

云南枸杞根中酰胺类化学成分及其抗炎活性研究

郑新恒, 陈芳, 梁秋萍, 逯燕, 周光雄*

暨南大学药学院中药及天然药物研究所 广东省普通高校中药和天然药物药效物质基础重点实验室, 广州 510632

摘要: 研究云南枸杞 (*Lycium yunnanense* Kuang) 根部的酰胺类化学成分。通过硅胶和 Sephadex LH-20 柱层析, 以及高效液相制备层析等分离纯化手段, 从云南枸杞根部醇提物中共分离得到 15 个酰胺类化合物, 运用现代波谱技术鉴定了它们的结构, 分别为反式-N-阿魏酰酪胺(1)、N-顺式-对羟基苯乙基阿魏酰胺(2)、dihydro-feruloyl-tyramine(3)、3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl] acrylamide(4)、N-反式桂皮酸酐对羟基苯乙胺(5)、反式-N-对羟基香豆酰酪胺(6)、反式-N-对羟基苯乙基咖啡酰胺(7)、二氢咖啡酰酪胺(8)、N-trans-coumaroyloctopamine(9)、N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(4-methoxyphenyl) prop-2-enamide(10)、N-trans-feruloyl-3'-O-methyl-dopamine(11)、dihydro-feruloyl-5-methoxytyramine(12)、N-trans-sinapoyl-tyramine(13)、N-acetyl-N'-trans-feruloylputrescine(14)、N-acetyltyramine(15)。其中, 化合物 3~5, 9~15 为首次从该植物中分离得到。对分离得到的 15 个酰胺类化合物进行抗炎活性筛选, 其中, 化合物 4, 6, 7 和 12 具有显著的抗炎活性, 其 IC_{50} 值均小于 $17.21 \pm 0.50 \mu\text{M}$ 。

关键词: 云南枸杞; 根部; 酰胺类; 抗炎活性

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.012

Amide Constituents from the Root of *Lycium yunnanense* Kuang and Their Anti-inflammatory Activity

ZHENG Xin-heng, CHEN Fang, LIANG Qiu-ping, LU Yan, ZHOU Guang-xiong*

Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New Drugs Research, Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: The amide constituents in the ethanol extract of the root of *Lycium yunnanense* Kuang were isolated and purified by column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 as well as preparative HPLC. Their structures were identified by physical and spectral data. Fifteen amides were isolated and elucidated as N-trans-feruloyltyramine (1), N-cis-feruloyltyramine (2), dihydro-N-trans-feruloyltyramine (3), 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl] acrylamide (4), N-trans-cinnamoyltyramine (5), N-trans-coumaroyltyramine (6), N-trans-caffeoyltyramine (7), dihydro-N-caffeoyltyramine (8), N-trans-coumaroyloctopamine (9), N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(4-methoxyphenyl) prop-2-enamide (10), N-trans-feruloyl-3'-O-methyl-dopamine (11), dihydro-feruloyl-5-methoxytyramine (12), N-trans-sinapoyltyramine (13), N-acetyl-N'-trans-feruloylputrescine (14), N-acetyltyramine (15). Additionally, compounds 3-5, 9-15 were isolated from *Lycium yunnanense* Kuang for the first time. They were evaluated for the anti-inflammatory activities. Among them, compounds 4, 6, 7 and 12 showed significant anti-inflammatory activities with IC_{50} values of lower than $17.21 \pm 0.50 \mu\text{M}$.

Key words: *Lycium yunnanense*; root; amide constituents; anti-inflammatory activities

枸杞属植物是我国非常重要的药用植物资源, 本属植物在全世界共有 80 余种, 主要分布于南美洲, 少数种类分布于欧洲、亚州等地区, 分布在我国枸杞属资源有 7 个种和 3 变种, 多分布于华北和西

北地区^[1]。其中, 宁夏枸杞 (*Lycium barbarum*) 属于该科一种药用植物^[2], 其果实即为我国一味传统常用中药枸杞。该药始载于《神农本草经》被列为上品, 谓之: “久服坚筋骨, 轻身不老, 耐寒暑”^[3]。而其根皮则为另一传统中药地骨皮的来源之一。现代药理学研究表明, 枸杞地下部分的提取物具有抗炎活性^[4]。云南枸杞 (*Lycium yunnanense* Kuang) 为同科属另一植物, 常见于云南禄劝、景东、富宁、砚山、

收稿日期: 2017-10-23 接受日期: 2018-03-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81573578)

* 通信作者 Tel: 86-20-85221469; E-mail: guangzxh@sina.com

麻栗坡等处,生于河边沙地潮湿处或丛林中海拔 700~2200 m 高地区。

迄今为止,关于云南枸杞中化学成分的研究较少。为了进一步研究云南枸杞中天然活性化学成分,为该植物资源开发利用提供依据,本课题组对其根部酰胺类化学成分进行了系统分离鉴定研究,分离鉴定了 15 个酰胺类化合物(图 1),其中,化合物 3~5、9~15 为首次从该植物中分离得到。经过对分得的酰胺类化合物进行体外抗炎活性的筛选,发现化合物 4、6、7 和 12 具有明显抗 NO 释放活性。本研究成果进一步丰富了云南枸杞植物的成分多样性与活性信息,为后续该植物资源开发利用及寻找和开发具有抗炎活性的先导化合物提供了一些研究基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Bruker AV-300 和 AV-600 型核磁共振仪(德国布鲁克公司);LC-100 型液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司);Agilent 6120 LC/MS TOF 质谱仪(美国安捷伦科技公司);Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);Thermo Scientific 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);液相分析色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈(5 μm, 4.6 × 250 mm)

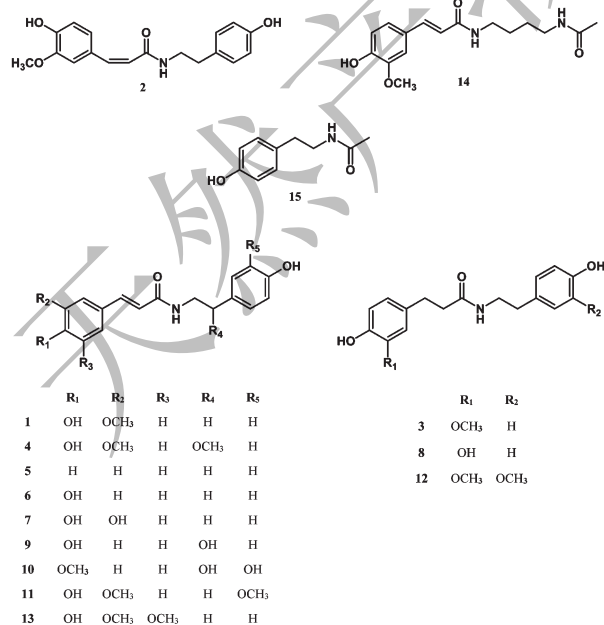


图 1 化合物 1~15 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-15

(美国 Welch 公司);液相半制备色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈(5 μm, 10 × 250 mm)(美国 Welch 公司);TLC 预制板(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20(Pharmacia 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);青-链霉素(美国 Hyclone 公司);核磁用氘代试剂(Merck 公司);色谱级甲醇(山东禹王公司);液相用水(广东怡宝公司生产纯净水),其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞株

小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 由暨南大学药学院中药及天然药物研究所提供。

1.3 药材来源

实验所用云南枸杞干燥根药材于 2015 年 6 月采自云南省文山州麻栗坡县,经中国科学院昆明植物研究所刘恩德博士鉴定为茄科植物云南枸杞(*Lycium yunnanense* Kuang)的干燥根。

2 实验方法

2.1 提取与分离

将云南枸杞干燥根晾干、粉碎、称重得 2.75 kg,加 7 倍量 95% 的乙醇回流提取两次,再用 80% 的乙醇回流提取一次,每次 2 h,滤过,合并三次提取液,减压浓缩后得总浸膏 276 g。向总浸膏中加入适量水悬浮,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,萃取液分别减压浓缩得到石油醚萃取物(41 g)、乙酸乙酯萃取物(40 g)。将乙酸乙酯萃取物(40 g)经硅胶柱色谱分离,以氯仿-甲醇(100:0→0:100)多梯度洗脱,经 TLC 分析合并相同流分,得到 12 个流分组 Fr. 1~12。Fr. 5 经硅胶柱层析分离,二氯甲烷-甲醇(100:0→0:100)多梯度洗脱,经 TLC 分析合并得到 6 个子流份 Fr. 5-1~6。Fr. 5-1 重结晶得化合物 1(55 mg)。Fr. 5-2 经半制备液相(甲醇/水 35:65)得到化合物 2(5.8 mg)和 3(16 mg)。Fr. 5-4 经过 Sephadex LH-20 柱色谱分离,纯甲醇系统洗脱,得到化合物 4(4 mg),其他流份经 TLC 分析合并得到 3 个子流份组 Fr. 5-4-1~3。Fr. 5-4-2 经半制备液相(甲醇/水 45:55)得到化合物 11(16 mg)和 12(3 mg)。Fr. 7 经 ODS 开放柱层析分离,以甲醇-水(1:5→100:0)多梯度洗脱,经 TLC 分析合并得到 5 个子流份 Fr. 7-1~5。Fr. 7-1 经过 Sephadex LH-20 柱色谱分离,纯甲醇系统洗脱,得到化合物 6(20 mg)和 7(36 mg)。Fr. 7-3 经半制备液相(甲醇/水 42:58)得到

化合物 **5** (3 mg) 和 **9** (13 mg)。Fr. 7-4 经半制备液相(甲醇/水 44:52)得到化合物 **8** (31 mg)、**13** (35 mg) 和 **14** (9.6 mg)。Fr. 8 经 ODS 开放柱层析分离,以甲醇-水(1:5→100:0)多梯度洗脱,经 TLC 分析合并得到 5 个子流份 Fr. 8-1~3。Fr. 8-1 经过 Sephadex LH-20 柱色谱分离,纯甲醇系统洗脱,得到化合物 **10** (44 mg)。Fr. 8-2 经半制备液相(甲醇/水 47:58)得到化合物 **15** (8 mg)。

2.2 细胞培养

小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,放置在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养,取对数期细胞用于实验。

2.3 细胞活力实验

RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释到每孔 4×10^4 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 100 μ L。置恒温培育箱(37 °C, 5% CO₂)中培养 24 h,吸出培养液,加入含有不同浓度的待测化合物及阳性对照药(槲皮素)的培养液,培养 24 h 后弃去上清液,在每孔中加入 5 mg/mL MTT, 37 °C 下反应 4 h,弃去 MTT,每孔加入 200 μ L DMSO,置摇床上低速震荡 10 min,使结晶充分溶解,用酶标仪在 570 nm 处测量各孔的 OD 值,计算化合物的 IC₅₀ 值。

2.4 抗炎活性实验

抗炎活性采用抑制一氧化氮(NO)生成实验,以 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 为检测模型,应用 Griess 试剂显色法检测一氧化氮生成量^[5,6]。RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释到每孔 4×10^4 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 100 μ L。置恒温培育箱(37 °C, 5% CO₂)中培养 24 h,吸出培养液,加入含有不同浓度的待测化合物及阳性对照药(槲皮素)的培养液,同时预先在培养液中加入 100 ng/mL LPS。培养 24 h 后,吸取各孔上清液至新的 96 孔板中,每孔加入以 1:1 比例混合的 Griess A 和 B 溶液 100 μ L。在 3000 rpm 下离心 1 min,继续在黑暗处反应 10 min。用酶标仪在 540 nm 波长下测定各孔 OD 值,计算化合物的 IC₅₀ 值。

3 实验结果

3.1 化合物结构鉴定

化合物 **1** 白色晶体; HR-ESI-MS: m/z 312.1241 [M-H]⁻, 确定其相对分子质量为 313, 分

子式为 C₁₈H₁₉NO₄; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.05 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-2), 6.79 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.98 (1H, dd, J = 8.1, 1.7 Hz, H-6), 7.44 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-7), 6.41 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-8), 7.03 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2'), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3'), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 7.03 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'), 2.73 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7'), 3.46 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8'), 3.80 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 128.1 (C-1), 111.4 (C-2), 149.6 (C-3), 56.3 (3-OCH₃), 149.1 (C-4), 116.4 (C-5), 123.2 (C-6), 142.0 (C-7), 118.6 (C-8), 169.1 (C-9), 131.2 (C-1'), 130.7 (C-2'), 116.2 (C-3'), 156.6 (C-4'), 116.2 (C-5'), 130.7 (C-6'), 35.6 (C-7'), 42.4 (C-8')。以上数据与文献[7]报道基本一致,故鉴定化合物 **1** 为反式-N-阿魏酰酪胺。

化合物 **2** 白色粉末; HR-ESI-MS: m/z 336.1172 [M+Na]⁺, 确定其相对分子质量为 313, 分子式为 C₁₈H₁₉NO₄; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.76 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-2), 6.48 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-3), 7.71 (1H, s, H-5), 3.74 (3H, s, 6-OCH₃), 6.71 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-8), 7.08 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-9), 3.25 (2H, m, H-1'), 2.62 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-2'), 6.99 (2H, d, J = 7.5 Hz, H-4'), 6.67 (2H, d, J = 7.5 Hz, H-5', 7'), 8.11 (1H, t, J = 5.0 Hz, -CONH), 9.18 (1H, br. s, 7-OH), 9.29 (1H, br. s, 6'-OH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.2 (C-1), 121.0 (C-2), 136.9 (C-3), 126.7 (C-4), 114.2 (C-5), 146.8 (C-6), 55.5 (6-OCH₃), 147.5 (C-7), 114.9 (C-8), 124.3 (C-9), 40.6 (C-1'), 34.3 (C-2'), 129.5 (C-3', 4', 8'), 115.1 (C-5', 7'), 155.7 (C-6')。以上数据与文献[8]报道基本一致,故鉴定化合物 **2** 为 N-顺式-对羟基苯乙基阿魏酰酪胺。

化合物 **3** 白色粉末; HR-ESI-MS: m/z 338.0992 [M+Na]⁺, 确定其相对分子质量为 315, 分子式为 C₁₈H₂₁NO₄; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 2.37 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-2), 2.83 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-3), 6.74 (2H, d, J = 2.0 Hz, H-5), 3.83 (3H, s, 6-OCH₃), 6.69 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-8), 6.59 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-9), 3.26 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-1'), 2.57 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-2'), 6.90 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-4', 8'), 6.65 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-

5',7'); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.4 (C-1), 39.4 (C-2), 32.6 (C-3), 133.7 (C-4), 113.1 (C-5), 145.8 (C-6), 56.4 (6-OCH₃), 148.8 (C-7), 116.2 (C-8), 121.8 (C-9), 42.3 (C-1'), 35.7 (C-2'), 131.2 (C-3'), 130.7 (C-4', 8'), 116.2 (C-5', 7'), 156.8 (C-6')。以上数据与文献[9]报道基本一致,故鉴定化合物**3**为 dihydro-feruloyltyramine。

化合物 4 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 366.1329 [M + Na]⁺, 确定其相对分子质量为 343; ^1H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.13 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃), 6.79 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 7.03 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Hz, H-6), 7.44 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 6.47 (1H, 1H, J = 15.9 Hz, H-8), 7.17 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.79 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 5'), 4.25 (1H, dd, J = 8.1, 4.5 Hz, H-7'), 3.22 (3H, s, 7'-OCH₃), 3.51 (1H, dd, J = 13.8, 4.5 Hz, H-8'a), 3.40 (1H, dd, J = 13.8, 8.1 Hz, H-8'b); ^{13}C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 128.1 (C-1), 111.5 (C-2), 149.4 (C-3), 56.4 (3-OCH₃), 150.1 (C-4), 116.5 (C-5), 123.3 (C-6), 142.3 (C-7), 118.5 (C-8), 169.2 (C-9), 131.4 (C-1'), 129.2 (C-2'), 116.3 (C-3'), 158.5 (C-4'), 116.3 (C-5'), 129.2 (C-6'), 83.3 (C-7'), 56.8 (7'-OCH₃), 47.1 (C-8')。以上数据与文献[10]报道基本一致,故鉴定化合物**4**为 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl] acrylamide。

化合物 5 黄色油状; HR-ESI-MS: m/z 268.1300 [M + H]⁺, 确定其相对分子质量为 267, 分子式为 C₁₇H₁₈NO₂; ^1H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.03 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-2, 6), 6.72 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-3, 5), 2.95 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7), 3.47 (2H, J = 7.2 Hz, H-8), 7.56 (3H, m, H-2', 6', 7'), 7.38 (2H, m, H-3', 5'), 6.58 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8'); ^{13}C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 131.2 (C-1), 130.8 (C-2), 116.3 (C-3), 157.3 (C-4), 116.3 (C-5), 130.8 (C-6), 35.8 (C-7), 42.6 (C-8), 168.6 (C-9), 136.3 (C-1'), 128.8 (C-2'), 129.9 (C-3'), 130.7 (C-4'), 129.9 (C-5'), 128.8 (C-6'), 141.6 (C-7'), 42.6 (C-8')。以上数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定化合物**5**为 *N*-反式桂皮酸酐对羟基苯乙胺。

化合物 6 白色粉末; HR-ESI-MS: m/z 306.1014 [M + Na]⁺, 确定其相对分子质量为 283,

分子式为 C₁₇H₁₇NO₃; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.38 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.78 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-3, 5), 7.31 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-7), 6.40 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-8), 7.01 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.68 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 5'), 2.64 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-7'), 3.32 (2H, q, H-8'); ^{13}C NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 125.9 (C-1), 129.2 (C-2, 6), 115.8 (C-3, 5), 158.8 (C-4), 138.6 (C-7), 118.7 (C-8), 165.3 (C-9), 129.6 (C-1'), 129.5 (C-2', 6'), 115.1 (C-3', 5'), 155.6 (C-4'), 34.5 (C-7'), 40.7 (C-8')。以上数据与文献[7]报道基本一致,故鉴定化合物**6**为反式-*N*-对羟基香豆酰酪胺。

化合物 7 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 298.1070 [M-H]⁻, 确定其相对分子质量为 299, 分子式为 C₁₇H₁₇NO₄; ^1H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.00 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.76 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.89 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6), 7.38 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-7), 6.33 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-8), 7.05 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.72 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 5'), 2.74 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7'), 3.45 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8'); ^{13}C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 128.1 (C-1), 116.4 (C-2), 146.7 (C-3), 148.7 (C-4), 118.4 (C-5), 122.1 (C-6), 115.0 (C-7), 142.2 (C-8), 169.3 (C-9), 131.3 (C-1'), 130.7 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 156.6 (C-4'), 35.8 (C-7'), 42.6 (C-8')。以上数据与文献[12]报道基本一致,故鉴定化合物**7**为反式-*N*-对羟基苯乙基咖啡酰胺。

化合物 8 黄色油状; HR-ESI-MS: m/z 300.1240 [M-H]⁻, 确定其相对分子质量为 301, 分子式为 C₁₇H₁₉NO₄; ^1H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 6.63 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.67 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.50 (1H, dd, J = 8.1, 1.9 Hz, H-6), 2.72 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-7), 2.36 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-8), 6.94 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.68 (2H, br. s, H-3', 5'), 2.60 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7'), 3.25 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8'); ^{13}C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 133.7 (C-1), 116.3 (C-2), 144.6 (C-3), 146.2 (C-4), 116.5 (C-5), 120.6 (C-6), 32.4 (C-7), 39.4 (C-8), 175.4 (C-9), 131.3 (C-1'), 130.7 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 155.6 (C-4'), 35.7 (C-7'), 42.3 (C-8')。以上数据与文献[7]报道基本一致,

故鉴定化合物 **8** 为二氢咖啡酰酪胺。

化合物 9 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 322. 1052 $[M + Na]^+$, 确定其相对分子质量为 299, 分子式为 $C_{17}H_{17}NO_4$; 1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ : 7. 22(2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6. 76(2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 7. 45(1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 6. 44(1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8), 7. 42(2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6. 79(2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 4. 72(2H, dd, $J = 8.0, 4.5$ Hz, H-7'), 3. 53(1H, dd, $J = 14.0, 4.5$ Hz, H-8'a), 3. 43(1H, dd, $J = 14.0, 8.0$ Hz, H-8'b); ^{13}C NMR(75 MHz, CD_3OD) δ : 127. 6(C-1), 128. 6(C-2, 6), 116. 8(C-3, 5), 142. 0(C-7), 118. 2(C-8), 169. 6(C-9), 134. 7(C-1'), 130. 6(C-2', 6'), 116. 1(C-3', 5'), 48. 3(C-7'), 73. 4(C-8')。以上数据与文献[13]报道基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为 *N-trans-coumaroyloctopamine*。

化合物 10 黄色油状; HR-ESI-MS: m/z 352. 1150 $[M + Na]^+$, 确定其相对分子质量为 329, 分子式为 $C_{18}H_{19}NO_5$; 1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ : 7. 23(2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6. 77(2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 3. 88(3H, s, 4-OCH₃), 7. 45(1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 6. 46(1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8), 7. 12(1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-2'), 6. 80(1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7. 02(1H, dd, $J = 8.5, 1.3$ Hz, H-6'), 4. 72(1H, dd, $J = 7.7, 4.9$ Hz, H-7'), 3. 54(1H, dd, $J = 13.5, 4.9$ Hz, H-8'a), 3. 44(1H, dd, $J = 13.5, 7.7$ Hz, H-8'b); ^{13}C NMR(75 MHz, CD_3OD) δ : 128. 1(C-1), 128. 5(C-2, 6), 116. 1(C-3, 5), 158. 1(C-4), 56. 3(4-OCH₃), 142. 3(C-7), 118. 5(C-8), 169. 5(C-9), 134. 7(C-1'), 111. 5(C-2'), 150. 1(C-3'), 149. 3(C-4'), 116. 5(C-5'), 123. 3(C-6'), 73. 4(C-7'), 48. 3(C-8')。以上数据与文献[14]报道基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 *N*-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-enamide。

化合物 11 白色粉末; HR-ESI-MS: m/z 366. 1326 $[M + Na]^+$, 确定其相对分子质量为 343, 分子式为 $C_{19}H_{21}NO_5$; 1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ : 7. 09(1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 3. 85(3H, s, 3-OCH₃), 6. 77(1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7. 00(1H, dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, H-6), 7. 43(1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 6. 39(1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8), 6. 80(1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 3. 83(3H, s, 3'-OCH₃), 2. 77(2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-7'), 3. 47(2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-

8'); ^{13}C NMR(75 MHz, CD_3OD) δ : 128. 0(C-1), 111. 5(C-2), 150. 3(C-3), 56. 3(3-OCH₃), 148. 9(C-4), 116. 7(C-5), 123. 3(C-6), 142. 1(C-7), 118. 6(C-8), 169. 2(C-9), 132. 0(C-1'), 113. 4(C-2'), 149. 4(C-3'), 56. 3(3'-OCH₃), 146. 0(C-4'), 116. 2(C-5'), 122. 2(C-6'), 36. 2(C-7'), 42. 5(C-8')。以上数据与文献[15]报道基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 *N-trans-feruloyl-3'-O-methyldopamine*。

化合物 12 白色粉末; HR-ESI-MS: m/z 346. 1667 $[M + H]^+$, 确定其相对分子质量为 345, 分子式为 $C_{19}H_{23}NO_5$; 1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ : 6. 75(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 3. 82(3H, s, 3-OCH₃), 6. 68(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6. 55(1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 2. 62(2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7), 3. 39(2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 6. 71(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 3. 82(3H, s, 3'-OCH₃), 6. 77(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6. 61(1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 2. 40(2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-7'), 2. 79(2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-8'); ^{13}C NMR(75 MHz, CD_3OD) δ : 128. 1(C-1), 113. 1(C-2), 149. 1(C-3), 56. 3(3-OCH₃), 145. 9(C-4), 116. 1(C-5), 122. 3(C-6), 36. 2(C-7), 42. 4(C-8), 175. 4(C-9), 133. 7(C-1'), 113. 3(C-2'), 146. 0(C-3'), 56. 3(3'-OCH₃), 149. 1(C-4'), 116. 1(C-5'), 121. 8(C-6'), 32. 6(C-7'), 39. 2(C-8')。以上数据与文献[16]报道基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为 dihydro-feruloyl-5-methoxytyramine。

化合物 13 淡黄色油状; HR-ESI-MS: m/z 344. 1492 $[M + H]^+$, 确定其相对分子质量为 343, 分子式为 $C_{19}H_{21}NO_5$; 1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ : 6. 44(1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2), 7. 41(1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-3), 6. 76(2H, s, H-5, 9), 3. 78(6H, s, 6, 8-OCH₃), 7. 02(2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6. 72(2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 3. 46(2H, t, $J = 7.5$ Hz, H- α), 2. 72(2H, t, $J = 7.5$ Hz, H- β); ^{13}C NMR(75 MHz, CD_3OD) δ : 169. 0(C-1), 119. 1(C-2), 142. 2(C-3), 127. 1(C-4), 106. 2(C-5, 9), 149. 2(C-6, 8), 56. 7(6, 8-OCH₃), 131. 2(C-7, 1), 42. 4(C- α), 35. 6(C- β), 130. 7(C-2, 6), 116. 2(C-3, 5), 156. 7(C-4)。以上数据与文献[17]报道基本一致, 故鉴定化合物 **13** 为 *N-trans-sinapoyltyramine*。

化合物 14 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 329. 1490 $[M + Na]^+$, 确定其相对分子质量为 306, 分子式为 $C_{16}H_{22}N_2O_4$; 1H NMR(300 MHz, CD_3OD)

δ : 6.41 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-2), 7.42 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-3), 7.10 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 3.86 (3H, s, 3'-OCH₃), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 7.02 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-6'), 3.33 (2H, m, H-1''), 3.19 (2H, m, H-4''), 1.55 (4H, m, H-2'', 3''), 1.92 (3H, s, -COCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 169.2 (C-1), 118.6 (C-2), 142.1 (C-3), 128.1 (C-1'), 111.5 (C-2'), 150.2 (C-3'), 56.5 (3'-OCH₃), 149.4 (C-4'), 116.5 (C-5'), 123.2 (C-6'), 40.1 (C-1'', 4''), 27.8 (C-2''), 27.9 (C-3''), 173.3 (-COCH₃), 22.5 (-COCH₃)。以上数据与文献[18]报道基本一致,故鉴定化合物 **14** 为 *N*-acetyl-*N'*-*trans*-feruloylputrescine。

化合物 15 白色油状; HR-ESI-MS: m/z 180.1256, [M+H]⁺ 确定其相对分子质量为 179, 分子式为 C₁₀H₁₃NO₂; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.70 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 3.33 (2H, m, H-7), 2.67 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8), 1.89 (3H, s, -CH₃); ¹³C NMR (75 MHz,

表 1 化合物 1~15 的细胞活力和抑制 NO 生成活性

Table 1 Cell viability assay of RAW 264.7 and inhibition of nitric oxide production of compounds 1-15

化合物 Compounds	细胞活力 IC ₅₀	抗炎活性 IC ₅₀
	Cell viability (IC ₅₀ in μ M)	Anti-inflammation (IC ₅₀ in μ M)
	RAW 264.7	NO
1	>100	33.15 \pm 2.04
2	>100	76.55 \pm 4.99
3	>100	>100
4	>100	17.00 \pm 1.11
5	>100	>100
6	>100	10.68 \pm 2.36
7	>100	8.98 \pm 0.57
8	>100	43.95 \pm 6.11
9	>100	>100
10	>100	>100
11	>100	34.51 \pm 3.25
12	>100	10.72 \pm 0.43
13	>100	34.78 \pm 2.65
14	>100	>100
15	>100	>100
阳性对照 Positive control	>100	17.21 \pm 0.50

注:阳性对照药为槲皮素。

Note: Quercetin was used as positive control.

CD₃OD) δ : 131.2 (C-1), 130.7 (C-2, 6), 116.2 (C-3, 5), 156.9 (C-4), 42.4 (C-7), 35.6 (C-9), 173.2 (C-9), 22.5 (-CH₃)。以上数据与文献[19]报道基本一致,故鉴定化合物 **15** 为 *N*-acetyltyramine。

3.2 抗炎活性实验结果

15 个酰胺类化合物 (**1**~**15**) 的细胞活力和抗炎活性结果见表 1。化合物 **4**、**6**、**7** 和 **12** 具有显著抗炎活性,其 IC₅₀ 值均小于 17.21 \pm 0.50 μ M。初步的构效关系发现,两个苯环的对位具有羟基取代以及酰胺键与反式双键共轭时的结构 (化合物 **4**、**6**、**7** 和 **12**) 具有显著的抗炎活性。

4 讨论与结论

本研究从云南枸杞根部的醇提物中分离鉴定了 15 个酰胺类化合物,其中,化合物 **3**~**5**、**9**~**15** 为首次从该植物中分离得到。此外,该类化合物具有一定的抗炎活性,其中化合物 **4**、**6**、**7** 和 **12** 具有显著的抗炎活性。本研究结果为酰胺类化合物的药物开发利用提供了一定的化学基础,为医药和天然产物开发提供了理论和物质基础。

参考文献

- Lu AM (路安民), Wang M (王美林). On the identification of the original plants in the modernization of Chinese herbal medicine-An example from the taxonomy and exploitation of 'Gouqi' [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), 2003, 23: 1077-1078.
- Yong P, Ma C, Li Y, et al. Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in *Lycium* fruits [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2006, 60: 161-164.
- Jiangsu New Medical School (江苏新医学院). Dictionary of Traditional Chinese Medicine (中药大词典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1997, 15: 1518.
- Lin CC, Chuang SC, Lin JM, et al. Evaluation of the anti-inflammatory hepatoprotective and anti-oxidant activities of *Lycium chinese* from Taiwan [J]. *Phytomedicine*, 1997, 3: 213-220.
- Cheng XX (成晓霞), Zhang ZQ (张志琪), Xiao YP (肖娅萍), et al. Chemical components and cytotoxic activity of *Polytrichum commune* L. ex Hedw [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1733-1738
- Yuan CM, Tang GH, Zhang Y, et al. Bioactive limonoid and triterpenoid constituents of *Turraea pubescens* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76, 1166-1174.
- Meng LJ (孟令杰), Lin BL (刘百联), Zhang Ying (张英) et al. Chemical constituents in root barks of *Lycium chinense*

- [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2014,15:2139-2142
- 8 Li YJ(李勇军),He X(何迅),Liu ZB(刘志宝),*et al.* Chemical constituents of flowers of *Polygonum orientale*[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*(时珍国医国药),2010,1:14-15.
- 9 Chen CY,Chang FR,Yen HF,*et al.* Amides from stems of *Annona Chermola*[J]. *Phytochemistry*,1998,49:1443-1447.
- 10 Choonghwan L,Jinhee K,Hojae L,*et al.* Two new constituents of isodon excisus and their evaluation in an apoptosis [J]. *J Nat Prod*,2001,64:659-660.
- 11 Ji MC(纪明昌),Xiao SJ(肖世基),Jiang SY(蒋舜媛),*et al.* Chemical constituents from *Pothos chinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2015,1:28-32.
- 12 Liu J(刘杰),Chen HS(陈海生),Xu YX(徐一新),*et al.* Studies on chemical constituents of *Tribulus terrestris* L[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*(第二军医大学学报),2003,24:221-222.
- 13 Duan CL,Jiang Y,Jiang Y,*et al.* Liposoluble chemical constituents from the fibrous root of *Ophiopogon japonicas*[J]. *J Chin Pharm Sci*,2009,18:236-239.
- 14 Khalid Mk,Ghulam MM,Ahmed A,*et al.* Three tyrosinase inhibitors and antioxidant compounds from *Salsola foetida* [J]. *Helv Chim Acta*,2003,86:457-463.
- 15 Francesca C,Brigida D,Marina DG,*et al.* Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: effects on seeds germination and plant growth[J]. *Phytochemistry*,2003,64:1381-1387.
- 16 Wang MH,Chou YT,Hong ZL,*et al.* Bioconstituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell(*Sapotaceae*) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxidant properties [J]. *J Taiwan Inst Chem E*,2011,42:204-211.
- 17 Mariana H,Nidia F. Amides and lignanamides from *Porcelia Macrocarpa*[J]. *Phytochemistry*,1997,46:879-881.
- 18 Alf M. *N*-Feruloylputrescine in infected potato tubers[J]. *Acta Chem Scand*,1984,38:153-155.
- 19 Zhao PJ,Wang HX,Li GH,*et al.* Secondary metabolites from Endophytic *Streptomyces* sp. Lz531 [J]. *Chem Biodivers*,2007,4:899-903.
- (上接第 707 页)
- 19 Chen C,*et al.* Nine new cytochalasan alkaloids from *Chaetomium globosum* TW1-1 (Ascomycota, Sordariales) [J]. *Sci Rep*,2016,6:18711.
- 20 Zhang Z,*et al.* Cytochalosins H and I, new antiproliferative cytochalasans from deep-sea-derived fungus *Chaetomium globosum* [J]. *Mar Drugs*,2016,14(12).
- 21 Jiang T,*et al.* Overexpression of the global regulator LaeA in *Chaetomium globosum* leads to the biosynthesis of chaetoglobosin Z [J]. *J Nat Prod*,2016,79:2487.
- 22 Yan X,*et al.* New on-line separation workflow of microbial metabolites via hyphenation of analytical and preparative comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*,2016,1033-1034:1.
- 23 Li M(李明). Study on the secondary metabolites of *C. globosum* of endophytic fungi from *Imperata cylindricall* [D]. Yangzhou:Yangzhou University(扬州大学),2015.
- 24 Ruan BH,*et al.* New bioactive compounds from aquatic endophyte *Chaetomium globosum* [J]. *Nat Prod Res*,2017: 1-6.
- 25 Xu GB,*et al.* Indole Alkaloids from *Chaetomium globosum* [J]. *J Nat Prod*,2015,78:1479.
- 26 Youn UJ,*et al.* Determination of the absolute configuration of chaetoviridins and other bioactive azaphilones from the endophytic fungus *Chaetomium globosum* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2015,25:4719-4723.
- 27 Osmanova N,*et al.* Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. [J]. *Phytochem Rev*,2010,9:315-342.
- 28 Yamada T,*et al.* New class azaphilone produced by a marine fish-derived *Chaetomium globosum*. The stereochemistry and biological activities [J]. *Bioorg Med Chem*,2011,19:4106.
- 29 Gao JM,*et al.* Azaphilones: chemistry and biology [J]. *Chem Rev*,2013,113:4755-4811.
- 30 Chen C,*et al.* Chaephilones A and B,two new azaphilone derivatives isolated from *Chaetomium globosum* [J]. *Chem Biodivers*,2016,13:422-426.
- 31 Eman MHH. Anticancer Compounds from *Chaetomium globosum* [J]. *Anal Biochem*,2015,04(2).
- 32 Newman DJ. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery [J]. *J Med Chem*,2008,51:2589-2599.
- 33 Ding G,*et al.* Chaetoglobosin U, a cytochalasan alkaloid from endophytic *Chaetomium globosum* IFB-E019 [J]. *J Nat Prod*,2006,69:302-304.
- 34 Momesso LS,*et al.* Chaetoglobosins produced by *Chaetomium globosum*,endophytic fungus found in association with *Vigniera robusta* Gardn. (*Asteraceae*) [J]. *Quim Nova*,2008,31:1680-1685.
- 35 Cui C M,*et al.* Cytochalosins A-G,cytochalasans from a marine-derived endophytic fungus, *Chaetomium globosum* QEN-14 [J]. *J Nat Prod*,2010,73:729.
- 36 Ge HM,*et al.* Chaetoglocins A-D,four new metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium globosum*. [J]. *Planta Medica*,2011,77(3):277.