

热毒宁注射液解热抗炎活性成分研究 (V)

葛 雯^{1,2,3}, 李海波^{1,2}, 王振中^{1,2}, 于 洋⁴, 苏真真^{1,2}, 杨 彪^{1,2}, 曹 亮^{1,2}, 黄文哲^{1,2},
肖 伟^{1,2*}, 姚新生^{4*}

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. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315000

4. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632

摘 要: 目的 研究中药复方热毒宁注射液解热抗炎活性部位的化学成分。方法 采用脂多糖 (LPS) 诱导小鼠内毒素休克模型对热毒宁注射液解热抗炎活性部位进行筛选, 综合应用 HP-20 大孔树脂、硅胶、MCI、ODS 柱色谱以及反相 MPLC、HPLC 等各种现代色谱技术对解热抗炎活性部位进行系统的分离纯化, 根据化合物的光谱数据和理化性质进行结构鉴定。采用 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型, 以抑制炎症细胞因子前列腺素 E₂ (PGE₂) 的分泌为评价指标对分离得到的化合物进行体外抗炎活性评价。结果 热毒宁注射液经大孔吸附树脂 95%乙醇洗脱部位为解热抗炎活性部位, 从中分离得到了 24 个化合物, 分别鉴定为 (4aS,7aS,7bS)-4,4a,7a,7b-tetrahydro-2H-1,7-dioxacyclopent [cd] indene-5-carboxylic acid methyl ester (1)、(4aS,7aS)-1,4a,5,7a-tetrahydro-7-(hydroxymethyl)-cyclopenta [c] pyran-4-carboxylic acid methyl ester (2)、3 α ,5 α -tetrahydrodeoxycordifoline lactam (3)、*R*-(*Z*)-4-甲基-5-[(2',6',6'-三甲基-4'-氧代-2'-环己烯-1'-基) 亚甲基]-2(5*H*)-呋喃酮 (4)、(1 α ,2 α ,3 β ,4 β)-2,4-双 (4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,3-环丁烷二甲酸 (5)、4-[(6-*O*-苯甲酰基- β -D-吡喃葡萄糖基) 氧基]-3-甲氧基苯甲酸 (6)、丁香脂素 (7)、*E*-3-(3,4-二羟基苯亚甲基)-5-(3,4-二羟基苯基) 二氢呋喃-2-酮 (8)、6,7-二甲氧基香豆素 (9)、7-羟基-6-甲氧基香豆素 (10)、水杨酸 (11)、丁香醛 (12)、苯乙酸 (13)、香草醛 (14)、咖啡酸 (15) 香草乙酮 (16)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (17)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (18)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (19)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (20)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (21)、5-*O*-咖啡酰奎宁酸乙酯 (22)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸乙酯 (23)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸乙酯 (24)。其中化合物 1、10、14~24 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 PGE₂ 的分泌具有显著的抑制作用。结论 化合物 1~9、11~13、22~24 均为首次从热毒宁注射液中分离得到, 有机酸类化合物可能为热毒宁注射液解热抗炎的主要药效物质基础之一。

关键词: 热毒宁注射液; 前列腺素 E₂; 6,7-二甲氧基香豆素; 7-羟基-6-甲氧基香豆素; 5-*O*-咖啡酰奎宁酸乙酯; 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸乙酯

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)17-4189-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.027

Research on antipyretic and anti-inflammatory constituents from Reduning Injection (V)

GE Wen^{1,2,3}, LI Hai-bo^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, YU Yang⁴, SU Zhen-zhen^{1,2}, YANG Biao^{1,2}, CAO Liang^{1,2},
HUANG Wen-zhe^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}, YAO Xin-sheng⁴

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

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

3. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315000, China

4. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China

收稿日期: 2019-03-02

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2013ZX09402203); 热毒宁注射液标准化建设项目 (ZYBZH-C-JS-31)

作者简介: 葛 雯 (1993—), 女, 江苏扬州人, 硕士, 研究方向为中药及天然药物的活性成分研究。E-mail: gewen19931598@163.com

*通信作者 肖 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的活性成分研究。Tel: (020)85225894 E-mail: tyaoxs@jnu.edu.cn

Abstract: Objective To study the antipyretic and anti-inflammatory constituents from the active fraction of Reduning (RDN) Injection. **Methods** In this study, the active fraction of RDN Injection was screened by the LPS-induced mouse endotoxin shock model. The chemical constituents were isolated by chromatography on HP-20 macroporous resin, silica gel, MCI, ODS, reverse MPLC, and HPLC repeatedly, and their structures were identified by spectral data and physicochemical property. Taking PGE₂ as the evaluating indicator, the model of LPS-induced RAW264.7 cells was used to evaluate the *in vitro* anti-inflammatory activity of these compounds. **Results** The 95% ethanol eluate of RDN Injection on the macroporous adsorption resin column was proved to be the antipyretic and anti-inflammatory active fraction of RDN Injection. A total of 24 compounds were isolated and identified as (4a*S*,7a*S*,7b*S*)-4,4a,7a,7b-tetrahydro-2*H*-1,7-dioxacyclopent [cd] indene-5-carboxylic acid methyl ester (**1**), (4a*S*,7a*S*)-1,4a,5,7a-tetrahydro-7-(hydroxymethyl)-cyclopenta [c] pyran-4-carboxylic acid methyl ester (**2**), 3*α*,5*α*-tetrahydrodeoxycordifoline lactam (**3**), *R*-(*Z*)-4-methyl-5-[(2',6',6'-trimethyl-4'-oxo-2'-cyclohexen-1'-yl) methylene]-2(5*H*)-furanone (**4**), (1*α*,2*α*,3*β*,4*β*)-2,4-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-cyclobutanedicarboxylic acid (**5**), 4-[(6-*O*-benzoyl- β -*D*-glucopyranosyl) oxy]-3-methoxybenzoic acid (**6**), syringaresinol (**7**), *E*-3-(3,4-dihydroxybenzylidene)-5-(3,4-dihydroxyphenyl) dihydrofuran-2-one (**8**), 6,7-dimethoxy coumarin (**9**), 7-hydroxy-6-methoxy coumarin (**10**), salicylic acid (**11**), syringaldehyde (**12**), phenylacetic acid (**13**), vanillin (**14**), caffeic acid (**15**), aceto-vanillone (**16**), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**17**), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**18**), 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (**19**), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (**20**), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (**21**), 5-*O*-caffeoylquinic acid ethyl ester (**22**), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid ethyl ester (**23**), and 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid ethyl ester (**24**). Among them, compounds **1**, **10**, and **14**—**24** significantly inhibited PGE₂ expression in RAW 246.7 cells stimulated by LPS. **Conclusion** Compounds **1**—**9**, **11**—**13**, and **22**—**24** are isolated from RDN Injection for the first time; And organic acids may be one of the main pharmacodynamic substances of RDN injection for antipyresis and anti-inflammation.

Key words: Reduning Injection; PGE₂; 6,7-dimethoxy coumarin; 7-hydroxy-6-methoxy coumarin; 5-*O*-caffeoylquinic acid ethyl ester; 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid ethyl ester

热毒宁注射液由青蒿、金银花、栀子 3 味常用中药精制组成，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、慢性阻塞肺疾病、手足口病等^[1-4]，临床应用广泛，疗效确切。

本课题组前期已从热毒宁注射液解热抗炎活性部位中分离鉴定 14 个化合物^[5]，在上述研究的基础上，继续对解热抗炎活性部位进行系统的化学成分研究，从中分离鉴定 24 个化合物，分别为 (4a*S*,7a*S*,7b*S*)-4,4a,7a,7b-tetrahydro-2*H*-1,7-dioxacyclopent [cd] indene-5-carboxylic acid methyl ester (**1**)、(4a*S*,7a*S*)-1,4a,5,7a-tetrahydro-7-(hydroxymethyl)-cyclopenta [c] pyran-4-carboxylic acid methyl ester (**2**)、3*α*,5*α*-tetrahydrodeoxycordifoline lactam (**3**)、*R*-(*Z*)-4-甲基-5-[(2',6',6'-三甲基-4'-氧代-2'-环己烯-1'-基) 亚甲基]-2(5*H*)-呋喃酮 {*R*-(*Z*)-4-methyl-5-[(2',6',6'-trimethyl-4'-oxo-2'-cyclohexen-1'-yl) methylene]-2(5*H*)-furanone, **4**}、(1*α*,2*α*,3*β*,4*β*)-2,4-双 (4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,3-环丁烷二甲酸 [(1*α*,2*α*,3*β*,4*β*)-2,4-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-cyclobutanedicarboxylic acid, **5**]、4-[(6-*O*-苯甲酰基- β -*D*-吡喃葡萄糖基) 氧基]-3-甲氧基苯甲酸 {4-[(6-*O*-benzoyl- β -*D*-glucopyranosyl)oxy]-3-methoxybenzoic acid, **6**}、

丁香脂素 (syringaresinol, **7**)、*E*-3-(3,4-二羟基苯亚甲基)-5-(3,4-二羟基苯基) 二氢呋喃-2-酮 [*E*-3-(3,4-dihydroxybenzylidene)-5-(3,4-dihydroxyphenyl) dihydrofuran-2-one, **8**]、6,7-二甲氧基香豆素 (6,7-dimethoxy coumarin, **9**)、7-羟基-6-甲氧基香豆素 (7-hydroxy-6-methoxy coumarin, **10**)、水杨酸 (salicylic acid, **11**)、丁香醛 (syringaldehyde, **12**)、苯乙酸 (phenylacetic acid, **13**)、香草醛 (vanillin, **14**)、咖啡酸 (caffeic acid, **15**) 香草乙酮 (aceto-vanillone, **16**)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, **17**)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, **18**)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **19**)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **20**)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **21**)、5-*O*-咖啡酰奎宁酸乙酯 (5-*O*-caffeoylquinic acid ethyl ester, **22**)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸乙酯 (3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid ethyl ester, **23**)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸乙酯 (4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid ethyl ester, **24**)。其中，化合物 **1**~**9**、**11**~**13**、**22**~**24** 均首次从热毒宁注射液中分离得到。采用脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞

RAW264.7 模型,对所有分离到的化合物进行体外抑制前列腺素 E₂ (PGE₂) 分泌作用研究,结果显示化合物 **1**、**10**、**14**~**24** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 PGE₂ 的分泌具有显著的抑制作用。

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); Agilent 1100 分析型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司, 四元泵, DAD 检测器); Agilent 1260 制备型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司, 二元泵, MWD 检测器); UltiMate 3000 半制备型高效液相色谱仪 (戴安股份有限公司); ELIX5 纯水系统 (上海密理博贸易有限公司); R502B 型旋转蒸发器 (上海申王科技有限公司); 循环水式多用真空泵 SHZ (临海市谭氏真空设备有限公司); HH-4 数显电子恒温水浴锅 (江苏金坛市晶玻实验仪器厂); KQ-500 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); ZF-I 型三用紫外分析仪 (上海顾村电光仪器厂); Thermo Scientific BB15 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国热电公司); Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪 (美国热电公司); Thermo VarioSkan Flash 多功能读数仪 (美国热电公司); TS100 型倒置显微镜 (日本尼康公司); A10051560 型超净工作台 (AIRTECH 公司); ZW-A 型微量振荡器 (常州国华仪器有限公司); L530 型离心机 (湘仪集团); S25 型小舞灵旋涡混合器 (德国 IKA); EDP3-plus 电动多道移液器 (美国 RAININ); 1 000、200、20、10 μ L 单道移液器 (Brand)。

分析高效色谱柱为 C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex), 制备高效色谱柱为 C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μ m, YMC-Pack ODS-A); 半制备高效色谱柱为 C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, YMC-Pack ODS-A); HP-20 大孔树脂 (Mitsubishi-Chemical, 日本); 柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工厂分厂); 薄层硅胶 GF₂₅₄ (烟台市牟平区康必诺化学试剂厂); MCI 填料 (CHO20/P120, 日本); ODS 填料 (120 A 孔径, 50 μ m 均一粒径, YMC 公司); 其余所用甲醇、乙醇、甲酸、石油醚、醋酸乙酯、二氯甲烷均为分析纯, 由南京化学试剂股份有限公司和国药集团化学试剂有限公司生产; DMEM 高糖细胞培养基 (Hyclone), 胎牛血清 (Lonsera), LPS (南京大治

生物科技有限公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 阿拉丁试剂), 24 孔细胞培养板 (JET 公司), 96 孔细胞培养板 (JET 公司), 0.25% 胰酶细胞消化液 (Gibco), PGE₂ ELISA kit (Enzo Life Sciences), 对氨基苯磺酰胺、N-1-萘基乙二胺 (Sigma-Aldrich), 亚硝酸钠 (南京化学试剂股份有限公司), 磷酸 (国药集团化学试剂有限公司)。

热毒宁注射液 (批号 150814), 江苏康缘药业股份有限公司生产; RAW264.7 细胞, 来源于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

2 提取与分离

热毒宁注射液成品浓缩液 62.5 kg, 经 HP-20 大孔吸附柱色谱进行分离, 乙醇-水梯度洗脱, 得到水洗脱部位 RDN-1 (6 228 g), 30%乙醇洗脱部位 RDN-2 (4 836 g), 95%乙醇洗脱部位 RDN-3 (1 314 g)。取 RDN-3 (502 g) 进行硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (0:100、98:2、95:5、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、0:100) 梯度洗脱共得到 16 个馏份 Fr. 1~16。其中 Fr. 3 经反复反相 HPLC 制备 (甲醇-甲酸水梯度洗脱), 得到化合物 **1** (93.8 mg, t_R =38 min)、**14** (236.5 mg, t_R =20.5 min)、**16** (9.5 mg, t_R =23 min)。Fr. 5 经反复反相 HPLC 制备 (甲醇-甲酸水梯度洗脱), 得到化合物 **10** (37.9 mg, t_R =21 min)、**13** (11 mg, t_R =22 min)。Fr. 4 经过硅胶柱色谱分离, 依次以石油醚-醋酸乙酯 (0:100 $\rightarrow$ 0:100)、二氯甲烷-甲醇 (0:100 $\rightarrow$ 0:100) 进行梯度洗脱, 70:30 石油醚-醋酸乙酯部位馏份经反复反相 HPLC 制备 (甲醇-甲酸水梯度洗脱), 得到化合物 **4** (10.2 mg, t_R =15 min)、**9** (20.9 mg, t_R =19 min)、**12** (145.2 mg, t_R =22 min)。Fr. 7 经过 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水 (30:70 $\rightarrow$ 0:100) 为洗脱剂进行梯度洗脱, 40%甲醇-水洗脱部位经 HPLC 制备经反复反相 HPLC 制备, 得到化合物 **2** (18.5 mg, t_R =16 min)、**7** (15.7 mg, t_R =19 min)、**11** (11.8 mg, t_R =14 min)。Fr. 10 经过 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水 (30:70 $\rightarrow$ 0:100) 为洗脱剂进行梯度洗脱, 共得到 11 个馏份 (Fr. 10-1~10-11), Fr. 10-2 经反复反相 HPLC 制备 (甲醇-甲酸水梯度洗脱), 得到化合物 **15** (51.7 mg, t_R =25 min); Fr. 10-5 经反复反相 HPLC 制备 (甲醇-甲酸水梯度洗脱), 得到化合物 **5** (6.6 mg, t_R =25 min)、**8** (7.7 mg, t_R =40 min)、**17** (11.9 mg, t_R =26 min)、**22** (243.9 mg, t_R =23.5 min); Fr. 10-7 经反复反相 HPLC 制

备(甲醇-甲酸水梯度洗脱),得到化合物 **6** (14.2 mg, $t_R=15$ min)、**23** (22.4 mg, $t_R=29.5$ min); Fr. 10-9 经反复反相 HPLC 制备(甲醇-甲酸水梯度洗脱),得到化合物 **24** (82.8 mg, $t_R=14$ min)。Fr. 13 经 MCI 柱色谱分离,以甲醇-水(30:70→0:100)为洗脱剂梯度洗脱共得到 12 个馏份(Fr. 13-1~13-12),其中 Fr. 13-5 再经过 ODS 柱色谱分离,以甲醇-水(30:70→0:100)为洗脱剂进行梯度洗脱,所得馏份再分别经反复反相 HPLC 制备(甲醇-甲酸水梯度洗脱),得到化合物 **18** (11.6 mg, $t_R=38$ min)、**20** (11.9 mg, $t_R=28$ min)、**21** (126.9 mg, $t_R=30$ min); Fr. 13-7 经反复反相 HPLC 制备(甲醇-甲酸水梯度洗脱),得到化合物 **19** (17.1 mg, $t_R=35$ min); Fr. 13-8 经反复反相 HPLC 制备(甲醇-甲酸水梯度洗脱),得到化合物 **3** (42.1 mg, $t_R=29.5$ min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色胶状液体, HR-ESI-MS m/z : 209.068 1 $[M+H]^+$, 提示该化合物的相对分子质量为 208。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据,推测分子式为 $C_{11}H_{12}O_4$, 经计算不饱和度为 6。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.28 (1H, d, $J=4.4$ Hz, H-1), 7.44 (1H, brs, H-3), 3.24 (1H, t, $J=7.2$ Hz, H-5), 3.18 (1H, m, H-6a), 2.61 (1H, m, H-6b), 5.53 (1H, brs, H-7), 3.64 (1H, m, H-9), 4.35 (2H, m, H-10), 3.68 (3H, s, 11-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 97.6 (C-1), 154.5 (C-3), 109.1 (C-4), 33.4 (C-5), 47.3 (C-6), 122.1 (C-7), 145.3 (C-8), 55.8 (C-9), 65.5 (C-10), 169.6 (C-11), 51.7 (11-OCH₃)。上述数据与文献报道京尼平^[6]对照十分相似,将京尼平结构式与化合物 **1** 比对,发现多 2 个氢和 1 个氧,少 1 个不饱和度,此外,该化合物的 HMBC 谱显示 H-1 与 C-10 相关, H-10 与 C-1 相关,推测化合物 **1** 为京尼平的 10 位与 1 位发生分子内脱水反应的产物(图

1)。因此,将化合物 **1** 鉴定为 (4a*S*,7a*S*,7b*S*)-4,4a,7a,7b-tetrahydro-2*H*-1,7-dioxacyclopent[*cd*]indene-5-carboxylic acid methyl ester。

化合物 **2**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 211.096 4 $[M+H]^+$, 提示该化合物的相对分子质量为 210。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据,推测分子式为 $C_{11}H_{14}O_4$, 不饱和度为 5。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.31 (1H, dd, $J=11.2, 4.4$ Hz, H-1a), 3.45 (1H, t, $J=10.8$ Hz, H-1b), 7.66 (1H, brs, H-3), 3.02 (1H, m, H-5), 2.82 (1H, m, H-6a), 2.04 (1H, m, H-6b), 5.75 (1H, brs, H-7), 2.73 (1H, m, H-9), 4.13 (2H, brs, H-10), 3.70 (3H, s, 11-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 67.9 (C-1), 156.9 (C-3), 111.8 (C-4), 35.7 (C-5), 39.6 (C-6), 128.8 (C-7), 145.0 (C-8), 42.7 (C-9), 60.9 (C-10), 170.1 (C-11), 51.6 (11-OCH₃)。上述数据与文献报道京尼平^[6]对照十分相似,其主要不同在于化合物 **2** 中 1 位碳信号为亚甲基碳信号而非半缩醛碳信号,且化合物 **2** 与京尼平相比仅少 1 个氧,推测化合物 **2** 为 1 位不连羟基的类京尼平结构的化合物(图 1)。因此,化合物 **2** 鉴定为 (4a*S*,7a*S*)-1,4a,5,7a-tetrahydro-7-(hydroxymethyl)-cyclopenta [*c*] pyran-4-carboxylic acid methyl ester。

化合物 **3**: 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 543.200 4 $[M+H]^+$, 1 085.390 0 $[2M+H]^+$, 541.186 0 $[M-H]^-$, 1 083.372 7 $[2M-H]^-$, 提示化合物 **10** 的相对分子质量为 542,结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据,推测化合物的分子式为 $C_{27}H_{30}N_2O_{10}$, 经计算不饱和度为 14。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.22 (1H, overlapped, H-1), 7.51 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3), 3.32 (1H, overlapped, H-5), 2.43 (1H, m, H-6a), 1.49 (1H, q, $J=13.2$ Hz, H-6b), 5.18 (1H, dd, $J=10.4, 2.0$ Hz, H-7), 5.52 (1H, overlapped, H-8), 2.73 (1H, m, H-9), 5.27 (1H, dd, $J=17.2, 1.6$ Hz, H-10a), 5.27 (1H, dd,

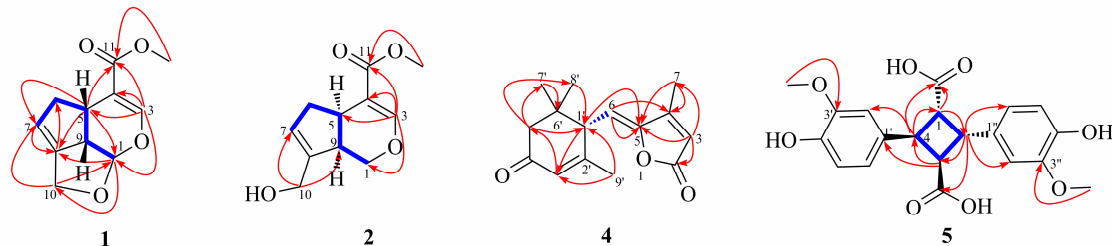


图 1 化合物 1、2、4、5 主要 1H - 1H COSY (—) 和 HMBC (—→) 相关

Fig. 1 Key HMBC (—→) and 1H - 1H COSY (—) correlations of compounds 1, 2, 4, and 5

$J = 10.4, 2.0$ Hz, H-10b), 5.94 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-13), 3.47 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-14a), 2.94 (1H, ddd, $J = 15.6, 6.4, 2.0$ Hz, H-14b), 7.28 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-19), 7.07 (1H, m, H-20), 6.99 (1H, m, H-21), 7.42 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-22), 4.72 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 3.23 (1H, m, H-2'), 3.38 (1H, m, H-3'), 3.34 (2H, m, H-4', 5'), 3.91 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, H-6'a), 3.68 (1H, dd, $J = 12.0, 5.6$ Hz, H-6'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 97.7 (C-1), 150.0 (C-3), 108.9 (C-4), 27.9 (C-5), 33.3 (C-6), 52.8 (C-7), 133.8 (C-8), 44.4 (C-9), 120.5 (C-10), 166.9 (C-12), 52.0 (C-13), 24.0 (C-14), 106.8 (C-15), 133.7 (C-16), 138.4 (C-18), 112.0 (C-19), 122.7 (C-20), 120.0 (C-21), 118.9 (C-22), 127.9 (C-23), 174.8 (13-COOH), 99.9 (C-1'), 74.7 (C-2'), 77.9 (C-3'), 78.3 (C-4'), 71.5 (C-5'), 62.5 (C-6')。上述数据与文献报道对照基本一致^[7], 故鉴定化合物 **3** 为 3 $\alpha, 5\alpha$ -tetrahydrodeoxycordifoline lactam。

化合物 **4**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 247 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 245 $[\text{M}-\text{H}]^-$, HR-ESI-MS m/z : 247.144 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 245.119 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 推测出相对分子质量为 246, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据, 确定分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$, 不饱和度为 7。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.10 (1H, s, H-3), 5.49 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-6), 2.21 (3H, d, $J = 0.8$ Hz, H-7), 3.41 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-1'), 5.92 (1H, s, H-3'), 2.58 (1H, brd, $J = 17.2$ Hz, H-5'a), 2.15 (1H, brd, $J = 17.2$ Hz, H-5'b), 1.00 (3H, s, H-7'), 1.08 (3H, s, H-8'), 1.93 (3H, s, H-9'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.8 (C-2), 117.9 (C-3), 157.1 (C-4), 154.6 (C-5), 110.6 (C-6), 11.7 (C-7), 50.7 (C-1'), 164.0 (C-2'), 126.6 (C-3'), 201.5 (C-4'), 48.5 (C-5'), 37.8 (C-6'), 26.9 (C-7'), 28.0 (C-8'), 23.7 (C-9')。以上数据通过与文献报道的脱落酸^[8]的核磁数据十分相似, 两者进行对比, 化合物 **4** 比脱落酸少 1 个氧和 2 个氢, 多 1 个不饱和度, 且 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据显示 1 位不连基团, 推测化合物 **4** 为脱落酸的 1 位羟基重排后与羧基发生分子内脱水所得的产物 (图 1)。因此, 将化合物 **4** 鉴定为 *R*-(*Z*)-4-甲基-5-[(2',6',6'-三甲基-4'-氧代-2'-环己烯-1'-基) 亚甲基]-2(5*H*)-呋喃酮。

化合物 **5**: 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 387.114 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 775.227 8 $[2\text{M}-\text{H}]^-$, 406.151 1 $[\text{M}+$

$\text{NH}_4]^+$, 提示化合物的相对分子质量为 388, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据, 推测该化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$, 不饱和度为 11。化合物 **5** 的 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 显示了 16 个氢信号, 其中包括低场区的 2 组 1,3,4-三取代苯环的芳香氢信号 [δ 6.92 (2H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2', 2''), 6.79 (2H, dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-6', 6''), 6.75 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5', 5'')], 以及高场区的 4 个叔碳上氢信号 [δ 3.73 (2H, t, $J = 9.6$ Hz, H-2, 4), 3.08 (2H, t, $J = 9.6$ Hz, H-1, 3)] 和 2 个甲氧基氢信号 [δ 3.84 (6H, s, 3', 3''-OCH₃)]; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) 结合 DEPT-135 谱共显示了 20 个碳信号, 包括: 2 个羧基碳信号 δ 177.3 (1, 3-COOH), 6 个芳香季碳信号 δ 134.5 (C-1', 1''), 149.0 (C-3', 3''), 146.5 (C-4', 4''), 10 个次甲基碳信号 δ 50.8 (C-1, 3), 44.5 (C-2, 4), 111.5 (C-2', 2''), 116.2 (C-5', 5''), 120.1 (C-6', 6'') 和 2 个甲氧基碳信号 δ 56.3 (3', 3''-OCH₃)。根据 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱中, H-2, 4 和 H-1, 3 之间的相关信号, 推测该化合物中存在 1 个环丁烷结构, 再根据 HMBC 谱中 H-2, 4 与 1, 3-COOH/C-1', 1''/C-6', 6''/C-2', 2''的相关信号, H-1, 3 与 1, 3-COOH/C-1', 1''的相关信号, 3', 3''-OCH₃ 和 C-3', 3''的相关信号, 以及该化合物的分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$ 确定其平面结构 (图 1)。因此, 将化合物 **5** 鉴定为 (1 $\alpha, 2\alpha, 3\beta, 4\beta$)-2,4-双 (4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,3-环丁烷二甲酸。

化合物 **6**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 452 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 433 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 提示化合物的相对相对分子质量为 434, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据, 推测该化合物的分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$, 不饱和度为 11。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.43 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 7.14 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.36 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6), 3.77 (3H, s, 3-OCH₃), 5.10 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 3.34 (2H, m, H-2', 3'), 3.26 (1H, m, H-4'), 3.81 (1H, m, H-5'), 3.18 (1H, m, H-2''), 4.58 (1H, dd, $J = 11.4, 1.8$ Hz, H-6'a), 4.22 (1H, dd, $J = 12.0, 7.8$ Hz, H-6'b), 7.92 (1H, dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-2'', 6''), 7.50 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3'', 5''), 7.65 (1H, m, H-4''); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 125.3 (C-1), 113.0 (C-2), 148.7 (C-3), 149.9 (C-4), 114.6 (C-5), 122.9 (C-6), 167.6 (C-7), 55.9 (3-OCH₃), 99.4 (C-1'), 73.4 (C-2'), 76.9 (C-3'), 70.4 (C-4'), 74.1 (C-5'), 64.6 (C-6'), 129.9 (C-1''), 129.6 (C-2'', 6''), 129.0 (C-3'', 5''), 133.8 (C-4''), 165.9 (C-7'')。上述数

据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **6** 为 4-[(6-*O*-苯甲酰基-β-*D*-吡喃葡萄糖基) 氧基]-3-甲氧基苯甲酸。

化合物 **7**: 白色针晶 (甲醇), mp 175~176 °C, ESI-MS m/z : 417 $[M-H]^-$, 419 $[M+H]^+$, 提示化合物的相对分子质量为 418。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测分子式为 $C_{22}H_{26}O_8$, 不饱和度为 10。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.64 (4H, brs, H-2, 2', 6, 6'), 4.70 (2H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7, 7'), 3.13 (2H, m, H-8, 8'), 4.25 (2H, dd, $J = 8.4, 6.4$ Hz, H-9a, 9'a), 3.87 (2H, dd, $J = 9.2, 3.2$ Hz, H-9b, 9'b), 3.83 (12H, brs, 3, 3', 5, 5'-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 133.1 (C-1, 1'), 104.5 (C-2, 2', 6, 6'), 149.3 (C-3, 3'), 136.2 (C-4, 4'), 149.3 (C-5, 5'), 87.6 (C-7, 7'), 55.5 (C-8, 8'), 72.8 (9, 9'), 56.8 (3, 3', 5, 5'-OCH₃)。上述数据与文献报道对照基本一致^[10], 故鉴定化合物 **7** 为丁香脂素。

化合物 **8**: 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 315.087 6 $[M+H]^+$, 推测出化合物的相对分子质量为 314, 结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 确定该化合物的分子式为 $C_{17}H_{14}O_6$, 计算不饱和度为 11。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 3.62 (1H, ddd, $J = 17.6, 12.4, 2.4$ Hz, H-4a), 3.08 (1H, ddd, $J = 17.6, 6.0, 3.2$ Hz, H-4b), 5.50 (1H, dd, $J = 8.4, 6.0$ Hz, H-5), 7.03 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.96 (1H, dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz, H-6'), 7.40 (1H, t, $J = 2.6$ Hz, H-7'), 6.77 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2''), 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), 6.69 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-6''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 175.1 (C-2), 122.1 (C-3), 37.3 (C-4), 80.5 (C-5), 128.0 (C-1'), 117.8 (C-2'), 146.7 (C-3'), 149.2 (C-4'), 116.7 (C-5'), 124.9 (C-6'), 138.3 (C-7'), 133.4 (C-1''), 113.8 (C-2''), 146.9 (C-3''), 146.8 (C-4''), 116.4 (C-5''), 118.7 (C-6'')。上述数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **8** 为 *E*-3-(3,4-二羟基苯亚甲基)-5-(3,4-二羟基苯基) 二氢呋喃-2-酮。

化合物 **9**: 无色针状结晶 (甲醇), mp 145~147 °C, ESI-MS m/z : 207 $[M+H]^+$, 提示化合物的相对分子质量为 206。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测分子式为 $C_{11}H_{10}O_4$, 不饱和度为 7。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.25 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 7.86 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-4), 6.96 (1H, s, H-5), 7.12 (1H, s, H-8), 3.91 (3H, s, 6-OCH₃), 3.87 (3H, s,

7-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 163.8 (C-2), 113.6 (C-3), 145.9 (C-4), 110.0 (C-5), 148.1 (C-6), 154.8 (C-7), 101.0 (C-8), 151.3 (C-9), 113.1 (C-10), 56.8 (6, 7-OCH₃)。上述数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **9** 为 6,7-二甲氧基香豆素。

化合物 **10**: 无色针状结晶 (甲醇), mp 202~204 °C, ESI-MS m/z : 193 $[M+H]^+$, 191 $[M-H]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 192。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测分子式为 $C_{10}H_8O_4$, 不饱和度为 7。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.19 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 7.84 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-4), 6.76 (1H, s, H-5), 7.10 (1H, s, H-8), 3.90 (3H, s, 6-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 164.1 (C-2), 112.6 (C-3), 146.1 (C-4), 109.9 (C-5), 147.1 (C-6), 153.0 (C-7), 104.0 (C-8), 151.4 (C-9), 112.5 (C-10), 56.8 (6-OCH₃)。上述数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **10** 为 7-羟基-6-甲氧基香豆素。

化合物 **11**: 无色粉末, ESI-MS m/z : 139 $[M+H]^+$, 137 $[M-H]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 138。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测化合物的分子式为 $C_7H_6O_3$, 计算得不饱和度为 5。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.85 (1H, overlapped, H-3), 7.43 (1H, m, H-4), 6.89 (1H, overlapped, H-5), 7.85 (1H, dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 114.5 (C-1), 163.2 (C-2), 118.1 (C-3), 136.6 (C-4), 120.0 (C-5), 131.6 (C-6), 173.8 (C-7)。上述数据与文献报道对照基本一致^[14], 故鉴定化合物 **11** 为水杨酸。

化合物 **12**: 白色针状结晶 (甲醇), mp 110~113 °C, ESI-MS m/z : 181 $[M-H]^-$, 183 $[M+H]^+$, 提示化合物的相对分子质量为 182。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测分子式为 $C_9H_{10}O_4$, 不饱和度为 5。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.19 (2H, s, H-2, 6), 9.72 (1H, s, H-7), 3.89 (6H, s, 3, 5-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 129.1 (C-1), 108.2 (C-2, 6), 149.5 (C-3, 5), 143.6 (C-4), 192.9 (C-7), 56.8 (3, 5-OCH₃)。上述数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **12** 为丁香醛。

化合物 **13**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 135 $[M-H]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 136。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测其分子式为 $C_8H_8O_2$, 计算得不饱和度为 5。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.26 (5H, overlapped, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.58

(1H, s, H-7); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 136.2 (C-1), 130.3 (C-2, 6), 129.4 (C-3, 5), 127.8 (C-4), 42.2 (C-7), 175.9 (C-8)。上述数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **13** 为苯乙酸。

化合物 **14**: 无色针晶 (甲醇), mp 81~84 °C, ESI-MS m/z : 153 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 151 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 152。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测化合物的分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, 计算得不饱和度为 5。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.42 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 6.93 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.43 (1H, dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, H-6), 9.73 (1H, s, H-7), 3.91 (3H, s, 3-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 130.7 (C-1), 111.3 (C-2), 149.7 (C-3), 154.7 (C-4), 116.3 (C-5), 127.9 (C-6), 192.9 (C-7), 56.4 (3-OCH₃)。上述数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **14** 为香草醛。

化合物 **15**: 淡黄色结晶 (丙酮), mp 194~198 °C, ESI-MS m/z : 179 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 180。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测该化合物的分子式为 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$, 计算得不饱和度为 6。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.76 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.92 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 7.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.21 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 127.8 (C-1), 115.0 (C-2), 146.8 (C-3), 149.4 (C-4), 116.0 (C-5), 116.4 (C-6), 146.7 (C-7), 122.8 (C-8), 171.5 (C-9)。上述数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **15** 为咖啡酸。

化合物 **16**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 167 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 189 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 提示化合物的相对分子质量为 166。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推测分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$, 计算其不饱和度为 5。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.56 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 3.90 (3H, s, 3-OCH₃), 2.53 (3H, s, 7-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 130.8 (C-1), 112.2 (C-2), 149.3 (C-3), 153.7 (C-4), 116.1 (C-5), 125.5 (C-6), 199.8 (C-7), 26.5 (C-8), 56.7 (3-OCH₃)。上述数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **16** 为香草乙酮。

化合物 **17**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 517 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 515 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 516。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推断化合物的分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$, 不饱和度为 14。 ^1H -NMR

(400 MHz, CD_3OD) δ : 2.30~2.16 (4H, m, H-2, 6), 5.42 (1H, m, H-3), 3.96 (1H, dd, $J = 8.0, 3.2$ Hz, H-4), 5.40 (1H, m, H-5), 7.06 (2H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2', 2''), 6.77 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5', 5''), 6.96 (2H, brd, $J = 8.4$ Hz, H-6', 6''), 7.57 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7'), 6.27 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 7.61 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-7''), 6.36 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 75.0 (C-1), 38.2 (C-2), 72.1 (C-3), 71.1 (C-4), 72.9 (C-5), 36.3 (C-6), 178.7 (C-7), 127.8 (C-1'), 127.9 (C-1''), 115.1 (C-2', 2''), 146.8 (C-3', 3''), 149.5 (C-4'), 149.6 (C-4''), 116.5 (C-5', 5''), 123.0 (C-6', 6''), 147.0 (C-7'), 147.2 (C-7''), 115.2 (C-8'), 115.7 (C-8''), 168.5 (C-9'), 169.0 (C-9'')。上述数据与文献报道对照基本一致^[18], 故鉴定化合物 **17** 为 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸。

化合物 **18**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 517 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 515 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 516。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推断化合物的分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$, 不饱和度为 14。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.23~2.07 (4H, m, H-2, 6), 4.36 (1H, m, H-3), 5.11 (1H, dd, $J = 9.2, 2.4$ Hz, H-4), 5.65 (1H, m, H-5), 6.99 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2'), 6.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.90 (2H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-6', 6''), 7.50 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7'), 6.18 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 7.01 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2''), 6.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5''), 7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7''), 6.28 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 76.5 (C-1), 38.4 (C-2), 69.1 (C-3), 75.9 (C-4), 69.1 (C-5), 36.8 (C-6), 178.2 (C-7), 127.6 (C-1'), 127.7 (C-1''), 114.7 (C-2', 2''), 146.8 (C-3', 3''), 147.9 (C-4', 4''), 116.4 (C-5', 5''), 123.2 (C-6', 6''), 147.6 (C-7'), 147.7 (C-7''), 115.1 (C-8', 8''), 168.5 (C-9'), 168.6 (C-9'')。上述数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **18** 为 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸。

化合物 **19**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 531 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 529 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 530。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推断化合物的分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$, 不饱和度为 14。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.34~2.13 (4H, m, H-2, 6), 5.61 (1H, m, H-3), 5.03 (1H, dd, $J = 8.0, 3.2$ Hz, H-4), 4.31 (1H, m, H-5), 3.75 (3H, s, 7-OCH₃), 7.02 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2', 2''), 6.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'),

6.90 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7'), 6.25 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 6.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), 6.87 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6''), 7.55 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7''), 6.26 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 75.6 (C-1), 41.4 (C-2), 66.1 (C-3), 75.2 (C-4), 69.9 (C-5), 36.8 (C-6), 176.2 (C-7), 127.7 (C-1'), 127.8 (C-1''), 115.0 (C-2'), 114.9 (C-2''), 146.8 (C-3', 3''), 149.6 (C-4', 4''), 116.5 (C-5', 5''), 123.2 (C-6'), 123.1 (C-6''), 147.4 (C-7'', 7'), 115.1 (C-8'), 115.2 (C-8''), 168.4 (C-9'), 168.5 (C-9''), 53.0 (7-OCH₃)。上述数据与文献报道对照基本一致^[20], 故鉴定化合物 **19** 为 3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **20**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 531 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 529 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 530。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推断化合物的分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$, 不饱和度为 14。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.31~2.16 (4H, m, H-2, 6), 5.39 (1H, m, H-3), 3.97 (1H, dd, $J = 6.4, 3.2$ Hz, H-4), 5.32 (1H, m, H-5), 3.68 (3H, s, 7-OCH₃), 7.05 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.97 (2H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, H-6', 6''), 7.54 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 6.21 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 7.06 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 6.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), 7.61 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7''), 6.34 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 73.2 (C-1), 35.2 (C-2), 68.2 (C-3), 70.5 (C-4), 70.8 (C-5), 34.2 (C-6), 174.2 (C-7), 126.2 (C-1'), 126.4 (C-1''), 113.7 (C-2'), 113.4 (C-2''), 145.5 (C-3'), 145.4 (C-3''), 148.2 (C-4'), 148.4 (C-4''), 115.1 (C-5', 5''), 121.6 (C-6'), 121.7 (C-6''), 145.8 (C-7'), 146.1 (C-7''), 113.7 (C-8'), 114.0 (C-8''), 166.5 (C-9'), 167.3 (C-9''), 51.6 (7-OCH₃)。上述数据与文献报道基本一致^[20], 故鉴定化合物 **20** 为 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **21**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 531 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 529 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 530。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推断化合物的分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$, 不饱和度为 14。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.28~2.08 (4H, m, H-2, 6), 4.34 (1H, m, H-3), 5.10 (1H, dd, $J = 8.0, 2.8$ Hz, H-4), 5.54 (1H, m, H-5), 3.71 (3H, s, 7-OCH₃), 7.00 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.75 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5', 5''),

6.90 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 7.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 6.15 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8'), 7.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 6.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), 6.92 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7''), 6.29 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 75.8 (C-1), 38.5 (C-2), 69.1 (C-3), 74.9 (C-4), 68.6 (C-5), 38.4 (C-6), 175.2 (C-7), 127.7 (C-1'), 127.5 (C-1''), 115.2 (C-2', 2''), 146.8 (C-3', 3''), 149.8 (C-4'), 149.7 (C-4''), 116.5 (C-5', 5''), 123.1 (C-6', 6''), 147.7 (C-7', 7''), 114.7 (C-8'), 114.6 (C-8''), 168.5 (C-9'), 167.9 (C-9''), 53.1 (7-OCH₃)。上述数据与文献报道基本一致^[20], 故鉴定化合物 **21** 为 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **22**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 383 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 381 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 382。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推断化合物的分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_9$, 不饱和度为 8。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.19~2.01 (4H, m, H-2, 6), 4.15 (1H, m, H-3), 3.75 (1H, brd, $J = 6.0$ Hz, H-4), 5.28 (1H, m, H-5), 4.10 (2H, m, H-8), 1.21 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-9), 7.04 (1H, brs, H-2'), 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.92 (1H, brd, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 7.52 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7'), 6.22 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 75.8 (C-1), 37.8 (C-2), 71.9 (C-3), 72.6 (C-4), 70.4 (C-5), 37.8 (C-6), 174.9 (C-7), 62.6 (C-8), 14.3 (C-9), 127.5 (C-1'), 114.9 (C-2'), 146.6 (C-3'), 149.5 (C-4'), 116.5 (C-5'), 123.0 (C-6'), 147.1 (C-7'), 115.1 (C-8'), 168.3 (C-9')。上述数据与文献报道对照基本一致^[21], 故鉴定化合物 **22** 为 5-*O*-咖啡酰奎宁酸乙酯。

化合物 **23**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 545 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 543 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 544。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推断化合物 **23** 的分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$, 不饱和度为 14。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.31~2.15 (4H, m, H-2, 6), 5.40 (1H, m, H-3), 3.98 (1H, dd, $J = 6.4, 3.2$ Hz, H-4), 5.32 (1H, m, H-5), 4.12 (2H, m, H-8), 1.23 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-9), 7.05 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.78 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5', 5''), 6.96 (2H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6', 6''), 7.54 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 6.21 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8'), 7.06 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2''), 7.61 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7''), 6.34 (1H, d, $J = 16.0$

Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 74.5 (C-1), 36.6 (C-2), 72.0 (C-3), 69.7 (C-4), 72.3 (C-5), 35.6 (C-6), 175.1 (C-7), 62.6 (C-8), 14.3 (C-9), 127.6 (C-1'), 127.9 (C-1''), 115.1 (C-2'), 114.8 (C-2''), 146.9 (C-3'), 146.8 (C-3''), 149.8 (C-4'), 149.5 (C-4''), 116.5 (C-5', 5''), 123.0 (C-6'), 123.1 (C-6''), 147.1 (C-7'), 147.4 (C-7''), 115.1 (C-8'), 115.4 (C-8''), 168.7 (C-9'), 168.0 (C-9'')。上述数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **23** 为 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸乙酯。

化合物 **24**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 545 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 543 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 提示化合物的相对分子质量为 544。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据, 推断分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$, 不饱和度为 14。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.23~2.07 (4H, m, H-2, 6), 4.35 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, H-4), 5.54 (1H, m, H-5), 4.15 (2H, m, H-8), 1.24 (3H, t, $J=7.2$ Hz, H-9), 7.00 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-2'), 6.74 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-5', 5''), 6.91 (2H, dd, $J=8.0, 1.2$ Hz, H-6', 6''), 7.50 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7'), 6.17 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8'), 7.02 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-2''), 7.60 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7''), 6.29 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 75.7 (C-1), 38.5 (C-2), 69.1 (C-3), 74.9 (C-4), 68.6 (C-5), 38.3 (C-6), 174.7 (C-7), 62.7 (C-8), 14.3 (C-9), 127.5 (C-1'), 127.7 (C-1''), 114.7 (C-2'), 114.5 (C-2''), 146.8 (C-3'), 146.7 (C-3''), 149.7 (C-4'), 149.6 (C-4''), 116.5 (C-5', 5''), 123.1 (C-6', 6''), 147.6 (C-7'), 147.7 (C-7''), 115.1 (C-8'), 115.2 (C-8''), 168.5 (C-9'), 167.9 (C-9'')。上述数据与文献报道基本一致^[23], 故鉴定化合物 **24** 为 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸乙酯。

4 化合物体外抗 PGE_2 活性评价

将细胞以 0.25%胰酶 (含 0.02% EDTA) 消化, 含 10% FBS 的 DMEM 培养基调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 均匀接种至 24 孔板, 每孔 400 μL , 种板后放入培养箱培养 24 h 后, 取出 24 孔板, 吸去上清液, 加入无血清的 DMEM 培养基配制的含药培养基 (实验共设 3 组, 分别为对照组: 每孔加入 495 μL 含 0.1% DMSO 的无血清 DMEM 培养基; 模型组: 每孔加入 495 μL 含 0.1% DMSO 的无血清的 DMEM 培养基; 给药组: 每孔加 495 μL 含相应浓度样品的 DMEM 培养基), 加药完毕后将 24 孔板放入 CO_2 细胞培养箱培养 1 h。1 h 后,

除对照组外, 其余每孔加入 5 μL 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS (终质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 对照组每孔加入 5 μL 的无血清的 DMEM 培养基, 加药完毕后将 24 孔板放入 CO_2 细胞培养箱继续培养 18 h。收集细胞培养液, 所有孔上清用无血清 DMEM 稀释 8 倍, 按 Elisa 试剂盒说明书检测 PGE_2 含量。并按照公式计算抑制率。

抑制率 = (模型组 PGE_2 平均含量 - 给药组 PGE_2 平均含量) / (模型组 PGE_2 平均含量 - 对照组 PGE_2 平均含量)

本实验采用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞模型, 以炎性细胞因子 PGE_2 的分泌为评价指标, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 值的测试结果见表 1, 以化合物物质的量浓度 ($\mu\text{mol}/\text{L}$) 的对数值为横坐标, 抑制率为纵坐标, 得到量效关系曲线见图 2。结果显示, 化合物 **1**、**10**、**14**~**24** 对 PGE_2 的分泌具有良好的抑制作用, 且化合物 **1**、**10**、**14**、**15**、**21**、**23** 和 **24** 的 IC_{50} 值小于 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 说明这 7 个化合物均有良好的体外抗炎活性, 有待进一步对其体内抗炎活性进行评价。本实验结果说明有机酸类成分是热毒宁注射液发挥抗炎作用的主要成分。

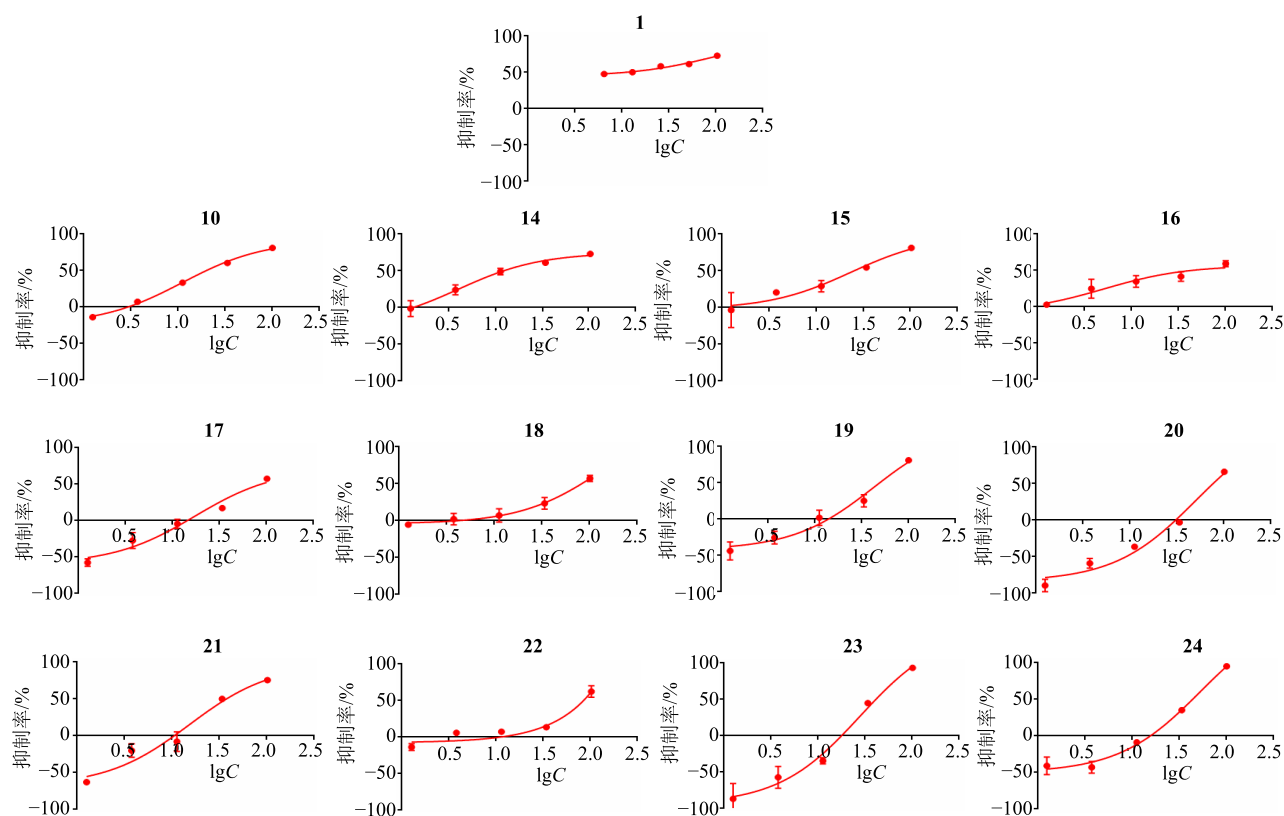
表 1 化合物体外抗炎 (PGE_2) 的 IC_{50} 的测定

Table 1 Determination of IC_{50} of *in vitro* anti-inflammatory activity (PGE_2) of compounds

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
1	12.94	19	54.08
10	21.38	20	81.47
14	15.14	21	42.76
15	28.25	22	82.04
16	50.47	23	36.06
17	84.53	24	42.36
18	83.95		

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, 从热毒宁注射液解热抗炎活性部位分离鉴定了 24 个化合物, 并采用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞模型, 对分离得到的化合物进行体外抑制 PGE_2 分泌作用研究, 结果显示, 化合物 **1**、**10**、**14**~**24** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 PGE_2 的分泌具有良好的抑制作用。上述研究阐明有机酸类成分可能为热毒宁注射液发挥抗炎作用的主要药效成分。本研究丰富了热毒宁注射液的化学成分, 部分揭示了其临床应用的物质基础。在后续研究中,

图2 化合物对 PGE₂ 的抑制作用的量效关系曲线Fig. 2 Dose-effect relationship of inhibition of compounds on PGE₂

本课题组将继续选择适宜的药理模型对追踪分离到的热毒宁注射液解热抗炎活性部位的化学成分进行药效评价,以期进一步提升热毒宁注射液的质控标准,建立与功效相关联的质量控制方法。

参考文献

- [1] 杨步流. 热毒宁、炎琥宁、利巴韦林注射液治疗外感风热证疗效比较 [J]. 山西中医学院学报, 2011, 12(4): 53.
- [2] 温玉峰, 郑中斌. 热毒宁注射液治疗急性上呼吸道感染的疗效观察 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2017, 17(8): 1052-1053.
- [3] 林玲, 夏翼. 热毒宁注射液治疗痰热壅肺型老年性肺炎的临床疗效观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(84): 95.
- [4] 胡理强. 热毒宁注射液治疗手足口病的临床疗效 [J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(3): 93-94.
- [5] 葛雯, 李海波, 于洋, 等. 热毒宁注射液化学成分研究 (IV) [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3042-3050.
- [6] 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.
- [7] Lamidi M, Ollivier E, Mahiou V, *et al.* Gluco-indole alkaloids from the bark of *Nauclea diderrichii*. ¹H and ¹³C-NMR assignments of 3a-5a-tetrahydrooxycordifoline lactam and cadambine acid [J]. *Magn Resonance Chem*, 2005, 43(5): 427-429.
- [8] 李海波, 于洋, 王振中, 等. 热毒宁注射液化学成分研究 (III) [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1643-1649.
- [9] Lee E J, Kim J S, Kim H P, *et al.* Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities [J]. *Food Chem*, 2010, 120(1): 134-139.
- [10] 张艳军, 聂辉, 周德雄, 等. 桂野桐化学成分的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2172-2176.
- [11] Bader A, De T N, Cotugno R, *et al.* Phenolic compounds from the roots of Jordanian Viper's grass, *Scorzonera judaica* [J]. *J Nat Prods*, 2011, 74(6): 1421-1426.
- [12] 周幸文, 刘珍伶, 寇亮, 等. 黄花补血草的化学成分研究 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2013, 49(4): 569-572.
- [13] 高莉, 田华, 吕培军, 等. 乌柏叶化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1518-1522.
- [14] 张婷婷, 马国需, 许福泉, 等. 诸葛菜水溶性化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 49(24): 2165-2167.
- [15] 尹宏权, 齐秀兰, 华会明, 等. 云木香化学成分研究

- [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(4): 217-220.
- [16] 蒋文贤, 罗世林, 王 英, 等. 美洲大蠊的化学成分 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2015, 36(4): 294-301.
- [17] 段 洁, 李 巍, 胡旭佳, 等. 九子参化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 528-530.
- [18] 杨昕昕, 王国才, 吴 春, 等. 白花地胆草中的酚类化学成分 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2011, 32(5): 489-492.
- [19] 张婷婷, 曹 跃, 曹 佳, 等. 火绒草的咖啡酰类成分研究 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 90-93.
- [20] 陈 斌, 蔡 巍, 刘 芳, 等. 脉络宁注射液的化学成分研究 (II) [J]. 中南药学, 2016, 14(9): 936-939.
- [21] 田景奎. 珍珠菜属两种药用植物化学成分的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2002.
- [22] Wang Y, Hamburger M, Gneho J, *et al.* Cyclohexanecarboxylic acid derivatives from *Psiadia trinervia* [J]. *Helv Chim Acta*, 1992, 75(1): 269-275.
- [23] 关焕玉, 兰燕宇, 廖尚高, 等. 羊耳菊中咖啡酰基奎宁酸类化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(12): 1948-1952.