

• 化学成分 •

五加皮中二萜类化学成分及其抗炎活性研究

张 雪^{1,2}, 解盈盈¹, 刘 琦¹, 关永霞³, 赵淑秀⁴, 刘青芝⁴, 林永强¹, 郭东晓^{1,3*}

1. 山东省食品药品检验研究院, 国家药监局胶类产品质量评价重点实验室, 山东省中药标准创新与质量评价工程实验室, 中药配方颗粒共性技术山东省工程研究中心, 山东 济南 250101
2. 山东现代学院, 山东 济南 250104
3. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276006
4. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘 要: 目的 对五加皮 *Acanthopanax Cortex* 的二萜类化学成分及抗炎活性进行研究。方法 通过 MCI 树脂柱、硅胶柱、薄层色谱、半制备 HPLC 等方法对五加皮药材中化学成分进行提取分离, 采用核磁共振波谱、质谱、红外光谱等方法, 对单体化合物的结构进行鉴定。采用 Griess 法测试脂多糖诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞释放炎症因子模型, 对化合物进行抗炎活性评价。结果 从五加皮 70%乙醇提取物中分离得到 13 个二萜类化合物, 包括 7 个对映海松烷型二萜 7 β -羟基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸 (1)、7-酮基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸 (2)、7 β -甲氧基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸 (3)、6,8(14),15-三烯-19-异海松烷酸 (4)、14-酮基-8,15-二烯-19-异海松烷酸 (7)、14-羟基-16-乙烯基-8,11,13-三烯-17-异海松烷酸 (8)、7 α -羟基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸 (11); 以及 6 个对映贝壳杉烷型二萜 16 α ,17-二羟基-19-异贝壳杉烷酸 (5)、17-羟基-19-异贝壳杉烷酸 (6)、异贝壳杉烯酸 (9)、17-醛基-19-异贝壳杉烯酸 (10)、17-醛基-15-烯-19-异贝壳杉烷酸 (12) 和 17-羟基-15-烯-19-异贝壳杉烷酸 (13)。其中化合物 8 为新化合物, 命名为细柱五加酸 G1; 3 和 4 为首次从细柱五加植物中分离得到。体外抗炎活性研究表明, 13 个化合物均具有一定的抗炎活性, 其中化合物 1~3、7 的活性较好。海松烷型二萜类化合物抗炎活性较贝壳杉烷型二萜强, 海松烷型二萜类化合物 7 位取代活性强弱顺序为 β -OH > β -OCH₃ > Δ^6 双键 > C=O > α -OH。结论 五加皮分离鉴定的化合物及其活性研究为五加皮专属性质控方法建立、药用资源合理开发和利用提供了依据。

关键词: 五加皮; 二萜类; 抗炎活性; 细柱五加酸 G1; 7 β -甲氧基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸; 6,8(14),15-三烯-19-异海松烷酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7709-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.012

Diterpenoids and their anti-inflammatory activities of *Acanthopanax Cortex*ZHANG Xue^{1,2}, XIE Ying-ying¹, LIU Qi¹, GUAN Yong-xia³, ZHAO Shu-xiu⁴, LIU Qing-zhi⁴, LIN Yong-qiang¹, GUO Dong-xiao^{1,3}

1. Shandong Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Gelatin Products, Shandong Engineering Laboratory for Standard Innovation and Quality Evaluation of TCM, Shandong Engineering Research Center for Generic Technologies of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Jinan 250101, China
2. Shandong Xiandai University, Jinan 250104, China
3. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Linyi 276006, China
4. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

收稿日期: 2023-07-30

基金项目: 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2021CXGC010511); 济南市“新高校 20 条”项目科研带头人工作室(202228096); 济宁市重点研发计划(软科学)项目(2022JNZC007); 山东软科学研究会“产教融合研究智库专项”课题(SDRKX-01-202214); 山东省食品药品检验研究院平台课题(SDIFDC-KY-1-2021023)

作者简介: 张 雪(1996—), 女, 山东邹城人, 硕士, 研究方向为药物分析学。E-mail: zhangxue323@163.com

***通信作者:** 郭东晓(1984—), 男, 主任药师, 研究方向为中药、保健食品和化妆品质量评价。Tel: (0531)81216540 E-mail: guodx0212@126.com

Abstract: Objective To study diterpenoids and their anti-inflammatory activities of Wujiapi (*Acanthopanax Cortex*, the root bark of *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith). **Methods** The chemical constituents were separated and obtained by MCI resin column, silica gel column, thin-layer chromatography, semi-preparative HPLC and other methods. Their structures were identified by nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, infrared spectrum, and so on. The Griess method was used to evaluate the anti-inflammatory activity by testing the inflammatory factor release model induced by lipopolysaccharide in mouse monocyte macrophage RAW264.7 cells. **Results** A total of 13 compounds were isolated from the 70% ethanol extract of *Acanthopanax Cortex*, including seven *ent*-pimarane diterpenoids: 7 β -hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid (**1**), 7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid (**2**), 7 β -methoxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid (**3**), *ent*-pimara-6,8(14),15-trien-19-oic acid (**4**), 14-oxo-*ent*-pimara-8,15-dien-19-oic acid (**7**), 14-hydroxy-16-devinyl-*ent*-pimara-8,11,13-trien-17-oic acid (**8**), 7 α -hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid (**11**), and 6 *ent*-kaurene diterpenoids: 16 α ,17-dihydroxy-*ent*-kaur-19-oic acid (**5**), 17-hydroxy-*ent*-kaur-19-oic acid (**6**), *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**9**), 17-oxo-*ent*-kaur-19-oic acid (**10**), 17-oxo-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid (**12**), and 17-hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid (**13**). Compound **8** is a new compound, named acangracilic acid G1. Compound **3** and **4** are obtained from this plant for the first time. *In vitro* anti-inflammatory activity studies showed that all of the compounds exhibited anti-inflammatory activities, among which **1—3** and **7** showed higher anti-inflammatory activities. The anti-inflammatory activities of *pimarane* diterpenoids are stronger than those of *kaurene* diterpenoids. The activity order of C-7 substitution of *pinane* diterpenoids is β -OH > β -OCH₃ > Δ^6 double bond > C=O > α -OH. **Conclusion** The compounds isolated and identified in this experiment and their activity research provide a basis for the establishment of specific quality control methods for *Acanthopanax Cortex*, as well as the rational development and utilization of medicinal resources.

Key words: *Acanthopanax Cortex*; diterpenoids; anti-inflammatory activity; acangracilic acid G1; 7 β -methoxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid; *ent*-pimara-6,8(14),15-trien-19-oic acid

五加皮为五加科五加属植物细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith. 的干燥根皮, 又称南五加皮、五谷皮、红五加皮, 主要分布于我国湖北、河南、陕西、安徽、浙江、辽宁、河北等省, 为临床常用的传统中药材^[1]。五加皮始载于《本经》, 主要功效为祛风除湿、补益肝肾、强筋壮骨、利水消肿, 临床上主要用于治疗风湿痹病、筋骨萎软、小儿行迟、体虚乏力、水肿和脚气等疾病^[2]。《中华本草》^[3]中记载五加皮具有抗炎镇痛、抗应激、抗肿瘤、提高免疫力等作用, 其化学成分主要有挥发油类、萜类、甾醇类、有机酸类、脂肪酸类、苯丙素类、黄酮类等^[4]。现代药理学研究表明, 五加皮具有很好的抗炎活性^[5-6]。

本研究从五加皮 70%乙醇提取物中分离得到 13 个二萜类化合物, 包括 7 个海松烷型二萜 7 β -羟基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸 [7 β -hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid, **1**]、7-酮基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸 [7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid, **2**]、7 β -甲氧基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸 [7 β -methoxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid, **3**]、6,8(14),15-三烯-19-异海松烷酸 [6,8(14),15-trien-19-oic acid, **4**]、14-酮基-8,15-二烯-19-异海松烷酸 [14-oxo-*ent*-pimara-8,15-dien-19-oic acid, **7**]、14-羟基-16-乙烯基-8,11,13-三

烯-17-异海松烷酸 (14-hydroxy-16-devinyl-*ent*-pimara-8,11,13-trien-17-oic acid, **8**)、7 α -羟基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸 [7 α -hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid, **11**]; 以及 6 个贝壳杉烷型二萜 16 α ,17-二羟基-19-异贝壳杉烷酸 (16 α ,17-dihydroxy-*ent*-kaur-19-oic acid, **5**)、17-羟基-19-异贝壳杉烷酸 (17-hydroxy-*ent*-kaur-19-oic acid, **6**)、异贝壳杉烯酸 (*ent*-kaur-16-en-19-oic acid, **9**)、17-醛基-19-异贝壳杉烯酸 (17-oxo-*ent*-kaur-19-oic acid, **10**)、17-醛基-15-烯-19-异贝壳杉烷酸 (17-oxo-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid, **12**) 和 17-羟基-15-烯-19-异贝壳杉烷酸 (17-hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid, **13**)。其中化合物 **8** 为新化合物, 命名为细柱五加酸 G1, **3** 和 **4** 为首次从细柱五加植物中分离得到。采用 Griess 法测试脂多糖诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞释放炎症因子模型, 对分离得到的化合物进行了抗炎活性评价。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Bruker Avance III 600 核磁共振波谱仪, 德国布鲁克公司; METTLER TOLEDO XSE205 型电子天平, 瑞士梅特勒托利多公司; Buchi R210 型旋转蒸发仪, 瑞士步奇公司; Agilent 1200 型 HPLC 色谱仪, 美国安捷伦公司; HPLC-IT-TOF-MS 液质联用仪, 日本岛

津公司; Bio Tek EPOCH2NS 酶标仪, 美国博腾公司。

乙醚、正丁醇、醋酸乙酯、甲醇、乙醇、石油醚、丙酮、二氯甲烷等试剂均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; MCI GEL CHP20P (37~75 μm), 日本三菱化学株式会社; 柱色谱硅胶 (200~300 目), 青岛海湾精细化工有限公司; Sephadex LH-20, 北京索莱宝科技有限公司; 硅胶薄层板, 烟台市化学工业研究所; HPLC 色谱柱, SymmetryShied™ RP₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); MTT 溶液, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; (Eagle) DMEM 高糖培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清, 上海达特希尔生物科技有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO), Life Science 公司; 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 对氨基苯磺酰胺, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 胰酶, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 3,4-二羟基苯甲羟肟酸 (DiDOX), 美国 MedChem Express 公司, 批号 HY-19387/CS-5292; 小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 美国菌种保藏中心 (ATCC); NO 试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司。

1.2 材料

五加皮产地为湖北, 经山东省食品药品检验研究院穆向荣副主任药师鉴定为五加科五加属植物细柱五加 *A. gracilistylus* W. W. Smith. 的干燥根皮, 样品 (SDIFDC-G-AGZ01) 保存于山东省食品药品检验研究院。

2 方法

2.1 提取与分离

取五加皮药材 4 kg, 粉碎, 以 70% 乙醇为溶剂, 加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得到粗提物浸膏 600 g。将粗提物用适量温水分散, 用乙醚萃取 3 次, 合并萃取液, 减压浓缩得乙醚层浸膏 130.2 g。将乙醚层浸膏溶解后经 MCI 树脂柱分离, 用甲醇-水溶液 (40%~100%) 梯度洗脱, 共得到 7 个流分。流分 4 用硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮系统 (100:1~1:1) 进行梯度洗脱, 经 TLC 检测并合并相同组分, 得到 Fr. 4A~4U 共 21 个组分。组分 4L 经结晶得到化合物 **1** (60 mg), 经硅胶柱 (石油醚-丙酮 19:5~17:1) 分离, 结晶得到化合物 **4** (2.0 mg); 组分 4J 和 4D 经结晶分别得到 **2** (32 mg) 和 **3** (33 mg); 组分 4N 先后经石油醚-醋酸乙酯 (15:1~10:1) 洗脱和 HPLC 色谱 (柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 甲醇-水 56:44, t_{R} =11.320 min) 分

离得到化合物 **6** (4.7 mg); 组分 4H 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇 100:1~80:1) 和 HPLC 色谱 (甲醇-水 68:32) 分离得到化合物 **7** (28 mg); 组分 4R 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇 90:1~70:1) 分离得到化合物 **5** (21 mg)。流分 3 用硅胶柱, 以石油醚-丙酮系统 (100:1~1:1) 进行梯度洗脱, 得到 Fr. 3A~3X 共 24 个组分。组分 3J 经凝胶柱和 HPLC 色谱 (柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 甲醇-水 70:30) 分离得到化合物 **8** (3.3 mg)。流分 5 用硅胶柱, 以石油醚-丙酮系统 (100:1~1:1) 进行梯度洗脱, 得到 Fr. 5A~5M 共 26 个组分。组分 5B 经结晶得到化合物 **9** (205 mg); 组分 5J 经凝胶柱和重结晶得到化合物 **11** (1.0 mg); 组分 5E 先后经凝胶和硅胶柱 (石油醚-醋酸乙酯 50:1~43:1) 分离得到化合物 **10** (34 mg) 和 **12** (3.6 mg)。流分 6 用硅胶柱, 以石油醚-丙酮系统 (100:1~1:1) 进行梯度洗脱, 得到 Fr. 6A~6J 共 10 个组分。组分 6G 经凝胶柱色谱分离得到化合物 **13** (9.7 mg)。

2.2 抗炎活性研究

2.2.1 RAW264.7 细胞培养 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境下, 向高糖 DMEM 培养基中加入 10% 的胎牛血清, 加入复苏的 RAW264.7 细胞。取对数生长期的细胞, 用胰酶消化, 制成细胞悬液, 计数并稀释细胞密度为 8×10^4 个/孔。以每孔 200 μL 的量加入 96 孔板, 待细胞在培养箱中培养 36 h 后用于实验。

2.2.2 MTT 法检测药物对 RAW264.7 细胞活力的影响 将对数生长期细胞调整细胞浓度为 8×10^5 个/孔, 接种于 96 孔板中, 每孔 200 μL , 分为空白对照组、阳性对照组 (阳性药物为 DiDOX) 和实验组 (加入待测化合物) 处理。细胞分别培养 24 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 继续培养 2 h, 弃去上清液, 加入 200 μL DMSO 避光振摇 10 min, 采用全波长酶标仪在 570 nm 波长处检测各孔的吸光度 (A) 值, 并按照公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{空白对照}}$$

2.2.3 单体化合物对 RAW264.7 细胞释放 NO 的测试 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调整细胞浓度为 2×10^5 个/孔加入 96 孔板中, 每孔 200 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境下培养 24 h, 去除上清液, 将细胞分为空白对照组 (空白培养基)、LPS 组 (1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS)、不同浓度的化合物 (1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS+100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{mol/L}$)。各组细胞加入药物或空白培养基后, 继续培养 24 h。取上清液 100 μL , 加入 100 μL Griess 试剂, 室温放置 10

min, 波长设置为 570 nm, 在酶标仪上测定 A , 将其代入标准曲线中, 标准曲线为 $A=0.0064C+0.0024$, $r=0.9997$, 其中 A 为吸光度, C 为亚硝酸钠浓度, 计算 NO 释放量。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 317.211 1 $[M-H]^-$, 理论值为 317.212 2, 推测分子式为 $C_{20}H_{30}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.69 (1H, dd, $J=17.3, 10.4$ Hz, H-15), 5.46 (1H, brs, H-14), 4.96 (1H, dd, $J=10.4, 1.7$ Hz, H-16), 4.84 (1H, dd, $J=17.4, 1.7$ Hz, H-16), 4.28 (1H, brs, H-7), 2.20 (1H, dt, $J=14.0$ Hz, H-3 β), 2.12 (1H, m, H-9), 2.10 (2H, m, H-6), 1.84 (1H, dd, $J=9.0, 7.0$ Hz, H-5), 1.79 (1H, dt, $J=3.4, 13.9$ Hz, H-2 β), 1.72 (1H, brd, $J=13.1$ Hz, H-1 β), 1.59 (2H, m, H-11 β , 12 β), 1.47 (1H, dq, $J=3.0, 14.0$ Hz, H-2 α), 1.27 (3H, s, H-18), 1.24~1.37 (2H, m, H-11 α , 12 α), 1.12 (1H, m, H-3 α), 1.11 (1H, ddd, $J=13.5, 13.5, 4.5$ Hz, H-1 α), 1.04 (3H, s, H-17), 0.63 (3H, s, H-20); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.4 (C-19), 146.4 (C-14), 140.2 (C-8), 133.2 (C-15), 113.3 (C-16), 73.2 (C-7), 48.3 (C-5), 45.7 (C-9), 39.2 (C-4), 39.2 (C-1), 43.6 (C-10), 38.5 (C-13), 37.9 (C-3), 35.5 (C-12), 30.6 (C-6), 29.0 (C-18), 28.8 (C-17), 19.6 (C-2), 18.7 (C-11), 13.0 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定该化合物为 7 β -羟基-8(14),15-二烯-19-异海松烷酸。

化合物 2: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 315.195 2 $[M-H]^-$, 理论值为 315.196 6, 推测分子式为 $C_{20}H_{28}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.58 (1H, s, H-14), 5.68 (1H, dd, $J=17.5, 10.5$ Hz, H-15), 5.00 (1H, dd, $J=10.5, 1.4$ Hz, H-16 α), 4.76 (1H, dd, $J=17.5, 1.4$ Hz, H-16 β), 3.13 (1H, dd, $J=18.8, 13.6$ Hz, H-6 α), 2.81 (1H, dd, $J=18.8, 5.0$ Hz, H-6 β), 2.19 (1H, m, H-9), 2.01 (1H, dd, $J=16.4, 5.0$ Hz, H-5), 1.25 (3H, s, H-20), 1.13 (3H, s, H-18), 0.76 (3H, s, H-17); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 200.6 (C-7), 182.1 (C-19), 145.7 (C-15), 142.8 (C-14), 136.8 (C-8), 114.3 (C-16), 51.7 (C-5), 50.4 (C-9), 44.0 (C-4), 39.3 (C-13), 38.8 (C-12), 38.7 (C-1), 38.0 (C-3), 37.3 (C-10), 35.0 (C-6), 28.4 (C-18), 28.3 (C-17), 19.6 (C-2), 19.1 (C-11), 12.9 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定该化合物为 7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid。

化合物 3: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z :

331.226 8 $[M-H]^-$, 理论值为 331.227 9, 推测分子式为 $C_{21}H_{31}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.70 (1H, dd, $J=17.3, 10.4$ Hz, H-15), 5.40 (1H, s, H-14), 4.97 (1H, dd, $J=10.4, 1.7$ Hz, H-16), 4.88 (1H, dd, $J=17.3, 1.7$ Hz, H-16), 3.60 (1H, t, $J=3.1$ Hz, H-7), 3.16 (3H, s, H-21), 2.15 (2H, m, H-3), 2.06 (1H, m, H-6), 1.92 (1H, m, H-9), 1.76 (1H, m, H-5), 1.68 (2H, m, H-1), 1.60 (2H, m, H-12), 1.46 (2H, m, H-2), 1.34 (2H, m, H-11), 1.26 (3H, s, H-18), 1.08 (3H, s, H-17), 0.65 (3H, s, H-20); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.6 (C-19), 146.4 (C-15), 135.5 (C-8), 134.5 (C-14), 113.2 (C-16), 81.7 (C-7), 54.6 (C-21), 48.8 (C-5), 45.7 (C-9), 43.6 (C-4), 39.1 (C-10), 38.8 (C-1), 38.7 (C-13), 37.8 (C-3), 35.5 (C-12), 29.9 (C-6), 29.6 (C-17), 28.8 (C-18), 19.5 (C-2), 18.7 (C-11), 13.2 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定该化合物为 7 β -methoxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid。

化合物 4: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 299.200 7 $[M-H]^-$, 理论值为 299.201 7, 推测分子式为 $C_{20}H_{28}O_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.6 (1H, dd, $J=2.7, 11.6$ Hz, H-6), 6.03 (1H, brd, $J=11.6$ Hz, H-7), 5.72 (1H, dd, $J=17.2, 10.1$ Hz, H-15), 5.24 (1H, s, H-14), 4.96 (1H, dd, $J=10.3, 1.7$ Hz, H-16), 4.86 (1H, dd, $J=17.3, 1.8$ Hz, H-16), 2.15~2.25 (1H, m, H-3), 2.04~2.10 (1H, m, H-5), 1.91~1.99 (1H, m, H-9), 1.79~1.91 (1H, m, H-11), 1.68~1.75 (2H, m, H-1), 1.60~1.66 (1H, m, H-12), 1.53~1.55 (1H, m, H-11), 1.50~1.53 (1H, m, H-2), 1.33 (3H, s, H-18), 1.28~1.31 (1H, m, H-12), 1.24~1.28 (1H, m, H-2), 1.07~1.09 (1H, m, H-3), 1.07 (3H, s, H-17), 0.63 (3H, s, H-20); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.9 (C-19), 147.3 (C-15), 135.9 (C-8), 131.7 (C-14), 128.3 (C-7), 127.4 (C-6), 113.1 (C-16), 55.5 (C-5), 49.3 (C-9), 43.2 (C-4), 38.9 (C-13), 37.9 (C-10), 37.4 (C-3), 37.2 (C-1), 35.4 (C-12), 29.0 (C-17), 28.2 (C-18), 19.5 (C-11), 18.6 (C-2), 11.8 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定该化合物为 *ent*-pimara-6,8(14),15-trien-19-oic acid。

化合物 5: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 335.221 9 $[M-H]^-$, 理论值为 335.222 8, 推测分子式为 $C_{20}H_{32}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.70 (1H, d, $J=11.3$ Hz, H-17 α), 3.59 (1H, d, $J=11.3$ Hz, H-17 β), 2.11 (1H, d, $J=13.4$ Hz, H-3 α), 2.02 (1H, brs, H-13), 1.18 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-20), 0.83 (1H,

td, $J = 13.0, 4.0$ Hz, H-1 β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 181.5 (C-19), 82.8 (C-16), 66.8 (C-17), 58.0 (C-5), 57.3 (C-9), 53.7 (C-15), 46.2 (C-13), 45.7 (C-8), 44.6 (C-4), 43.2 (C-7), 41.8 (C-1), 40.7 (C-10), 39.1 (C-14), 38.1 (C-3), 29.3 (C-18), 27.1 (C-12), 23.2 (C-6), 20.1 (C-2), 19.5 (C-11), 16.1 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定该化合物为 16 α ,17-dihydroxy-ent-kaur-19-oic acid。

化合物 6: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 319.226 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 理论值为 319.227 9, 推测分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.29 (1H, s, H-17), 1.17 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-20), 0.92~0.81 (1H, m, H-1 β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 181.8 (C-19), 67.9 (C-17), 58.5 (C-5), 57.1 (C-9), 46.5 (C-15), 46.1 (C-8), 44.8 (C-4), 44.6 (C-16), 43.1 (C-14), 42.3 (C-1), 41.0 (C-10), 39.7 (C-13), 39.4 (C-7), 38.2 (C-3), 32.7 (C-12), 29.7 (C-18), 23.9 (C-6), 20.5 (C-2), 20.1 (C-11), 16.5 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定该化合物为 17-hydroxy-ent-kaur-19-oic acid。

化合物 7: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 315.195 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 理论值为 315.196 6, 推测分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.04 (1H, dd, $J = 17.7, 10.9$ Hz, H-15 α), 5.07 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-16), 4.97 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-16), 2.40 (2H, m, H-6 α , 6 β), 2.19 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-3 α), 2.11 (1H, m, H-11 α), 2.00 (1H, m, H-7 β), 2.42 (1H, m, H-7 α), 1.96 (1H, m, H-2 α), 1.95 (1H, m, H-1 α), 1.92 (1H, m, H-12 α), 1.80 (1H, m, H-12 β), 1.78 (1H, m, H-11 β), 1.56 (1H, m, H-2 β), 1.35 (1H, brd, $J = 12.5$ Hz, H-5 β), 1.24 (3H, s, H-19 β), 1.21 (1H, m, H-1 β), 1.14 (3H, s, H-17), 1.07 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-3 β), 1.04 (3H, s, H-20); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 204.5 (C-14), 181.0 (C-18), 165.2 (C-9), 143.4 (C-15), 130.1 (C-8), 113.1 (C-16), 53.1 (C-5), 47.3 (C-13), 44.4 (C-4), 40.9 (C-10), 38.2 (C-3), 37.1 (C-1), 34.6 (C-12), 28.7 (C-19), 26.3 (C-7), 22.2 (C-17), 22.1 (C-6), 20.7 (C-11), 20.2 (C-2), 17.8 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定该化合物为 melanocane E。

化合物 8: 白色无定形粉末。 $[\alpha]_D^{20} -40.4$ (c 0.10, MeOH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 201 (3.38), 272 (2.09); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3390, 2909, 1696, 1639, 1416, 1265, 814。HR-ESI-MS m/z : 287.164 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 理论值为 287.165 3, 推测分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$, 不饱和度为 7。

^1H -NMR (表 1) 显示有 2 个角甲基 [δ_{H} 1.12 (s), 1.27 (s)] 和 1 个双键相连甲基 [δ_{H} 2.14 (s)] 的存在。通过 ^{13}C -NMR δ_{C} 122.7 (C-8), 147.2 (C-9), 116.6 (C-11), 127.4 (C-12), 120.3 (C-13), 151.7 (C-14) 6 个 C 信号可以确定苯环的存在, δ_{H} 6.73 ($J = 8.4$ Hz), 6.84 ($J = 8.4$ Hz) 为苯环上的 2 个相邻质子。通过 HMBC (图 1) 中 δ_{H} 6.84 ($J = 8.4$ Hz) 与 C-9、C-11 和 C-14 信号相关, δ_{H} 6.73 ($J = 8.4$ Hz) 与 C-8、C-9 和 C-13 信号相关, 确定苯环氢位于 11 和 12 位; 通过 HMBC 中 H-7 和 H₃-15 与 C-14 的相关信号可推测出羟基在 14 位; 通过 HMBC 中 H₃-16 与 δ_{C} 180.1 相关可推测羧基在 17 位。根据 HMBC 中 δ_{C} 147.2 与 H-7、H-12、H-18 的相关, δ_{C} 122.7 与 H-6、H-7、H-11 相关, δ_{C} 38.1 与 H-1、H-2、H-5、H-18 的相关可进一步证实其结构。根据 ^1H - ^1H COSY 中 H-1 与 H-2 的相关, H-2 与 H-3、H-5 与 H-6、H-6 与 H-7、H-11 与 H-12 的相关, 结合 HMBC 中信息, 可确定其平

表 1 化合物 8 的 ^1H - 和 ^{13}C -NMR 数据 (600/150 MHz, CD_3OD)

Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopic data for compound 8 (600/150 MHz, CD_3OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1 α	2.23 (m)	39.7
1 β	1.31 (m)	
2 α	1.98 (m)	19.9
2 β	1.56 (m)	
3 α	2.21 (m)	37.5
3 β	1.07 (dt, $J = 13.2, 4.2$ Hz)	
4		43.5
5	1.47 (d, $J = 12.6$ Hz)	52.5
6 α	2.19 (m)	20.4
6 β	1.96 (m)	
7 α	2.90 (dd, $J = 16.8, 5.4$ Hz)	25.8
7 β	2.45 (m)	
8		122.7
9		147.2
10		38.1
11	6.73 (d, $J = 8.4$ Hz)	116.6
12	6.84 (d, $J = 8.4$ Hz)	127.4
13		120.3
14		151.7
15	2.14 (s)	14.7
16	1.27 (s)	27.9
17		180.1
18	1.12 (s)	22.3

面结构(图1)。通过 NOESY 谱中 H-5 与 H-1 β 、H-7 β 、H-16 相关,推断其相对构型(图2)。结合以上数据,并与已知相似化合物^[8]比对,化合物 8 的结构确定为 14-hydroxy-16-devinyl-*ent*-pimara-8,11,13-trien-17-oic acid,经 Sci-finder 检索,是 1 个新的降海松烷型二萜,命名为细柱五加酸 G1。

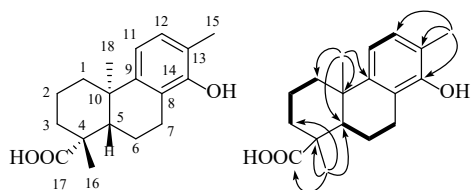


图 1 化合物 8 的结构(左)和关键 HMBC ($\rightarrow$)、 ^1H - ^1H COSY ($\leftarrow$) 相关(右)

Fig. 1 Structure (left), key HMBC ($\rightarrow$) and ^1H - ^1H COSY ($\leftarrow$) correlations (right) of compound 8

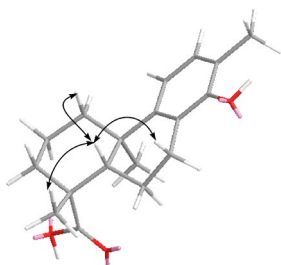


图 2 化合物 8 的关键 NOESY 相关($\leftrightarrow$)

Fig. 2 Key NOESY correlations ($\leftrightarrow$) of compound 8

化合物 9: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 301.216 7 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, 理论值为 301.217 3, 推测分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 4.80 (1H, brs, H-17 α), 4.74 (1H, brs, H-17 β), 2.64 (1H, brs, H-13), 2.23 (2H, m, H-15), 2.16 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-3), 2.05 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-16), 1.99 (1H, dd, J = 11.2, 2.2 Hz, H-14), 1.87 (2H, m, H-1, 2), 1.82 (2H, m, H-6), 1.60 (2H, m, H-11), 1.52 (2H, dt, J = 3.5, 13.0 Hz, H-7), 1.46 (2H, m, H-12), 1.43 (1H, m, H-2), 1.24 (3H, s, H-19), 1.14 (1H, dd, J = 11.4, 5.0 Hz, H-14), 1.06 (H, d, J = 5.2 Hz, H-5), 1.03 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-9), 1.00 (1H, dt, J = 4.5, 13.5 Hz, H-3), 0.95 (3H, s, H-18), 0.81 (1H, dt, J = 13.4, 3.6 Hz, H-1), 0.76 (1H, s, H-20); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 183.4 (C-19), 155.8 (C-16), 103.0 (C-17), 57.1 (C-5), 55.2 (C-9), 49.0 (C-15), 44.2 (C-8), 43.9 (C-13), 43.7 (C-4), 41.3 (C-7), 40.7 (C-1), 39.7 (C-14), 39.6 (C-10), 37.8 (C-3), 33.1 (C-12), 28.9 (C-18), 21.8 (C-6), 19.1 (C-2), 18.4 (C-11), 15.6 (C-

20)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定该化合物为 *ent*-kaur-16-en-19-oic acid。

化合物 10: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 317.211 4 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, 理论值为 317.212 2, 推测分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 9.59 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-17), 2.62 (1H, t, J = 5.3, 9.2 Hz, H-16), 2.00~2.03 (1H, m, H-3 α), 1.30~1.85 (8H, m, H-2 α , 3 β , 11, 12, 14 α), 1.10 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-20), 0.75~0.83 (1H, m, H-1 β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 203.9 (C-17), 178.6 (C-19), 56.0 (C-5), 54.6 (C-9), 52.7 (C-16), 48.6 (C-8), 44.6 (C-4), 42.9 (C-7), 40.8 (C-1), 40.4 (C-15), 39.1 (C-10), 37.7 (C-13), 37.3 (C-3), 37.0 (C-14), 30.5 (C-12), 28.6 (C-18), 22.2 (C-6), 18.9 (C-2), 18.3 (C-11), 15.4 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定该化合物为 17-oxo-*ent*-kaur-19-oic acid。

化合物 11: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 317.211 8 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, 理论值为 317.212 2, 推测分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.74 (1H, dd, J = 16.8, 10.2 Hz, H-15), 5.60 (1H, brs, H-14), 4.95 (1H, dd, J = 10.8, 2.4 Hz, H-16), 4.94 (1H, dd, J = 16.8, 1.8 Hz, H-16), 3.87 (1H, brs, H-7), 2.80 (1H, ddd, J = 12.7, 4.7, 1.2 Hz, H-6 β), 2.55 (1H, q, J = 12.7 Hz, H-6 α), 2.24 (2H, dt, J = 14.0 Hz, H-3 β), 2.16 (1H, m, H-9), 1.86 (1H, dd, J = 9.6, 7.8 Hz, H-5), 1.79 (1H, dt, J = 13.8, 4.8 Hz, H-2 β), 1.73 (1H, brd, J = 13.2 Hz, H-1 β), 1.59 (2H, m, H-11 β , 12 β), 1.44 (1H, dq, J = 14.4, 4.2 Hz, H-2 α), 1.25 (3H, s, H-18), 1.25~1.36 (2H, m, H-11 α , 12 α), 1.12 (1H, m, H-3 α), 1.11 (1H, ddd, J = 13.2, 13.2, 6.6 Hz, H-1 α), 1.04 (3H, s, H-17), 0.67 (3H, s, H-20); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 181.1 (C-19), 148.2 (C-15), 141.6 (C-8), 125.8 (C-14), 113.5 (C-16), 73.4 (C-7), 54.1 (C-5), 50.0 (C-9), 44.6 (C-10), 40.2 (C-4), 40.1 (C-1), 39.1 (C-3), 39.0 (C-13), 36.5 (C-12), 34.9 (C-6), 29.7 (C-17), 29.4 (C-18), 20.6 (C-2), 20.3 (C-11), 14.3 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定该化合物为 7 α -hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid。

化合物 12: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 317.195 8 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, 理论值为 315.196 6, 推测分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 9.73 (1H, s, H-17), 6.57 (1H, s, H-15), 3.04 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-13), 2.17 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-3 α), 1.26 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-20), 0.83 (1H, td, J = 16.8, 12.6

Hz, H-1 β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 189.3 (C-17), 182.2 (C-19), 161.3 (C-15), 148.7 (C-16), 56.6 (C-5), 50.9 (C-9), 46.0 (C-8), 43.7 (C-4), 43.0 (C-7), 40.6 (C-1), 40.1 (C-10), 38.2 (C-14), 37.9 (C-13), 37.8 (C-3), 28.9 (C-18), 25.1 (C-12), 20.2 (C-6), 19.0 (C-2), 18.7 (C-11), 15.5 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定该化合物为 17-oxo-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid。

化合物 13: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 317.211 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 理论值为 317.212 2, 推测分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.37 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-15), 4.19 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-16), 2.54~2.58 (1H, m, H-13), 2.10 (1H, m, H-3 α), 1.23 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-20), 0.80~0.94 (1H, m, H-1 β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 182.4 (C-19), 146.4 (C-16), 135.9 (C-15), 61.7 (C-17), 57.1 (C-5), 49.3 (C-8), 48.0 (C-9), 44.3 (C-7), 44.0 (C-4), 41.5 (C-13), 41.1 (C-1), 40.2 (C-10), 39.6 (C-14), 38.4 (C-3), 29.3 (C-18), 25.9 (C-12), 21.1 (C-6), 19.5 (C-2), 19.3 (C-

11), 15.8 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定该化合物为 17-hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid。

3.2 抗炎活性筛选结果

3.2.1 单体化合物对细胞 RAW264.7 细胞活力的影响 与空白对照组相比, 13 个化合物浓度在 3.125~100 $\mu\text{mol/L}$, 细胞活力在 80% 以上, 无显著性差异, 可认为在 3.125~100 $\mu\text{mol/L}$ 受试样品未出现细胞毒性, 因此实验选择在此质量浓度比较不同样品的抗炎作用的优劣。

3.2.2 单体化合物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞中 NO 的含量测定 为了明确五加皮中分离得到的单体化合物的抗炎作用, 采用 MTT 法进行了细胞毒性实验, 空白对照组的细胞存活率为 100%。与 LPS 组相比, 8 种化合物均具有抗炎活性, 化合物 1~3、7 具有较强的抗炎活性, 并且化合物 1~5、7、9、10 随着质量浓度的增加, NO 的含量减少, 抗炎活性增强; 化合物 6、9 质量浓度在 25~100 $\mu\text{mol/L}$ 时有抗炎活性, 低质量浓度时并未发挥抗炎活性(图 3)。

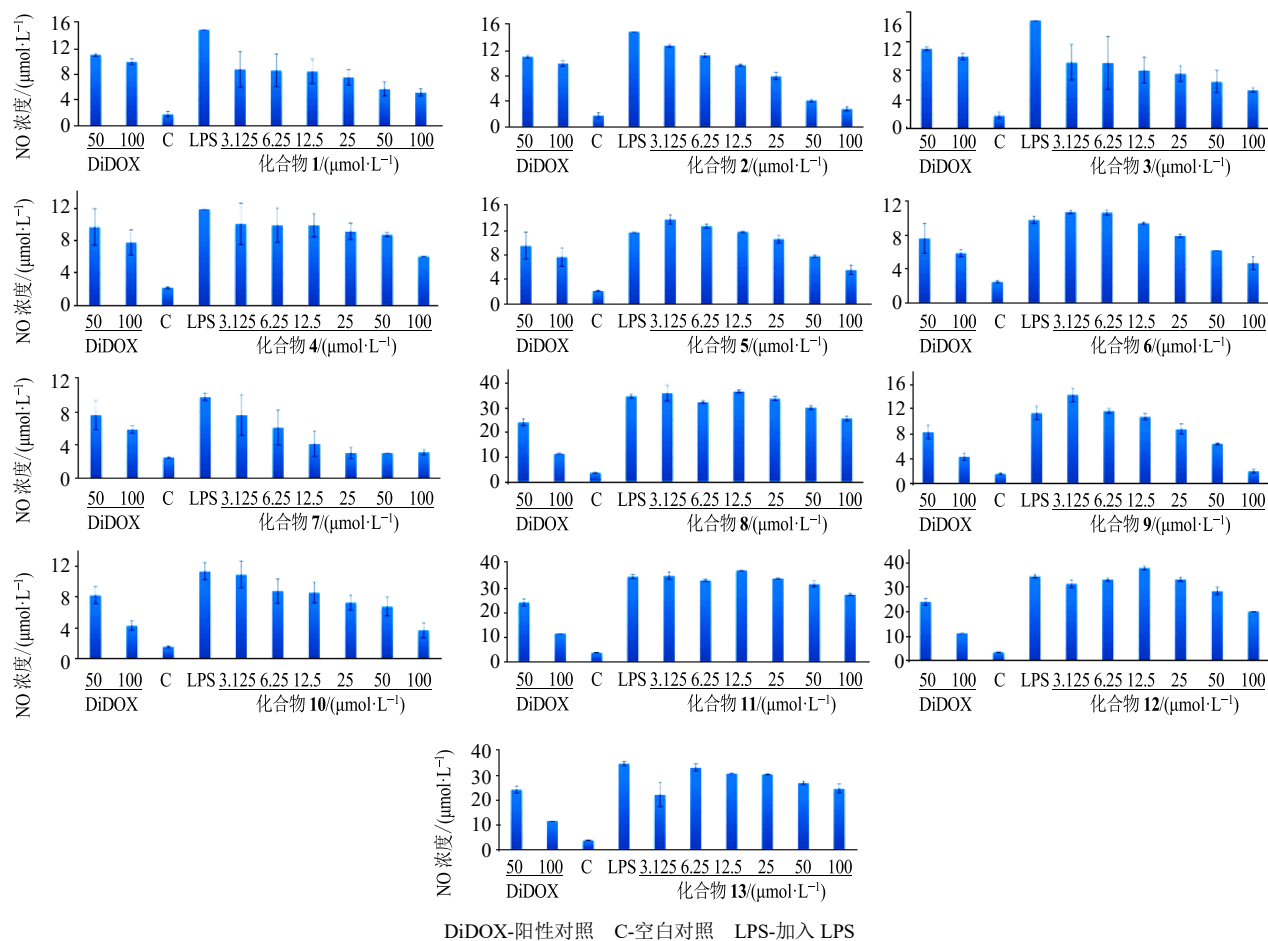


图 3 13 个化合物对 NO 释放的抑制情况 ($n = 3$)

Fig. 3 Inhibitory activities of 13 compounds ($n = 3$)

4 讨论

从五加皮中共得到 13 个二萜类化合物,分别为 7 个海松烷型二萜化合物 **1~4**、**7**、**8**、**11**, 以及 6 个贝壳杉烷型二萜化合物 **5**、**6**、**9**、**10**、**12**、**13**。化合物 **8** 为 1 个新的降海松烷型二萜, 化合物 **3** 和 **4** 为在首次该植物中发现。

体外抗炎活性研究发现, 海松烷型二萜的抗炎活性普遍高于贝壳杉烷型类化合物。对海松烷型二萜抗炎作用结果进行比较发现, 这类化合物 7 位取代活性顺序为 $\beta\text{-OH} > \beta\text{-OCH}_3 > \Delta^6 \text{ 双键} > \text{C=O} > \alpha\text{-OH}$ (活性顺序为 **1** > **3** > **4** > **2** > **11**)。

本实验分离鉴定的五加皮二萜类化合物及其活性研究, 为五加皮药材及制剂的质量控制方法建立、药用资源合理开发和利用提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 鞠康, 刘耀武. 五加皮的本草沿革及现代药理研究 [J]. 绥化学院学报, 2014, 34(11): 151-153.
- [2] 麻龙花, 陈峰, 孟庆然, 等. HS-SPME 结合 GC-MS/GC-O 法分析致中和五加皮酒的特征香气成分 [J]. 酿酒科技, 2021(1): 92-101.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-9 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 758.
- [4] 杨建波, 蔡伟, 李明华, 等. 细柱五加的化学成分及药理活性研究概述 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(4): 652-662.
- [5] 唐烨霞, 孙刚, 郑浩江, 等. 五加皮膏外敷对骨折早期骨痂形成的促进作用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(17): 146.
- [6] 郑浩江, 王小婧, 刘海忠, 等. 五加皮膏对大耳白兔骨折愈合的疗效观察 [J]. 包头医学院学报, 2020, 36(8): 67-69.
- [7] Jung H A, Lee E J, Kim J S, et al. Cholinesterase and BACE1 inhibitory diterpenoids from *Aralia cordata* [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(10): 1399-1408.
- [8] Wu Z Y, Zhang Y B, Zhu K K, et al. Anti-inflammatory diterpenoids from the root bark of *Acanthopanax gracilistylus* [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(11): 2342-2351.
- [9] Li Y H, Li H R, Yang C T, et al. Three new diterpenoids from *Aralia dumetorum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2019, 21(4): 308-315.
- [10] Li Y H, Li H R, Yang C T, et al. Three new diterpenoids from *Aralia dumetorum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2019, 21(4): 308-315.
- [11] Miyashita H, Nishida M, Okawa M, et al. Four new ent-kaurane diterpenoids from the fruits of *Annona cherimola* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(5): 765-768.
- [12] Yang Y L, Chang F R, Wu C C, et al. New ent-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(10): 1462-1467.
- [13] Jiang Z Y, Yang C T, Hou S Q, et al. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Aralia melanocarpa* [J]. *Planta Med*, 2016, 82(8): 742-746.
- [14] Miyazaki S, Kimura H, Natsume M, et al. Analysis of ent-kauranoic acid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2015, 2: 103-107.
- [15] Morarescu O, Grinco M, Kulciński V, et al. A straightforward synthesis of natural oxygenated ent-kauranoic acid derivatives [J]. *Synth Commun*, 2021, 51(1): 123-133.
- [16] 吴智渊. 中药五加皮的化学成分研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2012.

[责任编辑 王文倩]