

茯苓非多糖类化学成分的抗补体活性

倪付勇, 谢 雪, 温建辉, 李 明, 王永香, 胡晗绯, 吴 云, 王振中, 肖 伟*

江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 中药提取精制新技术重点研究室, 江苏 连云港 222000

摘要:目的 研究茯苓 *Poria cocos* 非多糖类化学成分的抗补体活性。方法 通过溶血实验方法进行抗补体活性成分的导向分离, 对所得化合物进行经典途径的体外抗补体活性测定, 采用现代波谱技术 ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 进行结构鉴定。结果 从茯苓醋酸乙酯部位分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为甾甾醇(1)、羽扇豆醇(2)、齐墩果酸(3)、乌苏酸(4)、猪苓酸 C(5)、土莫酸(6)、去氢土莫酸(7)、3-表-去氢土莫酸(8)、茯苓酸(9)、去氢茯苓酸(10)、松苓新酸(11)。化合物 1~4 为首次从茯苓中分离得到。抗补体实验表明化合物 3~11 对经典的补体激活具有不同程度的抑制作用。结论 三萜酸类化合物是茯苓非多糖类化学成分中主要的抗补体活性成分 [CH₅₀ 为 (0.10~0.27) g/L]。

关键词: 茯苓; 非多糖类化学成分; 抗补体活性; 三萜酸类化合物; 羽扇豆醇; 齐墩果酸; 乌苏酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2529-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.004

Non-polysaccharide chemical constituents of *Poria cocos* and their anti-complementary activity

NI Fu-yong, XIE Xue, WEN Jian-Hui, LI Ming, WANG Yong-xiang, HU Han-fei, WU Yun, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei

State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Key Laboratory of New Technique Research of TCM Extraction and Purification, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

Abstract: **Objective** To investigate the non-polysaccharide chemical constituents of *Poria cocos* and their anti-complementary activity. **Methods** The anti-complementary bioassay-guided isolation was carried out with the hemolysis test as guide. All isolates were evaluated for their *in vitro* anti-complementary activities on the classical pathway. The structures were identified by various spectroscopic data including ESI-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR data. **Results** Eleven compounds were isolated from the EtOAc fraction of *P. cocos* extracts, including stigmasterol (1), lupeol (2), oleanolic acid (3), ursolic acid (4), polyporenic acid C (5), tumulosic acid (6), dehydrotumulosic acid (7), 3-*epi*-dehydrotumulosic acid (8), pachymic acid (9), dehydropachymic acid (10), and dehydrotrametenolic acid (11). Compounds 1—4 were obtained from this plant for the first time, and compounds 3—11 showed the anti-complementary activity in different degrees. **Conclusion** Triterpenoid acids are the main anti-complementary constituents in the chemical constituents of *P. cocos* non-polysaccharides (CH₅₀ 0.10—0.27 g/L).

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; non-polysaccharide chemical constituents; anti-complementary activity; triterpenoid acids; lupeol; oleanolic acid; ursolic acid

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 性味甘淡、平; 归心、肾、脾、肺经; 具有利水渗湿、益脾和胃、宁心安神等功效。常用于治疗水肿尿少、脾胃虚和、心神不安、失眠惊悸等症^[1]。茯苓的主要化学成分有茯苓多糖、三萜类以及甾体类、脂肪酸等化合物^[2]。现代研究表

明茯苓中的三萜类物质具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节以及保肝等生物活性^[3]。因此, 本实验利用活性导向分离, 对茯苓非多糖化学成分中活性较好的醋酸乙酯部位 [溶血活性 CH₅₀=(0.52±0.01)g/L] 分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为甾甾醇 (stigmasterol, 1)、羽扇豆醇 (lupeol, 2)、齐墩果

收稿日期: 2019-01-29

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2013ZX090402203)

作者简介: 倪付勇, 男, 工程师, 从事中药新药开发与天然产物化学成分研究。Tel: (0518)81152323 E-mail: nifuyong163@163.com

*通信作者 肖 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518) 81152337 E-mail: kanionlunwen@163.com

酸 (oleanolic acid, 3)、乌苏酸 (ursolic acid, 4)、猪苓酸 C (polyporenic acid C, 5)、土莫酸 (tumulosic acid, 6)、去氢土莫酸 (dehydrotumulosic acid, 7)、3-表-去氢土莫酸 (3-*epi*-dehydrotumulosic acid, 8)、茯苓酸 (pachymic acid, 9)、去氢茯苓酸 (dehydropachymic acid, 10)、松苓新酸 (dehydrotretenolic acid, 11)。化合物 1~4 为首次从茯苓中分离得到。抗补体实验表明化合物 3~11 对经典的补体激活具有不同程度的抑制作用 [CH_{50} 为 $(0.10 \pm 0.02) \sim (0.27 \pm 0.01)$ g/L]。

1 仪器与材料

Bruker-AV-400 型核磁共振光谱仪; Agilent 1260 制备型高效液相色谱仪; 暗箱三用紫外分析仪 (上海嘉鹏科技有限公司); XT5 显微熔点测定仪 (北京科仪电光仪器厂); MULTISKAN MK3 型酶标仪 (Thermo Scientific, 美国); Agilent 1290-6538 液质联用仪 (美国 Agilent 公司); TDL-4 型低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); Jouan MR22i 型低温高速离心机 (JOUAN 公司, 法国); WMZK 8002 型恒温振荡器 (上海医用仪器厂)。

柱色谱及薄层硅胶 (青岛海洋化工厂); Fuji C₁₈ (江苏汉邦科技有限公司); 色谱乙腈、甲醇 (OCEANPAK)-水 (三蒸水, 自制); 巴比妥 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20170826); 巴比妥钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 H20160425); MgCl₂·6H₂O (湖北兴星和化工股份有限公司, 批号 150378); 肝素 (上海爱紫特生物科技有限公司, 批号 090608); 溶血素 1:4 000 (美国 Sigma 公司); 2% 绵羊红细胞 (SRBC) (上海康润生物科技有限公司); 豚鼠血清来自康缘药业股份有限公司试验动物中心。

茯苓药材于 2018 年 3 月购自安徽亳州药材市场 (供应商安徽鑫泰药业有限公司), 由连云港康济大药房连锁有限公司吴舟执业药师鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf。

2 方法

2.1 补体经典途径的 CH_{50} 测定^[4]

2.1.1 巴比妥缓冲液 (BBS) 溶液配制 取巴比妥钠 2.875 g, 溶于 250 mL 热水中, 超声振荡以加速溶解, 再加入 NaCl 42.5 g、MgCl₂·6H₂O 0.84 g、CaCl₂ 0.14 g、巴比妥 1.0 g, 补三蒸水至 1 000 mL 配制出 5 倍浓缩的 BBS (5×BBS)。使用时, 将 50 mL 此溶液加 200 mL 三蒸水混合, 配制成 BBS。

2.1.2 补体的效价评定 取一定量豚鼠血清 (补体) 配成 1:10 溶液, 并对倍稀释成 1:20、1:40、1:80、1:160。取溶血素、各浓度补体及 2% SRBC 各 0.1 mL 溶于 0.3 mL BBS 中, 混匀, 37 °C 水浴温育 30 min, 离心后取上清液在 405 nm 处测定吸光度 (*A*)。以三蒸水溶血管的 *A* 作为全溶血标准, 选择达到相似 *A* 的最低补体溶度作为正常溶血所需要的临界补体浓度。

2.1.3 药物经典途径抗补体活性测定 取临界浓度的补体分别与不同浓度的供试品混匀, 加入适量的 BBS、溶血素和 2% SRBC。37 °C 水浴温育 30 min, 离心后取上清液在 405 nm 处测定 *A*。实验同时设置对照组 (将等量的供试品加入 BBS 缓冲液中, 用于测定中药本底 *A* 值)、补体组 (取临界质量浓度的补体加入 BBS 缓冲液、溶血素和 2% SRBC, 用于测定临界质量浓度补体所造成红细胞溶血的 *A* 值) 和全溶血组 (将 2% SRBC 加入水中使之全溶血, 用于观察补体组是否达到或接近全溶血水平)。计算溶血抑制率。

$$\text{溶血抑制率} = 1 - (A_{\text{中药组}} - A_{\text{对照组}}) / A_{\text{补体组}}$$

2.2 提取分离

茯苓药材 (20 kg), 以 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 提取液经减压浓缩至原液的一半, 加适量 95% 乙醇醇沉, 静置滤过, 将滤液减压浓缩至无醇味。浓缩液加水制成水混悬液后依次用等体积醋酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得到醋酸乙酯部位 (103 g)、正丁醇部位 (67 g)、水部位 (56 g)。对各部位进行抗补体活性测定, 发现醋酸乙酯部位抗补体活性最好, 为 $CH_{50} = (0.52 \pm 0.01)$ g/L, 正丁醇部位 $CH_{50} = (2.68 \pm 0.01)$ g/L。

醋酸乙酯部位经硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱, 得 6 个馏份 (Fr. 1~6)。其中 Fr. 1 经反复硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯洗脱, 得到化合物 1 (13 mg); Fr. 2 经反复硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯 (20:1→6:1) 梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱纯化, 重结晶得化合物 2 (10 mg)。Fr. 3~4 经反复硅胶柱色谱, 并结合 Sephadex LH-20 柱色谱、重结晶及制备液相分离得到化合物 5 (13 mg)、6 (15 mg)、7 (12 mg)、8 (20 mg)、9 (16 mg)、10 (10 mg); Fr. 5 再经硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯洗脱后, 得到化合物 3 (10 mg)、4 (12 mg); Fr. 6 经 Sephadex LH-20 柱色谱及制备液相分离制备得到化合物 11

(14.8 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色针晶 (氯仿), mp 153~155 °C, ESI-MS m/z : 411 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.25 (1H, brd, $J = 5.4$ Hz, H-6), 5.08 (1H, dd, $J = 8.6, 12.5$ Hz, H-22), 4.95 (1H, dd, $J = 8.6, 12.5$ Hz, H-22), 3.54 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, s, H-21), 0.96 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-27), 0.82 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 140.8 (C-5), 138.5 (C-22), 129.4 (C-23), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.9 (C-17), 56.0 (C-14), 51.2 (C-24), 50.3 (C-9), 42.3 (C-4), 42.1 (C-13), 40.4 (C-24), 39.7 (C-12), 37.3 (C-1), 36.5 (C-10), 31.9 (C-25), 31.5 (C-2), 28.9 (C-16), 25.3 (C-28), 24.4 (C-15), 21.2 (C-27), 21.1 (C-11), 21.0 (C-21), 19.4 (C-19), 19.2 (C-26), 12.2 (C-29), 12.0 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物 **1** 为豆甾醇。

化合物 **2**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 427 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.69 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-29a), 4.61 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-29b), 3.21 (1H, dd, $J = 10.8, 4.8$ Hz, H-3), 1.68, 1.10, 1.01, 0.97, 0.83, 0.79, 0.76 (3H $\times$ 7, s, $CH_3\times 7$); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 151.2 (C-20), 110.0 (C-29), 79.3 (C-3), 55.6 (C-5), 50.6 (C-9), 48.6 (C-19), 48.3 (C-18), 43.0 (C-17), 42.2 (C-14), 41.1 (C-8), 40.2 (C-22), 38.8 (C-1), 38.5 (C-4), 38.1 (C-13), 36.9 (C-10), 35.6 (C-16), 34.4 (C-7), 29.9 (C-21), 29.6 (C-2), 28.2 (C-23), 27.6 (C-15), 25.4 (C-12), 21.2 (C-11), 19.4 (C-30), 18.5 (C-6), 18.1 (C-28), 15.9 (C-25), 15.7 (C-26), 15.4 (C-24), 14.2 (C-27)。以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **2** 为羽扇豆醇。

化合物 **3**: 白色针状结晶 (氯仿), ESI-MS m/z : 455 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CHCl_3$) δ : 5.27 (1H, brs, H-12), 3.21 (1H, dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz, H-3), 2.81 (1H, dd, $J = 13.6, 4.0$ Hz, H-18), 1.14 (3H, s, 27- CH_3), 0.98, 0.93, 0.91, 0.90, 0.78, 0.75 (3H $\times$ 6, s, 23, 24, 25, 26, 27, 29- CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CHCl_3$) δ : 183.6 (C-28), 143.6 (C-13), 122.7 (C-12), 79.0 (C-3), 55.3 (C-5), 47.8 (C-9), 46.5 (C-17), 45.9 (C-19), 41.5 (C-14), 40.9 (C-18), 39.3 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.1 (C-10), 33.8 (C-21), 33.1 (C-30), 32.7 (C-22), 32.4 (C-7), 30.6 (C-20), 28.1 (C-23), 27.8 (C-15), 27.2 (C-2), 25.9 (C-27), 23.6

(C-16), 23.3 (C-11), 22.9 (C-29), 18.4 (C-6), 17.2 (C-26), 15.6 (C-24), 15.3 (C-25)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **3** 为齐墩果酸。

化合物 **4**: 白色针状结晶 (氯仿), mp 240~245 °C。ESI-MS m/z : 479 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.19 (3H, s, H-27), 1.06 (3H, s, H-26), 1.04 (3H, s, H-25), 1.01 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, s, H-29), 0.98 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 180.2 (C-28), 138.7 (C-13), 123.4 (C-12), 78.3 (C-3), 55.6 (C-5), 52.7 (C-18), 48.5 (C-17), 47.2 (C-9), 42.3 (C-14), 39.8 (C-8), 39.6 (C-19), 39.5 (C-20), 38.5 (C-1), 38.0 (C-4), 37.8 (C-10), 37.2 (C-22), 33.9 (C-7), 30.3 (C-21), 29.1 (C-15), 27.5 (C-2), 25.5 (C-27), 24.6 (C-16), 23.9 (C-24), 23.7 (C-23), 23.5 (C-11), 21.5 (C-29), 18.7 (C-6), 17.6 (C-26), 16.5 (C-30), 16.3 (C-25)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **4** 为乌苏酸。

化合物 **5**: 白色针状晶体 (甲醇), mp 261~263 °C。ESI-MS m/z : 505 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 4.99, 4.86 (各 1H, s, H-31), 1.44 (3H, s, H-30), 1.12 (3H, s, H-29), 1.12 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-28), 0.99, 0.95 (各 3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27); ^{13}C -NMR (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 214.2 (C-3), 178.4 (C-21), 155.9 (C-24), 144.1 (C-9), 141.7 (C-8), 120.9 (C-7), 116.5 (C-11), 106.9 (C-31), 75.6 (C-16), 56.6 (C-17), 50.6 (C-5), 48.3 (C-14), 46.4 (C-4), 45.4 (C-13), 44.1 (C-15), 36.8 (C-10), 36.1 (C-12), 35.9 (C-1), 34.3 (C-25), 33.8 (C-23), 33.5 (C-2), 31.1 (C-22), 26.7 (C-29), 25.3 (C-30), 23.0 (C-6), 22.5 (C-20), 21.7 (C-26), 21.6 (C-19), 21.5 (C-27), 21.2 (C-28), 16.4 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **5** 为猪苓酸 C。

化合物 **6**: 白色晶体 (甲醇), mp 253~256 °C。ESI-MS m/z : 509 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 4.96, 4.81 (各 1H, s, H-31), 1.65 (3H, s, H-26), 1.45 (3H, s, H-30), 1.22 (3H, s, H-18), 1.13 (3H, s, H-19), 1.05 (3H, s, H-29), 0.99 (3H, s, H-28), 0.95, 0.97 (各 3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO) δ : 178.3 (C-21), 155.9 (C-24), 134.7 (C-8), 134.2 (C-9), 106.9 (C-31), 77.2 (C-3), 76.0 (C-16), 57.5 (C-17), 50.5 (C-5), 48.5 (C-20), 48.3

(C-14), 47.0 (C-20), 46.4 (C-13), 44.1 (C-15), 39.4 (C-4), 36.8 (C-10), 35.4 (C-1), 34.3 (C-25), 33.7 (C-23), 31.2 (C-22), 30.1 (C-12), 28.5 (C-2), 28.2 (C-28), 26.9 (C-7), 25.2 (C-30), 20.6 (C-26), 22.1 (C-27), 21.4 (C-11), 20.0 (C-19), 19.0 (C-6), 17.4 (C-18), 16.6 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **6** 为土莫酸。

化合物 **7**: 白色晶体 (甲醇), mp 253~256 °C。ESI-MS m/z : 507 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.51 (1H, s, H-7), 5.39 (1H, d, J = 5.0 Hz, H-11), 4.78 (1H, s, H-31), 1.45 (3H, s, H-30), 1.19 (3H, s, H-28), 1.06 (3H, s, H-19), 1.05 (3H, s, H-29), 1.04 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, d, J = 7.5 Hz, H-26), 0.98 (3H, d, J = 7.5 Hz, H-27); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 177.9 (C-21), 156.9 (C-24), 146.9 (C-9), 141.6 (C-8), 121.2 (C-7), 116.8 (C-11), 107.4 (C-31), 78.5 (C-3), 76.0 (C-16), 57.5 (C-17), 48.8 (C-14), 48.5 (C-20), 48.3 (C-5), 44.4 (C-13), 44.1 (C-15), 38.4 (C-4), 36.9 (C-10), 36.0 (C-1), 35.9 (C-12), 34.3 (C-25), 33.7 (C-23), 31.8 (C-22), 28.5 (C-2), 28.2 (C-28), 26.4 (C-30), 23.1 (C-6), 22.8 (C-19), 22.6 (C-26), 21.5 (C-27), 17.1 (C-18), 15.8 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **7** 为去氢土莫酸。

化合物 **8**: 白色针状晶体 (甲醇), mp 236~239 °C。ESI-MS m/z : 507 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 5.68 (1H, s, H-7), 5.52 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-11), 5.02 (1H, s, H-31), 4.58 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-16), 2.98 (1H, m, H-20), 2.90 (1H, m, H-17), 2.34 (1H, m, H-25), 1.45 (3H, s, H-30), 1.21 (3H, s, H-28), 1.12 (3H, s, H-19), 1.09 (3H, s, H-18), 1.03, 0.99 (各 3H, d, J = 6.5 Hz, H-26, 27), 0.98 (3H, s, H-29); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 177.3 (C-21), 153.9 (C-24), 145.2 (C-9), 141.5 (C-8), 115.5 (C-11), 121.9 (C-7), 106.5 (C-31), 77.6 (C-16), 74.7 (C-3), 56.5 (C-17), 49.5 (C-20), 49.3 (C-14), 44.7 (C-13), 43.5 (C-5), 44.1 (C-15), 37.4 (C-12), 36.8 (C-10), 36.5 (C-4), 34.3 (C-25), 33.7 (C-23), 31.2 (C-22), 31.1 (C-1), 27.2 (C-28), 26.6 (C-30), 26.5 (C-2), 24.0 (C-6), 23.5 (C-29), 22.6 (C-19), 22.0 (C-26), 20.5 (C-27), 16.7 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **8** 为 3-表-去氢土莫酸。

化合物 **9**: 白色针状晶体 (甲醇), mp 296~298

°C。ESI-MS m/z : 551 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 4.97, 4.71 (各 1H, s, H-31), 4.08 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-16), 2.31 (1H, m, H-25), 2.38 (1H, m, H-20), 1.75 (1H, dd, J = 11.0, 5.5 Hz, H-17), 1.53 (3H, s, H-30), 1.19 (3H, s, H-18), 1.13, 1.10 (各 3H, d, J = 6.5 Hz, H-26, 27), 1.00 (3H, s, H-28), 0.98 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-19); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 177.3 (C-21), 170.5 (CH₃CO), 155.9 (C-24), 135.5 (C-8), 134.9 (C-9), 106.1 (C-31), 80.7 (C-3), 77.6 (C-16), 56.5 (C-17), 50.9 (C-5), 49.5 (C-20), 49.3 (C-14), 45.7 (C-13), 44.1 (C-15), 37.5 (C-4), 36.8 (C-10), 34.9 (C-1), 34.3 (C-25), 33.7 (C-23), 31.2 (C-22), 29.4 (C-12), 27.2 (C-28), 26.9 (C-7), 25.5 (C-30), 24.5 (C-2), 21.6 (C-26), 21.5 (C-27), 21.1 (C-11), 20.9 (CH₃CO), 19.6 (C-19), 18.0 (C-6), 16.7 (C-18), 16.5 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **9** 为茯苓酸。

化合物 **10**: 白色针状晶体 (甲醇), mp 268~270 °C。ESI-MS m/z : 549 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 4.97, 4.88 (each 1H, s, H-31), 4.12 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-16), 2.48 (1H, m, H-20), 2.39 (1H, m, H-25), 1.79 (1H, dd, J = 11, 5.5 Hz, H-17), 1.53 (3H, s, H-30), 1.09 (3H, s, H-18), 1.00, 0.98 (各 3H, d, J = 6.5 Hz, H-26, 27), 0.98 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, s, H-28); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 178.3 (C-21), 170.9 (CH₃CO), 155.4 (C-24), 146.9 (C-9), 145.5 (C-8), 121.5 (C-7), 116.8 (C-11), 106.5 (C-31), 80.7 (C-3), 73.0 (C-16), 56.9 (C-17), 49.9 (C-5), 49.5 (C-20), 49.3 (C-14), 45.7 (C-13), 44.1 (C-15), 37.5 (C-4), 36.8 (C-10), 36.4 (C-12), 36.0 (C-1), 34.6 (C-25), 33.7 (C-23), 31.2 (C-22), 27.7 (C-28), 26.3 (C-30), 24.5 (C-2), 23.0 (C-6), 21.9 (CH₃CO), 21.8 (C-27), 21.6 (C-19), 21.2 (C-26), 17.7 (C-18), 16.8 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **10** 为去氢茯苓酸。

化合物 **11**: 白色针状晶体 (甲醇), mp 254~255 °C。ESI-MS m/z : 477 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.33 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-24), 1.65 (3H, s, H-26), 1.60 (3H, s, H-27), 1.20 (3H, s, H-28), 1.11 (3H, s, H-29), 1.04 (6H, s, H-19, 30), 0.98 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 177.3 (C-21), 145.7 (C-9), 141.4 (C-8), 130.3 (C-25), 123.9 (C-24),

120.2 (C-7), 115.5 (C-11), 76.9 (C-3), 48.5 (C-5), 48.5 (C-20), 48.3 (C-14), 47.5 (C-17), 43.4 (C-13), 38.4 (C-4), 36.8 (C-10), 35.3 (C-1), 35.1 (C-12), 31.2 (C-22), 30.1 (C-15), 27.5 (C-2), 27.2 (C-28), 26.0 (C-16), 24.7 (C-23), 24.6 (C-26), 24.4 (C-30), 21.9 (C-6), 21.8 (C-19), 16.5 (C-27), 15.8 (C-29), 15.4 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **11** 为松苓新酸。

4 化合物体外经典抗补体活性

测定了化合物 **1**~**11** 的体外经典抗补体活性, 结果发现三萜酸类化合物对经典途径的补体激活具有明显的抑制作用, CH_{50} 值在 0.10~0.27 g/L, 其他 2 个对经典途径的补体激活均无明显的抑制作用。结果见表 1。

表 1 化合物的体外经典抗补体活性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Anti-complementary activities of the fourteen compounds ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	$CH_{50}/(g \cdot L^{-1})$	化合物	$CH_{50}/(g \cdot L^{-1})$
1	NA	7	0.12 $\pm$ 0.02
2	NA	8	0.13 $\pm$ 0.01
3	0.20 $\pm$ 0.02	9	0.10 $\pm$ 0.02
4	0.27 $\pm$ 0.01	10	0.14 $\pm$ 0.05
5	0.18 $\pm$ 0.02	11	0.18 $\pm$ 0.02
6	0.15 $\pm$ 0.01	肝素	0.078 $\pm$ 0.01

NA-无抑制溶血活性

NA-no activity

5 讨论

补体系统是人体重要的免疫防御系统之一, 在消灭外来微生物、维持机体的平衡等生理过程中起着重要作用。然而该系统的过度激活会引发类风湿性关节炎、老年性痴呆、急性呼吸窘迫综合征以及系统性红斑狼疮等多种疾病^[14]。

非典期间, 中药对非典型肺炎 (SARS) 的防治效果显著, 而 SARS 也与补体的过度激活有关^[15], 因此, 直接从天然产物中开发出高效低毒的补体抑制剂成为可能。茯苓主要的非多糖类化学成分为三萜酸类化合物, 本研究发现三萜酸类化合物是其主要的抗补体活性成分, 通过体外经典抗补体活性研究表明 **3**~**11** 对补体激活的经典途径有明显的抑制作用, 另外也揭示了一定的构效关系。其中化合物 **3** 和 **4** 的 C-18 位及化合物 **5**~**11** 的 C-20 位的羧基

是三萜酸类发挥抗补体活性的重要官能团, 这一结果与文献报道^[16]一致。因此, 三萜酸类抗补体活性成分是茯苓非多糖类化学成分的重要药效物质, 但仍需要进一步的实验对这些活性成分进行药理作用机制研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 沈玉萍, 李 军, 贾晓斌. 中药茯苓化学成分的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 28(3): 297-300.
- [3] 金 惠, 赵英博, 江 维, 等. 茯苓药理作用及临床应用研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2008, 30(4): 59-61.
- [4] Xu H, Zhang Y Y, Zhang J W, *et al.* Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7: 175-182.
- [5] 倪付勇, 温建辉, 李 明, 等. 金银花化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3689-3692.
- [6] 王同为, 黄丽刚, 陈光英, 等. 毛叶鹰爪花中化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1670-1675.
- [7] 柏玉冰, 李 春, 周亚敏, 等. 夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3623-3629.
- [8] 高品一. 金樱子的化学成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [9] Zhou L, Zhang Y, Gapter L A, *et al.* Cytotoxic and anti-oxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from *Poria cocos* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(10): 1459-1462.
- [10] 王 帅, 姜艳艳, 朱乃亮, 等. 茯苓化学成分分离与结构鉴定 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(12): 841-844.
- [11] Takaakit T, Testsuro S H, Tohru K, *et al.* Isolation of lanostane-type triterpene acid having an acetoxyl group from sclerotia of *Poria cocos* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(1): 225-231.
- [12] Tai T, Akahori A, Shingu T. Triterpenes of *Poria cocos* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(5): 1239-1244.
- [13] 杨鹏飞. 桂枝茯苓胶囊及其单味药茯苓化学成分和生物活性研究 [D]. 北京: 中国医学科学院, 2012.
- [14] Makridea S C. Therapeutic inhibition of the complement system [J]. *Pharmacol Rev*, 1988, 50(1): 59-88.
- [15] Zhang T, Chen D F. Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 351-361.
- [16] Thuong P T, Min B S, Jin W Y. Anti-complementary activity of ursane-type triterpenes from *Weigela subsessilis* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(4): 830-833.