

余甘子化学成分研究

王淑慧, 程锦堂, 郭 丛, 崔文金, 石 佳, 刘 安*

中国中医科学院中药研究所 中药鉴定与安全性检测评估重点实验室, 北京 100700

摘要: 目的 研究药食两用的中药余甘子 *Phyllanthus emblica* 的化学成分, 并评价其抗炎活性。方法 利用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备 HPLC 以及重结晶方法对余甘子 50%乙醇提取物的醋酸乙酯部位进行分离纯化; 通过化合物的物理化学性质及其波谱数据等进行结构鉴定; 最后利用脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应模型, 探究余甘子中含量高的化合物对 NO、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) 等炎症因子的影响, 以评价其抗炎活性。**结果** 从余甘子中分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为异香草酸 (1)、反式肉桂酸 (2)、对羟基苯甲醛 (3)、松柏醛 (4)、槲皮素 (5)、山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖 (6)、柚皮素 (7)、2-羟基-3-苯基丙酸甲酯 (8)、对苯二酚 (9)、杨梅素 (10)、2-呋喃甲酸 (11)、没食子酸甲酯 (12)、原儿茶酸 (13)、没食子酸 (14)。对含量较高的没食子酸、没食子酸甲酯和槲皮素 3 个化合物展开抗炎活性研究, 结果表明没食子酸和没食子酸甲酯均能不同程度抑制各类炎症因子; 槲皮素对炎症因子 TNF- α 和 IL-6 无显著抑制作用。**结论** 化合物 1、3、4、8~11 和 13 均为首次从该植物中分离得到。余甘子的抗炎作用可能与其酚酸类化合物相关。

关键词: 余甘子; 酚酸; 黄酮; 炎症; 异香草酸; 松柏醛; 杨梅素; 原儿茶酸

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)20-4873-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.005

Chemical constituents of *Phyllanthus emblica* and its anti-inflammation activities

WANG Shu-hui, CHENG Jin-tang, GUO Cong, CUI Wen-jin, SHI Jia, LIU An

Key Laboratory of Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents and its anti-inflammatory activity effect of *Phyllanthus emblica*. **Methods** The chemical constituents of *P. emblica* were isolated and purified by silica gel column chromatography, ODS column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, semi-preparative high-performance liquid chromatography and recrystallization method. Through their spectra data, physical and chemical properties analysis, the structures of those compounds with high content were identified. LPS-induced RAW264.7 inflammatory cell model was established to evaluate the effect of compounds in *P. emblica* on proinflammatory factors (NO, IL-6, TNF- α , and MCP-1) of RAW264.7 inflammatory cells. **Results** Totally, 14 compounds were isolated from *P. emblica* and identified as isovanillic acid (1), *trans*-cinnamic acid (2), *p*-hydroxybenzaldehyde (3), coniferyl aldehyde (4), quercetin (5), kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnose (6), naringenin (7), 2-hydroxy-3-methyl phenylpropionate (8), hydroquinone (9), myricetin (10), 2-furoic acid (11), methyl gallate (12), protocatechuic acid (13), gallic acid (14). The experiment of anti-inflammatory effects showed that those compounds had different inhibitory effects on the production of inflammatory factors NO, IL-6, TNF- α and MCP-1. **Conclusion** Compounds 1, 3, 4, 8—11 and 13 are isolated from *P. emblica* for the first time. The anti-inflammatory effect of *P. emblica* is related to its phenolic acids.

Key words: *Phyllanthus emblica* L.; phenolic acids; flavonoids; inflammatory; isovanillic acid; coniferyl aldehyde; myricetin; protocatechuic acid

余甘子为大戟科 (Euphorbiaceae) 叶下珠属 *Phyllanthus* Linn. 植物余甘子 *Phyllanthus emblica*

L. 的干燥果实, 首载于《新修本草》, 为藏族习用药材。其性味甘、酸、涩、凉; 归肺、胃经; 具有

收稿日期: 2019-04-25

基金项目: 中国中医科学院“十三五”重点领域研究专项 (ZZ10-007)

作者简介: 王淑慧 (1994—), 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: wangshuhuiw@126.com

*通信作者 刘 安, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药化学。E-mail: aliu@icmm.ac.cn

清热凉血、生津止渴、消食健胃功效；常用于治疗血热血瘀、咳嗽、喉痛、口干、消化不良、腹胀等^[1]。余甘子是传统中药，同时在中国藏医、蒙医以及埃及、波斯、北美传统药物等 30 余个国家或民族医药体系中均有悠久的历史^[2]。另外，余甘子被卫生部列入药食两用名单。我国民间有服用余甘子治疗痛风的习惯，现临床上有含有余甘子治疗痛风的复方，如奇正青鹏膏、十五味乳鹏丸和十位乳香胶囊等。研究表明^[3]余甘子总提取物可降低血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、NO 和白细胞介素 (IL-1 β) 的水平，抑制棉球肉芽肿的形成。本实验旨在进一步对与余甘子抗炎相关的化合物展开研究。本研究运用多种分离技术从 50%乙醇提取的余甘子总提取物中分离得到了 14 个化合物，分别鉴定为异香草酸 (isovanillic acid, **1**)、反式肉桂酸 (*trans*-cinnamic acid, **2**)、对羟基苯甲醛 (*p*-hydroxybenzaldehyde, **3**)、松柏醛 (pine aldehyde, **4**)、槲皮素 (quercetin, **5**)、山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖 (kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnose, **6**)、柚皮素 (naringenin, **7**)、2-羟基-3-苯基丙酸甲酯 (2-hydroxy-3-phenylpropyl-propyl methyl ester, **8**)、对苯二酚 (hydroquinone, **9**)、杨梅素 (myricetin, **10**)、2-呋喃甲酸 (furoic acid, **11**)、没食子酸甲酯 (methyl gallate, **12**)、原儿茶酸 (protocatechuic acid, **13**)、没食子酸 (gallic acid, **14**)。采用脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应模型，对其中含量较高的黄酮类化合物槲皮素，酚酸类化合物没食子酸、没食子酸甲酯展开了抗炎活性评价。结果表明，没食子酸和没食子酸甲酯均能不同程度地抑制各类炎症因子；槲皮素对炎症因子 TNF- α 和 IL-6 无显著抑制作用。为进一步展开余甘子抗炎机制研究及其临床应用提供参考。

1 仪器、材料与试剂

布鲁克 Ascend-600M 超导核磁共振仪 (德国布鲁克公司)，谱图以溶剂峰作为内标；安捷伦 1100 高效液相 (美国安捷伦公司)；快速制备色谱 (上海拜泰齐贸易有限公司)；安捷伦 6545 UPLC-ESI-QTOF-MS/MS (美国安捷伦公司)；万分之一电子分析天平 (上海梅特勒-托利多公司)；Multiskan PC 酶标仪 (美国赛默飞公司)；液相分析色谱柱 YMC-Pack ODS-A (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 日本维美希公司)；质谱分析色谱柱 Agilent Eclipse Pluse C₁₈ (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m, 美国安捷伦公司)；半制备色谱柱 YMC-Pack ODS-A (250 mm $\times$ 10

mm, 5 μ m, 日本维美希公司)。

200~300、100~200 目硅胶 (青岛海洋化工厂)；硅胶 GF₂₅₄ 薄层板 (德国默克公司)；ODS (日本富士硅化学株式会社)；Sephadex LH-20 (瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司)。BD OptEIA™ 酶联免疫吸附测定试剂盒 (美国 R&D systems 公司)。

色谱级甲醇、乙腈、甲酸 (美国赛默飞世尔科技公司)；氘代试剂 (北京赛普锐思有限公司)；二甲基亚砜 (DMSO)、LPS, 美国 Sigma-Aldrich 公司；胎牛血清 (Gibco, 美国)；其他试剂均为分析纯。

余甘子饮片购于北京仟草中药饮片有限公司并具有质量检查检验报告，产地云南。经中国中医科学院中药研究所程锦堂助理研究员鉴定为大戟科叶下珠属植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥果实。RAW264.7 细胞购于北京协和医学院基础医学院。

2 方法

2.1 提取、分离与纯化

干燥余甘子药材 17 kg，经破碎后，5 倍量 50% 乙醇浸渍提取 2 次 (48、24 h)，合并提取液，减压浓缩成浸膏。取 50 mL 浸膏于蒸发皿中，100 $^{\circ}$ C 水浴干燥，105 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 3 h，计算其得膏率为 34.9%。浸膏加水混悬，分别用同等体积的石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C)、二氯甲烷和醋酸乙酯萃取 (各 2 次)。回收溶剂，得石油醚浸膏 (3.5 g)、二氯甲烷浸膏 (30.47 g)、醋酸乙酯浸膏 (750.97 g)。醋酸乙酯提取物用硅胶 (100~200 目) 拌样后，经过 3 倍量 200~300 目硅胶柱色谱，二氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (99:1 $\rightarrow$ 0:100)，薄层色谱法 (TLC) 和液相色谱法检测合并得到 4 个组分 (Fr. 1~4)。Fr. 2 反复进行硅胶柱色谱分离、最后 Sephadex LH-20 分离 (甲醇) 得到化合物 **1** (1.1 mg)、**2** (19.3 mg)、**3** (7.4 mg)、**4** (11.3 mg)。Fr. 3 反复使用 Sephadex LH-20 分离 (甲醇)，最后半制备等度洗脱 (20% 甲醇) 分离得到化合物 **5** (30 mg) 和 **6** (24 mg)。Fr. 4 进行硅胶柱色谱分离，硅胶 (100~200 目) 拌样后，经 3 倍量硅胶 (200~300 目) 柱色谱，二氯甲烷-醋酸乙酯梯度洗脱 (5:1 $\rightarrow$ 1:3)，TLC 和 HPLC-DAD 法检测合并得到 4 个组分 (Fr. 4.1~4.4)。Fr. 4.1 反复进行硅胶色谱分离，随后进行 Sephadex LH-20 分离 (甲醇)，最后半制备等度洗脱 (16% 甲醇) 分离得到化合物 **7** (6 mg)、**8** (0.5 mg)。Fr. 4.2 利用 ODS 分离，用甲醇-水 (5:95 $\rightarrow$ 100:0) 梯度洗脱，再用 Sephadex LH-20 (甲醇) 和半制备等度洗脱 (17%

甲醇) 分离得到化合物 **9** (11.8 mg)、**10** (10 mg)。Fr. 4 反复利用 Sephadex LH-20 (甲醇) 分离, 最后利用半制备等度洗脱 (23% 甲醇) 分离得到化合物 **11** (30 mg)、**12** (25 mg)、**13** (3 mg)。Fr. 4.4 利用经 ODS Flash 柱, 以甲醇-水 (5:95→30:70) 梯度中压制备分离和重结晶法得到大量的化合物 **14** (90 g)。

2.2 抗炎活性研究

2.2.1 供试品溶液的制备 取化合物 **5** (槲皮素) 3.02 mg, 化合物 **12** (没食子酸甲酯) 1.84 mg, 化合物 **14** (没食子酸) 1.70 mg, 阳性对照地塞米松 (DXM) 3.92 mg, 分别加入 1 mL DMSO 溶解, 配成浓度为 100 mmol/L 的供试品溶液。

2.2.2 细胞培养 在 37 °C、5% CO₂ 的潮湿环境下, 将细胞放置于 DMEM 培养基 (1 mmol/L 丙酮酸盐、2 mmol/L 谷氨酰胺、4.5 g/L 葡萄糖) 中培养, 使用时在培养基中添加 10% 的灭活胎牛血清 (FBS)、青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 U/mL)。将细胞培养至对数期后, 以 2×10^5 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 然后在培养箱中培养 24 h。

2.2.3 Griess 法测定化合物对 RAW264.7 细胞培养上清中 NO 释放的影响 将 RAW264.7 细胞随机分为空白对照组 (DMSO)、模型组 [LPS (500 ng/mL) 或 ox-LDL (50 μg/mL) 刺激]、实验组 [给药 (100 μmol/L) 后同样浓度 LPS 或 ox-LDL 刺激]。实验组 RAW264.7 细胞分别给药后培养 2 h, 随后 LPS 处理, 37 °C 下继续培养 24 h。将培养基收集至离心管中离心取上清液。遵照试剂盒说明书进行操作, 在 540 nm 下检测吸光度 (*A*) 值, 根据标准曲线计算待测样品中 NO 浓度。

2.2.4 ELISA 法测定化合物对 RAW264.7 细胞培养上清中 IL-6、TNF-α 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 释放量的影响 按上述方法分组, 实验组 RAW264.7 细胞分别给药后培养 2 h, 随后 LPS (500 ng/mL) 处理, 37 °C 下继续培养 24 h。将上清液收集至离心管中待测。根据说明书, 利用酶联免疫吸附测定试剂盒测定培养基上清液中 IL-6、TNF-α 和 MCP-1 的释放量。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色晶体 (甲醇), ESI-HR-MS *m/z*: 169.105 8 [M+H]⁺, 191.087 7 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.52 (1H, s, -COOH), 9.84 (1H, s, H-OH), 7.40~7.45 (2H, m, H-5, 6), 6.84 (1H,

d, *J* = 7.9 Hz, H-2), 3.81 (3H, s, H-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.4 (C = O), 151.2 (C-4), 147.3 (C-3), 123.5 (C-6), 121.6 (C-1), 115.0 (C-2), 112.7 (C-5), 55.5 (-OCH₃)。以上数据与文献报道对比^[4], 鉴定化合物 **1** 为异香草酸。

化合物 **2**: 白色粉末, ESI-HR-MS *m/z*: 149.055 8 [M+H]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.64 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz, H-7), 7.59 (2H, *m*, H-2, 6), 7.39 (3H, *m*, H-3~5), 6.49 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz, H-8); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 171.2 (C = O), 145.9 (C-7), 136.3 (C-1), 131.4 (C-4), 130.1 (C-2, 6), 129.3 (C-3, 5), 120.4 (C-8)。以上数据与文献报道对比^[5], 鉴定化合物 **2** 为反式肉桂酸。

化合物 **3**: 白色粉末, ESI-HR-MS *m/z*: 123.040 3 [M+H]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 9.77 (1H, *s*, C = O), 7.78 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-2, 6), 6.92 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 193.0 (C = O), 165.4 (C-4), 133.6 (C-2, 6), 130.5 (C-1), 117.0 (C-3, 5)。以上数据与文献报道对比^[6], 鉴定化合物 **3** 为对羟基苯甲醛。

化合物 **4**: 墨绿色粉末, ESI-HR-MS *m/z*: 179.065 0 [M+H]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 9.58 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, H-C = O), 7.59 (1H, *d*, *J* = 15.7 Hz, H-7), 7.26 (1H, *s*, H-2), 7.17 (1H, *d*, *J* = 8.2 Hz, H-6), 6.88 (1H, *d*, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.66 (1H, *dd*, *J* = 15.8, 7.8 Hz, H-8), 3.91 (3H, *s*, -OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 196.3 (C = O), 154.4 (C-7), 151.9 (C-4), 149.7 (C-3), 127.8 (C-1), 126.9 (C-6), 125.3 (C-8), 116.8 (C-7), 112.3 (C-2), 56.6 (-OCH₃)。以上数据与文献报道对比^[7], 鉴定化合物 **4** 为松柏醛。

化合物 **5**: 黄色粉末, ESI-HR-MS *m/z*: 303.043 5 [M+H]⁺, 325.023 9 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.74 (1H, *s*, H-6'), 7.64 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-2'), 6.88 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-3'), 6.39 (1H, *d*, *J* = 1.4 Hz, H-6), 6.18 (1H, *d*, *J* = 1.4 Hz, H-8); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 177.5 (C = O), 165.7 (C-7), 162.7 (C-5), 158.4 (C-9), 148.9 (C-4'), 148.2 (C-5'), 146.4 (C-2), 137.4 (C-3), 124.3 (C-1'), 121.8 (C-2'), 116.4 (C-3'), 116.1 (C-6'), 104.7 (C-10), 99.4 (C-6), 94.5 (C-8)。以上数据与文献报道对比^[8], 鉴定化合物 **5** 为槲皮素。

化合物 **6**: 黄色粉末, ESI-HR-MS *m/z*: 433.103 6 [M+H]⁺, 455.086 2 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (600 MHz,

CD₃OD) δ : 7.76 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.37 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-6), 5.38 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-1''), 4.23 (1H, dd, J = 3.1, 1.5 Hz, H-2''), 3.77~3.65 (1H, m, H-3''), 3.37~3.32 (2H, m, H-4'', 5''), 0.92 (3H, d, J = 5.2 Hz, H-6''); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 179.7 (C = O), 166.1 (C-5), 163.3 (C-7), 161.7 (C-4'), 159.4 (C-2), 158.7 (C-9), 136.3 (C-3), 132.1 (C-2', 6'), 122.8 (C-1'), 116.7 (C-3', 5'), 106.0 (C-10), 103.6 (C-1''), 100.0 (C-6), 94.9 (C-8), 73.3 (C-4''), 72.2 (C-3''), 72.1 (C-2''), 72.1 (C-5''), 17.8 (C-6''). 以上数据与文献报道对比^[9], 鉴定化合物 **6** 为山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖。

化合物 **7**: 淡黄色晶体 (甲醇), ESI-HR-MS m/z : 273.068 6 [M+H]⁺, 295.050 7 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.31 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-3', 5'), 6.81 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-2', 6'), 5.89 (1H, s, H-6), 5.88 (1H, s, H-8), 5.34 (1H, dd, J = 13.2, 2.6 Hz, H-2), 3.11 (1H, dd, J = 17.1, 13.2 Hz, H-3 α), 2.69 (1H, dd, J = 17.1, 2.6 Hz, H-3 β); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 197.9 (C = O), 168.5 (C-7), 165.6 (C-5), 159.2 (C-4'), 131.2 (C-1'), 129.2 (C-2', 6'), 116.5 (C-3', 5'), 103.5 (C-10), 97.2 (C-6), 96.3 (C-8), 80.6 (C-2), 44.2 (C-3)。以上数据与文献报道对比^[10], 鉴定化合物 **7** 为柚皮素。

化合物 **8**: 粉色油状物, ESI-HR-MS m/z : 181.080 2 [M+H]⁺, 203.061 8 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.40~7.35 (1H, m, H-4'), 7.30 (1H, t, J = 7.3 Hz, H-3', 5'), 7.21 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-1', 6'), 4.46 (1H, dd, J = 6.8, 4.4 Hz, H-2), 3.78 (3H, s, -OCH₃), 3.13 (1H, dd, J = 13.9, 4.4 Hz, H-3 β), 2.97 (1H, dd, J = 13.9, 6.8 Hz, H-3 α); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 174.8 (C = O), 136.5 (C-1'), 129.7 (C-2', 6'), 128.7 (C-3', 5'), 127.2 (C-4'), 71.5 (C-2), 52.7 (C-OCH₃), 40.8 (C-3)。以上数据与文献报道对比^[11], 鉴定化合物 **8** 为 2-羟基-3-苯基丙酸甲酯。

化合物 **9**: 白色粉末, ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.90 (4H, s, H-2, 3, 5, 6); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 145.5 (C-1, 4), 108.7 (C-2, 3, 5, 6)。以上数据与文献报道对比^[12], 鉴定化合物 **9** 为对苯二酚。

化合物 **10**: 黄色粉末, ESI-HR-MS m/z : 319.037 2 [M+H]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.34 (1H,

s, H-2', 6'), 6.38 (1H, s, H-6), 6.18 (1H, s, H-8); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 177.4 (C = O), 165.7 (C-7), 162.6 (C-5), 158.3 (C-9), 148.1 (C-2), 146.9 (C-3', 5'), 137.5 (C-4'), 137.1 (C-3), 123.2 (C-1'), 108.7 (C-2', 6'), 104.6 (C-10), 99.4 (C-6), 94.5 (C-8)。以上数据与文献报道对比^[13], 鉴定化合物 **10** 为杨梅素。

化合物 **11**: 白色粉末, ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.71 (1H, s, H-5), 7.20 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3), 6.57 (1H, t, J = 1.6 Hz, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 162.6 (C = O), 148.1 (C-5), 146.6 (C-2), 119.1 (C-3), 113.1 (C-4)。以上数据与文献报道对比^[14], 鉴定化合物 **11** 为 2-呋喃甲酸。

化合物 **12**: 白色粉末, ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.04 (2H, s, H-2, 6), 3.81 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 169.2 (C = O), 146.6 (C-3, 5), 139.9 (C-4), 121.6 (C-1), 110.2 (C-2, 6), 52.4 (-OCH₃)。以上数据与文献报道对比^[15], 鉴定化合物 **12** 为没食子酸甲酯。

化合物 **13**: 白色粉末, ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ : 8.39 (1H, s, OH), 7.57 (2H, m, H-2, 6), 6.97 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-5); ¹³C-NMR (150 MHz, D₂O) δ : 171.0 (C = O), 149.2 (C-4), 143.6 (C-3), 123.6 (C-6), 122.8 (C-1), 117.1 (C-5), 115.6 (C-2)。以上数据与文献报道对比^[16], 鉴定化合物 **13** 为原儿茶酸。

化合物 **14**: 白色晶体 (水), ESI-HR-MS m/z : 171.023 0 [M+H]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.07 (2H, s, H-2, 6); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 170.6 (C = O), 146.4 (C-3, 5), 139.7 (C-4), 122.1 (C-1), 110.5 (C-2, 6)。以上数据与文献报道对比^[15], 鉴定化合物 **14** 为没食子酸。

3.2 抗炎活性

本实验测定了对照组、模型组和实验组培养基中的 NO 释放量, 结果表明 (图 1) 3 个化合物 (100 μ mol/L) 均可抑制 RAW264.7 细胞中由 LPS 刺激引起的 NO 释放量升高。其中, 化合物 **14** 没食子酸的抑制作用最为显著。

炎症细胞因子在炎症发展过程中起到重要的作用, 如 IL-6、TNF- α 和 MCP-1, 所以为了更进一步的确定化合物的抗炎活性, 本实验研究了从余甘子中分离得到的含量较大的化合物对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 和 MCP-1 释放量的影响。如图 1 所示, 与对照组相比, 模型组

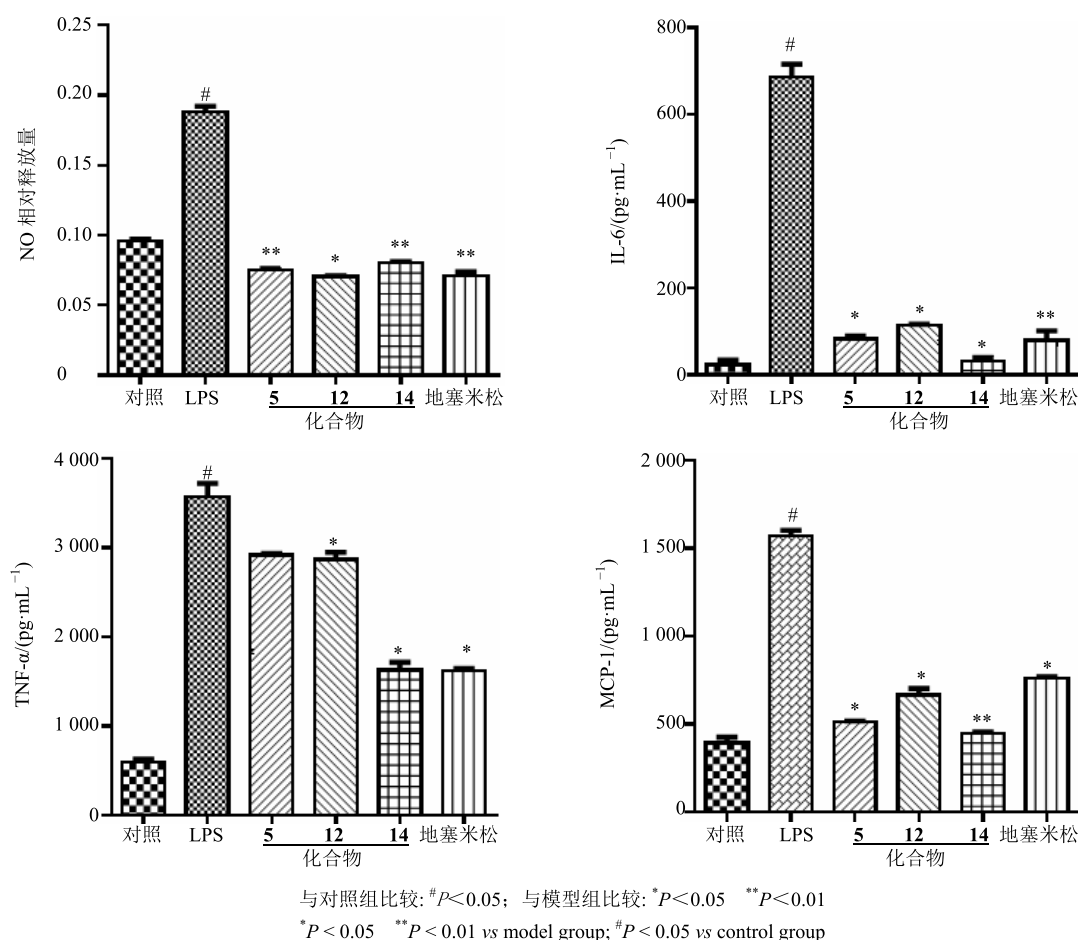


图1 中药余甘子及其化合物对LPS刺激的RAW264.7细胞炎症因子NO、IL-6、TNF-α和MCP-1释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 1 Effect of EO and its compounds on LPS-induced NO, IL-6, TNF-α, and MCP-1 production in RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IL-6、TNF-α和MCP-1释放量显著增加。化合物均可显著降低细胞中IL-6的释放量;除了化合物5外,其他化合物均可显著降低细胞中TNF-α的释放量;所有化合物均可显著降低细胞中MCP-1的释放量。

4 讨论

前人实验研究表明^[17]余甘子各提取部分均有一定的抗炎镇痛作用,其治疗痛风性关节炎的主要机制可能与抑制炎症介质前列腺素E₂(PGE₂)和TNF-α释放有关。本实验研究表明,中药余甘子抗炎作用,可能与其酚酸和黄酮类化合物有关,特别是其中没食子酸和没食子酸甲酯在余甘子中含量高,且能显著抑制炎症因子的释放,为今后作用机制研究奠定基础。同时表明余甘子作为保健品原料开发具有很大的潜在价值。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 侯开卫.余甘子的化学成分及在民族民间传统医药中的应用[J].中国民族民间医药杂志,2002,59(6):

345-348.

- [3] 王瑞国,郑良朴,林久茂,等.余甘子抗大鼠棉球肉芽肿形成及其机制的实验研究[J].福建中医学院报,2007,17(4):22-24.
- [4] 董梅,袁日,齐凤琴,等.青龙衣中细胞毒活性成分的研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(5):805-808.
- [5] 段和祥,罗文艳,杨毅生,等.蒺藜醋酸乙酯部位化学成分研究[J].中草药,2015,46(10):1441-1444.
- [6] 张爱莲,于敏,徐宏化,等.齿瓣石斛的化学成分及其抗氧化活性[J].中国中药杂志,2013,38(6):844-847.
- [7] 孙洋,刘欣,吴悠楠.爪哇黄芩化学成分研究[J].中国药物化学杂志,2017,27(4):312-314.
- [8] 黄凤杰,宋建晓,刘佳健.老鸭嘴化学成分研究[J].中国中药杂志,2013,38(8):1183-1187.
- [9] 吴新星,黄日明,徐志防.广东蛇葡萄的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2014,26(11):1771-1774.
- [10] 吕旭辉,李振麟,刘书霞,等.石崖茶的化学成分研究(II)[J].中草药,2018,49(6):1272-1276.

- [11] Cimmino A, Nocera P, Linaldeddu B, *et al.* The phytotoxic metabolites produced by *Diaporthella cryptica*, the causal agent of hazelnut branch canker [J]. *J Agri Food Chem*, 2018, 66(13): 3435-3442.
- [12] 王伟, 赵庆春, 安 晔, 等. 中药蜂房的化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 81(18): 54-56.
- [13] 周先礼, 秦长红, 梅 莹. 髯花杜鹃叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 206-208.
- [14] Geng Y, Zhu S L, Cheng P, *et al.* Bioassay-guided fractionation of ethyl acetate extract from *Armillaria mellea* attenuates inflammatory response in lipopolysaccharide (LPS) stimulated BV-2 microglia [J]. *Phytomedicine*, 2017, 26(15): 55-61.
- [15] 任恒春, 万定荣, 谷 婧, 等. 火炭母化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(10): 1387-1389.
- [16] 付 琛, 陈 程, 周光雄, 等. 阳春砂仁化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2410-2412.
- [17] 岑志芳, 张继平, 李海燕. 余甘子提取物对尿酸钠诱导大鼠急性痛风性关节炎的作用研究 [J]. 中国药房, 2011, 22(47): 4425-4427.