

山油柑枝叶中化学成分及其抗类风湿性关节炎活性研究

傅小雅^{1,2,3}, 李林轩^{1,3}, 李昕怡^{1,3}, 王天玉^{1,3}, 崔龙城^{1,3}, 刘艳萍^{1,3*}, 付艳辉^{1,3*}

1. 海南师范大学南药资源产业化关键技术研究海南省工程研究中心, 海南 海口 571158

2. 海南省检验检测研究院海南省药品检验所, 海南 海口 570216

3. 海南师范大学 热带果蔬研究与开发海口市重点实验室, 海南 海口 571158

摘要: **目的** 研究芸香科山油柑属植物山油柑 *Acronychia pedunculata* 枝叶中的化学成分。**方法** 综合运用多种色谱分离方法和技术进行系统分离和纯化, 根据分离得到化合物的理化性质及其 NMR 波谱数据和 MS 数据鉴定化合物的化学结构。**结果** 从山油柑枝叶的提取物中分离得到了 16 个化合物, 分别鉴定为阿里二醇 (1)、款冬二醇 (2)、马尼拉二醇 (3)、齐墩果-12-烯-3,11-二酮 (4)、16 β -羟基-羽扇豆-20(29)-烯-3-酮 (5)、岩高兰三萜-21-烯-3-酮 (6)、24-亚甲基环阿尔廷醇 (7)、5,6,7-三甲氧基香豆素 (8)、6-羟基-7,8-二甲氧基香豆素 (9)、6,7,8-三甲氧基香豆素 (10)、秦皮素 (11)、丝立尼亭 (12)、紫花前胡苷元 (13)、佛手酚 (14)、佛手柑内酯 (15) 和花椒毒素 (16)。其中化合物 1~7 为三萜类化合物, 化合物 8~16 为香豆素类化合物。对分离鉴定的化合物 1~16 的抑制滑膜成纤维细胞增殖活性研究评价结果表明, 化合物 1~7 对 MH7A 滑膜成纤维细胞增殖抑制活性的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值为 (9.26 $\pm$ 0.10) ~ (156.28 $\pm$ 0.17) μ mol/L。**结论** 所有化合物均为首次从山油柑属植物中分离得到, 化合物 1 和 4 表现出较为显著的抗类风湿性关节炎活性。

关键词: 山油柑属; 山油柑; 三萜; 香豆素; 阿里二醇; 款冬二醇; 齐墩果-12-烯-3,11-二酮; 24-亚甲基环阿尔廷醇; 抗类风湿性关节炎活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)23-7932-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.002

Chemical constituents from stems and leaves of *Acronychia pedunculata* and their anti-rheumatoid arthritis activities

FU Xiaoya^{1,2,3}, LI Linxuan^{1,3}, LI Xinyi^{1,3}, WANG Tianyu^{1,3}, CUI Longcheng^{1,3}, LIU Yanping^{1,3}, FU Yanhui^{1,3}

1. Engineering Research Center for Industrialization of Southern Medicinal Plants Resources of Hainan Province, Hainan Normal University, Haikou 571158, China

2. Hainan Institute for Drug Control, Hainan Academy of Inspection and Testing, Haikou 570216, China

3. Key Laboratory of Research and Development of Tropical Fruit and Vegetable of Haikou City, Hainan Normal University, Haikou 571158, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents from the stems and leaves of *Acronychia pedunculata*. **Methods** The chemical constituents of *A. pedunculata* were isolated and purified by a variety of chromatographic methods and techniques including silica gel, ODS, Sephadex LH-20 gel column chromatographies as well as preparative HPLC. Their chemical structures were identified according to their physicochemical properties, NMR spectral data, MS data, as well as comparisons with the reported data in literature. **Results** A total of 16 compounds were isolated from the 90% ethanol extract of the stems and leaves of *A. pedunculata*, which were

收稿日期: 2024-07-09

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2022SHFZ028); 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2024SHFZ145); 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2024XDNY148); 国家自然科学基金项目 (22067005); 国家自然科学基金项目 (2460116); 国家自然科学基金项目 (32070390); 海口市重点研发计划项目 (2020054); 国家大学生创新创业训练计划项目 (2024116580010, 202411658009, 202411658004, 202411658002); 海南省大学生创新创业训练计划项目 (S202411658007, S202411658001)

作者简介: 傅小雅, 副主任药师, 主要从事药品检验及药品质量研究工作。E-mail: fuxiaoya730805@163.com

***通讯作者:** 刘艳萍, 研究员, 硕士生导师, 主要从事天然活性物质的发现及其作用机制研究工作。E-mail: liuyanpings@163.com

付艳辉, 教授, 博士生导师, 主要从事天然活性物质的发现与应用研究工作。E-mail: fuyanhui80@163.com

identified as arnidiol (1), faradiol (2), maniladiol (3), olean-12-ene-3,11-dione (4), 16 β -hydroxylupa-20(29)-en-3-one (5), nigrum-21-en-3-one (6), 24-methylenecycartanol (7), 5,6,7-trimethoxy coumarin (8), 6-hydroxy-7,8-dimethoxy- coumarin (9), 6,7,8-trimethoxycoumarin (10), fraxidin (11), selinidin (12), nodakenetin (13), bergaptol (14), bergapten (15) and xanthotoxin (16). All isolated compounds were 1—16 were evaluated for their anti-rheumatoid arthritis activities using MTT methods, as a result, compounds 1—7 exhibited the inhibitory effects on the proliferation of MH7A synovial fibroblast cells with the IC₅₀ values in range of (9.26 $\pm$ 0.10) μ mol/L—(156.28 $\pm$ 0.17) μ mol/L. **Conclusion** All compounds were isolated from the genus *Artocarpus* for the first time, compounds 1-7 showed remarkable anti-rheumatoid arthritis activities.

Key words: *Acronychia* J. R. Forst. & G. Forst.; *Acronychia pedunculata* (L.) Miq.; triterpenes; coumarins; arnidiol; faradiol; olean-12-ene-3,11-dione; 24-methylenecycartanol; anti-rheumatoid arthritis activities

芸香科 (Rutaceae Juss.) 山油柑属 *Acronychia* J. R. Forst. & G. Forst. 植物全世界约有 42 种, 分布于亚洲的热带和亚热带地区以及大洋洲各岛屿, 主产于澳大利亚。分布于我国的芸香科山油柑属植物共有 2 种, 即山油柑 *Acronychia pedunculata* (L.) Miq. 和贡甲 *A. oligophlebia* Merr.^[1]。其中, 山油柑分布于我国的海南、云南、广东、广西、福建和台湾等省区以及中南半岛地区、菲律宾、印度、斯里兰卡、马来西亚、印度尼西亚以及巴布亚新几内亚等地。山油柑为黎族民间药用植物, 具有化气、活血、去瘀、消肿的功效, 常用于感冒、咳嗽、支气管炎、心气痛、疝气痛、跌打肿痛以及消化不良等症的治疗, 药用历史悠久, 疗效显著。大量植物化学研究表明山油柑属植物中含有生物碱类、苯乙酮类、间苯三酚类、香豆素类以及黄酮类等多种结构类型的化合物, 其中生物碱类和苯乙酮类化合物为山油柑属植物中主要的化合物类型^[2]。大量药理学研究表明山油柑属植物具有广泛的生物活性, 如抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗氧化以及镇痛等活性^[2]。本课题组长期致力于从具有海南特色的热带药用植物中发现具有显著生物活性的化合物, 在前期研究中发现山油柑枝叶 90%乙醇提取物具有显著的抗类风湿性关节炎活性^[3-8]。为了更合理地开发利用山油柑这种药食同源植物资源, 充分发挥其药用价值、食用价值和经济价值, 本研究对山油柑枝叶中的化学成分进行了系统研究, 从山油柑枝叶乙醇提取物的石油醚萃取部位中分离得到了 16 个化合物, 分别鉴定为阿里二醇 (arnidiol, 1)、款冬二醇 (faradiol, 2)、马尼拉二醇 (maniladiol, 3)、齐墩果-12-烯-3,11-二酮 (olean-12-ene-3,11-dione, 4)、16 β -羟基羽扇豆-20(29)-烯-3-酮 [16 β -hydroxylupa-20(29)-en-3-one, 5]、岩高兰三萜-21-烯-3-酮 (nigrum-21-en-3-one, 6)、24-亚甲基环阿尔廷醇 (24-methylenecycartanol, 7)、5,6,7-三甲氧基香豆素

(5,6,7-trimethoxy coumarin, 8)、6-羟基-7,8-二甲氧基香豆素 (6-hydroxy-7,8-dimethoxy-coumarin, 9)、6,7,8-三甲氧基香豆素 (6,7,8-trimethoxycoumarin, 10)、秦皮素 (fraxidin, 11)、丝立尼亭 (selinidin, 12)、紫花前胡苷元 (nodakenetin, 13)、佛手酚 (bergaptol, 14)、佛手柑内酯 (bergapten, 15) 和花椒毒素 (xanthotoxin, 16), 其中化合物 1~7 为三萜类化合物, 化合物 8~16 为香豆素类化合物, 所有化合物均为首次从山油柑属植物中分离得到。此外, 采用 MTS 法对分离鉴定的化合物进行了体外抑制滑膜细胞增殖活性测试, 评价了所有分离得到的化合物的抗类风湿性关节炎活性。活性评价结果表明, 化合物 1 和 4 表现出了较为显著的抗类风湿性关节炎活性, 化合物 1~7 对 MH7A 滑膜成纤维细胞增殖抑制活性的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值为 (9.26 $\pm$ 0.10) ~ (156.28 $\pm$ 0.17) μ mol/L。

1 仪器与材料

Finnigan LCQ Advantage MAX 液质联用仪 (美国赛默飞世尔科技公司); Bruker AV-400 型超导核磁共振仪 (德国布鲁克分析仪器公司); UltiMate 3000 制备型高效液相色谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); UltiMate 3000 分析型高效液相色谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); YMC-Pack ODS-A 分析型色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 日本 YMC 公司); YMC-Pack ODS-A 制备型色谱柱 (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μ m, 日本 YMC 公司); 中低压制备色谱系统 (瑞士 Buchi 公司); YOKO-ZX 型紫外分析暗箱 (武汉药科新技术开发有限公司); ODS 柱色谱材料 (德国 Merck 公司); Sephadex LH-20 (美国安玛西亚公司); 薄层硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶 (上海盛亚化工有限公司); 所用试剂均为色谱纯试剂或者分析纯试剂 (广东西陇化工股份有限公司)。XPR105DR/AC 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公

司); OLYM PUS-IX70 型生物倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社); HERAcell 240i 型 CO₂ 恒温细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Tecan Infinite Pro 型全波长多功能酶标仪(瑞士 Tecan 集团公司); BHC-1300B2 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 胰蛋白酶、F12 培养基、胎牛血清、磷酸盐缓冲液和双抗(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 噻唑蓝(德国 Merck 集团); 所用试剂均为色谱纯或者分析纯试剂(西陇化工股份有限公司); MH7A 滑膜成纤维细胞来源于美国模式培养物集存库 ATCC (American type culture collection) 细胞库, 购自于上海冠导生物工程有限公司。

山油柑枝叶于 2020 年 5 月采集于海南省昌江县霸王岭国家森林公园, 经海南师范大学生命科学学院钟琼芯教授鉴定为芸香科山油柑属植物山油柑 *A. pedunculata* (L.) Miq. 的果实, 凭证标本(ACPE20200503) 保存于海南师范大学南药资源产业化关键技术研究海南省工程研究中心植物标本室。

2 提取分离

将阴干山油柑的枝叶 22.8 kg 粉碎后用 90% 乙醇在室温条件下进行浸泡提取, 每次浸泡提取 3 d, 共提取 6 次, 合并乙醇提取液并减压浓缩得乙醇总提取物。乙醇总提取物加重蒸水混悬后依次分别用石油醚和醋酸乙酯进行萃取, 各分别萃取 6 次, 合并萃取液减压回收溶剂后分别得到石油醚萃取部位和醋酸乙酯萃取部位。取石油醚萃取部位 1 266.0 g 用常压硅胶柱色谱进行分离, 以氯仿-甲醇为洗脱剂(100:0~50:50)进行梯度洗脱, 得到 9 个流分(Fr. 1~9)。Fr. 2 (58.3 g) 经中低压柱色谱进行分离, 以 ODS 为分离材料, 甲醇-水为洗脱剂(65:35~100:0)进行梯度洗脱, 得到 7 个亚流分(Fr. 2A~2G)。Fr. 2B 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(流动相为氯仿-甲醇 4:6)纯化后经制备型 HPLC(流动相为甲醇-水 78:22)制备得到化合物 **1** (34.1 mg, t_R =21.7 min)、**5** (31.8 mg, t_R =32.9 min)、**6** (9.3 mg, t_R =37.2 min) 和 **15** (82.5 mg, t_R =43.8 min); Fr. 2C 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(流动相为氯仿-丙酮 4:6)纯化后经制备型 HPLC(流动相为甲醇-水 74:26)制备得到化合物 **2** (8.7 mg, t_R =29.7 min)、**7** (12.6 mg, t_R =38.7 min)、**8** (53.6 mg, t_R =40.3 min) 和 **14** (22.5 mg,

t_R =45.7 min); Fr. 2D 经加压硅胶柱色谱进行分离, 以石油醚-醋酸乙酯(80:20~40:60)为洗脱剂进行梯度洗脱, 洗脱流分经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(流动相为氯仿-甲醇 4:6)纯化后经制备型 HPLC(流动相为乙腈-水 62:28)制备得到化合物 **3** (52.9 mg, t_R =27.3 min)、**9** (32.3 mg, t_R =35.7 min)、**11** (7.9 mg, t_R =44.2 min) 和 **13** (72.5 mg, t_R =48.2 min); Fr. 2E 经加压硅胶柱色谱进行分离, 以石油醚-丙酮(85:15~25:75)为流动相进行梯度洗脱, 洗脱流分经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(流动相为氯仿-甲醇 4:6)纯化后经制备型 HPLC(流动相为甲醇-水 77:23)制备得到化合物 **4** (16.8 mg, t_R =23.6 min)、**10** (7.9 mg, t_R =37.3 min)、**12** (15.5 mg, t_R =47.6 min) 和 **16** (62.3 mg, t_R =50.9 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定型粉末; C₃₀H₅₀O₂, ESI-MS m/z : 443 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.68 (1H, d, J =2.0 Hz, H-30 α), 4.65 (1H, d, J =2.0 Hz, H-30 β), 3.41 (1H, dd, J =11.6, 5.0 Hz, H-3), 3.19 (1H, dd, J =11.6, 5.0 Hz, H-16), 1.05 (3H, d, J =6.8 Hz, H-29), 1.04 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, s, H-28), 0.97 (3H, s, H-25), 0.85 (3H, s, H-24), 0.84 (3H, s, H-26), 0.76 (3H, s, H-27); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 153.7 (C-20), 107.5 (C-30), 79.1 (C-3), 77.5 (C-16), 55.5 (C-5), 49.9 (C-9), 47.8 (C-18), 42.4 (C-14), 41.0 (C-17), 39.9 (C-8), 38.9 (C-19), 38.8 (C-4), 38.7 (C-1), 38.6 (C-13), 37.0 (C-10), 35.9 (C-15), 35.4 (C-22), 33.9 (C-7), 27.9 (C-23), 27.5 (C-2), 26.0 (C-12), 25.4 (C-29), 24.9 (C-21), 21.5 (C-11), 18.4 (C-6), 16.5 (C-25), 16.2 (C-26), 15.8 (C-27), 15.3 (C-24), 12.7 (C-28)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[9-10], 故鉴定化合物 **1** 为阿里二醇。

化合物 **2**: 白色无定型粉末; C₃₀H₅₀O₂, ESI-MS m/z : 443 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.29 (1H, d, J =7.2 Hz, H-21), 3.40 (1H, dd, J =11.8, 5.0 Hz, H-16), 3.21 (1H, dd, J =11.8, 5.0 Hz, H-3), 1.68 (3H, brs, H-30), 1.06 (3H, s, H-26), 1.05 (3H, d, J =6.0 Hz, H-29), 1.02 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-23), 0.86 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-24), 0.75 (3H, s, H-28); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 140.1 (C-20), 118.5 (C-21), 79.2 (C-3), 76.6 (C-16), 55.5 (C-5), 49.8 (C-18), 47.8 (C-9), 42.7 (C-14), 41.3 (C-8), 39.9 (C-17),

39.1 (C-4), 39.0 (C-1), 38.8 (C-19), 37.8 (C-22), 37.3 (C-10), 36.8 (C-15), 35.9 (C-13), 34.4 (C-7), 28.5 (C-2), 28.2 (C-23), 27.6 (C-12), 22.8 (C-30), 21.9 (C-27), 21.8 (C-11), 18.5 (C-6), 16.7 (C-29), 16.5 (C-26), 16.3 (C-25), 15.6 (C-24), 11.8 (C-28)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[10], 故鉴定化合物 **2** 为款冬二醇。

化合物 **3**: 白色无定型粉末; $C_{30}H_{50}O_2$, ESI-MS m/z : 443 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.31 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12), 4.19 (1H, dd, $J = 11.8, 4.6$ Hz, H-16), 3.24 (1H, dd, $J = 11.8, 4.6$ Hz, H-3), 1.23 (3H, s, H-27), 1.02 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, s, H-30), 0.90 (3H, s, H-29), 0.79 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 143.8 (C-13), 122.6 (C-12), 79.2 (C-3), 66.3 (C-16), 55.4 (C-5), 49.3 (C-18), 46.9 (C-9), 46.8 (C-19), 44.0 (C-14), 39.9 (C-8), 39.1 (C-4), 38.8 (C-1), 37.6 (C-10), 36.9 (C-17), 35.8 (C-15), 34.4 (C-21), 33.3 (C-29), 32.9 (C-7), 31.2 (C-20), 30.8 (C-22), 28.3 (C-23), 27.5 (C-2), 27.3 (C-27), 24.2 (C-30), 23.8 (C-11), 21.7 (C-28), 18.6 (C-6), 16.9 (C-26), 15.8 (C-24), 15.6 (C-25)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[11], 故鉴定化合物 **3** 为马尼拉二醇。

化合物 **4**: 白色无定型粉末; $C_{30}H_{46}O_2$, ESI-MS m/z : 439 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.61 (1H, brs, H-12), 1.39 (3H, s, H-27), 1.29 (3H, s, H-24), 1.20 (3H, s, H-29), 1.06 (3H, s, H-23), 1.09 (3H, s, H-28), 0.93 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, s, H-25), 0.88 (3H, s, H-26); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 217.5 (C-3), 199.8 (C-11), 171.4 (C-13), 128.3 (C-12), 61.3 (C-9), 55.7 (C-5), 48.1 (C-4), 47.9 (C-18), 45.5 (C-19), 43.8 (C-14), 40.0 (C-1), 36.9 (C-8), 36.8 (C-22), 34.7 (C-2), 34.5 (C-21), 33.3 (C-29), 32.7 (C-17), 32.6 (C-10), 32.4 (C-7), 31.3 (C-20), 29.0 (C-28), 26.9 (C-23), 26.8 (C-15), 26.6 (C-16), 23.7 (C-27), 23.6 (C-30), 21.7 (C-24), 19.0 (C-6), 18.8 (C-26), 16.0 (C-25)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[12], 故鉴定化合物 **4** 为齐墩果-12-烯-3,11-二酮。

化合物 **5**: 白色无定型粉末; $C_{30}H_{48}O_2$, ESI-MS m/z : 441 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.69 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-29 α), 4.58 (1H, brs, H-29 β), 3.62 (1H, dd, $J = 11.2, 4.8$ Hz, H-16), 1.68 (3H, s, H-30), 1.10 (3H, s, H-26), 1.06 (3H, s, H-23), 1.03 (3H, s, H-24), 0.98 (3H, s, H-27), 0.89 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s,

H-28); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 218.3 (C-3), 150.2 (C-20), 109.9 (C-29), 77.3 (C-16), 55.1 (C-5), 49.6 (C-9), 48.9 (C-17), 47.9 (C-18), 47.8 (C-4), 47.6 (C-19), 44.4 (C-14), 40.9 (C-8), 39.8 (C-1), 37.9 (C-22), 37.6 (C-15), 37.1 (C-13), 36.9 (C-10), 34.4 (C-2), 33.8 (C-7), 29.9 (C-21), 26.9 (C-23), 24.9 (C-12), 21.6 (C-11), 21.3 (C-24), 19.9 (C-6), 19.6 (C-30), 16.3 (C-25), 16.2 (C-26), 16.0 (C-27), 12.0 (C-28)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[13], 故鉴定化合物 **5** 为 16 β -羟基-羽扇豆-20(29)-烯-3-酮。

化合物 **6**: 白色无定型粉末; $C_{30}H_{50}O$, ESI-MS m/z : 427 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.09 (1H, m, H-21), 1.72 (3H, s, H-29), 1.58 (3H, s, H-30), 1.13 (3H, s, H-26), 1.08 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-28), 0.91 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-23), 0.83 (3H, s, H-27), 0.78 (3H, s, H-24); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 213.3 (C-3), 130.9 (C-22), 125.3 (C-21), 58.6 (C-4), 50.8 (C-17), 50.6 (C-14), 49.3 (C-10), 45.9 (C-13), 45.3 (C-8), 42.1 (C-2), 40.6 (C-5), 36.6 (C-19), 36.3 (C-15), 36.2 (C-18), 35.9 (C-9), 35.3 (C-6), 34.7 (C-11), 31.2 (C-12), 29.0 (C-25), 27.9 (C-16), 25.8 (C-29), 24.9 (C-20), 23.9 (C-1), 22.8 (C-26), 19.9 (C-7), 18.8 (C-28), 17.9 (C-30), 15.7 (C-27), 15.6 (C-24), 7.1 (C-23)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[14-15], 故鉴定化合物 **6** 为岩高兰三萜-21-烯-3-酮。

化合物 **7**: 白色无定型粉末; $C_{31}H_{52}O$, ESI-MS m/z : 441 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.75 (1H, brs, H-31 β), 4.70 (1H, brs, H-31 α), 3.30 (1H, dd, $J = 9.0, 4.8$ Hz, H-3), 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 1.02 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 1.00 (6H, s, H-18, 29), 0.93 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-21), 0.89 (3H, s, H-28), 0.79 (3H, s, H-30), 0.56 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-19 β), 0.38 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-19 α); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 157.0 (C-24), 105.9 (C-31), 79.0 (C-3), 52.4 (C-17), 48.9 (C-14), 48.3 (C-8), 47.3 (C-5), 45.5 (C-13), 40.6 (C-4), 36.3 (C-20), 35.7 (C-12), 34.9 (C-22), 33.9 (C-25), 32.9 (C-15), 31.9 (C-1), 31.6 (C-23), 30.3 (C-2), 30.0 (C-19), 28.3 (C-7), 26.6 (C-16), 26.2 (C-11), 25.9 (C-10), 25.6 (C-29), 22.2 (C-27), 22.0 (C-26), 21.3 (C-6), 19.9 (C-9), 19.5 (C-28), 18.5 (C-21), 18.2 (C-18), 14.2 (C-30)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[15], 故鉴定化合物 **7** 为 24-亚甲基环阿尔廷醇。

化合物 **8**: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色

反应阳性; $C_{12}H_{12}O_5$, ESI-MS m/z : 237 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.01 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-4), 7.09 (1H, s, H-8), 6.39 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-3), 3.89 (3H, s, 5-OCH₃), 3.85 (3H, s, 6-OCH₃), 3.83 (3H, s, 7-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.1 (C-2), 149.8 (C-7), 145.3 (C-5), 144.5 (C-4), 142.2 (C-9), 140.4 (C-6), 114.8 (C-3), 114.6 (C-10), 104.9 (C-8), 61.6 (7-OCH₃), 60.9 (6-OCH₃), 56.3 (5-OCH₃)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[16], 故鉴定化合物 **8** 为 5,6,7-三甲氧基香豆素。

化合物 **9**: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色反应阳性; $C_{11}H_{10}O_5$, ESI-MS m/z : 223 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.78 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-4), 6.79 (1H, s, H-5), 6.29 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-3), 3.98 (3H, s, 7-OCH₃), 3.93 (3H, s, 8-OCH₃); ^{13}C -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 162.9 (C-2), 149.0 (C-9), 146.3 (C-8), 146.0 (C-4), 142.9 (C-6), 142.0 (C-7), 116.6 (C-10), 115.2 (C-3), 109.0 (C-5), 61.9 (8-OCH₃), 61.7 (7-OCH₃)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[17], 鉴定化合物 **9** 为 6-羟基-7,8-二甲氧基香豆素。

化合物 **10**: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色反应阳性; $C_{12}H_{12}O_5$, ESI-MS m/z : 237 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.00 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-4), 7.09 (1H, s, H-5), 6.38 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-3), 3.89 (3H, s, 6-OCH₃), 3.84 (3H, s, 7-OCH₃), 3.79 (3H, s, 8-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.1 (C-2), 149.7 (C-10), 145.3 (C-8), 144.4 (C-4), 142.2 (C-9), 139.9 (C-7), 114.8 (C-3), 114.5 (C-5), 104.9 (C-6), 61.6 (7-OCH₃), 60.9 (7-OCH₃), 55.9 (8-OCH₃)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[18], 故鉴定化合物 **10** 为 6,7,8-三甲氧基香豆素。

化合物 **11**: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色反应阳性; $C_{11}H_{10}O_5$, ESI-MS m/z : 223 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.79 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-3), 6.18 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-4), 6.88 (1H, s, H-5), 3.89 (3H, s, 6-OCH₃), 3.82 (3H, s, 7-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.3 (C-2), 147.6 (C-6), 146.3 (C-9), 146.0 (C-8), 145.8 (C-4), 144.8 (C-7), 113.0 (C-3), 112.2 (C-10), 104.9 (C-5), 61.7 (7-OCH₃), 57.0 (6-OCH₃)。以上数据与文献中报道的数据基本一致^[19], 故鉴定化合物 **11** 为秦皮素。

化合物 **12**: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色反应阳性; $C_{19}H_{20}O_5$, ESI-MS m/z : 329 $[M+H]^+$;

1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.63 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-4), 7.21 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.78 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6), 6.19 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-3), 6.08 (1H, dd, J = 7.6, 1.8 Hz, H-3''), 5.18 (1H, dd, J = 5.8, 5.6 Hz, H-3'), 3.21 (1H, dd, J = 17.8, 5.8 Hz, H-4'), 3.10 (1H, dd, J = 17.8, 5.6 Hz, H-4''), 1.90 (3H, q, J = 7.6 Hz, H-4''), 1.83 (3H, q, J = 1.8 Hz, H-5''), 1.40 (3H, s, H-5'), 1.37 (3H, s, H-6'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 167.0 (C-1''), 161.3 (C-2), 156.5 (C-7), 153.6 (C-9), 144.0 (C-4), 139.3 (C-3''), 127.5 (C-2''), 126.8 (C-5), 114.4 (C-6), 112.6 (C-3), 112.2 (C-10), 107.4 (C-8), 76.7 (C-2'), 69.4 (C-3'), 25.0 (C-5'), 23.3 (C-4'), 20.7 (C-5''), 23.0 (C-6'), 15.9 (C-4'')。以上数据与文献中报道的数据基本一致^[20], 故鉴定化合物 **12** 为丝立尼亭。

化合物 **13**: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色反应阳性; $C_{14}H_{14}O_4$, ESI-MS m/z : 247 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.58 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-4), 7.19 (1H, s, H-5), 6.71 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-3), 4.69 (1H, dd, J = 9.3, 8.8 Hz, H-2'), 3.18 (2H, m, H-3'), 1.35 (3H, s, H-5'), 1.19 (3H, s, H-6'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 163.3 (C-7), 161.6 (C-2), 155.8 (C-9), 143.8 (C-4), 125.2 (C-6), 123.6 (C-5), 113.0 (C-10), 112.3 (C-3), 98.1 (C-8), 91.3 (C-2'), 71.8 (C-4'), 29.6 (C-3'), 26.2 (C-5'), 24.5 (C-6')。以上数据与文献报道的数据基本一致^[21], 故鉴定化合物 **13** 为紫花前胡苷元。

化合物 **14**: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色反应阳性; $C_{11}H_6O_4$, ESI-MS m/z : 203 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.31 (1H, s, 5-OH), 8.18 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-4), 7.90 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3'), 7.16 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.09 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-3); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.5 (C-2), 156.9 (C-7), 152.8 (C-5), 147.9 (C-8a), 145.0 (C-2'), 139.8 (C-4), 112.5 (C-6), 111.0 (C-3), 104.8 (C-3'), 104.6 (C-4a), 90.9 (C-8)。以上数据与文献中报道的数据基本一致^[22], 故鉴定化合物 **14** 为佛手酚。

化合物 **15**: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色反应阳性; $C_{12}H_8O_4$, ESI-MS m/z : 217 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.18 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-4), 7.63 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 7.15 (1H, s, H-8), 7.06 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-3'), 6.31 (1H, d, J = 10.0 Hz,

H-3), 4.30 (3H, s, 5-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 160.9 (C-2), 156.9 (C-7), 152.1 (C-9), 149.4 (C-5), 144.6 (C-2'), 139.1 (C-4), 113.3 (C-6), 113.0 (C-3), 106.7 (C-10), 105.0 (C-3'), 94.2 (C-8), 60.2 (5-OCH₃). 以上数据与文献中报道的数据基本一致^[23], 故鉴定化合物 15 为佛手柑内酯。

化合物 16: 白色无定型粉末, 异羟肟酸铁显色反应阳性; C₁₂H₈O₄, ESI-MS *m/z*: 217 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.78 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-4), 7.71 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.36 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-3'), 6.38 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-3), 4.30 (3H, s, 8-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 160.8 (C-2), 148.0 (C-7), 147.1 (C-2'), 144.6 (C-4), 143.3 (C-8a), 132.8 (C-8), 126.4 (C-6), 116.8 (C-4a), 114.9 (C-3), 113.2 (C-5), 107.0 (C-3'), 61.6 (8-OCH₃). 以上数据与文献中报道的花椒毒素的数据基本一致^[24], 故鉴定化合物 16 为花椒毒素。

4 抗类风湿性关节炎活性评价^[25-26]

以 MH7A 滑膜成纤维细胞株为活性评价细胞株, 以甲氨蝶呤为阳性对照药物, 采用 MTT 法对分离鉴定的 16 个化合物 1~16 的体外抑制 MH7A 滑膜成纤维细胞增殖的活性进行了测试, 以初步评价这些分离得到的化合物的抗类风湿性关节炎活性^[25-26]。具体的活性评价实验操作流程和方法如下: MH7A 滑膜细胞培养于 RPMI 1640 完全培养液 (含有 10.0% 胎牛血清、100.0 μg/mL 的青霉素及链霉素、1.0 mmol/L 的 *L*-谷氨酰胺) 中, 37.0 °C、50% CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育至对数生长期。取对数生长期的滑膜细胞接种至 96 孔板 (细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/mL)。待细胞贴壁生长 13 h 后, 加入不同浓度梯度的 16 个待测样品及阳性对照药 (甲氨蝶呤) 各 100.0 μL, 阴性对照组加入等体积的培养基。共同孵育 48.0 h 后, 每孔加入 10.0 μL 的 MTT 溶液 (5.0 mg/mL), 继续培养 4.0 h 后吸去上清液。加入 100.0 μL 的 DMSO, 结晶物充分溶解后于 490.0 nm 波长下测定各孔吸光度 (*A*) 值, 以阴性对照组的 *A* 值作为对照计算药物对滑膜细胞生长的抑制作用。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{给药}}$$

抗类风湿性关节炎活性评价结果表明三萜类化合物 1~7 对 MH7A 滑膜成纤维细胞表现出了较为显著的增殖抑制活性 (表 1), 它们对 MH7A 滑膜成纤维细胞增殖的抑制活性的 IC₅₀ 值为 (9.26 ±

表 1 部分化合物抑制 MH7A 滑膜成纤维细胞增殖的活性
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibitory effects of some compounds on growth of MH7A synovial fibroblast cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	IC ₅₀ /(μmol L ⁻¹)	化合物	IC ₅₀ /(μmol L ⁻¹)
1	23.78 ± 0.11	5	78.29 ± 0.15
2	45.23 ± 0.16	6	156.28 ± 0.17
3	65.39 ± 0.18	7	98.36 ± 0.12
4	9.26 ± 0.10	甲氨蝶呤	123.89 ± 0.19

0.10) ~ (156.28 ± 0.17) μmol/L, 分离得到的化合物 8~16 未表现出明显的抑制滑膜细胞增殖的活性 (IC₅₀ > 300.00 μmol/L)。值得一提的是, 三萜类化合物 1~7 大多表现出了优于阳性对照药物甲氨蝶呤对 MH7A 滑膜成纤维细胞的增殖抑制活性, 提示它们具有显著的体外抗类风湿性关节炎活性。

5 讨论

本研究综合运用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和制备型 HPLC 等多种色谱分离技术以及 NMR 波谱和 MS 等结构鉴定手段对芸香科山油柑属植物山油柑枝叶的 90% 乙醇提取物中的化学成分进行了系统研究, 从中分离鉴定了 16 个化合物, 包括 7 个三萜类化合物和 9 个香豆素类化合物, 所有化合物均为首次从山油柑属植物中分离得到。通过对分离得到的化合物 1~16 的体外抑制 MH7A 滑膜成纤维细胞增殖活性评价发现分离鉴定的三萜类化合物 1~7 表现出了较为显著的抗类风湿性关节炎活性, 提示三萜类化合物可能是山油柑具有抗类风湿性关节炎作用的药效物质基础。本研究不仅可为新型天然来源的抗类风湿性关节炎新药的开发提供坚实的技术支撑, 而且可为山油柑属植物资源的合理开发与利用提供重要的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [第 43(2)卷] [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 105-108.
- [2] Epifano F, Fiorito S, Genovese S. Phytochemistry and pharmacognosy of the genus *Acronychia* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 95: 12-18.
- [3] Fu Y H, Guo J M, Xie Y T, et al. Prenylated chromones from the fruits of *Artocarpus heterophyllus* and their potential anti-HIV-1 activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(7): 2024-2030.
- [4] Hu S, Ma Y L, Guo J M, et al. Bisabolane sesquiterpenes

- from *Clausena sanki* with their potential anti-inflammatory activities [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(24): 3499-3505.
- [5] Liu Y P, Guo J M, Liu Y Y, *et al.* Carbazole alkaloids with potential neuroprotective activities from the fruits of *Clausena lansium* [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(20): 5764-5771.
- [6] Liu Y P, Yan G, Xie Y T, *et al.* Bioactive prenylated coumarins as potential anti-inflammatory and anti-HIV agents from *Clausena lenis* [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 97: 103699.
- [7] Liu Y P, Hu S, Liu Y Y, *et al.* Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated carbazole alkaloids from *Clausena vestita* [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 91: 103107.
- [8] Liu Y P, Guo J M, Wang X P, *et al.* Geranylated carbazole alkaloids with potential neuroprotective activities from the stems and leaves of *Clausena lansium* [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 92: 103278.
- [9] Qiang Y, Zhang X X, Liu H, *et al.* Chemical constituents of *Alisma orientalis* [J]. *Chem Nat Compd*, 2014, 49(6): 1143-1145.
- [10] 薛鹏辉, 李金妍, 刘达, 等. 鹅不食草中三萜类化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(19): 4907-4915.
- [11] Quijano L, Rios T, Fronczek F R, *et al.* The molecular structure of maniladiol from *Baccharis salicina* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(7): 2065-2068.
- [12] 孙彪, 敖运林, 王德智, 等. 葎草茎叶石油醚部位化学成分 [J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(2): 178-184.
- [13] Pech G G, Brito W F, Mena G J, *et al.* Constituents of *Acacia cedilloi* and *Acacia gaumeri*. Revised structure and complete NMR assignments of resinone [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2002, 57(9/10): 773-776.
- [14] Toiron C, Rumero A, Wollenweber E, *et al.* A new skeletal triterpenoid isolated from *Empetrum nigrum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36(36): 6559-6562.
- [15] 赵明, 黄淑蕾, 徐阳宏, 等. 东北岩高兰中三萜类化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 69-74.
- [16] 胡疆, 张卫东, 柳润辉, 等. 两面针的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1689-1691.
- [17] 康洁, 苏现明, 张鹏, 等. 鸡眼藤地上部分的化学成分研究 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 111-113.
- [18] 张海新, 夏召, 许天启, 等. 小驳骨的化学成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4620-4626.
- [19] 黄圣卓, 马青云, 彭华, 等. 云南土沉香中的香豆素类成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 318-322.
- [20] 廖志超, 姜鑫, 田文静, 等. 紫花前胡中化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(15): 2999-3003.
- [21] 吴秀稳, 杨秀伟. 羌活中的香豆素类成分及其抑制脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 生成活性的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(13): 3383-3392.
- [22] 杨秀伟, 严仲铠, 顾哲明, 等. 羌活化学成分的研究 [J]. 中草药, 1993, 24(10): 507-511.
- [23] 罗鑫, 王雪晶, 赵祎武, 等. 羌活化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1492-1495.
- [24] 王琳, 孙琳, 刘慧颖, 等. 钩吻的化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2028-2032.
- [25] Hua L P, Zhang Y Q, Ye M, *et al.* A new polyoxygenated abietane diterpenoid from the rattans of *Bauhinia championii* (Benth.) Benth [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(21): 2577-2582.
- [26] Hua L P, Zhang Y Q, Ye M, *et al.* Bioactive dibenzofurans from the rattans of *Bauhinia championii* (benth.) Benth [J]. *Phytochem Lett*, 2018, 24: 154-157.

[责任编辑 王文倩]