

灯盏细辛中 1 个新咖啡酰酯类化合物的分离鉴定及抗肿瘤活性研究

陈恒¹, 王春国², 饶沁玲¹, 黄智兴¹, 王钰淼¹, 公佳玉¹, 李沐轩³, 刘永刚^{1*}, 邓欣祺^{4*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029

3. 北京中医药大学人文学院, 北京 102488

4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: **目的** 研究灯盏细辛 *Erigeron breviscapus* 的化学成分及其体外抗胶质母细胞瘤和结肠癌活性。**方法** 采用大孔树脂柱色谱、中压制备色谱、高压制备色谱等多种方法进行分离和纯化, 利用 1D-NMR、2D-NMR、HR-ESI-MS、UV、IR 等波谱技术对分离得到的化合物进行结构鉴定, 采用 CCK-8 法对新化合物的活性进行筛选。**结果** 从灯盏细辛 80% 甲醇提取物中分离得到 4 个化合物, 分别鉴定为反式-4-咖啡酰氧基-3-羟基-6-咖啡酰氧甲基-7,8-二氧杂环[3.2.1]辛烷-1-羧酸 (1)、异绿原酸 A (2)、绿原酸 (3) 和新绿原酸 (4); 其中化合物 1 对人胶质瘤 U87 细胞和人结肠癌 HT29 细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 (13.31±0.77)、(14.83±0.92) μmol/L。**结论** 化合物 1 为新化合物, 命名为新飞蓬酯乙; 化合物 1 对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制作用。

关键词: 灯盏细辛; 菊科; 抗肿瘤活性; 新飞蓬酯乙; 绿原酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)14-4650-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.002

Isolation, identification and antitumor activities study of a new caffeoyl ester compound from *Erigeron breviscapus*

CHEN Heng¹, WANG Chunguo², RAO Qinling¹, HUANG Zhixing¹, WANG Yumiao¹, GONG Jiayu¹, LI Muxuan³, LIU Yonggang¹, DENG Xinqi⁴

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. School of Humanities, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents of Dengzhanxixin [*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.] and its *in vitro* anti-glioblastoma and colon cancer activities. **Methods** Various methods including macroporous resin column chromatography, medium-pressure preparative chromatography, and high-pressure preparative chromatography were employed to isolate and purify the 80% methanol extract of *E. breviscapus*. The compounds obtained were structurally identified using 1D-NMR, 2D-NMR, HR-ESI-MS, UV, IR, and other spectroscopic techniques. The activity of the new compounds was screened using the CCK-8 method. **Results** Four compounds were isolated from *E. breviscapus* and identified as *trans*-4-caffeoyloxy-3-hydroxy-6-caffeoyloxymethyl-7,8-dioxabicyclo [3.2.1]octane-1-carboxylic acid (1), isochlorogenic acid A (2), chlorogenic acid (3), and neochlorogenic acid (4), respectively. The half inhibitory concentration (IC₅₀) of compound 1 on human glioma U87 cells and human colon cancer HT29 cells was (13.31±0.77), (14.83±0.92) μmol/L, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new compound

收稿日期: 2024-03-15

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82374076); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81703744); 北京市自然科学基金青年项目 (7244493); 北京市科学技术协会 2023-2025 年度青年人才托举工程项目 (BYESS2023354); 中国中医科学院中药研究所国家自然科学基金培育专项 (ZKKT23003); 北京中医药大学实验技术 (操作规程) 标准化研究项目 (2023-syjs-01)

作者简介: 陈恒, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: chenheng12138@163.com

***通信作者:** 刘永刚, 博士, 教授, 研究方向为中药物质基础及作用机制研究。E-mail: liuyg0228@163.com

邓欣祺, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药药理研究。E-mail: xqdeng@icmm.ac.cn

named neoerigeroster B; Compound 1 exhibits certain inhibitory effects on the proliferation of tumor cells.

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.; Compositae; antitumor activity; neoerigeroster B; chlorogenic acid

灯盏细辛为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.的干燥全草, 又名灯盏花、灯盏草。灯盏细辛始载于《滇南本草》, 该植物味辛、微苦, 性温, 归心、肝经; 具有活血通络止痛, 祛风散寒等功效; 用于治疗中风偏瘫、胸痹心痛、风湿痹痛、头痛、牙痛等病症^[1]。灯盏细辛中主要含有咖啡酰酯类、黄酮类、挥发油类和香豆素类等成分^[2]。现代药理学研究表明, 灯盏细辛乙醇提取物具有较强的自由基清除能力^[3]。灯盏细辛中的单体化合物具有广泛的药理作用如灯盏乙素、黄芩素具有神经保护作用^[4-5], 灯盏乙素还可以保护心脑血管^[6]和抑制癌细胞的转移和侵袭^[7]。本研究对

灯盏细辛 80%甲醇提取物进行化学成分研究, 利用 NKA-2 大孔树脂柱色谱、中压制备色谱、高压制备色谱等方法, 从中分离得到 4 个化合物, 分别鉴定为反式-4-咖啡酰氧基-3-羟基-6-咖啡酰氧甲基-7,8-二氧杂环[3.2.1]辛烷-1-羧酸 (*trans*-4-caffeoyloxy-3-hydroxy-6-caffeoyloxymethyl-7,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-1-carboxylic acid, 1)、异绿原酸 A (isochlorogenic acid A, 2)、绿原酸 (chlorogenic acid, 3)、新绿原酸 (neochlorogenic acid, 4), 结构见图 1。其中化合物 1 为 1 个新的咖啡酰酯类化合物, 命名为新飞蓬酯乙; 细胞活性筛选显示, 化合物 1 具有较好的胶质母细胞瘤细胞和结肠癌细胞抑制活性。

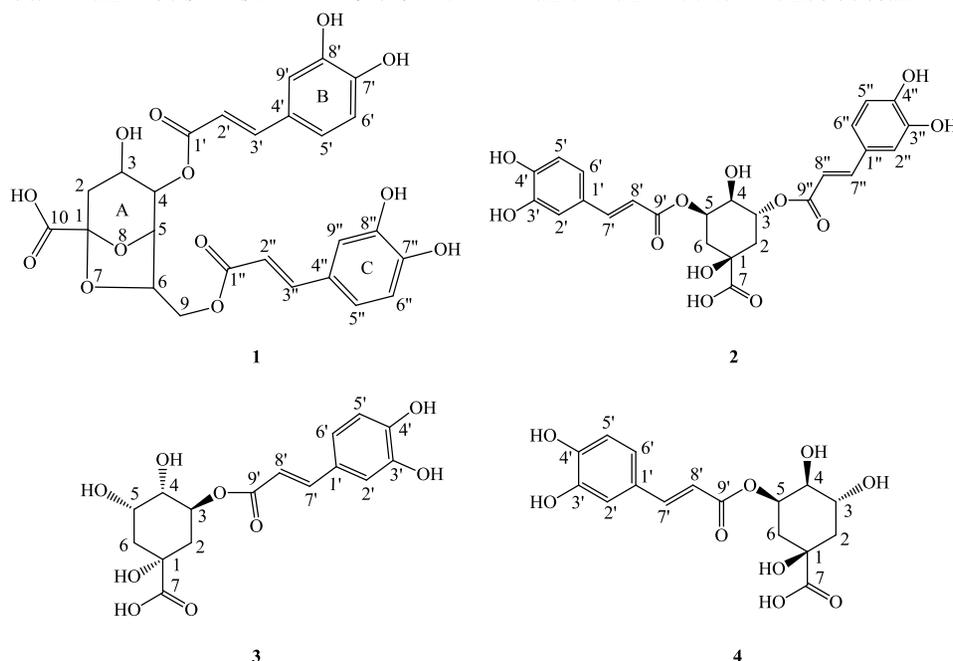


图 1 化合物 1~4 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—4

1 仪器与材料

Bruker AV-600 MHz 型核磁共振仪 (Bruker-Biospin 公司); Nicolet iS10 型傅里叶红外光谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 1901PC 型紫外可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司); Orbitrap Exploris 240 质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 中压制备色谱仪 (三泰科技常州有限公司); 高压制备色谱仪 (上海纯华生物科技有限公司); RE-52A 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); SHB-III 型循环水式多用真空泵 (北京中兴伟业有限

公司); 十万分之一电子分析天平 (赛多利斯公司); C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×21.2 mm, 5 μm, 月旭科技上海股份有限公司); FreeZone 型冷冻干燥机 (美国 LABCONCO 公司); NKA-2 型大孔树脂 (天津南开和成科技有限公司); 提取分离所用溶剂如无水乙醇、甲醇为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为超纯水; 替莫唑胺 (批号 T2577) 购自德国默克公司。

人胶质瘤 U87 细胞、人结肠癌 HT29 细胞和人

胶质瘤 A172 细胞均购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

灯盏细辛药材购买于安徽亳州（批号 J2304C1659，津皖制药有限责任公司），经北京中医药大学刘勇教授鉴定为菊科植物短葶飞蓬 *E. breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 的干燥全草。

2 提取与分离

取灯盏细辛药材 2 kg，加入 80% 甲醇 10 L，浸泡 5 d。滤液减压浓缩，浓缩液减压干燥成干浸膏 (560 g)。干浸膏水分散后，用 NKA-2 大孔树脂进行成分富集，乙醇-水 (0:100→100:0) 梯度洗脱，合并相同流分，分别得到 6 个组分 Fr. 1~6。Fr. 4 经旋转蒸发器减压浓缩和真空干燥箱干燥成干浸膏 (9.4 g)。干浸膏以适当溶剂溶解后，在 HPLC 跟踪下经中压制备色谱进行分离和纯化，在 327 nm 的检测波长下，用 10% 甲醇平衡色谱柱（装填 30 μm ODS 填料，80 g）15 min 后上样，然后用甲醇-水 (10:90→70:30) 梯度洗脱，得到 7 个组分 Fr. 4-1~4-7。Fr. 4-7 浓缩，静置后滤过除去析出物，滤液经高压制备色谱进一步纯化，以乙腈-0.3% 磷酸水 (30:70) 为流动相洗脱，得到化合物 1~4 的溶液。将上述溶液减压浓缩，浓缩液分别经中压制备色谱除磷酸，在 327 nm 的检测波长下，用 10% 甲醇平衡色谱柱（装填 30 μm ODS 填料，40 g）15 min 后上样，然后用 10% 甲醇等度洗脱 15 min，除去磷酸，再用 95% 甲醇洗脱。洗脱液经减压浓缩，冷冻干燥得到化合物 1 (20.3 mg, $t_{\text{R}}=24.05$ min)、2 (15.3 mg, $t_{\text{R}}=19.91$ min)、3 (55.4 mg, $t_{\text{R}}=3.99$ min)、4 (64.0 mg, $t_{\text{R}}=4.31$ min)。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色粉末。 $[\alpha]_{\text{D}}^{23}+37.1$ (c 0.9, MeOH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 323、303、246。HR-ESI-MS m/z 545.128 85 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论值 545.128 97)，确定该化合物的分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$ ，计算不饱和度为 15。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 423.73、1 685.70、1 630.46，提示含有羟基、酯羰基和羰基。

在 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) 谱 (表 1) 中，显示 2 组相近的苯环上 3 个芳氢的 ABX 耦合信号 [δ_{H} 6.98, 6.91 (各 1H, d, $J=2.1$ Hz, H-9', 9''), 6.87, 6.76 (各 1H, dd, $J=8.2, 2.1$ Hz, H-5', 5''), 6.68, 6.68 (各 1H, d, $J=8.2$ Hz, H-6', 6'')]; 2 个双键烯氢信号 [δ_{H} 7.56, 7.44 (各 1H, d, $J=15.9$ Hz, H-3', 3''), 6.21, 6.16 (各 1H, d, $J=15.9$ Hz, H-2', 2'')]; 2 个亚甲基氢

表 1 化合物 1 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据 (600/150 MHz, MeOD)

Table 1 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data of compound 1 (600/150 MHz, MeOD)

| 碳位 | δ_{C} | δ_{H} |
|-----|---------------------|--|
| 1 | 105.3 | |
| 2 | 41.1 | 2.38 (1H, dd, $J=15.1, 5.2$ Hz, H-2b) 2.32 (1H, d, $J=15.1$ Hz, H-2a) |
| 3 | 64.3 | 4.32 (1H, t, $J=5.2$ Hz) |
| 4 | 71.7 | 5.16 (1H, t, $J=5.2$ Hz) |
| 5 | 76.6 | 4.73 (1H, t, $J=4.2$ Hz) |
| 6 | 80.2 | 4.45 (1H, td, $J=6.6, 4.2$ Hz) |
| 7 | | |
| 8 | | |
| 9 | 64.1 | 4.99 (1H, dd, $J=14.4, 6.5$ Hz, H-9a) 4.85 (1H, dd, $J=14.4, 2.3$ Hz, H-9b) |
| 10 | 170.7 | |
| 1' | 169.1 | |
| 2' | 114.7 | 6.21 (1H, d, $J=15.9$ Hz) |
| 3' | 146.9 | 7.56 (1H, d, $J=15.9$ Hz) |
| 4' | 127.7 | |
| 5' | 123.4 | 6.87 (1H, dd, $J=8.2, 2.1$ Hz) |
| 6' | 116.6 | 6.68 (1H, d, $J=8.2$ Hz) |
| 7' | 149.9 | |
| 8' | 148.0 | |
| 9' | 115.4 | 6.98 (1H, d, $J=2.1$ Hz) |
| 1'' | 168.0 | |
| 2'' | 114.5 | 6.16 (1H, d, $J=15.9$ Hz) |
| 3'' | 146.8 | 7.44 (1H, d, $J=15.9$ Hz) |
| 4'' | 127.7 | |
| 5'' | 123.3 | 6.76 (1H, dd, $J=8.2, 2.1$ Hz) |
| 6'' | 116.5 | 6.68 (1H, d, $J=8.2$ Hz) |
| 7'' | 149.7 | |
| 8'' | 147.5 | |
| 9'' | 115.2 | 6.91 (1H, d, $J=2.1$ Hz) |

信号 [δ_{H} 4.99 (1H, dd, $J=14.4, 6.5$ Hz, H-9a), 4.85 (1H, dd, $J=14.4, 2.3$ Hz, H-9b), 2.38 (1H, dd, $J=15.1, 5.2$ Hz, H-2b), 2.32 (1H, d, $J=15.1$ Hz, H-2a)] 和 4 个次甲基氢信号 [δ_{H} 4.32 (1H, t, $J=5.2$ Hz, H-3), 5.16 (1H, t, $J=5.2$ Hz, H-4), 4.73 (1H, t, $J=4.2$ Hz, H-5), 4.45 (1H, td, $J=6.6, 4.2$ Hz, H-6)]。同样，在 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD) 谱 (表 1) 中，显示存在 2 个苯环 [δ_{C} 127.7 (C-4'), 123.4 (C-5'), 116.6 (C-6'), 149.9

(C-7'), 148.0 (C-8'), 115.4 (C-9'), 127.7 (C-4''), 123.3 (C-5''), 116.5 (C-6''), 149.7 (C-7''), 147.5 (C-8''), 115.2 (C-9''), 2个双键 [δ_c 114.7 (C-2'), 146.9 (C-3'), 114.5 (C-2''), 146.8 (C-3'')], 3个羰基碳 [δ_c 170.7 (C-10), 169.1 (C-1'), 168.0 (C-1'')], 2个亚甲基 [δ_c 64.1 (C-9), 41.1 (C-2)], 4个次甲基 [δ_c 80.2 (C-6), 76.6 (C-5), 71.7 (C-4), 64.3 (C-3)] 和1个季碳 δ_c 105.3 (C-1)。

HSQC谱中, δ_H 7.56 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3'), 7.44 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3'') 分别与 C-3' (δ_c 146.9)、C-3'' (δ_c 146.8) 直接相关; δ_H 6.98 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-9'), 6.91 (各 1H, d, J = 2.1 Hz, H-9'') 分别与 C-9' (δ_c 115.4)、C-9'' (δ_c 115.2) 直接相关; δ_H 6.87 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-5'), 6.76 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-5'') 分别与 C-5' (δ_c 123.4)、C-5'' (δ_c 123.3) 直接相关; δ_H 6.68 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-6'), 6.68 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-6'') 分别与 C-6' (δ_c 116.6)、C-6'' (δ_c 116.5) 直接相关; δ_H 6.21 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2'), 6.16 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2'') 分别与 C-2' (δ_c 114.7)、C-2'' (δ_c 114.5) 直接相关; δ_H 5.16 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-4) 与 C-4 (δ_c 71.7) 直接相关; δ_H 4.73 (1H, t, J = 4.2 Hz, H-5) 与 C-5 (δ_c 76.6) 直接相关; δ_H 4.45 (1H, td, J = 6.6, 4.2 Hz, H-6) 与 C-6 (δ_c 80.2) 直接相关; δ_H 4.32 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-3) 与 C-3 (δ_c 64.3) 直接相关; δ_H 2.32 (1H, d, J = 14.9 Hz, H-2a)、2.38 (1H, dd, J = 15.1, 5.2 Hz, H-2b) 与 C-2 (δ_c 41.1) 直接相关。

HMBC谱(图2)中显示, δ_H 7.56 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3') 与 C-5' (δ_c 123.4)、C-9' (δ_c 115.4), δ_H 7.44 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3'') 与 C-5'' (δ_c 123.3)、C-9'' (δ_c 115.2), δ_H 6.21 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2') 与 C-4' (δ_c 127.7)、C-1' (δ_c 169.1), δ_H 6.16 (1H, d, J =

15.9 Hz, H-2'') 与 C-4'' (δ_c 127.7)、C-1'' (δ_c 168.0) 相关。 1H - 1H COSY谱(图2)中显示, δ_H 6.21 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2') 与 δ_H 7.56 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3'), δ_H 6.16 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2'') 与 δ_H 7.44 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3'') 相关。以上NMR数据表明, 该化合物由2条咖啡酰基团B和C以及母核A组成, 初步推断为咖啡酰酯类化合物。

通过查阅文献, 发现其NMR数据与文献报道的化合物飞蓬酯乙^[8]相似。不同之处在于化合物中C-3 (δ_c 64.3) 和C-4 (δ_c 71.7)、 δ_H 4.32 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-3) 和 δ_H 5.16 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-4) 信号与飞蓬酯乙存在明显差异。咖啡酰基团取代会使质子因酰化移位效应向低场方向移动。 1H - 1H COSY谱中, 可以直接确定 δ_H 2.38 (1H, dd, J = 15.1, 5.2 Hz, H-2b), 2.32 (1H, d, J = 14.9 Hz, H-2a) 与 δ_H 4.32 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-3) 相关, δ_H 4.32 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-3) 与 δ_H 5.16 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-4) 相关, δ_H 4.73 (1H, t, J = 4.2 Hz, H-5) 与 δ_H 5.16 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-4) 相关, 其中 δ_H 5.16 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-4) 信号较 δ_H 4.32 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-3) 信号位于低场, 可以推断出新化合物中咖啡酰基团B取代在C-4 (δ_c 71.7) 位上。HMBC谱中 δ_H 5.16 (1H, t, J = 5.2 Hz, H-4) 与 C-3 (δ_c 64.3)、C-5 (δ_c 76.6) 相关, δ_H 4.45 (1H, td, J = 6.6, 4.2 Hz, H-6) 与 C-4 (δ_c 71.7) 相关也支持了这一点。在确定了平面结构后考虑化合物的相对构型, 在与化合物1结构极其相似的已知化合物飞蓬酯乙^[8]中, H-3和H-4 (J = 5.1 Hz) 为反式构型, 由此判断化合物1中H-3和H-4的相对构型。若H-3、H-4为顺式相对构型, 则H-3、H-4的二面角角度更大, 偶合常数在0~2 Hz。而H-3和H-4的偶合常数为5.2 Hz, 与飞蓬酯乙中H-3和H-4的偶合常数接近, 由此推断H-3、H-4为反式相对构型。根据以上分析确定了该化合物的结构为反式-4-咖啡酰氧基-3-羟基-6-咖啡酰氧甲基-7,8-二氧杂环[3.2.1]辛烷-1-羧酸。经文献检索确定该化合物为新化合物, 命名为新飞蓬酯乙。

化合物2: 淡黄色粉末。HR-ESI-MS m/z 516.12611 [$M+H$]⁺ (理论值 516.12623)。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.58 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7'), 7.54 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7''), 7.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.02 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2''), 6.97 (2H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6', 6''), 6.75 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5''), 6.31 (1H, d, J = 15.9 Hz,

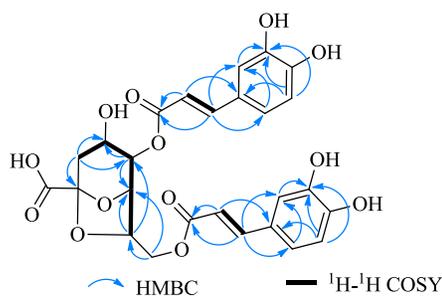


图2 化合物1的HMBC和 1H - 1H COSY相关
Fig. 2 Key HMBC and 1H - 1H COSY correlations of compound 1

H-8'), 6.23 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8"), 5.39 (1H, m, H-5), 5.35 (1H, m, H-3), 3.94 (1H, dd, $J = 7.4, 3.3$ Hz, H-4), 2.28 (1H, m, H-6a), 2.23~2.16 (2H, m, H-2), 2.13 (1H, m, H-6b); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 177.5 (C-7), 169.0 (C-9'), 168.5 (C-9"), 149.7 (C-4'), 149.6 (C-4"), 147.4 (C-3'), 147.2 (C-3"), 146.9 (C-7', 7"), 128.1 (C-1'), 127.9 (C-1"), 123.2 (C-6'), 123.1 (C-6"), 116.6 (C-5', 5"), 115.7 (C-2'), 115.4 (C-2"), 115.3 (C-8'), 115.2 (C-8"), 74.8 (C-1), 72.7 (C-3), 72.7 (C-5), 72.2 (C-4), 37.7 (C-6), 36.1 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 2 为异绿原酸 A。

化合物 3: 淡黄色粉末。HR-ESI-MS m/z 354.094 41 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论值 354.094 53)。 ^1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.52 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.01 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.92 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6'), 6.74 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.22 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.29 (1H, m, H-3), 4.13 (1H, m, H-5), 3.69 (1H, dd, $J = 8.5, 3.1$ Hz, H-4), 2.22~1.98 (4H, m, H-2, 6); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 177.1 (C-7), 168.8 (C-9'), 149.7 (C-4'), 147.2 (C-7'), 147.0 (C-3'), 127.9 (C-1'), 123.1 (C-6'), 116.6 (C-2'), 115.4 (C-8'), 115.3 (C-5'), 76.3 (C-1), 73.6 (C-3), 72.1 (C-4), 71.4 (C-5), 38.9 (C-6), 38.4 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 3 为绿原酸。

化合物 4: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z 354.094 43 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论值 354.094 53)。 ^1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.55 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.01 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.90 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 6.73 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.27 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.31 (1H, m, H-5), 4.12 (1H, m, H-3), 3.60 (dd, $J = 8.6, 3.4$ Hz, 1H, H-4), 2.19~1.92 (4H, m, H-2, 6); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 178.3 (C-7), 169.0 (C-9'), 149.4 (C-4'), 146.8 (C-7'), 146.8 (C-3'), 128.0 (C-1'), 122.9 (C-6'), 116.4 (C-5'), 115.8 (C-8'), 115.1 (C-2'), 75.4 (C-1), 74.8 (C-5), 73.0 (C-4), 68.3 (C-3), 41.5 (C-2), 36.7 (C-6)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 4 为新绿原酸。

4 化合物 1 的活性研究

4.1 对 U87 细胞的抗肿瘤活性

采用 CCK-8 法测定化合物 1 对 U87 细胞的抗肿瘤活性, 替莫唑胺为阳性药。结果 (图 3) 显示, 化合物 1 对 U87 细胞随着浓度增加, 细胞存活率大幅下降, 半数抑制浓度 (half inhibitory concentration,

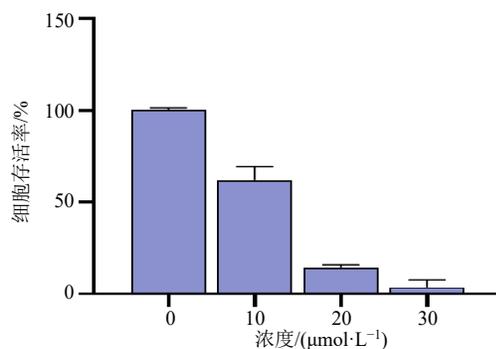


图 3 化合物 1 对 U87 细胞的细胞毒活性

Fig. 3 Cytotoxic activity of compound 1 against U87 cells

IC_{50}) 值为 (13.31 ± 0.77) $\mu\text{mol/L}$; 替莫唑胺对 U87 细胞的 IC_{50} 值为 (11.33 ± 1.05) $\mu\text{mol/L}$ 。表明化合物 1 具有较好的抗胶质母细胞瘤活性。

4.2 对 HT29 细胞的抗肿瘤活性

采用 CCK-8 法测定化合物 1 对 HT29 细胞的抗肿瘤活性, 替莫唑胺为阳性药。结果 (图 4) 显示, 化合物 1 对 HT29 细胞随着浓度增加, 细胞存活率大幅下降, IC_{50} 值为 (14.83 ± 0.92) $\mu\text{mol/L}$; 替莫唑胺对 HT29 细胞的 IC_{50} 值为 (11.97 ± 0.82) $\mu\text{mol/L}$ 。表明化合物 1 具有较好的抗结肠癌活性。

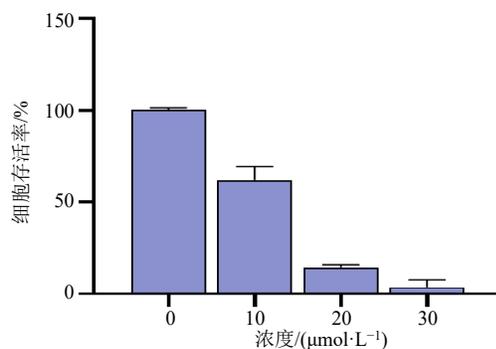


图 4 化合物 1 对 HT29 细胞的细胞毒活性

Fig. 4 Cytotoxic activity of compound 1 against HT29 cells

4.3 抗肿瘤活性机制探讨

对化合物 1 的抗肿瘤机制进行深入研究, 发现化合物 1 可以诱导 A172 细胞发生肿胀 (图 5), 随着时间的延长细胞膜破裂并观察到气泡的产生, 这可能是由膜穿孔导致的细胞死亡。化合物 1 诱导肿瘤细胞死亡的机制值得后期进一步探索研究。

5 讨论

灯盏细辛所含化学成分复杂, 药理作用广泛。主要用于治疗心脑血管疾病, 可以止胸痹心痛、头痛、风湿痹痛、牙痛等, 同时还具有神经保护、抗

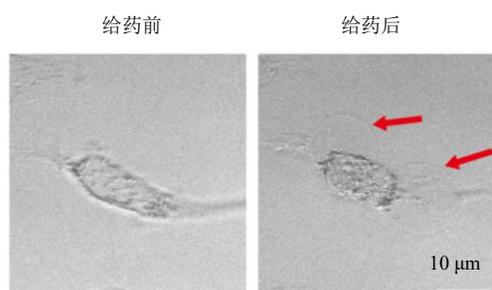


图5 化合物1诱导A172细胞肿胀死亡

Fig. 5 Compound 1 induces A172 cell swelling and death

氧化、清除自由基、抗癌、抗炎等作用。本课题组对灯盏细辛的化学成分进行研究，分离鉴定了4个化合物，其中化合物1为新化合物。该化合物具有独特的结构骨架，由2条咖啡酰基团和母核组成。2条咖啡酰基团可以通过¹H-NMR和¹³C-NMR谱中显示的2组特征峰信号鉴别，母核的结构可以通过以1个连有含氧官能团的质子基团为研究起点，结合¹H-¹H COSY谱、HMBC谱、HSQC谱提供的H-H、H-C相互关联的信息进行结构推导。化合物1中关键的2条咖啡酰基团结合位点的确定，是通过¹H-¹H COSY谱提供的质子相互关联信息初步推断以及HMBC谱提供的H-C远程相关信息进一步佐证实现的。这表明2D NMR在复杂化合物的结构鉴定中起着至关重要的作用。

对化合物1的抗肿瘤活性进行了测试，结果表明化合物1在低浓度（低于15 μmol/L）下对U87细胞和HT29细胞活性具有明显的抑制作用。进一步研究发现其抗肿瘤活性与肿瘤细胞的裂解性死亡有关，化合物1可以诱导肿瘤细胞肿胀至膜破裂死亡，具体的分子机制值得进一步深入研究。

本研究确定了新化合物新飞蓬酯乙的结构，为进一步阐明灯盏细辛的药效物质基础提供了帮助。生

物活性测试表明该新化合物具有较好的抗胶质母细胞瘤和结肠癌活性，丰富了灯盏细辛在抗肿瘤方面的药理作用，临床转化前景广阔。

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: 154.
- [2] 郭欣, 林珊, 吴丽明, 等. 灯盏细辛化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2019, 41(2): 393-402.
- [3] 党翠芝, 黄小燕, 杨庆雄, 等. 灯盏细辛的抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 100-103.
- [4] Jiang L, Hu Y, He X, *et al.* Breviscapine reduces neuronal injury caused by traumatic brain injury insult: Partly associated with suppression of interleukin-6 expression [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(1): 90-95.
- [5] Tang H, Dong Z X, Gu T, *et al.* Studies on the protective effects of scutellarein against neuronal injury by ischemia through the analysis of endogenous amino acids and Ca²⁺Concentration together with Ca²⁺-ATPase activity [J]. *J Chem*, 2015, 2015: 497842.
- [6] Li X L, Li Y Q, Yan W M, *et al.* A study of the cardioprotective effect of breviscapine during hypoxia of cardiomyocytes [J]. *Planta Med*, 2004, 70(11): 1039-1044.
- [7] Ke Y, Bao T H, Wu X S, *et al.* Scutellarin suppresses migration and invasion of human hepatocellular carcinoma by inhibiting the STAT3/Girdin/Akt activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 509-515.
- [8] 中国科学院昆明植物研究所. 飞蓬酯乙及其制备方法和在制药中的应用: CN03117753.0 [P]. 2003-12-24.
- [9] 冉小库, 窦德强. 牛蒡子化学成分研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(7): 71-72.
- [10] 王凯, 刘双, 李蒙, 等. 忍冬叶化学成分及其保肝活性研究 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2285-2291.
- [11] 赫军, 马秉智, 王晓雪, 等. 藤梨根的化学成分研究 (II) [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(22): 1960-1963.

[责任编辑 王文倩]