

壮药材红根草的化学成分及生物活性研究

陈兴广^{1,2}, 黄园园¹, 闵建国^{2*}, 袁经权^{1*}, 周艳林²

1. 广西中医药大学, 中医药科学实验中心, 广西 南宁 530200

2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

摘要: 目的 研究红根草(黄埔鼠尾草 *Salvia prionitis* 全草)的化学成分, 并对部分化合物进行初步的抗炎、抗肿瘤活性筛选。方法 应用正、反相硅胶, Sephadex LH-20, 制备液相色谱等方法分离纯化, 并结合核磁共振氢谱、碳谱和质谱等技术鉴定其结构。采用 Griess 法和 MTT 法对分离得到的部分三萜化合物进行初步的抗炎活性筛选和抗肿瘤活性研究。结果 从红根草 50%乙醇提取物中分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为 8,11,14-三烯-松香烷(1)、柳杉酚(2)、泪杉醇(3)、狗脊蕨酸(4)、白桦脂酸(5)、白桦脂醇(6)、桦木酮酸(7)、齐墩果酸(8)、3-表齐墩果酸(9)、23-羟基齐墩果酸(10)、常春藤皂苷元(11)、3 α ,24-二羟基-12-烯-28-齐墩果酸(12)、2 α ,3 α ,24-三羟基-12-烯-28-乌苏酸(13)、熊果酸(14)、 α -香树脂醇(15)。化合物 8、14 对 NO 生成抑制率达到 60%以上; 化合物 8、13 对人膀胱癌 EJ 细胞的半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC₅₀) 分别为 (24.32±1.60)、(44.23±0.82) μ mol/L; 化合物 8 对人胰腺癌 PANC-1 细胞的 IC₅₀ 值为 (25.13±7.07) μ mol/L。结论 化合物 4、7、10、14、15 为首次从该植物中分离得到; 其中化合物 8、14 抗炎活性较强; 化合物 8、11、13 对 EJ 细胞有较强抑制作用; 化合物 8、10、11 对 PANC-1 细胞有良好抑制作用。

关键词: 红根草; 三萜; 抗炎; 抗肿瘤; 狗脊蕨酸; 桦木酮酸; 齐墩果酸; 2 α ,3 α ,24-三羟基-12-烯-28-乌苏酸; 熊果酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)17-5276-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.003

Chemical compositions and biological activities of Zhuang medicine *Salviae prionitis*

CHEN Xing-guang^{1,2}, HUANG Yuan-yuan¹, MIN Jian-guo², YUAN Jing-quan¹, ZHOU Yan-lin²

1. Chinese Medicine Experimental Center, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China

Abstract: Objective To study the chemical composition of *Salvia prionitis*, and screen its anti-inflammatory and anti-tumor activities. **Methods** Normal phase silica gel, reversed-phase silica gel, Sephadex LH-20, preparative liquid chromatography were used for separation and purification of the chemical composition from *S. prionitis*, and the structures of the isolated compounds were identified by NMR and MS. The methods of Griess and MTT were used to conduct preliminary anti-inflammatory activity screening and anti-tumor activity research on some of the isolated triterpenoids from *S. prionitis*. **Results** A total of 15 compounds were isolated from the 50% ethanol extracts of *S. prionitis*, their structures were determined as abieta-8,11,13-trien (1), sugiol (2), manool (3), woodwardic acid (4), betulinic acid (5), betulin (6), betulonic acid (7), oleanic acid (8), 3-epioleanolic acid (9), 23-hydroxy-oleanolic acid (10), hederagenin (11), 3 α ,24-dihydroxy-12-en-28-oleanolic acid (12), 2 α ,3 α ,24-trihydroxy-12-en-28-ursic acid (13), ursolic acid (14) and α -amyrin (15). The inhibition rate of compounds 8 and 14 on NO production reached more than 60%, the IC₅₀ of compounds 8 and 13 on human bladder cancer cells (EJ) were (24.32 ± 1.60) μ mol/L and (44.23 ± 0.82) μ mol/L, respectively; the IC₅₀ value of compound 8 on human pancreatic cancer cells (PANC-1) was (25.13 ± 7.07) μ mol/L. **Conclusion** Compounds 4, 7, 10, 14, 15 are isolated from *S. prionitis* for the first time. Compounds 8 and 14 have better anti-inflammatory activity. Compounds 8, 11, 13 have a strong inhibitory effect on human bladder cancer cells (EJ); Compound 8, 10, 11 have an inhibitory effect on human pancreatic cancer cells (PANC-1).

收稿日期: 2022-01-26

基金项目: 广西中医药大学博士科研启动项目 (2018BS048)

作者简介: 陈兴广 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分及新产品研究。E-mail: 2970797317@qq.com

*通信作者: 袁经权, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药及天然药物研究与开发。E-mail: yjqgx@163.com

闵建国, 硕士, 工程师, 研究方向为中药新药研发。E-mail: 67493023@qq.com

Key words: *Salvia prionitis* Hance; triterpenes; anti-inflammation; antitumor; woodwardic acid; betulonic acid; oleanic acid; 2 α ,3 α ,24-trihydroxy-12-en-28-ursic acid; ursolic acid

红根草为唇形科鼠尾草属多年生草本植物黄埔鼠尾草 *Salvia prionitis* Hance 的干燥全草, 分布在广西、江西、福建、广东等省区。红根草味微苦, 性凉, 主入肺、肝、胃、大肠经, 具有疏风清热、利湿、止血、安胎等功效, 临床用于感冒发热、肺炎咳嗽、咽喉肿痛、腹泻、痢疾和肾炎等^[1-3]。收录于《广西壮药质量标准》第二卷^[4], 壮医认为其味微苦, 性凉, 具有清热毒, 调气道、谷道的功效, 常用于治疗货烟妈(咽炎)、埃病(咳嗽)、阿意咪(痢疾)等。现代研究表明, 红根草具有抗凝血^[5]、抑菌抗炎^[6]、抗癌^[7]等药理作用, 主要含有二萜^[8-9]、三萜^[10]、酚性类^[8]等化学成分。

民族医药是中国少数民族的传统医药, 是中医药的重要组成部分, 在保障少数民族群众健康方面发挥着重要作用, 需要在民族医学体系指导下不断传承创新^[11]。复方红根草片是桂林三金药业股份有限公司在广西民间验方基础上研制开发的独家品种, 处方由红根草、鱼腥草、穿心莲等5味组成, 具有清热解毒之功, 临床用于急性咽喉炎、扁桃体炎、肠炎、痢疾等疾病, 并列为富有特色的广西壮成药品种。红根草作为处方君药, 是发挥抗炎作用的主要药味之一。近年来, 红根草资源调查^[12]表明受生态环境破坏影响, 野生资源日趋紧张, 红根草有关化学成分、药理活性研究基础薄弱, 也限制了该资源可持续利用。本实验对壮药红根草的化学成分进行系统研究, 从其50%乙醇提取物中分离得到15个化合物, 分别鉴定为8,11,13-三烯-松香烷(abieto-8,11,13-trien, 1)、柳杉酚(sugiol, 2)、泪杉醇(manool, 3)、狗脊蕨酸(woodwardic acid, 4)、白桦脂酸(betulinic acid, 5)、白桦脂醇(betulin, 6)、桦木酮酸(betulonic acid, 7)、齐墩果酸(oleanic acid, 8)、3-表齐墩果酸(3-epioleanolic acid, 9)、23-羟基齐墩果酸(23-hydroxy-oleanolic acid, 10)、常春藤皂苷元(hederagenin, 11)、3 α ,24-二羟基-12-烯-28-齐墩果酸(3 α ,24-dihydroxy-12-en-28-oleanolic acid, 12)、2 α ,3 α ,24-三羟基-12-烯-28-乌苏酸(2 α ,3 α ,24-trihydroxy-12-en-28-ursic acid, 13)、熊果酸(ursolic acid, 14)、 α -香树脂醇(α -amyrin, 15)。其中, 化合物4、7、10、14、15为首次从该植物中分离得到; 初步探究了其中三萜类化合物的抗炎及抗

肿瘤生物活性, 可为红根草及其制剂质量标准提升, 民族药用资源合理开发和利用提供依据。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器与试剂

Bruker 600 MHz、Bruker 500 MHz 超导核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); Waters 2535 型制备型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Thermo C₁₈柱(150 mm×10 mm, 5 μ m); ICP-MS 质谱仪(美国 THERMO 公司); 多功能酶标仪(美国赛默飞公司); 高速冷冻微型离心机(美国 SCILOGEX 公司); 二氧化碳培养箱(新加坡 Esco 公司); AL204 精密电子天平(上海托利多仪器有限公司)。

柱色谱硅胶(100~200、200~300、300~400目, 青岛海洋化工有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯), 其余试剂为国产分析纯。DMEM 培养基、1640 培养基、澳洲胎牛血清、胰酶溶液(均购自美国 Gibco 公司); PBS 缓冲液、二甲亚砜、MTT(均购自 Solabio 公司); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, Sigma 公司); 一氧化氮检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 顺铂(美国 MedChemExpress 公司)。

1.2 材料

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7(购自中科院上海生科院细胞资源中心); 人膀胱癌 EJ 细胞、人食管癌 ECA-109 细胞、人胰腺癌 PANC-1 细胞均购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

红根草药材于2018年4月采自广西桂林临桂区, 经桂林三金药业股份有限公司正高级工程师钟小清鉴定为唇形科鼠尾草属植物黄埔鼠尾草 *S. prionitis* Hance 的干燥全草, 药材标本(20180516001)保存于该公司中药研究所标本室。

2 方法

2.1 提取与分离

取红根草10 kg, 破碎, 用50%乙醇回流提取3次, 减压回收溶剂, 得到总提取物。用水分散后, 以石油醚、醋酸乙酯、正丁醇依次反复萃取, 回收溶剂, 得到石油醚部位(140.4 g)、醋酸乙酯部位(72.8 g)和正丁醇部位(17.2 g)。

石油醚部位浸膏140.4 g, 用正相硅胶柱色谱(100~200 目)分离, 以石油醚-醋酸乙酯(100:1→1:100)梯度洗脱, 分得 PE1~11 组分。组分

PE1 (3.1 g) 经硅胶柱色谱法, 以石油醚-二氯甲烷 (100:1→1:100) 梯度洗脱, 得到化合物 **1** (195 mg); 组分 PE3 (41.3 g) 经硅胶柱色谱法, 以石油醚-醋酸乙酯 (50:1→1:100) 梯度洗脱, 得到流分 PE3-1~15, 其中 PE3-5 (2.2 g) 经多次硅胶柱色谱法分离得到化合物 **3** (11.3 mg), PE3-10 (50 mg)、PE3-13 (108 mg) 分别经 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 等度洗脱, 得到化合物 **15** (9.5 mg) 和 **2** (8.6 mg); PE3-4 (17 g) 依次经硅胶、Sephadex LH-20 和制备液相柱色谱分离得到化合物 **8** (92 mg)。

醋酸乙酯部位浸膏 72.8 g, 经 D101 大孔树脂柱色谱分离, 水及 30%、50%、70%、95% 乙醇梯度洗脱, 分得 EA1~7 个组分。组分 EA5 (19.3 g) 经硅胶柱色谱法, 以二氯甲烷-甲醇 (100:1→1:100) 梯度洗脱, 得到流分 EA5-1~10, 其中 EA5-6 (53 mg)、EA5-7 (27 mg) 经反复 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 分别以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 和甲醇等度洗脱, 分别得化合物 **11** (27 mg) 和 **12** (7.3 mg), EA5-8 (200 mg) 经过 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水 (0~100%) 梯度洗脱, 得到化合物 **13** (6.6 mg); 组分 6 (17.3 g) 经硅胶柱色谱法, 以石油醚-醋酸乙酯 (100:1→1:100) 梯度洗脱, 得到流分 EA6-1~11, EA6-4 (800 mg)、EA6-5 (820 mg)、EA6-8 (560 mg) 经过 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 等度洗脱, 得到化合物 **4** (200 mg)、**9** (11.3 mg) 和 **14** (78 mg), EA6-7 (210 mg) 经过制备高效液相色谱 (甲醇-水 83:17) 分离得到化合物 **10** (9.6 mg); EA7 (12.1 g) 经 ODS 柱色谱分离, 用水及 30%、60%、70%、80%、90%、甲醇梯度洗脱, 得到流分 EA7-1~7, 其中 EA7-6 (15.9 mg)、EA7-8 (25.6 mg) 和 EA7-10 (2 g) 分别经过 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 等度洗脱, 经过 TLC 分析合并相同流分, 得到化合物 **6** (5.5 mg)、**7** (7 mg)、**5** (1.4 g)。

2.2 抗炎、抗肿瘤活性筛选

2.2.1 红根草中单体化合物对 RAW264.7 细胞生长活力的影响 参考文献方法^[13], 应用 MTT 法评估化合物 **4~5**、**7~14** 均在 50.0 μmol/L 浓度下对 RAW264.7 细胞生长活力的影响。

2.2.2 红根草中单体化合物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 参考文献方法^[13], 采用 Griess 法测定吸光度 (A) 值, 考察化合物 **4~5**、**7~14**

在 50.0 μmol/L 浓度下抑制 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 能力。

$$\text{NO 生成抑制率} = (A_{\text{LPS}} - A_{\text{LPS+样品}}) / (A_{\text{LPS}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 抗肿瘤活性测定 参考文献方法^[14], 采用 MTT 法测定化合物 **4~5**、**7~14** 在不同浓度下 (终浓度分别为 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μmol/L) 对 ECA-109 细胞、EJ 细胞、PANC-1 细胞的抑制活性。使用 Graphpad Prism8 软件计算其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状物。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.16 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-11), 6.97 (1H, dd, J = 8.2, 1.6 Hz, H-12), 6.88 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-14), 2.87~2.79 (1H, m, H-15), 2.93~2.77 (2H, m, H-7), 1.39 (1H, td, J = 13.1, 3.6 Hz, H-1α), 2.26 (1H, d, J = 12.7 Hz, H-1β), 1.58 (1H, m, H-2α), 1.64~1.77 (1H, m, H-2β), 1.46 (1H, d, J = 13.2 Hz, H-3β), 1.34 (1H, dd, J = 12.5, 2.3 Hz, H-5), 1.85 (1H, ddd, J = 7.4, 6.6, 3.7 Hz, H-6α), 1.77~1.70 (1H, m, H-6β), 1.21 (6H, d, J = 7.0 Hz, 16, 17-CH₃), 1.17 (3H, s, 20-CH₃), 0.93 (3H, s, 18-CH₃), 0.92 (3H, s, 19-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 39.0 (C-1), 19.5 (C-2), 41.9 (C-3), 33.6 (C-4), 50.6 (C-5), 19.3 (C-6), 30.7 (C-7), 135.0 (C-8), 147.7 (C-9), 37.7 (C-10), 124.4 (C-11), 123.9 (C-12), 145.5 (C-13), 126.9 (C-14), 33.6 (C-15), 24.2 (C-16), 24.2 (C-17), 33.5 (C-18), 21.8 (C-19), 25.1 (C-20)。以上波谱数据与文献基本一致^[15], 故鉴定化合物 **1** 为 8,11,14-三烯-松香烷。

化合物 **2**: 白色细针状结晶 (三氯甲烷)。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.17 (1H, s, 12-OH), 7.66 (1H, s, H-14), 6.79 (1H, s, H-11), 3.18~3.10 (1H, m, H-15), 1.16 (3H, s, 20-CH₃), 1.17 (3H, d, J = 6.9 Hz, 16-CH₃), 1.14 (3H, d, J = 6.9 Hz, 17-CH₃), 0.95 (3H, s, 19-CH₃), 0.89 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 37.4 (C-1), 18.4 (C-2), 40.8 (C-3), 32.7 (C-4), 49.0 (C-5), 35.4 (C-6), 196.3 (C-7), 122.5 (C-8), 155.7 (C-9), 40.4 (C-10), 109.2 (C-11), 160.0 (C-12), 132.4 (C-13), 124.9 (C-14), 26.0 (C-15), 22.1 (C-16), 22.2 (C-17), 32.2 (C-18), 21.0 (C-19), 22.9 (C-20)。以上波谱数据与文献基本一致^[16], 故鉴定化合物 **2** 为柳杉酚。

化合物 **3**: 无色油状物。¹H-NMR (600 MHz,

CDCl_3) δ : 5.90 (1H, dd, $J = 17.4, 10.8$ Hz, H-14), 5.19 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-15 β), 5.04 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-15 α), 4.80 (1H, s, H-17 α), 4.50 (1H, s, H-17 β), 2.38 (1H, m, H-7 α), 1.95 (1H, td, $J = 12.9, 5.0$ Hz, H-7 β), 1.26 (3H, s, 16-CH₃), 0.86 (3H, s, 19-CH₃), 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.67 (3H, s, 20-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 39.2 (C-1), 19.5 (C-2), 42.3 (C-3), 33.8 (C-4), 55.7 (C-5), 24.6 (C-6), 38.5 (C-7), 148.8 (C-8), 57.4 (C-9), 40.0 (C-10), 17.8 (C-11), 41.5 (C-12), 73.7 (C-13), 145.4 (C-14), 111.7 (C-15), 27.8 (C-16), 106.6 (C-17), 33.7 (C-18), 21.9 (C-19), 14.6 (C-20)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 3 为泪杉醇。

化合物 4: 白色粉末状固体, ESI-MS m/z : 457 [M+H]⁺。 ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.09 (1H, s, 24-COOH), 4.68 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-29 β), 4.56 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-29 α), 4.29 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, 3-OH), 3.16 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-3 α), 1.64 (3H, s, 30-CH₃), 0.92 (3H, s, 28-CH₃), 0.86 (6H, s, 26-CH₃, 27-CH₃), 0.76 (3H, s, 25-CH₃), 0.64 (3H, s, 23-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.6 (C-1), 27.2 (C-2), 76.8 (C-3), 55.5 (C-4), 54.9 (C-5), 20.5 (C-6), 34.0 (C-7), 40.3 (C-8), 50.0 (C-9), 37.6 (C-10), 18.0 (C-11), 25.1 (C-12), 38.3 (C-13), 42.1 (C-14), 30.1 (C-15), 31.8 (C-16), 48.6 (C-17), 46.7 (C-18), 36.8 (C-19), 29.3 (C-20), 48.7 (C-21), 150.4 (C-22), 15.9 (C-23), 177.3 (C-24), 16.0 (C-25), 15.8 (C-26), 14.4 (C-27), 19.0 (C-28), 109.7 (C-29), 28.2 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[18], 故鉴定化合物 4 为狗脊蕨酸。

化合物 5: 白色针状结晶(醋酸乙酯), ESI-MS m/z : 457 [M+H]⁺。 ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.10 (1H, s), 4.68 (1H, brs, H-29 α), 4.55 (1H, brs, H-29 β), 3.45 (1H, brs, H-3), 4.32 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, 3-OH), 3.00~2.90 (1H, m, H-19), 1.63 (3H, s, 30-CH₃), 0.92 (3H, s, 27-CH₃), 0.86 (3H, s, 26-CH₃), 0.85 (3H, s, 24-CH₃), 0.75 (3H, s, 25-CH₃), 0.64 (3H, s, 23-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.6 (C-1), 27.3 (C-2), 76.9 (C-3), 38.4 (C-4), 55.0 (C-5), 18.1 (C-6), 34.0 (C-7), 40.4 (C-8), 50.1 (C-9), 36.5 (C-10), 20.6 (C-11), 25.2 (C-12), 37.7 (C-13), 42.1 (C-14), 30.2 (C-15), 31.8 (C-16), 55.5 (C-17), 48.7 (C-18), 46.8 (C-19), 150.5 (C-20), 29.3 (C-21), 36.8 (C-22), 28.2 (C-23), 15.8 (C-24), 15.9 (C-25), 16.1

(C-26), 14.5 (C-27), 177.4 (C-28), 109.8 (C-29), 19.0 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[19], 故鉴定化合物 5 为白桦脂酸。

化合物 6: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 443 [M+H]⁺。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.66 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-29 α), 4.53 (1H, dd, $J = 2.3, 1.3$ Hz, H-29 β), 3.88 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-28 a), 3.37 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-28 β), 3.20 (1H, dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz, H-3), 2.38 (1H, td, $J = 10.7, 6.0$ Hz, H-19), 1.63 (3H, s, 30-CH₃), 0.97 (3H, s, 27-CH₃), 0.92 (3H, s, 26-CH₃), 0.87 (3H, s, 23-CH₃), 0.76 (3H, s, 24-CH₃), 0.65 (3H, s, 25-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.2 (C-1), 27.2 (C-2), 78.8 (C-3), 38.5 (C-4), 54.9 (C-5), 18.0 (C-6), 33.8 (C-7), 40.5 (C-8), 49.9 (C-9), 36.9 (C-10), 20.4 (C-11), 24.8 (C-12), 36.8 (C-13), 42.2 (C-14), 26.7 (C-15), 29.0 (C-16), 47.6 (C-17), 47.6 (C-18), 48.6 (C-19), 150.4 (C-20), 29.3 (C-21), 33.8 (C-22), 28.1 (C-23), 15.7 (C-24), 15.8 (C-25), 15.9 (C-26), 14.5 (C-27), 60.2 (C-28), 109.6 (C-29), 18.8 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[20], 故鉴定化合物 6 为白桦脂醇。

化合物 7: 白色粉末, ESI-MS m/z : 455 [M+H]⁺。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.96 (1H, s, 28-COOH), 4.70 (1H, s, H-29 α), 4.56 (1H, s, H-29 β), 2.95 (1H, td, $J = 10.8, 5.3$ Hz, H-19), 1.66 (3H, s, 30-CH₃), 0.99 (3H, s, 23-CH₃), 0.96 (3H, s, 24-CH₃), 0.93 (3H, s, 27-CH₃), 0.92 (3H, s, 25-CH₃), 0.85 (3H, s, 26-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 40.1 (C-1), 33.5 (C-2), 216.4 (C-3), 46.5 (C-4), 53.8 (C-5), 19.1 (C-6), 33.0 (C-7), 40.1 (C-8), 49.0 (C-9), 36.3 (C-10), 21.0 (C-11), 25.1 (C-12), 38.8 (C-13), 42.0 (C-14), 30.1 (C-15), 31.6 (C-16), 55.4 (C-17), 48.5 (C-18), 46.4 (C-19), 150.2 (C-20), 29.1 (C-21), 37.7 (C-22), 26.4 (C-23), 20.6 (C-24), 15.6 (C-25), 15.4 (C-26), 14.2 (C-27), 177.2 (C-28), 109.5 (C-29), 18.9 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[21], 故鉴定化合物 7 为桦木酮酸。

化合物 8: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 457 [M+H]⁺。 ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.04 (1H, brs, 28-COOH), 5.16 (1H, t, $J = 3.4$ Hz, H-12), 4.30 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, 3-OH), 3.16 (1H, m, H-3), 2.73 (1H, dd, $J = 13.6, 4.1$ Hz, H-9), 1.09 (3H, s, 27-CH₃), 0.89 (3H, s, 26-CH₃), 0.87 (6H, s, 23-CH₃),

24-CH₃), 0.85 (3H, s, 25-CH₃), 0.71 (3H, s, 29-CH₃), 0.67 (3H, s, 30-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ: 38.9 (C-1), 27.0 (C-2), 76.8 (C-3), 38.1 (C-4), 54.8 (C-5), 18.0 (C-6), 32.1 (C-7), 38.4 (C-8), 47.1 (C-9), 36.6 (C-10), 22.6 (C-11), 121.6 (C-12), 143.9 (C-13), 41.3 (C-14), 27.2 (C-15), 22.9 (C-16), 45.7 (C-17), 40.8 (C-18), 45.5 (C-19), 30.4 (C-20), 33.3 (C-21), 32.4 (C-22), 28.3 (C-23), 16.1 (C-24), 15.1 (C-25), 16.9 (C-26), 25.6 (C-27), 178.6 (C-28), 32.9 (C-29), 23.4 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[22], 故鉴定化合物**8**为齐墩果酸。

化合物**9**: 白色无定形粉末, ESI-MS *m/z*: 457 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.04 (1H, brs, 28-COOH), 5.25 (1H, brs, H-12), 4.26 (1H, brs, 3-OH), 3.38 (1H, s, H-3), 1.19 (3H, s, 27-CH₃), 1.09 (3H, s, 23-CH₃), 0.98 (6H, s, 29-CH₃, 30-CH₃), 0.71 (3H, s, 25-CH₃), 0.85 (3H, s, 26-CH₃), 0.95 (3H, s, 24-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 36.4 (C-1), 24.9 (C-2), 75.8 (C-3), 37.4 (C-4), 48.6 (C-5), 18.0 (C-6), 32.4 (C-7), 38.9 (C-8), 47.1 (C-9), 36.9 (C-10), 22.6 (C-11), 122.3 (C-12), 143.9 (C-13), 41.3 (C-14), 27.3 (C-15), 23.4 (C-16), 46.1 (C-17), 40.8 (C-18), 45.5 (C-19), 30.4 (C-20), 32.4 (C-21), 30.1 (C-22), 28.3 (C-23), 15.1 (C-24), 15.1 (C-25), 16.9 (C-26), 25.8 (C-27), 184.6 (C-28), 32.9 (C-29), 23.3 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[23], 故鉴定化合物**9**为3-表齐墩果酸。

化合物**10**: 白色无定形粉末, ESI-MS *m/z*: 473 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.02 (1H, brs, 28-COOH), 5.16 (1H, t, *J* = 3.5 Hz, H-12), 4.39 (1H, s, 3-OH), 4.16 (1H, s, 23-OH), 3.43 (1H, dd, *J* = 10.4, 3.7 Hz, H-23), 3.07 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, *J* = 13.7, 4.1 Hz, H-18), 1.91 (1H, td, *J* = 13.4, 3.7 Hz, H-19), 1.09 (3H, s, 27-CH₃), 0.87 (9H, s, 25, 29, 30-CH₃), 0.71 (3H, s, 24-CH₃), 0.53 (3H, s, 26-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 37.9 (C-1), 26.6 (C-2), 70.3 (C-3), 41.4 (C-4), 47.1 (C-5), 17.5 (C-6), 32.1 (C-7), 38.8 (C-8), 46.4 (C-9), 36.3 (C-10), 22.6 (C-11), 121.6 (C-12), 143.9 (C-13), 41.9 (C-14), 27.2 (C-15), 22.9 (C-16), 45.5 (C-17), 40.8 (C-18), 45.7 (C-19), 30.4 (C-20), 33.3 (C-21), 32.0 (C-22), 64.4 (C-23), 12.7 (C-24), 15.5 (C-25), 16.9 (C-26), 25.7 (C-27), 178.6 (C-28), 32.9 (C-29),

23.4 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[24], 故鉴定化合物**10**为23-羟基齐墩果酸。

化合物**11**: 白色无定形粉末, ESI-MS *m/z*: 473 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.01 (1H, s, 28-COOH), 5.16 (1H, t, *J* = 3.5 Hz, H-12), 4.40 (1H, t, *J* = 5.1 Hz, 3-OH), 4.16 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, 23-OH), 3.45~3.40 (1H, m, H-23α), 3.37~3.30 (1H, m, H-23β), 3.07 (1H, dd, *J* = 10.5, 4.8 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, *J* = 13.7, 3.8 Hz, H-18), 1.90 (1H, td, *J* = 4.0, 14.5 Hz, H-19), 1.09 (3H, s, 27-CH₃), 0.87 (9H, s, 29, 30, 25-CH₃), 0.71 (3H, s, 26-CH₃), 0.53 (3H, s, 24-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 37.9 (C-1), 26.6 (C-2), 70.3 (C-3), 41.4 (C-4), 47.1 (C-5), 17.5 (C-6), 32.1 (C-7), 38.8 (C-8), 46.4 (C-9), 36.3 (C-10), 22.6 (C-11), 121.6 (C-12), 143.9 (C-13), 41.9 (C-14), 27.2 (C-15), 22.9 (C-16), 45.5 (C-17), 40.8 (C-18), 45.7 (C-19), 30.4 (C-20), 33.3 (C-21), 32.0 (C-22), 64.4 (C-23), 12.7 (C-24), 15.5 (C-25), 16.9 (C-26), 25.7 (C-27), 178.6 (C-28), 32.8 (C-29), 23.4 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[25], 故鉴定化合物**11**为常春藤皂苷元。

化合物**12**: 白色无定形粉末, ESI-MS *m/z*: 473 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 11.94 (1H, s, 28-COOH), 5.19 (1H, brs, H-12), 3.40 (1H, m, H-3), 3.24 (1H, dd, *J* = 10.5, 4.4 Hz, H-24α), 3.05 (1H, dd, *J* = 10.6, 4.3 Hz, H-24β), 1.23 (3H, s, 26-CH₃), 1.05 (3H, s, 23-CH₃), 0.98 (3H, s, 25-CH₃), 0.91 (3H, s, 27-CH₃), 0.88 (3H, s, 29-CH₃), 0.72 (3H, s, 30-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 33.3 (C-1), 26.6 (C-2), 70.5 (C-3), 42.6 (C-4), 47.4 (C-5), 17.7 (C-6), 31.8 (C-7), 38.0 (C-8), 47.1 (C-9), 35.8 (C-10), 22.8 (C-11), 121.8 (C-12), 143.1 (C-13), 41.7 (C-14), 27.1 (C-15), 22.6 (C-16), 45.4 (C-17), 40.8 (C-18), 45.7 (C-19), 30.3 (C-20), 32.8 (C-21), 32.1 (C-22), 22.6 (C-23), 66.0 (C-24), 13.7 (C-25), 16.7 (C-26), 25.6 (C-27), 178.5 (C-28), 32.1 (C-29), 23.3 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[26], 故鉴定化合物**12**为3 α ,24-二羟基-12-烯-28-齐墩果酸。

化合物**13**: 白色无定形粉末, ESI-MS *m/z*: 489 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 5.12 (1H, t, *J* = 3.3 Hz, H-12), 3.71 (1H, brd, *J* = 11.6 Hz, H-2), 3.60 (1H, brs, H-3), 3.43 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-24β), 3.29 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-24α), 2.09 (1H, d,

$J = 11.3$ Hz, H-18), 1.02 (3H, s, 23-CH₃), 0.93 (3H, s, 27-CH₃), 0.90 (3H, s, 26-CH₃), 0.85 (3H, d, $J = 4.4$ Hz, 30-CH₃), 0.80 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 29-CH₃), 0.69 (3H, s, 25-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 42.0 (C-1), 65.0 (C-2), 72.9 (C-3), 42.1 (C-4), 48.9 (C-5), 18.2 (C-6), 33.4 (C-7), 38.8 (C-8), 47.1 (C-9), 37.8 (C-10), 23.4 (C-11), 124.8 (C-12), 138.5 (C-13), 44.1 (C-14), 27.7 (C-15), 24.1 (C-16), 47.3 (C-17), 52.7 (C-18), 37.9 (C-19), 38.8 (C-20), 30.5 (C-21), 36.6 (C-22), 23.2 (C-23), 64.1 (C-24), 16.9 (C-25), 17.1 (C-26), 23.6 (C-27), 178.7 (C-28), 17.3 (C-29), 21.3 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[27], 故鉴定化合物**13**为2 α ,3 α -三羟基-12-烯-28-乌苏酸。

化合物**14**:无色细针状结晶(三氯甲烷), ESI-MS *m/z*: 457 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.96 (1H, s, 28-COOH), 5.12 (1H, brs, H-12), 4.31 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, 3-OH), 3.00 (1H, m, H-3), 2.10 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-18), 1.03 (3H, s, 23-CH₃), 0.91 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 29-CH₃), 0.89 (3H, s, 27-CH₃), 0.86 (3H, s, 26-CH₃), 0.81 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 30-CH₃), 0.74 (3H, s, 24-CH₃), 0.67 (3H, s, 25-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.4 (C-1), 27.0 (C-2), 76.9 (C-3), 38.5 (C-4), 54.8 (C-5), 18.1 (C-6), 32.8 (C-7), 41.7 (C-8), 46.9 (C-9), 36.4 (C-10), 22.9 (C-11), 124.6 (C-12), 138.2 (C-13), 41.7 (C-14), 23.3 (C-15), 23.9 (C-16), 46.9 (C-17), 52.4 (C-18), 38.3 (C-19), 38.3 (C-20), 30.2 (C-21), 36.6 (C-22), 28.3(C-23), 15.3 (C-24), 16.1 (C-25), 17.1 (C-26), 23.3 (C-27), 178.3 (C-28), 16.9 (C-29), 21.1 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[28], 故鉴定化合物**14**为熊果酸。

化合物**15**:白色针状结晶(三氯甲烷), ESI-MS *m/z*: 427 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.13 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-12), 3.22 (1H, dd, $J = 10.8$, 5.1 Hz, H-3), 1.11 (3H, s, 27-CH₃), 1.05 (3H, s, 26-CH₃), 0.97 (3H, s, 23-CH₃), 0.93 (3H, s, 25-CH₃), 0.91 (3H, d, $J = 4.6$ Hz, 30-CH₃), 0.81 (3H, s, 28-CH₃), 0.78 (3H, d, $J = 7.7$ Hz, 29-CH₃), 0.69 (3H, s, 24-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.4 (C-1), 26.9 (C-2), 78.6 (C-3), 38.3 (C-4), 54.7 (C-5), 17.9 (C-6), 32.4 (C-7), 40.1 (C-8), 47.1 (C-9), 36.4 (C-10), 23.0 (C-11), 124.0 (C-12), 139.1 (C-13), 41.6 (C-14), 28.4 (C-15), 26.1 (C-16), 33.3 (C-17), 58.4

(C-18), 39.0 (C-19), 39.0 (C-20), 30.6 (C-21), 40.9 (C-22), 28.1 (C-23), 15.3 (C-24), 15.9 (C-25), 16.5 (C-26), 22.9 (C-27), 27.5 (C-28), 21.1 (C-29), 17.2 (C-30)。以上波谱数据与文献基本一致^[29], 故鉴定化合物**15**为 α -香树脂醇。

3.2 药理活性筛选结果

3.2.1 抗炎活性筛选结果 Griess 法考察化合物**4~5**、**7~14**对LPS刺激的小鼠巨噬细胞RAW264.7的NO生成抑制活性结果见表1, 其中, 化合物**8**、**14**对NO生成抑制率超过60%, 但存在一定的细胞毒性。

3.2.2 抗肿瘤活性筛选结果 MTT法考察化合物**8**、**13**对人膀胱癌EJ细胞的IC₅₀值分别为(24.32±1.60)、(44.23±0.82) μmol/L; 化合物**8**、**11**对ECA-109细胞的IC₅₀值分别为(50.25±3.09)、(62.59±3.20) μmol/L; 化合物**8**对人胰腺癌PANC-1

表1 样品对NO生成抑制率

Table 1 Inhibition rate of NO production by samples

化合物	NO生成抑制率/%
4	26.27±2.04 (有细胞毒性)
5	24.81±0.76 (有细胞毒性)
7	49.55±2.16 (有细胞毒性)
8	63.10±0.64 (有细胞毒性)
9	23.98±0.70
10	39.95±1.65
11	46.25±1.71
12	22.07±3.11
13	26.78±1.27
14	64.19±0.70 (有细胞毒性)

表2 抗肿瘤筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Anti-tumor screening results ($\bar{x} \pm s, n=6$)

化合物	IC ₅₀ (μmol·L ⁻¹)		
	EJ	ECA-109	PANC-1
4	96.37±0.87	119.10±1.89	112.30±1.37
5	1 036.00±0.59	533.70±0.88	148.40±0.72
7	218.00±1.24	3 842.00±0.49	449.60±1.27
8	24.32±1.60	50.25±3.09	25.13±7.07
9	13 942.00±0.27	476.80±0.52	199.90±0.57
10	93.95±1.26	94.35±1.24	83.36±3.46
11	68.30±7.45	62.59±3.20	70.78±7.62
12	838.70±1.68	174.70±1.37	109.50±6.42
13	44.23±0.82	111.80±1.84	272.50±1.16
14	1 063.00±3.03	86.49±24.91	307.90±1.75
顺铂	55.69±0.38	37.88±1.24	45.25±1.36

细胞的 IC_{50} 值为 $(25.13\pm7.07)\mu\text{mol/L}$ 。

结果表明,化合物**8**、**14**具有较强的抗炎活性,其表现较其他三萜类化合物更好;但存在一定的细胞毒性。化合物**8**、**11**、**13**对EJ细胞、化合物**8**、**11**、**14**对ECA-109细胞具有一定的抑制作用;化合物**8**、**10**、**11**对PANC-1细胞增殖抑制活性作用较好。

4 讨论

本实验研究了红根草的化学成分,共分离鉴定了脱氢松香烷、柳杉酚、泪杉醇等15个化合物,多数为五环三萜类化合物,其母核结构类型有齐墩果烷型、乌苏烷型和羽扇豆烷型。五环三萜类化合物在植物次级代谢产物中较为常见,其种类较多,资源丰富,具有较广的生物活性,如抗炎、抗肿瘤等。前人开展了齐墩果酸^[30]、熊果酸^[31]药理作用研究,与本课题组抗炎药理研究结果比较,均表明齐墩果酸(**8**)、熊果酸(**14**)具有较强的抗炎活性,显示红根草发挥抑菌抗炎作用的物质基础可能为齐墩果酸、熊果酸等三萜类成分。研究中分离得到的化合物中,脱氢松香烷、泪杉醇、狗脊蕨酸、白桦脂酸的量较大,有待分别深入开展体外和体内药效活性研究,为建立谱效相关质控标准奠定基础。本研究丰富了红根草的化学成分及其化合物药理活性研究,为这一民族药材资源的可持续开发提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 652.
- [2] 广西实用中草药新选编辑部. 广西实用中草药新选 [M]. 广西: 广西人民出版社, 1969: 212.
- [3] 广西壮族自治区革命委员会卫生局. 广西本草选编 [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1974.
- [4] 广西壮族自治区食品药品管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准(第二卷) [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011: 141.
- [5] 朱传义, 徐宝林, 张卫, 等. 红根草抗凝血作用研究 [J]. 现代应用药学, 1987, 4(2): 11-12.
- [6] 吕强, 许国祥. 红根草抗结核有效成分的初步研究 [J]. 中国药学杂志, 1980, 15(9): 44.
- [7] 乐秀芳, 韩家娴, 沈祖铭, 等. 红根草邻醌的体内外抗癌作用研究 [J]. 肿瘤, 1992, 12(2): 49-50.
- [8] 蒋永俊. 两种鼠尾草属植物的化学成分研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2015.
- [9] 张金生, 黄勇. 红根草中的新二萜: 红根草酮内酯和新红根草酮 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(4): 1-4.
- [10] 霍华珍, 陈绍农, Guido F P, 等. 红根草三萜类化学成分的研究 [J]. 广西植物, 2019, 39(4): 516-522.
- [11] 罗婕, 张艺. 中华民族共同体视野下的民族医药传承创新 [J]. 世界中医药, 2021, 16(15): 2211-2216.
- [12] 钟小清, 卢志标, 唐倩, 等. 壮药红根草的基原调查和生药学研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1151-1155.
- [13] 宗明月. 莞花根中倍半萜类成分的抗炎活性及机制研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2021.
- [14] 马燕春, 张曼, 徐文彤, 等. 裸花紫珠化学成分及细胞毒性研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3094-3101.
- [15] Kutney J P, Han K. Studies with plant-cell cultures of the Chinese herbal plant, *Tripterygium wilfordii*. Isolation and characterization of diterpenes [J]. Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays Bas, 1996, 115(1): 77-93.
- [16] Li W H, Chang S T, Chang S C, et al. Isolation of antibacterial diterpenoids from *Cryptomeria japonica* bark [J]. Nat Prod Res, 2008, 22(12): 1085-1093.
- [17] Jang H J, Yang K S. Inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages by diterpenoids from *Phellinus pini* [J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(6): 913-917.
- [18] 何际婵, 韦松, 兰彬, 等. 黄杞茎皮化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1788-1789.
- [19] 卢旭然, 刘砾, 王满元, 等. 五指那藤三萜类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(23): 4629-4636.
- [20] 赵明, 赵英楠, 李军, 等. 白桦树皮化学成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4117-4123.
- [21] 伊哲, 张琦, 黎思露, 等. 引种亚麻叶白千层三萜类化学成分研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(12): 1982-1985.
- [22] 宣伟东, 陈海生, 袁志仙, 等. 中药胆木的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(3): 181-183.
- [23] Chen W H, Chen G Y, Wang J, et al. Chemical constituents of *Drypetes congestiflora* [J]. Chem Nat Compd, 2015, 51(4): 797-799.
- [24] 张援虎, 陈东林, 王峰鹏. 峨眉杠柳化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(5): 772-774.
- [25] 罗建光, 张洁, 孔令义. 丝石竹三萜成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1640-1641.
- [26] Wang K W, Zhang X, Zhang H J, et al. Cytotoxic triterpenes from *Streptocaulon griffithii* [J]. Chem Nat Compd, 2020, 56(1): 161-163.
- [27] Sun X R, Luo H W, Sakai T, et al. Pentacyclic triterpenes from *Salvia paramiltiorrhiza* [J]. Shoyakugaku Zasshi, 1992, 46: 202-205.
- [28] 张旋, 俞桂新. 黄花败酱化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(5): 783-791.
- [29] 莫青胡, 周先丽, 周云, 等. 桃金娘叶的化学成分研究 [J]. 中药材, 2020, 43(3): 587-590.
- [30] 戴岳, 杭秉茜, 谭立武. 齐墩果酸的抗炎作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3(2): 96-99.
- [31] 王立为, 刘新民, 余世春, 等. 枇杷叶抗炎和止咳作用研究 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 174-176.

[责任编辑 王文倩]