

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202008010



于玲玲, 宁德生, 符毓夏, 等. 尖尾枫化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 广西植物, 2021, 41(11): 1875–1881.

YU LL, NING DS, FU YX, et al. Chemical constituents and their anti-inflammatory activities of *Callicarpa longissima* [J].

Guihaia, 2021, 41(11): 1875–1881.

尖尾枫化学成分及其抗炎活性研究

于玲玲^{1,2}, 宁德生², 符毓夏², 李连春², 李海云¹, 潘争红^{2*}

(1. 桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541006; 2. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 中国科学院 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西 桂林 541006)

摘要: 尖尾枫 (*Callicarpa longissima*) 有止血镇痛的功效, 其化学成分和药理活性研究报道较少。为研究尖尾枫枝叶的化学成分以及抗炎活性, 该实验用尖尾枫枝叶 95% 乙醇提取物通过柱层析和 HPLC 进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。采用 LPS 离体诱导 RAW 264.7 细胞的 NO 生成模型, 研究主要化合物对 NO 生成的抑制活性。结果表明: (1) 从尖尾枫中分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为 4', 5-二羟基-7-甲氧基黄酮(1)、喷杜素(2)、蓟黄素(3)、洋艾素(4)、4', 5-二羟基-3', 7-二甲氧基黄酮(5)、甲基条叶蓟素(6)、金腰素(7)、泡桐素(8)、齐墩果酸(9)、桦木酸(10)、2, 4, 6-三甲氧基苯酚(11)、咖啡酸乙酯(12)。(2) 化合物 1–7 在 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放的 NO 均具有明显的抑制作用。化合物 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12 均为首次从该植物中分离得到, 化合物 1–7 均具有不同程度的抗炎作用, 其中化合物 2, 3, 6 表现出较强的抗炎活性。

关键词: 尖尾枫, 化学成分, 分离鉴定, 抗炎活性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)11-1875-07

Chemical constituents and their anti-inflammatory activities of *Callicarpa longissima*

YU Lingling^{1,2}, NING Desheng², FU Yuxia², LI Lianchun², LI Haiyun¹, PAN Zhenghong^{2*}

(1. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: *Callicarpa longissima* has hemostatic and analgesic effects, and there are few reports on its chemical composition and pharmacological activity. In order to study the chemical composition and anti-inflammatory activity of *C. longissima* branches and leaves, the 95% ethanol extract of *C. longissima* branches and leaves were isolated and purified by column chromatography and HPLC, and the structures of the obtained compound were identified based on the physical and chemical properties and spectral data. Using LPS-activated RAW 264.7 cell line models *in vitro*, main compounds were evaluated for the inhibition against NO production. The results were as follows: Twelve compounds were isolated and identified as 4', 5-dihydroxy-7-methoxyflavone(1), penduletin(2), cirsimaritin(3), artemetin(4), 4', 5-

收稿日期: 2020-09-25

基金项目: 广西自然科学基金重点项目(2018GXNSFDA050016); 中央引导地方科技发展专项资金(桂科 ZY20111010) [Supported by Natural Science Foundation of Guangxi(2018GXNSFDA050016); Special Fund for Central Guidance of Local Science and Technology Development(Guike ZY20111010)]。

作者简介: 于玲玲(1995-), 硕士研究生, 研究方向为天然植物化学成分, (E-mail) 646832929@qq.com。

*通信作者: 潘争红, 博士, 研究员, 研究方向为天然药物化学, (E-mail) pan7260@126.com。

dihydroxy-3',7-dimethoxyflavone(**5**), cirsilineol(**6**), chrysosplenetin(**7**), paulownin(**8**), oleanolic acid(**9**), betulinic acid(**10**), 2,4,6-trimethoxyphenol(**11**), ethyl caffeate(**12**). (2) Compounds **1–7** have significant inhibitory effect on the release of NO from mouse macrophages RAW 264.7 induced by LPS at a concentration of 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In conclusion, compounds **1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11** and **12** were isolated from this plant for the first time. Compounds **1–7** have anti-inflammatory effects, among which compounds **2, 3** and **6** show strong anti-inflammatory activity.

Key words: *Callicarpa longissima*, chemical constituents, isolation and identification, anti-inflammatory activity

尖尾枫(*Callicarpa longissima*)为马鞭草科紫珠属植物,药用全株,有止血镇痛、祛瘀消肿、祛风湿的功效,常用于治疗风湿性腰腿痛、跌打损伤、毒蛇咬伤、关节疼痛、产后风、骨折、风寒咳嗽等病症(中国科学院中国植物志编辑委员会,1982;江苏新医药学院,1986)。尖尾枫作为一种广西特色瑶药,是“虎牛钻风”中“七十二风”的粘手风,在广西瑶族、壮族等地区具有悠久的使用历史(戴斌和李钊东,1988)。已有研究报道表明,尖尾枫含有萜类、黄酮类、木脂素类、苯丙素类等成分(Liu et al., 2012;高微等,2013;袁经权,2015),具有抗炎、美白等作用(Yamahara et al., 2016;焦杨等,2016)。目前,有关尖尾枫化学成分文献报道较少,针对其化学成分的活性研究更少,导致其药效物质基础尚未得到确定。基于尖尾枫在广西少数民族地区的实际应用及确切疗效,为了进一步阐明该民族特色瑶药的抗炎活性物质基础,本研究对其枝叶的95%乙醇提取物进行了分离纯化,分离并鉴定了12个化合物(图1),并对其主要黄酮类化合物进行了抗炎活性测定。本研究结果不仅丰富了尖尾枫的化学物质基础,也为其今后开发与利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 实验药材

尖尾枫枝叶采集于广西桂林市雁山区,经广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所黄俞淞副研究员鉴定为马鞭草科紫珠属植物尖尾枫(*Callicarpa longissima*)的枝叶,凭证样品保存于广西植物功能物质研究与利用重点实验室。

细胞株:小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7 细胞),购买于中国典型培养物保藏中心。

1.2 实验仪器

布鲁克 AVANCE III 500 MHz 核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司);Shimadzu LC/MS-IT-TOF 质谱仪、色谱柱 PCR-ODS(日本岛津公司);Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);二氧化

碳细胞培养箱、-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(美国 Thermo Forma 公司);灭菌锅(日本 Hirayama 公司);倒置显微镜(舜宇光学科技有限公司);0.1~1 mL、20~200 μL 、2~20 μL 移液枪(法国 Gilson 公司);全波长多功能酶标仪(美国 Biotek 公司)。

1.3 实验耗材和试剂

DMEM 培养基(美国 Invitrogen);HyClone 胎牛血清(Fatal Bovine Serum, FBS)(美国 HyClone 公司);内毒素(LPS)、噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]、二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司);NO 检测试剂盒(美国 Promega 公司);12 孔培养板、75 cm^2 培养瓶、100 mm 培养皿、细胞刮刀、1.5 mL EP 管(美国 Corning costar 公司);MCI gel(日本三菱化学公司);柱层析分离填料硅胶(100~200 目,青岛海洋化工厂);葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(美国 GE 公司)。二氯甲烷、甲醇、95%乙醇、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、丙酮(分析纯,广东光华科技股份有限公司);乙腈[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

2 实验方法

2.1 提取与分离

尖尾枫枝叶 4.95 kg,阴干后粉碎,加入 95%乙醇 20 L,在室温下浸泡 48 h,过滤,滤渣再重复上述操作 4 次,合并 5 次提取液,减压回收溶剂得到浸膏 557 g。取 500 g 浸膏用水分散后,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取 3 次,每次萃取的溶剂为 2 L,回收溶剂后得到石油醚部位 138.7 g、氯仿部位 87.2 g、乙酸乙酯部位 251.3 g。

取氯仿部位 70 g 经凝胶柱分离,以氯仿-甲醇(1:1)洗脱,得到 8 个组分 A1~A8。组分 A3 经硅胶柱,以石油醚-丙酮(20:1-1:1)洗脱,经 HPLC(0~40 min,乙腈-水=48:52)纯化得化合物 **9**(22.6 mg)、**10**(10.1 mg),经 HPLC(0~40 min,乙腈-水=46:54)纯化得化合物 **11**(6.9 mg)、**12**(7.4 mg)。组分 A7 经硅胶柱,石油醚-乙

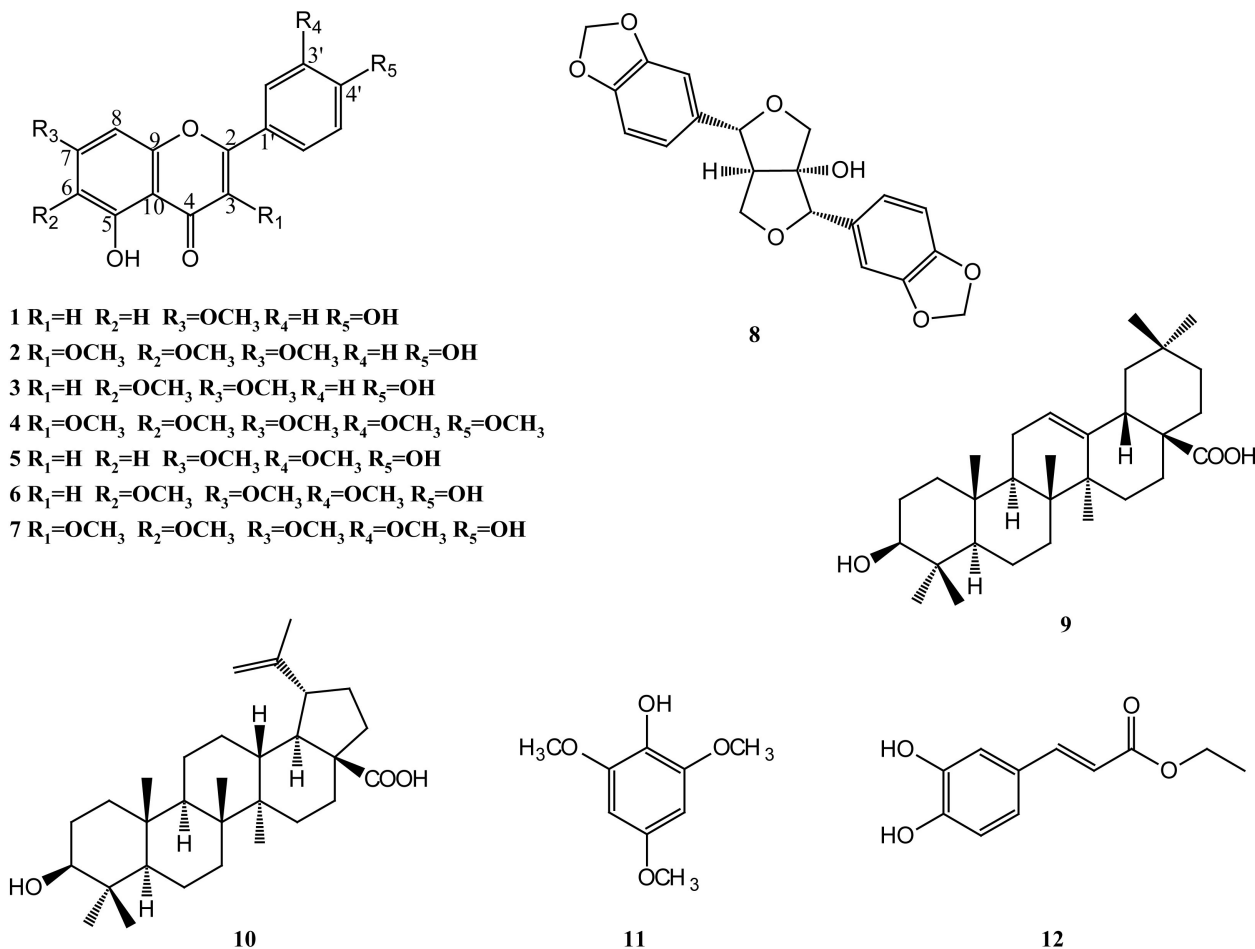


图 1 化合物 1-12 的结构式

Fig. 1 Structural formulas of compounds 1-12

酸乙酯(100:1~10:1)洗脱,用 Sephadex LH-20 柱色谱(氯仿:甲醇=1:1)纯化,重结晶,得化合物 **1** (6.5 mg)、**4** (9.9 mg)、**5** (8.3 mg)、**7** (5.5 mg)、**8** (4.2 mg)。取乙酸乙酯部位 200 g,过 MCI(甲醇-水=70:30、80:20、90:10、100:0)得到 4 个部位 B1~B4, B1 经硅胶柱分离,石油醚-丙酮梯度洗脱(50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1),得 5 个组分 C1~C5,组分 C1、C3 经 Sephadex LH-20 柱色谱(氯仿:甲醇=1:1)纯化,甲醇反复结晶,得到化合物 **2** (18.8 mg)、**3** (7.3 mg)、**6** (8.2 mg)。

2.2 抗炎活性实验

利用国际公认的脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 作为抗炎活性筛选模型,采用 Griess 试剂显色法检测 NO 的释放量(杨晓露等, 2013)。操作步骤如下:收集对数生长期的巨噬细胞 RAW 264.7,利用细胞计数器进行计数,调整密

度为 $5 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个每毫升的单细胞悬液,于 12 孔细胞培养板中接种,且每孔加入 100 μL 密度为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖(LPS)进行诱导刺激,同时加入待测的化合物($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),实验设置不加药物的组为对照,放置在 CO_2 浓度为 5%、温度为 37 $^\circ\text{C}$ 的细胞培养箱中培养 24 h 之后,吸取其培养液,加入 Griess 试剂,轻摇至混和均匀,在避光条件下,静静等待 10 min,用酶联免疫检测仪读取在 570 nm 波长处各孔的吸光值。NO 生成抑制率(%) = (模型组 $A_{570 \text{ nm}}$ - 样品组 $A_{570 \text{ nm}}$) / 模型组 $A_{570 \text{ nm}} \times 100\%$,对于 NO 产生抑制率高于 50% 的化合物,实验设置 25.00、12.50、6.25、3.12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度梯度,测定得出其不同浓度下的吸光值,再采用 SPSS 16.0 软件进行回归计算 IC_{50} 值。同一批次的细胞采用 MTT 法来检测细胞的活力(Mosmann, 1983)。

3 化合物结构鉴定

化合物 **1** 黄色粉末。ESI-MS m/z : 283.1 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$ 。 1H NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 7.96 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 7.28 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.98 (1H, s, H-3), 6.69 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.59 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.78 (3H, s, OMe-7); ^{13}C NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 164.7 (C-2), 104.2 (C-3), 183.0 (C-4), 162.5 (C-5), 98.7 (C-6), 165.9 (C-7), 93.1 (C-8), 157.9 (C-9), 105.4 (C-10), 122.1 (C-1'), 128.9 (C-2', 6'), 116.7 (C-3', 5'), 162.8 (C-4'), 56.0 (OMe-7)。上述数据与文献(余正文等, 2005)基本一致, 故将化合物 **1** 鉴定为 4', 5-dihydroxy-7-methoxyflavone(4', 5-二羟基-7-甲氧基黄酮)。

化合物 **2** 黄色晶体。ESI-MS m/z : 343.7 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{18}H_{16}O_7$ 。 1H NMR (500 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 8.05 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.98 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.80 (1H, s, H-8), 3.96 (3H, s, OMe-3), 3.90 (3H, s, OMe-7), 3.81 (3H, s, OMe-6); ^{13}C NMR (125 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 153.6 (C-2), 139.2 (C-3), 179.9 (C-4), 159.9 (C-5), 133.0 (C-6), 161.7 (C-7), 91.9 (C-8), 152.8 (C-9), 107.3 (C-10), 122.8 (C-1'), 131.4 (C-2', 6'), 116.5 (C-3', 5'), 157.1 (C-4'), 60.6 (OMe-6), 60.2 (OMe-3), 56.8 (OMe-7)。上述数据与文献(李顺林和丁靖垵, 1994)基本一致, 故将化合物 **2** 鉴定为 penduletin(喷杜素)。

化合物 **3** 淡黄色晶体。ESI-MS m/z : 313.1 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{17}H_{14}O_6$ 。 1H NMR (500 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 7.96 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 7.03 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.86 (1H, s, H-8), 6.71 (1H, s, H-3), 4.01 (3H, s, OMe-7), 3.79 (3H, s, OMe-6); ^{13}C NMR (125 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 165.1 (C-2), 104.1 (C-3), 183.3 (C-4), 154.2 (C-5), 132.9 (C-6), 160.4 (C-7), 92.2 (C-8), 153.8 (C-9), 106.1 (C-10), 122.7 (C-1'), 129.4 (C-6', 2'), 116.9 (C-5', 3'), 161.8 (C-4'), 60.5 (OMe-6), 56.8 (OMe-7)。上述数据与文献(Scharkowski et al., 2018)基本一致, 故将化合物 **3** 鉴定为 cirsimaritin(蓟黄素)。

化合物 **4** 黄色粉末。ESI-MS m/z : 389.1 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{20}H_{20}O_8$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.73 (1H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-6'), 7.70 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.97 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.51 (1H, s, H-8), 3.98 (3H, s, OMe-3'), 3.97 (3H, s, OMe-3), 3.97 (3H, s, OMe-4'), 3.93 (3H, s, OMe-7), 3.87 (3H, s, OMe-6); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 155.9 (C-2), 138.9 (C-3), 178.9 (C-4), 152.1 (C-5), 132.7 (C-6), 159.0 (C-7), 90.6 (C-8), 153.1 (C-9), 106.7 (C-10), 122.1 (C-1'), 110.8 (C-2'), 149.1 (C-3'), 151.3 (C-4'), 111.2 (C-5'), 123.0 (C-6'), 60.9 (OMe-3), 60.2 (OMe-6), 56.4 (OMe-7), 56.2 (OMe-4'), 56.0 (OMe-3')。上述数据与文献(姚巍等, 2007)基本一致, 故将化合物 **4** 鉴定为 artemetin(洋艾素)。

化合物 **5** 黄色针形。ESI-MS m/z : 337.3 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{17}H_{14}O_6$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.81 (1H, s, OH), 7.51 (1H, dd, $J = 1.5, 8.0$ Hz, H-6'), 7.36 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 7.06 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.52 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-8), 6.40 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-6), 4.01 (3H, s, OMe-3'), 3.90 (3H, s, OMe-7); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 164.3 (C-2), 104.7 (C-3), 182.6 (C-4), 162.2 (C-5), 98.13 (C-6), 165.4 (C-7), 93.0 (C-8), 158.1 (C-9), 105.9 (C-10), 123.4 (C-1'), 108.7 (C-2'), 149.3 (C-3'), 146.8 (C-4'), 115.4 (C-5'), 121.2 (C-6'), 56.4 (OMe-3'), 55.9 (OMe-7)。上述数据与文献(彭可等, 2010)基本一致, 故将化合物 **5** 鉴定为 4', 5-dihydroxy-3', 7-dimethoxyflavone(4', 5-二羟基-3', 7-二甲氧基黄酮)。

化合物 **6** 黄色粉末。ESI-MS m/z : 345.1 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{18}H_{16}O_7$ 。 1H NMR (500 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 12.98 (1H, s, OH), 7.64 (1H, s, H-2'), 7.59 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'), 7.01 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.86 (1H, s, H-8), 6.75 (1H, s, H-3), 4.00 (3H, s, OMe-3'), 3.97 (3H, s, OMe-7), 3.81 (3H, s, OMe-6); ^{13}C NMR (125 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 165.1 (C-2), 104.1 (C-3), 183.7 (C-4), 154.3 (C-5), 133.6 (C-6), 159.9 (C-7), 92.1 (C-8), 154.0 (C-9), 106.4 (C-10), 123.6 (C-1'), 110.7

(C-2'), 149.1 (C-3'), 151.8 (C-4'), 116.4 (C-5'), 121.4 (C-6'), 60.5 (OMe-6), 56.8 (OMe-7), 56.6 (OMe-3')。上述数据与文献 (Scharkowski et al., 2018) 基本一致, 故将化合物 **6** 鉴定为 *cirsilineol* (甲基条叶蓟素)。

化合物 **7** 黄色粉末。ESI-MS m/z : 373.2 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{19}H_{18}O_8$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.61 (1H, s, OH), 7.71 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.66 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-6'), 7.03 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.48 (1H, s, H-8), 3.97 (3H, s, OMe-3'), 3.93 (3H, s, OMe-3), 3.91 (3H, s, OMe-7), 3.88 (3H, s, OMe-6); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 156.0 (C-2), 138.7 (C-3), 178.9 (C-4), 152.5 (C-5), 132.3 (C-6), 158.5 (C-7), 90.1 (C-8), 152.6 (C-9), 106.6 (C-10), 122.1 (C-1'), 110.8 (C-2'), 146.6 (C-3'), 148.1 (C-4'), 114.4 (C-5'), 122.6 (C-6'), 60.7 (OMe-3), 60.1 (OMe-6), 56.3 (OMe-7), 56.2 (OMe-3')。上述数据与文献 (Numonov et al., 2013) 基本一致, 故将化合物 **7** 鉴定为 *chrysosplenetin* (金腰素)。

化合物 **8** 白色粉末。ESI-MS m/z : 371.3 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{20}H_{18}O_7$ 。 1H NMR (500 MHz, MeOD) δ : 6.96 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2''), 6.90-6.88 (1H, m, H-6'), 6.88-6.86 (1H, m, H-6''), 6.80 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5''), 5.94 (2H, s, OCH_2O), 5.93 (2H, s, OCH_2O), 4.84 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ : 92.8 (C-1), 87.6 (C-2), 76.2 (C-4), 72.0 (C-5), 86.6 (C-6), 74.9 (C-8), 136.3 (C-1'), 109.4 (C-2'), 149.4 (C-3'), 148.8 (C-4'), 108.6 (C-5'), 120.9 (C-6'), 131.7 (C-1''), 109.0 (C-2''), 148.9 (C-3''), 148.7 (C-4''), 107.8 (C-5''), 120.7 (C-6''), 102.4 (OCH_2O), 101.2 (OCH_2O)。上述数据与文献 (罗国良等, 2017) 基本一致, 故将化合物 **8** 鉴定为 *paulownin* (泡桐素)。

化合物 **9** 白色粉末。ESI-MS m/z : 455.1 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.31 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-12), 3.23 (1H, dd, $J = 5.0, 11.5$ Hz, H-3), 1.17 (3H, s, CH_3), 1.02 (3H, s, Me), 0.96 (3H, s, Me), 0.94 (3H, s, Me), 0.93 (3H, s, Me), 0.81 (3H, s, Me), 0.80 (3H, s, Me);

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.5 (C-1), 27.2 (C-2), 79.1 (C-3), 38.8 (C-4), 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 32.7 (C-7), 39.3 (C-8), 47.7 (C-9), 37.1 (C-10), 23.0 (C-11), 122.7 (C-12), 143.6 (C-13), 41.7 (C-14), 27.7 (C-15), 23.4 (C-16), 46.5 (C-17), 41.2 (C-18), 45.9 (C-19), 30.7 (C-20), 33.8 (C-21), 32.4 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 15.3 (C-25), 17.1 (C-26), 25.9 (C-27), 182.6 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30)。上述数据与文献 (方进波等, 2006) 基本一致, 故将化合物 **9** 鉴定为 *oleanolic acid* (齐墩果酸)。

化合物 **10** 白色粉末。ESI-MS m/z : 455.2 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.20 (1H, dd, $J = 5.0, 11.5$ Hz, H-3), 1.00 (3H, s, Me), 0.99 (3H, s, Me), 0.96 (3H, s, Me), 0.85 (3H, s, Me), 0.78 (3H, s, Me); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.9 (C-4), 55.4 (C-5), 18.3 (C-6), 34.4 (C-7), 40.7 (C-8), 50.6 (C-9), 37.2 (C-10), 20.9 (C-11), 25.5 (C-12), 38.4 (C-13), 42.5 (C-14), 30.6 (C-15), 32.2 (C-16), 56.3 (C-17), 49.3 (C-18), 46.9 (C-19), 150.4 (C-20), 29.7 (C-21), 37.0 (C-22), 28.0 (C-23), 15.3 (C-24), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 14.7 (C-27), 179.2 (C-28), 19.4 (C-29), 109.7 (C-30)。上述数据与文献 (Yili et al., 2009) 基本一致, 故将化合物 **10** 鉴定为 *betulinic acid* (桦木酸)。

化合物 **11** 白色粉末。ESI-MS m/z : 183.2 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_9H_{12}O_4$ 。 1H NMR (500 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 6.13 (2H, s, H-3, 5), 3.75 (6H, s, OMe-2, 6), 3.62 (3H, s, OMe-4); ^{13}C NMR (125 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 155.6 (C-1), 154.9 (C-2, 6), 94.1 (C-3, 5), 60.6 (OMe-4), 56.3 (OMe-2, 6)。上述数据与文献 (徐文等, 2010) 基本一致, 故将化合物 **11** 鉴定为 2, 4, 6-trimethoxyphenol (2, 4, 6-三甲氧基苯酚)。

化合物 **12** 透明晶体。ESI-MS m/z : 231.3 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{11}H_{12}O_4$ 。 1H NMR (500 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 7.53 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.04 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-6), 6.87 (1H, d,

$J = 8.5\text{ Hz}$, H-5), 6.27 (1H, d, $J = 16.0\text{ Hz}$, H-8), 4.18 (2H, q, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-10), 1.28 (3H, t, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-11); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 122.5 (C-1), 115.2 (C-2), 145.6 (C-3), 148.8 (C-4), 116.4 (C-5), 127.6 (C-6), 146.4 (C-7), 115.8 (C-8), 167.4 (C-9), 60.5 (C-10), 14.7 (C-11)。上述数据与文献(赵东保等,2006)基本一致,故将化合物 **12** 鉴定为 ethyl caffeate(咖啡酸乙酯)。

4 抗炎活性测试结果

将脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞 RAW 264.7 释

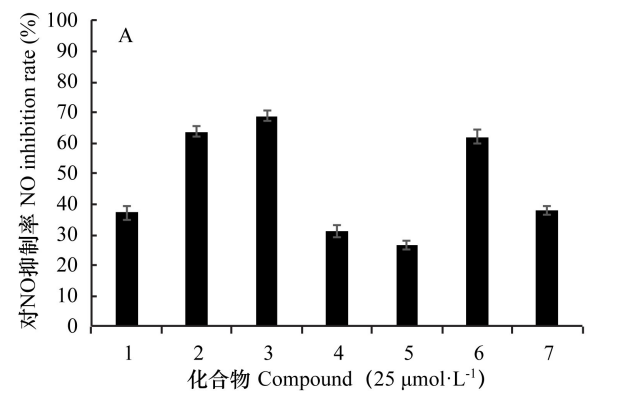
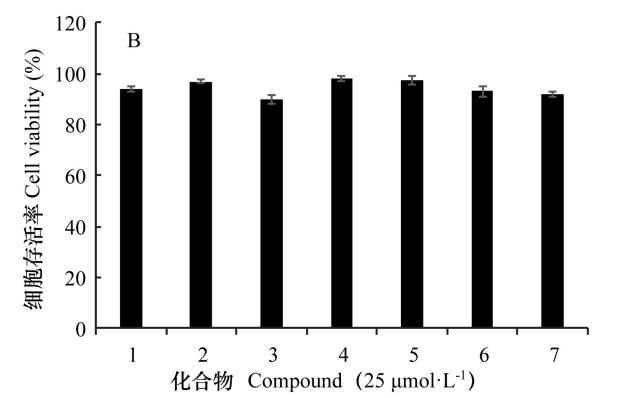


图 2 化合物 **1-7** 对 RAW 264.7 细胞 NO 抑制率的影响 (A) 和对细胞存活率的影响 (B) ($n=3$)
Fig. 2 Inhibitory effects of compounds **1-7** on NO production (A) and cell viability (B) in RAW 264.7 cell ($n=3$)

放 NO 作为筛选模型,对本研究分离得到的 7 个黄酮化合物采用 Griess 法来进行抗炎活性评价。在 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下,化合物 **1-7** 对巨噬细胞 RAW 264.7 生长无明显的负面影响,细胞的存活率均在 90% 以上(图 2:B),结果表明这些化合物在浓度为 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对细胞都没有毒性作用,而且化合物对于脂多糖(LPS)诱导 RAW 264.7 巨噬细胞产生的 NO 均表现出不同程度的抑制作用,抑制率最低为 26.72%,最高为 68.84%,结果见表 1 和图 2:A。值得关注的是化合物 **2、3、6** 表现出明显优于其他化合物的抑制活性,所以进一步测定其 IC_{50} 值,测得化合物 **2、3、6** 的 IC_{50} 值依次为 24.31 、 13.24 、 $12.45\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



5 讨论

本研究共从尖尾枫枝叶部位分离鉴定 12 个单体化合物,包括黄酮类 7 个、三萜类 2 个、木脂素 1 个、酚类 2 个,其中化合物 **1、2、4、5、6、8、10、11、12** 均为首次从该植物中分离得到。

炎症是机体在受到各种内外环境的刺激而引发的应激防御性反应,是临床中常见的一个病理过程。炎症本身是把双刃剑,适当的炎症反应有助于机体清除损伤,抵御外来感染,促进伤口的愈合;过度的炎症反应则会对正常组织和细胞造成损伤,引起机体功能的失调,进而促使多种疾病的发生和发展。动脉粥样硬化、肿瘤、败血症以及老年性痴呆等疾病都与异常的炎症反应有关联。天然药物具有多靶点、多机制、副作用小的独特本质,在治疗和预防炎症性疾病中发挥着重要作用。

尖尾枫在瑶族民间常用来治疗关节炎、风湿

表 1 化合物 **1-7** 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞 NO 释放的影响抑制率 ($x\pm s, n=3$)
Table 1 Inhibitory effects of compounds **1-7** on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells ($x\pm s, n=3$)

化合物 Compound	抑制率 Inhibition ratio (%)
1	37.16±2.4
2	63.60±1.7
3	68.84±1.8
4	31.12±2.0
5	26.72±1.3
6	62.01±2.2
7	37.98±1.5

注: 化合物 **1-7** 均在 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下测试。
Note: Compounds **1-7** were tested at a concentration of $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

痛等。本研究采用国际公认的脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞产生 NO 为模型,筛选了从尖尾枫中分

离得到主要单体化合物对 NO 生成的抑制作用。本研究结果表明, 7 个多甲氧基黄酮对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞释放 NO 均有不同程度的抑制作用, 其中化合物 2、3、6 的效果更好, 从构效关系分析来看, 6 位上的甲氧基和 4' 位上的羟基可能是其发挥抗炎作用的关键基团。多甲氧基黄酮化合物已被报道具有较强的抗炎活性(郭珊珊, 2012), 在本实验中得到进一步证实。本研究结果验证了尖尾枫的民间抗炎功效, 为其下一步的药理研究奠定了基础。

参考文献:

DAI B, LI ZD, 1998. Investigation and research on the traditional Yao medicine in the category of "Tiger Bull Drilling Wind" [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, (2): 28-33. [戴斌, 李钊东, 1998. "虎牛钻风"类传统瑶药的调查研究 [J]. 中国民族民间医药杂志, (2): 28-34.]

Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences, 1982. Flora Reipublicae Popularis Sinicae [M]. Beijing: Science Press, 65(10): 25-54. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 1982. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 65(10): 25-54.]

FANG JB, DUAN HQ, ZHANG YW, et al., 2006. Chemical constituents from herb of *Alternanthera philoxeroides* [J]. Chin J Chin Mat Med, 31(13): 1072-1075. [方进波, 段宏泉, 张彦文, 等, 2006. 空心莲子草的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 31(13): 1072-1075.]

GAO W, LIU BM, HUANG Y, et al., 2013. Chemical constituents of *Callicarpa longissima* [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 19(19): 153-155. [高微, 刘布鸣, 黄艳, 等, 2013. 尖尾枫化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 19(19): 153-155.]

GUO SS, 2012. Anti-inflammatory effects and associated molecular mechanisms of polymethoxyflavones [D]. Qingdao: Ocean University of China; 9-14. [郭珊珊, 2012. 多甲氧基黄酮的抗炎活性及相关分子机制研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学; 9-14.]

JIAO Y, ZOU LH, QIU L, et al., 2016. Anticomplementary effects of the extracts of five Verbenaceae herbs *in vitro* [J]. J Chin Pharm Univ, 47(4): 469-473. [焦杨, 邹录惠, 邱莉, 等, 2016. 5 种马鞭草科药用植物的抗补体活性 [J]. 中国药科大学学报, 47(4): 469-473.]

Jiangsu New Medical College, 1986. Dictionary of Traditional, Chinese Medicine (Vol. 1) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press; 875. [江苏新医学院, 1986. 中药大辞典(上册) [M]. 上海: 上海科技出版社; 875.]

LI SL, DING JY, 1994. The flavonols from *Laggera pterodonta* [J]. Acta Bot Yunnan, 16(4): 434-436. [李顺林, 丁靖垲, 1994. 臭灵丹中的黄酮醇成分 [J]. 云南植物研究, 16(4): 434-436.]

LIU YW, CHENG YB, LIAW CC, et al., 2012. Bioactive diterpenes from *Callicarpa longissima* [J]. J Nat Prod, 75(4): 689-693.

LUO GL, WANG Y, LI HQ, et al., 2017. Chemical constituents from fruits of *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 34(6): 794-799. [罗国良, 汪洋, 李华强, 等, 2017. 牡荆子化学成分研究 [J]. 中国现代应用药学, 34(6): 794-799.]

MOSMANN T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Imm Methods, 65(1): 55-63.

NUMONOV SR, USMANOVA SK, AISA HA, 2013. A triterpenoid and flavonoids from *Dracocephalum heterophyllum* [J]. Chem Nat Compd, 48(6): 1109-1110.

PENG K, MEI WL, WU J, et al., 2010. Flavones from the stem of *Aquilaria sinensis* [J]. J Trop Subtrop Bot, 18(1): 97-100. [彭可, 梅文莉, 吴娇, 等, 2010. 白木香树干中的黄酮类成分 [J]. 热带亚热带植物学报, 18(1): 97-100.]

SCHARKOWSKI A, SCHMIEDEL H, STANNARIUS R, et al., 2018. Flavonoids and triterpenes from *Combretum fragrans* with anti-inflammatory, antioxidant and antidiabetic potential [J]. Z Naturforsch C, 73(5-6): 211-219.

XU W, ZHOU GX, DAI Y, et al., 2010. Chemical constituents in stems of *Schima superba* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 41(6): 863-866. [徐文, 周光雄, 戴毅, 等, 2010. 木荷茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 41(6): 863-866.]

YAMAHARA M, SUGIMURA K, KUMAGAI A, et al., 2016. *Callicarpa longissima* extract, carnosol-rich, potently inhibits melanogenesis in B16F10 melanoma cells [J]. J Nat Med, 70(1): 1-8.

YANG XL, LIU D, BIAN K, et al., 2013. Study on *in vitro* anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Glycyrrhizae radix et Rhizoma* and its ingredients [J]. Chin J Chin Mat Med, 38(1): 99-104. [杨晓露, 刘朵, 卞卡, 等, 2013. 甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 38(1): 99-104.]

YAO W, LIN WY, ZHOU CX, et al., 2007. Studies on constituents from *Taraxacum mongolicum* [J]. Chin J Chin Mat Med, 32(10): 926-929. [姚巍, 林文艳, 周长新, 等, 2007. 蒙古蒲公英化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 32(10): 926-929.]

YILI A, MUTALIPU, AISA HA, et al., 2009. Betulinic acid and sterols from *Astragalus altaicus* [J]. Chem Nat Compd, 45(4): 592.

YUAN JQ, 2015. Studies on the constituents of *Callicarpa longissima* [D]. Guangzhou: Ji'nan University; 35-43. [袁经权, 2015. 瑶药粘手风化学成分研究 [D]. 广州: 暨南大学; 35-43.]

YU ZW, ZHU HY, YANG XS, et al., 2005. Study on chemical constituents from *Incarvillea arguta* and their accelerating PC-12 cell differentiation [J]. Chin J Chin Mat Med, 30(17): 1335-1338. [余正文, 朱海燕, 杨小生, 等, 2005. 毛茛草化学成分及其促 PC-12 细胞的分化作用研究 [J]. 中国中药杂志, 30(17): 1335-1338.]

ZHAO DB, ZHANG W, LI MJ, et al., 2006. Studies on chemical constituents of *Acroptilon repens* [J]. Chin J Chin Mat Med, 31(22): 1869-1872. [赵东保, 张卫, 李明静, 等, 2006. 顶羽菊化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 31(22): 1869-1872.]