

小驳骨的化学成分研究

张海新, 夏 召, 许天启, 陈宜敏, 周光雄*

暨南大学药学院中药及天然药物研究所 广东省普通高校中药和天然药物药效物质基础重点实验室, 广东 广州 510632

摘要: 目的 研究小驳骨 *Gendarussa vulgaris* 地上部分的化学成分。方法 采用反复硅胶柱色谱、ODS 开放柱、凝胶柱色谱以及反相半制备型 HPLC 等各种现代色谱分离技术对其化学成分进行分离纯化, 通过 HR-ESI-MS、NMR 等光谱数据及 X-ray 单晶衍射鉴定化合物结构。结果 从小驳骨地上部分 95%乙醇提取物的醋酸乙酯萃取物中分离得到了 17 个化合物, 分别鉴定为 24-降胆-5-烯-3 β -醇 (1)、dihydrobetulic acid (2)、桦木酸 (3)、3-羟基-30-去甲基-20-酮基-28-羽扇豆酸 (4)、6-羟基-7,8-二甲氧基香豆素 (5)、6,7-二甲氧基香豆素 (6)、5,6,7-三甲氧基香豆素 (7)、6,7,8-三甲氧基香豆素 (8)、左旋香树脂酚葡萄糖苷 (9)、4-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯 (10)、*N*-反式阿魏酸酰胺 (11)、*N*-(2-羟基-3-苯丙基) 乙酰胺 (12)、3-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯 (13)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (14)、对-*E*-香豆素奎宁酸甲酯 (15)、3,4,5-*O*-三咖啡酰基奎宁酸甲酯 (16)、1'*S**,4'*R**-8-(4'-hydroxy-2',6'-trimethylcyclohex-2-enyl)-6-methyloct-3*E*,5*E*,7*E*-trien-2-one (17)。结论 化合物 1、2 为新天然产物, 除化合物 6 以外, 其他化合物均为首次从该植物中分离得到。对分离得到的 17 个化合物进行抗炎活性筛选, 其中, 化合物 2、3、11、13、17 具有抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞释放 NO 的作用, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 (30.91 ± 0.50)、(4.66 ± 0.56)、(17.67 ± 0.57)、(28.45 ± 0.67)、(20.79 ± 0.24) μ mol/L。

关键词: 小驳骨; 24-norchol-5-en-3 β -ol; dihydrobetulic acid; 桦木酸; 6,7-二甲氧基香豆素; 3-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯; 抗炎活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4620-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.004

Study on chemical constituents of *Gendarussa vulgaris*

ZHANG Hai-xin, XIA Zhao, XU Tian-qi, CHEN Yi-min, ZHOU Guang-xiong

Guangdong Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicines, Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of aerial part of *Gendarussa vulgaris*. **Methods** The compounds were separated and purified by silica gel column chromatography, ODS and Sephadex LH-20 chromatography and semi-preparative HPLC. Base on HR-ESI-MS, NMR, and other spectral data, their structures were identified. **Results** A total of 17 compounds were isolated from the EtOAc fraction of 95% ethanol extract and identified as 24-norchol-5-en-3 β -ol (1), dihydrobetulic acid (2), betulinic acid (3), 3-hydroxy-30-nor-20-oxo-28-lupanoic acid (4), 6-hydroxy-7,8-dimethoxycoumarin (5), 6,7-dimethoxycoumarin (6), 5,6,7-trimethoxycoumarin (7), 6,7,8-trimethoxycoumarin (8), syringaresinol-4-*O*- β -*D*-glucopyranoside (9), 4-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (10), *N*-trans-feruloyl tyramine (11), *N*-(2-hydroxy-3-phenylpropyl) acetamide (12), 3-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (13), 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid methyl ester (14), *p*-*E*-coumarin quinic acid methyl ester (15), 3,4,5-*O*-tricaffeoyl quinic acid methyl ester (16) and 1'*S**,4'*R**-8-(4'-hydroxy-2',6'-trimethylcyclohex-2-enyl)-6-methyloct-3*E*,5*E*,7*E*-trien-2-one (17). **Conclusion** Compounds 1 and 2 are new natural products. All Compounds are isolated from this plant for the first time except compound 6. Besides, all compounds are screened for anti-inflammatory activity and compounds 2, 3, 11, 13, and 17 have NO release inhibiting activities on LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells with IC₅₀ values of (30.91 ± 0.50), (44.66 ± 0.56), (17.67 ± 0.57), (28.45 ± 0.67) and (20.79 ± 0.24) μ mol/L, respectively.

Key words: *Gendarussa vulgaris* Nees; 24-norchol-5-en-3 β -ol; dihydrobetulic acid; betulinic acid; 6,7-dimethoxycoumarin; 3-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester; anti-inflammatory activity

收稿日期: 2019-12-25

基金项目: 国家重点研究计划项目 (2017YFC1703800); 国家自然科学基金面上项目 (81573578); 广州市科技计划项目 (201704030120)

作者简介: 张海新 (1995—), 女, 在读硕士, 研究方向为天然药物化学。Tel: 15603016558 E-mail: 1227397445@qq.com

*通信作者 周光雄, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为天然药物化学。Tel: (020)85221469 E-mail: guangxzh@sina.com

小驳骨 *Gendarussa vulgaris* Nees 为爵床科驳骨草属小灌木植物, 广泛分布于中国、印度、斯里兰卡和马来半岛^[1], 主要生长在广东、广西、海南等省。其味辛, 性温。小驳骨的地上部分被广泛用于治疗筋膜骨折、创伤性损伤、风湿病、瘀血、血瘀、月经阻滞以及产后腹痛^[2]。现代药理研究表明小驳骨具有抗炎、抗氧化和保肝、抗血管生成、免疫抑制、抗病毒等多种活性^[3-7]。为了寻找小驳骨中具有生物活性的成分, 为下一步开发利用提供科学依据, 本实验对小驳骨地上部分 95%乙醇提取物的醋酸乙酯部位进行了深入的化学成分研究, 综合运用各种现代色谱和光谱技术, 从醋酸乙酯萃取部位中分离得到 17 个化合物, 分别鉴定为 24-降胆-5-烯-3 β -醇 (24-norchol-5-en-3 β -ol, **1**)、dihydrobetulic acid (**2**)、桦木酸 (betulinic acid, **3**)、3-羟基-30-去甲基-20-酮基-28-羽扇豆酸 (3-hydroxy-30-nor-20-oxo-28-lupanoic acid, **4**)、6-羟基-7,8-二甲氧基香豆素 (6-hydroxy-7,8-dimethoxycoumarin, **5**)、6,7-二甲氧基香豆素 (6,7-dimethoxycoumarin, **6**)、5,6,7-三甲氧基香豆素 (5,6,7-trimethoxycoumarin, **7**)、6,7,8-三甲氧基香豆素 (6,7,8-trimethoxycoumarin, **8**)、左旋香树脂酚葡萄糖苷 (syringaresinol-4-*O*- β -D-glucopyranoside, **9**)、4-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯 (4-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **10**)、*N*-反式阿魏酸酪胺 (*N*-trans-feruloyl tyramine, **11**)、*N*-(2-羟基-3-苯丙基) 乙酰胺 [*N*-(2-hydroxy-3-phenylpropyl) acetamide, **12**]、3-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯 (3-caffeoylquinic acid methyl ester, **13**)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid methyl ester, **14**)、对-*E*-香豆素酸甲酯 (*p*-*E*-coumarin quinic acid methyl ester, **15**)、3,4,5-*O*-三咖啡酰基奎尼酸甲酯 (3,4,5-*O*-tricaffeoyl quinic acid methyl ester, **16**) 1'*S*',4'*R*'-8-(4'-hydroxy-2',6',6'-trimethylcyclohex-2-enyl)-6-methyl-oct-3*E*,5*E*,7*E*-trien-2-one (**17**)。其中, 化合物 **1**、**2** 为新天然产物, 除化合物 **6** 以外, 其他化合物均为首次从该植物中分离得到, 发现化合物 **2**、**3**、**13**、**11**、**17** 具有抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞释放 NO 的作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Bruker AV-400 和 AV-600 型核磁共振仪 (德国布鲁克公司); LC-100 型液相色谱仪 (上海伍丰科学仪器有限公司); Agilent 6120 LC/MS TOF 质谱仪

(美国安捷伦科技公司); 液相分析色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m, 美国 Welch 公司); 半制备液相色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×10.0 mm, 5 μ m, 美国 Welch 公司); Eyela 旋转蒸发仪; BP211D 电子天平 (Sartorius 公司); TLC 预制板 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); ODS (Silicycle 公司); 氘代试剂 (Merck 公司); 色谱级甲醇 (山东禹王公司); 液相用水 (广东怡宝公司), 其他试剂均为分析纯。槲皮素由同实验室从叶下珠中分离得到, 质量分数为 98%。

1.2 细胞株

小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 由暨南大学药学院中药及天然药物研究所提供。

1.3 药材来源

实验药材于 2016 年 6 月在暨南大学校园内采集, 由暨南大学药学院周光雄教授鉴定为爵床科植物小驳骨 *Gendarussa vulgaris* Nees 的地上部分。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥的小驳骨地上部分 20 kg, 粗粉碎后用 95% 乙醇热回流反复提取 2 次, 80% 乙醇热回流提取 1 次, 每次 2 h, 滤过, 合并 3 次提取液, 减压浓缩至无醇味, 得到粗提取物浸膏。粗提取物浸膏加水混悬, 依次用石油醚、醋酸乙酯萃取, 萃取液分别减压浓缩, 得到石油醚部位 (500 g)、醋酸乙酯部位 (1.2 kg)。醋酸乙酯部位经正相硅胶柱色谱分离, 石油醚-丙酮 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 经薄层色谱检测, 合并后得到 24 个组分 Fr. 1~24。Fr. 12 经过反复硅胶柱色谱, 二氯甲烷-醋酸乙酯 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 经 TLC 分析合并得到 9 个子流分 Fr. 12-1~12-9。Fr. 12-1 重结晶得化合物 **1** (5 mg)。Fr. 12-6 经过 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱, 得到 Fr. 12-6-1~12-6-10。Fr. 12-6-4 经高效液相色谱分析制备纯化得到化合物 **5** (3 mg) 和 **8** (20 mg)。Fr. 12-6-6 经高效液相色谱分析制备纯化得到化合物 **10** (30 mg) 和 **13** (8 mg)。Fr. 12-6-9 经高效液相色谱分析制备纯化得到化合物 **16** (5 mg) 和 **17** (10 mg)。Fr. 20 经过反复 ODS 开放柱色谱, 甲醇-水 (20:80→100:0) 梯度洗脱, 经 TLC 分析合并得到 14 个子流分 Fr. 20-1~20-14。Fr. 20-2 重结晶得化合物 **2** (7 mg)。Fr. 20-1 重结晶得化合物 **4** (10 mg)。Fr. 20-4 经过反复硅胶柱色谱, 二氯甲烷-

甲醇系统, 经 TLC 分析合并得到 8 个子流分 Fr. 20-4-1~20-4-8, Fr. 20-4-8 经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱, 得到 Fr. 20-4-8-1~20-4-8-11。Fr. 20-4-8-9 经高效液相色谱分析制备纯化得到化合物 **3** (6 mg)。Fr. 20-4-8-3 经高效液相色谱分析制备纯化得到化合物 **6** (3 mg)、**7** (9 mg) 和 **9** (15 mg)。Fr. 20-4-8-5 经高效液相色谱分析制备纯化得到化合物 **11** (5 mg) 和 **12** (4 mg)。Fr. 20-4-8-11 经高效液相色谱分析制备纯化得到化合物 **14** (8 mg) 和 **15** (6 mg)。

2.2 细胞培养

小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 放置在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数期细胞用于实验。

2.3 细胞活力实验和抗炎活性实验

RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释到每孔 4×10^4 个细胞接种到 96 孔板, 孔体积 100 μ L, 置恒温培育箱 (37 °C、5% CO₂) 中培养 24 h, 吸出培养液, 加入含有不同浓度的待测化合物及阳性对照药 (槲皮素) 的培养液, 培养 24 h 后弃去上清液, 在每孔中加入 5 mg/mL MTT, 37 °C 下反应 4 h, 弃去 MTT, 每孔加入 200 μ L DMSO, 置摇床上低速震荡 10 min, 使结晶充分溶解, 用酶标仪在 570 nm 处测量各孔的吸光度 (*A*) 值, 计算化合物的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。

抗炎活性采用抑制一氧化氮 (NO) 生成实验, 以 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 为检测模型, 应用 Griess 试剂显色法检测一氧化氮生成量^[8-9]。RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释到每孔 4×10^4 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μ L。置恒温培育箱 (37 °C、5% CO₂) 中培养 24 h, 吸出培养液, 加入含有不同浓度的待测化合物及阳性对照药 (槲皮素) 的培养液, 同时预先在培养液中加入 100 ng/mL LPS。培养 24 h 后, 吸取各孔上清液至新的 96 孔板中, 每孔加入以 1:1 比例混合的 Griess A 和 B 溶液 100 μ L。在 3 000 r/min 下离心 1 min, 继续在黑暗处反应 10 min。用酶标仪在 540 nm 波长下测定各孔 *A* 值, 计算化合物的 IC₅₀ 值。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色针状晶体 (石油醚-丙酮)。mp 144~147 °C, HR-ESI-MS *m/z*: 331.350 1 [*M*+H]⁺,

分子式为 C₂₃H₃₈O。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.68 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, *J* = 1.6 Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 5.36 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 36.7 (C-1), 31.8 (C-2), 72.0 (C-3), 42.5 (C-4), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 32.1 (C-7), 32.0 (C-8), 50.3 (C-9), 37.4 (C-10), 21.2 (C-11), 39.9 (C-12), 42.5 (C-13), 56.9 (C-14), 26.2 (C-15), 25.6 (C-16), 56.2 (C-17), 12.1 (C-18), 19.5 (C-19), 39.0 (C-20), 19.2 (C-21), 28.4 (C-22), 12.0 (C-23)。经与文献数据比对, 并经单晶 X 射线衍射确定其结构为 24-norchol-5-en-3 β -ol^[10], 为新天然产物; 化合物 **1** (CCDC 1957803) 的晶体学数据可以从剑桥晶体学数据中心免费获得, 网址为 www.ccdc.cam.ac.uk。

化合物 **2**: 白色块状晶体 (石油醚-丙酮)。mp 182.5 °C, HR-ESI-MS *m/z*: 481.364 4 [*M*+Na]⁺, 分子式为 C₃₀H₅₀O₃。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.65 (3H, s, H-22), 0.76 (3H, s, H-23), 0.93 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, s, H-25), 0.86 (3H, s, H-26), 1.69 (3H, s, H-29), 1.69 (3H, s, H-30); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 14.4 (C-24), 15.7 (C-22), 18.0 (C-6), 18.5 (C-23), 20.3 (C-29), 20.3 (C-30), 20.5 (C-11), 23.4 (C-25), 23.4 (C-26), 25.0 (C-12), 27.2 (C-2), 28.1 (C-28), 29.2 (C-15), 30.1 (C-21), 31.7 (C-16), 34.0 (C-20), 36.3 (C-7), 37.6 (C-10), 38.3 (C-1), 38.5 (C-4), 40.1 (C-13), 40.2 (C-8), 42.0 (C-14), 46.6 (C-19), 48.2 (C-9), 50.0 (C-18), 54.9 (C-5), 55.4 (C-17), 78.6 (C-3), 177.2 (C-27)。经与文献数据比对, 并经单晶 X 射线衍射确定其结构为 dihydrobetulic acid^[11], 为新天然产物; 化合物 **2** (CCDC 1957804) 的晶体学数据可以从剑桥晶体学数据中心免费获得, 网址为 www.ccdc.cam.ac.uk。

化合物 **3**: 白色粉末 (甲醇)。HR-ESI-MS *m/z*: 479.349 1 [*M*+Na]⁺, 分子式 C₃₀H₄₈O₃。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.27 (1H, d, *J* = 5.1 Hz, H-3), 4.56 (1H, brs, H-20), 0.65 (3H, s, H-23), 0.76 (3H, s, H-24), 0.93 (3H, s, H-25), 0.86 (3H, s, H-26), 0.86 (3H, s, H-27), 1.64 (3H, s, H-29), 4.68 (1H, brs, H-30); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 38.3 (C-1), 27.2 (C-2), 76.8 (C-3), 38.5 (C-4), 54.9 (C-5), 18.0 (C-6), 33.9 (C-7), 40.3 (C-8), 49.9 (C-9), 36.7 (C-10), 20.5 (C-11), 25.1 (C-12), 37.6 (C-13), 42.0 (C-14), 30.1 (C-15), 31.7 (C-16), 55.4 (C-17), 46.6 (C-18),

48.5 (C-19), 150.3 (C-20), 29.2 (C-21), 36.3 (C-22), 28.1 (C-23), 15.9 (C-24), 15.7 (C-25), 15.8 (C-26), 14.4 (C-27), 177.2 (C-28), 18.9 (C-29), 109.6 (C-30)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **3** 为白桦酸。

化合物 **4**: 白色针状晶体 (二氯甲烷-甲醇)。mp 204 °C, HR-ESI-MS m/z : 479.342 9 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{29}H_{46}O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.64 (3H, s, H-22), 0.94 (3H, s, H-23), 0.76 (3H, s, H-24), 0.85 (6H, s, H-25, 26), 0.65 (3H, s, H-27); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 38.2 (C-1), 25.1 (C-2), 76.8 (C-3), 38.5 (C-4), 55.4 (C-5), 18.0 (C-6), 34.0 (C-7), 40.2 (C-8), 48.5 (C-9), 36.8 (C-10), 19.0 (C-11), 20.4 (C-12), 37.6 (C-13), 42.0 (C-14), 28.1 (C-15), 30.1 (C-16), 54.9 (C-17), 46.7 (C-18), 50.0 (C-19), 27.1 (C-20), 36.3 (C-21), 15.8 (C-22), 29.2 (C-23), 16.0 (C-24), 15.7 (C-25), 14.4 (C-26), 31.8 (C-27), 198.7 (C-28), 177.2 (C-29)。经与文献数据对比, 并经单晶 X 射线衍射确定其结构为 3-羟基-30-去甲基-20-酮基-28-羽扇豆酸^[13]。化合物 **4** (CCDC 1957805) 的晶体学数据可以从剑桥晶体学数据中心免费获得, 网址为 www.ccdc.cam.ac.uk。

化合物 **5**: 白色粉末 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 245.042 6 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{11}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.32 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.81 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 6.81 (1H, s, H-5), 4.00 (3H, s, 7-OCH₃), 3.97 (3H, s, 8-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 163.0 (C-2), 115.3 (C-3), 145.9 (C-4), 108.9 (C-5), 142.8 (C-6), 141.9 (C-7), 146.2 (C-8), 149.1 (C-9), 116.5 (C-10), 61.7 (7-OCH₃), 62.1 (8-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **5** 为 6-羟基-7,8-二甲氧基香豆素。

化合物 **6**: 无色针状结晶 (甲醇)。mp 146~149 °C, HR-ESI-MS m/z : 229.047 7 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{11}H_{10}O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.30 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.96 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.26 (1H, s, H-5), 7.07 (1H, s, H-8), 3.86 (3H, s, 6-OCH₃), 3.80 (3H, s, 7-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.5 (C-2), 112.6 (C-3), 144.3 (C-4), 109.0 (C-5), 145.9 (C-6), 152.5 (C-7), 100.0 (C-8), 149.4 (C-9), 111.2 (C-10), 55.9 (6-OCH₃), 56.1 (7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **6** 为 6,7-二甲氧基香豆素。

化合物 **7**: 无色方晶 (甲醇)。mp 146~149 °C, HR-ESI-MS m/z : 259.058 2 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{12}H_{12}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.41 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.97 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.13 (1H, s, H-8), 3.90 (3H, s, 5-OCH₃), 3.86 (3H, s, 7-OCH₃), 3.84 (3H, s, 7-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 159.8 (C-2), 114.7 (C-3), 144.4 (C-4), 145.2 (C-5), 140.3 (C-6), 149.7 (C-7), 105.0 (C-8), 142.1 (C-9), 114.4 (C-10), 56.2 (5-OCH₃), 61.0 (6-OCH₃), 61.5 (7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **7** 为 5,6,7-三甲氧基香豆素。

化合物 **8**: 无色针晶 (甲醇)。mp 146~149 °C, HR-ESI-MS m/z : 259.058 2 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{12}H_{12}O_5$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.40 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.97 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.13 (1H, s, H-5), 3.90 (3H, s, 6-OCH₃), 3.86 (3H, s, 7-OCH₃), 3.84 (3H, s, 8-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 159.7 (C-2), 114.6 (C-3), 144.3 (C-4), 114.4 (C-5), 105.0 (C-6), 140.0 (C-7), 145.2 (C-8), 142.1 (C-9), 149.6 (C-10), 61.4 (7-OCH₃), 61.0 (7-OCH₃), 56.1 (8-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **8** 为 6,7,8-三甲氧基香豆素。

化合物 **9**: 白色粉末 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 603.204 9 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{28}H_{36}O_{13}$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.07 (2H, m, H-1, 5), 4.61 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-2), 4.67 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-6), 6.60 (2H, s, H-2', 6'), 6.66 (2H, s, H-2'', 6''), 3.76 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.75 (6H, s, 3'', 5''-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 53.6, 53.7 (C-1, 5), 85.1, 85.4 (C-2, 6), 71.2, 71.3 (C-4, 8), 137.2 (C-1'), 104.2 (C-2', 6'), 152.6 (C-3', 5'), 133.7 (C-4'), 131.3 (C-1''), 103.7 (C-2'', 6''), 147.9 (C-3'', 5''), 134.9 (C-4''), 102.7 (C-1'''), 74.2 (C-2'''), 76.5 (C-3'''), 69.9 (C-4'''), 77.2 (C-5'''), 60.9 (C-6'''), 56.0 (3', 5'-OCH₃), 56.4 (3'', 5''-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **9** 为左旋香树脂酚葡萄糖苷。

化合物 **10**: 淡黄色无定形粉末 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 391.100 3 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{17}H_{20}O_9$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.00 (2H, m, H-2), 3.76 (1H, m, H-3), 5.01 (1H, m, H-4), 3.92 (1H, m, H-5), 1.92 (1H, dd, $J = 13.6, 3.6$ Hz, H-6a), 1.76 (1H, dd, $J = 12.8, 9.2$ Hz, H-6b), 3.79 (3H, s, 7-OCH₃), 7.24 (1H, s, H-2'), 6.77 (1H, d, $J =$

8.1 Hz, H-5'), 7.07 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6'), 7.44 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 73.3 (C-1), 35.3 (C-2), 67.1 (C-3), 71.1 (C-4), 69.6 (C-5), 37.3 (C-6), 173.8 (C-7), 52.1 (-OCH₃), 125.1 (C-1'), 115.8 (C-2'), 150.3 (C-3'), 148.3 (C-4'), 114.1 (C-5'), 123.4 (C-6'), 145.4 (C-7'), 111.1 (C-8'), 165.8 (C-9')。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **10** 为 4-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **11**: 无色结晶(甲醇)。mp 138~140 °C, HR-ESI-MS m/z : 336.121 6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 C₁₈H₁₉NO₄。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.10 (1H, t, $J = 5.7$ Hz, =NH), 7.29 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-3), 7.01 (2H, m, H-4', 8'), 6.98 (1H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, H-9), 6.40 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2), 6.67 (2H, m, H-5', 7'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8), 7.09 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5), 3.90 (3H, s, 6-OCH₃), 3.34 (2H, m, H-1'), 2.63 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2'); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.4 (C-1), 156.0 (C-6'), 149.1 (C-7), 148.4 (C-6), 140.0 (C-3), 130.1 (C-3', 4', 8'), 126.6 (C-4), 122.4 (C-9), 118.9 (C-2), 115.7 (C-5', 7'), 116.2 (C-8), 111.1 (C-5), 56.0 (6-OCH₃), 41.3 (C-1'), 34.8 (C-2')。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **11** 为 *N*-反式阿魏酸酰胺。

化合物 **12**: 白色粉末(甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 216.100 2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 C₁₁H₁₅NO₂。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.18 (2H, m, H-2, 6), 7.24 (2H, m, H-3, 5), 7.16 (1H, m, H-4), 2.82 (1H, dd, $J = 13.7, 5.7$ Hz, H-7a), 2.59 (1H, dd, $J = 13.7, 8.4$ Hz, H-7b), 3.86 (1H, m, H-8), 4.80 (1H, s, 8-OH), 3.34 (1H, dd, $J = 10.9, 5.2$ Hz, H-9a), 3.28 (1H, dd, $J = 10.6, 5.8$ Hz, H-9b), 7.71 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, =NH), 1.74 (3H, s, 12-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 139.3 (C-1), 129.1 (C-2, 6), 128.1 (C-3, 5), 125.9 (C-4), 36.6 (C-7), 52.4 (C-8), 62.6 (C-9), 169.0 (C-11), 22.7 (C-12)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **12** 为 *N*-(2-羟基-3-苯丙基) 乙酰胺。

化合物 **13**: 淡黄色无定形粉末(甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 391.100 7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 C₁₇H₂₀O₉。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.10 (2H, m, H-2), 5.01 (1H, m, H-3), 3.58 (1H, m, H-4), 3.88 (1H, m, H-5), 1.99 (1H, m, H-6a), 1.76 (1H, m, H-6b), 3.55 (3H, s, 7-OCH₃), 7.02 (1H, d, $J = 2.1$ Hz,

H-2'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.97 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 7.37 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 6.10 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 73.0 (C-1), 35.1 (C-2), 69.3 (C-3), 71.1 (C-4), 66.8 (C-5), 37.3 (C-6), 173.7 (C-7), 51.8 (7-OCH₃), 125.3 (C-1'), 115.9 (C-2'), 148.6 (C-3'), 145.2 (C-4'), 114.6 (C-5'), 121.0 (C-6'), 145.4 (C-7'), 113.8 (C-8'), 165.4 (C-9')。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **13** 为 3-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **14**: 淡黄色无定形粉末(甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 553.132 1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 C₂₆H₂₆O₁₂。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.99 (2H, m, H-2, 6), 2.21 (2H, m, H-2, 6), 5.18 (1H, m, H-3), 3.85 (1H, dd, $J = 5.7, 3.1$ Hz, H-4), 5.05 (1H, m, H-5), 3.59 (3H, s, 7-OCH₃), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.00 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 7.49 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 6.25 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), 6.98 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6''), 7.42 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7''), 6.13 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 72.5 (C-1), 34.5 (C-2), 70.0 (C-3), 69.9 (C-4), 70.9 (C-5), 34.5 (C-6), 173.8 (C-7), 52.0 (7-OCH₃), 125.2 (C-1'), 114.4 (C-2'), 145.5 (C-3'), 148.9 (C-4'), 115.9 (C-5'), 121.5 (C-6'), 145.8 (C-7'), 114.7 (C-8'), 165.3 (C-9'), 125.5 (C-1''), 113.5 (C-2''), 145.1 (C-3''), 148.6 (C-4''), 115.8 (C-5''), 121.3 (C-6''), 145.7 (C-7''), 114.6 (C-8''), 166.1 (C-9'')。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 **14** 为 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **15**: 黄色粉末(甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 375.105 6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 C₁₇H₂₀O₈。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.51 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2, 6), 6.80 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 7.46 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 6.23 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 2.08 (1H, m, H-2'), 1.93 (1H, dd, $J = 13.6, 3.7$ Hz, H-6'), 5.03 (1H, m, H-3'), 3.58 (1H, dd, $J = 6.1, 3.0$ Hz, H-4'), 3.88 (1H, m, H-5'), 1.77 (1H, dd, $J = 12.8, 9.1$ Hz, H-6''), 2.08 (1H, m), 3.55 (3H, s, 7'-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 124.8 (C-1), 130.2 (C-2, 6), 115.9 (C-3, 5), 160.2 (C-4), 144.8 (C-7), 113.9 (C-8), 165.5 (C-9), 73.1 (C-1'), 35.2 (C-2'), 71.0 (C-3'), 69.5 (C-4'), 67.0 (C-5'), 37.2 (C-6'), 173.6 (C-7'), 51.8 (7'-OCH₃)。

以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 **15** 为对-*E*-香豆素奎宁酸甲酯。

化合物 **16**: 淡黄色无定形粉末 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 693.476 3 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{35}H_{32}O_{15}$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.24 (1H, m, H-2a), 2.19 (1H, m, H-2b), 5.16 (1H, m, H-3), 4.96 (1H, dd, $J = 6.5, 3.1$ Hz, H-4), 5.07 (1H, m, H-5), 1.98 (1H, m, H-6a), 2.01 (1H, m, H-6b), 3.59 (3H, s, 7-OCH₃), 7.04 (1H, brs, H-2'), 7.05 (1H, brs, H-2''), 7.04 (1H, brs, H-2'''), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5''), 6.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'''), 7.00 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6'), 6.98 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6''), 6.98 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6'''), 7.49 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.47 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7''), 7.42 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'''), 6.28 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 6.27 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8''), 6.27 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'''); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 72.5 (C-1), 34.5 (C-2), 69.9 (C-3), 70.9 (C-4), 67.8 (C-5), 37.7 (C-6), 173.4 (C-7), 52.0 (7-OCH₃), 125.3 (C-1'), 125.4 (C-1''), 125.6 (C-1'''), 114.5 (C-2'), 114.7 (C-2''), 114.8 (C-2'''), 145.5 (C-3'), 145.7 (C-3''), 145.8 (C-3'''), 145.0 (C-4'), 145.5 (C-4''), 145.6 (C-4'''), 114.8 (C-5'), 115.8 (C-5''), 115.9 (C-5'''), 121.3 (C-6'), 121.5 (C-6''), 121.6 (C-6'''), 148.4 (C-7'), 148.6 (C-7''), 148.7 (C-7'''), 113.3 (C-8'), 113.6 (C-8''), 113.8 (C-8'''), 165.3 (C-9'), 166.0 (C-9''), 166.1 (C-9''')。以上数据与文献报道一致^[24], 故鉴定化合物 **16** 为 3,4,5-*O*-三咖啡酰基奎宁酸甲酯。

化合物 **17**: 无色油状物 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 297.183 1 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{18}H_{26}O_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.26 (3H, s, H-1), 6.14 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-3), 7.54 (1H, dd, $J = 15.3, 11.7$ Hz, H-4), 6.26 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-5), 6.24 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-7), 5.72 (1H, dd, $J = 15.5, 10.1$ Hz, H-8), 1.99 (3H, s, H-9), 2.42 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-1'), 5.47 (1H, s, H-3'), 4.15 (1H, dd, $J = 9.4, 7.1$ Hz, H-4'), 1.25 (1H, dd, $J = 13.0, 7.6$ Hz, H-5'), 1.68 (1H, dd, $J = 12.7, 5.8$ Hz, H-6'), 0.79 (3H, s, H-7'a), 0.92 (3H, s, H-7'b), 1.54 (3H, s, H-8'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.1 (C-1), 198.0 (C-2), 130.2 (C-3), 139.3 (C-4), 127.7 (C-5), 144.1 (C-6), 136.4 (C-7), 133.9 (C-8), 13.2 (C-9), 54.4 (C-1'), 134.1 (C-2'), 126.8 (C-3'),

63.5 (C-4'), 44.6 (C-5'), 33.8 (C-6'), 23.8 (C-7'a), 29.4 (C-7'b), 22.5 (C-8')。以上数据与文献报道一致^[25], 故鉴定化合物 **17** 为 1'S*,4'R*-8-(4'-hydroxy-2',6',6'-trimethylcyclohex-2-enyl)-6-methyloct-3*E*,5*E*,7*E*-trien-2-one。

3.2 活性结果

对分离得到的 17 个化合物进行抗炎活性筛选, 其中, 化合物 **2**、**3**、**11**、**13**、**17** 具有抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞释放 NO 的作用, 其 IC₅₀ 值分别为 (30.91±0.50)、(4.66±0.56)、(17.67±0.57)、(28.45±0.67)、(20.79±0.24) μ mol/L。

参考文献

- [1] Lu S, Zhang G. Alkaloids from *Gendarussa vulgaris* Nees [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(18): 1610-1613.
- [2] 唐闻闻, 曾佳, 王艺纯, 等. 小驳骨的化学成分与药理作用研究进展 [J]. *医药导报*, 2014, 33(4): 477-480.
- [3] Jothimanivannan C, Kumar R S, Subramanian N. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of aerial parts of *Justicia gendarussa* Burm [J]. *Int J Pharmacol*, 2010, 6(3): 278-283.
- [4] Krishna K L, Mruthunjaya K, Patel J A. Antioxidant and hepatoprotective potential of stem methanolic extract of *Justicia gendarussa* Burm [J]. *Int J Pharmacol*, 2010, 6(2): 72-80.
- [5] Periyanyagam K, Umamaheswari B, Suseela L, et al. Evaluation of antiangiogenic effect of the leaves of *Justicia gendarussa* (Burm. f) (Acanthaceae) by chorioallantoic membrane method [J]. *Am J Infect Dis*, 2009, 5(3): 180-182.
- [6] Arokiyaraj S, Perinbam K, Agastian P, et al. Immunosuppressive effect of medicinal plants of *Kolli hills* on mitogen-stimulated proliferation of the human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [J]. *Indian J Pharmacol*, 2007, 39(4): 180-183.
- [7] Cho H J, Jeong S G, Park J E, et al. Antiviral activity of angelicin against gammaherpesviruses [J]. *Antivir Res*, 2013, 100(1): 75-83.
- [8] Cheng X X, Zhang Z Q, Tang W, et al. Chemical components and cytotoxic activity of *Polytrichum commune* L. ex Hedw [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2014, 26: 1733-1738.
- [9] Yuan C M, Tang G H, Zhang Y, et al. Bioactive limonoid and triterpenoid constituents of *Turraea pubescens* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(6): 1166-1174.
- [10] Khripach V A, Zhabinskii V N, Konstantinova O V, et al. Preparation of (25*R*)-and (25*S*)-26-functionalized steroids

- as tools for biosynthetic studies of cholic acids [J]. *Steroids*, 2005, 70(8): 551-562.
- [11] Eignerova B, Tichy M, Krasulova J, *et al.* Synthesis and antiproliferative properties of new hydrophilic esters of triterpenic acids [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 140: 403-420.
- [12] 张琳, 金媛媛, 田景奎. 田基黄的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(5): 341-344.
- [13] 张龙来, 李玉霞, 魏孝义, 等. 领春木枝叶化学成分的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(2): 228-232.
- [14] 康洁, 苏现明, 张鹏, 等. 鸡眼藤地上部分的化学成分研究 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 111-113.
- [15] Wu S H, Luo X D, Ma Y B, *et al.* Two new germacranolides from *Magnolia grandiflora* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2001, 3(2): 95-102.
- [16] 胡疆, 张卫东, 柳润辉, 等. 两面针的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1689-1691.
- [17] 李芸芳, 田学军, 杨光忠, 等. 金刚纂化学成分研究 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2008, 42(3): 396-399.
- [18] 王敏, 梁敬钰, 刘雪婷, 等. 白马骨的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(3): 198-201.
- [19] Ge L, Wan H, Tang S, *et al.* Novel caffeoylquinic acid derivatives from *Lonicera japonica* Thunb. flower buds exert pronounced anti-HBV activities [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(62): 35374-35385.
- [20] 尹海龙, 李建, 董俊兴. 白英的化学成分研究(II)[J]. 军事医学, 2013, 37(4): 279-282.
- [21] Ma Q, Ding W, Chen Z, *et al.* Bisamides and rhamnosides from mangrove actinomycete *Streptomyces* sp. SZ-A15 [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(7): 761-766.
- [22] 王美娇, 王金兰, 王丹, 等. 柳蒿化学成分研究(II) [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5411-5418.
- [23] 向梅先, 胡亚京, 何峰, 等. 血三七正丁醇部位化学成分研究 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 1872-1874.
- [24] 何明珍, 巩升帅, 黄小方, 等. 平卧菊三七化学成分研究(II) [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2519-2526.
- [25] Shi D Y, Han L J, Sun J, *et al.* A new halogenated biindole and a new apo-carotenone from green alga *Chaetomorpha basiretorsa* Setchell [J]. *Chin Chem Lett*, 2005, 16(6): 777-780.