

甘草中抑制脂多糖诱导小鼠 RAW 264.7 产生 NO 的活性成分研究

王海强, 刘一宁, 陆晓燕, 王书芳*

浙江大学药学院药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

摘要: 目的 研究甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 中的抗炎活性成分。方法 采用大孔树脂、ODS、半制备液相等色谱手段进行分离纯化, 并通过 LC-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 等波谱技术进行结构鉴定。用细菌脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型对分离到的化合物进行抗炎活性筛选。结果 从甘草中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为甘草苷(1)、芹糖甘草苷(2)、异甘草苷(3)、芹糖异甘草苷(4)、sophoraisoflavone A(5)、粗毛甘草素 F(6)、光甘草酮(7)、光甘草定(8)、甘草黄酮醇(9)和粗毛甘草素 D(10)。结论 化合物 1、3、5、6、8 和 9 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 分泌有一定的抑制作用。其中化合物 5、6 和 9 抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 分泌为首次报道。

关键词: 甘草; 甘草苷; sophoraisoflavone A; 粗毛甘草素 F; 甘草黄酮醇; 抗炎活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)23-4155-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.007

Study on active constituents from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* against NO production in LPS-induced RAW264.7 macrophages

WANG Hai-qiang, LIU Yi-ning, LU Xiao-yan, WANG Shu-fang

Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory constituents in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. **Methods** The compounds were isolated and purified by means of macroporous resin, ODS column chromatography, and semi-preparative HPLC. And their structures were identified by LC-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. The anti-inflammatory activities of the compounds were evaluated on LPS-induced NO production in RAW 264.7 macrophages. **Results** Their structures were identified as liquiritin (1), liquiritin apioside (2), isoliquiritin (3), isoliquiritin apioside (4), sophoraisoflavone A (5), glyasperin F (6), glabrone (7), glabridin (8), licoflavonol (9), and glyasperin D (10). **Conclusion** Compounds 1, 3, 5, 6, 8, and 9 could inhibit NO production in RAW 264.7 macrophages to some extent. And the anti-inflammatory effects of compounds 5, 6, and 9 are first reported in this work.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; liquiritin; sophoraisoflavone A; glyasperin F; licoflavonol; anti-inflammatory activity

甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 是豆科 (Leguminosae) 甘草属 *Glycyrrhiza* Linn. 某些植物的干燥根及根茎, 广泛分布在中国的华北、东北和西北地区, 素有“国老”的尊称^[1]。《中国药典》2015 年版中收录的甘草有 3 种, 分别是甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 和光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L.。甘草具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和药效的功效^[2], 其主要的化学成分是黄酮类和三萜皂苷类等^[3], 还包括香豆素、生物碱、氨基酸、有机酸和多糖等。现代药理学研究表明, 甘草具有抗肿瘤、抗动脉粥样

硬化和抗血栓形成、抗病毒、抗炎、抗菌和抗原虫等药理作用^[2-4]。目前已有研究证明甘草中的抗炎活性成分主要有甘草酸 (glycyrrhizic acid)、异甘草素 (isoliquiritigenin)、异甘草苷 (isoliquiritin)、甘草素 (liquiritigenin)、甘草查耳酮 A (licochalcone A)、光甘草定 (glabridin) 和甘草酚 (glycyrol) 等^[4-10]。本实验对甘草乙醇提取液中的黄酮类化合物进行分离鉴定, 共得到 10 个化合物, 分别是甘草苷 (liquiritin, 1)、芹糖甘草苷 (liquiritin apioside, 2)、异甘草苷 (isoliquiritin, 3)、芹糖异甘草苷 (isoliquiritin apioside, 4)、sophoraisoflavone A (5)、

收稿日期: 2016-05-14

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2013ZX09402203)

作者简介: 王海强, 硕士研究生。E-mail: 18709496498@163.com

*通信作者 王书芳, 副教授。Tel: (0571)88208426 E-mail: wangsf@zju.edu.cn

粗毛甘草素 F (glyasperin F, **6**)、光甘草酮 (glabrone, **7**)、光甘草定 (glabridin, **8**)、甘草黄酮醇 (licoflavonol, **9**) 和粗毛甘草素 D (glyasperin D, **10**)。并用细菌脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型对分离到的化合物进行了抑制 NO 产生活性筛选, 发现化合物 **1**、**3**、**5**、**6**、**8** 和 **9** 对 NO 分泌有一定的抑制作用。其中化合物 **5**、**6** 和 **9** 对抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 分泌的结果为首次报道, 是甘草潜在的抗炎活性成分。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Bruker Avance III 500 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); Agilent 6230 TOF 质谱仪 (美国 Agilent 公司); Agilent Zorbax SB-C₁₈ Semi-Preparative 色谱柱 (250 mm×9.4 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); Milli-Q 水 (法国 Millipore 公司); D101 大孔树脂购自天津海光化工有限公司, ODS 填料购自日本 YMC 公司, 甲醇 (分析纯) 购自国药集团化学试剂有限公司, 无水乙醇 (分析纯) 购自上海凌峰化学试剂有限公司; RAW264.7 细胞购于上海细胞库, NO 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, TECAN F200 荧光及化学发光分析仪购自瑞士 TCAN 公司。

甘草 (新疆, 批号 150501) 购自杭州市本地药店, 由浙江大学药学院陈柳蓉副教授鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根。

2 提取与分离

取干燥的甘草 5.0 kg, 分别用 8 倍量和 6 倍量的 95%乙醇水溶液回流提取 2 次, 每次 1 h。合并 2 次提取液, 减压浓缩到一定浓度后, 置于装有 D101 大孔树脂的色谱柱, 分别用水和 40%、95%乙醇洗脱, 收集 40%乙醇洗脱液, 减压浓缩到适宜浓度后, 进行半制备液相色谱分离, 乙腈-水 (10:90→100:0) 梯度洗脱, 得到化合物 **1** (3.9 mg)、**2** (4.6 mg)、**3** (3.3 mg) 和 **4** (3.0 mg)。收集 95%乙醇洗脱液, 经 ODS 中压柱色谱进一步分离, 使用 55%甲醇和纯甲醇溶剂洗脱。收集纯甲醇洗脱液进行减压浓缩后冷冻干燥, 得到干燥粉末 (28 g)。取 0.43 g 干燥粉末用甲醇溶解, 半制备液相色谱分离, 乙腈-水 (15:85→100:0) 梯度洗脱, 得到化合物 **5** (2.8 mg)、**6** (10.8 mg)、**7** (1.2 mg)、**8** (3.0 mg)、**9** (2.7 mg) 和 **10** (2.1 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 417 [M-H]⁻, 835 [2M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.46

(1H, dd, J = 12.8, 3.0 Hz, H-2), 3.04 (1H, dd, J = 16.9, 12.8 Hz, H-3a), 2.74 (1H, dd, J = 16.9, 3.0 Hz, H-3b), 7.73 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5), 6.51 (1H, dd, J = 8.7, 2.3 Hz, H-6), 6.37 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 7.44 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 7.15 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3', 5'), 4.94 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 3.90 (1H, dd, J = 12.1, 2.2 Hz, H-6''a), 3.70 (1H, dd, J = 12.1, 5.6 Hz, H-6''b), 3.37~3.49 (4H, m, H-2''~5''); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 80.9 (C-2), 45.1 (C-3), 193.3 (C-4), 115.2 (C-4a), 134.6 (C-5), 112.0 (C-6), 167.0 (C-7), 104.0 (C-8), 165.6 (C-8a), 130.0 (C-1'), 128.9 (C-2', 6'), 118.0 (C-3', 5'), 159.4 (C-4'); glucose: 102.4 (C-1''), 75.1 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.4 (C-5''), 62.7 (C-6'')。以上数据与文献报道^[11]基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为甘草苷。

化合物 **2**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 549 [M-H]⁻, 1 099 [2M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.45 (1H, dd, J = 13.1, 3.1 Hz, H-2), 3.04 (1H, dd, J = 16.9, 12.8 Hz, H-3a), 2.74 (1H, dd, J = 17.0, 2.7 Hz, H-3b), 7.73 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5), 6.51 (1H, dd, J = 8.7, 2.3 Hz, H-6), 6.37 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 7.44 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 7.12 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3', 5'), 5.00 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 3.89 (1H, dd, J = 12.1, 2.2 Hz, H-6''a), 3.69 (1H, dd, J = 12.0, 5.5 Hz, H-6''b), 3.47~3.67 (4H, m, H-2''~5''), 5.47 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-1'''), 3.95 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2'''), 3.55 (2H, d, J = 2.3 Hz, H-4'''), 4.06 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-5'''a), 3.80 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-5'''b); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 80.9 (C-2), 45.1 (C-3), 193.3 (C-4), 115.2 (C-4a), 130.0 (C-5), 112.0 (C-6), 166.9 (C-7), 104.0 (C-8), 165.6 (C-8a), 134.5 (C-1'), 129.0 (C-2', 6'), 117.9 (C-3', 5'), 159.2 (C-4'); glucose: 101.0 (C-1''), 78.2 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.6 (C-4''), 78.8 (C-5''), 62.7 (C-6''); apiose: 111.0 (C-1'''), 78.8 (C-2'''), 80.9 (C-3'''), 75.6 (C-4'''), 66.2 (C-5''')。以上数据与化合物 **1** 非常相似, 仅比化合物 **1** 多出 1 组芹糖信号, 参考文献报道^[12], 鉴定化合物 **2** 为芹糖甘草苷。

化合物 **3**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 417 [M-H]⁻, 835 [2M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.69 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-α), 7.81 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-β), 7.72 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2, 6), 7.16 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3, 5), 6.30 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3'), 6.42 (1H, dd, J = 8.9, 2.4 Hz, H-5'), 7.99 (1H, d, J = 8.9

Hz, H-6'), 5.00 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.91 (1H, dd, $J = 12.2, 2.3$ Hz, H-6''a), 3.71 (1H, dd, $J = 12.1, 5.7$ Hz, H-6''b); 3.38~3.51 (4H, m, H-2''~5''); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 120.3 (C- α), 144.9 (C- β), 193.5 (C=O), 130.7 (C-1), 131.5 (C-2, 6), 118.2 (C-3, 5), 161.2 (C-4), 114.8 (C-1'), 166.8 (C-2'), 104.0 (C-3'), 167.7 (C-4'), 109.4 (C-5'), 133.6 (C-6'); glucose: 102.0 (C-1''), 75.0 (C-2''), 78.1 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.4 (C-5''), 62.7 (C-6''). 以上数据与文献报道^[13]基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为异甘草苷。

化合物 **4**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 549 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 1 099 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.70 (1H, d, $J = 15.1$ Hz, H- α), 7.81 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H- β), 7.72 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2, 6), 7.14 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 6.30 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 6.43 (1H, dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, H-5'), 7.99 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-6'), 5.06 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 3.91 (1H, dd, $J = 12.2, 2.3$ Hz, H-6''a), 3.70 (1H, dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz, H-6''b); 3.37~3.69 (4H, m, H-2''~5''), 5.47 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1'''), 3.95 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'''), 3.54 (2H, d, $J = 1.4$ Hz, H-4'''), 4.06 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-5'''a), 3.80 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-5'''b); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 120.3 (C- α), 145.0 (C- β), 193.6 (C=O), 130.7 (C-1), 131.6 (C-2, 6), 118.0 (C-3, 5), 161.1 (C-4), 114.9 (C-1'), 166.7 (C-2'), 104.0 (C-3'), 167.7 (C-4'), 111.0 (C-5'), 133.6 (C-6'); glucose: 100.7 (C-1''), 78.2 (C-2''), 78.3 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.8 (C-5''), 62.6 (C-6''); apiose: 109.2 (C-1'''), 80.9 (C-2'''), 78.7 (C-3'''), 75.6 (C-4'''), 66.2 (C-5'''). 以上数据与化合物 **3** 非常相似, 仅比化合物 **3** 多出 1 组芹糖信号, 参考文献报道^[14], 鉴定化合物 **4** 为芹糖异甘草苷。

化合物 **5**: 淡黄色粉末。TOF-MS m/z : 351.090 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.93 (1H, s, H-2), 6.23 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.35 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.40 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.68 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4''), 5.60 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3''), 1.36 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 156.5 (C-2), 122.1 (C-3), 182.5 (C-4), 106.4 (C-4a), 163.9 (C-5), 100.3 (C-6), 166.1 (C-7), 95.0 (C-8), 159.9 (C-8a), 111.5 (C-1'), 153.3 (C-2'), 111.1 (C-3'), 155.1 (C-4'), 108.5 (C-5'), 132.4 (C-6'), 118.3 (C-4''), 129.7 (C-3''), 77.5 (C-2''), 28.2

(5''/6''- CH_3), 27.9 (6''/5''- CH_3)。以上数据与文献报道^[15]基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 sophoraisoflavone A。

化合物 **6**: 黄色粉末。TOF-MS m/z : 353.101 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.58 (1H, dd, $J = 11.1, 10.0$ Hz, H-2), 4.43 (1H, dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz, H-2), 4.19 (1H, dd, $J = 10.0, 5.5$ Hz, H-3), 5.89 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.89 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.31 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.87 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6'), 6.65 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4''), 5.65 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-3''), 1.38 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 71.6 (C-2), 48.3 (C-3), 199.3 (C-4), 103.7 (C-4a), 166.0 (C-5), 97.3 (C-6), 168.5 (C-7), 96.2 (C-8), 165.3 (C-8a), 117.1 (C-1'), 152.3 (C-2'), 112.5 (C-3'), 154.9 (C-4'), 110.0 (C-5'), 130.8 (C-6'), 118.1 (C-4''), 130.6 (C-3''), 76.6 (C-2''), 28.1 (5''/6''- CH_3), 28.0 (6''/5''- CH_3)。以上数据与文献报道^[16]基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为粗毛甘草素 F。

化合物 **7**: 棕黄色粉末。TOF-MS m/z : 335.104 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.21 (1H, s, H-2), 8.11 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 6.99 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, H-6), 6.90 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.39 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.99 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1''), 5.65 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2''), 1.41 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 157.1 (C-2), 124.9 (C-3), 179.8 (C-4), 117.5 (C-4a), 128.8 (C-5), 117.3 (C-6), 165.6 (C-7), 103.3 (C-8), 160.0 (C-8a), 114.3 (C-1'), 153.3 (C-2'), 112.8 (C-3'), 156.1 (C-4'), 110.1 (C-5'), 131.5 (C-6'), 118.6 (C-4''), 130.2 (C-3''), 77.1 (C-2''), 28.2 ($2 \times \text{CH}_3$)。以上数据与文献报道^[17]基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为光甘草酮。

化合物 **8**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 323 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.30 (1H, ddd, $J = 10.2, 3.6, 2.1$ Hz, H-2), 3.96 (1H, t, $J = 10.2$ Hz, H-2), 3.42 (1H, m, H-3), 2.94 (1H, dd, $J = 15.6, 11.2$ Hz, H-4), 2.76 (1H, ddd, $J = 15.6, 5.2, 2.0$ Hz, H-4), 6.80 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.27 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6), 6.32 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 6.26 (1H, dd, $J = 8.3, 2.9$ Hz, H-5'), 6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.61 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-4''), 5.57 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-3''), 1.37 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 71.6 (C-2), 33.2 (C-3), 31.9 (C-4), 116.4 (C-4a), 131.6 (C-5), 109.6 (C-6), 153.2 (C-7), 111.1 (C-8), 151.2 (C-8a), 120.2 (C-1'), 157.4

(C-2'), 103.8 (C-3'), 158.2 (C-4'), 107.9 (C-5'), 129.9 (C-6'), 118.3 (C-4''), 130.4 (C-3''), 76.7 (C-2''), 28.1 (5''/6''-CH₃), 28.0 (6''/5''-CH₃)。以上数据与文献报道^[18]基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为光甘草定。

化合物 **9**: 黄色粉末。TOF-MS m/z : 353.106 9 [M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.43 (1H, s, H-8), 8.08 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', 5'), 3.33 (2H, m, H-1'', 与氘代试剂信号部分重合), 5.24 (1H, t, J = 7.3 Hz, H-2''), 1.79 (3H, s, 4''-CH₃), 1.67 (3H, s, 5''-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 147.9 (C-2), 137.2 (C-3), 177.5 (C-4), 104.5 (C-4a), 160.6 (C-5), 112.4 (C-6), 163.6 (C-7), 93.8 (C-8), 156.4 (C-8a), 124.1 (C-1'), 130.8 (C-2', 6'), 116.5 (C-3', 5'), 159.3 (C-4'), 22.4 (C-1''), 123.7 (C-2''), 132.1 (C-3''), 26.1 (5''-CH₃), 18.0 (4''-CH₃)。以上数据与文献报道^[15]基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为甘草黄酮醇。

化合物 **10**: 棕色粉末。TOF-MS m/z : 369.1805 [M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 4.21 (1H, ddd, J = 10.3, 3.5, 1.9 Hz, H-2), 3.96 (1H, t, J = 10.1 Hz, H-2), 3.35 (1H, m, H-3), 2.89 (1H, ddd, J = 16.0, 5.5, 1.9 Hz, H-4), 2.80 (1H, dd, J = 16.0, 10.7 Hz, H-4), 3.69 (3H, s, 5-OCH₃), 3.74 (3H, s, 7-OCH₃), 6.22 (1H, s, H-8), 6.32 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-3'), 6.27 (1H, dd, J = 8.3, 2.5 Hz, H-5'), 6.89 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-6'), 3.24 (1H, m, H-1''), 5.14 (1H, t, J = 7.1 Hz, H-2''), 1.75 (3H, s, 4''-CH₃), 1.65 (3H, s, 5''-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 71.2 (C-2), 32.9 (C-3), 26.9 (C-4), 109.7 (C-4a), 158.4 (C-5), 61.2

(5-OCH₃), 116.4 (C-6), 158.7 (C-7), 56.2 (7-OCH₃), 96.8 (C-8), 155.3 (C-8a), 120.4 (C-1'), 157.4 (C-2'), 103.8 (C-3'), 158.2 (C-4'), 107.8 (C-5'), 128.9 (C-6'), 23.6 (C-1''), 125.6 (C-2''), 131.1 (C-3''), 26.0 (5''-CH₃), 18.0 (4''-CH₃)。以上数据与文献报道^[19]基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为粗毛甘草素 D。

4 抗炎活性评价

采用细菌脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型评价化合物抑制 NO 产生的活性。将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板, 用 MTT 法测定各化合物的细胞毒性。确定无毒浓度后, 以吲哚美辛 (50.0 μ mol/L) 作阳性对照, 用 LPS (200 ng/mL) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型, 以 NO 抑制率作抗炎活性指标, 对各单体化合物进行抗炎活性初筛 (n = 3), 对有抗炎活性的化合物做进一步的量效考察。

实验结果显示, 异甘草苷 (**3**)、sophoraisoflavone A (**5**)、粗毛甘草素 F (**6**)、光甘草定 (**8**) 和甘草黄酮醇 (**9**) 有较强的抑制 NO 产生活性, 而甘草苷 (**1**) 在 50.0 μ mol/L 表现出较弱的 NO 抑制作用 (抑制率为 27%), 蔗糖甘草苷 (**2**, 200.0 μ mol/L)、蔗糖异甘草苷 (**4**, 200.0 μ mol/L)、光甘草酮 (**7**, 50.0 μ mol/L) 和粗毛甘草素 D (**10**, 12.5 μ mol/L) 未显示有抑制活性。其中对甘草苷、蔗糖甘草苷、异甘草苷和蔗糖异甘草苷的实验结果分析可知, 化合物结构中增加糖单元 (蔗糖), 会降低对 NO 的抑制作用。对具有抑制 NO 产生活性的化合物 **3**、**5**、**6**、**8**、**9** 进行量效关系考察, 根据毒性实验结果确定各化合物浓度梯度, 结果见图 1, 其半数抑制浓度 (IC₅₀)

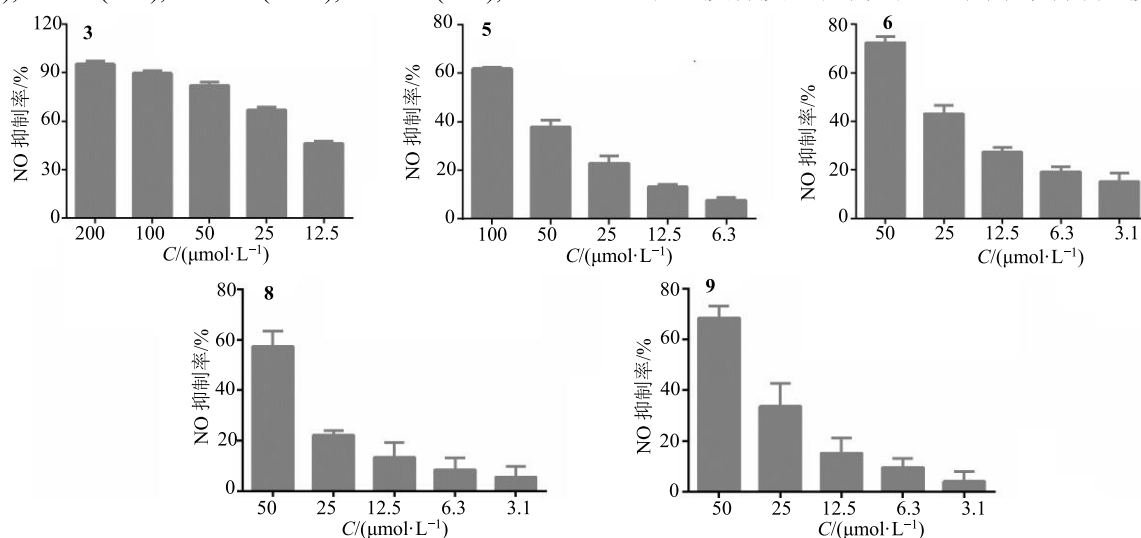


图1 化合物 **3**、**6**、**8**、**9** 抑制 NO 产生活性的量效结果

Fig. 1 Dose-effect result of inhibitory effect of compounds **3**, **5**, **6**, **8**, and **9** on NO production

值依次为 (14.0 ± 1.8) 、 (70.3 ± 4.0) 、 (26.5 ± 2.0) 、 (22.4 ± 2.0) 、 (17.0 ± 2.1) $\mu\text{mol/L}$ 。与阳性对照吗啉美辛 IC_{50} (31.6 ± 2.0) $\mu\text{mol/L}$ ^[20]相比, 化合物 **3**、**6**、**8**、**9** 有更好的抑制 NO 产生活性。

参考文献

- [1] 傅克治, 傅密宁. 甘草用途多 [J]. 植物杂志, 1987(3): 12-13.
- [2] 杨莉, 陈海霞, 高文远, 等. 甘草抗肿瘤活性成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 438-440.
- [3] Zhang Q Y, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (*Licorice*) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1969.
- [4] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 261-268.
- [5] Fujisawa Y, Sakamoto M, Matsushita M, et al. Glycyrrhizin inhibits the lytic pathway of complement - possible mechanism of its anti-inflammatory effect on liver cells in viral hepatitis [J]. *Microbiol Immunol*, 2000, 44(9): 799-804.
- [6] Kolbe L, Immeyer J, Batzer J, et al. Anti-inflammatory efficacy of licochalcone A: Correlation of clinical potency and *in vitro* effects [J]. *Arch Dermatol Res*, 2006, 298(1): 23-30.
- [7] Peng F, Du Q H, Peng C, et al. A review: The pharmacology of isoliquiritigenin [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(7): 969-977.
- [8] Kim J Y, Park S J, Yun K J, et al. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced NOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappa B in RAW 264.7 macrophages [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 584(1): 175-184.
- [9] Yu J Y, Ha J Y, Kim K M, et al. Anti-inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 13041-13054.
- [10] Shin E M, Zhou H Y, Guo L Y, et al. Anti-inflammatory effects of glycyrol isolated from *Glycyrrhiza uralensis* in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(11): 1524-1532.
- [11] 蒋晓文, 白俊鹏, 田星, 等. 牛蒡根中黄酮苷类化学成分及其抗氧化活性构效关系的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 726-731.
- [12] Xu J, Luo J, Kong L. Simultaneous separation of triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(19): 3295-3301.
- [13] Fu B, Li H, Wang X, et al. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(19): 7408-7414.
- [14] Kitagawa I, Hori K, Uchida E, et al. Saponin and sapogenol L. on the constituents of the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer from Xinjiang, China. Chemical structures of licorice-saponin L3 and isoliquiritin apioside [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(9): 1567-1572.
- [15] Shirataki Y, Yokoe I, Noguchi M, et al. Studies on the constituents of Sophora species XXII. Constituents of the root of *Sophora moorcroftiana* Benth ex Baker [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(6): 2220-2225.
- [16] Mckee T C, Bokesch H R, McCormick J L, et al. Isolation and characterization of new anti-HIV and cytotoxic leads from plants, marine, and microbial organisms [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60(5): 431-438.
- [17] Kinoshita T, Tamura Y, Mizutani K. Isolation and synthesis of two new 3-arylcoumarin derivatives from the root of *Glycyrrhiza glabra* (*Licorice*), and structure revision of an antioxidant isoflavonoid glabrene [J]. *Nat Prod Lett*, 1997, 9(4): 289-296.
- [18] Jirawattanapong W, Saifah E, Patarapanich C. Synthesis of glabridin derivatives as tyrosinase inhibitors [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(5): 647-654.
- [19] 王青, 苗文娟, 向诚, 等. 乌拉尔甘草中黄酮类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 31-36.
- [20] Wang S F, Xu Y M, Jiang W, et al. Isolation and identification of constituents with activity of inhibiting nitric oxide production in Raw 264.7 macrophages from *Gentiana triflora* [J]. *Planta Med*, 2013, 79(8): 680-686.