

• 化学成分 •

奇楠沉香中 2 个新的桉烷型倍半萜类化合物

陈德力¹, 马国需^{1,2}, 刘会梅¹, 王灿红¹, 杨云¹, 刘洋洋^{1*}, 魏建和^{1,2*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南 海口 570311

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 研究奇楠沉香 *Aquilaria sinensis* 中具有神经细胞损伤保护作用的活性化合物。方法 利用硅胶柱色谱、半制备液相色谱等现代色谱技术进行分离纯化, 结合核磁共振和质谱等现代谱学手段鉴定其结构, 同时体外法测定化合物对皮质酮 (corticosterone) 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用。结果 从奇楠沉香超临界提取物中分离得到 2 个桉烷型倍半萜类化合物, 分别鉴定为 (7*R*,8*S*,10*R*)-(+)-8-hydroxy-selina-4,11-dien-12,15-dial (1) 和 (7*S*,8*S*,10*R*)-(+)-8,11-dihydroxy-selina-4-en-15-al (2); 体外对 PC12 细胞损伤存活率显著升高。结论 化合物 1 和 2 为新化合物, 分别命名为奇楠醇 A 和奇楠醇 B, 均对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤具有一定的保护作用。

关键词: 奇楠; 沉香; 白木香; 桉烷型倍半萜; 神经保护; 奇楠醇 A; 奇楠醇 B

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)16-5137-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.16.001

Two new eudesmane-type sesquiterpenes in “Qi-Nan” agarwood from *Aquilaria sinensis*CHEN De-li¹, MA Guo-xu^{1,2}, LIU Hui-mei¹, WANG Can-hong¹, YANG Yun¹, LIU Yang-yang¹, WEI Jian-he^{1,2}

1. Hainan Branch Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Haikou 570311, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To investigate the neuroprotective of active molecules in “Qi-Nan” agarwood from *Aquilaria sinensis*. **Methods** The compounds were isolated and purified by modern chromatography techniques, such as silica gel column chromatography, and semi-preparative high performance liquid chromatography, and the chemical structures were identified by NMR and MS spectrometry. The neuroprotective effect of these compounds on corticosterone (CORT) induced PC12 cell damage was evaluated *in vitro*. **Results** Two eudesmane-type sesquiterpenoids were isolated from the supercritical extract of “Qi-Nan” agarwood, and named as (7*R*,8*S*,10*R*)-(+)-8-hydroxy-selina-4,11-dien-12,15-dial (1) and (7*S*,8*S*,10*R*)-(+)-8,11-dihydroxy-selina-4-en-15-al (2). Compounds 1 and 2 significantly increased the survival rate of PC12 cells after injury *in vitro*. **Conclusion** Compounds 1 and 2 are new compounds with the trivial name aquinanol A and B, which have moderate neuroprotective effects against PC12 cell damage induced by CORT.

Key words: Qi-Nan; agarwood; *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng; eudesmane-type sesquiterpenoids; neuroprotective; aquinanol A; aquinanol B

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2020111); 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2022SHFZ030); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-032); 国家自然科学基金青年基金项目 (82204657)

作者简介: 陈德力, 男, 博士, 副研究员, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: chendeli9999@163.com

*通信作者: 刘洋洋, 男, 研究员, 研究方向为中药质量控制技术及其应用。Tel: (0898)31589007 E-mail: eadchris@163.com

魏建和, 男, 研究员, 研究方向为药用植物基因资源、分子育种及次生代谢产物调控。Tel: (010)57833016 E-mail: wjianh@263.net

焦虑和抑郁等常见的神经精神性疾病,已成为危害人类健康的第二大疾病,且其病因病机复杂多变,并多伴有严重并发症^[1]。沉香为瑞香科(Thymelaeaceae)植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng 伤害诱导防御反应形成的含有树脂的木材,是我国传统医学中常用的理气药,具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘、益气和神的功效,通过吸入挥发性香气物质起到镇静安神、调节睡眠作用^[2-3]。现代药理研究表明,沉香提取物或单体化合物具有较好的镇静催眠、抗焦虑、抗抑郁和抗神经炎作用^[4-9]。课题组前期亦明确沉香挥发性成分或醇提物具有显著镇静促睡眠、抗焦虑和抗抑郁的作用^[10-14]。普通沉香的化学成分和药理作用已有大量研究^[15-17],而奇楠沉香因其独特的芳香气味和性状而区别于普通沉香,被认为是最具有上等品质和珍贵价值的沉香,现已开始批量上市销售,本课题组研究表明其物种仍为白木香,是一种新的化学型^[18-19],其研究报道较少。因此,从奇楠沉香中挖掘具有神经调控或保护作用的先导活性分子,具有重要的科学研究意义。

课题组为了进一步了解奇楠沉香挥发性成分,并从中挖掘具有神经保护作用的潜在药物分子,对其超临界提取物进行了分离纯化,采用波谱学技术手段鉴定了 2 个新化合物,分别鉴定为 (7R,8S,10R)-(+)-8-hydroxy-selina-4,11-dien-12,15-dial (1) 和 (7S,8S,10R)-(+)-8,11-dihydroxy-selina-4-en-15-al (2),均为桉烷型倍半萜类化合物(图 1)。同时,采用体外法评价化合物对皮质酮(corticosterone)诱导 PC12 细胞损伤的保护作用,发现化合物 1 和 2 可保护皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤。

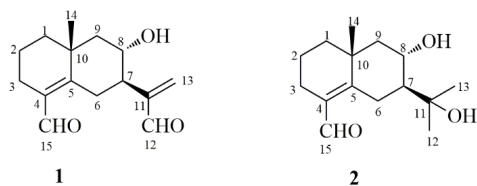


图 1 化合物 1 和 2 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

1 仪器与材料

Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司),高分辨质谱仪 Q-tof(美国沃特世公司), Nicolet iS5 FT-IR 型傅里叶红外光谱仪(美国赛默飞公司), Photophysics Chirascan 圆二色谱仪(英国应用光物理公司), MCP200 型自动旋光仪(德

国安东帕公司)。BS110S 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), P230 型高压半制备液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司), DAD230+二极管阵列大连检测器(大连依利特分析仪器有限公司), RE-5299 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), 超声波清洗仪(深圳市洁盟清洗设备有限公司)。SB-Phenyl 色谱柱(250 mm×9.4 mm, 5 μm, 安捷伦公司), 柱色谱用硅胶(100~200 目, 青岛海洋化工有限公司), 薄层色谱用硅胶 G、H、GF₂₅₄(青岛海洋化工有限公司), 水(杭州娃哈哈集团有限公司), 石油醚、醋酸乙酯、二氯甲烷、甲醇等常规试剂均为国产分析纯。

奇楠沉香 CO₂ 超临界提取物(100.0 g)由瑜丰沉香汇(广东)科技有限公司提供。奇楠沉香产自广东茂名,经中国医学科学院药用植物研究所海南分所刘洋洋研究员鉴定为奇楠种质沉香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng。

2 方法

2.1 提取与分离

奇楠沉香 CO₂ 超临界提取物(100.0 g)总浸膏经 100~200 目硅胶柱色谱分离,使用石油醚-醋酸乙酯溶剂系统进行梯度洗脱(40:1、30:1、20:1、15:1、10:1、8:1、6:1、3:1、1:1、0:1),得到 Fr. A~J。其中 Fr. H 部位(石油醚-醋酸乙酯 3:1)经半制备高效液相色谱分离纯化得到化合物 1(9.8 mg, *t_R*=17.2 min, 甲醇-水 65:35, 体积流量 2.0 mL/min); Fr. G 部位(石油醚-醋酸乙酯 6:1)经半制备高效液相色谱分离纯化得到化合物 2(2.4 mg, *t_R*=17.7 min, 甲醇-水 60:40, 体积流量 2.0 mL/min)。半制备高效液相检测波长均为 210 nm。

2.2 神经保护活性筛选

体外法测定化合物对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤的保护作用^[20]。PC12 细胞按常规方法培养,在 96 孔板中接种对数生长期细胞,使细胞浓度为 5×10⁴ 个/mL,每孔加入 100 μL,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。设置对照组、模型组、阳性对照地西洋组、实验组。对照组中加入 200 μL 不完全培养基不做任何处理;模型组只用 200 μL 的皮质酮(终浓度为 200 μmol/L)处理;实验组以 100 μL 的皮质酮(终浓度为 200 μmol/L)和相应药物(50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 μg/mL)处理,阳性对照组地西洋(地西洋产生毒性的血药浓度为 30 μg/mL,故给药剂量设其 1/10 剂量 3.125 μg/mL)100

μL 处理细胞。置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h ，小心吸取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的含药培养基，加入 CCK8 $10\text{ }\mu\text{L}$ ，置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的培养箱中孵育 2 h 后，将 96 孔板置于酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 **1**：无色油状物， $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 108.9$ ($c\text{ }0.1$, MeOH)，HR-ESI-MS m/z : $271.131\text{ }7$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calcd. $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NaO}_3$, $271.131\text{ }0$)，提示化合物 **1** 的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ 。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 225 (2.38), 247 (4.25)；IR 显示该结构中含有羟基 (3420 cm^{-1}) 以及羰基 (1687 、 1662 cm^{-1}) 等官能团。 ^1H -NMR 谱 (表 1) 中显示 1 个甲基氢信号 δ_{H} 1.27 (3H , s, H_3 -14)；6 个亚甲基氢信号 δ_{H} 1.63 (1H , m, H -1a), 1.42 (1H ,

m, H -1b), 1.60 (1H , m, H -2a), 1.42 (1H , m, H -2b), 2.38 (1H , m, H -3a), 2.06 (1H , d, $J = 4.2\text{ Hz}$, H -3b), 3.34 (1H , dd, $J = 8.4$, 3.6 Hz , H -6a), 2.44 (1H , dt, $J = 14.4$, 2.4 Hz , H -6b), 2.04 (1H , d, $J = 4.2\text{ Hz}$, H -9a), 1.44 (1H , m, H -9b), 6.47 (1H , s, H -13a), 6.23 (1H , s, H -13b)；2 个次甲基氢信号 δ_{H} 2.58 (1H , td, $J = 10.2$, 3.6 Hz , H -7), 4.14 (1H , td, $J = 10.8$, 4.2 Hz , H -8)；以及 2 个醛基质子信号 δ_{H} 9.61 (1H , s, H -12), 10.11 (1H , s, H -15)。 ^{13}C NMR 谱 (表 1) 中显示 15 个碳信号，结合 HSQC 谱，分别归属于 1 个甲基碳信号 δ_{C} 26.1 ；6 个亚甲基碳信号 δ_{C} 39.1 , 17.6 , 23.8 , 27.9 , 50.0 , 136.2 ；2 个次甲基碳信号 δ_{C} 46.7 , 68.8 ；4 个季碳信号 δ_{C} 133.7 , 160.3 , 38.3 , 150.2 ；以及 2 个醛基碳信号 δ_{C} 195.1 , 191.0 。1D NMR 数据 (表 1) 结合 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关 (图 2)，推断化合物 **1** 为 1 个桉烷型倍半萜类结构，且与化合物 (7*S*,8*R*,10*S*)-

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 ^1H -和 ^{13}C -NMR 数据 ($600/150\text{ MHz}$, CDCl_3)

Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR data of compounds **1** and **2** ($600/150\text{ MHz}$, CDCl_3)

碳位	1		2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	1.63 (m), 1.42 (m)	39.1	1.62 (m), 1.38 (m)	39.0
2	1.60 (m), 1.42 (m)	17.6	1.60 (m), 1.45 (m)	17.6
3	2.38 (m), 2.06 (d, $J = 4.2\text{ Hz}$)	23.8	2.37 (dd, $J = 15.6$, 4.8 Hz), 2.00 (d, $J = 4.2\text{ Hz}$)	23.9
4		133.7		133.3
5		160.3		161.4
6	3.34 (dd, $J = 8.4$, 3.6 Hz), 2.44 (dt, $J = 14.4$, 2.4 Hz)	27.9	3.37 (dd, $J = 14.4$, 3.6 Hz), 1.85 (t, $J = 3.0\text{ Hz}$)	25.1
7	2.58 (td, $J = 10.2$, 3.6 Hz)	46.7	1.60 (m)	55.0
8	4.14 (td, $J = 10.8$, 4.2 Hz)	68.8	4.20 (td, $J = 10.8$, 4.2 Hz)	68.5
9	2.04 (d, $J = 4.2\text{ Hz}$), 1.44 (m)	50.0	1.98 (d, $J = 4.2\text{ Hz}$), 1.40 (m)	50.0
10		38.3		37.9
11		150.2		75.2
12	9.61 (s)	195.1	1.33 (s)	23.8
13	6.47 (s), 6.23 (s)	136.2	1.34 (s)	30.3
14	1.27 (s)	26.1	1.21 (s)	26.1
15	10.11 (s)	191.0	10.17 (s)	190.7

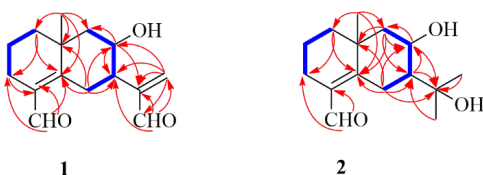


图 2 化合物 **1** 和 **2** 的关键 ^1H - ^1H COSY (—) 和 HMBC (—) 相关

Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY (—) and HMBC (—) correlations of compounds **1** and **2**

(+)-8,12-dihydroxy-selina-4,11-dien-14-al 结构相似^[21]，唯一不同的是该化合物中 C-12 位的含氧亚甲基在化合物 **1** 中被醛基取代。在 HMBC 谱图中 (图 2)， δ_{H} 9.61 (s, H -12) 与 δ_{C} 46.7 (C-7)、 150.2 (C-11) 和 136.2 (C-13) 相关，证明 C-11 位存在醛基取代。

化合物 **1** 的相对构型由 NOESY 谱图。在 NOESY 谱图中， H -8 与 H -14/ H -9a/ H -6a 存在相关，表明他们处于同侧； H -7 与 H -9b 存在 NOE 相关， H -7 与 H -8 未观察到 NOE 增益，结合两者的偶合常

数 ($J^2 > 9.0$) 进一步证明两者处于反式。为了进一步确定其绝对构型, 参考该类化合物的生物合成途径以及在 B3LYP/6-31 G (d) 基组水平的计算 ECD 图谱与化合物 **1** 的实验图谱一致 (图 3), 确定其绝对构型为 **7R,8S,10R-1**。经文献检索, 确定该化合物为新化合物, 鉴定为 (7R,8S,10R)-(+)-8-hydroxy-selina-4,11-dien-12,15-dial, 命名为奇楠醇 A。

化合物 **2**: 无色油状物, $[\alpha]_D^{25} + 26.0$ (c 0.1, MeOH), HR-ESI-MS m/z : 275.162 8 $[M + Na]^+$ (Calcd. $C_{15}H_{24}NaO_3$, 275.1623), 提示化合物 **2** 的分子式为 $C_{15}H_{24}O_3$ 。UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 220 (2.48), 237 (3.54); IR 显示该结构中含有羟基 (3410 cm^{-1}) 以及羰基 (1693 、 1661 cm^{-1}) 等官能团。综合比较分析 1H 和 ^{13}C NMR 数据 (表 1), 化合物 **2** 与 **1** 有相似的

桉烷型倍半萜骨架结构, 不同之处在于化合物 **2** 中有 2 个单线态甲基信号 [δ_H 1.33 (s, H_3-12), 1.34 (s, H_3-13)] 取代了化合物 **1** 中的 $\Delta^{11,13}$ 双键和醛基。在 HMBC 谱中, H_3-12/H_3-13 与 C-11 (δ_C 75.2) /C-7 (δ_C 55.0) 存在相关, 亦证明上述判断。在 NOESY 谱图中, H-8 与 H-14 存在相关, 表明他们处于同侧; H-7 与 H-8 未观察到 NOE 增益, 结合两者的偶合常数 ($J^2 > 9.0$) 进一步证明两者处于反式。为了进一步确定其绝对构型, 参考该类化合物的生物合成途径以及在 B3LYP/6-31 G (d) 基组水平的计算 ECD 图谱与化合物 **2** 的实验图谱一致 (图 3), 确定其绝对构型为 **7S,8S,10R-2**。经文献检索, 确定该化合物为新化合物, 鉴定为 (7S,8S,10R)-(+)-8,11-dihydroxy-selina-4-en-15-al, 命名为奇楠醇 B。

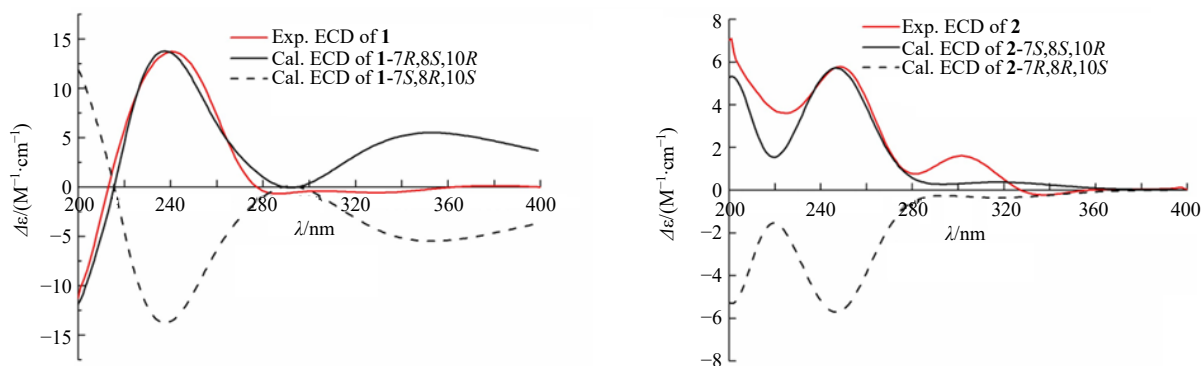


图 3 化合物 **1** 和 **2** 的实测和计算 ECD 谱图

Fig. 3 Experimental and calculated ECD spectra of compounds **1** and **2**

3.2 活性测试结果

体外测定化合物对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤的保护活性结果表明, 皮质酮诱导损伤的 PC12 细胞存活率为 48.8%, 与阳性对照药地西洋相比 (皮质酮诱导细胞损伤后的细胞存活率为 85.2%), 化合物 **1** 和 **2** 在 $25.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, 对损伤后的 PC12 细胞的存活率分别为 83.4%、86.2%; 在 $12.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, 化合物 **1** 和 **2** 对损伤后的 PC12 细胞的存活率分别为 72.4%、76.3%; 在 $6.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, 化合物 **1** 和 **2** 对损伤后的 PC12 细胞的存活率分别为 57.5%、63.8%; 表明化合物 **1** 和 **2** 对皮质酮诱导损伤的 PC12 细胞具有一定的保护作用。

4 讨论

沉香中含有结构类型丰富的倍半萜类化合物, 主要包括桉烷型、艾里莫芬烷型和愈创木烷型等。该研究利用多种现代色谱技术结合谱学手段, 从奇楠沉香超临界提取物中分离并鉴定了 2 个桉烷型倍

半萜类化合物, 均为新化合物。同时, 体外法测定化合物对 CORT 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用, 发现化合物 **1** 和 **2** 均具有一定的神经细胞损伤保护活性。综上, 本研究结果丰富了奇楠沉香超临界提取物的化学成分, 为其开发利用提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 弓宝, 王灿红, 吴玉兰, 等. 沉香熏香吸入抗焦虑、抗抑郁作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(4): 1023-1031.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 192.
- [3] 李时珍. 本草纲目 (第二册) [M]. 校点本. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 1939.
- [4] Huo H X, Zhu Z X, Pang D R, et al. Anti-neuroinflammatory sesquiterpenes from Chinese eaglewood [J]. *Fitoterapia*, 2015, 106: 115-121.
- [5] 史圣华, 金星, 莫日根. 广枣七味散、十三味槟榔散、沉香四味散抗抑郁作用的实验研究 [J]. 中国民族医药

- 杂志, 2012, 18(5): 41-43.
- [6] 侯金良, 张媛媛, 张浩, 等. 沉香片剂小鼠口鼻吸入给药抗焦虑和催眠功效实验研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(1): 113-119.
- [7] Kao W Y, Hsiang C Y, Ho S C, *et al.* Novel serotonin-boosting effect of incense smoke from Kynam agarwood in mice: The involvement of multiple neuroactive pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114069.
- [8] 梁宇, 孔德文, 周启蒙, 等. 沉香气体吸入给药通过影响神经递质调节小鼠睡眠的作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(6): 71-77.
- [9] 雷莉, 张婷, 高东, 等. 沉香熏香疗法对失眠障碍患者的临床疗效研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(7): 609-612.
- [10] 王帅, 周岳, 马富超, 等. 通体沉香对小鼠催眠和自主活动抑制作用 [J]. 国际药理学研究杂志, 2016, 43(6): 1082-1087.
- [11] Wang C H, Wang Y Y, Gong B, *et al.* Effective components and molecular mechanism of agarwood essential oil inhalation and the sedative and hypnotic effects based on GC-MS-qtof and molecular docking [J]. *Molecules*, 2022, 27(11): 3483.
- [12] Wang S, Wang C H, Peng D Q, *et al.* Agarwood essential oil displays sedative-hypnotic effects through the GABAergic system [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2190.
- [13] Wang S, Wang C H, Yu Z X, *et al.* Agarwood essential oil ameliorates restrain stress-induced anxiety and depression by inhibiting HPA axis hyperactivity [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3468.
- [14] Chen X Q, Wang C H, He Q Q, *et al.* Chemical composition and potential properties in mental illness (anxiety, depression and insomnia) of agarwood essential oil: a review [J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4528.
- [15] Li W, Chen H Q, Wang H, *et al.* Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: Chemistry, biological activities and biosynthesis [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(3): 528-565.
- [16] 彭德乾, 王灿红, 刘洋洋, 等. 沉香的化学成分及其药理活性的研究进展 [J]. 中国现代应用药理学, 2021, 38(3): 358-365.
- [17] Wang S, Yu Z X, Wang C H, *et al.* Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and *Aquilaria* plants [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 342.
- [18] 冯剑, 侯文成, 陈兰, 等. 基于《中华人民共和国药典》的奇楠种质产沉香的质量分析与评价 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(3): 432-437.
- [19] Hou W C, Liu P W, Liu Y Y, *et al.* Chi-Nan agarwood germplasms constitute a new chemotype of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng [J]. *Ind Crops Prod*, 2022, 187: 115494.
- [20] He Q, Hu D B, Zhang L, *et al.* Neuroprotective compounds from the resinous heartwood of *Aquilaria sinensis* [J]. *Phytochemistry*, 2021, 181: 112554.
- [21] Li W, Cai C H, Guo Z K, *et al.* Five new eudesmane-type sesquiterpenoids from Chinese agarwood induced by artificial holing [J]. *Fitoterapia*, 2015, 100: 44-49.

[责任编辑 王文倩]