

• 化学成分 •

救必应中 2 个新的咖啡酸半萜酯

黄婉凤¹, 何佳¹, 张琛伟¹, 何宇铭¹, 王宝林¹, 陆玫霖¹, 陈明¹, 冯育林^{1,2}, 杨世林^{1,2}, 潘其明^{1*}, 高红伟^{1*}

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330000

摘要: 目的 研究铁冬青 *Ilex rotunda* 干燥树皮(救必应)的化学成分及其体外抗炎活性。方法 采用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、D101 大孔吸附树脂柱色谱和半制备高效液相色谱进行分离纯化, 并运用 HR-ESI-MS、NMR 进行化合物结构鉴定。通过测定化合物对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞释放炎症介质一氧化氮(NO)的抑制能力, 评价化合物的抗炎作用; MTT 法测定化合物的细胞毒性。结果 从救必应中分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为咖啡酸[(*E*)-4-羟基-2-甲基丁-2-烯-1-基]酯(1)、咖啡酸[(*E*)-4-羟基异戊烯基]酯(2)、咖啡酸(4-羟基异戊烯基)酯 β-*D*-吡喃葡萄糖苷(3)、rotundarpenoside B(4)、3,5-二咖啡酰基奎宁酸甲酯(5)、3,4-二咖啡酰基奎宁酸甲酯(6)、紫丁香苷(7)、芥子醛葡萄糖苷(8)、*di-O*-methylcrenatin(9)、咖啡酸(10)、芥子醛(11)、紫丁香醛(12)、原儿茶醛(13)、丁香酸(14)。结论 化合物 1 和 2 为 2 个新的咖啡酸半萜酯, 分别命名为咖啡酸半萜酯 A 和咖啡酸半萜酯 B。化合物 3 的氢谱和碳谱数据为首次报道。化合物 1、2 和 11 具有潜在的抗炎活性。

关键词: 救必应; 苯丙素类化合物; 咖啡酸半萜酯; 紫丁香苷; 抗炎活性; 芥子醛

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)08-2365-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.002

Two new hemiterpenyl caffeates from bark of *Ilex rotunda*

HUANG Wan-feng¹, HE Jia¹, ZHANG Chen-wei¹, HE Yu-ming¹, WANG Bao-lin¹, LU Mei-lin¹, CHEN Ming¹, FENG Yu-lin^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}, PAN Qi-ming¹, GAO Hong-wei¹

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from the dried bark of *Ilex rotunda* ("Jiu Bi Ying" in Chinese) and their anti-inflammatory activities. **Methods** The compounds of *I. rotunda* were isolated and purified by silica gel, ODS, D101 macroporous resin column chromatography and semi preparative-HPLC. The structures were elucidated via HR-ESI-MS and NMR spectroscopic data interpretation. The inhibitory rates of the isolated compounds against inflammatory cytokine nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated mouse RAW264.7 macrophages were used to evaluate the anti-inflammatory activities. The cell viability was examined by the MTT assay. **Results** A total of 14 compounds were isolated from the bark of *I. rotunda*, their structures were elucidated as caffeic acid [(*E*)-4-hydroxy-2-methylbut-2-en-1-yl]-ester (1), caffeic acid [(*E*)-4-hydroxyphenyl]-ester (2), caffeic acid [4-hydroxyphenyl]-ester β-*D*-glucopyranoside (3), rotundarpenoside B (4), methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid (5), methyl 3,4-dicaffeoylquinic acid (6), syringin (7), sinapaldehyde glucoside (8), *di-O*-methylcrenatin (9), caffeic acid (10), sinapaldehyde (11), syringaldehyde (12), protocatechuic aldehyde (13), syringic acid (14). **Conclusion** Compounds 1 and 2 are two new caffeic acid hemiterpenyl esters, named as hemiterpenyl caffeate A and B, respectively. The ¹H and ¹³C NMR spectra of compound 3 are reported for the first time. Compounds 1, 2 and 11 showed potential anti-inflammatory activities.

Key words: *Ilex rotunda* Thunb.; phenylpropanoids; hemiterpenyl caffeate; syringin; anti-inflammatory activity; sinapaldehyde

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 广西中医药大学 2020 年博士科研启动基金项目 (2020BS017)

作者简介: 黄婉凤, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: huangwanfeng2020@163.com

*通信作者: 潘其明, 博士, 讲师, 主要研究方向为天然药物的化学成分研究。E-mail: qmingpan@163.com

高红伟, 博士, 研究员, 主要研究方向为中药抗炎活性及抗肿瘤活性研究。E-mail: gaohongwei06@126.com

救必应属冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属 *Ilex* L. 植物铁冬青 *Ilex rotunda* Thunb. 的干燥树皮, 铁冬青始载于《岭南采药录》, 主要分布于广东、广西等长江以南地区^[1-2], 其味苦性寒, 具有清热解毒, 利湿止痛的功效^[3]。目前有咽喉灵饮片、肠炎灵片和胃热清胶囊等复方制剂。研究表明, 救必应主要含有乌苏烷型五环三萜和苯丙素类化合物, 其中长梗冬青苷、铁冬青酸和紫丁香苷为其主要化学成分。具有抗炎、镇痛、调血脂、降血糖、抑菌、抗肿瘤及保护心血管等药理活性。临床上常用于咽喉肿痛、急慢性胃肠炎及跌打损伤等症^[4-6]。为充分开发和利用救必应, 探寻其抗炎活性物质基础, 本课题从救必应 70% 乙醇提取物的醋酸乙酯和正丁醇萃取部位分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为咖啡酸 [(*E*)-4-羟基-2-甲基丁-2-烯-1-基] 酯 (caffeic acid [(*E*)-4-hydroxy-2-methylbut-2-en-1-yl]-ester, **1**)、咖啡酸 [(*E*)-4-羟基异戊烯基] 酯 (caffeic acid [(*E*)-4-hydroxyprenyl]-ester, **2**)、咖啡酸(4-羟基异戊烯基)

酯 β -D-吡喃葡萄糖苷 [caffeic acid (4-hydroxyprenyl)-ester β -D-glucopyranoside, **3**]、rotundarpenoside B (**4**)、3,5-二咖啡酰基奎宁酸甲酯 (methyl 3,5-dicaffeoylquininate, **5**)、3,4-二咖啡酰基奎宁酸甲酯 (methyl 3,4-dicaffeoylquininate, **6**)、紫丁香苷 (syringin, **7**)、芥子醛葡萄糖苷 (sinapaldehyde glucoside, **8**)、di-*O*-methylecristatin (**9**)、咖啡酸 (caffeic acid, **10**)、芥子醛 (sinapaldehyde, **11**)、紫丁香醛 (syringaldehyde, **12**)、原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde, **13**)、丁香酸 (syringic acid, **14**)。其中化合物 **1** 和 **2** 为 2 个新的咖啡酸半萜酯, 分别命名为咖啡酸半萜酯 A 和咖啡酸半萜酯 B, 结构见图 1。化合物 **3** 的氢谱和碳谱数据为首次报道。体外抗炎活性测试结果表明, 化合物 **1**、**2** 和 **11** 在 40 μ mol/L 浓度下能明显抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 RAW264.7 细胞一氧化氮 (NO) 释放, NO 生成抑制率分别为 53.2%、84.7% 和 55.9%, 且无明显细胞毒性, 具有潜在的抗炎活性。

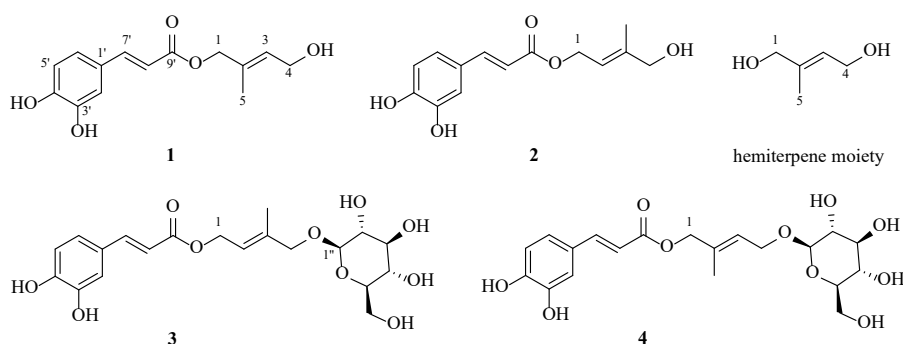


图 1 化合物 1~4 和半萜片段的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-4 and hemiterpene moiety

1 仪器与材料

Bruker AVANCE III 500 MHz 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Agilent G6230 飞行时间质谱仪 (美国 Agilent 公司); Waters G2-XS 飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司); Waters e2695 分析型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Shimadzu LC-20AD XR 高效液相色谱仪输液泵, SPD-20A 型紫外检测器 (日本岛津公司); Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm × 10 mm, 5 μ m) 色谱柱 (瑞典 Akzo Nobel 公司); HT7200S 型中压制备色谱仪 (苏州本草天成生物技术有限公司); Nicolet iS10 型红外光谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); UV-5200PC 型紫外光谱仪 (上海元析仪器有限公司); SB-800DTD 型超声波清洗机

(宁波新芝生物科技股份有限公司); RV3 eco S096 型旋转蒸发仪 (德国 IKA 公司); HH-8 型恒温水浴锅 (常州易晨仪器制造有限公司); DLSB-5/20 型低温冷却循环泵 (郑州长城科工有限公司); Milli-Q IQ 7000 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); ZF-7 暗箱式三用紫外分析仪 (上海嘉鹏科技有限公司); 硅胶 G 薄层色谱板、柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); D101 大孔吸附树脂 (西安蓝晓科技新材料股份有限公司); 色谱纯甲醇、乙腈 (美国 Thermo Fisher 科技有限公司); 其他试剂均为分析纯。磷酸盐缓冲液 (PBS)、胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); LPS、MTT、Griess 试剂 (美国 Sigma-Aldrich 公司)。

救必应于 2019 年 8 月采购自广西玉林市珍草堂中药饮片有限公司, 经广西中医药大学王柳萍教授鉴定为冬青科冬青属植物铁冬青 *I. rotunda* Thunb. 的干燥树皮。样本 (20190813) 保存于广西中医药大学科学实验中心。

RAW264.7 细胞购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。

2 提取与分离

干燥救必应药材 100 kg, 粉碎, 经 8 倍量 70% 乙醇加热回流提取, 得到的滤液经减压浓缩后得到干浸膏 50 kg, 用粉碎机粉碎成粉末, 加水混悬, 依次用醋酸乙酯、正丁醇萃取, 减压回收溶剂, 得醋酸乙酯部位 (400 g) 和正丁醇部位 (1000 g)。

醋酸乙酯部位经减压正相硅胶柱色谱 (100~200 目), 以二氯甲烷-甲醇体系梯度洗脱 (1:0、9:1、5:1、2:1、0:1), 薄层色谱 (TLC) 检测合并相同流分后得到 7 个流分 (Fr. A~G)。Fr. B (63 g) 经减压硅胶柱色谱 (200~300 目), 以二氯甲烷-甲醇体系梯度洗脱 (15:0、9:1、4:1、1:1、0:1), 得到 5 个流分 (Fr. B1~B5), 其中 Fr. B2 (10 g) 经中压 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (20:80, 体积流量 10 mL/min) 等度洗脱, TLC、HPLC 分析合并相同流分后得到 7 个流分 (Fr. B2-1~B2-7), Fr. B2-6 (500 mg), 经半制备高效液相色谱, 甲醇-水 (20:80, 2 mL/min) 等度洗脱得到化合物 11 (15 mg, $t_R=23.0$ min)、8 (15 mg, $t_R=24.9$ min)、7 (15 mg, $t_R=26.7$ min)、3 (15 mg, $t_R=34.9$ min) 和 4 (20 mg, $t_R=36.4$ min)。Fr. B3 (17 g) 经中压 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (20:80, 30 mL/min) 等度洗脱, 得到 19 个流分 (Fr. B3-1~B3-19), Fr. B3-5 (400 mg), 经半制备高效液相色谱, 甲醇-水 (20:80, 2 mL/min) 等度洗脱得到化合物 10 (10 mg, $t_R=25.8$ min)、13 (10 mg, $t_R=26.9$ min)、14 (15 mg, $t_R=28.8$ min) 和 12 (15 mg, $t_R=33.2$ min)。Fr. C (173 g) 经减压硅胶柱色谱 (200~300 目), 以二氯甲烷-甲醇体系梯度洗脱 (15:1、12:1、4:1、2:1、0:1), 得到 14 个流分 (Fr. C1~C14), 其中 Fr. C4 (12 g) 经中压 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (10:90→100:0, 10 mL/min) 梯度洗脱, TLC、HPLC 检测合并, 得到 5 个流分 (Fr. C4-1~C4-5)。Fr. C4-3 (3 g) 经中压 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (10:90→100:0, 10 mL/min) 梯度洗脱, 得到 6 个流分 (Fr. C4-3-1~C4-3-6), 其中 Fr. C4-3-2 (200 mg) 经半制备高效

液相色谱, 甲醇-水 (50:50, 2 mL/min) 等度洗脱得到化合物 5 (14 mg, $t_R=21.7$ min) 和 6 (15 mg, $t_R=24.1$ min)。

正丁醇部位浸膏加甲醇和水溶解, 减压回收溶剂至无醇味, 样品溶液倒入 D101 大孔吸附树脂柱吸附 12 h 后, 依次用纯水、10%、30%、50%、70% 和 90% 甲醇-水洗脱, 将以上各梯度洗脱液分别浓缩得到 6 个流分 (Fr. N1~N6)。Fr. N4 (30 g) 经中压 ODS 柱色谱, 以 30% 甲醇-水等度洗脱 (50 mL/min), TLC、HPLC 分析合并相同流分后得到 24 个流分 (Fr. N4-1~N4-24)。Fr. N4-10 (320 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 除去色素后, 再经半制备 HPLC 纯化, 甲醇-水 (40:60, 2 mL/min) 得化合物 9 (6 mg, $t_R=14.2$ min)。Fr. N5 (45 g) 经中压 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (0:100→100:0, 50 mL/min) 梯度洗脱, TLC、HPLC 检测合并, 得到 5 个流分 (Fr. N5-1~N5-5)。Fr. N5-4 (8 g) 经中压 ODS 柱色谱, 45% 甲醇-水等度洗脱 (10 mL/min), 得到 21 个流分 (Fr. N5-4-1~N5-4-21)。Fr. N5-4-15 (50 mg) 经半制备高效液相色谱制备, 甲醇-水 (50:50, 2 mL/min) 等度洗脱得到化合物 1 (5 mg, $t_R=12.5$ min), Fr. N5-4-19 (30 mg) 经半制备高效液相色谱制备, 甲醇-水 (50:50, 2 mL/min) 等度洗脱得到化合物 2 (2 mg, $t_R=14.1$ min)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末, UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 211 (4.16), 250 (3.73), 300 (3.77), 329 (3.87); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3371, 2922, 2851, 1661, 1633, 1497, 1385, 1263, 1179。HR-ESI-MS 显示阴离子准分子离子峰 m/z : 263.092 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值 263.092 5, $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_5$), 确定化合物 1 的分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 。 ^1H -NMR 数据 (表 1) 显示 1 组 ABX 偶合芳香质子信号 δ_{H} 7.03 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, $J=8.2, 1.4$ Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5'); 1 组反式双键质子信号 δ_{H} 7.55 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7'), 6.27 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8'); 1 个与亚甲基相连的烯烃质子信号 δ_{H} 5.66 (1H, t, $J=6.4$ Hz, H-3); 2 个连氧亚甲基质子信号 δ_{H} 4.59 (2H, s, H-1), 4.15 (2H, d, $J=6.4$ Hz, H-4) 和 1 个乙烯基甲基质子信号 δ_{H} 1.72 (3H, brs, H-5)。 ^{13}C -NMR 和 DEPT 数据 (表 1) 显示该化合物有 14 个碳信号, 包括 5 个季碳信号、6 个次甲基碳信号、2 个连氧亚甲基碳信号和 1 个甲基碳信号, 其中 δ_{C} 168.9 (C-9') 为 1 个酯

表 1 化合物 1 和 2 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 波谱数据 (500/125 MHz, CD_3OD)
Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compounds 1 and 2 (500/125 MHz, CD_3OD)

碳位	1		2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
hemiterpene moiety				
1	69.9 (CH_2)	4.59 (2H, s)	61.8 (CH_2)	4.75 (2H, d, $J = 7.0$ Hz)
2	134.0 (C)		119.6 (CH)	5.65 (1H, tq, $J = 7.0, 1.4$ Hz)
3	128.3 (CH)	5.66 (1H, t, $J = 6.4$ Hz)	142.3 (C)	
4	59.0 (CH_2)	4.15 (2H, d, $J = 6.4$ Hz)	67.7 (CH_2)	3.97 (2H, s)
5	14.0 (CH_3)	1.72 (3H, brs)	13.8 (CH_3)	1.74 (3H, s)
caffeoyl moiety				
1'	127.7 (C)		127.7 (C)	
2'	115.1 (CH)	7.03 (1H, d, $J = 1.4$ Hz)	115.1 (CH)	7.02 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)
3'	146.8 (C)		146.8 (C)	
4'	149.6 (C)		149.6 (C)	
5'	116.5 (CH)	6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.5 (CH)	6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)
6'	123.0 (CH)	6.94 (1H, dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz)	122.9 (CH)	6.93 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz)
7'	147.1 (CH)	7.55 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	146.9 (CH)	7.52 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
8'	114.9 (CH)	6.27 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	115.1 (CH)	6.24 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
9'	168.9 (C)		169.2 (C)	

羰基碳信号, δ_{C} 149.7 (C-4') 和 146.8 (C-3') 为 2 个与羟基相连的芳香碳信号, δ_{C} 69.9 (C-1) 和 59.0 (C-4) 为 2 个连氧亚甲基碳信号, δ_{C} 14.0 (C-5) 为 1 个甲基碳信号。

HMBC 谱 (图 2) 中, δ_{H} 7.03 (H-2'), 6.77 (H-5') 分别与 δ_{C} 149.6 (C-4'), 146.8 (C-3') 的相关及 δ_{H} 7.55 (H-7') 与 δ_{C} 115.1 (C-2'), 123.0 (C-6'), 168.9 (C-9') 的远程相关表明化合物 1 中存在 1 个咖啡酰基片段。 δ_{H} 4.15 (H-4) 与 δ_{C} 134.0 (C-2), δ_{H} 1.72 (H-5) 与 δ_{C} 128.3 (C-3), 69.9 (C-1) 及 δ_{H} 4.59 (H-1) 与 δ_{C} 128.3 (C-3) 的远程相关表明该化合物存在 1 个 2-甲基-丁-2-烯-1, 4-二醇半萜片段 (图 1)。 δ_{H} 4.59 (H-1) 与 δ_{C} 168.9 (C-9') 的关键 HMBC 相关及 H-1 为单峰, 确定半萜片段的 C-1 位氧原子与咖啡酰基

相连成酯。NOSEY 谱中 H-3 与 H-1, H-5 与 H-4 有 NOE 相关, 表明半萜片段中的双键为 *E* 构型。综上所述, 化合物 1 鉴定为咖啡酸 [(*E*)-4-羟基-2-甲基丁-2-烯-1-基] 酯, 为新化合物, 命名为咖啡酸半萜酯 A。

化合物 2: 白色无定形粉末, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 211 (4.30), 250 (3.93), 300 (3.98), 329 (4.07); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3359, 2921, 2851, 1685, 1599, 1523, 1448, 1385, 1261, 1180, 1118, 1063, 983。HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 287.089 6 [$\text{M} + \text{Na}$] $^{+}$ (计算值 287.089 0, $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$), 确定分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5$, 与化合物 1 互为同分异构体。对比化合物 2 和 1 的 NMR 数据 (表 1), 发现化合物 2 和 1 一样都存在 1 个咖啡酰基片段, 但是化合物 2 和 1 的半萜片段的信号存在一定的差异。

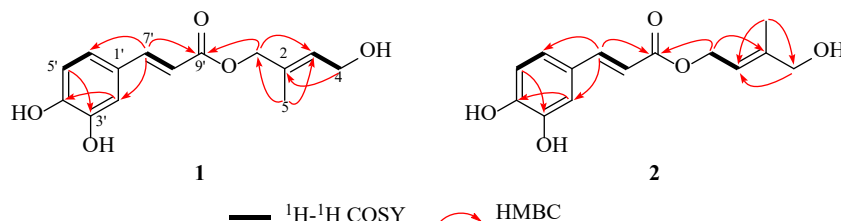


图 2 化合物 1 和 2 的 ^1H - ^1H COSY 和关键 HMBC 相关

Fig. 2 ^1H - ^1H COSY and key HMBC correlations of compounds 1 and 2

HMBC 谱 (图 2) 中, $\delta_{\text{H}} 4.75$ (H-1) 与 $\delta_{\text{C}} 142.3$ (C-3), $\delta_{\text{H}} 1.74$ (H-5) 与 $\delta_{\text{C}} 119.6$ (C-2), 67.7 (C-4) 及 $\delta_{\text{H}} 3.97$ (H-4) 与 $\delta_{\text{C}} 119.6$ (C-2), 13.8 (C-5) 的远程相关表明该化合物也存在 1 个 2-甲基-丁-2-烯-1,4-二醇半萜片段。 $\delta_{\text{H}} 4.75$ (H-1) 与 $\delta_{\text{C}} 169.2$ (C-9') 的关键 HMBC 相关及 H-1 为二重峰, 确定半萜片段的 C-4 位氧原子与咖啡酰基相连成酯。NOSEY 谱中 H-2 与 H-4, H-5 与 H-1 有 NOE 相关, 表明半萜片段中的双键也为 *E* 构型。综上所述, 化合物 **2** 鉴定为咖啡酸 [(*E*)-4-羟基异戊烯基] 酯, 为新化合物, 命名为咖啡酸半萜酯 **B**。

化合物 **3**: 淡黄色粉末; HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 449.142 6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 449.141 8, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{10}\text{Na}$), 确定其分子式为

$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$, 与 rotundarpenoside **B**^[7] (化合物 **4**) 具有相同的分子式。对比化合物 **3** 和 **4** 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (表 2), 发现化合物 **3** 和 **4** 具有相同的咖啡酰基片段 (1 组 ABX 耦合芳香质子信号 $\delta_{\text{H}} 7.02$ 、6.93、6.76, 2 个反式双键质子信号 $\delta_{\text{H}} 7.53$ 、6.24 和 1 个酯羰基碳信号 $\delta_{\text{C}} 169.2$) 和葡萄糖片段 (糖端基质子信号 $\delta_{\text{H}} 4.26$, 糖端基碳信号 $\delta_{\text{C}} 103.2$ 和 5 个连氧的碳信号 $\delta_{\text{C}} 78.1$ 、77.9、75.1、71.6、62.8)。与化合物 **1** 和 **2** 情况相似, 化合物 **3** 和 **4** 的半萜片段也均为 2-甲基-丁-2-烯-1,4-二醇, 但半萜片段的核磁信号存在一定的差异。HMBC 谱中, $\delta_{\text{H}} 4.74$ (H-1) 与 $\delta_{\text{C}} 169.2$ (C-9'), $\delta_{\text{H}} 4.27$, 4.09 (H-4) 与 $\delta_{\text{C}} 103.2$ (C-1'') 的关键 HMBC 相关及 H-1、H-4 均为二重峰, 确定半萜片段的 C-4 位氧原子与咖啡酰基相连成酯,

表 2 化合物 **3** 和 **4** 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 波谱数据 (500/125 MHz, CD_3OD)

Table 2 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compounds **3** and **4** (500/125 MHz, CD_3OD)

碳位	3		4	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
hemiterpene moiety				
1	61.7 (CH_2)	4.74 (2H, d, $J = 6.8$ Hz)	69.7 (CH_2)	4.60 (2H, s)
2	122.5 (CH)	5.74 (1H, t, $J = 6.8$ Hz)	135.9 (C)	
3	139.0 (C)		124.9 (CH)	5.70 (1H, t, $J = 6.6$ Hz)
4	74.6 (CH_2)	4.27 (1H, d, $J = 12.6$ Hz) 4.09 (1H, d, $J = 12.6$ Hz)	66.0 (CH_2)	4.44 (1H, dd, $J = 12.3, 6.1$ Hz) 4.29 (1H, overlapped)
5	14.3 (CH_3)	1.79 (3H, s)	14.2 (CH_3)	1.75 (3H, s)
caffeoyl moiety				
1'	127.5 (C)		127.6 (C)	
2'	114.9 (CH)	7.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	114.8 (CH)	7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
3'	147.0 (C)		147.1 (C)	
4'	150.0 (C)		149.6 (C)	
5'	116.5 (CH)	6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.5 (CH)	6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)
6'	123.0 (CH)	6.93 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz)	123.0 (CH)	6.95 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz)
7'	146.9 (CH)	7.53 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	146.8 (CH)	7.56 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
8'	115.0 (CH)	6.24 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	115.1 (CH)	6.27 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
9'	169.2 (C)		168.9 (C)	
glucopyranosyl moiety				
1''	103.2 (CH)	4.26 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	103.2 (CH)	4.29 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)
2''	75.1 (CH)	3.20 (1H, t, $J = 8.3$ Hz)	75.0 (CH)	3.18 (1H, t, $J = 8.5$ Hz)
3''	78.1 (CH)	3.34 (1H, t, $J = 8.7$ Hz)	78.0 (CH)	3.34 (1H, t, $J = 8.5$ Hz)
4''	71.6 (CH)	3.27 (1H, t, $J = 8.4$ Hz)	71.6 (CH)	3.27 (1H, overlapped)
5''	77.9 (CH)	3.23 (1H, dd, $J = 5.5, 2.0$ Hz)	77.9 (CH)	3.25 (1H, overlapped)
6''	62.8 (CH_2)	3.85 (1H, dd, $J = 11.9, 2.0$ Hz) 3.65 (1H, dd, $J = 11.9, 5.5$ Hz)	62.7 (CH_2)	3.87 (1H, dd, $J = 11.9, 1.7$ Hz) 3.66 (1H, dd, $J = 11.9, 5.3$ Hz)

半萜片段的 C-1 位氧原子与葡萄糖片段的 C-1'' 位相连成苷。NOSEY 谱中 H-2 与 H-4、H-5 与 H-1 有 NOE 相关,表明半萜片段中的双键也为 *E* 构型。综上所述,化合物 **3** 鉴定为咖啡酸(4-羟基异戊烯基)酯 β -D-吡喃葡萄糖苷。该化合物与文献报道一致^[8],但文献是将其乙酰化形式分离得到,化合物 **3** 的氢谱和碳谱数据为首次报道。

化合物 **4**: 黄色油状物; HR-ESI-MS m/z : 449.142 6 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{20}H_{26}O_{10}$; 1H 和 ^{13}C -NMR 数据见表 2。以上数据与文献对照^[7],确定化合物 **4** 为 rotundarpenoside B。

化合物 **5**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 553.132 0 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{26}H_{26}O_{12}$; 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.61 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7''), 7.54 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.06 (2H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2', 2''), 6.96 (2H, dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, H-6', 6''), 6.78 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5', 5''), 6.34 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 6.22 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8''), 5.39 (1H, dt, $J = 7.6, 3.6$ Hz, H-5), 5.30 (1H, m, H-3), 3.97 (1H, dd, $J = 6.4, 3.1$ Hz, H-4), 3.68 (3H, s, 7-OCH₃), 2.36~2.26 (2H, m, H-2a, 6a), 2.21~2.11 (2H, m, H-2b, 6b); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 175.6 (C-7), 168.8, 168.0 (C-9', 9''), 149.8, 149.6 (C-4', 4''), 147.5, 147.2 (C-7', 7''), 146.9, 146.8 (C-3', 3''), 127.9, 127.6 (C-1', 1''), 123.1, 123.0 (C-6', 6''), 116.6, 116.5 (C-5', 5''), 115.4, 115.1 (C-2', 2''), 115.1, 114.8 (C-8', 8''), 74.6 (C-1), 72.2 (C-3), 72.0 (C-5), 69.7 (C-4), 53.0 (7-OCH₃), 36.7 (C-6), 35.6 (C-2)。以上数据与文献对照^[9],确定化合物 **5** 为 3,5-二咖啡酰基奎宁酸甲酯。

化合物 **6**: 淡黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 553.132 1 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{26}H_{26}O_{12}$; 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.60 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7''), 7.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 7.03 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 7.00 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.92 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6''), 6.91 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.75 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5', 5''), 6.29 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 6.17 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8''), 5.53 (1H, m, H-3), 5.10 (1H, dd, $J = 8.0, 3.0$ Hz, H-4), 4.34 (1H, dt, $J = 6.5, 3.2$ Hz, H-3), 3.71 (3H, s, 7-OCH₃), 2.32 (1H, dd, $J = 14.0, 3.3$ Hz, H-2eq), 2.29~2.19 (2H, m, H-6) 2.08 (1H, dd, $J = 14.0, 6.4$ Hz, H-2ax); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 175.2 (C-7), 168.5, 167.9 (C-9', 9''), 149.8, 149.7

(C-4', 4''), 147.7 (C-7', 7''), 146.8 (C-3', 3''), 127.7, 127.5 (C-1', 1''), 123.2, 123.1 (C-6', 6''), 116.5 (C-5', 5''), 115.2, 115.1 (C-2', 2''), 114.7, 114.5 (C-8', 8''), 75.8 (C-1), 74.9 (C-4), 69.1 (C-3), 68.6 (C-5), 53.1 (7-OCH₃), 38.5 (C-2), 38.4 (C-6)。以上数据与文献对照^[10],确定化合物 **6** 为 3,4-二咖啡酰基奎宁酸甲酯。

化合物 **7**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 395.131 3 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{17}H_{24}O_9$; 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 6.87 (2H, s, H-2, 6), 6.87 (1H, dd, $J = 15.8, 1.5$ Hz, H-7), 6.61 (1H, dd, $J = 15.8, 5.0$ Hz, H-8), 5.79 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 4.58 (2H, dd, $J = 5.0, 1.5$ Hz, H-9), 4.39 (1H, dd, $J = 11.7, 2.6$ Hz, H-6'a), 4.34~4.28 (4H, m, H-2', 3', 4', 6'b), 3.93 (1H, m, H-5'), 3.74 (6H, s, 3, 5-OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 153.9 (C-3, 5), 135.6 (C-4), 133.9 (C-1), 131.2 (C-7), 129.3 (C-8), 105.2 (C-2, 6), 104.9 (C-1'), 78.8 (C-3'), 78.4 (C-5'), 76.1 (C-2'), 71.6 (C-4'), 62.8 (C-9), 62.6 (C-6'), 56.5 (3, 5-OCH₃)。以上数据与文献报道对照^[11],确定化合物 **7** 为紫丁香苷。

化合物 **8**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 393.115 3 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{17}H_{22}O_9$; 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 9.82 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-9), 7.45 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 7.01 (2H, s, H-2, 6), 6.90 (1H, dd, $J = 15.8, 7.7$ Hz, H-8), 5.98 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 3.79 (6H, s, 3, 5-OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 193.6 (C-9), 153.8 (C-3, 5), 153.0 (C-7), 138.6 (C-4), 130.2 (C-1), 128.4 (C-8), 107.4 (C-2, 6), 104.2 (C-1'), 79.0 (C-5'), 78.5 (C-3'), 76.0 (C-2'), 71.6 (C-4'), 62.6 (C-6'), 56.6 (3, 5-OCH₃)。以上数据与文献对照^[12],确定化合物 **8** 为芥子醛葡萄糖苷。

化合物 **9**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 369.116 4 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{15}H_{22}O_9$; 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.70 (2H, s, H-2, 6), 4.83 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.54 (2H, s, H-7), 3.84 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.76 (1H, dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz, H-6'a), 3.65 (1H, dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, H-6'b); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 154.2 (C-2, 6), 139.7 (C-1), 135.2 (C-4), 105.6 (C-3, 5), 105.4 (C-1'), 78.3 (C-5'), 77.8 (C-3'), 75.7 (C-2'), 71.3 (C-4'), 65.1 (C-7), 62.6 (C-6'), 56.9 (3, 5-OCH₃)。以上数据与文献对照^[13],确定化合物 **9** 为 di-*O*-methylcrenatin。

化合物 **10**: 黄色晶体 (甲醇), HR-ESI-MS m/z : 181.050 5 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_9H_8O_4$; 1H -NMR (500

MHz, CD₃OD) δ : 7.53 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-7), 7.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.92 (1H, dd, J = 2.0, 8.2 Hz, H-6), 6.77 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.21 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 171.1 (C-9), 149.4 (C-4), 147.1 (C-7), 146.8 (C-3), 127.8 (C-1), 122.9 (C-6), 116.5 (C-5), 115.5 (C-8), 115.1 (C-2)。以上数据与文献对照^[14], 确定化合物 **10** 为咖啡酸。

化合物 **11**: 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 209.081 8 [M+H]⁺, 分子式为 C₁₁H₁₂O₄; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 9.56 (1 H, d, J = 7.9 Hz, H-9), 7.56 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-7), 6.97 (2H, s, H-2, 6), 6.66 (1H, dd, J = 15.7, 7.9 Hz, H-8), 3.88 (6H, s, 3, 5-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 196.1 (C-9), 156.5 (C-7), 149.6 (C-3, 5), 140.9 (C-4), 127.0 (C-8), 126.4 (C-1), 107.6 (C-2, 6), 56.9 (3, 5-OCH₃)。以上数据与文献对照^[15], 确定化合物 **11** 为芥子醛。

化合物 **12**: 浅黄色固体, HR-ESI-MS m/z : 183.065 0 [M+H]⁺, 分子式为 C₉H₁₀O₄; ¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 10.01 (1H, s, H-7), 7.40 (2H, s, H-2, 6), 3.80 (6H, s, 3, 5-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 190.9 (C-7), 149.3 (C-3, 5), 144.3 (C-4), 127.9 (C-1), 107.8 (C-2, 6), 56.2 (3, 5-OCH₃)。上述数据与文献对照^[16], 确定化合物 **12** 为紫丁香醛。

化合物 **13**: 淡黄色晶体 (甲醇), HR-ESI-MS m/z : 139.040 0 [M+H]⁺, 分子式为 C₇H₆O₃; ¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 9.98 (1H, s, H-7), 7.88 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-2), 7.50 (1H, dd, J = 7.9, 1.2 Hz, H-6), 7.29 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 190.0 (C-7), 154.3 (C-4), 147.9 (C-3), 130.1 (C-1), 125.3 (C-6), 116.4 (C-5), 115.4 (C-2)。上述数据与文献报道对照^[17], 确定化合物 **13** 为原儿茶醛。

化合物 **14**: 白色针晶 (甲醇), HR-ESI-MS m/z :

221.043 0 [M+Na]⁺, 分子式为 C₉H₁₀O₅; ¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 7.90 (2H, s, H-2, 6), 3.79 (6H, s, 3, 5-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 169.6 (COOH), 148.6 (C-3, 5), 142.1 (C-4), 122.6 (C-1), 108.4 (C-2, 6), 56.2 (3, 5-OCH₃)。以上数据与文献对照^[18], 确定化合物 **14** 为丁香酸。

4 抗炎活性筛选

采用 LPS 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型, 使用 Griess 法测定 NO 的含量, MTT 法检测它们对 RAW264.7 细胞活性的影响^[19]。实验结果 (表 3) 显示在 40 μ mol/L 的浓度下, 化合物 **1**、**2** 和 **11** 对 NO 生成具有明显抑制作用, 抑制率分别为 53.2%、84.7% 和 55.9% (与 LPS 组比较 $P < 0.001$)。化合物 **1**、**2** 和 **11** 的细胞存活率测试结果 (图 3) 表明, 化合物 **1** 和 **11** 浓度小于 80 μ mol/L 时对细胞生长无影响, 细胞存活率均大于 90%, 化合物 **2** 在低浓度 (40 μ mol/L) 时无细胞毒性。因此, 化合物 **1**、**2** 和 **11** 均具有潜在的抗炎活性。

表 3 化合物 **1**~**4**、**9**~**11** 和 **14** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Inhibitory rates of compounds **1**—**4**, **9**—**11**, and **14** against NO production in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	浓度/ μ mol/L	NO 生成抑制率/%
1	40	53.2 $\pm$ 4.9***
2	40	84.7 $\pm$ 4.9***
3	40	9.5 $\pm$ 2.5***
4	40	11.4 $\pm$ 5.4***
9	40	28.3 $\pm$ 3.1***
10	40	25.1 $\pm$ 4.8***
11	40	55.9 $\pm$ 2.1***
14	40	24.3 $\pm$ 2.1***

与 LPS 组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs LPS group

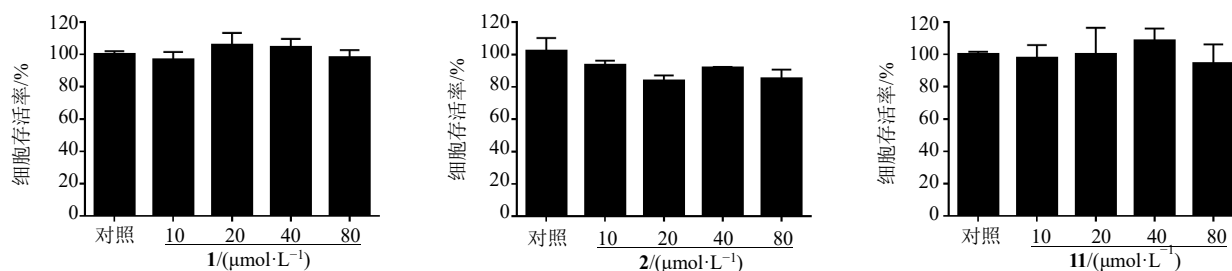


图 3 化合物 **1**、**2** 和 **11** 对 RAW264.7 细胞的毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Cytotoxicity of compounds **1**, **2**, and **11** in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

5 讨论

本研究从救必应醋酸乙酯和正丁醇部位中分离鉴定了 14 个化合物,其中 10 个为苯丙素类化合物,化合物 1 和 2 为 2 个新化合物。化合物 3 的氢谱和碳谱数据为首次报道。并对上述部分化合物进行了体外抗炎活性筛选,发现化合物 1、2 和 11 具有潜在的抗炎活性。对咖啡酸半萜类化合物 1~4 的构效分析表明,C-4 位连糖不利于抗炎活性。本研究结果进一步丰富了救必应苯丙素类化学成分的结构类型,对完善救必应抗炎作用的物质基础具有一定的意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第四十五卷第二分册) 被子植物门 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 45.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 精华本 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 163-164.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 312.
- [4] 刘振杰, 高红伟, 孙雪萍, 等. 基于 HPLC-MS 的救必应多指标成分的含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(11): 1868-1874.
- [5] 扈芷怡, 唐梅, 张谦华, 等. 救必应化学成分和药理作用研究进展 [J]. 长春师范大学学报, 2018, 37(4): 69-74.
- [6] 彭喻嫒, 梁敬钰, 冯锋. 救必应的研究进展 [J]. 海峡药学, 2014, 26(12): 4-8.
- [7] Kim M H, Park K H, Oh M H, *et al.* Two new hemiterpene glycosides from the leaves of *Ilex rotunda* Thunb [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(10): 1779-1784.
- [8] Jakupovic J, Zdero C, Paredes L, *et al.* Sesquiterpene glycosides and other constituents from *Osteospermum* species [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(9): 2881-2886.
- [9] Chen J, Manginckx S, Ma L, *et al.* Caffeoylquinic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Gynura divaricata* and their yeast α -glucosidase and PTP1B inhibitory activity [J]. *Fitoterapia*, 2014, 99: 1-6.
- [10] 刘静, 丁广治, 庾石山. 毒根斑鸠菊茎皮的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1421-1424.
- [11] Mizutani K, Yuda M, Tanaka O, *et al.* Tangshenosides I and II from Chuan-Dangshen, the root of *Codonopsis tangshen* Oliv [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(7): 2726-2729.
- [12] 任刚, 罗仇平, 李文艳, 等. 半边风苯丙素类成分及抑制中性粒细胞呼吸爆发活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 80-83.
- [13] 张东明, 李媛, 庾石山. 小叶石楠中苷类化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(6): 496-499.
- [14] 栗杰, 冯艳, 林炳锋, 等. 刺五加化学成分的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4783-4788.
- [15] 曹彦刚, 郑晓珂, 齐曼, 等. 水栀子中酚性成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4615-4619.
- [16] 黄艳, 郑金燕, 杨刚劲, 等. 苦丁茶冬青根的化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2371-2376.
- [17] 段绪红, 张学文, 秦梦, 等. 东亚小金发藓化学成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 3863-3868.
- [18] 徐文, 周光雄, 戴毅, 等. 木荷茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 863-866.
- [19] 王琴琴, 韩珊, 李新星, 等. 毛蕊花苷对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型的作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4217-4222.

[责任编辑 王文倩]