

• 化学成分 •

牛耳枫叶化学成分研究

翁佳程, 郭佳琪, 韩立柱, 李思琦, 秦路平*, 李华强*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311403

摘要: 目的 研究牛耳枫 *Daphniphyllum calycinum* 叶的化学成分及对人非小细胞肺癌 A549 细胞的细胞毒活性。方法 运用多种柱色谱技术进行分离纯化, 并采用多种波谱技术鉴定化合物结构; 同时采用 CCK8 法对所分离化合物进行体外 A549 细胞毒活性测试。结果 从牛耳枫叶分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为 (Z)-6-羟基-2-(4-羟基苯基)-5-(1-丙烯基)苯并呋喃-3-甲酸甲酯 (1)、(E)-2-(4-羟基苯基)-5-(1-丙烯基)苯并呋喃-3-甲酸甲酯 (2)、4-羟基-3-甲氧基苯甲酸-3,5-二羟基苯酯 (3)、methyl (E)-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(prop-1-en-1-yl)benzofuran-3-carboxylate (4)、4-[(2S)-3,4-dihydro-5,7-dimethoxy-2H-1-benzopyran-2-yl]phenol (5)、5-O-methylafzelechin (6)、儿茶素 (7)、表儿茶素 (8) 和香橙素 (9)。细胞毒活性显示, 化合物 1、2 和 4 有一定的抑制活性, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 分别为 (8.32 ± 1.50)、(14.03 ± 2.10)、(27.42 ± 0.95) μmol/L, 其他化合物在 40 μmol/L 内无明显活性。结论 化合物 1、2 和 4 为苯并呋喃类木脂素类化合物, 3 为香草酸衍生物, 5~8 为黄酮醇类化合物, 9 为黄酮醇化合物。其中化合物 1 和 3 为新化合物, 分别命名为牛耳枫素 A 和牛耳枫素 C; 化合物 2 为新天然产物, 命名为牛耳枫素 B; 化合物 5~9 为首次从牛耳枫中分离得到。化合物 1 和 2 具有较好的 A549 细胞毒活性。

关键词: 牛耳枫; 木脂素; 牛耳枫素 A; 牛耳枫素 B; 牛耳枫素 C; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)19-6968-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.19.009

Chemical constituents from leaves of *Daphniphyllum calycinum*

WENG Jiacheng, GUO Jiaqi, HAN Lizhu, LI Siqi, QIN Luping, LI Huaqiang

College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311403, China

Abstract: Objective This study aims to investigate the chemical constituents of the leaves of *Daphniphyllum calycinum* and evaluate their *in vitro* cytotoxic activity against human non-small cell lung carcinoma cells (A549). **Methods** A variety of chromatographic techniques were employed to separate and isolate compounds. Multiple spectroscopic methods were used to identify the structures. The cytotoxic activity of the isolated compounds against A549 cells was evaluated by CCK-8 assay. **Results** Nine compounds were isolated from the leaves of *D. calycinum* and were identified as methyl (Z)-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(prop-1-en-1-yl)benzofuran-3-carboxylate (1), methyl (E)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(1-propen-1-yl)-3-benzofurancarboxylate (2), (3,5-dihydroxyphenyl)-4-hydroxy-3-methoxybenzoate (3), methyl (E)-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(prop-1-en-1-yl)benzofuran-3-carboxylate (4), 4-[(2S)-3,4-dihydro-5,7-dimethoxy-2H-1-benzopyran-2-yl]phenol (5), 5-O-methylafzelechin (6), catechin (7), epicatechin (8), dihydrokaempferol (9). The cytotoxicity assay showed that compounds 1, 2 and 4 exhibited moderate inhibitory activity with IC₅₀ values of (8.32 ± 1.50), (14.03 ± 2.10), and (27.42 ± 0.95) μmol/L, respectively. Other compounds showed no significant activity at concentrations up to 40 μmol/L. **Conclusion** Compounds 1, 2 and 4 were identified as benzofuran-type lignans, 3 was a vanillic acid derivative, 5—8 were flavanols, and 9 was a flavone. Among them, 1 and 3 were new compounds and were named as daphnicalycins A and C, respectively. Compound 2 was a new natural product and was named as daphnicalycin B. 5—9 were first

收稿日期: 2025-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32470428)

作者介绍: 翁佳程, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: w1623926948@163.com

*通信作者: 李华强, 副研究员, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: lihq009@zcmu.edu.cn

秦路平, 教授, 博士生导师, 从事中药资源品质评价与开发利用。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

isolated from *D. calycinum*. Compounds **1** and **2** exhibited potential cytotoxic activity against A549 cells.

Key words: *Daphniphyllum calycinum* Blume; lignans; daphnicalycin A; daphnicalycin B; daphnicalycin C; cytotoxic activity

虎皮楠属 *Daphniphyllum* Blume 为虎皮楠科 (Daphniphyllaceae) 常绿灌木或小乔木, 全世界约有 25 种, 主要分布于亚洲热带和亚热带地区, 我国虎皮楠属植物约有 12 种, 主要分布于西南至东南各省^[1]。虎皮楠属植物自古以来便被广泛应用于传统医学, 在民族医药体系中具有重要地位, 其中的牛耳枫 *Daphniphyllum calycinum* Benth.、交让木 *D. macropodum* Miq. 和虎皮楠 *D. oldhamii* (Hemsl.) K. Rosenth. 3 种植物为我国传统的民间药用植物^[2]。牛耳枫别名南岭虎皮楠、山羊屎、牛耳铃、老虎耳、鸭旦籽、猪肚木和珠碌子等, 为虎皮楠科虎皮楠属常绿灌木, 主要产地于我国广东、广西、福建、江西等省区, 其各个部位 (根、枝叶、果实) 均可用于治疗疾病^[3]。《中华本草》记载, 牛耳枫叶味辛甘、性凉, 归肝、肾经, 具有祛风止痛、解毒消肿的功效, 主治风湿骨痛、疮疡肿毒、跌打骨折、毒蛇咬伤^[4]。现代研究表明, 牛耳枫叶含有各种化学成分, 如生物碱类^[5]、木脂素类^[6]、黄酮类^[7]及酚苷类^[8]等, 具有抗肿瘤^[9]、抗炎^[3]、抗氧化^[10]、抗菌^[11]、抗肠道病毒^[12]等多种药理活性。目前对牛耳枫化学成分的研究主要集中在生物碱类^[13], 其他类化合物的研究非常不充分, 制约着该属植物资源的进一步开发和利用。为进一步研究牛耳枫的其他类化学成分, 深

入挖掘其药理作用, 本研究以牛耳枫叶为研究对象, 综合运用多种色谱技术充分分离化学成分并采用多种波谱技术分离得到 9 个化合物 (结构见图 1), 分别鉴定为 (Z)-6-羟基-2-(4-羟基苯基)-5-(1-丙烯基) 苯并呋喃-3-甲酸甲酯 [methyl (Z)-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(prop-1-en-1-yl)benzofuran-3-carboxylate, **1**]、(E)-2-(4-羟基苯基)-5-(1-丙烯基) 苯并呋喃-3-甲酸甲酯 [methyl (E)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(1-propen-1-yl)-3-benzofurancarboxylate, **2**]、4-羟基-3-甲氧基苯甲酸-3,5-二羟基苯酯 [(3,5-dihydroxyphenyl)-4-hydroxy-3-methoxybenzoate, **3**]、methyl (E)-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(prop-1-en-1-yl)benzofuran 3-carboxylate (**4**)、4-[(2S)-3,4-dihydro-5,7-dimethoxy-2H-1-benzopyran-2-yl]phenol (**5**)、5-O-methyl afzelechin (**6**)、儿茶素 (catechin, **7**)、表儿茶素 (epicatechin, **8**) 和香橙素 (dihydrokaempferol, **9**)。化合物 **1** 和 **3** 为新化合物, 分别命名为牛耳枫素 A 和 C; 化合物 **2** 为新天然产物, 命名为牛耳枫素 B; 化合物 **5**~**9** 为首次从牛耳枫中分离得到。现有文献报道, 牛耳枫中的单体化合物主要进行了肿瘤细胞活性的研究, 部分化合物显示出显著的活性^[14-15]。本研究分离的化合物为木脂素类和黄酮类化合物, 曾有文献报道^[6], 从牛耳枫中发现

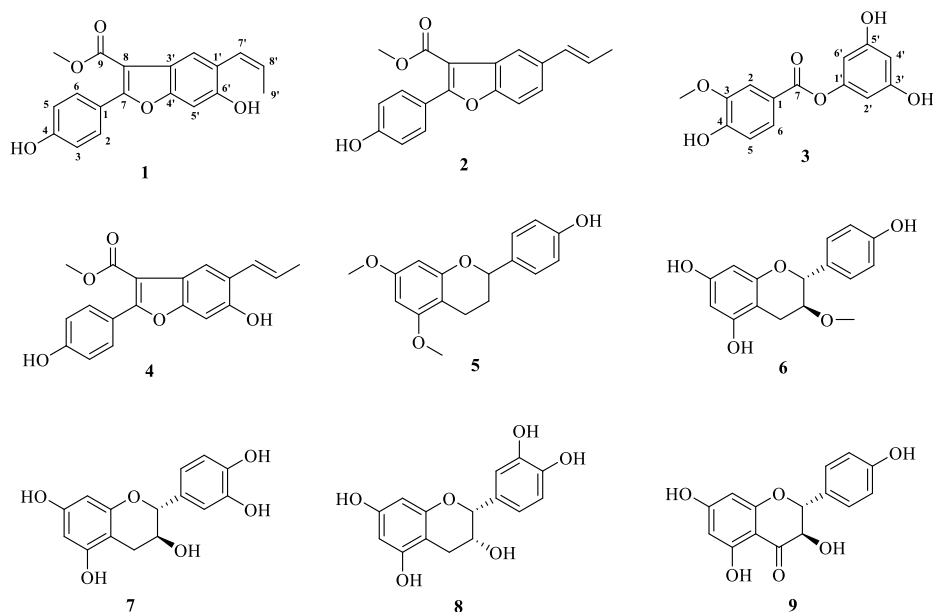


图 1 化合物 1~9 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—9

的相似结构化合物具有显著的抗人非小细胞肺癌 A549 细胞活性, 因此, 本实验选择 A549 细胞进行细胞毒活性测试。结果表明, 化合物 **1** 和 **2** 对 A549 细胞具有较好的活性, 其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值分别为 (8.32 ± 1.50) 和 $(14.03 \pm 2.10) \mu\text{mol/L}$ 。

1 仪器与材料

1.1 仪器与耗材

万分之一天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司); 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); AB SCIEX QTRAP 5500 型质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); Bruker AM-600 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Nicolet IS50 型红外光谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); UV-3600i plus 紫外可见近红外分光光度计 (日本岛津公司); Multiskan GO 酶标仪 (美国 Thermo 公司); 恒温培养箱 (日本松下公司); 高压蒸汽灭菌锅 [普和希健康医疗器械 (上海) 有限公司]。

柱色谱硅胶 (80~120、200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); ODS 填料 ($50 \mu\text{m}$, 日本 YMC 公司); LC-2010 双泵半制备型高效液相色谱 (武汉睿合色谱技术有限公司); 半制备型 RP- C_{18} 柱 ($250 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, 上海月旭有限公司); 半制备型 SiO_2 柱 ($250 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, 上海月旭有限公司); 60 F_{254} 薄层色谱硅胶板 (烟台化工研究所); 甲醇、乙醇、二氯甲烷等分析纯试剂 (国药集团化学试剂有限公司); 色谱试剂 (乙腈、甲醇、正己烷和乙醇, 美国天地公司); DEME 培养基、10% 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 顺铂 (白鲨生物科技有限公司); CCK8 试剂盒 (白鲨生物科技有限公司); A549 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药材

牛耳枫叶样品于 2023 年 2 月采自中国广西壮族自治区贵港市平南县官成镇, 经浙江中医药大学药学院张巧艳教授鉴定为虎皮楠科植物牛耳枫 *D. calycinum* Benth. 的叶。植物标本凭证 (LHQ-DC-2023-10) 存放于浙江中医药大学药学院天然药物化学分析实验室。

2 方法

2.1 提取与分离

取干燥牛耳枫叶 (50.0 kg), 以 95% 乙醇 55°C 加热浸泡提取 3 次后, 合并提取液减压浓缩得乙醇粗提物 (13.9 kg)。提取物经热水混悬, 加 2% HCl

酸化, 得不溶性成分及酸液, 酸液进一步碱沉得总生物碱; 不溶性成分 (非生物碱部位) 经水混悬后依次用石油醚、二氯甲烷和醋酸乙酯充分萃取。其中醋酸乙酯萃取物质量为 418.5 g 。

醋酸乙酯萃取部位经 ODS 反相柱色谱分离, 以甲醇-水 ($20:80 \rightarrow 100:0$) 梯度洗脱, 合并相似洗脱液得到 6 个组分 (Fr. A~F)。Fr. D (88.5 g) 经正相硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇 ($1:0 \rightarrow 0:1$) 梯度洗脱, 得到 11 个组分 (Fr. D1~D11)。Fr. D2 (4.5 g) 经 ODS 反相柱色谱分离, 甲醇-水 ($50:50 \rightarrow 100:0$) 梯度洗脱, 合并后得到 14 个组分 (Fr. D2a~D2n)。Fr. D2b (94.6 mg) 经半制备型高效液相色谱 (甲醇-水 $40:60$, 2.0 mL/min), 分离纯化得到化合物 **3** (5.3 mg , $t_R = 21.7 \text{ min}$)。Fr. D2c (144.0 mg) 经半制备型高效液相色谱 (乙腈-水 $60:40$, 2.0 mL/min), 分离纯化得到化合物 **9** (10.4 mg , $t_R = 39.6 \text{ min}$)。Fr. D2d (236.0 mg) 经半制备型高效液相色谱 (乙腈-水 $50:50$, 2.0 mL/min) 分离得到 4 个混合物组分 (Fr. D2d1~D2d4)。Fr. D2d1 (53.1 mg) 经半制备型高效液相色谱 (乙腈-水 $35:65$, 2.0 mL/min) 分离纯化得到化合物 **6** (7.1 mg , $t_R = 36.8 \text{ min}$)、**7** (4.3 mg , $t_R = 53.3 \text{ min}$) 和 **8** (5.8 mg , $t_R = 56.7 \text{ min}$)。Fr. D2d2 (92.0 mg) 再经半制备型高效液相色谱 (正己烷-乙醇 $90:10$, 2.0 mL/min) 纯化得到化合物 **1** (10.5 mg , $t_R = 51.0 \text{ min}$)。Fr. D2d4 (36.1 mg) 经半制备型高效液相色谱 (正己烷-乙醇 $98:2$, 2.0 mL/min) 分离纯化得到化合物 **5** (13.7 mg , $t_R = 30.2 \text{ min}$)。Fr. D2e (437.0 mg) 经半制备型高效液相色谱 (乙腈-水 $50:50$, 2.0 mL/min) 分离, 得到化合物 **4** (220.1 mg , $t_R = 43.6 \text{ min}$)。Fr. D2h (235.0 mg) 经半制备型高效液相色谱 (甲醇-水 $80:20$, 2.0 mL/min) 分离得到化合物 **2** (80.0 mg , $t_R = 41.0 \text{ min}$)。

2.2 体外细胞毒活性测试

依据文献方法^[16], 以顺铂作为阳性对照, 采用 CCK-8 法对分离的 9 个化合物 (**1**~**9**) 进行 A549 细胞的体外细胞毒活性测定。细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 于 37°C 、5% CO_2 条件下孵育, 随后接种到 96 孔板 (3×10^3 个/孔) 中, 培养至细胞贴壁。实验设置空白组、对照组、阳性对照组和实验组。空白组只加入 DMEM 培养基不加细胞, 对照组顺铂和实验组化合物 (**1**~**9**) 分别设置 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 的不同浓度, 孵

育 24 h。根据 CCK-8 试剂盒说明书,用酶标仪检测每孔在 450 nm 处的吸光度 (*A*) 值,每组重复 3 次独立实验,计算细胞存活率,通过 GraphPad Prism 9.0 进行非线性回归分析,计算 IC₅₀ 值。

细胞存活率=(*A*_{给药}−*A*_{空白})/(*A*_{对照}−*A*_{空白})

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状物。HR-ESI-MS *m/z*: 323.093 1 [*M*−*H*][−] (计算值 C₁₉H₁₅O₅, 323.091 9), 结合该化合物氢谱和碳谱确定其分子式为 C₁₉H₁₆O₅, 不饱和度为 12。UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 220 (3.29)。IR 吸收峰显示化合物 **1** 中存在羟基 (3 376 cm^{−1}), 羰基 (1 697 cm^{−1}) 和苯环 (1 613、1 592 和 1 509 cm^{−1}) 基团。根据 ¹H-NMR 数据 (表 1) 显示化合物 **1** 存在 1 组 1,2,4,5-四取代苯环氢信号 [δ_{H} 7.77 (1H, s, H-2'), 6.94 (1H, s, H-5')], 1 组对位二取代苯环氢信号 [δ_{H} 7.87 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 7.85 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.88 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3), 6.87 (1H, d, *J* = 2.1

Hz, H-5)], 1 组顺式烯烃信号 [δ_{H} 6.57 (1H, dq, *J* = 11.5, 1.8 Hz, H-8'), 5.83 (1H, dd, *J* = 11.5, 7.0 Hz, H-7')], 1 个甲氧基信号 [δ_{H} 3.88 (3H, s)] 和 1 个甲基信号 [δ_{H} 1.87 (3H, dd, *J* = 7.0, 1.8 Hz, H-9')]¹³C-NMR 和 DEPT-135 提示化合物 **1** 有 19 个碳信号, 其中 12 个为芳香碳信号 (δ_{C} 160.5, 155.0, 154.7, 131.9, 131.9, 123.8, 123.6, 122.3, 120.3, 115.9, 115.9, 97.9), 1 个酯羰基碳 (δ_{C} 166.3), 2 个烯烃碳 (δ_{C} 126.8 和 127.0), 1 个甲氧基碳 (δ_{C} 51.9) 和 1 个甲基碳 (δ_{C} 14.8)。以上数据提示化合物 **1** 为苯骈呋喃类木脂素^[17]。

¹H-¹H COSY (图 2) 显示 H-2/H-3, H-5/H-6 和 H-9'/H-8'/H-7' 的 3 组自旋偶合系统。HMBC 谱中 H-2/6 与 C-1, C-4 和 C-7 相关; H-3/5 与 C-1 和 C-4 相关; OCH₃ 与 C-9 相关; H-2'与 C-1', C-3', C-4', C-6', C-7 和 C-8 相关; H-5'与 C-1', C-3', C-4'和 C-6'相关; H-7'与 C-1', C-2'和 C-6'相关。H-7'和 H-8'的偶合常数 (*J* = 11.5 Hz) 确定双键为顺式。以上信息确定化合物

表 1 化合物 1 和 2 的 ¹H-和 ¹³C-NMR (600/150 MHz)
Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR of compounds 1 and 2 (600/150 MHz)

碳位	1 ^a		2 ^b	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	123.6		119.4	
2	131.9	7.87 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	130.9	7.87 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)
3	115.9	6.88 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	115.1	6.92 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)
4	160.5		159.8	
5	115.9	6.87 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	115.1	6.94 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
6	131.9	7.85 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	130.9	7.86 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
7	161.5		161.1	
8	107.9		106.3	
9	166.3		163.7	
1'	122.3		133.8	
2'	123.8	7.77 (s)	118.9	7.88 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)
3'	120.3		127.0	
4'	154.7		152.0	
5'	97.9	6.94 (s)	111.1	7.57 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz)
6'	155.0		122.9	7.43 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.8 Hz)
7'	127.0	5.83 (dd, <i>J</i> = 11.5, 7.0 Hz)	130.8	6.55 (dd, <i>J</i> = 15.8, 1.9 Hz)
8'	126.8	6.57 (dq, <i>J</i> = 11.5, 1.8 Hz)	125.0	6.30 (dq, <i>J</i> = 15.8, 6.6 Hz)
9'	14.8	1.87 (dd, <i>J</i> = 7.0, 1.8 Hz)	18.3	1.87 (dd, <i>J</i> = 6.6, 1.9 Hz)
OCH ₃	51.9	3.88 (s)	51.6	3.87 (s)
4-OH				10.28 (brs)

^a在 CD₃OD 中测试, ^b在 DMSO-*d*₆ 中测试。

^arecord in CD₃OD, ^brecord in DMSO-*d*₆.

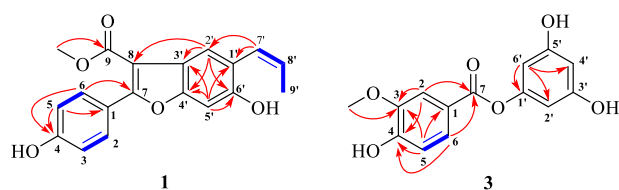


图2 化合物1和3的关键 ^1H - ^1H COSY和HMBC相关信号
Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlation signals of compounds 1 and 3

1 的平面结构, 鉴定为 (*Z*)-6-羟基-2-(4-羟基苯基)-5-(1-丙烯基)苯并呋喃-3-甲酸甲酯。经 SCIFinder 查询, 该化合物为新化合物, 命名为牛耳枫素 A。

化合物 **2**: 白色无定型粉末。HR-ESI-MS m/z : 307.098 5 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ (计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{O}_4$, 307.097 0), 结合该化合物氢谱和碳谱确定其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$, 不饱和度为 12。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 238 (3.59)。IR 吸收峰显示化合物 **2** 中存在羟基 ($3\,324\text{ cm}^{-1}$), 羰基 ($1\,691\text{ cm}^{-1}$) 和苯环 ($1\,612$ 、 $1\,590$ 、 $1\,513\text{ cm}^{-1}$) 基团。根据 ^1H -NMR 数据 (表 1) 显示化合物 **2** 存在 1 组 1,2,4-三取代苯环氢信号 [δ_{H} 7.88 (1H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-2'), 7.57 (1H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$, H-5'), 7.43 (1H, dd, $J = 8.6, 1.8\text{ Hz}$, H-6')], 1 组对位二取代苯环氢信号 [δ_{H} 7.87 (1H, d, $J = 2.0\text{ Hz}$, H-2), 7.86 (1H, d, $J = 2.1\text{ Hz}$, H-6), 6.94 (1H, d, $J = 2.1\text{ Hz}$, H-5), 6.92 (2H, d, $J = 2.0\text{ Hz}$, H-3)], 1 组反式烯烃氢信号 [δ_{H} 6.55 (1H, dd, $J = 15.8, 1.9\text{ Hz}$, H-7'), 6.30 (1H, dq, $J = 15.8, 6.6\text{ Hz}$, H-8')], 1 个甲氧基信号 [δ_{H} 3.87 (3H, s)] 和 1 个甲基信号 [δ_{H} 1.87 (3H, dd, $J = 6.6, 1.9\text{ Hz}$)]. ^{13}C -NMR 和 DEPT 135 提示化合物 **1** 有 19 个碳信号, 包括 1 个甲基碳、1 个甲氧基碳、9 个次甲基以及 8 个季碳信号。以上数据结合之前报道的虎皮楠属植物化学成分^[6], 化合物 **2** 与已知化合物 **4** 的数据相似, 其显著区别为化合物 **2** 在 C-6' (δ_{C} 130.8) 的位置没有羟基。化合物 **2** 的二维核磁数据进一步确定了该化合物的平面结构, SCIFinder 检索显示该化合物为 methyl (*E*)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(1-propen-1-yl)-3-benzofurancarboxylate, 为新天然产物, 首次从牛耳枫中发现, 因此命名为牛耳枫素 B。

化合物 **3**: 黄色油状物。HR-ESI-MS m/z : 275.056 6 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ (计算值 $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_6$, 275.055 6), 结合该化合物氢谱和碳谱确定其分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 204 (4.39)。IR 吸收峰显

示化合物 **3** 中可能存在羟基 ($3\,386\text{ cm}^{-1}$)、羰基 ($1\,709\text{ cm}^{-1}$) 和苯环 ($1\,608$ 、 $1\,515$ 、 $1\,464\text{ cm}^{-1}$) 基团。 ^1H -NMR 数据 (表 2) 显示化合物 **3** 存在 1 组 1,3,4-三取代苯环氢信号 [δ_{H} 7.68 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0\text{ Hz}$, H-6), 7.64 (1H, d, $J = 2.0\text{ Hz}$, H-2), 6.90 (1H, d, $J = 8.3\text{ Hz}$, H-5)], 1 组 1,3,5-间位三取代苯环氢信号 [δ_{H} 6.18 (1H, dd, $J = 2.1, 2.1\text{ Hz}$, H-4'), 6.12 (2H, dd, $J = 2.1, 2.1\text{ Hz}$, H-2', 6')] 和 1 个甲氧基氢信号 [δ_{H} 3.92 (3H, s)]。 ^{13}C -NMR 和 DEPT-135 提示化合物 **1** 有 14 个碳信号, 包括 7 个季碳 (δ_{C} 166.6, 160.2, 160.2, 154.0, 153.7, 149.0, 121.7), 6 个次甲基碳信号 (δ_{C} 125.7, 116.2, 113.9, 101.6, 101.6, 101.2) 和 1 个甲氧基碳信号 (δ_{C} 56.5)。

表2 化合物3的 ^1H -和 ^{13}C -NMR (600/150 MHz, CD_3OD)
Table 2 ^1H - and ^{13}C -NMR of compound 3 (600/150 MHz, CD_3OD)

碳位	δ_{C}	δ_{H}
1	121.7	
2	113.9	7.64 (d, $J = 2.0\text{ Hz}$)
3	149.0	
4	153.7	
5	116.2	6.90 (d, $J = 8.3\text{ Hz}$)
6	125.7	7.68 (dd, $J = 8.3, 2.0\text{ Hz}$)
7	166.6	
1'	154.0	
2'	101.6	6.12 (dd, $J = 2.1, 2.1\text{ Hz}$)
3'	160.2	
4'	101.2	6.18 (dd, $J = 2.1, 2.1\text{ Hz}$)
5'	160.2	
6'	101.6	6.12 (dd, $J = 2.1, 2.1\text{ Hz}$)
OCH ₃	56.5	3.92 (s)

化合物 **3** 的平面结构可由 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 谱确定。1 个 3-甲氧基香草酸结构单元由 ^1H - ^1H COSY 谱中 H-5/H-6 自旋偶合系统和 HMBC 中 H-2 与 C-1, C-3, C-4, C-6 及 C-7 相关, H-5 与 C-1, C-3 及 C-4 相关, H-6 与 C-2, C-4 及 C-7 相关确定。1 个间苯三酚结构单元由该化合物 3 个间位氢特性及苯环碳化学位移确定。根据 C-7 (δ_{C} 166.6) 和 C-1' (δ_{C} 154.0) 的化学位移及该化合物的分子式确定了 3-甲氧基香草酸与间苯三酚结构单元通过 C-7 和 C-1' 的酯键相连。推断其结构为 (3,5-dihydroxyphenyl)-4-hydroxy-3-methoxybenzoate; 经 SCIFinder 查询, 化合物 **3** 为新化合物, 并命名为牛耳枫素 C。

化合物 **4**: 白色无定型粉末。HR-ESI-MS m/z :

323.093 3 $[M-H]^-$, 确定其分子式为 $C_{19}H_{15}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.87 (1H, s, Ar-H), 7.84 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 7.83 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 6.88 (1H, s, Ar-H), 6.87 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 6.86 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 6.75 (1H, ddd, $J = 15.8$, 1.9, 0.6 Hz, H-7'), 6.23 (1H, dd, $J = 15.8$, 6.6 Hz, H-8'), 3.89 (3H, s, OCH_3), 1.90 (3H, dd, $J = 6.6$, 1.9 Hz, H-9'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.4 (C-9), 161.5 (C-7), 160.5 (C-4), 154.8 (C-6'), 154.4 (C-4'), 131.9 (C-2), 131.9 (C-6), 127.6 (C-7'), 125.8 (C-8'), 124.8 (C-1'), 122.3 (C-1), 120.0 (C-2'), 120.8 (C-3'), 115.9 (C-3), 115.9 (C-5), 107.8 (C-8), 97.9 (C-5'), 51.9 (OCH_3), 19.0 (C-9)。上述数据与文献报道一致^[6], 确定其为 methyl (*E*)-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(prop-1-en-1-yl)benzofuran-3-carboxylate。

化合物 5: 黄色无定型粉末。HR-ESI-MS m/z : 287.123 9 $[M+H]^+$, 确定其分子式为 $C_{17}H_{18}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.30 ~ 7.29 (2H, overlapped, Ar-H), 6.84 ~ 6.83 (2H, overlapped, Ar-H), 6.11 ~ 6.09 (2H, overlapped, Ar-H), 5.16 (1H, s, OH), 4.91 (1H, dd, $J = 10.6$, 2.2 Hz, H-2), 3.80 (3H, s, 7- OCH_3), 3.75 (3H, s, 5- OCH_3), 2.75 (1H, m, H-3 α), 2.63 (1H, m, H-3 β), 2.16 (1H, m, H-4 α), 2.00 (1H, m, H-4 β); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 159.5 (C-7), 158.8 (C-5), 156.6 (C-9), 155.5 (C-4'), 134.1 (C-1'), 127.9 (C-2'), 127.9 (C-6'), 115.5 (C-3'), 115.5 (C-5'), 103.6 (C-10), 93.6 (C-8), 91.6 (C-6), 77.8 (C-2), 55.7 (OCH_3), 55.6 (OCH_3), 29.6 (C-3), 19.6 (C-4)。上述数据与文献报道一致^[18], 确定其为 4-[(2*S*)-3,4-dihydro-5,7-dimethoxy-2*H*-1-benzopyran-2-yl]phenol。

化合物 6: 灰色针晶 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 289.099 3 $[M+H]^+$, 确定其分子式为 $C_{16}H_{16}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.22 ~ 7.20 (2H, overlapped, H-3', 6'), 6.79 ~ 6.78 (2H, overlapped, H-4', 5'), 6.03 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 5.93 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8a), 4.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-2), 3.98 (1H, dd, $J = 8.1$, 5.5 Hz, H-3), 3.76 (3H, s, OCH_3), 2.85 (1H, dd, $J = 16.3$, 5.5 Hz, H-4 β), 2.49 (1H, dd, $J = 16.3$, 8.1 Hz, H-4 α); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 160.1 (C-5), 158.4 (C-4'), 158.3 (C-7), 156.7 (C-8a), 131.4 (C-1'), 129.6 (C-2'), 116.0 (C-3'), 101.7 (C-4a), 96.3 (C-8), 92.7 (C-6), 82.8 (C-2), 68.7 (C-3), 55.8 (OCH_3), 28.7 (C-4)。上述数据与文献报道一致^[19], 确定其为

5-*O*-methylafzelechin。

化合物 7: 白色无定型粉末。HR-ESI-MS m/z : 291.079 8 $[M+H]^+$, 确定其分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.84 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 6.72 (1H, dd, $J = 8.1$, 2.1 Hz, Ar-H), 5.93 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 5.86 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 4.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 4.57 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2), 3.98 (1H, m, H-3), 2.85 (1H, dd, $J = 16.1$, 5.4 Hz, H-4 α), 2.51 (1H, dd, $J = 16.1$, 8.1 Hz, H-4 β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 157.8 (C-7), 157.6 (C-5), 156.9 (C-9), 146.2 (C-3'), 146.2 (C-4'), 132.2 (C-1'), 120.0 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.2 (C-2'), 100.8 (C-10), 96.3 (C-6), 95.5 (C-8), 82.8 (C-2), 68.8 (C-3), 28.5 (C-4)。上述数据与文献报道一致^[20], 确定其为儿茶素。

化合物 8: 白色无定型粉末。HR-ESI-MS m/z : 291.082 4 $[M+H]^+$, 确定其分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.98 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 6.80 (1H, dd, $J = 8.1$, 2.0 Hz, Ar-H), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 5.94 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 5.92 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 4.82 (1H, m, H-2), 4.18 (1H, dd, $J = 4.6$, 3.1 Hz, H-3), 2.86 (1H, dd, $J = 16.7$, 4.6 Hz, H-4 α), 2.74 (1H, dd, $J = 16.7$, 3.1 Hz, H-4 β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 158.0 (C-7), 157.7 (C-5), 157.4 (C-9), 145.9 (C-4'), 145.8 (C-3'), 132.3 (C-1'), 119.4 (C-6'), 115.9 (C-2'), 115.3 (C-5'), 100.1 (C-10), 96.4 (C-6), 95.9 (C-8), 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.3 (C-4)。上述数据与文献报道一致^[21], 确定其为表儿茶素。

化合物 9: 淡黄色粉末。HR-ESI-MS m/z : 289.063 3 $[M+H]^+$, 确定其分子式为 $C_{15}H_{12}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.35 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.34 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6'), 6.83 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 6.82 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5'), 5.93 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.88 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 4.98 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-2), 4.54 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 198.6 (C-4), 168.8 (C-7), 165.4 (C-5), 164.4 (C-9), 159.3 (C-4'), 130.4 (C-2', 6'), 129.3 (C-1'), 116.2 (C-3', 5'), 101.9 (C-10), 97.4 (C-6), 96.3 (C-8), 85.0 (C-2), 73.7 (C-3)。以上数据与文献一致^[22], 确定其为香橙素。

3.2 体外细胞毒活性测定

使用 CCK8 法测试所分离化合物对 A549 细胞的细胞毒活性。结果显示, 化合物 1、2 和 4 有一定

的抑制活性, IC_{50} 分别为 (8.32 ± 1.50) 、 (14.03 ± 2.10) 、 (27.42 ± 0.95) $\mu\text{mol/L}$, 其他化合物在 40 $\mu\text{mol/L}$ 内无明显活性, 阳性药顺铂 IC_{50} 值为 (12.77 ± 0.84) $\mu\text{mol/L}$ 。结果表明, 化合物 **1** 和 **2** 表现出较好的抗 A549 活性。

4 讨论

本研究运用了多种柱色谱和波谱技术对牛耳枫叶乙醇提取物的非生物碱部位进行了化学成分研究, 共分离鉴定出 9 个非生物碱化合物, 包括苯骈呋喃型木脂素类 (**1**、**2** 和 **4**), 香草酸衍生物 (**3**), 黄烷醇类 (**5**~**8**) 和黄酮醇类 (**9**), 其中化合物 **1** 和 **3** 为新化合物, 分别命名为牛耳枫素 A 和 C; 化合物 **2** 为新天然产物, 命名为牛耳枫素 B; 化合物 **5**~**9** 为首次从牛耳枫中分离得到。同时, 通过体外 A549 的细胞毒性活性实验筛选出化合物 **1** 和 **2** 具有较好的增殖抑制活性。虎皮楠属植物的植物化学研究目前聚焦在生物碱, 关于该属植物的其他类化学成分的研究尚不充分, 本研究以牛耳枫叶的非生物碱部位为研究对象, 发现了多种类型的化合物, 进一步丰富了牛耳枫化学成分数据, 也为该属植物后续的植物化学研究提供了一定借鉴。

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 [M]. 北京: 科学出版社, 1980: 1.
- [2] 彭政忠, 张丽艳, 唐靖雯, 等. 黎药牛耳枫研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(1): 53-57.
- [3] Guo J Q, Li W L, Ma R C, *et al.* Daphnicalycinones A and B, *Daphniphyllum* alkaloids from the roots of *Daphniphyllum calycinum* with anti-inflammatory activity [J]. *Phytochem Lett*, 2025, 67: 102946.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 865-867.
- [5] Chen L J, Lv C, Meng Y P, *et al.* The latest progress in the chemistry of *Daphniphyllum* alkaloids [J]. *Molecules*, 2024, 29(23): 5498.
- [6] Ma X H, Yang J, Brown C, *et al.* Cytotoxic neolignans from the traditional Chinese medicine *Daphniphyllum macropodum* Miq [J]. *RSC Adv*, 2017, 7(83): 52970-52976.
- [7] Gamez E J, Luyengi L, Lee S K, *et al.* Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(5): 706-708.

- [8] Majumdar S, Roy S. Antibacterial and antioxidative activity of the leaves of *Daphniphyllum himalense* (Benth.) Muell. Arg. growing in Darjeeling hills [J]. *J Tradit Med*, 2012, 7(2): 81-86.
- [9] Yang J, Liu X, Fu J, *et al.* Calycindaphines A-J, *Daphniphyllum* alkaloids from the roots of *Daphniphyllum calycinum* [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(16): 9057-9066.
- [10] Roy S, Majumdar S. Antioxidative properties of the leaves of *Daphniphyllum chartaceum* Rosenthal [J]. *J Med Plants Res*, 7(18): 1239-1243.
- [11] Wu H F, Zhang X P, Ding L S, *et al.* *Daphniphyllum* alkaloids: Recent findings on chemistry and pharmacology [J]. *Planta Med*, 2013, 79(17): 1589-1598.
- [12] Gu P S, Jin Y, Jia S J, *et al.* Cyano-containing *Daphniphyllum* alkaloids with antienteroviral activity from the leaves and stems of *Daphniphyllum calycinum* Benth [J]. *Phytochemistry*, 2025, 239: 114610.
- [13] Chattopadhyay A K, Hanessian S. Recent progress in the chemistry of *Daphniphyllum* alkaloids [J]. *Chem Rev*, 2017, 117(5): 4104-4146.
- [14] He T, Zhou Y, Wang Y H, *et al.* Two new alkaloids from *Daphniphyllum angustifolium* Hutch [J]. *Helv Chim Acta*, 2011, 94(6): 1019-1023.
- [15] Liu S, Zhang J H, Di Y T, *et al.* *Daphniphyllum* alkaloids with cytotoxic activity from *Daphniphyllum angustifolium* [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(18): 2165-2170.
- [16] Pan X Y, Cai J Y, Liu K H, *et al.* Glaucatonones A-I: Guaiane-type sesquiterpenoids from the roots of *Lindera glauca* with anti-inflammatory activity [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 144: 107135.
- [17] González-Laredo R F, Karchesy J J. Neolignan glycosides from *Pseudotsuga menziesii* [J]. *Planta Med*, 1996, 62(6): 582-583.
- [18] Okamoto A, Ozawa T, Imagawa H, *et al.* Flavans from the pith of sago palm [J]. *Agr Biological Chem*, 1986, 50(6): 1655-1656.
- [19] Liao S G, Zhang B L, Wu Y, *et al.* New phenolic components from *Daphne giraldii* [J]. *Helv Chim Acta*, 2005, 88(11): 2873-2878.
- [20] Yan T. Flavonoids from leaves of *Heritiera littoralis* D [J]. *J Chin Pharm Sci*, 13(3): 214-216.
- [21] 李鑫, 徐浩南, 李世兴, 等. “太白七药”朱砂七化学成分研究 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1043-1050.
- [22] Jin H Z, Chen G, Li X F, *et al.* Flavonoids from *Rhododendron decorum* [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45(1): 85-86.

[责任编辑 王文倩]