

壮药红花青藤中抑制NO生成的活性成分研究

甘杰, 韦微, 谭锦妮, 沈梦如, 谭钦刚*

(桂林医学院, 广西 桂林 541199)

摘要: 采用硅胶、ODS柱色谱、Sephadex LH-20等分离方法对红花青藤藤茎醇提物的化学成分进行分离纯化, 通过其理化性质及波谱数据对分离得到的化合物进行结构表征。从红花青藤藤茎醇提物中共分离得到16个化合物: (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxy-2-methylbutane-1,4-diylidibenzoate (**1**)、反式-阿魏酸对羟基苯乙酯 (**2**)、4-*O*-benzoyl-2-*C*-methyl-*D*-erythritol (**3**)、*N*-反式阿魏酰基-3-甲基多巴胺 (**4**)、tribulusamide A (**5**)、柳杉二醇 (**6**)、teuclatriol (**7**)、齐墩果酸 (**8**)、icario A₂ (**9**)、香草酸 (**10**)、对羟基苯甲酸 (**11**)、没食子酸 (**12**)、没食子酸乙酯 (**13**)、大黄酚 (**14**)、*D*-1-*O*-甲基-肌醇 (**15**) 和十六烷酸 (**16**)。其中**1**为新化合物, 其绝对构型采用Mosher法并结合ROESY法确定; 除**10**、**11**和**14**外, 其他化合物均是首次从青藤属中分离得到。与阳性对照药咪喹莫辛相比, 化合物**4**~**6**、**8**和**9**对LPS诱导RAW264.7细胞生成NO均有显著的抑制作用。

关键词: 莲叶桐科; 红花青藤; 化学成分; NO抑制活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)06-1849-06

The NO inhibitory constituents from *Illigera rhodantha*

GAN Jie, WEI Wei, TAN Jin-ni, SHEN Meng-ru, TAN Qin-gang*

(Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract: Sixteen compounds were isolated from the ethanol extract of *Illigera rhodantha* by silica gel, ODS, and Sephadex LH-20 column chromatographies. These compounds were identified as (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxy-2-methylbutane-1,4-diylidibenzoate (**1**), *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (**2**), 4-*O*-benzoyl-2-*C*-methyl-*D*-erythritol (**3**), *N*-*trans* feruloyl-3-methyldopamine (**4**), tribulusamide A (**5**), cryptomeridiol (**6**), teuclatriol (**7**), oleanolic acid (**8**), icario A₂ (**9**), vanillic acid (**10**), *p*-hydroxybenzoic acid (**11**), gallic acid (**12**), ethyl gallate (**13**), chrysophanol (**14**), *D*-1-*O*-methyl-inositol (**15**), and hexadecanoic acid (**16**) based on their spectral data and physico-chemical properties. Compound **1** is an undescribed compound, of which its absolute configurations were determined by Mosher and ROESY methods; all the compounds except **10**, **11** and **14** were isolated from *Illigera* genus for the first time. Compared with the positive control indomethacin, compounds **4**–**6**, **8** and **9** inhibited significantly against the NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

Key words: Hernandiaceae; *Illigera rhodantha*; chemical constituent; NO inhibitory activity

红花青藤 (*Illigera rhodantha* Hance) 又名毛青藤, 为莲叶桐科 (Hernandiaceae) 青藤属植物, 产自广东、广西、云南等地, 具鲜艳的红色花, 易与其他种区别^[1]。

红花青藤味甘、辛、涩、温, 以其药用部位藤茎为主药的成药—风湿药酒和加味风湿酒被《广西药品标准》收载^[2], 具有祛风、镇痛、活血通络之功效, 常用于治疗风湿性关节炎、头风痛、跌打瘀肿等, 在广西壮族民间中具有广泛的应用历史^[3]。现代研究表明, 红花青藤含有生物碱、黄酮、甾体和萜类等成分^[4], 其提取物具有抗炎镇痛作用^[5,6]。为了深入挖掘红花青藤的抗炎活性成分, 本文对红花青藤藤茎乙醇提取物的化学成分

收稿日期: 2022-01-07; 修回日期: 2022-02-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060783); 广西自然科学基金资助项目 (2020GXNSFAA259001); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202010601019).

*通讯作者 Tel: 86-773-2303433, E-mail: qgtan@glmc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0035

及其抑制 NO 的活性进行了研究, 通过硅胶、ODS、凝胶等柱色谱法和波谱法, 分离鉴定了 16 个化合物 (图 1), 其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **4**~**6**、**8** 和 **9** 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 均有显著的抑制作用。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 **1**, 白色粉末, mp 133~135 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -2.55 (c 0.12, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} : 232、274 nm; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3 458 (OH)、1 696 (C=O)、1 280 (C=C); HR-ESI-MS m/z [M+Na]⁺ 367.115 5 (计算值 367.115 8) 提示其分子式为 C₁₉H₂₀O₆, 不饱和度为 10。¹³C NMR 和 DEPT 谱仅显示 15 个碳信号, 根据化学位移值 δ_c 167.3、167.1、128.6~133.6 及 δ_H 8.03~8.06 (m, 4H)、7.55~7.59 (m, 2H) 和 7.41~7.46 (m, 4H) (表 1), 推测分子中含有单取代的苯甲酰基系统。与已知化合物 bonianol^[7] 相比, 化合物 **1** 比该化合物多了 1 个季碳 (δ_c 73.4)、1 个

甲基 (δ_c 20.2), 少了 4 个次甲基信号, 推测化合物 **1** 中没有直链双键且其中的 1 个季碳和次甲基上有羟基取代, 该推测由 HBMBC 图谱中 δ_H 4.00 (1H, dd, $J = 8.0, 2.5$ Hz, H-3) 与 δ_H 1.37 (3H, s) 与 δ_c 73.4 (s) 的相关得到证实 (图 2)。此外, HMBC 图谱中 δ_H 8.03~8.06 (4H, m, H-2',6',2'',6'') 与 δ_c 167.1 (s) 和 167.3 (s) 的相关证实了单取代苯甲酰基的存在。采用改进的 Mosher's 法确定 C-3 位的绝对构型为 *R* (图 3)。ROESY 谱中, δ_H 2.81 (1H, s, OH) 和 δ_H 3.12 (1H, s, OH) 两个宽单峰与 δ_H 4.00 (1H, dd, $J = 8.0, 2.5$ Hz, H-3) 均相关, 其中一个必为处于同侧的氢原子相关信号, 据此推测 δ_H 1.37 (3H, s, H-5) 与 C-3 位的 OH 位于同侧, 由此确定 C-2 位的绝对构型为 *R*, 故该化合物命名为 (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxy-2-methylbutane-1,4-diyl dibenzoate。

2 化合物对 RAW264.7 细胞的毒性和产生 NO 的影响

采用 MTT 比色法检测化合物对 RAW264.7 细胞存活率的影响。分别设置 6.25、12.5、25、50、100 和

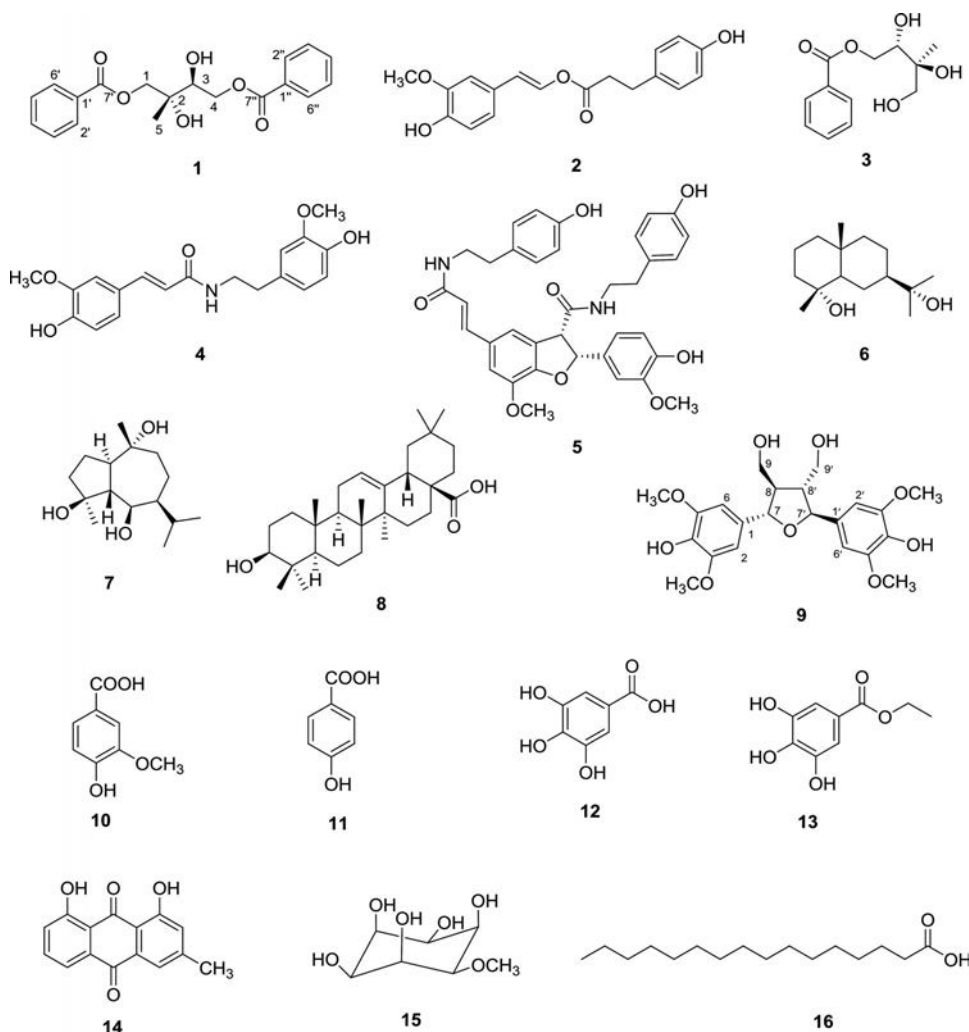
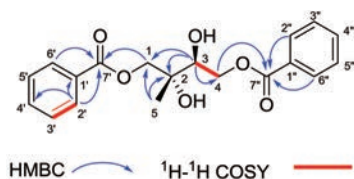
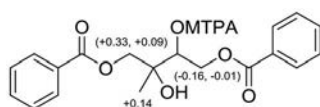


Figure 1 Chemical structures of compounds 1–16

Table 1 ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) data of compound **1** in CDCl_3 (J in Hz)

| No. | δ_{H} | δ_{C} |
|---------|---|---------------------|
| 1 | 4.57 (1H, d, $J = 11.5$), 4.32 (1H, d, $J = 11.5$) | 69.1, t |
| 2 | | 73.4, s |
| 3 | 4.00 (1H, dd, $J = 8.0, 2.5$) | 73.8, d |
| 4 | 4.70 (1H, dd, $J = 12.0, 2.5$), 4.48 (1H, dd, $J = 12.0, 8.0$) | 66.3, t |
| 5 | 1.37 (3H, s) | 20.2, q |
| 1' | | 129.6, s |
| 2',6' | 8.03–8.06, m | 129.8, d |
| 3',5' | 7.41–7.46, m | 128.6, d |
| 4' | 7.55–7.59, m | 133.4, d |
| 7' | | 167.1, s |
| 1'' | | 129.8, s |
| 2'',6'' | 8.03–8.06, m | 129.9, d |
| 3'',5'' | 7.41–7.46, m | 128.7, d |
| 4'' | 7.55–7.59, m | 133.6, d |
| 7'' | | 167.3, s |
| | 2.81 (s), 3.12 (s) | 2×OH |

**Figure 2** Selected key correlations for compound **1****Figure 3** $\Delta\delta_{\text{H}}^{S-R}$ values for the Mosher's ester derivatives of compound **1**

200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 等 6 个浓度, 孵育 24 h 后, 各化合物的各剂量组随着药物浓度的减少, RAW264.7 细胞活力显著提高, 实验结果表明, 化合物 **10** 和 **16** 的浓度在 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下时细胞存活率在 90% 以上, 表明上述两个化合物对 RAW264.7 细胞无毒。此外, 化合物 **7** 和 **12** 的浓度在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下时, 化合物 **1**~**3** 和 **9** 的浓度在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下时, 化合物 **4**~**6** 和 **8** 的浓度在 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下时对 RAW264.7 细胞无毒, 其他化合物 **11**、**13** 和 **14** 则对该细胞有较大的毒性。

使用 Griess 法测定红花青藤中部分单体化合物的抗炎活性。经过毒性筛选, 选择具有较大安全浓度范围的部分化合物进行 NO 抑制率实验, 分别设置化合物对细胞无毒的几个浓度梯度, 孵育 24 h 测定化合物抑制 NO 的 IC_{50} 值, 结果如表 2 所示。由表 2 可知, 与阳性对照药吲哚美辛相比, 化合物 **4**~**6**、**8** 和 **9** 能显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞生成 NO。

Table 2 The IC_{50} values of compounds inhibiting NO production in RAW264.7 cells. * $P < 0.05$ vs indomethacin

| Compd. | $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Compd. | $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|----------|--|--------------|--|
| 1 | >100* | 8 | 11.87 \pm 2.70* |
| 2 | >100* | 9 | 10.48 \pm 7.91 |
| 3 | 28.16 \pm 4.1 | 10 | 32.41 \pm 3.16* |
| 4 | 10.45 \pm 5.77 | 12 | 32.76 \pm 4.8 |
| 5 | 5.88 \pm 3.97* | 16 | 71.08 \pm 4.18* |
| 6 | 16.80 \pm 8.25 | Indomethacin | 19.21 \pm 6.1 |
| 7 | 21.16 \pm 3.13 | | |

实验部分

Bruker DRX-500, DRX-400 核磁共振仪 (Bruker 公司, 瑞士); 低分辨质谱 LCMS-8030 (岛津公司, 日本); 高分辨质谱 (Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series Q-TOF LC/MS System, 美国); 红外用 Nicolet iS10 测定 (Thermo Scientific 公司, KBr 压片法); UV-1600 (上海美谱达公司); 旋光仪 Model 341 LC polarimeter (Perkin Elmer 公司, 英国); 柱色谱及薄层色谱所用硅胶 (青岛海洋化工); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (瑞典 Pharmacia 公司); RP-18 (10~65 μm , 德国 Merck 公司); 小孔树脂 CHP20 (日本 Mitsubishi 公司); 薄层色谱用硅胶板 (GF254, 烟台江友硅胶开发有限公司); 显色剂 5% H_2SO_4 -EtOH 溶液 (喷洒后适当加热); 胎牛血清 (FBS)、基础培养基 (DMEM)、青链霉素混合液 (Gibco 公司); DMSO、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、脂多糖 (LPS)、吲哚美辛 (Solarbio 公司); RAW264.7 细胞购自 ATCC 细胞库, 由本实验自行传代培养。4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES, Biosharp 公司)。

红花青藤藤茎于 2018 年 10 月采自广西桂林永福县罗锦镇, 由广西植物所黄俞淞副研究员鉴定为莲叶桐科 (Hernandiaceae) 青藤属 (*Illigera*) 植物红花青藤 (*I. rhodantha*), 标本 (编号 Tir-2018-2) 保存于桂林医学院药学院实验中心。

1 提取与分离

干燥的红花青藤藤茎粗粉 20 kg 用 100 L 75% 乙醇室温提取 (7 天 \times 3 次), 过滤, 滤液减压回收得浸膏 1.6 kg, 将浸膏分散于 4 L 蒸馏水中, 等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 减压回收溶剂得乙酸乙酯层 209 g, 水层 1.2 kg。

乙酸乙酯层 (209 g) 经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇 (50:1~0:1) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同部分, 得到 9 个组分 Fr.I~IX。Fr.IV 经 MCI 柱色谱 (85% \rightarrow 100% 甲醇), 硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 = 20:1 \rightarrow 8:1) 得化合物 **1** (200.0 mg) 和 **4** (4.5 mg)。Fr.V 经 MCI 柱色谱 (75% \rightarrow 100% 甲醇), 得 Fr.V 1 和 Fr.V 2, Fr.V 1 依次经 LH-20 柱色谱 (甲醇), 硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 = 10:1), 得化合物 **10** (5.8 mg); Fr.V 2 经硅胶柱色谱 (石

油醚-乙酸乙酯 = 4:1) 得化合物 **6** (11.9 mg)。Fr.VI 经 MCI 柱色谱 (70%→100% 甲醇) 得 Fr.VI 1~5, 其中 Fr.VI 2 经 LH-20 柱色谱 (甲醇), 硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 = 6:1) 得化合物 **7** (6.6 mg); Fr.VI 3 经 LH-20 柱色谱 (甲醇) 和硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 = 35:1) 得化合物 **9** (5.2 mg); Fr.VII 经 MCI 柱色谱 (60%→100% 甲醇) 得到的 Fr.VII 1 经硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 = 100:1) 后, 得化合物 **3** (5.5 mg)。Fr.VIII 经 MCI 柱色谱 (45%→100% 甲醇) 得 Fr.VIII 1~6, Fr.VIII 3 经 LH-20 柱色谱 (甲醇) 和硅胶柱色谱 (氯仿-丙酮 = 3:1) 得化合物 **11** (1.8 mg) 和化合物 **16** (2.3 mg); Fr.VIII 5 经硅胶柱色谱 (氯仿-丙酮 = 12:1) 得化合物 **2** (8.9 mg); Fr.VIII 6 经 LH-20 柱色谱 (甲醇) 和硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 = 40:1, 30:1) 得化合物 **5** (1.8 mg) 和 **14** (10.0 mg)。Fr.IX 经 MCI 柱色谱 (35%→100% 甲醇) 得 Fr.IX 1~11, Fr.IX 11 经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 = 28:1) 得化合物 **8** (3.0 mg)。

水层部分经正相柱色谱二氯甲烷-甲醇 (30:1→1:1) 得 8 个组分 (Fr.W.I~VIII), Fr.W.III 经硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 = 20:1) 洗脱得化合物 **15** (9.8 mg); Fr.W.VII 经硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 = 80:1), 再经 LH-20 (甲醇), 得化合物 **13** (14.5 mg); Fr.VIII 经硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 = 30:1) 得化合物 **12** (10.2 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末, mp 133~135 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -2.55 (*c* 0.12, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{max} : 232, 274 nm。IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3 458 (OH)、1 696 (C=O)、1 280 (C=C)。HR-ESI-MS *m/z* [M+Na]⁺ 367.115 5 (计算值 367.115 8)。¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

化合物 **2** 淡黄色油状, C₁₈H₁₈O₅。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H : 7.44 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-7), 7.12 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 7.06 (2H, d, *J* = 9.5 Hz, H-2',6'), 7.02 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-2',6'), 6.80 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.72 (2H, d, *J* = 11.5 Hz, H-3',5'), 6.41 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-8), 3.88 (3H, s, -OCH₃), 3.47 (2H, t, *J* = 8 Hz, H-1''), 2.75 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2''); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C : 169.2 (C=O), 156.9 (C-4'), 149.8 (C-4), 149.3 (C-3), 142.0 (C-7), 131.3 (C-1'), 130.7 (C-2'), 128.3 (C-1), 123.2 (C-6), 118.7 (C-8), 116.5 (C-5), 116.3 (C-3'), 111.5 (C-2), 56.4 (-OCH₃), 42.5 (C-1''), 35.8 (C-2'')。以上数据结合文献^[8]确定该化合物为反式-阿魏酸对羟基苯乙酯。

化合物 **3** 白色粉末, mp 110~113 °C; C₁₂H₁₆O₅; HR-ESI-MS *m/z* 263.088 5 [M+Na]⁺。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H : 8.08~8.10 (2H, m, H-3', 7'), 7.60~7.63

(2H, m, H-4', 6'), 7.47~7.50 (1H, m, H-5'), 4.64 (1H, dd, *J* = 11.5, 2.5 Hz, H-4b), 4.36 (1H, dd, *J* = 11.5, 8.5 Hz, H-4a), 3.98 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, H-3), 3.60 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-1a), 3.49 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-1b), 1.20 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C : 168.4 (C=O), 134.2 (C-5'), 131.6 (C-2'), 130.6 (C-3', 7'), 129.5 (C-4', 6'), 74.7 (C-2), 73.6 (C-3), 68.5 (C-4), 67.6 (C-1), 19.3 (-CH₃)。以上数据结合文献^[9]确定该化合物为 4-*O*-benzoyl-2-*C*-methyl-*D*-erythritol。

化合物 **4** 无色油状物, C₁₉H₂₁NO₅。¹H NMR [500 MHz, (CD₃)₂CO] δ_H : 8.00 (1H, s, -OH), 7.34 (1H, s, -OH), 7.14 (1H, br s, -NH); Feruloyl: 7.33 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-3), 7.02 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.91 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 6.70 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-2), 3.74 (3H, s, -OCH₃); Amine: 6.72 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.61 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.50 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 3.69 (3H, s, -OCH₃), 3.38 (2H, m, H-1), 2.63 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2)。¹³C NMR [125 MHz, (CD₃)₂CO] δ_C : Feruloyl: 166.5 (C-1), 149.2 (C-4'), 148.6 (C-3'), 140.4 (C-3), 128.2 (C-1'), 122.5 (C-6'), 120.0 (C-2), 116.1 (C-5'), 111.2 (C-2'), 56.2 (OCH₃); Amine: 148.2 (C-3'), 145.9 (C-4'), 131.7 (C-1'), 122.0 (C-6'), 115.7 (C-5'), 113.1 (C-2'), 56.2 (OCH₃), 41.8 (C-1), 36.1 (C-2)。以上数据结合文献^[10]确定该化合物为 *N*-反式-阿魏酰基-3-甲基多巴胺。

化合物 **5** 白色粉末, mp 265~267 °C; C₃₆H₃₆N₂O₈。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H : 7.42 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-7), 6.67~7.08 (13H, Ar-H), 6.38 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-8), 5.88 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-7''), 4.16 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-8''), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃), 3.79 (3H, s, 3''-OCH₃), 3.47 (4H, m, H-1', 2'''), 2.75 (4H, m, H-2', 2''')。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C : 172.9 (C-9''), 169.0 (C-9), 156.9 (C-6'), 156.8 (C-6'''), 151.1 (C-4), 149.2 (C-4''), 148.1 (C-3''), 146.0 (C-3), 141.8 (C-7), 132.6 (C-1''), 131.2 (C-3'), 131.0 (C-3'''), 130.9 (C-4', 8'), 130.7 (C-4''', 8'''), 130.4 (C-1), 129.3 (C-5), 120.0 (C-8), 119.4 (C-6''), 118.1 (C-6), 116.5 (C-5', 7'), 116.3 (C-5''', 7'''), 113.0 (C-2), 110.5 (C-2''), 90.0 (C-7''), 58.6 (C-8''), 56.7 (3-OCH₃), 56.4 (3''-OCH₃), 42.6 (C-1'), 42.2 (C-1'''), 35.7 (C-2'), 35.3 (C-2''')。以上数据结合文献^[11]确定该化合物为 tribulusamide A。

化合物 **6** 白色粉末, mp 138~140 °C; C₁₅H₂₈O₂。¹H NMR [500 MHz, (CD₃)₂CO] δ_H : 3.03, 3.01 (2×OH), 1.14 (each 3H, s, H-12, 13), 1.11 (1H, dd, *J* = 12.5, 3.0 Hz, H-5), 1.06 (3H, s, H-15), 0.87 (3H, s, H-14)。¹³C NMR

[125 MHz, (CD₃)₂CO] δ_C: 72.2 (C-11), 71.6 (C-4), 55.6 (C-5), 51.1 (C-7), 45.9 (C-9), 44.4 (C-3), 42.2 (C-1), 35.2 (C-10), 28.0 (C-13), 27.7 (C-12), 23.3 (C-8), 23.1 (C-15), 22.4 (C-6), 21.0 (C-2), 19.2 (C-14)。以上数据结合文献^[12]确定该化合物为柳杉二醇。

化合物7 白色粉末, mp 256~258 °C; C₁₅H₂₈O₃。¹H NMR [500 MHz, (CD₃)₂CO] δ_H: 4.10, (br, OH), 4.06 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.20, 3.13 (s, 2×OH), 1.22, 1.17 (each 3H, s, H-14,15), 1.01, 0.94 (each 3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-12,13)。¹³C NMR [125 MHz, (CD₃)₂CO] δ_C: 81.5 (C-4), 74.9 (C-10), 71.7 (C-6), 56.2 (C-5), 53.1 (C-1), 49.2 (C-9), 46.4 (C-7), 42.1 (C-3), 30.7 (C-11), 24.1 (C-8), 23.3 (C-12), 22.4 (C-13), 22.0 (C-2), 21.6 (C-14), 21.6 (C-15)。以上数据结合文献^[13]确定该化合物为teuclatriol。

化合物8 白色粉末, mp 265~266 °C; C₃₀H₄₈O₃; HR-ESI-MS *m/z* 455.353 6 [M-H]⁻。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 5.23 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-12), 3.14 (1H, m, H-3), 2.83 (1H, dd, *J* = 14.0, 4.8 Hz, H-18), 1.14, 0.96, 0.92, 0.89, 0.80, 0.76 (each 3H×7, s, H-23,24,25,26,27,29,30)。¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 181.9 (C-28), 145.2 (C-13), 123.7 (C-12), 79.7 (C-3), 56.8 (C-5), 49.8 (C-9), 47.6 (C-17), 47.2 (C-19), 42.9 (C-14), 42.7 (C-18), 40.5 (C-8), 40.4 (C-4), 39.8 (C-1), 38.2 (C-10), 34.9 (C-21), 34.0 (C-7), 33.8 (C-22), 33.6 (C-29), 31.6 (C-20), 28.8 (C-15), 28.7 (C-23), 27.9 (C-2), 26.4 (C-27), 24.5 (C-16), 24.0 (C-11, C-30), 19.5 (C-6), 17.7 (C-26), 16.3 (C-24), 15.9 (C-25)。以上数据结合文献^[14]确定该化合物为齐墩果酸。

化合物9 淡黄色粉末, mp 91~93 °C; C₂₂H₂₈O₉; HR-ESI-MS *m/z* 417.155 2 [M-H₂O-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 6.76 (4H, s, H-2,2',6,6'), 4.98 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-7,7'), 3.88 (12H, s, 4-OCH₃), 3.73 (2H, dd, *J* = 11.5, 3.5 Hz, H-9*), 3.64 (2H, dd, *J* = 11.5, 5.0 Hz, H-9'*), 2.33 (2H, m, H-8,8')。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 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'), 61.7 (C-9,9'), 56.8 (-OCH₃), 55.2 (C-8,8')。以上数据结合文献^[15]确定该化合物为icario A₂。

化合物10 白色粉末, mp 218~221 °C; C₈H₈O₄。¹H NMR [500 MHz, (CD₃)₂CO] δ_H: 7.59 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6), 7.56 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 6.91 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 3.91 (3H, s, 4-OCH₃)。¹³C NMR [125 MHz, (CD₃)₂CO] δ_C: 167.5 (-COOH), 152.0 (C-4), 148.0 (C-3), 124.9 (C-6), 122.9 (C-1), 115.4 (C-2), 113.4 (C-5), 56.3 (-OCH₃)。以上数据结合文献^[16]确定该化合

物为香草酸。

化合物11 白色粉末, mp 214~216 °C; C₇H₆O₃; HR-ESI-MS *m/z* 248.962 2 [2M-CO]⁺。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.88 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2,6), 6.82 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3,5)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 170.1 (C=O), 163.4 (C-4), 133.0 (C-2,6), 122.8 (C-1), 116.0 (C-3,5)。以上数据结合文献^[17]确定该化合物为对羟基苯甲酸。

化合物12 白色粉末, mp 240~241 °C; C₇H₆O₅。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.02 (2H, s, H-2,6)。¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 170.4 (C=O), 146.4 (C-3,5), 139.6 (C-4), 121.9 (C-1), 110.3 (C-2,6)。以上数据结合文献^[18]确定该化合物为没食子酸。

化合物13 白色粉末, mp 156~158 °C; C₉H₁₀O₅。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.03 (2H, s, H-2,6), 4.25 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, -CH₂-), 1.32 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, -CH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 168.5 (C-7), 146.4 (C-3,5), 139.7 (C-4), 121.7 (C-1), 110.0 (C-2,6), 61.7 (-CH₂), 14.6 (-CH₃)。以上数据结合文献^[19]确定该化合物为没食子酸乙酯。

化合物14 黄色粉末, mp 198~200 °C; C₁₅H₁₀O₄; HR-ESI-MS *m/z* 621.433 7 [2M+CF₃COO]⁻。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 12.11, 12.00 (2×OH), 7.81 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 7.64 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-4), 7.28 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, H-7), 7.08 (1H, m, H-2), 2.46 (3H, s, -CH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 192.6 (C-9), 182.1 (C-10), 162.8 (C-8), 162.5 (C-1), 149.5 (C-3), 137.1 (C-6), 133.8 (C-10'), 133.4 (C-4'), 124.7 (C-2), 124.5 (C-7), 121.5 (C-4), 120.1 (C-5), 116.0 (C-8'), 113.9 (C-9'), 22.4 (CH₃)。以上数据结合文献^[20]确定该化合物为大黄酚。

化合物15 白色结晶, mp 196~197 °C; C₇H₁₄O₆; HR-ESI-MS *m/z* 239.076 9 [M+COOH]⁻。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 81.1 (C-1), 73.3 (C-5), 72.3 (C-3), 72.1 (C-6), 70.5 (C-4), 68.1 (C-2), 57.1 (-OCH₃)。以上数据结合文献^[21]确定该化合物为*D*-1-*O*-甲基-肌醇。

化合物16 白色粉末, mp 70~72 °C; C₁₆H₃₂O₂; HR-ESI-MS *m/z* 485.282 0 [2M-CO+H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 2.35 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, H-2), 1.64 (2H, m), 1.25 (24H, br), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, -CH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 178.8 (C=O), 22.9~34.0 (-CH₂-), 14.3 (-CH₃)。以上数据结合文献^[22]确定该化合物为十六烷酸。

3 细胞毒性及NO抑制实验

本实验中MTT法检测细胞毒性, Giress 试剂法测

定 NO 含量均采用参考文献^[23]中的方法。所有实验均重复 3 次, 应用 SPSS22 统计软件进行统计学分析, 采用单因素 ANOVA 分析样本间的均数比较。

作者贡献: 甘杰负责样品采集、提取与分离、活性测试; 韦微协助对分离得到的化合物进行活性测试; 谭锦妮协助化合物的结构鉴定; 沈梦如协助提取与分离; 谭钦刚负责选题、研究方案的设计及稿件修改等。

利益冲突: 本文不存在利益冲突。

References

- [1] Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Science. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol 31. Beijing: Science Press, 1982: 472.
- [2] The Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region. Guangxi Drug Standards (广西药品标准) [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 1984: 41.
- [3] Jia MR, Li XW. Introduction of Chinese Ethnic Medicinal Plants (中国民族药志要) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2005: 342.
- [4] Li J, Cai XL. Research advances of the ethnic medicinal plants *Illigera rhodantha* [J]. Acta Med Sin (华夏医学), 2009, 22: 992-994.
- [5] Ye Y, Zhang B, Bai YY, et al. Study on anti-inflammatory and analgesic effects of *Illigera rhodantha* Hance extract by transdermal administration [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2020, 31: 2843-2846.
- [6] Li J, Cai XL, Luo YL, et al. Study on the anti-inflammatory active fraction of *Illigera rhodantha* Hance [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2013, 24: 2623-2624.
- [7] Chen Z, Liu YL, Xu QM, et al. New polyoxygenated cyclohexene and polyoxygenated seco-cyclohexene from *Uvaria boniana* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15: 53-58.
- [8] Darwish FMM, Reinecke MG. Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. [J]. Phytochemistry, 2003, 62: 1179-1184.
- [9] Yamaura M, Suzuki T, Tagami Y, et al. Synthesis of 2,3-*O*-isopropylidene- and 3-*O*-benzoyl-2-*O*-benzyl-2-*C*-methyl-*L*-glycer-aldehyde [J]. Carbohydr Res, 1988, 181: 267-272.
- [10] Ren Y, Shen L, Dai SJ. Studies on flavonoids and amides from herbs of *Solanum lyratum* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2009, 34: 721-723.
- [11] Feng J, Hu M, Jin YJ, et al. Radical scavenging constituents from leaf of *Humulus scandens* [J]. Asian J Chem, 2016, 28: 1820-1822.
- [12] Werner I, Mucaji P, Presser A, et al. Sesquiterpenes and phenolic compounds from *Achillea clypeolata* [J]. Z Naturforsch B, 2007, 62: 267-271.
- [13] Li LJ, Yu LJ, Wu ZZ, et al. Chemical constituents in ethyl acetate extract from *Rabdosia flexicaulis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 339-343.
- [14] Zhang YH, Zhang WC, Zhang JG, et al. Chemical constituents of *Crepis flexuosa* [J]. Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报), 2011, 17: 509-511.
- [15] Li XY, Long CL, Wang YH, et al. Chemical constituents of *Oxyria digyna* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2008, 20: 816-820.
- [16] Ma HY, Yang L, Zhang M, et al. A new compound from *Senecio cannabifolius* var *integrifolius* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 626-629.
- [17] Lee SY, Kim KH, Lee IK, et al. A new flavonol glycoside from *Hylomecon vernalis* [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35: 415-421.
- [18] Zhou ZH, Yang CR. Phenolic constituents of the fresh leaves of *Myrica nana* [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2000, 22: 219-224.
- [19] Shu XK, Duan WJ, Liu W et al. Chemical constituents from flowers of *Paeonia lactiflora* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2014, 37: 66-69.
- [20] Zhang W, Lou HX, Li GY, et al. A new triterpenoid from *Entodon okamurae* Broth [J]. J Asian Nat Prod Res, 2003, 5: 189-195.
- [21] Tu PF, Luo Q, Zheng JH. Studies on chemical constituents in seed of *Litchi chinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2002, 33: 300-303.
- [22] Ren BR, Xia B, Li WL. Chemical constituents of *Stenoloma chusanum* (II) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 40: 104-106.
- [23] Chen X. Studies on the Chemical Constituents and Anti-inflammatory of Yao Medicine *Pothos chinensis* (Raf.) Merr. (瑶药石柑子的化学成分及抗炎活性研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017.