

• 化学成分 •

红花中 2 个新倍半萜苷类化合物

包家旭¹, 王永祥^{1#}, 张 娴¹, 尹娇娇¹, 林 悦¹, 杨亚珠¹, 赵云芳², 霍会霞², 屠鹏飞^{1,2}, 李 军^{1,2*}

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 中药现代研究中心, 北京 102488

摘要: 目的 研究红花 *Carthamus tinctorius* 的化学成分。方法 采用大孔吸附树脂、硅胶、Sephadex LH-20、ODS 柱色谱以及半制备型 HPLC 等分离技术对红花化学成分分离纯化, 运用理化性质和 UV、IR、HR-ESI-MS、NMR、ECD 等谱学数据鉴定化合物结构。采用氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 损伤的 H9C2 心肌细胞模型, 对分离得到的化合物进行心肌损伤保护活性筛选。结果 从红花 95%乙醇提取物大孔树脂 95%乙醇洗脱部位中共分离鉴定了 4 个化合物, 分别为 (-)-(3Z,1R,5S,9S,11R)-3-烯-石竹-8(13)-烯-5-醇-14-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (1)、(-)-(3Z,1R,5S,9S)-3-烯-石竹-8(13)-烯-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (2)、(-)-桃金娘烯醇-10-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (3)、香叶醇-1-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (4)。化合物 1 和 4 在 25 μmol/L 浓度下分别对 OGD/R 损伤的 H9C2 细胞存活率提高了 (25.01 ± 2.01)% 和 (29.99 ± 0.37)%。结论 化合物 1 和 2 为新的倍半萜苷类化合物, 命名为红花萜苷 A (1) 和红花萜苷 B (2); 化合物 3 和 4 为首次从红花属植物中分离得到的单萜苷类化合物, 体外活性测试表明化合物 1 和 4 具有良好的心肌损伤保护活性。

关键词: 红花; 倍半萜苷; 单萜苷; 心肌保护活性; (-)-桃金娘烯醇-10-O-β-D-吡喃葡萄糖苷; 香叶醇-1-O-β-D-吡喃葡萄糖苷; 红花萜苷 A; 红花萜苷 B

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0009-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.002

Two new sesquiterpenoid glucosides from *Carthamus tinctorius*

BAO Jiayu¹, WANG Yongxiang¹, ZHANG Xian¹, YIN Jiaojiao¹, LIN Yue¹, YANG Yazhu¹, ZHAO Yunfang², HUO Huixia², TU Pengfei^{1,2}, LI Jun^{1,2}

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

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents of *Carthamus tinctorius*. **Methods** The compounds were isolated and purified by various column chromatography over microporous resin, silica gel, Sephadex LH-20, ODS, and semi-preparative HPLC. The structures were elucidated by physicochemical characteristics and spectroscopic data including UV, IR, HR-ESI-MS, NMR, as well as ECD calculations. All the compounds were evaluated for their protective effects against OGD/R-stimulated H9C2 cell injury. **Results** A total of four compounds were isolated from the 95% EtOH extract of *C. tinctorius* and elucidated as (-)-(3Z,1R,5S,9S,11R)-3-en-caryophyll-8(13)-en-5-ol-14-O-β-D-glucopyranoside (1), (-)-(3Z,1R,5S,9S)-3-en-caryophyll-8(13)-en-5-O-β-D-glucopyranoside (2), myrtenyl-10-O-β-D-glucopyranoside (3), geranyl-1-O-β-D-glucopyranoside (4). Compounds 1 and 4 could significantly protect OGD/R-induced H9C2 cell injury, with increase of cell viabilities by (25.01 ± 2.01)% and (29.99 ± 0.37)% at the concentration of 25 μmol/L, respectively. **Conclusion** Compounds 1 and 2 were new sesquiterpene glucosides, named saffloterpenoside A (1) and saffloterpenoside B (2). Compounds 3 and 4 were isolated from the *Carthamus* plants for the first time. Compounds 1 and 4 exhibited protective effects on OGD/R-injured H9C2 cells.

收稿日期: 2024-11-07

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2022YFC3501602)

作者简介: 包家旭, 硕士研究生。E-mail: jiayu20233@163.com

#共同第一作者: 王永祥, 博士研究生。E-mail: xiaofendouwyx@163.com

*通信作者: 李 军, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质、作用机制和质量评价。E-mail: drlj666@163.com

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; sesquiterpene glucoside; monoterpene glucoside; cardioprotective activity; myrtenyl-10-*O*- β -*D*-glucopyranoside; geranyl-1-*O*- β -*D*-glucopyranoside; saffloterpenoside A; saffloterpenoside B

中药材红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 又名红蓝花, 集中分布于新疆、四川、云南、河南等地^[1]。红花入药历史悠久, 最早见于《金匱要略》的“妇人杂病篇”中用红蓝花酒方治疗妇科疾病。自唐代以后称作红花, 《开宝本草》^[2]有云: “红蓝花即红花也, 生梁汉及西域等”。《中国药典》2020年版记载, 红花味辛性温, 归心、肝经, 具有活血通经、散瘀止痛功效。用于治疗经闭、痛经、恶露不行、癥瘕痞块、胸痹心痛、瘀滞腹痛、胸胁刺痛、跌扑损伤、疮疡肿痛^[3]。现代药理研究表明红花能够预防和治疗心脑血管疾病、改善肺炎、降低肝毒性、减轻急性肝损伤、改善肾纤维化、预防骨质疏松^[4], 此外还具有抗癌^[5]和抗炎^[6-7]活性。

文献报道红花中化学成分主要含有醌式查耳酮苷类、黄酮类、生物碱类、聚炔类、萜类等。课题组前期研究发现, 红花提取物大孔树脂 95%乙醇

洗脱部位对 OGD/R 损伤的 H9C2 心肌细胞具有保护作用, 为进一步揭示红花药效物质, 本研究对该活性部位进行化学成分研究, 共鉴定了 4 个化合物, 分别为 (-)-(3*Z*,1*R*,5*S*,9*S*,11*R*)-3-烯-石竹-8(13)-烯-5-醇-14-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 [(-)-(3*Z*,1*R*,5*S*,9*S*,11*R*)-3-en-caryophyll-8(13)-en-5-ol-14-*O*- β -*D*-glucopyranoside, **1**]、(-)-(3*Z*,1*R*,5*S*,9*S*)-3-烯-石竹-8(13)-烯-5-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 [(-)-(3*Z*,1*R*,5*S*,9*S*)-3-en-caryophyll-8(13)-en-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside, **2**]、(-)-桃金娘烯醇-10-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 [(-)-myrtenyl-10-*O*- β -*D*-glucopyranoside, **3**]、香叶醇-1-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 (geranyl-1-*O*- β -*D*-glucopyranoside, **4**)。其中化合物 **1** 和 **2** 为新的倍半萜苷类化合物, 命名为红花萜苷 A (**1**) 和红花萜苷 B (**2**); 化合物 **3** 和 **4** 为单萜苷类化合物, 为首次从红花属植物中分离得到。结构如图 1 所示。

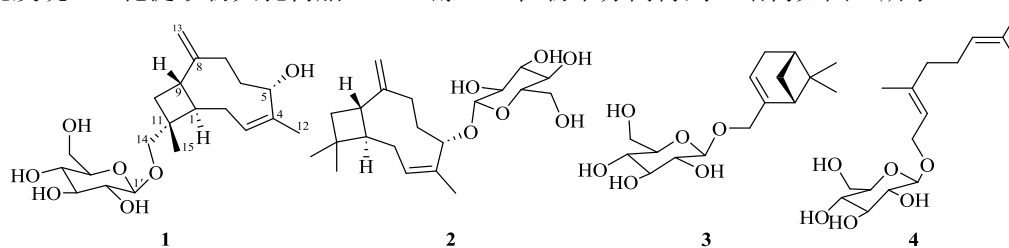


图 1 化合物 1~4 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—4

1 仪器与材料

LC-20AT 半制备高效液相色谱仪 (Shimadzu 公司, 日本), AVANCE NEO 400M 核磁共振波谱仪 (Bruker 公司, 德国), LC-Qtof-MS (Triple TOF6600⁺, SCIEX, Foster City, CA, 美国), Autopol IV-T 自动旋光仪 (Rudolph 公司, 美国), Nicolet Nexus 470 型傅里叶变换红外光谱仪 (Thermo Fisher 公司, 美国), UH-5300 型紫外可见分光光度计 (日本日立公司), Rotavapor R210 型旋转蒸发器 (BUCHI 公司, 瑞士), ME204 型万分之一电子分析天平 (METTLER TOLEDO 公司, 瑞士), ZF-1 型三用紫外分析仪 (江苏其林贝耳仪器制造有限公司), DZF-6090 型立式真空干燥箱 (上海申贤恒温设备厂)。色谱柱为 SPOLAR C₁₈ (250 mm×10 mm, 5 μ m, SHISEIDO 公司, 日本), SephadexTM LH-20 (GE Amersham Biosciences 公司, 瑞典), ODS (40~63 μ m, Merck

公司, 德国), 柱色谱用硅胶 (200~300 目) 及薄层色谱用 GF₂₅₄ 硅胶预制板均为青岛海洋化工厂生产。提取分离所用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇等试剂为西陇科学股份有限公司生产, 均为分析纯。水为超纯水。吡啶 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 货号 P111513), β -*D*-葡萄糖标准品 (RHAWN 公司, 货号 R010680), *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐 (MACKLIN 公司, 货号 L804704), 邻甲苯基异硫代异氰酸酯 (MACKLIN 公司, 货号 BD146365)。

大鼠 H9C2 心肌细胞, 购自于普诺赛公司。盐酸曲美他嗪片 (VASOREL) 购自施维雅 (天津) 制药有限公司 (国药准字 H20055465, 产品批号 2021303)。DMEM 高糖培养基 (Gibco, 批号 6124093), DMEM 无糖培养基 (Gibco, 批号 2961005), 胎牛血清 (FBS) (BI, 批号 2126181),

青霉素、Gibco 链霉素(双抗, P/S, 批号 227766), Gibco 0.25%胰酶(批号 2522743), 二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司, 批号 D1435), CCK8 检测试剂盒(美仑生物有限公司, 批号 MA0218-Mar-12J), Thermo 二氧化碳细胞培养箱(批号 Forma Series 3), Thermo 超净工作台(批号 51900900), Thermo 离心机(批号 X1R), Leica 光学显微镜(批号 ICCS0HD), 酶标仪(BIO-TEK 公司, 批号 SpectraMax iD3), SANYO 医用低温冰箱(-80 °C, 批号 MDF-U33V), 4 °C 实验室冰箱(Thermo 公司, 批号 TSX5005SV)。

红花药材于 2022 年 8 月采自中国新疆塔城, 由北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定为菊科植物红花 *C. tinctorius* L. 的干燥花, 样品标本(CT202208)存放于北京中医药大学北京中医药研究院中药现代研究中心。

2 方法

2.1 提取与分离

红花干燥花 50.0 kg, 加入 10 倍量 95%乙醇浸泡 1 h, 回流提取 2 次, 每次 2 h, 分别滤过, 合并滤液。药渣再用 8 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h。合并醇提和水提滤液, 减压浓缩后得到浓缩液 55 L, 离心分为水部位和沉淀。水部位通过 D101 大孔树脂, 纯水洗脱后依次用 10%、30%、50%、95%乙醇洗脱得到各洗脱部位。95%乙醇洗脱部位(147.5 g)进行硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱(5:1→0:1), 通过 TLC 检识合并相同流分, 共得到 6 个流分(Fr. A~F)。Fr. E(131.67 g)经 ODS 反相柱色谱, 以甲醇-水(25:75→100:0)梯度洗脱, 得到 Fr. E1~22。Fr. E13(12.8 g)经 C8 柱色谱, 以甲醇-水梯度洗脱(29:71→100:0)得到 Fr. E13a~j。Fr. E13d(1.8 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇洗脱得到 Fr. E13d1~4。Fr. E13d2(604.5 mg)经硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱(60:1→0:1)得到 Fr. E13d2a~g。Fr. E13d2b(40.3 mg)经半制备型 HPLC 以甲醇-0.04%甲酸水(53:47)进行纯化得到化合物 1(21.6 mg, $t_R=28.6$ min)。Fr. E13d3(974.0 mg)经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇洗脱得到 Fr. E13d3a~b。Fr. E13d3b(827.9 mg)经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇-水(7:3)洗脱得到 Fr. E13d3b1~6。Fr. E13d3b1(17.1 mg)经半制备型 HPLC 以乙腈-0.04%甲酸水(32:68)纯化得到化合物 3(8.39 mg, $t_R=55.0$ min)。Fr. E13e

(2.51 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇洗脱得到 Fr. E13e1~E13e5。Fr. E13e2(1.58 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇-水(7:3)洗脱得到 Fr. E13e2a~f。Fr. E13e2c(79.7 mg)经半制备型 HPLC 以甲醇-0.04%甲酸水(56:44)纯化得到化合物 4(18.3 mg, $t_R=29.9$ min)。Fr. E17(5.22 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇(1:9)洗脱得到 Fr. E17a~b。Fr. E17a(105.1 mg)经半制备型 HPLC 以甲醇-0.04%甲酸水(53:47)纯化得到化合物 2(13.4 mg, $t_R=45.9$ min)。

2.2 化合物的酸水解及糖的鉴定

化合物 1 和 2 的酸水解参照文献报道的方法进行^[8-9]。分别取化合物 1(1.48 mg)和 2(1.36 mg)溶于 3 mL 2 mol/L 的盐酸溶液, 80 °C 水浴加热 4 h。水解完成后对混合物进行干燥处理, 分别以乙酸乙酯和水进行萃取。将水层干燥后加入 1 mL 吡啶、1 mg *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐, 并在 60 °C 水浴加热 1.5 h, 然后向反应体系中加入 0.02 mL 邻甲苯基异硫代异氰酸酯, 继续在 60 °C 水浴加热 1.5 h, 得到糖部分的衍生物。采用 ACQUITY[®]HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)进行 LC-Qtof-MS 分析, 采用乙腈-0.1%甲酸水梯度洗脱(0~20 min, 5%~95% B), 柱温 30 °C, 体积流量 0.2 mL/min, 进样量 1 μL。比较水解产物糖部分衍生物($t_R=8.1$ min, m/z 447.126 0 [M+H]⁺)和标准品糖衍生物($t_R=8.1$ min, m/z 447.124 8 [M+H]⁺)的保留时间和质谱数据, 确定化合物 1 和 2 中的糖为 *D*-葡萄糖。

2.3 化合物 1 和 2 的量子化学计算

化合物 1 的 ¹³C-NMR 计算主要包括构象分析、NMR 计算、玻尔兹曼分布加权和 DP4⁺概率分析 4 个步骤。简而言之, 首先利用 Chem 3D 对化合物 1 进行能量最小化得到初始构象, 再利用 SYBYL 2.0 软件对化合物进行优势构象搜索。利用 Gaussian 6.0 软件在密度泛函理论(density functional theory, DFT)水平下采用密度泛函 B3LYP/6-31G 对各构象进行结构优化。计算 ¹³C NMR 时采用 GIAO 方法, 进一步采用密度泛函 B3LYP/6-31G+(d,p)搭配 CPCM 甲醇溶剂模型对化合物 1 的碳原子及四甲基硅烷(tetramethylsilane, TMS)屏蔽常数进行计算得到候选结构的化学位移值, 采用 DP4⁺方法同实测碳谱数据比较并计算不同构型的可能性占比, 从而确定化合物相对构型^[10]。

对化合物 1 和 2 的计算 ECD 实验在使用密度

泛函 B3LYP/6-31G 对各构象进行结构优化后,进一步采用 TD-DFT 方法下 B3LYP/6-31G+d 基组计算各个构象的 ECD 图谱。使用 SpecDis 软件生成化合物 **1** 和 **2** 计算的各构象 ECD 图谱,根据玻尔兹曼权重因子对符合能量分布的构象进行玻尔兹曼能量加权、拟合、生成计算图谱,同时与化合物 **1** 和 **2** 的实验图谱进行比较以确定化合物 **1** 和 **2** 的绝对构型^[11]。

2.4 生物活性测定

采用氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 损伤的 H9C2 心肌细胞模型对分离得到的萜苷单体化合物进行心肌损伤保护活性筛选。取对数生长期的 H9C2 细胞,制备成细胞悬液,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板上,置于细胞培养箱 (37 °C、5% CO₂) 中培养 24 h。将对照组的培养基更换为不含血清的 DMEM 高糖培养基继续放置于细胞培养箱中,其余各组更换为含盐酸曲美他嗪或萜苷单体化合物的 DMEM 无糖培养基,将细胞放进已加入厌氧袋的缺

氧盒中密闭培养 8 h。弃去原培养基,更换 DMEM 高糖培养基或含药的 DMEM 高糖培养基,转移至细胞培养箱 (37 °C、5% CO₂) 中复氧 12 h,每组设置 3 个复孔。通过 CCK-8 法测定 H9C2 细胞的存活率,每孔加入 100 μ L CCK-8 溶液,于 37 °C 培养箱中避光孵育 2 h。使用酶标仪在 450 nm 测定吸光度 (*A*) 值并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。[α]_D²⁵ -9.56 (c 1.21, MeOH)。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 204。HR-ESI-MS *m/z* 421.220 1 [M+Na]⁺ (计算值为 421.219 7), 推断化合物 **1** 的分子式为 C₂₁H₃₄O₇, 不饱和度为 5。红外光谱显示该化合物具有羟基 (3 556 cm⁻¹) 和双键 (1 629 cm⁻¹) 等官能团。在化合物 **1** 的 ¹H-NMR 谱 (表 1) 中观察到 2 组烯烃氢信号 [δ_{H} 5.28 (1H, m, H-3), 4.81 (1H,

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 ¹H-和 ¹³C-NMR 数据 (400/100 MHz)
Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data of compounds **1** and **2** (400/100 MHz)

| 碳位 | 1 ^a | | 2 ^b | |
|----|--|---------------------|--|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1 | 2.28 (1H, overlapped) | 47.3 | 1.53 (1H, m) | 51.9 |
| 2 | 2.28 (1H, overlapped, H-a), 1.97 (1H, m, H-b) | 26.8 | 2.19 (1H, m, H-a), 1.95 (1H, m, H-b) | 29.5 |
| 3 | 5.28 (1H, m) | 123.3 | 5.77 (1H, t, <i>J</i> = 8.0 Hz) | 130.7 |
| 4 | | 138.3 | | 136.5 |
| 5 | 4.35 (1H, t, <i>J</i> = 7.2 Hz) | 67.6 | 5.10 (1H, dd, <i>J</i> = 12.0, 5.4 Hz) | 74.7 |
| 6 | 1.62 (2H, overlapped) | 36.6 | 1.55 (1H, overlapped), 1.82 (1H, m) | 32.5 |
| 7 | 2.23 (1H, m), 1.62 (1H, overlapped, <i>J</i> = 5.0 Hz) | 32.0 | 2.19 (1H, m), 1.90 (1H, m) | 33.2 |
| 8 | | 153.1 | | 156.1 |
| 9 | 2.34 (1H, m) | 42.1 | 2.87 (1H, m) | 43.5 |
| 10 | 1.84 (1H, t, <i>J</i> = 10.2 Hz), 1.40 (1H, dd, <i>J</i> = 10.2, 7.4 Hz) | 31.8 | 1.97 (1H, overlapped), 1.55 (1H, overlapped) | 40.7 |
| 11 | | 37.2 | | 34.1 |
| 12 | 1.57 (3H, s) | 17.3 | 1.65 (3H, s) | 16.0 |
| 13 | 4.81 (1H, brs, H-a), 4.83 (1H, brs, H-b) | 109.9 | 4.74 (1H, brs, H-a), 4.50 (1H, brs, H-b) | 110.2 |
| 14 | 3.55 (1H, d, <i>J</i> = 9.8 Hz, H-a), 3.14 (1H, overlapped H-b) | 77.2 | 0.98 (3H, s) | 30.4 |
| 15 | 1.00 (3H, s) | 17.8 | 1.06 (3H, s) | 23.1 |
| 1' | 4.10 (1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz) | 103.4 | 4.12 (1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz) | 100.8 |
| 2' | 2.97 (1H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz) | 73.5 | 3.21 (1H, overlapped) | 75.0 |
| 3' | 3.14 (1H, overlapped) | 76.9 | 3.18 (1H, overlapped) | 77.9 |
| 4' | 3.05 (1H, overlapped) | 70.1 | 3.33 (1H, overlapped) | 71.8 |
| 5' | 3.05 (1H, overlapped) | 76.9 | 3.33 (1H, overlapped) | 78.2 |
| 6' | 3.65 (1H, brd, <i>J</i> = 11.6 Hz, H-a) | 61.1 | 3.87 (1H, dd, <i>J</i> = 12.0, 2.2 Hz, H-a) | 62.7 |
| | 3.44 (1H, dd, <i>J</i> = 11.6, 5.2 Hz, H-b) | | 3.70 (1H, dd, <i>J</i> = 12.0, 6.0 Hz, H-b) | |

^aDMSO-*d*₆ 中测试, ^bMethanol-*d*₄ 中测试。

^ameasured in DMSO-*d*₆, ^bmeasured in Methanol-*d*₄.

brs, H-13a) 和 4.83 (1H, brs, H-13b)], 1 个连氧次甲基氢信号 [δ_{H} 4.35 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5)], 1 个连氧亚甲基氢信号 [δ_{H} 3.55 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-14a), 3.14 (1H, overlapped, H-14b)], 2 个甲基氢信号 [δ_{H} 1.57 (3H, s, H₃-12), 1.00 (3H, s, H₃-15)], 以及 1 组葡萄糖残基氢信号 [δ_{H} 4.10 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.65 (1H, brd, $J = 11.6$ Hz, H-6a'), 3.44 (1H, dd, $J = 11.6, 5.2$ Hz, H-6b'), 3.14 (1H, overlapped, H-3'), 3.05 (2H, overlapped, H-4', 5'), 2.97 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-2')]. 通过分析该化合物 **1** 的 ^{13}C -NMR 和 HSQC 谱显示该结构有 21 个碳信号, 包括 4 个烯烃碳信号 (δ_{C} 153.1, 138.3, 123.3, 109.9), 1 个连氧次甲基碳信号 (δ_{C} 67.6), 1 个连氧亚甲基碳信号 (δ_{C} 77.2), 2 个甲基碳信号 (δ_{C} 17.8, 17.3) 以及 1 组葡萄糖残基碳信号 (δ_{C} 103.4, 77.0, 76.9, 73.5, 70.1, 61.1). 通过与已知化合物 (-)-(3*Z*,1*R*,5*S*,8*S*,9*S*,11*R*)-5,8-epoxycaryophyll-3-en-14-*O*- β -*D*-glucopyranoside 的 NMR 数据进行详细比对, 发现两者在多个关键信号上高度一致, 这表明他们可能有相同的母核结构^[12]. 根据以上数据可推断该化合物为倍半萜苷类化合物. 然而化合物 **1** 缺少了 1 组甲基信号, 多出了 1 组末端双键质子信号 [δ_{H} 4.81 (1H, brs, H-13a) 和 4.83 (1H, brs, H-13b)], 伴随着 C-5 (δ_{C} 67.6, $\Delta\delta_{\text{C}} -14.4$) 化学位移向高场移动, C-8 (δ_{C} 109.9, $\Delta\delta_{\text{C}} +22.6$) 和 C-13 (δ_{C} 156.1, $\Delta\delta_{\text{C}} +129.4$) 化学位移向低场移动, 这表明 C-5 与 C-8 之间氧桥在断裂后, C-8 与 C-13 形成了 1 对双键, 而 C-5 则为羟基取代. 在 HMBC 谱观察到了 H-1 与 C-3/C-8, H-5 与 C-3/C-7, H₃-12 与 C-3/C-5, H₂-13 与 C-7/C-9, H₂-10 与 C-1/C-8, H₃-15 与 C-1/C-10/C-11/C-14 之间的氢-碳远程相关信号 (图 2), 同时在 ^1H - ^1H COSY 中观察到 H₂-10/H-9/H-1/H₂-2/H-3/H₃-12, H-5/H₂-6/H₂-7 间的相关信号 (图 2) 进一步证实了上述推断. 而 H-1' 与 C-14 之间的 HMBC 信号则证明了糖的连接位置处于 C-14 位. 结合端基氢谱和碳谱化学位移及耦合常数 [δ_{C} 103.4; δ_{H} 4.10 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)], 确定化合物 **1** 中葡萄糖端基碳相对构型为 β 型. 基于以上分析确立了 **1** 的平面结构 (图 2).

进一步通过 NOESY 谱和 ^{13}C -NMR 计算确定了化合物 **1** 的相对构型. 在 NOESY 谱中观察到 H₃-15 与 H-2b/H-3/H-9/H-10b, H-10a 与 H₂-13/H-14a 存在 NOE 相关信号 (图 3), 说明 H₃-15, H-9 和 H-10b 位于同侧, H-1, H-10a 和 H-14a 位于同侧, 因此 C-1、C-9、C-11 的相对构型为 1*S**, 9*R**, 11*S** 或

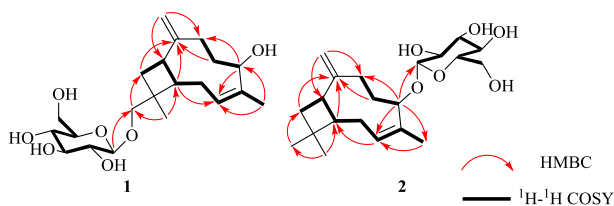


图 2 化合物 **1** 和 **2** 的主要 HMBC、 ^1H - ^1H COSY 相关
Fig. 2 Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compounds **1** and **2**

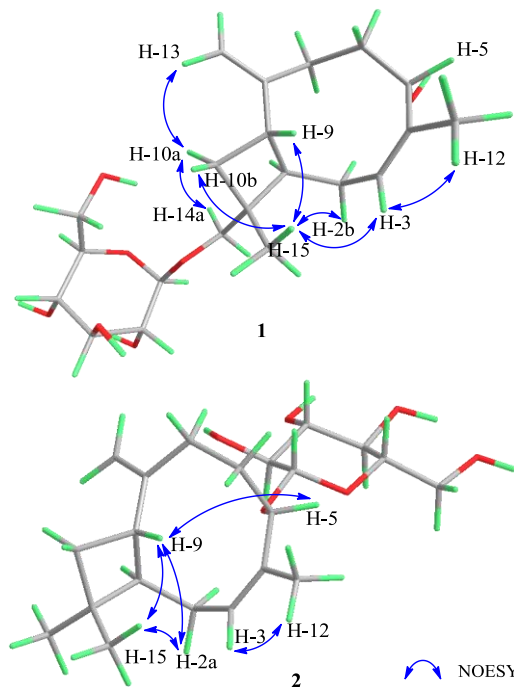


图 3 化合物 **1** 和 **2** 的主要 NOESY 相关

Fig. 3 Key NOESY correlations of compounds **1** and **2**

1*R**, 9*S**, 11*R**. 由于 H-1 和 H-2a 化学位移信号重叠, 不能通过 NOESY 实验来确定 C-5 位的相对构型, 因此利用 ^{13}C -NMR 计算来确定 C-5 位的相对构型. 即采用 B3LYP/6-31G+(d,p) 水平下的密度泛函理论 GIAO 来计算 2 种差向异构体 1*R**, 5*R**, 9*S**, 11*R** 和 1*R**, 5*S**, 9*S**, 11*R** 的 ^{13}C -NMR 化学位移值, 得到计算值与实验值的相关系数 (R^2) 分别为 0.995 7 和 0.988 3, 而 DP4⁺ 概率分析表明, 实验值与 1*R**, 5*S**, 9*S**, 11*R** 理论计算值的匹配度为 100%, 因此确定化合物 **1** 的相对构型为 1*R**, 5*S**, 9*S**, 11*R**. 进一步通过计算 ECD 和实测 ECD 谱图比对 (图 4) 确定其绝对构型为 1*R*, 5*S*, 9*S*, 11*R*. 此外, 在 NOESY 谱中还观察到 H-3 与 H₃-12 存在 NOE 相关信号, 确定 $\Delta^3,4$ 构型为顺式. 综上所述, 化合物 **1** 鉴定为 (-)-(3*Z*,1*R*,5*S*,9*S*,11*R*)-3-烯-石竹-8(13)-烯-5-醇-14-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷. 经检索为 1 个新化合物, 命名为红花萜苷 A.

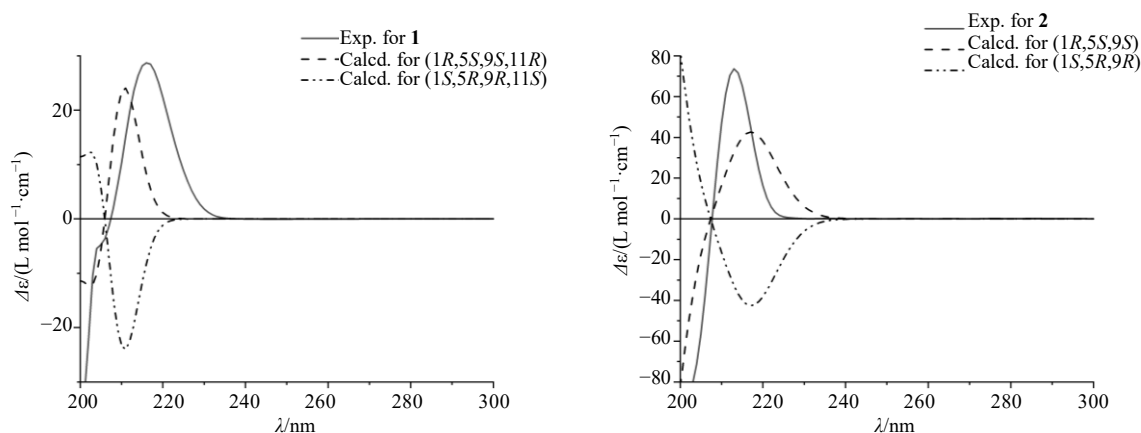


图4 化合物1和2的实验ECD和计算ECD图谱

Fig. 4 Experimental and calculated ECD spectra of compounds 1 and 2

化合物 2: 白色粉末。 $[\alpha]_D^{25} + 71.4$ (c 0.77, MeOH)。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 205。HR-ESI-MS m/z 405.224 9 $[M+Na]^+$ (计算值为 405.224 8), 结合 ^{13}C -NMR 数据推断化合物 2 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_6$, 不饱和度为 5。红外光谱显示该化合物含有羟基 (3363 cm^{-1})、双键 (1624 cm^{-1}) 和偕甲基 (1450 、 1367 cm^{-1})。在化合物 2 的 ^1H -NMR 谱 (表 1) 中观察到 2 组烯烃氢信号 [δ_{H} 5.77 (1H, t, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-3), 4.74 (1H, brs, H-13a), 4.50 (1H, brs, H-13b)], 1 个连氧次甲基氢信号 [δ_{H} 5.10 (1H, dd, $J = 12.0, 5.4\text{ Hz}$, H-5)], 3 个甲基氢信号 [δ_{H} 1.65 (3H, s, H₃-12), 1.06 (3H, s, H₃-14), 0.98 (3H, s, H₃-15)], 以及 1 组葡萄糖残基氢信号 [δ_{H} 4.12 (1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$, H-1'), 3.87 (1H, dd, $J = 12.0, 2.2\text{ Hz}$, H-6a'), 3.70 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0\text{ Hz}$, H-6b'), 3.33 (2H, m, H-4', 5'), 3.21 (1H, m, H-2'), 3.18 (1H, m, H-3')]. 通过分析化合物 2 的 ^{13}C NMR 和 HSQC 谱可知其结构有 21 个碳, 包括 4 个烯烃碳信号 (δ_{C} 156.1, 136.5, 130.7, 110.2), 1 个连氧次甲基碳信号 (δ_{C} 74.7), 3 个甲基碳信号 (δ_{C} 30.4, 23.0, 16.0) 以及 1 组葡萄糖残基碳信号 (δ_{C} 100.8, 78.2, 77.9, 75.0, 71.8, 62.7)。通过化合物 2 和化合物 1 的 1D NMR 数据比对发现二者数据呈现高度一致性。不同之处在于化合物 2 的 C-14 化学位移明显向高场位移 [δ_{C} 30.4, $\Delta\delta_{\text{C}} -46.8$; δ_{H} 0.98 (3H, s), $\Delta\delta_{\text{H}} -2.57$], 提示 C-14 的羟甲基变成了甲基。在 HMBC 图谱中, 发现 H-5 与 C-1' 存在氢-碳远程相关信号 (图 2), 这说明葡萄糖残基连接在 C-5 位。基于以上分析, 确立了化合物 2 的平面结构 (图 2)。

在 NOESY 谱中观察到 H₃-15 与 H-2a/H-9, H-9 与 H-2a/H-5 存在 NOE 相关信号, 因此 C-1、C-

5、C-9 的相对构型定为 $1R^*, 5S^*, 9S^*$ 或 $1S^*, 5R^*, 9R^*$ (图 3)。进一步比对实验 ECD 与计算 ECD 谱图 (图 4) 确定其绝对构型为 $1R, 5S, 9S$ 。此外, 在 NOESY 谱中还观察到 H-3 与 H₃-12 存在 NOE 相关信号, 确定 $\Delta^{3,4}$ 构型为顺式。综上所述, 化合物 2 被鉴定为 (-)-(3Z,1R,5S,9S)-3-烯-石竹-8(13)-烯-5-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。经检索为 1 个新化合物, 命名为红花萜苷 B。

化合物 3: 白色粉末; $[\alpha]_D^{25} - 32.5$ (c 0.08, MeOH); HR-ESI-MS m/z : 337.161 3 $[M+Na]^+$, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.60 (1H, s, H-2), 4.28 (1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$, H-1'), 4.18 (1H, dd, $J = 12.4, 1.4\text{ Hz}$, H-10a), 4.08 (1H, dd, $J = 12.4, 1.4\text{ Hz}$, H-10b), 3.88 (1H, dd, $J = 12.0, 2.2\text{ Hz}$, H-6'a), 3.68 (1H, dd, $J = 12.0, 5.6\text{ Hz}$, H-6'b), 3.36 (1H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$, H-2'), 3.28 (1H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$, H-3'), 3.24 (1H, dt, $J = 7.0, 2.6\text{ Hz}$, H-4'), 3.20 (1H, m, H-5'), 2.44 (1H, dt, $J = 8.6, 5.6\text{ Hz}$, H-4), 2.31 (2H, d, $J = 13.0\text{ Hz}$, H-7), 2.26 (1H, m, H-6), 2.11 (1H, m, H-3), 1.32 (3H, s, -CH₃), 1.21 (1H, d, $J = 8.8\text{ Hz}$, H-3), 0.87 (3H, s, -CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 146.1 (C-2), 121.6 (C-1), 102.7 (C-1'), 78.2 (C-5'), 77.9 (C-3'), 75.1 (C-10), 72.5 (C-4), 71.7 (C-2'), 62.8 (C-6'), 44.5 (C-3), 42.1 (C-2), 38.9 (C-5), 32.4 (C-6), 32.3 (C-4), 26.7 (C-7), 21.4 (2 \times CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 3 为 (-)-桃金娘烯醇-10-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 4: 白色粉末; $[\alpha]_D^{25} - 15.0$ (c 0.81, MeOH); HR-ESI-MS m/z : 339.176 1 $[M+Na]^+$, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.39 (1H, m, H-2), 5.13 (1H, m, H-6), 4.37 (1H, dd, $J = 12.0, 6.2$

Hz, H-1b), 4.31 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 4.26 (1H, m, H-1a), 3.89 (1H, dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz, H-6'a), 3.69 (1H, dd, $J = 12.0, 5.6$ Hz, H-6'b), 3.35~3.17 (4H, m, H-2'~5'), 2.20~2.04 (4H, m, H-4, 5), 1.70 (6H, s, H-9, 10), 1.63 (3H, s, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 141.8 (C-3), 132.5 (C-7), 125.1 (C-6), 121.6 (C-2), 102.7 (C-1'), 78.1 (C-3'), 78.0 (C-5'), 75.0 (C-2'), 71.7 (C-4'), 66.3 (C-1), 62.8 (C-6'), 40.7 (C-4), 27.4 (C-5), 25.9 (C-9), 17.8 (C-8), 16.4 (C-10)。以上数据与文献报道的基本一致^[14], 鉴定化合物 4 为香叶醇-1-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

3.2 生物活性测定结果

构建 OGD/R 损伤心肌细胞模型^[15], 以盐酸曲美他嗪片作为阳性对照, 评估化合物 1~4 的心肌损伤保护作用。结果表明, 与模型组相比, 25 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸曲美他嗪片提高了 OGD/R 损伤的 H9C2 细胞存活率 (19.03 \pm 1.55) %。在相同浓度下化合物 1 和 4 分别提高了 H9C2 细胞存活率 (25.01 \pm 2.01) % 和 (29.99 \pm 0.37) % (表 2)。以上实验结果表明, 化合物 1 和 4 能够明显提高 OGD/R 损伤的 H9C2 细胞活力, 具有良好的心肌损伤保护活性。

表 2 化合物 1~4 对 OGD/R 损伤的 H9C2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of compounds 1—4 on cell viability of OGD/R-induced H9C2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 化合物 | 存活率/% |
|--------|------------------|
| 1 | 25.01 \pm 2.01 |
| 2 | 18.47 \pm 0.11 |
| 3 | 23.93 \pm 3.38 |
| 4 | 29.99 \pm 0.37 |
| 盐酸曲美他嗪 | 19.03 \pm 1.55 |

4 讨论

本研究综合运用大孔树脂、硅胶柱色谱、Sephadex LH-20、ODS 柱色谱并结合半制备型 HPLC 技术对红花提取物大孔树脂 95%乙醇洗脱部位化学成分进行分离与纯化, 并运用 UV、IR、HR-ESI-MS、NMR 等技术对红花的化学成分进行结构研究, 共分离鉴定了 4 个化合物, 其中化合物 1 和 2 为新倍半萜苷类化合物, 化合物 3 和 4 为首次从红花属植物中分离得到的单帖苷类化合物。并评价了 4 个化合物对 OGD/R 损伤的 H9C2 细胞保护活性, 其中化合物 1 和 4 表现良好的心肌损伤保护活

性。本研究进一步拓展了红花化学成分多样性, 为进一步开发红花的药用价值、阐释红花发挥活血化瘀作用的药效物质提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 林寒, 李刚, 刘虹, 等. 中国红花种质资源的种类与分布 [J]. 生物资源, 2018, 40(4): 314-320.
- [2] 宋·卢多逊等撰. 尚志钧辑校. 开宝本草: 辑复本 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 218.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 157.
- [4] Xian B, Wang R, Jiang H J, *et al.* Comprehensive review of two groups of flavonoids in *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113462.
- [5] Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, *et al.* Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential [J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2277.
- [6] Cheng B F, Gao Y X, Lian J J, *et al.* Hydroxysafflor yellow A inhibits IL-1 β -induced release of IL-6, IL-8, and MMP-1 via suppression of ERK, NF- κ B and AP-1 signaling in SW982 human synovial cells [J]. *Food Funct*, 2016, 7(11): 4516-4522.
- [7] Li J, Zhang S Y, Lu M R, *et al.* Hydroxysafflor yellow A suppresses inflammatory responses of BV2 microglia after oxygen-glucose deprivation [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 535: 51-56.
- [8] 范雨欣, 徐瑞雯, 张晓祎, 等. 中华枸杞中 1 个新的香豆素葡萄糖苷 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 23-29.
- [9] Tanaka T, Nakashima T, Ueda T, *et al.* Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(6): 899-901.
- [10] Huo H X, Gu Y F, Sun H, *et al.* Anti-inflammatory 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives from Chinese agarwood [J]. *Fitoterapia*, 2017, 118: 49-55.
- [11] 梁乃允, 黄惠铭, 王超超, 等. 没药中 2 个新倍半萜类化合物 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 688-694.
- [12] Li L, Liu J, Li X R, *et al.* Sesquiterpenoids from the florets of *Carthamus tinctorius* (safflower) and their anti-atherosclerotic activity [J]. *Nutrients*, 2022, 14(24): 5348.
- [13] Yin X M, Zhang J D, Wang S H. Chemical constituents of the stems of *Orostachys malacophyllus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2020, 56(4): 740-742.
- [14] 王颖, 杨锡洪, 李爱军. 香料前体香叶醇- β -D-葡萄糖苷的合成、纯化与表征 [J]. 食品与机械, 2006, 22(3): 47-50.
- [15] Tan M Y, Yin Y F, Chen W X, *et al.* Trimetazidine attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial ferroptosis by modulating the Sirt3/Nrf2-GSH system and reducing oxidative/nitrative stress [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 229: 116479.

[责任编辑 王文倩]