

高山蓍中的萜类成分及其降糖活性研究

段江婧^{1,2}, 薛金凤¹, 赵晨光^{1,2},
潘浩^{1,2}, 秦月鸽^{1,2}, 冯卫生^{1,2}, 吴亚^{1,2*}, 薛贵民^{1,2*}

¹河南中医药大学药学院; ²河南省中药开发工程技术研究中心, 郑州 450046

摘要: 研究高山蓍 *Achillea alpina* L. 全草中萜类成分及其降糖活性。采用 ODS、Sephadex LH-20 柱色谱和 pre-HPLC 等方法分离纯化, 采用 NMR、MS 等波谱技术鉴定化合物的结构。从高山蓍的二氯甲烷部位中分离纯化得到 13 个单体化合物, 分别是 [3S-[3 α , 3 $\alpha\alpha$, 4 α (Z), 6 α , 6 $\alpha\alpha$, 9 α , 9 $\alpha\alpha$, 9 β]], 2-butenic acid, 2-methyl-2, 3, 3a, 4, 5, 6, 6a, 9, 9a, 9b-decahydro-6, 6a, 9-trihydroxy-3, 6, 9-trimethyl-2-oxoazuleno[4, 5-b]furan-4-yl ester (**1**)、10 β -hydroxyisodauc-6-en-14-al (**2**)、isodauc-6-ene-10 β , 14-diol (**3**)、aphanamol II (**4**)、ent-4 (15)-eudesmene-1 β , 6 α -diol (**5**)、12-羟基- α -香附酮 (**6**)、1 β -羟基- α -香附酮 (**7**)、(E)-3, 7, 11-trimethyl-1, 6, 10-dodecatriene-3, 5-diol (**8**)、2, 6, 10-trimethyl-3, 6, 11-dodecatriene-2, 8, 10-triol (**9**)、黑麦草内酯 (**10**)、8-hydroxyphellandral (**11**)、(3R, 6R, 7E)-3-hydroxy-4, 7-megastigmadien-9-one (**12**)、saniculamoid D (**13**)。化合物 **1**~**4**、**6**、**8** 和 **10**~**13** 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 **5**、**7** 和 **9** 为首次从植物高山蓍中分离得到。将化合物 **1**~**13** 在棕榈酸诱导的 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型上进行细胞耗糖量的活性筛选, 结果显示化合物 **5**、**9** 和 **10** (50 μ mol/L) 具有良好的逆转胰岛素抵抗活性。

关键词: 高山蓍; 化学成分; 萜类; 降糖活性

中图分类号: R284. 2; R285. 5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)1-0062-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.1.008

Study on the terpenoids from *Achillea alpina* L. and their hypoglycemic activity

DUAN Jiang-jing^{1,2}, XUE Jin-feng¹, ZHAO Chen-guang^{1,2},
PAN Hao^{1,2}, QIN Yue-ge^{1,2}, FENG Wei-sheng^{1,2}, WU Ya^{1,2*}, XUE Gui-min^{1,2*}

¹School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine; ²The Engineering and Technology Center for Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China

Abstract: To study the terpenoids constituents and their hypoglycemic activities from *Achillea alpina* L. The extract was separated and purified by column chromatography on ODS, Sephadex LH-20 column chromatography and pre-HPLC. The structures of the compounds **1**-**13** were identified by NMR, MS and other spectroscopic techniques. Thirteen compounds have been isolated and purified from dichloromethane extract of *A. alpina*, and they were identified as [3S-[3 α , 3 $\alpha\alpha$, 4 α (Z), 6 α , 6 $\alpha\alpha$, 9 α , 9 $\alpha\alpha$, 9 β]], 2-butenic acid, 2-methyl-2, 3, 3a, 4, 5, 6, 6a, 9, 9a, 9b-decahydro-6, 6a, 9-trihydroxy-3, 6, 9-trimethyl-2-oxoazuleno[4, 5-b]furan-4-yl ester (**1**), 10 β -hydroxyisodauc-6-en-14-al (**2**), isodauc-6-ene-10 β , 14-diol (**3**), aphanamol II (**4**), ent-4 (15)-eudesmene-1 β , 6 α -diol (**5**), 12-hydroxy- α -cyperone (**6**), 1 β -hydroxy- α -cyperone (**7**), (E)-3, 7, 11-trimethyl-1, 6, 10-dodecatriene-3, 5-diol (**8**), 2, 6, 10-trimethyl-3, 6, 11-dodecatriene-2, 8, 10-triol (**9**), lolilide (**10**), 8-hydroxyphellandral (**11**), (3R, 6R, 7E)-3-hydroxy-4, 7-megastigmadien-9-one (**12**), saniculamoid D (**13**). Compounds **1**-**4**, **6**, **8** and **10**-**13** were isolated from the *Achillea* genus for the first time. Compounds **5**, **7** and **9** were isolated from this plant for the first time. Glucose consumption was analyzed to investigate the effect of compounds **1**-**13** in palmitic acid-mediated HepG2-insulin resistance cell. The result showed that compounds **5**, **9** and **10** (50 μ mol/L) exhibited strong reversal IR ac-

tivity.

Key words: *Achillea alpina* L.; chemical constituents; terpenoids; hypoglycemic activity

蓍属(*Achillea*)是菊科多年生草本植物,截至目前从蓍属植物中分离得到了多种类型的化学成分,如萜类、黄酮、生物碱等,其中含量最丰富的是倍半萜类^[1]。现代药理学研究表明,蓍属植物具有抗菌^[2]、抗炎^[3]、抗感染、镇静^[4]、降血糖、调血脂和解痉^[5]等作用。

高山蓍为菊科蓍属植物,又名一支蒿、锯齿草、蜈蚣蒿等。该植物生命力顽强,适应能力较好,它抗低温、喜温暖、半荫,宜肥沃、湿润的土壤,故常栖息于我国北方地区的灌木丛、山坡坡面、山谷湿地等处,在我国华北、东北、江苏、宁夏、内蒙古以及日本、苏联等地区均有分布。高山蓍用药的历史已经有一千多年,最早作为上品记载于《神农本草经》,在古代,因其具有治愈疾病的疗效被人们视为“神草”和“灵物”^[6]。据2020版《中国药典》记载,此药味苦、酸,性平、温,归肺、脾、膀胱经。民间百姓常将高山蓍用于治疗外伤破损、感冒发热、风湿和关节疼痛等疾病。现代药理学研究显示,蓍属植物的提取物具有降血糖和调血脂的药理活性^[7],即表明对于高山蓍中具有降糖活性化合物的研究具有重要意义。我国高山蓍植物资源丰富,且应用越来越普遍,使得国内外很多学者对其产生了研究兴趣。所以,为进一步研究高山蓍的化学成分和药理活性,本文对高山蓍二氯甲烷部位的化学成分进行提取、分离、纯化和结构鉴定,并对这些化合物在棕榈酸诱导的HepG2胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)细胞模型上进行了细胞耗糖量的活性筛选^[8],以期丰富该中药的化学成分并发现具有良好降糖活性的化合物。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器

LC-52型高压制备液相色谱仪(赛谱锐思(北京)科技有限公司);Bruker AVANCE 500核磁共振仪(TMS为内标);Bruker maxis HD型飞行时间质谱仪(德国Bruker公司);SCIEX Qtrap 5500质谱仪(美国应用生物系统公司);Agilent 1260 Infinity II LC高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)。

1.1.2 材料

Sephadex LH-20(40~70 μm, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, 瑞士);大孔树脂 Diaion

HP-20(日本三菱化学);MCI(日本三菱化学公司);YMC-Pack ODS-A(40~60 μm, YMC);预制硅胶薄层G板(10~40 μm 青岛海洋化工厂);分析纯和色谱纯试剂(天津恒兴和天津四友精细化学有限公司);显色剂:10%浓硫酸乙醇。

2020年5月在云南省昆明市购买,由河南中医药大学董诚明教授鉴定为*Achillea alpina* L.全草,标本(20200515)放于河南中医药大学天然产物实验室Bs630。

1.2 实验方法

1.2.1 提取分离

高山蓍(5.0 kg)用二氯甲烷溶剂冷浸48 h,室温下超声提取三次,每次3 h。合并三次提取液,减压浓缩得到总浸膏52.0 g。将得到的浸膏与聚酰胺按1:1的比例拌样装于MCI色谱柱中,依次用10%、30%、60%、80%、90%、100%甲醇-水溶剂系统梯度洗脱,将洗脱液减压浓缩,得到的6个馏分依次命名为AN1、AN2、AN3、AN4、AN5、AN6。将AN3部位过Sephadex LH-20处理,用甲醇做流动相得到6个馏分(AN3B1、AN3B2、AN3B3、AN3B4、AN3B5、AN3B6)。将组分AN3B3过ODS色谱柱,用甲醇/水梯度洗脱得到20个馏分(AN3B3-1~AN3B3-20)。组分AN3B3-18经半制备液相以70%甲醇/水等度洗脱制备得化合物**8**($t_R = 20$ min, 20.0 mg)。组分AN3B3-12经半制备液相(30%→70%乙腈/水)制备得到化合物**9**($t_R = 32$ min, 4.4 mg)。组分AN3B3-10经半制备液相(45%→80%甲醇/水)制备得到化合物**13**($t_R = 31$ min, 3.2 mg)。

将组分AN3B4过ODS色谱柱,用甲醇/水梯度洗脱得到15个馏分(AN3B4-1~AN3B4-15)。组分AN3B4-10经半制备液相以55%甲醇/水等度洗脱制备得化合物**1**($t_R = 34$ min, 10.3 mg)。组分AN3B4-15以(30%→95%乙腈/水)为流动相经半制备液相制备得到化合物**2**($t_R = 32$ min, 3.5 mg)、**3**($t_R = 34$ min, 4.6 mg)、**4**($t_R = 40$ min, 3.5 mg)和**7**($t_R = 31$ min, 6.1 mg)。组分AN3B4-11经半制备液相(20%→65%乙腈/水, 0→50 min)制备得到化合物**5**($t_R = 38$ min, 5.6 mg)。组分AN3B4-12(35%→80%乙腈/水, 0→50 min)制备得化合物**6**($t_R = 28$ min, 2.1 mg)。组分AN3B4-6以(10%→50%乙腈/

水, 0→50 min) 为流动相经半制备液相制备得到化合物 **10** ($t_R = 24$ min, 21.0 mg) 和 **11** ($t_R = 33$ min, 3.3 mg)。组分 AN3B4-8 经半制备液相以 (10% → 70% 乙腈/水) 洗脱制备得化合物 **12** ($t_R = 30$ min, 1.4 mg)。

1.2.2 细胞毒性测定

取对数生长期的 HepG2 细胞以 8×10^3 个细胞/孔加入 96 孔板, 将板放入 CO₂ 培养箱中, 37 °C、5% CO₂, 孵育 24 h, 弃去 96 孔板中培养基, 在平板中加入配制好的待测药物 (最终浓度为 50 μmol/L)、空白组 (只含 DMEM 培养基)、对照组 (含有细胞的培养液), 每个待测药物设 3 个复孔, 每孔加入完全培养基为 100 μL, 孵育 48 h。然后再各加入 10 μL CCK-8 溶液, 将平板放入 CO₂ 培养箱中, 37 °C、5% CO₂, 孵育 2 h, 酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度, 按如下公式计算细胞存活率。

细胞存活率 =

$$\left(1 - \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}\right) \times 100\%$$

1.2.3 化合物降糖活性筛选

用胎牛血清和高糖 DMEM 基础培养基配置含 10% 胎牛血清的完全培养基进行 HepG2 细胞的培养。取对数生长期的 HepG2 细胞, 经过消化、离心、重悬、计数后, 接种于 96 孔板中 (4×10^3 个/孔), 37 °C 培养 12 h 后弃去上清液, 分别加入含有不同浓度的棕榈酸 (PA, 0、1、10、100、200、250、350 μmol/L) 培养基, 培养 24 h 后用 CCK-8 法检测细胞活力, 实验重复 3 次。确定对 HepG2 细胞无损伤作用的棕榈酸浓度以便进行下一步实验。

取对数生长期的 HepG2 细胞, 经过消化、离心、重悬、计数后, 铺入 24 孔板, 培养 12 h 后, 换入上一步实验得出的非损伤性浓度的棕榈酸溶液对细胞进行诱导, 培养 24 h 后收取细胞上清, 利用葡萄糖检测试剂盒检测其中的葡萄糖含量; 收取上清后换入含 1×10^{-7} mol/L 胰岛素的基础培养基继续培养 24 h, 然后以同法检测其中的葡萄糖含量, 以使上清葡萄糖含量显著升高作为确定诱导浓度。最后根据本部分实验设定在 PA 200 μmol/L 处理建立慢性炎症 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型。实验分组: 空白组 (只含 DMEM 培养基)、对照组 (CON, 含细胞和 DMEM 培养基)、PA 模型组 (含 PA)、阳性组罗格列酮 (ROSI) 和不同化合物干预 PA 组。每组设 6 复孔, 各组做相应处理后于培养箱内培养 24 h, 用葡萄

糖临床试剂盒检测培养基上清液中的葡萄糖含量, 实验重复 3 次, 检测化合物对 HepG2 各组细胞葡萄糖摄取的影响, 按如下公式计算葡萄糖消耗量。

$$\text{葡萄糖消耗量} = \text{空白组葡萄糖含量} - \text{实验组每孔剩余葡萄糖含量}$$

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 **1** 无色油状 (甲醇); ESI-MS: m/z 403 [M + Na]⁺, 分子式 C₂₀H₂₈O₇; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.18 (1H, m, H-3'), 5.92 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2), 5.89 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3), 5.24 (1H, m, H-8), 4.30 (1H, m, H-6), 2.75 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-5), 2.38 (1H, m, H-11), 2.30 (1H, m, H-7), 2.24 (1H, m, H-9a), 2.03 (3H, dd, $J = 7.0, 1.5$ Hz, H-4'), 1.93 (3H, m, H-5'), 1.80 (1H, m, H-9b), 1.45 (3H, s, H-15), 1.28 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13), 1.14 (3H, s, H-14); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 91.4 (C-1), 134.3 (C-2), 140.8 (C-3), 83.1 (C-4), 52.3 (C-5), 76.3 (C-6), 43.0 (C-7), 66.2 (C-8), 41.0 (C-9), 79.3 (C-10), 32.3 (C-11), 177.6 (C-12), 12.9 (C-13), 23.2 (C-14), 24.2 (C-15), 167.0 (C-1'), 126.9 (C-2'), 140.8 (C-3'), 16.1 (C-4'), 20.8 (C-5')。以上数据与文献^[9]报道一致, 故鉴定化合物 **1** 为 [3S-[3α, 3αα, 4α (Z), 6α, 6αα, 9α, 9αα, 9bβ]]-2-butenoic acid, 2-methyl-2, 3, 3a, 4, 5, 6, 6a, 9, 9a, 9b-decahydro-6, 6a, 9-trihydroxy-3, 6, 9-trimethyl-2-oxoazuleno[4, 5-b]furan-4-yl ester。

化合物 **2** 无色油状 (甲醇); ESI-MS: m/z 259 [M + Na]⁺, 分子式 C₁₅H₂₄O₂; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.36 (1H, s, H-14), 6.59 (1H, m, H-6), 3.48 (1H, dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, H-10), 2.97 (1H, dd, $J = 15.0, 6.0$ Hz, H-8a), 2.24 (1H, dd, $J = 10.0, 5.0$ Hz, H-5), 2.03 (1H, m, H-4), 1.92 (1H, m, H-8b), 1.86 (1H, m, H-3a), 1.78 (1H, m, H-9a), 1.62 (1H, m, H-11), 1.50 (1H, m, H-3b), 1.49 (1H, m, H-2a), 1.25 (1H, m, H-2b), 1.25 (1H, m, H-9b), 0.90 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-12), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-13), 0.73 (3H, s, H-15); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 49.5 (C-1), 39.6 (C-2), 25.0 (C-3), 51.0 (C-4), 50.4 (C-5), 159.6 (C-6), 143.6 (C-7), 19.6 (C-8), 29.0 (C-9), 83.4 (C-10), 32.3 (C-11), 19.5 (C-12), 21.6 (C-13), 193.2 (C-14), 13.5 (C-15)。以上数据与文献^[10]报道一致, 故鉴定化合物 **2** 为 10β-hydrox-

ysisodauc-6-en-14-al。

化合物 3 无色油状(甲醇);ESI-MS: m/z 261 $[M + Na]^+$,分子式 $C_{15}H_{26}O_2$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ :5.51(1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-6), 4.02(2H, s, H-14), 3.48(1H, dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, H-10), 2.82(1H, m, H-8a), 2.54(1H, m, H-9a), 2.42(1H, m, H-11), 2.28(1H, m, H-4), 2.28(1H, m, H-5), 2.07(1H, m, H-8b), 1.80(1H, m, H-9b), 1.50(1H, m, H-2a), 1.50(1H, m, H-3a), 1.35(1H, m, H-2b), 1.35(1H, m, H-3b), 1.26(3H, s, H-15), 0.91(3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-12), 0.88(3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-13); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ :47.9(C-1), 38.5(C-2), 26.7(C-3), 46.8(C-4), 44.3(C-5), 126.6(C-6), 138.8(C-7), 25.3(C-8), 28.8(C-9), 83.2(C-10), 28.9(C-11), 23.4(C-12), 19.7(C-13), 67.7(C-14), 13.6(C-15)。以上数据与文献^[11]报道一致,故鉴定化合物 3 为 isodauc-6-ene-10 β ,14-diol。

化合物 4 无色油状(甲醇);ESI-MS: m/z 259 $[M + Na]^+$,分子式 $C_{15}H_{24}O_2$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ :9.36(1H, s, H-14), 6.64(1H, m, H-6), 3.48(1H, dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, H-10), 2.80(1H, m, H-8a), 2.73(1H, m, H-8b), 2.53(1H, m, H-9a), 2.51(1H, m, H-9b), 2.46(1H, m, H-5), 2.22(1H, m, H-4), 1.85(1H, m, H-2a), 1.85(1H, m, H-3a), 1.66(1H, m, H-11), 1.43(1H, m, H-2b), 1.43(1H, m, H-3b), 1.35(3H, s, H-15), 0.94(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-12), 0.94(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ :48.8(C-1), 39.0(C-2), 24.5(C-3), 49.7(C-4), 49.2(C-5), 159.3(C-6), 143.2(C-7), 19.0(C-8), 28.5(C-9), 82.8(C-10), 31.9(C-11), 19.0(C-12), 21.2(C-13), 192.8(C-14), 13.0(C-15)。以上数据与文献^[10]报道一致,故鉴定化合物 4 为 aphanamol II。

化合物 5 无色油状(甲醇);ESI-MS: m/z 261 $[M + Na]^+$,分子式 $C_{15}H_{26}O_2$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ :5.02(1H, s, H-15a), 4.74(1H, s, H-15b), 3.71(1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-6), 3.42(1H, dd, $J = 11.5, 5.0$ Hz, H-1), 2.33(1H, ddd, $J = 13.0, 5.0, 2.0$ Hz, H-3a), 2.24(1H, m, H-11), 2.07(1H, td, $J = 13.5, 5.0$ Hz, H-3b), 1.91(1H, m, H-9a), 1.86(1H, m, H-2a), 1.75(1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-5), 1.55(1H, m, H-2b), 1.52(1H, m, H-8a), 1.30(1H, m, H-7), 1.23(1H, m, H-8b), 1.16(1H, m, H-9b), 0.95

(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-12), 0.87(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13), 0.70(3H, s, H-14); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ :79.3(C-1), 32.1(C-2), 35.2(C-3), 146.4(C-4), 56.0(C-5), 67.1(C-6), 49.5(C-7), 18.3(C-8), 36.4(C-9), 41.8(C-10), 26.1(C-11), 21.2(C-12), 16.3(C-13), 11.7(C-14), 108.0(C-15)。以上数据与文献^[12]报道一致,故鉴定化合物 5 为 ent-4(15)-eudesmene-1 β ,6 α -diol。

化合物 6 无色油状(甲醇);ESI-MS: m/z 257 $[M + Na]^+$,分子式 $C_{15}H_{22}O_2$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ :5.13(1H, s, H-12a), 5.01(1H, s, H-12b), 4.18(2H, s, H-13), 2.80(1H, m, H-6a), 2.53(1H, m, H-2a), 2.40(1H, m, H-7), 2.13(1H, m, H-2b), 2.09(1H, m, H-6b), 1.82(1H, m, H-8a), 1.77(3H, d, $J = 1.0$ Hz, H-15), 1.73(1H, m, H-1), 1.73(1H, m, H-8b), 1.67(1H, m, H-9a), 1.44(1H, m, H-1), 1.44(1H, m, H-9b), 1.24(3H, s, H-14)。以上数据与文献^[13]报道一致,故鉴定化合物 6 为 12-羟基- α -香附酮。

化合物 7 无色油状(甲醇);ESI-MS: m/z 257 $[M + Na]^+$,分子式 $C_{15}H_{22}O_2$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ :4.79(2H, m, H-12), 3.83(1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-1), 2.80(1H, dt, $J = 14.5, 2.5$ Hz, H-6a), 2.65(1H, dd, $J = 16.5, 5.0$ Hz, H-2a), 2.57(1H, dd, $J = 16.5, 12.5$ Hz, H-2b), 2.16(1H, m, H-9a), 2.10(1H, m, H-6b), 2.02(1H, m, H-7), 1.79(3H, s, H-13), 1.78(3H, s, H-15), 1.75(1H, m, H-8a), 1.58(1H, m, H-8b), 1.36(1H, m, H-9b), 1.18(3H, s, H-14); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ :74.7(C-1), 42.6(C-2), 197.3(C-3), 129.8(C-4), 161.6(C-5), 33.0(C-6), 45.2(C-7), 26.7(C-8), 37.9(C-9), 41.4(C-10), 149.1(C-11), 109.6(C-12), 20.8(C-13), 16.4(C-14), 11.1(C-15)。以上数据与文献^[14]报道一致,故鉴定化合物 7 为 1 β -羟基- α -香附酮。

化合物 8 无色油状(甲醇);ESI-MS: m/z 261 $[M + Na]^+$,分子式 $C_{15}H_{26}O_2$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ :5.94(1H, dd, $J = 17.0, 10.5$ Hz, H-2), 5.38(1H, dd, $J = 17.0, 1.5$ Hz, H-1a), 5.20(1H, dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz, H-6), 5.18(1H, dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz, H-1b), 5.07(1H, ddd, $J = 7.0, 5.5, 1.5$ Hz, H-10), 4.63(1H, m, H-5), 2.07(2H, m, H-8), 1.98(2H, m, H-9), 1.83(1H, dd, $J = 14.5, 11.0$ Hz, H-4a), 1.68(3H, s, H-14), 1.63(3H, s, H-13), 1.59

(3H, s, H-12), 1.53 (1H, dd, $J = 14.5, 2.0$ Hz, H-4b), 1.23 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 112.7 (C-1), 144.2 (C-2), 74.1 (C-3), 47.1 (C-4), 67.4 (C-5), 127.6 (C-6), 138.1 (C-7), 39.5 (C-8), 26.5 (C-9), 123.9 (C-10), 131.9 (C-11), 25.8 (C-12), 17.8 (C-13), 16.7 (C-14), 30.2 (C-15)。以上数据与文献^[15]报道一致,故鉴定化合物 **8** 为 (*E*)-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene-3,5-diol。

化合物 9 无色油状 (甲醇); ESI-MS: m/z 277 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.94 (1H, dd, $J = 17.0, 10.5$ Hz, H-2), 5.57 (1H, dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz, H-9), 5.56 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-10), 5.38 (1H, dd, $J = 17.0, 1.5$ Hz, H-1a), 5.22 (1H, dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz, H-6), 5.17 (1H, dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz, H-1b), 4.63 (1H, m, H-5), 2.67 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, H-8), 1.84 (1H, dd, $J = 15.0, 11.0$ Hz, H-4a), 1.62 (3H, d, $J = 1.0$ Hz, H-14), 1.53 (1H, dd, $J = 15.0, 2.0$ Hz, H-4b), 1.31 (3H, s, H-12), 1.31 (3H, s, H-15), 1.28 (3H, s, H-13); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 112.8 (C-1), 114.0 (C-2), 74.2 (C-3), 47.0 (C-4), 67.3 (C-5), 128.3 (C-6), 136.7 (C-7), 42.2 (C-8), 124.4 (C-9), 140.2 (C-10), 70.8 (C-11), 30.3 (C-12), 30.3 (C-13), 16.7 (C-14), 30.0 (C-15)。以上数据与文献^[15]报道一致,故鉴定化合物 **9** 为 2,6,10-trimethyl-3,6,11-dodecatriene-2,8,10-triol。

化合物 10 无色油状 (甲醇); ESI-MS: m/z 197 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.68 (1H, s, H-10), 4.32 (1H, m, H-5), 2.46 (1H, m, H-6a), 1.98 (1H, m, H-6b), 1.78 (1H, m, H-4a), 1.78 (3H, s, H-7), 1.52 (1H, m, H-4b), 1.46 (3H, s, H-1), 1.27 (3H, s, H-2); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 26.6 (C-1), 27.1 (C-2), 36.1 (C-3), 45.7 (C-4), 66.9 (C-5), 47.4 (C-6), 36.1 (C-7), 86.9 (C-8), 172.1 (C-9), 113.0 (C-10), 182.7 (C-11)。以上数据与文献^[16]报道一致,故鉴定化合物 **10** 为黑麦草内酯。

化合物 11 无色油状 (甲醇); ESI-MS: m/z 169 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.44 (1H, s, H-7), 6.83 (1H, m, H-2), 2.51 (2H, m, H-6), 2.17 (2H, m, H-3), 2.05 (2H, m, H-5), 1.62 (1H, m, H-4), 1.21 (3H, s, H-9), 1.21 (3H, s, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 141.6 (C-

1), 151.2 (C-2), 28.2 (C-3), 44.9 (C-4), 22.3 (C-5), 22.8 (C-6), 194.0 (C-7), 72.5 (C-8), 27.1 (C-9), 27.3 (C-10)。以上数据与文献^[17]报道一致,故鉴定化合物 **11** 为 8-hydroxyphellandra。

化合物 12 无色油状 (甲醇); ESI-MS: m/z 209 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_2$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.53 (1H, dd, $J = 16.0, 10.0$ Hz, H-7), 6.10 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 5.63 (1H, br s, H-4), 4.27 (1H, s, H-3), 2.50 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-6), 2.26 (3H, s, H-10), 1.84 (1H, dd, $J = 13.5, 6.0$ Hz, H-2a), 1.62 (3H, s, H-13), 1.41 (1H, dd, $J = 13.5, 6.0$ Hz, H-2b), 1.03 (3H, m, H-11), 0.89 (3H, s, H-12); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 34.0 (C-1), 44.0 (C-2), 65.6 (C-3), 126.0 (C-4), 135.0 (C-5), 54.4 (C-6), 147.3 (C-7), 133.8 (C-8), 199.0 (C-9), 27.0 (C-10), 29.5 (C-11), 24.8 (C-12), 22.8 (C-13)。以上数据与文献^[18]报道一致,故鉴定化合物 **12** 为 (3*R*, 6*R*, 7*E*)-3-hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one。

化合物 13 无色油状 (甲醇); ESI-MS: m/z 245 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 2.55 (2H, m, H-8), 2.17 (3H, s, H-14), 2.13 (1H, m, H-1a), 2.06 (2H, m, H-2), 2.03 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-1b), 1.85 (1H, dd, $J = 9.5, 5.0$ Hz, H-10), 1.78 (1H, m, H-11), 1.73 (1H, ddd, $J = 10.0, 7.0, 3.5$ Hz, H-7a), 1.65 (1H, m, H-7b), 1.64 (1H, m, H-4), 0.91 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, H-12), 0.90 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13), 0.67 (1H, m, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 23.07 (C-1), 32.9 (C-2), 214.4 (C-3), 34.6 (C-4), 30.1 (C-5), 46.5 (C-6), 24.9 (C-7), 41.8 (C-8), 208.9 (C-9), 28.05 (C-10), 31.15 (C-11), 19.70 (C-12), 19.34 (C-13), 30.1 (C-14)。以上数据与文献^[19]报道一致,故鉴定化合物 **13** 为 saniculamoid D。

化合物 **1**~**13** 的化学结构见图 1。

2.2 化合物降糖活性筛选

从高山蓍的二氯甲烷部位中分离纯化得到化合物 **1**~**13**, 在棕榈酸诱导的 HepG2-IR 细胞模型上进行了细胞耗糖量的活性筛选。采用 CCK-8 试剂盒检测化合物 **1**~**13** (50 $\mu\text{mol/L}$) 和不同浓度棕榈酸的细胞毒性, 结果显示, 250 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸为 HepG2 细胞生存的最大剂量 (细胞活力 > 90%)。不同浓度 (0~350 $\mu\text{mol/L}$) 的棕榈酸处理可降低 HepG2 细胞的葡萄糖消耗, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的棕榈酸处

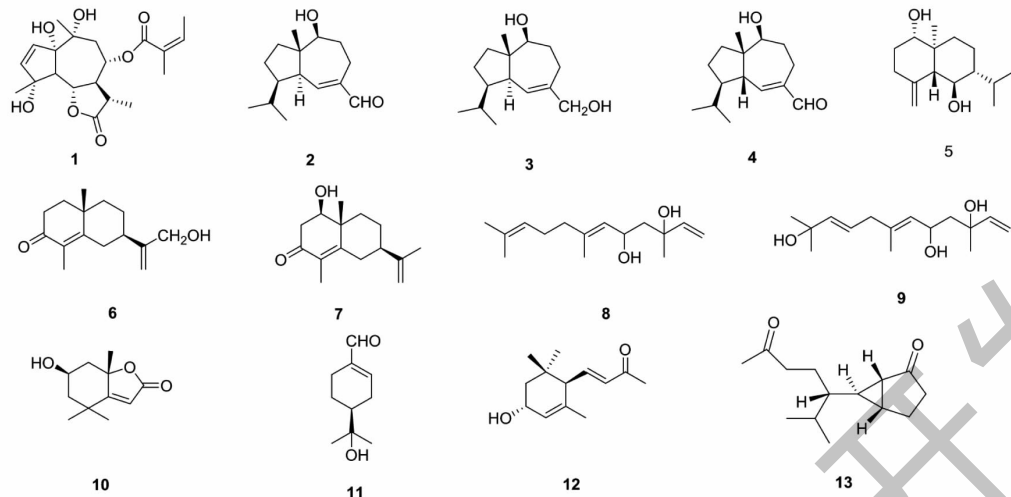


图1 化合物1~13的化学结构

Fig.1 The chemical structures of compounds 1-13

理可显著降低 HepG2 细胞的葡萄糖消耗(见表1)。化合物1~13(50 $\mu\text{mol/L}$)作用24 h,对 HepG2 细胞无明显的细胞毒性,并且对分离鉴定的13个化合物在棕榈酸(200 $\mu\text{mol/L}$)诱导的 HepG2-IR 细胞模型

上进行了细胞耗糖量的活性筛选(见表2),结果显示化合物5、9和10(50 $\mu\text{mol/L}$)具有良好的逆转胰岛素抵抗活性。

表1 不同浓度棕榈酸的细胞毒性和葡萄糖消耗量

Table 1 Cytotoxicity and glucose consumption in different concentrations of palmitic acid

浓度 Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	细胞活力 Cell viability (%)	葡萄糖消耗量 Glucose consumption (mmol/L)
0	100.0 \pm 2.9	4.72 \pm 0.10
1	100.2 \pm 3.1	4.49 \pm 0.11
10	99.0 \pm 2.7	3.89 \pm 0.14
100	97.3 \pm 3.0	3.51 \pm 0.14
200	96.2 \pm 3.7	2.46 \pm 0.08
250	92.4 \pm 1.4	2.42 \pm 0.12
350	82.9 \pm 0.8	2.20 \pm 0.13

注:每组数据均以三次独立的重复实验的平均值 \pm 标准差表示,下同。

Note: Each group of data was represented by the mean \pm SD value of three independent repeated experiments, the same below.

表2 化合物1~13的细胞毒性和葡萄糖消耗量

Table 2 Cytotoxicity and glucose consumption of compounds 1~13

化合物 Compound	浓度 Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	细胞活力 Cell viability (%)	葡萄糖消耗量 Glucose consumption (mmol/L)
1	50	89.1 \pm 2.5	2.88 \pm 0.13
2	50	89.8 \pm 2.2	2.79 \pm 0.25
3	50	87.5 \pm 3.5	2.15 \pm 0.12
4	50	91.2 \pm 2.4	2.01 \pm 0.27
5	50	95.7 \pm 6.0	4.18 \pm 0.08 **
6	50	88.7 \pm 0.9	2.46 \pm 0.11

续表 2(Continued Tab. 2)

化合物 Compound	浓度 Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	细胞活力 Cell viability (%)	葡萄糖消耗量 Glucose consumption (mmol/L)
7	50	85.9 \pm 9.0	2.67 \pm 0.09
8	50	93.2 \pm 2.2	2.69 \pm 0.23
9	50	94.9 \pm 3.1	3.28 \pm 0.09*
10	50	97.7 \pm 3.4	3.58 \pm 0.08**
11	50	87.5 \pm 0.5	2.59 \pm 0.11
12	50	98.3 \pm 1.6	2.60 \pm 0.08
13	50	88.1 \pm 2.6	2.50 \pm 0.21
CON	50	100.0 \pm 2.2	4.64 \pm 0.07
PA	200	96.2 \pm 3.7	2.24 \pm 0.23
ROSI	50	-	4.35 \pm 0.05

注:ROSI 为阳性对照。与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:ROSI is positive control. Compared with PA,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

3 结论

运用现代技术对菊科植物高山蓍的二氯甲烷部位进行提取分离,得到单体化合物 13 个。化合物 1~4、6、8 和 10~13 为首次从该属植物中分离得到,化合物 5、7 和 9 为首次从高山蓍中分离得到。并对这些化合物在 PA 诱导的 HepG2-IR 细胞模型上进行了细胞耗糖量的活性筛选,结果显示化合物 5、9 和 10 具有良好的逆转胰岛素抵抗活性,丰富了具有降糖活性的先导化合物的种类。经查阅高山蓍的相关文献,发现化学成分研究较少,药理方面对细胞毒性和降糖活性方面的研究极少。因此,我们对该植物进行提取分离得到单体化合物并进行降糖活性筛选,结果显示部分化合物具有明显的逆转胰岛素抵抗活性,对该植物的化学成分种类进行了丰富,并为后续学者探究其药理活性奠定基础。

参考文献

- 1 Qing X. Studies on chemical constituents and pharmacological activities of aboveground parts of *Achillea* [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University(河北医科大学),2016.
- 2 Jiang L, Wang P, Yang ZJ. Research progress of *Achillea kwangsiensis* in Xinjiang[J]. Farm Prod Process(农产品加工),2015:75-77.
- 3 Duan BY, Chen WL, Yu LX. Development and utilization of heat-clearing and detoxifying drug *Achillea*[J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med(长春中医药大学学报),2013,29:173-174.
- 4 Ali SI, Gopalakrishnan B, Venkatesalu V. Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea*

- millefolium* L. :a review [J]. Phytother Res,2017,31:1140-1161.
- 5 Karamenderes C, Apaydin S. Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. Schwarz) Bässler on the rat isolated duodenum[J]. J Ethnopharmacol,2003,84:175-179.
- 6 Li YL. The value of "God Grass" *Achillea* [J]. South Chin Agric(南方农业),2011,5:52-54.
- 7 Gusek SG. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s. l. on isolated guinea-pig ilea[J]. Arzneimittel-Forsch,2006,56:582-588.
- 8 Song H, Niu QC, Li YP. Induction of HepG2 insulin resistant cell model and its application in bioactivity evaluation[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:1469-1475.
- 9 Jakupovic J, Boeker R, Grenz M, et al. Highly oxygenated guaianolides from *Otanthus maritimus* [J]. Phytochemistry, 1988,27:1135-1140.
- 10 Liu HB, Zhang CR, Dong SH, et al. Sesquiterpenes from *Dysoxylum oliganthum* and *Dysoxylum excelsum* [J]. J Asian Nat Prod Res,2012,14:224-234.
- 11 Liu HB, Zhang CR, Dong SH, et al. Sesquiterpenes from *Dysoxylum oliganthum* and *Dysoxylum excelsum* [J]. J Asian Nat Prod Res,2012,14:224-234.
- 12 Nagashima F, Kishi K, Hamada Y, et al. *ent*-Verticillane-type diterpenoids from the Japanese liverwort *Jackiella javanica* [J]. Phytochemistry,2005,66:1662-1670.
- 13 Jakupovic J, Klemeyer H, Bohlmann F, et al. Glaucolides and guaianolides from *Artemisia afra* [J]. Phytochemistry, 1988, 27:1129-1133.