

热毒宁注射液化学成分研究 (II)

李海波^{1,2,3}, 于 洋³, 王振中^{1,2}, 梅玉丹³, 秦大鹏³, 李 林³, 萧 伟^{1,2*}, 姚新生^{3*}

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

3. 暨南大学药学院中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632

摘 要: 目的 研究中药复方热毒宁注射液化学成分。方法 综合应用硅胶、ODS、Sephadex LH-20 和 Toyopearl HW-40 柱色谱以及反相 MPLC、HPLC 等现代色谱技术进行分离和纯化, 根据化合物的光谱数据和理化性质鉴定化合物结构, 并通过观察细胞病变效应 (CPE) 和检测细胞存活率的方法, 对分离得到的咖啡酰奎宁酸类化合物进行了体外抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 作用研究。结果 从热毒宁注射液中分离得到 16 个化合物, 分别鉴定为 5-*O*-咖啡酰奎宁酸 (1)、5-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯 (2)、4-*O*-咖啡酰奎宁酸 (3)、4-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯 (4)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (5)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (6)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (7)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (8)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (9)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (10)、断马钱子酸 (11)、马钱子苷半缩醛内酯 (12)、7-表-马钱子苷半缩醛内酯 (13)、*E*-aldosecologanin (14)、*Z*-aldosecologanin (15)、5*H*,8*H*-pyrano [4,3-*d*] thiazolo [3,2-*a*] pyridine-3-carboxylic acid (16)。化合物 1~10 具有较强的体外抗 RSV 的效果, 其中化合物 1~4 的 EC₅₀ 值在 10~30 μmol/L, 选择指数 (SI) 大于 30; 化合物 5~10 的 EC₅₀ 值小于 10 μmol/L, SI 大于 100。结论 化合物 1~16 均为首次从热毒宁注射液中分离得到, 咖啡酰奎宁酸类化合物可能为热毒宁注射液抗病毒的主要药效物质基础之一。

关键词: 热毒宁注射液; 抗病毒; 咖啡酰奎宁酸; 5-*O*-咖啡酰奎宁酸; 断马钱子酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)11-1597-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.11.006

Study on chemical constituents from Re-Du-Ning Injection (II)

LI Hai-bo^{1,2,3}, YU Yang³, WANG Zhen-zhong^{1,2}, MEI Yu-dan³, QIN Da-peng³, LI Lin³, XIAO Wei^{1,2}, YAO Xin-sheng³

1. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

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

3. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: **Objective** To investigate the chemical constituents from Re-Du-Ning Injection (RDN). **Methods** The chemical constituents were isolated by chromatography on silica gel, ODS, Sephadex LH-20, and Toyopearl HW-40 columns and reverse phase MPLC and HPLC repeatedly. Their structures were identified by spectral data and physicochemical property. **Results** Sixteen compounds were isolated and identified as 5-*O*-caffeoylquinic acid (1), 5-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (2), 4-*O*-caffeoylquinic acid (3), 5-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (4), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (5), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (6), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (8), 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid (9), 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (10), secologanic acid (11), vogeloside (12), 7-*epi*-vogeloside (13), *E*-aldosecologanin (14), *Z*-aldosecologanin (15), and 5*H*,8*H*-pyrano [4,3-*d*] thiazolo [3,2-*a*] pyridine-3-carboxylic acid (16). Compounds 1—10 showed high efficiency and low toxicity with antiviral activity against RSV. **Conclusion** All the isolated compounds are reported from RDN Injection for the first time, and caffeoylquinic acids may be one of antiviral pharmacodynamic material bases of RDN.

Key words: Re-Du-Ning Injection; antiviral; caffeoylquinic acid; 5-*O*-caffeoylquinic acid; secologanic acid

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 江苏省自然科学基金: 基于活性成分追踪分离及快速检识分析新策略的中药复方药效物质基础研究 (BK20140441); 江苏省博士后科研资助计划 (1401171C)

作者简介: 李海波 (1985—), 女, 福建宁德人, 博士, 研究方向为中药及天然药物的活性成分研究。E-mail: lihaibo1985124@sina.com

*通信作者 萧 伟, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: xw_kanion@163.com

姚新生, 中国工程院院士, 博士生导师, 研究方向为中药及天然药物活性成分研究。Tel: (020)85225849 E-mail: tyaoxs@jnu.edu.cn

热毒宁注射液是江苏康缘药业股份有限公司自主研发的原国家中药二类新药,属中药复方注射液,由栀子、青蒿和金银花3味中药精制而成,具有清热、疏风、解毒的功效,临床上主要用于治疗外感风热所致的感冒、咳嗽、上呼吸道感染、急性支气管炎等症^[1-3]。其临床疗效确切,效果显著,前期报道从热毒宁注射液抗病毒活性部位(95%乙醇洗脱部位)中分离鉴定20个化合物,并对黄酮类化合物进行了体外抗病毒活性评价,结果显示木犀草素具有较强的体外抗甲型流感病毒的活性^[4]。热毒宁注射液正丁醇萃取部位的HPLC液相图谱涵盖了热毒宁注射液的主要色谱峰,为了全面阐释热毒宁注射液中的化学成分,并对注射液指纹图谱中的色谱峰进行指认,本实验拟对热毒宁注射液正丁醇部位的化学成分进行研究,从中分离得到16个化合物,分别鉴定为5-*O*-咖啡酰奎宁酸(5-*O*-caffeoylquinic acid, **1**)、5-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯(5-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **2**)、4-*O*-咖啡酰奎宁酸(4-*O*-caffeoylquinic acid, **3**)、4-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯(5-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **4**)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸(4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, **5**)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **6**)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸(3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, **7**)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **8**)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸(3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, **9**)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **10**)、断马钱子酸(secologanic acid, **11**)、马钱子苷半缩醛内酯(vogeloside, **12**)、7-表马钱子苷半缩醛内酯(7-*epi*-vogeloside, **13**)、*E*-aldosecologanin (**14**)、*Z*-aldosecologanin (**15**)、5*H*,8*H*-pyrano [4,3-*d*] thiazolo [3,2-*a*] pyridine-3-carboxylic acid (**16**)。所有化合物均为首次从热毒宁注射液中分离得到,采用观察细胞病变效应(CPE)和检测细胞存活率的方法^[5]对咖啡酰奎宁酸类化合物进行体外抗呼吸道合胞病毒(RSV)的活性评价,结果显示该类化合物具有较强的体外抗RSV的效果,其中化合物**1**~**4**的EC₅₀值在10~30 μmol/L,选择指数(SI)大于30;化合物**5**~**10**的EC₅₀值小于10 μmol/L, SI大于100。

1 仪器与材料

Brucker AVANCE400 型核磁共振仪(瑞士Brucker公司), Finnigan LCQ Advantage MAX 质谱

仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Waters Snapt G2 mass spectrometer 高分辨质谱仪(美国Waters公司), Shimadzu 分析高效液相色谱(日本Shimadzu公司, Shimadzu LC-6AD 泵, 紫外检测器), Shimadzu 制备型高效液相色谱(日本Shimadzu公司)。分析高效液相色谱柱为C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Nacalai Tesque Inc., 日本), 制备高效液相色谱柱为C₁₈柱(250 mm×20 mm, 5 μm, Nacalai Tesque Inc., 日本)。薄层硅胶GF₂₅₄和柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂), HP-20 大孔树脂(Mitsubishi-Chemical, 日本), 反相ODS 填料(Merck公司), Sephadex LH-20 填料(Amersham Biosciences公司), Toyo-pearl HW-40 填料(Toyo Soda MFG)。热毒宁注射液(江苏康缘药业股份有限公司生产, 批号100906)。人喉癌上皮细胞(Hep-2细胞, 中国科学院武汉病毒所); 呼吸道合胞病毒(RSV, 中国科学院武汉病毒所)。

2 提取与分离

取热毒宁注射液700支(10 mL/支), 减压回收溶剂, 得热毒宁注射液成品浓缩液700 g于10倍量水中, 等体积醋酸乙酯和正丁醇分别萃取3次, 减压浓缩得到醋酸乙酯萃取物(RDN-E, 69.9 g)、正丁醇萃取物(RDN-B, 300 g)和水层(RDN-W, 327 g)。取正丁醇部位RDN-B(150 g)进行硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇梯度洗脱得到8个馏份Fr. 1~8。Fr. 2经Sephadex LH-20(氯仿-甲醇1:1)柱色谱分离得到2个馏份Fr. 2A~2B, Fr. 2B经过反复ODS中低压柱色谱分离, HPLC制备得到化合物**1**(85 mg)、**2**(27.7 mg)、**3**(98 mg)和**4**(40 mg)。Fr. 4~5经反复硅胶、ODS和Sephadex LH-20柱色谱以及反相HPLC分离得到化合物**5**(440.6 mg)、**6**(159.2 mg)、**7**(16.4 mg)、**8**(28.9 mg)、**9**(15.6 mg)、**10**(25.2 mg)、**11**(6.8 mg)、**12**(7.9 mg)和**13**(10.1 mg)。Fr. 7经Sephadex LH-20柱色谱分离, 甲醇为流动相除去色素, 然后经ODS中低压柱色谱分离, HPLC制备得到化合物**14**(8.9 mg)、**15**(9.2 mg)和**16**(10.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**: 白色无定形粉末, ESI-MS *m/z*: 377 [M+Na]⁺, 353 [M-H]⁻, 相对分子质量为354。结合¹H-NMR和¹³C-NMR数据确定分子式为C₁₆H₁₈O₉, 不饱和度为8。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.57 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-β), 6.27 (1H, d, *J* = 16.0 Hz,

H- α), 7.04 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.93 (1H, dd, J = 8.2, 1.9 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 2.21 (2H, m, H-2), 4.18 (1H, brs, H-3), 3.74 (1H, dd, J = 8.6, 3.2 Hz, H-4), 5.28 (1H, ddd, J = 9.0, 8.6, 4.4 Hz, H-5), 2.07 (2H, m, H-6)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **1** 为 5-*O*-咖啡酰奎宁酸。

化合物 **2**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 391 $[M+Na]^+$, 367 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 368。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{17}H_{20}O_9$, 不饱和度为 8。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.53 (1H, d, J = 15.8 Hz, H- β), 6.22 (1H, d, J = 15.8 Hz, H- α), 7.04 (1H, brd, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.95 (1H, dd, J = 8.1, 1.9 Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 2.21 (2H, m, H-2), 4.14 (1H, ddd, J = 6.4, 3.2, 3.2 Hz, H-3), 3.72 (1H, dd, J = 7.7, 3.2 Hz, H-4), 5.28 (1H, ddd, J = 7.7, 7.9, 4.4 Hz, H-5), 2.07 (2H, m, H-6), 3.70 (3H, s, 7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **2** 为 5-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **3**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 377 $[M+Na]^+$, 353 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 354。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 不饱和度为 8。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.66 (1H, d, J = 15.8 Hz, H- β), 6.39 (1H, d, J = 15.8 Hz, H- α), 7.08 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 6.98 (1H, dd, J = 8.1, 1.8 Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 2.20 (2H, m, H-2), 4.31 (1H, m, H-3), 4.82 (1H, dd, J = 12.0, 3.0 Hz, H-4), 4.31 (1H, m, H-5), 2.05 (2H, m, H-6)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为 4-*O*-咖啡酰奎宁酸。

化合物 **4**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 391 $[M+Na]^+$, 367 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 368。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{17}H_{20}O_9$, 不饱和度为 8。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.65 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- β), 6.38 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- α), 7.08 (1H, brd, J = 1.8 Hz, H-2'), 6.93 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 2.21 (2H, m, H-2), 4.29 (1H, m, H-3), 4.84 (1H, overlap, H-4), 5.28 (1H, m, H-5), 2.05 (2H, m, H-6), 3.76 (3H, 7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **4** 为 4-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **5**: 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 539 $[M+Na]^+$, 515 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 516。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为

$C_{25}H_{24}O_{12}$, 不饱和度为 14。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.61 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-3'), 6.32 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2'), 7.51 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-3''), 6.12 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2''), 7.02 (2H, d, J = 2.0 Hz, H-5', 5''), 6.76 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8'), 6.94 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-9'), 6.77 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8''), 6.93 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-9''), 2.35~2.11 (2H, m, H-2), 4.38 (1H, td, J = 6.6, 3.3 Hz, H-3), 5.13 (1H, dd, J = 8.8, 1.9 Hz, H-4), 5.56 (1H, m, H-5), 2.38~2.11 (2H, m, H-6)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸。

化合物 **6**: 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 529 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 530。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{26}H_{26}O_{12}$, 不饱和度为 14。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.60 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-3'), 6.30 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2'), 7.51 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-3''), 6.17 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2''), 7.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5'), 6.76 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8'), 6.94 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-9'), 7.01 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5''), 6.76 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8''), 6.91 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-9''), 2.35~2.11 (4H, m, H-2, 6), 4.35 (1H, td, J = 6.6, 3.3 Hz, H-3), 5.13 (1H, dd, J = 8.2, 2.8 Hz, H-4), 5.56 (1H, dd, J = 14.6, 7.0 Hz, H-5), 3.72 (3H, s, 7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **6** 为 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **7**: 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 539 $[M+Na]^+$, 515 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 516。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$, 不饱和度为 14。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.62 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-3'), 6.35 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2'), 7.58 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-3''), 6.27 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2''), 7.07 (2H, brd, J = 2.0 Hz, H-5', 5''), 6.96 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-8', 8''), 6.79 (2H, d, J = 8.0, 1.9 Hz, H-9', 9''), 2.30 (2H, m, H-2), 5.43 (2H, m, H-3, 5), 3.99 (1H, dd, J = 6.5, 3.2 Hz, H-4), 2.19 (2H, m, H-6)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸。

化合物 **8**: 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 529 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 530。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{26}H_{26}O_{12}$, 不饱和度为 14。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.61 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-3'), 6.33 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-2'),

7.54 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 6.21 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2''), 7.06 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5'), 6.96 (1H, td, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-8'), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-9'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5''), 6.96 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8''), 6.78 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-9''), 2.35~2.27 (2H, m, H-2), 5.39 (1H, td, $J = 7.7, 3.3$ Hz, H-3), 3.97 (1H, dd, $J = 6.7, 3.3$ Hz, H-4), 5.31 (1H, m, H-5), 2.27~2.12 (2H, m, H-6), 3.69 (3H, s, 7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为 3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **9**: 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 539 [M+Na]⁺, 515 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 516。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₂₅H₂₄O₁₂, 不饱和度为 14。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.65 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-3'), 6.34 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-2'), 7.58 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 6.27 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2''), 7.06 (1H, brd, $J = 1.9$ Hz, H-5'), 6.96 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8'), 6.79 (1H, dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, H-9'), 7.07 (1H, brd, $J = 1.9$ Hz, H-5''), 6.95 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8''), 6.77 (1H, dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, H-9''), 2.21 (2H, m, H-2), 5.62 (1H, m, H-3), 5.03 (1H, dd, $J = 8.4, 3.0$ Hz, H-4), 4.32 (1H, m, H-5), 2.21 (1H, m, H-6)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为 3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸。

化合物 **10**: 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 529 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 530。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₂₆H₂₆O₁₂, 不饱和度为 14。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.62 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-3'), 6.32 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-2'), 7.53 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 6.21 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2''), 7.06 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5'), 6.96 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8'), 6.78 (1H, d, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-9'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5''), 6.97 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8''), 6.78 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-9''), 2.31 (2H, m, H-2), 5.62 (1H, m, H-3), 5.02 (1H, dd, $J = 8.4, 3.0$ Hz, H-4), 4.33 (1H, m, H-5), 2.21 (2H, m, H-6), 3.75 (3H, s, 7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **10** 为 3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **11**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 399 [M+Na]⁺, 375 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 376。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₁₆H₂₂O₁₀, 不饱和度为 6。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.44 (1H, brs, H-3), 5.62 (1H, m, H-8), 5.45 (1H, d, $J = 3.8$

Hz, H-1), 5.23 (1H, m, H-10), 4.64 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.86 (1H, dd, $J = 11.9, 1.8$ Hz, H-6'), 3.65 (1H, dd, $J = 11.9, 5.6$ Hz, H-6''), 3.32 (1H, m, H-5), 2.91 (1H, dd, $J = 16.5, 4.9$ Hz, H-6), 2.23 (1H, dd, $J = 16.5, 8.8$ Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 168.4 (C-11), 153.4 (C-3), 133.5 (C-8), 120.1 (C-10), 105.3 (C-4), 103.1 (C-7), 100.1 (C-1'), 98.6 (C-1), 78.5 (C-3'), 78.0 (C-5'), 74.7 (C-2'), 71.5 (C-4'), 62.7 (C-6'), 43.5 (C-9), 30.5 (C-6), 23.9 (C-5)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **11** 为断马钱子酸。

化合物 **12**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 411 [M+Na]⁺, 387 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 388。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₁₇H₂₄O₁₀, 不饱和度为 6。化合物 **12** 的 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) 与化合物 **11** 进行对比, 发现化合物 **12** 仅多出 1 个甲氧基信号 [3.47 (3H, s, 11-OCH₃)], 其余信号基本一致。化合物 **12** 的核磁数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **12** 为马钱子苷半缩醛内酯。

化合物 **13**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 411 [M+Na]⁺, 387 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 388。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₁₇H₂₄O₁₀, 不饱和度为 6。化合物 **13** 与化合物 **12** 具有相同的相对分子质量, 其 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) 数据非常相似, 结合 ¹H-¹H COSY、HSQC 和 HMBC 谱的信息, 确定化合物 **13** 与 **12** 的平面结构相同, 进一步通过与文献报道^[16]比对确定了 2 个化合物为 C-7 的差向异构体, 故鉴定化合物 **13** 为 7-表断氧化马钱子苷半缩醛内酯。

化合物 **14**: 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 781 [M+Na]⁺, 757 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 758。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₃₄H₄₆O₁₉, 不饱和度为 12。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.58 (1H, overlap, H-1), 7.55 (1H, brs, H-3), 3.10 (1H, m, H-5), 2.44 (1H, m, H-6), 3.08 (1H, m, H-6), 6.72 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-7), 5.77 (1H, m, H-8), 2.77 (1H, brdd, $J = 8.8, 5.1$ Hz, H-9), 5.28 (1H, brd, $J = 9.9$ Hz, H-10), 5.34 (1H, brd, $J = 17.2$ Hz, H-10), 3.74 (3H, s, 11-OCH₃), 4.70 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1'), 5.50 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-1''), 7.49 (1H, brs, H-3''), 4.05 (1H, m, H-5''), 9.22 (1H, s, H-7''), 5.58 (1H, m, H-8''), 2.61 (1H, m, H-9''), 5.02 (1H, m,

H-10''), 5.05 (1H, m, H-10''), 3.54 (3H, s, 11''-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 97.7 (C-1), 154.4 (C-3), 110.5 (C-4), 33.6 (C-5), 29.8 (C-6), 157.0 (C-7), 135.5 (C-8), 45.4 (C-9), 120.5 (C-10), 169.1 (C-11, 11''), 52.0 (11-OCH₃), 100.2 (C-1'), 74.7 (C-2', 2''), 78.2 (C-3'), 71.6 (C-4', 4''), 78.3 (C-5'), 62.8 (C-6'), 97.4 (C-1''), 152.1 (C-3''), 109.4 (C-4''), 31.0 (C-5''), 143.3 (C-6''), 197.0 (C-7''), 135.4 (C-8''), 46.4 (C-9''), 119.4 (C-10''), 51.7 (11''-OCH₃), 99.9 (C-1'''), 78.0 (C-3'''), 78.4 (C-5'''), 62.6 (C-6'''). 以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **14** 为 *E*-aldosecologanin。

化合物 **15**: 黄色无定形粉末, ESI-MS *m/z*: 781 [M+Na]⁺, 757 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 758。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₃₄H₄₆O₁₉, 不饱和度为 12。化合物 **15** 和 **14** 具有相同的相对分子质量和分子式, 且其 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) 与化合物 **14** 非常相似, 仅 7''-CHO (δ_H 10.03, δ_C 192.0) 和 C-7 (δ_H 6.39, δ_C 150.6) 的碳和氢化学位移发生了明显的变化。结合 ¹H-¹H COSY、HSQC 和 HMBC 谱的信息, 确定化合物 **15** 和 **14** 具有相同的平面的结构, 2 个化合物是在 C-7, 6''双键上几何构型不同的同分异构体。将化合物 **15** 的全部碳氢信号进行了归属, 经过 SciFinder Scholar 网络检索, 发现与文献报道的 *Z*-aldosecologanin 的数据一致^[7], 故鉴定化合物 **15** 为 *Z*-aldosecologanin。

化合物 **16**: 黄色胶状物, ESI-MS *m/z*: 482 [M+Na]⁺, 917 [2M-H]⁻, 提示相对分子质量为 459。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₁₉H₂₅NO₁₀S, 不饱和度为 8。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.49 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-1), 7.41 (1H, brs, H-3), 3.16 (1H, overlap, H-5), 2.17 (1H, m, H-6), 1.50 (1H, m, H-6), 5.00 (1H, m, H-7), 5.54 (1H, m, H-8), 2.69 (1H, m, H-9), 5.27 (1H, m, H-10), 3.15 (1H, m, H-12), 3.34 (1H, m, H-12), 5.11 (1H, m, H-13), 4.67 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-1'), 3.46~3.17 (4H, m, H-2'~5'), 3.64 (1H, m, H-6'), 3.85 (1H, m, H-6'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 97.9 (C-1), 149.7 (C-3), 107.9 (C-4), 28.4 (C-5), 33.0 (C-6), 62.7 (C-7), 133.6 (C-8), 44.5 (C-9), 120.8 (C-10), 166.2 (C-11), 32.1 (C-12), 63.4 (C-13), 169.7 (C-14), 99.9 (C-1'), 74.7 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.5 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.6 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **16** 为 5*H*,8*H*-pyrano

[4,3-*d*] thiazolo [3,2-*a*] pyridine-3-carboxylic acid。

4 咖啡酰奎宁酸类化合物体外抗 RSV 的活性评价

4.1 细胞毒性检测

实验采用 AlamarBlue® (Invitrogen) 试剂盒检测化合物对细胞的毒性作用。化合物的最高毒性测试浓度均为 500 μmol/mL。

AlamarBlue®是一种氧化还原指示剂, 能根据代谢活性产生吸光度变化和荧光信号。AlamarBlue®易溶于水, 其氧化形式进入细胞后经线粒体酶还原产生可测量的荧光及颜色变化, 用于细胞活性和细胞增殖的定量分析以及体外细胞毒性研究。这种测定是基于具有代谢活性的细胞将试剂转换成荧光和比色指示剂的能力, 受损和无活性细胞具有较低的代谢活性, 对应的信号较低。因此荧光信号强弱可以反映细胞活性的高低。

将 Hep-2 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞贴壁后备用。用细胞维持液将单体化合物从 2 倍起始浓度连续 3 倍梯度稀释 6 个梯度, 每浓度梯度单孔检测。实验分为 3 组, 样品组加入 Hep-2 细胞+化合物, 空白对照组加入细胞维持液, 细胞对照组加入 Hep-2 细胞, 培养 72 h 后, 光镜下观察化合物引起的细胞病变效应, 加入 AlamarBlue®, 37 °C 孵育 2 h, 荧光检测 AlamarBlue®的还原情况, 激发光波长 570 nm, 发射光波长 595 nm。计算 CC₅₀ 值, 结果见表 1。

细胞活力 = (样品组荧光值 - 空白对照组荧光值) / (细胞对照组荧光值 - 空白对照组荧光值)

4.2 对 RSV 的抑制试验

Hep-2 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞贴壁后备用。待细胞长成单层后加入 100 μL 含 2 倍药物的维持培养基和 100 μL RPMI 1640 培养基稀释的 RSV 病毒液, 37 °C 培养。实验设药物组、细胞对照组 (无病毒感染)、病毒对照组 (病毒感染后未加药物) 和阳性药物 (利巴韦林) 组, 每天观察并记录细胞出现特异性 CPE 情况, 培养 5 d 后 (病毒对照孔 75%~100%病变) 检测各组细胞活力, 检测方法同“4.1”项。再根据各组的细胞活力值, 按公式计算抑制率, 得出 EC₅₀ 值, 结果见表 1。

抑制率 = (药物组细胞活力 - 病毒对照组细胞活力) / (细胞对照组细胞活力 - 病毒对照组细胞活力)

实验结果表明咖啡酰奎宁酸类化合物 (**1**~**10**) 具有较强的体外抗呼吸道合胞病毒的效果, 其中化合物 **1**~**4** 的 EC₅₀ 值在 10~30 μmol/L, SI 值大于

表1 咖啡酰奎宁酸类化合物体外抗 RSV 实验结果

Table 1 Antiviral experiment results of caffeoylquinic acids *in vitro*

化合物	CC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	EC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	SI
1	>1 000	28.00	>35.7
2	>1 000	11.33	>88
3	>1 000	28.07	>35
4	>1 000	20.06	>50
5	>1 000	7.76	>129
6	>1 000	4.13	>242
7	>1 000	1.69	>591
8	>1 000	1.72	>581
9	>1 000	2.12	>472
10	687.1	2.40	286
利巴韦林	>600	10.03	>60

CC₅₀-50%细胞发生病变时的药物浓度; EC₅₀-能够有效抑制 50%细胞感染病毒的药物浓度; SI=CC₅₀/EC₅₀

CC₅₀-the median lethal dose of a substance, or the amount required to kill 50% of a given test population; EC₅₀-the molar concentration of an agonist, which produces 50% of the maximum possible response for that agonist; SI (selected index) = CC₅₀/EC₅₀

30; 化合物 5~10 的 EC₅₀ 值小于 10 μmol/L, SI 值大于 100, 高于阳性对照药利巴韦林的 SI 值, 值得进一步深入研究该类化合物的抗病毒作用机制。

5 讨论

在前期研究的基础上本研究采用现代化学-药理学相结合的方法对临床疗效确切、应用广泛的热毒宁注射液正丁醇萃取部位进行系统的化学成分研究。综合应用各种色谱分离手段分离鉴定了 16 个化合物, 所有化合物均为首次从热毒宁注射液中分离得到, 并采用观察细胞病变效应 (CPE) 和检测细胞存活率的方法, 对分离得到的咖啡酰奎宁酸类化合物进行了体外抗 RSV 作用研究, 结果显示该类化合物具有较强的体外抗 RSV 效果, 可能是热毒宁注射液的主要抗病毒药效物质基础之一。这在一定程度上揭示了该产品发挥抗病毒作用的物质基础, 为探讨咖啡酰奎宁酸类成分对复方药效的贡献提供了依据。此部分工作也为后期热毒宁注射液指纹图谱的指认以及建立与功效相关联的质量控制方法奠定了一定的基础。

志谢: 中国科学院武汉病毒所陈绪林教授课题组帮助完成单体化合物的体外活性评价工作; 暨南大学药学院中药及天然药物研究所帮助完成核磁和质谱的测试工作。

参考文献

[1] Li X H, Zhang X, Ding J B, *et al.* Comparison between

Chinese herbal medicines and conventional therapy in the treatment of severe hand, foot and mouth disease: a randomized controlled trial [J]. *Evid-Based Complement Alternat Med*, 2014, 140764, 1-7.

- [2] 余 俭. 抗菌抗病毒新药——热毒宁注射液 [J]. 中内药学, 2010, 8(7): 548-550.
- [3] 王振中, 鲍琳琳, 孙 兰, 等. 热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒作用机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 90-93.
- [4] 李海波, 于 洋, 王振中, 等. 热毒宁注射液抗病毒活性成分研究 (I) [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1682-1688.
- [5] 马双成, 毕培曦, 黄荣春, 等. 金银花药材中抗呼吸道感染病毒的咖啡酰奎宁酸类成分的定量研究 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 751-755.
- [6] 罗咏婧, 李会军, 李 萍, 等. 毛花柱忍冬花蕾化学成分研究 [J]. 林产化学与工业, 2010, 30(1): 73-76.
- [7] 陈宏超, 丁立生, 彭树林, 等. 皱皮木瓜化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 30-31.
- [8] 陈 斌. 脉络宁注射液及组方中药玄参防治心脑血管疾病活性成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [9] 滕荣伟, 周志宏, 杨崇仁, 等. 白花刺参中的咖啡酰基奎宁酸成分 [J]. 波谱学杂志, 2002, 19(2): 167-174.
- [10] Zhu X F, hang H X, Lo R. Three di-*O*-caffeoylquinic acid derivatives from the heads of *Cynara scolymus* L. [J]. *Nat Prod Res*, 2009, 23(6): 527-532.
- [11] 周 渊, 周思祥, 屠鹏飞, 等. 毛冬青叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1479-1483.
- [12] 刘 波, 谢亮亮, 王英锋. 杏香兔耳风化学成分研究 [J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2007, 28(6): 36-37.
- [13] 马俊利, 李金双. 金银忍冬叶的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 476-479.
- [14] 王 楠, 杨秀伟. 复方双黄连粉针剂金银花中间体化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1613-1617.
- [15] 田 野. 金银花化学成分研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2007.
- [16] Kawai H, Kuroyanagi M, Ueno A. Iridoid glucosides from *Lonicera japonica* Thunb. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(9): 3664-3666.
- [17] Koichi M, Hiromi S, Masao K, *et al.* Studies on the constituents of *Lonicera* species. Part 17. New iridoid glycosides of the stems and leaves of *Lonicera japonica* Thunb. [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(8): 1041-1044.
- [18] Lutz F T, Christoph B, Jens F. Iridoids, 24 biomimetic synthesis of the monoterpene alkaloids xylostosidine and loxylostosidine A and of similar unnatural compounds by transformations of the monoterpene glycoside secologanin [J]. *Liebigs Ann Chem*, 1989, 13(12): 1241-1245.