

# 萆澄茄化学成分及一对新的单萜对映异构体的鉴定和抗炎活性研究

陆玫霖<sup>1</sup>, 黄婉凤<sup>1</sup>, 何宇铭<sup>1</sup>, 王宝林<sup>1</sup>, 袁富红<sup>1</sup>, 张 婷<sup>1</sup>, 潘其明<sup>1\*</sup>, 徐新亚<sup>2</sup>,  
何 佳<sup>3</sup>, 韩 珊<sup>3</sup>, 王琴琴<sup>3</sup>, 杨世林<sup>1,3</sup>, 高红伟<sup>1\*</sup>

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530200; 2. 广西中医药大学海洋药物研究院, 广西南宁 530200;  
3. 江西中医药大学药学院, 江西南昌 330000)

**摘要:** 综合运用正相硅胶、ODS、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 反相和手性 HPLC 及重结晶等分离方法从萆澄茄 (山鸡椒 *Litsea cubeba* 的干燥成熟果实) 甲醇浸提物中分离得到 18 个化合物, 通过波谱数据分析和与文献对比确定化合物的结构, 并通过实验和量子化学计算电子圆二色谱确定对映异构体的绝对构型。分别鉴定为 (+)-(R)-4-hydroxypiperitenone (**1a**)、(-)-(S)-4-hydroxypiperitenone (**1b**)、(3S,4S,6R)-3,6-dihydroxy-1-menthene (**2**)、(4S,5R)-4-羟基-5-异丙基-2-甲基环己-2-烯-1-酮 (**3**)、(R)-6-羟基-3-(2-羟基异丙基)-6-甲基环己-2-烯-1-酮 (**4**)、(4S,6R)-4-羟基-6-异丙基-3-甲基环己-2-烯-1-酮 (**5**)、(1R,3S,4R)-3-羟基异胡薄荷醇 (**6**)、subamone (**7**)、(6S)-3,7-dimethyl-7-hydroxy-2(Z)-octen-6-olide (**8**)、(6S)-6,7-二羟基-3,7-二甲基辛-2(Z)-烯酸甲酯 (**9**)、holostylactone (**10**)、芝麻脂素 (**11**)、二甲基罗汉松脂素 (**12**)、*p*-hydroxybenzoylcarbinol (**13**)、丁香醛 (**14**)、对羟基苯甲醛 (**15**)、4-羟基-3-甲氧基苯甲醛 (**16**)、5,4'-二羟基-7-甲氧基黄酮 (**17**)。其中化合物 **1a** 和 **1b** 为一对新的单萜对映异构体, **8** 和 **9** 为新天然产物, **2**~**7**、**10**~**11** 和 **17** 均为首次从木姜子属植物中分离得到。化合物 **1**~**17** 体外抗炎活性测试结果表明, 在 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度下, 化合物 **14** 具有显著的抗炎活性, 对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 (RAW264.7) 中 NO 的产生有抑制作用, 抑制率为 66.27%。

**关键词:** 樟科; 山鸡椒; 萆澄茄; 单萜; 对映异构体; 抗炎

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1348-09

## Identification and anti-inflammatory activity of chemical constituents and a pair of new monoterpenoid enantiomers from the fruits of *Litsea cubeba*

LU Mei-lin<sup>1</sup>, HUANG Wan-feng<sup>1</sup>, HE Yu-ming<sup>1</sup>, WANG Bao-lin<sup>1</sup>, YUAN Fu-hong<sup>1</sup>,  
ZHANG Ting<sup>1</sup>, PAN Qi-ming<sup>1\*</sup>, XU Xin-ya<sup>2</sup>, HE Jia<sup>3</sup>, HAN Shan<sup>3</sup>, WANG Qin-qin<sup>3</sup>,  
YANG Shi-lin<sup>1,3</sup>, GAO Hong-wei<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Institute of Marine Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 3. College of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000, China)

**Abstract:** Eighteen compounds were isolated from the methanol extract of the fruits of *Litsea cubeba* by silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography, semi-preparative RP-HPLC, chiral HPLC and recrystallization. Their structures were elucidated by spectroscopic analyses and by comparison with reported spectroscopic data and physicochemical properties, and the absolute configurations of the enantiomers were established by experimental

收稿日期: 2023-10-29; 修回日期: 2023-12-20.

基金项目: 广西中医药大学 2020 年博士科研启动基金项目 (2020BS017); 广西“带土移植”人才引育计划项目 (2022AC18022); 广西中医药大学第二批“岐黄工程”高层次人才团队培育项目 (2021002).

\*通讯作者 Tel: 86-771-4953513, E-mail: qmingpan@163.com; gaohongwei06@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1216

and calculated electronic circular dichroism spectra. These compounds were identified as (+)-(R)-4-hydroxypiperitenone (**1a**), (-)-(S)-4-hydroxypiperitenone (**1b**), (3S,4S,6R)-3,6-dihydroxy-1-menthene (**2**), (4S,5R)-4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-en-1-one (**3**), (R)-6-hydroxy-3-(2-hydroxypropan-2-yl)-6-methylcyclohex-2-enone (**4**), (4S,6R)-4-hydroxy-6-isopropyl-3-methylcyclohex-2-enone (**5**), (1R,3S,4R)-3-hydroxy isopulegol (**6**), subamone (**7**), (6S)-3,7-dimethyl-7-hydroxy-2(Z)-octen-6-olide (**8**), (6S)-6,7-dihydroxy-3,7-dimethyloct-2(Z)-enoate (**9**), holostylactone (**10**), sesamin (**11**), dimethylmatairesinol (**12**), *p*-hydroxybenzoylcarbinol (**13**), syringaldehyde (**14**), *p*-hydroxybenzaldehyde (**15**), 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (**16**), 5, 4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (**17**). Among them, compounds **1a** and **1b** were a pair of new monoterpenoid enantiomers, **8** and **9** were new natural products, **2-7**, **10**, **11** and **17** were isolated from *Litsea* genus for the first time. The *in vitro* anti-inflammatory effects of compounds **1-17** were evaluated using lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells, the results showed that compound **14** exhibited significant anti-inflammatory activity with NO inhibitory rate of 66.27% at a concentration of 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Key words:** Lauraceae; *Litsea cubeba*; *Litsea cubeba* fruit; monoterpenoid; enantiomer; anti-inflammatory activity

萆澄茄为樟科 (Lauraceae) 木姜子属 *Litsea* Lam. 植物山鸡椒 *Litsea cubeba* Pers. 的干燥成熟果实, 主要分布于广西、江西、福建、浙江等长江以南地区。其气芳香, 味辛、微苦, 性温, 具有温中散寒, 行气止痛的功效, 用于胃寒呕逆, 脘腹冷痛, 寒疝腹痛, 寒湿郁滞, 小便浑浊等症<sup>[1]</sup>。目前临床上有以萆澄茄为“君药”, 用于治疗 (或辅助治疗) 气滞血瘀型胃脘痛、慢性胃炎等症的萆铃胃痛颗粒<sup>[2,3]</sup>。山鸡椒是具有独特芳香气味的药食两用植物, 在民间山鸡椒新鲜果实捣烂内服用于治疗胃寒、呕吐、中暑、积食、胀气等, 外敷用于治疗皮肤病和无名肿痛。除作为药用外, 山鸡椒果实还可以作为食品增味剂, 添加在各种食品中, 风味独特还有很好的抑菌作用<sup>[4]</sup>。研究表明, 萆澄茄主要含有以单萜和倍半萜为主的挥发油、木脂素以及少量黄酮成分, 其中柠檬醛为其挥发油的主要化学成分, 具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、平喘和抗过敏等作用<sup>[4-7]</sup>。为了进一步挖掘萆澄茄的抗炎活性成分, 本实验对萆澄茄甲醇浸提物的化学成分及其抗炎活性进行研究, 从其二氯甲烷和乙酸乙酯萃取部位共分离得到 18 个化合物 (**1-17**), 结构见图 1, 其中化合物 **1a** 和 **1b** 为一对新的单萜对映异构体, **8** 和 **9** 为新天然产物, **2-7**、**10**、**11** 和 **17** 均为首次从该属植物中分离得到。化合物 **1-17** 的体外抗炎活性初步评价表明, 化合物 **14** 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞中一氧化氮 (NO) 释放有较强的抑制作用。

## 结果与讨论

### 1 结构鉴定

化合物 **1** 无色油状物; 薄层喷以 10% 硫酸乙醇-香草醛溶液, 加热显棕色。HR-ESI-MS 给出准分

子离子峰  $m/z$  167.107 9  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值 167.106 7,  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_2$ ), 推测其分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ , 不饱和度为 4。

$^1\text{H}$  NMR 谱 (表 1) 显示 13 个氢信号。其中  $\delta_{\text{H}}$  5.83 (1H, q,  $J = 1.2$  Hz) 为 1 个三取代双键氢信号;  $\delta_{\text{H}}$  4.24 (1H, dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz) 为 1 个与吸电子基团相连的脂肪次甲基氢信号。  $\delta_{\text{H}}$  2.95 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.8$  Hz) 和 2.64 (1H, dd,  $J = 14.0, 7.6$  Hz) 为 2 个同碳偶合的脂肪亚甲基氢信号; 由偶合常数知该亚甲基与上述次甲基直接相连;  $\delta_{\text{H}}$  2.07 (3H, s)、1.99 (3H, s) 和 1.85 (3H, s) 为 3 个与季碳相连的甲基氢信号。

$^{13}\text{C}$  NMR 谱 (表 1) 显示 10 个碳信号, 结合 DEPT 135 谱可知  $\delta_{\text{C}}$  190.9 (C) 为 1 个共轭的羰基碳信号,  $\delta_{\text{C}}$  160.3 (C)、146.2 (C)、129.2 (CH) 和 126.0 (C) 为 4 个烯碳信号, 提示 **1** 中含有 2 个双键;  $\delta_{\text{C}}$  69.1 (CH) 为 1 个与吸电子基团相连的脂肪次甲基碳信号,  $\delta_{\text{C}}$  37.4 ( $\text{CH}_2$ ) 为 1 个脂肪亚甲基碳信号,  $\delta_{\text{C}}$  22.8 ( $\text{CH}_3$ )、22.7 ( $\text{CH}_3$ ) 和 20.1 ( $\text{CH}_3$ ) 为 3 个甲基碳信号。

通过 HSQC 谱进一步将上述碳与对应的氢关联。HSQC 谱显示  $\delta_{\text{H}}$  5.83 (1H, q,  $J = 1.2$  Hz) 与  $\delta_{\text{C}}$  129.2 (CH) 相关, 提示  $\delta_{\text{H}}$  5.83 为烯碳  $\delta_{\text{C}}$  129.2 上的一个烯氢;  $\delta_{\text{H}}$  4.24 (1H, dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz) 与  $\delta_{\text{C}}$  69.1 (CH) 相关, 证实  $\delta_{\text{H}}$  4.24 为与吸电子基团相连的脂肪次甲基碳  $\delta_{\text{C}}$  69.1 上的氢原子。  $\delta_{\text{H}}$  2.95 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.8$  Hz) 和 2.64 (1H, dd,  $J = 14.0, 7.6$  Hz) 均与  $\delta_{\text{C}}$  37.4 ( $\text{CH}_2$ ) 相关, 证实  $\delta_{\text{H}}$  2.95 和 2.64 为脂肪亚甲基碳  $\delta_{\text{C}}$  37.4 上的两个氢原子;  $\delta_{\text{H}}$  2.07 (3H, s)、1.99 (3H, s) 和 1.85 (3H, s) 分别与  $\delta_{\text{C}}$  22.7 ( $\text{CH}_3$ )、20.1 ( $\text{CH}_3$ ) 和 22.8 ( $\text{CH}_3$ ) 相关, 证实  $\delta_{\text{H}}$  2.07、1.99 和 1.85 分别为脂肪甲基碳  $\delta_{\text{C}}$  22.8、20.1 和 22.7 上的氢原子。结合分子式可知上述吸电子基团为羟基。

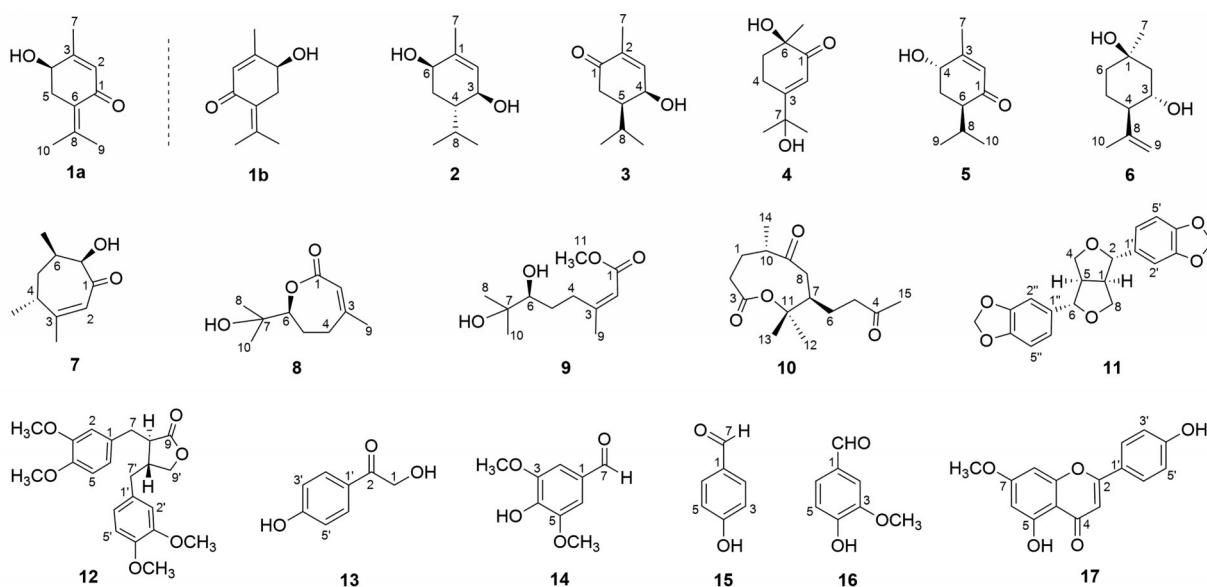


Figure 1 Structures of compounds 1-17

Table 1  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data of compound 1

| No. | $\delta_{\text{H}}$  | $\delta_{\text{C}}$    |
|-----|--|------------------------|
| 1   |  | 190.9 (C)              |
| 2   | 5.83 (1H, q, $J = 1.2$ Hz)   | 129.2 (CH)             |
| 3   |  | 160.3 (C)              |
| 4   | 4.24 (1H, dd, $J = 7.6, 4.8$ Hz)                                       | 69.1 (CH)              |
| 5   | 2.95 (1H, dd, $J = 14.0, 4.8$ Hz)<br>2.64 (1H, dd, $J = 14.0, 7.6$ Hz) | 37.4 ( $\text{CH}_2$ ) |
| 6   |  | 126.0 (C)              |
| 7   | 1.99 (3H, s)   | 20.1 ( $\text{CH}_3$ ) |
| 8   |  | 146.2 (C)              |
| 9   | 2.07 (3H, s)   | 22.8 ( $\text{CH}_3$ ) |
| 10  | 1.85 (3H, s)   | 22.7 ( $\text{CH}_3$ ) |

以上信息结合不饱和度,初步推断化合物**1**为含有1个羟基取代的单环单萜。进一步通过 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY和HMBC谱(图2A)确定化合物**1**的平面结构。HMBC谱中, $\delta_{\text{H}}$  5.83 (H-2)与 $\delta_{\text{C}}$  69.1 (C-4), 20.1 (C-7)相关, $\delta_{\text{H}}$  1.99 ( $\text{H}_3$ -7)与 $\delta_{\text{C}}$  69.1 (C-4)相关,以及H-4/ $\text{H}_2$ -5的 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY相关,提示**1**的结构中存在一个图2B所示的羟基取代的异戊烯基片段。脂肪甲基氢信号 $\delta_{\text{H}}$  2.07 ( $\text{H}_3$ -9), 1.85 ( $\text{H}_3$ -10)均与 $\delta_{\text{C}}$  126.0 (C-6), 146.2 (C-8)存在远程相关,表明它们可能为同一双键碳上的两个甲基;结合 $\delta_{\text{H}}$  2.07 ( $\text{H}_3$ -9), 1.85 ( $\text{H}_3$ -10)均与 $\delta_{\text{C}}$  190.9 (C-1)存在远程相关,可推测**1**结构中存在的另一个氧化的异戊烯基片段(图2C)。B片段的 $\delta_{\text{H}}$  5.83 (H-2), 1.99 ( $\text{H}_3$ -7)分别与C片段的 $\delta_{\text{C}}$  126.0 (C-6), 190.9 (C-1)存在远程相关,证明B片段的C-2与C片段的C-1相连;B片段的 $\delta_{\text{H}}$  4.24 (H-4)和C片段的 $\delta_{\text{C}}$  126.0 (C-6)存在远程相关,及B片段的 $\delta_{\text{H}}$  2.95, 2.64 ( $\text{H}_2$ -5)与C片段

的 $\delta_{\text{C}}$  126.0 (C-6), 146.2 (C-8), 190.9 (C-1)的远程相关证明B片段的C-5和C片段的C-6相连。因此,化合物**1**的平面结构确定为4-hydroxypiperitenone(图2D)。

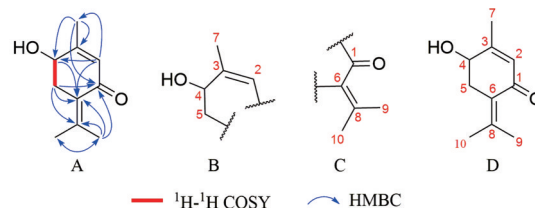


Figure 2  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and key HMBC correlations (A), oxygenated isopentenyl fragments (B, C), and planar structure (D) of compound 1

查阅文献发现化合物**1**的平面结构与从piperitenone的大鼠代谢物<sup>[8]</sup>、piperitenone的真菌*Mucor piriformis*生物转化产物<sup>[9]</sup>及金丝皇菊*Chrysanthemum morifolium*<sup>[10]</sup>中分离得到的4-hydroxypiperitenone的平面结构相同。但从piperitenone的大鼠代谢物和piperitenone的真菌*Mucor piriformis*生物转化产物中分离得到的4-hydroxypiperitenone的 $^1\text{H}$  NMR数据与本文化合物**1**的数据相差较大,通过仔细对比发现这两篇文献<sup>[8,9]</sup>中的5-hydroxypiperitenone的 $^1\text{H}$  NMR数据与本文**1**的数据一致,由于本文**1**的平面结构为通过2D NMR数据分析确定,故可知这两篇文献中的4-hydroxypiperitenone和5-hydroxypiperitenone的羟基位置鉴定有误。且上述3篇文献<sup>[8-10]</sup>均只对4-hydroxypiperitenone的平面结构进行了报道,均未对其绝对构型进行确定。

为了确定化合物**1**的绝对构型,本研究进一步对

其旋光和电子圆二色谱 (electronic circular dichroism, ECD) 进行了测试, 可知该化合物比旋光度较小,  $[\alpha]_D^{20} -7.3$  ( $c$  0.11, MeOH), 且 ECD 谱中无明显的 Cotton 效应, 表明该化合物为外消旋体。随后, 采用手性 HPLC (Hplcone 5-C 手性柱, 正己烷-异丙醇, 90:10) 对 **1** 进行拆分, 得到色谱峰面积比约为 1:1 的一对对映异构体 **1a** ( $[\alpha]_D^{20} +19.5$ ) 和 **1b** ( $[\alpha]_D^{20} -18.3$ )。最后, 通过实验及计算 ECD 确定化合物 **1a** 和 **1b** 的绝对构型, **1a** 和 **1b** 的实验 ECD 谱曲线呈镜像关系, 采用量子化学计算的方法 [B3LYP/6-31G(d)] 计算了 (*R*)-**1** 和 (*S*)-**1** 的 ECD 谱, 结果表明化合物 **1a** 和 **1b** 的实验 ECD 分别与 (*R*)-**1**, (*S*)-**1** 的计算 ECD 吻合较好 (图 3), 从而确定 **1a** 和 **1b** 的绝对构型分别为 4*R* 和 4*S*。因此, 化合物 **1a** 和 **1b** 的结构分别鉴定为 (+)-(*R*)-4-hydroxypiperitenone (**1a**) 和 (-)-(*S*)-4-hydroxypiperitenone (**1b**), 为一对新的单萜对映异构体。

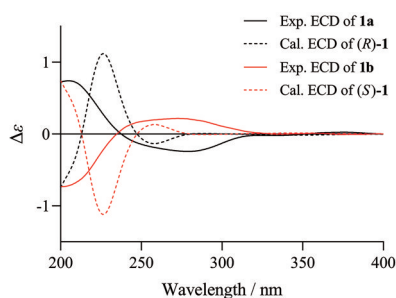


Figure 3 Experimental ECD spectra of **1a** and **1b** and calculated ECD spectra of (*R*)-**1** and (*S*)-**1**

## 2 抗炎活性

采用 MTT 比色法检测化合物 **1**~**17** 对 RAW264.7 细胞活性的影响, Griess 试剂法评价它们对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响。实验结果 (表 2) 显示在  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下化合物 **14** 对 RAW264.7 细胞无毒, 且对 NO 产生有较强的抑制作用, 抑制率为 66.27%, 具有潜在的抗炎活性。

## 3 讨论

本实验通过对萆澄茄甲醇浸提物的化学成分和抗炎活性进行研究, 从中共分离鉴定 18 个化合物, 其中化合物 **1a** 和 **1b** 为 **1** 经手性拆分得到的一对新的单萜对映异构体, 化合物 **14** 具有潜在的抗炎活性。本研究综合化合物 **1** 的 1D 和 2D NMR 谱信息, 首次对 4-hydroxypiperitenone 的氢碳谱进行了全归属 (表 1), 并通过量子化学计算 ECD 确定了手性 HPLC 拆分得到的一对新的单萜对映异构体 **1a** 和 **1b** 的绝对构型。化合物 **1a** 和 **1b** 的发现一定程度上丰富了萆澄茄的化学成分结构类型。萆澄茄中挥发油类成分含量丰富,

Table 2 Inhibitory rates of compounds **1**–**17** against lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production

| Compd./ $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | NO inhibition rate/% | Cell viability/%  |
|--|----------------------|-------------------|
| 1  | $20.71 \pm 2.71$     | $103.51 \pm 3.01$ |
| 2  | $-1.34 \pm 1.16$     | $93.19 \pm 2.04$  |
| 3  | $17.18 \pm 1.06$     | $99.96 \pm 1.42$  |
| 4  | $0.00 \pm 1.06$      | $95.65 \pm 1.61$  |
| 5  | $-4.91 \pm 1.06$     | $102.99 \pm 0.90$ |
| 6  | $16.11 \pm 0$        | $99.31 \pm 2.01$  |
| 7  | $31.95 \pm 1.03$     | $92.99 \pm 1.32$  |
| 8  | $24.85 \pm 1.03$     | $101.01 \pm 5.45$ |
| 9  | $21.30 \pm 1.02$     | $106.29 \pm 2.79$ |
| 10   | $26.63 \pm 4.47$     | $96.08 \pm 3.00$  |
| 11   | $35.57 \pm 1.16$     | $70.96 \pm 1.33$  |
| 12   | $40.83 \pm 1.02$     | $94.61 \pm 0.50$  |
| 13   | $18.79 \pm 1.16$     | $103.33 \pm 0.64$ |
| 14   | $66.27 \pm 1.77$     | $99.67 \pm 1.48$  |
| 15   | $28.40 \pm 1.02$     | $129.25 \pm 3.58$ |
| 16   | $28.99 \pm 1.77$     | $102.40 \pm 1.57$ |
| 17   | $25.44 \pm 0$        | $81.45 \pm 2.51$  |

分子结构类型复杂多样, 具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、平喘和抗过敏等生物活性<sup>[4-7]</sup>, 且其温中散寒, 行气止痛功效的物质基础尚未明确, 值得进一步深入研究。

## 实验部分

Avance III HD 500 MHz 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Waters G2-XS 飞行时间质谱仪和 Waters e2695 分析型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); UV-5200PC 紫外光谱仪 (上海元析仪器有限公司); Nicolet iS10 红外光谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); WZZ-3 自动旋光仪 (上海仪电物光公司); Shimadzu LC-20AD XR, SPD-20A 半制备型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); HT7200S 中压制备色谱仪 (苏州本草天成生物技术有限公司); RV3 eco S096 旋转蒸发器 (德国 IKA 公司); Alpha 2-4 LSCbasic 真空冷冻干燥机 (德国 Christ 公司); ME204E 分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; HH-8 水浴锅 (常州易晨仪器制造有限公司); ZF-7 暗箱式三用紫外分析仪 (上海嘉鹏科技有限公司); SYNERGYH1 多功能微孔板检测仪 (美国伯腾仪器公司); Shimadzu shim-pack GIST 分析型反相色谱柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ , 日本岛津公司); Waters SunFire C18 OBD 半制备型色谱柱 ( $10 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ , 美国 Waters 公司); COSMOSIL 5PE-MS 苯乙基半制备柱 ( $10 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ , 日本 COSMOSIL 公司); Hplcone 5-C 手性柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ , 苏州速研医药科技有限公司); 柱层析用硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂); ODS 填料 ( $5 \mu\text{m}$ , 日本 Daisogel 公司); Sephadex LH-20 凝胶 (美国 Cytiva 公司); 薄层色谱 (硅胶 G, 青岛海洋化工厂); 色谱甲醇、乙腈 (美国费

希尔公司); 其他试剂均为分析纯 (科隆化学品有限公司)。

葶澄茄药材于2021年4月采购于广西壮族自治区柳州市, 经广西中医药大学王柳萍教授鉴定为樟科 (Lauraceae) 木姜子属 *Litsea* 植物山鸡椒 *Litsea cubeba* Pers. 的干燥成熟果实。标本 (BCQ20210412) 现保存于广西中医药大学科学实验中心。

## 1 提取与分离

干燥葶澄茄药材 50.0 kg, 粉碎, 用 10 倍量甲醇室温浸提 3 次, 每次 3 天, 合并提取液减压浓缩得浸膏 20.9 kg。浸膏加水混悬后, 依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次, 浓缩后得各部位萃取物 (A~D)。

二氯甲烷部位 B (150.0 g) 经硅胶 (200~300 目) 柱色谱分离, 石油醚-乙酸乙酯 (50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1) 梯度洗脱, TLC 检测合并得到 20 个组分 (B-1~B-20)。B-14 (1.3 g) 经中压 ODS 柱色谱分离, 依次用 30%、40%、50%、60%、70% 甲醇-水 (8.0 mL·min<sup>-1</sup>) 梯度洗脱得到 20 个流分 (B-14-1~B-14-20), B-14-13 (32.1 mg) 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化, 得到黄色油状物 **1** (16.7 mg); 再用正相手性 HPLC (Hplcone 5-C 手性色谱柱, 正己烷-异丙醇, 90:10, 1.0 mL·min<sup>-1</sup>) 拆分得到化合物 **1a** (2.0 mg,  $t_R = 20.5$  min) 和 **1b** (2.3 mg,  $t_R = 23.5$  min)。B-17 (2.0 g) 经硅胶 (200~300 目) 柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (1:0, 200:1, 100:1, 50:1, 0:1) 梯度洗脱, 得到 8 个流分 (B-17-1~B-17-8)。B-17-7 (464.0 mg) 经中压 ODS 柱色谱分离, 依次用 20%、30%、40%、50%、60% 乙腈-水梯度洗脱 (4.0 mL·min<sup>-1</sup>) 分离得到 15 个流分 (B-17-7-1~B-17-7-15), B-17-7-6 (230.6 mg) 再经半制备 HPLC (SunFire C18 色谱柱, 乙腈-水, 12:88, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 纯化, 得到白色无定形粉末 **6** (118.5 mg,  $t_R = 47.6$  min)。B-19 (7.0 g) 经中压 ODS 柱色谱, 依次用 20%、30%、40%、50%、60%、70% 甲醇-水梯度洗脱 (30.0 mL·min<sup>-1</sup>), 得到 10 个流分 (B-19-1~B-19-10)。B-19-9 (127.9 mg) 经半制备 HPLC (COSMOSIL 苯乙基柱, 乙腈-水, 22:87, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 分离, 得到黄色油状物 **8** (62.0 mg,  $t_R = 16.3$  min) 和 **9** (4.0 mg,  $t_R = 26.2$  min)。

乙酸乙酯部位 C (160.0 g) 经硅胶 (200~300 目) 柱色谱分离, 石油醚-丙酮 (20:1, 15:1, 9:1, 5:1, 1:1) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同流分, 得到 5 个组分 (C-1~C-5)。C-2 (25.7 g) 经硅胶 (200~300 目) 柱色谱分离, 石油醚-乙酸乙酯 (20:1, 15:1, 9:1, 5:1, 1:1) 梯度洗脱, 得到 10 个流分 (C-2-1~C-2-10)。C-2-6 (3.2 g) 经甲

重结晶, 得到白色粉末 **11** (321.0 mg)。C-2-8 (8.4 g) 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (1:0, 300:1, 200:1, 100:1, 70:1, 30:1, 0:1) 梯度洗脱, 得到 10 个流分 (C-2-8-1~C-2-8-10)。C-2-8-3 (174.2 mg) 经半制备 HPLC (SunFire C18 色谱柱, 甲醇-水, 40:60, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 分离, 得到白色粉末 **16** (5.0 mg,  $t_R = 16.3$  min)。C-2-8-6 (720.0 mg) 经中压 ODS 柱色谱, 依次用 40%、50%、60%、70%、80%、90% 甲醇-水梯度洗脱 (4.0 mL·min<sup>-1</sup>), 得到 10 个流分 (C-2-8-6-1~C-2-8-6-10), C-2-8-6-2 (56.0 mg) 再经半制备 HPLC (COSMOSIL 苯乙基柱, 甲醇-水, 30:70, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 分离纯化得到无色结晶 **15** (2.3 mg,  $t_R = 25.5$  min)。C-2-8-6-5 (103.3 mg) 经半制备 HPLC (COSMOSIL 苯乙基柱, 甲醇-水, 50:50, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 纯化得到无色油状物 **5** (1.0 mg,  $t_R = 20.0$  min) 和 **7** (10.0 mg,  $t_R = 25.1$  min)。C-2-8-7 (494.5 mg) 经半制备 HPLC (SunFire C18 色谱柱, 甲醇-水, 36:64, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 分离得到 C-2-8-7-1 (8.2 mg) 和 C-2-8-7-2 (4.3 mg), C-2-8-7-1 和 C-2-8-7-2 再分别通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得到无色油状物 **3** (6.8 mg) 和 **4** (3.0 mg)。C-4 (23.1 g) 经中压 ODS 柱色谱, 依次用 30%、40%、50%、60%、70% 甲醇-水梯度洗脱 (30.0 mL·min<sup>-1</sup>), 得到 40 个组分 (C-4-1~C-4-40), C-4-1 (1.3 g) 经半制备 HPLC (COSMOSIL 苯乙基柱, 甲醇-水, 60:40, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 纯化得到白色结晶 **2** (159.0 mg,  $t_R = 12.7$  min)。C-4-5 (139.7 mg) 经半制备 HPLC (COSMOSIL 苯乙基柱, 甲醇-水, 20:80, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 分离得到无色油状物 **10** (7.8 mg,  $t_R = 26.5$  min) 和白色粉末 **13** (1.7 mg,  $t_R = 29.4$  min)。C-4-15 (199.2 mg) 经半制备 HPLC (COSMOSIL 苯乙基柱, 甲醇-水, 30:70, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 分离得到黄色粉末 **14** (3.0 mg,  $t_R = 42.1$  min)。C-4-30 (678.2 mg) 经半制备 HPLC (COSMOSIL 苯乙基柱, 甲醇-水, 65:35, 2.0 mL·min<sup>-1</sup>) 分离, 得到白色粉末 **12** (103.2 mg,  $t_R = 30.3$  min)。C-4-38 (218.7 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 分离, 得到黄色粉末 **17** (4.3 mg)。

## 2 结构鉴定

化合物 **1** 无色油状物; UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 239 (3.92), 278 (3.76) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$  3 360 (-OH)、2 922 (-CH<sub>3</sub>)、2 852 (-CH<sub>2</sub>-)、1 658 (共轭 C=O)、1 633 (C=C) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)、<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) 数据见表 1; HR-ESI-MS  $m/z$  167.107 9 [M+H]<sup>+</sup> (计算值 167.106 7, C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>)。 **1a**: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +19.5 ( $c$  0.32, MeOH); ECD (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 204 (+0.74), 282 (-0.24) nm。 **1b**: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -18.3 ( $c$  0.31, MeOH); ECD

(MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 204 (-0.72), 282 (-0.20) nm。

化合物**2** 白色片状晶体(甲醇);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +26.6$  ( $c$  0.45, MeOH)。ESI-MS  $m/z$  171  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  5.47 (1H, s, H-2), 3.92 (1H, br s, H-6), 3.85 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-3), 2.11 (1H, m, H-8), 1.77 (3H, s, H-7), 1.73 (1H, dt,  $J = 13.5, 2.7$  Hz, H-5a), 1.60 (1H, m, H-4), 1.39 (1H, td,  $J = 13.5, 4.1$  Hz, H-5b), 0.97 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, 8- $\text{CH}_3$ ), 0.83 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, 8- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  137.4 (C-1), 131.0 (C-2), 69.9 (C-3), 68.4 (C-6), 42.8 (C-4), 30.9 (C-5), 27.0 (C-8), 21.4 (8- $\text{CH}_3$ ), 20.7 (C-7), 17.1 (8- $\text{CH}_3$ )。以上数据结合文献<sup>[11]</sup>, 鉴定化合物**2**为(3*S*,4*S*,6*R*)-3,6-dihydroxy-1-menthene。

化合物**3** 无色油状物; ESI-MS  $m/z$  169  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  6.76 (1H, dq,  $J = 5.8, 1.5$  Hz, H-3), 4.40 (1H, dd,  $J = 5.8, 3.1$  Hz, H-4), 2.53 (1H, dd,  $J = 16.5, 4.3$  Hz, H-6a), 2.43 (1H, dd,  $J = 16.5, 12.8$  Hz, H-6b), 1.78 (3H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-7), 1.78 (1H, overlap, H-8), 1.63 (1H, m, H-5), 1.01 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, 8- $\text{CH}_3$ ), 0.94 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, 8- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  200.4 (C-1), 143.1 (C-3), 137.0 (C-2), 64.1 (C-4), 45.9 (C-5), 36.8 (C-6), 28.5 (C-8), 20.4 (8- $\text{CH}_3$ ), 20.2 (8- $\text{CH}_3$ ), 15.6 (C-7)。以上数据结合文献<sup>[12]</sup>, 鉴定化合物**3**为(4*S*,5*R*)-4-羟基-5-异丙基-2-甲基环己-2-烯-1-酮。

化合物**4** 无色油状物; ESI-MS  $m/z$  207  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  6.09 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz, H-2), 2.62 (1H, m, H-5a), 2.48 (1H, m, H-4a), 2.02 (1H, m, H-4b), 2.01 (1H, m, H-5b), 1.37 (3H, s, 7- $\text{CH}_3$ ), 1.35 (3H, s, 7- $\text{CH}_3$ ), 1.28 (3H, s, 6- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  204.1 (C-1), 173.4 (C-3), 120.9 (C-2), 73.6 (C-6), 73.1 (C-7), 37.6 (C-5), 28.7 (7- $\text{CH}_3$ ), 28.6 (7- $\text{CH}_3$ ), 25.6 (C-4), 23.7 (6- $\text{CH}_3$ )。以上数据结合文献<sup>[13]</sup>, 鉴定化合物**4**为(*R*)-6-羟基-3-(2-羟基异丙基)-6-甲基环己-2-烯-1-酮。

化合物**5** 无色油状物; ESI-MS  $m/z$  169  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  5.81 (1H, br d,  $J = 1.6$  Hz, H-2), 4.36 (1H, t,  $J = 4.5$  Hz, H-4), 2.37 (1H, ddd,  $J = 9.0, 5.8, 4.6$  Hz, H-6), 2.26 (1H, dq,  $J = 7.0, 6.8$  Hz, H-8), 2.16 (1H, ddd,  $J = 13.3, 9.0, 4.2$  Hz, H-5a), 2.05 (1H, dt,  $J = 13.3, 5.3$  Hz, H-5b), 2.04 (3H, s, H-7), 0.94 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, 8- $\text{CH}_3$ ), 0.89 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, 8- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  200.6 (C-1), 158.9 (C-3), 127.4 (C-2), 67.4 (C-4), 48.5 (C-6), 32.5 (C-5), 26.5 (C-8), 20.9 (8- $\text{CH}_3$ ), 20.6 (C-7),

19.0 (8- $\text{CH}_3$ )。以上数据结合文献<sup>[12]</sup>, 鉴定化合物**5**为(4*S*,6*R*)-4-羟基-6-异丙基-3-甲基环己-2-烯-1-酮。

化合物**6** 白色无定形粉末;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +97.2$  ( $c$  0.26,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )。ESI-MS  $m/z$  171  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.90 (1H, br s, H-9a), 4.86 (1H, br s, H-9b), 3.81 (1H, td,  $J = 10.7, 4.5$  Hz, H-3), 2.05 (1H, ddd,  $J = 13.2, 4.4, 2.6$  Hz, H-2a), 1.88 (1H, m, H-4), 1.73 (3H, s, H-10), 1.72 (1H, overlap, H-5a), 1.63 (1H, ddd,  $J = 14.0, 6.1, 2.8$  Hz, H-6a), 1.53 (1H, ddd,  $J = 13.3, 6.6, 3.6$  Hz, H-5b), 1.39 (1H, td,  $J = 14.0, 4.2$  Hz, H-6b), 1.32 (1H, dd,  $J = 13.2, 11.1$  Hz, H-2b), 1.27 (3H, s, H-7);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  146.3 (C-8), 113.0 (C-9), 71.3 (C-1), 67.3 (C-3), 53.9 (C-4), 46.1 (C-2), 38.1 (C-6), 31.7 (C-7), 25.3 (C-5), 19.2 (C-10)。以上数据结合文献<sup>[11]</sup>, 鉴定化合物**6**为(1*R*,3*S*,4*R*)-3-羟基异薄荷醇。

化合物**7** 无色油状物;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +74.8$  ( $c$  0.11,  $\text{CHCl}_3$ )。ESI-MS  $m/z$  169  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  6.72 (1H, q,  $J = 1.6$  Hz, H-2), 4.29 (1H, dq,  $J = 9.6, 2.0$  Hz, H-7), 2.36 (1H, dd,  $J = 16.0, 3.6$  Hz, H-5a), 2.18 (1H, overlap, H-5b), 2.16 (1H, m, H-4), 1.91 (1H, m, H-6), 1.73 (3H, t,  $J = 1.6$  Hz, 3- $\text{CH}_3$ ), 0.95 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz, 6- $\text{CH}_3$ ), 0.89 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, 4- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta_{\text{C}}$  202.2 (C-1), 151.0 (C-2), 135.4 (C-3), 69.4 (C-7), 51.2 (C-6), 37.2 (C-5), 27.3 (C-4), 20.9 (6- $\text{CH}_3$ ), 16.8 (4- $\text{CH}_3$ ), 15.5 (3- $\text{CH}_3$ )。以上数据结合文献<sup>[14]</sup>, 鉴定化合物**7**为subamone。

化合物**8** 黄色油状物;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +26.3$  ( $c$  0.30, MeOH)。ESI-MS  $m/z$  185  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  5.85 (1H, q,  $J = 1.3$  Hz, H-2), 4.03 (1H, dd,  $J = 9.1, 2.1$  Hz, H-6), 2.50 (1H, dt,  $J = 18.0, 5.8$  Hz, H-4a), 2.30 (1H, ddd,  $J = 18.0, 9.0, 6.8$  Hz, H-4b), 2.09 (1H, m, H-5a), 1.95 (3H, s, H-9), 1.92 (1H, m, H-5b), 1.26 (3H, s, H-8), 1.25 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  168.1 (C-1), 154.7 (C-3), 118.3 (C-2), 84.4 (C-6), 71.7 (C-7), 33.5 (C-4), 27.3 (C-5), 26.1 (C-9), 25.2 (C-8), 24.6 (C-10)。以上数据结合文献<sup>[15,16]</sup>, 鉴定化合物**8**为(6*S*)-3,7-dimethyl-7-hydroxy-2(*Z*)-octen-6-olide, 为新天然产物。

化合物**9** 黄色油状物; ESI-MS  $m/z$  217  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  5.77 (1H, s, H-2), 4.08 (1H, br s, OH), 3.70 (3H, s, H-11), 3.27 (1H, br d,  $J = 10.8$  Hz, H-6), 3.14 (1H, ddd,  $J = 12.6, 10.7, 6.1$  Hz, H-4a), 2.61 (1H, br s, OH), 2.32 (1H, ddd,  $J = 12.6, 6.4, 4.6$  Hz, H-4b), 1.89 (3H, br d,  $J = 1.2$  Hz,

H-9), 1.72 (1H, dddd,  $J = 13.8, 10.7, 6.4, 1.8$  Hz, H-5a), 1.55 (1H, dddd,  $J = 13.8, 10.8, 6.1, 4.6$  Hz, H-5b), 1.17 (3H, s, H-8), 1.15 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  168.1 (C-1), 160.1 (C-3), 117.0 (C-2), 76.0 (C-6), 73.0 (C-7), 51.4 (C-11), 29.6 (C-4), 29.3 (C-5), 26.1 (C-8), 24.8 (C-9), 23.5 (C-10)。以上数据结合文献<sup>[17]</sup>, 鉴定化合物 **9** 为 (6S)-6,7-二羟基-3,7-二甲基辛-2(Z)-烯酸甲酯, 为新天然产物。

化合物 **10** 无色油状物; ESI-MS  $m/z$  269  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  2.78 (1H, m, H-10), 2.59 (1H, overlap, H-8a), 2.58 (2H, overlap, H-5a, 5b), 2.33 (1H, ddt,  $J = 11.5, 11.0, 2.0$  Hz, H-7), 2.27 (1H, m, H-2a, 2b), 2.17 (3H, s, H-15), 2.14 (1H, m, H-1a), 2.02 (1H, dd,  $J = 12.5, 2.0$  Hz, H-8b), 1.63 (3H, s, H-12), 1.59 (2H, m, H-1b, 6a), 1.32 (3H, s, H-13), 1.28 (1H, m, H-6b), 1.04 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  215.5 (C-9), 208.0 (C-4), 171.0 (C-3), 85.0 (C-11), 49.1 (C-7), 47.7 (C-10), 43.0 (C-8), 42.2 (C-5), 34.6 (C-2), 30.9 (C-1), 30.2 (C-15), 25.6 (C-12), 23.7 (C-6), 20.3 (C-13), 18.6 (C-14)。以上数据结合文献<sup>[18]</sup>, 鉴定化合物 **10** 为 holostylactone。

化合物 **11** 白色无定形粉末;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +97.8$  ( $c$  0.55,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )。ESI-MS  $m/z$  355  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  6.85 (2H, s, H-2', 2''), 6.80 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-6', 6''), 6.78 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5', 5''), 5.95 (4H, s, 2 $\times$ -OCH<sub>2</sub>O-), 4.71 (2H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-2, 6), 4.23 (2H, dd,  $J = 9.1, 7.0$  Hz, H-4a, 8a), 3.87 (2H, dd,  $J = 9.1, 2.5$  Hz, H-4b, 8b), 3.05 (2H, m, H-1, 5);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  148.0 (C-3', 3''), 147.1 (C-4', 4''), 135.0 (C-1', 1''), 119.3 (C-6', 6''), 108.2 (C-5', 5''), 106.5 (C-2', 2''), 101.0 (2 $\times$ -OCH<sub>2</sub>O-), 85.8 (C-2, 6), 71.7 (C-4, 8), 54.3 (C-1, 5)。以上数据结合文献<sup>[19]</sup>, 鉴定化合物 **11** 为芝麻脂素。

化合物 **12** 白色无定形粉末; ESI-MS  $m/z$  387  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  6.76 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-5), 6.75 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-5'), 6.68 (1H, br s, H-2), 6.65 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-6), 6.54 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-6'), 6.48 (1H, br s, H-2'), 4.12 (1H, dd,  $J = 9.2, 7.2$  Hz, H-9a), 3.87 (1H, overlap, H-9b), 3.86 (6H, s, 4, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.83 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.81 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.96 (1H, dd,  $J = 14.1, 5.4$  Hz, H-7a), 2.91 (1H, dd,  $J = 14.1, 6.7$  Hz, H-7b), 2.63 (1H, m, H-7'a), 2.58 (1H, m, H-8), 2.52 (1H, m, H-7'b), 2.48 (1H, m, H-8');  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  178.7 (C-9), 149.0 (C-3, 3'), 147.9 (C-4, 4'), 130.4 (C-1'), 130.2 (C-

1), 121.3 (C-6), 120.5 (C-6'), 112.4 (C-2), 111.8 (C-2'), 111.3 (C-5'), 111.1 (C-5), 71.2 (C-9'), 55.9, 55.8, 55.8, 55.8 (3, 3', 4, 4'-OCH<sub>3</sub>), 46.5 (C-8), 41.0 (C-8'), 38.2 (C-7'), 34.5 (C-7)。以上数据结合文献<sup>[20]</sup>, 鉴定化合物 **12** 为二甲基罗汉松脂素。

化合物 **13** 白色无定形粉末; ESI-MS  $m/z$  153  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  7.84 (2H, dd,  $J = 8.8, 2.0$  Hz, H-2', 6'), 6.85 (2H, dd,  $J = 8.8, 2.0$  Hz, H-3', 5'), 4.81 (2H, s, H-1);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  198.5 (C-2), 164.3 (C-4'), 131.3 (C-2', 6'), 127.3 (C-1'), 116.5 (C-3', 5'), 65.9 (C-1)。以上数据结合文献<sup>[21]</sup>, 鉴定化合物 **13** 为 *p*-hydroxybenzoyl-carbinol。

化合物 **14** 黄色无定形粉末; ESI-MS  $m/z$  183  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  9.74 (1H, s, H-7), 7.22 (2H, s, H-2, 6), 3.91 (6H, s, 3, 5-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  192.9 (C-7), 149.7 (C-3, 5), 144.0 (C-4), 129.0 (C-1), 108.3 (C-2, 6), 56.8 (3, 5-OCH<sub>3</sub>)。以上数据结合文献<sup>[22]</sup>, 鉴定化合物 **14** 为丁香醛。

化合物 **15** 无色片状晶体 (甲醇); ESI-MS  $m/z$  123  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  9.75 (1H, s, H-7), 7.76 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2, 6), 6.90 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3, 5);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  192.8 (C-7), 165.4 (C-4), 133.4 (C-2, 6), 130.2 (C-1), 116.9 (C-3, 5)。以上数据结合文献<sup>[23]</sup>, 鉴定化合物 **15** 为对羟基苯甲醛。

化合物 **16** 白色无定形粉末; ESI-MS  $m/z$  153  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  9.82 (1H, s, 1-CHO), 7.42 (1H, dd,  $J = 8.5, 1.6$  Hz, H-6), 7.40 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2), 7.04 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-5), 3.96 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  190.9 (1-CHO), 151.7 (C-4), 147.1 (C-3), 129.9 (C-1), 127.5 (C-6), 114.4 (C-2), 108.8 (C-5), 56.1 (3-OCH<sub>3</sub>)。以上数据结合文献<sup>[24]</sup>, 鉴定化合物 **16** 为 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛。

化合物 **17** 黄色无定形粉末; ESI-MS  $m/z$  283  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  12.96 (1H, br s, 5-OH), 7.96 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3', 5'), 6.85 (1H, s, H-2), 6.77 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 6.38 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 3.87 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  182.0 (C-4), 165.1 (C-7), 164.1 (C-2), 161.3 (C-5), 161.2 (C-4'), 157.2 (C-9), 128.6 (C-2', 6'), 121.0 (C-1'), 116.0 (C-3', 5'), 104.6 (C-10), 103.0 (C-3), 98.0 (C-6),

92.7 (C-8), 56.0 (7-OCH<sub>3</sub>)。以上数据结合文献<sup>[25]</sup>, 鉴定化合物 **17** 为 5,4'-二羟基-7-甲氧基黄酮。

### 3 对映异构体 **1a** 和 **1b** 的 ECD 计算

计算 ECD 实验包括构象分析、图谱计算和图谱拟合 3 个步骤。首先利用 Chemdraw3D 14.0 对 (*R*)-**1** 和 (*S*)-**1** 进行能量最小化操作得到初始构象。接着采用 Conflex9 软件 (CONFLEX Inc., Tokyo, JAPAN) 进行优势构象搜索。利用 Gaussian16 软件, MeOH 为溶剂, 根据密度泛函理论 (DFT), 采用密度函数 B3LYP 和 6-31G(d) 基组进行进一步结构优化, 再结合较大基组 M062X/def2TZVP 计算每个构象的 ECD 图谱。最后采用 SpecDis1.70.1 软件分析数据, 拟合图谱, 根据每个构象的玻尔兹曼权重因子, 将所有能量分布率符合的构象按照玻尔兹曼能量分布进行拟合、生成 ECD 图谱。

### 4 抗炎活性筛选<sup>[26]</sup>

采用 MTT 比色法检测化合物 **1**~**17** 对 RAW264.7 细胞活性的影响。将 RAW264.7 细胞以每孔约  $2 \times 10^4$  个密度接种于 96 孔板中过夜培养, 待细胞贴壁后, 弃去孔内培养基, 加入  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的试样药液, 置于  $37^\circ\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 24 h, 然后加入 MTT 试剂, 避光孵育 3 h, 以  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃去上清液后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的 DMSO, 放置摇床上摇晃 15 min 直至紫色结晶二甲肼完全溶解, 用酶标仪检测 490 nm 波长下的吸光度值, 计算细胞存活率。

采用 Griess 试剂法检测化合物 **1**~**17** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响。将 RAW264.7 细胞以每孔约  $2 \times 10^4$  个密度接种于 96 孔板中过夜培养, 实验分为空白对照组、模型组和给药组, 每组 4 个复孔。给药组加入  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的试样药液, 预处理 1 h 后, 模型组和给药组均加入 LPS (终质量浓度为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 诱导, 继续培养 24 h 后, 各组吸取上清液 50  $\mu\text{L}$ , 加入 50  $\mu\text{L}$  Griess 试剂, 继续培养 30 min 后, 用酶标仪检测 540 nm 波长下的吸光度值。

**作者贡献:** 陆玫霖负责化合物分离纯化、结构鉴定及文章撰写等工作; 黄婉凤和何宇铭协助化合物红外和紫外的测定, 王宝林、袁富红和张婷协助化合物分离工作; 何佳、韩珊和王琴琴协助化合物药理活性的检测; 徐新亚负责对映异构体的实验 ECD 测试和 ECD 理论计算; 潘其明负责指导化学实验、结构解析、稿件修改, 并最终定稿; 高红伟组织了整个研究, 负责实验指导和实验材料; 杨世林负责研究选题和研究方案设计。

**利益冲突:** 所有作者均声明本文无任何利益冲突。

## References

[1] Chinese Pharmacopocia Commission. Pharmacopocia of the

People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 246.

- [2] Liu M. Basic research and clinical application of Biling Weitong Granules [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig (中国中西医结合消化杂志), 2018, 26: 553-556.
- [3] Xiao Q, Huang XL, Zhu ZB, et al. Research progress of clinical application and quality standard of Biling Weitong Granules [J]. Chin Pharm (中国药业), 2022, 31: 126-128.
- [4] Zhang SY, Guo Q, Gao XL, et al. A phytochemical and pharmacological advance on medicinal plant *Litsea cubeba* (Lauraceae) [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 769-776.
- [5] Weng D. Overview of chemical constituents and pharmacological effects of *Litsea cubeba* [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2013, 25: 45-46.
- [6] Lu ML, Pan QM, Wang BL, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological activities and clinical applications of *Litsea cubeba* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 5565-5581.
- [7] Qian BC, Gong WG, Chen J, et al. Pharmacological studies on anti-asthmatic and anti-anaphylactic activities of the essential oil of *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1980, 15: 584-589.
- [8] Madyastha KM, Gaikwad NW. Metabolic disposition of a monoterpene ketone, piperitenone, in rats: evidence for the formation of a known toxin, *p*-cresol [J]. Drug Metab Dispos, 1999, 27: 74-80.
- [9] Thulasiram HV, Madyastha KM. Transformation of a monoterpene ketone, piperitenone, and related terpenoids using *Mucor piriformis* [J]. Can J Microbiol, 2005, 51: 447-454.
- [10] Jiang S, Wang MY, Zafar S, et al. Structural elucidation, antioxidant and hepatoprotective activities of chemical composition from Jinsi Huangju (*Chrysanthemum morifolium*) flowers [J]. Arab J Chem, 2022, 15: 104292-104303.
- [11] Hong SS, Lee JE, Jung YW, et al. Monoterpenoids from the fruits of *Amomum tsao-ko* have inhibitory effects on nitric oxide production [J]. Plants (Basel), 2021, 10: 257.
- [12] Delort E, Jaquier A, Decorzant E, et al. Comparative analysis of three Australian finger lime (*Citrus australasica*) cultivars: identification of unique citrus chemotypes and new volatile molecules [J]. Phytochemistry, 2015, 109: 111-124.
- [13] Wei WW, Wu P, Pan W, et al. Chemical constituents from aerial parts of *Curcuma longa* [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2017, 25: 87-92.
- [14] Ye FM, Xie YG, Zhu Y, et al. Chemical constituents of branches and leaves of *Illicium wardii* A. C. Smith [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 604-608, 625.
- [15] Dong HB, Wang WW, Zhaon Y, et al. Synthesis and antifungal activity of 3,7-dimethyl-7-hydroxy-2-octen-6-olide analogues [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2021, 41: 1646-1657.
- [16] Gallardo GL, Peña NI, Cabrera GM. Neric acid derivatives

- produced by the honey bee fungal entomopathogen *Ascospaera apis* [J]. *Phytochem Lett*, 2008, 1: 155-158.
- [17] Wang W, Zhang X, Zhao Y, et al. Divergent synthesis of four isomers of 6, 7-dihydroxy-3, 7-dimethyloct-2-enoic acid, esters and evaluation for the antifungal activity [J]. *Chin Chem Lett*, 2018, 29: 1872-1874.
- [18] Marcos P, Tito DS, Lucia L, et al. 4,5-*seco*-guaiane and a nine-membered sesquiterpene lactone from *Holostylis reniformis* [J]. *Molecules*, 2012, 17: 14046-14057.
- [19] Jayasinghe L, Kumarihamy BM, Jayarathna KH, et al. Antifungal constituents of the stem bark of *Bridelia retusa* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 637-641.
- [20] Fu ML, Zhang WZ, Bai LM. Chemical constituents of *Larix gmelinii* needles [J]. *Guihaia (广西植物)*, 2020, 40: 654-662.
- [21] Wang JH, Wang CH, Yao LG, et al. Studies on the chemical constitutions of sponge *Mycale biacuta* from the North China Sea [J]. *Chin J Mar Drugs (中国海洋药物)*, 2017, 36: 11-17.
- [22] Wen P, Han HY, Wang NL, et al. Studies on the chemical constitutions of *Campylotropis hirtella* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2008, 437: 1143-1145.
- [23] Wang SH, Cheng JT, Guo C. Chemical constituents of *Phyllanthus emblica* and its anti-inflammation activities [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2019, 50: 4873-4878.
- [24] Ito J, Chang FR, Wang HK, et al. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from *Brazilian propolis* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64: 1278-1281.
- [25] Phan Duc T, Nguyen Thien TV, Jossang A, et al. New wedelolides, (9*R*)-eudesman-9,12-olide  $\delta$ -lactones from *Wedelia trilobata* [J]. *Phytochem Lett*, 2016, 17: 304-309.
- [26] Zhang YY, Zhang ZJ, Ye RR, et al. Alkaloids from the roots and rhizomes of *Sophora tonkinensis* and its anti-inflammatory activities [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 2825-2829.