

白木乌桕中 1 个新的木脂素葡萄糖苷

赵海燕, 王恒山, 梁 东*

广西师范大学化学与药学院 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室, 广西 桂林 541004

摘 要: 目的 研究白木乌桕 *Neoshirakia japonica* 醋酸乙酯提取物中木脂素类化学成分及其抗神经炎症和 DPPH 自由基清除活性。方法 利用多种色谱手段(硅胶、Sephadex LH-20、ODS 和制备型 HPLC 等)对醋酸乙酯提取物的化学成分进行分离纯化,再借助现代波谱手段(紫外、红外、核磁、质谱、圆二色谱)和化学方法对其进行结构鉴定,采用脂多糖(LPS)刺激的 BV-2 小胶质细胞释放 NO 模型分析化合物对 NO 产生的抑制作用,评价其潜在的抗神经炎症活性;另外以维生素 C(Vc)作为阳性对照分析化合物对 DPPH 自由基的清除能力。结果 首次从白木乌桕醋酸乙酯提取物中分离得到 2 个木脂素葡萄糖苷类化合物,分别鉴定为 (-)-松脂醇 4-O-[6-O-(E)-咖啡酰基]-β-D-吡喃葡萄糖苷(1)和 (+)-松脂醇 4-O-[6-O-(E)-咖啡酰基]-β-D-吡喃葡萄糖苷(2);DPPH 自由基清除活性实验结果显示,化合物 2 对 DPPH 自由基清除的半数抑制浓度(IC₅₀)为 38.1 μmol/L。结论 化合物 1 为新化合物,命名为白木乌桕糖苷 A。与阳性对照 Vc 相比,化合物 2 对 DPPH 自由基有一定的清除能力。

关键词: 白木乌桕; 木脂素葡萄糖苷; 抗神经炎症; DPPH 自由基清除能力; 白木乌桕糖苷 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)17-5198-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.17.010

One new lignan glucoside from *Neoshirakia japonica*

ZHAO Hai-yan, WANG Heng-shan, LIANG Dong

State Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, School of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents from the EtOAc extract of *Neoshirakia japonica* and their anti-neuroinflammatory and DPPH-radical scavenging activity. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, ODS column chromatographies, and semi-preparative HPLC, then their structures were elucidated by extensive modern spectroscopic analyses (UV, IR, NMR, HRESIMS, and ECD) and chemical methods. All compounds were evaluated for their anti-neuroinflammatory activities by inhibiting the nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine BV-2 microglial cells and their DPPH-radical scavenging abilities with the positive control vitamin C. **Results** Two lignan glucosides were isolated from the EtOAc extract of *N. japonica* and identified as (-)-pinoresinol 4-O-[6-O-(E)-caffeoyl]-β-D-glucopyranoside (1) and (+)-pinoresinol 4-O-[6-O-(E)-caffeoyl]-β-D-glucopyranoside (2). The results of DPPH-radical scavenging activity showed that the IC₅₀ value of compound 2 was 38.1 μmol/L. **Conclusion** Compound 1 is a new lignan glucoside named as japonicoside A. Compound 2 exhibited moderate DPPH-radical scavenging activity, compared to the positive control Vc (IC₅₀ = 20.7 μmol/L).

Key words: *Neoshirakia japonica* (Siebold & Zuccarini) Esser; lignan glucosides; anti-neuroinflammation; DPPH-radical scavenging ability; japonicoside A

白木乌桕为大戟科乌桕属植物,原拉丁名为《中国植物志》将其修订为 *Neoshirakia japonica* *Sapium japonicum* (Sieb. et Zucc.) Pax et Hoffm., 现 (Siebold & Zuccarini) Esser, 别名白乳木, 为野生油

收稿日期: 2021-07-21

基金项目: 广西八桂青年学者项目; 广西自然科学基金杰出青年项目(2017GXNSFFA198004)

作者简介: 赵海燕(1985—), 女, 博士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: 525032442@qq.com

*通信作者: 梁 东(1983—), 男, 沈阳药科大学 2006 级硕士天然药物化学专业校友, 教授、广西师范大学药用资源化学与药物分子工程
省部共建国家重点实验室主任助理、广西第一批八桂青年学者、广西自然科学基金杰出青年基金获得者, 主要从事天然药物化学研究。
E-mail: liangdongxnu@163.com

脂植物，为灌木或乔木^[1]。其在日本和朝鲜均有生长，在我国主要分布在山东、安徽、江苏、浙江、广东、广西等地，喜生于林中湿润处或溪涧边，因为其比较耐寒，部分在海拔 1700 m 时仍有分布^[1-2]。白木乌柏具有消肿利尿的功效，常用于治疗脑水肿、肺水肿等，其根叶对治疗疲劳过度、腰椎疼痛、膝盖疼痛有良好效果^[3]。目前对乌柏属植物的研究显示该属植物含有多种药理活性较好的萜类、木脂素类、黄酮类、诃子酸等化学成分^[4]。本课题组前期从该植物的茎叶乙醇提取物中分离得到 15 个黄酮糖苷和苯丙素糖苷，其中有 5 个黄酮糖苷显示较好的抗神经炎症活性^[5]。因此，为了进一步研究白木乌柏的化学成分，从中发现活性先导化合物，继续对白木乌柏茎叶的化学成分进行研究，从中分离鉴定了 2 个木脂素葡萄糖苷（图 1）。并通过紫外（UV）、红外（IR）、质谱、核磁以及圆二色谱（ECD）等波谱手段以及酸水解实验确定了化合物的结构分别为（-）-松脂醇 4-*O*-[6-*O*-(*E*)-咖啡酰基]- β -D-吡喃葡萄糖苷 {(-)-pinoresinol 4-*O*-[6-*O*-(*E*)-caffeoyl]- β -D-glucopyranoside, **1**} 和 (+)-松脂醇 4-*O*-[6-*O*-(*E*)-咖啡酰基]- β -D-吡喃葡萄糖苷 {(+)-pinoresinol 4-*O*-[6-*O*-(*E*)-caffeoyl]- β -D-glucopyranoside, **2**}，其中化合物 **1** 为新化合物，命名为 japonicoside A。采用脂多糖（LPS）刺激的 BV-2 小胶质细胞产生 NO 模型分析了化合物对 NO 释放的抑制效果，评价其潜在的抗神经炎症活性；同时分析了化合物对 DPPH 自由基的清除活性，发现与阳性对照维生素 C（Vc）相比化合物 **2** 对 DPPH 自由基具有一定的清除能力。

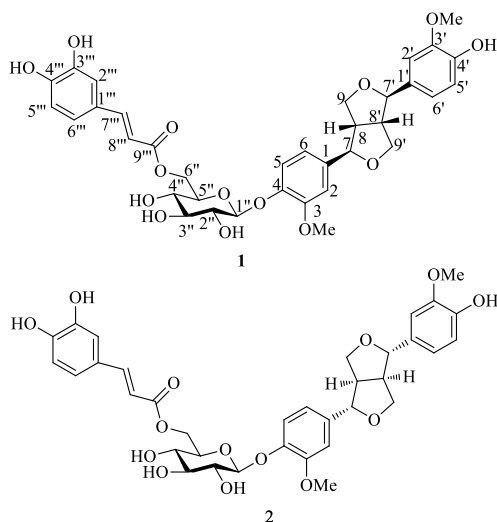


图 1 化合物 1 和 2 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1 and 2

1 仪器与材料

Agilent 6545 Q-TOF LC-MS 高分辨质谱仪（美国 Agilent 公司）；Bruker AVANCE 600 MHz 核磁共振仪（Bruker BioSpin AGFacilities 公司）；Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪配有 SPD-M20A 紫外检测器及 SIL-20A 自动进样器（Shimadzu 公司）；P3000 高效液相色谱仪配有 UV3000 检测器（北京创新通恒科技有限公司）；JASCO 圆二色光谱仪（JASCO 公司）；柱色谱硅胶（200~300 目）及薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 购自青岛海洋化工厂；葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 购自瑞典 Pharmacia Biotech 公司；反相柱色谱硅胶 RP₁₈（50 μm）、YMC ODS C₁₈ 色谱柱（250 mm×20 mm, 5 μm）和小孔树脂（MCI）CHP20（75~150 μm）分别购自日本的 YMC 公司和 Mitsubishi 公司；色谱纯试剂购自美国 Tedia 和 Fisher 公司；分析纯试剂购自西陇化工股份有限公司。

样品于 2019 年 4 月采集于广西桂林，由广西师范大学生命科学学院唐绍清教授鉴定为白木乌柏 *N. japonica* (Siebold & Zuccarini) Esser, 标本(NJ-201904) 保存于广西师范大学西南民族药协同创新中心。

2 提取与分离

白木乌柏干燥茎叶（20.5 kg）清除净杂质后，用 90%乙醇 70 °C 加热回流提取 4 次（100 L/次），每次 3 h。将 4 次提取液合并后减压浓缩得到乙醇总浸膏（2.5 kg）。将以上浸膏加水混溶，再依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇分别萃取，得到石油醚、醋酸乙酯、正丁醇和水 4 个部位。

取醋酸乙酯萃取部位（1.1 kg）过大孔树脂柱，以 30%、50%、80%、95%乙醇作为流动相进行梯度洗脱，得到 4 个组分 NJ. A~D。取 NJ. C（121.0 g）过 MCI 柱，以 30%~100%甲醇作为流动相，得到共 7 个组分 NJ. C. M1~C. M7。

将组分 NJ. C. M6（20.8 g）过硅胶（200~300 目）柱色谱，以二氯甲烷-甲醇（100:1~1:1）作为流动相，得到 NJ. C. M6. G1~C. M6. G6。

将组分 NJ. C. M6. G5（353.2 mg）过 ODS 柱，以 30%~100%甲醇作为流动相，共得到 7 个组分 NJ. C. M6. G5. O1~M6. G5. O7。

将组分 NJ. C. M6. G5. O2（25.0 mg）经半制备 HPLC 分离（乙腈-水 23:77, 6 mL/min），得到化合物 **2**（4.2 mg, *t_R*=69.0 min）和 **1**（2.1 mg, *t_R*=73.6 min）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：无色油状物， $[\alpha]_D^{20}$ -46.2° (*c* 0.07,

MeOH); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 230 (4.15), 282 (3.87), 331 (3.92); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3455, 2936, 2864, 1638, 1385。根据高分辨质谱中的准分子离子峰 m/z 705.215 6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 705.215 4, $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_{14}\text{Na}$) 和 ^{13}C -NMR 数据, 确定化合物 1 的分子式为 $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_{14}$,

不饱和度为 17。 ^1H -NMR 数据 (表 1) 显示存在 9 个芳香质子信号 δ_{H} 6.73~7.08; 2 个反式取代双键氢信号 δ_{H} 7.57 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7''), 6.27 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8''); 2 个甲氧基 δ_{H} 3.87 (3H, s, 3'-OMe), 3.86 (3H, s, 3-OMe); 1 个 β -糖片段的端基

表 1 化合物 1 和 2 的氢谱和碳谱数据 (600/150 MHz, MeOH- d_4)Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR data of compounds 1 and 2 (600/150 MHz, MeOH- d_4)

碳位	1		2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	137.6		137.2	
2	111.6	6.99 (d, $J = 1.2$ Hz)	111.6	6.97 (d, $J = 1.8$ Hz)
3	151.0		150.7	
4	147.3		147.3	
5	118.6	7.08 (d, $J = 8.4$ Hz)	117.8	7.05 (d, $J = 8.4$ Hz)
6	119.7	6.73 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz)	119.6	6.70 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz)
7	86.9	4.62 (d, $J = 5.4$ Hz)	86.8	4.59 (d, $J = 5.4$ Hz)
8	55.4	2.95 (m)	55.3	2.88 (m)
9	72.7	4.13 (dd, $J = 9.0, 7.2$ Hz) 3.72 (dd, $J = 9.0, 4.2$ Hz)	72.6	4.13 (dd, $J = 9.0, 7.2$ Hz) 3.73 (dd, $J = 9.0, 4.8$ Hz)
1'	133.6		133.6	
2'	111.0	6.94 (d, $J = 1.2$ Hz)	111.0	6.94 (d, $J = 1.8$ Hz)
3'	149.1		149.1	
4'	147.2		147.1	
5'	116.1	6.77 (d, $J = 8.4$ Hz)	116.1	6.78 (overlapped)
6'	120.1	6.78 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz)	120.2	6.78 (overlapped)
7'	87.5	4.64 (d, $J = 6.0$ Hz)	87.6	4.63 (d, $J = 6.0$ Hz)
8'	55.4	3.01 (m)	55.5	2.97 (m)
9'	72.5	4.11 (dd, $J = 9.0, 7.2$ Hz), 3.79 (dd, $J = 9.0, 4.2$ Hz)	72.4	4.07 (dd, $J = 9.0, 6.6$ Hz), 3.78 (dd, $J = 9.0, 4.2$ Hz)
1''	102.9	4.83 (d, $J = 7.8$ Hz)	102.4	4.85 (d, $J = 7.8$ Hz)
2''	74.9	3.52 (dd, $J = 9.0, 7.8$ Hz)	74.8	3.53 (dd, $J = 9.0, 7.8$ Hz)
3''	77.8	3.48 (t, $J = 9.0$ Hz)	77.9	3.49 (dd, $J = 9.0, 8.4$ Hz)
4''	72.1	3.38 (t, $J = 9.0$ Hz)	72.2	3.38 (dd, $J = 9.0, 8.4$ Hz)
5''	75.6	3.68 (m)	75.5	3.71 (m)
6''	64.6	4.47 (dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz) 4.40 (dd, $J = 12.0, 7.2$ Hz)	64.6	4.49 (dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz) 4.39 (dd, $J = 12.0, 7.8$ Hz)
1'''	127.7		127.7	
2'''	115.2	7.07 (d, $J = 1.8$ Hz)	115.2	7.07 (d, $J = 1.8$ Hz)
3'''	149.8		149.8	
4'''	147.0		147.0	
5'''	116.6	6.81 (d, $J = 8.4$ Hz)	116.6	6.81 (d, $J = 8.4$ Hz)
6'''	123.0	6.97 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz)	123.1	6.95 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz)
7'''	147.1	7.57 (d, $J = 15.6$ Hz)	147.1	7.55 (d, $J = 15.6$ Hz)
8'''	115.0	6.27 (d, $J = 15.6$ Hz)	115.1	6.28 (d, $J = 15.6$ Hz)
9'''	168.8		168.8	
3-OMe	56.4	3.86 (s)	56.4	3.85 (s)
3'-OMe	56.7	3.87 (s)	56.7	3.87 (s)

质子信号 δ_{H} 4.83 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''). ^{13}C -NMR 数据 (表 1) 显示 35 个碳信号, 其中包括 1 个酯羰基碳信号 δ_{C} 168.8, 20 个芳香或烯烃碳信号 δ_{C} 110.0~151.0, 2 个甲氧基碳信号 δ_{C} 56.7, 56.4, 12 个脂肪碳信号 δ_{C} 55.4~102.9。通过以上的 ^1H 和 ^{13}C -NMR 数据分析, 发现其与化合物 2 的核磁数据非常相似 (表 1), 故推测化合物 1 也是 1 个连有咖啡酰基片段的木脂素葡萄糖苷类化合物。

进一步分析该化合物的 2D-NMR 数据, 可以发现 H-1''/H-2'', H-2''/H-3'', H-3''/H-4'', H-4''/H-5'', H-5''/H-6'' 的 ^1H - ^1H COSY 相关信号 (图 2), 结合 1

组较大的偶合常数 $^3J_{1'',2''}$ (7.8 Hz)、 $^3J_{2'',3''}$ (9.0 Hz)、 $^3J_{3'',4''}$ (9.0 Hz)、 $^3J_{4'',5''}$ (9.0 Hz) 可以确定 12 个脂肪碳中的 6 个为 β -葡萄糖片段 (a) 的碳信号。随后分析化合物 1 的 HMBC 谱, 首先可以得到除糖片段以外的如图 2 所示的 b、c、d 这 3 组 C6-C3 结构片段。其次根据 H₂-6''/C-9''、H-1''/C-4 这 2 个关键的 HMBC 相关信号, 可以确定 a、b、d 存在如图所示的连接方式。最后根据 H-8/8' 的 ^1H - ^1H COSY 相关, 以及 H₂-9/C-7、H₂-9/C-7' 的 HMBC 相关, 结合分子式可以确定结构片段 b 和 c 之间是通过 7-O-9' 和 9-O-7' 连接的, 从而确定了化合物的平面结构。

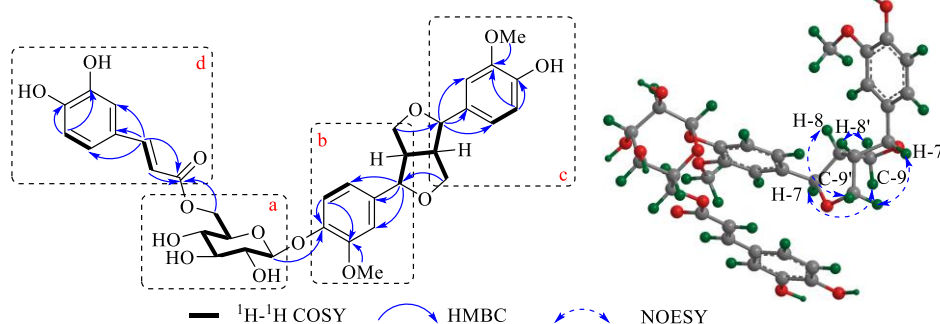


图 2 化合物 1 的关键 ^1H - ^1H COSY、HMBC 和 NOESY 相关

Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY, HMBC and NOESY correlations of compound 1

通过与类似化合物 H-7/H-7'、H-8/H-8'、C-8/C-8' 的核磁数据, 以及 $^3J_{7,8}$ 和 $^3J_{7',8'}$ 的偶合常数对比, 推测此化合物木脂素片段的相对构型与 pinoresinol 和化合物 2 相同^[6-7]。取化合物 1.0 mg, 加入 8% 的盐酸 1 mL, 在 80 °C 条件下水解 6 h, 水解液用醋酸乙酯萃取得到苷元和连有咖啡酰基的葡萄糖片段, 连有咖啡酰基片段的糖部分的旋光为正值, 从而确定化合物中的糖为 β -D-葡萄糖^[5,8]。同时测定了水解后化合物 1 和 2 苷元的 ECD 曲线 (图 3), 从图中可知在 238 nm 处为正值 (+5.07), 277 nm 处为负值 (-3.19), 从而确定其绝对构型为 7R, 7'R, 8S, 8'S-1^[6]。最后结合化合物 1 及水解后得到苷元的负旋光值将其鉴定为 (-)-松脂醇 4-O-[6-O-(E)-咖啡酰基]- β -D-吡喃葡萄糖苷, 并命名为 japonicoside A。

化合物 2: 无色油状物, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +28.8^\circ$ (c 0.06, MeOH)。 ^1H -和 ^{13}C -NMR 数据见表 1。从 1D NMR 数据可以看出化合物 2 具有与化合物 1 极其相似的核磁数据, 对比呋喃环上的碳氢化学位移和偶合常数, 推测其与化合物 1 具有相同的相对构型。通过分析化合物 2 水解后苷元的旋光值是正值, ECD 曲线在 238 nm 处为负 (-5.03) 和 277 nm 处为正

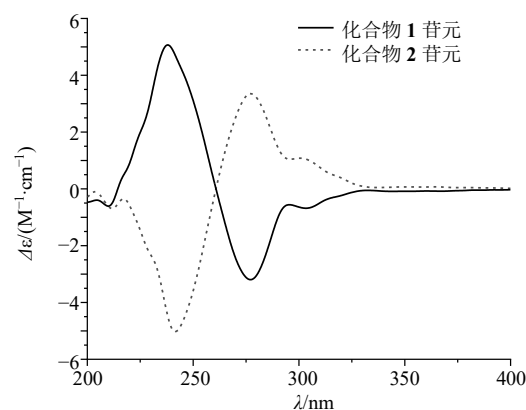


图 3 化合物 1 和 2 苷元的 ECD 谱图

Fig. 3 Experimental ECD spectra of aglycones of compounds 1 and 2

值 (+3.36) (图 3), 说明 2 个化合物在木脂素部分的绝对构型恰好相反。化合物 2 的 NMR、旋光值与文献报道的基本一致^[7], 故鉴定化合物 2 为 (+)-松脂醇 4-O-[6-O-(E)-咖啡酰基]- β -D-吡喃葡萄糖苷。

4 生物活性研究

4.1 对 NO 产生的抑制活性

LPS 可以刺激 BV-2 小胶质细胞释放 NO、促炎

细胞因子和活性氧等^[9]。本实验采用 Griess 法检测化合物对 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞释放 NO 的影响^[10], 并用 MTT 法检测化合物对 BV-2 小胶质细胞存活率的影响^[11]。实验结果表明与阳性对照米诺环素 ($IC_{50}=15.6 \mu\text{mol/L}$) 相比, 化合物 **1** 和 **2** 对 NO 释放的抑制作用均不明显, IC_{50} 值大于 $50 \mu\text{mol/L}$ 。

4.2 DPPH 自由基清除活性

DPPH 作为一种人工合成的商业自由基被广泛用在抗氧化分析模型中, 本实验在评价化合物对 DPPH 自由基清除能力时以 Vc 作为阳性对照^[12-13]。结果表明在相同的测试条件下, 当 Vc 对 DPPH 自由基清除率 IC_{50} 为 $20.7 \mu\text{mol/L}$ 时, 化合物 **2** 对 DPPH 自由基有相对较好的清除活性 ($IC_{50}=38.1 \mu\text{mol/L}$), 而化合物 **1** 对 DPPH 自由基的清除能力较弱 ($IC_{50}>100 \mu\text{mol/L}$)。初步推测此类化合物中 7S, 7'S, 8R, 8'R-**2** 构型较 7R, 7'R, 8S, 8'S-**1** 构型的分子空间排列更容易与自由基的孤对电子配对, 从而影响其对自由基的清除活性。

5 讨论

本实验对白木乌柏中的木脂素类化合物进行了研究, 得到的 2 个木脂素糖苷都是首次从该植物中发现, 其中化合物 **1** 是新化合物。在对 2 个化合物的生物活性评价实验中发现, 虽然化合物 **1** 和 **2** 没有明显的抗神经炎症活性, 但是化合物 **2** 对 DPPH 自由基有一定的清除能力。本研究不但丰富了白木乌柏的化学成分结构类型, 而且对其进一步开发和利用提供了一定的基础理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 21.
- [2] 张克迪. 山柃、白木乌柏育苗、嫁接试验初报 [J]. 浙江林业科技, 1981, 1(4): 162-164.
- [3] Lai X Z, Yang Y B, Shan X L. The investigation of euphorbiaceous medicinal plants in Southern China [J].

Econ Bot, 2004, 58(S1): S307-S320.

- [4] Al Muqarrabun L M, Ahmat N, Aris S R. A review of the medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Sapium* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 9-20.
- [5] Zhao H Y, Wang Y Q, Li Y C, et al. Flavonol glycosides and phenylpropanoid glycosides with inhibitory effects on microglial nitric oxide production from *Neoshirakia japonica* [J]. *Fitoterapia*, 2021, 151: 104877.
- [6] Xiong L, Zhu C G, Li Y R, et al. Lignans and neolignans from *Sinocalamus affinis* and their absolute configurations [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(5): 1188-1200.
- [7] Nagatani Y, Warashina T, Noro T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. II [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2002, 50(5): 583-589.
- [8] Zhang L, Gao H Y, Baba M, et al. Extracts and compounds with anti-diabetic complications and anti-cancer activity from *Castanea mollissima* Blume (Chinese chestnut) [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 422.
- [9] Bi X L, Yang J Y, Dong Y X, et al. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(1): 185-193.
- [10] Zhang Y L, Pan Q M, Liao H B, et al. Coumarinolignoids and lignanoids from the stems and leaves of *Sapium discolor* [J]. *Fitoterapia*, 2019, 133: 17-22.
- [11] Li J, Li N, Li X, et al. Characteristic α -acid derivatives from *Humulus lupulus* with antineuroinflammatory activities [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(12): 3081-3092.
- [12] Zhang Z S, Wang X M, Zhang J J, et al. Potential antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides extracted from ginger (*Zingiber officinale*) [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(2): 448-452.
- [13] Yang Z N, Su B J, Wang Y Q, et al. Isolation, absolute configuration, and biological activities of chebulic acid and brevifolincarboxylic acid derivatives from *Euphorbia hirta* [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(4): 985-995.

[责任编辑 王文倩]