苦楝皮中一个新的柠檬苦素类化合物及其抗肝癌活性

黄园园[1,2,3], 高尔建[1,2,3], 袁经权[4], 吴燕春[4], 饶小平[1,2,3*], 王 微[1,2,3*]

(1. 华侨大学先进碳转化技术研究院, 福建 厦门 361021; 2. 华侨大学, 生物质低碳转化福建省高校重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021; 4. 广西中医药大学中医药壮瑶医药研究院, 广西 南宁 530200)

摘要: 采用硅胶、SephadexLH-20、MCI、制备型高效液相等色谱技术对苦楝 (*Melia azedarach* L.) 树皮95%、85%乙醇提取物进行分离纯化, 从中分离得到了3个柠檬苦素类化合物, 根据其理化性质及其波谱数据分别鉴定为29-*O*-ethyl neoazedarachin D (**1**)、29-*O*-meliarachin G (**2**)、toosendanin (**3**), 其中化合物**1**为新化合物, 化合物**2**为新的天然产物, 首次从植物中分离得到。采用MTT法评价化合物**1**～**3**体外抗肝癌活性, 结果表明化合物**1**～**3**对HepG-2、Hep3B细胞都具有不同程度的抑制作用, 其中化合物**3**对HepG-2细胞的抑制作用与阳性药顺铂相当。此外, 化合物**1**～**3**抗HepG-2细胞的IC_{50}值分别为38.67 ± 1.336、28.21 ± 1.028、8.21 ± 1.231 μg·mL^{-1}, 抗Hep3B细胞的IC_{50}值分别为47.36 ± 1.008、35.69 ± 1.217、15.10 ± 1.017 μg·mL^{-1}。

关键词: 苦楝; 柠檬苦素类; 四环三萜; 结构鉴定; 肝癌

中图分类号: R284 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)02-0547-06

A new limonoid compound from the bark of *Melia azedarach* and its anti-hepatocarcinoma activity

HUANG Yuan-yuan[1,2,3], GAO Er-jian[1,2,3], YUAN Jing-quan[4], WU Yan-chun[4], RAO Xiao-ping[1,2,3*], WANG Wei[1,2,3*]

(*1. Institute of Advanced Carbon Conversion Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Biomass Low-Carbon Conversion, Huaqiao University, Xiamen 361021, China; 3. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China; 4. Institute of Traditional Chinese and Zhuang-Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China*)

Abstract: Three limonoids were isolated and purified from the 95%, 85% ethanol extracts of *Melia azedarach* using silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, MCI column chromatography, and preparative RP-HPLC. Their structures were determined based on physicochemical properties and spectral data, and they were identified as 29-*O*-ethyl neoazedarachin D (**1**), 29-*O*-meliarachin G (**2**), toosendanin (**3**). Compound **1** is a new limonoid, while compound **2** is a new natural product isolated from plants for the first time. The *in vitro* anti-hepatocarcinoma activities of compounds **1**−**3** were evaluated by MTT assay. The results showed that compounds **1**−**3** exhibited different degrees of inhibitory effects on both HepG-2 and Hep3B cell lines, and the inhibitory effect of compound **3** on HepG-2 cells was comparable to that of the positive drug cisplatin. In addition, compounds **1**−**3** exhibited IC_{50} values of 38.67 ± 1.336, 28.21 ± 1.028 and 8.21 ± 1.231 μg·mL^{-1} against HepG-2 cells, and 47.36 ± 1.008, 35.69 ± 1.217 and 15.10 ± 1.017 μg·mL^{-1} against Hep3B cells, respectively.

Key words: *Melia azedarach*; limonoid; tetracyclic triterpenoid; structural identification; hepatocarcinoma

收稿日期: 2025-10-21; 修回日期: 2025-11-21.

基金项目: “十四五”国家重点研发计划课题－林源萜类成分功能评价 (2022YFD2200604-04).

*通讯作者 E-mail: raoxp@hqu.edu.cn; wangwei1978@hqu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1252

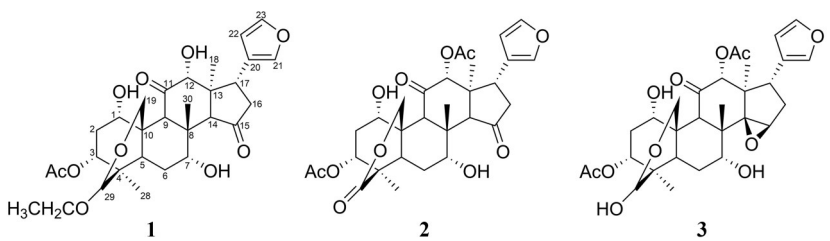
苦楝 (*Melia azedarach* L.) 为楝科 (Meliaceae) 楝属 (*Melia*) 植物, 在中国具有非常悠久的种植历史。据《周礼·考工记》记载, 在春秋时期, 人们就已掌握用楝叶灰漂白丝织品。苦楝广泛分布于中国黄河以南各省区, 如四川省、两广、湖南、河北等地, 由于其树冠如伞盖绿荫生凉, 且耐烟尘, 也是江南地区绿化常用优良树种[1,2]; 此外, 苦楝具有悠久的药用历史, 古籍记载其树皮、叶、花、果实均可入药: 树皮性寒有毒, 可杀虫疗癣; 叶清热燥湿、杀虫止痒; 果实行气止痛、驱虫; 花清热祛湿、止痒等[3,4]。现代研究表明, 该植物含萜类 (倍半萜类、齐墩果烷型三萜、达玛烷型三萜、柠檬苦素类等)、甾体类、木脂素类、黄酮类等化学成分, 其中, 柠檬苦素类为主要活性成分; 药理研究表明, 苦楝具有杀虫、抗肿瘤、抗病毒等生物活性。目前, 国内外学者从苦楝中分离得到160多个柠檬苦素类化合物, 具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等生物活性[5]。因此, 本研究初步开展了苦楝树皮中柠檬苦素类化学成分研究, 从中分离得到了3个柠檬苦素类化学成分 (图1), 分别鉴定为29-*O*-ethyl neoazedarachin D (**1**), 29-*O*-meliarachin G (**2**), toosendanin (**3**), 其中化合物**1**为新化合物, 化合物**2**为新的天然产物, 首次从植物中分离得到。同时, 采用MTT法评价化合物**1**～**3**体外抗肝癌活性, 实验结果表明化合物**1**～**3**对人肝癌细胞 (HepG-2、Hep3B) 都具有不同程度的抑制作用, 其中化合物**3**具有显著的抗肝癌活性, 其对HepG-2细胞的抑制作用与阳性药顺铂相当。化合物**1**～**3**抗HepG-2细胞的IC_{50}值分别为38.67 ± 1.336、28.21 ± 1.028、8.21 ± 1.231 μg·mL^{-1}, 抗Hep3B细胞的IC_{50}值分别为47.36 ± 1.008、35.69 ± 1.217、15.10 ± 1.017 μg·mL^{-1}。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物1 白色粉末, TLC薄层色谱喷10%的香草醛−硫酸乙醇溶液, 加热显色呈紫色, 提示其可能为萜类化合物。红外光谱IR显示化合物结构中存在羟基官能团 (3 443 cm^{-1})、甲基官能团 (2 963、2 930 cm^{-1}), 在1 730 cm^{-1}处有碳氧双键伸缩振动, 再结合1 257 cm^{-1}提示有羰基及酯基的存在, 在1 644 cm^{-1}处有碳碳双键的伸缩振动。HR-ESI-MS显示准分子离子峰 *m*/*z* 559.255 3 [M−H]$^-$ (计算值: 559.254 9), 确定分子式为$C_{30}H_{40}O_{10}$, 不饱和度为11。在^{1}H NMR谱中, 高场区显示5个甲基氢质子单峰信号δ_H 0.83 (3H, s), 0.91 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.17 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 2.04 (3H, s), 低场区显示14个连电负性基团碳上的氢质子信号δ_H 2.52 (1H, dd, *J* = 10.9, 2.0 Hz), 2.70 (1H, m), 3.40 (1H, br s), 3.44 (1H, d, *J* = 10.6 Hz), 3.45 (1H, m), 3.46 (1H, dd, *J* = 9.3, 7.1 Hz), 3.67 (1H, s), 3.82 (1H, dd, *J* = 9.7, 7.1 Hz), 4.06 (1H, br s), 4.14 (1H, d, *J* = 10.6 Hz), 4.23 (1H, s), 4.54 (1H, d, *J* = 4.3 Hz), 4.57 (1H, s), 5.11 (1H, d, *J* = 3.9 Hz), 以及3个呋喃环上氢质子单峰信号δ_H 6.36 (1H, s), 7.35 (1H, s), 7.43 (1H, s)。结合^{13}C NMR和DEPT135°谱表明该化合物共有30个碳信号, 其中包括5个伯碳、5个仲碳、12个叔碳、8个季碳。在高场区显示5个甲基碳信号δ_C 15.5、19.8、21.3、22.0、22.2, 低场区显示7个连氧碳信号δ_C 64.9、66.1、70.6、71.3、75.3、78.8、103.5, 1组呋喃环上碳信号δ_C 111.9、126.4、141.5、144.2, 1个酯基碳信号δ_C 172.8以及2个羰基碳信号δ_C 214.0、220.6。通过HSQC图谱对化合物**1**碳氢直接相关进行了准确的归属, 发现其核磁数据与文献[6,7]报道的已知化合物neoazedarachin D的核磁数据相似, 不同之处在于化合物**1**多了一个亚甲基。通过HMBC谱中H-19 [4.14 (1H, d, *J* = 10.6 Hz)]、H-28 [δ_H 0.83 (3H, s)] 与C-29 (δ_C 103.5) 相关, H-29 [4.57 (1H, s)] 和δ_H 1.17与δ_C 66.1相关, 说明化合物**1**的29位为乙氧基取代。

此外, 在HMBC谱中 (图2), H-9 [δ_H 3.67 (1H, s)] 和H-19α [δ_H 4.14 (1H, m)] 与C-1 (δ_C 71.3) 相关, 提示1位有羟基取代; H-28 [δ_H 0.83 (3H, s)] 与C-3 (δ_C 75.3)、C-4 (δ_C 40.8)、C-5 (δ_C 29.2) 相关以及δ_H 2.04 (3H, s) 与δ_C 172.8相关, 提示3位有乙酰氧基取代; H-30 [δ_H 1.13 (3H, s)] 与C-7 (δ_C 70.6)、C-8 (δ_C 42.7)、C-9 (δ_C 49.0)、C-14 (δ_C 59.4) 相关, 提示7位有羟基取代; H-18 [δ_H 0.91 (3H, s)] 与C-12 (δ_C 78.8)、C-13 (δ_C 47.5)、C-14 (δ_C 59.4)、C-17 (δ_C 39.7) 相关, 提示12位有羟基取代; H-12 [δ_H



1 **2** **3**

Figure 1 Chemical structures of compounds **1**–**3**

4.23 (1H, s)] 和 H-9 [δ_H 3.67 (1H, s)] 与 δ_C 214.0 相关以及 H-14 [δ_H 3.39 (1H, s)] 和 H-16α [δ_H 2.70 (1H, m)] 与 δ_C 220.6 相关, 提示 12 位和 15 位有羰基取代; 在 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中 (图 2), H-2 分别与 H-1、H-3 相关, H-6 分别与 H-5、H-7 相关, H-16 与 H-17 相关, H-22 与 H-23 相关以及 29-O$\underline{CH_2}CH_3$ 与 29-OCH$_2\underline{CH_3}$ 相关。同时通过 NOESY 谱 (图 3) 确定取代基的相对构型, H-19 [δ_H 4.14 (1H, m)] 与 H$_\beta$-30、H-1 相关, H-2 [δ_H 2.69 (1H, m)] 与 H-1、H-3 相关, 以及 H-7 和 H-12 与 H$_\beta$-30 相关, 说明 C-3 位上的乙酰基以及 C-1、C-7、C-12 位上取代的羟基都为 α 构型。此外, H-3 的化学位移为 5.11 (1H, d, J = 3.9 Hz), 表明 C-29 位的取代基为 *endo* 构型[7,8]。此外, 化合物 **1** 与已知化合物 neoazedarachin D 有相似的碳化学位移、质子耦合常数和 NOESY 相关, 以及参考这类 trichilin-type 柠檬苦素在自然界中的生物合成途径[9,10], 推测化合物的绝对构型为 1*S*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 7*R*, 8*S*, 9*S*, 10*S*, 12*R*, 13*S*, 14*S*, 17*R*。

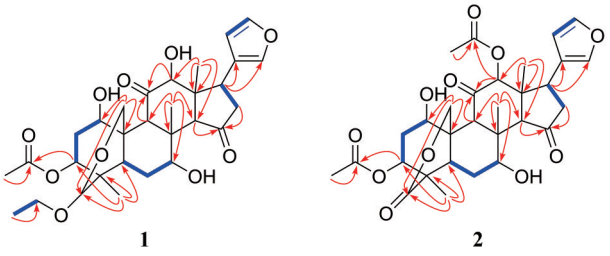


Figure 2 Key HMBC (⌒) and ^{1}H-^{1}H COSY (▬) correlations of compounds **1** and **2**

综上所述, 化合物 **1** 的结构鉴定为 (1*S*,3*R*,4*R*,5*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*,12*R*,13*S*,14*S*,17*R*)-29(*endo*)-19,29-epoxy-29-*O*-ethyl-1α,7α,12α-trihydroxytetra-3α-*O*-acetyl-meliacane-11,15-dione, 经文献检索未见报道, 为一个新化合物, 命名为 29-*O*-ethyl neoazedarachin D。波谱数据归属见表 1。

化合物 2 白色粉末, TLC 薄层色谱喷 10% 的香草醛–硫酸乙醇溶液, 加热显色呈紫色, 提示其可能为萜类化合物。红外光谱 IR 显示化合物结构中存在羟基官能团 (3 456 cm^{-1})、甲基官能团 (2 985、2 943 cm^{-1}), 在 1 730 cm^{-1} 处有碳氧双键伸缩振动, 再结合 1 241 cm^{-1} 提示有羰基及酯基的存在, 在 1 639 cm^{-1} 处有碳碳双键的伸缩振动。HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 m/z 573.233 1 [M+H]$^+$ (计算值: 573.232 0), 确定分子式为 $C_{30}H_{36}O_{11}$, 不饱和度为 13。在 ^{1}H NMR 谱中, 高场区显示 5 个甲基氢质子单峰信号 δ_H 1.03 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.20 (3H, s), 2.09 (3H, s), 2.10 (3H, s), 低场区显示 11 个连电负性基团碳上的氢质子信号 δ_H 2.60 (1H, d, J = 8.9 Hz), 2.67 (1H, d, J = 10.3 Hz), 3.37 (1H, t, J = 9.5 Hz), 3.44 (1H, s), 3.78 (1H, m), 3.93 (1H, br s), 4.08 (1H, s), 4.47 (1H, d, J = 14.1 Hz), 4.84 (1H, m), 4.84 (1H, s), 5.07 (1H, d, J = 14.0 Hz), 以及 3 个呋喃环上氢质子单峰信号 δ_H 6.42 (1H, s), 7.45 (1H, s), 7.48 (1H, s)。结合 ^{13}C NMR 和 DEPT135° 谱表明, 该化合物共有 30 个碳信号, 其中包括 5 个伯碳、4 个仲碳、11 个叔碳、10 个季碳。在高场区显示 5 个甲基碳信号 δ_C 19.9、20.0、20.7、21.1、21.6, 低场区显示 5 个连氧碳信号 δ_C 69.7、71.3、74.2、75.3、80.1, 1 组呋喃环上碳信号 δ_C 111.8、123.8、142.2、144.6, 3 个酯基碳信号 δ_C 172.0、172.2、175.9 以及 2 个羰基碳信号 δ_C 209.9、218.9。通过 HSQC 图谱对化合物 **2** 碳氢直接相关进行了准确的归属, 发现其核磁数据与文献[7,11]报道的已知化合物 meliarachin G 的核磁数据相似, 不同之处在于化合物 **2** 少了一个甲基, 通过 HMBC 谱中 H-19 [δ_H 4.47 (1H, d, J = 14.1 Hz), 5.07 (1H, d, J = 14.0 Hz)]、H-28 [δ_H 1.13 (3H, s)] 与 C-29 (δ_C 175.9) 相关, 说明化合物 **2** 的 29 位为酯基取代。

此外, 在 HMBC 谱中 (图 2), H-9 [δ_H 4.08 (1H, s)] 和 H-19 [δ_H 4.47 (1H, d, J = 14.1 Hz), 5.07 (1H, d, J = 14.0 Hz)] 与 C-1 (δ_C 71.3) 相关, 提示 1 位有羟基取代; H-30 [δ_H 1.20 (3H, s)] 与 C-7 (δ_C 69.7)、C-8 (δ_C 47.5)、C-9 (δ_C 48.3)、C-14 (δ_C 59.9) 相关, 提示 7 位有羟基取代; H-18 [δ_H 1.03 (3H, s)] 与 C-12 (δ_C 80.1)、C-13 (δ_C 49.7)、C-14 (δ_C 59.9)、C-17 (δ_C 38.8) 相关, H-12 [δ_H 4.84 (1H, s)] 和 δ_H 2.10 (3H, s) 与 δ_C 172.0 相关以及 H-28 [δ_H 1.13 (3H, s)] 与 C-3 (δ_C 75.3)、C-4 (δ_C 47.3)、C-5 (δ_C 28.9), H-3 [δ_H 4.84 (1H, m)] 和 δ_H 2.09 (3H, s) 与 δ_C 172.2 相关, 提示 3 位和 12 位有乙酰氧基取代; H-9 [δ_H 4.08

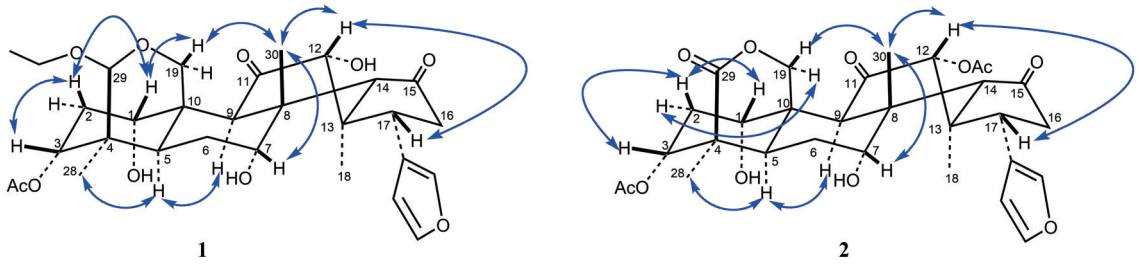


Figure 3 Key NOESY (⌒) correlations of compounds **1** and **2**

Table 1 ^{1}H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) data in CD_3OD for compounds **1** and **2**

Position	**1**		**2**	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	4.54 (1H, d, *J* = 4.3 Hz)	71.3	3.78 (1H, m)	71.3
2*α*	1.80 (1H, m)	37.0	1.98 (1H, m)	32.9
2*β*	2.69 (1H, m)		2.06 (1H, m)	
3	5.11 (1H, d, *J* = 3.9 Hz)	75.3	4.84 (1H, m)	75.3
4	–	40.8	–	47.3
5	2.76 (1H, m)	29.2	2.93 (1H, dd, *J* = 13.7, 3.6 Hz)	28.9
6*α*	1.70 (1H, m)	24.2	1.68 (1H, m)	27.3
6*β*	2.09 (1H, m)		1.84 (1H, m)	
7	4.06 (1H, br s)	70.6	3.93 (1H, br s)	69.7
8	–	42.7	–	47.5
9	3.67 (1H, s)	49.0	4.08 (1H, s)	48.3
10	–	43.7	–	40.8
11	–	214.0	–	209.9
12	4.23 (1H, s)	78.8	4.84 (1H, s)	80.1
13	–	47.5	–	49.7
14	3.40 (1H, br s)	59.4	3.44 (1H, s)	59.9
15	–	220.6	–	218.9
16*α*	2.52 (1H, dd, *J* = 10.9, 2.0 Hz)	46.3	2.60 (1H, d, *J* = 8.9 Hz)	44.6
16*β*	2.70 (1H, m)		2.67 (1H, d, *J* = 10.3 Hz)	
17	3.45 (1H, m)	39.7	3.37 (1H, t, *J* = 9.5 Hz)	38.8
18	0.91 (3H, s)	22.2	1.03 (3H, s)	21.6
19*α*	3.43 (1H, d, *J* = 10.6 Hz)	64.9	4.47 (1H, d, *J* = 14.1 Hz)	74.2
19*β*	4.14 (1H, d, *J* = 10.6 Hz)		5.07 (1H, d, *J* = 14.0 Hz)	
20	–	126.4	–	123.8
21	7.35 (1H, s)	141.5	7.48 (1H, s)	144.6
22	6.36 (1H, s)	111.9	6.42 (1H, s)	111.8
23	7.43 (1H, s)	144.2	7.45 (1H, s)	142.2
28	0.83 (3H, s)	19.8	1.13 (3H, s)	20.0
29	4.57 (1H, s)	103.5	–	175.9
30	1.13 (3H, s)	22.0	1.20 (3H, s)	20.0
3-OCO$\underline{CH_3}$	2.04 (3H, s)	21.3	2.09 (3H, s)	20.7
3-O$\underline{C}$OCH$_3$	–	172.8	–	172.0
12-OCO$\underline{CH_3}$	–	–	2.10 (3H, s)	21.0
12-O$\underline{C}$OCH$_3$	–	–	–	172.2
29-O$\underline{CH_{2(\alpha)}}CH_3$	3.46 (1H, dd, *J* = 9.3, 7.1 Hz)	66.1	–	–
29-O$\underline{CH_{2(\beta)}}CH_3$	3.82 (1H, dd, *J* = 9.7, 7.1 Hz)		–	–
29-OCH$_2\underline{CH_3}$	1.17 (3H, t, *J* = 7.1 Hz)	15.5	–	–

(1H, s)] 和 H-12 [δ_H 4.84 (1H, s)] 与 δ_C 209.9 相关, H-14 [δ_H 3.44 (1H, s)] 和 H-16 [δ_H 2.60 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 2.67 (1H, d, *J* = 10.3 Hz)] 与 δ_C 218.9 相关, 提示 C-11 和 C-15 为羰基取代。在 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中 (图 2), H-2 分别与 H-1、H-3 相关, H-6 分别与 H-5、H-7 相关, H-16 与 H-17 相关以及 H-22 与 H-23 相关。同时通过 NOESY 谱 (图 3) 确定取代基的相对构型, H-19 [δ_H 5.07 (1H, d, *J* = 14.0 Hz)] 与 H$_\beta$-30 相关, H-19 [δ_H 4.47 (1H, d, *J* = 14.1 Hz)] 与 H-2 [δ_H 1.98 (1H, m)] 相关, H-2 [δ_H 2.06 (1H, m)] 与 H-1、H-3 相关以及 H-7 和 H-12 与 H$_\beta$-30 相关, 说明 C-3、C-12 位上的乙酰基以及 C-1、C-7 位上取代的羟基都为 *α* 构型。经文献[12]检索发现, 化合物 **2** 在 2023 年被报道是由川楝素结构修饰后得到的产物, 进一步比对核磁数据, 判断化合物的绝对构型为 1*S*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 7*R*, 8*S*, 9*S*, 10*S*, 12*R*, 13*S*, 14*S*, 17*R*。

综上所述, 化合物 **2** 的结构鉴定为 (1*S*,3*R*,4*R*,5*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*,12*R*,13*S*,14*S*,17*R*)-19,29-epoxy-29-ester-1*α*, 7*α* -dihydroxy-3*α*, 12*α* -*O*-diacetyl-meliacane-11, 15-dione, 为一个新的天然产物。命名为 29-*O*-meliarachin G。本文对该化合物的波谱数据进行了较为详细的归属, 见表 1。

2 化合物的抗肝癌活性

采用 MTT 法对化合物 **1**～**3** 进行人肝癌细胞 (HepG-2、Hep3B) 的细胞毒活性实验, 并以顺铂为阳性对照进行评价。结果表明化合物 **1**～**3** 对人肝癌细胞都具有不同程度的抑制作用, 其中化合物 **3** 对 HepG-2 细胞的抑制作用与阳性药顺铂相当 (表 2)。

3 讨论

苦楝具有悠久的药用历史, 其柠檬苦素类成分是一种含 17*β*-呋喃环的四环三萜结构, 它们因其骨架的高度氧化和重排, 具有结构的多样性和广泛的生物活性, 也是苦楝中的特征化学成分和主要药效物质基

Table 2 Cytotoxicities of compounds **1**−**3** (IC_{50}, μg·mL^{-1}). n = 3, $\bar{x} \pm s$

Compound	HepG-2	Hep3B
1	38.67 ± 1.336	47.36 ± 1.008
2	28.21 ± 1.028	35.69 ± 1.217
3	8.21 ± 1.231	15.10 ± 1.017
Cisplatin	8.97 ± 1.062	5.36 ± 1.158

础[13]。本研究从苦楝树皮中分离得到3个柠檬苦素类成分, 其中化合物**1**为新化合物, 化合物**2**为新的天然产物, 并探讨了其抗肝癌活性。药理结果表明化合物**1**～**3**对肝癌细胞 (HepG-2、Hep3B) 都具有不同的抑制作用。从表2中可以看出3个化合物的抗肝癌活性强弱顺序为: 化合物**3** > 化合物**2** > 化合物**1**, 造成其活性差异的原因推测可能为化合物C-12上的-OAc取代使细胞毒活性优于-OH取代; C-29上引入-OH时活性优于=O, 而=O取代则优于-OCH_2CH_3取代; C-14/C-15上的环氧环也有利于活性的增加。已有研究也验证了这一推测[12]。此外, 该研究还表明当化合物C-1和C-7上为-OH取代时是提高活性的关键, 这也侧面说明了化合物**1**～**3**都具有抗肝癌活性的原因。而当C-15为=O取代时活性降低。基于以上分析及药理结果表明, 化合物**3**具有显著的抗肝癌活性, 且对HepG-2细胞的抑制作用与阳性药顺铂相当。

实验部分

Bruker AV III 600型核磁共振波谱仪 (德国Bruker公司); Agilent 1260 InfinityII制备型高效液相色谱仪 (美国Agilent公司); SCIEX/AB Sciex X500R高分辨液质联用仪 [新加坡AB SCIEX (Distribution) Pte. Ltd.]; EYELA型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); Spectrum TWO傅里叶红外光谱仪 (美国PerkinElmer公司); 酶标仪、二氧化碳培养箱、Sorvall ST 16低速离心机 (美国Thermo Fisher Scientific公司); OLYMPUS CKX41倒置显微镜 (日本Olympus公司); ESCO生物安全柜 (新加坡艺思高科技有限公司); HH-6数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); 细胞株 (HepG-2、Hep3B, 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心); COSMOSIL Packed Column 5C_{18}-MS-II色谱柱 (10 mm × 250 mm, 5 μm, 日本COSMOSIL公司); MCI GEL (CHP20/P120) (日本Mitsubishi Chemical Corporation); Sephadex LH-20 (美国Cytiva公司); 柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶 (青岛海洋化工); 乙腈、甲醇 (色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 其余试剂均为国产分析纯; FBS、DMEM培养基、Pen Strep (青霉素−链霉素双抗溶液, 美国Gibco公司); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT, 索莱宝公司)。

苦楝于2024年5月购于广西桂林, 由桂林三金股份有限公司钟小清副主任药师鉴定为苦楝*Melia azedarach* L.的树皮。植物样本 (202405MA) 存放于广西中医药大学中医药壮瑶医药研究院。

1 提取与分离

苦楝树皮 (45 kg) 干燥药材, 粉碎成粗块, 用95%乙醇加热回流提取2次, 每次2 h, 后再用85%乙醇提取1次, 每次2 h, 合并提取液并减压浓缩得到总浸膏 (2.5 kg)。总浸膏用水分散后, 依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯进行萃取, 减压回收溶剂, 得到三个不同极性段部位: 石油醚部位 (450 g)、二氯甲烷部位 (75 g)、乙酸乙酯部位 (290 g)。

取二氯甲烷部位经硅胶 (100～200目) 柱色谱分离, 二氯甲烷−甲醇 (100∶0、100∶1、80∶1、50∶1、30∶1、20∶1、10∶1、5∶1、2∶1、0∶1) 梯度洗脱, 得10个流分Fs. A～J; Fs. D流分通过硅胶 (200～300目) 柱色谱分离, 石油醚−乙酸乙酯 (20∶1、10∶1、5∶1、2∶1、1∶1、0∶1) 梯度洗脱, 得6个流分Fs. D.1～6; Fs. D.5流分经MCI柱色谱分离, 30%、50%、70%、80%、90%、100%乙醇水梯度洗脱, 得到6个流分Fs. D.5.1～5.6; 流分Fs. D.5.2经Sephadex LH-20柱色谱分离, 以甲醇作为洗脱剂, 所得流分通过TLC合并相同极性段, 得到7个流分Fs. D.5.2.1～5.2.7; Fs. D.5.2.2流分经制备型HPLC (COSMOSIL Packed Column 5C_{18}-MS-Ⅱ, 10 mm × 250 mm, 5 μm; 流动相为甲醇−水, 30∶70, 流速3 mL·min^{-1}) 分离纯化, 分离得到化合物**1** (t_R = 52.51 min, 4.5 mg)、**2** (t_R = 46.59 min, 6.5 mg)、**3** (t_R = 43.47 min, 21.0 mg)。

2 结构鉴定

化合物**1** 白色粉末; IR (KBr) ν_{max}: 3 443, 2 963, 2 930, 1 730, 1 644, 1 382, 1 257, 1 179, 1 068, 1 025 cm^{-1}; ^{1}H NMR (CD_3OD, 500 MHz) 和^{13}C NMR (CD_3OD, 125 MHz) 数据见表1; HR-ESI-MS *m*/*z* 559.255 3 [M−H]$^-$ (计算值559.254 9, $C_{30}H_{40}O_{10}$)。

化合物**2** 白色粉末; IR (KBr) ν_{max}: 3 456, 2 985, 2 943, 1 730, 1 639, 1 385, 1 241, 1 175, 1 058, 1 027 cm^{-1}; ^{1}H NMR (CD_3OD, 500 MHz) 和^{13}C NMR (CD_3OD, 125 MHz) 数据见表1; HR-ESI-MS *m*/*z* 573.233 1 [M+H]$^+$ (计算值573.232 0, $C_{30}H_{36}O_{11}$)。

化合物**3** 白色粉末; ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.40 (1H, s, H-21), 7.19 (1H, s, H-23), 6.16 (1H, s, H-22), 5.33 (1H, s, H-12), 5.18 (1H, t, J = 9.4 Hz, H-3), 4.83 (1H, s, H-29), 4.70 (1H, s, H-9), 4.31 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-19β), 4.26 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-19α), 4.26 (1H, m, H-1), 3.81 (1H, br s, H-15), 3.55 (1H, m, H-7),

2.88 (1H, m, H-17), 2.78 (1H, m, H-5), 2.06 (3H, s, 3-OAc), 1.95 (3H, s, 12-OAc), 1.38 (3H, s, H-18), 1.12 (3H, s, H-30), 0.84 (3H, s, H-28); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 70.9 (C-1), 37.2 (C-2), 74.8 (C-3), 41.2 (C-4), 29.6 (C-5), 26.2 (C-6), 70.8 (C-7), 42.9 (C-8), 50.1 (C-9), 43.9 (C-10), 209.1 (C-11), 79.7 (C-12), 46.9 (C-13), 73.6 (C-14), 59.9 (C-15), 34.8 (C-16), 39.8 (C-17), 20.9 (C-18), 65.4 (C-19), 124.2 (C-20), 143.7 (C-21), 113.0 (C-22), 142.0 (C-23), 20.0 (C-28), 97.3 (C-29), 15.8 (C-30), 172.8 (3-OAc), 23.1 (3-OAc), 172.2 (12-OAc), 21.4 (12-OAc)。以上数据与文献[14]报道的基本一致, 故鉴定化合物为川楝素 (toosendanin)。

3 抗肝癌活性筛选

采用MTT法进行人肝癌细胞增殖抑制活性测定, 分别将HepG-2、Hep3B细胞培养于含10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的DMEM培养基中。将生长状态良好且处于对数生长期的细胞以每毫升1×10^5的密度接种于96孔板 (每孔100 μL) 中, 于37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育24 h后加入待测样品 (终质量浓度为200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 μg·mL^{-1}), 继续培养48 h后, 每孔加入10 μL MTT (浓度为5 mg·mL^{-1}) 溶液, 继续在37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育4 h后小心吸弃去上清液, 每孔加入150 μL DMSO, 摇床振荡10 min, 用酶标仪在570 nm波长处检测吸光度 (OD) 值, 使用GraphPad Prism 8软件计算其半数存活浓度 (IC_{50})[15,16]。

作者贡献: 黄园园负责成分分离、结构鉴定和论文撰写; 高尔建协助中药提取; 袁经权和吴燕春负责实验指导和稿件修改; 饶小平和王微参与实验设计和课题管理。

利益冲突: 所有作者声明不存在任何利益冲突。

References

[1] Editorial Committee of Flora of China. Flora of China (中国植物志) [M]. 45th Vol. Beijing: Science Press, 1999, 45: 100.

[2] Chen YM. Landscape dendrology (园林树木学) [M]. 2nd Ed. Beijing: China Forestry Publishing House, 2013: 388.

[3] Li SZ. Compendium of Materia Medica (本草纲目) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2005: 35.

[4] Chinese Materia Medica (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999, 5: 52-56.

[5] Tran TH, Nguyen T, Vo Cong D, et al. Chemical composition and bioactivities of *Melia azedarach* (Meliaceae): a comprehensive review [J]. Curr Org Chem, 2022, 26: 1385-2728.

[6] Nakatani M. Limonoids from *Melia toosendan* (Meliaceae) and their antifeedant activity [J]. Heterocycles, 1999, 50: 595-610.

[7] Su ZS, Yang SP, Zhang S, et al. Meliarachins A − K: eleven limonoids from the twigs and leaves of *Melia azedarach* [J]. Helv Chim Acta, 2011, 94: 1515-1526.

[8] Huang RC, Okamura H, Iwagawa T, et al. The structures of azedarachins, limonoid antifeedants from Chinese *Melia azedarach* Linn [J]. Bull Chem Soc Jpn, 1994, 67: 2468-2472.

[9] Hodgson H, De La Peña R, Stephenson MJ, et al. Identification of key enzymes responsible for protolimonoid biosynthesis in plants: opening the door to azadirachtin production [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116: 17096-17104.

[10] Luo J, Sun YP, Li QR, et al. Research progress of meliaceous limonoids from 2011 to 2021 [J]. Nat Prod Rep, 2022, 39: 1325-1365.

[11] Akihisa T, Pan X, Nakamura Y, et al. Limonoids from the fruits of *Melia azedarach* and their cytotoxic activities [J]. Phytochemistry, 2013, 89: 59-70.

[12] Zhang HL, Chen YY, Liu QY, et al. Design, synthesis, and anti-triple negative breast cancer activity of novel toosendanin derivatives [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2023, 83: 129187.

[13] Tan QG, Luo XD. Meliaceous limonoids: chemistry and biological activities [J]. Chem Rev, 2011, 111: 7437-7522.

[14] Zhang Q, Zheng QH, Sang YS, et al. New limonoids isolated from the bark of *Melia toosendan* [J]. Chin J Nat Med, 2018, 16: 946-950.

[15] Huang YY, Jia XG, Deng FS, et al. Two new triterpenes from *Maytenus guangxiensis* with their antiproliferative activity [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 441-445.

[16] Zhao BX, Meng XY, Cao YG, et al. Study on the chemical constituents from the stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2025, 60: 2566-2572.