

板蓝根乙醇提取物化学成分及其抑制一氧化氮释放活性研究

张东东^{1,2}, 孙 玉¹, 李婧伊², 阮德清², 陈凯先^{2,3}, 李医明², 王 瑞^{2*}

1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203

摘要: 目的 研究板蓝根 *Isatidis Radix* 的化学成分及其抑制一氧化氮 (NO) 释放活性。方法 采用硅胶、反相 ODS C₁₈、葡聚糖凝胶、半制备液相等色谱技术分离纯化, 结合理化性质, NMR、MS 等波谱数据解析结构, CCK-8 法测定化合物抑制 NO 释放活性。结果 从板蓝根中共分离鉴定了 17 个化合物, 分别为 (7*S*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,3',4'-tetramethoxy-9,7-dihydroxy-8,8',7.0.9'-lignan (1)、(-)-(7*R*,7'*R*,8*S*,8'*S*)-4-β-*D*-吡喃葡萄糖基-4'-羟基-3,3',5'-三甲氧基-7,9',9'-双环氧木脂烷 (2)、liballinol (3)、2-amino-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,3-diol (4)、对羟基苯丙醇 (5)、3-甲氧基-4-羟基苯丙醇 (6)、3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基-苯基)-丙基-1-酮 (7)、3,4,5-三甲氧基肉桂酸 (8)、(*E*)-4-(3*R*,4*S*)-3,4-dihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)but-3-en-2-one (9)、对羟基苯甲醛 (10)、香草酸 (11)、3,4-二羟基苯乙酸 (12)、苯甲酰胺 (13)、苯乙酰胺 (14)、*L*-焦谷氨酸 (15)、*L*-焦谷氨酸甲酯 (16) 和 (4*R*,5*S*)-5-hydroxyhexan-4-olide (17)。化合物 7 和 8 具有抑制 NO 释放活性, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值分别为 98.5、58.3 μmol/L。结论 化合物 9 为新天然产物, 化合物 1~4、9、12~17 为首次从板蓝根中分离鉴定, 化合物 7 和 8 表现出抑制 NO 释放活性。

关键词: 板蓝根; 菰蓝; 一氧化氮抑制活性; 苯丙素; 苯甲酸衍生物; 3,4,5-三甲氧基肉桂酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)07-1943-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.003

Chemical constituents from alcohol extract of *Isatidis Radix* and their nitric oxide inhibitory activitiesZHANG Dong-dong^{1,2}, SUN Yu¹, LI Jing-yi², RUAN De-qing², CHEN Kai-xian^{2,3}, LI Yi-ming², WANG Rui²

1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the alcohol extract of *Isatis indigotica* roots and their nitric oxide inhibitory activities. **Methods** The chemical components were isolated and purified by silica gel, ODS C₁₈ gel, sephadex LH-20 and semi preparative-HPLC chromatographic techniques while the structures were deduced by NMR and MS spectral data analysis, the NO inhibitory activities were tested by CCK-8 methods. **Results** Seventeen compounds were obtained and elucidated as (7*S*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,3',4'-tetramethoxy-9,7-dihydroxy-8,8',7.0.9'-lignan (1), (-)-(7*S*,7'*S*,8*R*,8'*R*)-4-β-*D*-glucopyranosyloxy-3,3',5'-trimethoxy-7,9',9'-diepoxy-lignane (2), liballinol (3), 2-amino-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,3-diol (4), *p*-hydroxyl benzyl propanol (5), 3-methoxy-4-hydroxyphenylpropanol (6), 4-β-hydroxypropiovanillone (7), 3,4,5-trimethoxy-cinnamic acid (8), (*E*)-4-(3*R*,4*S*)-3,4-dihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)but-3-en-2-one (9), *p*-hydroxybenzaldehyde (10), vanillic acid (11), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (12), benzamide (13), phenylacetamide (14), *L*-pyroglutamate (15), methyl-*L*-pyroglutamate (16), and (4*R*,5*S*)-5-hydroxyhexan-4-olide (17). Compounds 7 and 8 exhibited NO inhibitory activities with IC₅₀ values of 98.5 and 58.3 μmol/L, respectively. **Conclusion** Compound 9 was a new natural product, compounds 1—4, 9 and 12—17 were isolated from

收稿日期: 2021-08-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573571); 国家自然科学基金项目 (81673570); 上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划项目 [ZY(2021-2023)-0215]; 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-YL12)

作者简介: 张东东, 男, 博士, 讲师, 主要从事中药药效物质基础研究。Tel: (029)38185165 E-mail: zhangnatprod@163.com

*通信作者: 王 瑞, 女, 教授, 博士生导师。Tel: (021)51322181 E-mail: wr@shutcm.edu.cn

Isatis indigotica root for the first time, compounds **7** and **8** showed NO inhibitory activities.

Key words: *Isatidis Radix*; *Isatis indigotica* Fort.; nitric oxide inhibitory activities; phenylpropanine; benzoic acid derivatives; 3,4,5-trimethoxy-cinnamic acid

板蓝根是十字花科(Cruciferae)菘蓝属 *Isatis* L. 植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根^[1], 主产于我国北方地区。其味苦性寒, 具有清热解毒、凉血利咽等功效, 常治疗流行性感、流行性腮腺炎、流行性乙型肝炎等疾病^[2-5]。近年来板蓝根备受国际青睐, 2019 年板蓝根国际质量标准的发布, 进一步促进了其国际化, 也展现出板蓝根优越的市场前景和研究价值。对板蓝根近 40 年的文献综述研究发现, 虽然已经有 300 多个化合物及其相关的药理活性被报道, 但是相比于板蓝根复杂的化学成分和广泛的药理活性, 这些研究基础并不足以阐明板蓝根的药效物质。为进一步科学开发利用板蓝根资源, 本实验在前期的研究基础上^[5-15], 继续对其 80%乙醇提取物进行系统分离纯化, 通过理化性质和波谱数据共鉴定了 17 个化合物, 分别为(7*S*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,3',4'-tetramethoxy-9,7-dihydroxy-8,8',7*O*,9'-lignan (**1**)、(-)-(7*R*,7'*R*,8*S*,8'*S*)-4-β-*D*-吡喃葡萄糖基-4'-羟基-3,3',5'-三甲氧基-7,9':7',9'-双环氧木脂烷[(-)-(7*S*,7'*S*,8*R*,8'*R*)-4-β-*D*-glucopyranosyloxy-3,3',5'-trimethoxy-7,9':7',9'-diepoxy-lignane, **2**]、liballinol (**3**)、2-amino-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,3-diol (**4**)、对羟基苯丙醇(*p*-hydroxyl benzyl propanol, **5**)、3-甲氧基-4-羟基苯丙醇(3-methoxy-4-hydroxyphenylpropanol, **6**)、3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基-苯基)-丙基-1-酮(4-β-hydroxy-propiovanillone, **7**)、3,4,5-三甲氧基肉桂酸(3,4,5-trimethoxy-cinnamic acid, **8**)、(*E*)-4-(3*R*,4*S*)-3,4-dihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl) but-3-en-2-one (**9**)、对羟基苯甲醛(*p*-hydroxy-benzaldehyde, **10**)、香草酸(vanillic acid, **11**)、3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, **12**)、苯甲酰胺(benzamide, **13**)、苯乙酰胺(phenylacetamide, **14**)、*L*-焦谷氨酸(*L*-pyroglutamate, **15**)、*L*-焦谷氨酸甲酯(methyl-*L*-pyroglutamate, **16**)和(4*R*,5*S*)-5-hydroxyhexan-4-olide (**17**)。其中, 化合物**9**为新天然产物, 化合物**1**~**4**、**9**、**12**~**17**为首次从板蓝根中分离鉴定。一氧化氮(NO)抑制活性结果显示, 化合物**7**和**8**具有抑制 NO 释放活性。

1 仪器与材料

Bruker Avance 400 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); BT 125D 型电子分析天平(德国赛多利斯有限公司); 1260Infinity II 半制备液相、1260Infinity 分析液相(美国安捷伦科技有限公司); CAPCELLPAK 半制备色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm), 资生堂(中国)投资有限公司; 乙腈和甲醇(阿达玛斯试剂有限公司, HPLC 纯); 葡聚糖凝胶 LH-20(美国 GE 公司); 反相 ODS C₁₈ 柱填料(日本岛津公司); Multiskan go 酶标仪(美国赛默飞公司); Thermo HERH 细胞培养箱(美国赛默飞公司); 氨基胍盐酸盐(Sigma 公司)。

板蓝根药材于 2017 年 7 月采自黑龙江省大庆市, 经上海中医药大学王瑞教授鉴定为十字花科菘蓝属植物松蓝 *I. indigotica* Fort. 的干燥根, 标本(20170716SL)保存于上海中医药大学中药化学教研室。

2 提取与分离

干燥的板蓝根药材 45 kg, 经 80%乙醇加热回流提取 3 次, 减压回收乙醇, 分别用石油醚、二氯甲烷、正丁醇萃取, 得到石油醚部位 20 g、二氯甲烷部位 170 g、正丁醇部位 800 g。二氯甲烷部位(170 g)经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(100:0~10:1)得到 11 个组分(F1~F11)。F3(16 g)经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(100:1~100:5)系统洗脱, 得到 F3-1~F3-6, 6 个组分。F3-5(2.9 g)经葡聚糖凝胶色谱二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得到化合物**7**(4.5 mg)和**8**(3.6 mg)。F3-6(1.7 g)经葡聚糖凝胶色谱二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得到化合物**9**(4.0 mg); F4(14 g)经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(100:1~100:5)系统洗脱, 得到 F4-1~F4-5, 5 个组分。F4-4(0.8 g)经葡聚糖凝胶色谱二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 合并相同流分后, 再经 SP-HPLC(乙腈-水 22:78)洗脱, 得到化合物**3**(2.8 mg, *t_R*=18.6 min)。F4-5(2.3 g)经葡聚糖凝胶色谱二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得到化合物**14**(5.4 mg); F7(5 g)经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(100:5~100:10)系统洗脱, 得到 F7-1~F7-4, 4 个组分。F7-2(3.1 g)经葡聚糖凝胶色谱

二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,得到 F7-2-1~F7-2-4, 4 个组分, F7-2-3(0.4 g)经 SP-HPLC(乙腈-水 28:72)洗脱,得到化合物 **5**(4.9 mg, $t_R=24.2$ min)和 **6**(2.5 mg, $t_R=32.1$ min); F8(4 g)经 ODS C_{18} 柱色谱,乙腈(10%、30%、60%)洗脱,得到 3 个组分 F8-1~F8-3。F8-3(2.7 g)经葡聚糖凝胶色谱二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,得到 F8-3-1~F8-3-3, 3 个组分, F8-3-2(0.5 g)经 SP-HPLC(乙腈-水 15:85)洗脱,得到化合物 **10**(4.4 mg, $t_R=9.4$ min)和 **11**(5.2 mg, $t_R=17.3$ min); F9(6 g)经 ODS C_{18} 柱色谱,乙腈(10%、30%、50%、70%)洗脱,得到 F9-1~F9-4, 4 个组分。F9-4(3.6 g)经葡聚糖凝胶色谱二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,得到 4 个组分 F9-4-1~F9-4-4。F9-4-4(0.8 g)经 SP-HPLC(乙腈-水 18:82)洗脱,得到化合物 **12**(2.3 mg, $t_R=9.2$ min); F10(6 g)经 ODS C_{18} 柱色谱,乙腈(10%、20%、40%、60%)洗脱,得到 4 个组分 F10-1~F10-4。F10-2(0.2 g)经 SP-HPLC(乙腈-水 21:79)洗脱,得到化合物 **2**(4.6 mg, $t_R=25.1$ min)。F10-4(3.6 g)经葡聚糖凝胶色谱二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,得到化合物 **1**(2.8 mg); F11(9 g)经葡聚糖凝胶色谱甲醇-水(1:1)洗脱,得到 F11-1~F11-8, 8 个组分。F11-5(0.3 g)经 SP-HPLC(乙腈-水 25:75)洗脱,得到化合物 **4**(9.4 mg, $t_R=14.9$ min)。F11-7(0.4 g)经葡聚糖凝胶色谱甲醇-水(1:1)洗脱,得到化合物 **17**(6.7 mg); F13(87 g)经 ODS C_{18} 柱色谱,乙腈(10%、30%、50%、70%)洗脱,得到 F13-1~F13-4, 4 个组分。F13-4(10.5 g)经葡聚糖凝胶色谱二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,得到化合物 **13**(3.1 mg); F14(22 g)经 ODS C_{18} 柱色谱,乙腈(10%、30%、50%、70%)洗脱,得到 F14-1~F14-4, 4 个组分。F14-3(3.2 g)经 ODS C_{18} 柱色谱,乙腈(10%、30%、50%、70%)洗脱,得到 F14-3-1~F14-3-4, 4 个组分。F14-3-3(0.9 g)经 SP-HPLC(乙腈-水 32:68)洗脱,得到化合物 **15**(5.6 mg, $t_R=10.3$ min)和 **16**(2.7 mg, $t_R=13.9$ min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 405 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR(400 MHz, CD_3OD) δ : 6.88(1H, d, $J=1.3$ Hz, H-2), 6.91(1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.84(1H, dd, $J=1.3, 8.0$ Hz, H-6), 4.55(1H, d, $J=7.3$ Hz, H-7), 2.37(1H, m, H-8), 3.10(2H, m, H-9), 6.84(1H, d, $J=1.3$ Hz, H-2'), 6.84(1H, d, $J=7.7$ Hz, H-5'),

6.74(1H, dd, $J=1.3, 7.7$ Hz, H-6'), 4.33(1H, dd, $J=3.4, 8.1$ Hz, H-7'), 1.73(1H, m, H-8'), 3.72(2H, overlapped, H-9); ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD) δ : 137.3(C-1), 110.1(C-2), 148.9(C-3), 148.1(C-4), 111.7(C-5), 118.6(C-6), 83.2(C-7), 49.7(C-8), 60.7(C-9), 135.7(C-1'), 110.5(C-2'), 148.8(C-3'), 148.1(C-4'), 119.2(C-5'), 111.5(C-6'), 74.1(C-7'), 52.4(C-8'), 69.9(C-9'), 55.8(3-OCH₃), 55.7(3'-OCH₃), 55.9(4-OCH₃), 55.8(4'-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 化合物 **1** 鉴定为 (7*S*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,3',4'-tetramethoxy-9,7-dihydroxy-8,8',7*O*,9'-lignan。

化合物 **2**: 无色胶状物, ESI-MS m/z : 551 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.88(1H, d, $J=1.3$ Hz, H-2), 6.71(1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5), 6.74(1H, dd, $J=1.3, 8.1$ Hz, H-6), 4.65(1H, d, $J=4.6$ Hz, H-7), 3.04(1H, overlapped, H-8), 4.15(1H, m, H-9a), 3.76(1H, overlapped, H-9b), 6.65(2H, s, H-2', 6'), 4.60(1H, d, $J=4.8$ Hz, H-7'), 3.04(1H, overlapped, H-8'), 4.15(1H, m, H-9'a), 3.76(1H, overlapped, H-9'b), 4.88(1H, m, H-1''), 3.17~3.11(4H, m, H-2''~5''), 3.60(1H, d, $J=11.3$ Hz, H-6'a), 3.40(1H, m, H-6'b), 3.76(9H, s, 3, 3', 5'-OCH₃); ^{13}C -NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 137.6(C-1), 110.9(C-2), 148.0(C-3), 146.4(C-4), 115.6(C-5), 119.1(C-6), 85.6(C-7), 54.2(C-8), 71.7(C-9), 132.6(C-1'), 104.7(C-2'), 153.1(C-3'), 134.2(C-4'), 153.1(C-5'), 104.7(C-6'), 85.6(C-7'), 54.0(C-8'), 71.5(C-9'), 103.2(C-1''), 74.6(C-2''), 77.0(C-3''), 70.4(C-4''), 77.7(C-5''), 61.4(C-6''), 56.1(3-OCH₃), 56.9(3', 5'-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 化合物 **2** 鉴定为 (-)-(7*R*,7'*R*,8*S*,8'*S*)-4- β -D-吡喃葡萄糖基-4'-羟基-3,3',5'-三甲氧基-7,9':7',9'-双环氧木脂烷。

化合物 **3**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 299 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, CD_3OD) δ : 7.18(4H, d, $J=8.6$, H-2, 2', 6, 6'), 6.75(4H, d, $J=8.6$ Hz, H-3, 3', 5, 5'), 4.68(2H, d, $J=4.2$ Hz, H-7, 7'), 3.11(2H, m, H-8, 8'), 3.81(2H, dd, $J=8.7, 3.9$ Hz, H-9a, 9a'), 4.19(2H, dd, $J=8.7, 2.2$ Hz, H-9b, 9b'); ^{13}C -NMR(150 MHz, CD_3OD) δ : 133.1(C-1, 1'), 128.8(C-2, 2', 6, 6'), 116.3(C-3, 3', 5, 5'), 158.3(C-4, 4'), 87.4(C-7, 7'), 55.3(C-8, 8'), 72.5(C-9, 9')。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **3** 为 liballinol。

化合物 **4**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 212

[M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.89 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 6.74 (1H, dd, *J* = 1.5, 8.0 Hz, H-6), 6.72 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 4.60 (1H, d, *J* = 4.1 Hz, H-7), 4.10 (1H, m, H-9a), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.70 (1H, dd, *J* = 3.4, 9.1 Hz, H-9b), 3.39 (2H, brs, NH₂), 3.03 (1H, dd, *J* = 2.0, 4.2 Hz, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 132.2 (C-1), 110.4 (C-2), 147.6 (C-3), 146.0 (C-4), 115.2 (C-5), 118.7 (C-6), 85.2 (C-7), 53.6 (C-8), 70.9 (C-9), 55.6 (OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故化合物 **4** 鉴定为 2-amino-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propane-1,3-diol。以上数据通过 DEPT 135、HSQC、HMBC 和 ¹H-¹H COSY 谱图进行归属验证。

化合物 **5**: 白色粉末, ESI-MS *m/z*: 151 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.96 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.65 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3, 5), 3.39 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-9), 2.48 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-7), 1.65 (2H, m, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 155.2 (C-4), 132.2 (C-1), 129.1 (C-2, 6), 115.0 (C-3, 5), 60.1 (C-9), 34.7 (C-8), 30.8 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[20], 化合物 **5** 鉴定为对羟基苯丙醇。

化合物 **6**: 白色粉末, ESI-MS *m/z*: 183 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.74 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.68 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-5), 6.58 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.8 Hz, H-6), 3.76 (3H, s, 3-OCH₃), 3.41 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-9), 2.52 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-7), 1.68 (2H, m, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 133.0 (C-1), 112.5 (C-2), 147.4 (C-3), 144.4 (C-4), 115.3 (C-5), 120.3 (C-6), 31.3 (C-7), 34.7 (C-8), 60.2 (C-9), 55.5 (OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[21], 化合物 **6** 鉴定为 3-甲氧基-4-羟基苯丙醇。

化合物 **7**: 无定形白色粉末, ESI-MS *m/z*: 195 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.44 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.51 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.81 (1H, m, H-2a), 3.05 (1H, m, H-2b), 3.74 (2H, t, *J* = 6.2 Hz, H-3); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 197.3 (C-1), 40.9 (C-2), 57.2 (C-3), 128.9 (C-1'), 111.0 (C-2'), 147.5 (C-3'), 151.6 (C-4'), 114.9 (C-5'), 123.1 (C-6'), 55.6 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 化合物 **7** 鉴定为 3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基-苯基)-丙基-1-酮。

化合物 **8**: 无色针状结晶 (甲醇), ESI-MS *m/z*:

237 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.59 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7), 6.91 (2H, s, H-2, 6), 6.37 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 3.88 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.77 (3H, s, 4-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 126.5 (C-1), 107.1 (C-2, 6), 149.7 (C-3, 5), 140.3 (C-4), 147.3 (C-7), 115.6 (C-8), 169.8 (C-9), 52.2 (3, 5-OCH₃), 57.0 (4-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[23], 化合物 **8** 鉴定为 3,4,5-三甲氧基肉桂酸。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS *m/z*: 387 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.76 (1H, dd, *J* = 3.1, 12.4 Hz, H-2a), 2.26 (1H, dd, *J* = 12.4, 12.4 Hz H-2b), 3.63 (1H, ddd, *J* = 12.4, 3.8, 3.4 Hz, H-3), 3.74 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-4), 7.15 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-7), 6.03 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-8), 2.27 (3H, s, H-10), 1.80 (3H, s, H-11), 1.06 (3H, s, H-12), 1.01 (3H, s, H-13); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 36.8 (C-1), 41.5 (C-2), 65.8 (C-3), 71.0 (C-4), 134.0 (C-5), 138.0 (C-6), 142.4 (C-7), 133.3 (C-8), 198.4 (C-9), 27.6 (C-10), 20.2 (C-11), 27.8 (C-12), 30.2 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[24], 化合物 **9** 鉴定为 (*E*)-4-(3*R*,4*S*)-3,4-dihydroxy-2,6,6-trimethyl-cyclohex-1-en-1-yl)but-3-en-2-one。

化合物 **10**: 白色粉末, ESI-MS *m/z*: 123 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.79 (1H, s, COH), 7.75 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.79 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3, 5), 10.63 (1H, brs, OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 128.9 (C-1), 136.1 (C-2, 6), 116.3 (C-3, 5), 163.8 (C-4), 191.4 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[25], 化合物 **10** 鉴定为对羟基苯甲醛。

化合物 **11**: 白色粉末, ESI-MS *m/z*: 169 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.15 (1H, brs, COOH), 7.44 (1H, overlapped, H-2), 6.79 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 6.79 (1H, overlapped, H-6), 3.81 (3H, s, OCH₃), 10.13 (1H, brs, OH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 122.3 (C-1), 115.5 (C-2), 147.6 (C-3), 151.5 (C-4), 113.2 (C-5), 123.9 (C-6), 167.8 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[26], 化合物 **11** 鉴定为香草酸。

化合物 **12**: 白色粉末, ESI-MS *m/z*: 169 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.66 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2), 6.56 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5), 6.61 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, H-6), 2.16 (2H, s, H-7), 8.94

(1H, brs, OH), 10.07 (1H, brs, OH); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 127.3 (C-1), 109.8 (C-2), 135.9 (C-3), 152.7 (C-4), 112.8 (C-5), 113.7 (C-6), 36.6 (C-7), 176.6 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[27-28], 化合物 **12** 鉴定为 3,4-二羟基苯乙酸。

化合物 **13**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 122 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.43 (2H, m, H-2, 6), 7.88 (2H, m, H-3, 5), 7.51 (1H, m, H-4), 8.02 (1H, brs, NH), 7.41 (1H, brs, NH); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 131.3 (C-1), 127.5 (C-2, 6), 128.3 (C-3, 5), 134.3 (C-4), 168.0 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[29], 化合物 **13** 鉴定为苯甲酰胺。

化合物 **14**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 136 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.26 (2H, m, H-2, 6), 7.28 (2H, m, H-3, 5), 7.20 (1H, m, H-4), 6.91 (1H, brs, NH), 7.51 (1H, brs, NH), 3.18 (2H, s, H-7); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 126.7 (C-1), 128.6 (C-2, 6), 129.5 (C-3, 5), 136.9 (C-4), 42.7 (C-7), 172.8 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[29], 化合物 **14** 鉴定为苯乙酰胺。

化合物 **15**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 130 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.93 (1H, brs, NH), 4.08 (1H, dd, $J = 4.2, 9.0$ Hz, H-2), 2.10 (1H, m, H-3a), 2.35 (1H, m, H-3b), 1.96 (1H, m, H-4a), 2.13 (1H, m, H-4b); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 52.5 (C-2), 24.9 (C-3), 29.3 (C-4), 180.0 (C-5), 174.9 (C-6)。以上数据与文献报道基本一致^[30], 化合物 **15** 鉴定为 *L*-焦谷氨酸。

化合物 **16**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 144 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.00 (1H, brs, NH), 4.18 (1H, dd, $J = 4.2, 9.0$ Hz, H-2), 2.11 (1H, m, H-3a), 2.34 (1H, m, H-3b), 1.96 (1H, m, H-4a), 2.12 (1H, m, H-4b), 3.67 (3H, s, OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 52.3 (C-2), 25.1 (C-3), 29.5 (C-4), 177.5 (C-5), 173.8 (C-6), 55.1 (OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[31], 化合物 **16** 鉴定为 *L*-焦谷氨酸甲酯。

化合物 **17**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 131 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.44 (2H, m, H-2), 1.95 (1H, m, H-3a), 2.14 (1H, m, H-3b), 4.30 (1H, m, H-4), 3.62 (1H, m, H-5), 1.08 (3H, d, $J = 4.2$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.9 (C-1), 28.7 (C-2), 23.9 (C-3), 84.0 (C-4), 68.2 (C-5),

19.4 (C-6)。以上数据与文献报道基本一致^[32], 化合物 **17** 鉴定为 (4*R*,5*S*)-5-hydroxyhexan-4-olide。

4 NO 抑制活性测定

参考课题组前期文献报道^[6-8], 化合物 **1**~**17** 采用 CCK8 法测定其 NO 抑制活性, 实验方法分别设置空白组 (FBS)、脂多糖 (LPS) 组 (LPS 1 $\mu\text{g/mL}$)、LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + 阳性药氨基胍盐酸盐 (0.1、1、5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 组和 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + 化合物 **1**~**17** (0.1、1、5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 组, 每组实验重复 3 次, IC₅₀ 取平均值。结果显示, 化合物 **7** 和 **8** 具有抑制活性, IC₅₀ 值分别为 (98.5 $\pm$ 6.4) 和 (58.3 $\pm$ 2.8) $\mu\text{mol/L}$, 其余化合物的 IC₅₀ 值均 > 100 $\mu\text{mol/L}$, 阳性药氨基胍盐酸盐 IC₅₀ 值为 (22.7 $\pm$ 0.4) $\mu\text{mol/L}$ 。

5 讨论

本实验通过系统分离纯化得到了 17 个化合物, 其中 11 个为首次从板蓝根中报道, 进一步丰富了其化学成分, 但 NO 抑制活性结果显示仅化合物 **7** 和 **8** 具有温和的抑制活性。因此, 关于其抗炎作用的药效物质基础仍需要大量系统的研究工作来支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 214.
- [2] 陈勇, 潘以琳, 陈建伟, 等. 板蓝根中 1 个新的生物碱苷 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 81-83.
- [3] Xie Z Y, Shi Y H, Wang Z T, *et al.* Biotransformation of glucosinolates epiprogoitrin and progoitrin to (*R*)- and (*S*)-goitrin in *Radix isatidis* [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(23): 12467-12472.
- [4] Chen M H, Gan L S, Lin S, *et al.* Alkaloids from the root of *Isatis indigotica* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(6): 1167-1176.
- [5] 张东东, 阮德清, 李婧伊, 等. 板蓝根乙醇提取物中生物碱类化学成分研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2287-2291.
- [6] Zhang D D, Shi Y H, Li J Y, *et al.* Alkaloids with nitric oxide inhibitory activities from the roots of *Isatis tinctoria* [J]. *Molecules*, 2019, 24(22): E4033.
- [7] Zhang D D, Shi Y H, Xu R, *et al.* Alkaloid enantiomers from the roots of *Isatis indigotica* [J]. *Molecules*, 2019, 24(17): E3140.
- [8] Zhang D D, Li J Y, Ruan D Q, *et al.* Lignans from *Isatis indigotica* roots and their inhibitory effects on nitric oxide production [J]. *Fitoterapia*, 2019, 137: 104189.
- [9] Zhang D D, Du K, Zhao Y T, *et al.* Indole alkaloid

- glycosides from *Isatis tinctoria* roots [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(2): 244-250.
- [10] Zhang D D, Shi Y H, Shi S S, *et al.* Isatisindigoticanine A, a novel indole alkaloid with an unrepresented carbon skeleton from the roots of *Isatis tinctoria* [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(8): 1249-1255.
- [11] 张东东, 李婧伊, 石燕红, 等. 板蓝根中糖苷类化学成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3575-3580.
- [12] Zhang D D, Sun Y, Shi Y H, *et al.* Four new indole alkaloids from the roots of *Isatis tinctoria* [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(1): 312-318.
- [13] Zhang D D, Sun Y, Chen Z Q, *et al.* Bisindole alkaloids with nitric oxide inhibitory activities from an alcohol extract of the *Isatis indigotica* roots [J]. *Fitoterapia*, 2020, 146: 104654.
- [14] Zhang D D, Ruan D Q, Li J Y, *et al.* Four undescribed sulfur-containing indole alkaloids with nitric oxide inhibitory activities from *Isatis tinctoria* L. roots [J]. *Phytochemistry*, 2020, 174: 112337.
- [15] Zhang D D, Sun Y, Ruan D Q, *et al.* Three new indole alkaloid glycosides with unusual structural features from the roots of *Isatis indigotica* [J]. *Phytochem Lett*, 2020, 39: 168-172.
- [16] 孙琛, 史鑫波, 侯青, 等. 窝儿七木脂素类成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5193-5197.
- [17] Tolstikhina V V, Semenov A A, Ushakov I A. Minor furofuranoid lignans from cultivated cells of *Scorzonera hispanica* L [J]. *Rastitel'nye Resursy*, 1999, 35(1): 87-90.
- [18] 游孟涛, 李亚葵, 郭美丽. 覆盆子二氯甲烷萃取物中的化学成分 [J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(10): 1199-1202.
- [19] Labed F, Masullo M, Cerulli A, *et al.* Chemical constituents of the aerial parts of *Santolina chamaecyparissus* and evaluation of their antioxidant activity [J]. *Nat Prod Commun*, 2017, 12(10): 1605-1608.
- [20] 张树军, 时志春, 王丹, 等. 紫丁香树叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3747-3757.
- [21] 董伟, 周堃, 王月德, 等. 傣药竹叶兰中 1 个新苯丙素及其抗烟草花叶病毒活性 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 2996-2998.
- [22] 段营辉, 戴毅, 高昊, 等. 草珊瑚的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 29-32.
- [23] 李萍, 闫明, 李平亚. 远志化学成分分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(1): 35-38.
- [24] Xie H H, Wang T, Matsuda H, *et al.* Bioactive constituents from Chinese natural medicines. part 15. inhibitory effect on aldose reductase and structures of saussureosides A and B from *Saussurea medusa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(11): 1416-1422.
- [25] 刘年珍, 赵碧清, 钱群刚, 等. 玄参化学成分的研究 [J]. 中成药, 2019, 41(3): 576-579.
- [26] 王丹, 吴喜民, 张东东, 等. 桂枝中羧酸及其衍生物的化学成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 8-12.
- [27] Zhang C, Zhou Q, Wu X N, *et al.* Discovery of novel PDE9A inhibitors with antioxidant activities for treatment of Alzheimer's disease [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33(1): 260-270.
- [28] 万仲贤, 吴建国, 吴飞, 等. 白花鬼针草化学成分研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(10): 1391-1394.
- [29] 司金光, 张涛, 李凌宇, 等. 美洲大蠊的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(3): 178-181.
- [30] 朱峰. 散斑竹根七化学成分及其生物活性的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [31] 何成军, 彭成, 戴鸥, 等. 益母草注射液化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3048-3052.
- [32] Buchanan M S, Hashimoto T, Takaoka S, *et al.* (+)-Osmundalactone, γ -lactones and spiromentins from the fungus *Paxillus atrotomentosus* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(4): 1251-1257.

[责任编辑 王文倩]