

## • 化学成分 •

## 尖萼紫珠枝叶中 1 个新的异海松烷型二萜

吴晓露<sup>1,2</sup>, 刘 婷<sup>2</sup>, 邹芷琪<sup>2</sup>, 丁 涛<sup>2</sup>, 宁德生<sup>2</sup>, 潘争红<sup>1,2\*</sup>

1. 广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林 541006

2. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室, 广西 桂林 541006

**摘要:** 目的 研究尖萼紫珠 *Callicarpa loboapiculata* 枝叶的二萜类化学成分及其体外抗炎活性。方法 以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型, 筛选不同极性溶剂萃取物的体外抗炎活性, 采用多种色谱分离方法对二氯甲烷活性部位展开化学成分分离, 运用核磁共振谱、高分辨质谱及电子圆二色散谱等技术鉴定化合物的结构, 并测试其体外抗炎活性。结果 从尖萼紫珠枝叶的乙醇提取物的二氯甲烷萃取物中共分离得到 8 个二萜类化合物, 分别鉴定为 (4*R*,7*S*,9*R*,13*R*)-7 $\beta$ -羟基-5(10)-8(14)-15-异海松三烯-18-酸 (1)、异海松酸 (2)、14 $\alpha$ -羟基异海松酸 (3)、7-羟基异海松酸 (4)、大叶紫珠烯 B (5)、7 $\beta$ -羟基异海松-8(14)-15-二烯-18-酸 (6)、(+)-7-氧代-13-表-海松-14,15-二烯-18-酸 (7) 和 3 $\beta$ -羟基-半日花-8(17),13*E*-二烯-15-酸 (8)。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为尖萼紫珠酸 A; 化合物 1~8 为首次从尖萼紫珠中分离得到, 包括 7 个异海松烷型二萜和 1 个半日花烷型二萜。8 个二萜类化合物能够不同程度地抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞株一氧化氮 (NO) 的产生。

**关键词:** 尖萼紫珠; 二萜类化合物; 异海松烷; 抗炎; 尖萼紫珠酸 A

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2024)18 - 6107 - 08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.001

## A new isopimarane-type diterpenoid from branches and leaves of *Callicarpa loboapiculata*

WU Xiaolu<sup>1,2</sup>, LIU Ting<sup>2</sup>, ZOU Zhiqi<sup>2</sup>, DING Tao<sup>2</sup>, NING Desheng<sup>2</sup>, PAN Zhenghong<sup>1,2</sup>

1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, China

2. Guangxi Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization, Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

**Abstract: Objective** To study the diterpenoids constituents from branches and leaves of *Callicarpa loboapiculata* and their anti-inflammatory activity *in vitro*. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) induced mouse macrophage RAW264.7 was used to screen the *in vitro* anti-inflammatory activity of different polar solvent extracts from *C. loboapiculata*. Multiple chromatographic separation methods were used to separate and purify dichloromethane soluble fraction. Compounds structures were elucidated by nuclear magnetic resonance (NMR), high resolution electro spray ionization mass spectroscopy (HR-ESI-MS) and electronic circular dichroism (ECD) spectral analysis. The *in vitro* anti-inflammatory activities of all compounds were also evaluated. **Results** A total of eight diterpenoids were isolated from the dichloromethane soluble fraction of *C. loboapiculata* and were identified as (4*R*,7*S*,9*R*,13*R*)-7 $\beta$ -hydroxy-5(10)-8(14)-15-isopimaratrien-18-oic acid (1), isopimaric acid (2), 14 $\alpha$ -hydroxyisopimaric acid (3), 7-hydroxyisopimaric acid (4), macrophypene B (5), 7 $\beta$ -hydroxyisopimara-8(14)-15-dien-18-oic acid (6), (+)-7-oxo-13-*epi*-pimara-14,15-dien-18-oic acid (7), 3 $\beta$ -hydroxy-labda-8(17),13*E*-dien-15-oic acid (8). **Conclusion** Compound 1 was a new compound named loboapiculatoid A, and compounds 1—8 were isolated from *C. loboapiculata* for the first time, including seven isopimarane-type diterpenoids and one

收稿日期: 2024-07-05

基金项目: 广西科技重大专项 (桂科 AA22096020-3); 广西植物研究所基本科研业务费资助项目 (桂植业 24003); 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室 (ZRJJ2023-5)

作者简介: 吴晓露 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。

\*通信作者: 潘争红 (1979—), 男, 博士, 广西植物研究所研究员, 研究方向为天然药物化学。E-mail: pan7260@126.com

labdane-type diterpenoid. Eight diterpenoids inhibited the production of nitric oxide (NO) in LPS-induced RAW264.7 to varying degrees.

**Key words:** *Callicarpa loboapiculata* F. P. Metcalf; diterpenoids; isopimarane; anti-inflammatory activity; loboapiculatoid A

紫珠属 *Callicarpa* L. 植物属于唇形科 (Lamiaceae), 全世界约有 140 种, 中国有 48 种, 主产长江以南, 少数种可延伸到华北至东北和西北的边缘<sup>[1]</sup>。该属植物药用历史悠久, 有 30 多种可以作为药用, 其中裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.、广东紫珠 *C. kwangtungensis* Chun、大叶紫珠 *C. macrophylla* Vahl 和杜虹花 *C. formosana* Rolfe 被《中国药典》2020 版收载<sup>[2]</sup>。该属植物性凉、味苦涩, 具有活血散瘀、消肿止痛的功效, 可用于治疗跌扑肿痛、肺热咳嗽、热毒疮疡和烫伤等。研究发现, 萜类、苯乙醇苷类和黄酮类等化学成分在紫珠属植物中含量丰富, 现代药理研究表明, 紫珠属植物粗提物及从中分离的单体具有抗炎、免疫调节、止血、神经保护、镇痛等活性<sup>[3-6]</sup>。萜类化合物是该属植物中一类重要的活性成分, 主要含倍半萜、二萜和三萜, 二萜是从中分离得到数量最多的一类成分<sup>[7]</sup>, 研究表明其具有良好的抗肿瘤<sup>[8]</sup>、抗炎<sup>[9-14]</sup>、抗氧化<sup>[15]</sup>、抗菌<sup>[16]</sup>、免疫调节<sup>[17-19]</sup>等生物活性。

尖萼紫珠 *C. loboapiculata* F. P. Metcalf 主要分布在湖南、广东、广西和贵州等地, 药用部位为叶, 具有祛风止痒、杀虫的功效。《中华药海》中记载其

能够治疗由各种癣疾引起的皮肤瘙痒、脱屑、溃烂等皮肤顽疾, 目前还没有关于该植物化学成分和现代药理研究的报道。本研究对尖萼紫珠乙醇提取物的不同极性溶剂萃取物进行体外抗炎活性评价, 运用多种色谱分离方法对二氯甲烷活性部位展开化学分离, 从中分离得到 8 个二萜类化合物, 分别鉴定为尖萼紫珠酸 A (loboapiculatoid A, **1**)、异海松酸 (isopimaric acid, **2**)、14 $\alpha$ -羟基异海松酸 (14 $\alpha$ -hydroxyisopimaric acid, **3**)、7-羟基异海松酸 (7-hydroxyisopimaric acid, **4**)、大叶紫珠烯 B (macrophyene B, **5**)、7 $\beta$ -羟基异海松-8(14)-15-二烯-18-酸 (7 $\beta$ -hydroxyisopimara-8(14)-15-dien-18-oic acid, **6**)、(+)-7-氧代-13-表-海松-14,15-二烯-18-酸 [(+)-7-oxo-13-*epi*-pimara-14,15-dien-18-oic acid, **7**]、3 $\beta$ -羟基-半日花-8(17),13E-二烯-15-酸 [3 $\beta$ -hydroxy-labda-8(17),13E-dien-15-oic acid, **8**]。化合物 **1**~**8** 的结构见图 1。其中, 化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **1**~**8** 为首次从尖萼紫珠中分离得到, 包括 7 个异海松烷型二萜和 1 个半日花烷型二萜。体外抗炎活性实验表明, 8 个二萜类化合物能够不同程度地对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞株产生一氧化氮 (NO) 呈现抑制活性。

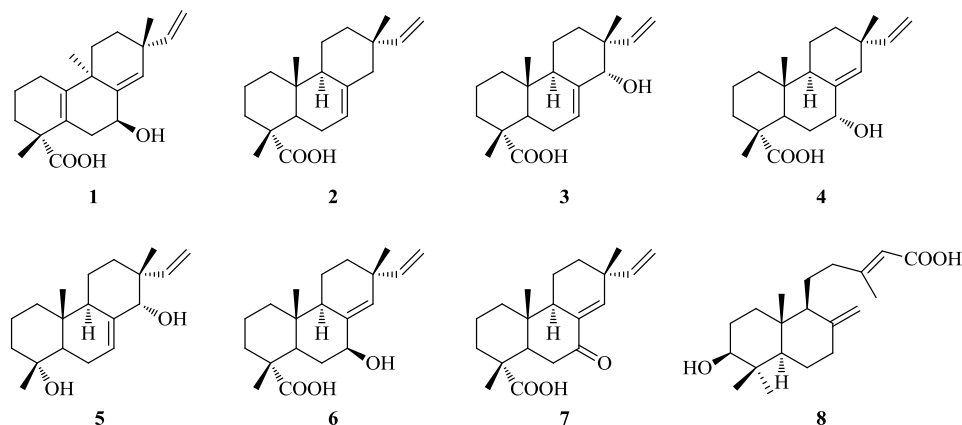


图 1 化合物 1~8 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—8

## 1 仪器与材料

AVANCE IIIHD-500 MHz 超导核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司), LC-20AT 液相色谱仪, LC-2030C3D 型液相色谱仪和超高分辨液相质谱联用仪 (日本岛

津公司), XS205 型精密分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), Spark 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), 高速冷冻离心机 (珠海海马公司), J-1500 型圆二色光谱仪和 P-2000 型旋光仪 (日本分光株式会

社), 薄层色谱硅胶 GF<sub>254</sub> 和柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工厂), MCI GEL9 (日本三菱化学), Shim-pack GIST C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 日本岛津公司), YMC-Triart C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×10 mm, 5 μm, 日本 YMC 公司); 甲醇和乙腈为色谱纯 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 其余试剂均为分析纯 (西陇化工股份有限公司)。

RAW264.7 细胞株 (中国科学院干细胞库); 细胞增殖检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8; 苏州优逸兰迪生物科技有限公司, 批号 C6005S); NO 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 S0021S-1); DMEM 培养基、胎牛血清和青霉素-链霉素溶液 (美国 Gibco 公司); DMSO (Biosharp 公司); 6 和 96 孔酶标板 (苏州科士达电子材料有限公司); *E. coli* 055: B5 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS; 大连美仑生物技术有限公司, 批号 MB5198-1); 小白菊内酯 (parthenolide, PTL; 上海联迈生物工程技术有限公司, 批号 LM11036); ELISA 试剂盒 (enzyme-linked immunosorbent assay; 武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 KE10007)。

尖萼紫珠枝叶于 2022 年 10 月在广西桂林采摘, 经广西植物研究所黄俞淞研究员鉴定为尖萼紫珠 *C. loboapiculata* F. P. Metcalf 的枝叶, 样品标本 (202201015) 保存于广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室。

## 2 方法

### 2.1 提取与分离

尖萼紫珠干燥枝叶 9 kg, 粉碎后用 95%乙醇以液固比 8:1 回流提取 3 次, 每次 2 h。滤过, 合并提取液, 减压浓缩, 所得浸膏 (825 g) 用适量蒸馏水分散后, 依次用石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次, 减压浓缩回收溶剂, 获得 5 个不同极性溶剂萃取物: 石油醚部位 (150 g)、二氯甲烷部位 (196 g)、醋酸乙酯部位 (125 g)、正丁醇部位 (115 g) 及水部位 (200 g)。

取二氯甲烷部位 160 g, 经 MCI 柱色谱进行分离, 以甲醇-水 (50:50~100:0) 进行梯度洗脱, 得到 5 个流分 (Fr. 1~5)。Fr. 2 先经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (20:1~1:1) 进行洗脱, 得到 7 个流分 (Fr. 2.1~2.7)。再取 Fr. 2.2 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (10:1~1:1) 进行洗脱, 得到 5 个流分 (Fr. 2.2.1~2.2.5)。最后取 Fr. 2.2.2 经重结晶得到化合物 3 (20.3 mg)。Fr. 2.2.3 先经硅胶柱色谱,

以石油醚-醋酸乙酯-丙酮 (10:0.5:0.5~1:0.5:0.5) 进行洗脱, 得到 5 个流分 (Fr. 2.2.3.1~2.2.3.5)。再取 Fr. 2.2.3.3 经半制备高效液相色谱纯化 ( $t_R=82$  min, 甲醇-0.1%甲酸水 75:25, 2.5 mL/min), 得化合物 5 (12.8 mg)。Fr. 2.2.4 先经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (10:1~1:1) 进行洗脱, 得到 5 个流分 (Fr. 2.2.4.1~2.2.4.5)。再取 Fr. 2.2.4.4 经半制备高效液相色谱纯化 ( $t_R=10$  min, 乙腈-0.1%甲酸水 60:40, 3 mL/min), 得化合物 4 (9.5 mg)。Fr. 2.3 先经硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯-丙酮 (10:0.5:0.5~1:0.5:0.5) 进行洗脱, 得到 6 个流分 (Fr. 2.3.1~2.3.6)。再取 Fr. 2.3.1 经半制备高效液相色谱纯化 ( $t_R=52.5$  min, 甲醇-0.1%甲酸水 75:25, 2.5 mL/min), 得化合物 7 (13.2 mg)。Fr. 2.3.2 经半制备高效液相色谱纯化 ( $t_R=74$  min, 甲醇-0.1%甲酸水 73:27, 2.5 mL/min), 得化合物 1 (8.6 mg)。Fr. 2.3.3 经半制备高效液相色谱纯化 ( $t_R=36$  min, 甲醇-0.1%甲酸水 78:22, 2.5 mL/min), 得化合物 6 (15.3 mg) 和 ( $t_R=53.5$  min, 甲醇-0.1%甲酸水 76:24, 2.5 mL/min), 得化合物 8 (6.3 mg)。Fr. 3 先经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (20:1~1:1) 进行洗脱, 得到 5 个流分 (Fr. 3.1~3.5)。再取 Fr. 3.2 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (20:1~1:1) 进行洗脱, 得到 5 个流分 (Fr. 3.2.1~3.2.5)。最后将 Fr. 3.2 经重结晶得到化合物 2 (18.8 mg)。

### 2.2 电子捕获检测器 (electron capture detector, ECD) 计算方法

采用 Gaussian 09 软件进行 ECD 计算。先用 Spartan 14 软件中的 MMFF 力场对化合物进行构象搜索, 选取玻尔兹曼分布大于 0.05 的构象用于后续的计算。然后, 在 Gaussian 09 中对选中的构象用 B3LYP/6-31G(d) 基组和 DFT 方法进行优化, 紧接着, 对优化好的构象用 B3LYP/6-31G(d, p) 基组和 TD-SCF 方法以甲醇为溶剂进行计算。最后在 SpecDis 1.6 软件中, 根据玻尔兹曼分布理论拟合构象的 ECD 谱图, 进而得到化合物的计算 ECD 谱图。

### 2.3 抗炎活性研究

**2.3.1 药物配制方法** 受试组分将不同萃取物用 DMSO 配制成 25 mg/mL 的母液, 受试单体化合物用 DMSO 配制成 10 mmol/L 的母液, 给药时使空白组、模型组和各给药组 DMSO 终浓度相等, 以消除 DMSO 的影响。

**2.3.2 细胞培养及活力测定** RAW264.7 细胞在 DMEM 培养基（添加 10% 的胎牛血清和 1% 的青霉素-链霉素溶液）中培养。将细胞置于细胞培养箱（37 °C、5% CO<sub>2</sub>）中培养 24 h 后，取对数生长期细胞，以  $1.5 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板，空白组不含细胞。约 24 h 后吸弃培养基，给药组加入含受试组分或化合物的培养基，阴性对照和空白组加入含 DMSO（DMSO 终浓度与给药组相同）的培养基。继续培养 24 h 后，加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液，孵育 1.5 h，于 450 nm 波长下检测培养基吸光度（A）值。按公式计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白}})$$

**2.3.3 抗炎活性评价** 取对数生长期细胞，以  $1.5 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板，培养 24 h 后吸弃培养基，给药组加入含受试组分、化合物或阳性药（小白菊内酯）的培养基，对照组和模型组加入含 DMSO（DMSO 终浓度与给药组相同）的培养基。预处理 2 h，除对照组外各组再加入 LPS (0.1  $\mu$ g/mL) 诱导 24 h。取 50  $\mu$ L 细胞上清液，先加入 50  $\mu$ L Griess 试剂 I，再加入 50  $\mu$ L Griess 试剂 II，采用酶标仪于 540 nm 处测定 A 值。根据公式计算 NO 抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (C_{\text{给药}} - C_{\text{对照}}) / (C_{\text{模型}} - C_{\text{对照}})$$

$C_{\text{给药}}$ 、 $C_{\text{对照}}$  和  $C_{\text{模型}}$  分别对应给药组、对照组和模型组细胞上清中的 NO 浓度

**2.3.4 炎症因子测定** 取对数生长期细胞，以  $3.0 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板，培养 24 h 后吸弃培养基，加入含受试组的培养基预处理 2 h，再加入 LPS (0.1  $\mu$ g/mL) 诱导 24 h。收集细胞上清液，按照 ELISA 试剂盒指示，测定上清液中白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）和肿瘤坏死因子- $\alpha$ （tumor necrosis factor  $\alpha$ ，TNF- $\alpha$ ）的含量。

## 2.4 统计学分析

实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示。用 GraphPad Prism 9 软件进行多组间的单因素方差分析（ANOVA）。 $P < 0.05$  认为具有显著性差异。

## 3 结果

### 3.1 结构鉴定

化合物 **1**：白色针晶（甲醇），HR-ESI-MS 给出准分子离子峰  $m/z$ : 339.194 1 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>，计算值为 339.193 6，推测分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>，不饱和度为 7。[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -4.7 ( $c$  0.30, MeOH)；<sup>1</sup>H-NMR 谱（表 1）中提示有 3 个甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  1.11 (3H, s), 1.32 (3H, s), 1.21 (3H, s)；低场区显示有 4 个烯氢信号  $\delta_{\text{H}}$  5.37 (1H, t,

$J = 1.8$  Hz), 5.71 (1H, dd,  $J = 17.3, 10.5$  Hz), 4.93 (1H, dd,  $J = 10.5, 1.8$  Hz), 4.86 (1H, dd,  $J = 17.3, 1.8$  Hz)；<sup>13</sup>C-NMR 和 DEPT 谱给出 20 个碳信号（表 1），包含 3 个甲基信号： $\delta_{\text{C}}$  29.7, 23.3, 26.3；7 个亚甲基信号： $\delta_{\text{C}}$  25.4, 20.1, 35.9, 39.2, 32.3, 33.0, 113.3；3 个次甲基信号： $\delta_{\text{C}}$  67.7, 121.7, 147.8；7 个季碳信号： $\delta_{\text{C}}$  48.0, 127.8, 146.5, 41.0, 138.4, 38.7, 181.2。通过 HSQC 谱确定 H 和 C 的直接相连。HMBC 谱中，H<sub>3</sub>-19 与  $\delta_{\text{C}}$  181.2 有远程相关，说明 C-18 为羧基；H-15、H<sub>3</sub>-17 与  $\delta_{\text{C}}$  121.7 有远程相关，说明 C-8 和 C-14 通过双键相连；H<sub>3</sub>-19 与  $\delta_{\text{C}}$  127.8 有远程相关，H<sub>3</sub>-20 与  $\delta_{\text{C}}$  138.4、146.5 有远程相关，说明 C-5 和 C-10 通过双键连接，且 20 位甲基连接在 9 位；H-14 与  $\delta_{\text{C}}$  67.7 有远程相关，说明羟基连接在 C-7 上。综上，确定了化合物 **1** 的平面结构。

目前从该植物中分离所得化合物绝大部分为异海松烷型二萜，且 18 位甲基氧化为羧基。如化合

表 1 化合物 **1** 的 <sup>1</sup>H-和 <sup>13</sup>C-NMR 谱数据 (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Table 1 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR data of compound **1** (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

碳位	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	2.08 (1H, m), 2.00 (1H, m)	25.4 (CH <sub>2</sub> )
2	1.77 (1H, dt, $J = 10.5, 5.9, 2.8$ Hz), 1.58 (1H, m)	20.1 (CH <sub>2</sub> )
3	1.97 (1H, m), 1.63 (1H, m)	35.9 (CH <sub>2</sub> )
4		48.0 (C)
5		127.8 (C)
6	2.42 (1H, ddd, $J = 14.2, 5.9, 1.8$ Hz) 1.96 (1H, m)	39.2 (CH <sub>2</sub> )
7	4.30 (1H, ddd, $J = 10.5, 5.9, 1.8$ Hz)	67.7 (CH)
8		146.5 (C)
9		41.0 (C)
10		138.4 (C)
11	1.59 (2H, m)	32.3 (CH <sub>2</sub> )
12	1.53 (2H, m)	33.0 (CH <sub>2</sub> )
13		38.7 (C)
14	5.37 (1H, t, $J = 1.8$ Hz)	121.7 (CH)
15	5.71 (1H, dd, $J = 17.3, 10.5$ Hz)	147.8 (CH)
16	4.93 (2H, dd, $J = 10.5, 1.8$ Hz) 4.86 (1H, dd, $J = 17.3, 1.8$ Hz)	113.3 (CH <sub>2</sub> )
17	1.11 (3H, s)	29.7 (CH <sub>3</sub> )
18		181.2 (C)
19	1.32 (3H, s)	23.3 (CH <sub>3</sub> )
20	1.21 (3H, s)	26.3 (CH <sub>3</sub> )

物 2~4、6 和 7 所示, 当 18 位为羧基时, 19 位甲基的碳化学位移在  $\delta$  16.3~17.4, 而化合物 1 的 C-5 和 C-10 通过双键相连, 19 位甲基化学位移向低场偏移, 为 23.3, 这与文献总结的规律一致<sup>[20]</sup>。此外, 由于 C-5 和 C-10 间双键的影响, 17 位甲基的化学位移也会向低场偏移  $\delta$  3.0~4.0<sup>[21]</sup>, 化合物 1、4、6、7 均为  $\Delta^{8(14),15}$  型异海松烷二萜, 化合物 4、6、7 的 17 位甲基化学位移约为 26.0, 而化合物 1 的 C-17 为  $\delta_c$  29.7, 与文献总结的规律一致, 综上, 确定

化合物 1 为异海松烷二萜。NOESY 谱中, H-7 和 H<sub>3</sub>-20 有 NOE 相关性, 结合 H-7 的 <sup>1</sup>H-NMR 数据 4.30 (1H, ddd,  $J=10.5, 5.9, 1.8$  Hz), 确定化合物 1 的相对构型如图 2 所示。通过比较计算和实测 ECD (图 3), 确定化合物 1 的绝对构型为 4*R*,7*S*,9*R*,13*R*。最终, 确定化合物 1 的结构为 (4*R*,7*S*,9*R*,13*R*)-7 $\beta$ -羟基-5(10)-8(14)-15-异海松三烯-18-酸。经 Sci-finder 检索, 为 1 个新化合物, 命名为尖萼紫珠酸 A (lomboapiculatoid A)。

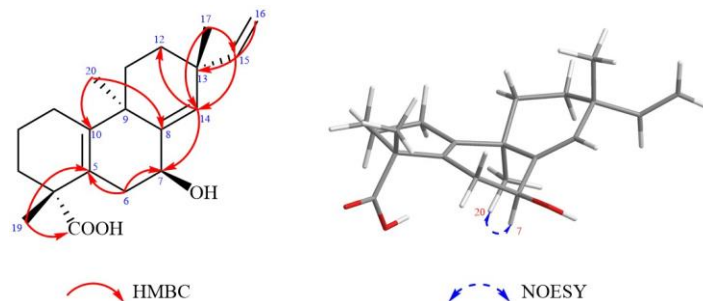


图 2 化合物 1 的关键 HMBC 和 NOESY 相关信号

Fig. 2 Key HMBC and NOESY correlations of compound 1

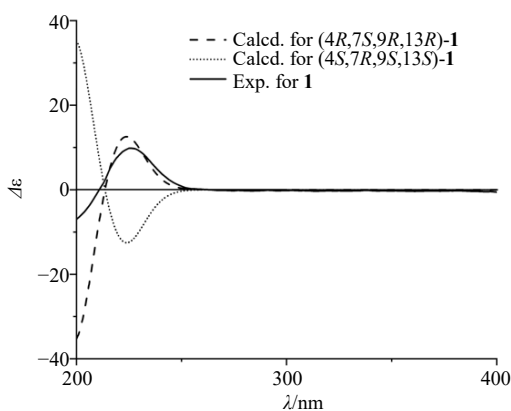


图 3 化合物 1 的 ECD 谱

Fig. 3 ECD spectra of compound 1

化合物 2: 白色结晶(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.80 (1H, dd,  $J=17.5, 10.7$  Hz, H-15), 5.32 (1H, dd,  $J=6.1, 2.0$  Hz, H-7), 4.93 (1H, dd,  $J=17.5, 1.4$  Hz, H-16a), 4.87 (1H, dd,  $J=10.7, 1.4$  Hz, H-16b), 1.27 (3H, s, H-17), 0.91 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 39.0 (C-1), 18.1 (C-2), 37.0 (C-3), 46.3 (C-4), 45.2 (C-5), 25.4 (C-6), 121.1 (C-7), 135.8 (C-8), 52.2 (C-9), 35.2 (C-10), 20.2 (C-11), 36.3 (C-12), 37.2 (C-13), 46.4 (C-14), 150.5 (C-15), 109.4 (C-16), 21.7 (C-17), 184.3 (C-18), 17.3 (C-19), 15.4 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[22]</sup>,

故鉴定化合物 2 为异海松酸。

化合物 3: 白色结晶(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.89 (1H, dd,  $J=17.6, 10.9$  Hz, H-15), 5.69 (1H, dd,  $J=5.0, 2.2$  Hz, H-7), 5.15 (1H, dd,  $J=10.9, 1.3$  Hz, H-16), 5.11 (1H, dd,  $J=17.6, 1.3$  Hz, H-16), 3.67 (1H, d,  $J=1.3$  Hz, H-14 $\beta$ ), 1.27 (3H, s, H-20), 0.89 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, s, H-17); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 38.9 (C-1), 18.1 (C-2), 37.0 (C-3), 46.3 (C-4), 44.7 (C-5), 25.3 (C-6), 127.2 (C-7), 137.4 (C-8), 47.1 (C-9), 34.9 (C-10), 19.4 (C-11), 27.6 (C-12), 41.1 (C-13), 79.6 (C-14), 146.6 (C-15), 113.8 (C-16), 22.2 (C-17), 182.5 (C-18), 17.4 (C-19), 15.3 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[23]</sup>, 故鉴定化合物 3 为 14 $\alpha$ -羟基异海松酸。

化合物 4: 白色无定型粉末(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.78 (1H, dd,  $J=17.4, 10.6$  Hz, H-15), 5.53 (1H, t,  $J=1.3$  Hz, H-14), 4.95 (1H, dd,  $J=17.4, 1.3$  Hz, H-16), 4.92 (1H, dd,  $J=10.6, 1.3$  Hz, H-16), 4.23 (1H, t,  $J=2.9$  Hz, H-7), 1.21 (s, 3H, H<sub>3</sub>-19), 1.05 (3H, s, H-17), 0.82 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 38.2 (C-1), 18.3 (C-2), 37.0 (C-3), 46.8 (C-4), 42.0 (C-5), 31.6 (C-6), 73.3 (C-7), 138.9 (C-8), 46.3 (C-9), 38.3 (C-10), 18.3 (C-11), 34.3 (C-12), 37.6 (C-13), 134.8 (C-14), 148.1 (C-15), 111.0 (C-16), 25.9

(C-17), 182.0 (C-18), 17.0 (C-19), 14.6 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[24]</sup>, 故鉴定化合物 4 为 7-羟基异海松酸。

化合物 5: 白色无定型粉末 (甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.89 (1H, dd, *J* = 17.7, 10.9 Hz, H-15), 5.75 (1H, dt, *J* = 6.5, 2.2 Hz, H-7), 5.15 (1H, dd, *J* = 10.9, 1.3 Hz, H-16), 5.10 (1H, dd, *J* = 17.7, 1.3 Hz, H-16), 3.63 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-14), 2.24 (1H, m, H-6), 2.15 (1H, m, H-9), 1.96 (m, H, H-12), 1.93 (1H, m, H-6), 1.83 (1H, m, H-3), 1.81 (1H, m, H-1), 1.46 (1H, dd, *J* = 12.1, 4.2 Hz, H-5), 1.41 (1H, m, H-2), 1.34 (1H, m, H-12), 1.33 (1H, m, H-3), 1.22 (3H, s, H-18), 1.11 (1H, td, *J* = 13.0, 3.6 Hz, H-1), 0.89 (3H, s, H-17), 0.82 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 39.2 (C-1), 19.9 (C-2), 43.5 (C-3), 72.5 (C-4), 52.4 (C-5), 22.7 (C-6), 127.2 (C-7), 137.7 (C-8), 47.1 (C-9), 36.2 (C-10), 20.5 (C-11), 27.7 (C-12), 41.2 (C-13), 79.8 (C-14), 146.7 (C-15), 113.7 (C-16), 22.2 (C-17), 23.5 (C-18), 14.6 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[25]</sup>, 故鉴定化合物 5 为大叶紫珠烯 B。

化合物 6: 白色无定型粉末 (甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.80 (1H, dd, *J* = 17.4, 10.6 Hz, H-15), 5.64 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, H-14), 4.95 (1H, m, H-16), 4.90 (1H, m, H-16), 4.08 (1H, m, H-7), 1.22 (3H, s, H-19), 1.07 (3H, s, H-17), 0.85 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 37.2 (C-1), 18.3 (C-2), 36.9 (C-3), 47.1 (C-4), 46.2 (C-5), 34.2 (C-6), 72.1 (C-7), 138.6 (C-8), 48.8 (C-9), 38.1 (C-10), 18.3 (C-11), 34.9 (C-12), 36.9 (C-13), 126.2 (C-14), 148.5 (C-15), 110.8 (C-16), 26.4 (C-17), 183.6 (C-18), 17.0 (C-19), 15.6 (C-

20)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[26]</sup>, 故鉴定化合物 6 为 7β-羟基异海松-8(14)-15-二烯-18-酸。

化合物 7: 无色透明固体 (甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.74 (1H, t, *J* = 1.8 Hz, H-14), 5.79 (1H, dd, *J* = 17.5, 10.6 Hz, H-15), 5.00 (1H, dd, *J* = 17.5, 0.9 Hz, H-16), 4.97 (1H, dd, *J* = 10.6, 0.9 Hz, H-16), 1.24 (3H, s, H-19), 1.10 (3H, s, H-17), 0.87 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 38.9 (C-1), 18.0 (C-2), 37.0 (C-3), 46.2 (C-4), 44.5 (C-5), 38.0 (C-6), 200.0 (C-7), 135.2 (C-8), 51.1 (C-9), 35.7 (C-10), 19.0 (C-11), 34.1 (C-12), 38.7 (C-13), 145.2 (C-14), 146.4 (C-15), 112.1 (C-16), 25.9 (C-17), 183.0 (C-18), 16.3 (C-19), 14.3 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[27]</sup>, 故鉴定化合物 7 为 (+)-7-氧代-13-表-海松-14,15-二烯-18-酸。

化合物 8: 白色羽毛状结晶 (甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.67 (1H, q, *J* = 1.3 Hz, H-14), 4.87 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-17), 4.51 (1H, s, H-17), 3.26 (1H, dd, *J* = 11.8, 4.4 Hz, H-3), 2.16 (3H, d, *J* = 1.3 Hz, H-16), 0.99 (3H, s, H-18), 0.77 (3H, s, H-19), 0.69 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 37.2 (C-1), 28.0 (C-2), 79.0 (C-3), 39.3 (C-4), 54.7 (C-5), 24.1 (C-6), 38.3 (C-7), 147.8 (C-8), 56.0 (C-9), 39.3 (C-10), 21.8 (C-11), 40.0 (C-12), 163.6 (C-13), 171.3 (C-15), 19.3 (C-16), 107.0 (C-17), 28.4 (C-18), 15.6 (C-19), 14.6 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[28]</sup>, 故鉴定化合物 8 为 3β-羟基-半日花-8(17),13E-二烯-15-酸。

### 3.2 抗炎活性评价

**3.2.1 萃取物对 RAW264.7 细胞的活力影响及抗炎活性评价** 采用 CCK-8 法测试 5 个不同极性溶剂萃取物对 RAW264.7 细胞活力的影响。如图 4 所示,

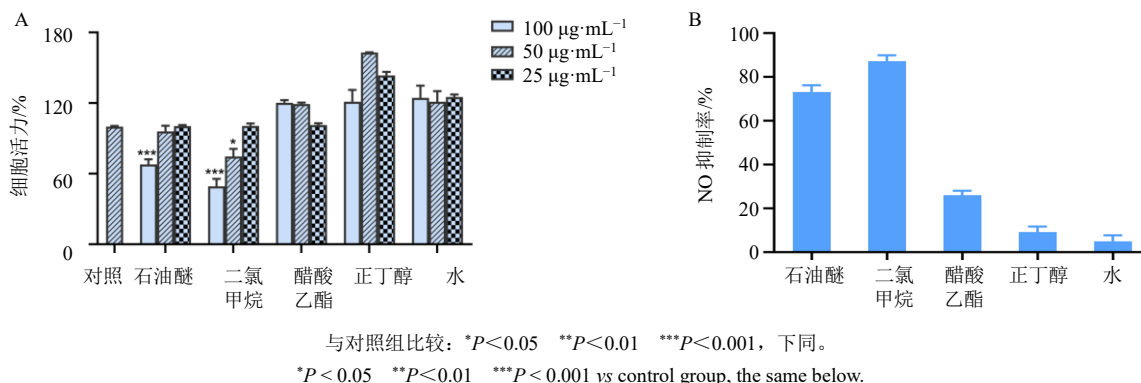


图 4 尖萼紫珠各萃取部位对 RAW264.7 细胞活力的影响 (A) 及对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 释放的抑制作用 (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of extracts from *C. loboapiculata* on viability on RAW264.7 cells (A) and inhibitory effects on LPS-induced NO release in RAW264.7 cells (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

醋酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及以下给药浓度,对 RAW264.7 细胞无明显的毒性,而石油醚部位和二氯甲烷部位在 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的给药浓度下对 RAW264.7 细胞无明显毒性。因此,考察 5 个萃取物在 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响,结果表明,二氯甲烷部位显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症介质 NO 的生成,并能浓度相关性地抑制 NO 和炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的生成(图 5)。

**3.2.2 二萜类化合物对 RAW264.7 细胞活力影响及抗炎活性评价** 采用 CCK-8 法测试 8 个二萜类化合物对 RAW264.7 细胞活力的影响,如图 6-A 所示,除化合物 2、3 和 5 以外,其余化合物在 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  时对 RAW264.7 细胞无毒性,而化合物 2、3 和 5 经过验证,在 25  $\mu\text{mol}/\text{L}$  时无细胞毒性。紧接着,考察 8 个化合物在 25  $\mu\text{mol}/\text{L}$  时对 NO 的抑制作用,结果如图 6-B 所示,8 个二萜类成分能够不同程度地抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中 NO 的产生。

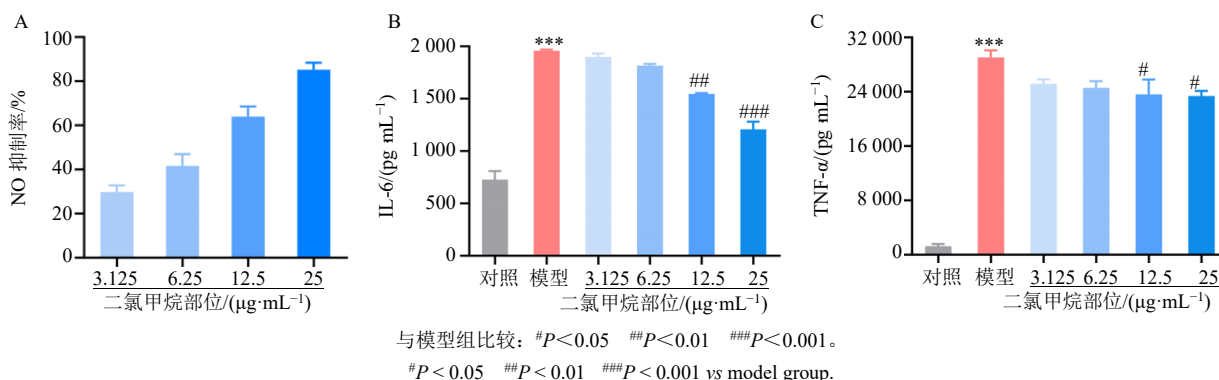


图 5 尖萼紫珠二氯甲烷部位对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症介质 NO (A)、IL-6 (B) 和 TNF- $\alpha$  (C) 的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Inhibitory effects of dichloromethane soluble fraction from *C. loboapiculata* on NO (A), IL-6 (B) and TNF- $\alpha$  (C) in LPS-induced RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

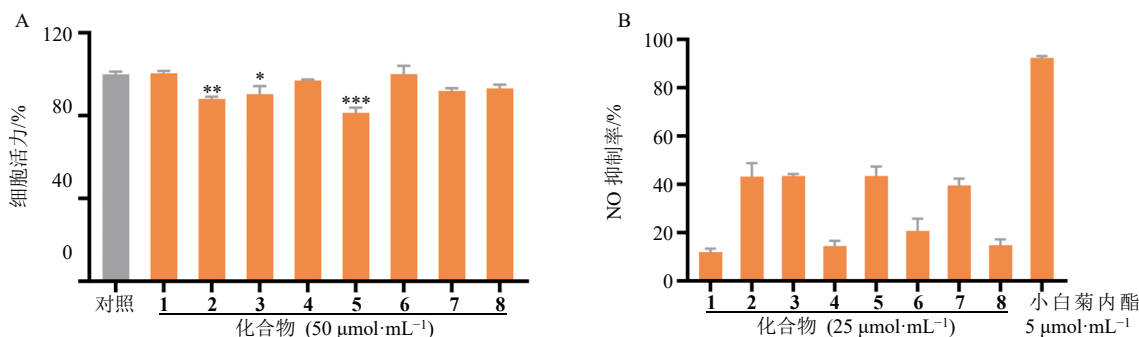


图 6 化合物 1~8 对 RAW264.7 细胞活力的影响 (A) 及对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 释放的抑制作用 (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of compounds 1—8 on viability of RAW264.7 cells (A) and inhibitory effects on LPS-induced NO release in RAW264.7 cells (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

目前关于尖萼紫珠化学成分的研究鲜见报道,本研究对尖萼紫珠体外抗炎活性突出的二氯甲烷部位进行化学成分分离与鉴定,得到 8 个二萜单体,主要以异海松烷型二萜为主,其中化合物 1 是新化合物。实验结果与前人提出的二萜类成分是紫珠属植物特征性成分的结论类型相吻合,为进一步探讨属间和种间亲缘关系提供化学依据。对分离得到化

合物进行体外抗炎活性评价,8 个化合物能够不同程度地对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞株产生 NO 呈现抑制活性,但尚未得到抗炎活性极突出的单体,对该植物化学成分和活性的挖掘有待继续进行。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Tu Y H, Sun L N, Guo M L, et al. The medicinal uses of *Callicarpa* L. in traditional Chinese medicine: An

- ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(2): 465-481.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 356.
- [3] 占丽丽, 叶先文, 张敏, 等. 紫珠属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 江西中医药, 2020, 51(8): 66-73.
- [4] 朱利婉, 周利, 李翔, 等. 紫珠属药用植物研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 天津中医药大学学报, 2023, 42(2): 243-256.
- [5] Ema R S, Neamul Kabir Zihad S M N, Islam M N, *et al.* Analgesic, anti-inflammatory activity and metabolite profiling of the methanolic extract of *Callicarpa arborea* Roxb. leaves [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 300: 115757.
- [6] Kim S M, Ryu H W, Kwon O K, *et al.* *Callicarpa japonica* Thunb. ameliorates allergic airway inflammation by suppressing NF- $\kappa$ B activation and upregulating HO-1 expression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113523.
- [7] 孙悦. 紫珠中萜类成分及其抗炎活性研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [8] Liu H X, Zhang L, Chen Y C, *et al.* Cytotoxic pimarane-type diterpenes from the marine sediment-derived fungus *Eutypella* sp. FS46 [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(4): 404-410.
- [9] Sun Y, Yang H Y, Huang P Z, *et al.* Abietane diterpenoids with anti-inflammatory activities from *Callicarpa bodinieri* [J]. *Phytochemistry*, 2023, 214: 113825.
- [10] Li Q, Wu X W, Wang Q, *et al.* Diterpenoids from *Callicarpa rubella* and their *in vitro* anti-NLRP3 inflammasome activity [J]. *Fitoterapia*, 2020, 147: 104774.
- [11] Wang Z H, Huang J, Niu C, *et al.* Isopimarane-type diterpenoids from *Callicarpa macrophylla* Vahl [J]. *Phytochem Lett*, 2017, 22: 224-228.
- [12] Wang Z H, Niu C, Zhou D J, *et al.* Three new abietane-type diterpenoids from *Callicarpa macrophylla* Vahl [J]. *Molecules*, 2017, 22(5): 842.
- [13] Liu T C, Wang R Q, Liu C P, *et al.* Active substances from *Callicarpa nudiflora* exert anti-cervicitis effects and regulate NLRP3-associated inflammation [J]. *Molecules*, 2021, 26(20): 6217.
- [14] 张雪儿, 黄逸敏, 方巧苗, 等. 红紫珠二萜类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(6): 1890-1898.
- [15] Bromann K, Viljanen K, Moreira V M, *et al.* Isolation and purification of *ent*-pimara-8(14),15-diene from engineered *Aspergillus nidulans* by accelerated solvent extraction combined with HPLC [J]. *Anal Methods*, 2014, 6(4): 1227-1234.
- [16] Lu X L, Liu J T, Liu X Y, *et al.* Pimarane diterpenes from the Arctic fungus *Eutypella* sp. D-1 [J]. *J Antibiot*, 2014, 67(2): 171-174.
- [17] Zhang L Q, Chen X C, Chen Z Q, *et al.* Eutypenoids A-C: Novel pimarane diterpenoids from the Arctic fungus *Eutypella* sp. D-1 [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(3): 44.
- [18] Chen H P, Li J, Zhao Z Z, *et al.* Diterpenes with bicyclo[2.2.2]octane moieties from the fungicolous fungus *Xylaria longipes* HFG1018 [J]. *Org Biomol Chem*, 2020, 18(13): 2410-2415.
- [19] Chen H P, Zhao Z Z, Cheng G G, *et al.* Immunosuppressive nor-isopimarane diterpenes from cultures of the fungicolous fungus *Xylaria longipes* HFG1018 [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(2): 401-412.
- [20] Seca A M L, Pinto D C G A, Silva A M S. ChemInform abstract: Structural elucidation of pimarane and isopimarane diterpenoids: The  $^{13}\text{C}$  NMR contribution [J]. *Nat Prod Commun*, 2008, 3(3): 399-412.
- [21] Taran M, Miguel B A S, Delmond B, *et al.*  $^{13}\text{C}$  NMR of diterpenes: Use of the C-19 methyl group as a probe for locating a tetrasubstituted double bond [J]. *Magnetic Reson Chemistry*, 1987, 25(12): 1090-1091.
- [22] 赵明, 陈丽杰, 裴世春, 等. 细叶杜香化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1532-1535.
- [23] 高兆洪. 鸡毛松药用植物化学成分的研究 [D]. 昆明: 云南师范大学, 2015.
- [24] Muto N, Tomokuni T, Haramoto M, *et al.* Isolation of apoptosis- and differentiation-inducing substances toward human promyelocytic leukemia HL-60 cells from leaves of *Juniperus taxifolia* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(2): 477-484.
- [25] Xu J, Sun Y H, Wang M C, *et al.* Bioactive diterpenoids from the leaves of *Callicarpa macrophylla* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(7): 1563-1569.
- [26] Din Z U, de Medeiros L S, Abreu L M, *et al.* Differential metabolism of diastereoisomeric diterpenes by *Preussia minima*, found as endophytic fungus in *Cupressus lusitanica* [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 78: 436-443.
- [27] Chang L C, Song L L, Park E J, *et al.* Bioactive constituents of *Thuja occidentalis* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(9): 1235-1238.
- [28] 赵迎春, 于鹏, 赵云丽, 等. 通经草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 7(7): 1043-1045.

[责任编辑 王文倩]