

木麻黄凋落物化学成分及其生物活性的研究

王海生^{1,2}, 戴好富², 王佩², 蔡彩虹², 周丽曼², 李蕾^{1*}, 梅文莉^{2*}¹海南师范大学, 海口 571158; 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: 利用多种柱色谱和高效液相色谱相结合的方法从木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 凋落物的乙酸乙酯提取物中分离得到 7 个单体化合物, 通过波谱分析结合理化性质鉴定化合物结构分别为: 3 β -(*p*-hydroxy-*trans*-cinnamoyloxy) olean-12-en-28-oic acid (**1**), 3-*O*-(*E*)-coumaroylerythrodiol (**2**), casuarmondol (**3**), alnusdiol (**4**), 山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (**5**), 4''-反-香豆酰基-山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (**6**), 山柰酚 (**7**), 其中化合物 **3**, **4**, **6** 和 **7** 为首次从该植物中分离得到。分别采用 MTT 法、Ellman 法和 PNPG 法对单体化合物的体外细胞毒活性、乙酰胆碱酯酶抑制活性和 α -糖苷酶抑制活性进行测试, 测试结果表明, 化合物 **1** 和 **6** 具有细胞毒活性, 化合物 **1**~**4** 和 **6** 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, 化合物 **1** 和 **3**~**5** 具有 α -糖苷酶抑制活性。

关键词: 木麻黄; 凋落物; 化学成分; 细胞毒活性; α -糖苷酶抑制活性; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.3.008

Chemical Constituents from Litters of *Casuarina equisetifolia* and Their Biological Activity

WANG Hai-sheng^{1,2}, DAI Hao-fu², WANG Pei², CAI Cai-hong², ZHOU Li-man², LI Lei^{1*}, MEI Wen-li^{2*}

¹Hainan Normal University, Haikou 571158, China; ²Key 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: Seven compounds were isolated from the ethyl acetate (EtOAc) extract of litters of *Casuarina equisetifolia* by the method of column chromatography and high performance liquid chromatography. Their structures were identified as 3 β -(*p*-Hydroxy-*trans*-cinnamoyloxy) olean-12-en-28-oic acid (**1**), 3-*O*-(*E*)-coumaroylerythrodiol (**2**), casuarmondol (**3**), alnusdiol (**4**), kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**5**), 4''-*trans*-*p*-coumaroyl-kaempferol-3-*O*- α -rhamnopyranoside (**6**) and kaempferol (**7**) on the basis of physicochemical properties and spectroscopic evidence. Compounds **3**, **4**, **6** and **7** were obtained from *Casuarina equisetifolia* for the first time. The compounds were tested for cytotoxicity, acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibitory activities by MTT, Elman and PNPG methods, respectively. Compounds **1** and **6** showed cytotoxic activity. Compounds **1**-**4** and **6** showed acetylcholinesterase inhibitory activity. In addition, compounds **1** and **3**-**5** exhibited α -glucosidase inhibitory activity.

Key words: *Casuarina equisetifolia*; Litters; chemical constituents; cytotoxicity activity; acetylcholinesterase inhibitory activity; α -glucosidase inhibitory activity

木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 为木麻黄科 (Casuarinaceae) 木麻黄属 (*Casuarina*) 植物, 原产于澳大利亚和波利尼西亚^[1]。其具有固沙性能好、耐盐碱、耐贫瘠、耐干旱及速生等优良特

性^[2], 是我国华南和东南沿海主要的防护林树种之一, 也是防风固沙农田防护林的先锋树种之一^[3], 对海岸带生态系统的恢复具有不可替代的作用^[4]。然而, 近年来木麻黄林地出现逐年退化, 据报道, 其原因除了木麻黄根分泌物及土壤微生物产生次生代谢产物的抑制作用外, 凋落物中的化学成分通过淋溶进入土壤对其幼苗生长的抑制作用也是主要原因之一^[5]。目前关于木麻黄凋落物的研究多集中在凋落物分解与土壤养分关系研究^[6-8], 对于其化

收稿日期: 2017-10-11 接受日期: 2018-01-08

基金项目: 国家自然科学基金 (31260068); 海南师范大学 2016 年研究生校级创新科研项目 (Hsyz2016-24); 海南自然科学基金创新研究团队项目 (2017CXTD020)

* 通信作者 E-mail: meiwensi@itbb.org.cn; lei-li@126.com

学成分的研究鲜有报道。为了进一步开发利用木麻黄凋落物,

本次研究对其化学成分进行研究,其中乙酸乙酯部分粗提物对分别在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5 mg/mL 浓度下表现出一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性和 α -糖苷酶抑制活性,同时,在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,还分别对 K-562, BEL-7402, SGC-7901 和 Hela 表现出细胞毒活性。对木麻黄凋落物的乙酸乙酯提取物化学成分进行研究,分离鉴定了 7 个化合物,分别为 3 β -(*p*-hydroxy-*trans*-cinnamoyloxy) olean-12-en-28-oic acid (1), 3-*O*-(*E*)-coumaroylerythrodilol (2), casuarmonditol (3), alnusdiol (4), 山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (5), 4'-反-香豆酰基-山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (6), 山柰酚 (7)。其中化合物 3、4、6 和 7 为首次从木麻黄植物中分离得到。

1 材料和仪器

1.1 材料

本次实验样品来源于海南省海口市桂林洋区海岸的木麻黄海防林,林龄为 15 ~ 20 年,收集地表 0 ~ 10 cm 的凋落物,置于室内室温干燥,获得干燥的木麻黄凋落物 14.5 kg。

1.2 仪器与试剂

DX-2015 低温循环机(北京长流科学仪器有限公司);N-1000(2L)式立旋转蒸发(上海爱朗仪器有限公司);SHZ-D(III)循环真空泵(上海隆拓仪器设备有限公司);薄层层析硅胶板、柱色谱硅胶(200 ~ 300 目)和硅胶 H(青岛海洋化工厂);RP-18(Fuji 公司);Sephadex LH-20(Merck 公司);MCI GEL CHP20P(75 ~ 150 μ) (三菱化学公司);分析型高效液相色谱仪(Agilent 1260)(Agilent 公司),COSMOSIL 色谱柱(π NAP, 10ID \times 250 mm),COSMOSIL 色谱柱(C_{18} , 4.6ID \times 250 mm),制备型高效液相色谱仪(SUMMIT P680A)(Dionex 公司);Bruker AV-500 型超导核磁共振仪(Bruker 公司);ELX-800 酶标仪购于 Bio Tex 公司;乙酰胆碱酯酶、碘化硫代乙酰胆碱、二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)、他克林均(Sigma 公司);DMSO(天津市富宇精细化工有限公司)。人胃癌细胞(SGC-7901)、人肝癌细胞(BEL-7402)、人慢性髓原白血病细胞(K562)和人宫颈癌细胞(Hela)(中山大学实验动物中心细胞库)。阳性对照紫杉醇(江苏红豆杉药业有限公司),肿瘤细胞株采用 RPMI1640 完全培养基(Solarbio)和

DMEM 低糖培养基(Hyclone)。

2 实验方法

2.1 提取和分离

14.5 kg 干燥的木麻黄凋落物经过粉碎后,用 95% 的乙醇室温浸泡 3 次,浸泡时间依次为 7 d, 5 d, 3 d, 得到浸提液,将浸提液减压浓缩至干(无醇味),得到乙醇提取物(180.0 g)。将乙醇提取物分散于水中形成悬浊液,依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇各萃取三次,减压浓缩,得到石油醚提取物(61.2 g)、乙酸乙酯提取物(61.6 g)和正丁醇提取物(27.2 g)。

乙酸乙酯提取物(61.6 g)经正相减压硅胶柱色谱,以石油醚-氯仿和氯仿-甲醇为流动相梯度洗脱,得到 13 个流分(Fr. 1 ~ Fr. 13)。Fr. 5 (5.2 g)经 RP-18 色谱柱进行分离,得到 14 个流份(Fr. 5-1 ~ Fr. 5-14);Fr. 5-12 (716.5 mg)经 Sephadex LH-20 (石油醚:氯仿:甲醇 = 2:1:1)色谱柱进行分离,得到 12 个流份(Fr. 5-12-1 ~ Fr. 5-12-12);Fr. 5-12-7 (62.6 mg)通过半制备型高效液相色谱仪,经 C_{18} 色谱柱,乙腈-水洗脱系统(90% 乙腈, v: v)洗脱,得到化合物 1 (4.0 mg, $t_R = 16.2$ min) 和化合物 2 (3.1 mg, $t_R = 25.9$ min)。Fr. 8 (10.3 g)经 MCI 色谱柱进行分离,得到 8 个流份(Fr. 8-1 ~ Fr. 8-8);Fr. 8-2 (700.4 mg)经 Sephadex LH-20 (氯仿:甲醇 = 1:1, v: v)柱色谱分离,得到 9 个流份(Fr. 8-2-1 ~ Fr. 8-2-9);Fr. 8-2-8 (14.9 mg)通过半制备型高效液相色谱仪,经 C_{18} 色谱柱,甲醇-水洗脱系统(50% 甲醇, v: v)洗脱,得到化合物 5 (2.0 mg, $t_R = 9.3$ min)。Fr. 8-2-6 (93.4 mg)经硅胶(200 ~ 300 目)柱色谱进行分离,通过石油醚-乙酸乙酯(4:1 ~ 0:1, v: v)系统洗脱,得到化合物 4 (3.9 mg),其余馏分再经 Sephadex LH-20 柱色谱分离(甲醇为洗脱剂)及半制备型高效液相色谱仪分离,经 C_{18} 色谱柱,乙腈-水洗脱系统(20% 乙腈, v: v)洗脱,得到化合物 3 (5.5 mg, $t_R = 11.6$ min)。Fr. 8-5 (1.3 g)经 RP-18 色谱柱进行分离,得到 10 个流份(Fr. 8-5-1 ~ Fr. 8-5-10), Fr. 8-5-6 (486.3 mg)经硅胶(200 ~ 300 目)柱色谱进行分离,通过氯仿-甲醇(v: v)系统洗脱,洗脱剂比例分别为,30:1 ~ 2:1, 得到 9 个流份;Fr. 8-5-6-5 (174.9 mg)经 Sephadex LH-20 (甲醇)柱色谱分离,得到 9 个流份;Fr. 8-5-6-5-9 (76.3 mg)经硅胶(200 ~ 300 目)柱色谱进行分离,通过氯仿-甲醇(v: v)系统洗

脱,洗脱剂比例分别为,15:1、10:1、2:1,得到4个流份;Fr. 8-5-6-5-9-2 (72.9 mg)经 Sephadex LH-20 (丙酮)柱色谱分离,得到2个流份;Fr. 8-5-6-5-9-2 (51.0 mg)通过半制备高效液相色谱仪,经 C18 色谱柱,乙腈-水洗脱系统(35%乙腈,v:v)洗脱,得到化合物 6 (30.0 mg, $t_R = 15.6$ min)。Fr. 9 (2.2 g)经 Sephadex LH-20 (氯仿:甲醇 = 1:1)柱色谱分离,得到6个流份;Fr. 9-4 经硅胶(200~300目)柱色谱进行分离,通过氯仿/甲醇(v/v)系统洗脱,洗脱剂比例分别为,50:1~10:1,得到4个流份;Fr. 9-4-3 (81.6 mg)经 Sephadex LH-20 柱色谱分离,甲醇进行洗脱,得到化合物 7 (36.4 mg)。

2.2 活性测试

2.2.1 体外细胞毒活性

采用 MTT^[9]法进行体外细胞毒活性测定。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,每个浓度有2个平行。选择对数生长期细胞,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37℃、5% CO₂、湿度90%以上温箱中培养。24 h后将一定量的待测样品加入其中,继续培养3 d后,取出,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的 MTT 溶液(溶于平衡盐溶液 PBS) 50 μL,在37℃条件下反应4 h,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),计算公式如下。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(IC₅₀),样品活性以半数抑制浓度(IC₅₀)表示。生长抑制率 = (1-用药组平均 A 值/对照组平均 A 值) × 100%。

2.2.2 体外乙酰胆碱酯酶抑制活性

采用 Ellman^[10]法进行体外乙酰胆碱酯酶抑制活性测定。化合物 1~6 均用 DMSO 溶解,取110 μL 磷酸缓冲液(pH 8.0)、10 μL 待测样品(50 μg/mL)和40 μL 乙酰胆碱酯酶(0.02 μg/mL)于96孔板中,温育20 min(30℃),之后加入 DTNB(2.48 mg/mL)和碘化硫代乙酰胆碱(1.81 mg/mL)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,阴性对照为 DMSO,终浓度为0.1%,试验重复3次。按照以下公式计算

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)。抑制率 = (E-S)/E × 100%

2.2.3 体外 α-糖苷酶抑制活性

使用 PNPG^[11]法进行体外 α-糖苷酶抑制活性测定。使用 PH 6.8 的 0.2 mol · L⁻¹ 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液(PBS 溶液)作为反应溶液。待测样品溶液的配制:1 mg 待测化合物溶解于20 μL 的二甲基亚砜后,取5 μL 的该溶液加至45 μL 的 PBS 溶液中,配制成5 mg/mL 的待测化合物溶液。将以下各溶液混匀于96孔酶标板后置于酶标仪中:实验组10 μL 待测样品溶液 + 70 μL PBS 溶液 + 20 μL PBS 溶液溶解的2 U/mL α-糖苷酶溶液(A),阴性对照10 μL 10%的 DMSO-PBS 溶液 + 70 μL PBS 溶液 + 20 μL PBS 溶液溶解的2 U/mL α-糖苷酶溶液(B),阳性对照10 μL 的5 mg/mL 阿卡波糖溶液 + 70 μL PBS 溶液 + 20 μL PBS 溶液溶解的2 U/mL α-糖苷酶溶液,背景对照10 μL 待测样品溶液 + 90 μL PBS 溶液(A₀),空白对照10 μL 10%的 DMSO-PBS 溶液 + 90 μL 的 PBS 溶液(B₀)。将96孔板于37℃放置15 min后,各组均加入2.5 mmol/L 的4-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)溶液20 μL;将96孔板于37℃放置30 min后,加入0.2 mol/L 的 Na₂CO₃ 终止液80 μL,于酶标仪405 nm 波长下测量每孔的 OD 值吸光度并计算化合物对 α-糖苷酶的抑制活性。计算公式如下:抑制率 = [(B-B₀)-(A-A₀)]/(B-B₀) × 100%。

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 1 白色无定形粉末;[α]_D²⁹ = +4.6(c 0.1, CHCl₃);ESI-MS 在 m/z: 625.5 处给出 [M + Na]⁺ 峰;结合¹H NMR 和¹³C NMR 谱推断化合物 1 的分子式 C₃₉H₅₄O₃;¹H NMR (CDCl₃-d + CD₃OD-d₄, 500 MHz): 7.49 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-3'), 7.32 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-6', H-8'), 6.73 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-5', H-9'), 6.17 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2'), 5.18 (1H, t, J = 3.5 Hz, H-12), 4.51 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, J = 13.5, 4.5 Hz, H-18), 1.70 (2H, dd, J = 13.5, 3.5 Hz, H-11), 1.58 (2H, d, J = 4.5 Hz, H-19), 1.41 ~ 1.55 (4H, m, H-1, H-2), 1.34 (2H, dd, J = 14.0, 4.1 Hz, H-22), 1.12 ~ 1.24 (4H, m, H-6, H-7), 1.10 (2H, dd, J =

10.5, 3.3 Hz, H-21), 0.90 (2H, dd, $J = 13.5, 4.0$ Hz, H-15), 0.86 (3H, s, H-25), 0.84 (3H, s, H-24), 0.83 (3H, s, H-26), 0.81 (3H, s, H-23), 0.80 (3H, s, H-29), 0.70 (3H, s, H-30); ^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 125 MHz) δ : 38.1 (C-1), 23.4 (C-2), 81.0 (C-3), 37.9 (C-4), 55.3 (C-5), 18.2 (C-6), 32.5 (C-7), 39.2 (C-8), 47.5 (C-9), 36.9 (C-10), 23.0 (C-11), 122.2 (C-12), 143.9 (C-13), 41.7 (C-14), 27.6 (C-15), 23.5 (C-16), 46.4 (C-17), 41.2 (C-18), 45.9 (C-19), 30.6 (C-20), 33.8 (C-21), 32.6 (C-22), 28.0 (C-23), 16.8 (C-24), 15.3 (C-25), 17.0 (C-26), 25.8 (C-27), 180.8 (C-28), 23.6 (C-29), 33.0 (C-30), 167.9 (C-1'), 115.1 (C-2'), 144.7 (C-3'), 126.1 (C-4'), 129.9 (C-5'/9'), 115.8 (C-6'/8'), 159.2 (C-7')。以上波谱及旋光数据与文献^[12]报道基本一致,故鉴定化合物 1 为 3 β -(*p*-hydroxy-*trans*-cinnamoyloxy)-olean-12-en-28-oic acid。

化合物 2 白色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{29} = +2.9$ (c 0.10, CHCl_3); ESI-MS 在 m/z : 611.4 处给出 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰; 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱推断化合物 2 的分子式 $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{O}_6$; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3-d + \text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 500 MHz) δ : 7.42 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3'), 7.24 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5', H-9'), 6.66 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6', H-8'), 6.10 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2'), 5.01 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-12), 4.43 (1H, dd, $J = 11.0, 6.5$ Hz, H-3), 3.39 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-28a), 2.96 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-28b), 1.80 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-18), 1.70 (2H, dd, $J = 13.5, 3.5$ Hz, H-11), 1.58 (2H, d, $J = 4.5$ Hz, H-19), 1.41 ~ 1.55 (4H, m, H-1, H-2), 1.34 (2H, dd, $J = 14.0, 4.1$, H-22), 1.12 ~ 1.24 (4H, m, H-6, H-7), 1.10 (2H, dd, $J = 10.5$ Hz, 3.3 Hz, H-21), 0.90 (2H, dd, $J = 13.5, 4.0$ Hz, H-15), 0.82 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-24), 0.78 (3H, s, H-26), 0.74 (3H, s, H-23), 0.71 (3H, s, H-29), 0.70 (3H, s, H-30); ^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 125 MHz) δ : 38.1 (C-1), 23.5 (C-2), 80.9 (C-3), 37.8 (C-4), 55.2 (C-5), 18.1 (C-6), 32.3 (C-7), 39.6 (C-8), 47.4 (C-9), 36.7 (C-10), 23.3 (C-11), 122.0 (C-12), 144.7 (C-13), 41.5 (C-14), 25.3 (C-15), 21.6 (C-16), 36.7 (C-17), 42.3 (C-18), 46.3 (C-19), 30.7 (C-20), 33.9 (C-21), 30.9 (C-22), 27.8 (C-23), 16.4 (C-

24), 15.3 (C-25), 16.6 (C-26), 25.7 (C-27), 69.0 (C-28), 32.9 (C-29), 23.4 (C-30), 167.9 (C-1'), 114.9 (C-2'), 144.2 (C-3'), 126.6 (C-4'), 129.9 (C-5'/9'), 115.8 (C-6'/8'), 159.2 (C-7')。以上波谱数据及旋光数据与文献^[13]报道基本一致,故鉴定化合物 2 为 3-*O*-(*E*)-coumaroylerythrodiol。

化合物 3 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{29} = +0.6$ (c 0.10, CH_3OH); ESI-MS 在 m/z : 329.3 处给出 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰; 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱推断化合物 3 的分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$; ^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 500 MHz) δ : 7.02 (1H, dd, $J = 8.2, 2.3$ Hz, H-4), 6.98 (1H, dd, $J = 8.2, 2.3$ Hz, H-4'), 6.78 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3), 6.76 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3'), 6.71 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.49 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6'), 4.36 (1H, dd, $J = 6.5, 1.9$ Hz, H-2''), 4.01 (1H, m, H-6''), 3.50 (1H, ddd, $J = 19.5, 9.7, 3.7$ Hz, H-4''a), 2.90 (1H, dd, $J = 15.1, 6.6$ Hz, H-1''a), 3.06 (1H, dd, $J = 15.7, 3.5$ Hz, H-7''a), 2.91 (1H, m, H-4''b), 3.49 (1H, m, H-1''b), 2.82 (1H, dd, $J = 15.7, 9.5$ Hz, H-7''b), 1.85 (2H, m, H-5''); ^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 125 MHz) δ : 128.2 (C-1), 152.9 (C-2), 116.9 (C-3), 130.6 (C-4), 130.8 (C-5), 135.7 (C-6), 127.1 (C-1'), 153.3 (C-2'), 117.1 (C-3'), 131.7 (C-4'), 129.7 (C-5'), 134.7 (C-6'), 40.3 (C-1''), 78.1 (C-2''), 220.1 (C-3''), 39.6 (C-4''), 32.1 (C-5''), 73.2 (C-6''), 41.9 (C-7'')。以上波谱数据及旋光数据与文献^[14]对照基本一致,故鉴定化合物 3 为 casuarmonditol。

化合物 4 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{29} = -4.1$ (c 0.10, CH_3OH); ESI-MS 在 m/z : 313.1 处给出 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 峰; 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱推断化合物 4 的分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$; ^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 500 MHz): 7.03 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-4, 4'), 7.02 (2H, s, H-6, 6'), 6.78 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3, 3'), 3.97 (2H, m, H-3'', 5''), 2.88 (2H, m, H-1'', 7''), 2.35 (2H, m, H-2''a, 6''a), 1.90 (2H, dd, $J = 7.9, 4.6$ Hz, H-4''), 1.75 (2H, dddd, $J = 15.9, 9.5, 2.5, 2.5$ Hz, H-2''b, 6''b); ^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 125 MHz) δ : 127.3 (C-1/1'), 152.5 (C-2/2'), 117.0 (C-3/3'), 130.5 (C-4/4'), 131.9 (C-5/5'), 135.0 (C-6/6'), 27.5 (C-1''/7''), 35.8 (C-2''/6''), 67.3 (C-3''/5''), 51.8 (C-4'')。以上波谱数据及旋光数据与文献^[15]报道基本一致,故鉴定化合物 4 为 alnusdiol。

化合物 5 黄色固体; $[\alpha]_D^{29} = -5.3$ (c 0.10, CH₃OH); ESI-MS 在 m/z : 455.2 处给出 $[M + Na]^+$ 峰; 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱推断化合物 5 的分子式 C₂₁H₂₀O₁₀; ¹H NMR (CD₃OD-*d*₄, 500 MHz) δ : 7.72 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', H-6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', H-5'), 6.33 (1H, br s, H-8), 6.15 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-6), 5.32 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-1"), 4.17 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, H-2"), 3.66 (1H, m, H-3"), 3.27 ~ 3.31 (2H, m, H-4", H-5"), 0.87 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, H-6"); ¹³C NMR (CD₃OD-*d*₄, 125 MHz) δ : 158.9 (C-2), 136.5 (C-3), 179.9 (C-4), 163.6 (C-5), 100.2 (C-6), 166.4 (C-7), 95.1 (C-8), 158.9 (C-9), 106.2 (C-10), 123.0 (C-1'), 132.2 (C-2'/6'), 116.9 (C-3'/5'), 161.9 (C-4'), 103.8 (C-1"), 72.4 (C-2"), 72.4 (C-3"), 73.5 (C-4"), 72.2 (C-5"), 18.0 (6"). 以上波谱数据及旋光数据与文献^[16]报道基本一致, 故鉴定化合物 5 为山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷。

化合物 6 黄色固体; $[\alpha]_D^{29} = +31.3$ (c 0.10, CH₃OH); ESI-MS 在 m/z : 601.2 处给出 $[M + Na]^+$ 峰; 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱推断化合物 6 的分子式 C₃₀H₂₆O₁₂; ¹H NMR (CD₃OD-*d*₄, 500 MHz) δ : 7.69 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2', 6'), 7.49 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'''), 7.45 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2''', H-6'''), 6.94 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3''', H-5'''), 6.76 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3', H-5'), 6.30 (1H, br s, H-8), 6.23 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'''), 6.13 (1H, br s, H-6), 5.57 (1H, br s, H-1''), 4.18 (1H, br s, H-2''), 3.93 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-4''), 3.35 (1H, br s, H-3''), 3.12 (1H, m, H-5''), 0.73 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-6''); ¹³C NMR (CD₃OD-*d*₄, 125 MHz) δ : 159.4 (C-2), 135.2 (C-3), 179.4 (C-4), 163.2 (C-5), 99.9 (C-6), 165.8 (C-7), 94.8 (C-8), 158.5 (C-9), 105.9 (C-10), 122.6 (C-1'), 132.0 (C-2'/6'), 116.8 (C-3'/5'), 161.7 (C-4'), 102.1 (C-1''), 71.9 (C-2''), 70.1 (C-3''), 74.6 (C-4''), 69.6 (C-5''), 17.6 (C-6''), 127.1 (C-1'''), 131.3 (C-2'''/6'''), 116.5 (C-3'''/5'''), 161.2 (C-4'''), 146.7 (C-7'''), 115.1 (C-8'''), 168.7 (C-9'''). 以上波谱数据及旋光数据与文献^[17]报道基本一致, 故鉴定化合物 6 为 4''-反-香豆酰基-山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷。

化合物 7 黄色固体; ESI-MS 在 m/z : 285.0 处

给出 $[M-H]^-$ 峰; 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱推断化合物 7 的分子式 C₁₅H₁₀O₆; ¹H NMR (CD₃OD-*d*₄, 500 MHz) δ : 8.08 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', H-6'), 6.90 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', H-5'), 6.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ¹³C NMR (CD₃OD-*d*₄, 125 MHz) δ : 148.0 (C-2), 137.1 (C-3), 177.4 (C-4), 162.5 (C-5), 99.3 (C-6), 165.6 (C-7), 94.5 (C-8), 158.3 (C-9), 104.5 (C-10), 123.7 (C-1'), 130.7 (C-2'/6'), 116.3 (C-3'/5'), 160.6 (C-4')。以上波谱数据与文献^[18]报道基本一致, 故鉴定化合物 7 为山柰酚。

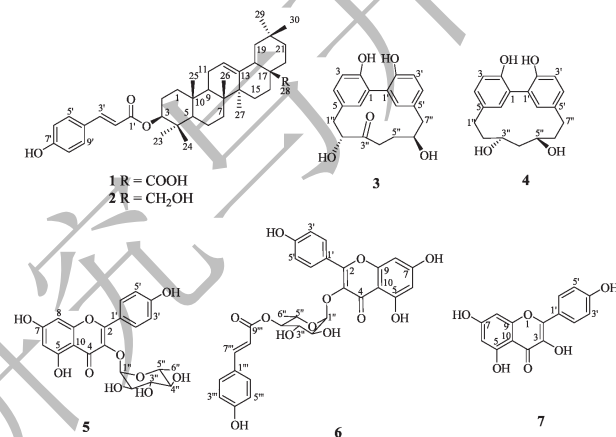


图 1 化合物 1~7 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-7

3.2 生物活性

3.2.1 体外细胞毒活性

采用 MTT 法对化合物 1~6 的进行体外细胞毒活性测试, 结果表明化合物 1 对人慢性髓原白血病细胞 (K562)、人肝癌细胞 (BEL-7402) 和人胃癌细胞 (SGC-7901) 具有一定的细胞毒活性; 化合物 6 对人慢性髓原白血病细胞 (K562)、人肝癌细胞 (BEL-7402)、人胃癌细胞 (SGC-7901) 和人宫颈癌细胞 (Hela) 具有一定的细胞毒活性, 具体活性结果见表 1。

3.2.2 体外乙酰胆碱酯酶抑制活性

采用 Elman 法对化合物 1~6 的进行乙酰胆碱酯酶抑制活性测试, 测试结果表明, 化合物 1~4 和 6 具有一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 具体活性结果见表 2。

3.2.3 体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性

采用 PNPG 法测定了化合物 1~6 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 结果表明, 化合物 1 和 3~5 具有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 具体活性结果见表 3。

表1 化合物1和6的细胞毒活性

Table 1 IC₅₀ values for cytotoxicity activity of compounds 1 and 6

化合物 Compound	IC ₅₀ (μM)			
	K-562	BEL-7402	SGC-7901	Hela
1	35.13 ± 0.98	75.88 ± 0.73	48.57 ± 0.66	-
6	13.06 ± 0.43	12.84 ± 0.38	11.14 ± 0.66	20.92 ± 1.68
紫杉醇 Taxol	0.98 ± 0.11	0.65 ± 0.03	1.23 ± 0.41	0.87 ± 0.08

注:“-”表示没有活性。

Note:“-”indicates no activity.

表2 化合物1~4和6的乙酰胆碱酯酶抑制活性(浓度:50 μg/mL)

Table 2 AChE inhibitory activity of compounds 1-4 and 6 at 50 μg/mL

化合物 Compound	抑制率(%) Inhibition ratio (%)
1	15.07 ± 0.56
2	17.73 ± 3.76
3	16.35 ± 4.28
4	18.26 ± 0.70
6	27.99 ± 3.76
他克林 Tacrine	75.48 ± 0.94

表3 化合物1和3~5的α-糖苷酶抑制活性(浓度:5 mg/mL)

化合物 Compound	抑制率(%) Inhibition ratio (%)
1	74.34 ± 1.36
3	37.38 ± 1.81
4	53.61 ± 1.25
5	71.20 ± 3.81
阿卡波糖 Acarbose	54.25 ± 4.74

4 讨论

本次研究从木麻黄凋落物乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分分离鉴定了7个单体化合物,其中2个三萜类,2个芳基庚烷类和3个黄酮类化合物,其中化合物3,4,6和7为首次从该植物中分离得到。据文献报道,齐墩果烷型三萜类化合物具有免疫抑制^[13]、细胞毒^[19]和抗细菌^[20]等生物活性。二芳基庚烷类化合物具有抗氧化和抗菌等生物活性^[21]。本次研究首次报道了齐墩果烷型三萜类化合物1和2及二芳基庚烷类化合物3和4的乙酰胆碱酯酶抑

制活性和α-葡萄糖苷酶抑制活性,为这两类化合物提供了新的活性研究方向。

研究表明木麻黄凋落物的水提取物对其幼苗的生长具有一定的抑制作用^[22],其凋落物化学成分通过淋溶进入土壤并长期积累,成为了近年来木麻黄林的逐渐退化的原因之一。对木麻黄林凋落物的合理开发利用,将在变废为宝的同时,有效缓解木麻黄林退化。本次研究结果表明,木麻黄凋落物的化学成分具有多种生物活性,为其进一步开发利用提供了科学依据。

参考文献

- 1 Chen XY(陈小勇), Lin P(林鹏). The decline phenomenon and reasons of Chinese *Casuarina* [J]. *Fujian Environment* (福建环境), 1997, 1(45): 37-39.
- 2 Schmid JL, Addison DS, Donnelly MA, et al. The effect of Australian pine (*Casuarina equisetifolia*) removal on loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) incubation temperatures on Keewaydin Island, Florida [J]. *J Coastal Res*, 2008, 55: 214-220.
- 3 Midgley SJ, Turnbull JW, Johnston RD, et al. *Casuarina* ecology management and utilization. International Workshop *Casuarina* Ecology Management and Utilization [C]. Canberra (Australia), 1981, 17-21.
- 4 Zhong CL(仲崇祿), Bai JY(白嘉雨), Zhang Y(张勇). Introduction and conservation of *Casuarina* trees in China [J]. *Forest Research* (林业科学研究), 2003, 17(2): 3-5.
- 5 Rice EL. Allelopathy [M]. Orlando: Academic Press, 1984: 309-315.
- 6 Tan FL(谭芳林). Study on litter decomposition and nutrient release in *Casuarina equisetifolia* protective plantation ecosystem [J]. *Sci Silvae Sin* (林业科学), 2003, 39(1): 21-26.
- 7 Zhang QH(张清海), Ye GF(叶功富), Lin YM(林益明). Dynamic caloric value of *Casuarina equisetifolia* litter fall during decomposition on coast sandy land [J]. *Forest Res* (林业科学研究), 2005, 18: 455-459.