

• 化学成分 •

热毒宁注射液化学成分研究(III)

李海波^{1,2}, 于洋³, 王振中^{1,2}, 孟兆青^{1,2}, 房卉^{1,2}, 丁岗^{1,2}, 黄文哲^{1,2}, 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. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东广州 510632

摘要: **目的** 研究热毒宁注射液抗病毒活性部位的化学成分。 **方法** 采用流感病毒致应激负荷小鼠模型进行抗病毒活性部位的筛选, 综合应用硅胶、ODS、Sephadex LH-20 和 Toyopearl HW-40 柱色谱以及反相 MPLC、HPLC 等现代色谱技术对抗病毒活性部位进行分离和纯化, 根据化合物的光谱数据和理化性质鉴定化合物结构。通过采用检测海肾荧光素酶(Rluc)报告基因的表达水平来反映病毒感染水平的方法, 对分离得到的化合物进行了体外抗登革热病毒的活性测试。 **结果** 热毒宁注射液经 HP-20 大孔吸附树脂, 95%乙醇洗脱部位为抗病毒活性部位, 从中分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为 (2*E*,6*S*)-8-[α -*L*-arabinopyranosyl-(1''-6')- β -*D*-glucopyranosyloxy]-2,6-dimethyl-2-eno-1,2''-lactone (1)、落叶脂素 (2)、5'-甲氧基异落叶松脂醇 (3)、异落叶松脂素 (4)、(7*R*,8*R*)-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan (5)、(7*S*,8*R*)-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan (6)、肥牛木素 (7)、5'-甲氧基肥牛木素 (8)、(-)-二氢脱氢二松柏醇 (9)、(7*S*,8*R*)-3,3',5'-trimethoxy-4',7'-epoxy-8,5'-neolignan-4,9,9'-triol (10)、2-顺式-4-反式-脱落酸 (11)、2-反式-4-反式-脱落酸 (12)、(1*S*,3*R*,4*R*,5*S*,7*R*,9*R*)-decane-6-carboxylic acid (13)、(1*S*,3*R*,4*S*,5*S*,7*R*,9*R*)-decane-6-carboxylic acid (14); 其中化合物 1 对登革热病毒的 EC₅₀ 值为 74.76 μ mol/L, 选择指数 (SI) 值大于 1.07, 具有体外抗登革热病毒的活性。 **结论** 化合物 8 为新化合物, 其他化合物均为首次从中药复方热毒宁注射液中分离得到, 化合物 1 具有体外抗登革热病毒的活性。

关键词: 热毒宁注射液; 5'-甲氧基肥牛木素; 木脂素; 落叶脂素; 2-顺式-4-反式-脱落酸; 抗登革热病毒活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)10-1643-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.10.002

Research on chemical constituents from Re-Du-Ning Injection (III)

LI Hai-bo^{1,2}, YU Yang³, WANG Zhen-zhong^{1,2}, MENG Zhao-qing^{1,2}, FANG Hui^{1,2}, DING Gang^{1,2}, HUANG Wen-zhe^{1,2}, 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, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To study the antiviral constituents from the active fraction of Re-Du-Ning (RDN) Injection. **Methods** In this study, the active fraction of RDN Injection was screened by the mice model loaded with restraint stress infected with influenza virus. The chemical constituents were isolated by chromatography on silica gel, ODS, Sephadex LH-20 & Toyopearl HW-40 columns, and reverse phase MPLC & HPLC repeatedly. Their structures were identified by spectral data and physicochemical property. **Results** The 95% ethanol eluate of RDN Injection on the macroporous adsorption resin column was proved to be the antiviral active fraction of RDN Injection. Fourteen compounds were isolated and identified as (2*E*,6*S*)-8-[α -*L*-arabinopyranosyl-(1''-6')- β -*D*-glucopyranosyloxy]-2,6-dimethyl-2-eno-1,2''-lactone (1), lyoniresinol (2), 5'-methoxysilariciresinol (3), ent-silariciresinol (4), (7*R*,8*R*)-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan (5), (7*S*,8*R*)-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan (6), ceplignan (7),

收稿日期: 2015-11-16

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

5'-methoxyceplignan (8), (-)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol (9), (7*S*,8*R*)-3,3',5'-trimethoxy-4',7'-epoxy-8,5'-neolignan-4,9,9'-triol (10), (2-*cis*, 4-*trans*)-abscisic acid (11), (2-*trans*, 4-*trans*)-abscisic acid (12), (1*S*,3*R*,4*R*,5*S*,7*R*,9*R*)-decane-6-carboxylic acid (13), and (1*S*,3*R*,4*S*,5*S*,7*R*,9*R*)-decane-6-carboxylic acid (14); Among them, compound 1 exhibited the antiviral activity against Dengue virus.

Conclusion Compound 8 is a new compound and the other isolated compounds are reported from RDN Injection for the first time, and compound 1 shows the anti-virus activity against Dengue virus.

Key words: Re-Du-Ning Injection; 5'-methoxyceplignan; lignans; lyoniresinol; (2-*cis*, 4-*trans*)-abscisic acid; anti-Dengue virus activity

中药复方热毒宁注射液是江苏康缘药业股份有限公司独家产品,处方由栀子、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^[1-4]。其临床疗效确切,效果显著,本课题组前期已从热毒宁注射液抗病毒活性部位中分离鉴定了20个化合物^[5],在上述研究的基础上,继续对抗病毒活性部位进行系统的化学成分研究,从中分离得到14个化合物,分别鉴定为(2*E*,6*S*)-8-[α -*L*-arabinopyranosyl-(1''-6')- β -*D*-glucopyranosyloxy]-2,6-dimethyl-2-eno-1,2''-lactone (1)、落叶脂素(lyoniresinol, 2)、5'-甲氧基异落叶松树脂醇(5'-methoxyisolariciresinol, 3)、异落叶松树脂素(5'-methoxyisolariciresinol, 4)、(7*R*,8*R*)-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan (5)、(7*S*,8*R*)-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan (6)、肥牛木素(ceplignan, 7)、5'-甲氧基肥牛木素(5'-methoxyceplignan, 8)、(-)-二氢脱氢二松柏醇[(-)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol, 9]、(7*S*,8*R*)-3,3',5'-trimethoxy-4',7'-epoxy-8,5'-neolignan-4,9,9'-triol (10)、2-顺式-4-反式-脱落酸[(2-*cis*, 4-*trans*)-abscisic acid, 11]、2-反式-4-反式-脱落酸[(2-*trans*, 4-*trans*)-abscisic, 12]、(1*S*,3*R*,4*R*,5*S*,7*R*,9*R*)-decane-6-carboxylic acid (13)、(1*S*,3*R*,4*S*,5*S*,7*R*,9*R*)-decane-6-carboxylic acid (14)。其中,化合物8为新化合物,其他化合物均为首次从中药复方热毒宁注射液中分离得到。对分离所得到的化合物进行体外抗登革热病毒的活性测试,结果显示化合物1对登革热病毒的EC₅₀值为74.76 μ mol/L,选择指数(SI)值大于1.07,具有体外抗登革热病毒的活性。

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), JASCO J-810 CD 光谱仪(日本分光株式会社), 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 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, Nacalai Tesque Inc., 日本), 制备高效液相色谱柱为 C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 20 mm, 5 μ m, 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); 乳仓鼠肾细胞(BHK 细胞, 中国科学院武汉病毒所), 登革热报告病毒(中国科学院武汉病毒所)。

2 提取与分离

热毒宁注射液成品浓缩液 840 g, 用适量水溶解后经 HP-20 大孔吸附柱色谱, 乙醇-水(水及 30%、95%乙醇)梯度洗脱, 得到水洗脱部位 RDN-1 (410 g), 30%乙醇洗脱部位 RDN-2 (318 g), 95%乙醇洗脱部位 RDN-3 (84 g)。取 RDN-3 (65 g) 进行硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇(98:2、95:5、90:10、80:20、70:30、50:50、30:70、0:100) 梯度洗脱共得到 9 个流分 Fr. 1~9。Fr. 1 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 12 (11.6 mg)、13 (8.6 mg)、14 (5.2 mg)。Fr. 2 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 2 (15.6 mg)、3 (5.6 mg)、4 (6.2 mg)、5 (4.7 mg)、6 (11.9 mg)、7 (6.3 mg)、8 (7.1 mg)、9 (3.3 mg)、10 (8.8 mg) 和 11 (12.5 mg)。Fr. 4 经过 ODS 中低压柱色谱分离, 甲醇-水(10%甲醇-水、30%甲醇-水、50%甲醇-水、70%甲醇-水和 100%甲醇) 梯度洗脱, 50%甲醇-水洗脱部分经 HPLC 制备(25%乙腈) 得到化合物 1 (69.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 8: 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 377 [M+H]⁺, 375 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 376。

HR-ESI-Q-TOF-MS 给出 m/z 377.123 3 $[M+H]^+$ (计算值为 377.123 6), 确定化合物分子式为 $C_{19}H_{20}O_8$, 不饱和度为 10。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) 谱中显示了 20 个氢信号, 其中 4 个芳香质子信号 [δ 6.69 (2H, s, H-2', 6'), 7.59 (1H, brs, H-6), 7.63 (1H, brs, H-4)], 推测结构中可能存在 2 个四取代苯环; 3 个甲氧基质子信号 [δ 3.83 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃)]; ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) 结合 DEPT 图谱显示了 19 个碳信号, 9 个季碳信号 [δ 170.0 (C-8), 133.3 (C-1'), 145.9 (C-3', 5'), 136.6 (C-4'), 125.3 (C-5), 145.1 (C-7), 153.3 (C-7a), 130.2 (C-3a)]; 4 个芳香次甲基碳信号 [δ 104.3 (C-2', 6'), 115.5 (C-6), 120.7 (C-4)]; 1 个亚甲基碳信号 [δ 64.7 (C-9)]; 2 个亚甲基碳信号 [90.3 (C-2), 54.8 (C-3)] 以及 3 个甲氧基碳信号 [δ 56.8 (3', 5'-OCH₃), 56.7 (7-OCH₃)]. 以上数据通过与文献报道^[6]的已知木脂素类化合物的核磁数据进行比对, 揭示化合物 **8** 为 C-3', C-5' 和 C-7 三甲氧基取代和 C-8 位氧化的苯并二氢呋喃型木脂素。进一步通过 HMBC 谱进行验证, 在 HMBC 谱中可见 δ_H 3.83 (6H, s, 3', 5'-OCH₃) 与 δ_C 145.9 (C-3', 5') 相关, δ_H 3.92 (3H, s, 7-OCH₃) 与 δ_C 145.1 (C-7) 相关, δ_H 7.63 (1H, brs, H-4) 与 δ_C 170.7 (C-8)/115.5 (C-6)/153.3 (C-7a) 相关, 通过主要的 HMBC 相关 (图 1) 确定了化合物的平面结构与文献报道中的 2,3-dihydro-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-5-benzofurancarboxylic acid 相一致^[7]。通过偶合常数 ($J_{2,3} = 6.3$ Hz) 判断化合物 **8** 的 H-2 与 H-3 处于反式^[8]。化合物 **8** 的 CD 谱中, 220 (Δ -6.21) 显示负的 Cotton 效应, 与文献进行对比^[9], 确定化合物 **8** 的绝对构型为 7*S*, 8*R*。对所有的碳氢信号进行了归属 (表 1), 最终确定化合物的结构, 命名为 5'-甲氧基肥牛木素。

化合物 **1**: 淡黄色无定型粉末, ESI-MS m/z : 485 $[M+Na]^+$, 507 $[M+HCOO]^-$, HR-ESI-Q-TOF-MS 给出 m/z 463.217 0 $[M+H]^+$ (计算值为 463.217 9),

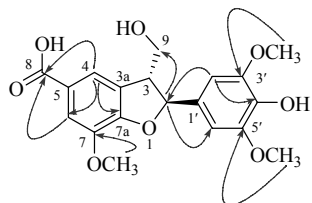


图 1 化合物 **8** 的主要 HMBC 相关

Fig. 1 Key HMBC correlations of compound **8**

表 1 化合物 **8** 的 NMR 数据
Table 1 NMR data of compound **8**

碳位	δ_C	δ_H	DEPT
1	—	—	
2	90.3	5.64 (d, $J = 6.3$ Hz)	CH
3	54.8	3.58 (m)	CH
4	120.7	7.63 (brs)	CH
5	125.3	—	
6	115.5	7.59 (brs)	CH
7	145.1	—	
8	170.0	—	
9	64.7	3.86 (m)	CH ₂
3a	130.2	—	
7a	153.6	—	
1'	133.3		
2'	104.3	6.69 (s)	CH
3'	149.5		
4'	136.6		
5'	149.5		
6'	104.3	6.69 (s)	CH
3'-OCH ₃	56.8	3.83 (s)	CH ₃
5'-OCH ₃	56.8	3.83 (s)	CH ₃
7-OCH ₃	56.7	3.92 (s)	CH ₃

确定化合物分子式为 $C_{21}H_{34}O_{11}$, 不饱和度为 5。 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 0.93 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 10-OCH₃), 1.13 (1H, m, H-7), 1.56 (1H, m, H-7), 1.37 (1H, m, H-5), 1.66 (1H, m, H-5), 1.64 (1H, m, H-6), 1.81 (3H, brs, 9-OCH₃), 2.39 (1H, m, H-4), 2.01 (1H, m, H-4), 1.60 (1H, m, H-7), 1.14 (1H, m, H-7), 6.92 (1H, ddd, $J = 8.1, 6.0, 4.8$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 169.6 (C-1), 128.1 (C-2), 145.5 (C-3), 26.9 (C-4), 37.2 (C-5), 30.7 (C-6), 34.6 (C-7), 67.6 (C-8), 12.1 (C-9), 20.7 (C-10), 103.2 (C-1'), 75.1 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.1 (C-4'), 76.0 (C-5'), 63.8 (C-6'), 104.4 (C-1''), 73.3 (C-2''), 72.5 (C-3''), 72.4 (C-4''), 68.6 (C-5''). 以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **1** 为 (2*E*, 6*S*)-8-[α -*L*-arabinopyranosyl-(1''-6')- β -*D*-glucopyranosyloxy]-2,6-dimethyl-2-enol-1,2''-lactone。

化合物 **2**: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 443 $[M+Na]^+$, 419 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 420。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{22}H_{28}O_8$, 不饱和度为 9。 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 6.38

(2H, s, H-2, 6), 6.58 (1H, brs, H-2'), 4.31 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, H-7), 3.86 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.74 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.37 (3H, s, 5'-OCH₃), 3.59 (1H, m, H-9'), 3.51 (1H, o, H-9'), 3.49 (1H, m, H-9), 3.46 (1H, m, H-9), 2.71 (1H, dd, $J = 15.3, 5.1$ Hz, H-7'), 2.52 (1H, dd, $J = 15.7, 11.4$ Hz, H-7'), 1.97 (1H, m, H-8'), 1.63 (1H, m, H-8); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 138.9 (C-1), 106.8 (C-2, 6), 149.0 (C-3, 5), 134.5 (C-4), 48.9 (C-7), 42.3 (C-8), 64.1 (C-9), 130.1 (C-1'), 107.7 (C-2'), 148.6 (C-3'), 138.9 (C-4'), 147.7 (C-5'), 126.2 (C-6'), 33.8 (C-7'), 40.9 (C-8'), 66.2 (C-9'), 56.7 (3, 5-OCH₃), 56.6 (3'-OCH₃), 60.1 (5'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **2** 为落叶脂素。

化合物 **3**: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 413 [M+Na]⁺, 389 [M-H]⁻, 相对分子质量为 390。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₂₁H₂₆O₇, 不饱和度为 9。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.42 (2H, s, H-2, 6), 6.65 (1H, s, H-2'), 6.20 (1H, s, H-5'), 3.81 (1H, m, H-7), 3.80 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.77 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.63 (2H, d, $J = 3.5$ Hz, H-9'), 3.40 (1H, dd, $J = 11.3, 4.0$ Hz, H-9), 3.67 (1H, m, H-9), 2.78 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H-7'), 1.99 (1H, m, H-8'), 1.79 (1H, m, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 137.8 (C-1), 107.8 (C-2, 6), 149.3 (C-3, 5), 135.0 (C-4), 48.6 (C-7), 47.9 (C-8), 62.3 (C-9), 129.0 (C-1'), 112.4 (C-2'), 147.3 (C-3'), 145.3 (C-4'), 117.3 (C-5'), 134.0 (C-6'), 33.6 (C-7'), 39.9 (C-8'), 65.9 (C-9'), 56.8 (3, 5-OCH₃), 56.4 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **3** 为 5'-甲氧基异落叶脂素。

化合物 **4**: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 383 [M+Na]⁺, 359 [M-H]⁻, 相对分子质量为 360。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₂₀H₂₄O₆, 不饱和度为 9。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.67 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.60 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, H-6), 6.65 (1H, s, H-2'), 6.17 (1H, s, H-5'), 3.80 (1H, m, H-7), 3.80 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.77 (3H, s, 3-OCH₃), 3.66 (2H, m, H-9'), 3.39 (1H, dd, $J = 11.3, 4.0$ Hz, H-9), 3.68 (1H, m, H-9), 2.77 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 1.99 (1H, m, H-8'), 1.75 (1H, m, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 138.6 (C-1), 113.8 (C-2), 149.0 (C-3), 145.9 (C-4), 116.0 (C-5), 123.2 (C-6), 48.0 (C-7), 48.1 (C-8), 62.2 (C-9), 129.0 (C-1'), 112.4 (C-2'), 147.2

(C-3'), 145.3 (C-4'), 117.4 (C-5'), 134.2 (C-6'), 33.6 (C-7'), 40.0 (C-8'), 65.9 (C-9'), 56.4 (3-OCH₃), 56.3 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **4** 为异落叶脂素。

化合物 **5**: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 401 [M+Na]⁺, 377 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 378。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₂₀H₂₆O₇, 不饱和度为 8。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.01 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.85 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6), 6.84 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.96 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.70 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 4.86 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7), 4.52 (1H, brs, H-8), 3.70 (1H, dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz, H-9), 3.45 (1H, dd, $J = 12.0, 5.6$ Hz, H-9), 2.62 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 1.80 (2H, m, H-8'), 3.55 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-9'), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃), 3.85 (3H, s, 3'-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 133.8 (C-1), 111.8 (C-2), 148.9 (C-3), 147.6 (C-4), 115.9 (C-5), 120.8 (C-6), 74.2 (C-7), 87.8 (C-8), 61.9 (C-9), 138.3 (C-1'), 114.0 (C-2'), 151.7 (C-3'), 147.2 (C-4'), 119.2 (C-5'), 122.1 (C-6'), 32.7 (C-7'), 35.5 (C-8'), 62.2 (C-9'), 56.4 (3-OCH₃), 56.6 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **5** 为 (7*R*,8*R*)-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan。

化合物 **6**: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 401 [M+Na]⁺, 377 [M-H]⁻, 提示相对分子质量为 378。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₂₀H₂₆O₇, 不饱和度为 8。¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.00 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.73 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.83 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz, H-6), 6.70 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.66 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 4.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 4.28 (1H, m, H-8), 3.84 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-9), 3.74 (1H, dd, $J = 12.0, 3.6$ Hz, H-9), 2.60 (2H, m, H-7'), 1.79 (2H, m, H-8'), 3.55 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-9'), 3.78 (3H, s, 3-OCH₃), 3.80 (3H, s, 3'-OCH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 134.2 (C-1), 111.8 (C-2), 148.7 (C-3), 147.0 (C-4), 115.7 (C-5), 121.0 (C-6), 74.1 (C-7), 86.7 (C-8), 62.2 (C-9), 138.1 (C-1'), 114.0 (C-2'), 151.9 (C-3'), 147.2 (C-4'), 119.7 (C-5'), 121.9 (C-6'), 32.7 (C-7'), 35.6 (C-8'), 62.2 (C-9'), 56.3 (3-OCH₃), 56.5 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **6** 为

(7*S*,8*R*)-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan。

化合物 **7**: 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 347 $[M+H]^+$, 345 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 346。结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据确定分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$, 不饱和度为 10。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.62 (1H, s, H-6'), 7.59 (1H, brs, H-2'), 6.94 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.82 (1H, dd, $J = 8.2, 1.2$ Hz, H-5'), 5.61 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7), 3.55 (1H, m, H-8), 3.83 (2H, m, H-9), 3.81 (3H, s, 3- OCH_3), 3.88 (3H, s, 3'- OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 134.0 (C-1), 110.7 (C-2), 149.2 (C-3), 147.8 (C-4), 116.3 (C-5), 119.8 (C-6), 90.2 (C-7), 54.6 (C-8), 64.6 (C-9), 125.7 (C-1'), 115.4 (C-2'), 145.2 (C-3'), 153.8 (C-4'), 130.4 (C-5'), 120.8 (C-6'), 170.6 (C-7'), 56.4 (3- OCH_3), 56.7 (3'- OCH_3)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **7** 为肥牛木素。

化合物 **9**: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 383 $[M+Na]^+$, 359 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 360。结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据确定分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$, 不饱和度为 9。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 6.95 (2H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.83 (1H, dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, H-6), 6.73 (2H, brs, H-2', 6'), 5.49 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-7), 3.48 (1H, dd, $J = 12.3, 6.2$ Hz, H-8), 3.82 (1H, o, H-9), 3.75 (1H, dd, $J = 7.1, 11.1$ Hz, H-9), 2.63 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 1.82 (2H, m, H-8'), 3.57 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-9'), 3.81 (3H, s, 3- OCH_3), 3.85 (3H, s, 3'- OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ : 134.2 (C-1), 110.5 (C-2), 149.1 (C-3), 147.5 (C-4), 116.1 (C-5), 119.7 (C-6), 89.0 (C-7), 55.5 (C-8), 65.0 (C-9), 129.9 (C-1'), 114.0 (C-2'), 145.2 (C-3'), 147.5 (C-4'), 130.9 (C-5'), 117.9 (C-6'), 32.9 (C-7'), 35.8 (C-8'), 62.2 (C-9') 56.3 (3- OCH_3), 56.7 (3'- OCH_3)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **9** 为 (-)-二氢脱氢二松柏醇。

化合物 **10**: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 413 $[M+Na]^+$, 389 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 390。结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据确定分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_7$, 不饱和度为 9。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.68 (2H, brs, H-2, 6), 6.73 (2H, s, H-2', 6'), 5.50 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-7), 3.57 (1H, overlap,

H-8), 3.84 (2H, m, H-9), 2.63 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 1.82 (2H, m, H-8'), 3.57 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-9'), 3.81 (6H, s, 3, 5- OCH_3), 3.86 (3H, s, 3'- OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ : 134.1 (C-1), 104.2 (C-2, 6), 149.3 (C-3, 5), 137.0 (C-4), 89.1 (C-7), 55.6 (C-8), 65.0 (C-9), 136.4 (C-1'), 114.1 (C-2'), 145.2 (C-3'), 147.5 (C-4'), 129.8 (C-5'), 117.9 (C-6'), 32.9 (C-7'), 35.8 (C-8'), 62.2 (C-9') 56.7 (3, 5- OCH_3), 56.8 (3'- OCH_3)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **10** 为 (7*S*,8*R*)-3,3',5-trimethoxy-4',7-epoxy-8,5'-neolignan-4,9,9'-triol。

化合物 **11**: 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 265 $[M+H]^+$, 263 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 264。HR-ESI-Q-TOF-MS 给出 m/z 287.127 2 $[M+Na]^+$ (计算值为 287.125 9), 确定化合物分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$, 不饱和度为 6。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.90 (1H, s, H-3'), 2.53 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-5'), 2.16 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-5'), 1.00 (3H, s, 6'- CH_3), 1.05 (3H, s, 6'- CH_3), 2.25 (3H, s, 2'- CH_3), 6.24 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-5), 6.46 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-4), 5.83 (1H, brs, H-2), 1.90 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 3- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 200.9 (C-4'), 127.4 (C-3'), 166.3 (C-2'), 80.3 (C-1'), 42.8 (C-6'), 50.7 (C-5'), 24.7 (5'- CH_3), 23.6 (5'- CH_3), 14.2 (2'- CH_3), 136.6 (C-5), 135.3 (C-4), 151.7 (C-3), 122.0 (C-2), 169.0 (C-1), 19.4 (3- CH_3)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **11** 为 2-顺式-4-反式-脱落酸。

化合物 **12**: 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 265 $[M+H]^+$, 263 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 264。HR-ESI-Q-TOF-MS 给出 m/z 287.127 2 $[M+Na]^+$ (计算值为 287.125 9), 确定化合物分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$, 不饱和度为 6。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.92 (1H, brs, H-3'), 2.53 (1H, d, $J = 16.9$ Hz, H-5'), 2.18 (1H, d, $J = 16.9$ Hz, H-5'), 1.03 (3H, s, 6'- CH_3), 1.06 (3H, s, 6'- CH_3), 1.92 (3H, d, $J = 0.8$ Hz, 3- CH_3), 6.22 (1H, d, $J = 16.3$ Hz, H-5), 7.76 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-4), 5.74 (1H, brs, H-2), 2.04 (3H, s, 3- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 201.0 (C-4'), 127.5 (C-3'), 166.5 (C-2'), 80.6 (C-1'), 42.8 (C-6'), 50.6 (C-5'), 24.6 (5'- CH_3), 23.6 (5'- CH_3), 19.6 (2'- CH_3), 137.8 (C-5), 129.4 (C-4), 150.8 (C-3), 119.8 (C-2), 168.0 (C-1), 21.2 (3- CH_3)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **12** 为 2-反式-4-反式-脱落酸。

化合物 **13**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 227 $[M+H]^+$, 225 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 226。HR-ESI-Q-TOF-MS 给出 m/z 249.073 7 $[M+Na]^+$ (计算值为 249.073 9), 确定化合物分子式为 $C_{11}H_{14}O_5$, 不饱和度为 5。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.04 (1H, overlap, H-1), 5.48 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H-3), 3.60 (1H, m, H-4), 2.68 (1H, m, H-5), 2.19 (1H, d, $J = 13.4$ Hz, H-6), 2.04 (1H, d, $J = 13.4$ Hz, H-6), 5.04 (1H, t, $J = 1.6$ Hz, H-7), 6.07 (1H, ddd, $J = 7.1, 10.6, 17.6$ Hz, H-8), 2.81 (1H, brd, $J = 7.0$ Hz, H-9), 5.29 (1H, m, H-10), 3.73 (3H, s, 11-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 96.3 (C-1), 94.0 (C-3), 48.9 (C-4), 31.5 (C-5), 26.8 (C-6), 94.7 (C-7), 137.2 (C-8), 47.0 (C-9), 118.3 (C-10), 171.8 (C-11), 52.5 (11-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **13** 为 (1*S*,3*R*,4*R*,5*S*,7*R*,9*R*)-decane-6-carboxylic acid。

化合物 **14**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 227 $[M+H]^+$, 225 $[M-H]^-$, 提示相对分子质量为 226。HR-ESI-Q-TOF-MS 给出 m/z 249.073 7 $[M+Na]^+$ (计算值为 249.073 9), 确定化合物分子式为 $C_{11}H_{14}O_5$, 不饱和度为 5。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.97 (1H, brs, H-1), 5.13 (1H, m, H-3), 3.23 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, H-4), 2.70 (1H, brs, H-5), 1.95 (1H, brd, $J = 15.0$ Hz, H-6), 2.44 (1H, m, H-6), 5.50 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H-7), 6.02 (1H, ddd, $J = 7.0, 10.7, 17.6$ Hz, H-8), 2.83 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-9), 5.25 (1H, m, H-10), 3.75 (3H, s, 11-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 96.8 (C-1), 94.1 (C-3), 48.7 (C-4), 31.7 (C-5), 30.6 (C-6), 94.0 (C-7), 137.4 (C-8), 43.0 (C-9), 118.1 (C-10), 172.0 (C-11), 52.5 (11-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **14** 为 (1*S*,3*R*,4*S*,5*S*,7*R*,9*R*)-decane-6-carboxylic acid。

4 化合物体外抗登革热病毒的活性评价

4.1 化合物的细胞毒性检测

实验采用 AlamarBlue[®] (Invitrogen) 试剂盒检测化合物对细胞的毒性作用。单体化合物的最高毒性测试浓度均为 500 $\mu\text{mol/mL}$ 。

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天然代谢活性, 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。

细胞活性 = (样品孔荧光值 - 空白对照孔荧光值) / (细胞对照孔荧光值 - 空白对照孔荧光值)

将单体化合物从起始浓度 80 $\mu\text{mol/L}$ 连续 3 倍稀释 6 个梯度。加药培养后, 光镜下观察药物引起的 BHK 细胞病变效应 (CPE), 加入 AlamarBlue[®], 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 荧光检测 AlamarBlue[®] 的还原情况, 激发光 570 nm, 发射光 595 nm。实验结果见表 1。

表 1 化合物体外抗登革热病毒活性

Table 1 Anti-Dengue virus activity of isolated compounds *in vitro*

化合物	CC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	EC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SI
1	>80	74.76	>1.07
2	>80	>80	—
3	>80	>80	—
4	>80	>80	—
5	>80	>80	—
6	>80	>80	—
7	>80	>80	—
8	>80	>80	—
9	>80	>80	—
10	>80	>80	—
11	>80	>80	—
12	>80	>80	—
13	>80	>80	—
14	>80	>80	—

CC₅₀: 使 50% 细胞发生病变时的药物浓度; EC₅₀: 指能够有效抑制 50% 细胞感染病毒的药物浓度; SI: 选择指数, $SI = CC_{50}/EC_{50}$; “—”: 无 SI

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) = CC_{50}/EC_{50} ; “—”: no selected index

4.2 用报告病毒评估化合物抗登革热病毒的活性

实验原理: 含 Rluc (海肾荧光素酶) 报告基因的登革热病毒感染细胞后, Rluc 随着病毒的复制得以表达, Rluc 报告基因的表达水平可以反映登革热病毒感染水平^[20]。实验步骤: (1) 细胞铺板: BHK 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁后备用; (2) 加药处理: 将单体化合物从起始浓度 80 $\mu\text{mol/L}$ 连续 3 倍梯度稀释 6 个梯度。待细胞长成单层后加入 100 μL 含 2 倍药物的 DMEM 培养液, 然后加入 100 μL DMEM 稀释的登革热报告病毒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养; (3) 活性检测: 病毒感染后继续培养 48 h

后,用 Luciferase Assay Kit 检测 Rluc 读值。实验设药物组、病毒对照组(病毒感染后未加药物)、细胞对照组(无病毒感染)。

抑制率=1-(药物组-细胞对照组)/(病毒对照组-细胞对照组)

实验结果在检测浓度下,这些化合物对 BHK 细胞没有明显的细胞毒性,所测试的 CC_{50} 值大于被测试的最高浓度,且在光学显微镜下看不到明显的细胞病变,其中化合物 **1** 具有抗登革热病毒的活性,其 EC_{50} 值为 $74.76 \mu\text{mol/L}$, SI 值大于 1.07,其余化合物均未检测到抗登革热病毒的活性。

5 讨论

在前期研究的基础上,本研究继续采用活性成分追踪分离的研究思路,从热毒宁注射液抗病毒活性部位(经 HP-20 大孔吸附树脂,95%乙醇洗脱部位)中分离并鉴定了 14 个化合物,其中化合物 **8** 为新化合物,于洋等^[11]从中药梔子中分离得到结构类似的木脂素类化合物,推测化合物 **8** 可能来源于梔子,而非生产工艺过程中产生,其余 13 个化合物均为首次从热毒宁注射液中分离得到。通过采用检测 Rluc 报告基因的表达水平来反映病毒感染水平的方法,对分离得到的化合物进行了体外抗登革热病毒的活性测试,发现化合物 **1** 对登革热病毒的 EC_{50} 值为 $74.76 \mu\text{mol/L}$, SI 值大于 1.07,具有体外抗登革热病毒的活性。本研究丰富了热毒宁注射液的化学成分,为全面揭示热毒宁注射液抗病毒临床功效的科学内涵提供一定依据,以期使热毒宁注射液的物质组成谱与功效谱相关联,建立与功效相关联的质量控制方法。

志谢:中国科学院武汉病毒所陈绪林教授课题组帮助测试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] 罗先才. 热毒宁注射液药理作用、临床应用及不良反应 [J]. 中国药物警戒, 2013, 10(4): 215-218.
- [3] 吴彩霞, 张娟娟, 顾雪竹, 等. 热毒宁注射液的临床应

用概况 [J]. 中国药房, 2014, 25(7): 666-669.

- [4] 孙 兰, 周 军, 王振中. 热毒宁注射液药理作用与临床研究进展 [J]. 中国中医急症, 2014, 23(12): 2247-2249.
- [5] 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.
- [6] Seidel V, Bailleul F, Waterman P G. Novel oligorhamnosides from the stem bark of *Cleistopholis glauca* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(1): 6-11.
- [7] Katayama T, Nakatsubo F, Higuchi T. Degradation of a phenylcoumaran, a lignin substructure model, by *Fusarium solani* M-13-1 [J]. *J Jpn Wood Res Soc*, 1986, 32(7): 535-544.
- [8] Matsuda N, Kikuchi M. Studies on the constituents of *Lonicera* species. X. Neolignan glycosides from the leaves of *Lonicera gracilipes* var. *glandulosa* MAXIM [J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44(9): 1676-1679.
- [9] Liu Q B, Huang X X, Song S J, *et al.* Neolignans from the seeds of *Prunus tomentosa* (Rosaceae) and their chemotaxonomic interest [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 55: 236-240.
- [10] Rie K, Mio I, Masao K, *et al.* A new glycoside from the flower buds of *Lonicera japonica* [J]. *Nat Med*, 2000, 54(6): 314-317.
- [11] 于 洋, 高 昊, 姚新生, 等. 梔子中的木脂素类成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 509-514.
- [12] 刘 泉, 林文翰. 中国南海红树植物老鼠簕的化学成分研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2008, 24(6): 648-651.
- [13] 周先礼, 张 钰, 梁 辉, 等. 鳞腺杜鹃化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(4): 483-489.
- [14] Ouyang F, Liu Y, Yao X S, *et al.* Five lignans and an iridoid from *Sambucus williamsii* [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(1): 26-29.
- [15] 梅文莉, 戴好富, 吴大刚. 肥牛木中一个新的降新木脂素 [J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(8): 1480-1481.
- [16] 徐巧林, 谢海辉, 吉川雅之. 欧洲李种子的化学成分研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(3): 299-302.
- [17] Wang Y H, Sun Q Y, Yang F M, *et al.* Neolignans and caffeoyl derivatives from *Selaginella moellendorffii* [J]. *Helve Chim Acta*, 2010, 93(12): 2467-2476.
- [18] 王 芳, 蒋跃平, 石建功, 等. 金银花的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1378-1385.
- [19] Gabor K, Akos K, Laszlo F S, *et al.* Formation of trioxadamantane type aglucones of 3-methoxy secologanin derivatives [J]. *Tetrahedron*, 1997, 54(34): 11659-11668.
- [20] Qing M, Liu W, Yuan Z M, *et al.* A high-throughput assay using dengue-1 virus-like particles for drug discovery [J]. *Antiviral Res*, 2010, 82(2): 163-171.