

金果榄二萜类成分及其抗炎活性研究

吕福杰^{1*}, 范在举¹, 李琦¹, 邓爱霞^{2*}

¹聊城市中医医院制剂中心; ²聊城大学材料科学与工程学院, 聊城 252000

摘要:研究金果榄的二萜类成分及其抗炎活性。采用多种色谱技术对金果榄乙醇提取物进行分离纯化, 通过质谱、核磁、圆二色谱及单晶衍射等方法对化合物结构进行鉴定, 并以 Griess 法测定化合物对脂多糖诱导的小鼠小胶质 BV2 细胞产生一氧化氮(NO)的抑制活性。从金果榄乙醇提取物乙酸乙酯萃取部分分离得到了七个克罗烷型二萜类化合物, 分别为 tinocapill A(1)、tinocapill B(2)、crispene A(3)、floridolide B(4)、古伦宾(5)、tinosporol B(6)、borapetol A(7)。其中化合物 1 和 2 为新化合物, 活性结果表明, 化合物 2 和 6 能够显著抑制 LPS 诱导小鼠 BV2 细胞释放 NO(IC₅₀ 值分别为 9.6 和 5.8 $\mu\text{mol/L}$), 具有潜在的抗炎活性。

关键词:金果榄; 提取分离; 二萜; 克罗烷; 抗炎

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)10-1707-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.10.007

Diterpenoids from *Tinosporae Radix* and their anti-inflammatory activity

LYU Fu-jie^{1*}, FAN Zai-ju¹, LI Qi¹, DENG Ai-xia^{2*}

¹Preparation Center of Liaocheng Traditional Chinese Medicine Hospital;

²School of Materials Science and Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China

Abstract: This study aims to investigate the diterpenoids of *Tinosporae Radix* and their anti-inflammatory activity. Various chromatographic techniques were used for isolation of the ethanol extract of *Tinosporae Radix*. The structures of the compounds were identified using MS, NMR, CD, and single X-ray crystal diffraction. The Griess method was used to determine the inhibitory activity of the compounds on the production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide-induced BV2 cells. Seven clerodane diterpenoids were isolated from the EtOAc part of the ethanol extract of *Tinosporae Radix*, including tinocapill A (1), tinocapill B (2), crispene A (3), floridolide B (4), columbin (5), tinosporol B (6) and borapetol A (7). Compounds 1 and 2 were new compounds, while the activity results indicated that compounds 2 and 6 could significantly inhibit LPS-induced NO release in murine BV2 cells (with IC₅₀ values of 9.6 and 5.8 $\mu\text{mol/L}$, respectively), showing potential anti-inflammatory activity.

Key words: *Tinosporae Radix*; extraction and isolation; diterpenoid; clerodane; anti-inflammatory

中药金果榄是防己科植物青牛胆 *Tinospora sagittate* (Oliv.) Gagnep. 或金果榄 *T. capillipes* Gagnep. 的干燥块根, 别名九龙胆、金牛胆、青鱼胆、地苦胆等, 被历版《中华人民共和国药典》所收载^[1]。作为一种多基原药材, 金果榄的药用资源分布于贵州、广西、重庆、四川、湖南、湖北等地, 以清热解暑、利咽止痛之功效而广受认可^[1,2]。研究表明金果榄醇提取物中蕴含丰富二萜、生物碱、甾体、脂肪酸、木脂素类化

合物等化学成分^[3,4]。这些成分展现出多种生物活性, 包括抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗溃疡及缓解压力等^[3,4]。古伦宾是一种克罗烷型二萜类化合物, 作为中国药典中鉴定金果榄的标志性成分具有抗炎、镇痛、肿瘤的化学预防作用等多种药理作用^[5]。相关研究表明金果榄的不同基原药材、不同提取物和不同萃取部位具有不同程度的抗炎活性, 抗炎机制为抑制一氧化氮或抑制诱导型一氧化氮合酶和环氧合酶-2^[3], 同时克罗烷型二萜类化合物抗炎功效被广泛报道^[6]。因此从金果榄药材中分离鉴定更多的克罗烷型二萜类成分, 并对其展开抗炎活性相关研究, 有望进一步丰富金果榄的药效物质基础。

收稿日期: 2024-04-10 接受日期: 2024-08-27

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2021ME126)

* 通信作者 Tel; E-mail: Lvj@ sina. cn, dengaixia@ lcu. edu. cn

1 材料与方法

1.1 药材来源

金果榄于2020年采购于安徽亳州药材市场,经聊城市中医院范在举主管中药师鉴定为 *Tinospora capillipes* Gagnep. 的根茎,标本 JGL 储存于聊城市中医院中药制剂中心。

1.2 仪器与试剂

Xcalibur Nova X-ray 单晶衍射仪(美国 Agilent 公司); Autopol I 自动旋光仪(美国 Rudolph Research Analytical 公司); Micromass Q-TOF Electrospray 质谱仪(美国 Waters 公司); Applied Photophysics 圆二色谱仪(英国 Applied Photophysics 公司); AvanceIII-600 MHz 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); Agilent1260 制备液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 绿百草 GH0525010C18A 色谱柱(9.4 mm × 250 mm, 北京绿百草科技发展有限公司); 柱色谱硅胶和 GF254 薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20(美国 GE 公司); 反相硅胶(德国 Merck 公司); CHP-20 MCI(日本 Mitsubishi 公司); 石油醚、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、乙醇等(分析纯, 天津大茂化学试剂厂); 小鼠小胶质细胞(BV2 细胞)(中科院上海细胞库); DMEM 培养基(批号: 6123147, 美国 Gibco 公司); 胎牛血清(批号: SV30208, 美国 Hyclone 公司); 噻唑蓝(MTT)(纯度 98%, 批号: 715F058, 北京索莱宝科技有限公司); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(纯度 98%, 批号: 124S031, 北京索莱宝科技有限公司); 一氧化氮检测试剂盒(批号: S0021S, 碧云天生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 提取与分离

将 2.5 kg 干燥后的金果榄根茎进行粉碎处理后,用 95% 乙醇冷浸提取三次(5.0 L × 3),浓缩后除去乙醇,得到粗浸膏(160 g)。将粗浸膏与水混合并悬浮形成水相,采用石油醚和乙酸乙酯进行分层萃取三次(石油醚 3.0 L × 3; 乙酸乙酯 3.0 L × 3),从而分离出两个不同极性的浸膏部分。针对乙酸乙酯提取部位(75 g)进行了系统分离工作:浸膏经 MCI 柱层析(甲醇:水 = 40% → 100%)洗脱为 7 个馏分(Fr. A ~ Fr. G)。其中 Fr. D 段经反相硅胶柱色谱进行梯度洗脱(甲醇:水, 50% → 70%)得 8 个组分(D1 ~ D8)。D1 经 HPLC(3 mL/min, 56% 甲醇)纯化得化合物 4($t_R = 10.0$ min, 1.5 mg)和 1($t_R =$

13.5 min, 0.8 mg)。D4 经 HPLC(3 mL/min, 58% 甲醇)纯化得化合物 6($t_R = 15.5$ min, 1.1 mg)和 2($t_R = 15.5$ min, 4.4 mg)。D7 经 HPLC(3 mL/min, 60% 甲醇)纯化得化合物 3($t_R = 19.5$ min, 5.4 mg)和 7($t_R = 25.0$ min, 3.0 mg)。D8 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离后经重结晶得到化合物 5(60.0 mg)。

1.3.2 化合物 1 和 2 的理论 ECD 计算

采用 Maestro 10.2 中的构象搜索功能,采用 MMFFs 力场计算构象能量,挑选能量阈值在 2.5 kcal/mol 以内的构象进行量子化学几何优化。然后采用 Gaussian 09 在 B3LYP-6-311G(2d,q)对得到的构象进行几何优化以及 TD-DFT 方法计算每个优势构象的激发态。最后采用 SpecDis 软件拟合化合物的 ECD 图谱,并与实验图谱比对。

1.3.3 抗炎活性测试

1.3.3.1 细胞培养

小鼠小胶质 BV2 细胞培养于温度 37 °C, 5% CO₂ 的条件下,使用 DMEM 培养液进行培养(含 10% 血清)。

1.3.3.2 MTT 测试

分离得到的化合物对于 BV2 细胞的毒性是通过 MTT 实验测试的。取处于对数生长期的细胞,消化,离心,重悬后按每孔 100 μL,每孔细胞数 5×10^3 个接种于 96 孔板中,培养 24 h 后吸除原培养液,在 100 μL 的细胞培养液中将受试化合物配成 40 μmol/L 的浓度,空白对照组只加 100 μL 的细胞培养液。加药 24 h 后,加入 20 μL 的 MTT 溶液。又孵育 4 h 后,去除孔中溶剂加入 150 μL 的 DMSO。通过紫外分光光度计在 490 nm 测试吸收值按计算公式(1)计算细胞增殖抑制率(I)。

$$I = [1 - (A_1 - A_0) / (A_2 - A_0)] \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_0 为空白组吸光度; A_1 为加药组吸光度; A_2 为对照组吸光度。

1.3.3.3 Griess 法检测目标化合物的 NO 抑制率

参考文献^[7]方法,通过 Griess 反应测定 NO,检测二萜化合物对 LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的抑制作用。实验分为空白对照组、模型组(LPS 组)、实验组。BV2 细胞以 3.0×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板中,培养 24 h。空白对照组细胞不做处理; LPS 模型组细胞加入 1 μg/mL 的 LPS 刺激 24 h。各给药组分别给不同浓度(40、20、10、5、2.5、1.25 μmol/L)的受试化合物预孵 1 h,然后加入 1 μg/mL 的 LPS 刺激 24 h。取 50 μL 细胞上清液,先后加入

50 μL Griess 试剂 A 及 Griess 试剂 B, 轻轻振荡数次, 待各孔反应液完全混匀后, 通过紫外分光光度计在 540 nm 测试吸收值按计算公式(1)计算 NO 抑制率(I)。以上实验均重复三次, 阳性对照药物是槲皮素。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 无色胶状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -58.1 (c 0.1, \text{MeOH})$; IR (KBr) ν_{max} 2 927、1 725、1 691、1 450、1 224 cm^{-1} ; HR-ESI-MS: m/z 389.159 0 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_7^+$, 389.159 5), 得知其分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$, 对应 10 个不饱和度。通过红外光谱 1 725 cm^{-1} 处的吸收确定其含有羰基片段。通过分析其 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) 发现该化合物有 2 个烯烃信号 [δ_{H} 7.14 (br s) 和 6.90 (t, $J = 3.5$ Hz)], 3 个连氧次甲基信号 [δ_{H} 5.82 (t, $J = 1.4$ Hz)、5.31 (dd, $J = 12.4, 4.4$ Hz) 和 4.57 (dd, $J = 10.6, 7.0$ Hz)], 1 个甲氧基 [δ_{H} 3.62 (s)] 以及 2 个单峰甲基信号 [δ_{H} 1.26 (s), 1.07 (s)]。通过分析其 ^1H NMR 以及 DEPT135 谱可知化合物 1 有 21 个碳信号的存在, 包含 3 个酯羰基、2 对三取代双键、3 个甲基(包括 1 个甲氧基)、4 个 sp^3 杂化的亚甲基、5 个 sp^3 杂化的次甲基(包括 3 个连氧次甲基)以及 2 个 sp^3 杂化的季

碳。通过分析化合物 1 的一维核磁数据(见表 1)可知其与本研究中分离得到的化合物 3 的 A/B/C/D 环的数据高度相似, 差别在于化合物 3 中 C-12 的呋喃环在 1 中变为了丁烯酸内酯。通过从 H-12 (δ_{H} 5.31) 到 C-13 (δ_{C} 137.4), C-14 (δ_{C} 143.3) 和 C-16 (δ_{C} 168.3) 以及从 H-15 (δ_{H} 5.82) 到 C-13 和 C-16 的 HMBC 证实了以上推论。此外, 从 H-15 到 δ_{C} 57.9 的 HMBC 相关揭示了 C-15 上连接了一个甲氧基基团。详细的二维核磁共振分析 (HSQC、HMBC 和 ^1H - ^1H COSY) 进一步确认了化合物 1 的平面结构(见图 1)。通过比对化合物 1 和化合物 3 的 A/B/C/D 环的一维核磁数据以及 NOESY 相关确定化合物 1 的 A/B/C/D 环上手性碳的相对构型与化合物 3 相同。化合物 1 的绝对构型是通过时间依赖的密度泛函理论 (TDDFT) 模拟其可能的绝对构型进行比对确定。通过其相对构型可以推测化合物 1 的绝对构型可能是 5*R*, 6*R*, 8*R*, 9*S*, 10*S*, 12*S* 或者 5*S*, 6*S*, 8*S*, 9*R*, 10*R*, 12*R*。化合物 1 的实测 ECD 图谱在 211 nm 显示负 Cotton 效应而在 256 nm 显示正 Cotton 效应, 这与 5*R*, 6*R*, 8*R*, 9*S*, 10*S*, 12*S*-1 构型的 Cotton 效应基本吻合(211 nm 显示负 Cotton 效应, 249 nm 显示正 Cotton 效应)(见图 2A)。因此, 化合物 1 的绝对构型被确定为 5*R*, 6*R*, 8*R*, 9*S*, 10*S*, 12*S*, 且被命名为 tinocapill A。

表 1 化合物 1 和 2 的氢谱 (600 MHz) 和碳谱 (150 MHz) 数据 (CDCl_3)

Table 1 ^1H NMR (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of compounds 1 and 2 (CDCl_3)

No.	1		2	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	2.13, m	17.7	2.01, m	17.5
	1.96, m	-	1.79, m	-
2	2.48, m	24.0	2.45, m	24.0
	2.40, m	-	2.40, m	-
3	6.90, t(3.5)	136.2	6.88, br s	136.2
4	-	133.0	-	132.7
5	-	38.8	-	39.0
6	4.57, dd(10.6, 7.0)	81.4	4.96, dd(10.3, 7.5)	81.2
7	2.81, m	26.6	2.60, m	26.3
	1.51, m	-	1.50, m	-
8	2.41, m	47.7	2.62, m	45.1
9	-	36.5	-	36.6
10	1.98, d(6.6)	37.5	1.62, d(6.2)	46.0
11	2.62, dd(14.8, 4.4)	39.1	2.36, dd(14.5, 3.4)	45.0
	1.55, dd(14.8, 12.4)	-	1.72, dd(14.5, 10.3)	-
12	5.31, dd(12.4, 4.4)	71.3	5.12, m	70.5

续表 1 (Continued Tab. 1)

No.	1		2	
	$\delta_{\text{H}} (J \text{ in Hz})$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}} (J \text{ in Hz})$	δ_{C}
13	—	137.4	—	136.1
14	7.14, br s	143.3	7.23, br s	144.1
15	5.82, t(1.4)	103.0	5.83, br s	103.1
16	—	168.3	—	168.4
17	—	170.0	—	172.3
18	—	169.2	—	169.3
19	1.26, s	30.0	1.20, s	29.7
20	1.07, s	24.1	1.25, s	24.4
15-OMe	3.62, s	57.9	3.64, s	57.9

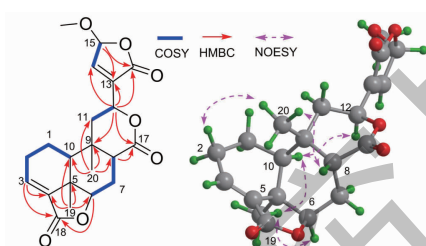


图 1 化合物 1 关键二维相关信号

Fig. 1 Key 2D correlations of 1

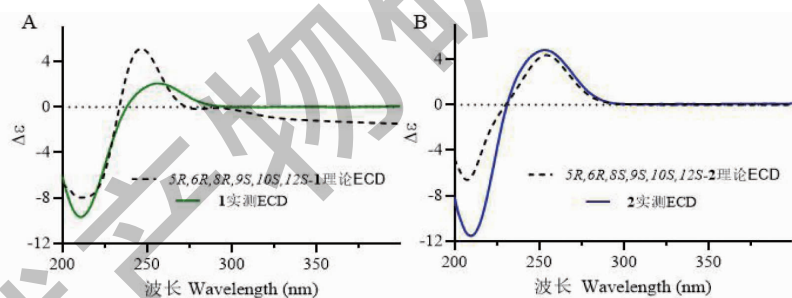


图 2 化合物圆二色谱图

Fig. 2 ECD spectra of the compounds

化合物 2 无色胶状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -11.0 (c 0.1, \text{MeOH})$; IR (KBr) ν_{max} 2 972, 2 929, 1 722, 1 692, 1 446, 1 247 cm^{-1} ; 通过 HR-ESI-MS: m/z 389.159 7; 计算值 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_7^+$, 389.159 5) 及碳谱数据 (见表 1) 确定其分子式与化合物 1 相同, 被认为是化合物 1 的同分异构体。化合物 2 的一维核磁数据和化合物 1 十分接近 (只在 C-8、C-10、C-11、C-12 位有较为明显差别), 通过二维核磁共振分析 (HSQC、HMBC 和 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY) 确定这两个化合物平面结构相同。通过分析 NOESY 相关信号可以看到化合物 2 中 H-6/H-8 以及 H-8/H-12 的相关 (见图 3), 说明 H-8 与

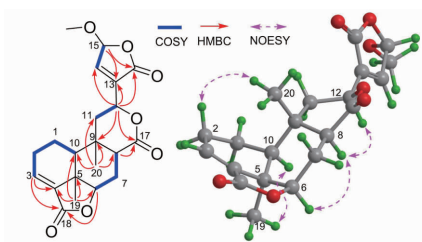


图 3 化合物 2 关键二维相关信号

Fig. 3 Key 2D correlations of 2

H-6 和 H-12 处于同侧即 α 朝向, 因此化合物 2 被定为化合物 1 的 8 位异构体。化合物 2 的绝对构型同

样通过 TDDFT 进行模拟,发现其与 5*R*,6*R*,8*S*,9*S*,10*S*,12*S*-2 构型的理论值具有相似 Cotton 效应(见图 2B)。化合物 **2** 被命名为 tinocapill B。化合物 **1** 和 **2** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载(www.trcw.ac.cn)。

化合物 3 无色块状晶体(甲醇),X-ray 射线单晶衍射晶体 Flack 参数为-0.1(3)(见图 4),熔点 175~177 °C, $[\alpha]_D^{25}$ (29.1(c 0.1, MeOH)),ESI-MS: m/z 343.1 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{20}H_{22}O_5$ 。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.41 (1H, br s, H-16), 7.36 (1H, m, H-15), 6.82 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-3), 6.38 (1H, br s, H-14), 5.46 (1H, dd, $J = 11.7, 4.5$ Hz, H-12), 4.51 (1H, dd, $J = 10.5, 7.0$ Hz, H-6), 2.70 (1H, ddd, $J = 13.8, 6.8, 3.4$ Hz, H-7b), 2.42 (1H, m, H-8), 2.36 (1H, m, H-2a), 2.30 (1H, dd, $J = 14.8, 4.5$ Hz, H-11a), 2.06 (2H, m, H-1), 1.99 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-10), 1.87 (1H, d, $J = 15.4, 7.7$ Hz, H-2b), 1.79 (1H, d, $J = 14.6, 11.8$ Hz, H-11b), 1.43 (1H, m, H-7a), 1.17 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 17.7 (C-1), 24.1 (C-2), 136.2 (C-3), 133.1 (C-4), 38.9 (C-5), 81.7 (C-6), 26.6 (C-7), 47.2 (C-8), 36.4 (C-9), 37.9 (C-10), 40.9 (C-11), 71.1 (C-12), 124.9 (C-13), 108.5 (C-14), 139.7 (C-15), 143.9 (C-16), 170.9 (C-17), 169.3 (C-18), 30.0 (C-19), 24.3 (C-20)。该化合物的波谱数据与文献^[8]报道的数据一致,故鉴定为 crispene A。

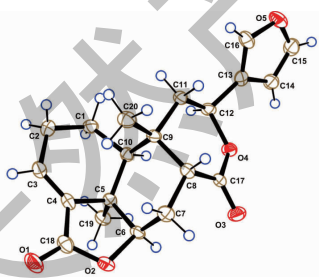


图 4 化合物 **3** 的单晶衍射图

Fig. 4 Drawing of X-ray single crystal diffraction of compound **3**

化合物 4 白色无定形粉末,ESI-MS: m/z 349.1 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{20}H_{28}O_5$ 。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.14 (1H, m, H-13), 6.76 (1H, t, $J = 3.8$ Hz, H-3), 4.78 (2H, q, $J = 1.9$ Hz, H-14), 3.75 (1H, dd, $J = 10.9, 3.7$ Hz, H-17a), 3.28 (1H,

dd, $J = 10.9, 8.3$ Hz, H-17b), 2.77 (1H, m, H-12a), 2.26 (3H, m, H-12b, H-11), 2.04 (1H, m, H-8), 1.84 (1H, dd, $J = 15.3, 8.8$ Hz, H-1a), 1.74 (2H, m, H-2), 1.59 (2H, m, H-5), 1.47 (1H, dd, $J = 6.3, 1.5$ Hz, H-10), 1.10 (3H, m, H-1b, H-6), 1.24 (3H, s, H-19), 0.80 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 19.4 (C-1), 24.4 (C-2), 144.3 (C-3), 137.7 (C-4), 39.9 (C-5), 36.3 (C-6), 23.5 (C-7), 46.0 (C-8), 36.2 (C-9), 45.4 (C-10), 35.8 (C-11), 19.5 (C-12), 134.8 (C-13), 141.6 (C-14), 70.5 (C-15), 174.9 (C-16), 63.9 (C-17), 172.3 (C-18), 33.1 (C-19), 16.6 (C-20)。该化合物的波谱数据与文献^[9]报道的数据一致,故鉴定为 floridolide B。

化合物 5 无色针状晶体(甲醇)。ESI-MS: m/z 359.1 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{20}H_{22}O_6$ 。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.48 (1H, dd, $J = 1.7, 0.9$ Hz, H-16), 7.43 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-15), 6.46 (1H, dd, $J = 7.9, 5.2$ Hz, H-3), 6.44 (1H, dd, $J = 1.7, 0.9$ Hz, H-14), 6.36 (1H, dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, H-2), 5.41 (1H, dd, $J = 11.9, 4.4$ Hz, H-12), 5.15 (1H, dd, $J = 5.3, 1.8$ Hz, H-1), 2.65 (1H, m, H-7a), 2.41 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-8), 2.26 (1H, dd, $J = 14.8, 4.3$ Hz, H-11a), 2.07 (1H, m, H-6a), 1.95 (1H, dd, $J = 14.4, 12.3$ Hz, H-11b), 1.75 (2H, m, H-6b, H-7b), 1.41 (1H, m, H-10), 1.25 (3H, s, H-19), 1.07 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 74.1 (C-1), 128.7 (C-2), 136.7 (C-3), 80.5 (C-4), 37.1 (C-5), 25.5 (C-6), 17.3 (C-7), 44.4 (C-8), 35.2 (C-9), 47.5 (C-10), 41.8 (C-11), 70.6 (C-12), 124.7 (C-13), 108.4 (C-14), 139.6 (C-15), 143.9 (C-16), 173.4 (C-17), 175.5 (C-18), 24.3 (C-19), 28.3 (C-20)。该化合物的波谱数据与文献^[10]报道的数据一致,故鉴定为古伦宾。

化合物 6 白色无定形粉末,ESI-MS: m/z 465.1 $[M+Cl]^-$,分子式为 $C_{23}H_{26}O_8$ 。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.47 (1H, dd, $J = 1.7, 1.0$ Hz, H-16), 7.43 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-15), 6.71 (1H, dd, $J = 2.5, 1.2$ Hz, H-3), 6.58 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-6), 6.54 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-7), 6.40 (1H, dd, $J = 1.7, 1.0$ Hz, H-14), 5.59 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, H-12), 4.55 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.1, 2.6$ Hz, H-2), 3.73 (3H, s, 18-OMe), 2.51 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-10), 2.30 (2H, m, H-11a/1a), 2.11 (3H, s, 8-OAc), 2.00 (2H, m, H-

1b/11b), 1.55 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 28.2 (C-1), 64.3 (C-2), 139.4 (C-3), 136.4 (C-4), 37.4 (C-5), 138.1 (C-6), 120.8 (C-7), 78.1 (C-8), 39.4 (C-9), 45.3 (C-10), 39.2 (C-11), 71.0 (C-12), 125.7 (C-13), 108.4 (C-14), 139.8 (C-15), 144.0 (C-16), 167.3 (C-17), 166.7 (C-18), 30.3 (C-19), 23.1 (C-20), 51.9 (18-OMe), 21.0, 168.7 (8-OAc)。该化合物的波谱数据与文献^[11]报道的数据一致,故鉴定为 tinosporol B。

化合物 7 无色胶状物, ESI-MS: m/z 377.1 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_7$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7.48 (1H, s, H-16), 7.42 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-15), 6.42 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-14), 5.67 (1H, dd, $J = 12.7, 4.7$ Hz, H-12), 5.02 (1H, dd, $J = 12.5, 4.1$ Hz, H-6), 4.00 (1H, m, H-3), 2.68 (1H, dd, $J = 13.1, 5.2$ Hz, H-8), 2.32 (2H, m, H-1a/11a), 2.16 (1H, q, $J = 12.6$ Hz, H-7a), 1.95 (1H, dd, $J = 15.4, 12.7$ Hz, H-11b), 1.89 (1H, dd, $J = 12.4, 5.3$ Hz, H-1b), 1.76 (1H, m, H-7b), 1.68 (1H, m, H-10), 1.19 (3H, s, H-19), 1.11 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 17.0 (C-1), 25.4 (C-2), 76.2 (C-3), 81.4 (C-4), 47.1 (C-5), 71.2 (C-6), 28.3 (C-7), 46.1 (C-8), 35.1 (C-9), 47.3 (C-10), 44.1 (C-11), 71.0 (C-12), 124.3 (C-13), 108.5 (C-14), 140.0 (C-15), 144.0 (C-16), 173.5 (C-17), 180.3 (C-18), 33.1 (C-19), 18.0 (C-20)。该化合物的波谱数据与文献^[12]报道的数据一致,故鉴定为 borapetol A。

化合物 1~7 的结构见图 5。

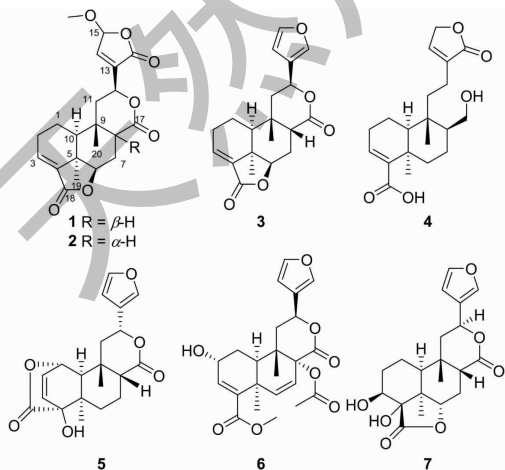


图 5 化合物 1~7 的结构

Fig. 5 Structures of compounds 1-7

2.2 抗炎活性测试

对从金果榄中分离出的七个二萜类化合物进行了筛选,以评估它们对 LPS 诱导的 BV2 细胞产生一氧化氮(NO)的抑制活性,槲皮素作为阳性对照药($\text{IC}_{50} = 8.3 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$)。我们首先通过 MTT 法确定化合物的细胞毒性,在化合物浓度为 $40 \mu\text{mol/L}$,未见明显的细胞毒活性。随后的 NO 抑制活性测试得知化合物 2 和 6 显示了与阳性对照药相似的活性, IC_{50} 分别为 9.6 ± 0.7 和 $5.8 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$,抑制曲线见图 6(横坐标 Log_{10}C , C 为浓度)。

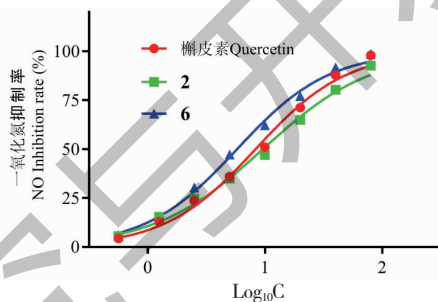


图 6 化合物 2、6 和槲皮素对 NO 的抑制率

Fig. 6 The inhibitory rate of 2, 6 and quercetin on NO

3 讨论与结论

金果榄作为一种传统中药和民族药,具有广大市场前景,加强对金果榄资源的开发及其药理药效、活性成分的深入研究显得尤为迫切。本研究通过对金果榄乙醇提取物乙酸乙酯萃取部分浸膏进行系统的分离,利用波谱学手段鉴定了 7 个克罗烷型二萜类化合物。本研究中鉴定出了两个全新的二萜化合物,拓展了对金果榄化学多样性的认识,表明其化学成分丰富性远未被完全发掘。这些新化合物可能拥有尚未知晓的独特生物活性,值得进一步深入探究其化学结构和生物活性。在体外活性筛选中,发现某些化合物展现出显著的抗炎潜力,这一发现暗示这类二萜成分很可能是金果榄发挥其抗炎功效的关键药效物质。这些发现不仅为金果榄的二萜类化学成分增添了新的篇章,而且为金果榄在临床治疗中的应用提供了初步的科学支撑,为未来的研究工作奠定了坚实的研究基础。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I(中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing, China Medical Science Press, 2020: 227.

- 2 Zhou XX, Shu S, Wang CH, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of *Tinosporae Radix* and other medicinal plants in the same genus [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2023, 25: 1135-1146.
- 3 Lu JL, Wu QH, Zhou YF, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Tinosporae Radix* and predictive analysis on quality marker [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53: 6245-6257.
- 4 Wang JJ, Yang RW, Xie YY, et al. Advances in chemical constituents and pharmacological action of *Tinosporae Radix* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2023, 29: 273-282.
- 5 Shi QR. Studies on bio-active constituents of four medicinal plants [D]. Shanghai: The Second Military Medical University (上海: 第二军医大学), 2008.
- 6 Li RT, Morris-Natschke SL, Lee KH. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 1166-1226.
- 7 Li XJ, Jin GY, Zhang XD, et al. Study on chemical constituents and their anti-inflammatory activity from ethyl acetate extract of fruits of *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 427-434.
- 8 Hossen F, Ahasan R, Haque MR, et al. Crispene A, B, C and D, four new clerodane type furanoid diterpenes from *Tinospora crispa* (L.) [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12: S37-S41.
- 9 Billet D, Durgeat M, Heitz S, et al. Diterpenes of *Evodia floribunda* Baker. III [J]. *J Chem Res*, 1978, 3: 110-111.
- 10 Huang C, Li W, Ma FH, et al. Tinospinosides D, E, and tinosin E, further clerodane diterpenoids from *Tinospora sagittata* [J]. *Chem Pharm Bul*, 2012, 60: 1324-1328.
- 11 Gao Y, Niu Y, Wang F, et al. Clerodane diterpenoids with anti-hyperglycemic activity from *Tinospora crispa* [J]. *Nat Prod Biopros*, 2016, 6: 247-255.
- 12 Fukuda N, Yonemitsu M, Kimura T, et al. Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. II. New diterpenoids, borapetoside A and borapetol A [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33: 4438-4444.

(上接第 1697 页)

- 23 Zhu D, Tian X, Yin X, et al. Oridonin triggers G2/M cell cycle arrest, cellular apoptosis and autophagy in human gastric cancer cells [J]. *J Buon*, 2020, 25: 2308-2314.
- 24 Ren D, Ghoorun RA, Wu X, et al. Oridonin induces apoptosis in HGC-27 cells by activating the JNK signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19: 255-260.
- 25 Xu L H, Bi Y L, Xu Y Z, et al. Oridonin inhibits the migration and epithelial-to-mesenchymal transition of small cell lung cancer cells by suppressing FAK-ERK1/2 signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24: 4480-4493.
- 26 Li Y, Wang Y, Wang S, et al. Oridonin phosphate induced autophagy effectively enhances cell apoptosis of human breast cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2015, 32: 365.
- 27 Zeng R, Chen Y, Zhao S, et al. Autophagy counteracts apoptosis in human multiple myeloma cells exposed to oridonin *in vitro* via regulating intracellular ROS and SIRT1 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33: 91-100.