

## 维药格蓬脂中三萜类化学成分研究及其抗胆碱酯酶活性评价

王书云<sup>1,2,3</sup>, 孙富周<sup>3</sup>, 孙义凡<sup>4</sup>, 黄健<sup>2,3</sup>, 王金辉<sup>2,3\*</sup>, 杨宝峰<sup>2</sup>

(1. 河南大学药学院, 河南 开封 475004; 2. 哈尔滨医科大学药化教研室, 省部共建生物医药工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081; 3. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 4. 深圳弘汇生物医药有限公司, 广东 深圳 518118)

**摘要:** 采用反复硅胶柱色谱、开放 ODS 柱色谱、重结晶和半制备型 HPLC 等方法, 从维药格蓬脂的甲醇超声提取物中共分离得到 8 个三萜类化合物。根据波谱数据及理化性质鉴定了化合物的结构, 分别为:  $3\beta, 19\alpha, 21\alpha$ -三羟基-12-烯-28-油酸 (**1**)、苏门树脂脑酸 (**2**)、 $3\beta, 19\alpha$ -二羟基-12-烯-28-油酸 (**3**)、齐墩果酸 (**4**)、 $3\beta, 6\beta, 19\alpha$ -三羟基-12-烯-28-油酸 (**5**)、 $19\alpha$ -羟基齐墩果酮酸 (**6**)、 $6\alpha$ -羟基齐墩果酮酸 (**7**) 和  $3\alpha, 6\alpha$ -二羟基-11 $R, 12R$ -环氧齐墩果烷-28, 13 $\alpha$ -内酯 (**8**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2**~**8** 首次从该科植物中分离得到。运用改进 Ellman 法对化合物 **1**~**8** 进行胆碱酯酶抑制活性筛选, 化合物 **1** 表现出较强的丁酰胆碱酯酶抑制活性, 进一步对其进行了分子对接研究, 提示 Trp82、His438、Phe329 及 Ala328 四个氨基酸残基是化合物 **1** 与丁酰胆碱酯酶结合的关键位点。

**关键词:** 格蓬脂; 三萜; 胆碱酯酶抑制活性; 分子对接

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)02-0283-06

## Triterpenoids from Galbanum of uygur medicine and their anticholinesterase activities

WANG Shu-yun<sup>1,2,3</sup>, SUN Fu-zhou<sup>3</sup>, SUN Yi-fan<sup>4</sup>, HUANG Jian<sup>2,3</sup>, WANG Jin-hui<sup>2,3\*</sup>, YANG Bao-feng<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Department of Medicinal Chemistry and Natural Medicine Chemistry (State-Province Key Laboratories of Biomedicine-Pharmaceutics of China), Harbin Medical University, Harbin 150081, China; 3. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 4. Shenzhen Honghui Biopharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518118, China)

**Abstract:** Eight triterpenes were isolated from the methanol extract of Galbanum by various chromatographic methods including silica gel, ODS opening column, recrystallization and semi-preparative HPLC. Their structures were determined by spectroscopic methods and physicochemical properties as  $3\beta, 19\alpha, 21\alpha$ -trihydroxyl-12-en-28-oic acid (**1**), sumaresinolic acid (**2**),  $3\beta, 19\alpha$ -dihydroxyl-12-en-28-oic acid (**3**), oleanolic acid (**4**),  $3\beta, 6\beta, 19\alpha$ -trihydroxyl-12-en-28-oic acid (**5**),  $19\alpha$ -hydroxy oleanonic acid (**6**),  $6\alpha$ -hydroxy oleanonic acid (**7**), and (11 $R, 12R$ )- $3\alpha, 6\alpha$ -dihydroxy-epoxyolean-28 $\alpha, 13\alpha$ -olide (**8**). Among them, compound **1** is a new compound, while compounds **2**–**8** were newly isolated from the Apiaceae family. The ability of compounds **1**–**8** to inhibit cholinesterase was determined with an improved Ellman method. Compound **1** showed strong inhibitory activity against butyrylcholinesterase. The molecular docking results indicated that Trp82, His438, Phe329 and Ala328 played an important role in the binding of compound **1** to butyrylcholinesterase.

**Key words:** Galbanum; triterpenes; cholinesterase inhibition activities; molecular docking

收稿日期: 2019-06-18; 修回日期: 2019-11-11.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2018ZX09305005).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-451-86685745, E-mail: wangjinhui@hrbmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0484

伞形科 (Apiaceae) 阿魏属 (*Ferula*) 植物全世界有 150 余种, 主要分布于中亚地区, 我国有 26 种和 1 变种, 主要分布于新疆<sup>[1]</sup>。阿魏属植物广泛应用于药品、食品、化妆品等行业, 文献<sup>[2-5]</sup>报道阿魏属植物中化学

成分主要有倍半萜类、香豆素类、倍半萜香豆素类、三萜类、木脂素类、挥发油类等。

格蓬脂为伞形科植物格蓬阿魏 (*Ferula galbaniflua* Boissier et Bubse) 的乳状胶脂, 维吾尔药名为加吾西尔, 产于伊朗、土耳其等地, 具有祛寒散风、利尿退肿、补胃除胀、止咳平喘、通经止痛等功效, 主治湿寒性或黏液质性疾, 如瘫痪、癫痫、肠梗阻、尿闭水肿、胃虚腹胀、咳嗽哮喘、闭经痛经等<sup>[6]</sup>。目前国内外对其化学成分及药理活性的研究欠缺, 为揭示格蓬脂的药效物质基础, 丰富格蓬脂的化学成分研究, 本文对格蓬脂中的化学成分进行系统研究, 从中分离得到8个三萜类化合物(图1), 其中化合物**1**为新化合物, 其他7个化合物为首次从该科中分离得到。运用改进 Ellman 法对化合物**1**~**8**进行胆碱酯酶抑制活性筛选, 化合物**1**表现出较强的胆碱酯酶抑制活性, 提示 Trp82、His438、Phe329 及 Ala328 等4个氨基酸残基是化合物**1**与丁酰胆碱酯酶结合的关键位点。

## 结果与讨论

### 1 新化合物结构解析

化合物**1**为白色羽状结晶(甲醇), 易溶于二氯甲烷、甲醇、乙腈等有机溶剂, 10% 硫酸-香草醛显色剂显紫红色。HR-ESI-MS给出  $m/z$  489.361 2  $[M+H]^+$  (Calcd. 489.361 0,  $C_{30}H_{49}O_5^+$ ), 计算化合物的分子式为:  $C_{30}H_{48}O_5$ , 不饱和度为7。IR谱中, 3 409、1 709、1 630  $cm^{-1}$ 吸收带显示其含有羟基、羧基和双键。

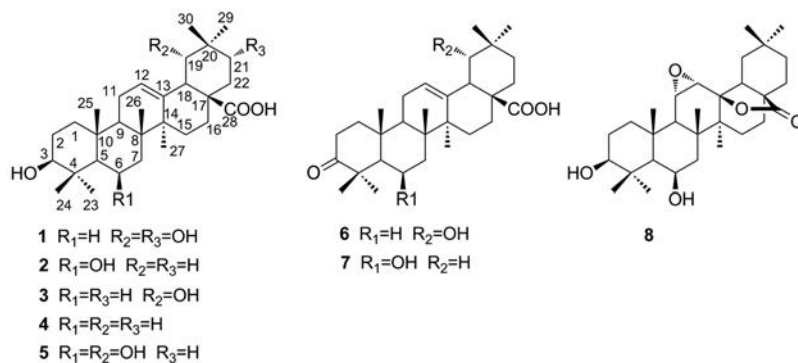
$^1H$  NMR (400 MHz,  $C_5D_5N$ ) 谱中(表1)给出7个角甲基质子信号:  $\delta_H$  0.96 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.11 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.26 (3H, s), 1.54 (3H, s), 1.67 (3H, s);  $\delta_H$  3.47 (1H, dd,  $J = 11.3, 4.9$  Hz), 3.87 (1H, dd,  $J = 6.6, 2.9$  Hz), 4.03 (1H, br s) 为3个连氧次甲基上的氢质子信号,  $\delta_H$  5.64 (1H, m) 为1个双键上的氢质子信号。

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $C_5D_5N$ ) 给出30个碳信号, 其中包括: 1个羰基碳信号 ( $\delta_C$  181.0), 2个环内双键碳信

**Table 1** The  $^1H$  (400 MHz) and  $^{13}C$  (100 MHz) NMR data for compound **1** in  $C_5D_5N$

No.	$\delta_H$ , Mult. ( $J$ in Hz)	$\delta_{C, type}$
1	1.58 m, 1.03 m	39.3, CH <sub>2</sub>
2	1.85 m	28.6, CH <sub>2</sub>
3	3.47 dd, (11.3, 4.9)	78.6, CH
4	–	39.9, C
5	0.92 dd, (12.8, 5.7)	56.4, CH
6	1.61 m, 1.44 m	19.4, CH <sub>2</sub>
7	1.59 m, 1.41 m	34.1, CH <sub>2</sub>
8	–	40.4, C
9	1.90 m	48.8, CH
10	–	38.1, C
11	1.91 m, 2.06 m	24.6, CH <sub>2</sub>
12	5.64 m	124.3, CH
13	–	144.8, C
14	–	42.8, C
15	2.11 td, (3.9, 3.0), 1.32 m	29.6, CH <sub>2</sub>
16	2.96 td, (13.5, 3.1), 2.52 m	31.7, CH <sub>2</sub>
17	–	46.6, C
18	3.82 br s	44.7, CH
19	3.87 dd, (6.6, 2.9)	84.8, CH
20	–	39.9, C
21	4.03 br s	75.8, CH
22	2.64 dd, (14.1, 4.9) 2.55 dd, (14.3, 3.5)	41.5, CH <sub>2</sub>
23	1.26 s	29.3, CH <sub>3</sub>
24	1.06 s	17.0, CH <sub>3</sub>
25	0.96 s	16.1, CH <sub>3</sub>
26	1.11 s	18.0, CH <sub>3</sub>
27	1.67 s	24.6, CH <sub>3</sub>
28	–	181.0, C
29	1.20 s	26.8, CH <sub>3</sub>
30	1.54 s	24.3, CH <sub>3</sub>

号 ( $\delta_C$  124.3, 144.8), 3个连氧次甲基碳信号 ( $\delta_C$  75.8, 78.6, 84.8)。根据 HSQC 谱, 将所有氢信号和相关的碳信号归属, 再次确认化合物中含有1个羧基、1个双键、3个连氧次甲基和7个甲基等结构片段, 推测该化合物为三位羟基取代的齐墩果烯型三萜酸类化合物<sup>[7]</sup>。化合物**1**的  $^1H$  NMR 和  $^{13}C$  NMR 数据与化合物**3**相似<sup>[8]</sup>, 化合物**1**在 C-21 多一个羟基, 可由 HMBC 谱中 H-21 ( $\delta_H$  4.03) 与 C-17 ( $\delta_C$  46.6)、C-19 ( $\delta_C$  84.8)、C-20 ( $\delta_C$  39.9)



**Figure 1** Chemical structures of compounds **1**–**8**

相关得以确证。

此外, HMBC谱(图2)中, CH<sub>3</sub>-23 ( $\delta_{\text{H}}$  1.26) 和 CH<sub>3</sub>-24 ( $\delta_{\text{H}}$  1.06) 与 C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  78.6)、C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  39.9)、C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  56.4) 相关, CH<sub>3</sub>-29 ( $\delta_{\text{H}}$  1.20) 和 CH<sub>3</sub>-30 ( $\delta_{\text{H}}$  1.54) 与 C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  84.8)、C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  39.9)、C-21 ( $\delta_{\text{C}}$  75.8) 相关, 提示 CH<sub>3</sub>-23 和 CH<sub>3</sub>-24、CH<sub>3</sub>-29 和 CH<sub>3</sub>-30 是连在同一碳上的偕甲基; H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.47) 与 C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  28.6)、C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  39.9)、C-23 ( $\delta_{\text{C}}$  29.3)、C-24 ( $\delta_{\text{C}}$  17.0) 相关, H-19 ( $\delta_{\text{H}}$  3.87) 与 C-17 ( $\delta_{\text{C}}$  46.6)、C-21 ( $\delta_{\text{C}}$  75.8) 相关, 提示 3,19 位存在羟基; H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  5.64) 分别与 C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  48.8)、C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  24.6)、C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  42.8)、C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  44.7) 相关, 推测三取代双键在 12,13 位碳上; H<sub>2</sub>-16 ( $\delta_{\text{H}}$  2.52, 2.96)、H-18 ( $\delta_{\text{H}}$  3.82)、H<sub>2</sub>-22 ( $\delta_{\text{H}}$  2.55, 2.64) 分别与 C-28 ( $\delta_{\text{C}}$  181.0) 相关, 由以上数据, 进一步确定化合物的平面结构。

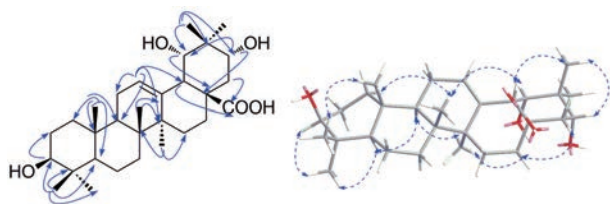


Figure 2 Key HMBC (→) and NOESY (↔) correlations of compound 1

化合物的相对构型通过 NOESY 谱(图2)和 <sup>1</sup>H NMR 谱的峰型及耦合常数确定。在 NOESY 谱中, H-3/H-5, H-3/CH<sub>3</sub>-23, H-5/H-9, H-9/CH<sub>3</sub>-27, CH<sub>3</sub>-27/H-16 $\alpha$ , H-16 $\alpha$ /H-22 $\alpha$ , H-22 $\alpha$ /CH<sub>3</sub>-29; CH<sub>3</sub>-24/CH<sub>3</sub>-25, CH<sub>3</sub>-25/CH<sub>3</sub>-26, CH<sub>3</sub>-26/H-18, H-18/H-19, H-19/CH<sub>3</sub>-30, CH<sub>3</sub>-30/H-21, 由 3 位氢的峰型及耦合常数可以推测 H-3 为  $\alpha$  构型, 即 OH-3 为  $\beta$  构型<sup>[9]</sup>, 从而确定 H-5、H-9、CH<sub>3</sub>-27、CH<sub>3</sub>-29 为  $\alpha$  构型, H-18、H-19、H-21、CH<sub>3</sub>-24、CH<sub>3</sub>-25、CH<sub>3</sub>-26、CH<sub>3</sub>-30 为  $\beta$  构型, 即 OH-19、OH-21 均为  $\alpha$  构型, 最终确定该化合物为 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -三羟基-12-烯-28-油酸 (3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -trihydroxyl-12-en-28-oic acid)。经 Scifinder 检索, 为一未见报道的新化合物。

## 2 胆碱酯酶抑制活性测试

采用改进的 Ellman 法对化合物 1~8 进行了乙酰胆碱酯酶及丁酰胆碱酯酶活性测试, 石杉碱甲及 Iso-OMPA 作为阳性对照。结果显示, 化合物 1~8 对乙酰胆碱酯酶抑制活性较弱, 对丁酰胆碱酯酶抑制活性较强。其中化合物 1、3 和 5 表现较强的丁酰胆碱酯酶抑制活性。结构上这 3 个化合物 3 位和 19 位均为羟基, 对比化合物 2, 推测 19 位羟基取代有利于活性提高。化合物 1 中, 21 位也被羟基取代, 其 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时抑制率达到 88%, 说明 E 环羟基的取代对丁酰胆碱酯

Table 2 The inhibitory ratio of compounds to AchE and BuChE

Compounds	AchE		BuChE	
	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibition rate/%	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibition rate/%
1	20	15.29 $\pm$ 5.61	20	88.25 $\pm$ 2.31
2	20	3.34 $\pm$ 5.53	20	36.79 $\pm$ 1.61
3	20	8.31 $\pm$ 5.61	20	72.35 $\pm$ 3.12
4	20	45.70 $\pm$ 3.22	20	37.07 $\pm$ 6.53
5	20	20.10 $\pm$ 5.42	20	77.56 $\pm$ 3.92
6	20	17.38 $\pm$ 7.05	20	37.50 $\pm$ 4.12
7	20	17.26 $\pm$ 1.13	20	28.70 $\pm$ 5.94
8	20	12.52 $\pm$ 5.44	20	33.02 $\pm$ 3.82
Iso-OMPA	-	-	4	90.00 $\pm$ 2.01
Huperzine A	0.8	29.96 $\pm$ 5.53	-	-

酶抑制活性起着重要的作用。

## 3 分子对接

为了考察化合物 1 与胆碱酯酶的潜在作用模式, 对其进行分子对接研究。结果显示化合物 1 不能够结合到乙酰胆碱酯酶活性位点 (PDB code 4EY5), 而与丁酰胆碱酯酶 (PDB code 4TPK) 结合较好, 其结果如图 3 所示。化合物 1 深嵌入丁酰胆碱酯酶活性位点, 21 位羟基与氨基酸残基 Asn289 的侧链形成一个保守的氢键, A 环进入有 Trp82、Phe329 形成的疏水口袋。23,24 位两个甲基与 Trp82、His438、Phe329 及 Ala328 形成疏水作用。

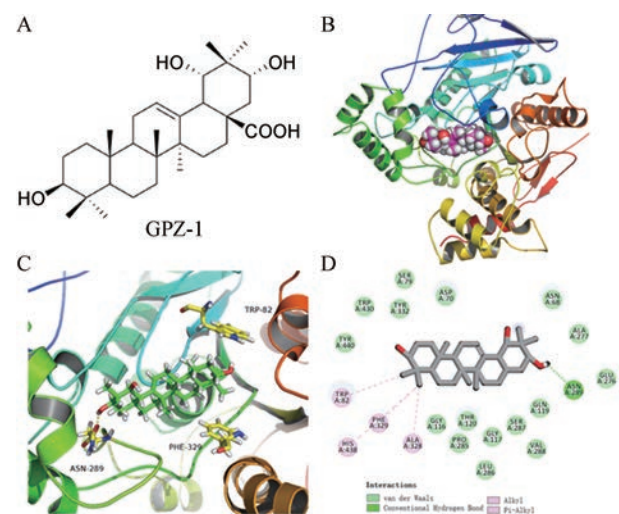


Figure 3 The molecular docking of compound 1 and BuChE. A: The structure of compound 1; B: The binding site of compound 1; C: A detailed show of interaction between compound 1 and BuChE; D: The 2D show of interactions

## 实验部分

Bruker AVANCE III HD-400 核磁共振谱仪和 Bruker IFS-55 光谱仪 (德国 Bruker 公司), Perkin-Elmer 241 MC 旋光仪 (美国 Perkin-Elmer 公司), 日立液相色谱

谱仪(日本日立株式会社), Waters LCT Premier XE TOF-MS(美国Waters公司)。薄层色谱硅胶GF<sub>254</sub>和柱色谱硅胶(200~300目, 青岛海洋化工有限公司生产), ODS(30~80 μm, 天津市化学试剂厂色谱技术开发公司生产), 所有试剂若无特别说明, 级别为分析纯或色谱纯(山东禹王实业有限公司生产)。

格蓬脂购于新疆乌鲁木齐市药材市场, 经石河子大学药学院朱芸副教授鉴定为伞形科(Apiaceae)植物格蓬阿魏(*Ferula galbaniflua* Boissier et Bubse)的乳状胶脂, 标本(SN0208)保存于沈阳药科大学中药学院天然药化实验室。

## 1 提取与分离

格蓬脂(200 g)经粉碎后, 以甲醇2 L超声提取3次, 每次1 h, 减压浓缩至干, 得到浸膏168 g。取浸膏150 g进行硅胶柱色谱分离, 以石油醚-丙酮系统(100:0~0:100)进行梯度洗脱, 得到10个流份(Fr.1~Fr.10)。流份Fr.3(12.5 g)经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-丙酮系统(100:0, 100:3, 100:5, 100:8, 100:10, 100:20, 100:50)梯度洗脱, 得到7个亚流份(Fr.3.1~Fr.3.7)。Fr.3.4(3.7 g)经开放ODS柱色谱, 以甲醇-水(10%~100%)梯度洗脱, 得到Fr.3.4.1~Fr.3.4.10, 亚流份Fr.3.4.6(276 mg)经重结晶得到化合物**8**(52.4 mg), Fr.3.4.8(1.5 g)再经硅胶柱, 石油醚-乙酸乙酯-丙酮系统(100:4:4, 100:5:5, 100:6:6, 100:7:7, 100:20:20)梯度洗脱, 得到5个亚流份(Fr.3.4.8.1~Fr.3.4.8.5), Fr.3.4.8.3(573 mg)经重结晶得到化合物**7**(104.3 mg)。流份Fr.5(4.9 g)经开放ODS柱色谱, 以甲醇-水(10%~100%)梯度洗脱, 得到Fr.5.1~Fr.5.10, Fr.5.7(159 mg)经重结晶得到化合物**2**(25.7 mg)。Fr.5.8(1.2 g)再经硅胶柱, 石油醚-乙酸乙酯-丙酮系统(100:4:4, 100:5:5, 100:6:6, 100:7:7, 100:20:20)梯度洗脱, 得到5个亚流份(Fr.5.8.1~Fr.5.8.5), Fr.5.8.3(101 mg)经重结晶得到化合物**6**(23.2 mg)。流份Fr.6(5.2 g)经开放ODS柱色谱, 以甲醇-水(10%~100%)梯度洗脱, 得到Fr.6.1~Fr.6.10, Fr.6.6(96 mg)经重结晶得到化合物**3**(13.3 mg)。Fr.6.8(242 mg) RP-HPLC分离, 以乙腈-水(85:15)为流动相(2.0 mL·min<sup>-1</sup>, 210 nm), 制备得到化合物**1**(*t<sub>R</sub>*=47.3 min, 50.6 mg)。流份Fr.7(4.7 g)经开放ODS柱色谱, 以甲醇-水(10%~100%)梯度洗脱, 得到Fr.7.1~Fr.7.10, Fr.7.6(1.3 g)再经硅胶柱, 石油醚-乙酸乙酯-丙酮系统(100:10:10, 100:12:12, 100:14:14, 100:25:25)梯度洗脱, 得到4个亚流份(Fr.7.6.1~Fr.7.6.4), Fr.7.6.3(126 mg)经重结晶得到化合物**4**(31.1 mg)。Fr.7.7(242 mg)经RP-HPLC分离, 以乙腈-水(85:15)为流动相(2.0 mL·min<sup>-1</sup>, 210 nm), 制备得到

化合物**5**(*t<sub>R</sub>*=82.3 min, 48.5 mg)。

## 2 结构鉴定

化合物**1** 白色羽状结晶(甲醇), [ $\alpha$ ] -47.6 (c 0.92, CHCl<sub>3</sub>); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3 409, 2 938, 2 873, 1 709, 1 630, 1 453, 1 385, 1 288, 1 050, 914, 626; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N), <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) 见表1, HR-ESI-MS给出 *m/z* 489.361 2 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd. 489.361 0, C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>)。

化合物**2** 白色固体粉末, HR-ESI-MS *m/z* 471.347 6 [M-H]<sup>-</sup> (Calcd. for 471.347 4, C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>)。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N):  $\delta_{\text{H}}$  0.90 (3H, s, CH<sub>3</sub>-29), 0.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.07 (6H, s, CH<sub>3</sub>-23, CH<sub>3</sub>-26), 1.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>-27), 1.18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24), 1.30 (3H, s, CH<sub>3</sub>-25), 3.16 (1H, dd, *J* = 10.3, 5.8 Hz, H-3), 4.54 (1H, br s, H-6), 5.31 (1H, t, *J* = 3.4 Hz, H-12); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N):  $\delta_{\text{C}}$  40.5 (C-1), 27.5 (C-2), 79.3 (C-3), 39.7 (C-4), 55.9 (C-5), 68.8 (C-6), 40.7 (C-7), 36.7 (C-8), 38.6 (C-9), 48.1 (C-10), 23.5 (C-11), 122.9 (C-12), 143.0 (C-13), 42.5 (C-14), 27.8 (C-15), 23.2 (C-16), 46.7 (C-17), 41.1 (C-18), 46.1 (C-19), 30.8 (C-20), 34.1 (C-21), 32.5 (C-22), 28.1 (C-23), 17.2 (C-24), 17.1 (C-25), 26.1 (C-26), 18.4 (C-27), 183.6 (C-28), 33.2 (C-29), 23.7 (C-30)。以上数据与文献对比<sup>[10]</sup>, 确定化合物**2**为苏门树脂脑酸。

化合物**3** 白色片状结晶, HR-ESI-MS *m/z* 471.347 6 [M-H]<sup>-</sup> (Calcd. for 471.347 4, C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>)。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N):  $\delta_{\text{H}}$  0.94 (3H, s, CH<sub>3</sub>-25), 1.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24), 1.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>-26), 1.13 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.20 (3H, s, CH<sub>3</sub>-29), 1.25 (3H, s, CH<sub>3</sub>-23), 1.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-27), 3.44 (1H, dd, *J* = 10.8, 5.2 Hz, H-3), 5.58 (1H, t, *J* = 4.0 Hz, H-12); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N):  $\delta_{\text{C}}$  38.9 (C-1), 28.6 (C-2), 78.3 (C-3), 39.5 (C-4), 56.1 (C-5), 19.1 (C-6), 33.8 (C-7), 40.1 (C-8), 48.5 (C-9), 37.7 (C-10), 24.3 (C-11), 123.5 (C-12), 145.0 (C-13), 42.3 (C-14), 30.0 (C-15), 28.2 (C-16), 46.1 (C-17), 44.9 (C-18), 81.4 (C-19), 35.9 (C-20), 29.0 (C-21), 33.5 (C-22), 29.3 (C-23), 16.6 (C-24), 15.6 (C-25), 17.6 (C-26), 25.0 (C-27), 180.9 (C-28), 29.0 (C-29), 25.0 (C-30)。以上数据与文献对比<sup>[8]</sup>, 确定化合物**3**为3 $\beta$ ,19 $\alpha$ -二羟基-12-烯-28-油酸。

化合物**4** 白色羽状结晶, HR-ESI-MS *m/z* 455.353 9 [M-H]<sup>-</sup> (Calcd. for 455.352 5, C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>)。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N):  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>-29), 0.97 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.03 (3H, s, CH<sub>3</sub>-23), 1.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24), 1.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>-25), 1.27 (3H, s, CH<sub>3</sub>-26), 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>-27), 3.43 (1H, dd, *J* = 10.7, 5.2 Hz, H-

3), 5.53 (1H, br s, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  39.9 (C-1), 28.6 (C-2), 78.6 (C-3), 40.3 (C-4), 56.3 (C-5), 19.3 (C-6), 34.7 (C-7), 42.5 (C-8), 50.2 (C-9), 39.4 (C-10), 24.2 (C-11), 123.1 (C-12), 145.3 (C-13), 42.7 (C-14), 28.8 (C-15), 24.3 (C-16), 47.2 (C-17), 46.9 (C-18), 48.6 (C-19), 31.5 (C-20), 37.9 (C-21), 33.7 (C-22), 29.2 (C-23), 17.0 (C-24), 16.0 (C-25), 17.9 (C-26), 26.7 (C-27), 180.9 (C-28), 33.7 (C-29), 24.3 (C-30)。以上数据与文献对比<sup>[11]</sup>, 确定化合物**4**为齐墩果酸。

化合物**5** 白色羽状结晶, HR-ESI-MS 给出  $m/z$  489.361 2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Calcd. 489.361 0,  $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_5^+$ )。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1.15 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 1.21 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -29), 1.45 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -23), 1.65 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -27), 1.67 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -26), 1.70 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24), 1.74 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -25), 3.49 (1H, dd,  $J = 11.6, 4.1$  Hz, H-3), 3.68 (1H, br s, H-19), 4.87 (1H, br s, H-6), 5.68 (1H, br s, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  39.9 (C-1), 28.9 (C-2), 79.2 (C-3), 41.0 (C-4), 57.3 (C-5), 68.4 (C-6), 42.0 (C-7), 41.5 (C-8), 49.5 (C-9), 37.8 (C-10), 24.7 (C-11), 124.3 (C-12), 144.3 (C-13), 43.1 (C-14), 29.8 (C-15), 28.8 (C-16), 46.6 (C-17), 45.3 (C-18), 81.8 (C-19), 36.8 (C-20), 29.4 (C-21), 34.2 (C-22), 29.6 (C-23), 17.5 (C-24), 18.5 (C-25), 25.4 (C-26), 18.8 (C-27), 181.4 (C-28), 29.1 (C-29), 25.4 (C-30)。以上数据与文献对比<sup>[12]</sup>, 确定化合物**5**为 $3\beta,6\beta,19\alpha$ -三羟基-12-烯-28-油酸。

化合物**6** 白色针状结晶, HR-ESI-MS  $m/z$  469.331 3  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (Calcd. for 469.331 8,  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4^-$ )。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0.77 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -26), 0.97 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -29), 0.98 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 1.04 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24), 1.05 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -25), 1.08 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -23), 1.26 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -27), 3.34 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz, H-19), 5.44 (1H, t,  $J = 3.8$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  38.8 (C-1), 34.1 (C-2), 217.5 (C-3), 47.5 (C-4), 55.4 (C-5), 19.6 (C-6), 32.0 (C-7), 39.6 (C-8), 47.1 (C-9), 37.0 (C-10), 23.7 (C-11), 124.8 (C-12), 142.7 (C-13), 41.3 (C-14), 28.0 (C-15), 27.4 (C-16), 45.3 (C-17), 43.4 (C-18), 81.5 (C-19), 34.6 (C-20), 28.0 (C-21), 32.4 (C-22), 26.2 (C-23), 21.5 (C-24), 14.7 (C-25), 17.1 (C-26), 24.4 (C-27), 184.7 (C-28), 28.0 (C-29), 24.9 (C-30)。以上数据与文献对比<sup>[13]</sup>, 确定化合物**6**为 $19\alpha$ -羟基齐墩果酮酸。

化合物**7** 白色针状结晶, HR-ESI-MS  $m/z$  469.331 3  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (Calcd. for 469.331 8,  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4^-$ )。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0.98 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -29), 1.03 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 1.28 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -27), 1.37 (3H, s,

$\text{CH}_3$ -23), 1.62 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24), 1.68 (6H, s,  $\text{CH}_3$ -25,  $\text{CH}_3$ -26), 4.68 (1H, br s, H-6), 5.59 (1H, t,  $J = 3.4$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  41.5 (C-1), 33.7 (C-2), 216.1 (C-3), 47.2 (C-4), 57.4 (C-5), 68.6 (C-6), 42.3 (C-7), 39.7 (C-8), 48.4 (C-9), 37.4 (C-10), 24.2 (C-11), 123.1 (C-12), 144.8 (C-13), 43.3 (C-14), 26.7 (C-15), 24.4 (C-16), 49.8 (C-17), 42.6 (C-18), 46.9 (C-19), 31.5 (C-20), 35.2 (C-21), 34.7 (C-22), 28.8 (C-23), 24.6 (C-24), 16.8 (C-25), 19.2 (C-26), 26.3 (C-27), 180.6 (C-28), 33.8 (C-29), 24.3 (C-30)。以上数据与文献对比<sup>[14]</sup>, 确定化合物**7**为 $6\alpha$ -羟基齐墩果酮酸。

化合物**8** 白色羽状结晶, HR-ESI-MS  $m/z$  487.349 5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Calcd. for 487.348 2,  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_5^+$ )。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0.79 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 0.88 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -29), 1.22 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -27), 1.41 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -23), 1.64 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -25), 1.72 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24), 1.83 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -26), 3.31 (1H, m, H-11), 3.33 (1H, m, H-12), 3.46 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.9$  Hz, H-3), 4.81 (1H, br s, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  40.2 (C-1), 28.4 (C-2), 79.0 (C-3), 41.0 (C-4), 56.5 (C-5), 67.9 (C-6), 41.2 (C-7), 41.6 (C-8), 52.5 (C-9), 37.0 (C-10), 53.6 (C-11), 57.9 (C-12), 88.2 (C-13), 41.8 (C-14), 27.5 (C-15), 22.1 (C-16), 44.6 (C-17), 50.4 (C-18), 38.6 (C-19), 32.0 (C-20), 34.9 (C-21), 28.1 (C-22), 28.4 (C-23), 18.1 (C-24), 19.5 (C-25), 21.8 (C-26), 19.6 (C-27), 179.4 (C-28), 33.5 (C-29), 23.9 (C-30)。以上数据与文献对比<sup>[15]</sup>, 确定化合物**8**为 $3\alpha,6\alpha$ -二羟基-11 $R,12R$ -环氧齐墩果烷-28,13 $\alpha$ -内酯。

### 3 胆碱酯酶活性测试

将准确质量的待测化合物溶于一定量二甲基亚砜 (DMSO) 配置成  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的母液, 取  $4 \mu\text{L}$  母液加入  $500 \mu\text{L}$  PBS 配成  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液。

丁酰胆碱酯酶抑制活性测定方法: 在 96 孔板上测定样品的 BuChE 抑制活性。具体操作如下: 在 96 孔酶标板中依次加入 PBS ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.0)  $25 \mu\text{L}$ , BuChE ( $\geq 0.04 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , pH 8.0 PBS 溶解稀释)  $25 \mu\text{L}$ , 样品溶液 ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )  $25 \mu\text{L}$ 。冰浴 5 min 后, 依次加入 BuSCH ( $1.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.0 PBS 溶解稀释)  $25 \mu\text{L}$  及 DTNB ( $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.0 PBS 溶解稀释)  $25 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 60 min 后, 用酶标仪在 412 nm 下测定其吸光度值。

其中, 标准组用  $25 \mu\text{L}$  PBS (pH 8.0) 代替  $25 \mu\text{L}$  样品溶液; 空白组用  $25 \mu\text{L}$  PBS (pH 8.0) 代替  $25 \mu\text{L}$  样品溶液及  $25 \mu\text{L}$  PBS (pH 8.0) 代替  $25 \mu\text{L}$  BuChE 液; 完全抑制组用  $25 \mu\text{L}$  Iso-OMPA ( $16.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 代替  $25 \mu\text{L}$

样品溶液。

乙酰胆碱酯酶抑制活性测定方法: 在 96 孔酶标板上测定样品的 AChE 抑制活性。具体操作如下: 在 96 孔酶标板中依次加入 PBS (100 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8.0) 35 μL, AChE (0.132 U·mL<sup>-1</sup>, pH 8.0 PBS 溶解稀释) 25 μL, 样品溶液 (400 μmol·L<sup>-1</sup>) 25 μL, ATCI (4 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.0 PBS 溶解稀释) 15 μL 及 DTNB (6 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8.0 PBS 溶解稀释) 15 μL。37 °C 孵育 60 min 后, 用酶标仪在 412 nm 下测定其吸光度值。

其中, 标准组用 25 μL PBS (pH 8.0) 代替 25 μL 样品溶液; 空白组用 50 μL PBS (pH 8.0) 代替 25 μL 样品溶液及 25 μL AChE 液; 完全抑制组用 20 μL 石杉碱甲液 (0.8 μmol·L<sup>-1</sup>) 代替 25 μL 样品溶液, 不足 100 μL 用 PBS (pH 8.0) 补齐。

酶抑制率的计算方法如下公式:

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{标准组} - \text{空白组}) - (\text{样品组} - \text{样品空白组})}{(\text{标准组} - \text{空白组})} \times 100\%$$

#### 4 分子对接

本文中分子对接采用 Discovery Studio 3.5 软件进行<sup>[16]</sup>。蛋白文件的准备包括添加氢原子, 删除水分子和施加 Charmm 力场。打分软件采用的是 Goldscore, 其他参数采用的是系统默认值。丁酰胆碱酯酶结构从 PDB 数据库下载<sup>[17]</sup>, 每次对接试验中保留 10 个最佳的分子构象作为候选, 并且计算 RMSD 值作为参考标准。

#### References

- [1] Pavlovic I, Kronic A, Nikolic D, et al. Chloroform extract of underground parts of *Ferula heuffelii*: secondary metabolites and spasmolytic activity [J]. Chem Biodiv, 2014, 11: 1417-1427.
- [2] Dastan D, Salehi P, Gohari AR, et al. Bioactive sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea* [J]. Planta Med, 2014, 80: 1118-1123.
- [3] Adhami HR, Fitz V, Lubich A, et al. Acetylcholinesterase inhibitors from galbanum, the oleo gum-resin of *Ferula gummosa* Boiss [J]. Phytochem Anal, 2014, 10: 82-87.
- [4] Meng H, Li G, Huang J, et al. Sesquiterpene coumarin and sesquiterpene chromone derivatives from *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korov [J]. Fitoterapia, 2013, 86: 70-77.
- [5] Li G, Li X, Cao L, et al. Steroidal esters from *Ferula sinkiangensis* [J]. Fitoterapia, 2014, 97: 247-252.
- [6] Chinese Materia Medica Editorial Board. Chinese Materia Medica (Uyur medicine volume) (中华本草: 维吾尔药卷) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2005: 269.
- [7] Ikuta A, Kamiya K, Satake T, et al. Triterpenoids from callus cultures of *Paeonia* species [J]. Phytochemistry, 1995, 38: 1203-1207.
- [8] Yoshihiro M, Masato F, Akihito Y, et al. Triterpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis* [J]. Phytochemistry, 2001, 57: 773-779.
- [9] Ahmed E, Malik A, Ferheen S, et al. Chymotrypsin inhibitory triterpenoids from *Silybum marianum* [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54: 103-106.
- [10] Wilfred RC, Veronicas H, Athleean M. Triterpenes from *Mzconaz stenostach* Ya [J]. J Nat Prod, 1992, 55: 963-966.
- [11] An RB, Kim HC, Jeong GS, et al. Constituents of the aerial parts of *Agrimonia pilosa* [J]. Nat Prod Sci, 2005, 11: 196-198.
- [12] Adnyana IK, Tezuka Y, Banskota AH, et al. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity [J]. J Nat Prod, 2001, 64: 360-363.
- [13] Braulio MF, Carmen ED, Nayra Q. Triterpenes from natural and transformed roots of *Plocama pendula* [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 1092-1094.
- [14] Nargis A, Abdul M. Oleanene type triterpenes form *Plumeria Rubra* [J]. Phytochemistry, 1993, 32: 1523-1525.
- [15] Wang F, Hua HM, Pei YH, et al. Triterpenoids from the resin of *Styrax tonkinensis* and their antiproliferative and differentiation effects in human leukemia HL-60 Cells [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 807-810.
- [16] Wu G, Robertson DH, Vieth M. Detailed analysis of grid-based molecular docking: a case study of CDOCKER-A CHARMm-based MD docking algorithm [J]. J Comput Chem, 2003, 24: 1549-1562.
- [17] Brus B, Košak U, Turk S, et al. Discovery, biological evaluation, and crystal structure of a novel nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor [J]. J Med Chem, 2014, 57: 8167-8179.