

• 化学成分 •

黑老虎果实中 1 个新的联苯环辛烯型木脂素

刘 健^{1,2}, 陶袁志², 吴沁昱², 马 静², 陈俐亲², 吴文明^{3*}, 金 岸^{1,2*}

1. 南华大学药学院, 湖南 衡阳 421200

2. 湖南医药学院药学院, 湖南 怀化 418000

3. 江西省人民医院(南昌医学院第一附属医院)药学部, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 对黑老虎 *Kadsura coccinea* 果实中的化学成分及抗炎活性进行研究。方法 通过硅胶、ODS、Sephadex LH-20、MCI 等多种柱色谱技术进行分离、纯化, 根据波谱数据和理化性质鉴定化合物的结构。构建脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的模型评价化合物的抗炎活性。结果 从黑老虎果实 75%乙醇提取物中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为 (a*S*,7*R*,8*R*,8'*S*,7'*R*)-7-苄酰氧基-7,7',8,8'-四氢-4,5-亚甲二氧基-3,3',4',5',7'-五甲氧基-8,8'-二甲基-二苯并[a,c]环辛烯(1)、3,4-二羟基-3',4'-二甲氧基-6,7'-环木脂素(2)、kadsuralignan H(3)、(+)-(8*S*,8'*R*)-4,4'-二羟基-3,3',5'-三甲氧基木脂烷(4)、前戈米辛(5)、松脂醇(6)、aromadendrane-4β,10β-diol(7)、nephthediol(8)、oplodiol(9)、1β,11-dihydroxy-5-eudesmene(10)、pubinernoid A(11)。结论 化合物 1 为 1 个新的联苯环辛烯型木脂素类化合物, 命名为血藤果素 A; 化合物 2、4、7~11 为首次从该属中分离得到。在 50 μmol/L 的浓度下, 化合物 4 可以有效的抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 的释放, 抑制率为 64.45%。

关键词: 黑老虎; 联苯环辛烯型木脂素; 抗炎活性; 血藤果素 A; 3,4-二羟基-3',4'-二甲氧基-6,7'-环木脂素; (+)-(8*S*,8'*R*)-4,4'-二羟基-3,3',5'-三甲氧基木脂烷

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)05-1443-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.003

A new dibenzocyclooctadiene lignan from fruits of *Kadsura coccinea*LIU Jian^{1,2}, TAO Yuanzhi², WU Qinyu², MA Jing², CHEN Liqin², WU Wenming³, JIN An^{1,2}

1. School of Pharmacy, University of South China, Hengyang 421200, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China

3. Department of Pharmacy, Jiangxi provincial People's Hospital (The First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents and anti-inflammatory activity in the fruits of Heilaohu [*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith]. **Methods** The chemical constituents from fruits of *K. coccinea* were isolated and purified by silica gel, ODS, Sephadex LH-20, and MCI column chromatography. Their structures were determined by analysis of spectroscopic data and physicochemical properties, and by comparison with the reported data. All compounds were evaluated for their anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Results** A total of eleven compounds were isolated from 75% ethanol extract of the fruits of *K. coccinea*, and they were identified as (a*S*,7*R*,8*R*,8'*S*,7'*R*)-7-dibenzoyloxy-7,7',8,8'-tetrahydro-4,5-methylenedioxy-3,3',4',5',7'-pentamethoxy-8,8'-dimethyl-dibenzo[a,c]cycloocten (1), 3,4-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-6,7'-cyclo lignan (2), kadsuralignan H (3), (+)-(8*S*,8'*R*)-4,4'-dihydroxy-3,3',5'-trimethoxylignan (4), pregomisin (5), pinorensinol (6), aromadendrane-4β,10β-diol (7), nephthediol (8), oplodiol (9), 1β,11-dihydroxy-5-eudesmene (10), pubinernoid A (11), respectively.

收稿日期: 2023-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81803847); 国家自然科学基金资助项目(82004063); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202112214010)

作者简介: 刘 健(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: 1669151066@qq.com

*通信作者: 金 岸, 男, 副教授, 博士、硕士生导师, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: 3405004@qq.com

吴文明, 男, 副主任药师, 博士, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: 715120620@qq.com

Conclusion Compound **1** is a new dibenzocyclooctadiene lignan named kadcolignan A, compounds **2**, **4**, and **7–11** were isolated from this genus for the first time. At a concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$, compounds **4** can significantly reduce the release of NO in LPS-stimulated RAW264.7 cells, with inhibition rates of 64.45%.

Key words: *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith; dibenzocyclooctadiene lignans; anti-inflammatory activity; kadcolignan A; 3,4-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-6,7'-cycloolignan; (+)-(8*S*,8'*R*)-4,4'-dihydroxy-3,3',5'-trimethoxylignan

黑老虎 *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith 为五味子科南五味子属常绿木质藤本植物, 原产于中国南部^[1], 其根茎在民间常用来治疗胃肠疾病和类风湿性关节炎^[2-3]。据文献报道, 从黑老虎中分离得到的化学成分有三萜、倍半萜、木脂素、甾体、单萜和氨基酸类等^[4]。其中, 木脂素和三萜类成分作为黑老虎的主要化学成分, 具有抗炎、抗肿瘤、抗艾滋病病毒和保肝等功效^[5-7]。目前, 对于黑老虎化学成分的研究主要集中在根和藤茎上, 而对于果实部位研究相对较少。

黑老虎果实民间又被称为“血藤果”“布福娜”“冷饭团”。黑老虎果实除含有丰富的维生素、氨基酸及多种微量元素外, 还具有广泛的药用价值^[8], 因此可作为一种功能性水果进行开发利用。据相关文献报道, 黑老虎果实中提取到的木脂素类成分具有一定的抗艾滋病病毒^[9]及保肝活性^[10], 多酚与花色苷类成分具有抗氧化活性^[11]。为进一步揭示黑老虎果实中的化学成分, 丰富黑老虎化学成分结构类型, 本实验从干燥的黑老虎果实中分离鉴定了 11 个单体化合物 (图 1), 其中, 化合物 **1** 为新化合物,

鉴定为 (a*S*,7*R*,8*R*,8'*S*,7'*R*)-7-苄酰氧基-7,7',8,8'-四氢-4,5-亚甲二氧基-3,3',4',5',7'-五甲氧基-8,8'-二甲苯并[a,c]环辛烯 [(a*S*,7*R*,8*R*,8'*S*,7'*R*)-7-dibenzoyloxy-7,7',8,8'-tetrahydro-4,5-methylenedioxy-3,3',4',5',7'-pentamethoxy-8,8'-dimethyl-dibenzo[a,c]cycloocten, **1**], 已知化合物分别鉴定为 3,4-二羟基-3',4'-二甲氧基-6,7'-环木脂素 (3,4-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-6,7'-cycloolignan, **2**)、kadsuralignan H (**3**)、(+)-(8*S*,8'*R*)-4,4'-二羟基-3,3',5'-三甲氧基木脂烷 [(+)-(8*S*,8'*R*)-4,4'-dihydroxy-3,3',5'-trimethoxylignan, **4**]、前戈米辛 (pregomisin, **5**)、松脂醇 (pinoresinol, **6**)、aromadendrane-4 β ,10 β -diol (**7**)、nephtediol (**8**)、oplodiol (**9**)、1 β ,11-dihydroxy-5-eudesmene (**10**)、pubinernoid A (**11**)。化合物 **1** 命名为血藤果素 A, 化合物 **2**、**4**、**7–11** 为首次从该属中分离得到。同时, 对分离得到的 11 个单体化合物开展了抗炎活性评价。

1 仪器与材料

LTQ-Orbitrap XL 质谱仪 (赛默飞公司, 美国); Bruker Avance (400、500 MHz) 核磁共振波谱仪 (布

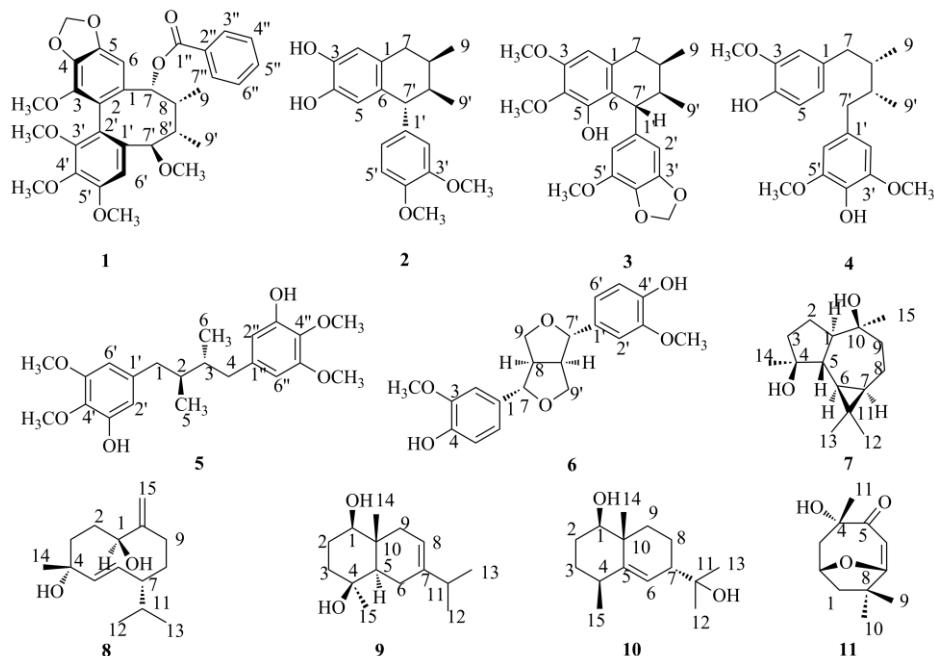


图 1 化合物 1~11 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—11

鲁克公司, 德国); Autopol IV 型旋光仪 (鲁道夫公司, 美国); J-810 型圆二色光谱仪 (佳司科公司, 日本); 快速纯化制备色谱仪 (三泰科技有限责任公司, 常州); 柱色谱硅胶 (40~63 μm , 三泰科技有限责任公司, 常州); Sephadex LH-20 凝胶 (GE 公司, 美国); MCI 小孔树脂 (75~150 μm , 三菱化学, 日本); Easysep-3030 Unimicro 全自动高效液相色谱仪 (通微公司, 上海); MULTISKAN MK3 酶标仪 (赛默飞公司, 美国); 十八烷基硅烷键合填料 (C_{18} , 50 μm , YMC 公司, 日本); SHIMADZU LC-20A 制备液相色谱仪 (岛津公司, 日本); 色谱柱 ZORBAX Bonus-RP (150 mm $\times$ 21.2 mm, 7 μm , 安捷伦公司制备柱, 美国) 及 Eclipse XDB- C_{18} (250 mm $\times$ 9.4 mm, 5 μm , 安捷伦公司半制备柱, 美国); 色谱级甲醇 (迈瑞达公司); 分析纯试剂 (奥普升化工有限公司, 天津)。DMEM (批号 SH30243.01B, Hyclone 公司, 美国), 胎牛血清 (批号 SH30084.03, Hyclone 公司, 美国); PBS (批号 C10010500BT, Life 科技公司, 美国), 胰酶 (批号 25200072, GIBCO 公司, 美国), MTT (批号 M5655-1G, Sigma 公司, 上海); L-NIL (批号 HY-12116, MCE 公司, 美国); 总一氧化氮检测试剂盒 (批号 S0023, 上海碧云天公司)。

样品于 2018 年采自湖南省怀化市通道县, 经湖南医药学院汪治教授鉴定为南五味子属植物黑老虎 *K. coccinea* (Lem.) A. C. Smith 的成熟果实。样品 (201801) 保存于湖南医药学院药学院。

2 方法

2.1 提取与分离

取黑老虎干燥果实 (32 kg), 粉碎后加入 75% 的乙醇冷浸提取 4 次, 浓缩得到粗提物浸膏。加适量水将浸膏混悬, 用石油醚萃取 5 次并收集萃取液, 浓缩得到石油醚部位的浸膏 1.2 kg。石油醚浸膏用硅胶拌样后经硅胶柱色谱粗分, 以石油醚-醋酸乙酯 (15:1~0:1) 梯度洗脱得到 12 个组分 (Fr. A~L)。

Fr. B (205 g) 首先用 MCI 柱 (甲醇~水 1:3 $\rightarrow$ 1:0) 分离成 4 个部分 Fr. B1~B4。Fr. B1 (50 g) 用快速纯化制备色谱仪经 ODS 色谱柱 (甲醇~水 1:4 $\rightarrow$ 1:0) 得到馏分 Fr. B1-1~B1-11, 其中 Fr. B1-5 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷~甲醇 1:1) 色谱分离得到 2 个组分 Fr. B1-5-1 和 Fr. B1-5-2, Fr. B1-5-2 经反相制备型高效液相色谱 (65% 甲醇) 得到化合物 **2** (10.5 mg) 和 **5** (13.2 mg); Fr. B1-8 经半制备 HPLC 分离得到化合物 **1** (6.5 mg,

$t_{\text{R}}=5.5$ min; 甲醇-水 60:40, 3 mL/min)、化合物 **3** (7.4 mg, $t_{\text{R}}=6.1$ min; 甲醇-水 60:40, 3 mL/min) 和 Fr. B1-8-1 (14.4 mg, $t_{\text{R}}=12.3$ min; 甲醇-水 60:40, 3 mL/min), Fr. B1-8-1 再经半制备色谱柱反复纯化得到化合物 **4** (6.2 mg, $t_{\text{R}}=19.8$ min; 甲醇-水 55:45, 3.3 mL/min) 和化合物 **6** (6.8 mg, $t_{\text{R}}=17.8$ min; 甲醇-水 55:45, 3.3 mL/min)。Fr. C 浸膏 (140 g) 通过 MCI 梯度洗脱 (甲醇-水 1:3 $\rightarrow$ 1:0) 后得到 6 个组分 Fr. C1~C6, 其中的 Fr. C3 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 柱色谱分离到 4 个组分 Fr. C3-1~C3-4, Fr. C3-2 经 ODS 色谱柱 (甲醇-水 1:4 $\rightarrow$ 1:0) 梯度洗脱得到 4 个组分 Fr. C3-2-1~C3-2-4, Fr. C3-2-2 经半制备 HPLC 得到化合物 **9** (9.3 mg, $t_{\text{R}}=10.8$ min; 甲醇-水 60:40, 3 mL/min) 和 **10** (8.5 mg, $t_{\text{R}}=15.8$ min; 甲醇-水 60:40, 3 mL/min), Fr. C3-2-3 经重结晶得到化合物 **8** (11.3 mg); Fr. C3-3 经 ODS 开放柱 (甲醇-水 1:3 $\rightarrow$ 1:0) 及半制备 HPLC 进一步纯化得到化合物 **7** (7.4 mg, $t_{\text{R}}=10.4$ min; 甲醇-水 65:35, 3 mL/min) 和 **11** (6.7 mg, $t_{\text{R}}=13.5$ min; 甲醇-水 65:35, 3 mL/min)。

2.2 抗炎活性测定

2.2.1 细胞毒性实验 取正常生长的 RAW264.7 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔细胞培养板中, 于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。以添加不含药物的培养基作为对照组, 以分别加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的待测样品 (**1**~**11**) 为给药组, 每组设 3 个复孔, 继续在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h。采用 MTT 法测定并计算细胞存活率。若化合物对 RAW264.7 细胞有毒性, 则选择更低浓度重复上述实验, 直至筛选到对 RAW264.7 细胞无明显毒性的浓度, 再以此浓度进行抗炎活性实验。

2.2.2 抗炎活性筛选 取正常生长的 RAW264.7 巨噬细胞, 以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔细胞培养板中, 并于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。诱导型 NO 合成酶抑制剂 (L-NIL) 为阳性对照。设置空白对照组、LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 组、LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + L-NIL (30 $\mu\text{mol/L}$) 组和 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + 化合物 **1**~**11** (化合物 **3**、**5** 用 20 $\mu\text{mol/L}$, 化合物 **2**、**4** 用 50 $\mu\text{mol/L}$, 其余用 100 $\mu\text{mol/L}$), 培养 24 h 后, 收集上清液, 按照 NO 试剂盒说明书检测 NO 含量。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 24.2$ (c 0.4,

CH₃OH); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 205 (4.53); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 2 940, 1 713, 1 597, 1 458, 1 404, 1 273, 1 096, 1 057。HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 m/z 568.252 7 [M+NH₄]⁺ (计算值 568.254 7, C₃₁H₃₈NO₉), 确定分子式为 C₃₁H₃₄O₉, 不饱和度为 15。

¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱中 (表 1) 显示 2 个芳香质子信号 δ_{H} 6.53 (1H, s, H-6), 6.63 (1H, s, H-6') 和 12 个芳香碳信号 δ_{C} 133.4 (C-1), 121.4 (C-2), 141.7 (C-3), 136.2 (C-4), 148.6 (C-5), 102.8 (C-6), 133.0 (C-1'), 123.7 (C-2'), 151.9 (C-3'), 141.7 (C-4'), 152.1 (C-

表 1 化合物 1 的 ¹H- 和 ¹³C-NMR 数据 (400/100 MHz, CDCl₃)
Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data of compound 1 (400/100 MHz, CDCl₃)

碳位	δ_{C}	δ_{H}	碳位	δ_{C}	δ_{H}
1	133.4		8'	39.9	2.12 (m)
2	121.4		9'	15.7	1.03 (d, $J = 7.2$ Hz)
3	141.7		1''	166.0	
4	136.2		2''	129.8	
5	148.6		3''	129.9	7.34 (m)
6	102.8	6.53 (s)	4''	128.2	7.27 (t, $J = 7.7$ Hz)
7	81.6	6.05 (d, $J = 7.3$ Hz)	5''	132.1	7.43 (t, $J = 7.7$ Hz)
8	38.8	2.35 (m)	6''	128.2	7.27 (t, $J = 7.7$ Hz)
9	21.5	1.08 (d, $J = 7.3$ Hz)	7''	129.9	7.34 (m)
1'	133.0		3-OMe	59.6	3.86 (s)
2'	123.7		3'-OMe	59.8	3.09 (s)
3'	151.9		4'-OMe	60.5	3.58 (s)
4'	141.7		5'-OMe	56.4	3.99 (s)
5'	152.1		7'-OMe	56.2	3.04 (s)
6'	111.1	6.63 (s)	OCH ₂ O	101.2	5.96 (overlapped)
7'	90.0	4.16 (s)			

5'), 111.1 (C-6'), 5 个甲氧基信号 δ_{H} 3.86 (3H, s), 3.09 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.04 (3H, s), 1 个亚甲二氧基质子信号 δ_{H} 5.96 (2H, overlapped), 由此推测化合物 1 中存在联苯基团。在 ¹H-¹H COSY 谱 (图 2) 中可看出-CH (H-7)-CH (H-8)-CH (H-8')-CH (H-7')-, -CH (H-8)-CH₃ (H-9)-和-CH (H-8')-CH₃ (H-9')- 3 个相连片段; HMBC 谱 (图 2) 中 H-7 与 C-2, 6 相关, H-6' 与 C-7' 相关, H-9 同 C-7, 8, 8' 相关, H-

9' 同 C-7', 8' 存在相关信号。以上数据表明化合物 1 具有联苯环辛烯类木脂素的基本骨架。此外, ¹H NMR 谱中证实化合物中还存在 2 个甲基信号 δ_{H} 1.08 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, H-9) 和 1.03 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-9'); ¹³C NMR 谱中还显示存在 1 组苯酰氧基信号 δ_{C} 166.0 (C-1''), 129.8 (C-2''), 129.9 (C-3'', 7''), 128.2 (C-4'', 6''), 132.1 (C-5'')^[12]。

结合 HMBC 谱分析, 5 个甲氧基信号分别与 C-3、C-3'、C-4'、C-5'、C-7' 相关, 由此确定 5 个甲氧基分别位于 C-3、C-3'、C-4'、C-5' 和 C-7'。亚甲二氧基质子信号与 C-4 和 C-5 有关联表明该基团连在 C-4 和 C-5 位上。H-7 (δ_{H} 6.05, 1H, s) 和 C-1'' (δ_{C} 166.0) 的 HMBC 相关性证实了 C-7 上存在苯酰氧基。根据以上数据分析得到化合物 1 的平面结构。CD 谱中显示在 225 nm 附近呈现正的 Cotton 效应, 240 nm 附近则呈现负值, 表明 1 具有 S-联苯构型^[13]。同时在 NOESY 谱中 (图 3) 显示 H-6 与 H-7, H-8 相关, H-6' 与 H-7', H₃-9' 相关, 以及 H₃-9 与 H₃-9' 相关, 表明 H-7', CH₃-9' 和 CH₃-9 是 α 构型, H-7 是 β 构型, 化合物 1 中的环辛二烯结构符合扭

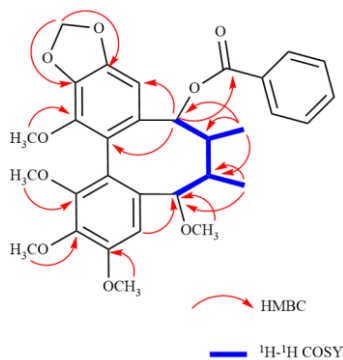


图 2 化合物 1 的结构以及主要 HMBC、¹H-¹H COSY 相关
Fig. 2 Structure of compound 1 and key HMBC, ¹H-¹H COSY correlations

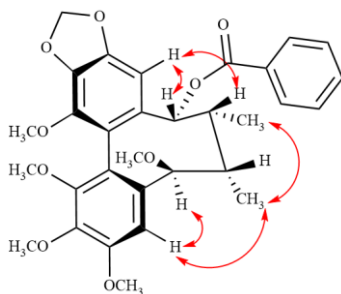


图 3 化合物 1 的重要 NOESY 相关

Fig. 3 Key NOESY correlations of compound 1

曲船椅式^[14], 其绝对构型为: C-7 (*R*), C-8 (*R*), C-8' (*S*), C-7' (*R*)。故化合物 1 的结构鉴定为(a*S*,7*R*,8*R*,8'*S*,7'*R*)-7-苄酰氧基-7,7',8,8'-四氢-4,5-亚甲二氧基-3,3',4',5',7'-五甲氧基-8,8'-二甲基-二苯并[a,c]环辛烯。经 Scifinder 数据库检索为新化合物, 命名为血藤果素 A。

化合物 2: 白色无定型粉末; $[\alpha]_D^{20}$ -60.2 (*c* 0.4, CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 351.16 [M+Na]⁺, 分子式 C₂₀H₂₄O₄。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.78 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.56 (1H, s, H-2), 6.54 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 6.48 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, H-6'), 6.40 (1H, s, H-5), 5.46 (1H, s, 4-OH), 5.32 (1H, s, 3-OH), 3.86 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.81 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.59 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-7'), 2.89 (1H, dd, *J* = 16.3, 5.4 Hz, H-7a), 2.46 (1H, dd, *J* = 16.3, 7.1 Hz, H-7b), 2.03 (1H, m, H-8), 1.93 (1H, m, H-8'), 0.90 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9'), 0.88 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 127.6 (C-1), 110.6 (C-2), 143.7 (C-3), 143.5 (C-4), 116.0 (C-5), 130.9 (C-6), 35.3 (C-7), 29.3 (C-8), 15.9 (C-9), 139.0 (C-1'), 111.5 (C-2'), 146.2 (C-3'), 145.0 (C-4'), 113.8 (C-5'), 122.1 (C-6'), 50.5 (C-7'), 40.6 (C-8'), 15.8 (C-9'), 55.8 (3'-OCH₃), 55.9 (4'-OCH₃)。以上数据经查阅文献报道^[15], 鉴定化合物 2 为 3,4-二羟基-3',4'-二甲氧基-6,7'-环木脂素。

化合物 3: 白色无定型粉末; $[\alpha]_D^{20}$ +35.6 (*c* 0.4, CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 387.18 [M+H]⁺, 分子式 C₂₂H₂₆O₆。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.26 (2H, m, H-6, 6'), 6.13 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2'), 5.89 (2H, s, OCH₂O), 5.65 (1H, s, OH-3), 3.98 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-7'), 3.86 (3H, s, 5-OCH₃), 3.84 (3H, s, 5'-OCH₃), 3.83 (3H, s, 4-OCH₃), 2.67 (1H, dd, *J* = 17.1, 5.5 Hz, H-7a), 2.39 (1H, dd, *J* = 17.1, 11.7 Hz, H-7b), 1.97 (1H, m, H-8), 1.87 (1H, m, H-8'), 0.93 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, H-

9'), 0.89 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-9); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 133.2 (C-1), 116.1 (C-2), 147.8 (C-3), 133.6 (C-4), 150.7 (C-5), 103.3 (C-6), 33.5 (C-7), 26.0 (C-8), 19.2 (C-9), 142.1 (C-1'), 102.6 (C-2'), 148.5 (C-3'), 133.2 (C-4'), 143.3 (C-5'), 107.9 (C-6'), 47.0 (C-7'), 41.0 (C-8'), 13.7 (C-9'), 61.2 (4-OCH₃), 55.8 (5-OCH₃), 56.8 (5'-OCH₃), 101.3 (OCH₂O)。以上数据经查阅文献报道^[16], 鉴定化合物 3 为 kadsuralignan H。

化合物 4: 白色无定型粉末; $[\alpha]_D^{20}$ +15.2 (*c* 0.4, CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 361.20 [M+H]⁺, C₂₁H₂₈O₅。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.82 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.66 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, H-6), 6.61 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.34 (2H, s, H-2', 6'), 3.84 (9H, m, 3, 3', 5'-OCH₃), 2.74 (1H, dd, *J* = 13.1, 4.1 Hz, H-7'a), 2.71 (1H, dd, *J* = 13.1, 4.3 Hz, H-7a), 2.30 (1H, dd, *J* = 13.1, 9.5 Hz, H-7b), 2.26 (1H, dd, *J* = 13.1, 9.1 Hz, H-7b), 1.76 (2H, m, H-8, 8'), 0.85 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9), 0.84 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 132.8 (C-1), 111.6 (C-2), 146.5 (C-3), 143.7 (C-4), 114.1 (C-5), 121.8 (C-6), 39.2 (C-7), 39.0 (C-8), 16.4 (C-9), 133.8 (C-1'), 105.8 (C-2', 6'), 146.9 (C-3', 5'), 133.0 (C-4'), 39.4 (C-7'), 39.1 (C-8'), 16.2 (C-9'), 55.9 (3-OCH₃), 56.3 (3', 5'-OCH₃)。以上数据经查阅文献报道^[17], 鉴定化合物 4 为 (+)-(8*S*,8'*R*)-4,4'-二羟基-3,3',5'-三甲氧基木脂烷。

化合物 5: 白色粉末; $[\alpha]_D^{20}$ 0 (*c* 0.4, CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 391.21 [M+H]⁺, 分子式 C₂₂H₃₀O₆。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.42 (2H, d, *J* = 1.9 Hz, H-6', 6''), 6.25 (2H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2', 2''), 3.87 (6H, s, OCH₃-4', 4''), 3.83 (6H, s, OCH₃-5', 5''), 2.69 (2H, dd, *J* = 13.3, 9.2 Hz, H-1b, 4b), 2.24 (2H, dd, *J* = 13.3, 9.2 Hz, H-1a, 4a), 1.76 (2H, m, H-2, 3), 0.85 (6H, d, *J* = 6.6 Hz, H-5, 6); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 152.1 (C-4', 4''), 149.0 (C-5', 5''), 138.2 (C-3', 3''), 133.6 (C-1', 1''), 108.6 (C-6', 6''), 104.9 (C-2', 2''), 61.0 (4', 4''-OCH₃), 55.8 (5', 5''-OCH₃), 39.4 (C-1, 4), 39.0 (C-2, 3), 16.3 (CH₃-2, 3)。以上数据经查阅文献报道^[18], 鉴定化合物 5 为前戈米辛。

化合物 6: 黄色油状物; $[\alpha]_D^{20}$ +45 (*c* 0.4, CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 357.13 [M-H]⁻, 分子式 C₂₀H₂₂O₆。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.89 (4H, m, H-2, 6, 2', 6'), 6.82 (2H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, H-5, 5'), 4.74 (2H, d, *J* = 4.0 Hz, H-7, 7'), 4.23 (2H, dd, *J* = 9.1,

6.8 Hz, H-9 a, 9'a), 3.90 (6H, m, 3, 3'-OCH₃), 3.88 (2H, dd, $J = 9.1, 3.5$ Hz, H-9b, 9'b), 3.09 (2H, m, H-8, 8'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 146.8 (C-3, 3'), 145.4 (C-4, 4'), 133.1 (C-1, 1'), 119.1 (C-6, 6'), 114.4 (C-5, 5'), 108.7 (C-2, 2'), 86.0 (C-7, 7'), 71.8 (C-9, 9'), 56.1 (OCH₃-3, 3'), 54.3 (C-8, 8'). 以上数据经查阅文献报道^[19], 鉴定化合物 **6** 为松脂醇。

化合物 **7**: 白色粉末; $[\alpha]_D^{20} -12.4$ (c 0.4, CH₃OH); ESI-MS m/z : 261.18 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₅H₂₆O₂。 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 0.43 (1H, dd, $J = 10.5, 9.4$ Hz, H-6), 0.64 (1H, ddd, $J = 11.1, 9.4, 6.1$ Hz, H-7), 0.88 (1H, m, H-8), 1.04 (6H, s, H-12, H-13), 1.17 (3H, s, H-15), 1.21 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-5), 1.25 (3H, s, H-14), 1.53-1.89 (8H, m, H-1, 2, 3, 8, 9); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 16.6 (C-13), 19.7 (C-11), 20.3 (C-8), 20.4 (C-15), 23.9 (C-2), 24.6 (C-14), 26.7 (C-7), 28.4 (C-6), 28.8 (C-12), 41.3 (C-3), 44.6 (C-9), 48.5 (C-5), 56.5 (C-1), 75.2 (C-10), 80.5 (C-4)。以上数据经查阅文献报道^[20], 鉴定化合物 **7** 为 aromadendrane-4 β ,10 β -diol。

化合物 **8**: 白色无定型粉末; $[\alpha]_D^{20} +61.2$ (c 0.4, CH₃OH); ESI-MS m/z : 261.18 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₅H₂₆O₂。 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.29 (1H, dd, $J = 15.5, 9.7$ Hz, H-6), 5.21 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-5), 5.12 (1H, s, H-15a), 4.89 (1H, s, H-15b), 3.93 (1H, dd, $J = 9.1, 3.1$ Hz, H-1), 2.0-1.4 (8H, m, H-2, 3, 8, 9), 1.26 (3H, s, CH₃-4), 0.89 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H₃-12), 0.84 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H₃-13); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 151.1 (C-10), 137.7 (C-5), 130.0 (C-6), 111.6 (C-15), 78.7 (C-1), 72.5 (C-4), 49.9 (C-7), 38.6 (C-2), 32.5 (C-11), 30.0 (C-3), 29.7 (C-14), 28.4 (C-8), 28.4 (C-9), 20.8 (C-12), 20.7 (C-13)。以上数据经查阅文献报道^[21], 鉴定化合物 **8** 为 nephthediol。

化合物 **9**: 无色针晶 (甲醇); $[\alpha]_D^{20} -45.5$ (c 0.4, CH₃OH); ESI-MS m/z : 261.18 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₅H₂₆O₂。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.34 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-8), 3.30 (1H, dd, $J = 11.7, 3.8$ Hz, H-1), 2.20 (1H, m, H-11), 2.12~1.88 (4H, m, H-6, 9), 1.84~1.48 (4H, m, H-2, 3), 1.30 (1H, dd, $J = 11.7, 5.6$ Hz, H-5), 1.18 (3H, s, 15-CH₃), 1.03 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 12-CH₃), 1.01 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 13-CH₃), 0.95 (3H, s, 14-CH₃); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 142.0 (C-7), 116.2 (C-8), 80.0 (C-1), 71.1 (C-4), 46.4 (C-5), 40.8 (C-

9), 39.6 (C-3), 37.8 (C-10), 35.1 (C-11), 30.0 (15-CH₃), 26.9 (C-2), 23.2 (C-6), 21.9 (13-CH₃), 21.4 (12-CH₃), 11.8 (14-CH₃)。以上数据经查阅文献报道^[22], 鉴定化合物 **9** 为 oplodiol。

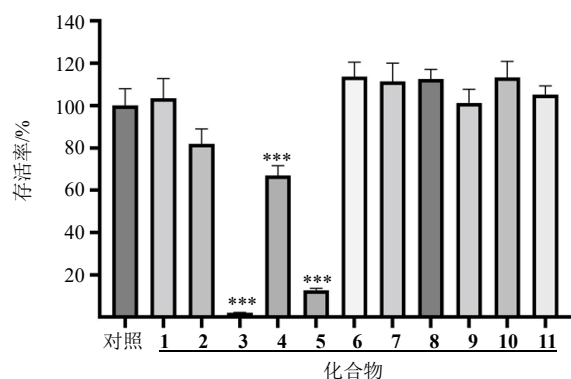
化合物 **10**: 白色无定型粉末; $[\alpha]_D^{20} -13.6$ (c 0.4, CH₃OH); ESI-MS m/z : 239.20 [M+H]⁺, 分子式 C₁₅H₂₆O₂。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.57 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-6), 3.32 (1H, dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz, H-1), 2.45 (1H, m, H-4), 2.05 (1H, m, H-7), 1.83 (1H, m, H-2a), 1.65 (1H, m, H-2b), 1.65 (1H, m, H-8a), 1.58 (1H, m, H-8b), 1.57 (2H, m, H-3), 1.65 (1H, m, H-9a), 1.51 (1H, m, H-9b), 1.20 (6H, d, $J = 3.8$ Hz, H-12, 13), 1.15 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, H-15), 1.09 (3H, s, H-14); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 149.1 (C-5), 123.6 (C-6), 78.5 (C-1), 73.5 (C-11), 45.6 (C-7), 40.2 (C-10), 38.7 (C-4), 35.0 (C-9), 31.0 (C-3), 28.1 (C-13), 27.3 (C-12), 26.6 (C-2), 22.4 (C-15), 20.8 (C-14), 20.2 (C-8)。以上数据经查阅文献报道^[23], 鉴定化合物 **10** 为 1 β ,11-dihydroxy-5-eudesmene。

化合物 **11**: 白色无定型粉末; $[\alpha]_D^{20} +17.5$ (c 0.4, CH₃OH); ESI-MS m/z : 197.12 [M+H]⁺, 分子式 C₁₁H₁₆O₃。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.68 (1H, s, H-6), 4.32 (1H, s, H-2), 2.46 (1H, dt, $J = 14.0, 2.7$ Hz, H-3b), 1.98 (1H, dt, $J = 14.5, 2.7$ Hz, H-1b), 1.73-1.81 (1H, m, H-3a), 1.78 (3H, s, H-11), 1.52 (1H, dd, $J = 14.5, 3.8$ Hz, H-1a), 1.46 (3H, s, H-9), 1.26 (3H, s, H-10); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 182.8 (C-5), 172.2 (C-7), 113.0 (C-6), 87.0 (C-4), 66.9 (C-2), 47.4 (C-1), 45.7 (C-3), 36.1 (C-8), 30.8 (C-10), 27.1 (C-11), 26.6 (C-9)。以上数据经查阅文献报道^[24], 鉴定化合物 **11** 为 pubinernoid A。

3.2 抗炎实验

3.2.1 细胞毒性评价 采用 MTT 法, 首先测定了在 100 μ mol/L 浓度下化合物 **1**~**11** 对 RAW264.7 细胞的毒性。结果表明 (图 4), 在 100 μ mol/L 浓度下, 化合物 **3** 和 **5** 显示出较强的细胞毒性, RAW264.7 细胞的存活率分别为 2.00%和 12.38%; 化合物 **2** 和 **4** 具有一定的细胞毒性, RAW264.7 的存活率分别为 75.32%和 63.73%。因此, 选择更低浓度测定化合物 **2**~**5** 对 RAW264.7 细胞的毒性。最终, 化合物 **2** 和 **4** 在 50 μ mol/L 下, 化合物 **3** 和 **5** 在 20 μ mol/L 下对 RAW264.7 细胞无明显毒性。

3.2.2 抗炎活性的评价 本实验选择化合物 **3**、**5** 浓



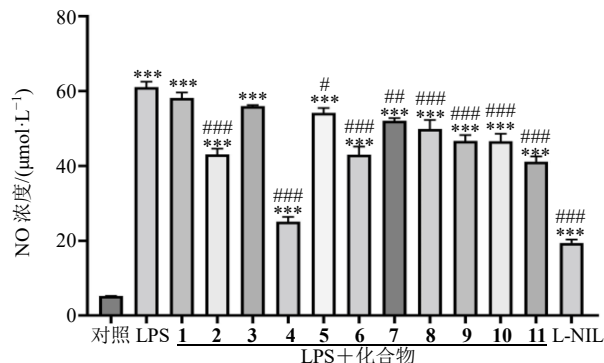
与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 4 RWA264.7 细胞化合物 1~11 作用下的存活率

Fig. 4 Survival rates of RAW264.7 cells under effects of compounds 1—11

度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 化合物 2、4 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 其余化合物浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。结果表明 (图 5), 与 LPS 组相比而言, 所有的化合物对 NO 的释放都有一定的抑制效果, 其中化合物 4 在抑制 NO 释放上展示出更好的效果, 抑制率为 64.45%。30 $\mu\text{mol/L}$ 的 L-NIL 作为阳性对照, 抑制率为 74.57%。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs LPS group.

图 5 化合物 1~11 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 的影响

Fig. 5 Effect of compounds 1-11 on NO production in RAW264.7 cells induced by LPS

4 讨论

本研究从黑老虎果实的乙醇提取物中分离得到 11 个多种类型的化合物包括 1 个新的联苯环辛烯型木脂素、2 个环木脂素、2 个简单木脂素、1 个双环木脂素、4 个倍半萜及 1 个单萜, 充分的表明黑

老虎果实中存在木脂素和萜类等化学成分。同时, 本次研究发现, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 化合物 3 和 5 对 RAW264.7 细胞表现出较强的毒性。在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 无细胞毒性的条件下, 化合物 4 在抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 上表现出较好的效果, 表明具有一定的抗炎活性。此外, 黑老虎果实中除含有丰富的木脂素外, 萜类成分也需得到足够的关注, 值得进行深入研究, 同时也为后续资源利用和产品开发奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 舒永志, 成亮, 杨培明. 黑老虎的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 805-813.
- [2] 王楠, 李占林, 华会明. 黑老虎根化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 195-197.
- [3] Xu H C, Hu K, Shi X H, *et al.* Synergistic use of NMR computation and quantitative interproton distance analysis in the structural determination of neokadococcitane A, a rearranged triterpenoid featuring an aromatic ring D from *Kadsura coccinea*¹ [J]. *Org Chem Front*, 2019, 6(10): 1619-1626.
- [4] 舒永志, 成亮, (曹) 潘喆, 等. 黑老虎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 428-431.
- [5] Gao X M, Pu J X, Huang S X, *et al.* Kadococcilactones A-J, triterpenoids from *Kadsura coccinea* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(7): 1182-1188.
- [6] Ban N K, Thanh B V, Kiem P V, *et al.* Dibenzocyclooctadiene lignans and lanostane derivatives from the roots of *Kadsura coccinea* and their protective effects on primary rat hepatocyte injury induced by t-butyl hydroperoxide [J]. *Planta Med*, 2009, 75(11): 1253-1257.
- [7] Yang Y P, Jian Y Q, Cheng S W, *et al.* Dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura coccinea* alleviate APAP-induced hepatotoxicity via oxidative stress inhibition and activating the Nrf2 pathway *in vitro* [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105277.
- [8] 李志春, 孙健, 封毅, 等. 黑老虎果毒理实验及其对血脂的调节作用 [J]. 食品科学, 2011, 32(1): 203-205.
- [9] Liu J S, Li L. Kadsulignans L-N, three dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura coccinea* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(1): 241-245.
- [10] Jia Y Z, Yang Y P, Cheng S W, *et al.* Heilaohuguosus A-S from the fruits of *Kadsura coccinea* and their hepatoprotective activity [J]. *Phytochemistry*, 2021, 184: 112678.
- [11] Sun J, Yao J Y, Huang S X, *et al.* Antioxidant activity of

- polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith [J]. *Food Chem*, 2009, 117(2): 276-281.
- [12] Yang J H, Zhang H Y, Du X, *et al.* New dibenzocyclooctadiene lignans from the *Kadsura ananosma* [J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(25): 4498-4504.
- [13] 吴红华, 李志峰, 张起辉, 等. CD 在木脂素类化合物绝对构型测定中的应用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(7): 587-594.
- [14] Dong K, Pu J X, Zhang H Y, *et al.* Dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura polysperma* and their antineurodegenerative activities [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(2): 249-256.
- [15] Núñez-Mojica G, Vázquez-Ramírez A L, García A, *et al.* New cyclolignans of *Larrea tridentata* and their antibacterial and cytotoxic activities [J]. *Phytochem Lett*, 2021, 43: 212-218.
- [16] Li H R, Wang L Y, Yang Z G, *et al.* Kadsuralignans H-K from *Kadsura coccinea* and their nitric oxide production inhibitory effects [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(12): 1999-2002.
- [17] Li Y R, Cheng W, Zhu C G, *et al.* Bioactive neolignans and lignans from the bark of *Machilus robusta* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(6): 1444-1452.
- [18] Lee I S, Jung K Y, Oh S R, *et al.* Platelet-activating factor antagonistic activity and (13)C NMR assignment of pregomisin and chamigrenal from *Schisandra chinensis* [J]. *Arch Pharm Res*, 1997, 20(6): 633-636.
- [19] 刘志华, 王金兰, 赵明, 等. 工业大麻地上部分化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(15): 4463-4472.
- [20] Wu T S, Chan Y Y, Leu Y L. The constituents of the root and stem of *Aristolochia heterophylla* Hemsl [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(3): 357-361.
- [21] Kitagawa I, Cui Z, Son B W, *et al.* Marine natural products. XVII. Nephtheoxydiol, a new cytotoxic hydroperoxy-germacrane sesquiterpene, and related sesquiterpenoids from an Okinawan soft coral of *Nephthea* sp. (Nephtheidae) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(1): 124-135.
- [22] Yang X. Sesquiterpenes from *Artemisia giraldii* var. *longipedunculata* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2018, 27(8): 576-581.
- [23] Bläs B, Zapp J, Becker H. *ent*-Clerodane diterpenes and other constituents from the liverwort *Adelanthus lindenbergerianus* (Lehm.) Mitt [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(1): 127-137.
- [24] 冯树慧, 张卫青, 孙茂, 等. 烟管头草的化学成分及其细胞毒活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(3): 383-389.

[责任编辑 王文倩]