

• 化学成分 •

牛蒡根中咖啡酸类化学成分及其神经保护活性研究

白俊鹏^{1,2}, 胡晓龙², 蒋晓文², 田 星², 赵庆春^{1*}

1. 沈阳军区总医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110840

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

摘 要: 目的 研究牛蒡 *Arctium lappa* 根中咖啡酸类化学成分及其神经保护活性。方法 采用硅胶、C₁₈ 反相硅胶、Sephadex LH-20、AB-8 大孔树脂柱色谱以及制备 HPLC 等方法对咖啡酸类化合物及类似物进行分离纯化, 通过波谱学方法鉴定其结构, 并采用 MTT 法对分离得到的化合物进行抗谷氨酸诱导神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株神经损伤的活性评价。结果 从牛蒡根 55%乙醇提取物中分离得到 8 个咖啡酸类化合物, 分别鉴定为 1,5-*O*-二咖啡酰-3-*O*-(4-苹果酸甲酯)-奎宁酸 (1)、3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (2)、3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (3)、4,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (4)、(2*E*)-1,4-dimethyl-2-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-butenedioic acid (5)、绿原酸甲酯 (6)、咖啡酸甲酯 (7)、3,4,3',4'-tetrahydroxy- δ -truxinate (8), 经活性测试发现此类化合物均具有较好的神经保护活性。结论 牛蒡根的抗谷氨酸诱导神经损伤的活性与其含有的咖啡酸类化合物有关; 化合物 1 为新化合物, 化合物 5 为新天然产物, 化合物 2~4、6、7 为首次从该植物中分离得到, 化合物 8 为首次从该属植物中分离得到。

关键词: 牛蒡; 咖啡酸类; 神经保护; 1,5-*O*-二咖啡酰-3-*O*-(4-苹果酸甲酯)-奎宁酸; 绿原酸甲酯

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)02-0163-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.002

Caffeic acids from roots of *Arctium lappa* and their neuroprotective activityBAI Jun-peng^{1,2}, HU Xiao-long², JIANG Xiao-wen², TIAN Xing², ZHAO Qing-chun¹

1. Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110840, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To investigate the caffeic acid compounds from the roots of *Arctium lappa* and their neuroprotective activity. **Methods** The compounds were isolated by column chromatography over silica gel, octadecylsilane (ODS) chemically bonded silica gel, Sephadex LH-20, and AB-8 macroporous resin coupled with preparative HPLC. Their structures were elucidated by spectroscopic analysis and their neuroprotective activity against glutamate-induced neurotoxicity was evaluated in SH-SY5Y cells by MTT assay. **Results** Eight caffeic acid compounds were isolated from the roots of *A. lappa*, which were identified as 1,5-*O*-dicafeoyl-3-*O*-(4-malic acid methyl ester)-quinic acid (1), 3,5-*O*-dicafeoyl-quinic acid methyl ester (2), 3,4-*O*-dicafeoyl-quinic acid methyl ester (3), 4,5-*O*-dicafeoyl-quinic acid methyl ester (4), (2*E*)-1,4-dimethyl-2-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-butenedioic acid (5), chlorogenic acid methyl ester (6), caffeic acid methyl ester (7), and 3,4,3',4'-tetrahydroxy- δ -truxinate (8). *In vitro*, these compounds showed the neuroprotective activity against glutamate-induced neurotoxicity on different levels. **Conclusion** The neuroprotective activity of the roots in *A. lappa* against glutamate-induced neurotoxicity is related to the caffeic acid compounds. Compound 1 is a new compound; Compound 5 is a new natural compound; Compounds 2—4 and 6—7 are isolated from *A. lappa* for the first time; Compound 8 is isolated from the plants of *Arctium* L. for the first time.

Key words: *Arctium lappa* L.; caffeic acid compounds; neuroprotective activity; 1,5-*O*-dicafeoyl-3-*O*-(4-malic acid methyl ester)-quinic acid; chlorogenic acid methyl ester

收稿日期: 2014-10-09

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2014ZX09J14101-05C)

作者简介: 白俊鹏, 男, 硕士研究生, 从事天然药物化学研究。E-mail: baijunpeng510@126.com

*通信作者 赵庆春, 男, 博士生导师, 研究方向为中药及天然产物物质基础研究和基于靶点的抗肿瘤天然产物研究。

Tel: (024)28856205 E-mail: Zhaoqingchun1967@163.com

牛蒡 *Arctium lappa* L. 为菊科 (Compositae) 牛蒡属 *Arctium* L. 两年生草本植物, 又名“恶实”、白肌人参或蒺藜菜等, 其果实、根和叶均可作为药用, 同时又是重要的经济作物, 在我国各地均有分布。牛蒡子为《中国药典》2010年版收载常用中药, 用于治疗风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛等症^[1]。目前国内外对牛蒡根的研究与应用尚局限, 没有形成中药类的商品, 也未收入药典, 多作为牛蒡子的副产品而废弃不用。本课题组前期发现牛蒡根经乙醇提取后的醋酸乙酯萃取物对谷氨酸诱导的神经损伤具有较好的保护活性^[2]。在此基础上, 为了进一步探究牛蒡根醋酸乙酯萃取物的化学成分, 对其进行系统提取分离, 从中分离鉴定了 8 个咖啡酸类化合物, 分别为 1,5-*O*-dicaffeoyl-3-*O*-(4-malic acid methyl ester)-quinic acid (**1**)、3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯(3,5-*O*-dicaffeoyl-quinic acid methyl ester, **2**)、3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯(3,4-*O*-dicaffeoyl-quinic acid methylester, **3**)、4,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯(4,5-*O*-dicaffeoyl-quinic acid methyl ester, **4**)、(2*E*)-1,4-dimethyl-2-[(4-hydroxyphenyl) methyl]-2-butenedioic acid (**5**)、绿原酸甲酯(chlorogenic acid methyl ester, **6**)、咖啡酸甲酯(caffeic acid methyl ester, **7**)、3,4,3',4'-tetrahydroxy- δ -truxinate (**8**)。结构见图 1。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **5** 为新天然产物, 化合物 **2~4**、**6**、**7** 为首次从该植物中分离得到, 化合物 **8** 为首次从该属植物中分离得到。体外活性测试发现, 此类化合物均有不同程度的神经保护活性。其中化合物 **1**、**2**、**5** 活性较好, 在 15 $\mu\text{mol/L}$ 给药浓度下神经保护率分别达到 48.86%、40.79%、39.31%。

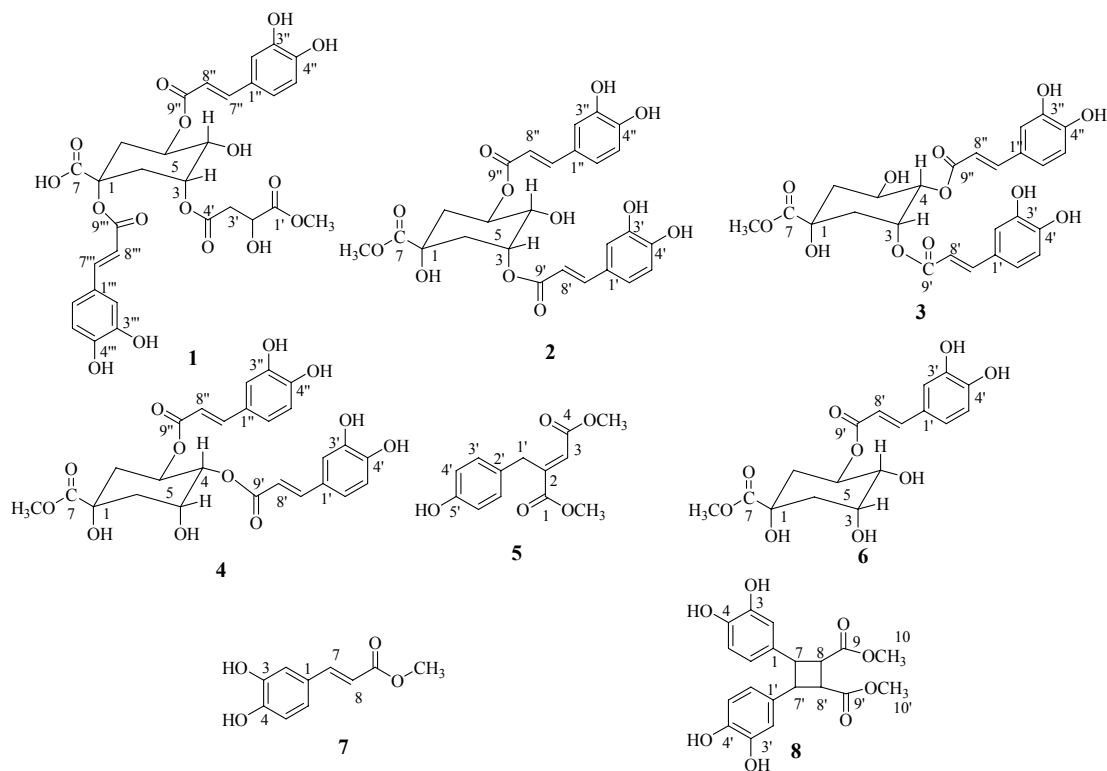


图 1 化合物 1~8 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1—8

1 仪器与材料

JASCO 制备型高效液相色谱仪, 加压机 PU-2087 Pump, 紫外检测器 SPD-10AV, 日本分光株式会社; 核磁共振光谱仪 Bruker ARX-300, 瑞士 Bruker 公司; EYELA-N1000、N1100 旋转蒸发仪, 日本东京理化; CO₂ 培养箱, 日本 SANYO 公司;

水平层流洁净工作台, 上海上净净化设备有限公司; 倒置显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; 低/高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 酶标仪, 伯乐生命医学产品有限公司; 紫外线分析灯, 德国 HERUENS 公司; SHIMADZU AUW120D 十万分之一分析天平, 日本 Shimadzu 公司; HH-D4 数显恒温水浴锅,

丹瑞公司; 制备反相色谱柱 YMC-Pack Pro ODS-A C₁₈ (250 mm×10 mm, 10 μm)、反相色谱硅胶 ODS (50 μm), 日本 YMC 公司; 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 及柱色谱硅胶 (100~140、200~300 目), 青岛海洋化工厂; 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20, 美国 Amersham Bioscience 公司; 柱色谱 MCI GEL CHP20p, 日本 YMC 公司; 色谱甲醇, 天津四友公司; 色谱乙腈, 美国 Fisher Scientific 公司; DMEM 培养液, 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; 胰酶, 美国 Sigma 公司; EDTA, 美国 Sino 公司; 台盼蓝, 美国 AmershamBioscience 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), 美国 Sigma 公司; 重蒸水, 实验室自制。

牛蒡根药材于 2012 年 9 月购自辽宁省沈阳市四方药店, 经沈阳药科大学路金才教授鉴定为菊科牛蒡属植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥根, 标本 (BJP2012AL) 保存于沈阳军区总医院药剂科标本室。

2 提取与分离

干燥牛蒡根 10.0 kg, 粉碎, 用 100 L 55%乙醇浸泡 12 h 后, 加热回流提取 3 次, 第 1 次 2 h, 后 2 次各 1 h, 减压回收溶剂得浸膏。将该浸膏分散于水中, 依次用石油醚 (30~60 °C)、二氯甲烷、醋酸乙酯和正丁醇溶剂各萃取 3 次。合并萃取液, 减压回收溶剂后得石油醚部位 6 g、二氯甲烷部位 56 g、醋酸乙酯部位 255 g 和正丁醇部位 874 g。

对醋酸乙酯部位 (240 g) 进行硅胶柱色谱分离, 采用二氯甲烷-甲醇 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 得到 15 组分 Fr. 1~15。对 Fr. 12 (25.5 g) 进行 ODS 中低压柱色谱, 采用甲醇-水 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 得到 17 个组分 Fr. 12-1~12-17。对 Fr. 12-9 与 Fr. 12-10 合并后 (1.15 g) 进行 MCI gel 柱色谱, 采用甲醇-水 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 得到 11 个组分。其中 Fr. 12-9-9 (0.20 g) 经制备 HPLC 分离 (41%甲醇-水, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 1 (97.0 mg); Fr. 12-9-8 (0.16 g) 经制备 HPLC 分离 (41%甲醇-水, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 7 (12.0 mg)。

Fr. 12-14 (2.2 g) 经制备 HPLC 分离 (45%甲醇-水, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 2 (238.0 mg)、4 (19.0 mg)。Fr. 12-15 (1.6 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (50:50) 为洗脱剂, 得到 13 个组分。其中组分 Fr. 12-15-10 (80 mg) 经制备 HPLC 分离 (46%甲醇-水, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 2 (13.0 mg) 和化合物 3 (7.0 mg)。

Fr. 12-8 (4.6 g) 经 ODS 开放柱色谱分离, 采用甲醇-水 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 得到 12 个组分。其中组分 Fr. 12-8-4 (0.48 g) 经制备 HPLC 分离 (45%甲醇-水, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 7 (34.5 mg)、8 (18.5 mg)。

Fr. 11 (12.6 g) 经 AB-8 大孔树脂柱色谱分离, 采用乙醇-水 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 得到 12 个组分。其中组分 Fr. 11-4 (0.12 g) 经制备 HPLC 分离 (46%甲醇-水, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 5 (8.5 mg)。Fr. 13 (9.8 g) 经 ODS 常压柱色谱分离, 采用甲醇-水 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 得到 22 个组分。其中组分 Fr. 13-8 (0.22 g) 经制备 HPLC 分离 (25%甲醇-水, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 6 (167.00 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末 (甲醇), 365 nm 下显蓝色荧光, 三氯化铁反应显墨绿色。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 330, 300, 243。HR-ESI-MS m/z : 645.148 3 [M-H]⁻, 理论计算值为 645.146 1, 故确定其相对分子质量为 646, 分子式为 C₃₀H₃₀O₁₆。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) 谱中, δ 7.62, 7.61 (各 1H, d, J = 15.8 Hz), δ 6.36, 6.31 (各 1H, d, J = 15.8 Hz) 为 2 组反式双键氢信号; δ 7.10, 7.07 (各 1H, d, J = 1.9 Hz), δ 7.01, 6.97 (各 1H, dd, J = 8.2, 1.9 Hz), δ 6.81, 6.79 (各 1H, d, J = 8.2 Hz) 为 2 组 ABX 耦合的芳香氢信号; δ 3.56 (3H, s) 为甲氧基氢信号。¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) 谱中, 结合氢谱可确定 2 个反式双键片段、2 个酯羰基片段和 2 个 1,2-二羟基-4-取代苯片段碳信号。HMBC 谱中, 2 组反式双键氢信号 δ 7.62, 7.61 (各 1H, d, J = 15.8 Hz), δ 6.36, 6.31 (各 1H, d, J = 15.8 Hz) 与 δ 168.6, 167.7 (C-9'', 9''') 存在相关, 提示双键一端与酯羰基相连; 同时与 δ 127.7, 127.6 (C-1'', 1'''), δ 123.3, 123.1 (C-6'', 6'''), δ 115.3, 115.2 (C-2'', 2''') 存在相关, 提示双键另一端与 1,2-二羟基-4-取代苯环相连。由此可知该分子含有 2 个咖啡酰基。HMBC 谱中, δ 3.56 (3H, s, 1'-OCH₃) 与 δ 174.9 (C-1') 相关; δ 4.47 (1H, m, H-2') 与 δ 40.3 (C-3'), δ 174.9 (C-1'), δ 171.3 (C-3') 分别相关; δ 2.72 (2H, m, H-3') 与 δ 68.2 (C-2'), δ 174.9 (C-1'), δ 171.3 (C-3') 分别相关。由此推测该分子中含有苹果酸甲酯。¹³C-NMR 谱中, 剩余 7 个碳为一组奎宁酸碳信号。低场区 δ 5.43 (1H, m, H-5), δ 5.46 (1H, m, H-3) 提示奎宁酸 3-OH 和

5-OH 被取代。C-1 位信号 δ 80.5 较奎宁酸母环向低场位移, 结合前面推出的 2 个咖啡酰基和 1 个苹果酸甲酯, 推测该化合物为 1,3,5-三取代奎宁酸类化合物。HMBC 谱中, δ 5.43 (1H, m, H-5) 与 δ 168.6 (C-9'') 存在远程相关, 提示 1 个咖啡酰基为 C-5 取代; δ 5.46 (1H, m, H-3) 与 δ 171.6 (C-4') 存在远程相关, 提示苹果酸甲酯为 C-3 取代; 则另 1 个咖啡

酰基为 C-1 取代。将该化合物氢谱、碳谱数据与文献中报道的 1,5-*O*-dicaffeoyl-3-*O*-(4-maloyl)-quinic acid^[3]对比发现, 仅多出 1 个甲氧基的碳氢信号外, 其他数据基本一致。综上所述, 鉴定化合物 **1** 为 1,5-*O*-二咖啡酰-3-*O*-(4-苹果酸甲酯)-奎宁酸, 经 SciFinder 查询确定该化合物是 1 个未见报道的新化合物, 具体碳氢信号归属见表 1。

表 1 化合物 **1** 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据
Table 1 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data of compound **1**

碳位	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
1	80.5	—	—
2	32.7	2.78 (1H, m) 2.45 (1H, dd, $J = 15.5, 3.0$ Hz)	C-1 C-1
3	73.2	5.46 (1H, m)	C-4, 5, 4'
4	71.7	3.95 (1H, dd, $J = 9.4, 3.5$ Hz)	C-5
5	71.0	5.43 (1H, m)	C-3, 4, 9''
6	37.9	2.00 (1H, dd, $J = 13.3, 10.4$ Hz) 2.63 (1H, m)	C-4, 5, 7 C-1, 2, 4, 5, 7
7	173.9	—	—
1'	174.9	—	—
2'	68.2	4.47 (1H, m)	C-1', 3', 4'
3'	40.3	2.72 (2H, m)	C-1', 2', 4'
4'	171.3	—	—
1'-OCH ₃	52.8	3.56 (3H, s)	C-1'
1'', 1'''	127.6, 127.7	—	—
2'', 2'''	115.2, 155.3	7.10, 7.07 (各 1H, d, $J = 1.9$ Hz)	C-3'', 3''', 4'', 4''', 6'', 6''', 7'', 7'''
3'', 3'''	146.7, 146.8	—	—
4'', 4'''	149.6, 149.8	—	—
5'', 5'''	116.5, 116.6	6.81, 6.79 (各 1H, d, $J = 8.2$ Hz)	C-1'', 1''', 2'', 2''', 3'', 3''', 4'', 4'''
6'', 6'''	123.1, 123.3	7.01, 6.97 (各 1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz)	C-2'', 2''', 4'', 4''', 5'', 5''', 7'', 7'''
7'', 7'''	147.4, 148.0	7.62, 7.61 (各 1H, d, $J = 15.8$ Hz)	C-2'', 2''', 6'', 6''', 8'', 8''', 9'', 9'''
8'', 8'''	114.9, 115.0	6.36, 6.31 (各 1H, d, $J = 15.8$ Hz)	C-1'', 1''', 7'', 7''', 9'', 9'''
9'', 9'''	167.7, 168.6	—	—

化合物 **2**: 淡黄色无定形粉末 (甲醇), 365 nm 下显蓝色荧光, 三氯化铁反应显墨绿色。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.61, 7.54 (各 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7', 7''), 7.06 (2H, brs, H-2', 2''), 6.96 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5', 5''), 6.78 (2H, m, H-6', 6''), 6.34, 6.21 (各 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8', 8''), 5.39 (1H, m, H-5), 5.30 (1H, m, H-3), 3.97 (1H, m, H-4), 3.68 (3H, s, 7-OCH₃), 2.32 (2H, m, H-2ex, 6ex), 2.15 (2H, m, H-2ax, 6ax); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD₃OD) δ : 175.6 (C-7), 168.7, 168.0 (C-9', 9''), 149.8, 149.6 (C-4', 4''), 147.4, 147.1 (C-7', 7''), 146.9, 146.8 (C-3', 3''), 127.9,

127.6 (C-1', 1''), 123.1, 123.0 (C-6', 6''), 116.6, 116.5 (C-5', 5''), 115.5, 114.9 (C-8', 8''), 115.0, 115.0 (C-2', 2''), 74.6 (C-1), 72.2 (C-5), 72.0 (C-3), 69.7 (C-4), 53.0 (7-OCH₃), 36.7 (C-6), 35.6 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 故鉴定化合物 **2** 为 3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **3**: 淡黄色无定形粉末 (甲醇), 365 nm 下显蓝色荧光, 三氯化铁反应显墨绿色。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.61, 7.51 (各 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7', 7''), 7.04, 7.01 (2H, brs, H-2', 2''), 6.93 (2H, m, H-5', 5''), 6.76 (2H, brs, H-6', 6''), 6.31, 6.18 (各

1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8', 8''), 5.53 (1H, m, H-3), 5.15 (1H, m, H-4), 4.34 (1H, m, H-5), 3.72 (3H, s, 7-OCH₃), 2.34 (1H, m, H-6ax), 2.26 (1H, m, H-2ex), 2.26 (1H, m, H-2ax), 2.80 (1H, dd, $J = 13.8, 6.0$ Hz, H-6ex); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 175.2 (C-7), 168.5, 168.0 (C-9', 9''), 149.8, 149.7 (C-4', 4''), 147.7, 147.6 (C-7', 7''), 146.8, 146.8 (C-3', 3''), 127.7, 127.5 (C-1', 1''), 123.1, 123.1 (C-6', 6''), 116.5, 116.5 (C-5', 5''), 115.2, 115.2 (C-2', 2''), 114.7, 114.6 (C-8', 8''), 75.8 (C-1), 74.9 (C-4), 69.1 (C-3), 68.6 (C-5), 53.1 (7-OCH₃), 38.6 (C-2), 38.4 (C-6)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物 **3** 为 3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **4**: 淡黄色无定形粉末 (甲醇), 365 nm 下显蓝色荧光, 三氯化铁反应显墨绿色。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.59, 7.50 (各 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7', 7''), 7.02, 7.00 (各 1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2', 2''), 6.92, 6.90 (各 1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-5', 5''), 6.78, 6.76 (各 1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6', 6''), 6.29, 6.16 (各 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8', 8''), 5.53 (1H, m, H-5), 5.10 (1H, dd, $J = 8.0, 2.8$ Hz, H-4), 4.34 (1H, m, H-3), 3.72 (3H, s, 7-OCH₃), 2.23~2.34 (2H, m, H-6), 1.95~2.23 (2H, m, H-2); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 175.2 (C-7), 168.5, 168.0 (C-9', 9''), 149.8, 149.7 (C-4', 4''), 147.7, 147.7 (C-7', 7''), 146.8, 146.8 (C-3', 3''), 127.7, 127.5 (C-1', 1''), 123.1, 123.1 (C-6', 6''), 116.5, 116.5 (C-5', 5''), 115.2, 115.2 (C-8', 8''), 114.7, 114.6 (C-2', 2''), 75.8 (C-1), 74.6 (C-4), 69.1 (C-5), 68.6 (C-3), 53.1 (7-OCH₃), 38.6 (C-6), 38.4 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **4** 为 4,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **5**: 棕色粉末 (甲醇), UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 203。HR-ESI-MS m/z : 249.080 7 [M-H]⁻, 理论计算值为 249.076 8, 故确定其相对分子质量为 250, 分子式为 C₁₃H₁₄O₅。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.00 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 7'), 6.73 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4', 6'), 5.76 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-3), 3.57 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-1'), 3.69 (3H, s, 1-OCH₃), 3.68 (3H, s, 4-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 170.5 (C-1), 167.1 (C-4), 157.7 (C-5'), 151.6 (C-2), 131.4 (C-3', 7'), 127.6 (C-2'), 121.4 (C-3), 115.5 (C-4', 6'), 52.7 (1-OCH₃), 52.3 (4-OCH₃), 40.3 (C-1')。NOESY 谱中, δ 5.76 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-3) 与 δ 3.69 (3H, s,

1-OCH₃) 相关, 提示 C-2 与 C-3 是反式双键。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **5** 为 (2*E*)-1,4-dimethyl-2-[(4-hydroxyphenyl) methyl]-2-butenedioic acid, 经 SciFinder 查询发现, 化合物 **5** 为新天然产物。

化合物 **6**: 淡黄色无定形粉末 (甲醇), 365 nm 下显蓝色荧光, 三氯化铁反应显墨绿色。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.53 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 7.02 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.22 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 5.29 (1H, m, H-5), 4.15 (1H, m, H-3), 3.75 (1H, m, H-4), 3.67 (3H, s, 7-OCH₃), 2.21 (2H, m, H-2ex, 6ex), 2.01 (2H, m, H-2ax, 6ax); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 175.4 (C-7), 168.3 (C-9'), 149.5 (C-4'), 147.1 (C-7'), 146.7 (C-3'), 127.5 (C-1'), 123.0 (C-6'), 116.5 (C-5'), 115.1 (C-8'), 115.0 (C-2'), 75.8 (C-1), 72.6 (C-3), 72.0 (C-4), 70.4 (C-5), 53.0 (7-OCH₃), 37.9 (C-6), 37.8 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[8-9], 故鉴定化合物 **6** 为绿原酸甲酯。

化合物 **7**: 棕色粉末 (甲醇)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.03 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.26 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 3.75 (3H, s, 9-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **7** 为咖啡酸甲酯。

化合物 **8**: 淡黄色油状物 (甲醇)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.70 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5, 5'), 6.69 (2H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2, 2'), 6.58 (2H, dd, $J = 8.0, 2.2$ Hz, H-6, 6'), 3.71 (6H, s H-10, 10'), 3.39 (2H, m, H-7, 7'), 3.29 (2H, m, H-8, 8'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 174.8 (C-9, 9'), 146.4 (C-3, 3'), 145.5 (C-4, 4'), 134.2 (C-1, 1'), 119.2 (C-6, 6'), 116.4 (C-5, 5'), 114.9 (C-2, 2'), 52.6 (C-10, 10'), 45.9 (C-8, 8')。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **8** 为 3,4,3',4'-tetrahydroxy- δ -truxinate。

4 体外神经保护活性测试

采用谷氨酸诱导神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株损伤模型, 以 MTT 法对化合物 **1~8** 进行神经保护活性测定。取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 接种于 96 孔培养板中, 细胞密度为 1×10^5 个/mL, 每孔加入 100 μ L, 置于培养箱中培养 24 h。然后分别给予化合物 **1~8** 使其终浓度为 5、10 和 15 μ mol/L,

每个浓度 6 个复孔, 置于培养箱中培养 4 h 后, 再给予 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸损伤培养 24 h。最后每孔再加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL , 培养箱中孵育 4 h。弃去上清, 每孔加入 150 μL DMSO 震荡 10 min, 在 490 nm 处测定吸光度 (A) 值。按照下列公式计算神经保护率。

$$\text{神经保护率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{损伤}})$$

MTT 测试结果 (表 2) 表明化合物 1~8 在 5、10 和 15 $\mu\text{mol/L}$ 给药浓度下均表现不同程度的神经保护活性且具有较好的剂量依赖性。其中化合物 1、2、5 活性较好, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 给药浓度下神经保护率分别为 33.41%、19.21%、22.27%; 而在 15 $\mu\text{mol/L}$ 给药浓度下神经保护率可分别达到 48.86%、40.79%、39.31%。上述结论与本课题组前期发现牛蒡根经乙醇提取后的醋酸乙酯萃取物对谷氨酸诱导的神经损伤具有较好保护活性的结论相一致^[2], 因此推测牛蒡根中神经保护活性物质可能与咖啡酸类化合物及其类似物有关。

表 2 化合物 1~8 的神经保护活性测定结果
Table 2 Neuroprotective activity of compounds 1—8

化合物	神经保护率/%		
	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1	28.41	33.41	48.86
2	7.89	19.21	40.79
3	6.05	10.29	12.89
4	9.73	16.32	30.00
5	12.64	22.27	39.31
6	7.14	13.65	21.33
7	5.14	12.56	14.78
8	8.35	20.73	33.96

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Tian X, Sui S, Huang J, *et al.* Neuroprotective effects of *Arctium lappa* L. roots against glutamate-induced oxidative stress by inhibiting phosphorylation of p38, JNK and ERK 1/2 MAPKs in PC12 cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(1): 189-198.
- [3] Zhou X W, Liu D, Liu Y, *et al.* Isolation and characterization of two new phenolic acids from cultured cells of *Saussurea involucre* [J]. *Phytochem Lett*, 2014, 7(1): 133-136.
- [4] Kim S H, Jang Y P, Sung S H, *et al.* Hepatoprotective dibenzylbutyrolactone lignans of *Torreya nucifera* against CCl_4 -induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(8): 1202-1205.
- [5] 翁裕馨, 陈湘宏, 刘占厚, 等. 细毡毛忍冬叶绿原酸类化学成分研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16566-16568.
- [6] Maha A E, Ei-Lakany A M, Abdel-Kader M S, *et al.* New quinic acid derivatives from hepatoprotective *Inula crithmoides* root extract [J]. *Helv Chim Acta*, 2012, 95(1): 61-66.
- [7] Toshima H, Saito M, Yoshihara T. Total syntheses of all four stereoisomers of piscidic acid via catalytic asymmetric dihydroxylation of (*Z*)- and (*E*)-trisubstituted olefins [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(11): 1934-1941.
- [8] Chang S W, Kim K H, Lee I K, *et al.* Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis* [J]. *Nat Prod Sci*, 2009, 15(4): 234-240.
- [9] 汤 丹, 李会军, 钱正明, 等. 黄褐毛忍冬花蕾咖啡酰奎宁酸类成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(20): 1537-1539.
- [10] Deng Y, Chin Y W, Chai H B, *et al.* Phytochemical and bioactivity studies on constituents of the leaves of *Vitex quinata* [J]. *Phytochem Lett*, 2011, 3(4): 213-217.