

美花圆叶筋骨草化学成分研究

杨凡¹,王利霞¹,唐飞¹,闫洪玲¹,沈晓飞²,张梅¹,赵文吉^{3*},谭玉柱^{1*}¹成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室—省部共建国家实验室培育基地,成都 611137;²四川大学华西第二医院 西部妇幼医学研究院,成都 610041;³四川省草原科学研究院,成都 610097

摘要:研究美花圆叶筋骨草 *Ajuga ovalifolia* var. *calantha* 的化学成分和生物活性。实验采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、ODS 柱色谱和半制备型高效液相色谱等分离纯化方法,从美花圆叶筋骨草全草 70% 丙酮提取物乙酸乙酯部位中分离得到了 12 个化合物,根据波谱学数据进行结构鉴定为:2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenyl- β -D-glucopyranoside(**1**)、oct-1-en-3-yl- β -glucopyranoside(**2**)、异地黄苷(**3**)、20-羟基蜕皮素-20,22-单丙酮化合物(**4**)、n-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷(**5**)、(2S)-3-O-octadeca-9Z,12Z,15Z-trienoylglycerol- O - β -D-galactopyranoside(**6**)、地黄苷(**7**)、乙酰哈巴苷(**8**)、水龙骨科素 B(**9**)、香草乙酮(**10**)、筋骨草内酯(**11**)、 α -(9Z,12'Z,15'Z)-octadecatrienoic acid monoglyceride(**12**)。其中化合物 **1**~**6**、**8**、**12** 为首次从该属植物中分离得到,化合物 **1**~**9**、**11**~**12** 为首次从美花圆叶筋骨草中分离得到。运用脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 生成 NO 的细胞模型对化合物 **3**、**4**、**7**、**9**、**11** 进行抗炎活性筛选和磷酸甘油酸脱氢酶(PHGDH)活性测定。所筛化合物均无抗炎活性,化合物 **7** 对 PHGDH 具有一定的抑制作用。

关键词:美花圆叶筋骨草;化学成分;抗炎活性;PHGDH 抑制活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)8-1386-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.8.012

Study on chemical constituents of *Ajuga ovalifolia* var. *calantha*YANG Fan¹, WANG Li-xia¹, TANG Fei¹, YAN Hong-ling¹, SHEN Xiao-fei²,
ZHANG Mei¹, ZHAO Wen-ji^{3*}, TAN Yu-zhu^{1*}¹Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China;²Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Ministry of Education), West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;³Sichuan Academy of Grassland Sciences, Chengdu 610097, China

Abstract: To investigate the chemical constituents and biological activity of *Ajuga ovalifolia* var. *calantha*. The 70% acetone extracts from the whole herb of *Ajuga ovalifolia* var. *calantha* were separated and purified by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, ODS and RP-HPLC. Their chemical structures were elucidated on the basis of physicochemical characteristics and spectral analyses. Twelve compounds were isolated and identified as 2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenyl- β -D-glucopyranoside (**1**), oct-1-en-3-yl- β -glucopyranoside (**2**), isomartynoside (**3**), 20-hydroxyecdysone-20,22-monoacetonide (**4**), octyl- β -D-Glucopyranoside (**5**), (2S)-3-O-octadeca-9Z,12Z,15Z-trienoylglycerol- O - β -D-galactopyranoside (**6**), martynoside (**7**), 8-acetylharpagide (**8**), polypodine B (**9**), acetovanillone (**10**), ajugalactone (**11**), α -(9Z,12'Z,15'Z)-octadecatrienoic acid monoglyceride (**12**). Compounds **1-6**, **8** and **12** were isolated from genus *Ajuga* for the first time, and compounds **1-9**, **11-12** were isolated from this plant firstly. Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages were

收稿日期:2019-03-13 接收日期:2019-06-06

基金项目:国家自然科学基金(81703693,81774202);第65批中国博士后基金面上资助(2019M653363);四川省科技创新苗子工程培育项目(2019052)

*通信作者 Tel:86-28-61800231;E-mail:tanyuzhu@cdutcm.edu.cn, zhaowenji2005@163.com

used to assess the anti-inflammatory activity of some compounds from *Ajuga ovalifolia* var. *calantha*, and their inhibitory activities to phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) were tested. The compound **3,4,7,9,11** had no anti-inflammatory activities, and compound **7** showed some inhibitory activity to PHGDH.

Key words: *Ajuga ovalifolia* var. *calantha*; Chemical constituents; Anti-inflammatory activity; PHGDH inhibited activity

美花圆叶筋骨草 *Ajuga ovalifolia* Bur. et Franch. var. *calantha* (Diels ex Limpricht) C. Y. Wu et C. Chen 为唇形科 (Labiata) 筋骨草属 (*Ajuga* Linn.) 植物, 产于四川西部及西北部、甘肃西南部, 是藏药达巴巴的来源之一^[1-3]。其性味苦寒, 功效清热解毒、凉血消肿, 全草药用可治疗浮肿后流黄水、关节积黄水、骨松质发炎、筋骨疼痛等症^[3]。其疗效显著, 民间应用广泛。但关于其化学成分和药理活性的现代研究鲜有报道。课题组前期研究表明, 筋骨草属主要含有二萜、甾体、黄酮等成分^[4]。本文在前期研究基础上, 进一步对其化学成分进行研究, 为筋骨草属药用资源开发奠定基础。本实验采用 70% 丙酮水对美花圆叶筋骨草进行冷浸提取, 减压浓缩后采用系统溶剂法得到各个萃取部位, 通过多种色谱分离技术从乙酸乙酯部位中分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为 2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenyl- β -D-glucopyranoside (**1**)、oct-1-en-3-yl- β -glucopyranoside (**2**)、异地黄苷(**3**)、20-羟基蜕皮素-20,22-单丙酮化合物(**4**)、n-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷(**5**)、(2S)-3-O-octadeca-9Z,12Z,15Z-trienoylglycerol- β -D-galactopyranoside(**6**)、地黄苷(**7**)、乙酰哈巴苷(**8**)、水龙骨科素 B(**9**)、香草乙酮(**10**)、筋骨草内酯(**11**)、 α -(9Z,12'Z,15'Z)-octadecatrienoic acid monoglyceride (**12**)。化合物 **1~6,8,12** 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 **1~9,11~12** 为首次从该种植物中分离得到。本研究对分离得到的化合物 **3,4,7,9,11** 进行了抗炎活性和 PHGDH 抑制活性的测定, 旨在为该种藏药资源的综合开发利用提供参考。

1 仪器与材料

Avance 400 MHz 超导核磁共振仪(德国 Bruker 公司); LC50 型中高压制备一体机(赛谱锐思北京科技有限公司); 酶标仪(美国 Fisher 公司); Sephadex LH-20 色谱填料(瑞士 Pharmacia 公司); MCI 树脂(日本三菱化学公司); 硅胶 GF₂₅₄ 薄层预制板(青岛海洋化工厂); 200~300 目柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂); 色谱纯甲醇(美国 TEDIA 公司); 氘代试剂(美国 CIL 公司); 优普 UPT 系列超纯水(成都优普电子有限公司); 其他试剂为分析纯(成都

市科隆化学品有限公司); LPS(中国上海 Sigma 公司, L-2880); RAW264.7 细胞株(中国科学院细胞库, 上海); DMEM + 10% FBS + 1% 双抗(青霉素, 链霉素)(美国 Hyclone 公司); CCK8, BAY 11-7085, Griess 试剂(中国 Beyotime 公司)。

美花圆叶筋骨草于 2017 年 12 月采收于四川阿坝红原县邛溪镇, 经中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室王强副研究员鉴定为唇形科筋骨草属植物美花圆叶筋骨草 *Ajuga ovalifolia* Bur. et Franch. var. *calantha* (Diels ex Limpricht) C. Y. Wu et C. Chen, 样品标本(JGC-1712) 现存于成都中医药大学中药化学 1001 研究室。

2 提取与分离

美花圆叶筋骨草干燥全草 6 kg, 粉碎后用 70% 丙酮水溶液室温冷浸提取 5 次, 浓缩提取液, 依次用石油醚, 乙酸乙酯和正丁醇萃取。乙酸乙酯部位(210 g)经 MCI 脱色素, 再经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇, 10:1 ~ 1:1)梯度洗脱, 薄层检识, 合并相同流分, 减压回收溶剂, 得到 6 个组分 Fr. 1 ~ Fr. 6。Fr. 3 经中压制备色谱(甲醇-水, 30:70 ~ 100:0)梯度洗脱, 薄层检识, 合并相同流分, 得到流分 Fr. 3.1 ~ Fr. 3.8; Fr. 3.3 经半制备 HPLC(甲醇-水, 60:40)分离得到化合物 **1**(7 mg) 和化合物 **2**(5 mg); Fr. 3.4 经半制备 HPLC(甲醇-水, 75:25)分离得到化合物 **11**(7 mg) 和化合物 **4**(8 mg); Fr. 3.6 经半制备 HPLC(甲醇-水, 70:30)分离得到化合物 **8**(5 mg)。Fr. 4 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇, 4:6)洗脱, 薄层检识, 合并相同流分, 得到流分 Fr. 4.1 ~ Fr. 4.5; Fr. 4.2 经半制备 HPLC(甲醇-水, 70:30)分离得到化合物 **12**(12 mg); Fr. 4.3 经半制备 HPLC(甲醇-水, 70:30)分离得到化合物 **5**(5 mg); Fr. 4.4 经半制备 HPLC(甲醇-水, 60:40)分离得到化合物 **3**(4 mg) 和化合物 **6**(3 mg) 和化合物 **9**(5 mg)。Fr. 5 经半制备 HPLC(甲醇-水, 60:40)分离得到化合物 **7**(7 mg) 和化合物 **10**(5 mg)。

3 生物活性测定

3.1 抗炎活性筛选

取指数生长期的鼠巨噬细胞 RAW264.7 铺

于24孔板(2.5×10^5 细胞/孔),在 37°C 、5% CO_2 的培养箱中常规培养于DMEM培养液中,过夜,用 $50 \mu\text{M}$ 浓度的单体化合物预处理2小时后,再加入LPS($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)反应24小时。以BAY 11-7085为阳性对照,通过Griess反应评估细胞培养基中的NO水平。

3.2 PHGDH 抑制活性测定

将人源PHGDH基因(1-310)克隆至pET16载体,其N端携带有 $6 \times \text{His}$ 标签。随后将载体转化至*E. coli* BL21, 28°C 培养,异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(ITPG)诱导蛋白表达。待菌液吸光度达到 $0.6 \sim 1.0$ (600 nm),超声破碎细菌, Ni柱纯化,测定浓度后 -80°C 冻存备用。配制所需试剂:

Mix1: 0.1 mM 3-PG; 0.1 mM resazurin; 4 mM NAD^+ ; $0.001 \text{ U}/\mu\text{L}$ diaphorase($30 \mu\text{L}$)

Mix2: 单体化合物($50 \mu\text{L}$, $25 \mu\text{M}$) + $0.5 \mu\text{M}$ PHGDH($20 \mu\text{L}$)

首先将Mix2加入到96孔板中,于室温下孵育20 min。随后加入Mix1,使得总体系达到 $100 \mu\text{L}$,室温继续孵育45 min。以CBR-5884为阳性对照,以550 nm激发,590 nm检测各孔吸光度值。

4 结构鉴定

化合物 1 黄色粉末(甲醇); ESI-MS: m/z 349.1259 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为349.1263), 相对分子量326, 分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7$; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.09(1H, d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, H-6), 6.83(1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-3), 6.73(1H, dd, $J = 8.3, 2.0 \text{ Hz}$, H-5), 6.01 ~ 5.90(1H, m, H-8), 5.09 ~ 5.00(2H, m, H-9), 4.85(1H, d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, H-1'), 3.87(1H, dd, $J = 12.0, 1.6 \text{ Hz}$, H-6'b), 3.84(3H, s, 2-OCH₃), 3.72-3.67(1H, m, H-6'a), 3.52 ~ 3.33(6H, m, H-7, 2', 3', 4', 5'); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 151.0(C-2), 146.5(C-1), 139.1(C-8), 136.7(C-4), 122.3(C-5), 118.5(C-6), 116.0(C-9), 114.4(C-3), 103.3(C-1'), 78.3(C-5'), 78.0(C-3'), 75.1(C-2'), 71.5(C-4'), 62.7(C-6'), 56.9(2-OCH₃), 40.9(C-7)。以上数据与文献^[5]报道一致,故鉴定化合物1为2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenyl- β -D-glucopyranoside。

化合物 2 白色粉末(甲醇); ESI-MS: m/z 313.1624 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为313.1627), 相对分子量290, 分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_6$; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 5.88(1H, ddd, $J = 17.3, 10.4, 7.1 \text{ Hz}$, H-

2), 5.20(1H, dt, $J = 17.3, 1.4 \text{ Hz}$, H-1a), 5.09(1H, dt, $J = 10.4, 1.4 \text{ Hz}$, H-1b), 4.32(1H, d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, H-1'), 4.12(1H, td, $J = 7.1, 5.8 \text{ Hz}$, H-3), 3.81(1H, dd, $J = 11.9, 2.5 \text{ Hz}$, H-6'a), 3.64(1H, dd, $J = 11.9, 5.5 \text{ Hz}$, H-6'b), 3.39 ~ 3.14(4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 0.90(3H, t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, H-8); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 141.2(C-2), 116.1(C-1), 103.3(C-1'), 83.0(C-3), 78.4(C-5'), 77.9(C-3'), 75.5(C-2'), 71.8(C-4'), 62.9(C-6'), 35.8(C-4), 33.1(C-6), 25.8(C-5), 23.8(C-7), 14.5(C-8)。以上数据与文献^[6]报道一致,故鉴定化合物2为oct-1-en-3-yl- β -gluco-pyranoside。

化合物 3 黄色油状物(甲醇); ESI-MS: m/z 675.2263 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为675.2230), 相对分子量652, 分子式 $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.63(1H, d, $J = 15.9 \text{ Hz}$, H-7'''), 7.16(1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-2'''), 7.02(1H, dd, $J = 8.2, 2.0 \text{ Hz}$, H-6'''), 6.80(1H, d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, H-5'''), 6.76(1H, d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, H-5), 6.69(1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-2), 6.61(1H, dd, $J = 8.2, 2.0 \text{ Hz}$, H-6), 6.39(1H, d, $J = 15.9 \text{ Hz}$, H-8'''), 5.17(1H, d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, H-1''), 4.51(1H, dd, $J = 11.9, 2.3 \text{ Hz}$, H-6'), 4.38(1H, dd, $J = 11.9, 6.2 \text{ Hz}$, H-6'), 4.33(1H, d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, H-1'), 3.99(1H, dd, $J = 9.1, 2.8 \text{ Hz}$, H-5''), 3.95(1H, dd, $J = 3.5, 1.8 \text{ Hz}$, H-2''), 3.86(3H, s, 3'''-OCH₃), 3.85(1H, m, H-7), 3.79(1H, m, H-7), 3.75(3H, s, 4-OCH₃), 3.72(1H, d, $J = 3.3 \text{ Hz}$, H-3''), 3.69(1H, d, $J = 3.2 \text{ Hz}$, H-5') 2.80(2H, t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, H-8), 1.25(3H, d, $J = 6.2 \text{ Hz}$, H-6''); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 169.2(C-9'''), 150.9(C-4'''), 149.6(C-3'''), 147.7(C-3), 147.5(C-7'''), 147.3(C-4), 132.9(C-1), 127.9(C-1'''), 124.4(C-6'''), 121.3(C-6), 117.2(C-5), 116.7(C-5'''), 115.5(C-8'''), 113.0(C-2), 111.9(C-2''), 104.6(C-1'), 102.9(C-1''), 84.3(C-3'), 75.8(C-2'), 75.6(C-5'), 74.2(C-4''), 72.5(C-2''), 72.5(C-3''), 72.4(C-7), 70.7(C-4'), 70.2(C-5''), 64.8(C-6'), 56.6(3''', 4-OCH₃), 36.9(C-8), 18.0(C-6'')。以上数据与文献^[7]报道一致,故鉴定化合物3为异地黄苷。

化合物 4 白色粉末(甲醇); ESI-MS: m/z 543.3288 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为543.3298), 相对分子量520, 分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_7$; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400

MHz) δ : 5.81 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-7), 3.95 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-3), 3.83 (1H, dt, $J = 12.1, 4.0$ Hz, H-2), 3.15 (1H, dd, $J = 10.6, 7.3$ Hz, H-9), 1.39 (3H, s, H-29), 1.32 (3H, s, H-30), 1.21 (3H, s, H-21), 1.20 (3H, s, H-26), 1.18 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 206.6 (C-6), 167.8 (C-8), 122.3 (C-7), 108.2 (C-28), 86.0 (C-22), 85.5 (C-14), 83.5 (C-20), 71.3 (C-25), 68.9 (C-2), 68.7 (C-3), 52.0 (C-5), 50.7 (C-17), 49.2 (C-13), 42.4 (C-24), 39.4 (C-10), 37.5 (C-1), 35.3 (C-9), 32.8 (C-4), 32.5 (C-12), 31.9 (C-15), 29.6 (C-26), 29.5 (C-27), 29.1 (C-29), 27.3 (C-30), 24.9 (C-23), 24.6 (C-19), 22.7 (C-21), 22.6 (C-16), 21.7 (C-11), 17.8 (C-18)。以上数据与文献^[8]报道的数据一致,故鉴定化合物 4 为 20-羟基鳝皮素-20,22-单丙酮化合物。

化合物 5 黄色油状物(甲醇);ESI-MS: m/z 315.178 1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为 315.178 4), 相对分子量 292, 分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_6$; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 4.24 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.89 -3.86 (1H, m, H-8), 3.85 -3.82 (1H, m, H-6'a), 3.69 -3.67 (1H, m, H-6'b), 3.55 -3.51 (1H, m, H-8), 3.37 -3.33 (1H, m, H-3'), 3.28 -3.26 (2H, m, H-4', 5'), 3.17 -3.13 (1H, m, H-2'), 1.61 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-7), 1.32 -1.28 (10H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 0.90 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H-1); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 104.6 (C-1'), 78.3 (C-3'), 78.1 (C-5'), 75.3 (C-2'), 71.9 (C-4'), 71.1 (C-8), 63.0 (C-6'), 33.2 (C-7), 31.0 (C-6), 30.7 (C-5), 30.6 (C-4), 27.3 (C-3), 23.9 (C-2), 14.5 (C-1)。以上数据与文献^[9]报道的数据一致,故鉴定化合物 5 为 *n*-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 6 黄色油状物(甲醇);ESI-MS: m/z 537.153 3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为 537.152 5), 相对分子量 514, 分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_9$; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 5.44 ~ 5.25 (6H, m, H-9''), 4.23 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.19 -4.10 (2H, m, H-3), 4.02 ~ 3.94 (1H, m, H-1), 3.91 (1H, dd, $J = 10.5, 5.2$ Hz, H-1), 3.83 (1H, dd, $J = 3.3, 1.1$ Hz, H-4'), 3.74 (1H, m, H-6'a), 3.66 (1H, dd, $J = 10.5, 4.6$ Hz, H-6'b), 3.57 -3.53 (1H, m, H-2'), 3.52 -3.49 (1H, m, H-5'), 3.47 (1H, dd, $J = 9.7, 3.3$ Hz, H-3'), 2.81 (4H, t, $J = 6.0$ Hz, H-11'', 14''), 2.35 (2H, t, $J = 7.5$ Hz,

H-2''), 2.08 (4H, m, H-17'', 8''), 1.62 (2H, m, H-3''), 1.43 -1.27 (8H, m, H-4'', 5'', 6'', 7''), 0.97 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18''); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 175.6 (C-1''), 132.9 (C-16''), 131.2 (C-15''), 129.4 (C-12''), 129.3 (C-13''), 129.0 (C-10''), 128.4 (C-9''), 105.5 (C-1'), 76.9 (C-5'), 75.0 (C-3'), 72.7 (C-2'), 72.0 (C-1), 70.4 (C-4'), 69.8 (C-2), 66.7 (C-3), 62.6 (C-6'), 35.1 (C-2''), 30.8 (C-4''), 30.4 (C-5''), 30.3 (C-6''), 30.3 (C-7''), 28.3 (C-8''), 26.7 (C-14''), 26.6 (C-11''), 26.1 (C-3''), 21.6 (C-17''), 14.8 (C-18'')。以上数据与文献^[10]报道一致,故鉴定化合物 6 为 (2*S*)-3-*O*-octadeca-9*Z*, 12*Z*, 15*Z*-trienoyl-glycerol-*O*- β -D-galactopyranoside。

化合物 7 棕黄色油状物(甲醇);ESI-MS: m/z 675.223 7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为 675.223 0), 相对分子量 652, 分子式 $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.65 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'''), 7.18 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-2'''), 7.07 (1H, dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, H-6'''), 6.81 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5, 5'''), 6.73 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.67 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6), 6.36 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'''), 5.20 (1H, brs, H-1''), 4.92 (1H, t, $J = 9.1$ Hz, H-4'), 4.37 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 3.87 (3H, s, 4-OCH₃), 3.80 (3H, s, 4'''-OCH₃), 3.3 ~ 4.2 (7H, m, H-2', 3', 5', 6', 4'', 5'', 7), 2.81 (2H, m, H-8), 1.16 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-6''); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 168.4 (C-9'''), 150.9 (C-4'''), 149.5 (C-3'''), 148.0 (C-7'''), 147.7 (C-3), 147.5 (C-4), 133.0 (C-1), 127.8 (C-1'''), 124.5 (C-6'''), 121.3 (C-6), 117.2 (C-5), 116.7 (C-5'''), 115.3 (C-8'''), 113.0 (C-2), 112.0 (C-2'''), 104.3 (C-1'), 103.1 (C-1''), 81.6 (C-3'), 76.3 (C-2'), 76.2 (C-5'), 73.9 (C-4''), 72.5 (C-2''), 72.3 (C-7), 72.2 (C-3''), 70.8 (C-4'), 70.5 (C-5''), 62.5 (C-6'), 56.7 (4-OCH₃), 56.6 (4'''-OCH₃), 36.7 (C-8), 18.6 (C-6'')。以上数据与文献^[11]报道一致,故鉴定化合物 7 为地黄苷。

化合物 8 棕黄色油状物(甲醇);ESI-MS: m/z 429.317 8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为 429.319 2), 相对分子量 406, 分子式 $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6.38 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-3), 6.07 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-1), 4.91 (1H, dd, $J = 6.4, 1.4$ Hz, H-4), 4.59 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.29 (1H, t, $J =$

6.6 Hz, H-6'), 3.89 (1H, dd, $J = 12.0$, 1.7 Hz H-6'), 3.71 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-6), 2.86 (1H, s, H-9), 2.18 (1H, d, $J = 15.1$ Hz, H-7), 2.01 (3H, s, H-12), 1.95 (1H, dd, $J = 15.1$, 4.5 Hz, H-7), 1.46 (3H, s, H-10); ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 173.4 (C-11), 144.0 (C-3), 107.1 (C-4), 100.1 (C-1'), 94.7 (C-1), 88.8 (C-8), 78.3 (C-6), 77.8 (C-3'), 77.7 (C-5'), 74.7 (C-2'), 73.5 (C-5), 71.9 (C-4'), 63.0 (C-6'), 55.7 (C-9), 46.2 (C-7), 22.6 (C-10), 22.3 (C-12)。以上数据与文献^[12]报道一致,故鉴定化合物 **8** 为乙酰多巴昔。

化合物 9 无色油状物 (甲醇); ESI-MS: m/z 519.294 4 [M + Na]⁺ (计算值为 519.293 4), 相对分子量 496, 分子式 C₂₇H₄₄O₈; ^1H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 5.86 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-7), 4.02 ~ 3.92 (2H, m, H-2, 3), 3.20 (1H, m, H-22), 1.21 (3H, s, H-27), 1.20 (3H, s, H-26), 1.19 (3H, s, H-21), 0.92 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 202.5 (C-6), 167.5 (C-8), 120.7 (C-7), 85.2 (C-14), 80.5 (C-5), 78.6 (C-22), 78.0 (C-20), 71.4 (C-25), 70.4 (C-3), 68.6 (C-2), 50.6 (C-17), 48.1 (C-13), 45.6 (C-10), 42.5 (C-24), 39.2 (C-9), 36.3 (C-4), 34.4 (C-1), 32.7 (C-12), 31.9 (C-15), 29.9 (C-27), 29.1 (C-26), 27.5 (C-23), 22.7 (C-11), 21.6 (C-16), 21.2 (C-21), 18.2 (C-19), 17.1 (C-18)。以上数据与文献^[13]报道一致,故鉴定化合物 **9** 为水龙骨素 B。

化合物 10 无色晶体 (甲醇); ESI-MS: m/z 167.071 0 [M + H]⁺ (计算值为 167.070 8), 相对分子量 166, 分子式 C₉H₁₀O₃; ^1H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 7.52 ~ 7.49 (2H, m, H-6, 2), 6.92 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5), 3.92 (3H, s, 3-OCH₃), 2.53 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 197.0 (C-7), 150.6 (C-4), 146.8 (C-3), 130.3 (C-1), 124.2 (C-6), 113.9 (C-2), 109.9 (C-5), 56.2 (3-OCH₃), 26.3 (C-8)。以上数据与文献^[14]报道一致,故鉴定化合物 **10** 为香草乙酮。

化合物 11 黄色油状物 (甲醇); ESI-MS: m/z 525.402 8 [M + Na]⁺ (计算值为 525.404 4), 相对分子量 502, 分子式 C₂₉H₄₂O₇; ^1H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 5.98 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 4.20 (1H, dd, $J = 12.6$, 4.1 Hz, H-22), 3.98 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H-3), 3.85 ~ 3.78 (1H, m, H-2), 3.55 (1H, t, $J = 10.6$ Hz, H-9), 2.93 (1H, t, $J = 9.1$ Hz, H-17), 2.77 (1H,

q, H-11), 2.53 ~ 2.43 (4H, m, H-23, 28), 2.40 ~ 2.32 (1H, m, H-16), 2.26 ~ 2.19 (1H, m, H-15), 1.87 (3H, s, H-27), 1.82 ~ 1.72 (2H, m, H-16, 15), 1.71 ~ 1.65 (2H, m, H-1), 1.29 (3H, s, H-21), 1.28 (3H, s, H-18), 1.24 (3H, t, H-29), 1.10 (3H, s, H-19); ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 212.5 (C-12), 205.4 (C-6), 169.3 (C-26), 163.2 (C-8), 157.5 (C-24), 124.0 (C-7), 121.8 (C-25), 90.1 (C-14), 84.1 (C-22), 76.1 (C-20), 68.6 (C-2), 68.4 (C-3), 62.2 (C-13), 51.5 (C-5), 44.4 (C-17), 40.5 (C-10), 37.7 (C-1), 37.4 (C-9), 37.2 (C-11), 32.5 (C-4), 32.1 (C-15), 30.9 (C-23), 28.2 (C-28), 23.9 (C-19), 22.0 (C-21), 21.3 (C-16), 17.7 (C-18), 12.2 (C-27), 11.9 (C-29)。以上数据与文献^[15,16]报道一致,故鉴定化合物 **11** 为筋骨草内酯。

化合物 12 黄色油状物 (甲醇); ESI-MS: m/z 352.071 3 [M + Na]⁺ (计算值为 352.072 8), 相对分子量 352, 分子式 C₂₁H₃₆O₄; ^1H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 5.38 ~ 5.31 (6H, m, H-9', 10', 12', 13', 15', 16'), 4.15 (1H, dd, $J = 11.4$, 4.4 Hz, H-1), 4.06 (1H, dd, $J = 11.4$, 6.3 Hz, H-1), 3.82 (1H, q, $J = 5.5$ Hz, H-2), 3.55 (2H, dd, $J = 5.6$, 1.8 Hz, H-3), 2.81 (4H, t, $J = 5.9$ Hz, H-11', 14'), 2.35 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2'), 2.09 (4H, q, $J = 7.4$, 6.9 Hz, H-3', 8'), 1.41 ~ 1.27 (10H, m, H-4', 5', 6', 7', 17'), 0.97 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18'); ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 175.7 (C-1'), 132.9 (C-16'), 131.2 (C-9'), 129.4 (C-12'), 129.4 (C-13'), 129.0 (C-15'), 128.4 (C-10'), 71.3 (C-2), 66.7 (C-1), 64.3 (C-3), 35.1 (C-2'), 30.8 (C-5'), 30.4 (C-7'), 30.3 (C-4', 6'), 28.30 (C-8'), 26.7 (C-11'), 26.6 (C-14'), 26.1 (C-3'), 21.6 (C-17'), 14.8 (C-18')。以上数据与文献^[17]报道一致,故鉴定化合物 **12** 为 α -(9'Z,12'Z,15'Z)-octadecatrienoic acid monoglyceride。

5 生物活性测定结果

本实验运用脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 生成的 NO 细胞模型对化合物 **3**、**4**、**7**、**9**、**11** 进行了抗炎活性测定,以 Bay 11-7085 为阳性对照,测试浓度为 50 μM ,通过测定化合物对 NO 的抑制作用评价其抗炎活性。3-磷酸甘油酸脱氢酶 (PHGDH) 是丝氨酸合成途径的关键酶,与多种肿瘤的发生发展密切相关。抑制 PHGDH 活性可以表现出一定的抗肿瘤作用。本实验对上述化合物进行了 PHGDH 抑制活性测定,以 CBR5884 为阳性对照,测

试浓度为 25 μM 。结果显示化合物 **3**、**4**、**7**、**9**、**11** 对 NO 抑制率不显著,没有明显的抗炎活性;化合物 **7** 对 PHGDH 具有一定的抑制作用,其抑制率为 23.3%。

6 讨论

唇形科筋骨草属植物在全世界范围内有超过 300 多种,其药用历史悠久,广泛应用于治疗发热,风湿,痛风,哮喘,糖尿病等症。目前,对于筋骨草属植物的研究主要集中于金疮小草,紫背金盘,苞叶筋骨草等品种,关于美花圆叶筋骨草的化学成分研究报道很少。本课题组前期从美花圆叶筋骨草中主要获得脂溶性成分,如二萜、甾体、黄酮、香豆素等成分,但其极性成分如糖苷类则报道较少。因此本研究通过优化提取分离流程,重点对其极性成分进行研究,从乙酸乙酯部位中共分离鉴定了 12 个化合物,化合物 **1**~**3**、**5**~**7** 为糖苷类,化合物 **4**、**9**、**11** 为甾体类,化合物 **8** 为环烯醚萜类,化合物 **10** 为酚类,化合物 **12** 为长链脂肪醇类,其中化合物 **1**~**6**、**8**、**12** 为首次从该属植物中分离得到,化合物 **1**~**9**、**11**~**12** 为首次从该种植物中分离得到,进一步丰富了本种药用植物的化学成分。化合物 **3**、**4**、**7**、**9**、**11** 的抗炎与 PHGDH 抑制活性研究表明,所筛化合物 **3**、**4**、**7**、**9**、**11** 均无抗炎活性,化合物 **7** 对 PHGDH 具有抑制作用,其抗肿瘤作用有待进一步研究。

本论文在前期研究基础上,进一步丰富了美花圆叶筋骨草的化学成分类型,为该种藏药资源的综合开发和利用奠定了基础;针对其抗炎活性和 PHGDH 抑制活性进行了初步筛选,尽管活性结果不尽如人意,但是对于此类分子生物活性的后期研究具有一定的参考价值和指导意义。结合美花圆叶筋骨草的民间应用经验和临床疗效,其抗炎活性值得挖掘研究,然而关于其抗炎的药效物质基础尚不明确,本研究结果提示其甾体类成分、糖苷类成分非其抗炎的有效成分,其它成分如二萜等将是我们后期的研究重点。

参考文献

- 1 Chinese Flora Editorial Board of the Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1979.
- 2 Zhou RH, Duan JA. Phytochemical taxonomy (植物化学分类学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2005.
- 3 Yang YC. Tibetan medicine (藏药志) [M]. Xining: Qinghai

- People's Publishing House, 1991.
- 4 Chen Y, Yang F, Ao H, et al. Study on chemical constituents of *Ajuga ovalifolia* var. *calantha* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 3475-3479.
- 5 Shimoda K, Kondo Y, Nishida T, et al. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana* [J]. Phytochem (Amsterdam), 2006, 67: 2256-2261.
- 6 Ling SK, Takashi TA, Kouno I. New cyanogenic and alkyl glycoside constituents from *Phyllagathis rotundifolia* [J]. J Nat Prod, 2002, 65: 131.
- 7 Kim HJ, Woo ER, Shin CG, et al. HIV-1 integrase inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum* [J]. Arch Pharm Res, 2001, 24: 286-291.
- 8 Cheng WX, Chen HY, Zhang YP, et al. Chemical constituents of *Vitex quinata* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2007, 19: 244-246.
- 9 Fan W, Tezuka Y, Komatsu K, et al. Prolylendopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sacra* S. H. Fu [J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22: 157.
- 10 Kiem PV, Minh CV, Nhiem NX, et al. Inhibitory effect on TNF- α -induced IL-8 secretion in HT-29 cell line by glyceroglycolipids from the leaves of *Ficus microcarpa* [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35: 2135-2142.
- 11 Teborg D, Junior P. Martynoside and the novel dimeric open-chain monoterpene glucoside digipen-stroside from *Penstemon digitalis* [J]. Planta Med, 1989, 55: 474-476.
- 12 Takeda Y, Tsuchida S, Fujita T. Four new iridoid glucoside p-coumaroyl esters from *Ajuga decumbens* [J]. Phytochemistry, 1987, 26: 2303-2306.
- 13 Deng YR, He L, Li WQ, et al. Studies on chemical constituents in herb of *Lamium maculatum* var. *kansuense* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 8: 730-732.
- 14 Huang WB, Du JL, Du CY, et al. Concurrent synthesis of acetovanillone and isoacetovanillone [J]. Chin J Synthetic Chem (合成化学), 2013, 21: 472-475.
- 15 Sadati N, JenettSiems K, Siems K, et al. Major constituents and cytotoxic effects of *Ajuga chamaecistus* ssp. *tomentella* [J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2012, 67: 275-281.
- 16 Calcagno MP, Camps F, Coll J, et al. A New family of phytoecdysteroids isolated from aerial part of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* [J]. Tetrahedron, 1995, 51: 12119-12126.
- 17 Ogihara T, Amano N, Mitsui Y, et al. Determination of the absolute configuration of a monoglyceride antibolting compound and isolation of related compounds from radish leaves (*Raphanus sativus*) [J]. J Nat Prod, 2017, 80: 872.