

独活中的两个新倍半萜化合物及其抗炎活性研究

李明^{1,2}, 温建辉^{1,2}, 倪付勇^{1,2}, 谢雪^{1,2}, 吴云^{1,2}, 王振中^{1,2}, 肖伟^{1,2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

摘要: 采用 Diaion HP-20 大孔吸附树脂、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、硅胶柱色谱、制备液相色谱等分离方法对独活 (*Radix Angelicae Pubescentis*) 醇提组分进行分离纯化, 并采用高分辨质谱、1D 和 2D 核磁共振谱等波谱技术进行化合物结构鉴定。结果从独活醇提组分中分离得到两个新倍半萜类化合物 Angesesquid A (**1**) 和 Angesesquid B (**2**)。采用原代大鼠椎间盘软骨细胞体外炎症模型对化合物进行体外抗炎活性评价, 结果发现, 化合物 **1** 和 **2** 对该体外炎症模型细胞的增殖均无明显影响, 它们都能明显抑制原代大鼠椎间盘软骨细胞体外炎症模型细胞中 NO 的释放, 但对 PGE₂ 的释放无明显抑制作用。这说明化合物 **1** 和 **2** 一定程度上都能抑制炎症反应的发生。

关键词: 独活; 化学成分; 结构鉴定; 抗炎活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)02-0343-05

Anti-inflammatory activity of two new sesquiterpenoids from *Radix Angelicae Pubescentis*

LI Ming^{1,2}, WEN Jian-hui^{1,2}, NI Fu-yong^{1,2}, XIE Xue^{1,2}, WU Yun^{1,2},
WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

Abstract: Chemical constituents from the ethanol extract of *Radix Angelicae Pubescentis* was isolated and purified through Diaion HP-20 macroporous, silica gel column chromatography, gel filtration over Sephadex LH-20 and preparative HPLC. Two new sesquiterpenoid derivatives were identified as angesesquid A (**1**) and angesesquid B (**2**), and their structures were determined. *In vitro* degeneration model of primary rat disc chondrocytes was used to evaluate the anti-inflammatory activity of these two compounds. The results showed that compounds **1** and **2** had no anti-proliferation effect. Both compounds inhibited the release of NO, but had no inhibitory activity for the release of PGE₂. This finding implies that both of these two new sesquiterpenoids could moderately inhibit the inflammatory reaction to some extent.

Key words: *Radix Angelicae Pubescentis*; chemical constituent; structure determination; anti-inflammatory activity

独活为伞形科植物重齿毛当归 (*Angelica pubescens* Maxim. *F. biserrata* Shan et Yuan) 的干燥根^[1], 其主要含有香豆素类、挥发油类, 以及少量甾醇和糖类等

化学成分^[2]。独活中的挥发油类成分主要为单萜和倍半萜及其衍生物^[3], 香豆素类成分主要包括甲氧基欧芹素、香柑内酯、花椒毒素、伞形花内酯、佛手酚、欧芹烯酚、欧芹酚甲醚、二氢欧山芹醇、二氢欧山芹素、二氢欧山芹醇乙酸酯、异欧前胡素、补骨脂素等^[4]。研究显示, 独活具有抗炎镇痛^[5-7]、抗老年痴呆^[8]、抗胃溃疡、抑菌、抗肿瘤和抗氧化等作用^[2]。

收稿日期: 2018-10-24; 修回日期: 2018-11-22.

基金项目: 国家重大新药创制科技专项-腰痹通胶囊欧盟注册申请及 II 期临床试验研究 (2018ZX09737016).

*通讯作者 Tel: 15062965253, E-mail: 15705279062@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0960

为进一步明确中药材独活的物质基础,为制定科学合理的质量控制方法提供依据,并为其作用机制研究奠定良好基础,本论文对独活醇提组分的化学成分进行了研究。采用 Diaion HP-20 大孔吸附树脂、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、硅胶柱色谱和制备液相色谱等方法对独活醇提组分的化学成分进行分离纯化,结果分离得到两个新倍半萜类化合物 angesesquid A (**1**) 和 angesesquid B (**2**)。进一步研究发现,化合物 **1** 和 **2** 都能明显抑制原代大鼠椎间盘软骨细胞中 NO 的释放,但对 PGE₂ 的抑制作用不明显,这说明它们一定程度上都能抑制炎症反应的发生。

结果与讨论

1 结构鉴定

Angesesquid A (**1**, 图 1) 为白色无定形粉末, HR-ESI-MS: m/z 为 305.136 8 [M+Na]⁺ (理论计算值为 305.136 5), 说明其相对分子质量为 282, 化合物分子式为 C₁₅H₂₂O₅, 不饱和度为 5。其 ¹H NMR 谱显示 4 个甲基质子信号, 包括两个偕甲基 δ_H 1.17 (3H, s, H-11) 和 δ_H 1.26 (3H, s, H-12), 1 个与烯碳相连的甲基 δ_H 1.96 (3H, s, H-14), 1 个甲基单峰 δ_H 1.35 (3H, s, H-13); 同时, 还有两个连氧的次甲基质子信号 δ_H 3.85 (1H, dd, $J = 7.1$ Hz, 6.1 Hz, H-9) 和 δ_H 4.62 (1H, m, H-7), 一个烯质子信号 δ_H 5.90 (1H, s, H-5)。¹³C NMR 谱和 DEPT 谱显示 15 个碳信号, 包括 1 个羰基碳 δ_C 198.4 (C-4), 一对双键碳 δ_C 126.2 (C-5) 和 δ_C 161.5 (C-6), 1 个季碳 δ_C 115.2 (C-2), 两个偕氧的季碳 δ_C 84.4 (C-8) 和 δ_C 81.6 (C-3), 两个连氧的次甲基碳 δ_C 76.5 (C-9) 和 δ_C 73.2 (C-7a), 1 个次甲基碳 δ_C 53.4 (C-3a), 2 个亚甲基碳 δ_C 37.0

(C-10) 和 δ_C 36.2 (C-7), 4 个甲基碳 δ_C 26.2 (C-11)、δ_C 23.2 (C-14)、δ_C 21.4 (C-12) 和 δ_C 20.0 (C-13)。综合上述质谱、¹H 和 ¹³C NMR 谱, 可推测化合物 **1** 为一个倍半萜化合物, 其结构中存在 3 个环。

化合物 **1** 的 ¹H-¹H COSY 谱中 (图 2), 可观察到烯质子 δ_H 5.90 (1H, s, H-5) 与 δ_H 1.96 (3H, s, H-14)、δ_H 2.65 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-7) 的相关, δ_H 2.65 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-7) 与 δ_H 4.62 (1H, m, H-7a) 的相关, δ_H 4.62 (1H, m, H-7a) 与 δ_H 2.81 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3a) 的相关, δ_H 3.85 (1H, dd, $J = 7.1, 6.1$ Hz, H-9) 与 δ_H 2.57 (1H, dd, $J = 14.4, 7.3$ Hz, H-10)、δ_H 2.03 (1H, dd, $J = 14.4, 6.0$ Hz, H-10) 的相关。化合物 **1** 的 HMBC 谱中 (图 2), 烯质子 δ_H 5.90 (1H, s, H-5) 与 δ_C 53.4 (C-3a)、δ_C 23.2 (C-14)、δ_C 36.2 (C-7) 相关, δ_H 2.82 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3a) 与 δ_C 198.4 (C-4)、δ_C 73.2 (C-7a)、δ_C 36.2 (C-7) 的碳相关, 表明结构中存在 1 个取代的环己烯酮片段。δ_H 1.96 (3H, s, H-14) 与 δ_C 161.5 (C-6)、δ_C 126.2 (C-5) 和 δ_C 36.2 (C-7) 的 HMBC 相关也证明 C-6 位被甲基取代。此外, δ_H 1.35 (3H, s, H-13) 与 δ_C 53.4 (C-3a)、δ_C 81.6 (C-3)、δ_C 115.2 (C-2) 相关, δ_H 2.03 (1H, dd, $J = 14.3, 5.9$ Hz, H-10a) 与 δ_C 115.2 (C-2)、δ_C 84.4 (C-8)、δ_C 76.5 (C-9) 相关, δ_H 3.85 (1H, dd, $J = 7.1, 6.1$ Hz, H-9) 与 δ_C 115.2 (C-2)、δ_C 26.2 (C-11) 相关, 证明了侧链的存在, 且环己烯酮的 δ_C 53.4 (C-3a) 与侧链的 δ_C 81.6 (C-3) 相连。综合以上信息, δ_C 84.4 (C-8) 的季碳只有与 δ_C 115.2 (C-2) 的季碳通过氧相连并成环才合理, 同样的, δ_C 73.2 (C-7a) 的次甲基碳只有与 δ_C 115.2 (C-2) 的季碳通过氧相连并成环才合理, 该化合物的平面结构确定。化合物 **1** 的 NOESY 谱 (图 3), H-3a/H-7a、

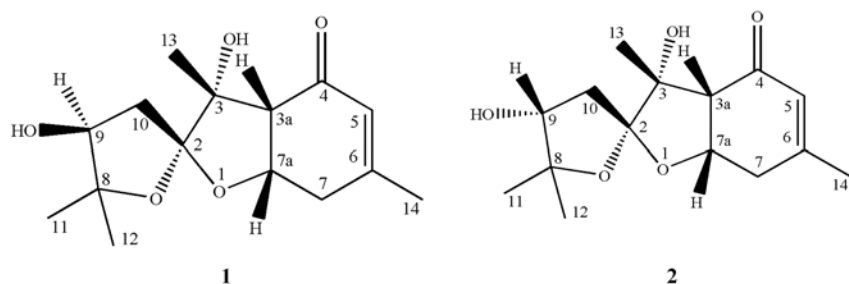


Figure 1 Structures of compounds **1** and **2**

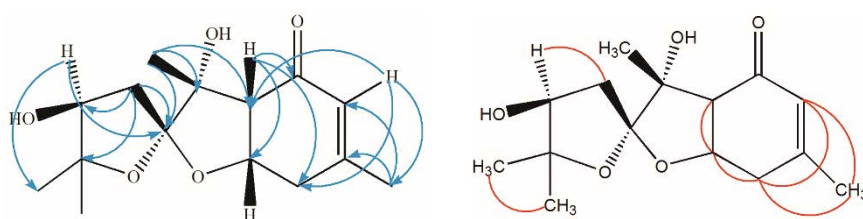


Figure 2 Key HMBC (—) and ¹H-¹H COSY (—) correlations of compound **1**

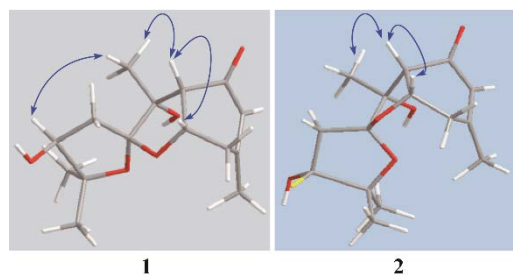


Figure 3 Key NOESY () correlations of compound **1** and **2**

H-3a/H-13的Noe相关证明H-3a、H-7a和H-13在同侧，H-9/H-13相关证明H-9和H-13在同侧。由此化合物**1**的相对构型被确定(图1)。该化合物的结构未见文献报道，其碳和氢信号归属列于表1。

Angesesquid B (**2**, 图1)为白色无定形粉末，HR-ESI-MS: m/z 为305.136 8 $[M+Na]^+$ (理论计算值为305.136 5)，说明其相对分子质量为282，化合物分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$ ，不饱和度为5。化合物**2**的 ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)和DEPT与化合物**1**相似，具有15个碳信号，其中1个羰基碳信号 δ_C 198.3 (C-4)，一对双键碳 δ_C 126.2 (C-5)、 δ_C 161.4 (C-6)，1个季碳 δ_C 114.7 (C-2)，两个偕氧的季碳信号 δ_C 84.1 (C-8)、 δ_C 81.8 (C-3)，两个连氧的次甲基碳信号 δ_C 76.2 (C-9)、 δ_C 73.0 (C-7a)，1个次甲基碳 δ_C 53.7 (C-3a)，2个亚甲基碳 δ_C 38.1 (C-10)、 δ_C 36.2 (C-7)，4个甲基碳 δ_C 27.3 (C-11)、 δ_C 23.2 (C-14)、

δ_C 21.4 (C-12)、 δ_{C-13} 20.0 (C-13)。化合物**2**的 1H NMR (400 MHz, CD_3OD)与化合物**1**相似，具有4个甲基质子信号：两个偕甲基 δ_H 1.11 (3H, s, H-11)、 δ_H 1.28 (3H, s, H-12)，1个连在烯碳上的甲基 δ_H 1.96 (3H, s, H-14)，1个单峰甲基 δ_H 1.40 (3H, s, H-13)；1个烯质子信号 δ_H 5.90 (1H, s, H-5)；1个连氧的次甲基质子信号 δ_H 4.62 (1H, m, H-7a)；化合物**2**的1个连氧的次甲基质子信号 δ_H 4.17 (1H, dd, $J = 7.8, 7.0$ Hz, H-9)与化合物**1**的一个连氧的次甲基质子信号 δ_H 3.85 (1H, dd, $J = 7.1, 6.1$ Hz, H-9)不同，可能是相对构型不同。 1H - 1H COSY和HMBC谱(图4)表明其平面结构和化合物**1**相同，其全部的碳和氢信号归属见表1。NOESY谱中(图3)，化合物**1**能明显看到H-9/H-13的相关，而化合物**2**无此相关，证明化合物**2**的9-OH构型与化合物**1**相反。化合物**2**的相对构型被确定(图1)。其结构也未见文献报道，碳和氢信号归属列于表1。

2 化合物的抗炎活性

采用原代大鼠椎间盘软骨细胞体外炎症模型对化合物进行抗炎活性评价。结果显示，化合物**1**和**2**对该体外炎症模型细胞的增殖均无明显影响(表2)，它们都能明显抑制NO的释放(表3)，但对 PGE_2 的释放无明显抑制作用。上述结果说明化合物**1**和**2**能一定程度上抑制炎症反应的发生。

Table 1 1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data of compounds **1** and **2** (CD_3OD , δ in ppm, J in Hz)

Position	1		2	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	115.2		114.7	
3	81.6		81.8	
3a	53.4	2.81 (1H, d, $J = 9.2$)	53.7	2.81 (1H, d, $J = 9.2$)
4	198.4		198.3	
5	126.2	5.90 (1H, s)	126.2	5.90 (1H, s)
6	161.5		161.4	
7	36.2	2.65 (2H, t, $J = 7.6$)	36.2	2.63 (2H, t, $J = 7.3$)
7a	73.2	4.62 (1H, m)	73.0	4.61 (1H, m)
8	84.4		84.1	
9	76.5	3.85 (1H, dd, $J = 7.1, 6.1$)	76.2	4.17 (1H, dd, $J = 7.8, 7.0$)
10	37.0	2.57 (1H, dd, $J = 14.3, 7.3$)	38.1	2.27 (1H, dd, $J = 13.6, 6.7$)
		2.03 (1H, dd, $J = 14.4, 6.0$)		2.15 (1H, dd, $J = 13.6, 8.1$)
11	26.2	1.17 (3H, s)	27.3	1.11 (3H, s)
12	21.4	1.26 (3H, s)	21.5	1.28 (3H, s)
13	20.0	1.35 (3H, s)	19.9	1.40 (3H, s)
14	23.3	1.96 (3H, s)	23.2	1.96 (3H, s)

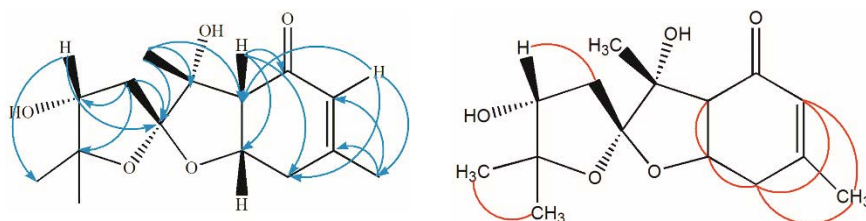


Figure 4 Key HMBC () and 1H - 1H COSY () correlations of compound **2**

Table 2 Effects of compounds on the growth of primary rat intervertebral disc chondrocytes

Compd.	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cell viability/%
1	50	80.7 ± 0.022
	25	79.8 ± 0.020
	12.5	80.1 ± 0.040
2	50	103.96 ± 3.19
	25	90.25 ± 2.88
	12.5	101.14 ± 2.30

Table 3 Effects of compounds on production of NO and PGE₂ in IL-1 β -stimulated cells. *** $P < 0.001$ vs model; ### $P < 0.001$ vs control

No.	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	PGE ₂ / $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$
Control	–	5.125 ± 0.151	6.621 ± 0.342
Model (IL-1 β)	–	8.801 ± 0.345###	8.544 ± 0.357
1	12.5	6.692 ± 0.124***	8.530 ± 0.35
	50	2.354 ± 0.192***	7.403 ± 0.296
2	12.5	6.051 ± 0.693***	7.884 ± 0.489
	50	4.185 ± 0.681***	7.342 ± 0.261

实验部分

Waters Snapt G2 质谱仪; Bruker AV-300/400 超导核磁共振波谱仪; Agilent 1260 分析型高效液相色谱仪和 Agilent 1260 制备型高效液相色谱仪; Agilent RRHD SB-C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 色谱柱和 Ultimate XB-C18 (250 mm×21.2 mm, 5 μm), 上海月旭科技股份有限公司; 超净工作台 (SW-CJ-2F, 苏州安泰空气技术有限公司, 中国); 二氧化碳培养箱 (Thermo scientific 3100, Thermo Fisher Scientific, 美国); 倒置显微镜 (CKX41SF, OLYPUS, 日本); 酶标仪 (Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, 美国); 立式压力蒸气灭菌锅 (BXM-30R, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂, 中国); 离心机 (LD4-2A, 北京众益中和生物技术有限公司, 中国); 细胞自动计数仪 (CI028, Invitrogen, 美国); 移液枪 (Eppendorf, 德国); 96 孔细胞培养板、细胞培养瓶购自美国 Costar 公司; Diaion HP-20 大孔吸附树脂购自日本三菱; 柱色谱硅胶 (200~300 目) 购自于青岛海洋化工公司; 薄层色谱硅胶预制板购自青岛海洋化工公司; Sephadex LH-20 柱色谱填料购自瑞典 Pharmacia 公司; 色谱纯乙腈、甲醇购自于瑞典 Oceanpak 公司; 食用级 95% 乙醇购自连云港长和酒业有限公司; 氘代试剂购自美国 CIL 公司; DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素及链霉素均购自于美国 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 购自于美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒购自于上海贝博生物公司; NO、PGE₂ 检测试剂盒购自于碧云天生物技术研究所; SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 体重 260~300 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公

司提供, 许可证号: SCXK (沪) 2008-0016, 动物饲养于屏障环境中, 12/12 h 明暗交替, 温度 22~25 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~60%, 动物自由进食饮水, 适应 7 天后开始实验。

中药材购自安徽亳州药材市场 (产地甘肃, 批号 20170911), 由连云港康济大药房连锁有限公司吴舟执业药师鉴定为独活 (*Radix Angelicae Pubescentis*)。药材留样 (编号: 独活 20170911) 现保存江苏康缘药业股份有限公司现代中药研究院中药组分库。

1 提取与分离

独活药材 10 kg 经 300 L、75% 乙醇提取 2 次, 合并 2 次提取液, 70 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩得 350 g 醇提浸膏。醇提浸膏经硅胶柱色谱分离、梯度洗脱 [二氯甲烷-甲醇 (100:0; 100:1; 100:2; 100:4; 100:10; 100:50; 100:100; 0:100, v/v)] 得到 8 个组分 (Fr.1~Fr.8)。其中组分 Fr.5 经 Saphadex LH-20 柱色谱, 甲醇洗脱得到 18 个组分 (Fr.5-1~Fr.5-18), 其中 Fr.5-(6~7), 经制备液相色谱等度洗脱 [乙腈-水 (35:65, v/v)] 得到的 4 个组分 [Fr.5-(6~7)-1~Fr.5-(6~7)-4], 其中 Fr.5-(6~7)-3 再经制备液相色谱等度洗脱 [乙腈-水 (30:70, v/v)] 得到化合物 1 (15 mg, $t_{\text{R}} = 35$ min), 其中 Fr.5-(6~7)-4 再经制备液相色谱等度洗脱 [乙腈-水 (30:70, v/v)] 得到化合物 2 (18 mg, $t_{\text{R}} = 40$ min)。

2 CCK-8 法检测细胞增殖^[9]

取对数生长期的原代大鼠椎间盘软骨细胞, 用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化约 2 min 后, 弃胰酶, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基中和胰酶作用, 轻轻吹打使成单细胞悬液, 离心弃上清, 用完全培养基重悬细胞并计数, 调整细胞悬液至每毫升 1×10^5 个细胞, 按每孔 200 μL 接种至 96 孔培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h, 吸弃上清, 每孔加入 100 μL 无血清 DMEM 培养基饥饿 24 h 使其同步化, 吸弃上清, 按实验需要分为对照组、化合物组, 并给予相应药物, 继续培养 24 h, 提前 4 h 每孔加入 10 μL CCK-8, 4 h 后于酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度值 (A_{450})。实验重复 3 次, 每组设 3 个复孔。

3 Griess 法测定细胞上清中 NO^[10]

取对数生长期细胞以每毫升 1×10^5 个细胞的浓度接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h。吸弃上清, 每孔加入 100 μL 无血清 DMEM 培养基饥饿 24 h 使其同步化, 吸弃上清后, 对照组给予无血清培养基 100 μL , 模型组给予用无血清培养基配制的 IL-1 β 100 μL (终质量浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 化合物组给予含 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-1 β (终质量浓度) 无血清培养基配制的药液 100 μL (终浓度为 50

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养24 h。取上清50 μL , 检测炎症因子NO。对炎症因子NO有明显抑制作用的化合物将进一步检测炎症因子PGE₂。实验重复3次, 每组实验设3个复孔。

4 统计分析方法

采用SPSS 19.0 统计软件进行分析, 实验结果以 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用LSD 检验。 $P<0.05$ 为差异有显著性, $P<0.01$ 为差异有非常显著性, $P<0.001$ 为差异有极显著性。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典·一部) [M]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 263-264.
- [2] Li ZY, Zhang HP. Aldose reductase and inflammatory diseases [J]. China Mod Med (中国当代医药), 2012, 5: 17-18.
- [3] Lin L, Qian XP, Liu BR, et al. Research progress on the chemical constituents and the anti-tumor activity of *Angelica pubescens* [J]. J Mod Oncol (现代肿瘤医学), 2011, 19: 373-376.
- [4] Ding XF, Feng X, Dong YF, et al. Studies on chemical constituents of the roots of *Angelica pubescens* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2008, 31: 516-518.
- [5] Qiu JB, Xu Q, Jiang XH. Effects of ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* on cyclooxygenase [J]. China Med Her (中国医药导报), 2011, 32: 42-43.
- [6] Fan L, Li L, He HF, et al. Pharmacological studies on anti-inflammatory and analgesic effects of *Radix Angelicae Pubescentis*'s volatile oil [J]. Anhui Med Pharm J (安徽医药), 2009, 13: 133-134.
- [7] Wang AW, Liu Y, Luo Q, et al. Study on pharmacodynamics of analgesia and anti-inflammation of *Duhuo-Jisheng Tang* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 61-64.
- [8] Du JG, Gao SS, Wang C, et al. *Duhuo*'s effect on the positioning navigation ethology of the AD model rat [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2009, 36: 144-145.
- [9] Liu YQ, Zhong KH, Wang YL, et al. Comparison of experimental conditions of CCK-8 and MTS for human amniotic epithelial cells proliferation assay [J]. Chin J Rehabil Theory Pract (中国康复理论与实践), 2012, 18: 827-830.
- [10] Pan SY, Pan XW, Wang SP. The relationship between the protection of ginsenoside for spinal cell and nitric oxide [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 28: 851-853.