

山胡椒根中 1 个新的倍半萜类成分

阮清锋^{1,2}, 卢洪平², 幸丹霞², 崔 辉^{2*}, 赵钟祥^{2*}

1. 武汉市第一医院药学部, 湖北 武汉 430022

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 挖掘山胡椒 *Lindera glauca* 根的倍半萜类成分, 以期寻找到具有潜在抗炎活性的先导化合物。方法 运用正相硅胶、反相硅胶、Sephadex LH-20 凝胶及制备型高效液相色谱等对山胡椒石油醚部位化学成分进行分离纯化, 并综合采用 HRESIMS、NMR、IR、UV、OR、ECD 量子化学计算等技术确定化合物的平面和绝对构型; 运用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞体外炎症模型对所制备化合物的抗炎活性进行初步评价。结果 从山胡椒石油醚部位分离得到 10 个倍半萜化合物, 分别鉴定为 (4*R*,7*R*,10*S*)-4-羟基-4,10-二甲基-5-羰基-1(6),11(13)-二烯-12-羧酸-萘酮 (1)、linderaguaianol C (2)、(-)-(4*S*,7*S*,10*S*)-2-oxo-guaia-1(5),11(13)-dien-12-oic acid (3)、一支蒿酮酸 (4)、针叶春黄菊酸 (5)、xylaguaianol D (6)、β-木香酸 (7)、3α-hydroxycostic acid (8)、ilicic acid (9)、异一枝蒿酮酸 (10)。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为一支蒿酮酸 M (rupestonic acid M); 化合物 2 为首次从天然产物中分离得到并确定了其绝对构型, 化合物 1~4、6~9 为首次从山胡椒中分离得到。化合物 5~7、9 显示出较强的抗炎活性, 具有抗炎药物研发和活性分子结构修饰的潜在价值。

关键词: 山胡椒; 倍半萜; 抗炎活性; 一支蒿酮酸 M; β-木香酸; linderaguaianol C; 针叶春黄菊酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0457-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.013

A new sesquiterpenoid from roots of *Lindera glauca*

RUAN Qing-feng^{1,2}, LU Qi-ping², XING Dan-xia², CUI Hui², ZHAO Zhong-xiang²

1. Department of Pharmacy, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To find the sesquiterpenoids with potent anti-inflammatory activities from the roots of Shanhujiiao (*Lindera glauca*). **Methods** The constituents were obtained by comprehensive use of silica gel, ODS, sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC. Their structures, including their absolute configurations were elucidated by extensive spectroscopic analysis such as HRESIMS, NMR, IR, UV, OR and ECD quantum chemical calculations. All the isolates were tested for the anti-inflammatory activities using the lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW264.7 cells. **Results** Ten sesquiterpene compounds were isolated from petroleum ether extract of the roots of *L. glauca* and identified as (4*R*,7*R*,10*S*)-4-hydroxy-4,10-dimethyl-5-oxo-1(6),11(13)-dien-12-oic acid-naphthyl ketone (1), linderaguaianol C (2), (-)-(4*S*,7*S*,10*S*)-2-oxo-guaia-1(5),11(13)-dien-12-oic acid (3), rupestonic acid (4), aciphylllic acid (5), xylaguaianol D (6), β-costic acid (7), 3α-hydroxycostic acid (8), ilicic acid (9), and isorupestonic acid (10). **Conclusion** Compound 1 is a new compound, named rupestonic acid M. Compound 2 is isolated from natural source for the first time and its absolute configuration was confirmed using ECD calculations. Compounds 1—4 and 6—9 are obtained from *L. glauca* for the first time. Furthermore, compounds 5—7 and 9 showed potent anti-inflammatory effects and have potential value for anti-inflammatory drug development and structural modification of active molecules.

Key words: *Lindera glauca* (Sieb.et Zucc.) Bl.; sesquiterpenoid; anti-inflammatory activity; rupestonic acid M; β-costic acid; linderaguaianol C

山胡椒根为樟科山胡椒属植物山胡椒 *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Bl. 的干燥根, 又名牛筋条、牛筋树、假死柴、野胡椒等^[1]。味辛, 大热无毒。具有祛风通络、理气活血的功效, 在民间常被用来治

收稿日期: 2022-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104524); 湖北省自然科学基金资助项目 (2022CFB976)

作者简介: 阮清锋, 男, 土家族, 博士, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制。E-mail: rqbblack@163.com

*通信作者: 崔 辉, 男, 博士, 研究员, 研究方向为天然产物及其活性成分。E-mail: cuihui@gzucm.edu.cn

赵钟祥, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制。E-mail: zzx37@gzucm.edu.cn

疗类风湿性关节炎^[2]、心腹痛、跌打损伤^[3]等。化学成分研究表明,山胡椒富含挥发油(单萜和倍半萜)、生物碱、黄酮等成分^[4-6];现代药理研究表明其具有抗炎、镇痛、抗肿瘤转移等活性^[4]。在前期研究中,课题组从山胡椒根的石油醚部位分离得到了一系列结构新颖、抗炎活性良好的先导化合物,尤其是具有[5, 7, 7]和[5, 7, 6]元环系骨架的愈创木烷型倍半萜内酯 pseudoguaianelactones A~C, 其 NO 抑制活性显著优于阳性药吲哚美辛^[7-8]。因此,本研究继续对山胡椒石油醚部位的化学成分进行挖掘,以期从中发现更多具有良好活性的倍半萜类化合物。从中共分离鉴定了 10 个倍半萜,分别为(4*R*,7*R*,10*S*)-4-羟基-4,10-二甲基-5-羰基-1(6),11(13)-二烯-12-羧酸-萘酮 [(4*R*,7*R*,10*S*)-4-hydroxy-4,10-dimethyl-5-oxo-1(6),11(13)-dien-12-oic acid-naphthyl ketone, **1**]、linderaguaianol C (**2**)、(-)-(4*S*,7*S*,10*S*)-2-oxo-guaia-1(5),11(13)-dien-12-oic acid (**3**)、一支蒿酮酸 (rupestonic acid, **4**)、针叶春黄菊酸 (aciphylllic acid, **5**)、xylaguaianol D (**6**)、 β -木香酸 (β -costic acid, **7**)、3 α -hydroxycostic acid (**8**)、ilicic acid (**9**)、异一枝蒿酮酸 (isorupestonic acid, **10**) (图 1)。其中化合物 **1** 为新化合物,命名为一支蒿酮酸 M; 化合物 **2** 为新的天然产物并首次确定了其绝对构型,化合物 **1**~**4**、**6**~**9** 为首次从该植物中分离得到。此外,对所有化合物的体外抗炎活性进行了初步评价,其中化合物 **5**~**7**、**9** 能不同程度地抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的 RAW264.7 体外

细胞炎症模型中 NO 的释放。

1 仪器与材料

核磁共振波谱仪(400 MHz,德国 Bruker 公司); Triple TOF 5600⁺高分辨液质联用仪(AB Sciex, 加拿大); 圆二色谱仪(Chirascan, 英国 Applied Photophysics 公司); LC-100 半制备高效液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司); Tensor 27 傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司); RV8 旋转蒸发器(IKA, Germany); TLE204 分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm×10 mm, 5 μ m); 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); 细胞培养箱(ESCO 公司,新加坡); 空气净化操作台(海尔生物医疗有限公司); Motic AE2000 型倒置显微镜(厦门麦克奥迪电气股份有限公司); 低速台式离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司); 移液器(德国 Ependoff 公司)。

柱层色谱、薄层色谱硅胶(青岛海洋化工分厂); 反相硅胶(YMC*GEL ODS-A-HG 12 nm S-50 μ m; 日本 YMC 公司); 羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20, 25~100 μ m; Fluka BioChemaka, Buchs, 瑞士); 甲醇、乙腈(色谱纯, Oceanpak, 瑞典); 甲酸(色谱纯, Sigma 公司, 美国); 石油醚、醋酸乙酯、氯仿、甲醇(分析纯, 天津致远试剂公司); RAW264.7 细胞(广州中医药大学周联教授课题组惠赠); 吲哚美辛(批号 A0501A, 大连美仑生物技术有限公司); DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); Fetal Bovine Serum(美国 Gibco 公司); 0.25% Trypsin EDTA(美国 Gibco 公司); DMSO(细胞级, 美国 Gibco 公司)。

山胡椒药材为本课题组成员采自湖北省巴东县野三关镇黄连坪村林边(东经 110.447 0°; 北纬 30.705 7°; 海拔 1203 m), 由广州中医药大学中药学院彭光天博士鉴定为樟科山胡椒属植物山胡椒 *L. glauca* (Sieb. et Zucc.) Bl.。标本(ZYXY-IR-2017-05) 现存于广州中医药大学药物化学部。

2 提取与分离

山胡椒干燥根 20 kg, 室温下甲醇渗滤提取, 减压回收溶剂得醇提物浸膏 2.4 kg, 将浸膏用蒸馏水混悬, 加石油醚萃取 3 次, 回收石油醚得萃取物 460 g。将石油醚萃取物采用硅胶柱色谱以石油醚-丙酮(含 1%二乙胺)系统梯度洗脱(100:1~2:1), 经过薄层分析合并, 得 13 个流分(Fr. A~M)。

Fr. E 过 Sephadex LH-20 凝胶柱, 三氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱得 Fr. E-i, Fr. E-i 经半制备高效液

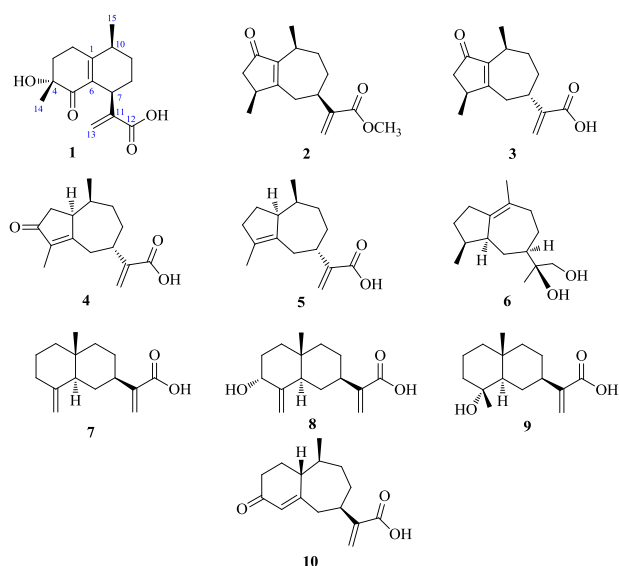


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—10

相色谱, 以甲醇-水 (75:25) 洗脱, 得化合物 **2** ($t_R=9.4$ min, 30.5 mg)。Fr. I 过 Sephadex LH-20 凝胶柱, 用三氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱得 Fr. I-c, Fr. I-c 过 ODC 反相柱, 40%~80% 甲醇梯度洗脱得 Fr. I-c-1, 继而用半制备高效液相色谱以甲醇-水 (50:50) 对其进行纯化, 得化合物 **3** ($t_R=10.2$ min, 11.7 mg) 和 **4** ($t_R=11.5$ min, 13.4 mg)。Fr. K 首先用 Sephadex LH-20 凝胶柱脱色素, 经三氯甲烷-甲醇 (1:1) 系统洗脱得 Fr. K-b, 再将 Fr. K-b 经正相硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (9:1~1:1) 梯度洗脱得 Fr. K-b-1~K-b-4, 其中 Fr. K-b-1 经过半制备高效液相色谱以甲醇-含 0.1% 甲酸水 (60:40) 进行制备, 得化合物 **7** ($t_R=10.6$ min, 20.3 mg); 组分 Fr. K-b-2 经 ODC 反相柱, 以 40%~80% 甲醇梯度洗脱得 Fr. K-b-2b 和 Fr. K-b-2c, 再将 Fr. K-b-2b 进一步经半制备高效液相色谱, 以甲醇-含 0.1% 甲酸水 (55:45) 进行制备, 得化合物 **9** ($t_R=12.2$ min, 5.7 mg), 而 Fr. K-b-2c 经半制备高效液相色谱, 以甲醇-含 0.1% 甲酸水 (58:42) 纯化, 得化合物 **10** ($t_R=8.1$ min, 11.1 mg); 最后将 Fr. K-b-4 经半制备高效液相色谱, 以甲醇-含 0.1% 甲酸水 (50:50) 进行制备, 得化合物 **1** ($t_R=12.7$ min, 8.3 mg)。将 Fr. L 经 ODC 反相柱, 以 40%~90% 甲醇梯度洗脱得 Fr. L-c, 继而将 Fr. L-c 经半制备高效液相色谱以甲醇-含 0.1% 甲酸水 (65:35) 纯化, 得化合物 **6** ($t_R=$

8.6 min, 9.6 mg) 和 **8** ($t_R=9.4$ min, 6.3 mg)。Fr. M 经 ODC 反相柱色谱, 以 50%~90% 甲醇梯度洗脱得 Fr. M-b, 将 Fr. M-b 用半制备高效液相色谱以甲醇-含 0.1% 甲酸水 (70:30) 纯化得化合物 **5** ($t_R=10.9$ min, 8.4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末 (二氯甲烷), 10% 香草醛浓硫酸显色液喷洒下显黄绿色, 易溶于氯仿、甲醇等溶剂。(-)-HRESIMS 数据 m/z 263.128 6 [M-H]⁻ (计算值 263.128 3, C₁₅H₁₉O₄) 给出分子式为 C₁₅H₂₀O₄, 计算不饱和度为 6; [α]_D²⁵ +23.5 (c 0.13, MeOH); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 236 (3.32); 圆二色谱特征吸收值为 ECD (c 1.01 mM, MeOH) λ_{max} (Δε) 212 (10.04), 256 (-6.38), 334 (0.67) nm; IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3448, 2927, 2850, 1656, 1639, 1621, 1384, 1118, 其中在波数 3448、2927 和 1639 cm⁻¹ 下的特征信号提示结构中含有羟基、甲基和羰基。

从 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 谱 (表 1) 高场区可观察到 1 个 -CH₃ 双峰信号 δ_H 1.14 (3H, d, J=7.2 Hz, CH₃-15) 和 1 个 -CH₃ 单峰信号 δ_H 1.28 (3H, s, CH₃-14); 在低场区可观察到 2 个末端烯质子信号 δ_H 5.21 (1H, s, H-13a) 和 6.31 (1H, s, H-13b); 另外观察到 2 个 sp³ 杂化的次甲基质子信号 δ_H 4.05 (1H, brs, H-7), 2.31 (1H, m, H-10) 和 8 个 sp³ 杂化的亚甲基质子信号 δ_H 2.63 (1H, m, H-2a), 2.32 (1H, m, H-2b), 2.15

表 1 化合物 1、2 的 ¹H-和 ¹³C-NMR 数据 (400/100 MHz, CDCl₃)

Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR (400/100 MHz) data for compounds 1 and 2 (400/100 MHz, CDCl₃)

碳位	1		2	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
1	163.1		146.3	
2	27.9	2.32 (m), 2.63 (m)	208.2	
3	35.3	2.01 (td, J = 12.4, 5.2 Hz), 2.15 (m)	43.1	1.97 (m), 2.60 (m)
4	72.4		37.9	2.72 (t, J = 6.8 Hz)
5	201.3		176.2	
6	130.3		37.2	2.40 (m), 2.57 (m)
7	33.2	4.05 (brs)	39.7	2.58 (m)
8	25.7	1.71 (m)	31.1	1.88 (m)
9	26.4	1.22 (m), 1.70 (m)	32.7	1.58 (m), 1.77 (m)
10	36.2	2.31 (m)	26.9	2.99 (m)
11	142.4		145.8	
12	171.4		167.4	
13	126.5	5.21 (s), 6.31 (s)	123.5	5.62 (s), 6.20 (s)
14	23.9	1.28 (s)	19.3	1.08 (d, J = 7.2 Hz)
15	19.2	1.14 (d, J = 7.2 Hz)	17.5	1.00 (d, J = 6.8 Hz)
-OCH ₃			52.1	3.76 (s)

(1H, m, H-3a), 2.01 (1H, td, $J = 12.4, 5.2$ Hz, H-3b), 1.71 (2H, m, H-8), 1.70 (1H, m, H-9a), 1.22 (1H, m, H-9b)。结合 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)、HSQC 和 DEPT 135 谱分析显示 15 个碳信号分别对应于 1 个 sp^3 杂化的季碳 $\delta_{\text{C}} 72.4$ (C-4); 5 个 sp^2 杂化的季碳 (为 3 个双键季碳 $\delta_{\text{C}} 163.1$ (C-1), 130.3 (C-6), 142.4 (C-11) 和 2 个羰基碳 $\delta_{\text{C}} 201.3$ (C-5), 171.4 (C-12)); 2 个 sp^3 杂化的次甲基 $\delta_{\text{C}} 33.2$ (C-7), 36.2 (C-10); 4 个 sp^3 杂化的亚甲基 $\delta_{\text{C}} 27.9$ (C-2), 35.3 (C-3), 25.7 (C-8), 26.4 (C-9); 1 个 sp^2 杂化的亚甲基即末端烯 $\delta_{\text{C}} 126.5$ (C-13); 2 个甲基 $\delta_{\text{C}} 23.9$ (C-14), 19.2 (C-15)。

化合物 **1** 的 1D NMR 特征与本课题组前期所报道的化合物 rupestonic acid K^[8] 非常相似, 不同的是 rupestonic acid K 的 C-10 号位上的羟基在化合物 **1** 中变到了 C-4 号位上。HMBC 谱中 H-15 与 C-1/C-10/C-9 以及 H-14 与 C-3/C-4/C-5 的相关信号证实了以上推论; 此外, ^1H - ^1H COSY 谱中所观察到的 2 个自旋偶合片段 H-2/H-3 和 H-7/H-8/H-9/H-15; HMBC 谱中 H-2 与 C-1/C-6; H-13 与 C-7/C-11/C-12 的相关信号进一步证明了化合物 **1** 平面结构的合理性 (图 2)。

为了确定化合物 **1** 的相对构型, 对化合物 **1** 的 NOESY 谱图进行分析 (图 2), 在谱图中, NOESY 信号 H-14 和 H-15 均与 Ha-13 相关, 说明 C-4 和 C-10 号位上的甲基朝向一致且都为 β 构型, 因此 H-7 为 α 构型。结合生源合成途径, 化合物 **1** 的绝对构型应该与本课题组前期报道的化合物 rupestonic acid J、rupestonic acid K 和 rupestonic acid I 的构型一致^[8], 于是采集了化合物 **1** 的 ECD 曲线 (图 3), 结果显示, 化合物 **1** 与上述已知化合物的 ECD 吸收曲线完全一致。由此, 化合物 **1** 的绝对构型被认定为 4*R*, 7*R*, 10*S*, 命名为一支蒿酮酸 M。

化合物 **2**: 淡黄色油膏状物 (氯仿), 10% 硫酸乙醇显亮黄绿色, 易溶于氯仿。(-)-HRESIMS m/z

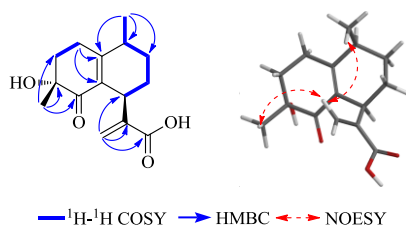


图 2 化合物 **1** 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关信号
Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations in compound **1**

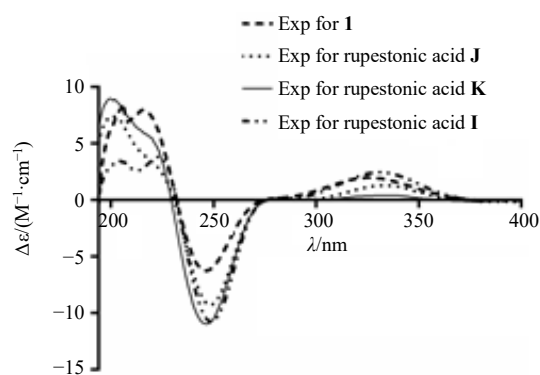


图 3 化合物 **1** 与已知化合物的实验 ECD 图谱
Fig. 3 Experimental ECD spectra of compound **1** and known compounds

261.149 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值 261.149 1, $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_3$) 给出分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$, 不饱和度为 6。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +33.7$ ($c 0.194$, MeOH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 242 (3.08); ECD ($c 1.38$ mmol/L, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 194 (23.60), 219 (-19.87) nm; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.97 (1H, m, H-3a), 2.60 (1H, m, H-3b), 2.72 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-4), 2.40 (1H, m, H-6a), 2.57 (1H, m, H-6b), 2.58 (1H, m, H-7), 1.88 (2H, m, H₂-8), 1.58 (1H, m, H-9a), 1.77 (1H, m, H-9b), 2.99 (1H, m, H-10), 5.62 (1H, s, H-13a), 6.20 (1H, s, H-13b), 1.08 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 14- CH_3), 1.00 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 15- CH_3), 3.76 (3H, s, 12- OCH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 17.6 (C-15), 19.3 (C-14), 26.9 (C-10), 31.1 (C-8), 32.7 (C-9), 37.2 (C-6), 37.9 (C-4), 39.7 (C-7), 43.1 (C-3), 52.1 (- OCH_3), 123.5 (C-13), 145.8 (C-11), 146.3 (C-1), 167.4 (C-12), 176.2 (C-5), 208.2 (C-2)。通过比对以上信息, 发现其与已知结构 (-)-(4*S*, 7*S*, 10*S*)-2-oxo-guaia-1(5), 11(13)-dien-12-oic acid^[9] 类似, 唯一不同的是化合物 (-)-(4*S*, 7*S*, 10*S*)-2-oxo-guaia-1(5), 11(13)-dien-12-oic acid 中 C-12 位上的羟基在化合物 **2** 中被 1 个甲氧基 ($\delta_{\text{C}} 52.1$) 取代。

该化合物曾被 Cheng 等^[9] 以反应中间产物报道了其平面结构。在 NOESY 谱图中, 可以观察到 CH_3 -14 和 CH_3 -15 与 H-3b 的相关信号, H-4 与 H-7 的相关信号, 说明 CH_3 -14 和 CH_3 -15 共平面, 而 H-4、H-7 与 H-10 处于共平面。为了进一步确定其绝对构型, 采用计算 ECD 与实验 ECD 相结合的方法来确定化合物 **2** 的绝对构型。首先对化合物 **2** 进行构象搜索、优化、激发态展宽、波尔兹曼拟合后, 其计算得到的构型为 4*S*, 7*R*, 10*S* 的 ECD 曲线与实验的

ECD 曲线显示出很好的吻合性(图4),从而确定了2的绝对构型是4*S*,7*R*,10*S*。因此这是该化合物首次从天然产物中分离得到并完整报道了其波谱数据,将其命名为 linderaguaianol C。

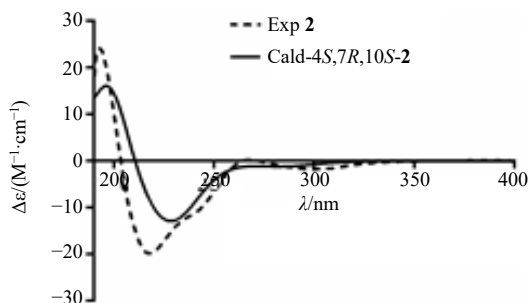


图4 化合物2的计算和实验ECD图谱

Fig. 4 Experimental and calculated ECD spectra of compound 2

化合物3: 透明油状物(氯仿), 10%香草醛浓硫酸显色液喷洒下显浅黄色, 易溶于氯仿。(–)HRESIMS 数据 m/z 247.133 6 $[M-H]^-$ (计算值 247.133 4, $C_{15}H_{19}O_3$) 给出分子式为 $C_{15}H_{20}O_3$, 计算不饱和度为6。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.98 (1H, d, $J = 18.8$ Hz, H-3a), 2.61 (1H, m, H-3b), 2.75 (1H, m, H-4), 2.45 (1H, m, H-6a), 2.60 (1H, m, H-6b), 2.61 (1H, m, H-7), 1.84 (1H, m, H-8a), 1.92 (1H, m, H-8b), 1.59 (1H, m, H-9a), 1.79 (1H, m, H-9b), 3.01 (1H, m, H-10), 5.75 (1H, s, H-13a), 6.38 (1H, s, H-13b), 1.11 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 14- CH_3), 1.02 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 15- CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 17.6 (C-15), 19.2 (C-14), 26.8 (C-10), 31.0 (C-8), 32.7 (C-9), 37.1 (C-6), 38.0 (C-4), 39.3 (C-7), 43.0 (C-3), 125.5 (C-13), 145.7 (C-11), 145.8 (C-1), 171.4 (C-12), 176.9 (C-5), 208.8 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物3为 (–)-(4*S*,7*S*,10*S*)-2-oxo-guaia-1(5), 11(13)-dien-12-oic acid。

化合物4: 透明晶体(氯仿), 10%香草醛浓硫酸溶液喷洒下显亮黄色, 易溶于氯仿。(–)HRESIMS 数据 m/z 247.134 6 $[M-H]^-$ (计算值 247.133 4, $C_{15}H_{19}O_3$) 给出分子式为 $C_{15}H_{20}O_3$, 计算不饱和度为6。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.19 (1H, m, H-1), 1.83 (1H, m, H-2a), 2.50 (1H, m, H-2b), 2.05 (1H, m, H-6a), 2.62 (1H, m, H-6b), 1.80 (1H, m, H-7), 1.68 (1H, m, H-8a), 1.82 (1H, m, H-8b), 1.84 (1H, m, H-9a),

2.92 (1H, m, H-9b), 2.15 (1H, m, H-10), 5.75 (1H, s, H-13a), 6.38 (1H, s, H-13b), 0.66 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -14), 1.64 (3H, s, CH_3 -15); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.2 (C-14), 12.3 (C-15), 31.7 (C-8), 35.4 (C-10), 36.7 (C-9), 37.8 (C-7), 38.5 (C-2), 41.5 (C-6), 46.1 (C-1), 125.7 (C-13), 138.0 (C-4), 145.8 (C-11), 171.6 (C-12), 174.7 (C-5), 208.7 (C-3)。以上数据与文献报道基本一致, 故鉴定化合物4为一支蒿酮酸^[10]。

化合物5: 淡黄色油状液体(二氯甲烷), 10%香草醛浓硫酸显蓝紫色, 易溶于氯仿。(–)HRESIMS 数据 m/z 233.152 3 $[M-H]^-$ (计算值 233.154 2, $C_{15}H_{21}O_2$) 给出分子式为 $C_{15}H_{22}O_2$, 计算不饱和度为5。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.70 (1H, t, $J = 10.4$ Hz, H-1), 1.32 (1H, m, H-2a), 2.04 (1H, m, H-2b), 1.50 (2H, m, H-2-3), 2.00 (1H, m, H-6a), 2.16 (1H, m, H-6b), 3.00 (1H, brs, H-7), 2.15 (1H, m, H-8a), 2.60 (1H, m, H-8b), 2.20 (1H, m, H-9a), 2.48 (1H, m, H-9b), 2.12 (1H, m, H-10), 5.66 (1H, s, H-13a), 6.28 (1H, s, H-13b), 1.56 (3H, s, 14- CH_3), 0.76 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 15- CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.2 (C-14), 14.3 (C-15), 28.6 (C-3), 32.6 (C-2), 35.6 (C-6), 36.9 (C-8), 37.1 (C-10), 37.5 (C-9), 38.6 (C-7), 53.2 (C-1), 124.7 (C-13), 133.1 (C-4), 134.4 (C-5), 147.3 (C-11), 173.0 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物5为针叶春黄菊酸。

化合物6: 淡黄透明油膏状物(氯仿), 10%硫酸乙醇显棕红色, 易溶于氯仿。(–)HRESIMS 数据 m/z 237.186 3 $[M-H]^-$ (计算值 237.185 5, $C_{15}H_{25}O_2$) 给出分子式为 $C_{15}H_{26}O_2$, 不饱和度为3。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.15 (1H, m, H-2a), 2.28 (1H, m, H-2b), 1.34 (1H, m, H-3a), 1.63 (1H, m, H-3b), 2.05 (1H, m, H-4), 2.39 (1H, m, H-5), 0.80 (1H, m, H-6a), 1.73 (1H, m, H-6b), 1.66 (1H, m, H-7), 1.13 (1H, m, H-8a), 2.04 (1H, m, H-8b), 2.08 (2H, m, H-2-9), 3.45 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-12a), 3.57 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-12b), 1.06 (3H, s, 13- CH_3), 1.64 (3H, s, 14- CH_3), 0.86 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 15- CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 15.4 (C-15), 20.3 (C-13), 22.4 (C-14), 26.8 (C-8), 29.0 (C-6), 30.4 (C-2), 33.1 (C-3), 34.9 (C-9), 39.0 (C-4), 46.3 (C-5), 49.6 (C-7), 68.7 (C-12), 75.7 (C-11), 129.2 (C-10), 141.4 (C-1)。以上信息显示该化合物含有1个愈创木烷倍半萜骨架, 与文献报道光谱数据基本一致^[12], 故鉴定化合物6为 xylaguaianol D。

化合物 7: 褐色油膏状物 (二氯甲烷), 10% 香草醛浓硫酸显色液喷洒下显深绿色, 易溶于氯仿。(-)-HRESIMS 数据 m/z 233.155 7 $[M-H]^-$ (计算值 233.154 2, $C_{15}H_{21}O_2$) 给出分子式为 $C_{15}H_{22}O_2$, 计算不饱和度为 5。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.69 (1H, s, H-13a), 6.32 (1H, s, H-13b), 0.74 (3H, s, CH_3 -14), 4.41 (1H, s, H-15a), 4.71 (1H, s, H-15b); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 16.6 (C-14), 23.6 (C-2), 27.4 (C-6), 30.1 (C-8), 36.0 (C-10), 37.0 (C-9), 39.5 (C-7), 41.2 (C-3), 41.9 (C-1), 50.0 (C-5), 105.6 (C-15), 125.1 (C-13), 145.4 (C-4), 150.7 (C-11), 173.1 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 7 为 β -木香酸。

化合物 8: 白色无定形粉末 (氯仿), 10% 香草醛浓硫酸显色液喷洒下显黄棕色, 易溶于氯仿。(-)-HRESIMS 数据 m/z 249.147 7 $[M-H]^-$ (计算值 249.149 1, $C_{15}H_{21}O_3$) 给出分子式为 $C_{15}H_{22}O_3$, 不饱和度为 5。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.70 (1H, m, H-1a), 1.82 (1H, m, H-1b), 1.54 (1H, m, H-2a), 1.88 (1H, m, H-2b), 4.40 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-3), 1.97 (1H, dd, $J=9.4, 4.0$ Hz, H-5), 1.50 (1H, m, H-6a), 1.66 (1H, m, H-6b), 2.50 (1H, m, H-7), 1.38 (1H, m, H-8a), 1.53 (1H, m, H-8b), 1.18 (1H, m, H-9a), 1.53 (1H, m, H-9b), 5.64 (1H, s, H-13a), 6.20 (1H, s, H-13b), 1.09 (3H, s, $14-CH_3$), 5.41 (1H, s, H-15a), 5.44 (1H, s, H-15b); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 21.8 (C-14), 26.3 (C-6), 31.6 (C-8), 33.3 (C-2), 34.7 (C-9), 38.7 (C-10), 39.0 (C-1), 40.3 (C-7), 42.8 (C-5), 73.9 (C-3), 107.0 (C-15), 121.3 (C-13), 146.5 (C-11), 153.5 (C-4), 171.6 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 8 为 3α -hydroxycostic acid。

化合物 9: 白色无定形粉末 (氯仿), 10% 香草醛浓硫酸显色液喷洒下显浅黄色, 易溶于氯仿。(-)-HRESIMS 数据 m/z 251.163 3 $[M-H]^-$ (计算值 251.164 7, $C_{15}H_{23}O_3$) 给出分子式为 $C_{15}H_{24}O_3$, 计算不饱和度为 4。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.63 (1H, m, H-1a), 1.70 (1H, m, H-1b), 1.44 (1H, m, H-2a), 1.68 (1H, m, H-2b), 1.80 (2H, m, H_2 -3), 1.45 (1H, m, H-5), 1.90 (1H, m, H-6a), 1.25 (1H, m, H-6b), 2.50 (1H, m, H-7), 1.38 (1H, m, H-8a), 1.54 (1H, m, H-8b), 1.35 (1H, m, H-9a), 1.75 (1H, m, H-9b), 5.60 (1H, s, H-13a), 6.18 (1H, s, H-13b), 0.90 (3H, s, $14-CH_3$), 1.11 (3H, s, $15-CH_3$); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 19.0 (C-14),

20.0 (C-2), 21.6 (C-15), 26.7 (C-8), 27.1 (C-6), 34.5 (C-10), 39.9 (C-7), 40.8 (C-9), 43.2 (C-1), 44.3 (C-3), 55.0 (C-5), 72.5 (C-4), 124.5 (C-13), 146.0 (C-11), 171.3 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 9 为 ilicic acid。

化合物 10: 无色柱状结晶 (氯仿), 10% 浓硫酸乙醇溶液喷洒下显黄色, 易溶于氯仿。(-)-HRESIMS 数据 m/z 247.132 8 $[M-H]^-$ (计算值 247.133 4, $C_{15}H_{19}O_3$) 给出分子式为 $C_{15}H_{20}O_3$, 计算不饱和度为 6。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.02 (1H, m, H-1), 2.10 (1H, m, H-2a), 2.19 (1H, m, H-2b), 2.23 (1H, m, H-3a), 2.56 (1H, m, H-3b), 5.80 (1H, s, H-5), 2.40 (1H, m, H-7a), 2.71 (1H, m, H-7b), 2.58 (1H, m, H-8), 1.58 (4H, m, H_2 -9, 10), 1.91 (1H, m, H-11), 5.59 (1H, s, H-14a), 6.25 (1H, s, H-14b), 1.03 (3H, d, $J=6.7$ Hz, CH_3 -15); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 21.8 (C-15), 27.6 (C-2), 28.3 (C-9), 32.9 (C-10), 33.2 (C-7), 33.3 (C-11), 42.1 (C-8), 44.5 (C-3), 45.8 (C-1), 125.6 (C-14), 127.1 (C-5), 144.7 (C-12), 167.8 (C-6), 171.5 (C-13), 200.3 (C-4)。通过与文献比对以上信息, 其与已知结构异一枝蒿酮酸的光谱数据基本一致, 该结构与本研究中报道的倍半萜类结构生源途径不吻合, 其含有比较少见的 [6, 7] 元环骨架, 其在 1991 年时被徐广顺等^[16]通过 X-射线单晶衍射实验确定了其平面以及立体构型。综合上述分析, 鉴定化合物 10 为异一枝蒿酮酸。

4 化合物的抗炎活性

本研究采用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞建立体外细胞炎症模型对化合物活性进行测试, 细胞培养和体外 NO 测定参照本课题组先前报道的方法^[7-8]。细胞培养在 DMEM 完全培养液中 [含 10% 胎牛血清 (FBS) + 青霉素 (60 units/mL) + 链霉素 (100 μ g/mL)], 实验时接种对数生长期细胞每孔 2×10^4 个细胞于 96 孔板中, 在 37 $^{\circ}C$ 和 5% CO_2 的细胞培养箱中贴壁生长 24 h。预先将测试化合物和阳性药吲哚美辛用完全培养液稀释至 25 μ mol/L, 加入 96 孔板预作用 2 h, 然后加入 1 μ g/mL LPS 培养 48 h。NO 测试选择 Griess 法^[17], 先吸取 100 μ L 细胞上清液, 在室温下先加入 50 μ L Griess 试剂 A, 再加入 50 μ L Griess 试剂 B, 室温下振摇均匀。将上述反应液用酶标仪测定 540 nm 下吸光度 (A)。同样方法下选择亚硝酸钠为标准品制作标准曲线, 计算 NO 浓度, 进而计算各化合物对 RAW264.7 细胞 NO 释

放的抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - (A_{\text{药物}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

结果如表 2 所示, 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 化合物 5~7、9 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 NO 释放显示出与阳性药相当的抑制活性, 抑制率为 24.34%~27.06%, 阳性药吲哚美辛抑制率为 38.16%。

表 2 化合物的 NO 抑制活性

Table 2 Inhibitory activities of compounds and indomethacin on release of NO

化合物	抑制率/%	化合物	抑制率/%
吲哚美辛	38.16	6	25.32
1	3.64	7	26.57
2	-7.78	8	16.42
3	-6.27	9	24.34
4	1.28	10	18.76
5	27.06		

5 讨论

本实验在前期研究的基础上, 综合应用系列化学手段对山胡椒低极性部位的倍半萜成分进行挖掘, 从中分离鉴定了 10 个倍半萜类成分, 其中化合物 1 为 1 个新的萜型倍半萜, 化合物 2 为首次从天然产物中分离得到并通过 ECD 量子化学计算确定了其绝对构型。倍半萜是自然界广泛存在的一类分子结构, 其由 3 个异戊二烯单元组成, 且具有 [6, 6] 二元环、[5, 7] 二元环、[6, 6, 3] 三元环等多种环系骨架^[18]。正是由于倍半萜复杂多样的分子结构类型, 使得倍半萜类成分具有诸如抗炎^[19]、抗肿瘤^[20]、抗疟^[21]、神经保护^[22]等广泛的生物活性, 吸引着大批药物化学家的关注。鉴于山胡椒具有治疗类风湿性关节炎的作用, 本研究对所有分离得到的化合物进行了初步抗炎活性评价, 结果表明化合物 5~7、9 对 LPS 诱导的 RAW264.7 体外细胞炎症模型中 NO 的释放具有较强的抑制活性。从构效关系上来看, 其抗炎活性可能与骨架类型、环上是否具有羰基官能团以及部分手性中心的构型有关。总之, 本研究的开展, 不仅丰富了山胡椒及山胡椒属植物的化学成分库, 还为山胡椒的药效物质基础及作用机制研究提供了思路和研究材料, 同时也寻找到了一个挖掘倍半萜活性先导化合物的宝贵来源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 孙慧玲, 王俊霞, 顾雪竹, 等. 山胡椒叶及果实挥发性

成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 94-97.

- [2] 中国药材公司. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 288-289.
- [3] 姚旭丽, 李钧敏, 付俊, 等. 山胡椒叶片次生代谢产物抑菌活性大小分析 [J]. 福建林业科技, 2008, 35(3): 174-176.
- [4] Yu J S, Baek J, Park H B, et al. A new rearranged eudesmane sesquiterpene and bioactive sesquiterpenes from the twigs of *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(12): 1628-1634.
- [5] Huh G W, Park J H, Kang J H, et al. Flavonoids from *Lindera glauca* Blume as low-density lipoprotein oxidation inhibitors [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(11): 831-834.
- [6] Chang Y C, Chen C Y, Chang F R, et al. Alkaloids from *Lindera glauca* [J]. *Jnl Chin Chemical Soc*, 2001, 48(4): 811-815.
- [7] Ruan Q F, Jiang S Q, Zheng X Y, et al. Pseudoguaianelactones A-C: Three unusual sesquiterpenoids from *Lindera glauca* with anti-inflammatory activities by inhibiting the LPS-induced expression of iNOS and COX-2 [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56(10): 1517-1520.
- [8] Ruan Q F, Pan W C, Zhao M, et al. Butyrolactone and sesquiterpene derivatives as inhibitors of iNOS from the roots of *Lindera glauca* [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 111: 104871.
- [9] Cheng W, Zhu C G, Xu W D, et al. Chemical constituents of the bark of *Machilus wangchiana* and their biological activities [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(12): 2145-2152.
- [10] 徐广顺, 陈希元, 于德泉. 新疆一枝蒿新倍半萜成分: 一枝蒿酮酸的结构 [J]. 药学学报, 1988, 23(2): 122-125.
- [11] Nii H, Furukawa K, Iwakiri M, et al. A new sesquiterpene carboxylic acid from *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume [J]. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 1983, 57(8): 725-732.
- [12] Wei H, Xu Y M, Espinosa-Artiles P, et al. Sesquiterpenes and other constituents of *Xylaria* sp NC1214, a fungal endophyte of the moss *Hypnum* sp. [J]. *Phytochemistry*, 2015, 118: 102-108.
- [13] 杨辉, 孙汉董. 云木香化学成分研究 I [J]. 云南植物研究, 1997(1): 85-91.
- [14] Xie W D, Weng C W, Shen T, et al. Sesquiterpenoids from *Aster himalaicus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2011, 47(2): 309-310.
- [15] Guilhon G M S P, Müller A H. Eudesmane sesquiterpenoids from *Pluchea quitoc* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(2): 227-229.
- [16] 徐广顺, 赵文, 吴丹, 等. 异一枝蒿酮酸的结构 [J]. 药

- 学学报, 1991, 26(7): 505-509.
- [17] Huang Y J, Lu H, Yu X L, *et al.* Dammarane-type triterpenoids from *Gentianella azurea* [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(5): 1201-1209.
- [18] Fraga B M. Natural sesquiterpenoids [J]. *Nat Prod Rep*, 2013, 30(9): 1226-1264.
- [19] Liang S, Shen Y H, Feng Y, *et al.* Terpenoids from *Daphne aurantiaca* and their potential anti-inflammatory activity [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(4): 532-535.
- [20] Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, *et al.* What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? [J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15(15/16): 668-678.
- [21] 李海波, 秦大鹏, 葛雯, 等. 青蒿化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(14): 3461-3470.
- [22] Zhou Q M, Chen M H, Li X H, *et al.* Absolute configurations and bioactivities of guaiane-type sesquiterpenoids isolated from *Pogostemon cablin* [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(9): 1919-1927.

[责任编辑 王文倩]