

牡丹皮正丁醇部位化学成分研究

陆彩侠¹,孔垂皓¹,唐旭¹,
吴丝雨^{1,2},张翠¹,吴德玲¹,王仁中^{1*},许凤清^{1,2*}¹安徽中医药大学药学院 安徽省中药饮片制造新技术重点实验室,合肥 230012;²太和县中医院,太和 236600

摘要:研究牡丹皮 85% 乙醇提取物正丁醇萃取部位化学成分及其抗炎、抗菌的活性。采用大孔树脂柱色谱、硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱结合反相中压柱色谱和半制备色谱技术,分离纯化牡丹皮的正丁醇萃取部位,并利用核磁共振波谱、质谱数据与文献比对鉴定化合物的结构。从牡丹皮乙醇提取部位的正丁醇萃取物中得到 16 个化合物,分别为 5-hydroxy-3S-hydroxymethyl-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran (**1**)、(S)-(6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl) methanol (**2**)、4-thujone-7-hydroxyl-8-O-β-D-glucopyranoside (**3**)、resacetophenone (**4**)、acetoisovanillone (**5**)、2,5-二羟基-4-甲氧基-苯乙酮 (**6**)、3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propan-1,2-diol (**7**)、erythro-1-(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-propan-1,2-diol (**8**)、threo-1-(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-propan-1,2-diol (**9**)、(+)-儿茶素 (**10**)、(+)-儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (**11**)、对羟基苯甲酸-β-D-吡喃葡萄糖苷 (**12**)、苯甲酸-β-D-吡喃葡萄糖苷 (**13**)、没食子酸乙酯 (**14**)、没食子酸甲酯 (**15**)、香草酸 (**16**)。化合物 **2**、**7**~**9** 和 **11**~**16** 均首次从芍药属中分离得到。活性筛选发现化合物 **1** 能够抑制脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞中的炎症因子水平 (NO、TNF-α 和 IL-6),其 IC₅₀ 值分别为 15.67 ± 1.20、18.59 ± 1.27 和 15.79 ± 1.20 μmol/L。

关键词:牡丹皮;单萜;酚酸;结构鉴定;抗炎;抗菌

中图分类号:R284;R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)10-1714-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.10.008

Chemical constituents from n-butyl alcohol extracts of Moutan Cortex

LU Cai-xia¹, KONG Chui-hao¹, TANG Xu¹,
WU Si-yu^{1,2}, ZHANG Cui¹, WU De-ling¹, WANG Ren-zhong^{1*}, XU Feng-qing^{1,2*}¹Anhui Province Key Laboratory of New Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces,
School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;²Taihe County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taihe 236600, China

Abstract: This study aims to investigate the chemical constituents of n-butyl alcohol extracts from the 85% ethanol extract of the Moutan Cortex. Compounds were isolated and purified via combinative chromatographic techniques, including macroporous resin, silica gel, Sephadex LH-20 gel, along with mid-pressure and semi-preparative reversed-phase chromatography. The structures of monomeric compounds were elucidated by the data of NMR and MS. Sixteen compounds were obtained and identified as 5-hydroxy-3S-hydroxymethyl-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran (**1**), (S)-(6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl) methanol (**2**), 4-thujone-7-hydroxyl-8-O-β-D-glucopyranoside (**3**), resacetophenone (**4**), acetoisovanillone (**5**), 2,5-dihydroxy-4-methoxyacetophenone (**6**), 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propan-1,2-diol (**7**), erythro-1-(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-propan-1,2-diol (**8**), threo-1-(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-propan-1,2-diol (**9**), (+)-catechin (**10**), (+)-catechin-7-O-β-D-glucopyranoside (**11**), p-hydroxybenzoic acid β-D-glucopyranoside (**12**), β-D-glucopyranosyl benzoate (**13**), ethyl gallate (**14**), gallicin (**15**) and vanillic acid (**16**), respectively. Among them, compounds **2**, **7-9** and **11-16** were obtained from the genus *Paeonia* for the first time. Activity screening showed that **1** inhibited the NO, TNF-α and IL-6 inflammatory cytokines levels with IC₅₀ of 15.67 ± 1.20, 18.59 ± 1.27 and 15.79 ± 1.20 μmol/L in lipopolysaccharide-induced

RAW 264.7 macrophages.

Key words: Moutan Cortex; monoterpene; phenolic acid; structural identification; anti-inflammatory; antibacterial

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,始载于《神农本草经》,具有清热凉血、活血化瘀的功效^[1]。研究表明,牡丹皮含有单萜、酚类、三萜其苷类等成分类型,其活血化瘀作用主要与丹皮酚和芍药苷类成分有关,清热凉血主要与抗炎抑菌作用相关^[2]。安徽省铜陵地区自古是牡丹皮的道地产区,所产牡丹皮药材以皮大、木心小、香气足闻名,品质上乘,习称“凤丹皮”。前期研究组从铜陵凤凰山产牡丹皮的水溶性部位及正丁醇萃取部位分离得到蒽烷型的单萜苷、丹皮酚苷类成分,并发现芍药苷类成分具有抗炎作用^[3-5]。本文继续报道牡丹皮正丁醇萃取部位中分离得到的其余类型单萜和酚性化学成分及部分单萜类成分的抗炎和抗菌活性研究工作。

1 材料与方法

1.1 材料

牡丹皮采集于安徽省铜陵市“安徽省道地药材铜陵凤丹 GAP 规模化种植示范基地”,刮去表皮,去除木心,阴干。由安徽中医药大学方成武教授鉴定为毛茛科芍药属植物牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 的干燥根皮。凭证标本 (NO. ACM20180911) 存放于安徽中医药大学标本中心。

1.2 仪器与试剂

Bruker AV-400 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司);捷欧路 JNM-ECP 600 MHz 型超导核磁共振仪 (日本电子株式会社);Xevo TQ-S-型质谱仪 (美国 Waters 公司);日本 JASCO P2000-型旋光仪 (日本 JASCO 公司);Waters 1525-型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司);Flash System/Cheetah-型中压液相色谱仪 (美国博纳艾杰尔科技有限公司), YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (10.0 mm × 250 mm, S-5 μm, 12 nm, 日本株式会社 YMC);Milli-Q 超纯水系统 (德国达姆施塔特默克集团);AB135-S-型电子天平 (瑞士梅特勒-托力多仪器 (上海) 公司), EYELAN-1300 型旋转蒸发器 (日本东京理化公司);硅胶 (硅胶 G, 200~300 目, 300~400 目, 青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20 (50~75 μm, 美国 GE 公司);ODS-反相填料 (20~45 μm, 日本 Fuji Silysia Chemical Ltd 公司);Spectra Max i3X 酶标仪 (奥地利美谷分子公司);ZCOR-1150CO₂ 培养箱 (上海智城分析仪器制

造有限公司);SW-40 超净工作台 (河流科技有限公司);AB-8 型大孔树脂 (沧州宝恩吸附树脂材料科技有限公司)。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (批号: C15166767, 上海麦克林生化科技股份有限公司);高糖培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) (批号: C11885500, 康源生物科技股份有限公司);胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (批号: 2396897P)、CCK-8 试剂盒 (批号: 22210343)、胰蛋白胍 (批号: 54240304003)、酵母提取物 (批号: 5230821002)、马铃薯葡萄糖肉汤培养基 (potato dextrose broth, PDB) (批号: 20231204)、琼脂粉 (批号: 2230821006)、二甲基亚砜 (批号: 401F0311) 均购于北京索莱宝生物科技有限公司;NO 检测试剂盒 (批号: S3090, 上海碧云天生物科技有限公司);小鼠 TNF-α 试剂盒 (批号: 110712001104841104)、小鼠 IL-6 试剂盒 (批号: 110712001192481104) (上海江莱生物科技有限公司);地塞米松 (纯度 ≥ 98%, 批号: 109955, 山东思科捷生物技术有限公司);氯化钠 (分析纯, 批号: 2308312, 西陇科学股份有限公司);氘代试剂 (美国 Cambridge Isotope Laboratories Inc);液相用乙腈、甲醇 (色谱纯, 美国天地公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 提取与分离

50 kg 牡丹皮粉碎成粗粉, 85% 乙醇浸泡过夜。渗漉提取, 提取液减压回收溶剂至无醇味, 加水分散。依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 减压回收溶剂, 得到相应萃取部位。取正丁醇萃取部位, 50% 乙醇复溶, 吸附于 AB-8 型大孔树脂, 挥干溶剂, 依次用 0%、20%、40%、60%、80%、95% 乙醇-水洗脱, 减压回收溶剂, 获得相应的洗脱流分。20% 乙醇-水洗脱部位获得的浸膏经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇, 85: 15 → 50: 50, V/V) 洗脱, 每 5L 收集一个流分, 经 TLC 检识合并相同的流分后得到 Fr. 1 ~ Fr. 8。Fr. 1 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇) 后得到流分 Fr. 1.1 ~ Fr. 1.2; 将流分 Fr. 1.1 经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇, 60: 1), Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇), 经制备柱色谱 (40% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min, $t_R = 19.0$ min, 检测波长 230 nm) 获得化合物 1 (16.00 mg)。Fr. 1.1.2 经制备柱色谱 (15% 甲

醇-水,流速 3.0 mL/min,检测波长为 210 nm)纯化后获得化合物 **7** ($t_R = 17.0$ min, 2.50 mg) 和 **9** ($t_R = 30.0$ min, 3.60 mg)。Fr. 1.2 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,98:2)纯化后经制备柱色谱(15% 甲醇-水,流速 3.0 mL/min,检测波长为 296 nm, $t_R = 31.0$ min)得化合物 **8** (2.70 mg)。Fr. 2 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)后得到流分 Fr. 2.1 ~ Fr. 2.3;流分 Fr. 2.2 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,98:7)和 Rp-18(15% 甲醇)得化合物 **12** (5.70 mg)。Fr. 4 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,90:10)得到流分 Fr. 4.1 和 Fr. 4.2,将 Fr. 4.1 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)得化合物 **15** (6.50 mg)。Fr. 4.2 经制备柱色谱(40% 甲醇-水,流速 2.0 mL/min,检测波长为 280 nm, $t_R = 10.0$ min)得化合物 **10** (5.00 mg)。Fr. 6 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇),Rp-18(40% 甲醇-水),硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,95:10)得到流分 Fr. 6.1 和 Fr. 6.2。流分 Fr. 6.1 经制备柱色谱(30% 甲醇-水,流速 3.0 mL/min,测波长为 230 nm 和 272 nm, $t_R = 12.0$ min)得化合物 **13** (8.10 mg)。Fr. 6.2 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)得化合物 **14** (8.00 mg)。Fr. 7 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,75:10)得 Fr. 7.1 和 Fr. 7.2,其中 Fr. 7.1 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)、制备柱色谱(10% 乙腈-水,流速 3.0 mL/min,检测波长为 210 nm 和 272 nm, $t_R = 16.0$ min)得化合物 **3** (22.70 mg)。Fr. 8 经 Rp-18(15% → 40% 甲醇-水)梯度洗脱后得到流分 Fr. 8.1 ~ Fr. 8.3;Fr. 8.2 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,55:10)、制备柱色谱(18% 甲醇-水,流速 3.0 mL/min,检测波长为 260 nm)得化合物 **11** ($t_R = 32.7$ min, 6.12 mg)。

40% 乙醇洗脱获得的浸膏经硅胶柱色谱梯度洗脱(二氯甲烷-甲醇,92:8 → 50:50),每 5L 收集一个流分,经 TLC 检识合并相同的流分后得到 Fr. 1-Fr. 3。Fr. 1 经 Rp-18(40% → 60% 甲醇)、Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)后得流分 Fr. 1.1-Fr. 1.4。Fr. 1.1 经硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯,90:10)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)后得化合物 **2** (9.47 mg)。Fr. 1.2 经 Rp-18(35% 甲醇-水)和硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯,80:20)得化合物 **4** (19.02 mg)。Fr. 1.2 剩余流分 Fr. 1.2.2 经制备柱色谱(45% 甲醇-水,流速 3.0 mL/min,检测波长为 210 nm 和 237 nm, $t_R = 19.9$ min)得化合物 **6** (14.20 mg)。Fr. 1.3 经硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯,90:10)得 Fr. 1.

3.1 和 Fr. 1.3.2,其中 Fr. 1.3.1 经 Rp-18、制备柱色谱(35% 甲醇-水,流速 3.0 mL/min,检测波长为 210 nm 和 228 nm)得化合物 **5** ($t_R = 26.8$ min, 18.20 mg)。其中 Fr. 1.3.2 经 Rp-18(30% 甲醇-水)、Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)、硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,97:3)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)得化合物 **16** (6.66 mg)。

1.3.2 体外抗炎活性评价

采用 CCK-8 法测定待测药物对细胞增殖及细胞毒性的影响^[5], Graph Pad Prism 进行统计分析。将密度为 1×10^5 个/mL 的 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板上,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。弃去上清液,实验组加入含设定化合物(化合物 **1** ~ **3**,纯度 > 98%)浓度(0、12.5、25、50、100、200、400、800 μmol/L)的 DMEM 培养基 100 μL,设置 6 个复孔,继续培养 24 h,加入 10 μL CCK-8 试剂,37 °C 孵育 30 min,在 450 nm 波长下测定 OD 值,计算细胞存活率。

在安全浓度范围内,采用地塞米松(dexamethasone)为阳性对照,评价化合物对 LPS 诱导的小鼠单核细胞(RAW 264.7)炎症模型的作用。分别设置空白组、LPS 诱导组、阳性对照组和化合物组(LPS 联合不同浓度药物处理组)。取对数生长期生长的(密度 1×10^5 个/mL)细胞,接种于 96 孔板上,37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。弃上清,空白对照组加入 100 μL DMEM 培养基,模型组加入等体积含 1 μg/mL 的 LPS,阳性对照组(与对应化合物组相同浓度)和实验组分别加入等体积含 1 μg/mL LPS 的不同浓度药物(化合物:6.25、12.5、25、50、100 μmol/L),每组均设置 6 个复孔,培养 24 h 后,取上清液,用 NO 试剂盒测定各组对 NO 释放量的抑制程度,测定并记录 540 nm 波长下每孔的 OD 值,计算半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC₅₀)。采用 Griess 法测定细胞上清液中 NO 的含量^[5]。用 ELISA 试剂盒测定其 TNF-α 和 IL-6 的含量,操作同“NO”,结合 IBM SPSS 23.0 计算 TNF-α、IL-6 的 IC₅₀ 值,结果用均数 ± 标准差表示。

1.3.3 体外抗菌活性评价

取 10 μL 供试品溶液(化合物 **1** ~ **3**,纯度 > 98%)添加到含 90 μL LB 和 PDB 培养基的 96 孔板中,得到供试品浓度为 5 mmol/L 的混合液。利用二倍稀释法依次将同一列孔中供试品溶液 5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 mmol/L,接着再加入

10 μL 菌悬液(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌悬浮液),以加菌悬液不加供试品溶液为对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 48 h,以肉眼观察 96 孔板中是否有细菌或真菌生长,若无细菌或真菌生长则有抗菌活性,否则无抗菌活性。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20.4} + 2.55$ (c 0.14, 甲醇);ESI-MS: m/z 181 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ :6.66(1H, s, H-4), 6.46(1H, s, H-7), 4.47(1H, dd, $J = 8.9, 8.7$ Hz, H-2b), 4.33(1H, dd, $J = 8.9, 5.3$ Hz, H-2a), 3.67(1H, dd, $J = 10.4, 5.6$ Hz, H-10b), 3.52(1H, dd, $J = 10.4, 8.1$ Hz, H-10a), 3.42(1H, m, H-3), 2.11(3H, s, H-11); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ :75.3(C-2), 46.5(C-3), 112.6(C-4), 125.6(C-5), 150.1(C-6), 111.8(C-7), 154.7(C-8), 126.7(C-9), 65.7(C-10), 16.6(C-11)。以上核磁数据与文献^[6]报道一致,故化合物 1 鉴定为 5-hydroxy-3S-hydroxymethyl-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran。

化合物 2 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 6.24$ (c 0.10, 甲醇);ESI-MS: m/z 165 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ :7.10(1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-4), 6.66(1H, br d, $J = 7.5$ Hz, H-6), 6.58(1H, s, H-7), 4.57(1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-2b), 4.47(1H, dd, $J = 8.8, 4.9$ Hz, H-2a), 3.73(1H, dd, $J = 10.2, 4.9$ Hz, H-10b), 3.50(1H, dd, $J = 10.2, 8.0$ Hz, H-10a), 3.50(1H, m, H-3), 2.27(3H, s, H-11); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ :75.5(C-2), 45.9(C-3), 126.1(C-4), 139.8(C-5), 122.1(C-6), 111.1(C-7), 162.0(C-8), 125.4(C-9), 65.6(C-10), 21.5(C-11)。以上核磁数据与文献^[7]一致,故化合物 2 鉴定为 (*S*)-(6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)methanol。

化合物 3 白色粉末;ESI-MS: m/z 369 $[\text{M} + \text{Na}]^+$,分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}_8$; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ :4.24(1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.10(1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-8a), 3.86(1H, dd, $J = 11.8, 1.5$ Hz, H-6a), 3.62(1H, dd, $J = 11.8, 5.5$ Hz, H-6b), 3.47(1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-8b), 3.33(1H, m, H-5'), 3.24(2H, m, H-3', H-4'), 3.15(1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-2'), 2.73(1H, m, H-2), 2.19(1H, dd, $J =$

17.4, 8.8 Hz, H-3a), 1.96(1H, dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, H-5), 1.81(1H, dd, $J = 17.4, 8.8$ Hz, H-3b), 1.48(1H, dd, $J = 9.1, 4.6$ Hz, H-6a), 1.29(3H, s, H-9), 1.13(3H, d, $J = 2.4$ Hz, H-10), 1.05(1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-6b); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ :45.6(C-1), 31.4(C-2), 43.6(C-3), 217.2(C-4), 36.1(C-5), 13.6(C-6), 72.7(C-7), 76.4(C-8), 24.7(C-9), 18.6(C-10), 104.6(C-1'), 75.4(C-2'), 78.1(C-3'), 71.8(C-4'), 78.2(C-5'), 63.0(C-6')。以上核磁数据与文献^[8]报道一致,故化合物 3 鉴定为 4-thujone-7-hydroxyl-8-*O*- β -*D*-glucopyranoside。

化合物 4 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 153 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ :7.69(1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 6.34(1H, dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, H-5), 6.24(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3), 2.51(3H, s, H-8); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ :116.1(C-1), 164.9(C-2), 104.9(C-3), 165.5(C-4), 109.2(C-5), 133.9(C-6), 204.7(C-7), 26.4(C-8)。以上核磁数据与文献^[9]报道一致,故化合物 4 鉴定为 2,4-二羟基苯乙酮。

化合物 5 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 153 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ :7.49(1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6), 7.38(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.95(1H, dd, $J = 8.8$ Hz, H-5), 2.49(3H, s, H-8), 3.89(3H, s, 4-OCH₃); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ :131.9(C-1), 115.8(C-2), 147.8(C-3), 153.9(C-4), 111.8(C-5), 123.3(C-6), 199.8(C-7), 26.5(C-8), 56.6(4-OCH₃)。以上核磁数据与文献^[9]报道一致,故化合物 5 鉴定为 acetovanillone。

化合物 6 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 183 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ :7.07(1H, s, H-6), 6.34(1H, s, H-3), 3.79(3H, s, 4-OCH₃), 2.40(3H, s, H-8); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ :113.5(C-1), 159.9(C-2), 100.9(C-3), 157.1(C-4), 140.9(C-5), 116.2(C-6), 204.4(C-7), 26.6(C-8), 56.7(4-OCH₃)。以上核磁数据与文献^[10]报道一致,故化合物 6 鉴定为 2,5-二羟基-4-甲氧基-苯乙酮。

化合物 7 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 199 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4$; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ :6.82(1H, br s, H-2), 6.69(1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.67(1H, br d, $J = 8.3$ Hz, H-6),

3. 83 (3H, s, 3-OCH₃), 3. 73 (1H, m, H-8), 3. 49 (1H, dd, $J = 11.1, 7.4$ Hz, H-9a), 3. 40 (1H, dd, $J = 11.1, 6.2$ Hz, H-9b), 2. 71 (1H, dd, $J = 13.8, 6.7$ Hz, H-7a), 2. 61 (1H, dd, $J = 13.8, 7.4$ Hz, H-7b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 131. 6 (C-1), 114. 2 (C-2), 148. 8 (C-3), 145. 9 (C-4), 116. 0 (C-5), 122. 9 (C-6), 40. 5 (C-7), 74. 7 (C-8), 66. 6 (C-9), 56. 4 (3-OCH₃)。以上核磁数据与文献^[11]报道一致,故化合物 **7** 鉴定为 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propan-1, 2-diol。

化合物 8 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 199 [M + H]⁺,分子式为 C₁₀H₁₄O₄; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6. 98 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 6. 77 (1H, dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, H-6), 6. 74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 4. 38 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-7), 3. 81 (1H, dq, $J = 6.4, 5.3$ Hz, H-8), 3. 80 (3H, s, 3-OCH₃), 1. 11 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-9); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 134. 8 (C-1), 111. 8 (C-2), 148. 7 (C-3), 146. 9 (C-4), 115. 7 (C-5), 120. 9 (C-6), 79. 0 (C-7), 72. 4 (C-8), 18. 4 (C-9), 56. 4 (3-OCH₃)。以上核磁数据与文献^[12]基本一致,依据耦合常数 $J_{7-8} = 5.3$ Hz 判断 H-7 和 H-8 立体关系为赤式^[13],故化合物 **8** 鉴定为 erythro-1-(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-propan-1, 2-diol。

化合物 9 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 199 [M + H]⁺,分子式为 C₁₀H₁₄O₄; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6. 93 (1H, br s, H-2), 6. 76 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 6. 74 (1H, br d, $J = 8.9$ Hz, H-6), 4. 23 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-7), 3. 85 (3H, s, 3-OCH₃), 3. 74 (1H, dq, $J = 7.4, 6.5$ Hz, H-8), 0. 94 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-9); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 135. 0 (C-1), 111. 8 (C-2), 149. 0 (C-3), 147. 3 (C-4), 116. 0 (C-5), 121. 2 (C-6), 80. 5 (C-7), 73. 2 (C-8), 19. 4 (C-9), 56. 5 (3-OCH₃)。以上核磁数据与文献^[12]报道一致,依据耦合常数 $J_{7-8} = 7.4$ Hz 判断 H-7 和 H-8 立体关系为苏式^[13],故化合物 **9** 鉴定为 thero-1-(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-propan-1, 2-diol。

化合物 10 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 291 [M + H]⁺,分子式为 C₁₅H₁₄O₆; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6. 82 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6. 74 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6. 70 (1H, dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, H-6'), 5. 92 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 5. 84 (1H,

d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 4. 55 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-2), 3. 95 (1H, dt, $J = 8.1, 5.4$ Hz, H-3), 2. 84 (1H, dd, $J = 16.1, 5.4$ Hz, H-4a), 2. 49 (1H, dd, $J = 16.1, 8.1$ Hz, H-4b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 83. 0 (C-2), 69. 0 (C-3), 28. 7 (C-4), 157. 1 (C-5), 96. 5 (C-6), 158. 0 (C-7), 95. 7 (C-8), 157. 7 (C-9), 101. 0 (C-10), 132. 4 (C-1'), 115. 4 (C-2'), 146. 4 (C-3'), 146. 4 (C-4'), 116. 2 (C-5'), 120. 2 (C-6')。以上核磁数据与文献^[14]报道一致,故化合物 **10** 鉴定为 (+)-儿茶素。

化合物 11 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 451 [M - H]⁻,分子式为 C₂₁H₂₄O₁₁; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6. 84 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2'), 6. 76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6. 71 (1H, dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, H-6'), 6. 28 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6. 04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 4. 87 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 4. 60 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-2), 3. 97 (1H, dt, $J = 7.5, 5.4$ Hz, H-3), 3. 91 (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H-6''a), 3. 72 (1H, dd, $J = 12.1, 3.9$ Hz, H-6''b), 3. 00 (1H, dd, $J = 16.4, 5.4$ Hz, H-4a), 2. 56 (1H, dd, $J = 16.4, 8.1$ Hz, H-4b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 83. 4 (C-2), 69. 1 (C-3), 28. 9 (C-4), 157. 2 (C-5), 98. 6 (C-6), 158. 6 (C-7), 97. 4 (C-8), 158. 5 (C-9), 103. 9 (C-10), 132. 6 (C-1'), 115. 7 (C-2'), 146. 8 (C-3'), 147. 8 (C-4'), 157. 2 (C-5), 120. 4 (C-6'), 103. 1 (C-1''), 75. 4 (C-2''), 78. 7 (C-3''), 71. 8 (C-4''), 78. 7 (C-5''), 63. 1 (C-6'')。以上核磁数据与文献^[15]报道一致,故化合物 **11** 鉴定为 (+)-儿茶素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 12 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 299 [M - H]⁻,分子式为 C₁₃H₁₆O₈; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7. 87 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6'), 6. 79 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 4. 50 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3. 27 (1H, m, H-5'), 3. 21 (2H, m, H-3', H-4'), 3. 17 (1H, m, H-2'), 3. 81 (1H, dd, $J = 12.0, 1.2$ Hz, H-6'a), 3. 57 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-6'b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 122. 0 (C-1), 133. 1 (C-2, C-6), 116. 5 (C-3, C-5), 164. 1 (C-4), 168. 2 (C-7), 100. 3 (C-1'), 75. 2 (C-2'), 78. 2 (C-3'), 71. 9 (C-4'), 78. 1 (C-5'), 63. 0 (C-6')。以上核磁数据与文献^[16]报道一致,故化合物 **12** 鉴定为对羟基苯甲酸- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 13 无色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z

283 [M - H]⁻, 分子式为 C₁₃H₁₆O₇; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8.05 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, H-6), 7.48 (2H, t, J = 7.7 Hz, H-3, H-5), 7.61 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-4), 4.52 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1'), 3.19 ~ 3.35 (4H, m, H-2' ~ H-5'), 3.85 (1H, d, J = 12.1 Hz, H-6' a), 3.60 (1H, dd, J = 12.1, 5.9 Hz, H-6' b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 133.4 (C-1), 130.8 (C-2, C-6), 129.8 (C-3, C-5), 134.6 (C-4), 168.1 (C-7), 100.2 (C-1'), 75.2 (C-2'), 78.2 (C-3'), 71.9 (C-4'), 78.1 (C-5'), 63.0 (C-6'). 以上核磁数据与文献^[17]报道一致, 故化合物 **13** 鉴定为苯甲酸-β-D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 14 无色针状结晶(甲醇); ESI-MS: m/z 199 [M + H]⁺, 分子式为 C₉H₁₀O₅; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.04 (2H, s, H-2, H-6), 4.27 (2H, q, J = 7.1 Hz, H-1'), 1.34 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-2'); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 120.4 (C-1), 108.7 (C-2, C-6), 145.2 (C-3, C-5), 138.4 (C-4), 167.2 (C-7), 60.3 (C-1'), 13.3 (C-2')。以上核磁数据与文献^[18]报道一致, 故化合物 **14** 鉴定为没食子

酸乙酯。

化合物 15 无色针状结晶(甲醇); ESI-MS: m/z 185 [M + H]⁺, 分子式为 C₈H₈O₅; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.04 (2H, s, H-2, H-6), 3.81 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 121.6 (C-1), 110.2 (C-2, C-6), 146.7 (C-3, C-5), 139.9 (C-4), 169.2 (C-7), 52.4 (OCH₃)。以上核磁数据与文献^[19]报道的没食子酸甲酯基本一致, 故化合物 **15** 鉴定为没食子酸甲酯。

化合物 16 无色针状结晶(甲醇); ESI-MS: m/z 169 [M + H]⁺, 分子式为 C₈H₈O₄; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.52 (1H, br s, H-2), 7.51 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5), 6.80 (1H, br d, J = 8.7 Hz, H-6), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 123.5 (C-1), 114.0 (C-2), 152.8 (C-3), 148.9 (C-4), 116.0 (C-5), 125.5 (C-6), 170.4 (C-7), 56.6 (3-OCH₃)。以上核磁数据与文献^[20]报道一致, 故化合物 **16** 鉴定为香草酸。

化合物 **1** ~ **16** 的化学结构见图 1。

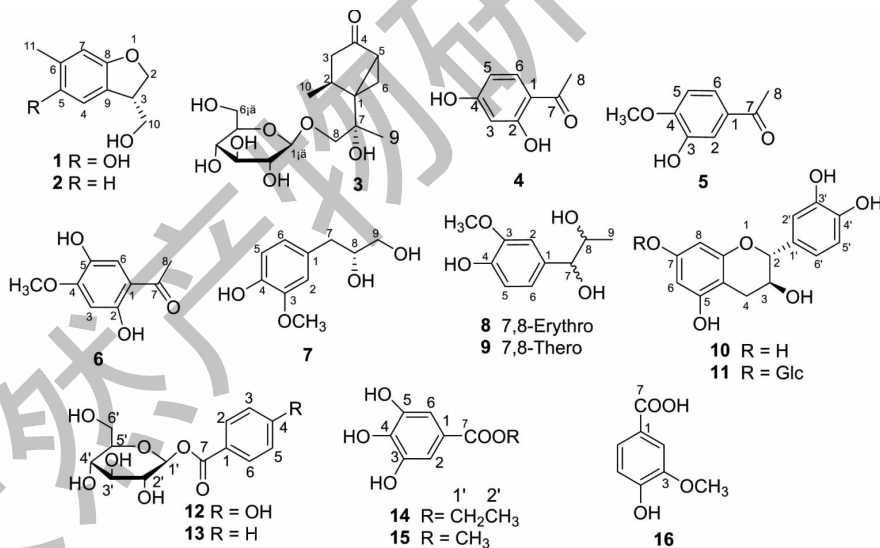


图 1 化合物 **1** ~ **16** 的化学结构

Fig. 1 Structure of compounds **1-16**

2.2 化合物活性研究结果

化合物 **1** ~ **3** 进行体外抗炎和抗真菌与细菌活性测试。在安全浓度范围内, 化合物 **1** 能够抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中炎症因子 NO、TNF-α 和 IL-6 的生成, 其 IC₅₀ 分别为 15.67 ± 1.20、18.59 ± 1.27 和 15.79 ± 1.20 μmol/L, 阳性药地塞米松对

炎症因子 NO、TNF-α 和 IL-6 的 IC₅₀ 分别为 12.11 ± 1.08、15.36 ± 1.20 μmol/L 和 11.99 ± 1.08 μmol/L, 化合物 **2** 和 **3** 未表现出抗炎活性; 抗菌活性结果显示, 在 0 ~ 5.0 mmol/L 浓度范围内, 化合物 **1** ~ **3** 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均无抑制作用。

3 讨论与结论

本研究从安徽铜陵产丹皮的正丁醇部位分离鉴定了 16 个化合物, 化合物 **1**~**2** 为薄荷烷型单萜类, 化合物 **3** 为侧柏烷型单萜苷, 化合物 **4**~**16** 为酚酸衍生物, 其中有 10 个化合物(**7**~**9** 和 **11**~**16**) 为芍药属中首次报道。化合物 **1** 表现出体外抑制糖基化终产物(advanced glycation end-products)的形成的活性^[6], 化合物 **2** 表现出抗老年痴的作用^[21], 化合物 **3** 目前未见活性相关数据报道。本研究对牡丹皮的正丁醇部位的化合物 **1**~**3** 单萜类进行了抗炎及抗菌活性评价, 通过检测其对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量, 初步判断抗炎活性, 用 ELISA 试剂盒测定其 TNF- α 和 IL-6 的含量, 结果表明化合物 **1** 具有良好的抗炎活性。抗菌活性检测, 化合物 **1**~**3** 未表现出抗菌活性。本研究的结果为后续牡丹皮后续开展其功效物质基础的研究工作奠定基础。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I(中华人民共和国药典: 第一部)[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 179.
- 2 Wang CH, Qiu ZD, Wang YC, et al. Modern research progress and quality marker prediction analysis of Moutan Cortex [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2023, 46: 2361-2369.
- 3 Sun L, Hu HP, Chen XX, et al. Two new acetovanillone glycosides from the water-soluble fraction of *Paeonia ostii* [J]. Nat Prod Res, 2021, 35: 2564-2568.
- 4 Sun L, Kong CH, Zhao H, et al. Two new disaccharide glycosides from the root cortex of *Paeonia ostii* [J]. Rec Nat Prod, 2023, 17: 151-156.
- 5 Kong CH, Wang KD, Sun L, et al. Two new glycosides from the root bark of *Paeonia ostii* [J]. Nat Prod Res, 2024. DOI: 10.1080/14786419.2024.2324372.
- 6 Ha DT, Ngoc TM, Lee I, et al. Inhibitors of aldose reductase and formation of advanced glycation end-products in Moutan Cortex(*Paeonia suffruticosa*) [J]. J Nat Prod, 2009, 72: 1465-1470.
- 7 Yang WQ, Liu YY, Zhang SS, et al. Copper-catalyzed intramolecular desymmetric aryl C-O coupling for the enantioselective construction of chiral dihydrobenzofurans and dihydrobenzopyrans [J]. Angew Chem Inter Ed, 2015, 54: 8805-8808.
- 8 Hu H Y. Study on chemical constituents of Moutan bark and

its anti-ages activity [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences of PLA(中国人民解放军军事医学科学院), 2007.

- 9 Yoshikawa M, Ohta HT, Kaeaguchi A, et al. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. V. Radical scavenging effect of Moutan Cortex. (1): absolute stereostructures of two monoterpenes, paeonisuffrone and paeonisuffral [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48: 1327-1331.
- 10 Li G, Seoc S, Lee KS, et al. Protective constituents against sepsis in mice from the root cortex of *Paeonia suffruticosa* [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27: 1123-1126.
- 11 Okasaka M, Kashiwada Y, Kodzhimatov OK, et al. Monoterpene glycosides from *Paeonia hybrid* [J]. Phytochemistry, 2008, 69: 1767-1772.
- 12 Kim TH, Kim JK, Ito H, et al. Enhancement of pancreatic lipase inhibitory activity of curcumin by radiolytic transformation [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21: 1512-1514.
- 13 Balboul AAA, Ahmed AA, Otsuka H, et al. 4-Hydroxyphenylpropan-7,8-diols and derivatives from *Narvalina domingensis* [J]. Phytochemistry, 1996, 42: 1191-1193.
- 14 Shen ZJ, Chen FL, Jia CY, et al. Evaluation of flavonoids from capers exocarp and their antioxidant activities [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2023, 35: 1877-1886.
- 15 Zhuang XC, Yan YM, Zhang QZ, et al. Chemical constituents from n-BuOH extract of *Codonopsis pilosula* [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2017, 19: 1233-1239.
- 16 Yang CY, Wang XL. Phenolic constituents from the barks of *Broussonetia papyrifera* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2018, 41: 111-113.
- 17 Kaneko T, Ohtani K, Kasai R, et al. *n*-Alkyl glycosides and *p*-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia cujete* [J]. Phytochemistry, 1998, 47: 259-263.
- 18 Chen X, Li RT, Zeng JG. Chemical constituents from leaves of *Rhus chinensis* Mill. and their antioxidant activity [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2024, 36: 755-761.
- 19 Yan YY, Liu G, Zhang XY, et al. A new monoterpene glycoside compound from *Paeoniae alba* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51: 5924-5928.
- 20 Wang W, Yang CG, Zhang YJ. Phenolic components in grass fruits [J]. Plant Divers(云南植物研究), 2009, 31: 284-288.
- 21 Lin S, Shang HC, Wang LY, et al. Application of monocyclic monoterpene in the preparation of anti-senile dementia drugs(单环单萜在制备抗老年痴呆药物中的应用): CN11402828366A [P]. 2021-10-30.