

本文引用: 王玉新, 刘艳阳, 黄玲, 张珞喻, 蒋跃平, 黄琪. 芸香中香豆素类化学成分研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 395-400.

芸香中香豆素类化学成分研究

王玉新^{1,2,3}, 刘艳阳^{2,3,4}, 黄玲^{2,3,5}, 张珞喻^{1,2,3}, 蒋跃平^{2,3}, 黄琪^{2,3*}

1. 大理大学药学院, 云南 大理 671013; 2. 中南大学湘雅医院药学部, 湖南 长沙 410008;
3. 中南大学湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心, 湖南 长沙 410008; 4. 绵阳四〇四医院药学部, 四川 绵阳 621053;
5. 泸州市中医医院药学部, 四川 泸州 646099

〔摘要〕 目的 研究中药芸香(*Ruta graveolens* L.)中香豆素类化学成分,并探讨其抗炎、抗凝活性。方法 本实验利用各种色谱分离技术,结合核磁共振波谱及质谱联用技术对分离得到的单体化合物进行结构鉴定。CCK-8法筛选出无明显细胞毒性的化合物,用于对脂多糖诱导小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)释放NO的检测,进行抗炎活性筛选,通过凝血酶原时间的测试进行抗凝活性筛选。结果 从芸香提取物中共鉴定出10个香豆素类化合物,分别为补骨脂素(1)、花椒毒素(2)、chalepentin(3)、rutamontin(4)、3-(1',1'-dimethyl allyl)-herniarin(5)、佛手柑内酯(6)、异芘苕亭(7)、异嗪皮啶(8)、去甲基软木花椒素(9)、Chalepin(10)。对10个化合物的抗炎、抗凝进行活性评价,结果显示,化合物2,4,9在20 μmol/L时对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的NO生成有较好的抑制作用,抑制率分别为54.3%±1.7%、51.2%±5.5%、52.3%±1.7%;10个化合物在浓度为1.0 mmol/L条件下,均未表现出抗凝活性。结论 从芸香提取物中分离得到10个香豆素类单体化合物,化合物3-5、7-10为首次从芸香中分离得到。该研究结果丰富了芸香的化学成分和生物活性研究,为芸香抗炎活性的开发和利用提供了理论基础。

〔关键词〕 芸香; 结构鉴定; 香豆素; 药理活性; 抗炎; 抗凝

〔中图分类号〕 R284.2

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.03.007

Chemical components of coumarins in Yunxiang (*Ruta graveolens* L.)

WANG Yuxin^{1,2,3}, LIU Yanyang^{2,3,4}, HUANG Ling^{2,3,5}, ZHANG Luoyu^{1,2,3}, JIANG Yueping^{2,3}, HUANG Qi^{2,3*}

1. College of Pharmacy, Dali University, Dali, Yunnan 671013, China; 2. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 3. National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 4. Department of Pharmacy, Mianyang 404 Hospital, Mianyang, Sichuan 621053, China; 5. Department of Pharmacy, Luzhou Hospital of Chinese Medicine, Luzhou, Sichuan 646099, China

〔Abstract〕 **Objective** To study the chemical components of coumarins in Chinese medicine Yunxiang (*Ruta graveolens* L.) and explore its anti-inflammatory and anticoagulant activities. **Methods** Various chromatographic separation techniques, combined with nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry were used in this experiment to identify the structures of the isolated monomeric compounds. The CCK-8 method was used to screen out compounds with non-significant cytotoxicity for the measurement of nitric oxide (NO) released by lipopolysaccharide (LPS)-induced mouse macrophages (RAW 264.7), as well as for anti-inflammatory activity screening. The prothrombin time (PT) was performed to screen for anticoagulant activity. **Results** Ten coumarin

〔收稿日期〕 2023-11-02

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(82003929); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40993)。

〔通信作者〕 * 黄琪, 男, 博士, 副主任药师, E-mail: huangqi20021986@163.com。

compounds were identified from Yunxiang (*Ruta graveolens* L.) extract, namely, psoralen (1), xanthotoxin (2), cholepentin (3), rutamontine (4), 3-(1',1'-dimethyl allyl)-herniarin (5), bergapten (6), isoscapoletin (7), isofraxidin (8), demethylsuberosin (9), and cholepin (10). Evaluation of the anti-inflammatory and anticoagulant activities of these compounds showed that compounds 2, 4, and 9 exhibited significant inhibitory effects on the production of NO induced by LPS at a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$, with inhibition rates of $54.3\pm 1.7\%$, $51.2\pm 5.5\%$, and $52.3\pm 1.7\%$, respectively. Besides, none of the ten compounds demonstrated anticoagulant activity at a concentration of 1.0 mmol/L. **Conclusion** Ten monomeric coumarin compounds were isolated from the extract of Yunxiang (*Ruta graveolens* L.), with compounds 3-5 and 7-10 being isolated from Yunxiang (*Ruta graveolens* L.) for the first time. This study enriches the research on the chemical composition and biological activity of Yunxiang (*Ruta graveolens* L.), providing a theoretical basis for the development and utilization of its anti-inflammatory activity.

[**Keywords**] Yunxiang (*Ruta graveolens* L.); structure identification; coumarin; pharmacological activity; anti-inflammatory; anticoagulant

芸香(*Ruta graveolens* L.),具有强烈而特殊的气味,别名臭草,为芸香科(Rutaceae)芸香属(*Ruta*)的多年生双子叶草本植物,原产于地中海和亚洲西南部地区,现分布于世界各地。我国南北方地区均有种植,主产于东南部和西南部地区,如福建、广西等^[1]。芸香全草(地上部分)供药用,具有清热解毒、凉血散瘀、利尿等功效,记载于《生草药性备要》《中国药用植物图鉴》《本草纲目拾遗》等。其主要化学成分有生物碱类、香豆素类、黄酮类、萜类等化合物^[2]。本实验选取芸香干燥地上部分为研究对象,为从芸香中获取更多的单体化合物,本实验对芸香经水提取之后,又进行醇提取。实验利用各种色谱分离技术,结合核磁共振波谱及质谱联用技术,对分离得到的单体化合物进行结构鉴定,结果从芸香提取物中共鉴定出10个香豆素类化合物。现代药理学研究表明,芸香提取物具有抗炎^[3]、抗凝^[4]等药理活性,为探讨本实验所得香豆素类化合物是否也具有抗炎、抗凝活性,从而开展实验研究,以期为芸香的药理活性及其药用资源的进一步开发利用奠定基础,对香豆素类抗炎、抗凝活性提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验药材芸香于2020年6月21日采自中国广东省肇庆市广宁县,经中南大学湘雅医院药学部刘韶教授鉴定为芸香科植物芸香(*Ruta graveolens* L.)的干燥地上部分,药材标本(No.2020001)现保存于中南大学湘雅医院药学楼药物化学实验室。

RAW264.7小鼠单核巨噬细胞(长沙艾碧维生物科技有限公司,货号:AW-CCM002);双抗(青、链霉素)

(上海碧云天生物技术有限公司,货号:SV30010);一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A013-2-1);磷酸盐缓冲溶液(PBS)(长沙艾碧维生物科技有限公司,货号:AWC0409);胰酶消化液(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0201);胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司,货号:10099141);细胞冻存液(长沙艾碧维生物科技有限公司,货号:AWC0229);凝血酶原试液(德国TECO公司,货号:10003109);凝血质控血浆(德国TECO公司,货号:093UK-K272A);DMEM培养基(德国Sigma公司,货号:D5796);色谱纯甲醇、乙腈(美国Fisher公司);分析醇(国药集团化学试剂有限公司);纯化水(自制)。

超净工作台(型号:YT-CJ-2NB,北京亚泰科隆仪器技术有限公司);直热式二氧化碳培养箱(型号:DH-160I,上海三腾仪器有限公司);倒置生物显微镜(型号:DSZ2000X北京中显恒业仪器仪表有限公司);低速离心机(型号:SL02,上海知信实验仪器技术有限公司);多功能酶标分析仪(型号:MB-530,深圳市汇松科技发展有限公司);血凝仪(型号:MC-4000德国TECO公司);核磁共振波谱仪(型号:Bruker AV-600,瑞士Bruker公司);UPLC-6545 Accurate Mass Q-TOF 色谱-质谱联用仪、Agilent 1200/1260 Series 制备型高效液相色谱仪、Agilent C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)均购自美国Agilent公司;圆二色谱仪(型号:Jasco J-1815,日本JASCO公司);自动旋光仪(型号:INESA SGW-3,上海仪电物理光学仪器有限公司);硅胶(200~300目)、GF254 硅胶板(青岛海洋化工有限公司);HPD-101 大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司);Sephadex LH-20 凝胶(瑞士Amersham Biosciences公司);YMC 苯基色谱柱 Ph (250 mm×10 mm,5 μm)、YMC-Pack ODS-A C₁₈ 色

谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm)均购自杭州亚莱博仪器有限公司。

1.2 提取与分离

称取芸香干燥地上部分 10 kg, 粗秆粉碎, 室温下超声提取 2 次(每次加入 8 L 纯化水, 提取时间为 1 h), 过滤(药渣暂放), 合并滤液, 减压浓缩, 得粗水提取物浸膏 60.5 g。

水提取物通过大孔树脂(HPD-101)柱色谱分离, 以乙醇-水(10%、50%、100%)梯度洗脱, 直至溶液颜色无明显变化, 收集流分, 分别减压浓缩干燥后得到 3 个流分样品(Fr.A~Fr.C), 进一步将 Fr.C(14.3 g)通过硅胶(200~300 目)柱色谱分离, 采用洗脱剂依次以 100%二氯甲烷、二氯甲烷:甲醇(100:1、50:1、30:1、20:1、10:1、1:1)和 100%甲醇梯度洗脱(洗脱剂中均添加 0.1%的甲酸水), 得到 12 个样品组分(Fr.C-1~Fr.C-12)。Fr.C-1 在室温下析出无色针状晶体, 得到化合物 1(5.4 mg)。Fr.C-1 析晶剩余样品通过薄层制备板分离(石油醚:丙酮=5:1), 得到 4 个组分(Fr.C-1-1~Fr.C-1-4)。Fr.C-1-2 通过反向半制备型 HPLC(ODS-A 柱, 乙腈-0.1%甲酸水 75:25, 2.0 mL/min)纯化得到化合物 3(1.7 mg, $t_R=54.9$ min)。Fr.C-3 通过 Sephadex LH-20 柱层析, 洗脱条件为石油醚:二氯甲烷:甲醇=5:5:1, 得到 10 个组分(Fr.C-3-1~Fr.C-3-10)。Fr.C-3-5 通过半制备型 HPLC(苯基色谱柱, 乙腈-0.1%甲酸水 50:50, 2.0 mL/min)纯化得到化合物 2(14.2 mg, $t_R=16.6$ min)。Fr.C-3-6 通过半制备型 HPLC(苯基色谱柱, 乙腈-0.1%甲酸水 29:71, 2.0 mL/min)纯化得到化合物 6(2.3 mg, $t_R=37.9$ min)。Fr.C-6 通过 Sephadex LH-20 柱层析, 甲醇洗脱, 得到 11 个组分(Fr.C-6-1~Fr.C-6-11)。Fr.C-6-3 在室温下析出浅黄色晶体, 得到化合物 4(8.5 mg)。Fr.C-6-5 通过半制备型 HPLC(苯基色谱柱, 乙腈-0.1%甲酸水 35:65, 2.0 mL/min)纯化得到化合物 5(1.5 mg, $t_R=28.1$ min)。

将超声提取后的药渣用 8 倍量 80%乙醇提取 1 次(提取时间为 1 h), 过滤(药渣弃用), 合并滤液, 减压浓缩至浸膏状, 得到醇提取物浸膏约 1 kg。提取物分别用石油醚和乙酸乙酯萃取, 经减压浓缩干燥, 得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和醇水萃取物 3 个组分(Fr.D~Fr.F)。乙酸乙酯萃取物(Fr.E 约 80 g)通过硅胶柱层析色谱柱(200~300 目)分离, 以

二氯甲烷:甲醇(100:0~0:100)梯度洗脱, 得到 9 个组分(Fr.E-1~Fr.E-9)。Fr.E-4 采用硅胶柱层析(200~300 目)分离, 以石油醚:乙酸乙酯(4:1~1:2)梯度洗脱, 得到 7 个组分(Fr.E-4-1~Fr.E-4-7)。Fr.E-4-5 通过 Sephadex LH-20 柱层析, 二氯甲烷:甲醇(1:1)等度洗脱, 得到 5 个组分(Fr.E-4-5-1~Fr.E-4-5-5)。Fr.E-4-5-2 通过反向半制备型 HPLC(ODS-A 柱, 乙腈-0.1%甲酸水 23:77, 2 mL/min)得到化合物 10(13.3 mg, $t_R=44.0$ min)。Fr.E-4-5-4 通过半制备型 HPLC(pH 柱, 乙腈-0.1%甲酸水 35:65, 2 mL/min)得到化合物 9(1.05 mg, $t_R=32.7$ min)。Fr.E-4-6 通过 Sephadex LH-20 柱层析, 二氯甲烷:甲醇(1:1)等度洗脱, 得到 6 个组分(Fr.E-4-6-1~Fr.E-4-6-6)。Fr.E-4-6-2 通过反向半制备型 HPLC(ODS-A 柱, 乙腈-0.1%甲酸水 13:87, 2.0 mL/min)纯化得到化合物 7(10.6 mg, $t_R=33.5$ min)、化合物 8(9.8 mg, $t_R=37.8$ min)。

1.3 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的抑制活性筛选

取处于对数期的 RAW264.7 细胞, 利用含 10%胎牛血清(FBS)加 1%双抗的 DMEM 培养基终止消化并计数, 并将细胞稀释到 5×10^3 个细胞/孔密度, 接种到 96 孔板中, 每孔 100 μL, CO₂ 培养箱孵育 24 h。单体化合物配制成 10 mmol/L 浓度母液, 然后用培养基稀释后, 加入 96 孔培养板至终浓度为 2.5、5、10、20、40 μmol/L, 培养箱孵育 1 h, 在 96 孔板中加入 10 μL 的 CCK-8, CO₂ 培养箱内孵育 4 h 后测定 450 nm 吸光度, 并计算化合物对 RAW264.7 细胞生长的存活率。

根据 CCK-8 法筛选出无明显细胞毒性的较佳浓度为 20 μmol/L, 实验设空白组(仅以培养基干预), LPS 组(含 1 μg/mL LPS), 阳性药组(地塞米松母液用培养基稀释至 20 μmol/L 与 1 μg/mL LPS 共同处理), 化合物组(化合物母液用培养基稀释至 20 μmol/L 与 1 μg/mL LPS 共同处理)。将 RAW264.7 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板孵育 24 h 后弃去培养液, 按上述分组方法进行药物干预, 每组平行重复 3 次, 继续培养 24 h 后取细胞上清液, 将细胞上清液离心 10 min 后收集上清液, 按照 NO 测定试剂盒说明书操作, 并计算各化合物及阳性药对 NO 分泌的抑制率^[5]。

1.4 通过凝血酶原时间(prothrombin time, PT)测试进行抗凝血活性筛选

将上述单体化合物母液用 pH 7.4 0.02 mol/L Tris-HCl(含 5% Tween 80)稀释至 1 mmol/L 待测。设置阳性对照组(药物:肝素)和 pH 7.4 0.02 mol/L Tris-HCl(含 5% Tween 80)的空白对照,每组设置 3 个平行组,按照 PT 试剂盒说明书操作,在 37 °C 预温比色杯中精确量取 5 μ L 上述溶液,然后加入人质控血浆,37 °C 下预热 2 min,加入 PT(37 °C 预温)试剂,记录凝血时间^[6-7]。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 无色针状晶体;由 HR-ESI-MS: m/z 187.040 4 $[M+H]^+$, 推测出其分子式为 $C_{11}H_6O_3$; 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.05 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.89 (1H, s, H-5), 7.87 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 7.53 (1H, s, H-8), 6.96 (1H, dd, $J=1.2$ Hz, 2.4 Hz, H-3'), 6.38 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 163.2 (C-2), 115.1 (C-3), 146.5 (C-4), 117.0 (C-4a), 121.7 (C-5), 126.7 (C-6), 158.0 (C-7), 100.4 (C-8), 153.4 (C-8a), 148.8 (C-2'), 107.6 (C-3')。以上数据与文献[8-9]报道基本一致,故鉴定化合物 1 为补骨脂素。

化合物 2 白色羽毛状;由 HR-ESI-MS: m/z 217.050 8 $[M+H]^+$, 推测出其分子式为 $C_{12}H_8O_4$; 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.02 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.89 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 7.55 (1H, s, H-5), 6.96 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 6.38 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 4.24 (3H, s, 8-OCH₃); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 162.8 (C-2), 115.1 (C-3), 146.8 (C-4), 118.0 (C-4a), 114.9 (C-5), 128.1 (C-6), 149.1 (C-7), 133.9 (C-8), 144.2 (C-8a), 148.6 (C-2'), 108.0 (C-3'), 61.8 (8-OCH₃)。以上数据与文献[10]报道基本一致,故鉴定化合物 2 为花椒毒素。

化合物 3 白色无定形粉末;由 HR-ESI-MS: m/z 255.102 3 $[M+H]^+$, 推测出其分子式为 $C_{16}H_{14}O_3$; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.92 (1H, s, H-4), 7.86 (1H, s, H-8), 7.85 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.47 (1H, s, H-5), 6.94 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 6.21 (1H, dd, $J=17.6$ Hz, 10.8 Hz, H-10), 5.10 (1H, dd, $J=10.4$ Hz, 1.2 Hz, H-11-trans), 5.07 (1H, dd, $J=3.2$ Hz, 1.2

Hz, H-11-cis), 1.50 (3H, s, H-12), 1.50 (3H, s, H-13); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 161.8 (C-2), 133.8 (C-3), 145.5 (C-4), 117.4 (C-4a), 121.4 (C-5), 126.5 (C-6), 157.4 (C-7), 99.5 (C-8), 152.5 (C-8a), 41.5 (C-9), 146.8 (C-10), 112.6 (C-11), 26.7 (C-12), 26.7 (C-13), 148.5 (C-2'), 99.5 (C-3')。以上数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定化合物 3 为 chalepensin。

化合物 4 浅黄色无定形粉末;由 HR-ESI-MS: m/z 353.066 6 $[M+H]^+$, 推测出其分子式为 $C_{19}H_{12}O_7$; 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.67 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-4), 7.46 (1H, d, $J=10.5$ Hz, H-5), 7.42 (1H, s, H-4'), 7.00 (1H, dd, $J=8.0$ Hz, 3.0 Hz, H-6), 6.99 (1H, s, H-8'), 6.96 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-8), 6.84 (1H, s, H-5'), 6.34 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-3), 3.97 (3H, s, 7'-OCH₃); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 159.5 (C-2), 114.8 (C-3), 143.0 (C-4), 114.9 (C-4a), 129.2 (C-5), 113.9 (C-6), 157.3 (C-7), 103.2 (C-8), 155.4 (C-8a), 160.6 (C-2'), 137.4 (C-3'), 129.3 (C-4'), 110.8 (C-4'a), 110.8 (C-5'), 144.6 (C-6'), 149.1 (C-7'), 107.2 (C-8'), 147.9 (C-8'a), 56.5 (7'-OCH₃)。以上数据与文献[12]报道基本一致,故鉴定化合物 4 为 rutamontine。

化合物 5 棕色无定形粉末;由 HR-ESI-MS: m/z 245.113 3 $[M+H]^+$, 推测出其分子式为 $C_{15}H_{16}O_3$; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.72 (1H, s, H-4), 7.43 (1H, d, $J=12.6$ Hz, H-5), 6.77 (1H, dd, $J=13.2, 3.6$ Hz, H-6), 6.66 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-8), 6.16 (1H, dd, $J=25.8$ Hz, H-2'), 5.07 (1H, dd, $J=13.8$ Hz, 1.8 Hz, H-3'-trans), 5.03 (1H, overlap, H-3'-cis), 3.84 (3H, s, 7-OCH₃), 1.45 (3H, s, H-4'), 1.45 (3H, s, H-5'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 162.3 (C-2), 131.4 (C-3), 140.3 (C-4), 113.4 (C-4a), 130.5 (C-5), 114.3 (C-6), 162.3 (C-7), 102.6 (C-8), 156.3 (C-8a), 41.3 (C-1'), 147.0 (C-2'), 112.4 (C-3'), 26.7 (C-4'), 26.7 (C-5'), 56.0 (7-OCH₃)。以上数据与文献[13]报道基本一致,故鉴定化合物 5 为 3-(1',1', dimethyl allyl)-herniarin。

化合物 6 绿色无定形粉末;由 HR-ESI-MS: m/z 217.047 6 $[M+H]^+$, 推测出其分子式为 $C_{12}H_8O_4$; 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.10 (1H, dd, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.61 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 7.15 (1H, s, H-8), 7.02 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 6.45 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 4.28 (3H, s, 5-OCH₃); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD)

δ : 160.8 (C-2), 113.4 (C-3), 139.2 (C-4), 106.7 (C-4a), 149.6 (C-5), 113.9 (C-6), 157.1 (C-7), 94.5 (C-8), 152.5 (C-8a), 146.0 (C-2'), 105.9 (C-3'), 61.9 (5-OCH₃)。以上数据与文献[14-15]报道基本一致,故鉴定化合物**6**为佛手苷内酯(bergapten)。

化合物 7 白色无定形粉末;由 HR-ESI-MS: m/z 193.050 8 [M+H]⁺, 推测出其分子式为 C₁₀H₈O₄; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.85 (1H, d, $J=14.2$ Hz, H-4), 7.10 (1H, s, H-5), 6.76 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d, $J=14.2$ Hz, H-3), 3.91 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 164.1 (C-2), 12.6 (C-3), 147.1 (C-4), 110.0 (C-4a), 112.5 (C-5), 153.0 (C-6), 146.1 (C-7), 103.9 (C-8), 151.4 (C-8a), 56.8 (7-OCH₃)。以上数据与文献[16-17]报道基本一致,故鉴定化合物**7**为异菝葜亭(isoscapoletin)。

化合物 8 白色无定形粉末;由 HR-ESI-MS: m/z 223.062 0 [M+H]⁺, 推测出其分子式为 C₁₁H₁₀O₅; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.84 (1H, d, $J=14.2$ Hz, H-4), 6.90 (1H, s, H-5), 6.22 (1H, d, $J=14.2$ Hz, H-3), 3.95 (3H, s, 6-OCH₃), 3.95 (3H, s, 8-OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 163.4 (C-2), 112.8 (C-3), 145.7 (C-4), 112.2 (C-4a), 105.0 (C-5), 147.1 (C-6), 144.7 (C-7), 136.2 (C-8), 146.5 (C-8a), 56.9 (6-OCH₃), 61.5 (8-OCH₃)。以上数据与文献[18]报道基本一致,故鉴定化合物**8**为异菝葜啉(isofraxidin)。

化合物 9 黄色油状;由 HR-ESI-MS: m/z 231.101 4 [M+H]⁺, 推测出其分子式为 C₁₄H₁₄O₃; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.82 (1H, d, $J=14.2$ Hz, H-4), 7.27 (1H, s, H-5), 6.70 (1H, s, H-8), 6.15 (1H, d, $J=9.4$ Hz, H-3), 5.33 (1H, m, H-2'), 3.32 (1H, brd, $J=5.3$ Hz, H-1'),

1.71 (3H, s, H-4'), 1.75 (3H, s, H-5'); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 164.1 (C-2), 112.9 (C-3), 146.3 (C-4), 112.0 (C-4a), 129.5 (C-5), 128.0 (C-6), 160.9 (C-7), 102.6 (C-8), 155.5 (C-8a), 28.7 (C-1'), 123.0 (C-2'), 134.0 (C-3'), 25.9 (C-4'), 17.8 (C-5')。以上数据与文献[19-20]报道基本一致,故鉴定化合物**9**为脱甲基软木花椒素(7-demethylsuberosin)。

化合物 10 棕色无定形固体;由 HR-ESI-MS: m/z 315.160 1 [M+H]⁺; $[\alpha]_D^{25} +4.6$ (c 0.89, MeOH), 推测出其分子式为 C₁₉H₂₂O₄; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.70 (1H, s, H-4), 7.36 (1H, s, H-5), 6.65 (1H, s, H-8), 6.16 (1H, dd, $J=18.0$ Hz, 10.8 Hz, H-2'), 5.05 (2H, d, $J=10.8$ Hz, H-3'), 4.71 (1H, m, H-2''), 3.22 (2H, overlap, H-1''), 1.45 (3H, s, H-4'), 1.44 (3H, s, H-4''), 1.25 (3H, s, H-5'), 1.44 (3H, s, H-5''); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 165.3 (C-2), 126.9 (C-3), 140.8 (C-4), 114.4 (C-4a), 124.3 (C-5), 124.7 (C-6), 164.2 (C-7), 97.7 (C-8), 155.4 (C-8a), 40.3 (C-1'), 146.9 (C-2'), 121.4 (C-3'), 20.6 (C-4'), 27.0 (C-5'), 30.4 (C-1''), 92.3 (C-2''), 72.3 (C-3''), 25.4 (C-4''), 25.3 (C-5'')。以上数据与文献[21]报道基本一致,故鉴定化合物**10**为 chalepin。

化合物**1-10**的结构见图1。

2.2 抗炎活性测定

对上述 10 个化合物进行抗炎活性筛选,根据 CCK-8 法筛选出无明显细胞毒性的浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 结果表明化合物**2, 4, 9**具有较好的抑制 RAW264.7 细胞释放 NO 活性,抑制率分别为 54.3% \pm 1.7%、51.2% \pm 5.5%、52.3% \pm 1.7%(阳性对照地塞米松浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$,抑制率为 77.8%)。

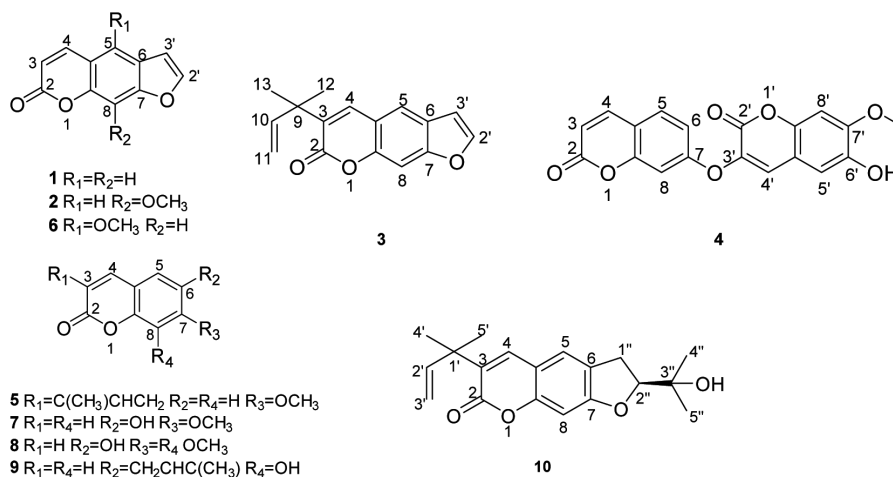


图1 化合物**1-10**的化学结构

2.3 抗凝活性测定

对上述 10 个化合物进行抗凝活性筛选,测试结果显示所有化合物在浓度为 1.0 mmol/L 检测浓度下所检测得到的 PT 范围为 12.8~13.4 s,阳性对照药物肝素在 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 检测浓度下测得 PT 为 21.6 s (已接近 $2*PT$ 25.6 s),与阳性对照组相比,结果表明 10 个化合物在该实验条件下均没有抗凝活性 ($P>0.05$)。

3 讨论

本研究报道了采自广东省肇庆市广宁县所产芸香属植物芸香的干燥地上部位进行提取分离提取,从芸香提取物中共分离得到 10 个香豆素类化合物,除化合物 1、2、6 外,其余 7 个化合物均为首次从芸香分离得到。这 10 个香豆素类化合物在佛手、花椒、九里香及吴茱萸等芸香科植物中均有分布。对 1~10 化合物进行抗炎、抗凝活性评价,结果表明化合物 2、4、9 对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)的 NO 产生有较好的抑制作用,但抗凝筛选结果表明 10 个单体化合物在浓度为 1.0 mmol/L 条件下均未表现出抗凝活性。本研究在一定程度上丰富了芸香化学成分及生物活性研究,也为后续关于芸香植物的进一步开发利用提供一定的实验基础。

参考文献

- [1] AINIWAER P, NUERAIHEMAIHEMAITI M, LI Z, et al. Chemical constituents of *Ruta graveolens* L. and their melanogenic effects and action mechanism[J]. *Fitoterapia*. 2022, 156: 105094.
- [2] ASGARPANAH J, KHOSHKAM R. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, 6(23): 3942-3949.
- [3] GIRESHA A S, ANITHA M G, DHARMAPPA K K. Phytochemical composition, antioxidant and in-vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Ruta graveolens* L. leaves[J]. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2015, 7(10): 272-76.
- [4] ALOTAIBI S M, SALEEM M S, AL-HUMAIIDI J G. Phytochemical contents and biological evaluation of *Ruta chalepensis* L. growing in Saudi Arabia[J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2018, 26(4): 504-508.
- [5] WU M, JIANG Y H, WANG J N, et al. The effect and mechanism of corilagin from *Euryale ferox* salisb shell on LPS-induced inflammation in Raw 264.7 cells[J]. *Foods*, 2023, 12(5): 979.
- [6] LING L, YONG B X, ZHONG L. Coumarin derivatives from *Ainsliaea fragrans* and their anticoagulant activity[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 13544.
- [7] FERESHTEH G, MOHAMMAD A, MOHAMMAD R S A, et al. Anticoagulant activity of isolated coumarins (suberosin and suberenol) and toxicity evaluation of *Ferulago carduchorum* in rats[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2014, 52(10): 1335-1340.
- [8] 聂丽娟. 补骨脂化学成分和大鼠血清药物化学初步研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2016.
- [9] 李铭柔. 无花果根中化学成分及生物活性的研究[D]. 西安: 西北大学, 2023.
- [10] 杨长水, 韩苏乔, 周童, 等. 黄花三宝木中香豆素类成分研究[J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5751-5755.
- [11] 蒋崇云, 李淑聪, 武倩, 等. 石椒草化学成分研究[J]. *中国药科大学学报*, 2023, 54(4): 468-473.
- [12] 朱海雯, 高蝶, 张永兰, 等. 藏药绿萝花的化学成分研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(30): 4293-4296.
- [13] VENDITTI A, SANNA C, LORENZETTI L M, et al. New coumarinyl ethers in *Daphne oleoides* Schreb. Collected from Sardinia Island[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2017, 14(6): e1700072.
- [14] UBALDO-SUÁREZ D, ESTRADA REYES R, DE LA ROSA-SIERRA R, et al. Antidepressant-like effect of *Casimiroa pubescens* root extracts[J]. *Nature Product Research*, 2019, 33(17): 2526-2530.
- [15] 胡亚雯, 耿菲菲, 车仙花, 等. 东当归花化学成分的分离与鉴定[J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(11): 1312-1317.
- [16] 何燕玲, 李小双, 马雪, 等. 苗药黑骨藤的化学成分研究(II)[J]. *中药材*, 2019, 42(2): 311-314.
- [17] 王清吉, 王友绍, 何磊, 等. 厚藤 *Ipomoea pes-caprae* (L.) Sweet 的化学成分研究(I)[J]. *中国海洋药物*, 2006(3): 15-17.
- [18] 栗杰, 冯艳, 林炳锋, 等. 刺五加化学成分的分离与鉴定[J]. *中草药*, 2021, 52(16): 4783-4788.
- [19] 晏晨, 张云东, 王星慧, 等. 川黄柏果实中的化学成分及抗肿瘤活性[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(8): 1276-1438.
- [20] 康国娇, 杨树娟, 周海瑜, 等. 傣药三桠苦化学成分研究[J]. *中药材*, 2014, 37(1): 74-76.
- [21] 蒋崇云, 李淑聪, 武倩, 等. 石椒草化学成分研究[J]. *中国药科大学学报*, 2023, 54(4): 468-473.

(本文编辑 苏维)