

·国家药监局重点实验室·麻精药品质量研究专题·

编者按:麻醉药品和精神药品都属于国家管控的特殊药品,需要遵守《麻醉药品和精神药品管理条例》的规定。2019年,国家药品监督管理局批准和授权重庆市食品药品检验检测研究院设立麻醉精神药品质量监测重点实验室,专门从事麻醉药品和精神药品的质量评价研究、防滥用制剂管控方法与管控标准、精神活性物质快检技术研究。为推动麻醉药品和精神药品研究技术高质量发展,本刊设置“麻精药品”系列专题,展示麻醉药品和精神药品研发、生产、检测技术、管理和使用等领域的先进实践经验,并针对相关问题结合工作实际提出解决方案,为麻醉药品和精神药品的监管及质量提升提供技术参考,从而促进麻醉药品和精神药品产业的高质量发展。



专题主持人:曾令高,国家药典委员会委员,国家药品监督管理局麻醉精神药品质量监测重点实验室主任,主任药师,重庆市食品药品检验检测研究院总检验师,重庆英才创新创业示范团队负责人,重庆药学会常务理事,《药物分析杂志》编委,重庆大学硕士研究生兼职导师。作为课题负责人承担或参与世界卫生组织、科技部、国家药典委员会、重庆市科学技术局科研课题20余项,主要从事麻醉药品和精神药品质量监测评价新技术、新方法开发及应用研究。

中图分类号:R932;R284.1;R285.5 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2024)03-0001-06

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.03.001



理肺散提取物乙酸乙酯层的化学成分及其对 RGC - 5 细胞损伤的保护作用研究*

王钰君¹,尹国平¹,胡昌华¹,曾令高²,熊有明^{2Δ}

(1. 西南大学药学院·黄连开发与利用教育部工程研究中心,重庆 400716; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院·国家药品监督管理局麻醉精神药品质量监测重点实验室,重庆 401121)

专家简介:熊有明,男,主任药师,主要研究方向为药品质量研究与评价。现任重庆市食品药品检验检测研究院党委书记、院长。主持和参与省部级科研项目5项。发表学术论文13篇,其中SCI1篇;参编学术专著2部。获重庆市人民政府科技进步奖一等奖。



摘要:目的 分析理肺散提取物乙酸乙酯层的化学成分,并探讨其对 RGC - 5 细胞损伤的保护作用。方法 采用硅胶柱、MCI 柱等柱色谱技术对理肺散提取物乙酸乙酯层进行分离,采用制备型高效液相色谱进行纯化,利用核磁共振法对化合物进行结构鉴定,采用 CCK - 8 法检测化合物对丙泊酚诱导的 RGC - 5 细胞损伤的保护作用。

结果 共分离鉴定出 15 个化合物,分别为 capsaicin (化合物 1)、homodihydrocapsaicin I (化合物 2)、secoisolariciresinol (化合物 3)、lariciresinol (化合物 4)、dehydrodiconiferyl alcohol (化合物 5)、cleomiscosin A (化合物 6)、curcasinlignan B (化合物 7)、syringaresinol (化合物 8)、oleanolic acid (化合物 9)、ursolic acid (化合物 10)、methyl 4 - benzoyloxy - 3 - methoxybenzeneacetate (化合物 11)、(R) - 6 - methyl - 4,6 - bis (4 - methylpent - 3 - enyl) cyclohexa - 1,3 - dienecarbaldehyde (化合物 12)、2 - hydroxy - 1 - methoxy - anthraquinone (化合物 13)、isocopoletin (化合物 14)、1H - indole - 3 - carboxaldehyde (化合物 15)。化合物 1,4,6 - 8 对丙泊酚诱导的 RGC - 5 细胞损伤具有一定保护作用,其中化合物 4、化合物 7 活性最强,分别使 RGC - 5 细胞的活力提升了 15.89% 和 13.09%。结论 化合物 1 - 7 为首次从耳草属中分离发现,化合物 9 - 10,13 为首次从理肺散中分离发现。化合物 4、化合物 7 对丙泊酚诱导的 RGC - 5 细胞损伤显示出较好的保护作用。

关键词:理肺散;耳草属;化学成分;RGC - 5 细胞损伤;保护作用

Chemical Constituents of Ethyl Acetate Layer Extracted from *Hedyotis scandens* and Its Protective Effect on RGC - 5 Cell Injury

WANG Yujun¹, YIN Guoping¹, HU Changhua¹, ZENG Linggao², XIONG Youming²

(1. College of Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine, Southwest University · Engineering Research Center of Coptis Development and Utilization < Ministry of Education >, Chongqing, China 400716; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances, Chongqing, China 401121)

Abstract: Objective To analyze the chemical constituents of the ethyl acetate layer extracted from *Hedyotis scandens*, and to investigate its protective effect on RGC - 5 cell injury. Methods The ethyl acetate layer extracted from *Hedyotis scandens* was

*基金项目:国家自然科学基金[82003629];重庆市自然科学基金面上项目[cstc2021jcyj - msxmX0975]。

第一作者:王钰君,女,硕士研究生在读,研究方向为天然药物化学,(电子信箱)1326113202@qq.com。

Δ通信作者:熊有明,男,大学本科,主任药师,研究方向为药品质量评价,(电子信箱)xiongyouming@cqifdc.org.cn。

isolated by the silica gel column, and MCI column, and it was purified by the preparative high - performance liquid chromatography (HPLC). The structure of the compound was identified by Magnetic Resonance Imaging (MRI) method, and the protective effect of the compound on propofol - induced RGC - 5 cell injury was detected by the CCK - 8 method. **Results** Fifteen compounds were isolated and identified, including capsaicin (compound 1), homodihydrocapsaicin I (compound 2), secoisolariciresinol (compound 3), lariciresinol (compound 4), dehydroniciferyl alcohol (compound 5), cleomiscosin A (compound 6), curcasinlignan B (compound 7), syringaresinol (compound 8), oleanolic acid (compound 9), ursolic acid (compound 10), methyl 4 - benzoyloxy - 3 - methoxybenzeneacetate (compound 11), (*R*) - 6 - methyl - 4,6 - bis (4 - methylpent - 3 - enyl) cyclohexa - 1,3 - dienecarbaldehyde (compound 12), 2 - hydroxy - 1 - methoxy - anthraquinone (compound 13), isoscopoletin (compound 14), 1H - indole - 3 - carboxaldehyde (compound 15). Compounds 1,4,6 - 8 had certain protective effects on the propofol - induced RGC - 5 cell injury, among which compounds 4 and 7 had the most significant activity, and the cell viability was increased by 15.89% and 13.09%, respectively. **Conclusion** Compounds 1 - 7 were isolated and discovered for the first time from the genus *Hedyotis*, while compounds 9 - 10 and 13 were isolated and discovered for the first time from *Hedyotis scandens*. Compounds 4 and 7 showed good protective effects on the propofol - induced RGC - 5 cell injury.

Key words: *Hedyotis scandens*; genus *Hedyotis*; chemical constituent; RGC - 5 cell injury; protective effect

理肺散为茜草科耳草属植物攀援耳草 *Hedyotis scandens* Roxb. 的全株,又名凉喉茶、接骨丹等,为我国白族、傣族、纳西族、傈僳族等民间常用药食两用植物。理肺散性凉,味苦,归肺、肾经,具有清热解毒、理肺止咳、润肺化痰、接骨续筋等功效,主治肺结核、肺炎、支气管炎、咽喉肿痛、骨折等^[1]。研究表明,耳草属植物的主要化学成分为黄酮类、环烯醚萜类、生物碱类等,其主要药理学活性为抗肿瘤、抗菌、镇痛、消炎、抗氧化、神经保护等^[2]。理肺散用途广泛且资源丰富,其发挥作用的物质基础具有巨大的研究价值。但目前关于理肺散化学成分的研究仅有3篇文献报道,从其乙醇提取物中分离鉴定了28个化合物,包括黄酮类6个、三萜类6个、甾体类1个、酚酸类15个^[3-5]。本课题组前期对该植物全株的水提取物进行了系统的化学成分和抗结核活性研究,在此基础上,本研究中进一步对理肺散提取物乙酸乙酯层的化学成分进行研究,并以丙泊酚诱导的RGC - 5细胞损伤为活性评价模型,探讨各化合物对RGC - 5细胞损伤的保护作用。现报道如下。

1 仪器、试剂与细胞

1.1 仪器

400 MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); LC110 型制备型高效液相色谱仪(赛谱锐思 <北京> 科技有限公司); LC - 20A 分析型和制备型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); C₁₈ 制备色谱柱(250 mm × 10 mm, 日本 YMC 公司; 250 mm × 20 mm, 日本 Shimadzu 公司); Varioskan LUX 型多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司); MCO - 15AC - SC 型二氧化碳培养箱(日本 Sanyo 公司)。

1.2 试剂

柱色谱硅胶(200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂); 甲醇(色谱纯, 阿达玛斯试剂有限公司); 乙酸乙酯、石油醚(分析纯, 重庆川东化工 <集团> 有限公司); 二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma 公司, 批号为 D2650); Dulbecco 改

良的 Eagle 培养基(DMEM) / F12 培养基(批号为 C11330500BT), 胎牛血清(批号为 10099 - 141), 均购自美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶(批号为 C0201), 青霉素 - 链霉素溶液(100X)(批号为 C0222), CCK - 8 试剂盒(批号为 C0039), 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 丙泊酚(美国 Aspen 公司, 批号为 SA084); 理肺散采自云南大理, 经西南大学胡昌华教授鉴定为正品。

1.3 细胞

小鼠视网膜神经节 RGC - 5 细胞(中国科学院细胞库, 批号为 BNCC359850)。

2 方法与结果

2.1 提取与分离

取理肺散干燥全草 20 kg, 粉碎, 用盐酸水溶液(pH = 5)加热回流提取3次, 每次2 h, 浓缩得水提浸膏 3 kg。药渣用95%乙醇加热回流提取2次, 每次2 h, 浓缩得醇提浸膏 1 kg。将浸膏以1:2(m:V)的比例加水混悬, 用氢氧化钠溶液调pH至9~10, 依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取, 分别得水提浸膏乙酸乙酯层 140.0 g 和醇提浸膏乙酸乙酯层 171.3 g。

水提浸膏乙酸乙酯层通过中性氧化铝色谱柱分离, 利用石油醚 - 乙酸乙酯梯度洗脱, 得7个组分(Fr. A1 ~ Fr. A7)。Fr. A1(10.6 g)经MCI柱色谱分离, 得31个亚组分(Fr. A1.1 ~ Fr. A1.31); Fr. A1.13经制备液相色谱(93%甲醇)分离, 得化合物12(32.5 mg)。Fr. A3(12.1 g)经MCI柱色谱分离, 得80个亚组分(Fr. A3.1 ~ Fr. A3.80); Fr. A3.24经制备液相色谱(27%甲醇)分离, 得化合物14(10.2 mg); Fr. A3.27经制备液相色谱(33%甲醇)分离, 得化合物15(12.2 mg); Fr. A3.64经制备液相色谱(66%甲醇)分离, 得化合物11(5.1 mg); Fr. A3.76经制备液相色谱(67%甲醇)分离, 得化合物1(6.7 mg)。Fr. A4(6.4 g)经MCI柱色谱分离, 得30个亚组分(Fr. A4.1 ~ Fr. A4.30); Fr. A4.13经制备液相色谱

(41% 甲醇)分离,得化合物3(7.4 mg);Fr. A4. 16经制备液相色谱(46% 甲醇)分离,得化合物4(7.0 mg)和化合物5(16.0 mg);Fr. A4. 21经制备液相色谱(56% 甲醇)分离,得化合物6(4.8 mg);Fr. A4. 23经制备液相色谱(51% 甲醇)分离,得化合物8(10.3 mg)。

醇提浸膏乙酸乙酯层通过硅胶色谱柱分离,利用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱,得10个组分(Fr. B1~Fr. B7)。Fr. B3(7.2 g)经MCI柱色谱分离,得34个亚组分(Fr. B3. 1~Fr. B3. 34);Fr. B3. 10经制备液相色谱(63% 甲醇)分离,得化合物13(6.9 mg)。Fr. B4(13.4 mg)经MCI柱色谱分离,得36个亚组分(Fr. B4. 1~Fr. B4. 36);Fr. B4. 24经制备液相色谱(85% 甲醇)分离,得化合物9(8.4 mg)和化合物10(18.4 mg)。Fr. B5(14.39 mg)经MCI柱色谱分离,得60个亚组分(Fr. B5. 1~Fr. B5. 60);Fr. B5. 16经制备液相色谱(48% 甲醇)分离,得化合物7(6.7 mg);Fr. B5. 37经制备液相色谱(74% 甲醇)分离,得化合物2(9.7 mg)。

2.2 结构鉴定

2.2.1 化合物1

黄色油状物。¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz)δ: 6.84(1H, d, J = 7.9 Hz, H-5), 6.78(1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.73(1H, dd, J = 8.0, 1.9 Hz, H-6), 5.34(1H, m, H-14), 5.29(1H, m, H-13), 4.33(2H, d, J = 5.6 Hz, H-7), 3.85(3H, s, 3-OCH₃), 2.18(3H, dd, J = 9.2, 6.0 Hz, H-9, 15), 1.96(2H, m, H-12), 1.63(2H, m, H-10), 1.36(2H, m, H-11), 0.93(6H, d, J = 6.8 Hz, H-16, 17)。¹³C-NMR(CDCl₃, 100 MHz)δ: 130.7(C-1), 110.9(C-2), 146.9(C-3), 145.4(C-4), 114.6(C-5), 121.0(C-6), 43.8(C-7), 173.0(C-8), 36.9(C-9), 25.6(C-10), 29.5(C-11), 32.4(C-12), 126.7(C-13), 138.3(C-14), 31.2(C-15), 22.9(C-16), 22.9(C-17), 56.2(3-OCH₃)。以上数据与文献[6]报道基本一致,故鉴定为capsaicin。

2.2.2 化合物2

黄色油状物。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz)δ: 8.16(1H, t, J = 5.9 Hz, 4-OH), 6.79(1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.68(1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.62(1H, dd, J = 8.0, 1.9 Hz, H-6), 4.13(2H, d, J = 5.8 Hz, H-7), 3.72(3H, s, 3-OCH₃), 2.09(2H, t, J = 7.3 Hz, H-9), 1.49(3H, m, H-10, 16), 1.23(8H, m, H-11, 12, 13, 14), 1.12(2H, q, J = 6.7 Hz, H-15), 0.84(6H, d, J = 6.6 Hz, H-17, 18)。¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz)δ: 130.5(C-1), 111.6(C-2), 147.8(C-3), 145.3(C-4), 115.1(C-5), 119.6(C-6), 41.8(C-7), 171.9(C-8), 35.4(C-9), 25.3(C-10), 28.7(C-11), 28.7(C-12), 29.0(C-13), 26.7(C-14), 38.4(C-15),

27.3(C-16), 22.5(C-17), 22.5(C-18), 55.5(3-OCH₃)。以上数据与文献[6]报道基本一致,故鉴定为homodihydrocapsaicin I。

2.2.3 化合物3

黄色油状物。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz)δ: 8.59(2H, s, 4-OH, 4'-OH), 6.63(4H, d, J = 7.9 Hz, H-2, 5, 2', 5'), 6.50(2H, dd, J = 7.9, 1.9 Hz, H-6, 6'), 4.50(2H, t, J = 5.0 Hz, 9-OH, 9'-OH), 3.68(6H, s, 3-OCH₃, 3'-OCH₃), 3.38(4H, dd, J = 8.2, 4.5 Hz, H-9, 9'), 1.82(2H, m, H-8, 8')。¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz)δ: 132.2(C-1, 1'), 113.0(C-2, 2'), 147.2(C-3, 3'), 144.3(C-4, 4'), 115.0(C-5, 5'), 121.1(C-6, 6'), 34.0(C-7, 7'), 42.5(C-8, 8'), 60.2(C-9, 9'), 55.4(3-OCH₃, 3'-OCH₃)。以上数据与文献[7]报道基本一致,故鉴定为secoisolariciresinol。

2.2.4 化合物4

无色油状物。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz)δ: 8.76(2H, d, 4-OH, 4'-OH), 6.82(1H, d, J = 1.7 Hz, H-2'), 6.74(1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.69(1H, s, H-6'), 6.67(2H, m, H-5, 5'), 6.57(1H, dd, J = 8.0, 1.9 Hz, H-6), 4.64(1H, d, J = 6.3 Hz, H-7'), 3.86(1H, dd, J = 8.2, 6.5 Hz, H-9), 3.74(3H, s, 3-OCH₃), 3.73(3H, s, 3'-OCH₃), 3.65(1H, dd, J = 10.8, 7.3 Hz, H-9'), 3.54(1H, dd, J = 8.2, 6.5 Hz, H-9), 3.45(1H, dd, J = 10.8, 7.3 Hz, H-9'), 2.82(1H, dd, J = 13.5, 4.8 Hz, H-7), 2.57(1H, m, H-8), 2.41(1H, dd, J = 13.4, 10.9 Hz, H-7), 2.18(1H, p, J = 6.9 Hz, H-8')。¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz)δ: 131.7(C-1), 112.7(C-2), 147.3(C-3), 144.5(C-4), 115.0(C-5), 120.5(C-6), 32.1(C-7), 41.9(C-8), 71.8(C-9), 134.6(C-1'), 110.0(C-2'), 147.4(C-3'), 145.5(C-4'), 115.3(C-5'), 118.1(C-6'), 81.7(C-7'), 52.3(C-8'), 58.6(C-9'), 55.6(3-OCH₃), 55.5(3'-OCH₃)。以上数据与文献[8]报道基本一致,故鉴定为lariciresinol。

2.2.5 化合物5

无色油状物。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz)δ: 6.95(1H, s, H-6), 6.92(2H, d, J = 6.0 Hz, H-2, 2'), 6.76(2H, s, H-5, 6'), 6.47(1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 6.21(1H, dt, J = 15.9, 5.3 Hz, H-8), 5.46(1H, d, J = 6.6 Hz, H-7'), 4.09(1H, d, J = 3.8 Hz, H-9), 3.80(3H, s, 3-OCH₃), 3.75(3H, s, 3'-OCH₃), 3.66(2H, m, H-9'), 3.45(1H, q, J = 6.4 Hz, H-8')。¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz)δ: 132.3(C-1), 110.4(C-2), 147.5(C-3), 146.4(C-4), 115.3(C-5), 118.5(C-6), 87.2(C-7), 53.0(C-8), 62.9(C-9), 129.5

(C - 1'), 110.4 (C - 2'), 143.6 (C - 3'), 147.1 (C - 4'), 130.5 (C - 5'), 114.9 (C - 6'), 128.9 (C - 7'), 128.0 (C - 8'), 61.6 (C - 9'), 55.7 (3 - OCH₃), 55.6 (3' - OCH₃)。以上数据与文献[9]报道基本一致,故鉴定为 dehydrodiconiferyl alcohol。

2.2.6 化合物 6

白色固体。¹H - NMR (DMSO - *d*₆, 400 MHz) δ: 9.23 (1H, s, 4' - OH), 7.96 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H - 4), 7.03 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H - 5), 6.92 (1H, s, H - 6'), 6.88 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, H - 5'), 6.82 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H - 2'), 6.34 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H - 3), 4.99 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H - 7'), 4.32 (1H, m, H - 8'), 3.78 (6H, d, *J* = 2.4 Hz, 6 - OCH₃, 3' - OCH₃), 3.67 (1H, m, H - 9')。¹³C - NMR (DMSO - *d*₆, 100 MHz) δ: 160.0 (C - 2), 113.2 (C - 3), 144.8 (C - 4), 100.8 (C - 5), 145.3 (C - 6), 137.1 (C - 7), 131.7 (C - 8), 138.0 (C - 9), 111.2 (C - 10), 126.7 (C - 1'), 112.1 (C - 2'), 147.6 (C - 3'), 147.3 (C - 4'), 115.4 (C - 5'), 120.8 (C - 6'), 76.2 (C - 7'), 77.8 (C - 8'), 59.8 (C - 9'), 55.9 (6 - OCH₃), 55.8 (3' - OCH₃)。以上数据与文献[10]报道基本一致,故鉴定为 cleomiscosin A。

2.2.7 化合物 7

黄色油状物。¹H - NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 9.81 (1H, s, H - 7'), 7.39 (2H, d, H - 2', 6'), 6.88 (3H, s, H - 2, 4, 6), 5.67 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, H - 7), 3.97 (2H, m, H - 9), 3.93 (3H, s, 3' - OCH₃), 3.85 (3H, s, 3 - OCH₃), 3.69 (1H, m, H - 8)。¹³C - NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 132.2 (C - 1), 119.7 (C - 2), 147.0 (C - 3), 114.7 (C - 4), 146.3 (C - 5), 109.0 (C - 6), 89.7 (C - 7), 52.9 (C - 8), 64.1 (C - 9), 131.6 (C - 1'), 112.5 (C - 2'), 145.3 (C - 3'), 154.3 (C - 4'), 129.0 (C - 5'), 121.1 (C - 6'), 190.8 (C - 7'), 56.2 (3 - OCH₃), 56.3 (3' - OCH₃)。以上数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定为 curcasinlignan B。

2.2.8 化合物 8

黄色油状物。¹H - NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6.56 (4H, br, s, H - 2, 2', 6, 6'), 5.51 (2H, br, s, H - 4, 4'), 4.71 (2H, br, s, H - 7, 7'), 4.26 (2H, m, H - 9, 9'), 3.88 (14H, br, s, H - 9, 9', 11, 11', 12, 12'), 3.07 (2H, br, s, H - 8, 8')。¹³C - NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 132.3 (C - 1, 1'), 103.0 (C - 2, 2', 6, 6'), 147.4 (C - 3, 3', 5, 5'), 134.5 (C - 4, 4'), 86.3 (C - 7, 7'), 54.4 (C - 8, 8'), 72.0 (C - 9, 9'), 56.4 (C - 11, 11', 12, 12')。以上数据与文献[12]报道基本一致,故鉴定为 syringaresinol。

2.2.9 化合物 9

白色粉末。¹H - NMR (DMSO - *d*₆, 400 MHz) δ:

5.15 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H - 12), 4.28 (1H, s, H - 3), 1.08 (3H, s, H - 27), 0.88 (3H, s, H - 30), 0.86 (3H, s, H - 29), 0.84 (3H, s, H - 25), 0.71 (3H, s, H - 24), 0.66 (3H, s, H - 23)。¹³C - NMR (DMSO - *d*₆, 100 MHz) δ: 38.0 (C - 1), 26.9 (C - 2), 76.8 (C - 3), 38.3 (C - 4), 54.8 (C - 5), 18.0 (C - 6), 32.4 (C - 7), 38.9 (C - 8), 47.1 (C - 9), 36.6 (C - 10), 22.9 (C - 11), 121.5 (C - 12), 143.8 (C - 13), 41.3 (C - 14), 27.2 (C - 15), 23.3 (C - 16), 45.7 (C - 17), 40.8 (C - 18), 45.4 (C - 19), 30.4 (C - 20), 33.3 (C - 21), 32.1 (C - 22), 28.2 (C - 23), 16.0 (C - 24), 15.1 (C - 25), 16.8 (C - 26), 25.6 (C - 27), 178.5 (C - 28), 32.8 (C - 29), 22.6 (C - 30)。以上数据与文献[13]报道基本一致,故鉴定为 oleanolic acid。

2.2.10 化合物 10

白色粉末。¹H - NMR (DMSO - *d*₆, 400 MHz) δ: 5.13 (1H, s, H - 12), 3.00 (1H, dd, *J* = 10.3, 5.6 Hz, H - 3), 2.11 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H - 18), 1.04 (3H, s, H - 23), 0.92 (3H, s, H - 29), 0.90 (3H, s, H - 27), 0.87 (3H, s, H - 26), 0.81 (3H, s, H - 30), 0.75 (3H, s, H - 24), 0.68 (3H, s, H - 25)。¹³C - NMR (DMSO - *d*₆, 100 MHz) δ: 38.2 (C - 1), 26.9 (C - 2), 76.8 (C - 3), 38.5 (C - 4), 54.8 (C - 5), 18.0 (C - 6), 32.7 (C - 7), 41.6 (C - 8), 46.8 (C - 9), 36.3 (C - 10), 22.8 (C - 11), 124.5 (C - 12), 138.2 (C - 13), 41.6 (C - 14), 27.5 (C - 15), 23.8 (C - 16), 47.0 (C - 17), 52.4 (C - 18), 38.4 (C - 19), 38.3 (C - 20), 30.2 (C - 21), 36.5 (C - 22), 28.2 (C - 23), 15.2 (C - 24), 16.0 (C - 25), 16.9 (C - 26), 23.2 (C - 27), 178.2 (C - 28), 16.9 (C - 29), 21.0 (C - 30)。以上数据与文献[14]报道基本一致,故鉴定为 ursolic acid。

2.2.11 化合物 11

白色固体粉末。¹H - NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 8.21 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, H - 2', 6'), 7.63 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, H - 4'), 7.50 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, H - 3', 5'), 7.10 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H - 5), 6.96 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H - 2), 6.90 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, H - 6), 3.82 (3H, s, 3 - OCH₃), 3.72 (3H, s, 8 - OCH₃), 3.64 (2H, s, H - 7)。¹³C - NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 132.8 (C - 1), 113.7 (C - 2), 151.3 (C - 3), 139.2 (C - 4), 122.9 (C - 5), 121.6 (C - 6), 41.1 (C - 7), 171.7 (C - 8), 129.5 (C - 1'), 130.3 (C - 2', 6'), 128.5 (C - 3', 5'), 133.4 (C - 4'), 164.7 (C - 7'), 56.0 (3 - OCH₃), 52.1 (8 - OCH₃)。以上数据与文献[15]报道基本一致,故鉴定为 methyl 4 - benzyloxy - 3 - methoxybenzeneacetate。

2.2.12 化合物 12

无色油状物。¹H - NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 9.38

(1H, s, H - 20), 6.64 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, H - 2), 5.90 (1H, d, H - 3), 5.10 ~ 4.98 (2H, m, H - 9, 15), 2.33 (1H, d, $J = 17.8, 1.5$ Hz, H - 5), 2.16 (4H, d, $J = 3.3$ Hz, H - 7, 8), 1.99 (1H, d, $J = 17.8, 1.5$ Hz, H - 5), 1.92 ~ 1.73 (3H, m, H - 13, 14), 1.66 (3H, s, Me - 11), 1.62 (3H, s, Me - 17), 1.59 (3H, s, Me - 12), 1.52 (3H, s, Me - 18), 1.39 ~ 1.30 (1H, m, H - 13), 1.16 (3H, s, Me - 19)。¹³C - NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 141.5 (C - 1), 145.8 (C - 2), 118.0 (C - 3), 150.8 (C - 4), 42.0 (C - 5), 36.2 (C - 6), 37.8 (C - 7), 25.6 (C - 8), 123.2 (C - 9), 132.3 (C - 10), 17.7 (C - 11), 25.2 (C - 12), 38.4 (C - 13), 25.7 (C - 14), 124.8 (C - 15), 131.1 (C - 16), 25.2 (C - 17), 17.9 (C - 18), 23.9 (C - 19), 193.3 (C - 20)。以上数据与文献[16]报道基本一致,故鉴定为(*R*) - 6 - methyl - 4,6 - bis (4 - methylpent - 3 - enyl) cyclohexa - 1,3 - dienecarbaldehyde。

2.2.13 化合物 13

黄色固体。¹H - NMR (DMSO - *d*₆, 400 MHz) δ : 8.24 (2H, dd, $J = 5.9, 3.3$ Hz, H - 5, 8), 8.12 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H - 4), 7.75 (2H, m, H - 6, 7), 7.33 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H - 3), 4.02 (3H, s, 1 - OCH₃)。¹³C - NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 146.9 (C - 1), 155.8 (C - 2), 120.5 (C - 3), 126.0 (C - 4), 127.3 (C - 5), 134.1 (C - 6, 7), 127.0 (C - 8), 182.7 (C - 9), 182.3 (C - 10), 133.2 (C - 11), 134.7 (C - 12), 125.9 (C - 13), 127.8 (C - 14), 62.5 (1 - OCH₃)。以上数据与文献[17]报道基本一致,故鉴定为2 - hydroxy - 1 - methoxy - anthraquinone。

2.2.14 化合物 14

白色固体。¹H - NMR (DMSO - *d*₆, 400 MHz) δ : 7.89 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H - 4), 7.03 (1H, s, H - 5), 7.01 (1H, s, H - 8), 6.23 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H - 3), 3.86 (3H, s, Me - 11)。¹³C - NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 160.7 (C - 2), 112.5 (C - 3), 144.3 (C - 4), 111.9 (C - 5), 143.9 (C - 6), 151.9 (C - 7), 100.0 (C - 8), 148.3 (C - 9), 111.5 (C - 10), 56.1 (C - 11)。以上数据与文献[18]报道基本一致,故鉴定为 isoscooletin。

2.2.15 化合物 15

白色固体。¹H - NMR (DMSO - *d*₆, 400 MHz) δ : 12.18 (1H, s, NH - 1), 9.94 (1H, s, CHO - 10), 8.28 (1H, s, H - 2), 8.10 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H - 4), 7.51 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H - 7), 7.23 (2H, m, H - 5, 6)。¹³C - NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 138.4 (C - 2), 118.1 (C - 3), 123.4 (C - 4), 122.1 (C - 5), 120.8 (C - 6), 112.6 (C - 7), 137.1 (C - 8), 124.1 (C - 9), 184.9 (C - 10)。以上数据与文献[19]报道基本一致,故鉴定为 1H - indole - 3 -

carboxaldehyde。

2.3 生物活性评价

细胞毒性筛选:将RGC - 5细胞培养于含有10%胎牛血清的DMEM / F12培养基中,以每孔 1×10^3 个的密度接种于96孔板(每孔100 μ L),培养24 h后,将细胞分为空白对照组、溶剂对照组和化合物组,弃上清液,化合物组每孔加入100 μ L不同浓度(3.75, 7.5, 15, 30 μ mol / L)的待测化合物,培养结束后,每孔加入10 μ L CCK - 8溶液,将培养板置培养箱内孵育1 ~ 4 h。用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度(OD)值,计算细胞存活率。细胞存活率(%) = $(OD_{\text{化合物组}} - OD_{\text{空白对照组}}) / (OD_{\text{溶剂对照组}} - OD_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。重复试验3次。结果溶剂对照组的细胞存活率为100.00%;药物浓度为15 μ mol / L时,化合物1, 5, 7 - 11, 15均表现出较好的细胞活力,其细胞存活率均大于86%;其他化合物在浓度为30 μ mol / L时也表现出较好的细胞活力,其细胞存活率均大于87%。故选择细胞存活率不低于85%的药物浓度对丙泊酚诱导的RGC - 5细胞损伤模型进行活性评价,化合物15在30 μ mol / L浓度时细胞存活率存在一定差异,故选择15 μ mol / L作为化合物15的给药浓度。详见表1。

表1 不同浓度化合物对RGC - 5细胞的毒性(%)

Tab. 1 Toxic effects of compounds with different concentrations on RGC - 5 cells (%)

| 化合物 | 细胞存活率 | | | |
|-----|------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | 3.75 μ mol/L | 7.5 μ mol/L | 15 μ mol/L | 30 μ mol/L |
| 1 | 97.71 | 96.26 | 89.11 | 83.77 |
| 2 | 109.82 | 97.62 | 103.91 | 88.47 |
| 3 | 106.38 | 105.77 | 101.66 | 94.78 |
| 4 | 99.11 | 95.18 | 98.87 | 106.34 |
| 5 | 100.73 | 89.14 | 86.15 | 76.73 |
| 6 | 96.97 | 93.86 | 91.33 | 92.14 |
| 7 | 101.65 | 91.80 | 86.71 | 76.72 |
| 8 | 97.51 | 100.62 | 96.56 | 83.31 |
| 9 | 115.33 | 109.33 | 106.57 | 80.01 |
| 10 | 114.77 | 96.79 | 96.25 | 74.04 |
| 11 | 97.23 | 97.88 | 92.49 | 84.11 |
| 12 | 103.80 | 95.41 | 91.32 | 96.83 |
| 13 | 104.21 | 98.49 | 96.70 | 105.55 |
| 14 | 99.01 | 94.30 | 91.81 | 87.91 |
| 15 | 94.04 | 91.29 | 90.82 | 96.79 |

RGC - 5细胞损伤模型的保护作用活性评价:将RGC - 5细胞培养于含有10%胎牛血清的DMEM / F12培养基中,以每孔 1×10^3 个的密度接种于96孔板(每孔100 μ L),培养24 h后,将细胞分为空白对照组、溶剂对照组、模型组(400 μ mol / L丙泊酚)和化合物组(400 μ mol / L丙泊酚 + 15, 30 μ mol / L待测化合物),弃上清液,按分组加入相应药物培养48 h,培养结束后,向每孔加入

10 μL CCK-8溶液,将培养板置培养箱内孵育1~4 h。用酶标仪测定450 nm波长处的OD值,计算细胞存活率。细胞存活率(%) = $(OD_{\text{化合物组}} - OD_{\text{空白对照组}}) / (OD_{\text{溶剂对照组}} - OD_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。重复试验3次。结果与溶剂对照组比较,模型组细胞出现明显病理改变,细胞存活率显著下降(100.00%比76.27%);化合物1,4,6-8对丙泊酚诱导的RGC-5细胞损伤均表现出一定的保护活性,其中化合物4,7最强,分别使RGC-5细胞的活力增加15.89%,13.09%。详见表2。

表2 不同化合物对丙泊酚诱导的RGC-5细胞损伤的保护活性

Tab.2 Protective effects of different compounds on propofol-induced RGC-5 cell injury

| 化合物 | 浓度($\mu\text{mol/L}$) | 细胞存活率(%) | 化合物 | 浓度($\mu\text{mol/L}$) | 细胞存活率(%) |
|-----|-------------------------|----------|-----|-------------------------|----------|
| 1 | 15 | 84.45 | 9 | 15 | 73.04 |
| 2 | 30 | 75.83 | 10 | 15 | 76.10 |
| 3 | 30 | 76.09 | 11 | 15 | 72.91 |
| 4 | 30 | 92.16 | 12 | 30 | 75.47 |
| 5 | 15 | 75.88 | 13 | 30 | 73.73 |
| 6 | 30 | 84.93 | 14 | 30 | 73.83 |
| 7 | 15 | 89.36 | 15 | 15 | 72.47 |
| 8 | 15 | 84.42 | | | |

3 讨论

理肺散作为民间常用药食两用植物,应用广泛,资源丰富,是重要的民族药。但目前对理肺散的研究较少,该资源未能被有效开发与利用。本研究中理肺散提取物的乙酸乙酯层经正相硅胶柱和MCI柱等现代柱色谱技术进行分离,采用制备型高效液相色谱仪进行纯化,应用核磁共振法对化合物进行结构鉴定。最终共分离鉴定出15个化合物,分别为capsaicin(化合物1)、homodihydrocapsaicin I(化合物2)、secoisolariciresinol(化合物3)、lariciresinol(化合物4)、dehydrodiconiferyl alcohol(化合物5)、cleomiscosin A(化合物6)、curcasinlignan B(化合物7)、syringaresinol(化合物8)、oleanolic acid(化合物9)、ursolic acid(化合物10)、methyl 4-benzoyloxy-3-methoxybenzeneacetate(化合物11)、(R)-6-methyl-4,6-bis(4-methylpent-3-enyl)cyclohexa-1,3-dienecarbaldehyde(化合物12)、2-hydroxy-1-methoxy-anthraquinone(化合物13)、isoscopoletin(化合物14)、1H-indole-3-carboxaldehyde(化合物15)。其中,化合物1-7为首次从耳草属中分离发现,化合物9-10,13为首次从理肺散中分离发现。以丙泊酚诱导的RGC-5细胞损伤为活性评价模型,采用CCK-8法评估各化合物对RGC-5细胞的保护作用,活性评价结果显示,化合物1,4,6-8对丙泊酚诱导的RGC-5细胞损伤均表现出一定的保护活性,其中化合物4、化合物7活性最强,为理肺散的进一步开发

和利用奠定了基础。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:439.
- [2] 杨元,姜艳艳,石任兵. 耳草属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(7):1145-1153.
- [3] WANG GC, LI T, DENG FY, et al. Five new phenolic glycosides from *Hedyotis scandens*[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(5):1379-1382.
- [4] 邓芳叶,王国才,王春华,等. 理肺散化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(5):861-865.
- [5] JABBAR A, AKHTERUZZAMAN SM, RASHID MA. Constituents of *Hedyotis scandens*[J]. Fitoterapia,1996,67(3):278-279.
- [6] WANG RR, LIU Y, SUN SW, et al. Capsaicinoids from hot pepper (*Capsicum annuum* L.) and their phytotoxic effect on seedling growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. Nat Prod Res, 2020,34(11):1597-1601.
- [7] 欧阳兰,周雷罡,周国平,等. 有柄石韦乙酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中药材,2021,44(8):1884-1888.
- [8] 孟凡成,王磊,张健,等. 云南黄连中非生物碱类化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2013,44(4):307-310.
- [9] 欧阳国庆,李剑军,杨敬芝,等. 小黄皮茎的化学成分研究[J]. 中草药,2016,47(9):1480-1485.
- [10] 赵立春,华威,付艳辉,等. 胡蔓藤中非生物碱类成分的分离与鉴定(III)[J]. 沈阳药科大学学报,2010,27(7):551-554.
- [11] XU JJ, TAN NH. New Lignans from *Jatropha curcas* Linn. [J]. Z Nat Forsch A J Phys Sci, 2012,67(1/2):176-180.
- [12] NIU XM, LI SH, PENG LY, et al. Constituents from *Limonia Crenulata*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2001,3(4):299-311.
- [13] 高冰,苏艳芳,张杰,等. α -葡萄糖苷酶抑制作用导向分离翻白草活性成分[J]. 中草药,2021,52(15):4473-4479.
- [14] 张旋,俞桂新. 黄花败酱化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2020,32(5):783-791.
- [15] 王钰君,黄居敏,文淳,等. 理肺散化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2023,48(22):6082-6087.
- [16] PADURARU MP, WILSON PD. Synthesis of the polycyclic ring systems of artocarpol A and D[J]. Org Lett, 2003,5(25):4911-4913.
- [17] WU YB, ZHENG CJ, QIN LP, et al. Antiosteoporotic Activity of Anthraquinones from *Morinda officinalis* on Osteoblasts and Osteoclasts[J]. Molecules, 2009,14(1):573-583.
- [18] TSUKAMOTO H, HISADA S, NISHIBE S. Coumarin and secoiridoid glucosides from bark of *Olea africana* and *Olea capensis*[J]. Chem Pharm Bull, 1985,33(1):396-399.
- [19] ZHOU HF, JIAN RJ, KANG J, et al. Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals [J]. J Agric Food Chem, 2010,58(24):12717-12721.

(收稿日期:2023-11-20;修回日期:2024-01-04)