

## 蓬莪术吉玛烷型倍半萜化学成分研究

李小翠<sup>1,2</sup>, 陈金凤<sup>1,2</sup>, 熊亮<sup>1,2</sup>, 彭成<sup>1</sup>, 郭力<sup>1,2\*</sup>, 刘菲<sup>1,2\*</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学, 西南特色药材创新药物成分研究所, 四川 成都 611137

**摘要:** 目的 研究蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* 根茎中吉玛烷型倍半萜化学成分及其抗血小板聚集活性。方法 采用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱、反相中压液相色谱、制备薄层色谱及半制备高效液相色谱等技术进行分离纯化, 运用现代波谱学手段鉴定各化合物的结构, 采用计算电子圆二色谱 (ECD) 方法确定新化合物的绝对构型; 对分离得到的相应化合物分别进行了体外腺苷-5'-二磷酸钠盐 (ADP) 及花生四烯酸 (AA) 诱导的抗血小板聚集活性筛选。结果 从蓬莪术茎 95% 乙醇提取物的中醋酸乙酯及正丁醇萃取部位共分离得到 8 个吉玛烷型倍半萜, 分别鉴定为新蓬莪术环氧酮 (1)、curdionolide B (2)、curdionolide A (3)、(-)-phaeocaulin A (4a)、(+)-phaeocaulin A (4b)、heyneanone C (5)、(4S,5S)-13-hydroxygermacrone 4,5-epoxide (6)、phagermadiol (7), 测试了分离所得化合物 1~3、6 对 ADP 及 AA 诱导的抗血小板聚集活性。结论 共从蓬莪术中分离得到 8 个吉玛烷型倍半萜, 其中化合物 1 为新化合物, 并通过计算 ECD 确定了绝对构型, 其对 ADP 及 AA 诱导的血小板聚集具有一定的抑制作用; 化合物 4a 和 4b 为一对对映异构体; 化合物 2、3、5、6 均为首次从蓬莪术中分离得到。

**关键词:** 蓬莪术; 吉玛烷型倍半萜; 计算电子圆二色谱; 抗血小板聚集活性; 新蓬莪术环氧酮

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)01-0028-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.005

## Study on germacrane-type sesquiterpenoids from *Curcuma phaeocaulis*

LI Xiao-cui<sup>1,2</sup>, CHEN Jin-feng<sup>1,2</sup>, XIONG Liang<sup>1,2</sup>, PENG Cheng<sup>1</sup>, GUO Li<sup>1,2</sup>, LIU Fei<sup>1,2</sup>

1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

2. Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To study the chemical constituents and anti-platelet aggregative activities of germacrane-type sesquiterpenoids from the rhizome of *Curcuma phaeocaulis*. **Methods** Ethyl acetate and *n*-butanol fractions were separated and purified by silica gel column, sephadex LH-20 column, reversed-phase medium pressure chromatography, preparative thin-layer chromatography, and semi-preparative high performance liquid chromatography. The structures of isolates were determined by modern spectroscopy techniques, and the absolute configuration of new compound was identified by calculating ECD. The isolates were tested for their effects on ADP- and AA-induced platelet aggregation. **Results** Eight germacrane-type sesquiterpenoids were isolated from the rhizome of *C. phaeocaulis*, and identified as neozederone epoxide (1), curdionolide B (2), curdionolide A (3), (-)-phaeocaulin A (4a), (+)-phaeocaulin A (4b), heyneanone C (5), (4S,5S)-13-hydroxygermacrone 4,5-epoxide (6), phagermadiol (7). The anti-platelet aggregation effects of compounds 1~3 and 6 were tested by suppressing ADP- and AA-induced platelet aggregation. **Conclusion** Eight germacrane-type sesquiterpenoids were isolated from *C. phaeocaulis*. Compound 1 is a new compound, and the absolute configuration of 1 is determined by calculating ECD, and compound 1 has a certain inhibitory effect on

收稿日期: 2020-09-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81903777); 国家自然科学基金项目 (82022072); 中国博士后科学基金资助项目 (2019M653362); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划 (BSH2018009); 四川省青年科技创新研究团队专项计划项目 (2017TD0001, 2016TD0006)

作者简介: 李小翠 (1994—), 在读硕士, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: 1527407972@qq.com

\*通信作者: 刘菲 (1989—), 博士, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: feifeifly555@126.com

郭力 (1964—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药化学成分及药效物质基础研究。E-mail: gli64@sina.com

ADP- and AA-induced platelet aggregation. Compounds **4a** and **4b** are a pair of enantiomers. Furthermore, compounds **2**, **3**, **5** and **6** are isolated from the rhizome of *C. phaeocaulis* for the first time.

**Key words:** *Curcuma phaeocaulis* Val.; germacrane-type sesquiterpenoids; ECD calculation; anti-platelet aggregative activity; neozederone epoxide

莪术为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val.、广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 或温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎, 是传统的活血化瘀中药, 药用历史悠久, 具有行气破血、消积止痛的功效, 临床上常用于治疗痛经、瘀血经闭、胸痹心痛等妇科疾病和心血管疾病<sup>[1-3]</sup>。现代研究表明, 莪术具有抗血小板聚集、抗血栓、抗炎、抗肿瘤等活性, 有效成分主要为挥发油和姜黄素类成分, 其中挥发油以倍半萜为主<sup>[4-8]</sup>。目前对莪术“活血”功效研究多集中于提取物、姜黄素类化合物及莪术二酮等量大的萜类成分, 生物活性涉及抗血小板聚集、抗血栓等, 可见关于莪术萜类单体成分的活血作用相关研究还明显不足<sup>[9-11]</sup>。基于此思考, 本课题组前期选择川产道地药材蓬莪术进行了一系列探索, 通过抗血小板聚集活性筛选发现莪术萜类及姜黄素类成分均具有抗血小板聚集活性, 但萜类强于姜黄素类成分。可见, 萜类成分可能是莪术传统功效物质基础之一, 是除姜黄素

类以外非常值得重视的另一类药效物质, 其对全面揭示莪术的活血药效物质基础具有重要意义。

因此, 为进一步阐明莪术传统功效的药效物质, 本课题在前期研究基础上进一步对莪术萜类成分进行了研究, 共分离得到 8 个吉玛烷型倍半萜(图 1), 经波谱解析分别鉴定为 (1*R*,4*S*,5*R*,9*R*,10*S*)-9-hydroxy-zederone epoxide (**1**)、curdionolide B (**2**)、curdionolide A (**3**)、(-)-phaeocaulin A (**4a**)、(+)-phaeocaulin A (**4b**)、heyneanone C (**5**)、(4*S*,5*S*)-13-hydroxygermacrane 4,5-epoxide (**6**)、phagermadiol (**7**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 命名为新蓬莪术环氧酮 (neozederone epoxide), 利用计算电子圆二色谱 (ECD) 确定了其绝对构型, 化合物 **4a** 和 **4b** 为一对对映异构体。化合物 **2**、**3**、**5**、**6** 均为首次从蓬莪术中分离得到。最后对分离得到的化合物进行了体外腺苷-5'-二磷酸钠盐 (ADP) 及花生四烯酸 (AA) 诱导的抗血小板聚集活性筛选。

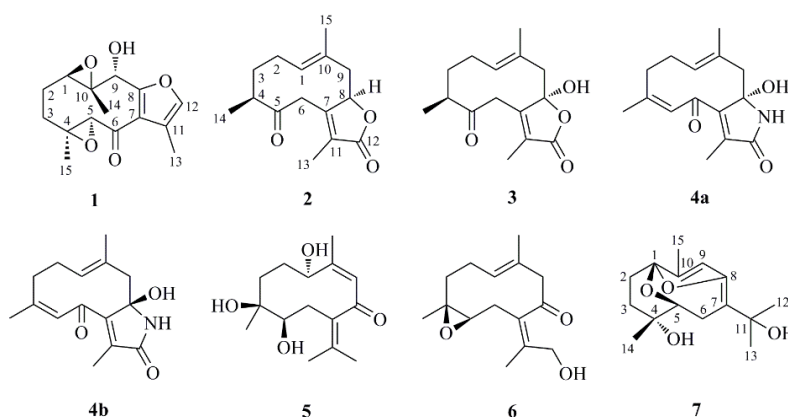


图 1 化合物 1~7 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—7

## 1 仪器与材料

### 1.1 实验仪器

Büchi Gradient Former B-687 中压液相色谱仪 (Rp C<sub>18</sub>, 40~60 μm, Welch 公司); 半制备型 C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm, Welch 公司); 分析型 C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 4 μm, 美国 Agilent 公司); Chiralpak AD-H 手性柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 手性拆分柱, 日本大赛璐公司); 圆二色谱

仪 (Chirascan CD 光谱仪, 英国应用光物理公司); Agilent Technologies 1100 Series 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Waters Synapt G2 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); Bruker AVIII HD-600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Anton Paar MCP 200 旋光测定仪 (美国 Anton Paar 公司); Agilent Cary 600 FT-IR (美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Milli-pore 公司); SC-2000 型血小板聚集测试仪

(北京赛科希德科技发展有限公司); Allegra X-30R 型超速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。

## 1.2 实验材料

薄层色谱硅胶(GF<sub>254</sub> 硅胶)、柱色谱硅胶(200~300 目, H 硅胶), 青岛海洋化工厂; 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (瑞典 Amershan Pharmacia 公司); 色谱甲醇及乙腈(美国 Sigma 公司); 其他常规试剂均为成都市科隆化学品的分析纯试剂; ADP(批号 N0306A)及 AA(批号 J20713A)均购自大连美伦生物技术有限公司。

新西兰兔, 雄性, 质量 2.2~2.5 kg, 购自成都达硕动物科技有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(川)2015-030。动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会审核, 均符合 3R 原则。

## 1.3 药材

蓬莪术药材采于四川省崇州市三江镇宋桥村, 经成都中医药大学高继海副教授鉴定为蓬莪术 *C. phaecocaulis* Val. 的干燥根茎, 植物标本(CP-20180303)保存于成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取与分离

蓬莪术药材(50 kg)粉碎后用 95%乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 减压浓缩后将浸膏分散于水中, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取。将各部分萃取液浓缩, 得到石油醚浸膏(1 kg)、醋酸乙酯浸膏(300 g)和正丁醇浸膏(500 g)。将醋酸乙酯浸膏用硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯(5:1~0:1)和醋酸乙酯-甲醇(1:0~0:1)梯度洗脱得到 11 个洗脱部分(A~K)。其中 D 组分经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(1:1)等度洗脱, 得到 4 个流分(Fr. 1~4)。Fr. 2 经反向中压液相色谱, 甲醇-水(20:80~0:100)梯度洗脱, 得到 8 个流分(Fr.2-1~2-8), 其中 Fr. 2-2 经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1)等度洗脱, 再经硅胶柱色谱[二氯甲烷-甲醇(100:1~1:1)]梯度洗脱后, 进行反相半制备液相色谱分离, 以 40%甲醇为流动相进行洗脱, 体积流量 1.5 mL/min, 分离得到化合物 1(5 mg,  $t_R=50$  min)。Fr. 2-5 经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1)等度洗脱, 得到 6 个流分(Fr.2-5-1~2-5-6)。其中 Fr.2-5-1 经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-丙

酮(100:1~1:1)梯度洗脱后, 以 23%乙腈为流动相, 体积流量 1 mL/min, 进行液相色谱分离(分析柱), 得到化合物 2(6 mg,  $t_R=12.4$  min)。Fr. 2-5-6 经高效液相色谱(分析柱), 以 30%乙腈水为流动相, 体积流量 1 mL/min, 分离得到化合物 3(4.6 mg,  $t_R=8.9$  min)。

E 组分经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(1:1)等度洗脱, 得到 3 个流分(Fr. 1~3), 其中 Fr. 2 经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1)等度洗脱得到 7 个流分(Fr. 2-1~2-7)。Fr. 2-3 经反相中压液相色谱, 以 10%~100%甲醇溶液进行梯度洗脱得到 10 个流分(Fr. 2-3-1~2-3-10), 其中 Fr. 2-3-3 经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱[石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1)]等度洗脱后, 再经液相色谱(分析柱), 以 45%甲醇等度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 分离得到到化合物 6(10 mg,  $t_R=6.2$  min)。

F 组分经反相中压液相色谱, 以 5%~100%甲醇梯度洗脱, 得到 19 个流分(Fr. 1~19), 其中 Fr. 8 经过葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1)等度洗脱得到 7 个流分(Fr. 8-1~8-7)。Fr. 8-6 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-丙酮(50:1~1:1)梯度洗脱得到 9 个流分(Fr. 8-6-1~8-6-9), 其中 Fr. 8-6-6 经反相半制备液相色谱, 以 50%甲醇为流动相, 体积流量 1.5 mL/min, 分离得到化合物 4(1.3 mg,  $t_R=47$  min)。外消旋混合物 4 经 Daicel Chiralpak AD-H 柱, 正己烷-乙醇(10:1)进行手性拆分, 得到对映异构体 4a(0.5 mg,  $t_R=13.9$  min)和 4b(0.4 mg,  $t_R=15.0$  min)。Fr. 9 经过葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1)等度洗脱得到 3 个流分(Fr. 9-1~9-3)。Fr. 9-1 经半制备薄层色谱[二氯甲烷-丙酮(20:1)]分离后, 再经反相半制备液相色谱, 以 50%甲醇水洗脱, 体积流量 1.5 mL/min, 分离得到到化合物 5(0.4 mg,  $t_R=41$  min)。

正丁醇萃取物经大孔吸附树脂, 以不同体积分数乙醇(20%、50%、70%、95%)进行梯度洗脱, 回收溶剂得到 4 个流分(Fr. 1~4)。其中 Fr.2 经反相中压液相色谱, 以 30%~85%甲醇梯度洗脱得到 12 个流分(Fr. 2-1~2-12)。Fr. 2-2 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇(200:1~0:1)梯度洗脱, 得到 10 个流分(Fr. 2-2-1~2-2-10)。Fr. 2-2-3 先后经反相中压液相色谱(20%~100%甲醇)和硅胶柱色谱[二氯甲

烷-甲醇(100:1~0:1)分离后,以35%甲醇为流动相,体积流量1 mL/min,进行反相半制备液相色谱分离,得到化合物7(0.6 mg,  $t_R=63$  min)。

## 2.2 化合物鉴定

化合物1:无色油状物。HR-ESI-MS给出准分子离子峰  $m/z$  301.104 9  $[M+Na]^+$  (计算值  $C_{15}H_{18}O_5Na$ , 301.105 2),推测其分子式为  $C_{15}H_{18}O_5$ , 不饱和度为7。  $[\alpha]_D^{20} -7.8^\circ$  ( $c$  0.014,  $CH_3OH$ ); ECD (MeCN)  $\lambda_{max}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 205 (-5.7), 230 (+4.9), 289 (-2.1) nm; UV (MeCN)  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ): 206 (3.18), 230 (2.79), 281 (2.49) nm; IR(ATR)  $\nu_{max}$ : 3445, 1669, 1522, 1385, 1238, 1073, 1045, 932, 865, 830, 791, 760, 722  $cm^{-1}$ 。紫外提示该化合物可能具有  $\alpha,\beta$ -不饱和酮片段或者共轭双键,红外提示该化合物可能存在羟基、羰基及双键等基团。化合物1的  $^1H$ -NMR谱(600 MHz, acetone- $d_6$ )可见3个单峰甲基信号  $\delta_H$  1.19 (3H, s), 1.52 (3H, s), 2.11 (3H, brs); 3个连氧次甲基信号  $\delta_H$  2.92 (1H, dd,  $J=10.6, 4.8$  Hz), 4.59 (1H, s), 5.11 (1H, d,  $J=4.2$  Hz); 1个连氧烯氢质子信号  $\delta_H$  7.32 (1H, brs) 以及1个OH质子信号  $\delta_H$  5.77 (1H, d,  $J=4.2$  Hz)(表1)。 $^{13}C$ -NMR、DEPT谱显示3个甲基碳信号,2个亚甲基碳信号,4个次甲基碳信号(3个连氧次甲基碳和1个烯碳)和6个季碳信号(2个连氧季碳、3个烯碳和1个羰基碳)(表1),根据以上谱图信息推测化合物1为含有1个羰基和2个双键的多氧取代吉玛烷型倍半萜。

为进一步确定化合物1的结构,进行了2D NMR实验(图2),通过化合物1的  $^1H$ - $^1H$  COSY谱中相关信号以及HMBC谱中  $H_3-14$ 与C-1、C-9、C-10相关,OH-9与C-9、C-10相关,H-9与C-1、C-7、C-8、C-10相关,  $H_3-15$ 与C-3、C-4、C-5相

关, H-5与C-3、C-6、C-7相关确证了C-1至C-10形成了4,10-二甲基-9-羟基-6-环癸酮。此外进一步根据HMBC谱中  $H_3-13$ 与C-7、C-11、C-12相关以及H-12与C-7、C-8相关确定了结构中C-7、C-8和C-11~C-13形成了11位甲基取代呋喃环。最后结合该化合物的不饱和度及连氧碳情况确定了化合物1的平面结构如图1所示。

在化合物1的NOESY谱中,  $H_3-14$ 与H-5、H-9相关,H-3与H-5相关,以及  $H_3-15$ 与H-1相关,表明H-1和  $H_3-15$ 位于同侧,而与H-5、H-9和  $H_3-14$ 位于异侧。进一步,通过ECD与实验ECD谱对比的方法(图3)确定了化合物1的绝对构型。使用IEFPCM模型在甲醇中针对(1*R*,4*S*,5*R*,9*R*,10*S*)-1和(1*S*,4*R*,5*S*,9*S*,10*R*)-1在CAM-B3LYP/DGDZVP计算水平上计算得到的ECD谱如图3所示。结果表明计算出的(1*R*,4*S*,5*R*,9*R*,10*S*)-1 ECD谱与实验ECD谱吻合,因此化合物1确定为(1*R*,4*S*,5*R*,9*R*,10*S*)-9-hydroxy-zederone epoxide,并命名为新蓬莪术环氧酮。

化合物2:无色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 249  $[M+H]^+$ 。 $^1H$ -NMR(600 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 5.08 (1H, brs, H-8), 4.87 (1H, brs, H-1), 3.52 (1H, d,  $J=16.3$  Hz, H-6a), 2.91 (1H, brs, H-9a), 2.55 (1H, brs, H-4), 2.29 (1H, m, H-2a), 2.00 (2H, m, H-2b, 3a), 1.95 (1H, m, H-9b), 1.88 (3H, s, H-15), 1.77 (3H, s, H-13), 1.75 (2H, overlapped, H-3b, 6b), 1.04 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, H-14);  $^{13}C$ -NMR(125 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 209.4 (C-5), 173.8 (C-12), 157.8 (C-7), 133.8 (C-1), 130.7 (C-10), 128.5 (C-11), 80.4 (C-8), 48.3 (C-4), 47.4 (C-9), 42.3 (C-6), 36.7 (C-3), 27.9 (C-2), 18.8 (C-14), 16.0 (C-15), 9.3 (C-13)。以上数据与文献报道基本一

表1 化合物1的  $^1H$ -NMR及  $^{13}C$ -NMR数据(600/150MHz, acetone- $d_6$ )  
Table 1  $^1H$ -NMR and  $^{13}C$ -NMR data for compound 1 (600/150MHz, acetone- $d_6$ )

碳位	$\delta_H$	$\delta_C$	碳位	$\delta_H$	$\delta_C$
1	2.92 (1H, dd, $J=10.6, 4.8$ Hz)	62.7	9	5.11 (1H, d, $J=4.2$ Hz)	72.4
2	2.19 (1H, m), 1.58 (1H, m)	24.2	10	—	61.4
3	2.27 (1H, dd, $J=12.5, 6.4$ Hz), 1.30 (1H, m)	35.2	11	—	123.4
4	—	62.2	12	7.32 (1H, brs)	140.0
5	4.59 (1H, s)	66.5	13	2.11 (3H, brs)	10.3
6	—	190.9	14	1.52 (3H, s)	15.4
7	—	122.9	15	1.19 (3H, s)	15.2
8	—	162.1	OH	5.77 (1H, d, $J=4.2$ Hz)	—

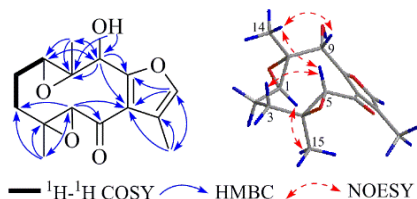


图2 化合物1的 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、HMBC和NOESY相关信号  
Fig. 2  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC and NOESY correlations of compound 1

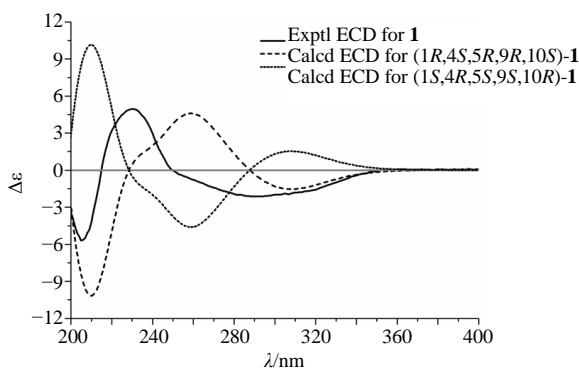


图3 化合物1的实测和计算ECD谱图

Fig. 3 Experimental and calculated ECD spectra of compound 1

致<sup>[12]</sup>, 故鉴定化合物2为 curdionolide B。

化合物3: 无色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 265  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 4.85 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz, H-1), 3.61 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz, H-6a), 3.51 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz, H-6b), 2.87 (1H, d,  $J = 13.2$  Hz, H-9a), 2.56 (1H, m, H-4), 2.31 (1H, m, H-2a), 2.23 (1H, d,  $J = 13.2$  Hz, H-9b), 2.00 (2H, m, H-2b, H-3a), 1.96 (3H, s, H-15), 1.79 (3H, s, H-13), 1.69 (1H, m, H-3b), 1.02 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-14);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 209.7 (C-5), 171.5 (C-12), 155.4 (C-7), 134.2 (C-1), 131.6 (C-10), 130.0 (C-11), 107.0 (C-8), 50.8 (C-9), 48.2 (C-4), 40.9 (C-6), 36.9 (C-3), 27.9 (C-2), 18.7 (C-14), 16.8 (C-15), 9.4 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[12]</sup>, 故鉴定化合物3为 curdionolide A。

化合物4a和4b: 无色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 262  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.42 (1H, s, H-5), 4.95 (1H, m, H-1), 2.86 (1H, m, H-3a), 2.73 (1H, d,  $J = 12.8$  Hz, H-9a), 2.28 (1H, d,  $J = 12.8$  Hz, H-9b), 2.22 (1H, m, H-2a), 2.15 (1H, m, H-3b), 2.07 (1H, m, H-2b), 1.88 (6H, m, H-13, 14), 1.69 (3H, s, H-15);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 193.1 (C-6), 169.2 (C-12), 151.5 (C-7), 146.1 (C-4), 137.7

(C-10, 11), 129.9 (C-5), 127.1 (C-1), 91.1 (C-8), 49.6 (C-9), 29.6 (C-3), 25.6 (C-2), 24.1 (C-14), 17.7 (C-15), 9.1 (C-13)。以上数据与文献报道的 phaeocaulin A<sup>[13]</sup>基本一致。化合物4为外消旋混合物, 经手性高效液相色谱分离得到一对对映异构体4a和4b, 其ECD数据分别为 {ECD (MeCN)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 236 (+30.7), 293 (-18.0), 360 (+2.2) nm; 4a}; {ECD (MeCN)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 236(-30.4), 293 (+17.9), 360 (-2.1) nm; 4b}。通过与文献中 (+)/(-)-phaeocaulin A<sup>[13]</sup>的ECD数据进行对比分析, 最终确定化合物4a为(-)-phaeocaulin A, 4b为(+)-phaeocaulin A。

化合物5: 无色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 269  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 5.64 (1H, s, H-9), 4.33 (1H, m, H-1), 3.51 (1H, dd,  $J = 13.2, 3.8$  Hz, H-5), 2.88 (1H, t,  $J = 13.2$  Hz, H-6a), 2.64 (1H, dd,  $J = 13.2, 3.8$  Hz, H-6b), 2.32 (1H, m, H-2a), 2.09 (3H, s, H-13), 1.90 (3H, s, H-12), 1.86 (1H, m, H-2b), 1.76 (3H, s, H-15), 1.70 (1H, m, H-3a), 1.49 (1H, m, H-3b), 1.17 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 198.1 (C-8), 145.5 (C-11), 144.9 (C-10), 132.6 (C-7), 128.4 (C-9), 83.3 (C-5), 74.1 (C-1), 69.3 (C-4), 32.7 (C-6), 29.0 (C-3), 27.6 (C-14), 23.6 (C-12, 13), 22.3 (C-15), 21.6 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物5为 heyneanone C。

化合物6: 无色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 251  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 5.26 (1H, m, H-1), 4.26 (2H, m, H-13), 4.18 (1H, m, H-5), 1.87(3H, s, H-12), 1.71 (3H, s, H-15), 0.96 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 204.0 (C-8), 138.2 (C-11), 135.6 (C-10), 130.6 (C-1), 127.2 (C-7), 64.8 (C-5), 62.6 (C-13), 60.7 (C-4), 55.6 (C-9), 38.3 (C-3), 29.5 (C-6), 25.2 (C-2), 18.4 (C-12), 17.2 (C-15), 16.2 (C-14)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物6为 (4S,5S)-13-hydroxygermacrone 4,5-epoxide。

化合物7: 无色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 267  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.16 (1H, s, H-9), 3.20 (1H, dd,  $J = 13.8, 6.3$  Hz, H-5), 2.54 (1H, dd,  $J = 12.7, 6.3$  Hz, H-6a), 2.49 (1H, m, H-3a), 2.43 (1H, m, H-3b), 2.20 (3H, s, H-15), 2.16 (2H, m, H-2), 2.05 (1H, dd,  $J = 13.8, 12.7$  Hz, H-6b), 1.31 (3H, s, H-12), 1.30 (3H, s, H-13), 1.26 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$ -NMR

(125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 166.7 (C-8), 160.8 (C-10), 126.7 (C-9), 120.9 (C-7), 96.6 (C-1), 74.5 (C-11), 71.8 (C-5), 71.3 (C-4), 48.0 (C-3), 32.5 (C-2), 29.3 (C-6), 25.0 (C-12, 14, 15), 23.4 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物 **6** 为 phagermadiol。

在分离纯化过程中, 除化合物 **1~3**、**6** 外, 其余化合物量较少, 所以本实验对化合物 **1~3**、**6** 进行了抗血小板聚集活性筛选。

### 2.3 抗血小板聚集实验<sup>[17]</sup>

家兔心脏取血, 3.8%枸橼酸三钠溶液抗凝, 血液与抗凝剂比例为 9:1, 收集于离心管中, 轻轻颠倒混匀。800 r/min 离心 10 min, 取上清液, 共离心 2 次, 合并即得富血小板血浆 (PRP)。下层血液以 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液即为贫血小板血浆 (PPP)。实验分为对照组、阿司匹林阳性对照组 (100、50、25  $\mu\text{mol/L}$ ) 及实验组 (100、50、25  $\mu\text{mol/L}$ ), 重复 5 次。取比浊管, 分别加入 290  $\mu\text{L}$  PPP 后, 再分别加入各组对应溶液 10  $\mu\text{L}$ , 作为空白溶液。另取比浊管, 各加入 280  $\mu\text{L}$  PRP, 再分别加入各组对应剂量溶液 10  $\mu\text{L}$ , 作为相应的待测溶液。血小板聚集仪预热至 37  $^{\circ}\text{C}$ , 以空白溶液调零后, 换为对应待测溶液, 预热 60 s, 加入 ADP (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 或 AA (0.5 mmol/L) 10  $\mu\text{L}$  诱导血小板聚集, 测定各待测溶液组血小板聚集率, 计算血小板聚集抑制率。

聚集抑制率=(对照组血小板聚集率-给药组血小板聚集率)/对照组血小板聚集率

蓬莪术作为传统活血化瘀中药莪术的重要来源之一, 具有抗血小板聚集、抗血栓等活性<sup>[18-19]</sup>, 因此对分离得到的相应单体化合物 (**1~3**、**6**) 进行了抗血小板聚集活性筛选。实验结果显示, 100  $\mu\text{mol/L}$  阳性药阿司匹林对 ADP 及 AA 诱导的血小板聚集抑制率分别为 (44.83 $\pm$ 1.24)% 和 (72.74 $\pm$ 7.54)%, 化合物 **1** 在 100  $\mu\text{mol/L}$  时对 ADP 及 AA 诱导的血小板聚集具有一定的抑制作用, 抑制率分别为 (21.07 $\pm$ 8.67)% 和 (27.73 $\pm$ 6.42)%, 而其余 3 个化合物 (**2**、**3**、**6**) 在 100  $\mu\text{mol/L}$  时均无抑制作用。

### 3 讨论

蓬莪术为传统的川产活血化瘀中药, 药用历史悠久, 对妇科疾病及心脑血管疾病具有显著疗效, 且现代研究表明这些疾病均与活血化瘀功效密切相关。因此, 进行蓬莪术活血化瘀功效的现代研究具有深远的科学意义和社会价值。本研究采用现代分离手段和有机波谱学技术, 共从蓬莪术中分离鉴定

8 个吉玛烷型倍半萜, 其中 **1** 为新化合物, 并通过计算 ECD 确定了其绝对构型。现代研究表明莪术具有较好的抗血小板聚活性, 而抑制血小板聚集的异常发生, 对血栓栓塞性心血管疾病的防治具有重要意义<sup>[18-20]</sup>。因此, 对分离所得化合物进行了 ADP 及 AA 诱导的抗血小板聚集活性筛选, 试验结果表明, 除化合物 **1** 在 100  $\mu\text{mol/L}$  时对 ADP 及 AA 诱导的血小板聚集具有一定抑制作用外, 其余化合物 (**2**、**3**、**6**) 均无明显抑制血小板聚集的作用。可见, 蓬莪术中吉玛烷型倍半萜在抗血小板聚集方面活性欠佳, 活性较强的成分有待进一步探究。本研究丰富了蓬莪术倍半萜类化合物, 且为后续继续寻找与其活血功效相关的药效物质奠定了基础和方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 274-275.
- [2] 王菊. 醋制莪术对 CYP450 酶的调控及入肝机制的初步研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [3] 李瑶, 吴建华, 谢艳华. 莪术油的研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报, 2017, 40(3): 118-121.
- [4] 陈金凤, 熊亮, 刘菲, 等. 蓬莪术姜黄素类化学成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 16-20.
- [5] 彭炳先, 陈受惠. HPLC 测定不同产地莪术中 3 种有效成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(22): 1742-1744.
- [6] Zhu J J, An Y W, Hu G, et al. Simultaneous determination of multiple sesquiterpenes in *Curcuma wenyujin* herbal medicines and related products with one single reference standard [J]. *Molecules*, 2013, 18(2): 2110-2121.
- [7] 赵志梅, 张立杰, 夏天, 等. 莪术主要单体成分抗炎、抗肿瘤作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 119-124.
- [8] 彭炳先, 周欣, 王道平, 等. 中药蓬莪术化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11): 1091-1092.
- [9] 陈晓军, 韦洁, 蒋珍藕, 等. 广西莪术乙酸乙酯部位的抗血栓作用 [J]. 中成药, 2018, 40(6): 1238-1242.
- [10] 徐雨静. 广西醋莪术活血化瘀物质基础研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [11] 王秀. 莪术二酮抗血栓和抗血小板聚集作用研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [12] Lou Y, Zhao F, Wu Z H, et al. Germacrane-type sesquiterpenes from *Curcuma wenyujin* [J]. *Helv Chim Acta*, 2009, 92(8): 1665-1672.
- [13] Xia G Y, Sun D J, Ma J H, et al. (+)/(-)-Phaeocaulin A-D, four pairs of new enantiomeric germacrane-type sesquiterpenes from *Curcuma phaeocaulis* as natural nitric oxide inhibitors [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43576.

- [14] Saifudin A, Tanaka K, Kadota S, *et al.* Sesquiterpenes from the rhizomes of *Curcuma heyneana* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(2): 223-229.
- [15] Kuroyanagi M, Ueno A, Koyama K, *et al.* Structures of sesquiterpenes of *Curcuma aromatica* Salisb. II. Studies on minor sesquiterpenes [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(1): 55-58.
- [16] Ma J H, Wang Y, Liu Y, *et al.* Four new sesquiterpenes from the rhizomes of *Curcuma phaeocaulis* and their iNOS inhibitory activities [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(5): 532-540.
- [17] Liu F, Chen J F, Qiao M M, *et al.* Seven pairs of new enantiomeric sesquiterpenoids from *Curcuma phaeocaulis* [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 99: 103820.
- [18] 毛春芽, 谢辉, 陆兔林. 莪术炮制品的抗血小板聚集及抗凝血作用 [J]. *中药材*, 2000, 23(4): 212-213.
- [19] 王秀, 夏泉, 许杜娟, 等. 莪术中莪术二酮抗凝血和抗血栓作用的实验研究 [J]. *中成药*, 2012, 34(3): 550-553.
- [20] Showkathali R, Natarajan A. Antiplatelet and antithrombin strategies in acute coronary syndrome: State-of-the-art review [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2012, 8(3): 239-249.

[责任编辑 王文倩]