

瑶药尖尾枫果实活性部位筛选及其化学成分研究

邹芷琪^{1,2}, 于玲玲², 潘争红^{1,2*}, 宁德生², 符毓夏², 李连春²¹广西中医药大学药学院, 南宁 530200;²广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室, 桂林 541006

摘要: 筛选尖尾枫果实的抗炎及抗氧化活性部位, 并对抗炎成分进行研究。以 NO 生成抑制为筛选模型, 并结合 FRAP、ABTS 及 DPPH 自由基清除法对尖尾枫果实的不同极性部位及化合物进行活性评价。采用硅胶、葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20)、MCI 柱色谱、高效液相色谱和重结晶等方法对活性部位进行分离纯化, 并结合波谱学方法确定化合物结构。结果表明, 尖尾枫果实乙酸乙酯萃取部位的抗炎及抗氧化活性均强于其他部位, 并从中分离鉴定出 9 个化合物, 包括 2 个黄酮: 猫眼草黄素(1)和藜香黄酮醇(2); 7 个二萜酚: 鼠尾草酚(3)、迷迭香酚(4)、7-甲氧基迷迭香酚(5)、7-乙氧基迷迭香酚(6)、carnosic acid-11-methylether(7)、迷迭香双醛(8)、20-去氧鼠尾草酚(9), 其中化合物 3、4、6 是其主成分, 1、2、5~9 均为首次从该植物中分离得到。化合物 1~9 均具有不同程度的抗炎作用, 其中化合物 3、4 表现出良好的抗炎活性。

关键词: 尖尾枫; 抗炎; 抗氧化; 化学成分; 二萜酚

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)11-1865-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.11.007

Study on active fraction screening and chemical constituents of Yao Medicine *Callicarpa longissima* fruitsZOU Zhi-qi^{1,2}, YU Ling-ling², PAN Zheng-hong^{1,2*}, NING De-sheng², FU Yu-xia², LI Lian-chun²¹College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;²Guangxi Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization,

Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

Abstract: To screen the anti-inflammatory and anti-oxidative active fractions from fruits of *Callicarpa longissima* and study its chemical constituents. The activities of different fractions and compounds from fruits of *C. longissima* were evaluated by the inhibition of NO production and the multiple antioxidant methods including FRAP, ABTS and DPPH radical scavenging. The compounds were isolated and purified from the active fractions by using various chromatography techniques including silica gel, Sephadex LH-20, MCI, HPLC and recrystallization, and their structures were identified by spectroscopic methods. The results showed that the anti-inflammatory and anti-oxidative activities of the ethyl acetate fraction were stronger than others. Nine compounds, obtained from active fractions, were identified as two flavonoids: chrysofenetin (1) and pachypodol (2); and seven diterpene phenols: carnosol (3), rosmanol (4), 7-methoxyrosmanol (5), 7-ethoxyrosmanol (6), carnosic acid-11-methylether (7), rosmadial (8), 20-deoxycarnosol (9), respectively. Compounds 3, 4, 6 were the main compounds, and 1, 2, 5-9 were isolated from this plant for the first time. Compounds 1-9 have anti-inflammatory effects, among which compounds 3, 4 showed significant anti-inflammatory activity.

Key words: *Callicarpa longissima*; anti-inflammatory; anti-oxidative; chemical constituents; diterpene phenols尖尾枫 *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr 为马鞭草科紫珠属植物, 又名粘手风、赤药子、穿骨风 (广西)、牛舌广 (福建) 等, 有祛风湿、祛瘀消肿、止血镇痛之功效^[1,2], 是广西特色瑶药“七十二风”之一, 在壮、瑶等少数民族地区有广泛应用, 常以全株入药。目前, 关于尖尾枫的研究主要集中在枝叶的

收稿日期: 2022-04-02 接受日期: 2022-06-28

基金项目: 广西自然科学基金重点项目 (2018GXNSFDA050016);

中央引导地方科技发展专项 (桂科 ZY20111010); 广西

科学院基本科研业务费 (CQZ-C-1901)

* 通信作者 Tel: 86-015807737260; E-mail: Pan7260@126.com

化学成分分离^[3,4]、含量分析^[5]、挥发油提取^[6]及药理活性^[7,8]等方面,研究显示其枝叶中含有丰富的萜类、苯丙素类、木脂素类、黄酮类、甾醇类及挥发油等成分,而且在抗炎、抗氧化、美白等方面具有良好的生物活性。然而对于资源量丰富的尖尾枫果实,尚未见其化学成分及生物活性报道。本课题组前期对尖尾枫果实进行了精油制备并发现其具有较好的抗炎、美白作用^[9]。为了进一步明确尖尾枫的活性部位及其物质基础,本实验以尖尾枫果实为研究对象,通过 NO 生成抑制模型与多种抗氧化方法进行活性评价,筛选出尖尾枫果实的活性部位,并对其开展化学成分研究,研究结果将阐明尖尾枫果实抗炎、抗氧化作用的物质基础,为尖尾枫资源高效合理利用提供科学依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

LC-MS-IT-TOF 液相质谱联用仪、LC-2030C 3D 高效液相色谱仪(日本岛津公司);二氧化碳细胞培养箱、-80 °C 超低温冰箱(Thermo Forma 公司);全波长多功能酶标仪(Biotek 公司);倒置显微镜(舜宇光学科技有限公司);紫外-可见分光光度计 T6(北京普析通用仪器有限公司);超导核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司);HyClone 胎牛血清(HyClone 公司);LPS、MTT、DMSO(Sigma 公司);DMEM 培养基(Invitrogen 公司);NO 检测试剂盒(Promega 公司);总抗氧化能力检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)(麦克林生化科技有限公司);色谱纯试剂(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);氘代试剂(安诺伦(北京)生物科技有限公司);分析纯试剂(广东光华科技股份有限公司)。

细胞株:小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7 细胞),购买于中国典型培养物保藏中心。

植物样品采集于广西桂林植物园,经广西植物研究所黄俞淞副研究员鉴定为植物尖尾枫 *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr. 的果实。

1.2 实验方法

1.2.1 样品提取

取干燥粉碎后的尖尾枫果实 5.0 kg,用 95% 乙醇于室温下浸提 5 次,每次 48 h,减压回收得到粗提取物浸膏 802.1 g(Fr. 1)。将浸膏与水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,得到石油醚(Fr. 2)、乙酸乙酯(Fr. 3)、正丁醇(Fr. 4)、水(Fr. 5)4 个

部位。

1.2.2 抗氧化活性测定

1.2.2.1 DPPH 法测定自由基清除能力^[10]

精密称取 DPPH 9.859 mg,加无水乙醇配置成 0.1 mmol/L 的 DPPH 储备液待用。精密称取 Vc (抗坏血酸)样品 1 mg,加甲醇配置得到浓度为 0.2 g/L 的标准溶液。吸取一系列浓度的待测样品和 Vc 溶液于 10 mL 的具塞试管中,加水至 2 mL,再加 2 mL 的 DPPH 储备液,混匀后,避光反应 20 min,在 517 nm 下测定其吸光值。以样品浓度为横坐标,对应的清除率为纵坐标,作回归曲线,并计算出 IC₅₀ 值。以 Vc 作为阳性对照,实验重复 3 次。

1.2.2.2 FRAP 法测定总抗氧化能力

参照 FRAP 试剂盒方法,每孔加入 FRAP 工作液 180 μL,5 μL 待测样品,混匀,37 °C 反应 4 min 后测定 A_{593 nm}。以一系列不同浓度的 FeSO₄ 标准溶液绘制标准曲线,以每 1 g 待测样品相当于 FeSO₄ 的 mmol 数为该待测样品的 FRAP 值(FeSO₄ mmol/g)。实验以 Vc 为阳性对照,重复 3 次。

1.2.2.3 ABTS 法测定总抗氧化能力

参照 ABTS 试剂盒方法,每孔加入 200 μL 的 ABTS 工作液,待测样品 10 μL,室温下反应 3 min 后测定 A_{734 nm}。以一系列不同浓度的 Trolox 标准溶液绘制标准曲线,以 TEAC(Trolox 等效物抗氧化能力)来表示样品的抗氧化活性,该值越大,其抗氧化活性越强。实验以 Vc 为阳性对照,重复 3 次。

1.2.3 抗炎活性筛选

部位抗炎活性筛选:利用脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 作为抗炎活性筛选模型,采用 Griess 法来检测 NO 的释放量^[11]。取对数生长期的 RAW 264.7 细胞接种于 24 孔板中,设加药组和 LPS 组,各组加入终浓度为 25 μg/mL 的药物和终浓度为 0.2 μg/mL 的 LPS,经培养后取其上清液,加入 Griess 试剂,混匀反应后于波长 570 nm 处测定其吸光值。

化合物抗炎活性筛选:加药组各组加入浓度为 25 μmol/L 的化合物,其余步骤同“部位抗炎活性筛选”。

1.2.4 化合物的分离

Fr. 3 (351.5 g) 经 MCI 初步分离,用甲醇-水(70%→100%)进行洗脱,得到 A1~A5 五个组分。A1 组分经甲醇反复重结晶得到化合物 1(6.6 mg); A2 组分经硅胶柱分离,以石油醚-丙酮(50:1→1:1)

进行洗脱,经 TLC 检测后合并得到 F1 ~ F5 共 5 个组分。F3 经凝胶柱色谱(氯仿-甲醇 1:1)和 HPLC(乙腈:水 = 60:40 → 70:30, 40 min, 3.0 mL/min)纯化得到化合物 **3**(1.5 mg)、**7**(2.9 mg)、**8**(4.1 mg)、**9**(2.4 mg);F2 经硅胶柱,以石油醚-乙酸乙酯(100:1 → 10:1)进行梯度洗脱,得到化合物 **6**(24.2 mg);A3 组分经硅胶柱,以石油醚-丙酮(20:1 → 2:1)进行梯度洗脱,再通过 HPLC(乙腈:水 = 60:40, 2.0 mL/min)进行进一步的分离纯化,得到化合物 **2**(3.4 mg)、**4**(4.8 mg)、**5**(3.5 mg)。

1.2.5 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 26 数据分析软件进行单因素 ANOVA 显著性分析,实验数据表示为“平均数 ± 标准差”, $P < 0.01$ 表示有极显著差异,有统计学意义。

2 实验结果

2.1 抗氧化实验结果

2.1.1 DPPH 自由基清除能力评价

如表 1 所示,尖尾枫各部位均具有一定的 DPPH 自由基清除能力,其中乙酸乙酯部位(Fr. 3)的 DPPH 自由基清除能力最强。

表 1 尖尾枫各部位的 DPPH 自由基清除能力($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 The DPPH radical scavenging ability of *C. longissima* in each fraction ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 样品 Sample | IC ₅₀ (μg/mL) |
|-----------|----------------------------|
| Fr. 1 | 36.93 ± 0.09 ^{**} |
| Fr. 2 | 45.66 ± 0.20 ^{**} |
| Fr. 3 | 15.55 ± 0.13 ^{**} |
| Fr. 4 | 18.65 ± 0.05 ^{**} |
| Fr. 5 | 65.23 ± 0.17 ^{**} |
| 抗坏血酸 Vc | 4.65 ± 0.11 |

注:与 Vc 比较, ^{**} $P < 0.01$ 。Note: Compared with Vc group, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.1.2 总抗氧化能力评价

FRAP、ABTS 法实验结果一致显示(见图 1),尖尾枫果实的乙酸乙酯萃取部位(Fr. 3)的总抗氧化效果最好,总抗氧化能力分别为 4.192 8 (FeSO₄ mmol/g)、1.744 0 (Trolox mmol/g)。

2.2 抗炎活性实验

2.2.1 部位抗炎活性

尖尾枫不同部位对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放的影响结果如表 2 所示,与对照组相比,模型组的 NO 含量显著升高($P < 0.01$);与模型组

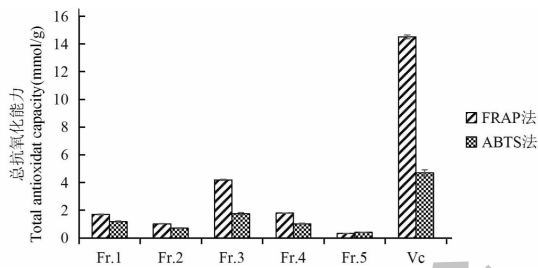


图 1 尖尾枫各部位总抗氧化能力($n = 3$)

Fig. 1 Total antioxidant capacity of *C. longissima* in each fraction ($n = 3$)

相比,浓度为 25 μg/mL 的粗提物及各个萃取部位均能显著抑制 NO 的释放($P < 0.01$),表现出一定程度上的抗炎活性,在同一质量浓度下,乙酸乙酯部位(Fr. 3)的活性最强。

表 2 尖尾枫各部位的抗炎活性($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 The anti-inflammatory activity of *C. longissima* in each fraction ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 部位 Part | NO 含量 Content of NO (μg/mL) | 抑制率 Inhibition ratio (%) |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Fr. 1 | 8.55 ± 0.32 ^{**} | 50.91 ± 0.20 ^{**} |
| Fr. 2 | 6.86 ± 0.21 ^{**} | 62.18 ± 0.28 ^{**} |
| Fr. 3 | 4.68 ± 0.27 ^{**} | 76.69 ± 0.23 ^{**} |
| Fr. 4 | 13.51 ± 0.43 ^{**} | 17.87 ± 0.46 ^{**} |
| Fr. 5 | 13.03 ± 0.23 ^{**} | 21.07 ± 0.13 ^{**} |
| 对照组 Control group | 1.18 ± 0.01 | - |
| 模型组 Model group | 16.19 ± 0.10 ^{###} | - |

注:与对照组比较, ^{###} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, ^{###} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.2.2 化合物抗炎活性

从尖尾枫乙酸乙酯部位(Fr. 3)分离得到的化合物 **1** ~ **9** 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放的影响结果如表 3 所示,与空白对照组比较,模型组的 NO 含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,浓度为 25 μmol/L 的化合物 **1** ~ **9** 均能显著抑制 NO 的释放($P < 0.01$),表现出不同程度的抗炎活性,在相同浓度水平下,化合物 **3**、**4** 的活性强于其他化合物。

2.3 结构鉴定

化合物 **1** 黄色线状晶体;ESI-MS: m/z 373.12 [M-H]⁻, 分子式为 C₁₉H₁₈O₈; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.71 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 7.67 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-6'), 7.05 (1H, d, $J = 8.5$

表3 化合物1~9的抗炎活性筛选($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Anti-inflammatory activity screening of compounds 1-9

 $(\bar{x} \pm s, n = 3)$

| 化合物 Compound | NO 含量 Content of NO($\mu\text{mol/L}$) | 抑制率 Inhibition ratio(%) |
|---------------------------------|---|----------------------------|
| 1 | 16.37 \pm 0.08 ** | 37.98 \pm 0.09 ** |
| 2 | 18.17 \pm 0.31 ** | 31.16 \pm 0.17 ** |
| 3 | 2.87 \pm 0.59 ** | 89.11 \pm 0.30 ** |
| 4 | 5.31 \pm 0.10 ** | 79.89 \pm 0.14 ** |
| 5 | 21.40 \pm 0.14 ** | 18.93 \pm 0.24 ** |
| 6 | 20.30 \pm 0.17 ** | 23.12 \pm 0.27 ** |
| 7 | 22.65 \pm 0.30 ** | 14.19 \pm 0.38 ** |
| 8 | 23.83 \pm 0.34 ** | 9.73 \pm 0.41 ** |
| 9 | 12.64 \pm 0.22 ** | 52.12 \pm 0.30 ** |
| 阳性对照组 Positive control group | 1.24 \pm 0.03 | 95.32 \pm 0.34 |
| 空白对照组 Blank control group | 0.18 \pm 0.04 | - |
| 模型组 Model group | 26.38 \pm 0.07 ^{##} | - |

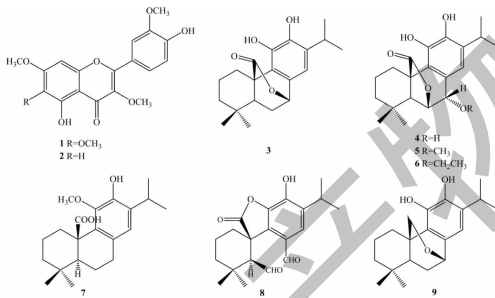
注:与空白对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。Note: Compared with blank control group,^{##} $P < 0.01$; Compared with model group,** $P < 0.01$.

图2 化合物1~9的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of compounds 1-9

Hz, H-5'), 6.50 (1H, s, H-8), 3.98 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.96 (3H, s, 7-OCH₃), 3.92 (3H, s, 6-OCH₃), 3.86 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 156.1 (C-2), 138.9 (C-3), 179.0 (C-4), 152.9 (C-5), 132.5 (C-6), 158.9 (C-7), 90.5 (C-8), 152.8 (C-9), 106.7 (C-10), 122.6 (C-1'), 111.1 (C-2'), 146.6 (C-3'), 148.5 (C-4'), 114.7 (C-5'), 122.8 (C-6'), 60.3 (3-OCH₃), 61.0 (6-OCH₃), 56.5 (7-OCH₃), 56.3 (3'-OCH₃)。上述数据与文献^[12]报道基本一致,因此化合物1鉴定为猫眼草黄素。

化合物2 黄色无定形粉末;ESI-MS: m/z 345.12 [M + H]⁺,分子式为 C₁₈H₁₆O₇; ¹H NMR

(500 MHz, CD₃OD) δ : 7.73 (1H, s, H-2'), 7.68 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6'), 6.96 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.64 (1H, s, H-8), 6.34 (1H, s, H-6), 3.95 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.89 (3H, s, 7-OCH₃), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 163.3 (C-2), 124.7 (C-3), 185.0 (C-4), 160.1 (C-5), 96.2 (C-6), 158.7 (C-7), 95.5 (C-8), 151.4 (C-9), 104.4 (C-10), 123.5 (C-1'), 113.0 (C-2'), 149.5 (C-3'), 148.4 (C-4'), 116.2 (C-5'), 110.2 (C-6'), 51.3 (3-OCH₃), 56.5 (7-OCH₃), 56.1 (3'-OCH₃)。以上数据与文献^[13]报道基本一致,故化合物2鉴定为藿香黄酮醇。

化合物3 无色针状晶体;ESI-MS: m/z 329.03 [M-H]⁻,分子式为 C₂₀H₂₆O₄; ¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 6.77 (1H, s, H-14), 5.43 (1H, dd, $J = 4.0, 1.5$ Hz, H-7), 3.30 (1H, sept, $J = 6.0$ Hz, H-15), 2.83 (1H, m, H-1b), 2.54 (1H, td, $J = 13.5, 4.0$ Hz, H-1a), 2.18 (1H, ddd, $J = 14.0, 5.5, 4.0$ Hz, H-6a), 1.94 (1H, m, H-2b), 1.85 (1H, ddd, $J = 14.0, 10.5, 1.5$ Hz, H-6b), 1.71 (1H, dd, $J = 10.5, 5.5$ Hz, H-5), 1.58 (1H, m, H-2a), 1.49 (1H, m, H-3b), 1.31 (1H, td, $J = 13.5, 3.5$ Hz, H-3a), 1.19 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17), 1.18 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-16), 0.88 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, s, H-19); ¹³C NMR (125 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 29.9 (C-1), 19.7 (C-2), 41.8 (C-3), 35.1 (C-4), 46.3 (C-5), 30.6 (C-6), 78.2 (C-7), 133.6 (C-8), 123.1 (C-9), 49.2 (C-10), 144.0 (C-11), 143.4 (C-12), 135.1 (C-13), 112.4 (C-14), 27.5 (C-15), 23.1 (C-16), 23.1 (C-17), 32.0 (C-18), 20.0 (C-19), 176.0 (C-20)。以上数据与文献^[14]报道基本一致,故化合物3鉴定为鼠尾草酚。

化合物4 白色粉末;ESI-MS: m/z 347.16 [M + H]⁺,分子式为 C₂₀H₂₆O₅; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.85 (1H, s, H-14), 4.60 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-7), 4.53 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-6), 3.24 (1H, sept, $J = 6.5$ Hz, H-15), 2.82 (1H, m, H-1b), 2.26 (1H, s, H-5), 1.30 (1H, m, H-3a), 1.20 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-17), 1.17 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 1.02 (3H, s, H-18), 0.90 (3H, s, H-19); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 28.6 (C-1), 20.1 (C-2), 39.4 (C-3), 32.5 (C-4), 51.6 (C-5), 79.9 (C-6), 69.1 (C-7), 129.4 (C-8), 124.9 (C-9), 48.3 (C-10), 145.3

(C-11), 143.3 (C-12), 137.4 (C-13), 120.4 (C-14), 27.9 (C-15), 23.0 (C-16), 23.2 (C-17), 31.7 (C-18), 22.3 (C-19), 180.9 (C-20)。以上数据与文献^[14]报道基本一致,故化合物**4**鉴定为迷迭香酚。

化合物 5 白色粉末;ESI-MS: m/z 361.21 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₁H₂₈O₅; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.76 (1H, s, H-14), 4.80 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-6), 4.27 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 3.65 (3H, s, 7-OCH₃), 3.21 (1H, sept, J = 6.5 Hz, H-15), 2.17 (1H, s, H-5), 1.96 (1H, td, J = 14.0, 5.5 Hz, H-1a), 1.60 (1H, m, H-2a), 1.24 (1H, m, H-3a), 1.21 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-17), 1.19 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-16), 0.92 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 28.6 (C-1), 20.2 (C-2), 39.4 (C-3), 32.4 (C-4), 52.3 (C-5), 76.1 (C-6), 78.9 (C-7), 127.7 (C-8), 125.1 (C-9), 48.8 (C-10), 145.3 (C-11), 143.7 (C-12), 137.4 (C-13), 120.9 (C-14), 27.9 (C-15), 22.9 (C-16), 23.1 (C-17), 22.4 (C-18), 32.0 (C-19), 180.9 (C-20), 58.6 (7-OCH₃)。以上数据与文献^[15]报道基本一致,故化合物**5**鉴定为7-甲氧基迷迭香酚。

化合物 6 无色晶体;ESI-MS: m/z 397.20 [M + Na]⁺, 分子式为 C₂₂H₃₀O₅; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.78 (1H, s, H-14), 6.06 (1H, s, 11-OH), 5.51 (1H, s, 12-OH), 4.66 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-6), 4.36 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-7), 3.86 (2H, m, H-21), 3.18 (1H, br d, J = 13.5 Hz, H-1a), 3.06 (1H, sept, J = 7.0 Hz, H-15), 2.28 (1H, s, H-5), 1.99 (1H, td, J = 13.5, 5.5 Hz, H-1b), 1.68 (1H, m, H-2a), 1.56 (1H, m, H-2b), 1.46 (1H, m, H-3a), 1.33 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-22), 1.23 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-17), 1.21 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-16), 1.19 (1H, m, H-3b), 1.01 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 27.4 (C-1), 19.0 (C-2), 38.0 (C-3), 31.4 (C-4), 50.9 (C-5), 75.3 (C-6), 75.8 (C-7), 126.8 (C-8), 124.4 (C-9), 47.0 (C-10), 142.3 (C-11), 141.7 (C-12), 134.6 (C-13), 120.7 (C-14), 27.5 (C-15), 22.2 (C-16), 22.4 (C-17), 31.4 (C-18), 22.1 (C-19), 178.9 (C-20), 66.3 (C-21), 15.8 (C-22)。以上数据与文献^[16]报道基本一致,故化合物**6**鉴定为7-乙氧基迷迭香酚。

化合物 7 白色粉末;ESI-MS: m/z 347.31 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₁H₃₀O₄; ¹H NMR (500 MHz,

CDCl₃) δ : 6.51 (1H, s, H-14), 3.73 (3H, s, 11-OCH₃), 3.53 (1H, br d, J = 13.5 Hz, H-1b), 3.16 (1H, sept, J = 7.0 Hz, H-15), 2.83 (2H, m, H-7), 2.28 (1H, m, H-5), 1.82 (1H, m, H-1a), 1.22 (3H, d, J = 7.5 Hz, H-17), 1.20 (3H, d, J = 7.5 Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 32.1 (C-1), 20.1 (C-2), 41.6 (C-3), 34.0 (C-4), 61.8 (C-5), 20.1 (C-6), 34.2 (C-7), 134.7 (C-8), 125.6 (C-9), 47.8 (C-10), 142.4 (C-11), 139.6 (C-12), 118.2 (C-13), 26.6 (C-14), 24.0 (C-16), 23.6 (C-17), 32.9 (C-18), 18.6 (C-19), 181.8 (C-20), 54.4 (11-OCH₃)。以上数据与文献^[17]报道基本一致,故化合物**7**鉴定为carnosic acid-11-methylether。

化合物 8 白色粉末;ESI-MS: m/z 343.21 [M - H]⁻, 分子式为 C₂₀H₂₄O₅; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.76 (1H, s, H-7), 9.66 (1H, s, H-6), 7.40 (1H, s, H-14), 4.09 (1H, s, H-5), 3.34 (1H, sept, J = 7.0 Hz, H-15), 2.27 (1H, td, J = 13.5, 4.0 Hz, H-1a), 2.10 (1H, m, H-2a), 1.89 (1H, m, H-3a), 1.70 (1H, m, H-1b), 1.61 (1H, m, H-3b), 1.56 (1H, m, H-2b), 1.50 (3H, s, H-18), 1.28 (3H, s, H-19), 1.28 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-17), 1.27 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-16); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 31.6 (C-1), 16.7 (C-2), 40.3 (C-3), 34.0 (C-4), 61.2 (C-5), 201.1 (C-6), 192.0 (C-7), 124.1 (C-8), 136.0 (C-9), 48.3 (C-10), 142.6 (C-11), 141.2 (C-12), 131.7 (C-13), 131.3 (C-14), 27.1 (C-15), 22.2 (C-16), 22.3 (C-17), 33.4 (C-18), 23.9 (C-19), 177.1 (C-20)。以上数据与文献^[18]报道基本一致,故化合物**8**鉴定为迷迭香双醛。

化合物 9 白色粉末;ESI-MS: m/z 317.79 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₀H₂₈O₃; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.59 (1H, s, H-14), 4.67 (1H, dd, J = 3.5, 1.5 Hz, H-7), 4.32 (1H, dd, J = 16.0, 8.5 Hz, H-20a), 3.25 (1H, sept, J = 7.0 Hz, H-15), 3.02 (1H, dd, J = 8.5, 1.5 Hz, H-20b), 2.74 (1H, td, J = 14.0, 4.5 Hz, H-1a), 1.43 (1H, m, H-5), 1.29 (1H, m, H-3b), 1.21 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-17), 1.20 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-16), 1.14 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 38.9 (C-1), 20.1 (C-2), 42.5 (C-3), 34.9 (C-4), 44.7 (C-5), 31.4 (C-6), 72.7 (C-7), 134.8

(C-8), 129.7 (C-9), 41.1 (C-10), 141.9 (C-11), 143.5 (C-12), 133.9 (C-13), 112.9 (C-14), 27.9 (C-15), 23.4 (C-16), 23.3 (C-17), 33.5 (C-18), 21.6 (C-19), 69.9 (C-20)。以上数据与文献^[19]报道基本一致,故化合物**9**鉴定为20-去氧鼠尾草酚。化合物**1~9**的结构见图2。

3 讨论与结论

本实验通过多种模型筛选出尖尾枫果实抗氧化、抗炎活性的最佳部位——乙酸乙酯部位,并从中分离鉴定出一系列二萜酚成分。通过抗炎活性结果与结构关系分析发现,二萜酚类化合物中的邻二酚羟基(C-11和C-12)是其抗炎活性的关键基团;C-7上的羟基若被甲氧基或乙氧基取代(化合物**5、6**),抗炎活性显著降低;另外,若C-20与C-6或C-7形成含氧环,抗炎活性提高。

鼠尾草酚(**3**)、迷迭香酚(**4**)是尖尾枫乙酸乙酯部位的主要活性成分。研究表明,鼠尾草酚、迷迭香酚不仅抗氧化活性显著^[20],而且可通过抑制MAPK、NF- κ B、STAT3等信号通路,抑制iNOS、COX-2的表达,缓解炎症损伤^[21,22]。新近,我们在抗类风湿性关节炎(RA)研究中发现,从尖尾枫枝叶中获得的鼠尾草酚、迷迭香酚具有协同增效作用,它们通过阻断TLR4/NF- κ B/MAPK通路,抑制炎症反应,改善RA^[23],提示鼠尾草酚、迷迭香酚抗炎活性好,具备开发治疗RA新药的潜力。因此,通过本实验,进一步阐明了尖尾枫果实抗氧化、抗炎活性部位及其物质基础,这将为尖尾枫资源综合利用提供科学依据。

参考文献

- 1 Editorial Committee of Flora of China. Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 1982: 25-54.
- 2 Jiangsu New Medical College. Chinese Dictionary of Herbal Medicine(中药大辞典)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific Technical Publishers, 1986: 875.
- 3 Gao W, Liu BM, Huang Y, et al. Chemical constituents of *Callicarpa longissima*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 153-155.
- 4 Yuan JQ. Studies on the constituents of *Callicarpa longissima*[D]. Guangzhou: Jinan University(暨南大学), 2015.
- 5 Gao W, Liu BM, Chen MS, et al. Isolation and determination of verbascoside from *Callicarpa longissima*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 60-62.
- 6 Gao W, Liu BM, Chai L, et al. Study on chemical constituents

- of volatile oil from *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Meer. [J]. Flavour Frag Cosmet(香料香精化妆品), 2015, 6: 1-3.
- 7 Yamahara M, Sugimura K, Kumagai A, et al. *Callicarpa longissima* extract, carnosol-rich, potently inhibits melanogenesis in B16F10 melanoma cells[J]. J Nat Med, 2016, 70: 28-35.
- 8 Jiao Y, Zou LH, Qiu L, et al. Anticomplementary effects of the extracts of five verbenaceae herbs *in vitro* [J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报), 2016, 47: 469-473.
- 9 Pan ZH, Yu LL, Ning DS, et al. A preparation method of *Callicarpa longissima* fruits essential oil and application of oil(一种尖尾枫种子精油、其制备方法及应用): CN202011405238.4[P]. 2021-05-07.
- 10 Chen YX, Liu JH, Lin F, et al. Determination of antioxidative activity of 41 kinds of Chinese herbal medicines by using DPPH and FRAP methods[J]. Res Explor Lab(实验室研究与探索), 2011, 30: 11-14.
- 11 Huang YM, Yuan H, Chen P, et al. Terpenoids from *Callicarpa kwangtungensis* and their anti-inflammatory activity[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2022, 34: 50-56.
- 12 Zhao YW, Ni FY, Song YL, et al. Chemical constituents from *Artemisia annua*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39: 4816-4821.
- 13 Fu MQ, Xiao GS, Wu JJ, et al. Chemical constituents from *Pericarpium Citri Reticulatae*[J]. Chin Herb Med(中草药:英文版), 2017, 9: 86-91.
- 14 Inatani R, Nakatani N, Fuwa H, et al. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary(*Rosmarinus officinalis* L.) [J]. Agric Biol Chem, 1982, 46: 1661-1666.
- 15 Makoto T, Toshiro W, Kazuo S, et al. New antimicrobial substances against streptomyces scabies from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) [J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61: 1440-1444.
- 16 Alvarez F, Tello E, Bauer K, et al. Cytotoxic and antimicrobial diterpenes isolated from *Hyptis dilatata* [J]. Curr Bioact Compd, 2015, 11: 189-197.
- 17 Luis JG, Herrera JR, Bello A. The isolation of carnosic acid-11-methylether from citrus roots infected by nematode *Tylenchulus semipenetrans*[J]. Nat Prod Lett, 2006, 14: 379-385.
- 18 Nakatani N, Inatani R. A new diterpene lactone, rosmadial, from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) [J]. Agr Biol Chem, 1983, 47: 353-358.
- 19 Ramzi A, Mothana MS, Nawal M, et al. In vitro antiprotozoal activity of abietane diterpenoids isolated from *Plectranthus barbatus* Andr. [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15: 8360-8371.