

中麻黄二氯甲烷萃取部位化学成分研究

范锡玲^{1,2}, 曹彦刚^{1,2}, 郑晓珂^{1,2,3}, 王振中⁴, 肖伟⁴, 冯卫生^{1,2,3*}

(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 河南省中药开发工程技术研究中心, 河南 郑州 450046;
3. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046; 4. 中药制药过程控制与智能制造
技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222001)

摘要: 采用各种柱色谱分离技术对中麻黄二氯甲烷萃取部位化学成分进行分离纯化得到10个化合物, 并通过波谱学方法 (MS 和 NMR) 对其进行结构鉴定, 分别为 1-allyl-3,4-dimethoxy-benzene-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**1**)、lyoniresinol (**2**)、开环异落叶松脂素 (**3**)、4,3',4'-trihydroxy-3-methoxylignan-9,9'-diyl diacetate (**4**)、dehydroconiferyl alcohol (**5**)、isocubebin (**6**)、balanophonin B (**7**)、sesquipinsapol B (**8**)、crataegifin A (**9**) 以及 1-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)ethan-1-one (**10**), 其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2**~**10** 为木脂素类化合物, 且均为首次从该植物中分离得到, 化合物 **3**、**4**、**8** 具有潜在的抗哮喘活性。

关键词: 中麻黄; 化学成分; β -氨基己糖苷酶释放率

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2574-07

Chemical constituents of dichloromethane extract from the stems of *Ephedra intermedia*

FAN Xi-ling^{1,2}, CAO Yan-gang^{1,2}, ZHENG Xiao-ke^{1,2,3}, WANG Zhen-zhong⁴,
XIAO Wei⁴, FENG Wei-sheng^{1,2,3*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Engineering and Technology Center for Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China; 3. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan Province and Ministry of Education of China, Zhengzhou 450046, China; 4. State Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Lianyungang 222001, China)

Abstract: Ten compounds were isolated and purified from the dichloromethane extract of stems of *Ephedra intermedia* by various chromatographic methods. Based on the analysis of physicochemical properties and spectral data, the structures of the ten compounds were identified as 1-allyl-3,4-dimethoxy-benzene-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**1**), lyoniresinol (**2**), secoisolariciresinol (**3**), 4,3',4'-trihydroxy-3-methoxylignan-9,9'-diyl diacetate (**4**), dehydroconiferyl alcohol (**5**), isocubebin (**6**), balanophonin B (**7**), sesquipinsapol B (**8**), crataegifin A (**9**), 1-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)ethan-1-one (**10**). Compound **1** is a new compound, named as 1-allyl-3,4-dimethoxy-benzene-5-*O*- β -*D*-glucopyranosyl, compounds **2**–**10** are lignans and isolated from this plant for the first time. Compound **3**, **4**, **8** possess potentially anti-asthmatic activities.

Key words: *Ephedra intermedia*; chemical constituents; β -hexosaminidase release rate

收稿日期: 2024-02-27; 修回日期: 2024-04-30.

基金项目: 国家重点研发计划—中医药现代化研究重点专项 (2019YFC1708800).

*通讯作者 E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0168

麻黄为麻黄科 (Ephedraceae) 麻黄属 (*Ephedra*) 植物草麻黄 (*Ephedra sinica* Stapf.)、中麻黄 (*Ephedra intermedia* Schrenket C. A. Meyer.) 和木贼麻黄 (*Ephedra equisetina* Bunge.) 的干燥草质茎^[1], 史载于《神农本草经》, 列为中品, 药用历史悠久。其味辛, 微苦, 归肺、膀胱经, 具有发汗散寒, 宣肺平喘, 利水消肿的功效^[2]。随着科学技术的不断发展, 后世医家对麻黄具有诸多记载, 如《素问·经脉别论篇》^[3]记载麻黄能“饮入于胃, 脾气散精, 上归于肺, 通调水道, 下输膀胱”。《本草经集注》^[4]称麻黄能“通腠理, 解肌”等。《本草纲目》^[5]在前人的基础上补充了麻黄能“散目赤肿痛, 水肿、风肿、产后血滞”等。同时现代药理学研究也表明, 麻黄具有利尿、镇咳平喘、兴奋神经中枢系统、抗肿瘤的丰富的药理活性^[6-10]。

查阅文献^[11-14]发现, 关于麻黄的药效物质基础研究多集中于草麻黄和木贼麻黄, 其化学成分主要有木脂素类、生物碱类、黄酮类、挥发油以及多糖类等化合物。但关于中麻黄的化学成分研究相对较少, 为进一步丰富中麻黄的化学成分, 明确其药效物质基础, 本研究对中麻黄二氯甲烷萃取部位进行化学成分研究, 得到10个化合物, 分别为: 1-allyl-3,4-dimethoxy-benzene-5-O- β -D-glucopyranoside (1)、lyoniresinol (2)、开环异落叶松脂素 (3)、4,3',4'-trihydroxy-3-methoxylignan-9,9'-diyl diacetate (4)、dehydroconiferyl alcohol (5)、isocubebin (6)、balanophonin B (7)、sesquipinsapol B (8)、crataefin A (9) 以及 1-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)ethan-1-one (10), 结构见图1。其中化合物1为新化合物, 化合物2~10为首次从该植物中分离得到的木脂素类化合物; 并对所得单体化合物进行体外抗哮喘活性筛选, 结果表明, 化合物3、4、8能够通过抑制 β -氨基己糖苷酶的释放, 改善RBL-2H3细胞脱颗粒现象, 发挥潜在的抗哮喘活性。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物1 无定形粉末, 易溶于甲醇。 $[\alpha]_D^{20}$: -70.202 (c 0.040, CH₃OH), 经HR-ESI-MS测定得到准分子离子峰 $[M+Na]^+$ m/z : 379.136 3 (C₁₇H₂₄O₈Na 计算值为 379.138 9), 提示该化合物的分子式为 C₁₇H₂₄O₈。UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ): 204 (1.927); IR 光谱中显示该结构中含有羟基 (3 367 cm⁻¹), 苯环 (1 409 cm⁻¹) 等特征吸收峰。

在¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) 谱中, 在芳香区, δ_H : 6.67 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-2), 6.55 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-6)为苯环上的两个氢质子信号, δ_H : 5.94 (1H, m, H-8), 5.08 (1H, dd, J = 17.0, 1.7 Hz, H-9a), 5.03 (1H, dd, J = 17.0, 4.9 Hz, H-9b) 为一个反式双键氢质子信号, δ_H : 4.87 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1') 以及 3.38~3.86 处的一系列多重峰, 结合HSQC及碳谱数据 δ_C : 102.9 (C-

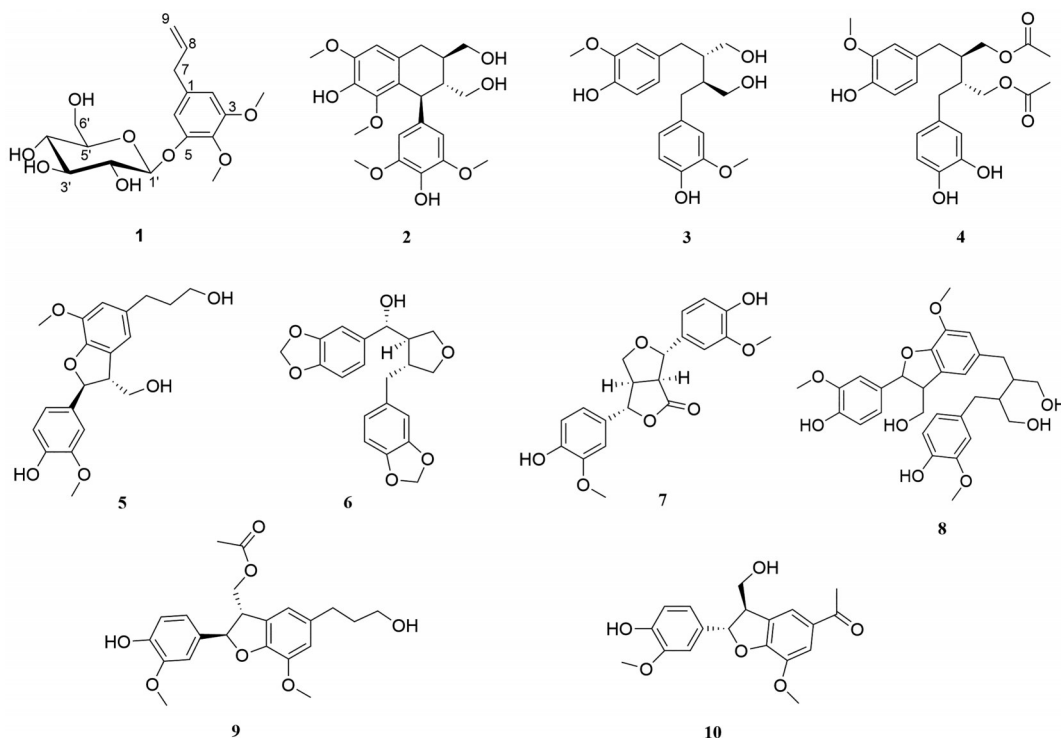


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-10

1'), 75.0 (C-2'), 78.2 (C-3'), 71.3 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.5 (C-6'), 可推测该化合物含有一个葡萄糖片段, 通过酸水解确定葡萄糖的绝对构型为 *D*-构型 ($t_R = 16.8$ min), 同时根据端基氢的偶合常数 $J = 7.4$ Hz 推断为 β -构型; δ_H : 3.32 (2H, br s, H-7) 为一个亚甲基氢信号, δ_H : 3.81 (3H, s, 3-OCH₃), 3.78 (3H, s, 4-OCH₃) 为两个甲氧基氢信号。

在 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) 谱中, 共给出 17 个碳信号, 在芳香区, δ_C : 137.8 (C-1)、110.9 (C-2)、154.5 (C-3)、138.1 (C-4)、152.1 (C-5)、108.1 (C-6) 为苯环上的碳信号, δ_C : 138.7 (C-8)、116.2 (C-9) 为一个反式双键上的碳信号。结合 DEPT 135 谱可知, δ_C : 62.5 (C-7) 为一个亚甲基碳信号, δ_C : 56.5 (3-OCH₃)、61.6 (4-OCH₃) 为两个甲氧基碳信号。在 ¹H-¹H COSY 谱中, H-8 与 H-9a、H-9b、H-7 分别有相关关系, 即 H-7/8/9 为一个自旋偶合体系。在 HMBC 图谱中, H-1' 与 C-5 具有远程相关关系, 提示葡萄糖片段的与苯环上的 C-5 位相连; H-7 与 C-1 具有远程相关关系, 提示 C₇-C₉ 片段通过 C-7 与苯环上的 C-1 位相连; δ_H : 3.81 (3-OCH₃)、3.78 (4-OCH₃) 分别与 C-3、C-4 具有远程相关关系, 提示 δ_H : 3.81 (3-OCH₃)、3.78 (4-OCH₃) 分别连在苯环上的 C-3 和 C-4 位。综合以上分析, 可以确定该化合物的结构如图 2 所示, 其主要 ¹H-¹H COSY 和 HMBC 相关关系见图 3, 经 Scifinder 检索为一个新化合物, 命名为 1-allyl-3,4-dimethoxy-benzene-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside, 其碳氢数据归属见表 1。

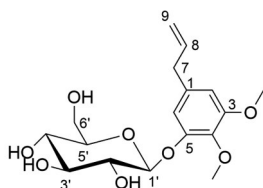


Figure 2 Structure of compound 1

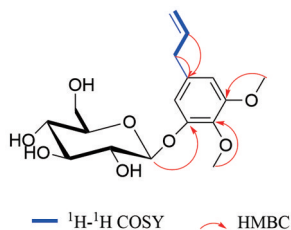


Figure 3 Structure and key ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compound 1

2 体外抗哮喘活性筛选

通过建立 C48/80 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒体外模型, 对中麻黄二氯甲烷萃取部位得到的 10 个单体化合物进行活性筛选, 结果表明, 与模型组相比, 化合物

Table 1 ¹H NMR (500 MHz in CD₃OD) and ¹³C NMR (125 MHz in CD₃OD) data of compound 1

No.	δ_H	δ_C
1		137.8
2	6.67 (1H, d, $J=1.3$ Hz)	110.9
3		154.5
4		138.1
5		152.1
6	6.55 (1H, d, $J=1.3$ Hz)	108.1
7	3.32 (2H, br s)	41.3
8	5.94 (1H, m)	138.7
9	5.08 (1H, dd, $J = 17.0, 1.7$ Hz)	116.2
	5.03 (1H, dd, $J = 17.0, 4.9$ Hz)	
1'	4.87 (1H, d, $J = 7.4$ Hz)	102.9
2'	3.38–3.86 (4H, m)	75.0
3'		78.2
4'		71.3
5'		78.0
6'	3.86 (1H, m)	62.5
	3.68 (1H, m)	
3-OCH ₃	3.81 (3H, s)	56.5
4-OCH ₃	3.78 (3H, s)	61.6

4 能够显著抑制 β -氨基己糖苷酶的释放, 化合物 3 和 8 能够轻微抑制 β -氨基己糖苷酶的释放, 化合物 3、4、8 均能不同程度改善 RBL-2H3 细胞脱颗粒现象 (表 2)。

Table 2 Effect of compounds on release of β -hexosaminidase (β -Hex) in RBL-2H3 induced by C48/80. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs normal group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

Group	Dose/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Release of β -Hex/%
Normal	–	0.59 \pm 0.06
Model	–	1.00 \pm 0.08 ^{##}
1	10	1.08 \pm 0.07
3	10	0.80 \pm 0.03
4	10	0.69 \pm 0.05 [*]
5	10	1.05 \pm 0.06
6	10	0.90 \pm 0.02
8	10	0.87 \pm 0.12

实验部分

所用仪器分别为 Bruker AVANCE III 500 型核磁共振仪、Bruker maxis HD 型飞行时间质谱, 德国布鲁克公司; 赛谱锐思 LC52 型高压制备液相色谱仪 (赛谱锐思北京科技有限公司); Thermo EVO300 紫外分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 型紫外检测器; Autopol IV 全自动旋光仪 (美国鲁道夫公司); N-1001 型旋转蒸发仪、A-1000S 型水流抽气机、N-1111 型冷冻水循环装置 (上海埃朗仪器有限公司); 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

所用试剂分别为 YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (250 mm \times 20 mm, 5 μm , 日本 YMC 有限公司); 柱色谱填料 Sephadex LH-20 (瑞典 Amersham Pharmacia

Biotech 公司); Toyopearl HW-40C (日本 TOSOH 公司); ODS (40~60 μm , 日本 YMC 有限公司); MCI gel CHP-20、大孔树脂 Diaion HP-20 (日本三菱化学公司); 薄层色谱硅胶 GF254、柱色谱硅胶 (100~200 目、200~300 目, 青岛海洋化工厂); 甲醇 (色谱纯, 天津四友精细化学品有限公司); 乙腈 (色谱纯, 美国天地有限公司); 大鼠嗜碱性细胞白血病细胞株 (RBL-2H3) (北纳创联生物科技有限公司); TrintonX-100 (批号: 1109F0518, 北京索莱宝科技有限公司); EMEM 培养基 (Gibco Invitrogen 公司); 氨苄青霉素 (批号: 3230426002)、链霉素 (批号: 5220726003)、C48/80 (批号: 0000220011)、4-硝基苯基-*N*-乙酰基- β -*D*-氨基葡萄糖 (批号: 102547763, 纯度 $\geq 99\%$), 美国 Sigma 公司; 所用其他分析纯试剂均为天津恒兴化学试剂有限公司。

中麻黄购自新疆西域漠草中药材开发有限公司, 经河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为麻黄科植物中麻黄的干燥草质茎, 植物标本 (NO.20201111) 保存于河南中医药大学中药化学提取分离实验室。

1 提取与分离

取 45.0 kg 中麻黄的干燥草质茎, 切段, 用 50% 含水丙酮浸泡 1 周后, 组织破碎提取 2 次, 减压浓缩得到总浸膏 11.1 kg, 加水分散, 依次用二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取 15 次后得到二氯甲烷部位 (185.0 g)、乙酸乙酯部位 (1.37 kg)、正丁醇部位 (1.5 kg) 和水部位。

二氯甲烷部位 (185.0 g) 上硅胶柱 (100~200 目), 用石油醚-乙酸乙酯 (50:1、20:1、10:1、4:1、1:1) 以及乙酸乙酯-甲醇 (20:1、10:1、5:1) 梯度洗脱, 薄层检识后合并相同流分得到 10 个组分 (D1~10)。D5 (20.1 g) 经硅胶柱色谱 (200~300 目), 以二氯甲烷-甲醇 (150:1 \rightarrow 10:1) 梯度洗脱, 得到 9 个组分 (D5-1~5-9)。D5-3 (3.7 g) 上 MCI gel CHP-20 柱, 以甲醇-水 (10:90 \rightarrow 100:0) 梯度洗脱得到 6 个组分 (D5-3-1~5-3-6), 其中 D5-3-2 经半制备 HPLC (甲醇-水 44:56) 分离纯化得到化合物 5 ($t_{\text{R}} = 28.6$ min, 6.0 mg) 和化合物 10 ($t_{\text{R}} = 32.4$ min, 2.5 mg); D5-3-3 经硅胶柱色谱 (200~300 目), 以二氯甲烷-甲醇 (250:1 \rightarrow 20:1) 梯度洗脱后又经半制备 HPLC (甲醇-水 25:75) 分离纯化得到化合物 2 ($t_{\text{R}} = 30.4$ min, 3.1 mg); D6 (11.8 g) 经 ODS 反相色谱柱分离, 以甲醇-水 (10:90 \rightarrow 100:0) 梯度洗脱, 得到 5 个组分 (D6-1~6-5), D6-4 (1.6 g) 经硅胶柱 (200~300 目), 以甲醇-水 (35:1 \rightarrow 5:1) 梯度洗脱得到 7 个组分, 其中 D6-4-1 和 D6-4-6 分别经半制备 HPLC 分离纯化得到化合物 3 (乙腈-水 22:78, $t_{\text{R}} = 37.8$ min, 18.9 mg) 和化合物 6 (乙腈-水 45:55, $t_{\text{R}} = 30.0$ min, 9.3 mg); D8 (12.0 g)

上 MCI gel CHP-20 柱, 以甲醇-水 (10:90 \rightarrow 100:0) 梯度洗脱, 得到 6 个组分 (D8-1~8-6); D8-5 (1.4 g) 经硅胶柱色谱 (200~300 目), 以二氯甲烷-甲醇 (130:1 \rightarrow 18:1) 梯度洗脱得到 4 个组分 (D8-5-1~8-5-4), 其中 D8-5-2 重复经半制备 HPLC 分离纯化得到化合物 4 (乙腈-水 34:66, $t_{\text{R}} = 30.2$ min, 2.3 mg) 和化合物 7 (乙腈-水 31:69, $t_{\text{R}} = 31.2$ min, 4.2 mg); D10 (24.2 g) 经 ODS 反相色谱柱分离, 以甲醇-水 (10:90 \rightarrow 100:0) 梯度洗脱得到 10 个组分, 其中 D10-5 (5.9 g) 经硅胶柱 (200~300 目), 以二氯甲烷-甲醇 (100:1 \rightarrow 15:1) 梯度洗脱后得到 8 个组分 (D10-5-1~10-5-8), 其中 D10-5-1 上 Sephadex LH-20 凝胶柱 (甲醇-水 70:30) 以及经薄层制备色谱得到化合物 8 (二氯甲烷-甲醇 35:1, 6.4 mg); D10-5-2 上 Sephadex LH-20 凝胶柱, 以纯甲醇洗脱后经半制备 HPLC (甲醇-水 53:47) 分离纯化得到化合物 9 ($t_{\text{R}} = 35.6$ min, 2.3 mg); D10-5-5 上 Sephadex LH-20 凝胶柱, 以纯甲醇洗脱后经薄层制备色谱得到化合物 1 (二氯甲烷-甲醇 25:1, 3.2 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1 无定形粉末, 易溶于甲醇。[α]_D²⁰: -70.202 (c 0.040, CH₃OH), 经 HR-ESI-MS 测定得到准分子离子峰 [M+Na]⁺ m/z : 379.136 3 (C₁₇H₂₄O₈Na 计算值为 379.138 9), 提示该化合物的分子式为 C₁₇H₂₄O₈。UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ): 204 (1.927); IR ν_{max} 3 367、1 409、1 032 cm⁻¹ 等。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) 和 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) 数据见表 1。

化合物 2 白色粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS m/z : 443 [M+Na]⁺, 提示化合物分子式为 C₂₂H₂₈O₈。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_{H} : 6.57 (1H, s, H-2), 6.37 (2H, s, H-2', 6'), 4.30 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, H-7'), 3.59 (1H, dd, $J = 10.8, 5.0$ Hz, H-9a), 3.48 (1H, dd, $J = 10.8, 8.6$ Hz, H-9b), 2.69 (1H, dd, $J = 15.1, 4.7$ Hz, H-7a), 2.56 (1H, dd, $J = 15.1, 11.5$ Hz, H-7b), 1.95 (1H, m, H-8'), 1.61 (1H, m, H-8), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃), 3.73 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.36 (3H, s, 5-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_{C} : 130.2 (C-1), 107.7 (C-2), 148.6 (C-3), 138.9 (C-4), 147.7 (C-5), 126.2 (C-6), 33.6 (C-7), 40.8 (C-8), 66.7 (C-9), 139.3 (C-1'), 106.8 (C-2', 6'), 149.0 (C-3', 5'), 134.5 (C-4'), 42.3 (C-7'), 64.1 (C-9'), 56.7 (3-OCH₃), 60.1 (5-OCH₃), 56.6 (3', 5'-OCH₃)。结合以上数据并参考文献^[15], 确定化合物为 lyoniresinol。

化合物 3 白色粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS m/z : 385 [M+Na]⁺, 提示化合物分子式为 C₂₀H₂₆O₆。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_{H} : 6.65 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5, 5'), 6.58 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2, 2'), 6.53 (2H, dd, $J = 8.0,$

2.0 Hz, H-6, 6'), 3.59 (4H, m, H-9, 9'), 2.65 (2H, dd, $J = 13.8, 6.9$ Hz, H-7a, 7'a), 2.54 (2H, dd, $J = 13.8, 7.8$ Hz, H-7b, 7'b), 1.90 (2H, m, H-8, 8'), 3.73 (6H, s, 3, 3'-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_c : 133.9 (C-1, 1'), 113.4 (C-2, 2'), 148.8 (C-3, 3'), 145.5 (C-4, 4'), 115.8 (C-5, 5'), 122.7 (C-6, 6'), 36.0 (C-7, 7'), 44.1 (C-8, 8'), 62.1 (C-9, 9'), 56.2 (3, 3'-OCH₃)。结合以上数据并参考文献^[16], 确定化合物为开环异落叶松脂素。

化合物 4 无色油状物, 易溶于甲醇, ESI-MS m/z : 455 [M+Na]⁺, 提示化合物分子式为 C₂₃H₂₈O₈。 ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_H : 6.67 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.64 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.59 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.53 (1H, br s, H-6), 6.39 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 4.13 (2H, m, H-9'), 4.00 (2H, m, H-9), 2.67 (1H, dd, $J = 13.9, 7.1$ Hz, H-7a), 2.61 (1H, dd, $J = 12.5, 5.9$ Hz, H-7'a), 2.57 (1H, dd, $J = 12.5, 6.8$ Hz, H-7'b), 2.53 (1H, dd, $J = 13.9, 7.8$ Hz, H-7b), 2.13 (1H, m, H-8'), 2.08 (1H, m, H-8), 2.03 (6H, s, H-12, 12'), 3.77 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_c : 132.8 (C-1), 113.3 (C-2), 148.9 (C-3), 146.2 (C-4), 116.0 (C-5), 122.5 (C-6), 35.8 (C-7), 41.5 (C-8), 65.7 (C-9), 173.0 (C-11, 11'), 20.9 (C-12, 12'), 132.7 (C-1'), 117.1 (C-2'), 145.8 (C-3'), 145.5 (C-4'), 116.3 (C-5'), 121.3 (C-6'), 35.5 (C-7'), 41.2 (C-8'), 65.7 (C-9'), 56.3 (3-OCH₃)。结合以上数据并参考文献^[8], 确定化合物为 4, 3', 4'-trihydroxy-3-methoxylignan-9, 9'-diyl diacetate。

化合物 5 黄色无定形粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS m/z : 385 [M+Na]⁺, 提示化合物分子式为 C₂₀H₂₄O₆。 ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_H : 6.94 (1H, s, H-2), 6.81 (1H, overlap, H-6), 6.75 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.71 (2H, s, H-2', 6'), 5.48 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-7), 3.82 (1H, dd, $J = 11.0, 9.2$ Hz, H-9b), 3.74 (1H, dd, $J = 11.0, 7.2$ Hz, H-9a), 3.56 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-9'), 3.46 (1H, dd, $J = 12.4, 6.2$ Hz, H-8), 2.61 (2H, m, H-7'), 1.81 (2H, m, H-8'), 3.84 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.80 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_c : 134.8 (C-1), 110.5 (C-2), 149.1 (C-3), 147.5 (C-2', 4), 116.1 (C-5), 119.7 (C-6), 89.0 (C-7), 55.4 (C-8), 65.0 (C-9), 129.9 (C-1'), 145.2 (C-3'), 114.0 (C-4'), 136.9 (C-5'), 117.9 (C-6'), 32.9 (C-7'), 35.8 (C-8'), 62.2 (C-9'), 56.7 (3-OCH₃), 56.3 (3'-OCH₃)。结合以上数据并参考文献^[17], 确定化合物为 dehydroconiferyl alcohol。

化合物 6 浅黄色油状物, 易溶于甲醇, ESI-MS m/z 356 [M]⁺, 提示化合物分子式为 C₂₀H₂₀O₆。 ¹H NMR

(CD₃OD, 500 MHz), δ_H : 6.82 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-2), 6.75 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.72 (1H, br s, H-6), 6.71 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.65 (1H, dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, H-6'), 5.91 (2H, s, 10-OCH₂O), 5.88 (2H, s, 10'-OCH₂O), 4.75 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-7), 3.96 (1H, dd, $J = 11.0, 6.5$ Hz, H-9a), 3.80 (1H, dd, $J = 11.0, 7.5$ Hz, H-9b), 3.69 (1H, dd, $J = 11.0, 6.2$ Hz, H-9'a), 3.61 (1H, dd, $J = 11.0, 6.6$ Hz, H-9'b), 2.90 (1H, m, H-7'b), 2.68 (1H, m, H-8'), 2.50 (1H, dd, $J = 13.5, 11.1$ Hz, H-7'a), 2.30 (1H, m, H-8); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_c : 138.5 (C-1), 108.8 (C-2), 149.2 (C-3), 148.4 (C-4), 110.5 (C-5), 120.6 (C-6), 84.0 (C-7), 54.1 (C-8), 60.4 (C-9), 102.3 (C-10), 135.8 (C-1'), 107.3 (C-2'), 149.3 (C-3'), 147.4 (C-4'), 109.1 (C-5'), 120.4 (C-6'), 33.7 (C-7'), 43.8 (C-8'), 73.5 (C-9'), 102.1 (C-10')。结合以上数据并参考文献^[18], 确定化合物为 isocubebin。

化合物 7 白色无定形粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS m/z 373 [M+H]⁺, 提示化合物分子式为 C₂₀H₂₀O₇。 ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_H : 6.96 (1H, br s, H-3'), 6.93 (1H, br s, H-3), 6.84 (1H, overlap, H-5'), 6.82 (1H, overlap, H-5), 6.81 (1H, br s, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 5.38 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-7'), 5.22 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-7), 4.28 (1H, m, H-9'a), 4.02 (1H, m, H-9'b), 3.65 (1H, m, H-8'), 3.34 (1H, m, H-8), 3.86 (3H, s, 2'-OCH₃), 3.85 (3H, s, 2-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_c : 147.5 (C-1), 149.2 (C-2), 110.6 (C-3), 132.4 (C-4), 119.5 (C-5), 116.2 (C-6), 85.1 (C-7), 51.0 (C-8), 179.7 (C-9), (C-1'), 149.4 (C-2'), 110.7 (C-3'), 133.2 (C-4'), 119.8 (C-5'), 116.4 (C-6'), 87.2 (C-7'), 54.5 (C-8'), 73.8 (C-9'), 56.4 (2-OCH₃), 56.5 (2'-OCH₃)。结合以上数据并参考文献^[19], 确定化合物为 balanophenin B。

化合物 8 白色无定形粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS m/z 563 [M+Na]⁺, 提示化合物分子式为 C₃₀H₃₆O₉。 ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_H : 6.96 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 6.83 (1H, dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), 6.63 (1H, d, $J = 1.6, H-2''$), 6.58 (1H, s, H-6'), 6.54 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-6''), 6.50 (1H, s, H-2'), 5.50 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7), 3.80 (1H, s, H-9a), 3.73 (1H, m, H-9b), 3.62 (2H, overlap, H-9'a, 9'a), 3.57 (2H, overlap, H-9'b, 9'b), 3.44 (1H, dd, $J = 12.0, 6.3$ Hz, H-8), 2.68 (2H, m, H-7'a, 7'a), 2.57 (2H, m, H-7'b, 7'b), 1.95 (1H, m, H-8''), 1.92 (1H, m, H-8'), 3.80 (3H, s, 3-OCH₃), 3.76 (3H, s,

3'-OCH₃), 3.71 (3H, s, 3''-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_c: 133.9 (C-1), 110.6 (C-2), 149.0 (C-3), 147.4 (C-4, 4'), 116.1 (C-5), 119.7 (C-6), 88.9 (C-7), 55.3 (C-8), 64.7 (C-9), 135.7 (C-1'), 114.3 (C-2'), 145.1 (C-3'), 134.7 (C-5'), 118.4 (C-6'), 44.2 (C-8'), 62.1 (C-9', 9''), 130.0 (C-1''), 113.5 (C-2''), 148.7 (C-3''), 145.4 (C-4''), 115.8 (C-5''), 122.7 (C-6''), 36.0 (C-7''), 43.9 (C-8''), 56.4 (3-OCH₃), 56.5 (3'-OCH₃), 56.2 (3''-OCH₃)。结合以上数据并参考文献^[20], 确定化合物为 sesquipin-sapol B。

化合物 9 无色油状物, 易溶于甲醇, ESI-MS *m/z* 425 [M+Na]⁺, 提示化合物分子式为 C₂₂H₂₆O₇。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_H: 6.94 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-2'), 6.82 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.74 (1H, s, H-2), 6.71 (1H, s, H-6), 5.43 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-7'), 4.40 (1H, dd, *J* = 11.1, 5.2 Hz, H-9'a), 4.30 (1H, dd, *J* = 11.1, 7.6 Hz, H-9'b), 3.56 (2H, m, H-9), 1.99 (3H, s, H-11'), 3.84 (3H, s, 3-OCH₃), 3.81 (3H, s, 3'-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_c: 137.2 (C-1), 114.4 (C-2), 145.3 (C-3), 128.8 (C-4), 147.5 (C-5), 117.6 (C-6), 32.9 (C-7), 35.8 (C-8), 62.2 (C-9), 133.9 (C-1'), 110.7 (C-2'), 149.2 (C-3'), 147.8 (C-4'), 116.2 (C-5'), 120.0 (C-6'), 89.6 (C-7'), 52.0 (C-8'), 66.8 (C-9'), 172.6 (C-10'), 20.7 (C-11'), 56.7 (3-OCH₃), 56.4 (3'-OCH₃)。结合以上数据并参考文献^[21], 确定化合物为 crataegifin A。

化合物 10 无色油状物, 易溶于甲醇, ESI-MS *m/z* 344 [M]⁺, 提示化合物分子式为 C₁₉H₂₀O₆。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_H: 7.63 (1H, s, H-6'), 7.53 (1H, s, H-2'), 6.94 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.82 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, H-6), 6.77 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 5.63 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-7), 3.85 (2H, dd, *J* = 5.9, 3.2 Hz, H-9), 3.57 (1H, q, *J* = 6.1 Hz, H-8), 2.56 (3H, s, H-8'), 3.90 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ_c: 133.8 (C-1), 110.6 (C-2), 149.2 (C-3, 3'), 147.8 (C-4), 116.3 (C-5), 119.8 (C-6), 90.4 (C-7), 54.6 (C-8), 64.6 (C-9), 130.5 (C-1'), 113.8 (C-2'), 154.5 (C-4'), 132.6 (C-5'), 120.5 (C-6'), 199.3 (C-7'), 26.5 (C-8'), 56.4 (3-OCH₃), 56.7 (3'-OCH₃)。结合以上数据并参考文献^[22], 确定化合物为 1-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)ethan-1-one。

3 体外抗哮喘活性筛选

参考文献^[11], 对所得化合物进行体外抗哮喘活性筛选。将 RBL-2H3 细胞置于含有 15% FBS 的 EMEM 培养基中, 于 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱培养至对

数生长期, 按照细胞密度为每毫升 3×10⁴ 个, 接种于 96 孔板中, 24 h 后分为正常组 (NC)、模型组 (M, C48/80, 30 μg·mL⁻¹)、各给药组 (10 μmol·L⁻¹ + C48/80, 30 μg·mL⁻¹) 以及总酶组 (1% Trinton X-100)。刺激 30 min 后, 取 50 μL 细胞上清, 加入 50 μL 1 mmol·L⁻¹ 的 β-氨基己糖苷酶底物溶液, 37 °C 孵育 1 h, 加入 150 μL Na₂CO₃/NaHCO₃ 终止液终止反应, 酶标仪 405 nm 下检测吸光度, 计算 β-氨基己糖苷酶释放率 (*R*)。R = (A₁ - A₂) / (A₃ - A₂) × 100%, 式中, A₁: 实验组上清液吸光度; A₂: 空白孔上清液吸光度; A₃: 总酶孔上清液吸光度。

4 统计学分析

运用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计处理, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。P < 0.05 表示具有显著性差异, P < 0.01 表示具有极显著差异。

作者贡献: 范锡玲是本文的第一作者, 负责中麻黄药材的分离、鉴定以及文章的整理; 曹彦刚及时对实验中遇到的问题给予帮助和指导, 同时和王振中、肖伟负责相关稿件的修改; 郑晓珂负责文中体外抗哮喘活性实验的指导; 冯卫生负责实验设计、稿件修改以及最终定稿等工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Jia JF, Zeng MN, Zhang BB, et al. Study on the differences of immune effects of water extracts of *Ephedra sinica* Stapf, *Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey., *Ephedra equisetina* Bge. on wind-cold superficies syndrome in rats [J]. Chem Life (生命的化学), 2021, 4: 2265-2273.
- [2] Ye XB. Progress in the study of chemical composition and pharmacological effects of commonly used drug pairs of *Ephedra* [J]. Tradit Chin Med Res (中医研究), 2021, 34: 57-62.
- [3] Cheng F, Hu KM, Zhu S. A review on the action mechanism of Mahuang on enuresis in children [J]. Clin J Chin Med (中医临床研究), 2022, 14: 133-136.
- [4] Li HY, Ding XY, Zhang D, et al. Herbal textual research on Ephedrae Herba in famous classical formulas [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 102-110.
- [5] Liu ZG, Chai CZ. Drug syndrome of ephedra based on its property and pharmacology [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 3883-3889.
- [6] Zhang BB, Zeng MN, Zhang QQ, et al. Intervention effects of *Ephedra sinica* Stapf, *Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey., and *Ephedra equisetina* Bge. on rat model of Fenghanbiaozheng [J]. Chin Med Pharmacol Clin (中药药理与临床), 2022, 38: 121-127.
- [7] Zhu DH, Zhang JK, Jia JF, et al. Alkaloids from the stem of *Ephedra equisetina* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2022, 25: 1-7.

- [8] Zhu DH, Zhang JK, Jia JF, et al. Lignans and terpenoids from the stem of *Ephedra equisetina* Bunge [J]. *Phytochemistry*, 2022, 200: 113230.
- [9] Tian NN, Yang QH, Zhu YX, et al. Mahuang (herbaceous stem of *Ephedra* spp.): chemistry, pharmacodynamics, and pharmacokinetics [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47: 3409-3424.
- [10] Zhang MT, Zhang JL, Ren YY, et al. Research progress in *Ephedrae* Herba [J]. *World J Tradit Chin Med* (世界中医药), 2016, 11: 1917-1921, 1928.
- [11] Zhang BW, Li M, Wang XL, et al. A new suberin from roots of *Ephedra sinica* Stapf [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2024, 59: 661-666.
- [12] Zhu DH, Zhang JK, Li M, et al. Chemical constituents of dichloromethane extract from the stems of *Ephedra equisetina* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2023, 46: 353-357.
- [13] Zhu DH, Zhang JK, Li M, et al. Chemical constituents of dichloromethane extract from *Ephedra equisetina* Bunge. [J]. *Chin Paharm J* (中国药学杂志), 2023, 58: 236-242.
- [14] Tao HM, Zhu QH, Liu YH. Flavonoids from roots of *Ephedra sinica* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 1678-1682.
- [15] Li M, Zhang ZG, Shi JY, et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2020, 30: 481-486.
- [16] Moon SS, Rahman AA, Kim JY, et al. Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 7264-7269.
- [17] Li XS, Long J, Luo YH, et al. A new phenyldihydronaphthalene lignan from the root of *Cynanchum otophyllum* Schneid [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33: 1860-1865.
- [18] Liang S, Shen YH, Tian JM, et al. Phenylpropanoids from *Daphne feddei* and their inhibitory activities against NO production [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 1902-1905.
- [19] Ma GX, Wu HF, Wu LH, et al. Phenylpropanoid constituents from the seeds of *Lithocarpus pachylepis* [J]. *Phytochem Lett*, 2013, 6: 152-155.
- [20] Wen LR, He JR, Wu D, et al. Identification of sesquilignans in Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and their anticancer activities [J]. *J Funct Foods*, 2014, 8: 26-34.
- [21] Zhu DH, Zhang JK, Li M, et al. Lignans from the stems of *Ephedra equisetina* and their anti-asthmatic activities [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2023, 45: 1513-1520.
- [22] Zhang S, Huang Y, Li Y, et al. Anti-neuroinflammatory and antioxidant phenylpropanoids from Chinese olive [J]. *Food Chem*, 2019, 286: 421-427.