

黔产徐长卿根茎化学成分及抗烟草花叶病毒活性

唐攀¹, 陈洁¹, 晏英^{1,2}, 胡嘉琪², 徐冉^{1,2}, 张吉泉^{1,2}, 汤磊^{1,2*}¹贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; ²贵州医科大学 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵阳 550004

摘要:通过应用多种色谱方法从徐长卿根茎的乙醇提取物中分离得到 13 个单体化合物, 运用现代波谱技术鉴定了结构, 分别为 glaucogenin A (**1**)、glaucogenin A 3-*O*- β -*D*-cymaropyranoside (**2**)、*N*-(*N*-benzoyl-*S*-phenylalaninyl)-*S*-phenylalaninol acetate (**3**)、*N*-(*N*-benzoyl-*S*-phenylalaninyl)-*S*-phenylalaninol benzoate (**4**)、androst-4,6-dien-3,17-dione (**5**)、20-hydroxy-4,6-diene-gestrol-3-one (**6**)、5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone (**7**)、5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone (**8**)、5-(hydroxymethyl)-1-isopentyl-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde (**9**)、mono-terpenes (**10**)、4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (**11**)、pavonisol (**12**)、4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (**13**)。其中化合物 **2**~**5** 和 **7**~**10** 系首次从该植物中分离得到。离体叶圆片法和钝化活性测试表明, 化合物 **1**~**4** 和 **9** 均有抗 TMV 活性, 保护活性测试表明, 化合物 **4** 具有抗 TMV 活性, 且首次发现化合物 **3**, **4**, **9** 具有抗 TMV 活性。

关键词:徐长卿, 化学成分, 分离纯化, 抗 TMV 活性

中图分类号: R284.1; R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)6-0989-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.6.011

Chemical constituents and anti-TMV activity of the roots and stems of *Cynanchum paniculatum* in Guizhou Province

TANG Pan¹, CHEN Jie¹, YAN Ying^{1,2}, HU Jia-qi², XU Ran^{1,2}, ZHANG Ji-quan^{1,2}, TANG Lei^{1,2*}¹College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;²Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Abstract: Thirteen compounds were obtained from the ethanol extract of the roots and stems of *Cynanchum paniculatum* by applying various chromatographic techniques. Their structures were elucidated and identified as glaucogenin A (**1**), glaucogenin A 3-*O*- β -*D*-cymaropyranoside (**2**), *N*-(*N*-benzoyl-*S*-phenylalaninyl)-*S*-phenylalaninol acetate (**3**), *N*-(*N*-benzoyl-*S*-phenylalaninyl)-*S*-phenylalaninol benzoate (**4**), androst-4,6-dien-3,17-dione (**5**), 20-hydroxy-4,6-diene-gestrol-3-one (**6**), 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone (**7**), 5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone (**8**), 5-(hydroxymethyl)-1-isopentyl-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde (**9**), mono-terpenes (**10**), 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (**11**), pavonisol (**12**), 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (**13**), respectively, based on the spectral data. Among them, compounds **2**-**5** and **7**-**10** were obtained from the fruits of *C. paniculatum* for the first time. The results showed that compounds **1**-**4** and **9** have anti-TMV activity, through *in vitro* disc method and inactivation effect tested. The protection effect test showed that compound **4** has anti-TMV activity. It was found that compound **3**, **4** and **9** have anti-TMV activity for the first time.

Key words: *Cynanchum paniculatum*; chemical constituents; separation and purification; anti-TMV activity

徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitagawa 为萝藦科鹅绒藤属多年生草本植物, 其干燥根和根茎入药, 味辛、性温, 归肝、肾经, 具有祛风化湿、止痛止痒的功能, 用于治疗风湿痹痛、胃痛胀满、牙痛、

腰痛、跌打伤痛、风疹、湿疹等症^[1]。全世界约有萝藦科植物 180 属, 2 200 种, 分布于世界热带、亚热带和少数温带地区。我国约有 44 属, 245 种, 33 变种, 分布于西南及东南部以及少数西北与东北各省区。其主要成分丹皮酚具有抗炎镇痛、抗病毒、抗菌、抗蛇毒、免疫调节、抗肿瘤、保护心血管等作用^[2]。临床应用广泛, 已开发的徐长卿注射液用于镇痛、消炎及类风湿性关节炎^[3], 复方徐长卿洗剂联合西药用

收稿日期: 2019-12-30 接受日期: 2020-05-15

基金项目: 国家自然科学基金(31760089); 贵州省自然科学基金(黔科合基础[2017]1141); 贵阳市科技局计划(筑科合同[2017]30-28)

* 通信作者 Tel: 86-851-88416078; E-mail: tlei1974@163.com

于各型湿疹的临床治疗^[4],复方徐长卿合剂作鼻腔冲洗,治疗常年性变态性鼻炎^[5]。研究发现,从徐长卿中分离得到的一系列 *seco*-pregnane 类 C_{21} 甾体化合物具有很强的抗烟草花叶病毒(TMV)活性,该类化合物能高选择性地抑制 TMV 亚基因组 RNA 的表达,而对病毒基因组 RNA 没有影响,同时,化合物还能明显抑制 TMV 的长距离移动^[6],说明该类 C_{21} 甾体化合物对 TMV 新颖的作用机制为抗病毒制剂研究带来新的机遇。为了继续寻找具有抗 TMV 活性的化学成分,我们对黔产徐长卿根茎的化学成分进行了研究,并对化合物进行了抗 TMV 活性测试。

1 仪器与材料

旋转蒸发器(东京理化, N-1300D-WD), Bruker AV-600 MHz 核磁共振仪(德国布鲁克公司);四甲基硅烷(TMS)为内标;Bruker HTC / Esquire 质谱仪(德国布鲁克公司);高效液相色谱仪为 Agilent 1200 型(美国安捷伦科技司);色谱柱 Waters sunfire C_{18} (10×150 mm, 4.6×250 mm)(沃特世公司);BP211D 电子天平(Sartorius 公司);高速冷冻离心机(2K15 型,德国 Sigma 公司),酶标仪(美国 BIOTEK 公司),Sephadex LH-20(三菱公司); C_{18} 反相硅胶(日本 YMC 公司);正相硅胶和薄层色谱板(青岛海洋化工厂);核磁用氘代试剂(美国 CIL 氘代试剂);液相用水(娃哈哈纯净水 20181109);色谱级甲醇、乙腈(科密欧试剂公司);化学实验用溶剂为工业重蒸溶剂,显色剂为 8% 的硫酸乙醇溶液。

供试毒源:TMV(U1)普通株系,购于中国科学院武汉病毒研究所。保存于 -20 °C,临用时取出用 0.01 M PB 稀释至 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。供试寄主:心叶烟(*Nicotiana glutinosa*),为 TMV 枯斑寄主,普通烟 K326(*Nicotiana tabacum* K326),温室中繁育,种子均购于中国农业科学院烟草研究所。

样品采自贵州省黔东南州,经过贵阳中医学院孙庆文老师鉴定为徐长卿 *Cynanchum paniculatum*,凭证标本(XCQ201809)保存于贵州医科大学药理学实验室。

2 实验方法

2.1 化合物提取与分离

干燥徐长卿根茎 50 kg,用 90% 的乙醇回流提取 3 次,提取温度为每次时间为 3 h,浓缩回收酒精得粗提物约 10 kg,加水混溶成浑浊液体,分别用石油醚、乙酸乙酯等体积萃取 3 次,回收乙酸乙酯得浸膏 2.130 kg。乙酸乙酯部分经过硅胶柱层析,用石

油醚/丙酮(30:1→0:1)快速梯度洗脱得到 Fr1 ~ Fr6 共 6 个部分,其中 Fr2(56g)以石油醚/丙酮(10:1~5:1)梯度洗脱,分成 3 个亚部分 Fr2-1 ~ Fr2-3,Fr2-1 反复经过通过凝胶柱层析(甲醇)得化合物 **11**(51.7 mg),Fr2-2 经过凝胶柱层析(甲醇)后再通过硅胶柱层析以石油醚/丙酮(7:1)洗脱得到化合物 **12**(29.6 mg)和 **13**(19.5 mg);Fr3(130 g)再次以二氯甲烷/甲醇(30:1~5:1)梯度洗脱,分成 4 个亚部分,分别为 Fr3-1 ~ Fr3-4。其中 Fr3-2 经过反相柱层析洗脱(甲醇:水 = 75:25)得化合物 **1**(15mg),再经过硅胶柱层析(石油醚/丙酮 = 5:1)及高效液相色谱 HPLC 分离(流动相为甲醇:水 = 80:20,流速为 $3 \text{ mL}/\text{min}$)得化合物 **3**(12.2 mg)和 **4**(9.8 mg);Fr3-3 通过凝胶柱层析(氯仿:甲醇 = 1:1)得化合物 **2**(23.1 mg),Fr3-4 经过反相柱层析洗脱(甲醇:水 = 65:35),再经过高效液相色谱 HPLC 制备分离(流动相为甲醇:水 = 80%:20%,流速为 $3 \text{ mL}/\text{min}$)得化合物 **7**(15.3 mg)和 **8**(7.2 mg);Fr3-1 通过凝胶柱层析(纯甲醇)再经过硅胶柱层析(石油醚/丙酮 = 8:1)得化合物 **9**(10.5 mg);Fr4(310 g)经过二氯甲烷/甲醇(30:1→5:1)梯度洗脱,再用反相硅胶柱层析(甲醇:水 = 60:40)洗脱分成 Fr4-1 ~ Fr4-6 部分,Fr4-6 再通过凝胶柱层析(纯甲醇)及高效液相色谱(流动相为甲醇:水 = 75:25,流速为 $3 \text{ mL}/\text{min}$)制备分离纯化,得到化合物 **5**(11.9 mg);Fr4-5 再经过高效液相色谱(流动相为甲醇:水 = 75:25,流速为 $3 \text{ mL}/\text{min}$)制备分离纯化得到化合物 **6**(6.8 mg)和 **10**(16.7 mg)。

2.2 化合物活性筛选

2.2.1 化合物对 TMV 的钝化作用实验

挑选健康长势一致的 5~6 叶期的心叶烟,暗室放置一夜。将供试化合物与 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TMV 1:1 (V:V)混合至所需浓度,混匀放置 0.5 h。每棵烟挑选大小相似的 4~6 片叶子,每片叶子的一半摩擦接种化合物与 TMV 的混合溶液 $100 \mu\text{L}$ 作为处理;另一半摩擦接种 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMV $100 \mu\text{L}$ 作为阳性对照;摩擦接种相应浓度 DMSO 溶液的叶片作为空白。2 h 后用无菌水将叶表面的金刚砂洗净。放入无虫温室中,3~4 天后按公式计算 TMV 抑制率 = $[1 - (\text{处理的平均枯斑数}/\text{阳性对照的平均枯斑数})] \times 100\%$ ^[7],每个化合物重复三次。

2.2.2 化合物对烟草的保护作用实验

挑选健康长势一致的 5~6 叶期的心叶烟,暗室

放置一夜。每棵烟挑选大小相似的4~6片叶子,供试化合物用无菌水稀释为所需浓度,每片叶子的一半均匀施药100 μL 作为处理,24 h后每片叶子摩擦接种50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TMV 200 μL ,未施药的一半作为阳性对照,未施药且摩擦接种相应浓度DMSO溶液的叶片作为空白。2 h后用无菌水将叶表面的金刚砂洗净。放入无虫温室中,3~4天后按公式计算TMV抑制率 = $[1 - (\text{处理的平均枯斑数}/\text{阳性对照的平均枯斑数})] \times 100\%$,每个化合物重复三次。

2.2.3 化合物对烟草的治疗作用实验

挑选健康长势一致的5~6叶期的心叶烟,暗室放置一夜。每棵烟挑选大小相似的4~6片叶子摩擦接种50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TMV 200 μL ,2h后每片叶子的一半均匀施药100 μL 作为处理;另一半作为阳性对照;未施药且摩擦接种相应浓度DMSO溶液的叶片作为空白。2 h后用无菌水将叶表面的金刚砂洗净。放入无虫温室中,3~4天后按公式计算TMV抑制率 = $[1 - (\text{处理的平均枯斑数}/\text{阳性对照的平均枯斑数})] \times 100\%$,每个化合物重复三次。

2.2.4 离体叶圆片法

挑选健康合适的普通烟,暗室放置一夜。每棵烟挑选大小相似的3片叶子,每片叶子摩擦接种0.032 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ TMV 200 μL ,10 min后用无菌水冲洗干净。6 h后将叶片切成直径1 cm的圆片,取20片浸入供试化合物溶液中作为处理;另20片浸入25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ DMSO溶液中作为阳性对照;只摩擦未接种的20片浸入25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ DMSO溶液中作为空白。放入28 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中培养,48 h后进行TAS-ELISA,测定OD₄₀₅值,根据TMV病毒标准曲线计算TMV浓度,按公式计算TMV抑制率 = $[1 - (\text{处理的TMV浓度}/\text{阳性对照的TMV浓度})] \times 100\%$ ^[8],每个化合物重复三次。

3 实验结果

3.1 结构鉴定

化合物1 白色粉末;ESI-MS: m/z 399 $[\text{M} + \text{Na}]^+$,确定分子质量376;分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_6$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.28 (1H, s, H-18), 5.46 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 5.33 (1H, m, H-16), 4.17 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-15 β), 3.86 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-15 α), 3.71 (1H, m, H-2), 3.45 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-17), 3.34 (1H, m, H-3), 2.62 (1H, m, H-11 α), 2.59 (2H, m, H-7), 2.44 (1H, m, H-8), 2.28 (1H, t, $J = 11.2$ Hz, H-1 α), 2.12 (2H, m, H-4), 2.06 (1H,

m, H-12 α), 1.55 (1H, s, H-21), 1.36 (1H, m, H-11 β), 1.27 (1H, m, H-9), 1.25 (1H, m, H-12 β), 1.08 (1H, t, $J = 11.2$ Hz, H-1 β), 0.97 (1H, m, H-19); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 175.4 (C-14), 143.4 (C-18), 138.8 (C-5), 121.0 (C-6), 118.2 (C-20), 113.8 (C-13), 76.1 (C-16), 75.1 (C-2), 72.2 (C-3), 67.3 (C-15), 55.7 (C-17), 52.5 (C-9), 44.1 (C-1), 39.9 (C-8), 39.9 (C-10), 38.8 (C-4), 29.7 (C-12), 27.9 (C-7), 24.6 (C-21), 23.6 (C-11), 19.1 (C-19)。以上数据与文献^[9]报道基本一致,故鉴定化合物1为glaucogenin A。

化合物2 白色粉末;ESI-MS: m/z 543 $[\text{M} + \text{Na}]^+$,确定分子质量520;分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_9$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.29 (1H, s, H-18), 5.44 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 5.34 (1H, m, H-16), 4.57 (1H, dd, $J = 1.8, 12.0$ Hz, H-1'), 4.17 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-15 β), 3.86 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-15 α), 3.73 (1H, m, H-2), 3.45 (1H, m, H-4'), 3.42 (1H, s, H-6'-OCH₃), 3.40 (1H, m, H-17), 3.30 (1H, m, H-3), 3.23 (1H, m, H-5'), 3.20 (1H, m, H-3'), 2.53 (1H, m, H-11 α), 2.48 (1H, m, H-8), 2.40 (1H, m, H-7 α), 2.34 (1H, m, H-4 β), 2.34 (1H, m, H-2' α), 2.29 (1H, m, H-4 α), 2.27 (1H, m, H-12 α), 2.06 (1H, m, H-7 β), 2.04 (1H, m, H-1 α), 1.55 (1H, s, H-21), 1.53 (1H, m, H-2' β), 1.38 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6'), 1.28 (1H, m, H-11 β), 1.26 (1H, m, H-12 β), 1.24 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-9), 1.03 (1H, m, H-1 β), 0.97 (1H, m, H-19); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 175.4 (C-14), 143.5 (C-18), 139.0 (C-5), 120.8 (C-6), 118.1 (C-20), 113.7 (C-13), 99.9 (C-1'), 86.8 (C-3), 80.5 (C-4'), 75.2 (C-16), 75.2 (C-3'), 71.9 (C-2), 69.7 (C-5'), 67.5 (C-15), 56.4 (C-17), 55.7 (C-7'), 52.6 (C-9), 43.8 (C-1), 39.9 (C-8), 39.2 (C-10), 37.4 (C-4), 35.5 (C-2'), 29.7 (C-12), 28.0 (C-7), 24.6 (C-21), 23.6 (C-11), 18.9 (C-6'), 17.7 (C-19)。以上数据与文献^[10]报道基本一致,故鉴定化合物2为glaucogenin A 3-O- β -D-cymaropyranoside。

化合物3 白色粉末;ESI-MS: m/z 467 $[\text{M} + \text{Na}]^+$,确定分子质量444;分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.74 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2', H-6'), 7.56 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4'), 7.47 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-3', H-5'), 7.32~7.08 (10H, m), 6.84 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.12 (1H, d, J

= 9.6 Hz, H-5), 4.81 (1H, m, H-7), 4.37 (1H, m, H-4), 3.96 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-3 β), 3.84 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-3 α), 3.23 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-10 β), 3.08 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-10 α), 2.75 (2H, m, H-11), 2.05 (3H, s, 1-H-OCH₃); ¹³C NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 170.8 (C-2), 170.3 (C-6), 167.1 (C-9), 136.7 (C-1''), 136.7 (C-1'''), 133.7 (C-1'), 131.9 (C-4'), 129.3 (C-3''), 129.3 (C-5''), 129.3 (C-3'), 129.3 (C-5'), 129.1 (C-3'''), 129.1 (C-5'''), 128.8 (C-2''), 128.8 (C-6''), 128.7 (C-2'), 128.7 (C-6'), 128.6 (C-2'''), 128.6 (C-6'''), 127.1 (C-4''), 126.8 (C-4'''), 64.6 (C-3), 55.0 (C-7), 49.4 (C-4), 38.5 (C-10), 37.4 (C-10), 20.8 (C-1)。以上数据与文献^[11]报道基本一致,故鉴定化合物 **3** 为 *N*-(*N*-benzoyl-*S*-phenylalaninyl)-*S*-phenylalaninol acetate。

化合物 4 白色粉末;ESI-MS: m/z 529 [M + Na]⁺, 确定分子质量 506;分子式 C₃₂H₃₀N₂O₄; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.73 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2'), 7.73 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'), 7.69 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2'''), 7.69 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'''), 7.54 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-4'''), 7.46 ~ 7.23 (15H, m), 6.69 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 6.56 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7), 4.96 (1H, q, $J = 7.2$ Hz, H-6), 4.64 (1H, m, H-3), 4.08 (1H, dd, $J = 1.8, 9.6$ Hz, H-2), 3.34 (1H, dd, $J = 9.0, 14.4$ Hz, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 171.9 (C-5), 167.4 (C-8), 167.2 (C-1), 137.2 (C-1''), 135.8 (C-1'), 134.2 (C-1'), 133.3 (C-1'''), 132.0 (C-4'''), 131.4 (C-4'), 129.3 (C-3''), 129.3 (C-5''), 129.2 (C-3'''), 129.2 (C-5'''), 128.9 (C-2''), 128.9 (C-6''), 128.7 (C-2'''), 128.7 (C-6'''), 128.7 (C-2'''), 128.7 (C-6'''), 128.4 (C-2'), 128.4 (C-6'), 127.4 (C-4''), 127.1 (C-3'), 127.1 (C-5'), 127.1 (C-3'''), 127.1 (C-5'''), 126.8 (C-4'''), 65.4 (C-2), 54.5 (C-6), 50.3 (C-3), 37.5 (C-9), 37.3 (C-10)。以上数据与文献^[12]报道基本一致,故鉴定化合物 **4** 为 *N*-(*N*-benzoyl-*S*-phenylalaninyl)-*S*-phenylalaninol benzoate。

化合物 5 白色粉末;ESI-MS: m/z 307 [M + Na]⁺, 确定分子质量 284;分子式 C₁₉H₂₄O₂; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.20 (1H, s, H-6), 6.20 (1H, s, H-7), 5.71 (1H, s, H-4), 2.48 (1H, m, H-2 β), 2.46

(1H, m, H-16 β), 2.38 (1H, m, H-2 α), 2.15 (1H, m, H-12 β), 2.12 (1H, m, H-16 α), 2.03 (1H, m, H-1 β), 2.02 (1H, m, H-15 α), 1.89 (1H, m, H-8), 1.74 (1H, m, H-12 α), 1.72 (1H, m, H-1 α), 1.71 (1H, m, H-15 β), 1.70 (1H, m, H-11 α), 1.53 (1H, m, H-14), 1.47 (1H, m, H-11 β), 1.33 (1H, m, H-9), 1.16 (1H, s, H-19), 0.98 (1H, s, H-18); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 219.5 (C-17), 199.4 (C-3), 162.9 (C-5), 138.4 (C-7), 128.8 (C-6), 124.2 (C-4), 50.8 (C-14), 48.7 (C-9), 48.3 (C-13), 37.0 (C-10), 36.1 (C-8), 35.6 (C-16), 33.9 (C-1), 33.9 (C-1), 31.3 (C-12), 21.4 (C-15), 20.0 (C-11), 16.3 (C-19), 13.7 (C-18)。以上数据与文献^[13]报道基本一致,故鉴定化合物 **5** 为 androst-4,6-dien-3,17-dione。

化合物 6 白色粉末;ESI-MS: m/z 337 [M + Na]⁺, 确定分子质量 314;分子式 C₂₁H₃₀O₂; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.14 (1H, dd, $J = 9.8, 2.6$ Hz, H-6), 6.12 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-7), 5.69 (1H, s, H-4), 3.77 (1H, m, H-20), 2.45 (1H, m, H-2 β), 2.36 (1H, m, H-2 α), 2.25 (1H, m, H-12 β), 2.05 (1H, m, H-1 β), 2.03 (1H, m, H-15 α), 2.02 (1H, m, H-16 α), 1.76 (1H, m, H-8), 1.74 (1H, m, H-12 α), 1.72 (1H, m, H-11 α), 1.70 (1H, m, H-1 α), 1.68 (1H, m, H-15 β), 1.67 (1H, m, H-16 β), 1.53 (1H, m, H-14), 1.47 (1H, m, H-11 β), 1.32 (1H, m, H-9), 1.27 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-20), 1.16 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 199.6 (C-3), 163.8 (C-5), 141.2 (C-7), 128.0 (C-6), 123.6 (C-4), 70.0 (C-20), 58.1 (C-14), 53.9 (C-17), 50.7 (C-9), 42.7 (C-13), 38.6 (C-12), 37.3 (C-8), 36.1 (C-10), 34.0 (C-1), 33.9 (C-2), 25.5 (C-16), 23.6 (C-15), 23.6 (C-21), 20.4 (C-11), 16.3 (C-19), 12.5 (C-18)。以上数据与文献^[14]报道基本一致,故鉴定化合物 **6** 为 20-hydroxy-4,6-diene-gestrol-3-one。

化合物 7 黄色粉末;ESI-MS: m/z 307 [M + Na]⁺, 确定分子质量 284;分子式 C₁₆H₁₂O₅; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 13.03 (1H, s, 5-OH), 7.92 (2H, m, H-2', 6'), 7.58 (3H, m, H-3', 4', 5'), 6.68 (1H, s, H-8), 6.63 (1H, s, H-3), 4.09 (3H, s, OCH₃-6); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 183.0 (C-4), 164.1 (C-2), 155.2 (C-7), 153.3 (C-5), 152.1 (C-9), 131.9 (C-4'), 130.4 (C-1'), 130.4 (C-6), 129.1

(C-3'), 129.1 (C-5'), 126.3 (C-2'), 126.3 (C-6'), 105.9 (C-3), 105.3 (C-10), 93.4 (C-8), 60.9 (OCH₃-6)。以上数据与文献^[15]报道基本一致,故鉴定化合物 **7** 为 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone。

化合物 8 黄色粉末;ESI-MS: m/z 307 [M + Na]⁺, 确定分子质量 284;分子式 C₁₆H₁₂O₅; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 12.52 (1H, s, OH-5), 7.92 (1H, m, H-2', 6'), 7.59 (1H, m, H-3', 4', 5'), 6.72 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, s, H-6), 4.07 (1H, s, OCH₃-6); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 182.5 (C-4), 163.5 (C-2), 157.8 (C-7), 155.3 (C-5), 148.9 (C-9), 132.0 (C-4'), 131.3 (C-1'), 129.3 (C-3'), 129.3 (C-5'), 126.9 (C-8), 126.2 (C-2'), 126.2 (C-6'), 105.3 (C-3), 105.3 (C-10), 98.9 (C-6), 62.1 (OCH₃-8)。以上数据与文献^[16]报道基本一致,故鉴定化合物 **8** 为 5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone。

化合物 9 无色粉末;ESI-MS: m/z 218 [M + Na]⁺, 确定分子质量 195;分子式 C₁₁H₁₇NO₂; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 9.66 (1H, s, H-2-CHO), 6.96 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-3), 6.26 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-4), 4.40 (2H, m, H-1'), 3.67 (3H, s, H-6), 1.61 (2H, m, H-2'), 1.60 (2H, m, H-3'), 1.36 (3H, s, H-4'), 1.31 (3H, s, H-5'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 179.3 (C-1), 135.2 (C-2), 131.5 (C-5), 125.0 (C-3), 109.7 (C-4), 51.7 (C-6), 48.0 (C-1'), 34.9 (C-2'), 30.2 (C-4'), 26.4 (C-3'), 23.4 (C-5')。以上数据与文献^[17]报道基本一致,故鉴定化合物 **31** 为 5-(hydroxymethyl)-1-isopentyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde。

化合物 10 白色粉末;ESI-MS: m/z 207 [M + Na]⁺, 确定分子质量 184;分子式 C₁₀H₁₆O₃; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.91 (1H, t, J = 6.0 Hz, H-3), 5.91 (1H, q, J = 6.0 Hz), 5.27 (1H, d, J = 18.0 Hz, H-8 α), 5.12 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-8 β), 2.26 (2H, m, H-4), 1.83 (3H, s, H-9), 1.67 (2H, m, H-5), 1.33 (3H, s, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 173.1 (C-1), 144.7 (C-7), 144.3 (C-8), 127.2 (C-2), 112.4 (C-3), 73.2 (C-6), 40.4 (C-5), 27.9 (C-10), 23.7 (C-4), 12.0 (C-9)。以上数据与文献^[18]报道基本一致,故鉴定化合物 **10** 为 monoterpenes。

化合物 11 白色粉末;ESI-MS: m/z 247 [M + Na]⁺, 确定分子质量 224;分子式 C₁₁H₁₂O₅; ¹H NMR

(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.12 (1H, s, H-3'-COOH), 8.86 (1H, s, 3-OH), 7.51 (1H, d, J = 18.0 Hz, H-1'), 6.99 (2H, s, H-1), 6.99 (2H, s, H-5), 6.43 (1H, d, J = 18.0 Hz, H-2'), 3.82 (3H, s, H-2-OCH₃), 3.82 (3H, s, H-4-OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 168.0 (C-3'), 148.0 (C-2), 148.0 (C-4), 144.8 (C-1'), 138.0 (C-3), 124.6 (C-6), 116.1 (C-2'), 106.1 (C-1), 106.1 (C-5), 56.1 (OCH₃-2), 56.1 (OCH₃-4)。以上数据与文献^[19]报道基本一致,故鉴定化合物 **11** 为 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid。

化合物 12 白色粉末;ESI-MS: m/z 265 [M + Na]⁺, 确定分子质量 242;分子式 C₁₂H₁₈O₅; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.51 (2H, s, H-2, 6), 3.91 (6H, s, H-3, 5-OCH₃), 3.80 (1H, m, H-8), 3.75 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-7), 3.24 (3H, s, 7-H-OCH₃), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, H-9); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 147.1 (C-3, 5), 134.6 (C-4), 129.5 (C-1), 104.3 (C-2), 104.3 (C-6), 89.3 (C-7), 71.5 (C-8), 56.6 (OCH₃-7), 56.3 (OCH₃-3), 56.3 (OCH₃-5), 18.1 (C-9)。以上波谱数据与文献^[20]报道基本一致,故可鉴定化合物 **12** 为 pavonisol。

化合物 13 白色粉末;ESI-MS: m/z 221 [M + Na]⁺, 确定分子质量 198;分子式 C₉H₁₀O₅; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.40 (2H, s, H-2, 6), 3.97 (6H, s, H-3, 5-OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.6 (C = O), 146.7 (C-3), 146.7 (C-5), 140.0 (C-1), 120.0 (C-4), 107.4 (C-2), 107.4 (C-6), 56.5 (OCH₃-3), 56.5 (OCH₃-5)。以上数据与文献^[21]报道基本一致,故鉴定化合物 **13** 为 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-benzoic acid。

3.2 抗烟草花叶病毒活性结果

采用 2.2 的三种半叶枯斑法和离体叶圆片法对分离得到的化合物 **1** ~ **10** 进行抗 TMV 活性测试,以宁南霉素作为阳性对照药物。测试结果见表 1。从活性结果来看,化合物 **1** ~ **4** 和 **9** 均有钝化的抗 TMV 活性,但是化合物 **1** ~ **3** 均不具有保护活性,说明化合物 **1** ~ **3** 的抗 TMV 活性不是由植物系统获得抗性产生。化合物 **4** 具有保护活性,说明其抗 TMV 活性除了作用于 TMV 病毒外,还由植物系统获得抗性产生。以上化合物活性均与离体叶圆片法活性相同,并首次发现化合物 **3**, **4**, **9** 具有抗 TMV 活性。

表 1 化合物 1~10 的抗 TMV 活性结果

Table 1 Antiviral Activities of compounds 1-10 against tobacco mosaic virus

化合物 Compound	抑制率 Inhibition rate(%)			
	离体叶圆片法 ^a In vitro leaf disc method	钝化效果 ^b Inactivation effect	保护效果 ^c Protection effect	治疗效果 ^d Curative effect
1	90.05 ± 1.87	85.23 ± 2.82	39.83 ± 3.07	43.25 ± 3.15
2	91.26 ± 2.60	87.48 ± 3.23	41.23 ± 4.72	49.53 ± 4.21
3	88.53 ± 4.17	82.52 ± 4.51	36.81 ± 2.32	45.43 ± 3.98
4	87.46 ± 3.65	80.52 ± 4.89	52.67 ± 0.93	38.67 ± 2.89
5	62.82 ± 4.58	56.34 ± 3.72	48.36 ± 4.19	38.83 ± 3.27
6	58.57 ± 2.53	51.27 ± 3.26	37.24 ± 5.61	35.29 ± 4.23
7	41.62 ± 3.51	43.45 ± 4.32	35.04 ± 5.62	38.72 ± 5.87
8	40.41 ± 3.92	31.35 ± 4.21	30.24 ± 4.10	29.31 ± 2.72
9	73.18 ± 2.53	61.96 ± 2.35	41.62 ± 2.58	36.46 ± 3.64
10	69.57 ± 2.94	55.56 ± 3.24	40.15 ± 2.15	33.29 ± 3.14
宁南霉素 Ningnanmycin	69.23 ± 3.38	58.91 ± 4.61	50.24 ± 5.21	40.69 ± 2.91

注:宁南霉素为阳性对照药物,^a50 μg/mL,^b50 μg/mL,^c200 μg/mL,^d200 μg/mL。

Note: Ningnanmycin was used as positive control drug, ^a50 μg/mL, ^b50 μg/mL, ^c200 μg/mL, ^d200 μg/mL.

4 结论

通过应用多种色谱方法从萝藦科植物徐长卿根茎的乙醇提取物中分离得到 13 个单体化合物, 化合物 2~5 和 7~10 为首次从该植物中分离得到。对化合物 1~10 进行抗 TMV 活性测试, 从活性结果来看, 化合物 1~4 和 9 均有钝化的抗 TMV 活性, 且化合物 4 具有保护活性, 说明化合物 4 抗 TMV 活性除了作用于 TMV 病毒外, 还由植物系统获得抗性产生。除了 *seco*-pregnane 类 C₂₁ 甾体化合物外, 首次发现化合物 3、4、9 具有抗 TMV 活性, 丰富抗 TMV 化合物结构的多样性。本研究成果丰富了徐长卿根茎中的化学成分及生物活性内容, 为其进一步的研究开发提供参考资料。

参考文献

- 1 Fu M, Wang DY, Hu X, et al. Chemical constituents from *Cynanchum paniculatum* [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2015, 38(1): 97-100.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 285.
- 3 Gong LP, Wang SY. Perspective of research oil *Cynanchum paniculatum* (Bge.) King and paeonol [J]. *Food Drug (食品与药品)*, 2005, 7(6): 14-17.
- 4 Zhao LP. Research progress of *Cynanchum paniculatum* [J]. *China Pharm (中国药业)*, 2011, 20(2): 79-80.

- 5 Deng HY, Wang HH. Clinical observation from compound radix cynanchi panicu-lati mixture as nasalirrigation treatment allergic rhinitis [J]. *J Clin Exp Med (临床和实验医学杂志)*, 2007, 5: 149-150.
- 6 Li YM, Wang LH, Li SL, et al. Seco-pregnane steroids target the subgenomic RNA of alphavirus-like RNA virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 8083-8088.
- 7 Ge YH, Liu KX, Zhang JX, et al. The limonoids and their anti-tobacco mosaic virus (TMV) activities from *Munronia unifoliolata* Oliv [J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60: 4289-4295.
- 8 Jian JY, Liu KX, Geng ZL, et al. Alkaloids of *Aconitum carmichaeli* Debx and against TMV activity [J]. *Agrochemicals (农药)*, 2017, 56: 767-770.
- 9 Nakagawa T, Hayashi K, Wada K, et al. The structures of glaucogenin-A, glaucogenin-B, and glaucogenin-C mono D-thevetoside from Chinese drug "Pai-Ch'ien" *Cynanchum glaucescens* Hand-Mazz [J]. *Tetrahedron Lett*, 1982, 23: 757-760.
- 10 Yan Y, Zhang JX, Liu KX, et al. Seco-pregnane steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum atratum* and their anti-TMV activity [J]. *Fitoterapia*, 2014, 97: 50-63.
- 11 Zhou BX, Yang ZF, Feng QT, et al. Aurantiamide acetate from *Baphicacanthus cusia* root exhibits anti-inflammatory and anti-viral effects via inhibition of the NF-κB signaling pathway in influenza A virus-infected cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 199: 60-67.