

红花中一个炔类和两个苯丙素衍生物

乔霖清, 夏格格, 李瑛杰, 赵文萱, 王彦志*

(河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 采用 MCI Gel CHP-20、ODS、硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱柱以及半制备液相等方法对红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 乙醇提取物的正丁醇萃取部位的化学成分进行分离纯化, 得到 1 个炔烃和 2 个苯丙素类衍生物。运用现代波谱学方法(1D NMR、2D NMR、UV、IR 和 MS) 鉴定结构分别为 (5*R*,*E*)-十四碳-12-烯-8,10-二炔-1,5,14-三醇 (**1**)、(*E*)-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖肉桂酸丁酯 (**2**) 和 (7*S*,8*S*)-7-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯)-7-正丁基-8,9-二醇 (**3**)。1~3 均为新化合物。对化合物 1~3 进行体外抗肾纤维化活性筛选, 均未表现出明显活性。

关键词: 红花; 菊科; 化学成分; 炔烃类; 苯丙素衍生物; 酶水解

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)01-0185-06

An alkyne and two phenylpropanoid derivants from *Carthamus tinctorius* L.

QIAO Lin-qing, XIA Ge-ge, LI Ying-jie, ZHAO Wen-xuan, WANG Yan-zhi*

(School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: The chemical constituents from the *n*-butanol fraction of ethanol extract of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) were isolated and purified using chromatographic process including MCI Gel CHP-20, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography, and semi-preparative HPLC method, and one alkyne and two phenylpropanoid derivants were obtained. Their structures were identified as (5*R*,*E*)-tetradecane-12-ene-8,10-diyne-1,5,14-triol (**1**), (*E*)-8-*O*- β -D-glucopyranosyl *n*-butyl cinnamate (**2**), and (7*S*,8*S*)-7-(4-hydroxy-3-methoxybenzene)-7-butyl-8,9-diol (**3**) by modern spectroscopy methods (1D NMR, 2D NMR, UV, IR and MS). **1–3** are all new compounds. Compounds **1–3** were screened for their anti-renal fibrosis activities *in vitro*, and none of them showed obvious effect.

Key words: safflower; compositae; chemical constituent; alkyne; phenylpropanoid derivant; enzymatic hydrolysis

红花为菊科 (*Compositae*) 植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥管状花, 别名蓝红花、刺红花和菊红花等。主产于新疆、河南省, 另外四川、云南等省少量有产, 河南作为红花最悠久的道地产区之一, 集中于新乡市卫辉县和延津县以及商丘市的宁陵县和柘城县^[1], 称为卫红花。红花在历代本草均有记载, 具有通经活血、祛瘀止痛功效, 主治妇女病、跌打损伤^[2]。现代药理学研究表明, 红花不仅对心脑血管、

免疫系统等有药理作用, 还有抗炎镇痛、抗肿瘤和抗氧化等多种生物活性^[3]。化学成分研究表明红花中含有醌式查尔酮苷、黄酮、生物碱、木脂素、甾醇、有机酸、烷基二醇及多炔等化合物^[4]。近年来, 红花的心脏保护作用被广泛关注, 但是其药效物质还不够明确。为寻找红花中新颖的天然产物, 为其应用开发提供依据, 本实验在课题组之前的研究基础上^[5,6], 对红花正丁醇部位的化学成分进行分离, 得到了 1 个新的炔类化合物 (**1**) 和 2 个新的苯丙素衍生物 (**2** 和 **3**, 图 1), **2** 和 **3** 可能为已知化合物在提取分离过程和正丁醇反应生成的产物。

收稿日期: 2024-07-30; 修回日期: 2024-10-26.

*通讯作者 Tel: 86-371-65962746, E-mail: wangyz@hactcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0734

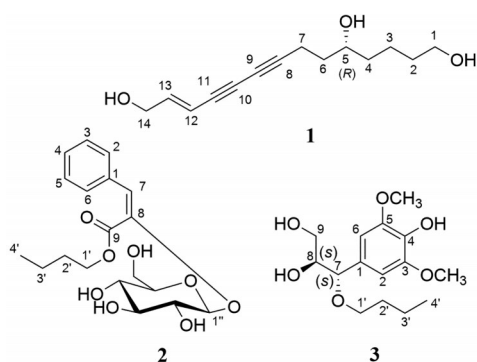


Figure 1 Structures of compounds 1-3

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 **1**, 白色固体, $[\alpha]_D^{20} -9.47$ (c 0.15, MeOH); HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 259.129 6 $[M+Na]^+$, 计算值为 259.130 5 $[M+Na]^+$, 推测分子式为 $C_{14}H_{20}O_3$ 。 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) 谱 (表 1) 显示存在双键氢信号 [δ_H 5.75 (1H, dt, $J = 16.0, 2.0$ Hz, H-12), 6.33 (1H, dt, $J = 16.0, 4.8$ Hz, H-13)], 2 个连氧仲碳氢信号 [δ_H 3.55 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, H₂-1), 4.11 (2H, dd, $J = 4.8, 2.0$ Hz, H₂-14)], 1 个连氧叔碳氢信号 [δ_H 3.61 (1H, dq, $J = 8.3, 4.1$ Hz, H-5)]; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) 谱显示 14 个碳信号, 其中 δ_C 147.0 (C-13)、109.1 (C-12) 为双键碳, δ_C 84.5 (C-8)、66.0 (C-9)、75.3 (C-10)、74.0 (C-11) 为 2 组炔键, δ_C 62.9 (C-1)、62.7 (C-14) 为 2 个连氧仲碳, 还有 1 个连氧叔碳 [δ_C 71.0 (C-5)], 5 个亚甲基碳 [δ_C 33.6 (C-2)、23.1 (C-3)、38.1 (C-4)、36.9 (C-6)、16.6 (C-7)]。其 NMR 数据与文献^[7]报道的 (5*S*,*E*)-十四碳-6-烯-8,10-二炔-1,5,14-三醇基本一致。 1H - 1H COSY 谱 (图 2) 中出现 H₂-1 (δ_H 3.55) / H₂-2 (δ_H 1.55)、H₂-2 / H₂-3 (δ_H 1.43)、H₂-3 / H₂-4 (δ_H 1.43)、H₂-4 / H-5 (δ_H 3.61)、H-5 / H₂-6 (δ_H 1.68)、H₂-6 / H₂-7 (δ_H 1.55) 的相关信号推断出 C₁-C₇ 片段的存在, 结合 HMBC 谱中 H₂-6 和 H₂-7 与 C-8 (δ_C 84.5) 存在相关信号, H₂-7 与 C-5 (δ_C 71.0) 存在相关信号, 确定庚醇基片段与炔键相连。 1H - 1H COSY 谱还显示 H₂-14 (δ_H 4.11) 与 H-13 (δ_H 6.33) 相关, 结合 HMBC 谱 (图 2) 中 H-13 与 C-11 (δ_C 74.0)、H-12 (δ_H 5.75) 和

H-13 与 C-14 均存在相关信号, 而与 C-2 (δ_C 33.6)、C-3 (δ_C 23.1)、C-4 (δ_C 38.1) 和 C-5 (δ_C 71.0) 均无相关信号, 证明了烯丙醇的存在并推测双键位于 $\Delta_{12,13}$ (δ_{C-12} 109.1, δ_{C-13} 147.0), 另有一炔键位于 $\Delta_{10,11}$ 。 δ_C 109.1 (C-12)、147.0 (C-13)、84.5 (C-8)、75.3 (C-10)、66.0 (C-9) 和 74.0 (C-11) 一组数据, 证明存在一个双键和两个炔键相连的共轭结构^[7], 根据双键的耦合常数 ($J = 16.0$ Hz) 推测为反式构型。综上所述, 确定化合物 **1** 的结构为 (*E*)-十四碳-12-烯-8,10-二炔-1,5,14-三醇。

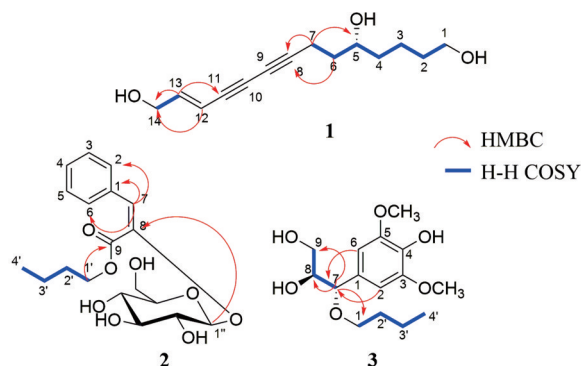


Figure 2 Key 1H - 1H COSY and HMBC correlations of compounds 1-3

C-5 的构型采用计算 NMR 的方法确定为 5*R*, 且概率达到 100%。为了实验的严谨性, 采用 Mosher 实验, 用 Mosher 试剂将化合物 **1** 转化为对应的 *S* 酯和 *R* 酯, 再将 *S* 酯和 *R* 酯用氘代三氯甲烷溶解测得氢谱, 以 H-7 [2.43 (2H, m)] 为参照, $\Delta\delta_{SR} [\Delta(\delta_S - \delta_R)] < 0$, 以 H-1 [3.55 (2H, t, $J = 6.3$ Hz)]、H-2 [1.55 (2H, m)]、H-3 [1.43 (2H, m)] 和 H-4 [1.44 (2H, m)] 为参照, $\Delta\delta_{SR} [\Delta(\delta_S - \delta_R)] > 0$, 根据文献^[8]报道, 判断化合物 **1** 中 C-5 的构型为 *R*。由此确定化合物 **1** 的结构为 (5*R*,*E*)-十四碳-12-烯-8,10-二炔-1,5,14-三醇。

化合物 **2**, 白色固体, $[\alpha]_D^{20} -33.82$ (c 0.19, MeOH); HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 405.150 9 $[M+Na]^+$, 计算值为 405.152 0 $[M+Na]^+$, 推测分子式为 $C_{19}H_{26}O_8$ 。化合物 **2** 的 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) 谱 (表 2) 显示存在一个单取代苯环 [δ_H 7.84 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-2, 6)、7.34 (2H, dd, $J = 8.2, 6.3$ Hz, H-3, 5)、7.30 (1H, d,

Table 1 1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) data of **1** (in CD_3OD)

No.	δ_H	δ_C	No.	δ_H	δ_C
1	3.55 (2H, t, $J = 6.3$ Hz)	62.9	8		84.5
2	1.55 (2H, m)	33.6	9		66.0
3	1.43 (2H, m)	23.1	10		75.3
4	1.43 (2H, m)	38.1	11		74.0
5	3.61 (1H, dq, $J = 8.3, 4.1$ Hz)	71.0	12	5.75 (1H, dt, $J = 16.0, 2.0$ Hz)	109.1
6	1.68 (1H, m)	36.9	13	6.33 (1H, dt, $J = 16.0, 4.8$ Hz)	147.0
7	1.55 (1H, m)	16.6	14	4.11 (2H, dd, $J = 4.8, 2.0$ Hz)	62.7

$J = 7.0$ Hz, H-4)], 一个取代双键 [δ_{H} 6.96 (1H, s, H-7)], 一个葡萄糖 [δ_{H} 5.20 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)、3.48 (1H, dd, $J = 9.7, 7.7$ Hz)、3.40 (1H, t, $J = 8.9$ Hz)、3.34 (1H, t, $J = 9.2$ Hz)、3.21 (1H, m)、3.74 (1H, dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz)、3.59 (1H, dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz)], 1个甲基 [δ_{H} 0.99 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H₃-4')], 3个亚甲基 [δ_{H} 1.72 (2H, m, H₂-2')、1.48 (2H, dt, $J = 15.0, 7.4$ Hz, H₂-3')、4.25 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H₂-1')]; ^{13}C NMR (125 MHz, CD₃OD) 显示 19 个碳信号, 其中一组苯环碳 [δ_{C} 134.7 (C-1)、131.7 (C-6)、129.4 (C-3)、130.0 (C-4)、129.4 (C-3, 5)、131.7 (C-6)], 一组双键碳 [δ_{C} 125.3 (C-7)、142.6 (C-8)], δ_{C} 102.5、75.6、78.6、71.4、78.1 和 62.5 为葡萄糖碳信号, δ_{C} 14.0 (C-4') 为甲基碳, δ_{C} 66.3 (C-1')、31.8 (C-2') 和 20.3 (C-3') 为 3 个亚甲基碳。将其 NMR 数据与文献^[9]报道的 (*E*)-8-*O*- β -*D*-glucopyrano-sylcinnamic acid 进行对比, 推测化合物 **2** 多一个正丁基。 ^1H - ^1H COSY 谱 (图 2) 中出现 H₂-1' (δ_{H} 4.25) / H₂-2' (δ_{H} 1.72)、H₂-2' / H₂-3' (δ_{H} 1.48)、H₂-3' / H₃-4' (δ_{H} 0.99) 的相关信号, 结合 HMBC 谱 (图 2) 中 H₂-1' (δ_{H} 4.25) 与 C-2' (δ_{C} 31.8)、C-3' (δ_{C} 20.4) 存在相关信号, H₂-2' (δ_{H} 1.72) 与 C-1' (δ_{C} 66.3)、C-3' (δ_{C} 20.4) 存在相关信号, H₂-3' (δ_{H} 1.5) 与 C-2' (δ_{C} 31.8)、C-4' (δ_{C} 14.1) 存在相关信号, H₃-4' (δ_{H} 0.99) 与 C-2' (δ_{C} 31.8)、C-3' (δ_{C} 20.4) 存在相关信号, 证明结构中存在丁基片段; H₂-1' (δ_{H} 4.25) 与 C-9 (δ_{C} 165.6) 存在 HMBC 相关信号, 推断丁醇基与羧基成酯。HMBC 谱中, H-7 (δ_{H} 6.96) 与 C-1 (δ_{C} 134.7)、C-2 (δ_{C} 131.7) 和 C-6 (δ_{C} 131.7) 存在相关信号, 说明双键与苯环相连; 葡萄糖端基氢 H-1" (δ_{H} 5.20)

与苯环碳不存在相关信号, 与 C-8 (δ_{C} 142.6) 存在相关信号, 证明葡萄糖连接位置在 C-8 (δ_{C} 142.6), 糖端基氢的耦合常数 $J = 7.7$ Hz 证明苷键为 β 构型。化合物 **2** 经酶水解后进行衍生化反应, 与标准品对照进行 LC-MS 分析, 通过对比供试品葡萄糖衍生物 ($t_{\text{R}} = 11.93$ min, m/z 447.125 3 [M+H]⁺) 与 *D*-葡萄糖标准品衍生物 ($t_{\text{R}} = 11.89$ min, m/z 447.125 4 [M+H]⁺) 的保留时间和质谱数据, 确定化合物 **2** 中葡萄糖的绝对构型为 *D*-型。综上所述, 确定化合物 **2** 为 (*E*)-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖肉桂酸丁酯。

化合物 **3**, 白色固体, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -7.58$ (c 0.13, MeOH); HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 323.147 0 [M+Na]⁺, 计算值为 323.146 5 [M+Na]⁺, 推测分子式为 C₁₅H₂₄O₆。 ^1H NMR (500 MHz, CD₃OD) 谱 (表 2) 显示存在 1,3,4,5-四取代苯环 [δ_{H} 6.62 (2H, s, H-2, 6)], 2 个甲氧基 [δ_{H} 3.83 (6H, s)], 2 个连氧亚甲基 δ_{H} 3.46 (1H, m, H-9a)、3.31 (1H, m, H-9b) 和 δ_{H} 3.34 (2H, m, H₂-1'), 2 个连氧次甲基 [δ_{H} 4.18 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7)、 δ_{H} 3.65 (1H, td, $J = 6.4, 3.9$ Hz, H-8)], 2 个亚甲基 [δ_{H} 1.39 (2H, m, H₂-2')、 δ_{H} 1.57 (2H, m, H₂-3')], 1 个甲基 [δ_{H} 0.88 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H₃-4')]; ^{13}C NMR (125 MHz, CD₃OD) 显示 15 个碳信号, 其中 δ_{C} 129.2 (C-1)、105.7 (C-2, 6)、149.3 (C-3, 5) 和 131.5 (C-4) 为苯环碳, δ_{C} 64.0 (C-9)、69.7 (C-1')、77.1 (C-8)、84.0 (C-7) 为连氧叔碳或仲碳, δ_{C} 56.7 为甲氧基碳, δ_{C} 14.2 (C-4') 为甲基碳, δ_{C} 33.0 (C-2')、20.4 (C-3') 为亚甲基碳。以上 NMR 数据与文献^[10]报道的 (2*S*, 3*R*)-3-(4-羟基-3-甲氧基苯)-3-甲氧基丙烷-1,2-二醇对

Table 2 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR data of **2** and **3** (in CD₃OD)

No.	2		3	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		134.7		129.2
2	7.84 (1H, d, $J = 7.1$ Hz)	131.7	6.62 (1H, s)	105.7
3	7.34 (1H, dd, $J = 8.2, 6.3$ Hz)	129.4		149.3
4	7.30 (1H, 7.0 Hz)	130.0		131.5
5	7.34 (1H, dd, $J = 8.2, 6.3$ Hz)	129.4		149.3
6	7.84 (1H, d, $J = 7.1$ Hz)	131.7	6.62 (1H, s)	105.7
7	6.96 (1H, s)	125.3	4.18 (1H, d, $J = 6.4$ Hz)	84.0
8		142.6	3.65 (1H, td, $J = 6.4, 3.9$ Hz)	77.1
9		165.6	3.46 (1H, m)	64.0
			3.31 (1H, m)	
1'	4.25 (2H, t, $J = 6.6$ Hz)	66.3	3.34 (2H, m)	69.7
2'	1.72 (2H, m)	31.8	1.39 (2H, m)	33.0
3'	1.48 (2H, dt, $J = 15.0, 7.4$ Hz)	20.3	1.57 (2H, m)	20.4
4'	0.99 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)	14.1	0.88 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)	14.2
1"	5.20 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	102.5		
2"	3.48 (1H, dd, $J = 9.1, 7.7$ Hz)	75.6		
3"	3.40 (1H, t, $J = 8.9$ Hz)	78.6		
4"	3.34 (1H, t, $J = 9.2$ Hz)	71.4		
5"	3.21 (1H, m)	78.1		
6"	3.74 (1H, dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz)	62.5		
	3.59 (1H, dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz)			
-OCH ₃			3.83 (6H, s)	56.7

比非常相近,区别点是参考物C-7的甲氧基改为正丁基且苯环C-5位连接甲氧基。 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY谱(图2)中 H_2-1' (δ_{H} 3.34) / H_2-2' (δ_{H} 1.39)、 H_2-2' / H_2-3' (δ_{H} 1.57)、 H_2-3' / H_3-4' (δ_{H} 0.88)、 $\text{H}-7$ (δ_{H} 4.18) / $\text{H}-8$ (δ_{H} 3.65)、 $\text{H}-8$ / $\text{H}-9$ (δ_{H} 3.46) 的相关信号,结合HBMC谱(图2)中苯环氢 $\text{H}-2$ (δ_{H} 6.62)和 $\text{H}-6$ (δ_{H} 6.62)与连氧碳C-7 (δ_{C} 84.0)有相关信号,推测C-7 (δ_{C} 84.0)与C-1 (δ_{C} 129.2)相连, $\text{H}-7$ (δ_{H} 4.18)与C-8 (δ_{C} 77.1)、C-9 (δ_{C} 64.0)、C-1' (δ_{C} 69.7)具有相关信号,证明正丁醇基在C-7成酯。据文献^[11]报道,对于邻二醇手性中心的构型,可以根据手性碳上 $\text{H}-7$ 和 $\text{H}-8$ 的耦合常数来判断相对构型,苏式构型耦合常数为7.0 Hz左右,赤式构型为3.5 Hz左右。化合物 $\mathbf{3}$ 的 $\text{H}-7$ (δ_{H} 4.18, 1H, d, $J = 6.4$ Hz)和 $\text{H}-8$ (δ_{H} 3.65, 1H, dt, $J = 6.4, 3.9$ Hz),耦合常数6.4 Hz与苏式构型较为接近。为了确定化合物 $\mathbf{3}$ 的绝对构型,采用计算ECD的方法,结果显示实验ECD曲线与构型(7*S*, 8*S*)的曲线吻合较好(图3),故确定化合物 $\mathbf{3}$ 的绝对构型为(7*S*, 8*S*),综上,确定化合物 $\mathbf{3}$ 的结构为(7*S*, 8*S*)-7-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯)-7-正丁基-8,9-二醇。

2 体外抗肾纤维化活性筛选

使用生长因子(TGF- β 1)诱导大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52e)进行纤维化,以模拟肾纤维化的情况。

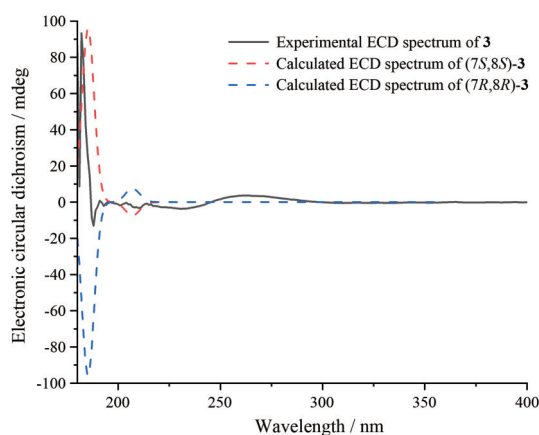


Figure 3 Experimental and calculated ECD of compound $\mathbf{3}$

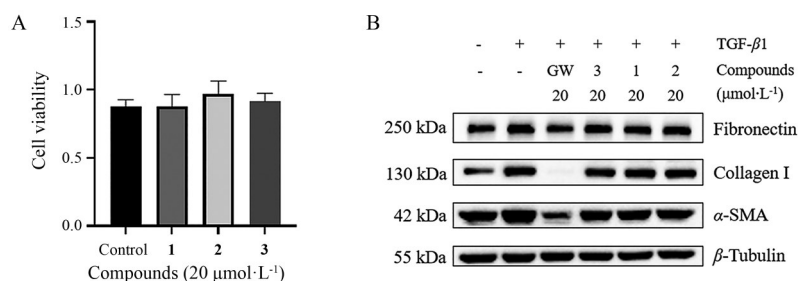


Figure 4 Compound $\mathbf{1-3}$ are inactive against renal fibrosis. A: Cell viability of compounds $\mathbf{1-3}$ at $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h was determined by CCK-8; B: Western blot was used to determine the expression levels of relevant protein markers in renal fibrosis at $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Internal control: β -Tubulin; positive control: GW (GW788388)

使用CCK-8试剂盒对被化合物处理过的细胞进行细胞活力测定,结果显示所有化合物在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下均对细胞活力无影响或影响较小(图4A)。通过Western blot实验结果显示,化合物 $\mathbf{1-3}$ 在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,无明显的抑制纤维连接蛋白(fibronectin)表达作用(图4B)。

实验部分

1 实验仪器与试剂

AM-500 MHz 超导核磁共振仪 (TMS 做内标, 德国 Bruker 公司); Triple TOF 6600 UPLC/MS 液质联用分析仪 (美国 AB SCIEX 公司); LC-52 型半制备液相色谱仪和半制备用色谱柱 Basic C_{18} (120 A $5 \mu\text{m}$, $10 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$), 赛谱锐思北京科技有限公司; Anton Paar MCP 5100 型旋光仪 (奥地利 Anton Paar 公司); EVO300 紫外分光光度计和 Nicolet IS10 红外光谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); CA-2610 冷却水循环装置 (上海爱朗仪器有限公司), 1820C 型纯水机 (重庆摩尔水处理设备有限公司); ZF-90 型暗箱式紫外投射仪 (上海宝山顾村光电仪器厂); 5424R 离心机 (德国 Eppendorf 公司); SQP 型精密分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); HH-4 电热恒温水浴锅 (上海比朗仪器有限公司); TH-II 型薄层色谱显色加热器 (上海科哲生化科技有限公司); MCI Gel CHP-20 柱色谱材料 (日本三菱化学公司), Sephadex LH-20 柱色谱材料 (瑞典 Pharmacia Biotech 公司); 硅藻土和正相 200~300 目硅胶柱色谱材料 (青岛海洋化工厂); UPLC-MS 用色谱柱 Eclipse XDS- C_{18} ($3.5 \mu\text{m}$, $3.0 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, 美国 Agilent 公司); 色谱纯及分析纯试剂 (天津四友精细化学品有限公司); GW788388 (美国 Glpbio 公司, 批号: GC11878); TGF- β (上海皓元生物医药科技有限公司, 批号: 318652); fibronectin (批号: AB268020) 和 collagen (批号: AB270993), 英国 Abcam 公司; β -Tubulin (上海艾比玛特生物医药有限公司, 批号: M20005F); α -SMA (美

国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: A2547); CCK-8 (中国大连美仑生物技术有限公司, 批号: MA0218-Mar-12J)。

红花于2018年12月采自河南省延津县, 经河南中医药大学陈随清教授鉴定为菊科植物红花 (*C. tinctorius* L.) 的干燥冠状花, 属于卫红花。药材标本 (编号: 20181212A) 保存于河南中医药大学药学院中药化学实验室。

2 提取分离

18.0 kg 干燥红花用 70% 含水丙酮组织破碎提取两次, 合并提取液, 低温减压浓缩得到总浸膏 3.6 kg。浸膏用 8 L 的水混悬, 依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 减压浓缩后得到石油醚部位 (123.0 g)、二氯甲烷部位 (78.5 g)、乙酸乙酯部位 (280.0 g)、正丁醇部位 (400.0 g) 和水部位。正丁醇部位采用 MCI 色谱柱乙醇/水溶剂体系进行洗脱, 得到水部位 (57.6 g), 10% 乙醇部位 (44.2 g), 20% 乙醇部位 (42.6 g), 30% 乙醇部位 (65.7 g), 40% 乙醇部位 (35.5 g), 50% 乙醇部位 (37.6 g), 70% 乙醇部位 (23.4 g) 和 95% 乙醇部位 (35.0 g)。40% 乙醇部位采用 ODS 色谱柱分离, 甲醇-水 (10%~100%) 系统梯度洗脱, 得到 6 个组分 Fr.A1~Fr.A6。将 Fr.A3 (6.7 g) 采用 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 用甲醇洗脱, 得到 4 个组分 Fr.A3.1~Fr.A3.4。将 Fr.A3.2 (864.0 mg) 采用硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (50:1~1:1) 系统梯度洗脱, 得到 3 个组分 Fr.A3.2.1~Fr.A3.2.3, Fr.A3.2.1 (37.0 mg) 经半制备高效液相色谱分离纯化, 以甲醇-水 (48:52) 进行洗脱, 流速为 3 mL·min⁻¹, 得到化合物 3 ($t_R = 20.66$ min, 4.15 mg)。50% 乙醇部位用 MCI 色谱柱分离, 乙醇-水系统梯度洗脱, 得到 6 个组分 Fr.B1~Fr.B6。Fr.B4 (6.7 g) 采用 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 100% 甲醇进行洗脱, 得到 4 个组分 Fr.B4.1~Fr.B4.4, Fr.B4.1 (1.9 g) 采用硅胶柱色谱 (200~300 目), 二氯甲烷-甲醇 (50:1~1:1) 梯度洗脱, 得到 3 个组分 (Fr.B4.1.1~Fr.B4.1.3), Fr.B4.1.3 (48.1 mg) 经半制备高效液相色谱分离纯化, 以甲醇-水 (66:34) 进行洗脱, 流速为 3 mL·min⁻¹, 得到化合物 1 ($t_R = 10.90$ min, 3.41 mg)。Fr.B6 (3.2 g) 采用 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 用 100% 甲醇洗脱, 得到 3 个组分 Fr.B6.1~Fr.B6.3, Fr.B6.1 (1.0 g) 采用硅胶柱色谱 (200~300 目), 二氯甲烷-甲醇 (50:1~1:1) 梯度洗脱, 得到 3 个组分 Fr.B6.1.1~Fr.B6.1.3, Fr.B6.1.3 (32.9 mg) 经半制备高效液相色谱分离纯化, 以甲醇-水 (77:23) 进行洗脱, 流速为 3 mL·min⁻¹, 得到化合物 2 ($t_R = 16.40$ min, 5.85 mg)。

3 酶水解和葡萄糖绝对构型的确定

化合物 2 约 1 mg, 精密称定后, 加入 2.1 mg 蜗牛

酶 (上海源叶生物科技有限公司), 再加入 3 mL 蒸馏水, 置于 37 °C 水浴加热 48 h, 反应液吹干后加入 1 mL 蒸馏水, 然后加入乙酸乙酯 (1 mL×3 次) 进行萃取, 水层浓缩干燥得到葡萄糖。水层样品中加入 1 mg L⁻¹ 半胱氨酸甲酯酸盐 (上海麦克林生化科技股份有限公司), 再加入 1 mL 吡啶 (MREDA), 60 °C 水浴加热 1.5 h 后, 加入 20 μL 邻甲苯异硫氰酸酯 (上海麦克林生化科技股份有限公司), 在 60 °C 水浴下加热 1.5 h, 得到衍生化产物。同时各取 1 mg *D*-和 *L*-葡萄糖对照品进行上述衍生化过程, 将化合物 2 衍生物和两种葡萄糖标准品衍生物进行 LC-MS 分析。色谱条件: Agilent Eclipse XDS-C18 (3.5 μm, 3.0 mm × 150 mm); 等度洗脱: 水 (A)-甲醇 (B), 60:40, 0~28 min; 柱温 42 °C, 流速 0.3 mL·min⁻¹; 质谱条件: 正离子模式。*D*-葡萄糖对照品衍生物 ($t_R = 11.89$ min, m/z 447.125 4 [M+H]⁺), *L*-葡萄糖对照品衍生物 ($t_R = 10.79$ min, m/z 447.127 9 [M+H]⁺)^[12]。

4 Mosher 实验

化合物 1 约 1 mg 两份, 干燥后各加入 50 μL 吡啶, 再分别加入 15 μL 的 (*S*)-和 (*R*)-(+)- α -甲氧基- α -(三氟甲基)苯乙酰胺。密封反应约 6 h, 真空干燥后用半制备高效液相进行纯化, 色谱条件: 乙腈-水 (9:1), 流速 3 mL·min⁻¹, *R* 酯 $t_R = 13.27$ min, *S* 酯 $t_R = 14.97$ min。将纯化后的化合物溶解于氘代三氯甲烷测试氢谱, 以 H-1、H-2、H-3、H-4 和 H-7 为参照, 计算 $\Delta\delta_{SR} [\Delta(\delta_S - \delta_R)]$, 所得结果与计算结果一致。

5 结构鉴定

化合物 1, 白色固体, 易溶于甲醇, $[\alpha]_D^{20} -9.47$ (c 0.15, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 212 (2.45), 252 (0.73), 266 (1.00), 282 (0.83) nm; IR ν_{max} 3 376, 2 933, 1 682, 1 029 cm⁻¹; HR-ESI-MS m/z 259.129 6 [M+Na]⁺ (计算值为 C₁₄H₂₀O₃Na⁺, 259.130 5)。

化合物 2, 白色固体, 易溶于甲醇, $[\alpha]_D^{20} -33.82$ (c 0.19, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 203 (1.30), 217 (1.10), 281 (2.09) nm; IR ν_{max} 3 397, 2 962, 1 709, 1 640, 1 449, 1 257, 1 205, 1 071, 1 028 cm⁻¹; HR-ESI-MS m/z 405.150 9 [M+Na]⁺ (计算值为 C₁₉H₂₆O₈Na⁺, 405.152 0)。

化合物 3, 白色固体, 易溶于甲醇, $[\alpha]_D^{20} -7.58$ (c 0.13, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 213 (3.44) nm; IR ν_{max} 1 204, 1 118, 972 cm⁻¹; HR-ESI-MS m/z 323.147 0 [M+Na]⁺ (计算值为 C₁₅H₂₄O₆Na⁺, 323.146 5)。

6 抗肾纤维化活性研究

活性评价实验方法与课题组之前发表的文章^[13]中描述一致。

作者贡献: 乔霖清负责化学实验实施、数据处理和论文撰写; 夏格格负责生物实验实施及数据处理; 李瑛杰、赵文萱参与实验实施; 王彦志负责实验设计、文章审阅和修改。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

References

- [1] Li TT, Han HY, Zhang B, et al. Analysis of hydroxysafflor yellow A and kaempferol in *Carthamus tinctorius* L [J]. J Liaoning Univ Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2017, 19: 67-70.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 157.
- [3] Yang Y, Huang XL, Jiang ZM, et al. Recent advances in studies on chemical constituents and pharmacological effects of safflower [J]. Chin Arch Trad Chin Med (中华中医药学刊), 2023, 41: 119-126.
- [4] Feng DP, Duan BZ, Xia CL, Fan M. Studies on the chemical constituents of safflower [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2021, 4: 2253-2255.
- [5] Liu YL, Wang MN, Cao YG, et al. Chemical constituents from the flowers of *Carthamus tinctorius* L. and their lung protective activity [J]. Molecules, 2022, 27: 3573.
- [6] Wang MN, Cao YG, Wei YX, et al. Saffloflavone, a new flavonoid from the flowers of *Carthamus tinctorius* L. and its cardioprotective activity [J]. J Nat Prod, 2022, 36: 3317-3323.
- [7] Chao CH, Juang SH, Chan HH, et al. UV-guided isolation of polyynes and polyenes from the roots of *Codonopsis pilosula* [J]. RSC Adv, 2015, 5: 41324-41331.
- [8] Chen ZH, Li WS, Zhang ZY, et al. Sinusiaetone A, an anti-inflammatory norditerpenoid with a bicyclo[11.3.0]hexadecane nucleus from the Hainan soft coral *Sinularia siaesensis* [J]. Org Lett, 2021, 23: 5621-5625.
- [9] Cho JY, Kim SJ, Lee HJ, et al. Two novel glycosyl cinnamic and benzoic acids from Korean black raspberry (*Rubus coreanus*) wine [J]. Food Sci Biotechnol, 2014, 23: 1081-1085.
- [10] Hu FC, Han R, Guo C, et al. Chemical constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides* and its neuroprotective activity [J]. Chem Ind Forest Prod (林产化学与工业), 2023, 43: 9-15.
- [11] Xu K, Yang PF, Yang YN, et al. Direct assignment of the threo and erythro configurations in polyacetylene glycosides by ¹H NMR spectroscopy [J]. Org Lett, 2017, 19: 686-689.
- [12] Li Q, Pang X, Lu PX, et al. Four new dammarane triterpenoid saponins from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 1670-1676.
- [13] Zhu YT, Liu XN, Lu BT, et al. Novel sesquiterpenoids with renoprotective activities from the fruits of *Alpinia oxyphylla* as potent TGF- β 1/Smads phosphorylation inhibitors [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72: 13138-13153.