

· 化学与分析 ·

防风化学成分分离鉴定

李阳¹, 王旭¹, 李壮壮¹, 张静¹, 孟红², 吕青涛^{1*}, 容蓉^{1*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355;

2. 山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

[摘要] 目的:对防风二氯甲烷及乙酸乙酯部位化学成分进行研究。方法:采用镜下观察细胞病变效应(CPE)法,以Vero-HSV-1(F),RD-EV71,Vero-RSV体外感染模型,对防风不同极性部位进行体外抗病毒活性初步筛选,发现防风二氯甲烷及乙酸乙酯部位具有体外抗HSV-1的活性,采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、液相制备、重结晶等手段对其进行分离纯化,通过理化性质,MS,¹H-NMR和¹³C-NMR等谱学技术进行结构鉴定。结果:从中分离得到11个化合物,分别鉴定为:单棕榈酸甘油酯(1),2-丁氧基乙基亚油酸(2),3'(R)-(+) - 亥茅酚(3),(-) - marmesin(4),(6Z,9Z)-十七烷(5),32,33,34-三甲基-16-烯-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(6),亥茅酚苷(7),香草酸(8),升麻素(9),5,7-二羟基-2-甲基色原酮(10),伞形花内酯(11)。结论:化合物2,5,6,10为首次从该属植物中分离得到。

[关键词] 防风; 化学成分; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0060-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150060

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1406.076.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 14:06

Isolate and Identify Chemical Constituents of Methylene Chloride and Ethyl Acetate Extract of Saposhnikovia Radix

LI Yang¹, WANG Xu¹, LI Zhuang-zhuang¹, ZHANG Jing¹, MENG Hong², LYU Qing-tao^{1*}, RONG Rong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250062, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of the methylene chloride and ethyl acetate extract of Saposhnikovia Radix. **Method:** The activity of anti-HSV-1 was screened by CPE method with Vero-HSV-1 (F), RD-EV71 and Vero-RSV *in vitro* infection models and the compounds were isolated and purified by silica gel column chromatography, gel column chromatography, HPLC preparation and recrystallization. The structures were elucidated by the physical and chemical properties, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopy. **Result:** The 11 compounds were isolated and their structures were identified as glyceroylmonopalmitate (1), 2-butoxyethyl linoleate (2), 3' (R) - (+) - hamaudol (3), (-) - marmesin (4), (6Z, 9Z) - heptadecadiene (5), 32, 33, 34-trimethyl-bacteriohopan-16-ene 3-O-β-D-glucopyranoside (6), sec-O-glucosylhamaudol (7), vanillic acid (8), cimifugin (9), noreugenin (10) and umbelliferone (11). **Conclusion:** Compounds 2, 5, 6 and 10 were isolated from the genus for the first time.

[Key words] Saposhnikovia Radix; chemical constituents; structure identification

[收稿日期] 20161212(002)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09509001-001);山东省中医药抗病毒协同创新中心(XTCX2014C01-02)

[第一作者] 李阳,在读硕士,从事天然药物化学成分及化学成分分析,Tel:13658610300,E-mail:1144323588@qq.com

[通讯作者] *容蓉,博士,教授,从事中药及复方活性成分与质量控制研究,Tel:0531-89628085,E-mail:rosierong@163.com;

*吕青涛,博士,教授,从事天然药物化学成分及化学分析研究,Tel:0531-89628596,E-mail:luqingtao@163.com

防风为伞形科植物防风未抽花茎的干燥根,主产于黑龙江、吉林、辽宁、河北等地。归膀胱、肝、脾经,有祛风解表,胜湿止痛,止痉,用于感冒头痛,风湿痹痛,风疹瘙痒,破伤风等^[1]。防风化学成分主要包括色原酮类、香豆素类、多糖类,还含有有机酸类、聚乙炔类、甘油酯类、挥发油类成分^[2]。根据文献查阅情况,目前对防风成分的抗病毒活性研究较少,本实验室采用细胞病变法(cytopathic effect, CPE),对防风不同极性部位进行体外抗病毒活性初步筛选,并对具有体外抗疱疹病毒I型(HSV-1)活性的2个极性部位的化学成分进行了研究,分离得到11个化合物,分别鉴定为单棕榈酸甘油酯(1),2-丁氧基乙基亚油酸(2),3'(R)-(+) -亥茅酚(3),(-) -marmesin(4),(6Z,9Z)-十七烷(5),32,33,34-三甲基-16-烯-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(6),亥茅酚苷(7),香草酸(8),升麻素(9),5,7-二羟基-2-甲基色原酮(10),伞形花内酯(11)。其中,化合物2,5,6,10为首次从该属植物中分离得到。

1 材料

Ascend 600M AVANCE III HD型核磁共振仪(瑞士Bruker公司,TMS为内标);1260型高效液相色谱仪(DAD检测器),6540 UHD Accurate Mass Q-TOF MS(美国Agilent公司);N-1100系列旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司),KQ5200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),LH-20羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20,美国GE公司),GF₂₅₄薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂),柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂);甲酮色谱纯,其他试剂均为分析纯(天津市富宇精细化工有限公司),MEM培养基(美国Gibco公司),胰酶(Diffico公司)。

非洲绿猴肾细胞(Vero),横纹肌瘤细胞(RD),按常规方法传代、培养;HSV-I,肠道病毒71型(EV71),呼吸道合胞病毒(RSV),临用前于37℃解冻,用细胞维持液稀释成100TC ID₅₀备用。均由山东省医学科学院基础医学研究所提供。

细胞培养液:含10%新生牛血清及100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素的MEM培养基,过滤除菌,分装置4℃备用。细胞维持液:含2%新生牛血清及100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素MEM培养基,过滤除菌,分装置4℃备用。PBS:pH 7.2,含NaCl 8 g,KCl 0.2 g,KH₂PO₄ 0.2 g,Na₂HPO₄ 2.9 g,加双蒸水至1 000 mL,过滤除菌,分装,置4℃备用。细胞消化液:胰酶2.5 g用1 000 mL PBS溶解,过滤除菌,分装青霉素瓶,置-20℃冰箱备用。

防风药材购自安徽亳州药材市场,经山东中医药大学徐凌川教授鉴定为伞形科植物 *Saposhnikovia divaricata* 未抽花茎的干燥根。

2 提取

防风饮片10.5 kg,粉碎,过20~40目筛,分别用8,6,6倍量的70%乙醇回流提取3次,时间分别为2,1.5,1 h,32层纱布过滤,合并提取液,减压回收溶剂,浓缩至无醇味,浓缩液为9 L,相当于药材1.17 g·mL⁻¹。分别用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、水饱和正丁醇对浓缩液进行萃取,将萃取液浓缩至浸膏状,得石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取部位,各取石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇部位膏状物5 mg,溶于DMSO 20 mL,用细胞维持液做倍比系列稀释(第一孔10倍,后续孔逐级稀释2倍),共12个浓度,备用。

3 体外抗病毒活性

3.1 抗HSV-1药效试验

3.1.1 细胞复苏与传代 将液氮冻存的Vero细胞在37℃水浴1 min内迅速融化,1 000 r·min⁻¹离心3 min,吸弃上清,悬浮于细胞培养液中,于细胞培养瓶中37℃5% CO₂静止培养,3 d后长成单层,用0.25%胰酶消化,按1:3传代,细胞长成单层时用于试验。

3.1.2 病毒活化 取HSV-1毒种0.1 mL接种于已经长成单层的Vero细胞上,35℃5% CO₂培养,镜下观察细胞病变效应(CPE),当CPE达到90%,收集。收获的病毒冻融3次,吹打离心(1万 r·min⁻¹,20 min),定量分装,-80℃冰箱冻存备用。

3.1.3 药物体外抗病毒筛选试验 制备多孔板内单层细胞:将细胞培养瓶内Vero细胞消化分散,分别接种96孔板,细胞密度为5×10⁵个/mL,5% CO₂,37℃培养,待长成单层,备用。

药物体外抗HSV-1试验:将受试药物依次加入96孔板内的单层Vero细胞上(100 μL/孔),设细胞对照、病毒对照。除细胞对照外,各孔加100半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)的病毒100 μL。35℃5% CO₂培养,每日显微镜下观察细胞病变,待病毒对照出现90%细胞病变后终止培养。镜下观察药物毒性及细胞病变情况,并计算治疗指数(TI)。

3.2 抗EV71药效试验

3.2.1 细胞复苏与传代 将液氮冻存的RD细胞在37℃水浴1 min内迅速融化,800 r·min⁻¹离心5 min,吸弃上清,悬浮于细胞培养液中,于细胞培养瓶中37℃5% CO₂静止培养,3 d后长成单层,用

0.25% 胰酶消化,按 1:3 传代,细胞长成单层时用于试验。

3.2.2 病毒活化 取 EV71 毒种 0.2 mL 接种于已经长成单层的 RD 细胞上,35 °C 5% CO₂ 培养,镜下观察 CPE,当 CPE 达到 90%,收集。收获的病毒冻融 3 次,吹打离心(1 万 r·min⁻¹,20 min),定量分装,-80 °C 冰箱冻存备用。

3.2.3 药物体外抗病毒筛选试验 制备多孔板内单层细胞:将细胞培养瓶内 RD 细胞消化分散,分别接种 96 孔板,5 × 10⁵ 个/mL,5% CO₂,37 °C 培养,待长成单层,备用。

药物体外抗 EV71 试验:将受试药物依次加入 96 孔板内的单层 RD 细胞上(100 μL/孔),每个浓度均为 5 孔。设细胞对照、病毒对照,每组均设 5 个复孔。除细胞对照外,各孔加 100 TCID₅₀ 的 EV71 病毒 100 μL,35 °C 5% CO₂ 培养,每日显微镜下观察细胞病变,待病毒对照出现 90% 细胞病变后终止培养。镜下观察药物毒性及细胞病变情况,并计算 TI 值。

3.3 抗 RSV 药效试验 试验方法同抗 HSV 药效试验方法。结果见表 1。

表 1 防风各极性部位体外抗病毒 TI 值

Table 1 Antiviral TI of different parts in Saposhnikovia Radix

部位	HSV-1 (F)	EV71	RSV
石油醚	4~8	8~16	-
二氯甲烷	8~16	-	-
乙酸乙酯	4~8	-	-
正丁醇	4~8	-	-

注:“-”表示“无活性”。

4 分离

采用 CPE 法初步筛选防风抗病毒活性部位,显示二氯甲烷和乙酸乙酯部位具有一定的体外抗 HSV-1 活性,进而对这两部位进行系统分离。

取二氯甲烷部位 51 g,经硅胶柱(100~200 目)色谱进行初步分离,二氯甲烷-甲醇(100:1~0:1)梯度洗脱,硅胶薄层色谱检测合并流分,分为 Fr. 1~Fr. 6;对 Fr. 2 部位进行硅胶柱色谱分离,硅胶采用 200~300 目,二氯甲烷-甲醇(100:1~0:1)梯度洗脱,得到化合物 1 和 2。

取乙酸乙酯部位 37 g,经硅胶柱(100~200 目)色谱进行初步分离,洗脱剂为二氯甲烷-甲醇(100:1~0:1)梯度洗脱,硅胶薄层色谱检测合并流分,划分为 Fr. 1~Fr. 6,对 Fr. 2,Fr. 3,Fr. 4 经过硅胶柱色谱(200~300 目)分离,Sephadex LH-20 凝胶柱分离,制备液相,从 Fr. 2 部位得到化合物 3~5,8,10,11,从 Fr. 3 部位得到化合物 7,从 Fr. 4 部位得到

化合物 6,9。

5 结构鉴定

化合物 1 白色粉末(甲醇),ESI-MS *m/z* 330 [M]⁺。¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 4.04(1H, dd, *J* = 6.0, 11.6 Hz, H-1a), 4.02(1H, dd, *J* = 4.7, 11.6 Hz, H-1b), 3.91(1H, m, H-2), 3.65(1H, dd, *J* = 5.8, 11.2 Hz, H-3a), 3.62(1H, dd, *J* = 4.0, 11.2 Hz, H-3b), 2.74(1H, br s, OH), 2.29(2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2'), 1.52(2H, m, H-15'), 1.24(24H), 0.87(3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-16'); ¹³C-NMR(151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 65.95(C-1), 69.75(C-2), 63.10(C-3), 173.39(C-1'), 33.95(C-2'), 31.77(C-3'), 29.18~29.51(C-4'~C-13'), 24.92(C-14'), 22.57(C-15'), 14.42(C-16')。以上数据与文献[3]基本一致,确定化合物为单棕榈酸甘油酯(glyceroyl monopalmitate)。

化合物 2 白色油状(二氯甲烷),ESI-MS *m/z* 380 [M]⁺。¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.86(3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.05(3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.08~1.24(CH₂), 1.51(4H, m), 2.28(2H, m), 2.74(2H, m), 3.32(2H, m), 3.63(2H, m), 4.04(2H, m), 4.62~5.33(4H, m); ¹³C-NMR(151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 173.39(C-1), 31.76(C-2), 24.90(C-3), 25.68(C-4), 28.92(C-5), 29.03(C-6), 28.97(C-7), 31.36(C-8), 130.19(C-9), 28.22(C-10), 33.94(C-11), 28.21(C-12), 30.17(C-13), 29.46(C-14), 27.07(C-15), 29.17(C-16), 22.56(C-17), 14.42(CH₃), 14.39(CH₃), 9.75(C-1'), 5.96(C-2'), 63.10(C-3'), 29.35(C-4'), 22.44(C-5')。以上数据与文献[4]基本一致,确定化合物为 2-丁氧基乙基亚油酸(2-butoxyethyl linoleate)。

化合物 3 白色无定形粉末(甲醇),ESI-MS *m/z* 277 [M]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ: 6.37(1H, s, H-8), 6.09(1H, s, H-3), 3.83(1H, t, *J* = 5.9 Hz, H-3'), 2.94(1H, dd, *J* = 17.0, 5.2 Hz, H-4'β), 2.64(1H, dd, *J* = 17.0, 6.7 Hz, H-4'α), 2.38(3H, s, 2-CH₃), 1.38(3H, s, 2'-CH₃), 1.32(3H, s, 2'-CH₃); ¹³C-NMR(151 MHz, CD₃OD) δ: 168.12(C-2), 107.29(C-3), 182.76(C-4), 159.54(C-5), 103.49(C-6), 158.92(C-7), 94.37(C-8), 156.26(C-9), 103.74(C-10), 78.49(C-2'), 67.90(C-3'), 24.60(C-4'), 24.23, 20.18[gem(CH₃)₂], 18.95(C₂-CH₃)。以上数据与文献[5]基本一致,确定化合物为 3'(R)-(+) - 亥茅酚 [3'(R)-(+) -

hamaudol]。

化合物4 白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z 247 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.86 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-4), 7.41 (1H, s, H-5), 6.73 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3), 4.77 (1H, t, J = 8.7 Hz, H-2), 3.33 (1H, s, OH), 3.30 ~ 3.21 (2H, m, H-3'), 1.31 (3H, s, 5'-CH₃), 1.25 (3H, s, 6'-CH₃); ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ : 163.89 (C-2), 110.75 (C-3), 144.85 (C-4), 112.66 (C-4a), 123.59 (C-5), 125.88 (C-6), 162.34 (C-7), 155.52 (C-8a), 96.76 (C-8), 91.09 (C-2'), 28.86 (C-3'), 70.89 (C-4'), 23.95 (C-5'), 23.89 (C-6')。以上数据与文献[6]基本一致,确定化合物为异紫花前胡内酯[(-)-marmesin]。

化合物5 无色油状(二氯甲烷),ESI-MS m/z 236 [M]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.39 ~ 5.33 (m, 4H, CH₂CH = CHCH₂CH = CHCH₂), 2.77 (2H, t, J = 6.6 Hz, CHCH₂CH), 0.92 (3H, t, J = 6.3 Hz, CH₃), 0.88 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 14.09 (C-1), 22.70 (C-2), 31.94 (C-3), 29.67 (C-4), 27.21 (C-5, 11), 130.25 (C-6, 10), 127.90 (C-7, 9), 25.64 (C-8), 31.54 (C-15), 29.72 (C-12), 29.38 (C-13), 29.15 (C-14), 22.59 (C-16), 14.13 (C-17)。以上数据与文献[7]基本一致,确定化合物为十七烷(6Z, 9Z)-heptadecadiene。

化合物6 白色结晶(二氯甲烷),ESI-MS m/z 700 [M]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.93 ~ 0.96 (2H, m, H-1), 1.91 ~ 1.95 (2H, m, H-2), 3.44 (1H, br s, H-3), 0.78 ~ 0.81 (1H, m, H-5), 0.81 (1H, m, H-5), 0.96 ~ 0.99 (2H, m, H-6), 1.47 ~ 1.49 (2H, m, H-7), 0.96 ~ 0.99 (1H, m, H-9), 0.87 ~ 0.91 (2H, m, H-11), 0.87 ~ 0.91 (2H, m, H-12), 0.91 ~ 0.93 (1H, m, H-13), 0.87 ~ 0.91 (1H, m, H-15), 5.04 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-16), 0.56 ~ 0.59 (2H, m, H-19), 0.56 ~ 0.59 (2H, m, H-20), 1.03 (1H, overlap, H-21), 1.95 ~ 1.97 (1H, m, H-22), 0.96 (3H, overlap, H-23), 0.93 (3H, overlap, H-24), 0.87 (3H, overlap, H-25), 0.90 (3H, overlap, H-26), 0.91 (3H, overlap, H-27), 0.86 (3H, overlap, H-28), 1.18 (3H, overlap, H-29), 1.95 ~ 1.97 (2H, m, H-30), 1.90 ~ 1.93 (2H, m, H-31), 1.90 ~ 1.93 (1H, m, H-32), 0.72 (3H, overlap, H-32a), 2.50 ~ 2.51 (1H, m, H-33), 0.67 (3H,

overlap, H-33a), 2.50 ~ 2.51 (1H, m, H-34), 0.67 (3H, overlap, H-34a), 0.65 (3H, overlap, H-35), 5.14 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1'), 3.12 ~ 3.14 (1H, m, H-2'), 3.64 ~ 3.66 (1H, m, H-3'), 4.21 ~ 4.22 (1H, m, H-4'), 3.08 ~ 3.12 (1H, m, H-5'), 4.42 ~ 4.85 (2H, m, H-6'); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 37.30 (C-1), 31.85 (C-2), 77.37 (C-3), 45.61 (C-4), 55.89 (C-5), 19.09 (C-6), 29.74 (C-7), 36.69 (C-8), 51.06 (C-9), 40.27 (C-10), 21.58 (C-11), 24.34 (C-12), 50.07 (C-13), 42.33 (C-14), 33.81 (C-15), 121.68 (C-16), 140.90 (C-17), 42.21 (C-18), 37.30 (C-19), 29.74 (C-20), 56.64 (C-21), 35.96 (C-22), 29.17 (C-23), 19.32 (C-24), 19.41 (C-25), 20.19 (C-26), 19.58 (C-27), 19.09 (C-28), 21.07 (C-29), 25.35 (C-30), 23.07 (C-31), 23.07 (C-32), 21.42 (C-33), 25.90 (C-34), 12.15 (C-35), 12.60 (32-CH₃), 12.32 (33-CH₃), 12.26 (34-CH₃), 101.25 (C-1'), 77.23 (C-2'), 77.37 (C-3'), 70.56 (C-4'), 73.93 (C-5'), 61.56 (C-6')。以上碳谱数据与文献[8]基本一致,确定化合物为32,33,34-三甲基-16-烯-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(32,33,34-trimethyl-bacteriohopan-16-ene 3-*O*- β -D-glucopyranoside)。

化合物7 黄色针状结晶(甲醇),ESI-MS m/z 439 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.34 (1H, s, H-8), 6.07 (1H, s, H-3), 3.69 (1H, dd, J = 11.8, 5.7 Hz, H-2'), 3.00 (1H, dd, J = 17.1, 5.2 Hz, H-4'), 2.76 (1H, dd, J = 17.0, 6.8 Hz, H-3'), 2.38 (3H, s, H-2), 1.42 (3H, s, H-2'), 1.38 (3H, s, H-2'), 3.18 ~ 3.32 (6H, m, 糖上各质子信号); ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ : 168.08 (C-2), 20.76 (CH₃, C-2), 107.31 (C-3), 182.70 (C-4), 103.55 (C-4a), 158.97 (C-5), 103.52 (C-6), 158.97 (C-7), 94.33 (C-8), 156.23 (C-8a), 100.32 (Glc-1), 73.27 (Glc-2), 76.67 (Glc-3), 70.39 (Glc-4), 76.70 (Glc-5), 61.56 (Glc-6), 77.88 (C-2'), 24.61 (CH₃, C-2'), 21.73 (CH₃, C-2'), 72.78 (C-3'), 21.08 (C-4')。以上数据与文献[9]基本一致,确定化合物为亥茅酚苷(sec-*O*-glucosylhamaudol)。

化合物8 无色针晶(甲醇),ESI-MS m/z 169 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.45 (2H, m, J = 8.2 Hz, H-2, 6), 6.73 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 3.79 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ : 169.09 (C = O), 122.32 (C-2),

112.40(C-3), 147.19(C-4), 151.01(C-5), 114.36(C-6), 123.76(C-7), 54.97(OCH₃)。以上数据与文献[10]基本一致,确定化合物为香草酸(vanillic acid)。

化合物 9 无色针晶(甲醇),ESI-MS m/z 307 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 6.60(1H, s, H-8), 6.24(1H, s, H-3), 4.77(1H, t, J = 8.6 Hz, H-3'), 4.45(2H, s, H-CH₂OH), 3.94(3H, s, H-5), 3.33(2H, m, H-2'), 1.31(3H, s, H-5'), 1.25(3H, s, H-6'); ¹³C-NMR(151 MHz, CD₃OD) δ : 167.24(C-2), 107.89(C-3), 178.34(C-4), 165.67(C-5), 117.02(C-6), 159.70(C-7), 93.13(C-8), 155.60(C-9), 110.92(C-10), 59.77(CH₂-OH), 59.65(OCH₃), 27.35(C-2'), 91.22(C-3'), 70.84(C-4'), 24.03(C-5'), 23.96(C-6')。以上数据与文献[11]基本一致,确定化合物为升麻素(cimifugin)。

化合物 10 淡黄色针晶(甲醇),ESI-MS m/z 193 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 8.45(1H, s, 5-OH), 6.20(1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.07(1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 4.73(1H, s, 7-OH), 4.48(1H, s, H-3), 3.25(3H, s, 2-OCH₃); ¹³C-NMR(151 MHz, CD₃OD) δ : 167.81(C-2), 107.44(C-3), 182.53(C-4), 161.83(C-5), 98.76(C-6), 165.08(C-7), 93.61(C-8), 158.54(C-9), 103.49(C-10), 18.86(CH₃)。以上数据与文献[12]基本一致,确定化合物为 5,7-二羟基-2-甲基色原酮(noreugenin)。

化合物 11 白色针晶(甲醇),ESI-MS m/z 163 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 7.74(1H, d, J = 9.4 Hz, H-4), 7.35(1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 6.69(1H, dd, J = 8.5, 2.2 Hz, H-6), 6.61(1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.08(1H, d, J = 9.4 Hz, H-3); ¹³C-NMR(151 MHz, CD₃OD) δ : 161.90(C-2), 111.69(C-3), 144.65(C-4), 129.24(C-5), 113.17(C-6), 162.30(C-7), 102.02(C-8), 155.86(C-9), 110.86(C-10)。以上数据与文献[13]基本一致,确定化合物为伞形花内酯(umbelliferone)。

6 讨论

本实验采用 CPE 法,以 TI 为指标,对防风各极性部位进行了体外抗 HSV-1, EV71, RSV 活性筛选,结果防风二氯甲烷和乙酸乙酯部位 TI 范围为 8 ~ 16, 4 ~ 8, 有一定的体外抗 HSV-1 效果,进而对 2 部位进行了系统分离,共得到 11 个化合物,多为色原

酮和香豆素类化合物,其中 4 个化合物为首次从该属植物中分离。

防风为清热解表药,其主要成分为色原酮和香豆素两大类成分,预计其抗病毒活性与其相关。本试验初步筛选了其体外抗病毒活性部位,并通过化学成分研究丰富了防风中所含化合物种类,为研究其抗病毒活性作用及其物质基础提供初步实验依据,下一步拟进行抗病毒活性组分与单体成分的进一步筛选。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 221.
- [2] 窦红霞, 高玉兰. 防风化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 15-17.
- [3] 王硕, 龚小妹, 周丹丹, 等. 西瓜藤的化学成分研究(I)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 131-133.
- [4] CHANG M H, WANG G J, KUO Y H, et al. The low polar constituents from *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff [J]. J Chin Chem Soci, 2000, 47: 1131-1136.
- [5] HUANG P, Massatosh N, JIANG W H, et al. Studies on the chemical constituents of Mashanqianhu (*Peucedanum mshanense*) [J]. Chin Tradit Herb Drug, 1997, 28(10): 579-581.
- [6] Mansour Z, Hichem B J, Sylvie C, et al. Antioxidant, 5-lipoxygenase inhibitory and cytotoxic activities of compounds isolated from *Ferula lutea* flowers [J]. Molecules, 2014, 19(10): 16959-16975.
- [7] Twidle A M, Mas F, Harper A R, et al. Kiwifruit flower odor perception and recognition by honey bees, *Apis mellifera* [J]. J Agricult Food Chem, 2015, 63(23): 5597-5602.
- [8] Semwal R B, Semwal D K, Semwal R, et al. Chemical constituents from the stem bark of *Symplocos paniculata* Thunb. with antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(1): 78-87.
- [9] AN R B, Park B Y, Kim J H, et al. Coumarins and chromones from *Angelica genuflexa* [J]. Nat Prod Sci, 2005, 11(2): 79-84.
- [10] 孔娜娜, 方圣涛, 刘莺, 等. 罗布麻叶中非黄酮类化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3114-3118.
- [11] 但飞君, 褚立军, 田瑛, 等. 紫金沙抗菌活性部位的化学成分[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 299-300.
- [12] 李孝栋, 吴立军, 臧晓燕, 等. 东北珍珠梅化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(11): 841-843.
- [13] 郑峰, 孙文文, 张琦, 等. 苦荞籽粒的化学成分研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2011, 39(10): 199-203.

[责任编辑 顾雪竹]