

• 化学成分 •

柯拉斯那沉香的倍半萜类化学成分研究

康科星^{1,2}, 戴好富², 王佩², 孔凡栋², 周丽曼², 董文化², 朱国鹏^{1*}, 梅文莉^{2*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南 海口 570228

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, 海南 海口 571101

摘要: 目的 研究柯拉斯那沉香 *Aquilaria crassna* 的倍半萜类化学成分。方法 采用多种柱色谱和高效液相色谱相结合的方法对化合物进行分离纯化; 通过波谱数据结合理化性质分析对所得单体化合物的结构进行鉴定; 分别采用 Ellman 比色法和 pNPG 法对化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性及 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行测试。结果 从柯拉斯那沉香的乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部分共分离得到 7 个倍半萜类化合物, 分别鉴定为 2-[(2 β ,8 β ,8 $\alpha\alpha$)-8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl]-3-hydroxy-2-methoxypropanoic acid (1)、2-[(2 β ,8 α ,8 $\alpha\alpha$)-8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl] propane-1,2-diol (2)、(1 β ,3 α ,4 $\alpha\beta$,5 β ,8 $\alpha\alpha$)-4a,5-dimethyl-3-(prop-1-en-2-yl) octahydronaphthalene-1,8a(1H)-diol (3)、eremophila-9-en-8 β ,11-diol (4)、eudesma-4-en-8,11-diol (5)、eudesma-4-en-11,15-diol (6)、methyl-15-oxo-eudesmane-4,11(13)-dien-12-oate (7)。活性测试结果表明化合物 1、4 和 5 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, 化合物 5 具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为柯拉斯那酸 A; 化合物 1~3 和 7 为首次从沉香中分离得到。

关键词: 沉香; 柯拉斯那沉香; 倍半萜; 抗乙酰胆碱酯酶活性; α -葡萄糖苷酶抑制活性; 柯拉斯那酸 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)22-4601-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.002

Sesquiterpenoids of agarwood from *Aquilaria crassna*

KANG Ke-xing^{1,2}, DAI Hao-fu², WANG Pei², KONG Fan-dong², ZHOU Li-man², DONG Wen-hua²,
ZHU Guo-peng¹, MEI Wen-li²

1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, 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: Objective To study the chemical constituents of sesquiterpenoids of agarwood from *Aquilaria crassna*. **Methods** Seven sesquiterpenoids were isolated and purified by various column chromatographic techniques and HPLC method. The structures of the compounds were identified through the combined analysis of physicochemical properties and spectral data. The acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibitory activity of compounds were evaluated by Ellman colorimetric method and pNPG method, respectively. **Results** Seven compounds were isolated from the ethyl acetate extract obtained from 95% aq. ethanol extract of agarwood from *Aquilaria crassna* and were identified as 2-[(2 β ,8 β ,8 $\alpha\alpha$)-8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl]-3-hydroxy-2-methoxypropanoic acid (1), 2-[(2 β ,8 α ,8 $\alpha\alpha$)-8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl] propane-1,2-diol (2), (1 β ,3 α ,4 $\alpha\beta$,5 β ,8 $\alpha\alpha$)-4a,5-dimethyl-3-(prop-1-en-2-yl) octahydronaphthalene-1,8a(1H)-diol (3), eremophila-9-en-8 β ,11-diol (4), eudesma-4-en-8,11-diol (5), eudesma-4-en-11,15-diol (6), and methyl-15-oxo-eudesmane-4,11(13)-dien-12-oate (7). Moreover, compounds 1, 4 and 5 showed acetylcholinesterase inhibitory activity, and compound 5 exhibited α -glucosidase inhibitory activity.

收稿日期: 2017-05-31

基金项目: 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2016004-03); 海南省科协青年科技英才学术创新计划项目 (HAST201628); 海南省重点研发项目 (ZDYF2016210); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金 (17CXTD-15, 1630052016008)

作者简介: 康科星 (1990—), 女, 河南巩义人, 硕士在读, 主要从事天然产物化学研究。Tel: 15799033421 E-mail: 1244506913@qq.com

*通信作者 梅文莉, 女, 研究员, 硕士生导师。Tel: (0898)66987529 E-mail: meiwenli@itbb.org.cn

朱国鹏, 男, 教授, 研究生导师。Tel: 13976495575 E-mail: guopengzhu@163.com

Conclusion Compound **1** is a new compound named as crasscid A, and compounds **1—3** and **7** are obtained from agarwood for the first time.

Key words: agarwood; *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte; sesquiterpene; anti-acetylcholinesterase activity; α -glucosidase inhibitory activity; crasscid A

沉香为瑞香科 (Thymelaeaceae) 沉香属 *Aquilaria* Lam. 植物含有树脂的芯材, 全世界报道的沉香属植物共有 23 种, 主要分布于南亚次大陆的东北部、印度尼西亚群岛及巴布亚新几内亚群岛等地。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^[1], 主要应用于胃病、胸闷和气喘等疾病, 有“药中黄金”之称。现代药理研究表明^[2-7], 沉香具有镇痛、镇静安神、调血脂、抗菌、抗炎、抗癌和抗氧化等作用, 对于胃溃疡具有良好的治疗效果^[8-9]。在沉香的化学成分研究方面, 迄今为止, 国内外学者主要对白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.、柯拉斯那沉香 *A. crassna* Pierre ex Lecomte 和马来沉香 *A. malaccensis* Lam. 3 种沉香属植物所产的沉香进行了研究^[10]。沉香的特征性化学成分为倍半萜和 2-(2-苯乙基) 色酮 2 类化合物, 其中倍半萜类化合物主要有 7 种骨架类型: 按烷型倍半萜、艾里莫酚烷型倍半萜、沉香呋喃型倍半萜、愈创木烷型倍半萜、沉香螺旋烷型倍半萜、杜松烷型倍半萜和前香草烷型倍半萜^[10]。这 7 种骨架类型的倍半萜在不同种沉香的分布有一定的差别, 有可能作为区别不同种沉香的依据。

柯拉斯那沉香主要分布于老挝、泰国、越南和柬埔寨等国家^[11]。迄今为止, 国内外文献对柯拉斯那沉香的化学成分报道较少, 本研究组前期主要针对其中的色酮类化合物进行了研究^[12-14], 本实验主要对柯拉斯那沉香中的倍半萜类化学成分进行研究, 为寻找其区别于其他种沉香的倍半萜类成分提供科学依据。本实验从柯拉斯那沉香醋酸乙酯部分分离得到 7 个倍半萜类化合物, 分别鉴定为 2-[(2 β ,8 β ,8 α)-8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl]-3-hydroxy-2-methoxypropanoic acid (**1**)、2-[(2 β ,8 α ,8 α)-8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl] propane-1,2-diol (**2**)、(1 β ,3 α ,4 α ,5 β ,8 α)-4a,5-dimethyl-3-(prop-1-en-2-yl) octahydronaphthalene-1,8a(1*H*)-diol (**3**)、eremophila-9-en-8 β ,11-diol (**4**)、eudesma-4-en-8,11-diol (**5**)、eudesma-4-en-11,15-diol (**6**)、methyl-15-oxo-eudesmane-4,11(13)-dien-12-oate (**7**)。其中化合物 **1** 为新化合

物, 命名为柯拉斯那酸 A, 化合物 **1—3** 和 **7** 为首次从沉香中分离得到。化合物结构见图 1。

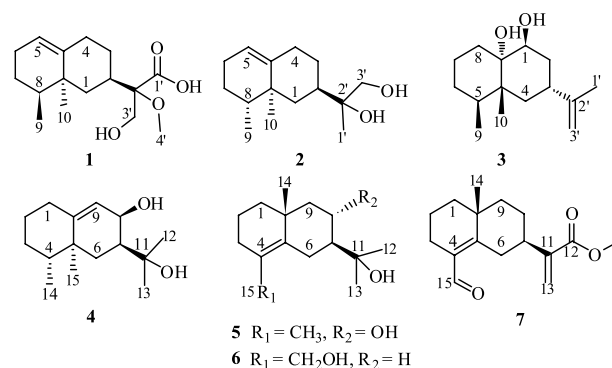


图 1 化合物 1~7 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—7

1 仪器与材料

薄层色谱硅胶板 G、柱色谱硅胶 (200~300 目) 和硅胶 H 购于青岛海洋化工厂; RP-18 购于 Fuji Silysia Chemical Ltd 公司; Sephadex LH-20 购于 Merck 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)、他克林均购于 Sigma 公司; α -葡萄糖苷酶购于 Solarbio 公司; 阿卡波糖购于北京百灵威科技有限公司; pNPG 购于 Sigma-Aldrich 公司; DX-2015 低温循环机购于北京长流科学仪器有限公司; N-1000 (2L) 式立旋转蒸发购于上海爱朗仪器有限公司; BP221S 万分之一电子秤购于北京赛多利斯天平有限公司; SHZ-D (III) 循环真空泵购于上海隆拓仪器设备有限公司; 超净工作台购于上海博讯实业有限公司医疗设备厂; Bruker AV-500 型超导核磁仪购于德国 Bruker 公司; ELX-800 酶标仪购于 Bio Tex 公司; 制备型高效液相色谱仪 (SUMMIT P680A) 购于 Dionex 公司, Agilent 1260 分析型高效液相色谱仪购于 Agilent 公司, COSMOSIL 色谱柱 (μ NAP, 250 mm $\times$ 10 mm, ID) 和 COSMOSIL 色谱柱 (C_{18} , 250 mm $\times$ 4.6 mm, ID) 购于日本 Nacalai Tesque 公司。

本实验沉香样品于 2014 年 9 月购买于老挝, 经中国热带农业科学院热带生物技术研究所王军博士鉴定其基原植物为柯拉斯那沉香 *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte。标本 (20140909) 存放在中国热

带农业科学院热带生物技术研究所以。

2 提取与分离

2.2 kg 干燥的柯拉斯那沉香经过粉碎后,置于 20 L 圆底烧瓶中,分别以 95%乙醇 10 L 加热回流提取 3 次(每次 3 h),减压浓缩至无醇味,得到乙醇提取物(296.0 g)。将乙醇提取物分散于水中形成悬浊液,依次用等体积的醋酸乙酯和正丁醇各萃取 3 次,减压浓缩,得到醋酸乙酯提取物(191.6 g)和正丁醇提取物(74.0 g)。

醋酸乙酯提取物(191.6 g)经减压硅胶柱色谱,以三氯甲烷-甲醇(1:0→0:1)为洗脱剂,梯度洗脱,得到 11 个流分(Fr. 1~11)。Fr. 2(1.4 g)经 Sephadex LH-20(三氯甲烷-甲醇 1:1)得到 5 个流分(Fr. 2.1~2.5)。Fr. 2.4(331.3 mg)依次经 Sephadex LH-20(MeOH)和硅胶柱色谱进行分离,得到 4 个流分(Fr. 2.4.1~2.4.4)。Fr. 2.4.3(52.7 mg)通过半制备型高效液相色谱仪,以 C₁₈ 色谱柱经乙腈-水(45:55)洗脱系统进行洗脱,得到化合物 2(5.0 mg)。Fr. 2.4.1(43.9 mg)通过半制备型高效液相色谱仪,经 C₁₈ 色谱柱,甲醇-水(68:32)系统洗脱,得到化合物 1(6.4 mg);经 π NAP 色谱柱,甲醇-水(70:30)系统洗脱,得到化合物 3(1.9 mg)。Fr. 2.3(344.6 mg)依次经过 Sephadex LH-20(甲醇)和硅胶柱色谱纯化,得到 2 个流分(Fr. 2.3.1~2.3.2)。Fr. 2.3.1(177.5 mg)经硅胶柱色谱,得到 10 个流分(Fr. 2.3.1.1~2.3.1.10)。Fr. 2.3.1.4(42.0 mg)通过半制备型高效液相色谱仪,经 C₁₈ 色谱柱,甲醇-水(60:40)系统洗脱,得到化合物 4(1.5 mg);Fr. 2.3.2(101.0 mg)通过半制备型高效液相色谱仪,经 C₁₈ 色谱柱,甲醇-水(65:35)系统洗脱,得到化合物 5(2.0 mg)和 6(1.1 mg)。Fr. 9(1.3 g)经

硅胶柱色谱分离得到 10 个流分(Fr. 9.1~9.10),Fr. 9.5(61.6 mg)通过半制备型高效液相色谱仪,经 C₁₈ 色谱柱,乙腈-水(45:55)系统洗脱得到化合物 7(2.1 mg)。

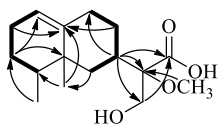
3 结构鉴定

化合物 1:淡黄色油状物;[α]_D²⁰ -36.6°(c 0.3, MeOH);HR-ESI-MS 在 m/z : 305.173 1(计算值为 305.172 3)处给出 [M+Na]⁺峰,化合物 1 的分子式为 C₁₆H₂₆O₄。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 497, 2 955, 1 735, 分别提示结构中存在羟基、羰基和双键。分析 ¹³C-NMR 和 DEPT 谱(表 1)可知,该化合物结构中共有 16 个碳原子,包括 4 个季碳(C)、3 个次甲基(CH)、6 个亚甲基(CH₂)、3 个甲基(CH₃)。

在 ¹³C-NMR 谱中,显示有 3 个甲基碳信号 δ_{C} 16.4, 21.3, 52.6; 2 个连氧碳信号 δ_{C} 81.9, 67.6; 1 个羰基信号 δ_{C} 176.4; 2 个烯烃碳信号 δ_{C} 121.9, 144.4。在 ¹H-NMR 谱中,高场区显示有 3 个甲基质子信号,其中包括 1 个甲氧基 δ_{H} 3.73(3H, s)、2 个甲基 0.90(3H, s) 和 0.89(3H, d, J = 6.4 Hz), 1 个亚甲基质子信号 δ_{H} 3.65(2H, d, J = 11.0 Hz); 低场区显示有 1 个烯质子信号 δ_{H} 5.31(1H, brs)。同时,¹H-¹H COSY 谱(图 2)中 H-1(δ_{H} 1.11)/H-2(δ_{H} 1.63)/H-3(δ_{H} 2.24)/H-4(δ_{H} 1.34)之间相关信号和 H-5(δ_{H} 5.31)/H-6(δ_{H} 1.96)/H-7(δ_{H} 2.24)/H-8(δ_{H} 1.54)/H-9(δ_{H} 0.89)之间相关信号,结合 HMBC 谱(图 2)中 H-2(δ_{H} 1.63)与 C-4(δ_{C} 26.7)相关, H-3(δ_{H} 1.90)与 C-4a(δ_{C} 144.4)相关, H-7(δ_{H} 1.91)与 C-8a(δ_{C} 38.8)和 C-5(δ_{C} 121.9)相关, H-9(δ_{H} 0.89)与 C-7(δ_{C} 28.6)相关, H-10(δ_{H} 0.90)与 C-8(δ_{C} 35.5)和 C-4a(δ_{C} 144.4)相关, H-1(δ_{H} 1.11)与 C-10(δ_{C} 21.3)相关,推导出该化合物具 8,8a-二甲基-八氢茚

表 1 化合物 1 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR(500/125 MHz, CD₃OD) 数据
Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectral data of compound 1(500/125 MHz, CD₃OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	1.11(1H, overlapped), 1.68(1H, overlapped)	35.3	8	1.54(1H, m)	35.5
2	1.63(1H, m)	37.3	8a	—	38.8
3	1.90(1H, m), 2.24(1H, m)	28.2	9	0.89(3H, d, J = 6.4 Hz)	16.4
4	1.64(1H, m), 1.34(1H, m)	26.7	10	0.90(3H, s)	21.3
4a	—	144.4	1'	—	176.4
5	5.31(1H, brs)	121.9	2'	—	81.9
6	2.03(1H, m), 1.96(1H, m)	26.1	3'	3.65(1H, d, J = 11.0 Hz), 3.70(1H, d, J = 11.0 Hz)	67.6
7	2.24(1H, m), 1.91(1H, m)	28.6	4'	3.73(3H, s)	52.6

图2 化合物1的¹H-¹H COSY和HMBC相关Fig. 2 ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compound 1

的骨架结构。除此之外,结合分子式和HMBC相关信号H-4' (δ_{H} 3.73, OCH₃)与C-2' (δ_{C} 81.9)相关, H-3' (δ_{H} 3.65)与C-2' (δ_{C} 81.9)和C-1' (δ_{C} 176.4)相关,推导出化合物1中剩余片段为1,2,2-三取代-丙酸。最后结合HMBC谱中, H-2 (δ_{H} 1.63)与C-2' (δ_{C} 81.9)、C-1' (δ_{C} 176.4)和C-3' (δ_{C} 67.6)相关,推导出1,2,2-三取代-丙酸通过C-2' (δ_{C} 81.9)与8,8a-二甲基-八氢萘的C-2 (δ_{C} 37.3)相连。因此,化合物1的平面结构为2-(8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl)-3-hydroxy-2-methoxypropanoic acid。

ROESY谱(图3)中显示, H-8 (δ_{H} 1.54)与H-2 (δ_{H} 1.63)相关,提示H-8与H-2在同一平面上, H-2 (δ_{H} 1.63)与8a-CH₃ (δ_{H} 0.90)相关,提示H-2与8a-CH₃在同一平面上,综上所述, H-8、H-2与8a-CH₃在同一平面上,所以, H-2 (δ_{H} 1.63)、H-8 (δ_{H} 1.54)和8a-CH₃ (δ_{H} 0.90)的相对构型为 β 、 β 和 α 。

综上所述,化合物1鉴定为2-[(2 β ,8 β ,8 α)-8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl]-3-hydroxy-2-methoxypropanoic acid。经检索为1个新化合物,命名为柯拉斯那酸A。

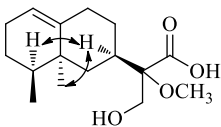


图3 化合物1的ROESY相关

Fig. 3 ROESY correlations of compound 1

化合物2:淡黄色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{29} +52.9^{\circ}$ (c 0.22, CHCl₃); ESI-MS在 m/z : 261.3处给出 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 峰;结合NMR谱数据推断分子式为C₁₅H₂₆O₂; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.32 (1H, m, H-5), 3.57 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-3'a), 3.44 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-3'b), 2.74 (1H, m, H-4a), 2.13 (1H, m, H-4b), 2.01 (1H, m, H-6a), 1.95 (1H, m, H-6b), 1.90 (2H, m, H-3), 1.83 (1H, m, H-2), 1.78 (1H, m, H-1a), 1.42 (1H, m, H-8), 1.41 (2H, m, H-7), 1.08 (3H, s, H-1'), 0.92 (3H, s, H-10), 0.87 (3H, d, J = 6.2 Hz, H-9), 0.81 (1H, m, H-1b); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 40.8 (C-1),

40.4 (C-2), 28.2 (C-3), 32.7 (C-4), 143.2 (C-4a), 120.3 (C-5), 25.9 (C-6), 27.3 (C-7), 41.2 (C-8), 37.8 (C-8a), 15.8 (C-9), 18.6 (C-10), 20.4 (C-1'), 74.9 (C-2'), 68.6 (C-3')。以上数据与文献对照基本一致^[15],故鉴定化合物2为2-[(2 β ,8 α ,8 α)-8,8a-dimethyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl] propane-1,2-diol。

化合物3:粉红色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{29} +5.4^{\circ}$ (c 0.08, CHCl₃); ESI-MS在 m/z : 261.1处给出 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 峰;结合NMR谱数据推断分子式为C₁₅H₂₆O₂; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 4.74 (1H, s, H-3'a), 4.73 (1H, s, H-3'b), 4.17 (1H, dd, J = 4.9, 12.0 Hz, H-1), 2.21 (1H, m, H-3), 2.00 (1H, m, H-4a), 1.89 (1H, m, H-5), 1.86 (1H, m, H-2a), 1.75 (3H, s, H-1'), 1.59 (1H, m, H-2b), 1.55 (1H, m, H-7a), 1.52 (1H, m, H-6a), 1.52 (1H, m, H-8a), 1.50 (1H, m, H-4b), 1.46 (1H, m, H-7b), 1.45 (1H, m, H-8b), 1.41 (1H, m, H-6b), 0.90 (3H, s, H-10), 0.83 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-9); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 68.2 (C-1), 35.8 (C-2), 37.1 (C-3), 30.4 (C-4), 42.0 (C-4a), 32.9 (C-5), 36.3 (C-6), 30.1 (C-7), 22.5 (C-8), 75.4 (C-8a), 15.3 (C-9), 15.6 (C-10), 21.0 (C-1'), 150.8 (C-2'), 108.8 (C-3')。以上数据与文献对照基本一致^[16],故鉴定化合物3为(1 β ,3 α ,4 α ,5 β ,8 α)-4a,5-dimethyl-3-(prop-1-en-2-yl) octahydronaphthalene-1,8a(1H)-diol。

化合物4:淡黄色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{29} -22.3^{\circ}$ (c 0.10, CHCl₃); ESI-MS在 m/z : 261.3处给出 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 峰;结合NMR谱数据推断分子式为C₁₅H₂₆O₂; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.05 (1H, brs, H-9), 4.03 (1H, brd, J = 8.9 Hz, H-8), 2.00 (1H, m, H-1a), 1.84 (1H, m, H-1b), 1.65 (1H, m, H-2a), 1.52 (1H, overlapped, H-6a), 1.32 (1H, m, H-3a), 1.26 (1H, m, H-3b), 1.14 (1H, m, H-2b), 1.08 (1H, m, H-4), 1.08 (3H, s, H-12), 1.07 (1H, m, H-7), 1.04 (3H, s, H-13), 0.88 (3H, s, H-15), 0.81 (1H, overlapped, H-6b), 0.75 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-14); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 31.4 (C-1), 27.2 (C-2), 30.6 (C-3), 43.6 (C-4), 38.2 (C-5), 37.8 (C-6), 46.8 (C-7), 68.7 (C-8), 124.8 (C-9), 143.7 (C-10), 72.8 (C-11), 29.1 (C-12), 25.4 (C-13), 15.1 (C-14), 17.0 (C-15)。以上数据与文献对照基本一致^[17],故鉴定化合物4为eremophila-9-en-8 β ,11-diol。

化合物5:淡黄色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{29} +43.7^{\circ}$ (c 0.10, CHCl₃); ESI-MS在 m/z : 261.3处给出 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 峰;

结合 NMR 谱数据推断分子式为 $C_{15}H_{26}O_2$; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.10 (1H, m, H-8), 2.52 (1H, dd, $J = 3.6, 14.0$ Hz, H-6a), 2.00 (1H, m, H-3a), 1.89 (1H, m, H-3b), 1.79 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-9a), 1.61 (3H, s, H-13), 1.58 (2H, m, H-2), 1.56 (1H, m, H-1a), 1.51 (1H, m, H-6b), 1.39 (1H, m, H-7), 1.33 (1H, m, H-1b), 1.29 (3H, s, H-15), 1.29 (3H, s, H-12), 1.25 (1H, overlapped, H-9b), 1.04 (3H, s, H-14); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 39.9 (C-1), 18.9 (C-2), 33.1 (C-3), 132.9 (C-4), 125.8 (C-5), 26.7 (C-6), 55.0 (C-7), 69.9 (C-8), 51.3 (C-9), 35.8 (C-10), 75.1 (C-11), 23.8 (C-12), 19.4 (C-13), 25.6 (C-14), 30.2 (C-15)。以上数据与文献对照基本一致^[18-19], 故鉴定化合物 5 为 eudesma-4-en-8,11-diol。

化合物 6: 淡黄色油状物; $[\alpha]_D^{29} +16.0^\circ$ (c 0.06, $CHCl_3$); ESI-MS 在 m/z : 261.3 处给出 $[M+Na]^+$ 峰; 结合 NMR 谱数据推断分子式为 $C_{15}H_{26}O_2$; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.45 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-15a), 3.73 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-15b), 2.89 (1H, m, H-3a), 1.73 (2H, m, H-8), 1.70 (1H, m, H-1a), 1.44 (1H, m, H-1b), 1.25 (3H, s, H-14), 1.24 (2H, m, H-2), 1.20 (3H, s, H-13), 1.09 (3H, s, H-12), 0.94 (1H, m, H-3b); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.4 (C-1), 29.8 (C-2), 22.1 (C-3), 121.2 (C-4), 140.8 (C-5), 28.9 (C-6), 66.1 (C-7), 19.0 (C-8), 45.0 (C-9), 34.7 (C-10), 74.7 (C-11), 24.6 (C-12), 26.2 (C-13), 25.0 (C-14), 63.8 (C-15)。以上数据与文献对照基本一致^[19], 故鉴定化合物 6 为 eudesma-4-en-11,15-diol。

化合物 7: 淡黄色油状物; $[\alpha]_D^{29} +6.8^\circ$ (c 0.032 5, $CHCl_3$); ESI-MS 在 m/z : 285.3 处给出 $[M+Na]^+$ 峰; 结合 NMR 谱数据推断分子式为 $C_{16}H_{22}O_3$; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 10.17 (1H, s, H-15), 6.25 (1H, brs, H-13a), 5.63 (1H, brs, H-13b), 3.77 (3H, s, 12-OCH₃), 2.61 (1H, m, H-9a), 2.12 (1H, m, H-6a), 1.78 (1H, m, H-7), 1.74 (2H, overlapped, H-2), 1.74 (2H, overlapped, H-8), 1.70 (1H, overlapped, H-9b), 1.41 (1H, m, H-1a), 1.30 (1H, m, H-1b), 1.24 (2H, m, H-3), 1.23 (1H, m, H-6b), 1.21 (3H, s, H-14); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 39.4 (C-1), 17.9 (C-2), 23.9 (C-3), 133.2 (C-4), 163.4 (C-5), 29.9 (C-6), 41.6 (C-7), 27.3 (C-8), 41.4 (C-9), 36.7 (C-10), 144.3 (C-11), 167.4 (C-12), 123.7 (C-13), 25.4 (C-14), 191.0 (C-15), 52.1 (12-OCH₃)。以上数据与文献对照基本

一致^[20-21], 故鉴定化合物 7 为 methyl-15-oxo-eudesmane-4,11(13)-dien-12-oate。

4 活性测试

4.1 乙酰胆碱酯酶抑制活性测定

采用 Ellman 法^[22]测定乙酰胆碱酯酶抑制活性。化合物 1~7 均用 DMSO 进行溶解, 取 110 μ L 磷酸缓冲液 (pH 值 8.0)、10 μ L 待测样品 (50 μ g/mL) 和 40 μ L 乙酰胆碱酯酶 (0.02 μ g/mL) 于 96 孔板中, 30 $^\circ$ C 温育 20 min, 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 40 μ L, 反应体系总共 200 μ L。30 min 后, 405 nm 处用酶标仪检测吸光度 (A) 值。阳性对照为他克林, 反应终质量浓度为 0.08 μ g/mL, 阴性对照为 DMSO, 终浓度为 0.1%, 实验重复 3 次。按照公式计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制率 [抑制率 = $(E - S)/E$, E 为阴性对照平均 A 值, S 为待测样品的平均 A 值]。结果见表 2。

表 2 化合物 1~7 的乙酰胆碱酯酶抑制活性

Table 2 AChE inhibitory activity of compounds 1—7

化合物	抑制率/%
1	15.2 $\pm$ 0.8
2	<10
3	<10
4	32.7 $\pm$ 1.3
5	21.2 $\pm$ 0.9
6	<10
7	<10
他克林	71.8 $\pm$ 0.9

4.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

使用 4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG) 法^[23]对化合物 1~7 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行评价。使用 pH 6.8 的 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液 (PBS 溶液) 作为反应溶液, 样品终质量浓度为 0.25 mg/mL, 阴性对照为 DMSO-PBS 溶液, 阳性对照为阿卡波糖溶液, 将混匀的各溶液加入到 96 孔酶标板后置于酶标仪中, 于 37 $^\circ$ C 放置 15 min 后, 加入 pNPG 溶液, 然后将 96 孔板于 37 $^\circ$ C 放置 30 min 后, 加入 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 终止液 80 μ L, 于酶标仪 405 nm 波长下测量每孔的 A 值并按公式计算化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。结果见表 3。

$$\text{抑制率} = [(B - B_0) - (A - A_0)] / (B - B_0)$$

A 为实验组 (10 μ L 待测样品溶液+70 μ L PBS 溶液+20 μ L PBS 溶液溶解的 2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液) A 值; A₀ 为背景对照组 (10 μ L 待测样品溶液+90 μ L PBS 溶液) A 值; B 为阴性对照 (10 μ L 10 %DMSO-PBS 溶液+70 μ L PBS 溶液+20 μ L PBS 溶液溶解的 2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液) A 值; B₀ 为空白对照 (10 μ L 10 %DMSO-PBS 溶液+90 μ L 的 PBS 溶液) A 值

表3 化合物1~7的 α -葡萄糖苷酶抑制活性Table 3 α -Glucosidase inhibitory activity of compounds 1—7

化合物	抑制率/%
1	15.6 $\pm$ 4.1
2	15.2 $\pm$ 0.8
3	<10
4	12.5 $\pm$ 4.7
5	32.7 $\pm$ 1.3
6	<10
7	21.2 $\pm$ 0.9
阿卡波糖	59.7 $\pm$ 1.3

5 讨论

本实验采取多种色谱技术,从柯拉斯那沉香中共分离得到了7个倍半萜类化合物,其中化合物1为新化合物。活性测试结果显示,化合物1、4和5具有乙酰胆碱酯酶抑制活性,化合物5具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

目前,国内外学者主要对白木香、柯拉斯那沉香和马来沉香3种沉香属植物所产的沉香进行了研究,发现了7种骨架类型的倍半萜类化合物,其中前香草烷型倍半萜类化合物只在马来沉香中分离得到过^[24]。本实验分离得到的7个倍半萜类化合物,其中1~4属于艾里莫酚烷型倍半萜、5~7属于桉烷型倍半萜,本课题组前期从柯拉斯那沉香中还分离得到了杜松烷型倍半萜^[25],其他类型的倍半萜未见报道,由此看来,不同植物来源的沉香其倍半萜骨架类型是有所区别的。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Zhou F Q, Tian S Y, Pan J L, *et al.* Contrastive study on the pharmacological action of alcohol extract *Caulis Cinnamomi Camphorae* and *Lignum Aquilaria Sinensis* [J]. *J Chin Med*, 2013, 28(12): 1849-1851.
- [3] Miyosh T, Ito M, Kitayama T, *et al.* Sedative effects of inhaled benzylacetone and structural features contributing to its activity [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(9): 1474-1481.
- [4] Chen H, 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.) Gilgtrrees [J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 4884-4896.
- [5] Yadav D K, Mudgal V, Agrawal J, *et al.* Molecular docking and ADME studies of natural compounds of agarwood oil for topical anti-inflammatory activity [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2013, 9(3): 360-370.
- [6] Hashim Y Z, Phirdaous A, Azura A. Screening of anticancer activity from agarwood essential oil [J]. *Pharmacogn Res*, 2014, 6(3): 191-194.
- [7] Miniya P B, Chitre T S, Karve S S, *et al.* Anti-oxidant activity of ethyl acetate 16 extract of *Aquilariaagallocha* on nitrite-induced methemoglobin formation [J]. *Int J Green Pharm*, 2008, 2(1): 43-45.
- [8] Kumphune S, Prompant E, Phaebuaw K, *et al.* Anti-inflammatory effects of the ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* inhibits LPS-induced tumour necrosis factor- α production by attenuating P38 MAPK activation [J]. *Int J Green Pharm*, 2011, 5(1): 43-48.
- [9] Kakino M, Izuta H, Ito T, *et al.* Agarwood induced laxative effects via acetylcholine receptors on loperamide-induced constipation in mice [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(8): 1550-1555.
- [10] Naef R. The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: A review [J]. *Flavour Fragr J*, 2015, 26: 73-87.
- [11] 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.
- [12] Yang Y, Mei W L, Kong F D, *et al.* Four new bi-2-(2-phenylethyl) chromone derivatives of agarwood from *Aquilaria crassna* [J]. *Fitoterapia*, 2017, doi: 10.1016/j.fitote.2017.03.008.
- [13] 王红妮, 董文化, 梅文莉, 等. 柯拉斯那沉香化学成分研究 [J]. 热带生物学报, 2016, 7(1): 111-116.
- [14] 杨洋, 梅文莉, 董文化, 等. 柯拉斯那沉香的生物活性成分研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(5): 577-583.
- [15] Arantes S F, Hanson J R, Hitchcock P B, *et al.* The hydroxylation of the sesquiterpenoid valerianol by *Mucor plumbeus* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(6): 1063-1067.
- [16] Xu J J, Su J, Li Y, *et al.* Eremophilane-type sesquiterpenes from *Alipinia oxyphylla* with inhibitory activity against nitric oxide production [J]. *Chem Nat Comp*, 2013, 49(3): 457-461.

- [17] Huo H X, Zhu Z X, Pang D R, *et al.* Anti-neuroinflammatory sesquiterpenes from Chinese eaglewood [J]. *Fitoterapia*, 2015, 106(9): 115-121.
- [18] Humber D C, Pinder A R. Synthetic experiments in the eudalene group of bicyclic sesquiterpenes [J]. *J Org Chem*, 1966, 31(12): 4188-4192.
- [19] Maatooq G T. Microbial transformation of a β - and γ -eudesmanol mixture [J]. *Zeitschrift Natur Forschung C*, 2014, 57(7/8): 654-659.
- [20] Mahmoud A A. 7-Epi-eudesmanes, eudesmanoic acids, eudesmanolides and other sesquiterpenes from *Pluchea dioscoridis* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(8): 1633-1638.
- [21] Dawidar A A, Metwally M. New α -cyclocostunolide and isocostic acid derivatives from *Pluchea dioscoridis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11): 5068-5070.
- [22] Ellman G L, Courtney K D, Andres J V, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2): 88-95.
- [23] Jong A N, Bhandari M R, Kawabata J. α -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*) [J]. *Food Chem*, 2007, 103(4): 1319-1323.
- [24] Chen H Q, Wei J H, Yang J S, *et al.* Chemical constituents of agarwood originating from the *Endemic* genus *Aquilaria* plants [J]. *Chem Biodivers*, 2012, 9(2): 236-250.
- [25] Wang H N, Dong W H, Huang S Z, *et al.* Three new sesquiterpenoids from agarwood of *Aquilaria crassna* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 7(1): 111-116.