

# LC-MS 导向分离灯心草中激动 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的活性成分

杨通华<sup>1,2</sup>, 耿长安<sup>1</sup>, 黄晓燕<sup>1</sup>, 马云保<sup>1</sup>, 颜得秀<sup>1,2</sup>, 陈纪军<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201;

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 本文对灯心草 *Juncus effusus* 的活性部位进行研究, 在 LC-MS 导向下, 利用多种色谱技术(硅胶、氧化铝、Sephadex LH-20 和 HPLC) 从中分离得到 9 个化合物, 根据波谱学数据鉴定其化学结构为厄弗酚(1)、去氢厄弗酚(2)、灯心草酚(3)、juncuenin G(4)、dehydrojuncuenin D(5)、5-(hydroxymethyl)-1-methylphenanthrene-2,7-diol(6)、齐墩果酸(7)、5-羟甲基-2-呋喃糠醛(8)、麦芽酚-3-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷(9)。化合物 8、9 为首次从灯心草属植物中分离得到并且化合物 9 为首次从天然来源获到。在 1.0 mM 浓度下, 化合物 1、3、4 对 5-HT<sub>1A</sub> 受体的激动率分别为 65.35 ± 6.70%、71.33 ± 7.39% 和 64.11 ± 5.33%; 对 MT<sub>2</sub> 受体的激动率分别为 62.77 ± 12.06%、67.28 ± 9.26% 和 56.21 ± 11.43%。该研究首次利用 LC-MS 与活性追踪相结合的方法, 快速分离灯心草中激动 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的活性成分, 为其进一步开发与利用奠定了基础。

**关键词:** 灯心草; 化学成分; 5-HT<sub>1A</sub> 受体; MT<sub>2</sub> 受体; LC-MS

中图分类号: R284.1; R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.001

## LC-MS-Guided Isolation of Chemical Constituents from *Juncus effusus* with 5-HT<sub>1A</sub> and MT<sub>2</sub> Receptors-Agitating Activity

YANG Tong-hua<sup>1,2</sup>, GENG Chang-an<sup>1</sup>, HUANG Xiao-yan<sup>1</sup>, MA Yun-bao<sup>1</sup>, Yan De-xiu<sup>1,2</sup>, CHEN Ji-jun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; <sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Phytochemical studies on the active part of *Juncus effusus* resulted in the isolation of nine compounds using LC-MS and chromatographic techniques (Silica gel, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Sephadex LH-20 and HPLC). Their structures were identified as effusol (1), dehydroeffusol (2), juncusol (3), juncuenin G (4), dehydrojuncuenin D (5), 5-(hydroxymethyl)-1-methylphenanthrene-2,7-diol (6), oleanic acid (7), 2-formyl-5-hydroxymethylfuran (8) and maltol-3-O-β-D-glucopyranoside (9) by HR-ESI-MS and NMR methods. Compounds 8 and 9 were obtained from the genus *Juncus* for the first time, and compound 9 was firstly isolated from natural resource. Compounds 1, 3 and 4 showed significantly activity on 5-HT<sub>1A</sub> receptor with agitating rates of 65.35 ± 6.70%, 71.33 ± 7.39% and 64.11 ± 5.33%, and on MT<sub>2</sub> receptor with agitating rates of 62.77 ± 12.06%, 67.28 ± 9.26% and 56.21 ± 11.43% at the concentration of 1.0 mM. Compounds 2, 5 and 6 possessed moderate activities agitating 5-HT<sub>1A</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. These results provided valuable information for the further study and utilization of *J. effusus*.

**Key words:** *Juncus effusus*; chemical constituents; 5-HT<sub>1A</sub> receptor; MT<sub>2</sub> receptor; LC-MS

5-HT<sub>1A</sub> 受体是 5-羟色胺受体中的重要亚型之一, 与其相关的生理学和行为学功能包括认知、精神状态、抑郁、疼痛、焦虑等, 其激动剂主要用于治疗抑郁症和焦虑症, 同时还具有神经保护和治疗认知障

碍等潜在作用<sup>[1-3]</sup>。褪黑素是由松果体分泌的一种具有昼夜调节作用的神经递质<sup>[4]</sup>。除此之外, 褪黑素还具有调节免疫系统, 控制血压以及骨骼生成等作用<sup>[5]</sup>。临床上用褪黑素受体激动剂治疗节律性失眠, 抑郁症和调节时差<sup>[6]</sup>。MT<sub>2</sub> 受体是褪黑素受体中的三个亚型之一, 其激动剂具有诱导褪黑素分泌, 脾细胞增殖, 控制血管舒张以及调节催产素受体基因表达<sup>[7]</sup>。本文利用 LC-MS 分析和 HEK293 细

收稿日期: 2016-02-17 接受日期: 2016-06-08

基金项目: 中国科学院“百人计划”

\* 通讯作者 Tel: 86-871-65223265; E-mail: chenjj@mail.kib.ac.cn

胞模型跟踪分离灯心草中激动 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的活性成分。

中药灯心草为灯心草科植物灯心草 (*Juncus effusus* L.) 的干燥茎髓, 性甘、淡, 微寒, 具有清心火, 利小便, 治疗心烦失眠, 尿少涩痛, 口舌生疮之功效<sup>[8]</sup>。化学成分研究表明灯心草中主要成分为菲类与 9,10-二氢菲类等<sup>[9-11]</sup>。现代药理研究表明灯心草具有抗菌、抗肿瘤、抗焦虑、镇静等多种生物活性<sup>[12-14]</sup>。前期研究表明厄弗酚、去氢厄弗酚和灯心草酚为灯心草的主要成分, 主要研究了去氢厄弗酚的促进小鼠小肠平滑肌收缩和镇静作用以及灯心草酚和厄弗酚的镇静作用<sup>[14-16]</sup>。而目前厄弗酚、灯心草酚和去氢厄弗酚以及灯心草中其它化合物对 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的激动活性未见报道。本文利用活性指导并结合 LC-MS 分析的方法, 从灯心草的活性部位中分离鉴定 9 个化合物, 其中 6 个菲类化合物, 3 个其他类化合物。化合物 **8**、**9** 为首次从灯心草属植物中分离得到并且化合物 **9** 为首次从天然产物中分离得到; 化合物 **1**、**3** 和 **4** 对 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体具有较好的激动活性, 化合物 **2**、**5** 和 **6** 显示一定的 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 激动作用。

## 1 仪器与材料

高分辨质谱用 LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto, Japan) 质谱仪测定。核磁共振谱用 Bruker AM-400、DRX-500 或 BrukerAvance III-600 型超导核磁共振仪 (Bruker, Bremerhaven, Germany) 测定; 高效液相为 Waters Aillance 2695 (Waters, USA), 半制备色谱柱为 Agilent Zorbax-ODS (5 μm, 9.4 × 250 mm)。薄层层析硅胶板 Si60 F254 购于默克化工技术 (上海) 有限公司; 柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目) 购自青岛青岛美高集团有限公司; 柱色谱氧化铝 (100 ~ 200 目) 购于上海五四化学试剂厂; Sephadex LH-20 购自 Pharmacia 公司。分析纯甲醇购自江苏汉邦科技有限公司; 显色剂为 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) 的乙醇溶液; 所用其他试剂均为化学纯或分析纯。

FlexStation 3 台式多功能酶标仪 (Bio-RAD 680, 美国); 倒置生物显微镜 (XD-101 型, 南京江南光电集团股份有限公司); CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo Forma 3310, 美国); 全自动立式压力蒸汽灭菌器 YXQ-LS-30S II (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 钙流检测试剂盒 Wash Free Fluo-8 (HD Biosciences Co. Ltd, 上海, 中国); SW-CJ 系列医用型超净工作台

(苏州安泰空气技术有限公司); 阳性药物 5-羟色胺和褪黑素分别购自 Affa Aesar 和 Damas-beta 公司。

灯心草于 2014 年 10 月购自云南省昆明市菊花村药材市场, 经中国科学院昆明植物研究所雷立公副研究员鉴定为灯心草 (*Juncus effusus* L.), 标本存放于中国科学院昆明植物研究所抗病毒与天然药物化学研究组 (No. 2014102101)。

## 2 实验方法

### 2.1 提取与分离

灯心草干燥茎髓 (1 kg) 粉碎, 加 90% 乙醇浸泡 24 h 后, 采用渗漉法提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩至小体积, 得到浸膏 35 g。浸膏用水溶解后, 加入 150 mL 乙酸乙酯萃取, 萃取 3 次后分别合并乙酸乙酯层和水层, 减压浓缩后得到乙酸乙酯部分 12.5 g, 水部分 22.5 g。乙酸乙酯部分经硅胶柱色谱 (240 g, 5.0 × 45 cm), 用乙酸乙酯-石油醚 (10:90 ~ 100:0) 梯度洗脱, 经 TLC 检查并合并相同流分后得到 7 个组分 (Fr. 1 ~ 7)。

Fr. 4 (660 mg) 经硅胶柱层析 (35 g, 2.5 × 30 cm), 氯仿-石油醚 (20:80) 洗脱, 得到四个组分 (Fr. 4-1 ~ 4-4)。Fr. 4-2 (35 mg) 经硅胶柱层析 (10 g, 1.5 × 30 cm), 用乙酸乙酯-石油醚 (5:95) 洗脱, 得到化合物 **3** (23 mg)。Fr. 4-3 (262 mg) 经硅胶柱层析 (15 g, 2.0 × 30 cm), 用乙酸乙酯-石油醚 (10:90) 洗脱, 得到化合物 **1** (105 mg) 和 **2** (114 mg)。Fr. 4-4 (215 mg) 经硅胶柱层析 (20 g, 2.0 × 30 cm), 经丙酮-石油醚 (10:90) 洗脱, 得到五个组分 (Fr. 4-4-1 ~ 4-4-5)。Fr. 4-4-3 (35 mg) 经硅胶柱层析 (10g, 1.5 × 30 cm), 用丙酮-石油醚 (5:95) 洗脱, 得到化合物 **7** (8 mg)。Fr. 4-4-5 (112 mg) 经硅胶柱层析 (15 g, 2.0 × 30 cm), 乙酸乙酯-石油醚 (15:85) 洗脱, 得到四个组分 (Fr. 4-4-5-1 ~ 4-4-5-4)。Fr. 4-4-5-3 (61 mg) 经氧化铝柱层析 (10g, 2.0 × 20 cm), 用乙酸乙酯-石油醚 (15:85) 洗脱, 得到两个组分 (Fr. 4-4-5-3-1 ~ 4-4-5-3-2)。Fr. 4-4-5-3-2 (16 mg) 经 Sephadex LH-20 (30 g, 1.4 × 120 cm), 用甲醇-氯仿 (50:50) 洗脱, 得到化合物 **5** (8 mg)。Fr. 4-4-5-3-1 (30 mg) 经 HPLC (Agilent Zorbax-ODS, 9.4 × 250 mm, 5 μm) 纯化, 乙腈-水 (72:28) 洗脱, 得到化合物 **4** (8 mg) 和化合物 **6** (10 mg)。Fr. 4-4-5-4 (37 mg) 经硅胶柱层析 (10 g, 2.0 × 20cm), 用甲醇-氯仿 (1:100 ~ 15:85) 梯度洗脱后, 再经硅胶柱层析 (10 g, 2.5

× 30 cm), 氯仿-甲醇(10:90)洗脱, 得到化合物 **8** (12 mg) 和 **9** (8 mg)。

## 2.2 活性测试方法

活性测试在 HEK293 细胞模型上完成, 具体实验方法参照文献<sup>[17]</sup>。采用 Dulbecco's 改良的 eagle 培养基, G418 (400 μg/mL) 和 10% 胎牛血清的培养基并放置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中培养。细胞在 Matrigel<sup>®</sup> 包被的 96 孔黑壁透底板中并在 CO<sub>2</sub> 中培养 24 h。化合物对 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的实验在钙流检测试剂盒 Wash Free Fluo-8 (激发波长: 485 nm; 发射波长: 525 nm; 发射截止: 515 nm) 完成。实验数据由 Flex Station 3 台式多功能酶标仪读取。EC<sub>50</sub> 值通过 GraphPad Prism 5 软件计算得到; 激动率 =  $\Delta\delta a / \Delta\delta c \times 100\%$  (a: 测试样品; c: 阳性对照), 阳性对照分别为 5 羟色胺和褪黑素。

## 2.3 LC-MS 测试条件

Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (100 × 2.1 mm i. d, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈(0.05% 甲酸) (A) 和水(0.05% 甲酸) (B), 梯度洗脱程序如下: 0 ~ 15 min, 5% ~ 100% A。柱温: 30 °C, 流速: 0.2 mL/min; Fr. 4-3 的液相色谱条件为: 0 ~ 15 min, 5% ~ 90% A, 流

速: 0.2 mL/min; Fr. 4-4 的液相色谱条件为: 0 ~ 3 min, 5% ~ 10% A; 3 ~ 10 min, 10% ~ 80%; 10 ~ 15 min, 80% ~ 100%, 流速: 0.2 mL/min。

质谱分析在正离子模式和负离子模式下测定。ESI 作为离子源, 喷雾电压为 +4.5/-3.5 kV; 检测电压: 1.65 kV; 飞行时间区域 (TOF) 压力:  $1.6 \times 10^{-4}$  Pa; 离子阱区域 (IT) 压力:  $1.5 \times 10^{-2}$  Pa; 干燥气压力: 100.0 kPa; 雾化气流速: 1.5 L/min; 曲线脱溶剂系统 (CDL) 温度: 200 °C; 扫描范围:  $m/z$  100 ~ 2000。岛津 Composition Formula Predictor 用来预测分子式。

## 3 结果与讨论

### 3.1 活性部位筛选

在 HEK293 细胞模型上, 测定灯心草总提物、乙酸乙酯部位和水部位对 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2C</sub>、MT<sub>1</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的激动作用; 选择活性较好的乙酸乙酯部位做进一步分离并得到七个子流分, 再测定这七个流分对 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2C</sub>、MT<sub>1</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的激动作用, 结果见表 1。

表 1 灯心草不同部位对 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2C</sub>、MT<sub>1</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的激动率 ( $n = 3, \bar{x} \pm SDs$ )

Table 1 Agonistic rates of different parts from *J. effusus* on 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors ( $n = 3, \bar{x} \pm SDs$ )

样品 <sup>a</sup> Sample	5-HT <sub>1A</sub> 受体激动率 <sup>b</sup> 5-HT <sub>1A</sub> receptor agonistic rates (%)	5-HT <sub>2C</sub> 受体激动率 <sup>b</sup> 5-HT <sub>2C</sub> receptor agonistic rates (%)	MT <sub>1</sub> 受体 激动率 <sup>c</sup> MT <sub>1</sub> receptor agonistic rates (%)	MT <sub>2</sub> 受体激动率 <sup>c</sup> MT <sub>2</sub> receptor agonistic rates (%)
总提物 Total extract	23.21 ± 5.75	11.21 ± 2.39	-3.70 ± 1.55	10.25 ± 4.28
水部分 Aqueous part	22.82 ± 8.59	8.12 ± 4.17	-1.22 ± 0.94	8.57 ± 2.38
乙酸乙酯部分 Ethyl acetate part	43.90 ± 6.71	10.63 ± 1.73	-2.03 ± 2.13	35.78 ± 10.31
Fr. 1	-0.63 ± 1.39	4.62 ± 1.20	-4.43 ± 1.97	-8.22 ± 5.67
Fr. 2	-1.64 ± 3.20	5.39 ± 0.85	-5.70 ± 3.30	-8.86 ± 2.94
Fr. 3	0.23 ± 0.28	7.87 ± 3.32	-2.90 ± 0.61	-14.90 ± 7.58
Fr. 4	59.14 ± 4.77	2.64 ± 0.25	-7.95 ± 2.49	67.74 ± 10.79
Fr. 5	29.73 ± 3.25	2.00 ± 1.91	-7.99 ± 1.38	-7.60 ± 1.37
Fr. 6	32.76 ± 6.82	7.43 ± 2.40	-8.66 ± 5.02	33.62 ± 9.23
Fr. 7	-1.09 ± 2.13	3.59 ± 1.94	-7.04 ± 2.81	-13.05 ± 3.59

注: <sup>a</sup> 样品测试浓度为 350.00 μg/mL; <sup>b</sup> 5-羟色胺的最大激动率作为 100%; <sup>c</sup> 褪黑素的最大激动率作为 100%。

Note: <sup>a</sup> The concentrations of samples were 350.00 μg/mL; <sup>b</sup> The highest agonistic rate of 5-HT was 100%; <sup>c</sup> The highest agonistic rate of melatonin was 100%.

活性筛选结果表明: 乙酸乙酯部位对 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的激动率均明显大于水部位。因此, 将乙酸乙酯部位分成七个流分, 发现 Fr. 4 对两个受体的激动率都有一定增加, 而其它流分的激动率均明显

降低, 这说明激动 5-HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的活性成分主要位于 Fr. 4 中。另外, 所有流分对 5-HT<sub>2C</sub> 和 MT<sub>1</sub> 受体的激动率均较低。因此, 本研究对活性部位 Fr. 4 进一步分离, 并测定从中分离得到的化合物对 5-

HT<sub>1A</sub> 和 MT<sub>2</sub> 受体的激动作用。

### 3.2 活性部位的 LC-MS 分析

为了确定活性部位 Fr. 4 中的化学成分,对其进行 UFLC/MS-IT-TOF 分析,结果如图 1。

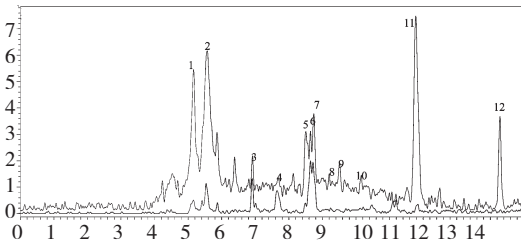


图 1 活性部位的 LC-MS 的 BPC 谱图(1 BPC 表示正离子模式,3 BPC 表示负离子模式)

Fig. 1 LC-MS base peak chromatogram (BPC) of the active fraction (1 BPC indicated positive mode, 3 BPC indicated negative mode)

通过分析图 1,活性部位主要含有 12 个基峰离子流色谱峰,再通过分析每个峰的一级与二级质谱,利用岛津 Composition Formula Predictor 预测其分子式与前期文献报道比对,推断该流分主要含有 6 个萜类化合物,2 个黄酮类,1 个含葡萄糖的化合物,1 个三萜类以及 2 个其他类化合物。接着对 Fr. 4 进一步分离,得到 Fr. 4-1 ~ 4 四个流分,以上四个流分

的 LC-MS 分析见附图 2。以分析 Fr. 4 中峰 1 为例介绍 LC-MS 的导向与分离过程。在 Fr. 4 中,根据正离子模式中的碎片离子 311.0725 ( $[M + Na]^+$ , -1.2) 和 289.0870 ( $[M + H]^+$ , -4.8) 以及负离子模式中的碎片离子 333.0820 ( $[M + HCOO]^-$ , -0.7) 和 287.0761 ( $[M-H]^-$ , -1.1), 预测得到分子式  $C_{12}H_{16}O_8$ , 不饱和度为 5 (表 2)。在其  $MS^2$  中,正离子模式中有 127.0389 ( $C_6H_6O_3$ ) 的碎片离子,负离子模式中有 161.0447 ( $C_6H_{10}O_5$ ) 的碎片离子 (附图 1)。因此,推测该化合物中有一个葡萄糖及一个  $C_6H_6O_3$  的片段。进一步分析各亚流分的 LC-MS,发现该化合物主要位于 Fr. 4-4 流分,因此对该流分进一步分离。经硅胶柱层析色谱等方法,分离得到化合物 9,再根据核磁数据最终确定为麦芽酚-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖。化合物 9 可能的裂解方式为失去一分子葡萄糖 ( $C_6H_{10}O_5$ ) 得到  $C_6H_6O_3$  的离子碎片或失去中性碎片  $C_6H_6O_3$  得到  $C_6H_{10}O_5$  的离子碎片,具体见附图 2。其余化合物的分析过程与化合物 9 的相同,在 LC-MS 分析引导下分离得到其它 8 个化合物,其 LC-MS 分析数据和 BPC 图谱见表 2 和图 2。将分离得到的 9 个化合物经高分辨质谱仪测定其分子量预测得到分子式,分别与前面分析的分子式进行对比,确认为追踪的目标化合物。

表 2 活性部位中化学成分的确定

Table 2 The identification of chemical constituents in the active fraction

编号 No.	分子量 MW	正离子模式 ( $m/z$ ) Ion in positive mode MS/MS <sup>2</sup> (error in mDa and relative abundance)	负离子模式 ( $m/z$ ) Ion in negative mode MS/MS <sup>2</sup> (error in mDa and relative abundance)	不饱和度 DBE	分子式 Formula	化合物 Compounds
1	288	311.0725 ( $[M + Na]^+$ , -1.2) 289.0870 ( $[M + H]^+$ , -4.8) →127.0389 ( $C_6H_6O_3$ , 100%)	333.0820 ( $[M + HCOO]^-$ , -0.7) 287.0761 ( $[M-H]^-$ , -1.1) →161.0447 ( $C_6H_{10}O_5$ , 100%)	5	$C_{12}H_{16}O_8$	麦芽酚-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖(9)
2	126	127.0365 ( $[M + H]^+$ , -2.5)	125.0211 ( $[M-H]^-$ , -3.3)	4	$C_6H_6O_3$	5-羟甲基-2-呋喃糠醛(8)
3	286	287.0510 ( $[M + H]^+$ , -4.0)	285.0371 ( $[M-H]^-$ , -3.4)	11	$C_{15}H_{10}O_6$	-
4	414	437.1159 ( $[M + Na]^+$ , -4.8) 415.1439 ( $[M + H]^+$ , -5.2)	413.1231 ( $[M-H]^-$ , -1.1)	12	$C_{22}H_{22}O_8$	-
5	250	251.1088 ( $[M + H]^+$ , -2.1)	295.0958 ( $[M + HCOO]^-$ , -1.8) 249.0921 ( $[M-H]^-$ , -0.0)	11	$C_{17}H_{14}O_2$	去氢厄弗酚(2)
6	252	505.2333 ( $[2M + H]^+$ , -4.0) 253.1221 ( $[M + H]^+$ , -0.2)	503.2169 ( $[2M-H]^-$ , -5.9) 297.1106 ( $[M + HCOO]^-$ , -2.6) 251.1079 ( $[M-H]^-$ , -0.1)	10	$C_{17}H_{16}O_2$	厄弗酚(1)
7	266	533.2704 ( $[2M + H]^+$ , -4.0) 267.1361 ( $[M + H]^+$ , -1.9)	311.1350 ( $[M + HCOO]^-$ , -2.1) 265.1226 ( $[M-H]^-$ , -0.8)	10	$C_{18}H_{18}O_2$	灯心草酚(3)

编号 No.	分子量 MW	正离子模式 ( $m/z$ ) Ion in positive mode MS/MS <sup>2</sup> (error in mDa and relative abundance)	负离子模式 ( $m/z$ ) Ion in negative mode MS/MS <sup>2</sup> (error in mDa and relative abundance)	不饱和度 DBE	分子式 Formula	化合物 Compounds
8	298	321.1451 ( $[M+Na]^+$ , -1.0) 299.1609 ( $[M+H]^+$ , -3.3)	297.1466 ( $[M-H]^-$ , -3.0)	9	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	juncuenins G(4)
9	296	319.1232 ( $[M+Na]^+$ , -7.3) 297.1520 ( $[M+H]^+$ , 3.5)	295.1326 ( $[M-H]^-$ , -1.4)	10	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	dehydrojuncuenins D(5)
10	248	249.0895 ( $[M+H]^+$ , -1.5)	247.0777 ( $[M-H]^-$ , 1.2)	12	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	5-(hydroxymethyl)-1- methylphen-anthrene-2,7-diol(6)
11	278	301.1370 ( $[M+Na]^+$ , -4.0) 279.1572 ( $[M+H]^+$ , -1.9)	-	6	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	-
12	456	913.7473 ( $[2M+H]^+$ ) 457.3675 ( $[M+H]^+$ , -0.1) →439.3564 ( $[M-H_2O+H]^+$ , 100%)	911.7198 ( $[2M-H]^-$ ) 455.3735 ( $[M-H]^-$ , -1.6)	7	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	齐墩果酸(7)

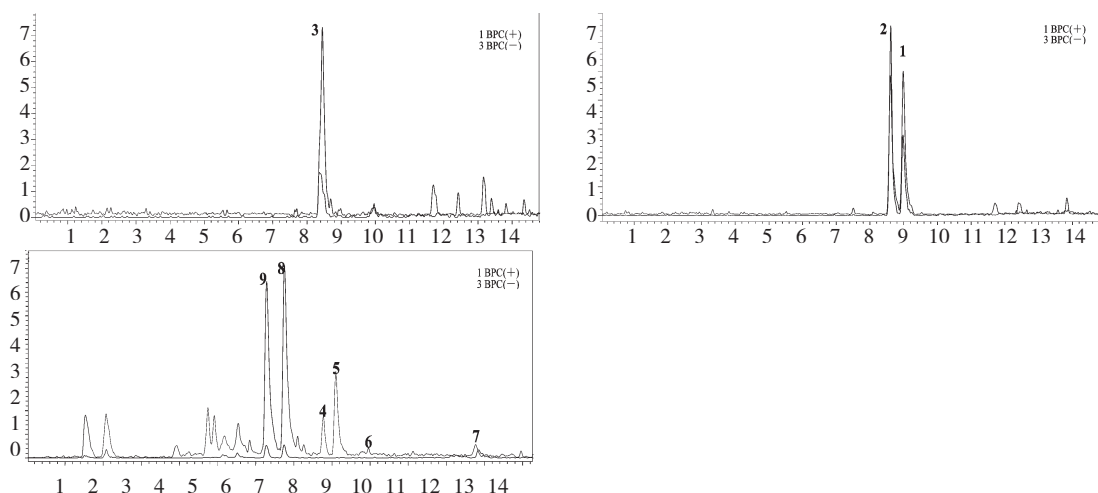


图2 三个亚流分 LC-MS 的 BPC 谱图 (编号为化合物, 1 BPC 表示正离子模式, 3 BPC 表示负离子模式)

Fig. 2 LC-MS base peak chromatogram (BPC) of three subfractions (Numbers indicated compounds, 1 BPC indicated positive mode, 3 BPC indicated negative mode)

### 3.3 化合物的结构鉴定

**化合物 1** 淡黄色粉末; HR-ESI-MS (-)  $m/z$  251.1075  $[M-H]^-$  (计算值 251.1078)。<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)  $\delta_H$ : 7.19 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-4), 6.94 (1H, dd,  $J = 17.4, 10.9$  Hz, H-12), 6.90 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-6), 6.74 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3), 6.72 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-8), 5.64 (1H, dd,  $J = 17.4, 1.2$  Hz, H-13a), 5.20 (1H, dd,  $J = 10.9, 1.2$  Hz, H-13b), 2.67 (2H, m, H-9), 2.62 (2H, m, H-10), 2.67 (3H, s, H-11); <sup>13</sup>C NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 150 MHz)  $\delta_C$ : 121.6 (s, C-1), 139.8 (s, C-1a), 154.7 (s, C-2), 112.3 (d, C-3), 127.1 (d, C-4), 126.5 (s, C-4a), 136.7 (s, C-5), 127.9 (s, C-

5a), 113.4 (d, C-6), 156.3 (s, C-7), 115.0 (d, C-8), 141.2 (s, C-8a), 31.0 (t, C-9), 26.1 (t, C-10), 11.8 (q, C-11), 139.8 (d, C-12), 113.6 (t, C-13)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>中的化合物对照一致, 鉴定化合物 **1** 为厄弗酚 (effusol)。

**化合物 2** 淡黄色粉末; HR-ESI-MS (-)  $m/z$  249.0918  $[M-H]^-$  (计算值 249.0921)。<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)  $\delta_H$ : 8.49 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-4), 7.89 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-10), 7.64 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-9), 7.47 (1H, dd,  $J = 17.2, 10.7$  Hz, H-12), 7.25 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-6), 7.21 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-8), 7.19 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-3), 5.74 (1H, dd,  $J = 17.2, 1.4$  Hz, H-

13a), 5.42 (1H, dd,  $J = 10.7, 1.4$  Hz, H-13b), 2.56 (3H, s, H-11);  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 118.1 (s, C-1), 133.4 (s, C-1a), 153.0 (s, C-2), 115.8 (d, C-3), 127.0 (d, C-4), 125.7 (s, C-4a), 139.2 (s, C-5), 124.0 (s, C-5a), 119.3 (d, C-6), 155.2 (s, C-7), 112.5 (d, C-8), 134.2 (s, C-8a), 127.2 (d, C-9), 123.9 (d, C-10), 11.3 (q, C-11), 142.6 (d, C-12), 114.4 (t, C-13)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>中的化合物对照一致, 鉴定化合物 **2** 为去氢厄弗酚 (dehydroeffusol)。

**化合物 3** 淡黄色粉末; HR-ESI-MS (+)  $m/z$  267.1383 [M + H]<sup>+</sup> (计算值 267.1380)。 $^1\text{H}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.41 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-4), 6.78 (1H, dd,  $J = 18.0, 11.4$  Hz, H-12), 6.59 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-3), 6.64 (1H, s, H-8), 5.44 (1H, dd,  $J = 11.4, 2.0$  Hz, H-13a), 5.15 (1H, dd,  $J = 18.0, 2.0$  Hz, H-13b), 2.64 (2H, m, H-9), 2.56 (2H, m, H-10), 2.23 (3H, s, H-11), 2.19 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 120.1 (s, C-1), 139.0 (s, C-1a), 153.0 (s, C-2), 110.6 (d, C-3), 127.8 (d, C-4), 126.3 (s, C-4a), 136.8 (s, C-5), 126.6 (s, C-5a), 120.6 (s, C-6), 153.3 (s, C-7), 112.3 (d, C-8), 136.2 (s, C-8a), 30.1 (t, C-9), 25.4 (t, C-10), 10.5 (q, C-11), 138.1 (d, C-12), 117.8 (t, C-13)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>中的化合物对照一致, 鉴定化合物 **3** 为灯心草酚 (juncusol)。

**化合物 4** 淡黄色粉末; HR-ESI-MS (-)  $m/z$  297.1471 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 297.1496)。 $^1\text{H}$  NMR (Acetone- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.99 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-4), 6.95 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 6.77 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3), 6.67 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 4.93 (1H, q,  $J = 6.0$  Hz, H-12), 3.02 (2H, q,  $J = 6.6$  Hz, H-14), 2.51 (2H, m, H-9), 2.41 (2H, m, H-10), 2.21 (3H, s, H-11), 1.51 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-13), 0.95 (3H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-15);  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 121.6 (s, C-1), 140.9 (s, C-1a), 154.6 (s, C-2), 112.4 (d, C-3), 127.0 (d, C-4), 126.4 (s, C-4a), 142.9 (s, C-5), 127.8 (s, C-5a), 112.4 (d, C-6), 156.6 (s, C-7), 114.2 (d, C-8), 140.3 (s, C-8a), 31.5 (t, C-9), 26.4 (t, C-10), 11.9 (q, C-11), 73.7 (d, C-12), 24.0 (q, C-13), 63.4 (t, C-14), 15.7 (q, C-15)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>中的化合物对照一致, 鉴定化合物

**4** 为 juncuenin G。

**化合物 5** 淡黄色粉末; HR-ESI-MS (-)  $m/z$  295.1331 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 295.1340)。 $^1\text{H}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.94 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-4), 7.81 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-9), 7.54 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-10), 7.44 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-6), 7.10 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 7.09 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3), 5.53 (1H, q,  $J = 6.1$  Hz, H-12), 3.00 (2H, m, H-14), 2.53 (3H, s, H-11), 1.79 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-13), 1.03 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-15);  $^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 118.9 (s, C-1), 134.2 (s, C-1a), 153.3 (s, C-2), 115.8 (d, C-3), 127.0 (d, C-4), 125.5 (s, C-4a), 144.3 (s, C-5), 125.5 (s, C-5a), 116.4 (d, C-6), 155.9 (s, C-7), 112.4 (d, C-8), 134.7 (s, C-8a), 128.3 (d, C-9), 123.7 (d, C-10), 11.4 (q, C-11), 76.0 (d, C-12), 24.1 (q, C-13), 64.6 (t, C-14), 15.5 (q, C-15)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>中的化合物对照一致, 鉴定化合物 **5** 为 dehydrojuncuenin D。

**化合物 6** 淡黄色粉末; HR-ESI-MS (+)  $m/z$  249.0898 [M + H]<sup>+</sup> (计算值 249.0910)。 $^1\text{H}$  NMR (Acetone- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.88 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-10), 6.64 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-9), 6.63 (1H, s, H-3), 6.55 (1H, s, H-4), 6.55 (1H, s, H-5), 6.31 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-6), 6.27 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 1.47 (3H, s, H-11);  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 120.4 (s, C-1), 153.9 (s, C-2), 112.7 (d, C-3), 121.0 (s, C-3a), 128.1 (d, C-4), 127.1 (d, C-5), 133.3 (s, C-5a), 112.4 (d, C-6), 155.8 (s, C-7), 112.4 (d, C-8), 121.0 (s, C-8a), 127.8 (d, C-9), 124.9 (d, C-10), 130.7 (s, C-10a), 132.7 (s, C-10b), 130.9 (s, C-10c), 11.4 (q, C-11)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>中的化合物对照一致, 鉴定化合物 **6** 为 5-(hydroxymethyl)-1-methylphenanthrene-2,7-diol。

**化合物 7** 白色粉末; HR-ESI-MS  $m/z$  457.3675 [M + H]<sup>+</sup> (计算值 457.3676);  $m/z$  455.3531 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 455.3519), 其分子式预测为 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> ( $\Omega = 7.0$ )。其最大紫外吸收为 207 nm。经与齐墩果酸进行 TLC 薄层层析对照, 采用三个展开剂即氯仿-石油醚 (30:70), 其  $R_f = 0.50$ ; 乙酸乙酯-石油醚 (20:80), 其  $R_f = 0.62$ ; 丙酮-石油醚 (15:85), 其  $R_f = 0.60$ ; 均与齐墩果酸的  $R_f$  值一致。

经硫酸乙醇(10%)显色为紫红色,与齐墩果酸一致。因此,化合物**7**的结构鉴定为齐墩果酸。

**化合物 8** 棕色油状;<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) δ<sub>H</sub>: 9.58 (1H, s, H-1), 7.36 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H-3), 6.57 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H-4), 4.62 (2H, s, H-6); <sup>13</sup>C NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 150 MHz) δ<sub>C</sub>: 178.0 (d, C-1), 153.4 (s, C-2), 123.0 (d, C-3), 110.1 (d, C-4), 162.8 (s, C-5), 57.4 (t, C-6)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>中的化合物对照一致,鉴定化合物**8**为5-羟甲基-2-咪喃糠醛。

**化合物 9** 白色粉末;HR-ESI-MS (+) *m/z* 289.0876 [M + H]<sup>+</sup> (计算值 289.0918)。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) δ<sub>H</sub>: 8.00 (1H, d, *J* = 5.6 Hz, H-5), 6.44 (1H, d, *J* = 5.6 Hz, H-6), 4.80 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-6'a), 3.65 (1H, m, H-6'b), 3.39 (1H, m, H-3'), 3.35 (1H, m, H-4'), 3.29 (1H, m, H-5'), 3.24 (1H, m, H-2'), 2.43 (3H, s, H-7); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) δ<sub>C</sub>: 143.6 (s, C-2), 164.6 (s, C-3), 177.2 (s, C-4), 117.3 (d, C-

5), 157.2 (d, C-6), 15.3 (t, C-7), 105.4 (d, C-1'), 75.4 (d, C-2'), 78.5 (d, C-3'), 71.1 (d, C-4'), 78.0 (d, C-5'), 62.5 (t, C-6')。以上数据与文献<sup>[19]</sup>中的化合物对照一致,鉴定化合物**9**为麦芽酚-3-*O*-β-D-葡萄吡喃糖苷。

### 3.4 化合物的活性测定

利用 HEK293 细胞模型测定 9 个化合物对 5-HT<sub>1A</sub>和 MT<sub>2</sub> 受体的激动作用。测试结果表明:在 1.0 mM 下,厄弗酚(**1**)、灯心草酚(**3**)和 juncuenin G (**4**)对 5-HT<sub>1A</sub>受体有较好的激动作用,其激动率分别为 65.35 ± 6.70%、71.33 ± 7.39% 和 64.11 ± 5.33%;灯心草酚、厄弗酚和 juncuenin G 对 MT<sub>2</sub> 受体也有较好的激动作用,其激动率分别为 67.28 ± 9.26%、62.77 ± 12.06% 和 56.21 ± 11.43%。去氢厄弗酚和 dehydrojuncuenin D 对 MT<sub>2</sub> 受体有一定的激动作用,其激动率分别为 42.13 ± 8.54% 和 31.06 ± 6.21%。5-(hydroxymethyl)-1-methylphenanthrene-2,7-diol 对 5-HT<sub>1A</sub>受体也有一定的激动作用,其激动率为 37.04 ± 5.84%。见表 3。

表 3 9 个化合物对 5-HT<sub>1A</sub>和 MT<sub>2</sub> 受体的激动作用 (*n* = 3,  $\bar{x} \pm SDs$ )

Table 3 The agonistic rates of 9 compounds on 5-HT<sub>1A</sub> and MT<sub>2</sub> receptors (*n* = 3,  $\bar{x} \pm SDs$ )

化合物 <sup>a</sup> Compound	5-HT <sub>1A</sub> 受体激动率 <sup>b</sup>	MT <sub>2</sub> 激动率 <sup>c</sup>
	5-HT <sub>1A</sub> receptor agonistic rates (%)	MT <sub>2</sub> receptor agonistic rates (%)
厄弗酚 Effusol ( <b>1</b> )	65.35 ± 6.70	62.77 ± 12.06
去氢厄弗酚 Dehydroeffusol ( <b>2</b> )	38.21 ± 9.02	42.13 ± 8.54
灯心草酚 Juncosol ( <b>3</b> )	71.33 ± 7.39	67.28 ± 9.26
Juncuenin G ( <b>4</b> )	64.11 ± 5.33	56.21 ± 11.43
Dehydrojuncuenin D ( <b>5</b> )	26.72 ± 7.99	31.06 ± 6.21
5-(Hydroxymethyl)-1-methylphenanthrene-2,7-diol ( <b>6</b> )	37.04 ± 5.84	20.24 ± 3.35
齐墩果酸 Oleanic acid ( <b>7</b> )	7.32 ± 6.96	15.13 ± 5.67
5-羟甲基-2-咪喃糠醛 2-Formyl-5-hydroxymethylfuran ( <b>8</b> )	4.30 ± 5.47	6.58 ± 3.39
麦芽酚-3- <i>O</i> -β-D-葡萄吡喃糖苷 Maltol-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside ( <b>9</b> )	5.16 ± 2.41	4.23 ± 4.12

注:<sup>a</sup>样品测试浓度为 1.00 mM;<sup>b</sup>5-羟色胺的最大激动率作为 100%;<sup>c</sup>褪黑素的最大激动率作为 100%。

Note:<sup>a</sup>The concentrations of samples were 1.00 mM;<sup>b</sup>The highest agonistic rate of 5-HT was 100%;<sup>c</sup>The highest agonistic rate of melatonin was 100%.

## 4 结论

本文首次利用活性追踪并结合 LC-MS 分析的方法,从灯心草中快速分离得到了 9 个化合物。其中首次分离得到 2 个化合物;首次测定了灯心草中化学成分对 5-HT<sub>1A</sub>和 MT<sub>2</sub> 受体的激动作用。结果表明厄弗酚、juncuenin G 和灯心草酚对 5-HT<sub>1A</sub>和 MT<sub>2</sub> 受体有较好的激动作用,去氢厄弗酚和 dehydrojuncuenin D 对 5-HT<sub>1A</sub>和 MT<sub>2</sub> 受体也有一定的

激动作用。该研究首次揭示了灯心草中激动 5-HT<sub>1A</sub>和 MT<sub>2</sub> 受体活性成分,为其进一步开发与利用奠定了基础。

### 参考文献

- Olivier B, Soudijn W, Van WI. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor and its ligands: structure and function. *Prog Drug Res*, 1999, 52: 103-165.
- De Vry J. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists: recent development and

- controversial issues. *Psychopharmacology (Berlin)*, 1995, 121:1-26.
- 3 Berends AC, Luiten PG, Nyakas C. A review of the neuroprotective properties of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist repinotan HCl in ischemic stroke. *CNS Drug Rev*, 2005, 11:379-402.
  - 4 Arendt J. Melatonin; characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms*, 2005, 20:291-303.
  - 5 Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*, 2008, 85:335-353.
  - 6 Mor M, Rivara S, Pala D, et al. Recent advances in the development of melatonin MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptor agonists. *Expert Opin Ther Pat*, 2010, 20:1059-1077.
  - 7 Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, et al. International union of basic and clinical pharmacology. LXXV. nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*, 2010, 62:343-380.
  - 8 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 147.
  - 9 Greta MD, Fiorentino A, Mangoni L, et al. 9, 10-Dihydrophenanthrene metabolites from *Juncus effusus* L. *Tetrahedr Lett*, 1992, 33:5257-5260.
  - 10 Su XH, Yuan ZP, Liang B, et al. Phenanthrenes from *Juncus effusus*. *Planta Med*, 2013, 79:1447-1452.
  - 11 Yang Z, Li HX, Song FJ, et al. Diterpenoid and phenolic compounds from *Juncus effusus* L. *Helv Chim Acta*, 2007, 90:1289-1295.
  - 12 Hanawa F, Okamoto M, Towers GN. Antimicrobial DNA-binding photosensitizers from the common rush, *Juncus effusus*. *Photochem Photobiol*, 2002, 76:51-56.
  - 13 Armando A, Cruz D, Howard M, et al. Toxic effects of *Juncus sol*, a marsh plant phenolic extraction estuarine fish and shrimp. *Life Sci*, 1982, 30:1805-1810.
  - 14 Liao YJ, Zhai HF, Huang JM, et al. Anxiolytic and sedative effects of dehydroeffusol from *Juncus effusus* in mice. *Planta Med*, 2011, 77:416-420.
  - 15 Wang YG, Wang YL, Zhai HF, et al. Phenanthrenes from *Juncus effusus* with Anxiolytic and sedative activities. *Nat Prod Res*, 2012, 26:1234-1239.
  - 16 Di Fan, Zhai HF, Li P, et al. Effects of dehydroeffusol on spasmogen-induced contractile response of rat intestinal smooth muscles. *Planta Med*, 2014, 80:978-983.
  - 17 Yutaka H, James RE, Graham JG, et al. Identification of a phosphothionate analogue of lysophosphatidic acid (LPA) as a selective agonist of the LPA3 receptor. *J Biol Chem*, 2003, 278:11962-11969.
  - 18 Murai N, Yonaga M, Tanaka K. Palladium-catalyzed direct hydroxymethylation of aryl halides and triflates with potassium acetoxymethyltrifluoroborate. *Org Lett*, 2012, 14:1278-1281.
  - 19 Jody L, Major J, Cohen SM. Enzymatic activation of a matrix metalloproteinase inhibitor. *Chem Commun*, 2010, 46:1241-1243.