

小黄皮茎的化学成分及生物活性研究

夏红旻^{1,2}, 曲延伟³, 王 亮¹, 郭 威¹, 张东明^{2*}

1. 山东省中医药研究院 泰山学者特聘专家岗位 国家中医药管理局中药分析重点学科 山东省中药质量标准研究重点实验室, 山东 济南 250014
2. 北京协和医学院 中国医学科学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050
3. 山东达冠医药科技有限公司, 山东 济南 250101

摘要: 目的 研究小黄皮 *Clausena emarginata* 茎的化学成分及其保肝活性。方法 采用硅藻土、硅胶等多种柱色谱、中压制备液相色谱 (MPLC) 及制备型 HPLC 等方法对小黄皮茎的化学成分进行分离纯化, 根据化合物理化性质结合现代波谱学方法鉴定化合物结构; 并测试其对 DL-半乳糖胺诱导肝细胞损伤的保护活性及其对脂多糖 (LPS) 诱导小鼠小胶质 BV2 细胞产生一氧化氮 (NO) 的抑制活性。结果 从小黄皮茎的 95%乙醇提取物的氯仿部位分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为 nordenatin (1)、oxanordenatin (2)、5'-羟基葡萄糖内酯 (3)、7-[(E)-7'-羟基-3',7'-二甲基-2',5'-二烯]-香豆素 (4)、7-羟基香豆素 (5)、claulamine A (6)、 γ -崖椒碱 (7)、开环异落叶松脂素 (8)、2-[4-[(1E)-3-hydroxyprop-1-en-1-yl]-2,6-dimethoxyphenoxy]propane-1,3-diol (9)、2-[4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol (10)、甲基-2-O- β -D-吡喃葡萄糖基苯甲酸 (11)。其中, 化合物 1~5 为香豆素类化合物, 6 为吡啶生物碱, 7 为咪唑啉类生物碱, 8 为木脂素类化合物, 9、10 为苯丙素类化合物, 11 为酚酸类化合物。结论 化合物 2~4、7~11 为首次从该植物中分离得到, 化合物 5 和 7 对 DL-半乳糖胺诱导的肝细胞损伤具有一定的保护活性, 化合物 11 对 LPS 诱导 BV2 细胞产生 NO 具有一定的抑制作用。

关键词: 小黄皮; 香豆素; 生物碱; 苯丙素; 7-羟基香豆素; γ -崖椒碱; 生物活性; 肝损伤

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)03-0630-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.004

Chemical constituents and biological activities of stems of *Clausena emarginata*

XIA Hong-min^{1,2}, QU Yan-wei³, WANG Liang¹, GUO Wei¹, ZHANG Dong-ming²

1. Shandong Key Laboratory of Chinese Medicine Quality Standard Research, Key Disciplines on Analysis of Traditional Chinese Medicine of SATCM, Taishan Scholar-Distinguished Experts Position, Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China
2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China
3. Shandong Daguan Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Jinan 250101, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents and hepatoprotective effects from the stems of *Clausena emarginata*.

Methods The compounds were isolated and purified by chromatography on kieselguhr, silica gel, MPLC, and preparative HPLC. Their structures were identified based on physicochemical properties and spectral data. Hepatoprotective activities against DL-galactosamine-induced damage and inhibitory effects on LPS-induced NO production of the compounds were investigated.

Results Eleven compounds were isolated from the CHCl₃ fractions of 95% ethanol extract of the stems of *C. emarginata*, and their structures were identified as nordenatin (1), oxanordenatin (2), anisocoumarin H (3), 7-[(E)-7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyloxy]-coumarin (4), 7-hydroxycoumarin (5), claulamine A (6), γ -fagarine (7), secoisolariciresinol (8), 2-[4-[(1E)-3-hydroxyprop-1-en-1-yl]-2,6-dimethoxyphenoxy]propane-1,3-diol (9), 2-[4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol (10), and methyl 2-O- β -D-glucopyranosylbenzoate (11). Compounds 1-5 were coumarins, 6 was a carbazole alkaloid, 7

收稿日期: 2020-06-22

基金项目: 山东省重大科技创新工程 (2017CXGC1308); 山东省重点研发计划 (2019GSF108001); 山东省自然科学基金项目 (ZR2016HQ17, ZR2016HQ49)

作者简介: 夏红旻, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0531)82949821 E-mail: xiahm_jn@163.com

*通信作者: 张东明, 研究员, 博士生导师, 研究方向为天然药物化学。Tel: (010)63165227 E-mail: zhangdm@imm.ac.cn

was a furoquinoline alkaloid, **8** was a lignan, **9-10** were phenylpropanoids, and **11** was a phenolic acid. **Conclusion** Compounds **2-4**, **7-11** are isolated from this plant for the first time. Compounds **5** and **7** show hepatoprotective effects against *DL*-galactosamine-induced toxicity in WB-F344 cells. Compound **11** shows inhibitory effect against LPS-induced NO production in microglia BV2 Cell.

Key words: *Clausena emarginata* Huang; coumarins; alkaloids; phenylpropanoids; 7-hydroxycoumarin; γ -fagarine; biological activities; liver injury

小黄皮 *Clausena emarginata* Huang 是芸香科 (Rutaceae) 黄皮属 *Clausena* Burm. f. 小乔木, 分布于云南、广西、海南等地。其根、叶均可入药, 具有宣肺止咳、通经活络、行气止痛等功效, 用于感冒头痛、风寒咳嗽、胃痛及风湿性关节炎等症的治疗^[1]。前期本课题组从小黄皮茎枝 95%乙醇提取物的氯仿部位分离到了一系列的柠檬苦素、生物碱、香豆素及木脂素类化合物, 并对其进行了多模型药理活性评价, 结果表明部分化合物具有良好的抗炎、保肝等活性^[2-6]。为继续寻找结构新颖、活性强的单体化合物, 为小黄皮的临床应用及资源的合理开发利用提供理论支持, 本课题组从其 95%乙醇提取物的氯仿部位分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为 nordentatin (**1**)、oxanordentatin (**2**)、5'-羟基葡萄糖内酯 (anisocoumarin H, **3**)、7-[(*E*)-7'-羟基-3',7'-二甲基-2',5'-二烯]-香豆素 (7-[(*E*)-7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyloxy]-coumarin, **4**)、7-羟基香豆素 (7-hydroxycoumarin, **5**)、claulamine A (**6**)、 γ -崖椒碱 (γ -fagarine, **7**)、开环异落叶松脂素 (secoisolariciresinol, **8**)、2-[4-[(1*E*)-3-hydroxyprop-1-en-1-yl]-2,6-dimethoxyphenoxy]propane-1,3-diol (**9**)、2-[4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol (**10**)、甲基-2-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基苯甲酸 (methyl 2-*O*- β -D-glucopyranosylbenzoate, **11**)。其中, 化合物 **1~5** 为香豆素类化合物, **6** 为呋喃生物碱, **7** 为呋喃喹啉类生物碱, **8** 为木脂素类化合物, **9、10** 为苯丙素类化合物, **11** 为酚酸类化合物。化合物 **2~4**、**7~11** 为首次从该植物中分离得到。在化合物体外活性评价中, 化合物 **5** 和 **7** 对 *DL*-半乳糖胺诱导的 WB-F344 细胞损伤具有一定的保护活性, 化合物 **11** 对 LPS 诱导 BV2 细胞产生 NO 具有一定的抑制作用。

1 仪器与材料

Mercury-400 型 (美国 Varian 公司); Bruker AV500-III 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Agilent 1100 Series LC-MSD-Trap-SL 型质谱仪 (安捷伦科技有限公司); 中压制备液相色谱系统 (瑞士布琪有

限公司); Shimadzu LC-6AD 型半制备液相色谱仪 (日本岛津公司); 制备柱 (YMC ODS-A C₁₈, 250 mm×20 mm, 5 μ m, 日本 YMC 公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); 色谱纯溶剂 (美国 Fisher 公司); 分析纯试剂 (国药集团化学试剂有限公司)。

小黄皮药材于 2010 年 8 月采自云南西双版纳, 经中国科学院西双版纳热带植物园崔景云研究员鉴定为小黄皮 *C. emarginata* Huang 的干燥茎枝, 标本 (ID-22254) 存放于中国医学科学院药物研究所标本室。

2 提取与分离

小黄皮茎 18 kg, 经干燥、粉碎后, 用 95%乙醇加热回流提取 3 次 (每次 2 h), 减压浓缩至无醇味, 得提取物 570 g。提取物经硅藻土柱色谱分离, 依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、丙酮、丙酮-乙醇 (1:1)、乙醇、乙醇-水 (1:1) 进行洗脱, 分成 7 个部位。氯仿洗脱部位 (81 g) 用硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以石油醚-丙酮 (100:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5) 进行梯度洗脱, 得到 6 个部位 (A1~A6)。其中 A3 (15 g) 采用硅胶柱色谱 (200~300 目) 粗分, 以石油醚-丙酮 (100:0、95:5、9:1、85:15、8:2、75:25、7:3、65:35、6:4、55:45、5:5) 为洗脱剂梯度洗脱, 根据薄层色谱分析结果, 将相同组分合并后得到 5 个组分 (A3B1~A3B5)。组分 A3B1 (4.0 g) 先经 MPLC 分离 (30%~90%甲醇, 25 mL/min, 4 h), 再经制备型 HPLC 纯化 (40%甲醇, 8 mL/min), 得到化合物 **1** (45 mg)、**2** (0.8 mg)、**3** (4.2 mg)、**4** (8.3 mg)、**5** (9.5 mg) 和 **6** (15 mg)。A3B2 (2.8 g) 通过 MPLC 进行粗分 (30%~90%甲醇, 25 mL/min, 3 h), 然后用制备型 HPLC 分离纯化, 38%甲醇溶液为流动相 (8 mL/min), 得到化合物 **7** (5 mg)。A5 (8.1 g) 先用硅胶柱色谱分离, 以石油醚-丙酮 (100:0~5:5) 为洗脱剂, 根据薄层色谱分析结果, 将相同组分合并, 得到 2 个组分 (A5B1~A5B2)。组分 A5B1 (3.2 g) 经过 MPLC 粗分 (10%~90%甲醇, 25

mL/min, 3 h), 再用制备型 HPLC 分离 (35% 甲醇, 8 mL/min), 得到化合物 **8** (3 mg)。组分 A5B2 (2.8 g) 先用 MPLC 分离, 10%~90% 甲醇为流动相 (25 mL/min, 3 h), 再经制备型 HPLC 纯化 (35% 甲醇, 8 mL/min), 得到化合物 **9** (4 mg)、**10** (7 mg) 和 **11** (4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 335.1 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.11 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 8.11 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 5.71 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3'), 6.70 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4'), 6.22 (1H, dd, $J = 17.6, 10.8$ Hz, H-2''), 4.82 (2H, dd, $J = 17.6, 10.8$ Hz, H-3''), 1.56 (6H, s, 2'-CH₃), 1.37 (6H, s, 1''-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 159.9 (C-2), 109.5 (C-3), 140.2 (C-4), 106.6 (C-4a), 148.4 (C-5), 104.1 (C-6), 155.5 (C-7), 113.8 (C-8), 153.7 (C-8a), 76.8 (C-2'), 128.5 (C-3'), 116.6 (C-4'), 40.4 (C-1''), 150.0 (C-2''), 107.9 (C-3''), 27.0 (2'-CH₃), 29.5 (1''-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为 nordentatin。

化合物 **2**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 329.2 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.12 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.93 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 5.73 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3'), 6.40 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4'), 4.41 (1H, dd, $J = 6.4, 5.2$ Hz, H-2''), 3.74 (2H, m, H-3''), 1.42 (6H, s, 2'-CH₃), 1.50 (3H, s, 1''-CH₃), 1.26 (3H, s, 1''-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 159.8 (C-2), 109.9 (C-3), 139.2 (C-4), 103.0 (C-4a), 149.8 (C-5), 101.4 (C-6), 157.5 (C-7), 113.9 (C-8), 150.4 (C-8a), 78.0 (C-2'), 128.8 (C-3'), 115.1 (C-4'), 42.9 (C-1''), 94.4 (C-2''), 59.6 (C-3''), 27.6 (2'-CH₃), 27.5 (2'-CH₃), 26.4 (1''-CH₃), 20.8 (1''-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为 oxanordentatin。

化合物 **3**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 337.3 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.27 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.98 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.60 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.92 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, H-6), 6.96 (1H, s, H-8), 4.63 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 5.41 (1H, t, $J = 6.4$ Hz, H-2'), 2.19 (1H, dd, $J = 13.2, 7.2$ Hz, H-4'a), 2.02 (1H, dd, $J = 13.2, 6.0$ Hz, H-4'b), 4.45 (1H, m, H-5'), 5.05 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 1.57 (3H, s, H-8'), 1.72 (3H, s, 3'-CH₃), 1.56 (3H, s,

7'-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.4 (C-2), 113.0 (C-3), 144.4 (C-4), 112.4 (C-4a), 129.5 (C-5), 112.3 (C-6), 161.7 (C-7), 101.4 (C-8), 155.4 (C-8a), 65.7 (C-1'), 120.9 (C-2'), 138.8 (C-3'), 47.8 (C-4'), 65.2 (C-5'), 129.5 (C-6'), 131.4 (C-7'), 25.5 (C-8'), 17.1 (3'-CH₃), 18.0 (7'-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为 5'-羟基葡萄糖内酯。

化合物 **4**: 淡黄色油状物; ESI-MS m/z 337.2 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.27 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.97 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.60 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.94 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6), 6.99 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 4.65 (2H, d, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 5.46 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 2.71 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-4'), 5.50 (1H, dt, $J = 15.6, 6.4$ Hz, H-5'), 5.58 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-6'), 1.14 (3H, s, H-8'), 1.70 (3H, s, 3'-CH₃), 1.14 (3H, s, 7'-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.3 (C-2), 112.9 (C-3), 144.4 (C-4), 112.4 (C-4a), 129.4 (C-5), 112.3 (C-6), 161.7 (C-7), 101.4 (C-8), 155.4 (C-8a), 65.2 (C-1'), 119.2 (C-2'), 141.5 (C-3'), 41.4 (C-4'), 122.2 (C-5'), 140.6 (C-6'), 68.8 (C-7'), 30.1 (C-8'), 16.5 (3'-CH₃), 30.1 (7'-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为 7-[(E)-7'-羟基-3',7'-二甲基-2',5'-二烯]-香豆素。

化合物 **5**: 黄色粉末; ESI-MS m/z 185.1 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.16 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 7.90 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.49 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.75 (1H, dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz, H-6), 6.67 (1H, d, $J = 0.8$ Hz, H-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.9 (C-2), 113.3 (C-3), 144.5 (C-4), 111.0 (C-4a), 129.6 (C-5), 111.0 (C-6), 160.5 (C-7), 102.2 (C-8), 155.6 (C-8a)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为 7-羟基香豆素。

化合物 **6**: 白色粉末; ESI-MS m/z 306.2 $[M-H]^-$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.59 (1H, brs, H-4), 8.23 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.22 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-6), 7.44 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.55 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 3.28 (1H, dd, $J = 16.0, 3.0$ Hz, H-1'a), 3.16 (1H, dd, $J = 16.4, 10.8$ Hz, H-1'b), 5.05 (1H, overlapped, H-2'), 5.15 (1H, s, H-4'a), 5.03 (1H, s, H-4'b), 1.86 (3H, s, H-5'), 3.95 (3H, s, 1-OCH₃), 11.84 (1H, brs, NH); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6)

δ : 140.7 (C-1), 136.2 (C-1a), 116.0 (C-2), 127.6 (C-3), 119.0 (C-4), 123.5 (C-4a), 120.8 (C-5), 122.9 (C-5a), 119.9 (C-6), 126.6 (C-7), 111.7 (C-8), 140.6 (C-8a), 26.1 (C-1'), 80.0 (C-2'), 142.6 (C-3'), 113.4 (C-4'), 18.3 (C-5'), 60.9 (1-OCH₃), 165.4 (3-C=O)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **6** 为 claulamine A。

化合物 **7**: 白色粉末; ESI-MS m/z 252.0 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.05 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 7.46 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-3), 7.75 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 7.37 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-6), 7.16 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-7), 4.43 (3H, s, 4-OCH₃), 3.94 (3H, s, 8-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 144.6 (C-2), 105.3 (C-3), 103.5 (C-3a), 156.2 (C-4), 113.5 (C-5), 123.6 (C-6), 108.4 (C-7), 154.3 (C-8), 162.6 (C-9a), 59.4 (4-OCH₃), 55.6 (8-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **7** 为 γ -崖椒碱。

化合物 **8**: 白色粉末; ESI-MS m/z 385.1 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ : 6.53 (2H, brs, H-2, 2'), 6.60 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-5, 5'), 6.49 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-6, 6'), 2.60 (2H, dd, J = 13.6, 6.8 Hz, H-7a, 7'a), 2.50 (2H, dd, J = 13.6, 8.8 Hz, H-7b, 7'b), 1.84 (2H, m, H-8, 8'), 3.53 (4H, m, H-9a, 9b, 9'a, 9'b), 3.68 (6H, s, 3,3'-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **8** 为开环异落叶松脂素。

化合物 **9**: 白色粉末; ESI-MS m/z 307.0 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.76 (2H, brs, H-2, 6), 6.47 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 6.33 (1H, dt, J = 16.0, 4.8 Hz, H-8), 4.33 (2H, m, H-9), 3.55 (4H, m, H-1', 3'), 3.84 (1H, m, H-2'), 3.77 (6H, s, 3, 5-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 132.3 (C-1), 103.3 (C-2), 152.8 (C-3), 134.8 (C-4), 152.8 (C-5), 103.3 (C-6), 128.3 (C-7), 130.0 (C-8), 61.2 (C-9), 59.8 (C-1'), 83.2 (C-2'), 59.8 (C-3'), 55.8 (3, 5-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **9** 为 2-{4-[(1*E*)-3-hydroxyprop-1-en-1-yl]-2,6-dimethoxyphenoxy}propane-1,3-diol。

化合物 **10**: 白色粉末; ESI-MS m/z 277.0 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.02 (1H, brs, H-2), 6.88 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.97 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6), 6.45 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 6.24 (1H, dt, J = 15.6, 5.2 Hz, H-8), 4.71 (2H, t, J = 5.6 Hz,

H-9), 3.55 (4H, m, H-1', 3'), 4.14 (1H, m, H-2'), 3.76 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 130.2 (C-1), 109.6 (C-2), 149.6 (C-3), 146.8 (C-4), 115.5 (C-5), 118.8 (C-6), 128.3 (C-7), 128.5 (C-8), 61.4 (C-9), 60.0 (C-1'), 80.7 (C-2'), 60.0 (C-3'), 55.3 (3-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **10** 为 2-[4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol。

化合物 **11**: 白色粉末; ESI-MS m/z 337.1 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.25 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-4), 7.08 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-5), 7.51 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-6), 7.62 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-7), 4.89 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-1'), 3.15~3.26 (4H, m, H-2'~5'), 3.69 (1H, dd, J = 11.2, 4.8 Hz, H-6'a), 3.57 (1H, m, H-6'b), 3.79 (3H, s, 1-COOCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.2 (C-1), 121.0 (C-2), 155.9 (C-3), 116.1 (C-4), 133.1 (C-5), 121.4 (C-6), 130.1 (C-7), 100.7 (C-1'), 73.1 (C-2'), 76.3 (C-3'), 69.4 (C-4'), 76.9 (C-5'), 60.4 (C-6'), 51.8 (1-COOCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **11** 为甲基-2-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基苯甲酸。

4 活性筛选

4.1 保肝活性筛选

将 WB-F344 细胞置于 DMEM 培养基 (含 10% 新生牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素, pH 值为 7.2~7.4), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下生长。以培养基将细胞分散, 使成为密度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液, 以每孔 0.1 mL 接种于 96 孔板。将细胞分为 4 组, 即对照组、模型组、实验组和阳性对照组, 24 h 后, 实验组加入待测单体化合物 (**1**~**11**), 阳性对照组加入阳性对照药双环醇, 给药浓度均为 10 μ mol/L, 1 h 后, 除对照组外, 其余各组分别加入 DL-半乳糖胺, 终浓度为 50 mmol/L。继续培养 24 h 后换含有 MTT (0.5 mg/mL) 无血清的培养基, 培养 4 h, 吸取培养液, 加入 DMSO 振荡使溶解, 于 490 nm 下测定吸光度 (A) 值。研究结果显示, 化合物 **5** 和 **7** 对 DL-半乳糖胺诱导的 WB-F344 细胞损伤具有一定的保护活性, 在浓度为 10 μ mol/L 时肝细胞的存活率分别为 49% 和 48%, 与模型组比较差异具有显著性, 结果见表 1。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白基质}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白基质}})$$

4.2 抗炎活性筛选

将 BV2 细胞置于 DMEM-F12 培养基 (含 10%

表1 化合物5和7对DL-半乳糖胺诱导的肝细胞损伤的保护作用

Table 1 Hepatoprotective effects of compounds 5 and 7 against DL-galactosamine-induced toxicity in WB-F344 cells

组别	A值	细胞存活率/%
对照	1.484±0.138	100
模型	0.522±0.095	33 ^{###}
双环醇	0.902±0.084	59 ^{***}
5	0.750±0.131	49 [*]
7	0.740±0.015	48 [*]

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{***} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

新生牛血清), 在 37 °C、5% CO₂、100%相对湿度下生长。将其接种到 96 孔板中 (2×10⁴ 个/孔), 并分为 4 组, 即对照组、模型组、实验组和阳性对照组, 24 h 后, 实验组加入不同浓度的受试化合物(1~11), 阳性对照组加入不同浓度的阳性药姜黄素 (10.0、1.0、0.1 μmol/L, 每个浓度 3 个平行孔), 1 h 后, 除对照组外, 其余各组分别加入 LPS (终质量浓度为 300 ng/mL), 继续培养 24 h, 收集培养基上清 100 μL, 加入等体积 Griess 试剂, 室温静置 20 min, 蒸馏水调零, 于酶标仪上测定 540 nm 处 A 值, 以所测样品中 NO₂⁻ 的浓度来反映 NO 的浓度。结果显示, 化合物 11 对 LPS 诱导的 BV2 细胞释放 NO 具有较好的抑制活性, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 8.5 μmol/L, 其他化合物的 IC₅₀ 值均大于 10 μmol/L, 阳性对照姜黄素的 IC₅₀ 值为 0.5 μmol/L。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1976: 790.
- [2] Xia H M, Li C J, Yang J Z, et al. A, D-seco-limonoids from the stems of *Clausena emarginata* [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(4): 784-791.
- [3] Xia H M, Li C J, Yang J Z, et al. Anti-inflammatory amide alkaloids from the stems of *Clausena emarginata*

[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(10): 971-975.

- [4] Xia H M, Yang G Q, Li C J, et al. Clauemarazoles A-G, seven carbazole alkaloids from the stems of *Clausena emarginata* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 103: 83-89.
- [5] Xia H M, Li C J, Yang J Z, et al. Hepatoprotective pyranocoumarins from the stems of *Clausena emarginata* [J]. *Phytochemistry*, 2016, 130: 238-243.
- [6] 夏红旻, 张东明. 小黄皮茎的木脂素类化学成分研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4494-4499.
- [7] Huang S C, Wu P L, Wu T S. Two coumarins from the root bark of *Clausena excavata* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(1): 179-181.
- [8] Ju-Ichi M, Takemura Y, Azuma M, et al. New coumarins from *Citrus hassaku* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(9): 2252-2255.
- [9] 彭文文, 刘欣媛, 曾广智, 等. 小叶臭黄皮的化学成分研究 [J]. *林产化学与工业*, 2016, 36(1): 127-134.
- [10] Rashid M A, Gray A I, Waterman P G, et al. Coumarins from *Phebalium tuberosum* ssp. *megaphyllum* and *Phebalium filifolium* [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(7): 851-858.
- [11] 尹伟, 刘金旗, 张国升. 桂花果实的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(24): 4329-4334.
- [12] Shen D Y, Chao C H, Chan H H, et al. Bioactive constituents of *Clausena lansium* and a method for discrimination of aldose enantiomers [J]. *Phytochemistry*, 2012, 82: 110-117.
- [13] 刘洁, 李创军, 杨敬芝, 等. 黄皮茎枝化学成分研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(1): 32-37.
- [14] 张茂婷, 杨柳, 胡江苗, 等. 茜草地上部分木脂素类成分研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(23): 4856-4859.
- [15] Wu B, Wang J. Phenolic compounds from *Selaginella moellendorffii* [J]. *ChemBiodivers*, 2011, 8(9): 1735-1747.
- [16] Duan W J, Pan S B, Yu Z Y, et al. Studies on chemical constituents of twigs of *Trichosan theskirilowii* Maxim [J]. *Asian J Chem*, 2015, 27(8): 2756-2758.
- [17] Ushiyama M, Furuya T. Glycosylation of phenolic compounds by root culture of *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(11): 3009-3013.

[责任编辑 王文倩]