

## 美花筋骨草乙酸乙酯部位化学成分分析

杨天龙, 秦玲玲, 冯丹, 胡瀚文, 郭大乐, 邓放\*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:研究美花筋骨草(*Ajuga ovalifolia* var. *calantha*)95%乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位的化学成分。方法:将美花筋骨草药材用95%乙醇渗漉,合并渗漉液减压浓缩得到浸膏,加水分散浸膏后用石油醚萃取,得到石油醚萃取部位和水层,再用乙酸乙酯对水层进行萃取,得到乙酸乙酯萃取部位。利用硅胶, LH-20型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20),小孔树脂(MCI), ODS等色谱柱及半制备型高效液相色谱等方法对美花筋骨草的乙酸乙酯萃取部位分离纯化,并利用NMR, ESI-MS等波谱手段对化合物进行结构鉴定。结果:从美花筋骨草中分离得到17个已知化合物,分别鉴定为蜂斗菜内酯-E(1), 黑麦草内酯(2), 异黑麦草内酯(3), (*E*)-linalool-1-oic acid(4), 伞形花内酯(5), 连翘脂素(6), 1-(4-hydroxyphenyl)-ethanol(7), (2*E*)-8-hydroxy-2, 6-dimethyl-2-octenoic acid(8), 1*H*-吡啶-3-羧酸(9), ajuugarin I(10), ajugalactone(11), 木犀草素(12), 20-hydroxyecdysone-2-acetate(13), benzyl-4'-hydroxy-benzoyl-3'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside(14), harpagide(15), 6-deoxy-8-acetylharpagide(16), acteoside(17)。结论:其中化合物1, 3~4, 6~9, 14均为初次在该属植物中分离得到, 化合物2, 5, 10, 13, 15~16均为初次在该植物中分离得到。

**[关键词]** 美花筋骨草; 乙酸乙酯部位; 化学成分; 结构鉴定

**[中图分类号]** R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0188-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202065

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200722.1831.008.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-23 09:32

### Chemical Constituents of Ethyl Acetate Extract from *Ajuga ovalifolia* var. *calantha*

YANG Tian-long, QIN Ling-ling, FENG Dan, HU Han-wen, GUO Da-le, DENG Fang\*

(Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding of Systematic Research Development and Utilization of Chinese Medical Resources, Co-founded by Sichuan Province and MOST, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the chemical constituents from the ethyl acetate extract of 95% ethanol extract from *Ajuga ovalifolia* var. *calantha*. **Method:** *A. ovalifolia* var. *calantha* was percolated with 95% ethanol, and the percolate was concentrated under reduced pressure to obtain the extract. The extract was then dispersed with water and extracted with petroleum ether to obtain the petroleum ether extract fraction and water layer. Then ethyl acetate was used to extract the water layer to obtain the ethyl acetate extract fraction. The Compounds from the ethyl acetate extract fraction were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, MCI column, ODS column chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography. Their structures were elucidated by interpretation of NMR, ESI-MS and other spectral evidence. **Result:** 17 Compounds were isolated and elucidated as bakkenolide-E(1), loliotide(2), isololiotide(3), (*E*)-linalool-1-oic

**[收稿日期]** 20191023(023)

**[基金项目]** 四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项计划项目(2016TD0006);四川省教育厅科研项目(18ZA0191)

**[第一作者]** 杨天龙,在读硕士,从事中药成分分析和质量标准研究, E-mail:1223802710@qq.com

**[通信作者]** \*邓放,博士,副教授,从事中药及其复方物质基础和质量控制研究, E-mail:dengf99@163.com

acid(4), umbelliferone(5), phillygenin(6), 1-(4-hydroxyphenyl)-ethanol(7), (2E)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-2-octenoic acid(8), 1H-indole-3-carboxylic acid(9), ajugarin I(10), ajugalactone(11), luteolin(12), 20-hydroxyecdysone-2-acetate(13), benzyl-4'-hydroxy-benzoyl-3'-O-β-D-glucopyranoside(14), harpagide(15), 6-deoxy-8-acetylharpagide(16), and acteoside(17). **Conclusion:** Compounds 1, 3-4, 6-9, 14 were isolated from the plants of *Ajuga* for the first time, and compounds 2, 5, 10, 13, 15-16 were isolated from this plant for the first time.

**[Key words]** *Ajuga ovalifolia* var. *calantha*; ethyl acetate extract; chemical constituents; structure identification

美花筋骨草分布于四川省西部及西北部、西藏自治区、青海省东南部等地。其性温,味甘、苦,具有补髓、接骨、干黄水、止血的功效。临床用于医治跌打损伤、筋骨疼痛和风湿性关节炎等<sup>[1-2]</sup>。据文献报道,美花筋骨草的化学成分复杂多样,主要包括萜类、甾体类、黄酮类、香豆素类、脂肪酸类、酚酸类等成分<sup>[3-5]</sup>。研究发现筋骨草属植物药理活性广泛,具有抑菌、抗炎、抗肿瘤、降血糖、抑制胆碱酯酶及钙离子拮抗等活性,具有广阔的开发潜力<sup>[6]</sup>。本课题组前期已分离得到13个化合物,主要为脂肪酸类、萜类、酚酸类化合物<sup>[7]</sup>。本文在此基础上,对美花筋骨草乙酸乙酯部位的化学成分进行了进一步分离,并鉴定了17个化合物,分别为蜂斗菜内酯-E(bakkenolide-E, 1),黑麦草内酯(loliotide, 2),异黑麦草内酯(isololiotide, 3), (E)-linalool-1-oic acid(4),伞形花内酯(umbelliferone, 5),连翘脂素(phillygenin, 6), 1-(4-hydroxyphenyl)-ethanol(7), (2E)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-2-octenoic acid(8), 1H-吲哚-3-羧酸(1H-indole-3-carboxylic acid, 9), ajugarin I(10), ajugalactone(11),木犀草素(luteolin, 12), 20-hydroxyecdysone-2-acetate(13), benzyl-4'-hydroxy-benzoyl-3'-O-β-D-glucopyranoside(14), harpagide(15), 6-deoxy-8-acetylharpagide(16), acteoside(17)。化合物1, 3, 4, 6~9, 14均为初次在该属植物中分离得到,化合物2, 5, 10, 13, 15, 16为初次在该植物中分离得到。

## 1 材料

Bruker AM-400型核磁共振仪(德国Bruker公司); Micromass Xevo Triple-quadrupole型质谱仪(Waters公司);中压色谱柱[利穗科技(苏州)有限公司]; NP7000型制备型高效液相色谱仪(江苏汉邦仪器有限公司); Dubhe C<sub>18</sub>色谱柱(20 mm×250 mm, 10 μm, 江苏汉邦科技有限公司); LH-20型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20, 瑞士Pharmacia公司); YMC Pack ODS-A色谱柱(10 mm×250 mm,

5 μm, 日本YMC公司);小孔树脂柱(MCI, 日本三菱化学公司);其他试剂均为分析纯(成都科龙化工试剂厂)。

美花筋骨草于2016年7月采收于四川阿坝红原县,经成都中医药大学药学院中药鉴定教研室龙飞副教授鉴定为唇形科筋骨草属植物美花圆叶筋骨草 *Ajuga ovalifolia* var. *calantha* 的干燥全草。标本(20160720)存放于成都中医药大学药学院中药分析实验室。

## 2 提取与分离

取美花筋骨草药材8 kg,用95%乙醇渗漉得到渗漉液20 L,渗漉液经MCI脱除色素后,减压浓缩得到总浸膏590.2 g。浸膏用5 L水分散,依次用石油醚、乙酸乙酯等体积萃取4次,萃取液减压浓缩得乙酸乙酯萃取部位37.9 g。乙酸乙酯部位通过中压硅胶柱色谱,用石油醚-丙酮(100:0~10:90)进行梯度洗脱,TLC检视合并相同馏分,得到组分Fr.1~Fr.28。Fr.4经Sephadex LH-20凝胶柱(三氯甲烷-甲醇,1:1)色谱得到Fr.4-2,进一步通过半制备型高效液相色谱用甲醇-水(30:70~80:20)洗脱纯化,得到化合物1(2.2 mg)。Fr.9通过Sephadex LH-20凝胶柱(三氯甲烷-甲醇,1:1)色谱得到Fr.9-1~Fr.9-6共6组流分,Fr.9-4通过硅胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇,9:1)等度洗脱得到Fr.9-4-2,通过半制备型高效液相色谱用甲醇-水(35:65~100:0)洗脱纯化,得到化合物2(7.9 mg);Fr.9-6通过半制备型高效液相色谱用甲醇-水(35:65~100:0)洗脱纯化,得到化合物4(2.4 mg);Fr.9-7通过半制备型高效液相色谱用甲醇-水(30:70~80:20)洗脱纯化,得到化合物5(4.5 mg)。Fr.10通过Sephadex LH-20凝胶柱(三氯甲烷-甲醇体系,1:1)色谱得到若干组分,Fr.10-4通过半制备型高效液相色谱反复制备,用甲醇-水(25:75~100:0)梯度洗脱,用15%甲醇纯化,得到化合物3(2.5 mg),再用50%甲醇纯化,得到化合物6(1.0 mg);Fr.10-6,Fr.10-7分别通过半高效液相色谱

反复制备,用甲醇-水(25:75~45:55)梯度洗脱,依次得到化合物**7**(4.1 mg),**8**(7.5 mg)。Fr.11通过聚酰胺色谱,用甲醇-水(5:95~60:40)梯度洗脱得到Fr.11-2,进一步通过Sephadex LH-20凝胶柱(三氯甲烷-甲醇,1:1)色谱得到Fr.11-2-1,通过半制备型高效液相色谱以15%甲醇洗脱纯化,得到化合物**9**(4.7 mg)。Fr.12通过聚酰胺色谱,用甲醇-水(0:100~50:50)梯度洗脱,得到Fr.12-1,再通过MCI色谱,用甲醇-水(10:90~70:30)梯度洗脱得到Fr.12-1-3,进一步通过半制备型高效液相色谱用甲醇-水(40:60~50:50)梯度洗脱,得到化合物**10**(2.5 mg)。Fr.14通过聚酰胺色谱,用甲醇-水(0:100~50:50)梯度洗脱得到Fr.14-2,Fr.14-7,Fr.14-2通过半制备型高效液相色谱以50%甲醇洗脱纯化,得到化合物**11**(14.5 mg);Fr.14-7通过半制备型高效液相色谱以65%甲醇洗脱纯化,得到化合物**12**(2.5 mg)。Fr.15通过Sephadex LH-20凝胶柱(三氯甲烷-甲醇,1:1)色谱得到若干组分,Fr.15-2通过半制备型高效液相色谱反复制备,用甲醇-水(53:47~100:0)梯度洗脱,得到化合物**13**(11.3 mg)。Fr.16通过聚酰胺色谱用甲醇-水(0:100~50:50)梯度洗脱得到Fr.16-2,通过半制备型高效液相色谱反复制备,用甲醇-水(45:55~75:25)以及50%甲醇洗脱纯化,得到化合物**14**(3.2 mg)。Fr.25通过C<sub>8</sub>柱色谱,用甲醇-水(5:95~30:70)梯度洗脱得到Fr.25-1,Fr.25-2,Fr.25-1通过半制备型高效液相色谱以32%甲醇纯化,得到化合物**15**(6.1 mg);Fr.25-2通过半制备型高效液相色谱用40%甲醇纯化,得到化合物**16**(18.4 mg)。Fr.28通过半制备型高效液相色谱用甲醇-水(35:65~55:45)梯度洗脱,得到化合物**17**(13.4 mg)。

### 3 结构鉴定

化合物**1** 白色结晶,ESI-MS  $m/z$  391[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.93(1H, qd,  $J=7.2$ , 1.4 Hz, H-3'), 5.75(1H, d,  $J=11.2$  Hz, H-9), 5.19(1H, s, H-13a), 5.16(1H, s, H-13b), 5.13(1H, m, H-1), 4.65(2H, t,  $J=1.9$  Hz, H-12), 2.81(1H, dd,  $J=11.2$ , 4.9 Hz, H-10), 2.24(1H, d,  $J=14.3$  Hz, H-6a), 1.95(1H, d,  $J=12.3$  Hz, H-6b), 1.93(3H, s, H-2''), 1.88(3H, dd,  $J=7.2$ , 1.5 Hz, H-4'), 1.83(2H, dd,  $J=8.8$ , 3.6 Hz, H-2a, 2b), 1.78(3H, m, H-5'), 1.73~1.53(2H, m, H-3a, 3b), 1.37(1H, m, H-4), 1.12(3H, s, H-15), 0.90(3H, d,  $J=6.7$  Hz, H-14); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 70.6(C-1), 29.7(C-2), 27.0(C-3), 35.5(C-4), 43.5(C-5), 46.1(C-6), 55.2(C-7), 177.6

(C-8), 81.0(C-9), 51.7(C-10), 148.0(C-11), 70.7(C-12), 108.4(C-13), 15.7(C-14), 19.7(C-15), 167.5(C-1'), 128.5(C-2'), 136.7(C-3'), 21.1(C-4'), 20.5(C-5'), 170.1(C-1''), 20.5(C-2'')。以上数据与文献[8]报道的蜂斗菜内酯-E基本一致,故鉴定化合物**1**为蜂斗菜内酯-E。

化合物**2** 淡黄色油状物,ESI-MS  $m/z$  197[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.68(1H, s, H-7), 4.34~4.29(1H, m, H-3), 2.46(1H, dt,  $J=14.1$ , 2.6 Hz, H-4a), 2.01~1.94(1H, m, H-2a), 1.77(3H, s, H-11), 1.79~1.75(1H, m, H-4b), 1.52(1H, dd,  $J=14.6$ , 3.7 Hz, H-2b), 1.46(3H, s, H-9), 1.26(3H, s, H-10); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 36.1(C-1), 47.4(C-2), 66.9(C-3), 45.8(C-4), 87.0(C-5), 172.1(C-6), 113.0(C-7), 182.8(C-8), 26.6(C-9), 27.1(C-10), 30.8(C-11)。以上数据与文献[9]报道的黑麦草内酯基本一致,故鉴定化合物**2**为黑麦草内酯。

化合物**3** 淡黄色油状物,ESI-MS  $m/z$  197[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.71(1H, s, H-7), 4.13(1H, m,  $J=11.4$ , 4.0 Hz, H-3), 2.54(1H, ddd,  $J=11.8$ , 4.0, 2.3 Hz, H-4a), 2.04(1H, ddd,  $J=12.8$ , 4.3, 2.3 Hz, H-2a), 1.58(3H, s, H-11), 1.49(1H, d,  $J=11.8$  Hz, H-4b), 1.31(1H, m, H-2b), 1.31(3H, s, H-10), 1.26(3H, d,  $J=5.1$  Hz, H-9); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 35.2(C-1), 50.0(C-2), 65.2(C-3), 48.1(C-4), 86.6(C-5), 171.6(C-6), 113.4(C-7), 180.9(C-8), 25.2(C-9), 25.7(C-10), 30.1(C-11)。以上数据与文献[9]报道的异黑麦草内酯基本一致,故鉴定化合物**3**为异黑麦草内酯。

化合物**4** 无色油状物,ESI-MS  $m/z$  183[M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.89(1H, t,  $J=7.1$  Hz, H-3), 5.91(1H, dd,  $J=17.3$ , 10.8 Hz, H-7), 5.24(1H, dd,  $J=17.3$ , 0.9 Hz, H-8b), 5.10(1H, dd,  $J=10.8$ , 0.9 Hz, H-8a), 2.34~2.16(2H, m, H-4), 1.83(3H, s, H-9), 1.66(2H, m, H-5), 1.32(3H, s, H-10); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 173.2(C-1), 127.3(C-2), 144.6(C-3), 23.8(C-4), 40.6(C-5), 73.2(C-6), 144.8(C-7), 112.5(C-8), 12.2(C-9), 28.2(C-10)。以上数据与文献[10]报道的(*E*)-linalool-1-oic acid基本一致,故鉴定化合物**4**为(*E*)-linalool-1-oic acid。

化合物**5** 白色固体,ESI-MS  $m/z$  163[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.84(1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-4), 7.44(1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5), 6.78(1H, dd,  $J=8.5$ , 2.3 Hz, H-6), 6.70(1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-8),

6.17 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 163.2 (C-2), 112.3 (C-3), 146.0 (C-4), 130.7 (C-5), 114.5 (C-6), 163.7 (C-7), 103.4 (C-8), 157.3 (C-9), 113.1 (C-10)。以上数据与文献[11]报道的伞形花内酯基本一致,故鉴定化合物**5**为伞形花内酯。

化合物**6** 白色固体,ESI-MS  $m/z$  373[M+H]<sup>+</sup>。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.95~6.83 (m, 6H, H-2, 2', 5, 5', 6, 6'), 5.59 (1H, s, OH), 4.88 (1H, d,  $J=5.6$  Hz, H-7'), 4.43 (1H, d,  $J=7.1$  Hz, H-7), 4.13 (1H, d,  $J=9.9$  Hz, H-9b), 3.91 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.91 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.89 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.85 (2H, m, H-9a, H-9'a), 3.32 (2H, m, H-8', H-9'b), 2.91 (1H, dd,  $J=15.1, 6.3$  Hz, H-8);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 133.2 (C-1), 109.1 (C-2), 146.9 (C-3), 145.5 (C-4), 114.4 (C-5), 119.3 (C-6), 87.9 (C-7), 54.7 (C-8), 71.2 (C-9), 131.1 (C-1'), 108.7 (C-2'), 149.0 (C-3'), 148.2 (C-4'), 111.2 (C-5'), 117.9 (C-6'), 82.2 (C-7'), 50.3 (C-8'), 69.9 (C-9'), 56.1 (3, 3', 4'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[12]报道的连翘脂素基本一致,故鉴定化合物**6**为连翘脂素。

化合物**7** 无色针状晶体,ESI-MS  $m/z$  137[M+H]<sup>+</sup>。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.03 (1H, dt,  $J=2.78, 8.51$  Hz, H-3, 5), 6.70 (1H, dt,  $J=3.11, 8.43$  Hz, H-2, 6), 3.68 (1H, t,  $J=7.2$  Hz, H-1'), 2.71 (1H, t,  $J=7.2$  Hz, H-2');  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 156.8 (C-1), 116.1 (C-2, 6), 130.9 (C-3, 5), 131.0 (C-4), 64.6 (C-1'), 39.4 (C-2')。以上核磁数据与文献[13]报道的1-(4-hydroxyphenyl)-ethanol基本一致,故鉴定化合物**7**为1-(4-hydroxyphenyl)-ethanol。

化合物**8** 黄色油状物,ESI-MS  $m/z$  185[M-H]<sup>-</sup>。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.77 (1H, td,  $J=7.4, 1.1$  Hz, H-3), 3.67-3.54 (2H, m, H-8), 2.31-2.14 (2H, m, H-4), 1.82 (3H, s, H-10), 1.68~1.55 (2H, m, H-6, 7a), 1.48 (1H, m,  $J=9.1, 8.0, 6.0$  Hz, H-5a), 1.43~1.24 (2H, m, H-5b, 7b), 0.93 (3H, t,  $J=7.4$  Hz, H-9);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 172.1 (C-1), 129.0 (C-2), 143.8 (C-3), 27.2 (C-4), 37.0 (C-5), 30.5 (C-6), 40.6 (C-7), 61.0 (C-8), 12.5 (C-9), 19.8 (C-10)。以上数据与文献[14]报道的(2E)-8-hydroxy-2, 6-dimethyl-2-octenoic acid基本一致,故鉴定化合物**8**为(2E)-8-hydroxy-2, 6-dimethyl-2-octenoic acid。

化合物**9** 黄色固体,ESI-MS  $m/z$  160[M-H]<sup>-</sup>。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.07 (1H, dd,  $J=6.6,$

1.7 Hz, H-4), 7.94 (1H, s, H-2), 7.45~7.41 (1H, m, H-7), 7.22~7.13 (2H, m, H-5, 6)。  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 133.3 (C-2), 108.9 (C-3), 122.1 (C-4), 122.3 (C-5), 123.6 (C-6), 112.9 (C-7), 127.6 (C-9), 138.2 (C-8), 169.4 (3-COOH)。以上数据与文献[15]报道的1H-吲哚-3-羧酸基本一致,故鉴定化合物**9**为1H-吲哚-3-羧酸。

化合物**10** 白色固体,ESI-MS  $m/z$  435[M+H]<sup>+</sup>。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 5.89 (1H, s, H-14), 4.91 (2H, dd,  $J=12.0, 2.7$  Hz, H-16), 4.87 (1H, s, H-19a), 4.81 (1H, d,  $J=3.1$  Hz, H-6), 4.41 (1H, dd,  $J=12.1, 1.9$  Hz, H-19b), 3.02 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-18a), 2.41-2.35 (2H, m, H-12a, 18b), 2.28~2.14 (3H, m, H-2a, 3a, 12b), 2.08 (3H, d,  $J=3.1$  Hz, 19-OAc), 1.92 (3H, d,  $J=3.1$  Hz, 6-OAc), 1.60 (8H, m, H-1, 2b, 7, 8, 10, 11), 1.03 (1H, d,  $J=12.5$  Hz, H-3b), 0.89~0.84 (3H, m, H-20), 0.79 (3H, d,  $J=3.0$  Hz, H-19);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 173.8 (C-15), 171.0 (6-OCOCH<sub>3</sub>), 170.2 (19-OCOCH<sub>3</sub>), 169.9 (C-13), 115.6 (C-14), 73.1 (C-16), 72.3 (C-6), 65.2 (C-4), 61.9 (C-19), 48.6 (C-18), 48.3 (C-10), 45.3 (C-5), 38.5 (C-9), 34.8 (C-8, 11), 33.0 (C-7), 32.7 (C-3), 25.2 (C-2), 22.1 (C-12), 21.1 (C-1), 17.5 (C-17), 15.4 (C-20), 21.3 (6, 19-OCOCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[16]报道的ajugarin I基本一致,故鉴定化合物**10**为ajugarin I。

化合物**11** 无色油状物,ESI-MS  $m/z$  519[M+H]<sup>+</sup>。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 5.98 (1H, d,  $J=2.6$  Hz, H-7), 4.20 (1H, dd,  $J=13.2, 3.7$  Hz, H-22), 3.96 (1H, d,  $J=2.6$  Hz, H-3), 3.82~3.77 (1H, m, H-2), 3.57~3.52 (1H, m, H-9), 2.92 (1H, dd,  $J=10.1, 8.3$  Hz, H-17), 2.78 (1H, dd,  $J=14.8, 10.3$  Hz, H-5), 2.52~2.32 (6H, m, H-4b, 11a, 11b, 15a, 16a, 23a), 2.27~2.20 (1H, m, H-16b), 2.11 (1H, m, H-15b), 1.87 (3H, s, H-27), 1.82~1.70 (4H, m, H-4a, 23a, 28), 1.68 (1H, dd,  $J=13.7, 4.4$  Hz, H-1a), 1.52~1.46 (1H, m, H-1b), 1.28 (3H, s, H-21), 1.24 (3H, s, H-19), 1.13 (3H, t,  $J=7.6$  Hz, H-29), 1.10 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 212.3 (C-12), 205.1 (C-6), 169.3 (C-26), 163.0 (C-8), 157.2 (C-24), 123.9 (C-7), 121.7 (C-25), 90.0 (C-14), 83.9 (C-22), 68.4 (C-2, 3), 75.9 (C-20), 62.1 (C-13), 51.3 (C-5), 44.2 (C-17), 40.4 (C-10), 37.6 (C-1), 37.3 (C-11), 37.2 (C-9), 32.3 (C-4), 32.0 (C-15), 30.4 (C-23), 28.0 (C-

28), 23.8(C-19), 21.8(C-21), 21.2(C-16), 17.8(C-18), 12.0(C-27), 11.8(C-29)。以上数据与文献[17]报道的ajugalactone基本一致,故鉴定化合物11为ajugalactone。

化合物12 淡黄色粉末,ESI-MS  $m/z$  289[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.38(2H, dd,  $J=6.4, 2.2$  Hz, H-2', 6'), 6.91(1H, d,  $J=8.8$  Hz, H-5'), 6.54(1H, s, H-3), 6.43(1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-8), 6.22(1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 183.9(C-4), 166.4(C-7), 166.2(C-2), 163.2(C-9), 159.4(C-5), 151.0(C-4'), 147.1(C-3'), 123.7(C-6'), 120.3(C-1'), 116.8(C-5'), 114.2(C-2'), 105.3(C-10), 103.9(C-3), 100.1(C-6), 95.0(C-8)。以上数据与文献[5]报道的木犀草素基本一致,故鉴定化合物12为木犀草素。

化合物13 白色不定型粉末,ESI-MS  $m/z$  523[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 5.83(1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-7), 4.98(1H, ddd,  $J=12.2, 4.1, 3.1$  Hz, H-2), 4.10(1H, s, H-3), 3.33(1H, m, H-22), 3.23(1H, m, H-9), 2.44(1H, dd,  $J=13.3, 4.1$  Hz, H-5), 2.40(1H, m, H-17), 2.16(1H, m, H-12a), 2.00~1.56(13H, m, H-1a, 1b, 4a, 4b, 11a, 11b, 12b, 15a, 15b, 16a, 16b, 23a, 23b), 1.44(1H, m, H-24b), 1.30(1H, m, H-23a), 1.21(3H, s, H-27), 1.20(3H, s, H-26), 1.19(3H, s, H-21), 0.99(3H, s, H-19), 0.89(3H, s, H-18); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 205.7(C-6), 172.4(2-OCOCH<sub>3</sub>), 168.1(C-8), 122.2(C-7), 85.2(C-14), 78.4(C-22), 77.9(C-20), 72.7(C-2), 71.3(C-25), 66.1(C-3), 51.7(C-5), 50.5(C-17), 49.0(C-13), 42.3(C-24), 39.5(C-10), 35.0(C-9), 34.0(C-1), 32.8(C-4), 32.5(C-12), 31.8(C-15), 29.7(C-27), 29.0(C-26), 27.3(C-23), 24.2(C-19), 21.5(C-11), 21.5(C-16), 21.1(C-21), 21.1(2-OCOCH<sub>3</sub>), 18.0(C-18)。以上数据与文献[18]报道的20-hydroxyecdysone-2-acetate基本一致,故鉴定化合物13为20-hydroxyecdysone-2-acetate。

化合物14 淡黄色粉末,ESI-MS  $m/z$  407[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.63(1H, d,  $J=3.1$  Hz, H-2'), 7.48(2H, m, H-2, 6), 7.38(3H, m, H-3, 4, 5), 7.32(1H, dd,  $J=9.1, 3.1$  Hz, H-6'), 6.89(1H, d,  $J=9.1$  Hz, H-5'), 5.40(2H, d,  $J=3.4$  Hz, H-7), 4.75(1H, d,  $J=6.4$  Hz, H-1''), 3.80(1H, dd,  $J=12.1, 2.3$  Hz, H-6'a), 3.68(1H, dd,  $J=12.2, 4.8$  Hz, H-6'b), 3.42(4H, m, H-2'', 3'', 4'', 5''); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz,

CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 170.8(C-7'), 158.4(C-4'), 151.6(C-3'), 137.1(C-1), 129.7(C-3, 5), 129.5(C-4), 129.4(C-2, 6), 127.4(C-6'), 119.2(C-5'), 118.5(C-2'), 113.4(C-1'), 103.7(C-1''), 78.1(C-5''), 78.0(C-3''), 74.9(C-2''), 71.2(C-4''), 68.2(C-7), 62.3(C-6'')。以上数据与文献[19]报道的benzyl-4'-hydroxy-benzoyl-3'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside基本一致,故鉴定化合物14为benzyl-4'-hydroxy-benzoyl-3'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside。

化合物15 白色粉末,ESI-MS  $m/z$  365[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.31(1H, d,  $J=6.4$  Hz, H-3), 5.74(1H, s, H-1), 4.95(1H, dd,  $J=6.4, 1.3$  Hz, H-4), 4.57(1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-1'), 3.89(1H, dd,  $J=12.3, 1.7$  Hz, H-6), 3.68(2H, m, H-6'a, 6'b), 3.33(3H, m, H-3', 4', 5'), 3.21(1H, dd,  $J=9.1, 8.1$  Hz, H-2'), 2.54(1H, s, H-9), 1.90(1H, dd,  $J=13.6, 4.7$  Hz, H-7a), 1.79(1H, dd,  $J=13.6, 3.9$  Hz, H-7b), 1.24(3H, s, H-10); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 142.5(C-3), 108.5(C-4), 99.4(C-1'), 93.2(C-1), 78.3(C-8), 78.2(C-5'), 78.1(C-3'), 77.5(C-6), 74.5(C-2'), 72.4(C-5), 71.7(C-4'), 62.7(C-6'), 59.6(C-9), 47.2(C-7), 24.9(C-10)。以上数据与文献[20]报道的harpagide基本一致,故鉴定化合物15为harpagide。

化合物16 白色粉末,ESI-MS  $m/z$  391[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.37(1H, d,  $J=6.5$  Hz, H-3), 5.91(1H, s, H-1), 4.94(2H, d,  $J=6.3$  Hz, H-4), 4.56(1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-1'), 3.88(1H, dd,  $J=18.4, 6.4$  Hz, H-6'a), 3.69(2H, dd,  $J=11.8, 4.1$  Hz, H-5', 6'b), 3.34(1H, s, H-4'), 3.19(1H, t,  $J=8.5$  Hz, H-2'), 2.63(1H, s, H-9), 2.23~2.15(1H, m, H-6a), 2.09(1H, dd,  $J=13.6, 7.2$  Hz, H-7a), 2.02(3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.73-1.60(2H, m, H-6b, 7b), 1.48(3H, s, H-10); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 173.4(CH<sub>3</sub>CO), 142.8(C-3), 109.4(C-4), 99.5(C-1'), 93.9(C-1), 90.1(C-8), 78.2(C-5'), 77.6(C-3'), 74.5(C-2'), 72.6(C-5), 71.6(C-4'), 62.7(C-6'), 58.3(C-9), 38.8(C-7), 38.0(C-6), 22.2(C-10), 21.7(CH<sub>3</sub>CO)。以上数据与文献[21]报道的6-deoxy-8-acetylharpagide基本一致,故鉴定化合物16为6-deoxy-8-acetylharpagide。

化合物17 白色粉末,ESI-MS  $m/z$  625[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.60(1H, d,  $J=15.9$  Hz, H- $\beta'$ ), 7.06(1H, s, H-2'''), 6.96(1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-6'''), 6.78(1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-5'''), 6.69(2H, m, H-2, 5), 6.57(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-6), 6.28

(1H, d,  $J=15.9$  Hz, H- $\alpha'$ ), 5.19(1H, s, H-1"), 4.38(1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-1'), 4.10~3.40(12H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'a, 6'b, 2", 3", 4", 5",  $\alpha$  a,  $\alpha$  b), 2.79(2H, t,  $J=6.9$  Hz, H- $\beta$  a,  $\beta$  b), 1.10(3H, d,  $J=6.1$  Hz, H-6");  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 146.1 (C-3), 144.7 (C-4), 131.4 (C-1), 121.3 (C-6), 117.1 (C-2), 116.5 (C-3), 72.3 (C- $\alpha$ ), 36.5 (C- $\beta$ ), 104.2 (C-1'), 81.6 (C-3'), 76.2 (C-2'), 76.0 (C-5'), 70.6 (C-4'), 62.3 (C-6'), 103.0 (C-1"), 73.8 (C-4"), 72.3 (C-2"), 72.1 (C-3"), 70.4 (C-5"), 18.5 (C-6"), 168.2 (CO), 149.8 (C-4"), 148.0 (C- $\beta'$ ), 146.8 (C-3"), 127.6 (C-1"), 123.2 (C-6"), 116.5 (C-5"), 115.2 (C-2"), 114.7 (C- $\alpha'$ )。以上数据与文献[22]报道的 acteoside 基本一致,故鉴定化合物 17 为 acteoside。

#### 4 讨论

本实验从美花筋骨草的乙酸乙酯部位中分离得到 17 个化合物,化合物 1~3, 10 为萜类,化合物 4, 8 为脂肪酸类,化合物 5 为香豆素类,化合物 6 为木质素类,化合物 7, 14 为芳香族类,化合物 9 为吡啶类,化合物 11, 13 为甾醇类,化合物 12 为黄酮类,化合物 15, 16 为环烯醚萜类,化合物 17 为苯丙素类,其中化合物 1, 3, 4, 6~9, 14 均为初次在筋骨草属植物中分离得到,化合物 2, 5, 10, 13, 15, 16 为初次在美花筋骨草中分离得到。化合物 1 是倍半萜类化合物,研究表明该类化合物有细胞增殖抑制作用,具有的潜在的抗癌作用<sup>[23]</sup>。化合物 2(黑麦草内酯)与 3(异黑麦草内酯)为非对映异构体,研究表明化合物 2 具有中等免疫抑制活性<sup>[24]</sup>及强的细胞毒活性<sup>[25]</sup>。化合物 5 具有抗惊厥作用和昆虫拒食作用<sup>[26-27]</sup>。化合物 6 可以抑制炎症因子的释放,起到抗炎的作用<sup>[28]</sup>。化合物 10 具有昆虫拒食作用<sup>[29]</sup>。化合物 12 对 5 种癌细胞有较好的抑制作用,还可以促进宫颈癌细胞和结肠癌细胞凋亡<sup>[30-31]</sup>。化合物 15 和化合物 16 是环烯醚萜类化合物,化合物 15 可以激活 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路来减弱神经元凋亡,是一种有治疗脊髓损伤前途的药物<sup>[32]</sup>。这些化合物的药理活性与美花筋骨草的传统用药有相似的部分,为后续的药理活性研究提供了物质基础。

美花筋骨草生长于海拔 3 000~4 300 m 的山坡草地及砂质山坡草地。由于青藏高原的特殊生态环境、生物学特性和长期的滥采使野生植物资源面临日益枯竭的状况,合理开发及利用美花筋骨草是其发展以及环境保护中所必须面临的问题。本课题组通过对美花筋骨草的化学成分进行系统的提

取分离,为美花筋骨草的药效活性成分研究提供物质基础,这对于美花筋骨草的保护及有效利用具有重要的意义。

#### [参考文献]

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:119-121.
- [2] 四川省食品药品监督管理局. 四川省藏药材标准[M]. 成都:四川科学技术出版社,2014:137.
- [3] 邓放. 美花圆叶筋骨草的化学成分与质量研究[D]. 成都:成都中医药大学,2009.
- [4] 张慧,夏厚林,杨孟妮,等. HPLC 测定美花筋骨草中三种黄酮的含量[J]. 中药与临床,2017,8(2):19-21.
- [5] 陈银,杨凡,敖慧,等. 美花圆叶筋骨草的化学成分研究[J]. 中草药,2017,48(17):3475-3479.
- [6] 李卫文,吴文玲,刘守金,等. 筋骨草属植物的化学成分[J]. 安徽医药,2009,13(3):329-336.
- [7] 秦玲玲,胡瀚文,冯丹,等. 美花筋骨草化学成分研究[J]. 中药材,2018,41(9):2101-2104.
- [8] 侯臣杰,王光寅,吴迎春,等. 掌叶蜂斗菜根部倍半萜成分的研究[J]. 中成药,2016,38(9):1970-1974.
- [9] 肖美添,叶静,洪本博,等. 白苞蒿化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(6):414-417.
- [10] 邹涛,何红平,赵庆,等. 黄桐枝叶的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(10):1610-1613.
- [11] 邓可众,丁邑强,周斌,等. 枳壳化学成分的分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14):36-38.
- [12] KWAK J H, KANG M W, ROH J H, et al. Cytotoxic phenolic compounds from *Chionanthus retusus* [J]. Arch Pharm Res, 2009,32(12):1681-1687.
- [13] LOU H, YUAN H, YAMAZAKI Y, et al. Alkaloids and flavonoids from peanut skins [J]. Planta Med, 2001,67(4):345-349.
- [14] WANG L Y, CHEN M H, WU J, et al. Bioactive glycosides from the twigs of *Litsea cubeba* [J]. J Nat Prod, 2017,80(6):1808-1818.
- [15] 刘远,欧阳富,于海洋,等. 马蓝叶化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志,2009,19(4):273-275.
- [16] KURIA K A M, CHEPKWONY H, GOVAERTS C, et al. The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga reptans* [J]. J Nat Prod, 2002,65(5):789-793.
- [17] CALCAGNO M P, CAMPS F, COLL J, et al. A new family of phytoecdysteroids isolated from aerial part of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* [J]. Tetrahedron, 1995,51(44):12119-12126.
- [18] BUDESINSKY M, VOKAC K, HARMATHA J, et al. Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides* [J]. Steroids, 2008,73(5):502-514.

- [19] KIM J P, SONG S B, LEE I, et al. Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *longituba* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(11): 3483-3487.
- [20] POTTERAT O, SAADOU M, HOSTETTMANN K. Iridoid glucosides from *Rogeria adenophylla* [J]. *Planta Med*, 1989, 55(7): 630-630.
- [21] ISAEV I M, AGZAMOVA M A, ISAEV M I. Genkwanin and iridoid glycosides from *Leonurus turkestanicus* [J]. *Chem Nat Compd+*, 2011, 47(1): 132-134.
- [22] STICHER O, LAHLOUB M. Phenolic glycosides of *Paulownia tomentosa* Bark [J]. *Planta Med*, 1982, 46(11): 145-148.
- [23] 张福金. 毛裂蜂斗菜中蜂斗菜总内酯的制备及生物活性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [24] OKADA N, SHIRATA K, NIWANO M, et al. Immunosuppressive activity of a monoterpene from *Eucommia ulmoides* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(1): 281-282.
- [25] 苏镜娉. 耳壳藻 *Peyssonnelia caulifera* 抗肿瘤有效成分的研究[J]. *中国海洋药物*, 1992, 11(3): 1-3.
- [26] 靳隽, 陈正跃, 王永学, 等. 瑞香狼毒成分抗惊厥作用的初步研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(6): 779-781.
- [27] 张国洲, 徐汉虹, 王亚维. 瑞香亭等化合物对昆虫的生物活性测定[J]. *青海大学学报: 自然科学版*, 2002, 20(1): 23-24.
- [28] 汤韵秋, 全云云, 余琳媛, 等. 连翘脂素对LPS诱导RAW264. 7细胞炎症反应的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(7): 1117-1123.
- [29] KUBO I, LEE Y W, BALOGH-NAIR V, et al. Structure of *Ajugarins* [J]. *J Chem Soc Chem Commun*, 1976(22): 949-950.
- [30] 潘磊, 黄超, 周健, 等. 木犀草素对宫颈癌细胞增殖、迁移及Ras-MAPK通路的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(18): 4310-4313.
- [31] 王丽芳, 赵方毓, 唐鲜娥, 等. 木犀草素通过线粒体凋亡途径诱导SW480结肠癌细胞的凋亡作用研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(17): 1862-1864, 1875.
- [32] RONG Y L, LIU W, ZHOU Z, et al. Harpagide inhibits neuronal apoptosis and promotes axonal regeneration after spinal cord injury in rats by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 148: 91-99.

[责任编辑 顾雪竹]