

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202103077

罗明楚, 石小翠, 孙朋, 等. 拔毒散的化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(9): 1522–1530.

LUO MC, SHI XC, SUN P, et al. Chemical constituents of *Sida szechuensis* and their anti-inflammatory activities [J]. *Guihaia*, 2022, 42(9): 1522–1530.



拔毒散的化学成分及其抗炎活性研究

罗明楚^{1,2}, 石小翠^{1,2}, 孙朋^{1,2}, 鲁建美^{1,2}, 宋兴震^{1,2},
贾慧珍^{1,2}, 吴敏^{1,2}, 许又凯^{1*}

(1. 热带植物资源可持续利用重点实验室 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 拔毒散(*Sida szechuensis*)为一种傣族传统的药用植物,常用于治疗诸疮肿毒、皮肤瘙痒、跌打损伤、刀枪伤等疾病。为研究拔毒散的化学成分及其体外抗炎活性,该研究采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、半制备 HPLC 等方法对其地上部分的化学成分进行分离纯化,通过理化性质和 NMR 等波谱数据鉴定化合物的结构,并用脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞(RAW 264.7)作为炎症模型,评价所分离化合物的抗炎活性。结果表明:从拔毒散乙醇提取物中共分离得到 16 个化合物,分别鉴定为 kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**1**)、kaempferol-3-*O*-rutinoside (**2**)、槲皮素 (**3**)、20-hydroxyecdysone (**4**)、 α -ecdysone (**5**)、22-deoxyecdysterone (**6**)、abutasterone (**7**)、pterosterone (**8**)、icariside E₅ (**9**)、icariside E₃ (**10**)、(+)-syringaresinol (**11**)、pinosresinol (**12**)、balanophonin B (**13**)、*N*-*trans*-feruloyl tyramine (**14**)、(-)-loliolide (**15**)、棕榈酸 (**16**),其中化合物 **1-3, 9-13, 16** 首次从该植物中分离得到。抗炎活性测试结果表明,在 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下,化合物 **1, 4, 5** 无明显抑制 NO 生成作用,而化合物 **2, 3, 6-16** 均能在不同程度上抑制 NO 生成,其中化合物 **2, 3, 11-14** 具有较强的抗炎活性,其 IC₅₀ 值分别为 18.63、40.76、21.46、14.32、16.82、42.31 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该研究结果丰富了拔毒散的化学成分,明确了其具有抗炎效果的物质基础,验证了其传统用途的科学性,为其进一步在医药领域的开发利用提供了新思路及科学依据。

关键词: 傣药, 拔毒散, 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(2022)09-1522-09

Chemical constituents of *Sida szechuensis* and their anti-inflammatory activities

LUO Mingchu^{1,2}, SHI Xiaocui^{1,2}, SUN Peng^{1,2}, LU Jianmei^{1,2}, SONG Xingzhen^{1,2},
JIA Hiuzhen^{1,2}, WU Min^{1,2}, XU Youkai^{1*}

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 中国科学院西双版纳热带植物园“十三五”项目(XTBG-F02);中国科学院专项中科院合作局一带一路民族药研究与产业合作(Y6ZK131B01) [Supported by the 13th Five-Year Project of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences (XTBG-F02); One Belt and One Road Ethnic Medicine Research and Industry Cooperation of the Cooperation Bureau of Chinese Academy of Sciences (Y6ZK131B01)]。

第一作者: 罗明楚(1996-), 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学, (E-mail) luomingchu@xtbg.ac.cn。

*通信作者: 许又凯, 研究员, 研究方向为天然药物化学, (E-mail) xyk@xtbg.ac.cn。

(1. Key Laboratory of Tropical Plant Resources Sciences and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, Yunnan, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Sida zechuensis* is a traditional medicine used by Dai people to treat various diseases such as furuncle, pruritus, bruise and wounds, in Xishuangbanna, Southwest, China. The chemical constituents from the aerial parts of *S. zechuensis* and their anti-inflammatory activities *in vitro* was investigated in this study. Multiple techniques, such as column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, semi-preparative HPLC, were used to isolate and purify compounds. Their structures were identified by physicochemical properties and NMR spectral data. All isolated compounds were evaluated for their nitric oxide (NO) inhibitory effects in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells. The results were as follows: A total of 16 compounds were isolated from the ethanol extract and identified as kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**1**), kaempferol-3-*O*-rutinoside (**2**), quercetin (**3**), 20-hydroxycyclopentanone (**4**), α -ecdysone (**5**), 22-deoxycyclopentanone (**6**), abutasterone (**7**), pterosterone (**8**), icariside E₅ (**9**), icariside E₃ (**10**), (+)-syringaresinol (**11**), pinringaresinol (**12**), balanophonin B (**13**), *N*-*trans*-feruloyl tyramine (**14**), (-)-loliolide (**15**), and palmitic acid (**16**). Compounds **1-3**, **9-13**, and **16** were isolated from this plant for the first time. The anti-inflammatory results showed that except for compounds **1**, **4** and **5**, all other tested compounds had NO inhibitory activities at the concentration of 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Especially, compounds **2**, **3**, **11-14** demonstrated significant anti-inflammatory activities, with fifty percent NO inhibition concentration (IC₅₀) at 18.63, 40.76, 21.46, 14.32, 16.82, 42.31 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The results enrich the chemical constituents of *S. zechuensis*, clarify the material basis of its anti-inflammatory effect, verify the scientificity of its traditional usage, and provide new insight and scientific evidence for its further development and utilization in medicine industry.

Key words: Dai medicine, *Sida zechuensis*, chemical constituents, isolation and identification, anti-inflammatory activity

拔毒散(*Sida zechuensis*)为锦葵科黄花稔属植物,主要分布在四川、贵州、云南和广西等地(中国科学院中国植物志编辑委员会,1982)。在中国云南傣族地区,拔毒散作为一种传统药用植物,具有悠久的历史,其茎叶常用于治疗诸疮肿毒、皮肤瘙痒、跌打损伤、刀枪伤等疾病(李维峰等,2006;段立纲等,2013)。然而,围绕这些药效的相关研究却鲜有报道。化学成分研究方面,国内学者通过分离鉴定,发现该植物主要的化合物类型为甾体类的蜕皮激素(姚春所,2000;曲世津,2006;雷春,2008)。为了深入研究该植物化学资源,寻找与传统药用价值相关的抗炎活性成分,本研究利用经典的色谱学分离手段和核磁共振波谱技术对拔毒散的化学成分进行了分离和鉴定,共得到16个单体化合物,并利用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 炎症模型评价化合物的抗炎活性,以期明确该植物抗炎活性的物质基础,并为其进一步开发利用提供新的思路及理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器和试剂

1.1.1 材料 拔毒散的地上部分于2020年5月13日采集自云南省西双版纳傣族自治州勐腊县勐仑镇,由中国科学院西双版纳热带植物园高级实验员肖春芬老师鉴定,植物标本保存于中国科学院西双版纳热带植物园标本馆(No. 153662);RAW 264.7 细胞购于中国科学院昆明动物所细胞库。

1.1.2 仪器和试剂 ESI-MS(UPLC-IT-TOF,日本岛津制作所);500 MHz 核磁共振波谱仪(Avance III 500,德国 Bruker 公司);600 MHz 核磁共振波谱仪(Avance III 600,德国 Bruker 公司);半制备型 HPLC 配备 Waters 600 泵(Waters 2996 二极管阵列紫外检测器),色谱柱为 YMC-Pack ODS-A(250 mm \times 10 mm, S-5 μm , 3 mL \cdot min⁻¹);柱层析硅胶(200~300 目,青岛海洋化工有限公司);Sephadex LH-20(40~70 μm , 瑞典 Amersham

Pharmacia Biotech 公司);微孔树脂 MCI (CHP20/P120, 75~150 μm , 日本三菱公司)。

生物安全柜(BSC-1100II B2-X, 济南鑫贝西生物技术有限公司);二氧化碳细胞培养箱(QP-80, 济南鑫贝西生物技术有限公司);倒置生物显微镜(NIB-100, 宁波永新光学股份有限公司);多功能酶标仪(MULTISKAN MK3, 美国 Thermo 公司)。

T25 培养瓶、离心管、96 孔板(美国 Corning 公司);胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司);DMEM 培养基、PBS、胰蛋白酶(以色列 Biological Industries 公司);脂多糖、地塞米松(美国 Sigma 公司);Griess 试剂、MTS(美国 Promega 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 提取与分离 将采集的拔毒散阴干并粉碎后,得到样品 3.1 kg,用 95%的乙醇常温浸提 7 d,合并提取液并减压浓缩,重复 3 次,共得到浸膏 182 g。加水分散浸膏成混悬液,用乙酸乙酯萃取得到粗样 60 g,再将其置于微孔树脂 MCI 色谱柱中,用不同梯度的甲醇:水体系(30:70, 50:50, 70:30, 90:10)依次洗脱,TLC 点板合并极性相同的部分,得到 Fr. 1~Fr. 4 四个组分。取 Fr. 2(8 g)置于硅胶色谱柱中,用不同梯度乙酸乙酯和丙酮以及二氯甲烷和甲醇反复洗脱,再经过 Sephadex LH-20(甲醇)洗脱、半制备 HPLC(乙腈:水)梯度洗脱,得到得到化合物 **1**(8.5 mg)、**2**(3.0 mg)、**4**(11.2 mg)、**5**(10.8 mg)、**6**(6.1 mg)、**7**(4.4 mg)、**8**(6.5 mg)、**9**(2.4 mg)、**10**(2.6 mg)。取 Fr.3(2 g)和 Fr. 4(8 g)分别置于硅胶色谱柱中用不同梯度二氯甲烷和甲醇反复洗脱,结合 Sephadex LH-20(甲醇)以及半制备 HPLC,分别得到化合物 **3**(3.4 mg)、**11**(2.8 mg)、**12**(4.1 mg)、**13**(3.2 mg)、**14**(4.8 mg)和化合物 **15**(3.5 mg)、**16**(11.0 mg),化合物结构图见图 1。

1.2.2 抗炎活性实验 RAW 264.7 细胞使用 DMEM 完全培养基(10%FBS, 1%青霉素、链霉素),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。选择处于对数生长期的细胞,按密度为每毫升 1×10^6 个均匀种入 96 孔板,每孔 100 μL 。贴壁培养 18 h 后,空白组加入完全培养基,模型组加入含终浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖(LPS)的完全培养基,实验组在模型组的基础上加入终浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的待测化合物,阳性对照为地塞米松(dexamethasone, Dex)。处理 24 h

后,按照 Griess 试剂的标准操作处理。同一批次的细胞按照 MTS 法测定细胞活力。

所有实验均设置 3 个复孔,结果以平均值加减标准差表示。利用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析和 Dunnett's 多重比较检验来分析实验的数据, $P < 0.05$ 接受为显著性差异。采用回归分析的方法计算 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 黄色针状晶体,分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ 。ESI-MS m/z : 449 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.10 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'), 6.42 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.15 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.83-3.42 (6H, overlap, H-2''-6'')。 ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 179.69 (C-4), 166.03 (C-7), 163.08 (C-5), 161.60 (C-4'), 159.06 (C-9), 158.51 (C-2), 135.57 (C-3), 132.36 (C-2', 6'), 122.69 (C-1'), 116.10 (C-3', 5'), 105.67 (C-10), 104.94 (C-1'''), 99.87 (C-6), 94.73 (C-8), 77.13 (C-5''), 75.02 (C-3''), 73.01 (C-2''), 70.01 (C-4''), 61.98 (C-6'')。以上数据与文献(李昉等,2010)基本一致,故鉴定为 kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside。

化合物 2 黄色无定型粉末,分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$ 。ESI-MS m/z : 595 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.08 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.14 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1'''), 1.13 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-6''')。 ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 179.41 (C-4), 166.24 (C-7), 163.07 (C-5), 161.53 (C-4'), 159.39 (C-2), 158.62 (C-9), 135.51 (C-3), 132.38 (C-2', 6'), 122.77 (C-1'), 116.14 (C-3', 5'), 104.63 (C-10), 104.58 (glc C-1'''), 102.44 (rha C-1'''), 100.05 (C-6), 94.91 (C-8), 78.15 (glc C-3''), 77.23 (glc C-5''), 75.77 (glc C-2''), 73.89 (rha C-4'''), 72.29 (glc C-4''), 72.10 (rha C-3'''), 71.45 (rha C-2''),

69.74 (rha C-5'''), 68.56 (glc C-6''), 17.92 (rha C-6'''). 上述数据与文献(冯卫生等, 2007)基本一致, 故鉴定为 kaempferol-3-*O*-rutinoside。

化合物 3 黄色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$ 。ESI-MS m/z : 303 [M+H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.74 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 7.64 (1H, dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 177.34 (C-4), 165.66 (C-7), 162.53 (C-9), 158.26 (C-5), 148.77 (C-2), 146.24 (C-3'), 137.24 (C-3), 124.15 (C-1'), 121.66 (C-6'), 116.22 (C-5'), 115.98 (C-2'), 104.50 (C-10), 99.25 (C-6), 94.41 (C-8)。上述数据与文献(周威等, 2013)基本一致, 故鉴定为槲皮素(querceetin)。

化合物 4 白色针晶, 分子式为 $C_{27}H_{44}O_7$ 。ESI-MS m/z : 481 [M+H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.77 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-7), 3.91 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-3), 3.80 (1H, ddd, $J=12.1, 4.5, 3.1$ Hz, H-2), 3.27 (1H, dq, $J=10.6, 1.4$ Hz, H-22), 3.11 (1H, ddd, $J=10.4, 7.4, 2.5$ Hz, H-9), 1.17 (3H, s, 27-OCH₃), 1.16 (3H, s, 26-OCH₃), 1.15 (3H, s, 21-OCH₃), 0.93 (3H, s, 19-OCH₃), 0.85 (3H, s, 18-OCH₃)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 206.44 (C-6), 167.97 (C-8), 122.13 (C-7), 85.21 (C-14), 78.40 (C-22), 77.89 (C-20), 71.29 (C-25), 68.69 (C-2), 68.50 (C-3), 51.77 (C-5), 50.51 (C-17), 49.85 (C-13), 42.38 (C-24), 39.26 (C-10), 37.35 (C-1), 35.06 (C-9), 32.84 (C-4), 32.50 (C-15), 31.77 (C-12), 29.71 (C-27), 28.95 (C-26), 27.32 (C-16), 24.41 (C-19), 21.51 (C-11), 21.49 (C-23), 21.05 (C-21), 18.05 (C-18)。上述数据与文献(Darwish & Reinecke, 2003)基本一致, 故鉴定为 20-hydroxyecdysone。

化合物 5 白色针晶, 分子式为 $C_{27}H_{44}O_6$ 。ESI-MS m/z : 465 [M+H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.82 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H-7), 3.96 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-3), 3.92~3.80 (1H, m, H-2), 3.60 (1H, ddd, $J=10.2, 3.2, 1.7$ Hz, H-

22), 3.16 (1H, ddd, $J=10.2, 7.0, 2.6$ Hz, H-9), 2.39 (1H, dd, $J=12.9, 4.5$ Hz, H-5), 1.21 (3H, s, 27-CH₃), 1.20 (3H, s, 26-CH₃), 0.98 (3H, s, 19-CH₃), 0.96 (3H, d, $J=6.8$ Hz, 21-CH₃), 0.74 (3H, s, 18-CH₃)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 206.53 (C-6), 167.62 (C-8), 122.01 (C-7), 85.08 (C-14), 75.25 (C-22), 71.41 (C-25), 68.70 (C-2), 68.51 (C-3), 51.78 (C-5), 48.80 (C-17), 48.13 (C-13), 43.45 (C-20), 42.25 (C-24), 39.24 (C-10), 37.36 (C-1), 35.25 (C-9), 32.88 (C-4), 32.08 (C-12), 32.04 (C-15), 29.61 (C-27), 29.10 (C-26), 27.01 (C-16), 25.33 (C-23), 24.48 (C-19), 21.58 (C-11), 16.20 (C-18), 13.34 (C-21)。上述数据与文献(Budesinsky et al., 2008)基本一致, 故鉴定为 α -ecdysone。

化合物 6 白色针晶, 分子式 $C_{27}H_{44}O_6$ 。ESI-MS m/z : 465 [M+H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.82 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H-7), 3.96 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-3), 3.84 (1H, ddd, $J=12.2, 4.5, 3.1$ Hz, H-2), 3.16 (1H, ddd, $J=11.3, 7.1, 2.3$ Hz, H-9), 1.28 (3H, s, 21-CH₃), 1.20 (6H, s, 26, 27-CH₃), 0.97 (3H, s, 19-CH₃), 0.86 (3H, s, 18-CH₃)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 206.46 (C-6), 168.10 (C-8), 122.08 (C-7), 85.52 (C-14), 75.98 (C-20), 71.47 (C-25), 68.70 (C-2), 68.51 (C-3), 53.34 (C-5), 51.80 (C-17), 48.06 (C-13), 45.89 (C-24), 45.49 (C-22), 39.26 (C-10), 37.36 (C-1), 35.05 (C-9), 32.87 (C-4), 32.38 (C-15), 31.58 (C-12), 29.34 (C-27), 29.10 (C-26), 26.47 (C-19), 24.40 (C-21), 21.97 (C-11), 21.51 (C-16), 20.11 (C-23), 18.13 (C-18)。上述数据与文献(程永现等, 2001)基本一致, 故鉴定为 22-deoxyecdysone。

化合物 7 白色针晶, 分子式 $C_{27}H_{44}O_7$ 。ESI-MS m/z : 497 [M+H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.82 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H-7), 3.95 (1H, d, $J=2.9$ Hz, H-22), 3.84 (1H, ddd, $J=12.1, 4.4, 3.0$ Hz, H-3), 3.66 (1H, dd, $J=10.4, 2.0$ Hz, H-2), 3.53 (1H, dd, $J=9.6, 2.1$ Hz, H-24), 3.16 (1H, ddd, $J=10.7, 5.2, 2.0$

Hz, H-9), 1.23 (3H, s, H-21), 1.20 (3H, s, H-27), 1.16 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H-18), 0.90 (3H, s, H-19)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 206.44 (C-6), 167.92 (C-8), 122.17 (C-7), 85.22 (C-14), 80.37 (C-24), 78.48 (C-22), 77.82 (C-20), 73.40 (C-25), 68.71 (C-2), 68.52 (C-3), 51.80 (C-5), 50.49 (C-17), 48.61 (C-13), 39.27 (C-10), 37.36 (C-1), 35.10 (C-9), 32.98 (C-23), 32.87 (C-4), 32.48 (C-15), 31.79 (C-12), 26.26 (C-26), 24.50 (C-27), 24.41 (C-19), 21.57 (C-16), 21.52 (C-21), 21.00 (C-11), 18.08 (C-18)。上述数据与文献(程春梅等, 2010)基本一致, 故鉴定为 abutasterone。

化合物 8 无色针状结晶, C₂₇H₄₄O₇。ESI-MS *m/z*: 481 [M+H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.82 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-7), 3.96 (1H, br s, H-3), 3.85 (1H, dt, *J* = 11.5, 3.5 Hz, H-2), 3.64~3.60 (1H, m, H-24), 3.60~3.57 (1H, m, H-22), 3.16 (1H, m, H-9), 1.22 (3H, s, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-27), 0.92 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-26), 0.90 (3H, s, H-18)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 206.43 (C-6), 167.90 (C-8), 122.16 (C-7), 85.19 (C-14), 77.74 (C-20), 77.55 (C-22), 77.45 (C-24), 68.70 (C-2), 68.51 (C-3), 51.79 (C-5), 50.44 (C-17), 48.58 (C-13), 39.26 (C-10), 37.36 (C-1), 35.74 (C-23), 35.09 (C-9), 34.10 (C-25), 32.87 (C-4), 32.49 (C-12), 31.77 (C-15), 24.41 (C-19), 21.54 (C-16), 21.54 (C-11), 20.95 (C-21), 19.36 (C-27), 18.05 (C-18), 16.97 (C-26)。上述数据与文献(梅文莉等, 2006)基本一致, 故鉴定为 pterosterone。

化合物 9 白色无定型粉末, 分子式为 C₂₆H₃₄O₁₁。ESI-MS *m/z*: 523 [M+H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 6.94 (1H, s, H-2'), 6.92 (1H, s, H-6'), 6.61~6.55 (3H, overlap, H-2, 7', 5), 6.49 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.31 (1H, dt, *J* = 15.8, 5.7 Hz, H-8'), 4.69 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), 4.23 (2H, d, *J* = 5.7, H-9'a, 9'b), 4.02~3.93 (1H, m, H-8), 3.84 (3H, s, OCH₃-3'), 3.78 (2H, overlap, H-9a, 6''

a), 3.70 (3H, s, OCH₃-3), 3.68 (2H, overlap, H-9b, 6''b), 3.49~3.39 (3H, overlap, H-2'', 3'', 4''), 3.16~3.11 (1H, m, H-5''), 2.98 (1H, dd, *J* = 13.8, 5.6 Hz, H-7a), 2.73 (1H, dd, *J* = 13.8, 9.3 Hz, H-7b)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 153.46 (C-3'), 148.41 (C-3), 145.36 (C-4), 144.99 (C-4'), 138.96 (C-5'), 135.38 (C-1'), 133.19 (C-1), 131.50 (C-7'), 129.64 (C-8'), 122.58 (C-6), 119.13 (C-6'), 115.64 (C-2), 113.71 (C-5), 109.06 (C-2'), 105.35 (C-1''), 78.09 (C-3''), 77.87 (C-5''), 75.95 (C-2''), 71.24 (C-4''), 66.82 (C-9), 63.68 (C-9'), 62.44 (C-6''), 56.35 (C-10), 56.22 (C-10'), 42.81 (C-8), 39.17 (C-7)。上述数据与文献(Van et al., 2008)基本一致, 故鉴定为 icariside E₅。

化合物 10 白色无定型粉末, 分子式为 C₂₆H₃₆O₁₁。ESI-MS *m/z*: 525 [M+H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 6.71 (2H, br s, H-2', 6'), 6.56~6.52 (2H, m, H-2, 5), 6.46 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, H-6), 4.60 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''), 3.95 (1H, m, H-8), 3.82 (1H, m, H-6''a), 3.79 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.76 (1H, m, H-9a), 3.74 (1H, m, H-6''b), 3.68 (3H, s, 3-OCH₃), 3.65 (1H, m, H-9b), 3.56 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-9'a, H-9'b), 3.44 (1H, m, H-3''), 3.40 (1H, m, H-2''), 3.32 (1H, m, H-4''), 3.11 (1H, ddd, *J* = 8.6, 5.3, 2.4 Hz, H-5''), 2.97 (1H, dd, *J* = 13.8, 5.5 Hz, H-7a), 2.70 (1H, dd, *J* = 13.8, 5.5 Hz, H-7b), 2.63 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-7'a, H-7'b), 1.85~1.76 (2H, m, H-8'a, H-8'b)。¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 153.10 (C-3'), 148.38 (C-3), 145.29 (C-4), 143.57 (C-4'), 140.33 (C-1'), 138.54 (C-5'), 133.34 (C-1), 122.58 (C-6), 120.33 (C-6'), 115.61 (C-2), 113.63 (C-5), 111.70 (C-2'), 105.58 (C-1''), 78.06 (C-3''), 77.87 (C-5''), 75.95 (C-2''), 71.23 (C-4''), 67.08 (C-9), 62.46 (C-6''), 62.20 (C-9'), 56.31 (C-10), 56.22 (C-10'), 42.79 (C-8), 39.21 (C-7), 35.59 (C-8'), 33.14 (C-7')。上述数据与文献(李慧娟等, 2014)基本一致, 故鉴定为 icariside E₃。

化合物 11 黄色固体, 分子式为 C₂₂H₂₆O₈。ESI-MS *m/z*: 419 [M+H]⁺, ¹H NMR (500 MHz,

CD₃OD) δ : 6.67 (4H, s, H-2, 6, 2', 6'), 4.73 (2H, d, $J=4.1$ Hz, H-7, 7'), 4.36~4.20 (2H, m, H-9), 3.89 (2H, dd, $J=9.1, 3.5$ Hz, H-9'), 3.86 (12H, s, -OCH₃×4), 3.18~3.12 (2H, m, H-8, 8')。 ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 149.35 (C-3', 5', 3'', 5''), 136.19 (C-4', 4''), 133.13 (C-1', 1''), 104.49 (C-2', 6', 2'', 6''), 87.63 (C-2, 6), 72.76 (C-4, 8), 56.79 (C-3', 5', 3'', 5''-OCH₃), 55.52 (C-1, 5)。上述数据与文献 (Wang et al., 2009) 一致, 故鉴定为 (+)-syringaresinol。

化合物 12 黄色固体, 分子式 C₂₀H₂₂O₆。ESI-MS m/z : 359 [M + H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.96 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-2, 2'), 6.82 (2H, dd, $J=8.2, 2.0$ Hz, H-6, 6'), 6.78 (2H, d, $J=8.1$ Hz, H-5, 5'), 4.72 (2H, d, $J=4.3$ Hz, H-7, 7'), 4.24 (2H, dd, $J=9.0, 6.8$ Hz, H-9 α , 9' α), 3.87 (6H, s, -OCH₃×2), 3.85 (2H, dd, $J=9.0, 3.6$ Hz, H-9 β , 9' β), 3.15 (2H, m, H-8, 8')。 ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 149.13 (C-3, 3'), 147.33 (C-4, 4'), 133.80 (C-1, 1'), 120.06 (C-6, 6'), 116.07 (C-5, 5'), 110.97 (C-2, 2'), 87.53 (C-7, 7'), 72.61 (C-9, 9'), 56.40 (C-OCH₃×2), 55.38 (C-8, 8')。上述数据与文献 (In et al., 2015) 基本一致, 故鉴定为 pinoresinol。

化合物 13 无定型粉末, 分子式为 C₂₀H₂₀O₇。ESI-MS m/z : 371 [M + H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.98 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-3'), 6.95 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-3), 6.85 (1H, dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, H-5'), 6.84 (1H, dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, H-5), 6.83 (1H, d, $J=7.8$, H-6'), 6.80 (1H, d, $J=7.8$, H-6), 5.40 (1H, d, $J=3.9$ Hz, H-7'), 5.24 (1H, d, $J=3.9$ Hz, H-7), 4.30 (1H, dd, $J=9.4, 6.9$ Hz, H-9' α), 4.04 (1H dd, $J=9.5, 6.9$ Hz, H-9' β), 3.88 (3H, s, 2'-OCH₃), 3.87 (3H, s, 2-OCH₃), 3.67 (1H, m, H-8'), 3.40~3.34 (1H, m, H-8)。 ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 179.69 (C-9), 149.39 (C-2'), 149.18 (C-2), 148.27 (C-1'), 147.49 (C-1), 133.19 (C-4'), 132.39 (C-4), 119.79 (C-5'), 119.50 (C-5), 116.43 (C-6'), 116.16 (C-6), 110.59 (C-3'), 109.69 (C-3), 87.18 (C-7'),

85.09 (C-7), 73.80 (C-9'), 56.48 (C-2'), 56.33 (C-2), 54.45 (C-8'), 51.02 (C-8)。上述数据与文献 (Ma et al., 2013) 基本一致, 故鉴定为 balanophonin B。

化合物 14 白色固体, 分子式为 C₁₈H₁₉O₄N。ESI-MS m/z : 336 [M + Na]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.43 (1H, d, $J=15.7$ Hz, H-8'), 7.11 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.05 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, 6), 7.02 (1H, dd, $J=8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5'), 6.71 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, 5), 6.40 (1H, d, $J=15.7$ Hz, H-7'), 3.88 (3H, s, -OCH₃), 3.46 (2H, dd, $J=8.0, 6.8$ Hz, H-8), 2.75 (2H, t, $J=7.4$ Hz, H-7)。 ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 169.19 (C-9'), 156.95 (C-4), 149.98 (C-4'), 149.32 (C-3'), 142.05 (C-7'), 131.29 (C-1), 130.73 (C-2, 6), 128.19 (C-1'), 123.24 (C-6'), 118.66 (C-8'), 116.49 (C-5'), 116.26 (C-3, 5), 111.50 (C-2'), 56.36 (C-OCH₃), 42.55 (C-8), 35.81 (C-7)。上述数据与文献 (Kan et al., 2011) 基本一致, 故鉴定为 *N-trans*-feruloyl tyramine。

化合物 15 无色针晶, 分子式 C₁₁H₁₆O₃。ESI-MS m/z : 197 [M + H]⁺, ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.76 (1H, s, H-7), 4.31~4.13 (1H, m, H-3), 2.43 (1H, dt, $J=14.0, 2.5$ Hz, H-4 α), 2.00 (1H, dd, $J=14.3, 2.3$ Hz, H-2 α), 1.77 (3H, s, CH₃-9), 1.74 (1H, dd, $J=14.0, 4.0$, H-4 β), 1.54 (1H, dd, $J=14.4, 3.7$ Hz, H-2 β), 1.48 (3H, s, CH₃-10), 1.28 (3H, s, CH₃-11)。 ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 185.69 (C-8), 174.44 (C-6), 113.34 (C-7), 88.96 (C-5), 67.25 (C-3), 47.98 (C-4), 46.44 (C-2), 37.19 (C-1), 31.02 (C-9), 27.43 (C-11), 26.96 (C-10)。上述数据与文献 (李燕等, 2010) 基本一致, 故鉴定为 (-)-loliolide。

化合物 16 白色片晶, C₁₆H₃₂O₂。ESI-MS m/z : 255 [M - H]⁻, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 2.32 (2H, t, $J=7.5$ Hz, -CH₂-COOH), 1.62 (2H, m, $J=7.5$ Hz, -CH₂-CH₂-CH₃), 0.87 (3H, t, $J=6.9$ Hz, -CH₂-CH₃)。 ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 177.68 (s), 33.97 (t), 32.06 (t),

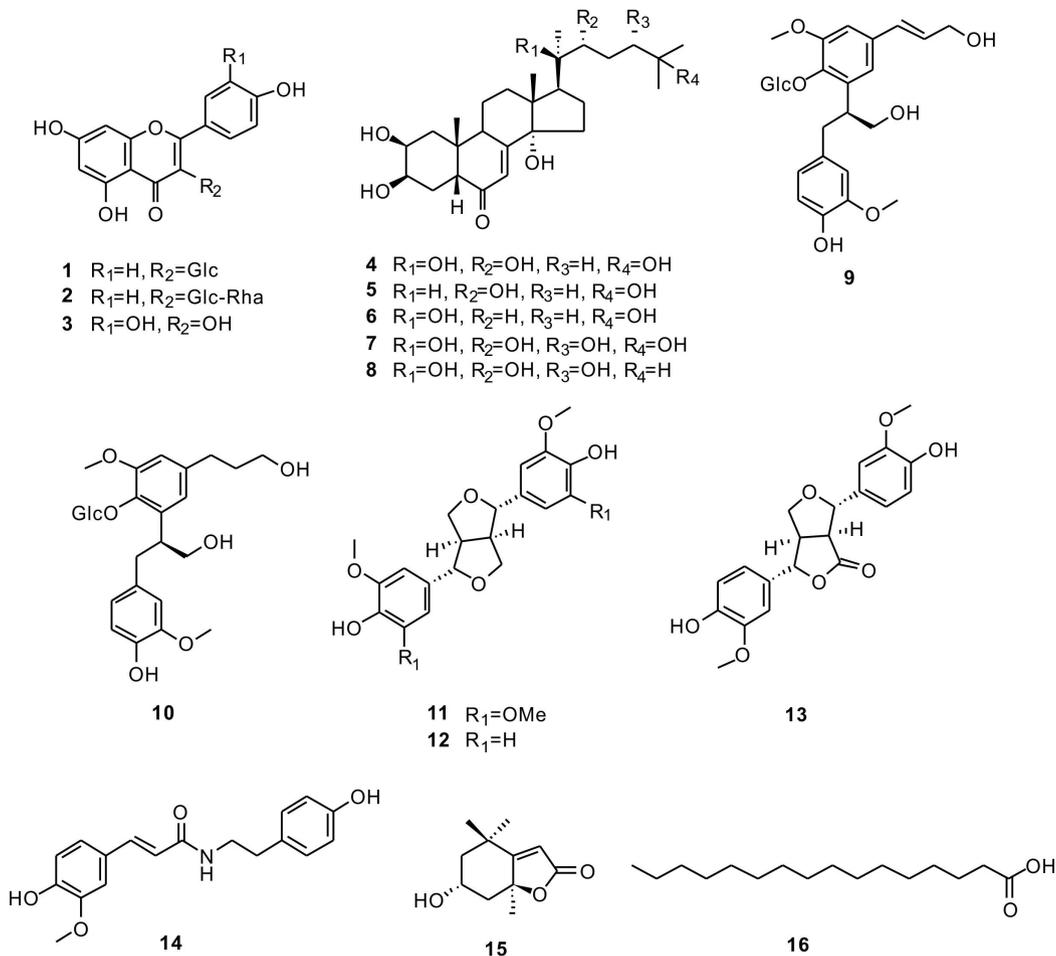


图 1 化合物 1-16 的结构式

Fig. 1 Structural formulas of compounds 1-16

29.82 (t), 29.8 (t) 1, 29.79 (t), 29.73 (t), 29.59 (t), 29.50 (t), 29.40 (t), 29.24 (t), 24.92 (t), 22.83 (t), 14.25 (q)。上述数据与文献(高幼衡等, 2002)基本一致, 故鉴定为棕榈酸 (palmitic acid)。

2.2 抗炎活性测试结果

利用 MTS 法检测细胞活力发现, 与阴性对照组相比, 浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 所测化合物的细胞活力均大于 100%, 表明所测化合物对 RAW 264.7 细胞均无细胞毒性(图 2:A)。

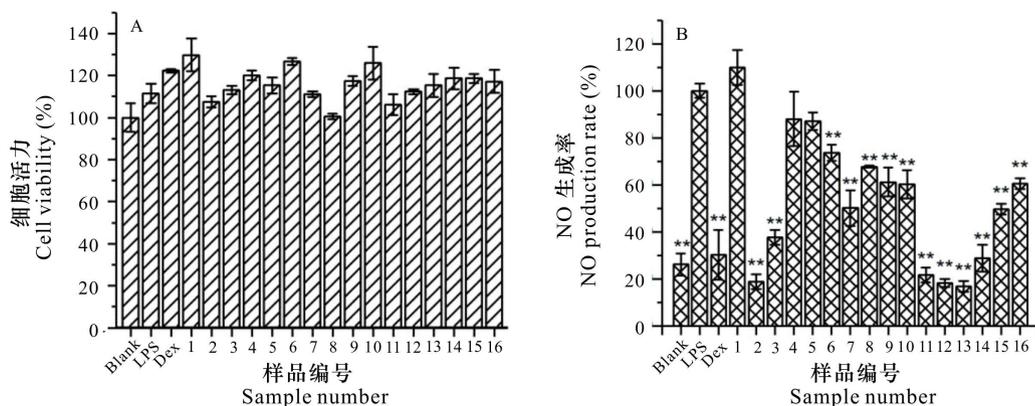
利用炎症模型评价发现, 与空白组相比, LPS 组的 NO 释放量显著增高, 表明造模成功。与 LPS 组相比, 在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下, 化合物 1、4、5 无明显抑制 NO 生成作用; 化合物 2、3、6-16 均能在一定程度上抑制 NO 生成; 其中, 化合物 2、3、11-14 抑制 NO 产生的能力与浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

的地塞米松相当(图 2:B); 进一步对其进行浓度梯度筛选, 结果表明, 化合物 2、3、11-14 对 NO 产生的抑制率均呈浓度依赖, IC_{50} 值分别为 18.63、40.76、21.46、14.32、16.82、42.31 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论与结论

本研究通过对拔毒散样品分离纯化, 共鉴定 16 个化合物, 涵盖了较多种类的化合物类型, 包括黄酮类 3 个(化合物 1-3)、甾体类蜕皮激素 5 个(化合物 4-8)、苯丙素类 2 个(化合物 9、10)、木脂素类 3 个(化合物 11-13)、酰胺类 1 个(化合物 14)、单萜类 1 个(化合物 15)以及脂肪酸类 1 个(化合物 16)。其中, 化合 1-3、9-13、16 均为在该植物中首次分离得到。

炎症反应是机体受到体内或体外因素的刺激



LPS、Dex、化合物测试浓度分别为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与 LPS 组相比, $** P < 0.01$ 。

LPS, Dex, compounds were tested at a concentration of $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. Compared with LPS group, $** P < 0.01$.

图 2 化合物 1-16 对 RAW 267.1 细胞活力(A) 及对 LPS 刺激细胞产生 NO(B) 的影响

Fig. 2 Effects of compounds 1-16 on cell viability (A) and NO production stimulated by LPS in RAW 264.7 cells (B)

而引发的应激防御性反应,与临床中其他病理过程的发生关系密切(于玲玲等,2021)。本研究利用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生 NO 为评价模型,综合化合物结构类型,发现拔毒散中主要抗炎活性成分为木脂素类化合物,且属于双四氢呋喃型木脂素。已有研究表明,双四氢呋喃型木脂素在抗炎、抗肿瘤、抗氧化、神经保护以及抗病毒等方面具有较好的活性(于森等,2013),其中的抗炎活性在本实验中得到验证,但该类成分抗炎活性的构效关系尚不明确。此外,在本研究中,拔毒散中含量较高的蜕皮激素类化合物抗炎效果并不理想。其他研究表明,该类化合物在抗氧化、防止内皮细胞损伤以及促进表皮细胞分化等方面具有一定作用(赵一路等,2010)。综上,通过抗炎和组织细胞修复等方式,拔毒散在傣族民间治疗诸疮肿毒、皮肤瘙痒、跌打损伤、刀枪伤等症状的用法有一定的科学依据。

本研究丰富了拔毒散的化学成分,明确了其具有抗炎效果的物质基础,验证了其在民间用法的科学性,为其进一步开发利用提供了思路及科学依据。

参考文献:

BUDESINSKY M, VOKAC K, HARMATHA J, et al., 2008. Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea*

carthamoides [J]. *Steroids*, 73(5): 502-514.

CHEN CM, 2010. Study on the chemical constituents of the root tuber of *Tinospora sagittate* var. *yunnanensis* (S · Y · Hu) H · S · Lo [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 41(5): 689-692. [程春梅, 2010. 云南青牛胆块根的化学成分研究 [J]. *中草药*, 41(5): 689-692.]

CHENG YX, ZHOU J, TAN NH, et al., 2001. Phytoecdysterones from *Cucubalus baccifer* (Caryophyllaceae) [J]. *Acta Bot Sin*, 43(3): 316-318. [程永现, 周俊, 谭宁华, 等, 2001. 狗筋蔓中的植物蜕皮甾酮类化合物 [J]. *植物学报*, 43(3): 316-318.]

DARWISH F, REINECKE MG, 2003. Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. [J]. *Phytochemistry*, 62(8): 1179-1184.

DUAN LG, PAN YX, LIN YF, 2013. Fresh medicine application compilation of Dai nationality [M]. Kunming: Yunnan Nationalities Press: 193-194. [段立纲, 潘玉秀, 林艳芳, 2013. 傣族鲜药应用汇编 [M]. 昆明: 云南民族出版社: 193-194.]

Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences, 1982. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [M]. Beijing: Science Press, 49(2): 20. [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, 49(2): 20.]

FENG WS, HAO ZY, ZHENG XK, et al., 2007. Chemical constituents from leaves of *Celastru sgemmatu* Loes [J]. *Acta Pharm Sin*, 42(6): 625-630. [冯卫生, 郝志友, 郑晓珂, 等, 2007. 哥兰叶化学成分的研究 [J]. *药学学报*, 42(6): 625-630.]

GAO YH, XU HH, DIAO YM, et al., 2002. Studies on

- chemical constituents of *Citrus medicda* L. var. *sarcodactylis* (Noot) Swingle [J]. Trad Chin Drug Res Pharmacol, 13(5): 315–316. [高幼衡, 徐鸿华, 刁远明, 等, 2002. 佛手化学成分的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 13(5): 315–316.]
- IN SJ, SEO KH, SONG NY, et al., 2015. Lignans and neolignans from the stems of *Vibrunum erosum* and their neuroprotective and anti-inflammatory activity [J]. Arch Pharm Res, 38(1): 26–34.
- KAN S, CHEN G, HAN C, et al., 2011. Chemical constituents from the roots of *Xanthium sibiricum* [J]. Nat Prod Res, 25(13): 1243–1249.
- LEI C, 2008. Studies on the chemical constituents and bioactivity of three medicinal plants [D]. Kunming: Kunming Institute of Botany: 111–112. [雷春, 2008. 三种药用植物的化学成分和生物活性研究 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所: 111–112.]
- LI F, LI XM, WANG BG, 2010. Chemical constituents of marine mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. Mar Sci, 34(10): 24–27. [李昉, 李晓明, 王斌贵, 2010. 海洋红树林植物木榄化学成分研究 [J]. 海洋科学, 34(10): 24–27.]
- LI HJ, WANG LX, LIU MQ, et al., 2014. Chemical constituents from the fruits of *Illicium lanceolatum* [J]. Chin Pharm J, 49(8): 636–639. [李慧娟, 王丽霞, 刘孟奇, 等, 2014. 披针叶茴香果实的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 49(8): 636–639.]
- LI WF, SONG QS, XIANG W, et al., 2006. Study on chemical constituents of *Sida szechuensis* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 37(9): 1304–1306. [李维峰, 宋启示, 项伟, 等, 2006. 拔毒散化学成分的研究 [J]. 中草药, 37(9): 1304–1306.]
- LI Y, WANG CL, WANG FF, et al., 2010. Chemical constituents of *Dendrobium candidum* [J]. Chin J Chin Mat Med, 35(13): 1715–1719. [李燕, 王春兰, 王芳菲, 等, 2010. 铁皮石斛化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 35(13): 1715–1719.]
- MA G, WU H, YUAN J, et al., 2013. Phenylpropanoid constituents from the seeds of *Lithocarpus pachylepis* [J]. Phytochem Lett, 6(1): 152–155.
- MEI WL, ZENG YB, DING ZT, et al., 2006. Isolation and identification of the chemical constituents from Mangrove plant *Acrostichum aureum* [J]. Chin J Med Chem, 16(1): 46–48. [梅文莉, 曾艳波, 丁中涛, 等, 2006. 红树植物卤蕨化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 16(1): 46–48.]
- QU SJ, 2006. Phytochemical studies on constituents of *Evodia fargesii* Dode and *Sida szechuensis* Matsuda [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Materia Medica: 5–6. [曲世津, 2006. 臭辣树和拔毒散化学成分的研究 [D]. 上海: 中国科学院上海药物研究所: 5–6.]
- VAN KIEM P, TRI MD, TUONG LVD, et al., 2008. Chemical constituents from the leaves of *Manglietia phuthoensis* and their effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Chem Pharm Bull Tokyo, 56(9): 1270–1275.
- WANG LQ, ZHAO YX, ZHOU L, et al., 2009. Lignans from *Gnetum montanum* Markgr. f. *megalocarpua* [J]. Chem Nat Compd, 45(3): 424–426.
- YAO CS, 2020. Study on chemical constituents from four medical plants [D]. Kunming: Kunming Institute of Botany: 34–35. [姚春所, 2000. 四种药用植物的化学成分研究 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所: 34–35.]
- YU LL, NING DS, FU YX, et al., 2021. Study on the chemical constituents and their anti-inflammatory activities of *Callicarpa longissimi* [J]. Guihaia, 41(11): 1875–1881. [于玲玲, 宁德生, 符毓夏, 2021. 尖尾枫化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 广西植物, 41(11): 1875–1881.]
- YU M, ZENG GY, TAN JB, et al., 2013. Research progress on the activities of lignans [J]. Centr S Pharm, 11(6): 452–456. [于淼, 曾光尧, 谭健兵, 等, 2013. 木脂素类化合物的活性研究进展 [J]. 中南药学, 11(6): 452–456.]
- ZHAO YL, XING ZY, CHEN JL, et al., 2010. Research advances in pharmacological effects of phytoecdysones [J]. Anti Infect Pharm, 7(3): 147–152. [赵一路, 邢朝云, 陈晶磊, 等, 2010. 植物蜕皮激素药理活性研究进展 [J]. 抗感染药学, 7(3): 147–152.]
- ZHOU W, CHENG QZ, CHEN X, et al., 2013. Studies on flavonoids of propolis collected in Tonglu of Zhejiang Province [J]. Chin J Trad Chin Med Pharm, 28(2): 394–397. [周威, 程清洲, 陈新, 等, 2013. 浙江桐庐产蜂胶中黄酮类化合物研究 [J]. 中华中医药杂志, 28(2): 394–397.]

(责任编辑 李 莉)