基于 NMR 指导的六神曲成分研究

张慧茹[1]，张婷婷[1,2]，许 枏[1*]，付 鸣[1]，李泽煜[1]
1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连 116600
2. 锦州市中心医院，辽宁 锦州 121000

摘 要：目的 研究六神曲的化学成分。**方法** 运用各种色谱技术分离六神曲的化学成分，并利用理化性质和波谱技术鉴定其结构。**结果** 从六神曲中分离得到 11 个成分，分别鉴定为 5-二十五烷基间苯二酚（**1**）、5-十七烷基间苯二酚（**2**）、5-二十一烷基间苯二酚（**3**）、5-二十三烷基间苯二酚（**4**）、(9*S*,10*E*,12*Z*)-9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid（**5**）、*trans*-4-hydroxy-2-nonenoic acid（**6**）、9,10,11-trihydroxy-11(*E*)-octadecenoic acid（**7**）、(9*S*,12*R*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid（**8**）、(9*S*,12*S*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid（**9**）、(9*S*,12*S*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid methyl ester（**10**）、9,12(*Z*)-octadecadienoic acid methyl ester（**11**）。**结论** 化合物 **1**～**11** 均为首次从六神曲中分离得到。抗炎活性研究显示，六神曲氯仿提取物和化合物 **8** 均显示出良好的抗炎活性。

关键词：六神曲；5-二十五烷基间苯二酚；5-十七烷基间苯二酚；三羟基-十八碳烯酸；(9*S*,12*R*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecaenoic acid

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2019)16 - 3764 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.005

NMR-based study of chemical constituents of *Massa Medicata Fermentata*

ZHANG Hui-ru[1], ZHANG Ting-ting[1,2], XU Nan[1], FU Ming[1], LI Ze-yu[1]
1. School of pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China
2. Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121000, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from Medicated Leaven (namely *Massa Medicata Fermentata* in Chinese). **Methods** Compounds were isolated and purified from chloroform extract of Medicated Leaven by column chromatograph of silica gel, ODS, Sephadex LH-20, HPLC, and their structure were elucidated on the basis of spectral data and physicochemical property. **Results** Eleven chemical compounds were identified as 5-pentacosyl resorcinol (**1**), 5-heptadecyl resorcinol (**2**), 5-heneicosyl resorcinol (**3**), 5-tricosyl resorcinol (**4**), (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-hydroxy-10,12-octadeca-dienoic acid (**5**), *trans*-4-hydroxy-2-nonenoic acid (**6**), 9,10,11-trihydroxy-11(*E*)-octadecenoic acid (**7**), (9*S*,12*R*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid (**8**), (9*S*,12*S*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid (**9**), (9*S*,12*S*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid methyl ester (**10**), and 9,12(*Z*)-octadecadienoic acid methyl ester (**11**). **Conclusion** All above compounds are all isolated from *Massa Medicata Fermentata* for the first time, and the chloroform extract of *Massa Medicata Fermentata* and compound **8** showed inhibitory effect against TNF-α generation of RAW 264.7 induced by LPS in a dose-dependent manner.

Key words: *Massa Medicata Fermentata*; 5-pentacosyl resorcinol; 5-heptadecyl resorcinol; trihydroxy-octadecenoic acid; (9*S*,12*R*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid

六神曲被誉为中药第一曲，应用广泛，是由面粉、赤小豆、苦杏仁、辣蓼、苍耳草、青蒿等原料经固体发酵工艺制成的[1]。由于采用自然接种的方式，发酵过程中微生物体系十分复杂[2-5]。不同地区的地方标准不同，生产工艺不尽相同，突出表现为原料、发酵时间和终点控制的不统一。原料上，有用鲜青蒿、辣蓼和苍耳的，也有用干品的。发酵终点判断虽基本以霉衣生长程度为指标，但有要求白

收稿日期：2019-02-02
基金项目：2015 年国家公益性行业专项课题（201507009-03）
作者简介：张慧茹（1994—），女，硕士研究生，从事天然化学成分研究。Tel: (0411)85890191 E-mail: 578496417@qq.com
***通信作者** 许 枏（1968—），女，博士，教授，从事中药有效成分及其质量研究。Tel: (0411)85890191 E-mail: xudanbs@163.com

色的，也有要求黄白色的，还有要求黄色的；发酵时间也从 48 h 至 7 d 不等，导致目前市场上销售的六神曲质量参差不齐，甚至出现以其他物质代替面粉制成的伪品[6-7]，严重影响六神曲临床用药安全。产生上述问题的根本原因是六神曲的有效成分不清楚，生产工艺和质量控制缺乏可靠的依据。前期本课题组采用 NMR 技术对其成分的组成及类型做了初步鉴定，发现其中含有较大量的长链烯酸类化合物[8]。为深入研究六神曲的化学成分，揭示其活性成分，本实验以 NMR 技术为指导，在对六神曲的氯仿提取物的化学类型认识基础上，进行成分分离，从中得到 11 个化学成分，分别鉴定为 5-二十五烷基间苯二酚（5-pentacosy lreso rcinol，**1**）、5-十七烷基间苯二酚（5-heptadecy lresorcinol，**2**）、5-二十一烷基间苯二酚（5-heneicosy lresorcinol，**3**）、5-二十三烷基间苯二酚（5-tricosy lresorcinol，**4**）、(9*S*,10*E*,12*Z*)-9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid（**5**）、*trans*-4-hydroxy-2-nonenoic acid（**6**）、9,10,11-trihydroxyl-11(*E*)-octadecenoic acid（**7**）、(9*S*,12*R*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecaenoic acid（**8**）、(9*S*,12*S*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecaenoic acid（**9**）、(9*S*,12*S*,13*S*)-9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid methyl ester（**10**）、9,12(*Z*)-octadecadienoic acid methyl ester（**11**）。所有化合物均为首次从六神曲中分离得到。细胞实验表明，六神曲氯仿提取物有良好抗炎活性。

1 材料与仪器

Burker Avance 600 型核磁共振光谱仪（瑞士布鲁克公司）；GCMS-QP5050A 质谱仪（日本岛津公司）；硅胶（青岛海立信精细硅胶化工有限公司）；Sephadex LH-20（瑞士 Pharmacia 公司）；ODS C_{18} 反相硅胶（日本富士化学公司）；Agilent C_{18} 色谱柱（100 mm×4.6 mm，2.7 μm，安捷伦公司）。肿瘤坏死因子（TNF-α）ELISA 试剂盒（上海朗顿生物科技有限公司）。正己烷、环己烷、醋酸乙酯、氯仿、丙酮、甲醇、乙醇、氨水、盐酸、二乙胺均为分析纯（天津科密欧化学试剂有限公司）；水用娃哈哈纯净水。

六神曲，由中国药材集团公司提供（批号 20160522），原料经辽宁中医药大学贾天柱教授鉴定，苍耳子为菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 的干燥成熟带总苞的果实、赤小豆为豆科植物赤小豆 *Vina umbellate* (Thunb.) Ohwi et Ohashi 的干燥成熟种子、苦杏仁为蔷薇科植物东北杏 *Prunus mandshurica* (Maxim) Koehne 的干燥成熟种子；辣廖为蓼科植物伏毛蓼 *Polygonum pubescens* Blume 的干燥全草；面粉购自沈阳香雪面粉股份有限公司；麦麸购自长春市药材公司。

2 提取与分离

取六神曲 2 kg，加氯仿浸渍提取 2 周，减压回收溶剂，得浸膏 175 g。取上述浸膏 150 g，用氯仿-甲醇（1∶1）混合溶剂溶解，经硅胶柱色谱，以环己烷-醋酸乙酯（50∶1、30∶1、20∶1、10∶1、5∶1）梯度洗脱，每 250 毫升收集 1 个流分，回收溶剂，经薄层检识（氯仿-丙酮-甲酸 10∶3∶0.2，香草醛-浓硫酸加热显色），合并相同成分流分，得到 4 个流分 Fr. 1～4。流分 Fr. 3 经硅胶柱色谱，以氯仿-丙酮（50∶1→10∶1）梯度洗脱，经薄层检识，合并相同斑点流分，得到流分 Fr. 3-a（氯仿-丙酮 30∶1 洗脱部分）与 Fr. 3-b（氯仿-丙酮 10∶1 洗脱部分）。流分 Fr. 3-a 经 Sephadex LH-20 柱色谱脱色后（以氯仿-甲醇 1∶1 洗脱），经高效液相液色谱制备（甲醇-水 90∶10）得化合物 **1**（11 mg）、**2**（55 mg）、**3**（10 mg）、**4**（5 mg）。Fr. 2 经 Sephadex LH-20 柱色谱脱色后（以氯仿-甲醇 1∶1 洗脱），再经高效液相色谱制备（甲醇-水 87∶23），得化合物 **5**（15 mg）。流分 Fr. 2 经硅胶柱色谱分离，以氯仿-甲醇（50∶1→20∶1）梯度洗脱，再经 ODS-C_{18} 中压柱色谱分离，以甲醇-水（30∶70→90∶10）梯度洗脱，其中甲醇- 水（30∶70）洗脱部分再经制备液相色谱制备（甲醇-水 50∶50）得到化合物 **6**（30 mg）。甲醇-水（60∶40）洗脱部分得化合物 **7**（8 mg）。甲醇-水（70∶30）洗脱部分析出固体物，得化合物 **8**（21 mg）。甲醇-水（80∶20）洗脱部分经 Sephadex LH-20 色谱柱纯化（以氯仿-甲醇 1∶1 洗脱），得化合物 **9**（32 mg）。流分 Fr. 1 经硅胶柱色谱，以环己烷-醋酸乙酯（50∶1→20∶1）梯度洗脱，其中环己烷-醋酸乙酯（50∶1）洗脱部分经 Sephadex LH-20 柱色谱脱色纯化后得化合物 **10**（35 mg）。环己烷-醋酸乙酯（20∶1）部分经 Sephadex LH-20 柱色谱纯化得到化合物 **11**（40 mg）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：无色粉末，硫酸显红色，三氯化铁显灰红色。ESI-MS *m/z*: 459 $[M-H]^-$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.87 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-31), 1.25 (44H, s, H-9～30), 1.56 (2H, m, H-8), 2.47 (2H, t, J =

7.6 Hz, H-7), 6.18 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-2), 6.24 (2H, d, J = 2.0 Hz, H-4, 6)；^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 156.7 (C-1, 3), 100.4 (C-2), 107.9 (C-4, 6), 146.1 (C-5), 35.8 (C-7), 31.9 (C-8), 31.1 (C-9), 30.9 (C-10), 29.3～29.7 (C-11～29), 22.7 (C-30), 14.1 (C-31)。以上光谱数据与文献对照基本一致[9]，故鉴定化合物 **1** 为 5-二十五烷基间苯二酚。

化合物 **2**：无色粉末，硫酸显红色，三氯化铁显灰红色。EIS-MS m/z: 347 [M－H]$^-$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-23), 1.25 (28H, s, H-9～22), 1.56 (2H, m, H-8), 2.48 (2H, t, J = 7.6 Hz, H-7), 6.17 (1H, brs, H-2), 6.24 (2H, brs, H-4, 6)；^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 156.6 (C-1, 3), 100.1 (C-2), 108.0 (C-4, 6), 146.2 (C-5), 35.8 (C-7), 31.9 (C-8), 31.1 (C-9), 29.3～29.7 (C-10～21), 22.7 (C-22), 14.1 (C-23)。将该化合物的光谱数据与文献对照基本一致[9]，故鉴定化合物 **2** 为 5-十七烷基间苯二酚。

化合物 **3**：无色粉末，硫酸显红色，三氯化铁显灰红色。ESI-MS m/z: 403 [M－H]$^-$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-27), 1.25 (36H, s, H-9～26), 1.56 (2H, m, H-8), 2.48 (2H, t, J = 7.6 Hz, H-7), 6.18 (1H, brs, H-2), 6.24 (2H, brs, H-4, 6)；^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 156.6 (C-1, 3), 100.1 (C-2), 108.0 (C-4, 6), 146.2 (C-5), 35.8 (C-7), 31.9 (C-8), 31.1 (C-9), 29.3～29.7 (C-10～25), 22.7 (C-26), 14.1 (C-27)。以上光谱数据与文献对照基本一致[9]，故鉴定化合物 **3** 为 5-二十一烷基间苯二酚。

化合物 **4**：无色粉末，硫酸显红色，三氯化铁显灰红色。ESI-MS m/z: 431 [M－H]$^-$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-29), 1.25 (40H, s, H-9～28), 1.56 (2H, m, H-8), 2.48 (2H, t, J = 7.6 Hz, H-7), 6.17 (1H, brs, H-2), 6.24 (2H, brs, H-4, 6)。以上光谱数据与文献对照基本一致[8]，故鉴定化合物 **4** 为 5-二十三烷基间苯二酚。

化合物 **5**：无色粉末，硫酸-香草醛显暗红色，溴甲酚绿显黄色。ESI-MS m/z: 295.1 [M－H]$^-$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.92 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-18), 1.30～1.61 (16H, m, H-3～8, 15, 16), 2.21 (2H, q, J = 7.2 Hz, H-14), 2.28 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-2), 4.09 (1H, brq, J = 6.8 Hz, H-9), 5.42 (1H, m, H-13), 5.63 (1H, dd, J = 15.2, 6.8 Hz, H-10), 5.99 (1H, dt, J = 11.1, 11.0 Hz, H-12), 6.50 (1H, dd, J = 15.2, 11.1 Hz, H-11)；^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 176.3 (C-1), 33.6 (C-2), 24.7 (C-3), 28.7～28.9 (C-4～8), 72.0 (C-9), 135.9 (C-10), 125.1 (C-11), 128.0 (C-12), 131.5 (C-13), 27.2 (C-14), 29.3 (C-15), 31.6 (C-16), 22.3 (C-17), 13.0 (C-18)。以上光谱数据与文献对照基本一致[10]，故鉴定化合物 **5** 为 (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid。

化合物 **6**：无色粉末，硫酸-香草醛显浅红色，溴甲酚绿显黄色。ESI-MS m/z: 171 [M－H]$^-$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.81 (1H, dd, J = 15.6, 5.8 Hz, H-3), 5.97 (1H, dt, J = 15.6, 1.4 Hz, H-2), 4.20 (1H, td, J = 5.8, 6.0 Hz, H-4), 1.33～1.54 (8H, m, H-5～8), 0.91 (3H, t, J = 6.9 Hz, H-9)；^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 170.8 (C-1), 124.7 (C-2), 145.7 (C-3), 70.4 (C-4), 36.3 (C-5), 24.7 (C-6), 31.5 (C-7), 22.2 (C-8), 13.0 (C-9)。以上光谱数据与文献对照基本一致[11]，故鉴定化合物 **6** 为 *trans*-4-hydroxy-2-nonenoic acid。

化合物 **7**：无色粉末，硫酸-香草醛显蓝色，溴甲酚绿显黄色。ESI-MS m/z: 331 [M＋H]$^+$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 5.45～5.57 (2H, m, H-12, 13), δ 4.46 (1H, dd, J = 9.3, 4.1 Hz, H-11), 3.72 (1H, m, H-9), 3.26 (1H, dd, J = 7.3, 4.1 Hz, H-10), 2.23 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-2), 1.60 (2H, m, H-3), 1.50 (2H, m, H-8), 1.34 (2H, m, H-17), 0.90 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-18)；^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 178.2 (C-1), 35.4 (C-2), 26.3, 29.4, 29.5, 29.6, 30.7 (C-3～7), 34.8 (C-8), 71.9 (C-9), 77.0 (C-10), 69.2 (C-11), 134.8 (C-12), 130.8 (C-13), 29.0 (C-14), 29.4 (C-15), 32.7 (C-16) 23.7 (C-17), 14.5 (C-18)。以上光谱数据与文献对照基本一致[12]，故鉴定化合物 **7** 为 9,10,11-trihydroxy-12(*Z*)-octadecaenoic acid。

化合物 **8**：无色粉末，硫酸-香草醛显蓝色，溴甲酚绿显黄色。EI-MS m/z: 330 [M]$^+$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 5.71 (1H, dd, J = 15.5, 5.8 Hz, H-11), 5.70 (1H, dd, J = 15.5, 5.8 Hz, H-10), 4.06 (1H, ddd, J = 6.5, 6.0, 5.0 Hz, H-9), 3.92 (1H, tdd, J = 5.5, 4.5 Hz, H-12), 3.46 (1H, m, H-13), 2.28 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-2), 1.60 (2H, m, H-3), 1.50 (2H, m, H-8), 1.34 (2H, m, H-17), 0.93 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-18)；^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 176.4 (C-1), 35.8 (C-2), 25.4, 25.8, 29.4, 29.5, 29.7 (C-3～7), 37.3 (C-8), 72.0 (C-9), 130.0 (C-10), 135.5 (C-11), 74.8

(C-12), 75.5 (C-13), 32.1 (C-14), 25.6 (C-15), 32.7 (C-16), 22.7 (C-17), 13.4 (C-18)。以上数据与文献对照基本一致[13]，故鉴定化合物 **8** 为 (9*S*,12*R*,13*S*)-(*E*)-9,12,13-trihydroxy-10-octadecaenoic acid。

化合物 **9**：无色粉末，硫酸-香草醛显蓝色，溴甲酚绿显黄色。EI-MS *m*/*z*: 330 $[M]^+$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) *δ*: 5.73 (1H, dd, *J* = 15.5, 5.8 Hz, H-11), 5.65 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.4 Hz, H-10), 4.06 (1H, ddd, *J* = 6.0, 5.5, 5.0 Hz, H-9), 3.92 (1H, dd, *J* = 5.0, 4.5 Hz, H-12), 3.46 (1H, m, H-13), 2.28 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-2), 1.60 (2H, m, H-3), 1.50 (2H, m, H-8), 1.34 (2H, m, H-17), 0.93 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18)；^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) *δ*: 176.8 (C-1), 34.0 (C-2), 25.4, 25.7, 29.4, 29.5, 29.7 (C-3～7), 37.2 (C-8), 72.3 (C-9), 130.2 (C-10), 135.7 (C-11), 74.7 (C-12), 75.7 (C-13), 32.1 (C-14), 25.4 (C-15), 32.7 (C-16) 22.6 (C-17), 13.4 (C-18)。以上光谱数据与文献对照基本一致[14-15]，故鉴定化合物 **9** 为 (9*S*,12*S*,13*R*)-(*E*)-9,12,13-trihydroxy-10-octadecaenoic acid。

化合物 **10**：无色粉末，硫酸-香草醛显蓝色。ESI-MS *m*/*z*: 344 $[M]^+$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) *δ*: 5.71 (1H, dd, *J* = 15.5, 5.8 Hz, H-11), 5.67 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.4 Hz, H-10), 4.04 (1H, ddd, *J* = 5.8 Hz, H-9), 3.92 (1H, dd, *J* = 10.4 Hz, H-12), 3.64 (3H, s, H-19), 3.42 (1H, m, H-13), 2.30 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-2), 1.60 (2H, m, H-3), 1.50 (2H, m, H-8), 1.34 (2H, m, H-17), 0.90 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18)；^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) *δ*: 175.0 (C-1), 33.8 (C-2), 25.0, 25.5, 29.1, 29.3, 29.5 (C-3～7), 37.2 (C-8), 72.1 (C-9), 129.9 (C-10), 135.5 (C-11), 74.7 (C-12), 75.5 (C-13), 32.1 (C-14), 29.4 (C-15), 32.5 (C-16) 22.7 (C-17), 13.4 (C-18), 50.9 (OCH_3)。以上光谱数据与文献对照基本一致[15]，故鉴定化合物 **10** 为 (9*S*,12*S*,13*R*)-9,12,13-trihydroxy-10-octadecaenoic acid methyl ester。

化合物 **11**：无色粉末，硫酸-香草醛显蓝色。EI-MS *m*/*z*: 294 $[M]^+$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 5.32～5.37 (4H, m, H-9～12), 3.66 (3H, s, OCH_3), 2.30 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-2), 1.60 (22H, m, H-3～17), 0.86 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18)；^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 174.2 (C-1), 31.9 (C-2), 25.0, 25.5, 29.1, 29.2, 29.3 (C-3～7), 29.6 (C-8), 130.1 (C-9), 128.0 (C-10), 34.8 (C-11), 129.9 (C-12), 127.8 (C-13), 31.5 (C-14), 29.4 (C-15), 32.5 (C-16) 22.7 (C-17), 13.4 (C-18), 51.4 (OCH_3)。以上光谱数据与文献对照基本一致[16]，故鉴定化合物 **11** 为 9,12(*Z*)-octadecadienoic acid methyl ester。

4 抗炎作用研究

实验以先期建立的 RAW264.7 细胞 LPS 耐受模型进行六神曲提取物抗炎作用评价。用含 10% 胎牛血清（FBS）的 RPMI 1640 的细胞培养液将 RAW264.7 细胞制成 5×10^5 个/mL 的浓度，每孔 1 mL 接种于 24 孔板中，再加入脂多糖（LPS）使质量浓度达到 200 ng/mL，置于二氧化碳培养箱 37℃孵育 4 h，弃去上清液，得到 RAW264.7 细胞 LPS 耐受模型。然后设置模型组、模型细胞＋不同浓度六神曲氯仿提取物（SQE）组和模型细胞＋不同浓度化合物 **8** 组。各孔加入无血清 RPMI 1640 培养基 1 mL，其中受试药物组分别加入用 1% DMSO 配制的用于分离单体成分的 SQE 和化合物 **8** 各 10 μL（每组 2 个复孔），终浓度分别为 5、10、25、50、100 μmol/L，模型组（4 孔）加入同体积 1% DMSO，置于二氧化碳培养箱中 37 ℃孵育 12 h，离心，收集细胞培养液，用 ELISA 试剂盒，按照操作说明用酶标仪测定 TNF-α 含量。数据经 SPSS 15.0 软件统计分析，结果见表 1。

由表 1 可见，SQE 与化合物 **8** 均有降低模型细胞分泌 TNF-α 的作用，且呈剂量依赖趋势，其中 10、25、50、100 μmol/L 浓度的作用显著（*P*＜0.05）。提示 SQE 可能是通过降低 TNF-α 含量发挥抗炎作用的。

表 1 六神曲氯仿提取物对 LPS 诱导的巨噬细胞分泌 TNF-α 影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 1 Inhibition of LPS-induced TNF-α production by $CHCl_3$ extract of *Massa Medicata Fermentata* ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(μmol·L^{-1})	TNF-α/(pg·mL^{-1})
模型	0	185.26±15.33
SQE	5	170.33±14.27
	10	106.54± 9.98*
	25	89.13± 7.66**
	50	70.42± 5.17**
	100	59.49± 4.86**
8	5	172.48±11.94
	10	117.11±12.03*
	25	95.43± 8.01**
	50	83.22± 7.24**
	100	76.37± 2.19**

与模型组比较：*P＜005 **P＜0.01

*P < 005 **P < 0.01 *vs* model group

5 讨论

六神曲化学成分研究报道极少，其主要成分的类型不清楚。为了增加成分分离的针对性，本实验首先对 SQE 进行 NMR 分析。由 SQE 的 HSQC 谱对高场区的 6 组 sp3 杂化碳上质子信号的归属，结合 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中烯质子 (δ 5.34, m) 与其他质子的偶合关系，及 TOCSY 谱和 HMBC 谱中 sp2 杂化碳 δ 128.0、130.0、173.3 的相关信号，提示提取物中存在结构具有 CH_3-$(CH_2)_n$-CH_2-CH=CH-CH_2-$(CH_2)_m$- 和 HOOC-CH_2-CH_2-$(CH_2)_m$- 片段的含量较大的化合物。基于上述信息指导，利用 sephadex LH-20、MCI 色谱的吸附性特征反复纯化，并合理设置 UV 吸收波长进行 HPLC 制备，从六神曲中分离多种碳烯酸类成分。很好地实现了 NMR 技术对成分分离的指导作用。

实验所用 RAW264.7 细胞 LPS 耐受模型为本实验先期建立的稳定细胞模型，已证实该所制备的模型细胞分泌 TNF-α 量较正常 RAW264.7 细胞显著增加。且因该实验是基于抗溃疡性结肠炎整体实验基础上探索药物抗炎途径，故未设置阳性药组，仅设模型组。

因文献报道三羟基-十八碳烯酸类成分（THOD）有抗炎、抗氧化等多种活性[17]。故本实验考察 SQE 和单体化合物 **8** 的活性。结果显示，化合物 **8** 与总提取物的抗炎活性近似，说明 SQE 具有良好的抗炎活性，THOD 可能是其活性物质。

参考文献

[1] 高 慧, 贾天柱. 六神曲研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13(8): 491-493.

[2] 陈 娟, 焦晓琳, 杨春勇, 等. 分离培养方法结合 PCR-SSGP 技术分析六神曲中的真菌类群 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4169-4173.

[3] 邬吉野, 李 莹, 王德馨, 等. 六神曲的发酵菌种分离及纯种发酵考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 12-14.

[4] 王秋红, 苏 阳, 王荔慧. 六神曲中真菌的分离与鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 122-127.

[5] 张丽霞, 高文远, 王海洋, 等. 六神曲中酵母菌的鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1929-1931.

[6] 王海洋, 高文远, 张丽霞, 等. 六神曲不同的制备工艺对其淀粉酶活力的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2084-2087.

[7] 张南方, 韩顺意, 张义生. 六神曲质量标准研究 [J]. 中医学报, 2015, 30(1): 98-100.

[8] 曹美娇, 张婷婷, 许 枬, 等. NMR 法分析鉴定神曲的发酵产物 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(2): 183-187.

[9] 冯 煦, 姜 东, 单 宇, 等. 小麦麸皮的化学成分 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 27-29.

[10] Hartmut K, Rainer W, Lutz A, *et al*. Occurrence of free and esterified lipoxygenase products in leaves of *Glechoma hederacea* L. and other Labiatae [J]. *Eur J Biochem*, 1989, 186(1/2): 155-162.

[11] Mu L H, Ju Q F, Liu P, *et al*. Chemical constituents of the roots of *Pottsia laxiflora* [J]. *Chem Nat Compds*, 2013, 48(6): 1004-1007.

[12] Gao J M, Wang C Y, Zhang A L, *et al*. A new trihydroxy fatty acid from the Ascomycete, Chinese truffle *Tuber indicum* [J]. *Lipids*, 2001, 36(12): 1366-1370.

[13] Liu M J, Liu M C, Gong H Y, *et al*. Chemical constituents of *Thalictrum ichangense* [J]. *Chem Nat Compds*, 2015, 51(1): 175-177.

[14] Kuo T M, Manthey L K, Hou C T. Fatty acid bioconversions by pseudomonas aeruginosa PR_3 [J]. *J Ame Oil Chem Soc*, 1998, 75(7): 875-879.

[15] Shirahata T, Sunazuka T, Yoshida K, *et al*. Total synthesis, elucidation of absolute stereochemistry, and adjuvant activity of trihydroxy fatty acids [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(40): 9483-9496.

[16] Hanagata H, Shida O, Takagi H. Taxonomic homogeneity of a salt-tolerant lactic acid bacteria isolated from shoyu mash [J]. *J General Appl Microbiol*, 2003, 49(2): 95-100.

[17] Venkat N V, Holger J, Richard L K, *et al*. Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 785(17): 70-76.