿瘤细胞包括 HepG2, A549, HeLa, MCF-7, PC-3 进行消化,得到细胞悬液后计数,按照计数结果将细胞浓度调整为大约 1×10^4 个/mL,以每孔 100 μ L 分别接种于 96 孔板中,在 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下的细胞培养箱中培养 24 h 后,将上清液吸弃。再把不同浓度的阳性对照药(顺铂)以及安息香化合物样品(设置 5 个浓度,分别为 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μ mol \cdot L⁻¹)加入到 96 孔板中,每个浓度梯度设置 3 个复孔,于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 24 h。最后将稀释好的 CCK-8 加入 96 孔板,继续培养 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长下测定其吸光度 *A*, Graphpad prism 5.0 计算样品的半数抑制浓度(IC₅₀)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色针晶(三氯甲烷),EI-MS *m/z* 442.73 [M]⁺。¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ : 5.51(1H, dd, *J* = 8.1, 3.1 Hz, H-15), 3.22(2H, d, *J* = 10.8 Hz, H-28), 3.19(1H, dd, *J* = 11.1, 4.7 Hz, H-3), 2.56(1H, dd, *J* = 15.6, 6.7 Hz, H-18), 1.06(3H, s, CH₃), 0.97(3H, s, CH₃), 0.97(3H, s, CH₃), 0.96(3H, s, CH₃), 0.92(3H, s, CH₃), 0.89(3H, s, CH₃), 0.80(3H, s, CH₃)。 ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ : 37.7(C-1), 27.3(C-2), 79.2(C-3), 40.5(C-4), 55.6(C-5), 18.9(C-6), 35.9(C-7), 39.2(C-8), 44.9(C-9), 37.9(C-10), 15.6(C-11), 30.9(C-12), 38.1(C-13), 159.3(C-14), 115.8(C-15), 32.8(C-16), 38.9(C-17), 49.3(C-18), 41.4(C-19), 28.8(C-20), 33.7(C-21), 28.1(C-22), 17.5(C-23), 28.1(C-24), 15.6(C-25), 30.0(C-26), 26.2(C-27), 65.6(C-28), 21.8(C-29), 33.6(C-30)。以上数据与文献[11]基本一致,故鉴定为 myricadiol。

化合物 **2** 白色针晶(三氯甲烷),EI-MS *m/z* 454.69 [M]⁺。¹H-NMR(500 MHz, DMSO) δ : 12.03(1H, s, 28-COOH), 5.17(1H, t, H-12), 2.74(1H, dd, *J* = 14.0, 4.6 Hz, H-18), 2.50(1H, m, H-2), 2.27(1H, ddd, *J* = 15.8, 7.0, 3.7 Hz, H-2), 1.09(3H, s, H-27), 0.98(3H, s, H-25), 0.96(3H, s, H-30), 0.94(3H, s, H-29), 0.86(6H, s, H-23, 24), 0.76(3H, s, H-26)。 ¹³C-NMR(125 MHz, DMSO) δ : 38.8(C-1), 33.6(C-2), 216.0(C-3), 46.6(C-4),

54.3 (C-5), 19.2 (C-6), 32.1 (C-7), 38.4 (C-8), 46.2 (C-9), 36.3 (C-10), 22.6 (C-11), 121.4 (C-12), 143.8 (C-13), 41.4 (C-14), 27.2 (C-15), 23.3 (C-16), 45.6 (C-17), 40.9 (C-18), 45.5 (C-19), 30.4 (C-20), 33.3 (C-21), 31.8 (C-22), 26.3 (C-23), 21.1 (C-24), 14.7 (C-25), 16.7 (C-26), 25.5 (C-27), 178.5 (C-28), 32.8 (C-29), 23.0 (C-30)。以上数据与文献[12]基本一致,故鉴定为 3-keto-oleanonic acid。

化合物 **3a** 白色粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 328.41 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.17 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.15 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', 6''), 6.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.75 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3'', 5''), 6.20 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-5), 5.92 (1H, ddd, $J = 15.7, 7.9, 6.7$ Hz, H-4), 4.18 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1), 3.53 (1H, dd, $J = 9.3, 5.6$ Hz, H-6b), 3.35 (1H, m, H-6a), 3.34 (3H, s, 6-OCH₃), 3.19 (3H, s, 1-OCH₃), 2.19 (1H, m, $J = 13.5, 6.7, 4.9, 1.5$ Hz, H-2), 2.08 (1H, m, H-3b), 1.98 (1H, m, H-3a)。¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 83.1 (C-1), 45.6 (C-2), 31.1 (C-3), 126.6 (C-4), 131.0 (C-5), 71.7 (C-6), 132.2 (C-1'), 129.0 (C-2', 6'), 115.5 (C-3', 5'), 155.3 (C-4'), 130.9 (C-1''), 127.4 (C-2'', 6''), 115.2 (C-3'', 5''), 154.9 (C-4''), 59.0 (6-OCH₃), 56.9 (1-OCH₃)。以上数据与文献[13]基本一致,故鉴定为 (4*E*)-1,5-*bis* (4-hydroxyphenyl)-1-methoxy-2-(methoxymethyl)-4-pentene。

化合物 **3b** 白色粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 328.41 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.21 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.16 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', 6''), 6.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.76 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3'', 5''), 6.32 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-5), 6.02 (1H, m, H-4), 4.16 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1), 3.24 (1H, dd, $J = 9.3, 5.1$ Hz, H-6a), 3.22 (3H, s, 6-OCH₃), 3.20 (3H, s, 1-OCH₃), 2.99 (1H, dd, $J = 9.4, 5.0$ Hz, H-6b), 2.01 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-2, H-3a), 1.92 (1H, t, $J = 10.3$ Hz, H-3b)。¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 83.3 (C-1), 46.4 (C-2), 27.3 (C-3), 127.2 (C-4), 130.2 (C-5), 71.8 (C-6), 130.8 (C-1'), 127.4 (C-2', 6'), 115.3 (C-3', 5'), 155.1 (C-4'), 129.9 (C-1''), 115.5 (C-3'', 5''), 154.8 (C-4''), 128.7 (C-2'', 6''), 58.9 (6-OCH₃), 57.1 (1-OCH₃)。以上数据与文献[13]基本一致,故鉴

定为化合物 **3a** 的同分异构体。

化合物 **4** 白色粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 164.20 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ: 9.55 (1H, s, H-4'), 7.26 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', H-6'), 6.72 (2H, dd, $J = 6.5, 4.8$ Hz, H-3', H-5'), 6.48 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-1), 6.10 (1H, dt, $J = 15.9, 6.1$ Hz, H-2), 3.98 (2H, dd, $J = 6.1, 1.2$ Hz, H-3), 3.25 (3H, s, 3-OCH₃)。¹³C-NMR (125 MHz, DMSO) δ: 131.7 (C-1), 122.8 (C-2), 72.5 (C-3), 57.1 (C-OCH₃), 127.4 (C-1'), 127.7 (C-2', 6'), 115.4 (C-3'), 157.2 (C-4')。以上数据与文献[13]基本一致,故鉴定为 (*E*)-*p*-coumaryl alcohol γ -*O*-methyl ether。

化合物 **5** 白色粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 354.36 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.82 (2H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6, H-6'), 6.77 (2H, dd, $J = 1.6, 0.5$ Hz, H-2, H-2'), 6.76 (2H, d, $J = 0.5$ Hz, H-5, H-5'), 5.93 (4H, s, O-CH₂-O), 4.69 (2H, d, $J = 4.3$ Hz, H-7, H-7'), 4.22 (2H, m, Ha-9, H-9'), 3.85 (2H, dd, $J = 9.3, 3.7$ Hz, Hb-9, H-9'), 3.03 (2H, ddd, $J = 4.7, 3.1, 1.4$ Hz, H-8, H-8')。¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 148.1 (C-4, 4'), 147.3 (C-3, 3'), 135.2 (C-1, 1'), 119.5 (C-6, 6'), 108.3 (C-5, 5'), 106.6 (C-2, 2'), 101.2 (O-CH₂-O), 85.9 (C-7, 7'), 71.9 (C-9, 9'), 54.5 (C-8, 8')。以上数据与文献[14]基本一致,故鉴定为芝麻素。

化合物 **6** 黄色油状物(三氯甲烷), EI-MS m/z 430.46 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.04 (1H, m, H-2b, 6b), 7.56 (1H, m, H-4d), 7.45 (2H, m, H-3c, 5c), 7.40 (1H, dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, H-6'), 7.32 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2'), 6.99 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-4), 6.87 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.79 (1H, s, H-3), 6.63 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-6), 6.01 (2H, s, OCH₂O), 4.38 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-3''), 4.02 (3H, s, 7-OCH₃), 2.87 (2H, m, H-1''), 2.18 (2H, m, H-2'')。¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 156.3 (C-2), 100.5 (C-3), 112.6 (C-4), 137.1 (C-5), 107.6 (C-6), 145.0 (C-7), 142.6 (C-8), 131.3 (C-9), 124.9 (C-1'), 105.7 (C-2'), 148.2 (C-3', 4'), 108.8 (C-5'), 119.4 (C-6'), 101.5 (O-CH₂-O), 32.9 (C-1''), 30.9 (C-2''), 64.5 (C-3''), 56.4 (7-OCH₃), 130.5 (C-1a), 129.7 (C-2b, 6b), 128.5 (C-3c, 5c), 133.0 (C-4d), 166.8 (C=O)。以上数据与文献[15]基本一致,故鉴定为 5-(3'-benzyloxypropyl)-7-methoxy-2-(3',4'-methylenedioxy

phenyl)-benzofuran。

化合物 7 白色粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 278.35 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.71 (2H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-3, 6), 7.52 (2H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-4, 5), 4.30 (4H, t, $J = 6.7$ Hz, H-1'), 1.71 (2H, dq, $J = 8.9, 6.8$ Hz, H-2'), 1.45 (4H, m, H-3'), 0.96 (6H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4')。 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 167.9 (COO), 132.4 (C-1, 2), 131.1 (C-4, 5), 128.0 (C-3, 6), 65.7 (C-1'), 30.7 (C-2'), 19.3 (C-3'), 13.8 (C-4')。以上数据与文献[16]基本一致,故鉴定为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 8 棕色粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 182.18 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.63 (1H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, H-6), 7.54 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 6.93 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 3.94 (3H, s, 3-OCH₃), 3.85 (3H, s, H-8)。 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 122.4 (C-1), 111.9 (C-2), 150.1 (C-3), 146.3 (C-4), 114.2 (C-5), 124.3 (C-6), 167.0 (C-7), 52.1 (C-8), 56.2 (3-OCH₃)。以上数据与文献[17]基本一致,故鉴定为香草酸甲酯。

化合物 9 无色针状结晶(三氯甲烷), EI-MS m/z 122.12 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 9.76 (1H, s, H-7), 7.78 (2H, m, H-2, 6), 6.92 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5)。 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 192.9 (7-CHO), 165.1 (C-4), 133.4 (C-2, 6), 130.2 (C-1), 116.9 (C-3, 5)。以上数据与文献[18]基本一致,故鉴定为对羟基苯甲醛。

化合物 10 无色块状结晶(三氯甲烷), EI-MS m/z 136.15 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.88 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6), 2.52 (3H, s, H-8)。 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 164.4 (C-1), 116.4 (C-2, 6), 132.2 (C-3, 5), 129.9 (C-4), 199.6 (C-7), 26.3 (C-8)。以上数据与文献[18]基本一致,故鉴定为对羟基苯乙酮。

化合物 11 无色块状结晶(三氯甲烷), EI-MS m/z 166.18 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.56 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6), 7.51 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.85 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃), 2.53 (3H, s, CH₃-7)。 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 130.5 (C-1), 111.8 (C-2), 149.0 (C-3), 153.4 (C-4), 115.8 (C-5), 125.2 (C-6), 199.5 (C-7), 26.2 (C-8), 56.4 (3-OCH₃)。以上数据与文献[19]基本一致,故鉴定为香草乙酮。

化合物 12 白色粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 450.31 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.17 (1H, dd, $J = 10.1, 3.0$ Hz, H-12), 5.74 (1H, dd, $J = 10.2, 2.1$ Hz, H-11), 4.71 (1H, s, H-19), 1.10 (3H, s, H-29), 1.10 (3H, s, H-23), 1.07 (3H, s, H-25), 1.04 (3H, s, H-24), 1.03 (3H, s, H-27), 0.94 (3H, d, $J = 3.7$ Hz, H-30), 0.80 (3H, s, H-26)。 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 39.2 (C-1), 34.0 (C-2), 217.2 (C-3), 47.6 (C-4), 54.7 (C-5), 19.5 (C-6), 32.6 (C-7), 41.0 (C-8), 52.3 (C-9), 36.6 (C-10), 129.1 (C-11), 123.5 (C-12), 134.7 (C-13), 40.7 (C-14), 25.7 (C-15), 24.4 (C-16), 44.2 (C-17), 133.3 (C-18), 85.1 (C-19), 35.9 (C-20), 32.7 (C-21), 34.7 (C-22), 26.5 (C-23), 21.1 (C-24), 17.6 (C-25), 17.0 (C-26), 19.3 (C-27), 178.1 (C-28), 28.0 (C-29), 23.4 (C-30)。以上数据与文献[20]基本一致,故鉴定为 3-oxo-olean-11,13(18)-dien-28,19β-olide。

化合物 13 白色无定型粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 152 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ: 9.91 (1H, s, 7-CHO), 7.57 (1H, dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, H-5), 7.53 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 7.11 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.19 (1H, s, 4-OH), 3.99 (3H, s, 3-OCH₃)。 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO) δ: 190.9 (7-CHO), 126.3 (C-1), 110.6 (C-2), 148.3 (C-3), 153.8 (C-4), 115.5 (C-5), 128.3 (C-6), 55.6 (3-OCH₃)。以上数据与文献[11]基本一致,故鉴定为香草醛。

化合物 14 白色针状晶体(三氯甲烷), EI-MS m/z 122 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 11.38 (1H, s, COOH), 8.14 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-3, 7), 7.63 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-5), 7.49 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-4, 6)。 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 172.6 (C-1), 129.5 (C-2), 130.4 (C-3, 7), 128.6 (C-4, 6), 134.0 (C-5)。以上数据与文献[21]基本一致,故鉴定为苯甲酸。

化合物 15 白色粉末(三氯甲烷), EI-MS m/z 472 [M]⁺。¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ: 5.67 (1H, br s, H-12), 3.73 (2H, br s, H-18, 19), 3.53 (1H, dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, H-3), 1.66 (3H, s, H-27), 1.25 (3H, s, H-29), 1.20 (3H, s, H-23), 1.13 (3H, s, H-30), 1.08 (3H, s, H-26), 1.04 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-25)。 ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ: 38.8 (C-1), 28.4 (C-2), 78.2 (C-3), 39.4 (C-4), 56.0 (C-5), 19.0 (C-6), 33.7 (C-7), 40.0 (C-8), 48.4

(C-9), 37.6 (C-10), 24.2 (C-11), 123.8 (C-12), 144.9 (C-13), 42.2 (C-14), 29.2 (C-15), 28.1 (C-16), 46.1 (C-17), 44.8 (C-18), 81.3 (C-19), 35.8 (C-20), 28.9 (C-21), 33.4 (C-22), 29.2 (C-23), 16.5 (C-24), 15.5 (C-25), 17.5 (C-26), 24.9 (C-27), 180.9 (C-28), 28.8 (C-29), 24.9 (C-30)。以上数据与文献[22]基本一致,故鉴定为暹罗树脂酸。

表 1 安息香的化合物体外抗肿瘤细胞的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	HepG2	A549	HeLa	MCF-7	PC-3
1	>100	>100	>100	>100	>100
2	20.58 ± 1.49	24.77 ± 0.46	12.16 ± 0.70	18.95 ± 0.62	25.55 ± 1.48
3a	93.84 ± 1.95	74.54 ± 3.87	77.06 ± 4.44	67.64 ± 6.20	>100
3b	>100	>100	90.31 ± 7.01	>100	>100
4	>100	>100	>100	>100	>100
5	>100	>100	>100	>100	>100
6	>100	>100	>100	57.1 ± 2.15	>100
7	53.84 ± 4.07	51.23 ± 0.24	>100	31.97 ± 1.68	54.42 ± 4.26
8	>100	67.98 ± 2.66	27.28 ± 1.54	>100	>100
9	>100	>100	>100	>100	>100
10	>100	>100	>100	>100	>100
11	>100	>100	51.51 ± 4.24	>100	>100
12	18.91 ± 1.03	14.67 ± 0.80	10.76 ± 0.74	18.82 ± 1.80	9.80 ± 1.45
13	>100	>100	>100	>100	>100
14	>100	>100	>100	>100	>100
15	86.00 ± 6.68	>100	39.93 ± 3.80	53.74 ± 4.08	>100
顺铂	36.62 ± 1.25	38.57 ± 3.77	40.95 ± 0.82	47.36 ± 3.17	35.89 ± 2.49

4 抗肿瘤活性考察

采用 CCK-8 方法测定了化合物 1~15 和顺铂对肿瘤细胞存活率的影响,结果见表 1。与顺铂相比,化合物 2,3a,3b,6,7,8,11,12,15 均有不同程度的抑制作用。其中化合物 2,12 对 5 种肿瘤细胞均有较强的抑制作用;化合物 7 对 MCF-7,化合物 8 对 HeLa,化合物 15 对 HeLa 也都有很强的抑制作用,且都优于顺铂。

5 讨论

安息香在我国分布广泛,是非常值得进一步开发和实现综合利用的农林副产品。为了实现安息香合理开发和综合利用,其化学成分和药理活性研究是基础。本文从安息香树脂中分离出的 15 个单体化合物并采用 HepG2, A549, HeLa, MCF-7, PC-3 肿瘤细胞对其进行抗肿瘤活性筛选,发现了化合物 2 和 12 对这 5 种肿瘤细胞均有良好的抗肿瘤活性,且都显著优于阳性药。除了化合物 7,8 和 15 在抑制 MCF-7, HeLa 细胞活性方面有一定活性,其他化合物均没有很明显的抗肿瘤活性。笔者推测萜类化合物可能是安息香发挥抗肿瘤的重要物质基础,显示了其在作为天然抗肿瘤药物开发上的良好发展潜力。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:148.
- [2] 李因刚,柳新红,赵勋,等. 越南安息香不同分布区的群落特征[J]. 林业科学研究,2011,24(4):500-504.
- [3] 王峰. 安息香和乳香化学成分及抗肿瘤活性研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2007.
- [4] 王一波. 安息香化学成分分离与鉴定[D]. 广州:广东药科大学,2015.
- [5] 雷玲,王强,白筱璐,等. 安息香的抗炎解热作用研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(2):110-111.
- [6] 黄萍,夏厚林,贾芳,等. 安息香配伍合成冰片对小鼠脑缺血缺氧及血脑屏障通透性的影响[J]. 中药药理与临床,2013,29(5):75-78.
- [7] 谢予朋,李阳,孙晓迪. 安息香提取物对损伤内皮细胞中乳酸脱氢酶、肿瘤坏死因子及白细胞介素-8 活

- 性的影响[J]. 中医药导报, 2014, 20(1): 6-7, 10.
- [8] 王一波, 陈欢, 王淑美, 等. 中药安息香药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(3): 48-49.
- [9] WANG F, HUA H M, PEI Y H, et al. Triterpenoids from the resin of *Styrax tonkinensis* and their antiproliferative and differentiation effects in human leukemia HL-60 cells[J]. J Nat Prod, 2006, 69(5): 807-810.
- [10] 余昕, 周洁, 欧丽兰, 等. 美洲大蠊不同提取物及不同提取方法对肿瘤细胞的细胞毒性作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 153-156.
- [11] 张瑛, 袁怡, 崔保松, 等. 宽苞水柏枝醋酸乙酯部位化学成分[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 1019-1023.
- [12] Abbas F A, Almassarany S M, Khan S, et al. Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L. [J]. Nat Prod Res, 2007, 21(5): 383-391.
- [13] Ly T N, Shimoyamada M, Kato K, et al. Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum*, Hance) [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(17): 4924-4929.
- [14] 葛利, 蓝柳凤, 暴惠宾, 等. 山蓝化学成分的初步研究[J]. 广西植物, 2014, 34(2): 155-159.
- [15] Akgul Y Y, Anil H. Benzofurans and another constituent from seeds of *Styrax officinalis* [J]. Phytochemistry, 2003, 63(8): 939-943.
- [16] 杨瑞昆, 邬思芳, 闫君, 等. 雷公藤乙酸乙酯部位和水部位化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药房, 2019, 30(5): 638-641.
- [17] 冯卫生, 王建超, 何玉环, 等. 辛夷化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(24): 2103-2106.
- [18] 刘年珍, 赵碧清, 钱群刚, 等. 玄参化学成分的研究[J]. 中成药, 2019, 41(3): 576-579.
- [19] 姚金龙, 付辉政, 周志强, 等. 鲜竹沥乙酸乙酯部位的化学成分研究[J]. 中药材, 2018, 41(10): 2354-2358.
- [20] WANG F, WANG Y B, CHEN H, et al. Two new triterpenoids from the resin of *Styrax tonkinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2015, 17(8): 823-827.
- [21] 柳继锋, 张雪梅, 薛多清, 等. 大青叶的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1961-1965.
- [22] 周曦曦, 许琼明, 周英, 等. 枸骨根的化学成分研究[J]. 中药材, 2013, 36(2): 233-236.

[责任编辑 顾雪竹]