

密枝圆柏的化学成分及其抗补体、抗氧化活性

张 姣^{1,2}, 德 吉³, 付爱玲², 陈道峰¹, 卢 燕^{1*}

1. 复旦大学药学院, 上海 201203

2. 西南大学药学院, 重庆 400715

3. 西藏大学理学院, 西藏 拉萨 850000

摘要: 目的 对密枝圆柏 *Juniperus convallium* 进行化学成分和抗补体、抗氧化活性研究。方法 采用正相硅胶、ODS-C₁₈、Sephadex LH-20 以及制备型 HPLC 等方法进行分离纯化, 结合理化性质和波谱数据鉴定化合物结构, 采用细胞溶血法测定经典、旁路途径的抗补体活性及作用靶点, DPPH、ABTS、FRAP 法研究抗氧化活性。结果 从密枝圆柏醋酸乙酯部位分离鉴定了 17 个化合物, 包括黄酮类化合物 9 个: 穗花杉双黄酮 (1)、柏木双黄酮 (2)、柏木双黄酮葡萄糖苷 (3)、柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷 (4)、芹菜素 (5)、山柰酚-3-*O*-(6''-*O*-*E*-肉桂酰基)- β -D-吡喃葡萄糖苷 (6)、槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (7)、槲皮素吡喃鼠李糖苷 (8) 和海波拉亭-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (9); 木脂素类化合物 3 个: 异马尾松脂苷 B (10)、异落叶松脂素-2a-*O*- β -D-葡萄糖苷 (11) 和异落叶松脂素-3a-*O*- β -D-葡萄糖苷 (12); 萜类化合物 3 个: 柳叶二醇 (13)、3 β -羟基山达海松酸 (14) 和 (1*R*,3*R*,4*aR*,4*bS*,7*R*,10*aR*)-7-乙烯基-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,7,9,10,10*a*-十二氢-3-羟基-1,4*a*,7-三甲基-1-菲甲醇 (15); 以及大丁苷元 (16) 和 β -谷甾醇 (17)。除 16 外, 不同类型化合物对补体系统都显示了一定程度的抑制活性, 经典途径 50% 抑制溶血所需浓度 (CH₅₀) 为 0.05~3.99 mmol/L, 旁路途径 50% 抑制溶血所需浓度 (AP₅₀) 为 0.58~19.13 mmol/L, 其中, 黄酮类化合物尤其是双黄酮类, 是密枝圆柏中重要的抗补体活性成分, 并且酚羟基和糖苷基团是影响其抗补体活性的重要因素。仅羟基基团较多的黄酮类 (1~3、5~9) 和木脂素类 (10~12) 化合物显示不同程度的抗氧化活性。结论 所有化合物均为首次从密枝圆柏中分离得到, 黄酮及木脂素类是其抗补体和抗氧化的主要活性成分, 且显示出一定的构效关系, 为密枝圆柏药效物质基础及质量控制研究提供了依据。

关键词: 密枝圆柏; 抗补体; 抗氧化; 穗花杉双黄酮; 柏木双黄酮; 芹菜素; 槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)13-3008-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.003

Anticomplementary and anti-oxidant activities of constituents from *Juniperus convallium*

ZHANG Jiao^{1,2}, DE Ji³, FU Ai-ling², CHEN Dao-feng¹, LU Yan¹

1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

2. College of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China

3. College of Science, Tibet University, Lasa 850000, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from *Juniperus convallium*, as well as their anticomplementary and antioxidant activities. **Methods** The constituents were isolated and purified by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, ODS-C₁₈, and preparative HPLC. Their structures were identified by spectra analysis. The cell hemolysis assay was used to evaluate the anticomplementary activities and the targets through classical and alternative pathways. Also the anti-oxidant activities were tested by DPPH, ABTS and FRAP methods. **Results** A total of 17 compounds were obtained from the ethyl acetate extract of *J. convallium* and identified as amentoflavone (1), cupressuflavone (2), cupressuflavone-4'''-*O*- β -D-glucosides (3), naringenin-7-*O*-glycoside (4), apigenin (5), tiliroside (6), quercetin 3-*O*- β -D-glucoside (7), quercetin-3-*O*-rhamnoside (8), hypolaetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (9), isomassonianoside B (10), (+)-isolariciresinol 2a-*O*- β -D-glucoside (11), (+)-isolariciresinol 3a-*O*- β -D-glucopyranoside

收稿日期: 2019-04-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673690); 西藏自治区科技计划重大科技项目 (XZ201801-GH-13)

作者简介: 张 姣 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物生物工程。Tel: 13108919993 E-mail: swuzhangjiao@163.com

*通信作者 卢 燕 (1979—), 女, 硕士生导师, 主要从事中草药活性成分与质量标准研究。E-mail: luyan@fudan.edu.cn

(12), cryptomeridiol (13), 3 β -hydroxysandaracopimeric acid (14), (1R,3R,4aR,4bS,7R,10aR)-7-ethenyl-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,9,10,10a-dodecahydro-3-hydroxy-1,4a,7-trimethyl-1-phenanthrene methanol (15), 4-hydroxy-5-methyl-coumarin (16) and β -sitosterol (17). Compounds 1—15 and 17 showed anticomplementary activities in different degrees (CH₅₀: 0.05—3.99 mmol/L, AP₅₀: 0.58—19.13 mmol/L). The flavonoids, especially the biflavonoids, are the important anticomplementary constituents in *J. convallium*. Further analysis of structure-activity relationship showed that phenolic hydroxyl and glycosidic groups influenced their anticomplementary activity. Only the flavonoids (1—3, 5—9) and lignans (10—12) showed different degrees of antioxidant activities due to their hydroxyl groups. **Conclusion** All the 17 compounds are isolated from *J. convallium* for the first time. The flavonoids and lignans are the important anticomplementary and antioxidant constituents in *J. convallium* with a certain structure-activity relationship. This study provides a good reference for further research on the pharmacological substance and quality control of *J. convallium*.

Key words: *Juniperus convallium* Rehder et E. H. Wilson; anticomplementary activity; anti-oxidant activity; amentoflavone; cupressuflavone; apigenin; quercetin 3-O- β -D-glucoside

密枝圆柏 *Juniperus convallium* Rehder et E. H. Wilson 为柏科 (Cupressaceae) 刺柏属 *Juniperus* Linn. 植物, 是我国特有树种, 主要分布在西藏和四川西部地区^[1]。密枝圆柏等多种刺柏属植物的枝叶在传统藏药中作为“徐巴”使用, 收载于《晶珠本草》, 清热、祛湿、解毒, 被广泛用于治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎、肺炎等^[2-6], 为特色藏药浴“五味甘露汤”配伍之一。刺柏属植物化学成分类型丰富, 主要有挥发油、萜类、黄酮、木脂素、香豆素、甾体等, 在抗炎^[7]、抗氧化^[8]、抗菌^[9]、抗肿瘤^[10]等方面具有较好的生物活性。密枝圆柏为刺柏属代表性植物之一, 目前尚未见对其化学成分和药理活性方面的研究报道。风湿及类风湿关节炎等炎症疾病与补体系统的过度激活有关^[11], 氧化应激产生的自由基也可作为氧化剂参与类风湿关节炎的病理过程^[12]。为阐明密枝圆柏的药效物质基础, 本研究对其抗补体及抗氧化活性较强的醋酸乙酯部位进行了系统化学成分研究, 首次分离鉴定了 17 个化合物, 包括 9 个黄酮类化合物: 穗花杉双黄酮 (amentoflavone, 1)、柏木双黄酮 (cupressuflavone, 2)、柏木双黄酮葡萄糖苷 (cupressuflavone-4'''-O- β -D-glucosides, 3)、柚皮素-7-O-葡萄糖苷 (naringenin-7-O-glycoside, 4)、芹菜素 (apigenin, 5)、山柰酚-3-O-(6''-O-E-肉桂酰基)- β -D-吡喃葡萄糖苷 (tiliroside, 6)、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷 (quercetin-3-O- β -D-glucoside, 7)、槲皮素吡喃鼠李糖苷 (quercetin-3-O-rhamnoside, 8) 和海波拉亭-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 (hypolaetin-7-O- β -D-glucopyranoside, 9); 3 个木脂素类化合物: 异马尾松脂苷 B (isomassonioside B, 10)、异落叶松脂素-2a-O- β -D-葡萄糖苷 [(+)-isolariciresinol-2a-O- β -D-glucoside, 11] 和异落叶松脂素-3a-O- β -D-葡萄糖苷 [(+)-isolarisiresinol 3a-O- β -D-glucopyra-

noside, 12]; 3 个萜类化合物: 柳叶二醇 (cryptomeridiol, 13)、3 β -羟基山达海松酸 (3 β -hydroxysandaracopimeric acid, 14) 和 (1R,3R,4aR,4bS,7R,10aR)-7-乙烯基-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,9,10,10a-十二氢-3-羟基-1,4a,7-三甲基-1-菲甲醇 [(1R,3R,4aR,4bS,7R,10aR)-7-ethenyl-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,9,10,10a-dodecahydro-3-hydroxy-1,4a,7-trimethyl-1-phenanthrene methanol, 15]; 以及大丁苷元 (4-hydroxy-5-methyl-coumarin, 16) 和 β -谷甾醇 (β -sitosterol, 17)。并测定了化合物在经典和旁路途径的抗补体活性, 以及 DPPH、ABTS、FRAP 不同方法的抗氧化活性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

APEXIII 7.0TESLA FTMS 型质谱仪 (德国 Bruker 公司); DRX 400 和 600M 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); 中压制备色谱仪 (上海利穗科技有限公司); 半制备 HPLC (岛津循环制备液相色谱); 1260 分析型 HPLC (Agilent 公司); ZHBE-50T 型闪式提取器 (河南智晶生物科技股份有限公司); Multiskan MK3 型酶标仪 (Thermo 公司)。

1.2 材料

柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 凝胶 (瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司); C₁₈ 制备型色谱柱 (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μ m, 日本 YMC 公司); C₁₈ 分析型色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 4 μ m, 日本 YMC 公司); 色谱级纯乙腈、甲醇及普通分析纯级试剂 (国药集团化学试剂有限公司); 水溶性维生素 E (trolox, Sigma 公司, 批号 BCBM8158); DPPH (国药集团化学试剂有限公司, 批号 X27A016)、肝素钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20150120); 补体抗血清 C1q、C2、C3、C4、C5 和 C9 (Abcam 公司); 补体、溶血素 (自制);

FRAP 和 ABTS 试剂盒 (江苏碧云天生物科技公司)。

1.3 植物来源

密枝圆柏植物的枝叶于 2017 年 4 月在西藏亚东地区采集, 经西藏大学德吉副教授鉴定为柏科刺柏属植物密枝圆柏 *Juniperus convallium* Rehder et E. H. Wilson, 标本 (JC2017) 存放于复旦大学药学院生药学教研室。

2 方法

2.1 提取与分离

取干燥的密枝圆柏枝叶 2.1 kg, 用 95%乙醇按 10 倍量闪式提取 4 次, 每次 30 min, 再以 95%乙醇渗漉提取, 滤液减压浓缩, 得总浸膏 1 202 g。总浸膏用水混悬后, 依次用石油醚、醋酸乙酯、水饱和正丁醇萃取, 减压浓缩后, 得到石油醚部位 186 g、醋酸乙酯部位 206 g、正丁醇部位 197 g 和水溶性部位。

取醋酸乙酯部位 (200 g) 经硅胶 (100~200 目) 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (100:0、100:3、100:7、100:9、100:14、100:20) 梯度洗脱得到 6 个部分 (Fr. 1~6), 取 Fr. 1 部分经中压 ODS 柱 (甲醇-水 20%~50%) 得到 Fr. 1a、1b 部分; Fr. 1a 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 甲醇洗脱得到化合物 15 (23 mg); Fr. 1b 经制备型 HPLC (乙腈-水) 制备得到化合物 14 (15 mg)。取 Fr. 2 部分经中压 ODS 柱 (甲醇-水 30%~70%) 得到 Fr. 2a~2c 部分; Fr. 2a 经半制备型 HPLC (乙腈-水) 制备得到化合物 13 (16 mg); Fr. 2b 经制备型 HPLC (甲醇-水) 制备得到化合物 5 (10 mg); Fr. 2c 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 甲醇洗脱得到化合物 4 (2 mg)、6 (26 mg)。取 Fr. 3 部分经中压 ODS 柱 (甲醇-水 40%~80%) 得到 Fr. 3a、3b 部分; Fr. 3a、3b 两部分分别经 Sephadex LH-20 柱色谱, 甲醇洗脱得到化合物 17 (16 mg) 和 3 (82 mg)。取 Fr. 4 部分经中压 ODS 柱 (甲醇-水 40%~90%) 得到 Fr. 4a 部分和化合物 8 (336 mg); Fr. 4a 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 甲醇洗脱, 再经半制备型 HPLC (甲醇-水) 制备得到化合物 7 (6 mg)、16 (1 mg)。取 Fr. 5 部分经中压 ODS 柱 (甲醇-水 30%~100%) 得到 Fr. 5a~5d 部分; Fr. 5a 经 ODS 反相柱 (甲醇-水) 得到化合物 9 (71 mg); Fr. 5b 经制备型 HPLC (乙腈-水) 制备得到化合物 10 (50 mg)、11 (6 mg); Fr. 5c 经制备型 HPLC (乙腈-水) 制备得到化合物 12 (80 mg); Fr. 5d 经半制备型 HPLC (甲醇-水) 制备得到化合物 1 (21 mg)、2 (28 mg)。

2.2 抗补体活性测定

2.2.1 经典途径的抗补体活性测定^[13] 将样品溶于 DMSO, 不同浓度的样品 (BBS 缓冲液稀释) 加入临界浓度的补体 (1:80 稀释的豚鼠血清), 溶血素和 2% 绵羊红细胞 (SRBC)。37 °C 水浴 30 min, 离心后取上清液在 405 nm 下测定吸光度 (*A*) 值。同时设置中药对照组 (将等量的供试品加入 BBS 缓冲液中, 用于测定中药本底 *A* 值)、补体组 (取临界浓度的补体直接加入适量的 BBS 缓冲液、溶血素和 2% SRBC, 用于测定临界浓度补体所造成红细胞溶血的 *A* 值) 和全溶血组 (将 2% SRBC 加入水中使之全溶血, 用于观察补体组是否达到或接近全溶血水平), 并以肝素钠作为阳性对照组, 计算溶血抑制率。以供试品浓度为横坐标 (*X*), 溶血抑制率为纵坐标 (*Y*), 计算 CH₅₀ (经典途径 50%抑制溶血所需供试品浓度)。

$$\text{溶血抑制率} = 1 - (A_{\text{中药}} - A_{\text{中药对照}}) / A_{\text{全溶血}}$$

2.2.2 旁路途径的抗补体活性测定^[13] 取临界浓度的补体 (1:4 稀释的人血清) 分别与不同浓度的样品混匀, 加入适量的 AP 缓冲液和 0.5% 兔红细胞。37 °C 水浴 30 min, 离心后取上清液在 405 nm 下测定 *A*。同时设置中药对照组、补体组和全溶血组, 并以肝素钠作为阳性对照组。计算溶血抑制率, 以供试品浓度为横坐标 (*X*), 溶血抑制率为纵坐标 (*Y*), 计算 AP₅₀ (旁路途径 50%抑制溶血所需浓度)。

2.2.3 补体作用靶点的测定^[13] 取临界浓度的补体抗体 (C1q、C2、C3、C5 为 1:16, C4 为 1:64, C9 为 1:8) 分别与临界浓度的补体 (1:8 稀释的人血清) 等体积混合, 制得补体缺失血清。取临界浓度的补体和供试品混匀后加入适量补体缺失血清、溶血素和 2% SRBC, 37 °C 水浴加热 30 min, 离心后在 405 nm 下测定靶点组 *A* 值。同时设置中药组、中药对照组、缺失血清组、补体组和全溶血组, 计算溶血抑制率。若靶点组较缺失血清组溶血能力不恢复, 则说明供试品作用于该缺失靶点, 若溶血能力明显恢复, 说明供试品不作用于该缺失靶点。

2.3 抗氧化活性测定

2.3.1 清除 DPPH 活性测定^[14] 将样品溶于无水乙醇, 将不同浓度的样品加入适量的 DPPH 无水乙醇溶液, 混匀后避光放置 30 min 后于 517 nm 下测定 *A* 值 (供试品组)。同时设置空白组 (以等体积的无水乙醇代替 DPPH 溶液) 和对照组 (以等体积的无水乙醇代替样品溶液), 并以 trolox 代替供试品作为

阳性对照组。计算 DPPH 清除率, 以供试品浓度为横坐标 (X), DPPH 清除率为纵坐标 (Y) 做图, 计算 IC_{50} (DPPH 清除率为 50% 时的供试品浓度)。

$$\text{DPPH 清除率} = 1 - (A_{\text{供试品}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{对照}}$$

2.3.2 清除 ABTS 活性测定^[15] ABTS 自由基清除活性测定参照试剂盒使用方法。配制过氧化氢溶液和过氧化物酶、ABTS 工作液, 将样品溶于无水乙醇, 取适量过氧化物酶工作液与不同浓度样品轻轻混匀, 再加入适量 ABTS 工作液混匀, 室温孵育 6 min 后在 414 nm 下测定 A 值。同时设置空白对照组 (以等体积无水乙醇代替样品溶液), 以 trolox 标准溶液代替供试品测定标准曲线, 根据标准曲线计算出样品的总抗氧化能力 (如 1 mmol/L 样品抑制率相当于 1.5 mmol/L trolox 标准溶液时, 该样品的抗氧化能力为 1.5 mmol/L)。

2.3.3 清除 FRAP 活性测定^[16] FRAP 自由基清除活性测定参照试剂盒使用方法: 配制 FRAP 工作液和 $FeSO_4$ 标准溶液, 将样品溶于无水乙醇, 取适量 FRAP 工作液与不同浓度样品轻轻混匀, 37 °C 孵育 3~5 min 后在 593 nm 下测定 A 值。同时设置空白对照组 (以等体积无水乙醇代替样品溶液) 和阳性对照组 (以等体积 trolox 溶液代替样品溶液), 以 $FeSO_4$ 标准溶液代替供试品测定标准曲线, 根据标准曲线计算出样品的总抗氧化能力 (如 0.2 mmol/L 样品吸光度相当于 1 mmol/L $FeSO_4$ 标准溶液时, 该样品的相对抗氧化能力为 5)。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 537 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 538。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.94 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-6'), 7.83 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, H-2'), 7.49 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', 6''), 7.07 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'), 6.68 (1H, s H-3), 6.67 (1H, s H-3'), 6.54 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3''', 5'''), 6.35 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.32 (1H, s H-6''), 6.14 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 184.4 (C-4''), 184.0 (C-4), 166.5 (C-2''), 166.2 (C-2), 166.2 (C-7), 164.6 (C-5), 163.4 (C-7''), 162.8 (C-4'''), 162.7 (C-5''), 161.5 (C-4'), 159.6 (C-9), 156.7 (C-9''), 133.1 (C-6'), 129.6 (C-2''', 6'''), 129.1 (C-2'), 123.5 (C-1'''), 123.3 (C-1'), 122.1 (C-3'), 118.0 (C-5'), 117.1 (C-3''', 5'''), 105.9 (C-8''), 105.6 (C-10''), 105.6 (C-10), 104.2 (C-3), 103.6 (C-3''),

100.6 (C-6), 100.5 (C-6''), 95.4 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **1** 为穗花杉双黄酮。

化合物 **2**: 淡黄色粉末, EI-MS m/z : 538 $[M]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 13.15 (2H, s, OH-5, 5''), 11.08 (2H, brs, OH-7, 7''), 10.27 (2H, brs, OH-4, 4''), 7.47 (4H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6', 2''', 6'''), 6.77 (2H, s, H-3, 3''), 6.73 (4H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5', 3''', 5'''), 6.42 (2H, s, H-6, 6''); ^{13}C -NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 182.0 (C-4, 4''), 163.4 (C-2, 2''), 161.0 (C-7, 7''), 160.8 (C-5, 4', 5'', 4'''), 154.7 (C-9, 9''), 127.9 (C-2', 6', 2''', 6'''), 121.2 (C-1', 1'''), 115.8 (C-3', 5', 3''', 5'''), 103.5 (C-10, 10''), 102.5 (C-3, 3''), 98.9 (C-6, 8, 6'', 8'')。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **2** 为柏木双黄酮。

化合物 **3**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 699 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 700。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.60 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.50 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2''', 6'''), 7.09 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.77 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3''', 5'''), 6.67 (1H, s H-3), 6.61 (1H, s H-3''), 6.50 (1H, s H-6), 6.49 (1H, s H-6''), 4.99 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, Glc-H-1), 3.39~3.89 (6H, m, Glc-H-2~6); ^{13}C -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 184.3 (C-4), 184.3 (C-4''), 166.1 (C-7''), 165.4 (C-2''), 164.4 (C-7), 164.2 (C-2), 163.0 (C-4'''), 162.9 (C-5), 162.6 (C-5''), 161.9 (C-4'), 157.0 (C-9), 157.0 (C-9''), 129.2 (C-2''', 6'''), 128.9 (C-2', 6'), 126.0 (C-1'), 123.1 (C-1'''), 117.9 (C-3', 5'), 116.9 (C-3''', 5'''), 105.7 (C-10), 105.6 (C-10''), 105.6 (C-3), 104.5 (C-3''), 103.4 (C-6''), 101.5 (C-6); Glc δ : 99.9 (C-1), 78.2 (C-5), 77.8 (C-3), 74.8 (C-2), 71.3 (C-4), 62.4 (C-6)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **3** 为柏木双黄酮葡萄糖苷。

化合物 **4**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 433 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 434。 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.99 (1H, s, 5-OH), 9.77 (1H, s, 4'-OH), 7.33 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.80 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.16 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.14 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.51 (1H, dd, $J = 12.9, 2.9$ Hz, H-2), 5.35 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, 5''-OH), 5.11 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, 3''-OH), 5.04 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, 4''-OH), 4.98 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, 1''-OH), 4.56 (1H, dd, $J = 9.0, 5.0$ Hz, 6''-OH), 3.14~3.66 (6H, m, H-2''~6''), 2.75 (1H, dd, $J = 17.0, 2.9$ Hz, 3-OH);

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 197.5 (C-4), 165.5 (C-7), 163.0 (C-5), 158.1 (C-4'), 128.9 (C-1'), 128.7 (C-2', 6'), 115.4 (C-3', 5'), 103.5 (C-10), 99.7 (C-2''), 96.8 (C-6), 95.7 (C-8), 78.9 (C-2), 77.3 (C-5'), 76.6 (C-3''), 73.3 (C-2''), 69.8 (C-4''), 60.8 (C-6''), 42.3 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **4** 为柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷。

化合物 **5**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 269 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 相对分子质量为 270。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.95 (1H, s, 5-OH), 7.92 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.75 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.16 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.6 (C-4), 169.9 (C-2), 163.6 (C-4'), 161.4 (C-7), 161.3 (C-5), 157.9 (C-9), 128.4 (C-2', 6'), 121.1 (C-1'), 116.0 (C-3', 5'), 103.4 (C-10), 102.7 (C-3), 99.1 (C-6), 94.1 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **5** 为芹菜素。

化合物 **6**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 593 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 相对分子质量为 594。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.00 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-2', 6'), 7.43 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- β), 7.32 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2''', 6'''), 6.83 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-3', 5'), 6.81 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3''', 5'''), 6.31 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.14 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.10 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- α), 5.27 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1''), 4.32 (1H, dd, J = 11.8, 2.2 Hz, H-6''), 4.23 (1H, dd, J = 11.6, 6.4 Hz, H-6''), 3.48~3.51 (3H, m, H-2'', 3'', 4''), 3.32~3.37 (1H, m, H-5''); ^{13}C -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 179.4 (C-4), 168.8 (COO), 166.0 (C-7), 163.0 (C-5), 161.5 (C-4'), 161.2 (C-4'''), 159.3 (C-2), 158.4 (C-9), 146.5 (C- β), 135.2 (C-3), 133.2 (C-2', 6'), 131.2 (C-2''', 6'''), 127.1 (C-1'''), 122.7 (C-1'), 116.8 (C-3''', 5'''), 116.0 (C-3', 5'), 114.7 (C- α), 105.6 (C-10), 104.0 (C-1''), 100.0 (C-6), 94.8 (C-8), 78.0 (C-3''), 75.8 (C-2''), 75.7 (C-5''), 71.7 (C-4''), 64.3 (C-6'')。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 **6** 为山柰酚-3-*O*-(6''-*O*-*E*-肉桂酰基)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **7**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 463 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 相对分子质量为 464。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.71 (2H, m, H-2', 6'), 6.87 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-5'), 6.39 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, s, H-6), 5.25 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-1''), 3.33~3.72 (6H, m, H-2''~6'');

^{13}C -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 179.5 (C-4), 166.3 (C-7), 163.1 (C-5), 159.0 (C-9), 158.5 (C-2), 149.9 (C-4'), 145.9 (C-3'), 135.6 (C-3), 123.2 (C-6'), 123.1 (C-1'), 117.6 (C-2'), 116.0 (C-5'), 105.6 (C-10), 104.4 (C-1''), 100.0 (C-6), 94.8 (C-8), 78.4 (C-5''), 78.1 (C-3''), 75.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 62.6 (C-6'')。以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 **7** 为槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。

化合物 **8**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 447 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 相对分子质量为 448。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.36 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.32 (1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.94 (1H, dd, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.37 (1H, d, J = 1.1 Hz, H-1''), 4.24 (1H, s, H-2''), 3.78 (1H, dd, J = 8.0, 7.2 Hz, H-3''), 3.46 (1H, m, H-4''), 3.33 (1H, m, H-5''), 0.97 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-6''); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 179.6 (C-4), 165.8 (C-7), 163.2 (C-5), 159.3 (C-9), 158.5 (C-2), 149.8 (C-4'), 146.4 (C-3'), 136.2 (C-3), 123.0 (C-1'), 122.9 (C-6'), 116.9 (C-5'), 116.4 (C-2'), 105.9 (C-10), 103.5 (C-1''), 99.8 (C-6), 94.7 (C-8), 73.2 (C-4''), 72.1 (C-3''), 72.0 (C-2''), 71.9 (C-5''), 17.6 (C-6'')。以上数据与文献报道一致^[24], 故鉴定化合物 **8** 为槲皮素吡喃鼠李糖苷。

化合物 **9**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 463 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 相对分子质量为 464。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.39 (1H, s, 5-OH), 9.92 (1H, s, 8-OH), 9.46 (1H, s, 4'-OH), 8.63 (1H, s, 3'-OH), 7.50 (2H, m, H-2', 6'), 6.92 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-5'), 6.72 (1H, s, H-3), 6.64 (1H, s, H-6), 4.94 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1''), 3.17~3.75 (6H, m, H-2''~6''); ^{13}C -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.2 (C-4), 164.2 (C-2), 152.3 (C-5), 151.1 (C-7), 149.8 (C-4'), 145.7 (C-3'), 144.3 (C-9), 127.0 (C-8), 121.6 (C-1'), 119.2 (C-6'), 116.0 (C-2'), 113.6 (C-5'), 105.2 (C-10), 102.6 (C-3), 101.3 (C-1''), 98.6 (C-6), 77.3 (C-3''), 75.7 (C-5''), 73.2 (C-2''), 69.7 (C-4''), 60.7 (C-6'')。以上数据与文献报道一致^[25], 故鉴定化合物 **9** 为海波拉亭-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **10**: 淡黄色固体, ESI-MS m/z : 491 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 相对分子质量为 492。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.10 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5), 7.08 (1H, s, H-2), 6.96 (1H, dd, J = 1.6, 8.3 Hz, H-6), 6.62 (1H, s,

H-6'), 6.60 (1H, s, H-2'), 5.58 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-7), 5.36 (1H, d, $J = 1.1$ Hz, H-1''), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 3.58 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-9'), 2.59 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7'), 1.83 (2H, m, H-8'), 1.25 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6''); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 152.1 (C-3), 146.4 (C-4), 146.4 (C-4'), 141.9 (C-5'), 139.1 (C-1), 136.9 (C-1'), 129.5 (C-3'), 119.6 (C-6), 119.1 (C-5), 117.1 (C-6'), 116.7 (C-2'), 111.3 (C-2), 101.4 (C-1''), 88.2 (C-7), 73.8 (C-4''), 72.2 (C-3''), 70.0 (C-2''), 70.8 (C-5''), 65.2 (C-9), 62.3 (C-9'), 56.4 (-OCH₃), 55.9 (C-8), 35.7 (C-8'), 32.7 (C-7'), 17.9 (C-6''). 以上数据与文献报道一致^[26], 故鉴定化合物 **10** 为异马尾松脂苷 B。

化合物 **11**: 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 521 [M-H]⁻, 相对分子质量为 522; $[\alpha]_D^{22} + 26.5^\circ$ (c 0.83, MeOH); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.71 (1H, s, OH-6), 8.42 (1H, s, H-4'), 6.69 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.64 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.61 (1H, s, H-8), 6.52 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 6.09 (1H, s, H-5), 4.37 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 4.34 (1H, m, H-3), 3.95 (1H, m, H-3 α), 3.71 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.70 (3H, s, 3-OCH₃), 3.53 (2H, m, H-2 α), 3.42~3.71 (6H, m, H-2''~6''), 2.75 (1H, m, H-1), 2.08 (1H, m, H-2), 1.84 (1H, m, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 147.6 (C-3'), 145.9 (C-7), 145.0 (C-4'), 144.4 (C-6), 137.2 (C-1'), 132.4 (C-10), 127.6 (C-9), 121.9 (C-6'), 116.6 (C-5), 115.6 (C-5'), 113.5 (C-8), 112.0 (C-2'), 103.1 (C-1''), 77.1 (C-3''), 77.1 (C-5''), 73.8 (C-2''), 70.1 (C-2 α), 68.9 (C-4'), 63.6 (C-6''), 61.1 (C-3 α), 56.0 (3'-OCH₃), 55.8 (3-OCH₃), 46.5 (C-3), 43.8 (C-4), 39.1 (C-2), 32.5 (C-1)。以上数据与文献报道一致^[27], 故鉴定化合物 **11** 为异落叶松脂素-2a-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **12**: 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 521 [M-H]⁻, 相对分子质量为 522; $[\alpha]_D^{22} + 32^\circ$ (c 0.11, MeOH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.77 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.67 (1H, s, H-8), 6.65 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 6.20 (1H, s, H-5), 4.14 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 4.10 (1H, m, H-3), 3.82 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.82 (3H, s, 3-OCH₃), 3.22~3.86 (6H, m, H-2''~6'') 2.84 (1H, m, H-1), 2.11 (1H, m, H-2), 1.88 (1H, m, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 148.9 (C-3'), 147.1

(C-7), 145.8 (C-4'), 145.2 (C-6), 138.7 (C-1'), 134.4 (C-10), 129.2 (C-9), 123.1 (C-6'), 117.4 (C-5), 116.1 (C-5'), 114.4 (C-8), 112.4 (C-2'), 105.2 (C-1''), 78.1 (C-3''), 77.9 (C-5''), 75.2 (C-2''), 71.7 (C-2 α), 69.5 (C-4'), 65.2 (C-6''), 62.8 (C-3 α), 56.5 (-3'OCH₃), 56.4 (-3OCH₃), 47.9 (C-3), 45.9 (C-4), 39.5 (C-2), 33.9 (C-1)。以上数据与文献报道一致^[28], 故鉴定化合物 **12** 为异落叶松脂素-3a-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **13**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 222 [M-H₂O]⁺, 相对分子质量为 240; $[\alpha]_D^{26} + 24.8^\circ$ (c 0.22, CHCl₃); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 1.98 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-6 β), 1.96 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-8 α), 1.76 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-3 β), 1.74 (1H, m, H-2), 1.58 (1H, m, H-9 β), 1.56 (1H, m, H-7 α), 1.55 (1H, m, H-1 α), 1.46 (1H, m, H-6 α), 1.46 (1H, m, H-3 α), 1.34 (1H, dd, $J = 4.1, 12.8$ Hz, H-5 β), 1.23 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-9 α), 1.22 (1H, m, H-1 β), 1.19 (3H, s, H-12), 1.17 (3H, s, H-13), 1.09 (3H, s, H-14), 1.05 (1H, m, H-8 β), 0.90 (3H, s, H-15); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 73.7 (C-11), 73.2 (C-4), 55.8 (C-5), 51.4 (C-7), 46.3 (C-9), 44.3 (C-3), 42.5 (C-1), 35.7 (C-10), 27.6 (C-12), 27.0 (C-13), 23.7 (C-14), 22.9 (C-8), 22.6 (C-6), 21.3 (C-2), 19.4 (C-5)。以上数据与文献报道一致^[29], 故鉴定化合物 **13** 为柳叶二醇。

化合物 **14**: 白色针晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 341 [M+Na]⁺, 相对分子质量为 318; $[\alpha]_D^{25} \pm 0^\circ$ (c 0.05, pyridine); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.78 (1H, dd, $J = 9.8, 17.5$ Hz, H-15), 5.24 (1H, s, H-14), 4.88 (2H, m, H-16), 4.03 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-3), 2.27 (1H, dd, $J = 3.4, 15.1$ Hz, H-7a), 2.25 (1H, m, H-7b), 2.10 (1H, m, H-1a), 2.07 (1H, m, H-2a), 1.83 (1H, m, H-9), 1.81 (1H, m, H-5), 1.76 (1H, m, H-11a), 1.67 (1H, m, H-2b), 1.64 (1H, m, H-6a), 1.61 (H, m, H-11b), 1.53 (H, m, H-12a), 1.47 (H, m, H-12b), 1.37 (1H, m, H-1b), 1.22 (1H, m, H-6b), 1.13 (3H, s, H-19), 1.04 (3H, s, H-17), 0.86 (3H, s, H-20); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 181.7 (C-18), 150.2 (C-15), 137.9 (C-8), 130.7 (C-14), 111.1 (C-16), 76.7 (C-3), 55.0 (C-4), 52.1 (C-5), 51.7 (C-9), 38.9 (C-10), 38.8 (C-13), 38.6 (C-7), 36.9 (C-1), 36.0 (C-12), 28.2 (C-6), 26.9 (C-17), 25.8 (C-2), 20.1 (C-11), 16.0 (C-20), 12.1 (C-19)。以上数据与文献报道一致^[30], 故鉴定化合物 **14** 为 3 β -羟基山达海松酸。

化合物 **15**: 白色针晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 304 $[M]^+$; $[\alpha]_D^{24} +10.3^\circ$ (c 1.6, EtOH); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.80 (1H, dd, $J = 10.5, 18.0$ Hz, H-15), 5.30 (1H, s, H-14), 4.93 (2H, m, H-16), 3.85 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-2), 3.30, 3.37 (2H, d, $J = 11.0$ Hz, H-18), 1.06 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-17), 0.84 (3H, s, H-20); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 150.1 (C-15), 137.9 (C-8), 130.3 (C-14), 110.7 (C-16), 71.7 (C-18), 65.7 (C-2), 52.0 (C-9), 48.1 (C-1), 47.9 (C-5), 45.4 (C-3), 40.6 (C-10), 40.3 (C-4), 38.5 (C-13), 36.6 (C-7), 35.8 (C-12), 26.4 (C-17), 23.2 (C-6), 20.1 (C-11), 19.3 (C-19), 17.1 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[31], 故鉴定化合物 **15** 为 (1*R*,3*R*,4*aR*,4*bS*,7*R*,10*aR*)-7-乙炔基-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,7,9,10,10*a*-十二氢-3-羟基-1,4*a*,7-三甲基-1-菲甲醇。

化合物 **16**: 淡黄色固体, ESI-MS m/z : 175 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 176。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.59 (1H, dd, $J = 8.3, 7.6$ Hz, H-7), 7.30 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-8), 7.25 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-6), 5.89 (1H, s, H-3), 2.80 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150

MHz, CD_3OD) δ : 171.5 (C-4), 165.8 (C-2), 155.9 (C-9), 138.6 (C-5), 132.9 (C-7), 128.9 (C-6), 115.9 (C-8), 115.5 (C-10), 90.4 (C-3), 23.3 (CH_3)。以上数据与文献报道一致^[32], 故鉴定化合物 **16** 为大丁苷元。

化合物 **17**: 白色针晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 414 $[M]^+$; $[\alpha]_D^{20} -34^\circ$ (c 2, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5.35 (1H, m, H-6), 3.55 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.81, 0.83, 0.86 (9H, m, 3- CH_3), 0.68 (3H, s, H-19)。易溶于三氯甲烷, 薄层喷硫酸-乙醇溶液加热显紫红色, 不同的薄层展开剂展开, 与 β -谷甾醇对照品比较, 其 R_f 值一致, 且以上波谱数据与文献报道一致^[33], 故鉴定化合物 **17** 为 β -谷甾醇。

3.2 化合物的抗补体活性及作用靶点测定

对分离的 16 个化合物 (**1~15**, **17**) 进行了经典和旁路途径的抗补体活性测定, 结果见表 1。16 个化合物对补体系统显示了不同程度的抑制活性: 黄酮类化合物 (**1~9**) 的 CH_{50} 为 0.049~2.981 mmol/L, AP_{50} 为 0.580~13.563 mmol/L, 仅 **6** 显示无活性; 木脂素类化合物 (**10~12**) 的 CH_{50} 为

表 1 化合物抗补体及抗氧化活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Anticomplementary and anti-oxidant activity of compounds from *J. convallium* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$\text{CH}_{50}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$\text{AP}_{50}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	DPPH $\text{IC}_{50}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	ABTS 总抗氧化能力/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	FRAP 总抗氧化能力
1	0.19 ± 0.01	13.26 ± 0.03	0.76 ± 0.15	0.08 ± 0.04	0.12 ± 0.04
2	0.30 ± 0.05	11.75 ± 0.02	1.68 ± 0.09	0.02 ± 0.07	0.04 ± 0.01
3	0.05 ± 0.12	1.26 ± 0.08	0.05 ± 0.05	0.14 ± 0.12	0.28 ± 0.14
4	1.47 ± 0.03	0.84 ± 0.11	—	—	—
5	2.98 ± 0.07	4.66 ± 0.14	1.96 ± 0.01	0.02 ± 0.09	0.02 ± 0.09
6	0.48 ± 0.09	NA	7.64 ± 0.03	0.10 ± 0.05	0.08 ± 0.06
7	1.78 ± 0.15	0.58 ± 0.09	0.02 ± 0.14	0.44 ± 0.01	1.09 ± 0.11
8	1.04 ± 0.11	1.17 ± 0.04	0.02 ± 0.07	0.24 ± 0.15	0.71 ± 0.15
9	0.63 ± 0.09	9.38 ± 0.07	0.01 ± 0.03	0.99 ± 0.12	2.89 ± 0.14
10	1.44 ± 0.05	7.76 ± 0.06	0.04 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.83 ± 0.11
11	0.25 ± 0.06	6.03 ± 0.04	0.06 ± 0.08	1.80 ± 0.02	2.74 ± 0.12
12	1.35 ± 0.02	1.74 ± 0.21	0.04 ± 0.11	0.50 ± 0.11	2.28 ± 0.17
13	3.99 ± 0.13	19.13 ± 0.14	NA	NA	NA
14	0.67 ± 0.05	NA	NA	NA	NA
15	2.58 ± 0.12	NA	NA	NA	NA
17	0.71 ± 0.07	1.05 ± 0.02	NA	NA	NA
肝素钠	$(0.06 \pm 0.26) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$(0.13 \pm 0.31) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	—	—
trolox	—	—	0.01 ± 0.07	1.11 ± 0.18	1.99 ± 0.11

NA-无活性; —未测

NA-no activity; — not tested

0.251 ~ 1.435 mmol/L, AP_{50} 为 1.736 ~ 7.764 mmol/L; 萜类化合物 (13~15) 的 CH_{50} 为 0.670 ~ 3.988 mmol/L, 仅 13 显示有旁路抗补体活性, 其 AP_{50} 为 19.129 mmol/L; 甾醇化合物 17 的 CH_{50} 为 0.710 mmol/L, AP_{50} 为 1.050 mmol/L。其中, 黄酮类化合物 3 对补体经典途径的抑制活性最强, 其 CH_{50} 为 0.049 mmol/L, 黄酮类化合物 7 对补体旁路途径的抑制活性最强, 其 AP_{50} 为 0.580 mmol/L, 以上结果表明, 黄酮类、木脂素类、萜类、甾醇类, 这些化合物是密枝圆柏中发挥抗补体作用的重要组成部分, 尤其黄酮类化合物起着至关重要的作用; 本研究首次发现双黄酮类化合物具有较好的抗补体活性, 并且双黄酮类化合物 (1~3) 经典抗补体活性显著高于单黄酮类化合物 (4~9), 这可能与其中化合物中酚羟基个数增加有关。黄酮中糖苷类化合物 (3) 抗补体活性明显比其苷元 (2) 强, 这说明黄酮类化合物被苷化后其抗补体活性增强, 以上结果表

明, 在黄酮中酚羟基是抗补体作用的关键基团, 并且含有糖苷结构的黄酮类化合物具有较强的抗补体活性, 由此可见, 黄酮化合物的抗补体活性受多个因素的影响。木脂素化合物中 11 比 12 的抗补体活性强, 这说明羟基成苷后, 不同的糖基取代位置会带来不同的空间效应, 从而显著影响木脂素类化合物的抗补体活性。

对不同结构类型中抗补体活性较强的 9 个代表性化合物 1~3、6、9~11、14、17 进行补体作用靶点研究, 结果见图 1。双黄酮苷元 1 和 2 的靶点相同, 都作用于 C3、C4 和 C9, 而双黄酮苷 3 作用于 C1q、C2、C3、C4、C5 和 C9 所有测试靶点。黄酮苷 6 作用于 C3、C4 和 C5, 而 9 的作用靶点是 C1q、C3、C4 和 C9。木脂素 10 的作用靶点是 C2、C3、C4 和 C5, 11 的作用靶点是 C3、C4 和 C9。萜类化合物 14 作用于 C1q、C2、C3 和 C5, β -谷甾醇 17 仅作用于 C3 和 C4。各类化合物的抗补体作用靶点多样。

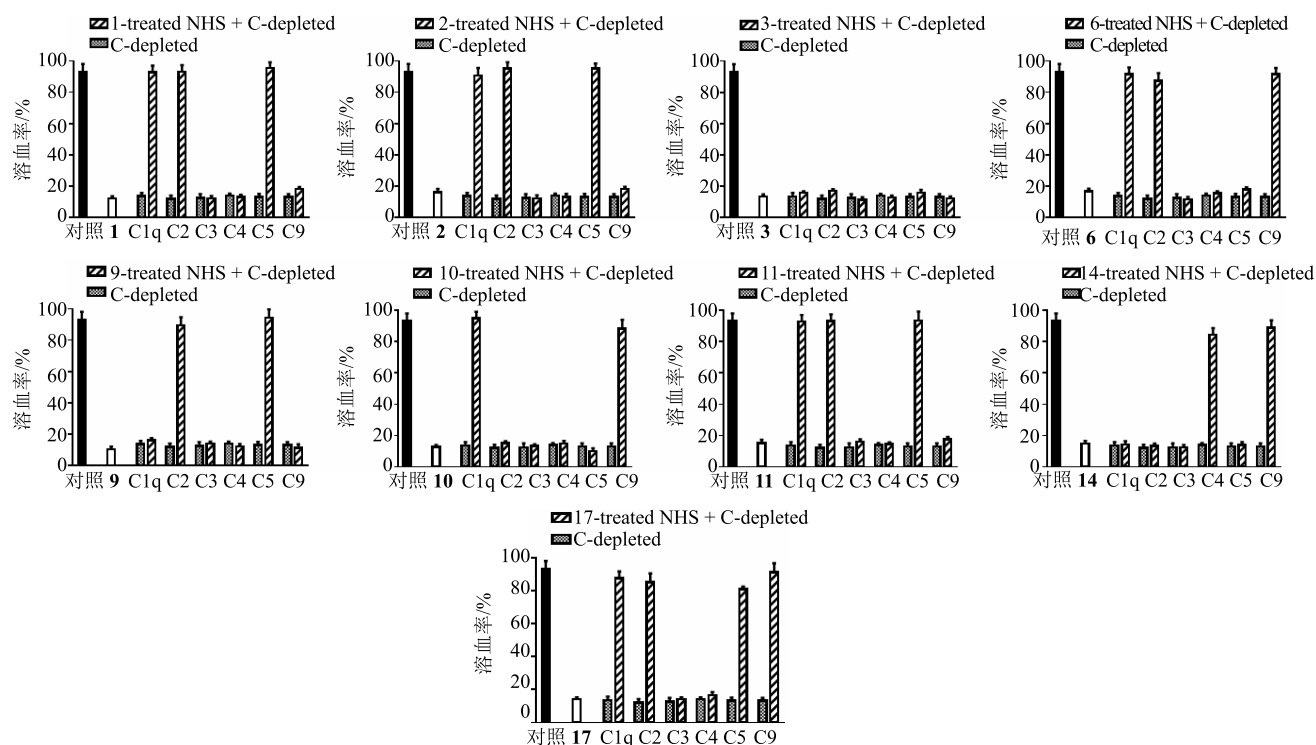


图 1 9 个化合物 (1~3、6、9~11、14、17) 的抗补体作用靶点 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Anticomplementary action targets of nine compounds (1—3, 6, 9—11, 14, 17) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 化合物的抗氧化活性测定

对分离的 15 个化合物 (1~3、5~15、17) 进行了 DPPH、ABTS、FRAP 抗氧化活性测定, 结果见表 1。黄酮类 (1~3、5~9) 和木脂素类 (10~12) 化合物显示一定程度的抗氧化活性, 萜类 (13~

15) 和甾醇类 (17) 化合物显示无抗氧化活性, 其活性差异可能在于前者结构中都具有较强的羟基, 尤其是酚羟基。黄酮中苷类 (3、7~9) 抗氧化活性明显强于苷元 (1、2、5), 但 6 例外, 可能也是受羟基数目影响。

4 讨论

本研究首次从密枝圆柏中分离鉴定了黄酮类、木脂素类和萜类等共 17 个化合物。密枝圆柏作为传统藏药,在类风湿关节炎等疾病有显著疗效^[2-3,6],而这些疾病又与补体系统的过度激活^[11]和氧化应激产生的自由基^[12]相关。本研究发现密枝圆柏中黄酮类、木脂素类、萜类和甾醇类发挥抗补体作用,尤其黄酮类化合物对补体激活的经典和旁途径都有显著的抑制活性,且不同结构类型化合物抗补体活性强度和作用靶点不同,显示了一定规律的构效关系。同时,黄酮类和木脂素类还具有一定的抗氧化作用,为密枝圆柏在治疗类风湿等疾病方面研究其药效物质基础提供了理论依据。

参考文献

- [1] 李忠虎. 西藏圆柏复合体的群体遗传学与物种形成研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
- [2] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [3] 青海省生物研究所, 同仁县隆务诊疗所. 青藏高原药物图鉴 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1972.
- [4] 青海高原生物研究所植物室. 青藏高原药物图鉴 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1978.
- [5] 玛依拉·买买提依明, 满尔哈巴·海如拉, 于 睿, 等. 新疆圆柏叶药材质量标准的探讨 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1686-1687.
- [6] 罗达尚. 新修晶珠本草 [M]. 成都: 四川科技出版社, 2004.
- [7] 许 芳. 新疆圆柏抗炎有效成分及其总黄酮抗大鼠佐剂性关节炎的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2014.
- [8] 薛永新. 香柏总黄酮及其制备方法与医药用途: 中国, CN121002536 A [P]. 2009-08-12.
- [9] 董艳芳, 叶睿超, 郭彩霞, 等. 垂枝香柏挥发油的化学成分与抑菌活性分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(3): 88-92.
- [10] 宗玉英, 党合群, 骆桂法, 等. 110 种藏药抗肿瘤体外筛选实验研究 [J]. 药学实践杂志, 2000, 18(5): 290-291.
- [11] Makrides S C. Therapeutic inhibition of the complement system [J]. *Pharmacol Rev*, 1998, 50(1): 59-88.
- [12] 王沛坚, 施旭光. 类风湿关节炎的抗氧化治疗展望 [J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(3): 39-42.
- [13] Xu H, Zhang Y, Zhang J, *et al.* Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(2): 175-182.
- [14] 黄积武, 李创军, 杨敬芝, 等. 三七叶的化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4381-4386.
- [15] Chen L, Gin K Y, Y H. Effects of sulfate on microcystin production, photosynthesis, and oxidative stress in *Microcystis aeruginosa* [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23(4): 3589-3595.
- [16] Zhou Y, Yuan J, Wu J, *et al.* The toxic effects of microcystin-LR on rat spermatogonia *in vitro* [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 212(1): 48-56.
- [17] 伏劲松, 林 燕, 韩贺东, 等. 香柏枝叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1724-1726.
- [18] 刘 伟, 白素平, 梁会娟, 等. 小叶忍冬藤的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1065-1068.
- [19] Inatomi Y, Iida N, Murata H, *et al.* A pair of new atropisomeric cupressuflavone glucosides isolated from *Juniperus communis* var. *depressa* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46(38): 6533-6535.
- [20] 孙丽娟, 胡小芳, 程 寻, 等. 柚皮素 7-O-葡萄糖苷非对映异构体的 NMR 波谱分析 [J]. 波谱学杂志, 2017, 34(4): 465-473.
- [21] 殷帅文, 胡文杰, 叶飞飞, 等. 蜈蚣草化学成分及抑制乙酰胆碱酯酶生物活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(8): 1367-1370.
- [22] 刘东彦, 石晓峰, 李 冲, 等. 雪松松针醋酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1921-1924.
- [23] 王 莉, 喻明明, 迟宇前, 等. 蒿状大戟化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3969-3973.
- [24] 褚纯隽, 李显伦, 夏 龙, 等. 乌饭树叶的抗补体活性成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 458-465.
- [25] 许 芳, 赵 军, 徐 芳, 等. 新疆圆柏枝叶化学成分研究 [J]. 中药材, 2013, 36(12): 1957-1959.
- [26] 张静娇, 马跃平, 袁久志, 等. 红松松针中木脂素类成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(10): 797-802.
- [27] 郑 健, 高慧媛, 陈广通, 等. 留兰香的活性成分 (II) [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(4): 212-215.
- [28] Achenbach H, Lowel M, Waibel R, *et al.* New lignan glucosides from *Stemmadenia minima* [J]. *Planta Med*, 1992, 58(3): 270-272.
- [29] Zhu W M, Zhao Q, Li S L, *et al.* Sesquiterpenoids from *Hedychium yunnanense* and *Porana discifera*, and the structural revision of two sesquiterpenoids from *Laggera pterodonta* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(3): 277-283.
- [30] 杨亚滨, 杨雪琼, 徐艳群, 等. 千层塔中的 2 个二萜类化合物 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8): 987-989.
- [31] Cambie R C. The structure of Hallol [J]. *J Org Chem*, 1975, 40(25): 3789-3791.
- [32] Cesari I, Hoerlé M, Simoes-Pires C, *et al.* Anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities of *Diospyros bipindensis* (Gürke) extracts and its main constituents [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(1): 264-270.
- [33] Zhang X, Geoffroy P, Miesch M, *et al.* Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol: Synthesis and characterization of β -sitosterol oxides [J]. *Steroids*, 2005, 70(13): 886-895.