

• 化学成分 •

黔产牛耳朵正丁醇部位中 1 个新的齐墩果烷型三萜糖苷

黄红英, 陈俊磊, 刘思妍, 陈 泉, 陈兴欣, 陈显容, 郝小江*, 顾 玮*

中药功效成分发掘与利用全国重点实验室, 贵州医科大学药学院, 贵州省天然产物研究中心, 贵州 贵阳 550014

摘 要: 目的 研究牛耳朵 *Primulina eburnea* 正丁醇部位的化学成分及其抗氧化和抗炎活性。方法 运用正、反相硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱与 RP-HPLC 等色谱学技术对化合物进行分离纯化, 并结合 NMR、UV、IR 等光谱学技术对其结构进行鉴定。进一步利用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 法和总抗氧化能力检测试剂盒 [total antioxidant capacity (T-AOC) assay kit, ABTS] 法评价所得化合物的抗氧化活性, 采用 Griess 法检测化合物对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 的影响来评估其抗炎活性。结果 从牛耳朵正丁醇部位中分离得到 20 个化合物, 分别鉴定为火焰木酸-28-*O*- β -D-龙胆二糖苷 (1)、木通苯乙醇苷 B (2)、2-(3,4-二羟基苯基)乙醇葡萄糖苷 (3)、红景天苷 (4)、酪醇 (5)、6-hydroxyapigenin-7-*O*- β -[2-*O*- β -xyloglucoside] (6)、淫羊藿醇 A₂ (7)、(+)-异落叶松脂素 (8)、5-甲氧基-(+)-异落叶松脂素 (9)、(+)-丁香脂素-4'-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (10)、二氢菜豆酸 (11)、(6*S*,9*R*)-长寿花糖苷 (12)、七叶内酯 (13)、对羟基苯甲酸 (14)、原儿茶酸 (15)、香草酸 (16)、丁香酸 (17)、咖啡酸 (18)、咖啡酸甲酯 (19)、3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基-4-羟基咖啡酸甲酯 (20)。化合物 7、17 和 18 表现出显著的抗氧化活性。化合物 3、5~9 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 的生成有显著的抑制作用。结论 化合物 1 为新的三萜糖苷类, 命名为牛耳朵苷 A, 化合物 4、6、7、9~12、14、15 和 20 为报春苣苔属植物首次分得, 化合物 17 和 18 为牛耳朵植物中首次分得, 且部分化合物表现出显著抗氧化和抗炎活性。

关键词: 苦苣苔科; 牛耳朵; 三萜糖苷; 抗氧化活性; 抗炎活性; 牛耳朵苷 A; 红景天苷; 淫羊藿醇 A₂; 丁香酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)01-0013-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.01.002

A new oleanane-type triterpenoid glycoside from *n*-butanol fraction of *Primulina eburnea* from Guizhou

HUANG Hongying, CHEN Junlei, LIU Siyan, CHEN Quan, CHEN Xingxin, CHEN Xianrong, HAO Xiaojiang, GU Wei

State Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components in Traditional Chinese Medicine, Natural Products Research Center of Guizhou Province, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents, antioxidant activity and anti-inflammatory activity of the *n*-butanol fraction from *Primulina eburnea*. **Methods** Compounds were separated and purified using chromatographic techniques such as normal-phase and reversed-phase silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography and RP-HPLC. Meanwhile, their structures were identified by spectroscopic techniques including NMR, UV and IR. Subsequently, the antioxidant activities of obtained compounds were evaluated by the DPPH and ABTS assays, while the Griess assay was employed to determine the effect of these compounds on NO production in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells to assess their anti-inflammatory activity. **Results** A total of 20 compounds were isolated from the *n*-butanol fraction of *P. eburnea* and were respectively identified as spathodic acid-28-*O*- β -D-gentiobioside (1), calceolarioside B (2), 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol glucoside (3), salidroside (4), tyrosol (5), 6-hydroxyapigenin-7-*O*- β -[2-*O*- β -xyloglucoside] (6), icariol A₂ (7), (+)-isolariciresinol (8), 5-methoxy-(+)-isolariciresinol (9), (+)-

收稿日期: 2025-11-07

基金项目: 贵州省自然科学基金重点项目 (黔科合基础-ZK[2024]重点 084)

作者简介: 黄红英, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 2836168052@qq.com

*通信作者: 郝小江, 研究员, 博士生导师, 从事植物化学研究。E-mail: haoxj@mail.kib.ac.cn

顾 玮, 研究员, 博士生导师, 从事民族药物化学研究。E-mail: guwei2009@126.com

syringaresinol-4'-*O*- β -*D*-glucopyranoside (10), dihydrophaseic acid (11), (6*S*,9*R*)-roseoside (12), esculetin (13), *p*-hydroxybenzoic acid (14), protocatechuic acid (15), vanillic acid (16), syringic acid (17), caffeic acid (18), caffeic acid methyl ester (19) and methyl-3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-4-hydroxy caffeic acid (20). Meanwhile, compounds 7, 17 and 18 exhibited significant antioxidant activity. Compounds 3, 5—9 exhibited significant inhibitory effects on the production of NO in LPS-induced RAW264.7 cells. **Conclusion** Compound 1 is a new triterpenoid glycoside, named eburneoside A. While compounds 4, 6, 9—12, 14, 15 and 20 were isolated for the first time from the genus *Primulina*. Additionally, compounds 17 and 18 were firstly isolated from *P. eburnea*. Furthermore, some of these compounds exhibited significant antioxidant and anti-inflammatory activities.

Key words: Gesneriaceae; *Primulina eburnea* (Hance) Yin Z. Wang; triterpenoid glycoside; antioxidant activity; anti-inflammatory activity; eburneoside A; salidroside; icariol A₂; syringic acid

牛耳朵 *Primulina eburnea* (Hance) Yin Z. Wang 为苦苣苔科 (Gesneriaceae) 报春苣苔属 *Primulina* Hance 植物, 俗名为岩白菜、山金兜菜、爬面虎等, 主要分布于贵州、广西北部、广东北部、湖南东南部、四川南部及东部、湖北西部, 生于石灰山林中石上或沟边林下, 海拔 100~1 500 m^[1]。牛耳朵以其全草或根茎入药, 具有清肺止咳、凉血止血、解毒等功效, 主要用于治疗阴虚肺热、咳嗽咯血, 肺结核和红崩白带等病症^[2]。《贵州民族常用天然药物》记载了多个贵州民族对牛耳朵的药用方法, 布依族以其配白龙须、白及和五匹风, 温开水送服治疗肺结核; 仡佬族将其入鸡腹炖烂喝汤治疗肾虚; 水族用鲜全草捶烂兑酒包敷关节, 治疗红肿性关节炎^[3]。牛耳朵中已经报道的化学成分有苯乙醇苷类、黄酮类、醌类、萜类和甾体类等^[4-8], 现代药理学研究表明其具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、降压等作用^[7-11]。目前, 国内外对牛耳朵的化学成分及其生物活性的研究较少, 仅局限在广西和贵州 2 个产区。本课题组前期从黔产牛耳朵醋酸乙酯萃取部位分离鉴定 36 个化合物, 主要包括苯乙醇苷类、萜类、醌类和黄酮类等成分^[8,11], 为充分挖掘牛耳朵的化学成分, 因此, 本课题继续对其正丁醇萃取部位的化学成分进行分离, 并进一步评价其抗氧化和抗炎活性, 为该药用植物的开发应用提供科学依据。

本研究从黔产牛耳朵正丁醇部位中分离得到 20 化合物, 分别鉴定为火焰木酸-28-*O*- β -*D*-龙胆二糖苷 (spathodic acid-28-*O*- β -*D*-gentiobioside, 1)、木通苯乙醇苷 B (calceolarioside B, 2)、2-(3,4-二羟基苯基) 乙醇葡萄糖苷 [2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol glucoside, 3]、红景天苷 (salidroside, 4)、酪醇 (tyrosol, 5)、6-hydroxyapigenin-7-*O*- β -[2-*O*- β -xyloglucoside] (6)、淫羊藿醇 A₂ (icariol A₂, 7)、(+)-异落叶松脂素 [(+)-isolariciresinol, 8]、5-甲氧基-(+)-异落叶松脂素 [5-methoxy-(+)-

isolariciresinol, 9]、(+)-丁香脂素-4'-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 [(+)-syringaresinol-4'-*O*- β -*D*-glucopyranoside, 10]、二氢菜豆酸 (dihydrophaseic acid, 11)、(6*S*,9*R*)-长寿花糖苷 [(6*S*,9*R*)-roseoside, 12]、七叶内酯 (esculetin, 13)、对羟基苯甲酸 (*p*-hydroxybenzoic acid, 14)、原儿茶酸 (protocatechuic acid, 15)、香草酸 (vanillic acid, 16)、丁香酸 (syringic acid, 17)、咖啡酸 (caffeic acid, 18)、咖啡酸甲酯 (caffeic acid methyl ester, 19)、3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基-4-羟基咖啡酸甲酯 (methyl-3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-4-hydroxy caffeic acid, 20)。其中化合物 1 为新化合物, 命名为牛耳朵苷 A (eburneoside A); 化合物 4、6、7、9~12、14、15 和 20 为报春苣苔属植物中首次分得, 化合物 17 和 18 为牛耳朵植物中首次分得。此外, 化合物的体外抗氧化活性采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 和总抗氧化能力检测试剂盒 [total antioxidant capacity (T-AOC) assay kit, ABTS] 法进行评价。采用 Griess 法对化合物的体外抗炎活性进行筛选。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪 (沃特世公司, 美国); 鼓风干燥箱 (上海恒科学仪器有限公司); HP1100 型液相色谱质谱联用仪 (惠普公司, 美国); 半制备 HPLC 色谱柱 PrePulite Perfect T3 (250 mm×10 mm, 5 μ m, 广州微纯生物科技有限公司); Bruker Avance NEO 600 MHz 超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); AUTOPOL1 自动旋光仪 (鲁道夫公司, 美国); API Qstar Pulsar 质谱仪; 柱色谱硅胶和薄层柱色谱硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); 反相填充材料 RP-18 (Merck 公司, 德国); Sephadex LH-20 型凝胶 (Pharmacia 公司, 美国); EYELA OSB-2200 型旋转蒸发仪 (东京理化器械株式会社, 日本); BioTek Epoch 全波长酶标仪 (BioTek 公司, 美国);

DLSB-5/20C 低温冷却液循环泵（郑州长城科工贸有限公司）。本实验所用甲醇、丙酮、二氯甲烷、石油醚等有机溶剂均为工业级，重蒸后使用；邻甲苯异硫氰酸酯（安徽泽升科技有限公司）；氘代甲醇（美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司）；色谱级甲醇（批号 P3607276，上海阿达玛斯试剂有限公司）；L-抗坏血酸（批号 C17072198，山东科源生化有限公司）；L-半胱氨酸甲酯盐酸盐（批号 F2302667，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；胎牛血清（批号 A424042，美国 Gemini Bio 公司）；一氧化氮试剂盒（批号 A060250311，上海碧云天生物技术股份有限公司）；胰酶（批号 32724004CJ，北京兰杰柯科技有限公司）；脂多糖（lipopolysaccharide, LPS，批号 112H036，上海叶源生物科技有限公司）。

牛耳朵全草于 2021 年 3 月采自贵州省安顺市紫云苗族布依族自治县，经贵州省天然产物研究中心顾玮研究员鉴定为牛耳朵 *P. eburnea* (Hance) Y. Z. Wang，凭证标本（GZCNP-G-2021-003）保存于贵州省天然产物研究中心。

2 方法

2.1 提取与分离

牛耳朵干燥全草（30.0 kg）粉碎后过 40 目筛，用 80% 甲醇加热回流提取 6 次（3 h/次），减压浓缩得粗提取物浸膏（2.9 kg）。用适量的水溶解浸膏后，依次用石油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取，减压浓缩各部分萃取液得到石油醚部位（505.0 g）、醋酸乙酯部位（210.0 g）和正丁醇部位（1.1 kg）。将正丁醇萃取物（1.1 kg）用正相硅胶柱色谱（40~80 目）进行分离，洗脱溶剂为三氯甲烷-甲醇（20：1→1：1），结合 TLC 分析合并相似流分，得到 5 个组分（Fr. A~E）。

Fr. A（23.0 g）用 MCI 柱色谱分离，以甲醇-水（0：100→100：0）梯度洗脱，得到 10 个亚组分 Fr. A.1~A.10。Fr. A.1（6.3 g）用正相硅胶柱色谱（100~200 目）分离，以三氯甲烷-甲醇（100：1→1：1）梯度洗脱，得到 9 个组分 Fr. A.1a~A.1i。其中，Fr. A.1a（1.1 g）和 Fr. A.1c（522.4 mg）经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离和 HPLC（乙腈-水-甲酸 25：75：0.04，2.0 mL/min）纯化，分别得到化合物 **16**（18.5 mg， t_R =16.0 min）、**14**（34.0 mg， t_R =14.0 min）；Fr. A.1e（1.1 g）经过正相硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离后，通过 HPLC（甲

醇-水-甲酸 20：80：0.04，2.0 mL/min）纯化得到化合物 **5**（34.0 mg， t_R =22.7 min）。Fr. A.2（989.5 mg）用正相硅胶柱色谱（200~300 目）分离，以三氯甲烷-甲醇（2：1→1：1）梯度洗脱得到化合物 **17**（39.0 mg）。Fr. A.4（1.3 g）经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离，得到 8 个组分 Fr. A.4a~A.4h。Fr. A.4e（769.0 mg）用正相硅胶柱色谱（200~300 目）分离，以二氯甲烷-甲醇（100：0→1：1）梯度洗脱，得到 10 个组分 Fr. A.4e-1~A.4e-10。其中 Fr. A.4e-5（188.0 mg）经过 HPLC（乙腈-水-甲酸 12：88：0.04，2.0 mL/min）纯化得到化合物 **8**（70.0 mg， t_R =69.8 min）和 **9**（6.0 mg， t_R =62.3 min）；Fr. A.4e-6（77.0 mg）经过 HPLC（乙腈-水-甲酸 15：85：0.04，2.0 mL/min）纯化得到化合物 **7**（12.0 mg， t_R =52.7 min）。Fr. A.5（1.4 g）经过正相硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离，并进一步通过 HPLC（甲醇-水-甲酸 19：81：0.04，2.0 mL/min）纯化得到化合物 **10**（12.0 mg， t_R =91.5 min）。

Fr. B（207.0 g）用 RP-18 柱色谱分离，以甲醇-水（10：90→100：0）梯度洗脱，得到 12 个亚组分 Fr. B.1~B.12。Fr. B.1（4.4 g）用正相硅胶柱色谱（300~400 目）分离，以二氯甲烷-甲醇（10：1→1：1）梯度洗脱得到 8 个组分 Fr. B.1a~B.1h。其中，Fr. B.1c（937.0 mg）经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离和 HPLC（乙腈-水-甲酸 10：90：0.04，2.0 mL/min）纯化得到化合物 **2**（31.0 mg， t_R =73.0 min）；Fr. B.2（8.9 g）反复经过正相硅胶柱色谱（200~300 目）分离，以二氯甲烷-甲醇（20：1→1：1）梯度洗脱，得到 8 个组分 Fr. B.2a~B.2h。Fr. B.2g（202.5 mg）经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离和 HPLC（乙腈-水-甲酸 5：95：0.04，2.0 mL/min）纯化得到化合物 **3**（157.5 mg， t_R =18.5 min）。Fr. B.2c（1.0 g）先依次经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和正相硅胶柱色谱（200~300 目）分离后，再用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离和 HPLC（乙腈-水-甲酸 5：95：0.04，2.0 mL/min）纯化得到化合物 **4**（19.0 mg， t_R =47.5 min）；Fr. B.3（146.5 g）反复经过正相硅胶柱色谱（100~200 目）分离，以二氯甲烷-甲醇（20：1→1：1）梯度洗脱，得到 10 个组分 Fr. B.3a~B.3j。Fr. B.3a（314.5 mg）经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离和 HPLC（乙腈-水-甲酸 30：70：0.04，2.0 mL/min）纯化得到化合物 **19**（7.4 mg， t_R =9.3 min）。Fr. B.3d（1.4 g）经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱

分离, 得到 15 个组分 Fr. B.3d-1~B.3d-15。Fr. B.3d-9 (75.7 mg) 经过 HPLC (乙腈-水-甲酸 15:85:0.04, 2.0 mL/min) 纯化得到化合物 **18** (48 mg, $t_R=23.0$ min)。Fr. B.3d-2 (175.5 mg) 用正相硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以二氯甲烷-甲醇 (20:1→1:1) 梯度洗脱, 得到 8 个组分 Fr. B.3d-2.1~B.3d-2.8。Fr. B.3d-2.8 (27.5 mg) 经过 HPLC (甲醇-水-甲酸 35:65:0.04, 2.0 mL/min) 纯化得到化合物 **11** (4.0 mg, $t_R=13.5$ min)。Fr. B.3d-8 (103.0 mg) 用正相硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以二氯甲烷-甲醇 (50:1→10:1) 梯度洗脱, 得到 8 个组分 Fr. B.3d-8.1~B.3d-8.8。Fr. B.3d-8.4 (11.5 mg) 经过 HPLC (甲醇-水-甲酸 35:65:0.04, 2.0 mL/min) 纯化得到化合物 **13** (4.6 mg, $t_R=14.5$ min)。Fr. B.3d-8.6 (56.6 mg) 经过 HPLC (甲醇-水-甲酸 30:70:0.04, 2.0 mL/min) 纯化得到化合物 **15** (26.0 mg, $t_R=11.0$ min)。Fr. B.3h (1.9 g) 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离和正相硅胶柱色谱分离后, 用 HPLC (甲醇-水-甲酸 20:80:0.04, 2.0 mL/min) 纯化得到化合物 **12** (17.5 mg, $t_R=57.5$ min)。

Fr. C 经过重结晶 (三氯甲烷-甲醇 7:1) 后得到化合物 **6** (312.0 mg), 其母液 (94.4 g) 用 RP-18 柱色谱分离, 以甲醇-水 (10:90→100:0) 梯度洗脱, 得到 11 个组分 Fr. C.1~C.11。Fr. C.4 (23.2 g) 经过正相硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离后, 用 HPLC (甲醇-水 35:65, 2.0 mL/min) 纯化得到化合物 **20** (6.6 mg, $t_R=47.0$ min)。Fr. C.7 (5.2 g) 经过正相硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 后, 重结晶 (甲醇) 得到化合物 **1** (27.0 mg)。

2.2 抗氧化活性筛选

2.2.1 DPPH 自由基清除活性测试 参考文献报道的方法^[12]测试化合物的 DPPH 自由基清除活性。以色谱甲醇为溶剂, 配制浓度为 0.150 0 mmol/L 的 DPPH 溶液和 3 mg/mL 的样品母液, 样品使用时稀释成不同终质量浓度 (30.000 0、15.000 0、7.500 0、3.750 0、1.875 0、0.937 5 $\mu\text{g/mL}$)。实验分为空白对照组 (160 μL 甲醇和 40 μL DPPH)、样品组 (160 μL 样品和 40 μL DPPH) 和样品对照组 (160 μL 样品和 40 μL 甲醇), 加完样后避光充分反应 30 min, 测定在 517 nm 处的吸光度 (A) 值。根据如下公式计算 DPPH 的清除率, 以 *L*-抗坏血酸为阳性对照, 所有测定均平行重复 3 次, 并计算半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}}) / A_{\text{空白对照}}$$

$A_{\text{样品}}$ 为样品在溶液体系中反应后在 517 nm 处 A 值, $A_{\text{样品对照}}$ 为甲醇代替 DPPH 溶液在溶液体系中反应后在 517 nm 处 A 值, $A_{\text{空白对照}}$ 为甲醇代替样品在溶液体系中反应后在 517 nm 处 A 值

2.2.2 ABTS 自由基清除活性测试 参考文献报道的 ABTS 自由基清除活性的方法^[13]并稍作修改。将 7 mmol/L 的 ABTS 与 2.600 mmol/L 的过硫酸钾 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 溶液等体积混合均匀后室温避光反应 16 h, 临用前用色谱甲醇稀释 ABTS 储备液在波长 734 nm 处的 A 值为 $0.700 0 \pm 0.020 0$, 得到 ABTS^+ 工作液。化合物用甲醇溶解配制, 使用时稀释成不同终质量浓度 (30.000 0、15.000 0、7.500 0、3.750 0、1.875 0、0.937 5 $\mu\text{g/mL}$)。实验设置空白对照组 (40 μL 甲醇和 160 μL ABTS^+)、样品组 (40 μL 样品和 160 μL ABTS^+) 和样品对照组 (40 μL 样品和 160 μL 甲醇), 加完样后避光充分反应 6 min, 测定在 734 nm 处的 A 值。按照公式计算 ABTS 自由基清除率, 以 *L*-抗坏血酸为阳性对照, 所有测定均平行重复 3 次, 并计算 IC_{50} 值。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}}) / A_{\text{空白对照}}$$

$A_{\text{样品}}$ 为样品在溶液体系中反应后在 734 nm 处 A 值, $A_{\text{样品对照}}$ 为甲醇代替 ABTS^+ 工作液在溶液体系中反应后在 734 nm 处 A 值, $A_{\text{空白对照}}$ 为甲醇代替样品在溶液体系中反应后在 734 nm 处 A 值

2.3 NO 抑制活性筛选

2.3.1 RAW264.7 细胞的培养 将液氮冷冻保存的 RAW264.7 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中快速解冻复苏后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养生长, 并放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。

2.3.2 MTT 法检测化合物对 RAW264.7 细胞活力的影响 根据已报道的实验方法^[14]并稍作修改, 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中过夜培养后, 设置空白对照组 (不接种细胞)、对照组和实验组。实验组加入 100 μL 含有不同浓度药物的培养基, 其余各组均加入等量的培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后, 每孔加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 放培养箱中孵育 4 h。弃去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 震荡 10 min, 待结晶完全溶解后, 使用酶标仪于 490 nm 处测定各孔的 A 值。实验重复 3 次, 根据公式计算各组细胞的存活率。

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

$A_{\text{实验}}$ 为实验组 A 值, $A_{\text{空白}}$ 为空白组 A 值, $A_{\text{对照}}$ 为对照组 A 值

2.3.3 Griess 法检测化合物对 LPS 诱导 RAW264.7

细胞产生 NO 浓度的影响 根据已报道的实验方法^[15]并稍作修改, 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以每孔 5×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 过夜培养后, 设置对照组、模型组、阳性对照组和实验组。实验组加入含 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 和不同浓度药物的培养基, 阳性对照组加入含 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 和不同浓度阳性药地塞米松的培养基, 模型组加入含 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 的培养基, 空白对照组加入等量的培养基, 在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 24 h, 于 2000 r/min, 离心 10 min 后, 收集上清液, 按照一氧化氮试剂盒说明书检测 NO 含量, 实验重复 3 次。

3 结果

3.1 结构鉴定

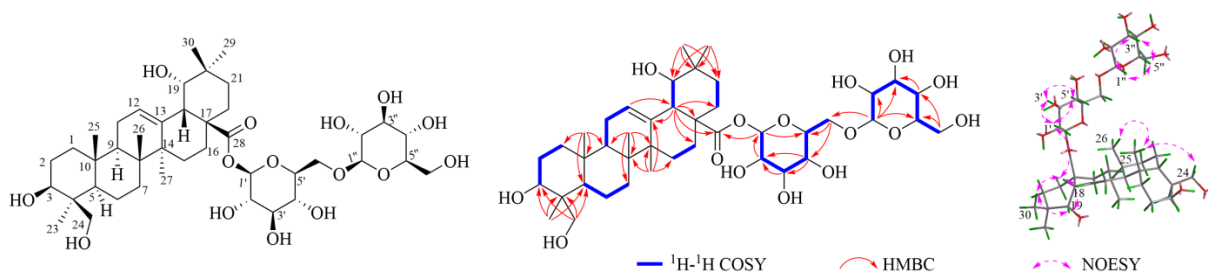
化合物 **1**: 白色针晶 (甲醇), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 20.0^\circ$ (MeOH, c 0.1), HR-ES-MS 图谱显示分子离子峰 (m/z) 835.445 5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 835.445 0), 推测其分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{15}$, 不饱和度为 9。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 397, 2 937, 1 726, 1 648, 1 456, 1 068, 1 031, 提示分子中存在羟基、酯基、双键和醚键。 ^1H -NMR 数据 (表 1) 显示该化合物有 6 个甲基质子信号 [δ_{H} 1.31 (3H, s), 1.03 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.94 (3H, s),

0.91 (3H, s), 0.72 (3H, s)], 1 个烯烃质子信号 [δ_{H} 5.32 (1H, d, $J=4.2$ Hz)], 4 个连氧碳上的氢信号 [δ_{H} 3.69 (1H, m), 3.39 (1H, m), 3.29 (1H, m), 3.27 (1H, m)], 葡萄糖中的端基质子信号 H-1' [δ_{H} 5.34 (1H, d, $J=7.8$ Hz)], H-1'' [4.34 (1H, d, $J=7.8$ Hz)] 及其相应 10 个连氧碳上的 12 个质子信号。结合 ^{13}C -NMR (表 1)、DEPT-135 以及 HSQC 谱确认该化合物有 42 个碳信号, 分别为 8 个季碳、16 个次甲基碳、12 个亚甲基碳和 6 个甲基碳。其中包括 1 个酯羰基 (δ_{C} 178.6)、2 个烯碳 (δ_{C} 144.3 和 125.0) 和 16 个连氧碳 (包括 2 组糖上的 12 个碳)。化合物 **1** 的苷元部分 ^1H - ^1H COSY 图谱显示如下相关信号: $\text{H}_2\text{-1}/\text{H}_2\text{-2}/\text{H}_3\text{-5}/\text{H}_2\text{-6}/\text{H}_2\text{-7}/\text{H}_9\text{-11}/\text{H}_2\text{-12}/\text{H}_2\text{-15}/\text{H}_2\text{-16}/\text{H}_2\text{-18}/\text{H}_2\text{-19}/\text{H}_2\text{-21}/\text{H}_2\text{-22}$; 结合 HMBC 图谱相关信号以及文献报道^[16]分析, 其苷元结构与火焰木酸一致。进一步分析化合物 **1** 的分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{15}$, 与苷元火焰木酸 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$) 相比, 相对分子质量差值为 324.4, 该数值与 2 分子葡萄糖 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 经缩合反应脱去 2 分子水 (H_2O) 的理论相对分子质量差值一致, 提示化合物 **1** 结构中较火焰木酸增加了 2 个葡萄糖基取代单元。再进一步通过 ^1H - ^1H COSY (图 1)

表 1 化合物 **1** 的核磁共振波谱数据 (600/150 MHz, CD_3OD)

Table 1 NMR spectroscopic data of compound **1** (600/150 MHz, CD_3OD)

| 碳位 | δ_{C} | δ_{H} | 碳位 | δ_{C} | δ_{H} |
|----|---------------------|---|-----|---------------------|--|
| 1 | 34.1, CH_2 | 1.48 (1H, m), 1.35 (1H, m) | 23 | 22.8, CH_3 | 1.03 (3H, s) |
| 2 | 26.0, CH_2 | 1.54 (1H, m), 1.94 (1H, m) | 24 | 66.2, CH_2 | 3.69 (1H, m), 3.39 (1H, m) |
| 3 | 71.3, CH | 3.29 (1H, m) | 25 | 16.2, CH_3 | 0.91 (3H, s) |
| 4 | 43.9, C | | 26 | 17.7, CH_3 | 0.72 (3H, s) |
| 5 | 50.8, CH | 1.42 (1H, m) | 27 | 25.0, CH_3 | 1.31 (3H, s) |
| 6 | 19.6, CH_2 | 1.51 (1H, m), 1.39 (1H, m) | 28 | 178.6, C | |
| 7 | 34.2, CH_2 | 1.37 (1H, m), 1.28 (1H, m) | 29 | 28.6, CH_3 | 0.94 (3H, s) |
| 8 | 41.0, C | | 30 | 25.3, CH_3 | 0.96 (3H, s) |
| 9 | 48.9, CH | 1.89 (1H, m) | 1' | 95.8, CH | 5.34 (1H, d, $J=7.8$ Hz) |
| 10 | 38.2, C | | 2' | 73.8, CH | 3.33 (1H, m) |
| 11 | 24.9, CH_2 | 1.92 (1H, m), 1.97 (1H, m) | 3' | 78.1, CH | 3.41 (1H, m) |
| 12 | 125.0, CH | 5.32 (1H, d, $J=4.2$ Hz) | 4' | 70.9, CH | 3.44 (1H, m) |
| 13 | 144.3, C | | 5' | 77.8, CH | 3.50 (1H, m) |
| 14 | 42.7, C | | 6' | 69.4, CH_2 | 4.11 (1H, dd, $J=12.0, 2.4$ Hz) 3.78 (1H, dd, $J=12.0, 4.8$ Hz) |
| 15 | 29.4, CH_2 | 1.62 (1H, m), 1.01 (1H, m) | 1'' | 104.6, CH | 4.34 (1H, d, $J=7.8$ Hz) |
| 16 | 28.4, CH_2 | 2.30 (1H, td, $J=13.2, 3.6$ Hz) 1.70 (1H, m) | 2'' | 75.1, CH | 3.21 (1H, m) |
| 17 | 47.2, C | | 3'' | 78.0, CH | 3.35 (1H, m) |
| 18 | 45.0, CH | 3.05 (1H, brs) | 4'' | 71.5, CH | 3.76 (1H, m) |
| 19 | 82.5, CH | 3.27 (1H, m) | 5'' | 78.0, CH | 3.24 (1H, m) |
| 20 | 36.0, C | | 6'' | 62.7, CH_2 | 3.84 (1H, dd, $J=12.0, 2.4$ Hz) 3.65 (1H, dd, $J=12.0, 5.4$ Hz) |
| 21 | 29.5, CH_2 | 1.75 (1H, m), 0.99 (1H, m) | | | |
| 22 | 33.4, CH_2 | 1.79 (1H, m), 1.65 (1H, m) | | | |

图 1 化合物 1 的结构及其关键 ^1H - ^1H COSY、HMBC 和 NOESY 相关Fig. 1 Structure of compound 1 and its key ^1H - ^1H COSY, HMBC and NOESY correlations

谱中存在的 H-1' (δ_{H} 5.34)/H-2' (δ_{H} 3.33)/H-3' (δ_{H} 3.41)/H-4' (δ_{H} 3.44)/H-5' (δ_{H} 3.50)/H-6' (δ_{H} 3.77) 和 H-1'' (δ_{H} 4.34)/H-2'' (δ_{H} 3.21)/H-3'' (δ_{H} 3.35)/H-4'' (δ_{H} 3.76)/H-5'' (δ_{H} 3.24)/H-6'' (δ_{H} 3.65) 相关, 并结合 HMBC 谱显示 H-1' (δ_{H} 5.34) 与 C-5' (δ_{C} 77.8) 和 H-1'' (δ_{H} 4.34) 与 C-5'' (δ_{C} 78.0) 相关以及 H-1'' (δ_{H} 4.34) 与 C-6' (δ_{C} 69.4) 的关键相关, 可推测化合物 1 的糖苷部分为 β -龙胆二糖基。通过 HMBC 谱 (图 1) 中 H-1' (δ_{H} 5.34) 与 C-28 (δ_{C} 178.6) 相关, 可确定葡萄糖基部分与火焰木酸的 C-28 位相连。通过 NOESY 谱 (图 1) 中 H-1' (δ_{H} 5.34) 与 H-18 (δ_{H} 3.05)、H-3' (δ_{H} 3.41)、H-5' (δ_{H} 3.50) 有相关, 以及 H-1'' (δ_{H} 4.34) 与 H-3'' (δ_{H} 3.35)、H-5'' (δ_{H} 3.24) 有相关确定糖的相对构型。

为进一步确定糖的绝对构型, 参考本课题组前期报道的酸水解及衍生化反应方法^[17], 化合物 1 经酸水解后, 其糖部分与 *D*-葡萄糖标准品均按上述方法的衍生化步骤处理, 分别得到化合物 1 糖部分的衍生物及 *D*-葡萄糖标准品衍生物。以 5% 乙腈水溶液-0.1% 甲酸为流动相, 体积流量 0.3 mL/min 的通过 LC-MS 对上述衍生物进行分析 50 min。结果显示化合物 1 糖部分的衍生物 (t_{R} = 16.3 min) 与 *D*-葡萄糖标准品衍生物 (t_{R} = 16.3 min) 的保留时间一致, 化合物 1 中葡萄糖的绝对构型被确定为 *D*-构型。因此, 化合物 1 鉴定为火焰木酸-28-*O*- β -*D*-龙胆二糖苷。经 Scifinder 数据库检索化合物 1 为新化合物, 命名为牛耳朵苷 A。

化合物 2: 白色粉末, ESI-MS m/z : 479.2 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.45 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7''), 7.05 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2''), 6.96 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz, H-6''), 6.74 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5''), 6.64 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.57 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5), 6.44 (1H, dd, J = 7.8, 1.8 Hz, H-6), 6.27 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8''),

4.38 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-6'a), 4.23 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 4.14 (1H, dd, J = 12.0, 6.6 Hz, H-6'b), 3.81 ~ 3.39 (6H, m, H-8, Glc-H), 2.65 (2H, m, H-7); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.7 (C=O), 148.7 (C-4'), 145.7 (C-3''), 145.4 (C-3), 145.1 (C-7''), 143.6 (C-4), 129.3 (C-1), 125.5 (C-1''), 121.6 (C-6''), 119.6 (C-6), 116.4 (C-5), 115.9 (C-2), 115.6 (C-5''), 114.9 (C-8''), 113.8 (C-2''), 103.1 (C-1'), 76.6 (C-3'), 73.8 (C-5'), 73.4 (C-2'), 70.3 (C-8), 70.1 (C-4'), 63.6 (C-6'), 35.3 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 2 为木通苯乙醇苷 B。

化合物 3: 白色粉末, ESI-MS m/z : 317.2 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_8$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.70 (1H, brs, H-2), 6.67 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.55 (1H, dd, J = 7.8, 1.8 Hz, H-6), 4.29 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 4.02 (1H, m, H-8a), 3.86 (1H, brd, J = 12.0 Hz, H-6'b), 3.67 (2H, m, H-8b, 6'a), 3.37 (1H, m, H-5'), 3.29 (2H, m, H-3', 4'), 3.21 (1H, m, H-2'), 2.76 (2H, m, H-7); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 146.0 (C-3), 144.6 (C-4), 131.4 (C-1), 121.2 (C-6), 117.1 (C-5), 116.3 (C-2), 104.3 (C-1'), 78.0 (C-5'), 77.8 (C-3'), 75.0 (C-2'), 72.1 (C-8), 71.5 (C-4'), 62.6 (C-6'), 36.5 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[19], 因此鉴定化合物 3 为 2-(3,4-二羟基苯基)乙醇葡萄糖苷。

化合物 4: 无色固体, ESI-MS m/z : 301.1 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_7$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.03 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.65 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 4.15 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 3.84 (1H, m, H-8a), 3.64 (1H, dd, J = 12.0, 2.4 Hz, H-6'a), 3.54 (1H, m, H-8b), 3.40 (1H, m, H-6'b), 3.11 (1H, m, H-3'), 3.06 (1H, m, H-5'), 3.01 (1H, m, H-4'), 2.93 (1H, dd, J = 9.0, 7.8 Hz, H-2'), 2.68 (2H, m, H-7); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 155.7 (C-4), 130.0 (C-2, 6),

128.7 (C-1), 115.1 (C-3, 5), 102.9 (C-1'), 76.9 (C-5'), 76.8 (C-3'), 73.5 (C-2'), 70.2 (C-4'), 70.0 (C-8), 61.2 (C-6'), 34.9 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[20], 因此鉴定化合物 **4** 为红景天苷。

化合物 **5**: 无色针晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 319.1 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_8H_{10}O_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.03 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.72 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 3.68 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 2.71 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 156.7 (C-4), 131.0 (C-1), 130.9 (C-2, 6), 116.1 (C-3, 5), 64.6 (C-8), 39.4 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **5** 为酪醇。

化合物 **6**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 581.1 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{26}H_{28}O_{15}$ 。 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.94~7.93 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 7.05 (1H, s, H-8), 6.94~6.93 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.83 (1H, s, H-3), 5.14 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, xyl-H-1''), 4.56 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, glc-H-1''); ^{13}C -NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 182.6 (C-4), 164.2 (C-2), 161.3 (C-4'), 151.0 (C-7), 149.0 (C-9), 146.3 (C-5), 130.8 (C-6), 128.6 (C-2', 6'), 121.3 (C-1'), 116.1 (C-3', 5'), 106.2 (C-10), 105.3 (C-1'''), 102.6 (C-3), 99.8 (C-1''), 94.6 (C-8), 82.7 (C-2''), 77.2 (C-5''), 76.1 (C-3'''), 75.6 (C-3''), 74.3 (C-2'''), 69.4 (C-4''), 69.2 (C-4'''), 65.9 (C-5'''), 60.6 (C-6'')。以上数据与文献报道一致^[22], 因此鉴定化合物 **6** 为 6-hydroxyapigenin-7- O - β -[2- O - β -xyloglucoside]。

化合物 **7**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 437.2 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{22}H_{28}O_9$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.75 (4H, s, H-2, 2', 6, 6'), 4.96 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7, 7'), 3.87 (12H, s, H-3, 3', 5, 5'), 3.71 (2H, dd, $J = 11.4, 3.6$ Hz, H-9), 3.63 (2H, dd, $J = 11.4, 4.8$ Hz, H-9'), 2.32 (2H, overlapped, H-8, 8'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 149.3 (C-3, 3', 5, 5'), 136.2 (C-4, 4'), 134.2 (C-1, 1'), 104.8 (C-2, 2', 6, 6'), 84.6 (C-7, 7'), 61.6 (C-9, 9'), 56.8 (3, 3', 5, 5'-OMe), 55.1 (C-8, 8')。以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 **7** 为淫羊藿醇 A₂。

化合物 **8**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 359.2 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{20}H_{24}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.73 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 6.68 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.65 (1H, s, H-2'), 6.61 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, H-6), 6.18 (1H, s, H-5'), 3.82 (1H,

overlapped, H-7), 3.80 (3H, s, 3'-OMe), 3.77 (3H, s, 3-OMe), 3.70 (2H, m, H-9'), 3.65 (1H, overlapped, H-9a), 3.38 (1H, dd, $J = 11.4, 4.2$ Hz, H-9b), 2.77 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 1.99 (1H, m, H-8'), 1.75 (1H, m, H-8); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 149.0 (C-3), 147.2 (C-3'), 145.9 (C-4), 145.3 (C-4'), 138.6 (C-1), 134.1 (C-6'), 129.0 (C-1'), 123.2 (C-6), 117.3 (C-5'), 116.0 (C-5), 113.8 (C-2), 112.4 (C-2'), 65.9 (C-9'), 62.2 (C-9), 56.4 (3'-OMe), 56.3 (3-OMe), 48.0 (C-7, 8), 40.0 (C-8'), 33.6 (C-7')。以上数据与文献报道一致^[24], 因此鉴定化合物 **8** 为 (+)-异落叶松脂素。

化合物 **9**: 无色固体, ESI-MS m/z : 391.2 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{21}H_{26}O_7$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.66 (1H, s, H-2'), 6.43 (2H, s, H-2, 6), 6.21 (1H, s, H-5'), 3.83 (1H, brs, H-7), 3.81 (3H, s, 3'-OMe), 3.78 (6H, s, 3, 5-OMe), 3.71 (2H, m, H-9), 3.69 (1H, m, H-9'), 3.42 (1H, dd, $J = 11.4, 4.2$ Hz, H-9'), 2.80 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 2.03 (1H, m, H-8'), 1.80 (1H, m, H-8); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 149.2 (C-3, 5), 147.3 (C-3'), 145.3 (C-4'), 137.8 (C-1), 135.0 (C-4), 134.0 (C-6'), 129.0 (C-1'), 117.3 (C-5'), 112.4 (C-2'), 107.7 (C-2, 6), 65.9 (C-9'), 62.1 (C-9), 56.7 (3, 5-OMe), 56.4 (3'-OMe), 48.5 (C-7), 47.8 (C-8), 40.0 (C-8'), 33.6 (C-7')。以上数据与文献报道一致^[24], 因此鉴定化合物 **9** 为 5-甲氧基-(+)-异落叶松脂素。

化合物 **10**: 无色固体, ESI-MS m/z : 581.2 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{28}H_{36}O_{13}$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.71 (2H, s, H-2, 6), 6.65 (2H, s, H-2', 6'), 4.86 (1H, overlapped, H-1''), 4.75 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-7), 4.72 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-7'), 4.28 (2H, m, H-9b, 9'b), 3.90 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.85 (6H, s, 3, 5-OMe), 3.84 (6H, s, 3', 5'-OMe), 3.76 (1H, dd, $J = 12.6, 3.0$ Hz, H-6''b), 3.65 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-6''a), 3.47 (1H, m, H-2''), 3.41 (2H, m, H-3'', 4''), 3.20 (1H, m, H-5''), 3.12 (2H, brs, H-8, 8'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 154.4 (C-3, 5), 149.3 (C-3', 5'), 139.5 (C-1), 136.2 (C-4'), 135.5 (C-4), 133.1 (C-1'), 105.3 (C-1''), 104.8 (C-2, 6), 104.5 (C-2', 6'), 87.6 (C-7'), 87.2 (C-7), 78.3 (C-5''), 77.8 (C-3''), 75.7 (C-2''), 72.9 (C-9'), 72.8 (C-9), 71.3 (C-4''), 62.5 (C-6''), 57.1 (3, 5-OMe), 56.8 (3', 5'-OMe), 55.7 (C-8'), 55.5 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[25], 故鉴定化合物 **10** 为 (+)-丁香脂素-4'- O - β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **11**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 281.1 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.99 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.53 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 5.78 (1H, s, H-10), 4.12 (1H, m, H-3), 3.81 (1H, dd, $J = 7.2, 2.4$ Hz, H-12a), 3.72 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-12b), 2.08 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-15), 2.04 (1H, m, H-4a), 1.86 (1H, m, H-2a), 1.74 (1H, dd, $J = 13.8, 10.8$ Hz, H-4b), 1.66 (1H, m, H-2b), 1.15 (3H, s, H-14), 0.93 (3H, s, H-13); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 169.3 (C-11), 151.1 (C-9), 134.9 (C-7), 131.9 (C-8), 119.2 (C-10), 87.8 (C-5), 83.3 (C-6), 77.3 (C-12), 66.0 (C-3), 49.4 (C-1), 46.0 (C-4), 44.5 (C-2), 21.2 (C-15), 19.6 (C-14), 16.3 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[26], 故鉴定化合物 **11** 为二氢菜豆酸。

化合物 **12**: 淡黄色油状物, ESI-MS m/z : 387.2 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{19}H_{30}O_8$ 。 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 5.78 (1H, brs, H-7), 5.76 (1H, brs, H-4), 5.72 (1H, dd, $J = 15.6, 6.0$ Hz, H-8), 4.32 (1H, m, H-9), 4.16 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.62 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-6'b), 3.12 (1H, m, H-6'a), 3.05 (1H, overlapped, H-3'), 3.02 (1H, overlapped, H-4'), 2.92 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 2.43 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-2b), 2.06 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-2a), 1.81 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-13), 1.18 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-10), 0.93 (3H, s, H-11), 0.92 (3H, s, H-12); ^{13}C -NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 197.5 (C-3), 164.1 (C-5), 133.4 (C-8), 130.4 (C-7), 125.7 (C-4), 100.9 (C-1'), 77.9 (C-6), 76.9 (C-3'), 76.8 (C-5'), 74.7 (C-9), 73.7 (C-2'), 70.0 (C-4'), 61.1 (C-6'), 49.4 (C-2), 41.0 (C-1), 24.1 (C-12), 23.1 (C-11), 20.9 (C-10), 18.9 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[27], 故鉴定化合物 **12** 为 (6*S*,9*R*)-长寿花糖苷。

化合物 **13**: 白色针晶(甲醇), ESI-MS m/z : 177.0 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_9H_6O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.86 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-4), 6.97 (1H, s, H-5), 6.74 (1H, s, H-8), 6.16 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 160.9 (C-2), 150.5 (C-6), 148.6 (C-7), 144.5 (C-4), 143.0 (C-9), 112.4 (C-5), 111.5 (C-3), 110.8 (C-10), 102.7 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[28], 故鉴定化合物 **13** 为七叶内酯。

化合物 **14**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 161.0 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.87 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.82 (2H,

d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 163.3 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 116.0 (C-3, 5)。以上数据与文献报道一致^[29], 故鉴定化合物 **14** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **15**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 155.0 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_7H_6O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.44 (1H, m, H-2), 7.42 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 170.3 (C=O), 151.5 (C-4), 146.0 (C-3), 123.9 (C-6), 123.1 (C-1), 117.7 (C-5), 115.8 (C-2)。以上数据与文献报道一致^[30], 故鉴定化合物 **15** 为原儿茶酸。

化合物 **16**: 无色针晶(丙酮), ESI-MS m/z : 167.0 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_8H_8O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.43 (2H, overlapped, H-2, 6), 6.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 3.79 (3H, s, 3-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 167.8 (-COOH), 151.0 (C-4), 147.3 (C-3), 123.6 (C-6), 122.3 (C-1), 115.1 (C-2), 112.8 (C-5), 55.6 (3-OMe)。以上数据与文献报道一致^[30], 故鉴定化合物 **16** 为香草酸。

化合物 **17**: 白色针晶(甲醇), ESI-MS m/z : 197.1 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_9H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.32 (2H, s, H-2, 6), 3.88 (6H, s, 3, 5-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 170.0 (-COOH), 148.8 (C-3, 5), 141.7 (C-4), 121.9 (C-1), 108.3 (C-2, 6), 56.7 (3, 5-OMe)。以上数据与文献报道一致^[31], 因此鉴定化合物 **17** 为丁香酸。

化合物 **18**: 白色固体, ESI-MS m/z : 179.0 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_9H_8O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.52 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-3), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.92 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.21 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 171.1 (C-1), 149.3 (C-4'), 147.1 (C-3), 146.7 (C-3'), 127.7 (C-1'), 122.9 (C-6'), 116.5 (C-2), 115.4 (C-5'), 115.0 (C-2')。以上数据与文献报道一致^[32], 故鉴定化合物 **18** 为咖啡酸。

化合物 **19**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 193.1 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.53 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-3), 7.03 (1H, brs, H-2'), 6.93 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.25 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2), 3.76 (3H, s, -OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 169.8 (C-1), 149.7 (C-4'), 147.0 (C-3), 146.8 (C-3'), 127.6 (C-1'), 122.9 (C-6'), 116.5 (C-2), 115.1 (C-5'), 114.8

(C-2'), 52.0 (1-OMe)。以上数据与文献报道一致^[33], 故鉴定化合物 **19** 为咖啡酸甲酯。

化合物 **20**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 357.1 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{16}H_{20}O_9$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.59 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7), 7.21 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), 7.11 (1H, brs, H-2), 7.06 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 6.38 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8), 4.60 (1H, brs, H-1'), 3.92 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-6'a), 3.77 (3H, s, 9-OMe), 3.73 (1H, brd, $J=12.0$ Hz, H-6'b), 3.52~3.41 (4H, m, H-2'~5'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 169.4 (C-9), 151.2 (C-4), 148.9 (C-3), 146.1 (C-7), 131.0 (C-1), 122.2 (C-6), 118.1 (C-5), 117.0 (C-8), 115.9 (C-2), 103.4 (C-1'), 78.4 (C-5'), 77.5 (C-3'), 74.7 (C-2'), 71.2 (C-4'), 62.4 (C-6'), 52.1 (9-OMe)。以上数据与文献报道一致^[34], 故鉴定化合物 **20** 为 3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基-4-羟基咖啡酸甲酯。

3.2 抗氧化活性筛选结果

根据“2.2”项下方法对所得化合物进行了体外抗氧化活性实验。化合物经初筛(质量浓度为 30 $\mu g/mL$)后, 选择自由基清除率大于 50%的化合物继续测 IC_{50} 值, 仅化合物 **6** 和 **10** 初筛时在 ABTS 自由基清除实验中清除率小于 50%。

如表 2 所示, 在 DPPH 自由基清除实验中, 化合物 **2**、**7**、**15**、**17** 和 **18** 的抗氧化活性强于阳性对照 *L*-抗坏血酸, 其中化合物 **18** 表现出的 DPPH 自由基清除能力最强, 其 IC_{50} 值为 (0.208 ± 0.019) $\mu g/mL$ 。在 ABTS 自由基清除实验中, 化合物 **7**、**17** 和 **18** 的抗氧化活性强于阳性药对照 *L*-抗坏血酸,

其中化合物 **7** 表现出的 ABTS 自由基清除能力最强, 其 IC_{50} 值为 (9.087 ± 0.486) $\mu g/mL$; 化合物 **15** 的 ABTS 自由基清除能力与阳性药相当。化合物 **7**、**17** 和 **18** 在 DPPH 与 ABTS 自由基清除活性测定实验中表现出显著的抗氧化活性且活性均高于阳性药 *L*-抗坏血酸。

3.3 NO 抑制活性筛选结果

3.3.1 化合物对 RAW264.7 细胞活力的影响 根据“2.3.2”项下方法检测了化合物 **2**~**9** 对 RAW264.7 细胞活力的影响, 实验结果发现, 化合物 **2**~**5**、**7**~**9** 均在 40 $\mu mol/L$ 时对细胞活力没有影响, 化合物 **6**、地塞米松分别在 2.500、20 $\mu mol/L$ 时对细胞活力没有影响。因此, 化合物 **2**~**5**、**7**~**9** 选取 40 $\mu mol/L$ 为安全给药浓度进行后续实验, 化合物 **6**、地塞米松分别选取 2.500、20 $\mu mol/L$ 为安全给药浓度用于后续实验。

3.3.2 化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 NO 的影响 通过测定各化合物在安全浓度范围内干预处理后 RAW264.7 细胞产生 NO 的含量, 探究其对 NO 释放的抑制效果, 进而对其抗炎活性进行评价。实验结果如图 2 所示, 与模型组相比, 化合物 **6** 在 0.625、1.250、2.500 $\mu mol/L$ 时均表现出显著的 NO 抑制活性, 且抑制作用呈浓度相关性增强。化合物 **3**、**5**、**7**~**9** 在 20、40 $\mu mol/L$ 时均能显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 NO, 且抑制作用呈浓度相关性增强。化合物 **2** 和 **4** 未表现出明显的 NO 抑制活性。

4 讨论

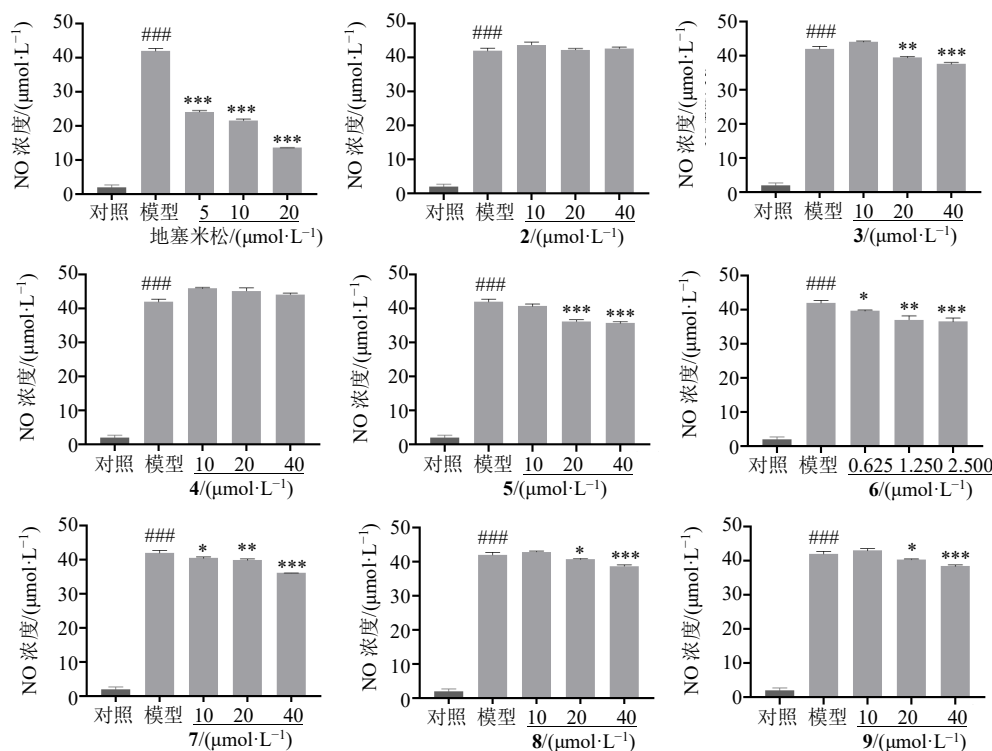
本研究从黔产牛耳朵正丁醇部位中分离鉴定了 20 个化合物, 包括 3 个萜类化合物、4 个苯乙醇及其苷类、4 个木脂素类、1 个黄酮苷类、1 个香豆素类及 7 个酚酸类。其中化合物 **1** 为新化合物, 命名为牛耳朵苷 A。化合物 **4**、**6**、**7**、**9**~**12**、**14**、**15** 和 **20** 为报春苣苔属首分, 化合物 **17** 和 **18** 为牛耳朵首分。通过 DPPH 自由基清除法与 ABTS 自由基清除法评价所得化合物的体外抗氧化活性, 结果显示化合物 **7**、**17** 和 **18** 在 2 种实验方法中均表现出显著的抗氧化活性且活性均高于阳性药 *L*-抗坏血酸。化合物的体外抗炎活性通过 Griess 法进行评价, 结果显示化合物 **3**、**5**~**9** 表现出显著的抗炎活性。

黔产牛耳朵分布广泛、储量充足, 作为贵州喀斯特地区特色野生药用植物, 且在民间应用历史悠久, 但其发挥药效作用的物质基础尚未明确, 药用

表 2 化合物的抗氧化活性筛选结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Screening results of antioxidant activity of compounds ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 化合物 | $IC_{50}/(\mu g \cdot mL^{-1})$ | |
|----------------|---------------------------------|--------------------|
| | DPPH | ABTS ⁺ |
| 2 | 1.313 ± 0.047 | 19.231 ± 0.972 |
| 3 | 2.208 ± 0.026 | 25.265 ± 0.989 |
| 6 | 4.243 ± 0.300 | >30 |
| 7 | 1.247 ± 0.020 | 9.087 ± 0.486 |
| 8 | 5.041 ± 0.256 | 13.064 ± 0.670 |
| 10 | 3.619 ± 0.327 | >30 |
| 15 | 1.714 ± 0.078 | 11.600 ± 0.350 |
| 17 | 1.152 ± 0.043 | 10.401 ± 0.631 |
| 18 | 0.208 ± 0.019 | 10.011 ± 0.215 |
| <i>L</i> -抗坏血酸 | 1.879 ± 0.054 | 11.170 ± 0.531 |



与对照组相比: ### $P < 0.001$; 与模型组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

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

图 2 化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of compounds on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

价值长期停留在经验层面,深入研究其化学成分与药理活性具有重要现实与科学意义。本研究在前期研究基础上进一步揭示了黔产牛耳朵中的化学成分,并探讨了其抗氧化活性和抗炎活性,不仅能明确其药效物质基础,为筛选天然抗氧化剂、抗炎药物提供科学支撑,还能为后续黔产牛耳朵药用资源的进一步开发和利用奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第六十九卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 292.
- [2] 覃海宁, 刘演. 广西植物名录 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 625.
- [3] 罗迎春, 孙庆文. 贵州民族常用天然药物 (第二卷) [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2013: 36.
- [4] Cai X H, Luo X D, Zhou J, *et al.* Quinones from *Chirita eburnea* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(5): 797-799.
- [5] Cai X H, Luo X D, Zhou J, *et al.* A new naphthaquinone derivative from *Chirita eburnea* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(4): 351-353.
- [6] 蔡祥海, 邓德山, 马云保, 等. 牛耳朵化学成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 510-511.
- [7] 陈文娟, 文永新, 陈月圆, 等. 牛耳朵苯乙醇苷类化学成分及其细胞毒活性研究 [J]. 中成药, 2010, 32(6): 1000-1003.
- [8] 杨丽媛, 王朝阳, 陈俊磊, 等. 牛耳朵全草中化学成分及其生物活性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3430-3437.
- [9] 王晓琴, 彭勇, 白贞芳, 等. 苦苣苔科药用植物体外抗菌活性的研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(1): 37-39.
- [10] 吴建璋, 文永新, 陈月圆, 等. 牛耳朵乙醇提取物对自发性高血压大鼠血压和左心室肥厚的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 184-185.
- [11] Yang L Y, Yi P, Chen J L, *et al.* Chemical constituents of *Primulina eburnea* (Gesneriaceae) and their cytotoxic activities [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(5): e202300248.
- [12] 周立强, 熊燕, 陈俊磊, 等. 艾纳香地上部分化学成分及其抗氧化与酪氨酸酶抑制活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(7): 1112-1120.
- [13] Xie R X, Chen J L, Zhou L Q, *et al.* Oreocharioside A-G, new acylated C-glycosylflavones from *Oreocharis auricula* (Gesneriaceae) [J]. *Fitoterapia*, 2022, 158: 105158.
- [14] 王妍婷, 牛志强, 刘亚男, 等. 柴胡皂苷 d 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症的抗炎作用机制 [J]. 现代食品

- 科技, 2025, 41(3): 80-88.
- [15] 孙嘉文, 李广涛, 陈斌, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合分子网络技术的浙江红山茶花成分分析及其抗炎活性评价 [J]. 中草药, 2025, 56(12): 4187-4205.
- [16] Ngouela S, Nyasse B, Tsamo E, *et al.* Spathodic acid: A triterpene acid from the stem bark of *Spathodea campanulata* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(12): 3959-3961.
- [17] Luo L L, Chen J L, Du C X, *et al.* Three novel quinoline alkaloids from *Tetradium glabrifolium* and their antibacterial activities [J]. *Chem Biodivers*, 2025, 22(5): e202402980.
- [18] 龚宇, 罗伟, 周惠祯, 等. 大叶桉的酚性成分及其体外抗氧化活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(3): 420-426.
- [19] 刘召阳, 罗都强. 金莲花的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 370-373.
- [20] Yu P Z, Hu C Q, Meehan E J, *et al.* X-ray crystal structure and antioxidant activity of salidroside, a phenylethanoid glycoside [J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(3): 508-513.
- [21] 张艳丽, 冯志毅, 郑晓珂, 等. 地黄叶的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(1): 15-21.
- [22] Mitchell K A, Markham K R, Bayly M J. Flavonoid characters contributing to the taxonomic revision of the *Hebe parviflora* complex [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56(5): 453-461.
- [23] 高广春, 陶曙红, 漆淑华, 等. 山石榴的化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2010, 41(4): 539-541.
- [24] Jutiviboonsuk A, Zhang H J, Tan G T, *et al.* Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(23): 2745-2751.
- [25] Xu Q, Shen N, Xin H W, *et al.* Chemical constituents of *Arenaria kansuensis* [J]. *Chem Nat Compd*, 2025, 61(3): 608-611.
- [26] Taiwo O M, Olaoluwa O O, Aiyelaagbe O O, *et al.* Chemical constituents from *Ficus sagittifolia* stem bark and their antimicrobial activities [J]. *Plants*, 2023, 12(15): 2801.
- [27] Caliş I, Kuruüzüm-Uz A, Lorenzetto P A, *et al.* (6S)-Hydroxy-3-oxo- α -ionol glucosides from *Capparis spinosa* fruits [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(4): 451-457.
- [28] Kwon O S, Choi J S, Islam M N, *et al.* Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and its constituents [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(9): 1561-1569.
- [29] 匡蕾, 肖春荣, 涂林锋, 等. 山香圆叶化学成分的研究 [J]. 中药材, 2019, 42(11): 2570-2573.
- [30] 王晔, 杨崇仁, 张颖君. 草果果实中的酚性成分 [J]. 云南植物研究, 2009, 31(3): 284-288.
- [31] Xiao T, Wu A, Wang X W, *et al.* Anti-hypertensive and composition as well as pharmacokinetics and tissues distribution of active ingredients from *Alpinia zerumbet* [J]. *Fitoterapia*, 2024, 172: 105753.
- [32] de Sá de Sousa Nogueira T B, de Sá de Sousa Nogueira R B, E Silva D A, *et al.* First chemical constituents from *Cordia exaltata* Lam and antimicrobial activity of two neolignans [J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 11086-11099.
- [33] 郑丹, 张晓琦, 王英, 等. 滇桂艾纳香地上部分的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 421-424.
- [34] 孔江波, 朱莹, 张文静, 等. 枸杞子醋酸乙酯部位非生物碱类化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 1877-1883.

[责任编辑 王文倩]