

黑柳树皮化学成分及其抑制脂肪生成活性研究

刘欢, 甲次拉母, 蒲沙龙, 张吉仲, 李丽梅*

西南民族大学药学院 四川 成都 610041

摘要: 目的 研究黑柳 *Salix nigra* 树皮的化学成分, 并对部分化合物进行抑制脂肪生成活性研究。方法 采用多种色谱分离技术进行分离和纯化, 并运用核磁共振波谱技术鉴定其结构。以秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 为实验模型, 利用油红 O 和苏丹黑 B 染色, 研究从黑柳树皮中分离到的部分化合物对秀丽隐杆线虫脂肪生成的影响。结果 从黑柳树皮甲醇提取物的正丁醇萃取部位中共分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为柳皮苷(1)、特里杨苷(2)、7-水杨酰-2'-苯甲酰水杨苷(3)、cochinchiside A(4)、2'-苯甲酰水杨苷(5)、胡萝卜苷(6)、rosin(7)、水杨苷(8)、chalcononaringenin-2'-O- β -D-glucopyranoside(9)、3,4-二羟基苯甲酸(10)、苯甲酸(11)和水杨酸(12)。其中化合物 1、2、5 和 9 能够显著抑制秀丽隐杆线虫脂肪生成。结论 12 个化合物均为首次从黑柳中分离得到。化合物 5 对秀丽隐杆线虫脂肪生成的抑制作用最强。

关键词: 黑柳; 秀丽隐杆线虫; 抑制脂肪生成活性; 柳皮苷; 特里杨苷; 2'-苯甲酰水杨苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4111-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.004

Chemical constituents from barks of *Salix nigra* and its anti-adipogenic activity

LIU Huan, JIACI Lamu, PU Sha-long, ZHANG Ji-zhong, LI Li-mei

College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To study the chemical composition from the barks of *Salix nigra* Marshall and its anti-adipogenic activity. **Methods** The chemical constituents from the barks of *S. nigra* were isolated by chromatographic methods and the structures of the isolated compounds were elucidated on the basis of NMR spectroscopic analyses. The anti-adipogenic activity of some compounds was evaluated in *Caenorhabditis elegans* by oil red O and Sudan black B staining methods. **Results** A total of 12 compounds were isolated from barks of *S. nigra* and identified as salicortin (1), tremulacin (2), salicylyltremuloidin (3), cochinchiside A (4), tremuloidin (5), daucosterol (6), rosin (7), salicin (8), chalcononaringenin-2'-O- β -D-glucopyranoside (9), 3,4-dihydroxybenzoic acid (10), benzoic acid (11), and salicylic acid (12), respectively. Among them, compounds 1, 2, 5 and 9 could significantly reduce adipose accumulation in *C. elegans*. **Conclusion** All twelve compounds were isolated from *S. nigra* for the first time. Compound 5 exhibited the strongest effect to reduce adipose accumulation in *C. elegans*.

Key words: *Salix nigra* Marshall; *Caenorhabditis elegans*; anti-adipogenic activity; salicortin; tremulacin; tremuloidin

杨柳科柳属 *Salix* L. 植物资源丰富, 全球约有 520 种, 主要分布于北半球温带及寒带地区, 极少数分布在亚热带和南半球地区; 我国有 257 种、122 变种、33 变型, 在各省均有分布^[1]。其树皮、枝、叶、花等部位均可入药, 具有悠久的药用历史。19 世纪 40 年代, 化学家首次从柳树皮中分离出水杨酸并发现其具有显著的解热和镇痛作用, 后来以之为先导化合物诞生了医药史上的经典药物——阿司匹

林, 至今仍是世界上应用最广泛的解热、镇痛和抗炎药^[2]。后续的研究表明柳属植物主要含有黄酮类、水杨酸衍生物类、苯丙素类等酚性成分, 具有抗肿瘤、镇痛抗炎、抗氧化、降血糖、调节神经系统等药理作用^[3]。其中酚类成分的减肥作用受到研究者的持续关注, 例如 Han 等^[4-5]研究证实旱柳 *Salix matsudana* Koidz 叶中的多酚组分具有减肥作用; 刘可越等^[6]发现垂柳 *Salix babylonica* L. 叶中木犀草素

收稿日期: 2023-01-09

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目 (S202210656135)

作者简介: 刘欢, 本科生。E-mail: 1115935565@qq.com

*通信作者: 李丽梅, 教授, 研究方向为中药与民族药研究与开发。E-mail: limeili@swun.edu.cn

等黄酮类化合物能够促进去甲肾上腺素分解脂肪,抑制小肠吸收脂肪酸; Lee 等^[7]从朝鲜垂柳 *Salix pseudo-lasiogyne* Lévl. 树枝中发现柳皮苷衍生物,该类成分可通过调节 C/EBP α 和 SREBP1c 通路,显著减少脂质积累,抑制前脂肪细胞 3T3-L1 分化。因此,富含酚类成分的柳属植物可能是发现减肥药物的源泉之一。

黑柳 *Salix nigra* Marshall (black willow) 别名北美黑柳、沼泽柳、西南黑柳、海湾黑柳、镰叶柳,原产北美洲,用于治疗咳嗽、痢疾、风湿、关节炎和痛风等^[8]。现代药理学研究表明黑柳醇提取物具有抗炎、抗菌活性。Verma 等^[9]证实黑柳甲醇提取物具有抗炎活性;此外,Sharma 等^[10]发现黑柳甲醇提取物还可以通过抑制前炎症因子和氧化压缓解胶原诱导的关节炎症状;Tahir 等^[11]报道黑柳乙醇提取物具有抗革兰阳性菌和革兰阴性菌活性。然而,暂未见黑柳树皮化学成分及其抑制脂肪生成活性方面的相关报道。因此,本研究采用多种现代色谱和波谱方法对黑柳树皮化学成分进行分离纯化和结构鉴定,并以秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 为实验模型,利用油红 O 和苏丹黑 B 染色,探究分离得到的部分化合物抑制脂肪生成活性,以期黑柳化学成分研究及减肥药物研发提供参考。从黑柳树皮 70% 甲醇提取物中分离鉴定 12 个化合物,分别为柳皮苷 (salicortin, **1**)、特里杨苷 (tremulacin, **2**)、7-水杨酰-2'-苯甲酰水杨苷 (salicyloyltremuloidin, **3**)、cochinchiside A (**4**)、2'-苯甲酰水杨苷 (tremuloidin, **5**)、胡萝卜苷 (daucosterol, **6**)、rosin (**7**)、水杨苷 (salicin, **8**)、chalcononaringenin-2'-O- β -D-glucopyranoside (**9**)、3,4-二羟基苯甲酸 (3,4-dihydroxybenzoic acid, **10**)、苯甲酸 (benzoic acid, **11**) 和水杨酸 (salicylic acid, **12**)。12 个化合物均为首次从黑柳中分离得到;其中化合物 **1**、**2**、**5** 和 **9** 具有显著抑制秀丽隐杆线虫脂肪生成的作用,化合物 **5** 的作用最强。

1. 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

ME204E 型电子天平 (德国 Mettler Toledo 公司); 半制备色谱柱 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, 日本 YMC 公司; 250 mm $\times$ 21.2 mm, 10 μ m, 苏州纳微生物科技有限公司); LC-P100 型高效液相色谱仪 (上海伍丰科学仪器有限公司); AVANCE III-400 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Leica DM750 型

显微镜 (德国 Leica 公司); LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安公司); DH-600 型电热恒温培养箱 (北京中兴伟业仪器有限公司); ZHWY-211B、ZHWY-2102C 型恒温培养振荡器 (上海智诚分析仪器制造有限公司); H1650-W 型离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

柱色谱硅胶 (80~100、200~300 目)、薄层硅胶板 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB); 反相硅胶 (苏州纳微生物科技有限公司); 油红 O 和苏丹黑 B (美国阿拉丁工业公司); 其余试剂均为国产分析纯。奥利司他 (浙江海正药业股份有限公司; 规格: 0.12 g/片)。

1.2 材料

黑柳树皮药材购于成都健腾生物技术有限公司,由西南民族大学药学院任艳副教授鉴定为杨柳科柳属植物黑柳 *S. nigra* Marshall 的干燥树皮,标本保存在药学院中药标本室;秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 和大肠杆菌 OP50 (*Escherichia coli* OP50) 来源于中国科学院成都生物研究所应用与环境微生物中心。

2. 方法

2.1 提取与分离

取干燥的黑柳树皮药材 20 kg, 粉碎后,用 70% 甲醇-水提取 3 次,滤过,浓缩,随后加水使其成悬浊液,用正丁醇萃取得总浸膏 (100.5 g)。总浸膏用纯水溶解后,进行反相柱色谱,分别以 40% 甲醇-水和 60% 甲醇-水进行洗脱,得 40% 甲醇-水 (A, 10.5 g)、60% 甲醇-水 (B, 15.3 g) 2 个组分。

40% 甲醇-水组分 (A, 10.5 g), 用正相硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离,以二氯乙烷-丙酮 (25:1、15:1、10:1、5:1、3:1) 洗脱,共得 5 个组分 A1~A5。化合物 **6** (3 mg) 从 A2 (8 mg) 的甲醇溶液中以白色松软固体析出; A3 (3 g) 经半制备液相色谱 (12% 乙腈-水, 30 mL/min) 分离得到化合物 **8** (1.1 g, t_R =6 min) 和 **10** (15 mg, t_R =24 min); A4 (1.2 g) 进行 Sephadex LH-20 柱色谱,以二氯乙烷-甲醇 (1:1) 洗脱,分得 3 个组分 A3-1~A3-3,其中 A3-3 (300 mg) 经半制备液相色谱分离 (15 mL/min),得化合物 **9** (22 mg, t_R =16 min); A5 (3 g) 用正相硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离,以石油醚-丙酮 (2:1) 混合溶剂洗脱,得 A5-1 (2.4 g), A5-1 经半制备液相色谱 (22% 乙腈-水, 30 mL/min) 分离得到 A5-1-1 (0.65 g, t_R =9.5 min) 和化合物

7 (9 mg, $t_R=13$ min), A5-1-1 再进行 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇-水 (1:1) 洗脱, 得到化合物 **1** (0.61 g)。

60%甲醇-水组分 (B, 15.3 g), 经半制备液相色谱 (60%甲醇-水, 50 mL/min) 分离得到 6 个组分 B1~B6。B1 (2.2 g) 经半制备液相色谱 (30%乙醇-水, 30 mL/min) 分离得 B1-1 (1 g, $t_R=5$ min), B1-1 用正相硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 依次以二氯乙烷-丙酮 (10:1、3:1) 洗脱, 得化合物 **11** (12 mg)、**4** (61.6 mg) 和 **5** (130 mg); B6 (2.9 g) 用正相硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 分别以二氯乙烷-丙酮 (25:1、15:1、3:1) 混合溶剂洗脱, 得 B6-1~B6-3, 其中 B6-1 的甲醇溶液中析出化合物 **12** (1.7 g), B6-2 进行 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇-水 (1:1) 为溶剂洗脱, 分离得到化合物 **2** (0.69 g) 和 **3** (8 mg)。

2.2 抑制脂肪生成活性筛选

2.2.1 *C. elegans* 的培养与同期化 将 *C. elegans* 接种于长满 *E. coli* OP50 的线虫生长培养基 (nematode growth medium, NGM) 上, 于 18.5 °C 的恒温培养箱中培养 3~5 d, 约 3 d 转板 1 次, 防止线虫过老或处于饥饿抑制状态, 同时要保证线虫干净^[12]。培养完成后, 选取 50~70 条 *C. elegans* 用 700 μ L M9 缓冲液冲洗转移至 1.5 mL EP 管中, 离心后弃去上清液。用 M9 缓冲液定容至 500 μ L, 加入等体积的现配裂解液, 再次离心弃去上清液。加入 M9 缓冲液, 孵化 12 h, 得 L1 期的 *C. elegans*。离心后, 沉淀转入含有 *E. coli* OP50 的 NGM 培养基上培养 48~72 h, 即可得到 L4 期的 *C. elegans*。

2.2.2 加样培养 预实验结果显示化合物质量浓度为 50 μ g/mL 时抑制 *C. elegans* 体内脂肪生成的作用较强。因此, 设置样品质量浓度为 50 μ g/mL 以测定其对脂肪生成抑制活性。吸取等量配制好的样品溶液和活化后的 *E. coli* OP50 于 EP 管中混合均匀, 均匀涂布于 NGM 培养基上, 置于恒温培养箱 (37 °C) 中, 培养 18 h, 待 NGM 培养基上长满 *E. coli* OP50 后, 将同期化至 L1 期的 *C. elegans* 转移到该培养基上 (为了方便区分, 只接种于 NGM 培养基的半边), 于恒温培养箱 (18.5 °C) 培养 3~5 d 即可进行后续实验。观察样品对 *C. elegans* 脂肪生成的影响, 阳性对照和阴性对照分别为奥利司他和 DMSO。

2.2.3 油红 O 染色 给药 3~5 d 后, 挑选出 50 条 *C. elegans* 至 EP 管中, 在室温下, 加入 500 μ L 4%

多聚甲醛固定, 30 min 后, 迅速转移至 -80 °C 的冷冻箱内冷藏 15 min, 紧接着快速置于水浴锅 (43 °C) 中使之融化, 其后加入 700 μ L M9 缓冲液清洗 *C. elegans*, 并于 1500 r/min 离心 3 min 后弃去上清液, 重复清洗操作 3 次。加入油红 O 染液染色 12 h 后, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 置于显微镜下观察、拍照^[13]。

2.2.4 苏丹黑 B 染色 给药 3~5 d 后, 挑选出 50 条 *C. elegans* 至 EP 管中, 在室温下, 加入 500 μ L 4% 多聚甲醛固定, 30 min 后, 离心弃去上清液, 并依次用 25% 甲醇溶液、50% 甲醇溶液和 70% 甲醇溶液 (500 μ L) 对 *C. elegans* 进行脱水处理 (8~10 min), 每次脱水结束后, 置于 1500 r/min 离心机中离心 3 min, 弃去上清液。脱水处理后用苏丹黑 B 染液染色, 浸润, 待过夜后用 70% 乙醇冲洗, 然后再加入 M9 缓冲液冲洗 3 次, 置于显微镜下观察、拍照^[14]。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形吸湿性粉末, 易溶于甲醇。分子式 $C_{20}H_{24}O_{10}$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.32 (1H, m, H-5), 7.30 (1H, d, $J = 7.52$ Hz, H-3), 7.20 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 7.01 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4), 6.14 (1H, dt, $J = 9.7, 3.8$ Hz, H-11), 5.75 (1H, dt, $J = 9.8, 1.6$ Hz, H-10), 5.37, 5.26 (各 1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-7), 4.92 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 3.88 (1H, dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz, H-6a'), 3.69 (1H, dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, H-6b'), 3.37~3.47 (4H, m, H-2'~5'), 2.89 (1H, m, H-13a), 2.71~2.60 (3H, m, H-12, 13b); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 207.5 (C-14), 171.4 (C-8), 157.0 (C-1), 133.2 (C-10), 131.1 (C-5), 130.7 (C-11), 129.4 (C-3), 125.9 (C-6), 123.4 (C-4), 117.0 (C-2), 102.3 (C-1'), 79.5 (C-9), 78.1 (C-3'), 78.0 (C-5'), 74.9 (C-2'), 71.2 (C-4'), 64.4 (C-7), 62.5 (C-6'), 36.8 (C-13), 27.2 (C-12)。上述数据与文献报基本一致^[15-16], 故鉴定化合物 **1** 为柳皮苷。

化合物 **2**: 白色无定形粉末, 易溶于氯仿。分子式 $C_{27}H_{28}O_{11}$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.00 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-3''', 7'''), 7.51 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-5'''), 7.36 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-4''', 6'''), 7.24 (1H, td, $J = 7.9, 1.4$ Hz, H-5), 7.16 (1H, dd, $J = 7.5, 1.0$ Hz, H-3), 7.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6), 6.98 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4), 6.03 (1H, dt, $J = 9.6, 3.7$ Hz, H-3'), 5.69 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-2'), 5.32 (1H, t, $J = 8.5$ Hz,

H-2''), 5.15 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 5.09, 4.95 (各 1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-7a, 7b), 3.90 (3H, m, H-3''~6''), 3.52 (1H, m, H-5''), 2.94 (1H, dt, $J = 14.7, 8.0$ Hz, H-5'), 2.39~2.66 (3H, m, H-5', 4'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 207.6 (C-6'), 170.0 (C-7'), 166.2 (C-1'''), 156.1 (C-1), 133.5 (C-5'''), 132.1 (C-3'), 130.0 (C-5), 129.9 (C-3''', 7'''), 129.6 (C-2'''), 129.5 (C-3), 128.7 (C-4''', 6'''), 127.6 (C-2), 127.4 (C-2'), 123.2 (C-4), 115.7 (C-6), 99.7 (C-1''), 78.3 (C-1'), 76.1 (C-5''), 75.0 (C-3''), 74.0 (C-2''), 70.1 (C-4''), 63.5 (C-7), 60.9 (C-6''), 35.4 (C-5'), 26.7 (C-4')。上述数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 2 为特里杨苷。

化合物 3: 白色无定形粉末, 微溶于甲醇。分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.43 (1H, s, 10-OH), 7.93 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-2'', 6''), 7.41~7.55 (3H, m, H-12, 14, 4''), 7.40 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3'', 5''), 7.35 (2H, m, H-3, 5), 7.25 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6), 7.04 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4), 6.95 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-11), 6.80 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-13), 5.51 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, 3'-OH), 5.33~5.41 (2H, m, 4'-OH, H-1'), 5.12 (2H, s, H-7), 5.05~5.11 (1H, m, H-2'), 4.74 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, 6'-OH), 3.78 (1H, dd, $J = 9.8, 5.3$ Hz, H-6'), 3.71 (1H, td, $J = 9.2, 5.9$ Hz, H-3'), 3.51~3.59 (2H, m, H-5', 6'), 3.35 (1H, m, H-4'); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 168.7 (C-8), 165.2 (C-7''), 160.4 (C-10), 155.0 (C-1), 135.7 (C-12), 133.0 (C-4''), 130.1 (C-3, 5), 129.7 (C-14), 129.5 (C-1''), 129.3 (C-2'', 6''), 128.5 (C-3'', 5''), 124.0 (C-2), 122.2 (C-4), 119.5 (C-11), 117.3 (C-13), 115.0 (C-6), 112.7 (C-9), 98.5 (C-1'), 77.5 (C-5'), 74.3 (C-2'), 74.0 (C-3'), 70.1 (C-4'), 61.7 (C-7), 60.2 (C-6')。上述数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 3 为 7-水杨酰-2'-苯甲酰水杨苷。

化合物 4: 浅黄色无定形粉末, 微溶于甲醇。分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.95 (2H, dd, $J = 8.2, 1.2$ Hz, H-2''', 6'''), 7.58 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4'''), 7.46 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3''', 5'''), 7.24 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-5), 7.17 (1H, dd, $J = 7.6, 1.3$ Hz, H-3), 7.12 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 6.96 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4), 6.03 (1H, dt, $J = 9.8, 3.8$ Hz, H-3''), 5.66 (1H, dt, $J = 9.8, 1.8$ Hz, H-2''), 5.18 (1H, d, $J = 13.1$ Hz, H-7a), 5.14~5.07 (2H, m, H-7b, 3'), 5.02 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 3.45~3.65 (5H, m, H-2',

4'~6'), 2.46~2.64 (4H, m, H-4'', 5''); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 206.1 (C-6''), 170.1 (C-7''), 165.4 (C-7'''), 154.7 (C-1), 133.1 (C-4'''), 131.7 (C-3''), 130.4 (C-5), 129.5 (C-3, 2''', 6'''), 128.8 (C-1'''), 128.6 (C-3''', 5'''), 128.4 (C-2''), 124.6 (C-2), 122.1 (C-4), 115.1 (C-6), 100.4 (C-1'), 78.5 (C-1''), 77.4 (C-5'), 76.7 (C-3'), 71.5 (C-2'), 67.6 (C-4'), 62.2 (C-7), 60.4 (C-6'), 35.7 (C-5''), 26.0 (C-4')。上述数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 4 为 cochinchiside A。

化合物 5: 白色粉末, 微溶于甲醇。分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_8$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.99 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2'', 6''), 7.65 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4''), 7.52 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-3'', 5''), 7.30 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-3), 7.17 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5), 7.08 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 6.98 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4), 5.49 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, 3'-OH), 5.34 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, 4'-OH), 5.24 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 5.06 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-2'), 4.89 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, 7-OH), 4.71 (1H, t, $J = 5.3$ Hz, 6'-OH), 4.38, 4.11 (各 1H, dd, $J = 15.1, 5.5$ Hz, H-7), 3.76 (1H, dd, $J = 10.3, 5.1$ Hz, H-6'), 3.65~3.72 (1H, m, H-3'), 3.49~3.57 (3H, m, H-6'~4'); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.5 (C-7''), 153.8 (C-1), 133.8 (C-4''), 131.6 (C-2), 130.3 (C-1''), 129.8 (C-2'', 6''), 129.2 (C-3'', 5''), 127.8 (C-5), 126.8 (C-3), 122.4 (C-4), 114.4 (C-6), 98.7 (C-1'), 77.7 (C-5'), 74.7 (C-2'), 74.3 (C-3'), 70.4 (C-4'), 61.0 (C-6'), 57.7 (C-7)。上述数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 5 为 2'-苯甲酰水杨苷。

化合物 6: 白色固体, 微溶于甲醇。分子式 $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.32 (1H, brs, H-6), 4.87 (3H, m, OH), 4.43 (1H, t, $J = 5.7$ Hz, H-3), 4.20 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 2.88~3.63 (m, 5H of glucose), 0.94 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-21), 0.80 (9H, overlapped, H-26, 27, 29), 0.64 (3H, s, H-18)。上述数据与文献报道基本一致^[20], 且与胡萝卜苷对照品对照, 多种展开体系下 TLC 的 R_f 值一致, 故鉴定化合物 6 为胡萝卜苷。

化合物 7: 白色无定形粉末, 易溶于甲醇。分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.40 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-2, 6), 7.28 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-3, 5), 7.20 (1H, m, H-4), 6.67 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.36 (1H, dt, $J = 16.0, 6.1$ Hz, H-8), 4.52 (1H, ddd, $J = 12.8, 5.6, 1.3$ Hz, H-9a), 4.35 (1H, d, $J = 7.8$

Hz, H-1'), 4.31 (1H, ddd, $J = 12.9, 9.6, 1.1$ Hz, H-9b), 3.87 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, H-6a'), 3.66 (1H, dd, $J = 11.9, 5.4$ Hz, H-6b'), 3.20~3.37 (4H, overlapped, H-2'~5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 136.8 (C-1), 132.4 (C-7), 128.2 (C-3, 5), 127.3 (C-4), 126.1 (C-2, 6), 125.3 (C-8), 101.9 (C-1'), 76.7 (C-3'), 76.6 (C-5'), 73.7 (C-2'), 70.3 (C-4'), 69.3 (C-9), 61.4 (C-6'). 上述数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定化合物 7 为 rosin。

化合物 8: 白色针状结晶 (甲醇), 易溶于甲醇。分子式 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_7$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.36 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-3), 7.19 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5), 7.09 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.00 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4), 5.35 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, 4'-OH), 5.09 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, 3'-OH), 5.03 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, 2'-OH), 4.99 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, 7-OH), 4.76 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 4.64 (1H, dd, $J = 14.3, 5.5$ Hz, H-7a), 4.59 (1H, t, $J = 5.7$ Hz, 6'-OH), 4.46 (1H, dd, $J = 14.3, 6.2$ Hz, H-7b), 3.74~3.66 (1H, m, H-6a'), 3.47 (1H, dt, $J = 11.8, 6.0$ Hz, H-6b'), 3.33~3.16 (4H, m, H-2'~5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 155.1 (C-1), 132.4 (C-2), 128.1 (C-5), 127.7 (C-3), 122.5 (C-4), 115.4 (C-6), 101.6 (C-1'), 82.9 (C-5'), 82.3 (C-3'), 73.7 (C-2'), 70.0 (C-4'), 61.0 (C-6'), 58.8 (C-7)。上述数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 8 为水杨苷。

化合物 9: 黄色针状结晶 (甲醇), 易溶于甲醇。分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_8$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.99 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- α), 7.64 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 7.60 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H- β), 6.82 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3, 5), 6.15 (1H, brs, H-5'), 5.94 (1H, brs, H-3'), 5.07 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 3.23~3.71 (6H, m, of glucose); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 191.9 (C=O), 166.1 (C-2'), 164.8 (C-4'), 160.4 (C-4), 160.0 (C-6'), 142.7 (C- β), 130.8 (C-2, 6), 126.3 (C-1), 124.3 (C- α), 116.02 (C-3, 5), 105.3 (C-1'), 100.4 (C-1''), 97.1 (C-3'), 94.9 (C-5'), 77.4 (C-5''), 76.8 (C-3''), 73.7 (C-2''), 69.5 (C-4''), 60.5 (C-6'')。上述数据与文献基本一致^[23], 故鉴定化合物 9 为 chalcononaringenin-2'-O- β -D-glucopyranoside。

化合物 10: 白色粉末, 易溶于甲醇。分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.46 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 7.43 (1H, dd, $J = 7.9, 2.1$ Hz, H-6),

6.82 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.3 (C-7), 151.5 (C-4), 146.0 (C-3), 123.9 (C-1), 123.0 (C-6), 117.7 (C-2), 115.7 (C-5)。上述数据与文献报道基本一致^[24], 故鉴定化合物 10 为 3,4-二羟基苯甲酸。

化合物 11: 白色粉末, 易溶于甲醇。分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.12 (2H, m, H-2, 6), 7.59 (1H, m, H-4), 7.46 (2H, m, H-3, 5); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 172.4 (C-7), 134.0 (C-4), 130.5 (C-2, 6), 129.5 (C-1), 128.5 (C-3, 5)。上述数据与文献报道基本一致^[25], 故鉴定化合物 11 为苯甲酸。

化合物 12: 白色针状结晶 (甲醇), mp 160~161 $^{\circ}\text{C}$ 。在 3 种展开体系中 TLC 行为与水杨酸对照品一致, 且混合熔点不下降。故鉴定为水杨酸。

3.2 抑制脂肪生成活性筛选结果

由于苯乙醇苷类化合物是从黑柳树皮中分离得到的主要成分, 所以本研究选择 3 个代表性化合物即柳皮苷 (1)、特里杨苷 (2) 和 2'-苯甲酰水杨苷 (5) 进行抑制脂肪生成活性筛选, 同时也选择了黄酮类化合物 chalcononaringenin-2'-O- β -D-glucopyranoside (9), 以对比 2 类化合物的抑制脂肪生成活性, 为后续研究提供参考。

3.2.1 油红 O 染色结果 油红 O 染色结果如图 1 所示, 脂肪率根据脂肪颗粒占线虫整体体积的比例确定。实验样品作用于 *C. elegans* 后, 与阴性对照组比较 (脂肪率为 42.05%), *C. elegans* 体内被染色部分明显减少, 线虫体内脂肪率分别降低为柳皮苷 11.77%、特里杨苷 25.23%、2'-苯甲酰水杨苷 11.35% 和 chalcononaringenin-2'-O- β -D-glucopyranoside 15.98%, 说明 4 个化合物对 *C. elegans* 体内脂肪生成均有明显的抑制作用, 其中化合物 1、5 和 9 的活性强于阳性对照 (脂肪率为 21.57%)。

3.2.2 苏丹黑 B 染色结果 苏丹黑 B 对 *C. elegans* 染色结果如图 2 所示, 与阴性对照组相比较 (脂肪率为 26.70%), 可看到 *C. elegans* 体内被染成黑色的脂肪颗粒明显减少, 线虫体内脂肪率分别降低为柳皮苷 13.35%、特里杨苷 14.15%、2'-苯甲酰水杨苷 10.15% 和 chalcononaringenin-2'-O- β -D-glucopyranoside 11.75%, 这表明 4 个化合物对 *C. elegans* 体内脂肪生成均有明显的抑制作用, 且强于阳性对照 (脂肪率为 14.46%)。

4 讨论

本研究从黑柳树皮中分离鉴定了 12 个化学成

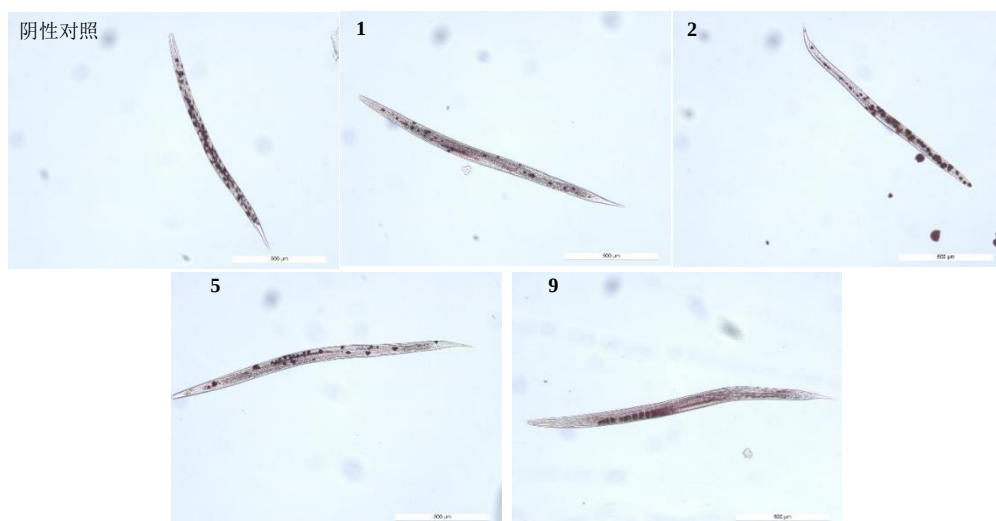


图 1 化合物 1、2、5、9 抑制 *C. elegans* 体内脂肪生成的油红 O 染色结果

Fig. 1 Compounds 1, 2, 5 and 9 reducing adipose accumulation in *C. elegans* by oil red O staining method



图 2 化合物 1、2、5、9 抑制 *C. elegans* 体内脂质累积的苏丹黑 B 染色结果

Fig. 2 Compounds 1, 2, 5 and 9 reducing adipose accumulation in *C. elegans* by Sudan black B staining method

分, 包括 6 个水杨苷类化合物 (化合物 1~5 和 8)、1 个查耳酮类化合物 (化合物 9)、1 个甾体皂苷类化合物 (化合物 6)、1 个苯丙烯醇苷类化合物 (化合物 7) 和 3 个苯甲酸衍生物 (10~12), 所有化合物均为首次从黑柳中分离得到。选择其中 4 个化合物进行了线虫体内抑制脂肪生成活性研究, 油红 O 和苏丹黑 B 2 种染色结果都显示, 4 个化合物样品具有较好的抑制 *C. elegans* 脂肪生成的作用, 其中 2'-苯甲酰水杨苷 (5) 在 2 种染色实验中均呈现最强的抑制活性。

此外, 通过对实验结果的观察, 发现油红 O 能将脂肪染成滴状, 易观察, 而苏丹黑 B 很难将脂肪染成滴状或颗粒, 通常呈现为黑色堆积, 但是苏丹黑 B 能够将 *C. elegans* 内脂肪显示的更完整。因此, 结合 2 种染色方法, 才能够更好地观察 *C. elegans*

体内脂肪的分布和数量。

本研究首次报道了黑柳树皮提取物的化学成分, 并探究了部分化合物对脂肪生成的影响, 为从该植物中发现具有抑制脂肪生成作用的化合物提供了一定的参考, 并为黑柳植物的开发与应用提供科学基础。

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 (第二十卷第二分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 81.
- [2] Noleto-Dias C, Ward J L, Bellisai A, et al. Salicin-7-sulfate: A new salicinoid from willow and implications for herbal medicine [J]. *Fitoterapia*, 2018, 127: 166-172.
- [3] 祝星宇, 张贻强, 陈雨晴, 等. 柳属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5952-5960.
- [4] Han L K, Sumiyoshi M, Zhang J, et al. Anti-obesity

- action of *Salix matsudana* leaves (Part 1). Anti-obesity action by polyphenols of *Salix matsudana* in high fat-diet treated rodent animals [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(10): 1188-1194.
- [5] Han L K, Sumiyoshi M, Zheng Y N, *et al.* Anti-obesity action of *Salix matsudana* leaves (Part 2). Isolation of anti-obesity effectors from polyphenol fractions of *Salix matsudana* [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(10): 1195-1198.
- [6] 刘可越, 刘海军, 周斌, 等. 垂柳叶化学成分及其促进脂肪分解的活性研究 [J]. 复旦学报: 自然科学版, 2008, 47(4): 520-523.
- [7] Lee M N, Lee S H, Kang J, *et al.* Salicortin-derivatives from *Salix pseudo-lasiogyne* twigs inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells via modulation of C/EBP α and SREBP1c dependent pathway [J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 10484-10496.
- [8] United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service. *Salix nigra* Marshall [DB/OL]. [2010]. <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=SANI>.
- [9] Verma N, Tripathi S K, Sahu D, *et al.* Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 336(1): 127-135.
- [10] Sharma S, Sahu D, Das H R, *et al.* Amelioration of collagen-induced arthritis by *Salix nigra* bark extract via suppression of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(12): 3395-3406.
- [11] Tahir U, Fakhar M, Zameer M, *et al.* Antibacterial activity, phytochemical analysis and FT-IR analysis of *Salix nigra* plant extract against gram positive and gram negative bacteria [J]. *Fresen Environ Bull*, 2022, 31(8): 7535-7542.
- [12] 苗祥贞, 张潇, 袁炎炎, 等. 黄连水提物对秀丽隐杆线虫毒性效应评价 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 874-878.
- [13] 屈长青, 徐林丽, 陆娟, 等. 罗勒水提物对秀丽隐杆线虫脂肪沉积的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(2): 165-166.
- [14] 冯婉娟, 黄文明, 许想平, 等. 秀丽隐杆线虫脂肪染色的方法比较(英文) [J]. 生命科学研究, 2012, 16(1): 9-14.
- [15] Wu Y Q, Dobermann D, Beale M H, *et al.* Acutifoliside, a novel benzoic acid glycoside from *Salix acutifolia* [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(15): 1731-1739.
- [16] Lee H J, Kim J S, Kim Y K, *et al.* Phenolic glycosides as inhibitors of inducible nitric oxide synthase from *Populus davidiana* in LPS-activated RAW 264.7 murine macrophages [J]. *Die Pharm*, 2012, 67(10): 870-873.
- [17] Rasmussen B, Nkurunziza A J, Witt M, *et al.* Dovyalicin-type spermidine alkaloids from *Dovyalis* species [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(9): 1300-1304.
- [18] Mizuno M, Kato M, Misu C, *et al.* Chaenomeloidin: A phenolic glucoside from leaves of *Salix chaenomeloides* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(5): 1447-1450.
- [19] Ishikawa T, Nishigaya K, Takami K, *et al.* Isolation of salicin derivatives from *Homalium cochinchinensis* and their antiviral activities [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(4): 659-663.
- [20] 李静, 宋启示, 项伟, 等. 大苞蛇根草化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 433-434.
- [21] Wan C P, Yuan T, Cirello A L, *et al.* Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers [J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 1929-1937.
- [22] 王金兰, 孙大鹏, 吕伟强, 等. 银中杨落叶的化学成分及活性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3276-3281.
- [23] Zhang S X, Tani T, Yamaji S, *et al.* Glycosyl flavonoids from the roots and rhizomes of *Asarum longerhizomatosum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(1): 25-30.
- [24] 黄永林, 陈月圆, 颜小捷, 等. 红背山麻杆叶的化学成分研究(I): 酚酸类及相关化合物 [J]. 广西植物, 2014, 34(1): 126-129.
- [25] 钱纯果, 金路, 朱龙平, 等. 桂枝中化学成分及抗肿瘤和抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 31-40.

[责任编辑 王文倩]