

抗疲劳中药刺五加中 1 个新倍半萜

于 亮¹, 张军武², 石新燕¹, 刘 昭¹, 孙 涛^{2*}, 梁文娟^{3*}

1. 陕西中医药大学 体育部, 陕西 西安 712046

2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 西安 712046

3. 云南农业大学食品科技学院, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 研究中药刺五加 *Acanthopanax senticosus* 的抗疲劳活性成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20、MCI gel CHP-20P、ODS 等多种色谱技术分离纯化, 通过质谱及核磁共振等数据对化合物进行结构鉴定; 并采用 ABTS 法研究其体外清除自由基活性。结果 从刺五加甲醇提取物中分离得到 1 个倍半萜类化合物 7 α (H)-桉烷-4 α ,5 β ,11,12-四醇-3-酮 (1), 该化合物自由基清除的半数清除浓度为 (43.1 $\pm$ 1.2) μ g/mL。结论 化合物 1 为 1 个新的 eudesmane 型倍半萜, 命名为刺五加醇 A; 也是首次从五加科植物中分离得到此类化合物。

关键词: 刺五加; 刺五加醇 A; 抗疲劳; 倍半萜; 自由基清除

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)11-2508-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.004

A new antifatigue eudesmane sesquiterpenoid from *Acanthopanax senticosus*

YU Liang¹, ZHANG Jun-wu², SHI Xin-yan¹, LIU Zhao¹, SUN Tao², LIANG Wen-juan³

1. Department of Physical Education, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

3. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To study the antifatigue bioactive constituents from *Acanthopanax senticosus*. **Methods** The compounds were isolated by means of various chromatographic techniques (Silica gel, Sephadex LH-20, MCI GEL CHP-20P, and HPLC), and its structures were elucidated by extensive spectroscopic analysis (IR, HR-MS, 1D- and 2D-NMR). The free radical scavenging activity *in vitro* was assessed by an ABTS assay. **Results** One new eudesmane sesquiterpenoid was isolated and identified as 7 α (H)-eudesm-4 α ,5 β ,11,12- tetraol-3-one, and its scavenging activities towards ABTS free radical with half scavenging concentration of (43.1 $\pm$ 1.2) μ g/mL. **Conclusion** Compound 1 is a new eudesmane sesquiterpenoid named senticosol A. Meanwhile, this compound with eudesmane skeleton is also obtained from the Araliaceae for the first time.

Key words: *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.; senticosol A; anti-fatigue; sesquiterpenoid; free radical scavenging activity

刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎, 具有益气健脾、补肾安神之功效^[1]。现代药理学研究表明, 刺五加有显著的抗疲劳作用, 且该作用在多种实验模型上得到验证^[2-4]; 此外, 刺五加还具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力、保护中枢神经系统和心脑血管等作用^[5-6]。刺五加含有多种

类型的活性成分, 主要为三萜、多糖、黄酮、木脂素、香豆素类成分及多种微量元素和氨基酸^[7-9]等。迄今为止, 仅从刺五加中分离得到 2 个倍半萜类化合物^[10-11], 尚未有 eudesmane 型倍半萜的报道。为深入探讨刺五加抗疲劳活性物质基础, 本实验对刺五加活性成分进行研究, 从其甲醇提取物中分离鉴定了 1 个新的倍半萜类化合物 7 α (H)-桉烷-4 α ,5 β ,11,

收稿日期: 2017-12-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (31600279)

作者简介: 于 亮, 男, 讲师, 从事运动疲劳的中药恢复和机能评定研究。Tel: 13087690333 E-mail: cd1984116@163.com

*通信作者 孙 涛, 男, 副教授, 从事中药药效物质研究。E-mail: Suntao1151@163.com

梁文娟, 女, 博士, 从事天然产物化学研究。E-mail: liangwenjuan2007@163.com

12-四醇-3-酮 [7 α (H)-eudesm-4 α ,5 β ,11,12-tetraol-3-one, 1], 命名为刺五加醇 A, 为 1 个稀有的 11,12-二羟基化 eudesmane 型倍半萜, 也是首次从五加科植物中分离得到此类型结构化合物。

1 仪器与材料

核磁共振谱经 Brucker Avance 600 型超导核磁共振仪 (Bruker, Bremerhaven, 德国) 测定, 高分辨质谱用岛津 IT-TOF-LC-MS 质谱仪 (Shimadzu, Kyoto, 日本) 测定, 红外光谱用 Bio-Rad FTS-185 型红外光谱仪 (Bio-Rad, Hercules, California, 美国) 测定; 半制备高效液相色谱仪为创新通恒 LC3000 型 (北京创新通恒科技有限公司), 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m)。薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶 (200~300 目) 为青岛海洋化工有限公司产品; MCI CHP-20P gel 柱色谱分离材料购自日本三菱化学公司; Sephadex LH-20 购自 Pharmacia 公司, 显色剂为 H₂SO₄ (10%) 的乙醇溶液; 其他试剂均为化学纯或分析纯。

刺五加药材于 2014 年 5 月购自西安万寿路中药材市场, 经陕西中医药大学王继涛副教授鉴定为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根及根茎。

2 提取、分离与分析条件

刺五加药材 7 kg, 粉碎后用甲醇室温下浸泡 2 次, 每次浸泡 72 h。合并浸泡液, 减压浓缩至浸膏, 将该浸膏混悬于适量水中, 用等量醋酸乙酯萃取 4 次后, 将水溶液部分经 D101 大孔树脂柱色谱分离, 依次用水、50% 甲醇和甲醇洗脱, 分别得到水洗脱部分 (113 g)、50% 甲醇部分 (Fr. B, 48 g) 和甲醇部分 (82 g)。Fr. B 经硅胶柱色谱 (12 cm $\times$ 90 cm, 500 g), 用二氯甲烷-甲醇 (0:100 $\rightarrow$ 100:0) 梯度洗脱, 经 TLC 检查并合并相同流分后得到 5 个组分 Fr. B-1~B-9。Fr. B-2 (12 g) 经 MPLC (ODS, 75 μ m, 100 g), 甲醇-水 (30:70、75:25、100:0) 梯度洗脱得到 3 个组分 Fr. B-2-1~B-2-3。Fr. B-2-3 (1.7 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (100 g, 3 cm $\times$ 150 cm), 用甲醇洗脱得到 5 个组分 (Fr. B-2-3-1~B-2-3-5)。Fr. B-2-3-1 (700 mg) 再经半制备 HPLC 和硅胶柱色谱反复纯化, 得到化合物 1 (4 mg)。

LC-MS 分析条件: 岛津 Communications Bus Module (CBM-20A) 液相色谱分析仪, 包括 LC-30AD 二元泵, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱以及 SPD-M20A 二极管阵列检测

器 (Shimadzu, Kyoto, 日本)。色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m, Agilent)。流动相: 甲酸-水 (0.05:100, A) 和甲酸-乙腈 (0.05:100, B)。梯度洗脱程序: 0~5 min, 10%~55% B; 5~9 min, 55%~80% B; 9~9.5 min, 80%~100% B; 9.5~10.5 min, 100% B; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样量为 2 μ L。

质谱分析条件: 喷雾电压为 -3.50 kV, 检测电压为 1.60 kV, 干燥气压力为 100.0 kPa, 喷雾气 (N₂) 体积流量 0.5 L/min, CDL 温度为 200.0 $^{\circ}$ C, 离子捕获时间为 10 ms, 母离子选择宽度为 $\pm$ 3.0, 选择时间为 20 ms, CID 裂解时间为 30 ms, 裂解能量为 50%, 裂解气为 50%, 扫描范围为 m/z 100~1 000。分子式预测采用 Shimadzu Composition Formula Predictor 软件。

3 结构鉴定

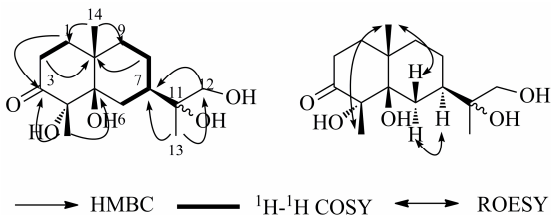
化合物 1: 淡黄色油状物; $[\alpha]_D^{18.5}$ -33.4 $^{\circ}$ (c 0.06, MeOH)。HR-ESI-MS m/z 287.182 9 [M+H]⁺ (计算值 287.185 3), 可推测其分子式为 C₁₅H₂₆O₅, 不饱和度为 3。红外光谱显示其结构中含有羟基 (3 403 cm⁻¹) 和羰基 (1 700 cm⁻¹) 等基团。¹H-NMR (表 1) 中, δ_H 1.35 (3H, s), 1.12 (3H, s) 和 1.05 (3H, s) 提示结构中有 3 个甲基。¹³C-NMR (DEPT) 谱显示 15 个碳信号 (表 1), 包括 5 个季碳、1 个次甲基、6 个亚甲基、3 个甲基。¹³C-NMR 谱中 δ_C 209.4 提示结构中有 1 个羰基; δ_C 74.9, 73.6, 68.8, 66.6 提示结构中有 4 个碳与氧连接。

检索文献发现, 化合物 1 的 ¹³C-NMR 数据与文献报道的化合物 (11R)-eudesmane-5 α ,11,12-triol^[12] 相似, 不同之处在于, 化合物 1 数据中多了 1 个羰基碳信号 δ_C 209.4 和 1 个连氧季碳信号 δ_C 66.6, 表明化合物 1 为 eudesmane 型倍半萜类。

化合物 1 的 ¹H-¹H COSY (图 1) 中, δ_H 1.78 (2H, m, H-1) 与 2.34 (1H, m, H-2); δ 1.90 (1H, dd, J = 13.9, 6.5 Hz, H-6a) 与 1.93 (1H, overlapped, H-7)、 δ 1.93 (1H, overlapped, H-7) 与 1.55 (1H, m, H-8)、 δ 1.55 (1H, m, H-8) 与 1.15 (1H, m, H-9) 之间存在相关, 可以推测羰基处于 C-3 位; 4 个连氧碳原子分别为 C-4、5、11、12。在 HMBC 谱中 (图 1), δ_H 1.78 (2H, m, H-1) 及 1.35 (3H, s, H-15) 与 δ_C 209.5 (C-3) 存在相关, 证实了羰基位于 C-3 位; δ_H 1.35 (3H, H-15), 1.05 (3H, H-14) 与 δ_C 73.6 (C-5); δ_H 2.36 (1H, m, H-2a), 1.27 (1H, d, J = 13.9 Hz, H-6b) 与 δ_C 66.6

表1 化合物1的¹H-NMR和¹³C-NMR数据Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound 1

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	1.78 (2H, m)	34.2, t
2	2.36 (1H, m), 2.34 (1H, m)	32.9, t
3		209.4, s
4		66.6, s
5		73.6, s
6	1.90 (1H, dd, $J = 13.9, 6.5$ Hz), 1.27 (1H, d, $J = 13.9$ Hz)	28.2, t
7	1.93 (1H, overlapped)	43.5, d
8	1.55 (1H, m), 1.49 (1H, m)	22.2, t
9	1.93 (1H, overlapped), 1.15 (1H, m)	39.2, t
10		35.0, s
11		74.9, s
12	3.46 (1H, d, $J = 11.3$ Hz), 3.40 (1H, d, $J = 11.3$ Hz)	68.8, t
13	1.12 (3H, s)	21.6, q
14	1.05 (3H, s)	20.8, q
15	1.35 (3H, s)	11.5, q

图1 化合物1的结构和主要HMBC、¹H-¹H COSY和ROESY相关Fig. 1 Structure and key HMBC, ¹H-¹H COSY, and ROESY correlations of compound 1

(C-4); δ_{H} 1.90 (1H, dd, $J = 13.9, 6.5$ Hz, H-6a), 1.55 (1H, m, H-8a) 与 δ_{C} 74.9 (C-11); δ_{H} 1.93 (1H, overlapped, H-7), 1.12 (3H, s, H-13) 与 δ_{C} 68.8 (s, C-12) 存在相关, 可以证实 C-4、5、11、12 位连接羟基。

在 ROESY 谱中 (图 1), δ_{H} 1.35 (3H, s, H-15)/1.05 (3H, s, H-14)/1.90 (1H, dd, $J = 13.9, 6.5$ Hz, H-6a) 及 δ_{H} 1.27 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-6b)/1.93 (1H, overlapped, H-7) 存在相关, 提示 4-OH 为 α 构型, H-7 为 α 构型。5-OH 被推测为 β 构型是基于 14 位甲基质子化学位移为 1.05 (如为 α 构型, 则 $\delta_{\text{H-14}}$ 为 0.87) [13-14]; 由于 C-11 处于侧链位置, 旋转自由度较大, 因此其相对构型没有确定。至此, 化合物 1 的结构确定为 7 α (H)-桉烷-4 α , 5 β , 11, 12-四醇-3-酮。

化合物 1 为 1 个新的 11, 12 位二羟基化 eudesmane

型倍半萜, 该类化合物在天然产物中比较稀有, 迄今, 仅从几个植物[12, 15-18]和人类尿液[19]中分离得到几个该类化合物。此外, 化合物 1 也是首个从刺五加中分离得到的 eudesmane 型倍半萜。

为了确定化合物 1 是否来源于刺五加, 对刺五加提取物进行了 LC-MS 分析, 但鉴于刺五加甲醇提取物化学成分比较复杂, 而且 MS 谱中信号重叠严重, 化合物 1 的信息被掩盖, 放弃了对其甲醇提取物的分析, 转而对其亚流分进行分析, 结果发现 Fr. B-2-3 的分离度较好, 且各峰之间辨识度较高。经 LC-HR-MS 分析, 在 Fr. B-2-3 中发现了化合物 1 的存在, 该信号峰的 LC-MS 属性与化合物 1 完全一致 ($t = 8.6$ min, HR-ESI-MS m/z 287.187 7 [$\text{M} + \text{H}$]⁺), 见图 2。该结果间接证明了化合物 1 来自刺五加。

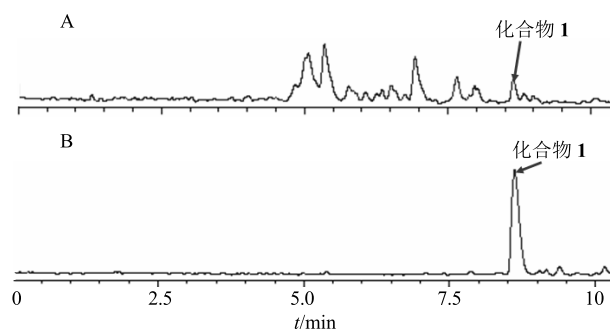


图2 Fr. B-2-3 (A) 和化合物 1 (B) 的 UPLC-IT-TOF/MS 正离子基峰色谱图

Fig. 2 UPLC-IT-TOF/MS base peak chromatograms (BPC) of Fr. B-2-3 (A) and compound 1 (B) in positive ion mode

4 药理活性

现代药理学研究表明, 机体疲劳的发生与机体中氧化产物, 特别是氧自由基增多相关, 而具有自由基清除作用的物质能使疲劳迅速解除; 目前自由基清除活性测试是抗疲劳作用评价的一个重要指标[20-21]。鉴于刺五加显著的抗疲劳作用以及所得化合物量较少, 故本实验采用 ABTS 法测试化合物 1 的体外清除自由基活性, 按照文献所述实验方法[22], 阳性对照维生素 C 半数清除浓度为 (7.4 ± 0.3) $\mu\text{g/mL}$, 测得化合物 1 的自由基半数清除浓度为 (43.1 ± 1.2) $\mu\text{g/mL}$ 。可见化合物 1 仅显示出中等强度的自由基清除活性, 其他方面活性亦有待评价。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 徐 峰, 赵江燕, 刘天硕. 刺五加提取物抗疲劳作用的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(9): 453-456.

- [3] Huang L Z, Huang B K, Ye Q, *et al.* Bioactivity-guided fractionation for anti-fatigue property of *Acanthopanax senticosus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(1): 213-219.
- [4] Zhang X L, Ren F, Huang W, *et al.* Anti-fatigue activity of extracts of stem bark from *Acanthopanax senticosus* [J]. *Molecules*, 2010, 16(1): 28-37.
- [5] 白雪, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 刺五加活性成分的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(4): 378-381.
- [6] 涂正伟, 周渭渭, 单淇, 等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [7] 李志峰, 杨金火, 张武岗, 等. 刺五加的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 852-855.
- [8] 龚婧如, 王书芳. 刺五加的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2337-2341.
- [9] 黄青, 张洪岩, 张本, 等. 刺五加化学药理研究的新进展 [J]. 中草药, 1999, 30(3): 234-236.
- [10] Li Z F, Wang Q, Chen G, *et al.* A New Sesquiterpenoid from *Acanthopanax senticosus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2017, 53(2): 273-275.
- [11] Li Z F, Wu Z H, Chen G, *et al.* Two new compounds from *Acanthopanax senticosus* Harms [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(8): 716-719.
- [12] Sánchez-Martínez R, Villaescusa-Castillo L, Bernabé M, *et al.* Two new eudesmane alcohols from *Jasonia glutinosa* [J]. *Z Naturforsch C*, 2000, 55(9/10): 693-696.
- [13] Kitagawa I, Yamazoe Y, Shibuya H, *et al.* Biogenetically patterned transformation of eudesmanolide to eremophilanolide. I. Angular methyl migration of 5 α , 6 α -epoxy-dihydroalantolactone [J]. *Chem Pharm Bull*, 1974, 22(11): 2662-2674.
- [14] Rukachaisirikul V, Kaewbumrung C, Phongpaichit S, *et al.* Eudesmane sesquiterpenes from the aquatic fungus *Beltrania rhombica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(2): 238-240.
- [15] Marino S, Borbone N, Zollo F, *et al.* New sesquiterpene lactones from *Laurus nobilis* leaves as inhibitors of nitric oxide production [J]. *Planta Med*, 2005, 71(8): 706-710.
- [16] Cisero M, Appendino G, Tagliapietra S, *et al.* A sesquiterpene alcohol from the fruits of *Laurus nobilis* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(7): 2537-2538.
- [17] Teresa J P, Barrero A F, Feliciano A S, *et al.* eudesmane alcohols from *Jasonia glutinosa* [J]. *Phytochemistry*, 1980, 19(10): 2155-2157.
- [18] Teresa J P, Barrero A F, Feliciano A S, *et al.* Kudtdiol, new sesquiterpene alcohol from *Jasonia glutinosa* D. C. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1978, 19(43): 4141-4144.
- [19] Chayen R, Mazur Y, Wyler H, *et al.* Urodiolenone from grapefruit juice, a urinary metabolite found in hypertensive subjects [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(2): 369-372.
- [20] 郑荣梁, 刘光顺, 贾忠建, 等. 大苞雪莲多糖清除自由基及抗疲劳作用 [J]. 中国药理学报, 1993, 14: S47-S49.
- [21] Cherian E, Sudheesh N P, Janardhanan K K, *et al.* Free radical scavenging and mitochondrial antioxidant activities of Reishi-*Ganoderma lucidum* (Curt: Fr) P. Karst and *Arogyapacha-Trichopus zeylanicus* Gaertn extracts [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2009, 20(4): 289-308.
- [22] 黄积武, 李创军, 杨敬芝, 等. 三七叶的化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4381-4386.