

## 忍冬根的化学成分与抗炎活性研究

王召平<sup>1,2</sup>, 朱 姮<sup>2</sup>, 李 岗<sup>2</sup>, 杨 鹏<sup>3</sup>, 王 晓<sup>1\*</sup>, 于金倩<sup>1\*</sup>

1. 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250014

3. 济南康森三峰生物工程有限公司, 山东 济南 250014

**摘要:** 目的 研究忍冬 *Lonicera japonica* 根中的化学成分及其抗炎活性。方法 采用反复碱性硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、薄层色谱、制备液相色谱等方法进行分离纯化, 并通过波谱学分析鉴定其化学结构; 采用斑马鱼抗炎模型, 测定分离所得部分单体成分的抗炎活性。结果 从忍冬根 95%乙醇提取物中分离得到 14 个化合物, 并鉴定其结构为 3,13-dihydroxystemodan-2-one (1)、大黄酚 (2)、palmarumycin CP<sub>2</sub> (3)、 $\beta$ -谷甾醇 (4)、豆甾醇 (5)、豆甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 (6)、erythrassin D (7)、羊毛甾醇 (8)、齐墩果酸-3-乙酸酯 (9)、原儿茶醛 (10)、胡萝卜苷 (11)、(E)-3-(3,4-二羟基苯亚甲基)-5-(3,4-二羟基苯)-2(3H)-呋喃酮 (12)、lomacarinolide B (13)、(2E,6S)-8-( $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 6'))- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-2,6-dimethyloct-2-eno-1,2"-lactone (14)。结论 化合物 1 为新化合物, 化合物 2、3、6、7~9、13 均为首次从该植物中分离得到; 化合物 9、10 在 100  $\mu$ g/mL 质量浓度下表现出明显的抗炎活性。

**关键词:** 忍冬根; 3,13-dihydroxystemodan-2-one; 大黄酚; palmarumycin CP<sub>2</sub>; 齐墩果酸-3-乙酸酯; 原儿茶醛; 抗炎; 斑马鱼  
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)14-2412-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.003

## Chemical constituents of *Lonicera japonica* roots and anti-inflammatory activity

WANG Zhao-ping<sup>1,2</sup>, ZHU Heng<sup>2</sup>, LI Gang<sup>2</sup>, YANG Peng<sup>3</sup>, WANG Xiao<sup>1</sup>, YU Jin-qian<sup>1</sup>

1. Shandong Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

3. Kangsen Sanfeng Biological Engineering Technology Co., Ltd., Jinan 250014, China

**Abstract: objective** To research the chemical composition from the roots of *Lonicera japonica* and their anti-inflammatory activities.

**Methods** The compounds were isolated and purified by chromatography on silica gel column, Sephadex LH-20 column, preparative thin-layer, and semi-preparative HPLC, etc. Their structures were identified on the basis of spectroscopic data, and parts of the isolated compounds were tested for their anti-inflammatory activities against zebrafish. **Results** Fourteen compounds were isolated and elucidated as 3,13-dihydroxystemodan-2-one (1), chrysophanol (2), palmarumycin CP<sub>2</sub> (3),  $\beta$ -sitosterol (4), stigmasterol (5), stigmast-4,6,8(14), 22-tetraen-3-one (6), erythrassin D (7), lanosterin (8), 3-O-acetyloleanolic acid (9), protocatechuic aldehyde (10), daucosterol (11), (E)-3-(3,4-dihydroxybenzylidene)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-2(3H)-furanone (12), lomacarinolide B (13), and (2E,6S)-8-( $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 6'))- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-2,6-dimethyloct-2-eno-1,2"-lactone (14). **Conclusion** Compound 1 is a new compound, and compounds 2, 3, 6, 7~9, and 13 are isolated from *L. japonica* for the first time. Compounds 9 and 10 show the significant anti-inflammatory activities at 100  $\mu$ g/mL.

**Key words:** roots of *Lonicera japonica*; 3,13-dihydroxystemodan-2-one; chrysophanol; palmarumycin CP<sub>2</sub>; 3-O-acetyloleanolic acid; protocatechuic aldehyde; anti-inflammation; zebrafish

忍冬根为忍冬科 (Caprifoliaceae) 植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥根。忍冬作为山东地道药材, 是我国传统中药之一, 其花作为金银花

入药, 茎作为忍冬藤入药<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 金银花具有抗菌<sup>[2]</sup>、抗病毒<sup>[3]</sup>、抗炎<sup>[4]</sup>、保肝<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>等药理活性, 临床上主要用于治疗温病发热、

收稿日期: 2016-03-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473298); 山东省科技发展项目 (2014GSF119031); 山东省科技发展项目 (2014GZX219003)

作者简介: 王召平 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物分离与纯化。Tel: (0531)82605319 E-mail: sdwfwzp@163.com

\*通信作者 于金倩 (1987—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为天然产物化学。Tel: (0531)82605319 E-mail: yujinqian87528@126.com

王 晓 (1971—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为天然产物化学。Tel: (0531)82605319 E-mail: wangx@sas.org

热毒血痢、痈肿疮疡、风湿热痹、关节红肿热痛等症<sup>[7]</sup>。忍冬根作为忍冬的植物组成部位却未曾开发利用,为了进一步扩大药用部位,本实验对忍冬根部位进行系统的成分研究,分离纯化得到14个化合物,分别鉴定为3,13-dihydroxystemodan-2-one (**1**)、大黄酚(chrysophanol, **2**)、palmarumycin CP<sub>2</sub> (**3**)、 $\beta$ -谷甾醇( $\beta$ -sitosterol, **4**)、豆甾醇(stigmasterol, **5**)、豆甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮[stigmast-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, **6**]、erythrassininate D (**7**)、羊毛甾醇(lanosterin, **8**)、齐墩果酸-3-乙酸酯(3-O-acetyloleanolic acid, **9**)、原儿茶醛(protocatechuinaldehyde, **10**)、胡萝卜苷(daucosterol, **11**)、(E)-3-(3,4-二羟基苯亚甲基)-5-(3,4-二羟基苯)-2(3H)-呋喃酮[(E)-3-(3,4-dihydroxybenzylidene)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-2(3H)-furanone, **12**]、lomacarinoside B (**13**)、(2E,6S)-8-( $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 6'))- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-2,6-dimethyloct-2-eno-1,2"-lactone (**14**)。其中化合物**1**为新化合物,化合物**2**、**3**、**6**、**7**~**9**、**13**均为首次从该植物中分离。

## 1 仪器与材料

Bruker-400 核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司); Waters 600 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 普源 L-3000 系列高效液相色谱仪(北京普源精电科技有限公司); 旋转蒸发器 R-3(瑞士 Buchi 公司); WZZ-15 自动旋光仪(上海光学仪器厂); Agilent 1200 RRLC-6410 QQQ-MS/MS 质谱仪(美国 Agilent 公司); YRT-3 型药物熔点仪(天津天天发科技有限公司); YMC-PEAK ODS-A 分析型色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); YMC-PEAK ODS-A 半制备型色谱柱(250 mm $\times$ 10.0 mm, 5  $\mu$ m); 薄层硅胶 GF<sub>254</sub>, 柱色谱硅胶(200~300 目, 青岛海洋化工厂); SZX16 型荧光显微镜及 DP2-BSW 图像采集系统(日本 Olympus 公司); Forma 3111 型水套式 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Forma 公司); 斑马鱼养殖饲养设备(北京爱生科技公司); JS7 系巨噬细胞荧光转基因斑马鱼(山东省科学院生物研究所药物筛选研究室); CuSO<sub>4</sub> (Sigma 公司); HPLC 用甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司); HPLC 用水为娃哈哈纯净水; 提取分离用试剂乙醇、石油醚、醋酸乙酯、甲醇、二氯甲烷均为分析纯。

忍冬根药材采购于山东临沂市平邑县,经山东中医药大学李佳教授鉴定为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥根。

## 2 方法

### 2.1 提取与分离

干燥忍冬根 18 kg, 粉碎, 95%乙醇回流提取 3 次, 分别为 2、2、1 h, 提取液合并、浓缩, 得乙醇提取物。乙醇提取物用纯净水复溶到 5 L, 依次用等体积石油醚(60~90  $^{\circ}$ C)、醋酸乙酯、正丁醇萃取 4 次, 分别合并每部分萃取液, 减压浓缩干燥得石油醚浸膏 A (86 g) 和醋酸乙酯浸膏 B (460 g)。A 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 100:0 $\rightarrow$ 0:100 洗脱, 得到 A1~A18 段。A5 (石油醚-醋酸乙酯 100:1, 8 g) 经硅胶柱色谱(石油醚-醋酸乙酯 100:0 $\rightarrow$ 1:1) 分为 8 段(A5a-A5h), 其中 A5d 部分(石油醚-醋酸乙酯 25:1, 0.35 g) 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 得化合物 **2** (13 mg) 和 **3** (8 mg)。A10 部分(石油醚-醋酸乙酯 15:1, 13 g) 经硅胶柱色谱(石油醚-醋酸乙酯 100:1 $\rightarrow$ 1:1) 分离, 其中 A10d2 (石油醚-醋酸乙酯 15:1, 0.3 g) 析晶, 滤过、重结晶得化合物 **4** (200 mg), A10e5 (石油醚-醋酸乙酯 10:1, 0.1 g) 重结晶得化合物 **5** (35 mg), A10b2 (石油醚-醋酸乙酯 20:1, 0.1 g) 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 得化合物 **6** (18 mg), A10f3 部分(石油醚-醋酸乙酯 10:1, 0.15 g) 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 得化合物 **7** (5 mg)。A13 部分(石油醚-醋酸乙酯 10:1, 6 g) 经硅胶柱色谱(石油醚-醋酸乙酯 100:0 $\rightarrow$ 0:100)、Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 得化合物 **8** (8.5 mg); B 通过硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 100:0 $\rightarrow$ 0:100) 分为 B1~B13 段。B1 部分(二氯甲烷-甲醇 100:0, 6.3 g) 经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 得化合物 **9** (5 mg)。B3 部分(二氯甲烷-甲醇 100:1, 17 g) 经硅胶柱色谱(石油醚-醋酸乙酯 100:0 $\rightarrow$ 1:1) 分离, 其中 B3g4 部分(二氯甲烷-甲醇 50:1, 3 g) 重结晶得化合物 **1** (30 mg)。B4 部分(二氯甲烷-甲醇 50:1, 22 g) 经逆流色谱, 流动相为石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 6:4:1:9, 得到化合物 **10** (8 mg)。B5 部分(二氯甲烷-甲醇 25:1, 35 g) 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 100:0 $\rightarrow$ 0:100) 分离, 其中 B5j (二氯甲烷-甲醇 15:1, 5 g) 重结晶得化合物 **11** (45 mg), B5a5b 部分(二氯甲烷-甲醇 15:1, 0.15 g) 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 得化合物 **12** (6 mg)。B8 部分(二氯甲烷-甲醇 10:1, 40 g) 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 100:1 $\rightarrow$ 1:1)、

Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1)、高效制备液相制备得化合物 **13** (100 mg)、化合物 **14** (15 mg)。

## 2.2 细胞活性研究

**2.2.1 斑马鱼抗炎模型的培养**<sup>[8]</sup> JS7 系巨噬细胞荧光转基因斑马鱼雌雄分开喂养, 照明 14 h、黑暗 10 h 交替进行, 定时喂以人工颗粒状饵料和刚孵出的卤虫无节幼体。采卵时取健康性成熟的斑马鱼按雌雄 1:1 的比例放入交配缸内, 次日 9~10 时获得受精卵。对受精卵进行消毒和洗涤后移入斑马鱼胚胎培养用水 (含 5.0 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、0.16 mmol/L MgSO<sub>4</sub>) 中, 28 °C 下控光培养。

**2.2.2 不同药物对转基因斑马鱼抗炎活性研究** 受精卵发育 3 d 时, 体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎, 移入 6 孔培养板中, 每孔 20 枚, 每组 2 个复孔, 实验重复 2 次。分别加入不同质量浓度 (1、10、100 μg/mL) 的 10 个化合物 (化合物 **1~3**、**6**、**8~10**、**12~14**) 溶液, 加培养水至 6.0 mL, 阳性对照组加入 3.6 μg/mL 阿司匹林, 阴性对照组加入 0.1% DMSO, 加盖置于光照培养箱 (28 °C) 让胚胎继续发育 1 h。CuSO<sub>4</sub> 避光处理斑马鱼 1 h 后, 室温条件下用 4% 多聚甲醛 (PFA) 固定 1 h, 清除 4% PFA 并使用 PBST 清洗。另设空白对照组、CuSO<sub>4</sub> 对照组, 空白对照组、CuSO<sub>4</sub> 对照组斑马鱼发育 3 d 时, 使用 0.1% DMSO 处理, 随后置于光照培养箱 (28 °C) 让胚胎继续发育 1 h 后, 空白对照组不添加 20 μmol/L 的 CuSO<sub>4</sub> 溶液; CuSO<sub>4</sub> 对照组添加 20 μmol/L 的 CuSO<sub>4</sub> 溶液, 继续在 28 °C 条件下避光培养。1 h 后, 利用 4% PFA 在室温条件下将其固定。固定 1 h 后去除 PFA, 并使用磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 清洗。

## 3 结果

### 3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +57.5° (c 0.2,

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。mp 159.1~161.2 °C。(–) HR-ESI-MS 给出准分子离子峰  $m/z$  319.235 1 [M–H]<sup>–</sup> (理论值 320.235 3, C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>), 确定分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>, 不饱和度为 5。红外光谱数据包括 3 464, 2 952, 2 857, 1 683, 1 445, 1 212, 1 077 cm<sup>–1</sup>, 其中 3 464 和 1 683 cm<sup>–1</sup> 说明化合物结构中含有羟基和羰基。

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 显示该化合物在低场区有连氧氢信号 δ<sub>H</sub> 3.83 (1H, s), 在高场区有 4 个甲基信号 δ<sub>H</sub> 1.18 (3H, s), 1.15 (3H, s), 0.88 (3H, s) 和 0.72 (3H, s) (表 1)。<sup>13</sup>C-NMR 结合 HSQC 图谱显示 20 个碳信号, 其中包括 1 个羰基碳 (δ<sub>C</sub> 212.0)、2 个连氧碳 (δ<sub>C</sub> 82.8, 72.4) 和 4 个甲基碳 (δ<sub>C</sub> 30.3, 28.0, 16.4, 15.7)。上述官能团中仅羰基不饱和度为 1, 表明化合物 **1** 为四环结构。以上波谱数据与已知的二萜类化合物 stemodinone<sup>[9]</sup> 比较相似, 不同的是化合物 **1** 在 C-3 位置连有 –OH 取代基。HMBC 谱图 (图 1) 中的相关进一步验证了上述推断: 从 δ<sub>H</sub> 3.83 (H-3) 与 δ<sub>C</sub> 45.3 (C-5)、30.3 (C-18)、16.4 (C-19) 的相关信号, δ<sub>H</sub> 2.14 (H-5) 与 δ<sub>C</sub> 82.8 (C-3), 30.3 (C-18), 23.6 (C-6), 16.4 (C-19) 的相关信号, δ<sub>H</sub> 1.18 (H<sub>3</sub>-18) 与 δ<sub>C</sub> 82.8 (C-3), 45.3 (C-5), 16.4 (C-19) 的相关信号, δ<sub>H</sub> 0.72 (H<sub>3</sub>-19) 与 δ<sub>C</sub> 82.8 (C-3), 45.3 (C-5), 30.3 (C-18) 的相关信号可以确定 C-3 位连有 –OH 取代; 通过 NOESY 谱中照射 δ<sub>H</sub> 3.83 (H-3) 信号发现 δ<sub>H</sub> 1.18 (H<sub>3</sub>-19) 有增益, 说明 H-3 为 β 构型, OH 为 α 构型 (图 1)。因此化合物 **1** 的化学结构确定为 3,13-dihydroxystemodan-2-one。经 Scifinder 数据库检索为新化合物。

化合物 **2**: 橙红色粉末, ESI-MS:  $m/z$  253.2 [M–H]<sup>–</sup> (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.14 (1H, s, 1-OH), 7.11 (1H, s, H-2), 7.66 (1H, s, H-4), 7.84 (1H, dd,  $J$  = 8.4, 1.2 Hz, H-5), 7.82 (1H, dd,  $J$  = 8.4, 1.2

表 1 化合物 **1** 的波谱数据 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Table 1 <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of compound **1** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

| 碳位 | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub>                                 | 碳位 | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub>                                             |
|----|----------------|------------------------------------------------|----|----------------|------------------------------------------------------------|
| 1  | 47.8           | 2.13 (d, $J$ = 8.0 Hz), 2.68 (d, $J$ = 8.0 Hz) | 11 | 25.5           | 1.68 (dd, $J$ = 3.8, 8.8 Hz), 1.94 (overlapped)            |
| 2  | 212.0          |                                                | 12 | 32.5           | 1.38 (overlapped), 1.62 (dd, $J$ = 3.6, 8.8 Hz)            |
| 3  | 82.8           | 3.83 (s)                                       | 13 | 72.4           |                                                            |
| 4  | 45.9           |                                                | 14 | 46.5           | 2.00 (m)                                                   |
| 5  | 45.3           | 2.14 (dd, $J$ = 3.0, 12.6 Hz)                  | 15 | 33.0           | 1.33 (overlapped), 1.74 (overlapped)                       |
| 6  | 26.3           | 1.34 (overlapped), 1.75 (overlapped)           | 16 | 31.6           | 1.00 (dd, $J$ = 5.2, 8.8 Hz), 1.87 (dd, $J$ = 3.2, 8.4 Hz) |
| 7  | 23.6           | 1.35 (overlapped), 1.80 (overlapped)           | 17 | 28.0           | 1.15 (s)                                                   |
| 8  | 39.7           | 1.93 (overlapped)                              | 18 | 30.3           | 0.72 (s)                                                   |
| 9  | 48.2           |                                                | 19 | 16.4           | 1.18 (s)                                                   |
| 10 | 45.6           |                                                | 20 | 15.7           | 0.88 (s)                                                   |

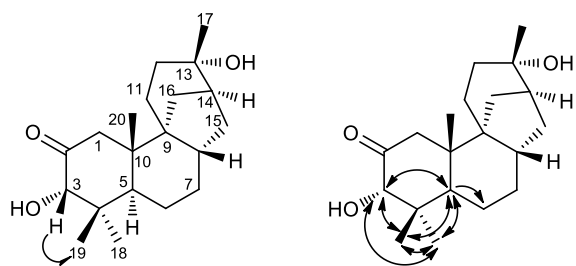


图1 化合物1的结构及重要HMBC(→)相关

Fig. 1 Structure and key HMBC correlations (→) of compound 1

Hz, H-6), 7.26 (1H, m, H-7), 12.03 (1H, s, 8-OH), 2.47 (3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 22.3 (C-CH<sub>3</sub>), 162.3 (C-1), 124.6 (C-2), 149.4 (C-3), 121.4 (C-4), 119.9 (C-5), 136.9 (C-6), 124.4 (C-7), 162.8 (C-8), 192.6 (C-9), 182.1 (C-10), 133.3 (C-4a), 115.9 (C-8a), 113.8 (C-9a), 133.7 (C-10a)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[10]</sup>, 故鉴定化合物2为大黄酚。

化合物3: 黄白色油状物质, ESI-MS:  $m/z$  317.3 [M-H]<sup>-</sup> (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.49 (2H, t,  $J$  = 2.4 Hz, H-2), 2.85 (2H, t,  $J$  = 2.4 Hz, H-3), 7.54 (2H, d,  $J$  = 5.2 Hz, H-4', 5'), 7.46 (2H, dd,  $J$  = 7.6, 5.2 Hz, H-3', 6'), 7.11 (1H, d,  $J$  = 0.8 Hz, H-6), 6.98 (2H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-2', 7'), 7.64 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-7), 7.45 (1H, dd,  $J$  = 7.6, 0.8 Hz, H-8), 12.44 (1H, s, -OH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 98.4 (C-1), 29.4 (C-2), 34.1 (C-3), 203.4 (C-4), 162.5 (C-5), 116.7 (C-6), 137.2 (C-7), 119.6 (C-8), 115.4 (C-4a), 134.2 (C-4a'), 140.8 (C-8a), 113.4 (C-8a') 147.4 (C-1', 8'), 109.4 (C-2', 7'), 127.6 (C-3', 6'), 120.9 (C-4', 5')。以上数据与文献报道基本一致<sup>[11]</sup>, 故鉴定化合物3为 palmarumycin CP<sub>2</sub>。

化合物4: 白色粉末, ESI-MS:  $m/z$  413.5 [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.35 (1H, s, H-6), 3.52 (1H, brs, H-3), 1.01 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.68 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, d,  $J$  = 4.0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.84 (6H, m, 26, 27-CH<sub>3</sub>), 0.81 (3H, s, 29-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 36.5 (C-1), 29.2 (C-2), 71.8 (C-3), 45.9 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.7 (C-7), 31.9 (C-8), 50.2 (C-9), 36.1 (C-10), 28.2 (C-11), 39.8 (C-12), 42.3 (C-13), 56.8 (C-14), 26.1 (C-15), 29.6 (C-16), 56.1 (C-17), 11.7 (C-18), 19.8 (C-19), 37.0 (C-20), 19.4 (C-21), 33.9 (C-22), 24.3 (C-23), 37.3 (C-24), 19.0 (C-25), 11.9 (C-26), 23.1

(C-27), 21.1 (C-28), 18.8 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[12]</sup>, 故鉴定化合物4为β-谷甾醇。

化合物5: 白色粉末, ESI-MS:  $m/z$  413.6 [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.68 (3H, s, H-18), 0.78 (3H, s, H-27), 0.79 (3H, s, H-19), 0.81 (3H, s, H-29), 0.83 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, brs, H-21), 3.35 (1H, m, H-3α), 5.13 (1H, m, H-22), 5.30 (1H, d,  $J$  = 4.0 Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 37.3 (C-1), 31.8 (C-2), 71.8 (C-3), 41.3 (C-4), 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.2 (C-9), 36.6 (C-10), 21.2 (C-11), 39.8 (C-12), 42.3 (C-13), 56.9 (C-14), 24.3 (C-15), 29.1 (C-16), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 19.4 (C-19), 40.5 (C-20), 21.1 (C-21), 138.3 (C-22), 129.2 (C-23), 51.2 (C-24), 31.7 (C-25), 19.0 (C-26), 21.2 (C-27), 25.4 (C-28), 12.0 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[12]</sup>, 故鉴定化合物5为豆甾醇。

化合物6: 黄白色油状物质, ESI-MS:  $m/z$  405.3 [M-H]<sup>-</sup> (C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>O); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.82 (3H, t,  $J$  = 6.8 Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, 26-CH<sub>3</sub>), 0.94 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, 27-CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, s, 21-CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 1.05 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, 18-CH<sub>3</sub>), 5.23 (2H, m, H-22, 23), 5.73 (1H, s, H-4), 6.02 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-6), 6.62 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-7); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 34.1 (C-1), 34.2 (C-2), 199.5 (C-3), 123.0 (C-4), 164.4 (C-5), 124.5 (C-6), 134.0 (C-7), 124.4 (C-8), 42.9 (C-9), 44.0 (C-10), 18.9 (C-11), 29.7 (C-12), 36.7 (C-13), 156.1 (C-14), 27.7 (C-15), 35.6 (C-16), 55.7 (C-17), 21.2 (C-18), 19.9 (C-19), 39.3 (C-20), 17.6 (C-21), 132.6 (C-22), 135.0 (C-23), 44.4 (C-24), 19.0 (C-25), 33.1 (C-26), 19.7 (C-27), 25.4 (C-28), 16.7 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[13]</sup>, 故鉴定化合物6为豆甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮。

化合物7: 白色粉末, ESI-MS:  $m/z$  557.5 [M-H]<sup>-</sup> (C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>4</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.87 (3H, t,  $J$  = 6.8 Hz, 26''-CH<sub>3</sub>), 1.10~1.48 [48H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>24</sub>], 3.93 (3H, s, 4-OMe), 4.20 (2H, t,  $J$  = 6.4 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>R), 5.82 (1H, brs, -OH), 6.31 (1H, d,  $J$  = 16.0 Hz, H-2'), 6.92 (1H, d,  $J$  = 16.0 Hz, H-5), 7.03 (1H, m, H-2), 7.08 (1H, m, H-6), 7.56 (1H, d,  $J$  = 16 Hz, H-1'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 127.3 (C-1), 115.7 (C-2), 144.6 (C-3, 4, 1'), 114.7 (C-5), 123.0 (C-6), 109.3 (C-2'), 169.3 (C-3'), 64.6 (C-1''), 28.8 (C-2''), 26.0 (C-3''), 29.7 (C-4''~C-23''), 31.9

(C-24''), 22.7 (C-25''), 14.1 (C-26''), 59.6 (4-OMe)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **7** 为 erythrinassinate D。

化合物 **8**: 白色粉末, ESI-MS:  $m/z$  425.7  $[M-H]^-$  ( $C_{30}H_{50}O$ );  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 3.25 (1H, m, H-3), 0.81 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 5.07 (1H, m, H-24), 1.60 (3H, brs, H-26), 1.68 (3H, brs, H-27), 0.85 (3H, s, H-28), 1.00 (3H, s, H-29), 0.69 (3H, s, H-30);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 36.4 (C-1), 28.0 (C-2), 79.0 (C-3), 38.9 (C-4), 50.9 (C-5), 21.0 (C-6), 28.2 (C-7), 134.4 (C-8), 130.9 (C-9), 37.1 (C-10), 18.3 (C-11), 25.5 (C-12), 44.5 (C-13), 49.8 (C-14), 30.9 (C-15), 29.7 (C-16), 50.4 (C-17), 15.8 (C-18), 18.6 (C-19), 36.3 (C-20), 19.1 (C-21), 35.6 (C-22), 25.7 (C-23), 125.3 (C-24), 134.4 (C-25), 24.9 (C-26), 17.6 (C-27), 24.3 (C-28), 27.9 (C-29), 15.4 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 **8** 为羊毛甾醇。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS:  $m/z$  497.7  $[M-H]^-$  ( $C_{32}H_{50}O_4$ );  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 4.40 (1H, dd,  $J = 2.8, 4.0$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 5.17 (1H, t,  $J = 4.0$  Hz, H-12), 2.77 (1H, dd,  $J = 2.9, 4.0$  Hz, H-18), 0.73 (3H, s, 23-CH<sub>3</sub>), 0.82 (3H, s, 24-CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, s, 25-CH<sub>3</sub>), 1.05 (3H, s, 26-CH<sub>3</sub>), 1.07 (3H, s, 27-CH<sub>3</sub>), 0.90 (3H, s, 28-CH<sub>3</sub>), 0.99 (3H, s, 29-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, s, 30-CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 38.7 (C-1), 23.1 (C-2), 79.8 (C-3), 37.4 (C-4), 54.4 (C-5), 17.7 (C-6), 32.1 (C-7), 39.9 (C-8), 46.7 (C-9), 37.1 (C-10), 22.8 (C-11), 121.3 (C-12), 143.7 (C-13), 41.2 (C-14), 27.1 (C-15), 22.5 (C-16), 45.6 (C-17), 40.7 (C-18), 45.4 (C-19), 30.3 (C-20), 33.2 (C-21), 31.2 (C-22), 27.65 (C-23), 16.7 (C-24), 14.9 (C-25), 16.5 (C-26), 25.4 (C-27), 178.5 (C-28), 32.7 (C-29), 23.3 (C-30), 20.9 (Ac), 170.0 (CO)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物 **9** 为齐墩果酸-3-乙酸酯。

化合物 **10**: 灰白色粉末, ESI-MS:  $m/z$  137.1  $[M-H]^-$  ( $C_7H_6O_3$ );  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 9.70 (1H, s, 7-CHO), 7.23 (1H, brs, H-2), 6.91 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 7.28 (1H, m, H-6);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 129.2 (C-1), 114.8 (C-2), 146.4 (C-3), 152.8 (C-4), 115.9 (C-5), 124.9 (C-6), 191.4 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物 **10** 为原儿茶醛。

化合物 **11**: 白色粉末, mp 298~300 °C, 难溶于一般有机溶剂, Libermann-Burchard 反应阳性, Molish 反应阳性, 与  $\beta$ -胡萝卜素对照品在多种溶剂系统展开进行 TLC 对照, 喷硫酸-乙醇显色剂, 105 °C 下加热显色, 样品斑点的  $R_f$  值与  $\beta$ -胡萝卜素对照品相同, 且均为紫红色, 且混合后熔点不下降, 故鉴定化合物 **11** 为  $\beta$ -胡萝卜素。

化合物 **12**: 橙色油状物, ESI-MS:  $m/z$  313.1  $[M+H]^+$  ( $C_{17}H_{12}O_6$ );  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 9.46 (4H, brs, -OH), 7.10 (1H, s, H-3), 7.22 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-6), 6.83 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-9), 7.12 (1H, s, H-11), 7.23 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-13), 6.86 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-16), 7.20 (2H, brs, H-10, 17);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 170.0 (C-1), 121.6 (C-2), 98.6 (C-3), 155.5 (C-4), 119.8 (C-5), 112.7 (C-6), 146.2 (C-7), 148.5 (C-8), 116.5 (C-9), 117.9 (C-10), 134.4 (C-11), 126.9 (C-12), 117.7 (C-13), 148.5 (C-14), 149.2 (C-15), 116.7 (C-16), 124.4 (C-17)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[18]</sup>, 故鉴定化合物 **12** 为 (*E*)-3-(3,4-二羟基苯亚甲基)-5-(3,4-二羟基苯)-2(3*H*)-呋喃酮。

化合物 **13**: 白色粉末, ESI-MS:  $m/z$  359.1  $[M+H]^+$  ( $C_{16}H_{22}O_9$ );  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 7.26 (1H, s, H-2), 2.95 (1H, m, H-4), 2.07 (1H, m, H-5a), 1.45 (1H, m, H-5b), 1.84 (1H, m, H-7), 3.89 (1H, s, H-8), 5.12 (1H, s, H-10), 1.71 (1H, brs, H-11), 0.98 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-12), 4.49 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1'), 2.97 (1H, m, H-2'), 3.16 (1H, m, H-3'), 3.04 (1H, m, H-4'), 3.14 (1H, m, H-5'), 3.89 (1H, m, H-6a'), 3.44 (1H, m, H-6b');  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 112.6 (C-1), 151.0 (C-2), 167.4 (C-3), 31.2 (C-4), 42.2 (C-5), 45.2 (C-7), 72.6 (C-8), 96.2 (C-10), 41.0 (C-11), 13.9 (C-12), 99.1 (C-1'), 73.6 (C-2'), 77.2 (C-3'), 70.6 (C-4'), 77.8 (C-5'), 61.6 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致<sup>[19]</sup>, 故鉴定化合物 **13** 为 lomacarinoside B。

化合物 **14**: 白色粉末, ESI-MS:  $m/z$  461.2  $[M-H]^-$  ( $C_{21}H_{34}O_{11}$ );  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 6.68 (1H, s, H-3), 2.13 (1H, m, H-4 $\beta$ ), 1.47 (1H, m, H-6), 1.35 (2H, m, H-5, 7), 3.48 (1H, s, H-8), 3.98 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-9), 2.90 (1H, brs, H-10), 3.10 (1H, m, H-11), 2.81 (1H, brs, H-12), 4.12 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-14 $\alpha$ ), 3.17 (1H, m, H-14 $\beta$ ), 4.31 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz,

H-15), 4.90 (1H, m, H-16), 3.61 (1H, s, H-17), 3.69 (1H, s, H-18), 3.75 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-19 $\alpha$ ), 2.24 (1H, m, H-19 $\alpha$ ), 3.51 (1H, m, H-19 $\beta$ ), 1.76 (3H, s, H-20), 0.92 (3H, s, H-21);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 166.9 (C-1), 127.6 (C-2), 142.45 (C-3), 25.0 (C-4), 35.3 (C-5), 29.7 (C-6), 34.6 (C-7), 68.0 (C-8), 102.4 (C-9), 73.9 (C-10), 77.1 (C-11), 72.1 (C-12), 75.8 (C-13), 70.2 (C-14), 102.0 (C-15), 72.7 (C-16), 71.2 (C-17), 69.0 (C-18), 66.9 (C-19), 12.9 (C-20), 25.5 (C-21)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[20]</sup>, 故鉴定化合物 **14** 为 (2*E*,6*S*)-8-( $\alpha$ -*L*-arabinopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -*D*-glucopyranosyloxy)-2,6-dimethyloct-2-eno-1,2"-lactone。

### 3.2 抗炎活性

对化合物 **1**~**3**、**6**、**8**~**10**、**12**~**14** 进行抗炎活性研究。荧光显微镜下观察巨噬细胞炎症反应, 计算炎症细胞数量, 统计样品对炎症反应的影响, 并观察胚胎死亡或畸形情况。各个化合物的抗炎活性见表 2。

表 2 化合物对斑马鱼炎症的影响

Table 2 Effects of compounds against zebrafish inflammation

| 组别                                   | 巨噬细胞数量                             |                                     |                                      |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
|                                      | 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
| 1                                    | 18.00 $\pm$ 5.35                   | 18.57 $\pm$ 4.23                    | 15.86 $\pm$ 4.38                     |
| 2                                    | 17.43 $\pm$ 4.12                   | 16.71 $\pm$ 2.81                    | 14.43 $\pm$ 2.51                     |
| 3                                    | 15.71 $\pm$ 3.86                   | 15.86 $\pm$ 3.85                    | 13.71 $\pm$ 3.30                     |
| 6                                    | 14.71 $\pm$ 3.72                   | 17.86 $\pm$ 3.89                    |                                      |
| 8                                    | 16.71 $\pm$ 5.15                   | 14.86 $\pm$ 2.41                    | 13.29 $\pm$ 2.75                     |
| 9                                    | 16.29 $\pm$ 2.14                   | 14.43 $\pm$ 3.51                    | 7.57 $\pm$ 2.57*                     |
| 10                                   | 16.29 $\pm$ 3.77                   | 14.29 $\pm$ 4.50                    | 7.14 $\pm$ 2.41*                     |
| 12                                   | 14.91 $\pm$ 3.53                   | 15.85 $\pm$ 5.96                    | 21.60 $\pm$ 5.98                     |
| 13                                   | 18.00 $\pm$ 7.97                   | 16.62 $\pm$ 5.07                    | 26.14 $\pm$ 7.17                     |
| 14                                   | 17.70 $\pm$ 2.06                   | 15.16 $\pm$ 4.35                    | 16.62 $\pm$ 5.55                     |
| 空白对照                                 |                                    | 3.43 $\pm$ 0.79                     |                                      |
| CuSO <sub>4</sub> 对照                 |                                    | 17.00 $\pm$ 5.35                    |                                      |
| 阿司匹林                                 |                                    | 7.52 $\pm$ 1.88                     |                                      |
| 3.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |                                    |                                     |                                      |

与 CuSO<sub>4</sub> 对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs CuSO<sub>4</sub> group

结果表明, 当质量浓度为 1、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 所有化合物均未表现出抗炎活性; 当质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 化合物 **9**、**10** 表现出明显的抗炎活性, 其他化合物均未表现出抗炎活性。

### 参考文献

[1] 陈玲, 张海艳, 李晓, 等. 忍冬的化学成分研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(1): 108-114.

[2] 李平, 赵成. 金银花水提物及醇提物体外抗菌实验 [J]. 中国当代医药, 2010, 17(17): 48.

[3] 王变利, 高燕, 赵秀香. 金银花水提物体外抗病毒实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(8): 1495-1497.

[4] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 490-495.

[5] 黎先胜. 金银花总皂苷的抗炎和保肝作用研究 [J]. 食品工业, 2009(4): 4-6.

[6] 滕杨, 谭天, 罗时旋, 等. 金银花醇提物的抗氧化及保肝作用 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(24): 57-59.

[7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[8] d'Alençon C A, Peña O A, Wittmann C, et al. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish [J]. BMC Biol, 2010, 8: 151-166.

[9] Lamm A S, Reynolds W F, Reese P B. Bioconversion of *Stemodia maritima* diterpenes and derivatives by *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* and *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Phytochemistry, 2006, 67(11): 1088-1093.

[10] 杨淑敏, 刘锡葵, 卿晨, 等. 水杨柳根的化学成分 (英文) [J]. 药学学报, 2007, 42(3): 292-296.

[11] Krohm K, Michel A, Floerke U, et al. Palmarumycins CP1-CP4 from *Coniothyrium palmarum*: Isolation, structure elucidation, and biological activity [J]. Liebigs Annalen der Chemie, 1994, 11: 1093-1097.

[12] 许明峰, 沈莲清, 王奎武. 雷丸化学成分的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 251-254.

[13] 熊英, 邓可众, 高文远, 等. 中药猫爪草化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(8): 909-911.

[14] Nkengfack A E, Vouffo T W, Vardamides J C, et al. Phenolic metabolites from *Erythrina* species [J]. Phytochemistry, 1997, 46(3): 573-578.

[15] 孔令义, 闵知大. 大戟根化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1996, 31(7): 45-50.

[16] Kolak U, Topcu G, Birteksoz S, et al. Terpenoids and steroids from the roots of *Salvia blepharochlaena* [J]. Turk J Chem, 2005, 29(2): 177-186.

[17] 杨琳, 赵庆春, 谭菁菁, 等. 桂枝的化学成分研究 [J]. 实用药物与临床, 2010, 13(3): 183-185.

[18] Tanaka S, Okabe T, Nakajima S, et al. BE-23372M, a novel protein tyrosine kinase inhibitor. II. Physico-chemical properties and structure elucidation [J]. J Antibiot, 1994, 47(3): 294-296.

[19] Wang Q, Dai N, Han N. The structural elucidation and antimicrobial activities of two new monoterpeneglucoside derivatives from *Lomatogonium carinthiacum* (Wulf) Reichb [J]. Magn Reson Chem, 2014, 52(9): 511-514.

[20] 谢乔, 王文婧, 李国强, 等. 仔榄树的化学成分 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2013, 34(1): 121-124.