

# 槐角化学成分及其抗骨质疏松作用研究

张庆贺<sup>1</sup>, 柏金辰<sup>2</sup>, 孙冰雪<sup>1</sup>, 卢丹<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>吉林大学药学院, 长春 130021; <sup>2</sup>吉林大学第二医院药品管理部, 长春 130041

**摘要:** 研究槐角的化学成分及其抗骨质疏松作用。利用硅胶柱、ODS 反相硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱和半制备型高效液相等色谱技术对槐角进行分离纯化, 并结合化合物的理化性质和波谱数据确定化合物的结构。从槐角中分离得到 15 个化合物, 分别为染料木素(1)、山萘酚(2)、鸢尾苷(3)、芒柄花苷(4)、 $\alpha$ -鼠李异洋槐素(5)、鹰嘴豆芽素 A-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(6)、南酸枣苷(7)、thevetiaflavon(8)、香豌豆酚-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(9)、山萘酚-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(10)、槲皮苷(11)、山萘酚-3-O- $\beta$ -D-槐糖苷(12)、染料木素-7,4'-双葡萄糖苷(13)、槲皮素-3-O- $\beta$ -D-槐糖苷(14)、山萘酚-3-O- $\beta$ -D-槐糖-7-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷(15)。其中化合物 6~12, 14 为首次从该种植物中分离得到, 化合物 7, 8, 10, 14 为首次从该属植物中分离得到。对所分离的化合物进行了抗骨质疏松体外药理活性筛选, 结果表明除化合物 7 和 15 以外, 其他化合物均具有促进成骨细胞增殖作用。

**关键词:** 槐角; 异黄酮; 黄酮醇; 抗骨质疏松

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.9.011

## Chemical Constituent and Their Anti-osteoporosis Activities of Fructus Sophorae

ZHANG Qing-he<sup>1</sup>, BAI Jin-chen<sup>2</sup>, SUN Bing-xue<sup>1</sup>, LU Dan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China;

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China

**Abstract:** To study the chemical constituents from Fructus Sophorae, the dry mature fruits of *Sophora japonica* L. The constituents were separated and purified by silica gel column chromatography, ODS reversed phase column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and semi-preparative HPLC. Their structures were identified by physical and chemical properties and spectral data. Fifteen compounds were isolated from Fructus Sophorae, and identified as genistein (1), kaempferol (2), tectoridin (3), ononin (4),  $\alpha$ -rhamnoisorobin (5), sissotrin (6), choerospondin (7), thevetiaflavon (8), orobol-7-O- $\beta$ -D-glucoside (9), kaempferol-7-O- $\beta$ -D-glucoside (10), quercitrin (11), kaempferol-3-O- $\beta$ -D-sophoroside (12), genistein-7,4'-O- $\beta$ -D-diglucoside (13), quercetin-3-O- $\beta$ -D-sophoroside (14), kaempferol-3-O- $\beta$ -D-sophoroside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (15). Compounds 6-12 and 14 were obtained from this plant for the first time. Compounds 7, 8, 10 and 14 were obtained from genus *Sophora* Linn. for the first time. The isolated compounds were screened for anti-osteoporosis activities, and the results suggested that Fructus Sophorae can be an excellent source of natural antiosteoporosis agents. The results showed that all compounds can promote osteoblast proliferation except compounds 7 and 15.

**Key words:** Fructus Sophorae; isoflavanones; flavonols; anti-osteoporosis

槐角 Fructus Sophorae 为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥成熟果实, 性寒, 味苦, 归肝、大肠经。具有清热泻火, 凉血止血的功效。临床上常用于治疗肠热便血, 痔肿出血, 肝热头痛, 眩晕目赤<sup>[1]</sup>。目前报道的槐角中的化学成分主要有异黄

酮、黄酮醇、三萜皂苷、生物碱、氨基酸和磷脂等, 其中以异黄酮及其苷类含量最高<sup>[2]</sup>。现代药理学实验证明, 槐角具有抗炎<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、避孕<sup>[5]</sup>、抗癌<sup>[6]</sup>、抗骨质疏松<sup>[7]</sup>和抗血栓<sup>[8]</sup>的作用。本课题组在前期研究中发现, 槐角乙醇提取物的正丁醇和乙酸乙酯萃取液具有明显的促进成骨细胞增殖和分化的活性, 即具有抗骨质疏松的作用, 为了进一步探寻槐角抗骨质疏松作用的活性化合物, 阐明其构效关

系,本实验对槐角的化学成分进行了系统的研究,从槐角 70% 乙醇提取物的正丁醇部位和乙酸乙酯部位中分离得到了 15 个化合物,分别鉴定为染料木素(1)、山萘酚(2)、鸢尾苷(3)、芒柄花苷(4)、 $\alpha$ -鼠李异洋槐素(5)、鹰嘴豆芽素 A-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(6)、南酸枣苷(7)、thevetiaflavon(8)、香豌豆酚-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(9)、山萘酚-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(10)、槲皮苷(11)、山萘酚-3-O- $\beta$ -D-槐糖苷(12)、染料木素-7,4'-双葡萄糖苷(13)、槲皮素-3-O- $\beta$ -D-槐糖苷(14)、山萘酚-3-O- $\beta$ -D-槐糖-7-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷(15)。化合物 6~12、14 为首次从该种植物中分离得到,其中化合物 7、8、10、14 为首次从槐属植物中分离得到。对以上化合物进行体外抗骨质疏松作用筛选,其中化合物 1~3、5、11~14 具有明显的促进成骨细胞 MC3T3-E1 增殖的作用,可以作为预防或治疗骨质疏松的潜在药物。

## 1 仪器与材料

Bruker ARX-600 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司);Bruker ARX-500 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司);Waters Xevo G2-XS QToF 高分辨质谱仪(美国 Waters 公司);Waters Model 500 制备型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);YMC C<sub>18</sub> 制备型色谱柱(250 mm × 20 mm, 5  $\mu$ m);WRS-2A 型熔点测定仪(上海轩澄仪器有限公司);ZF-7 型手提式紫外检测灯(上海宝山顾村光电仪器厂);薄层硅胶 GF<sub>254</sub>、薄层色谱硅胶 G 和 200~300 目柱色谱硅胶(青岛海洋化工有限公司),Sephadex LH-20 凝胶(瑞典 GE Healthcare 公司),ODS C<sub>18</sub> 柱色谱填料(加拿大 Sili-cycle 公司);色谱甲醇、乙腈(美国 Fisher 公司),其他试剂均为分析纯试剂(北京化工厂)。

槐角药材于 2015 年 10 月采购于河北安国中药材批发市场,经吉林大学药学院王广树教授鉴定为植物槐 *Sophora japonica* L. 的成熟干燥果实—槐角 Fructus Sophorae,标本(No. FSJ-20151012)保存于吉林大学药学院。

## 2 提取与分离

将干燥的槐角(5.0 kg)粉碎后用 70% 的乙醇(40 L, 3 次)在 50~60 °C 下浸提三次,合并提取液,减压浓缩至无醇味得乙醇总提取物。总提取物加水混悬,分别依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,减压回收溶剂,得乙酸乙酯萃取部位约 77 g

和正丁醇萃取部位约 1400 g。乙酸乙酯萃取部位(76.0 g)经硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇(40:1→0:1, v/v)梯度洗脱,薄层色谱检测,合并相似流分,减压回收溶剂得到 7 个流分,分别为 Fr. E1-E7。Fr. E2 经硅胶柱分离,石油醚-乙酸乙酯-丙酮-水(10:4:1:1, 上层, v/v)洗脱得到化合物 1(70 mg)、2(63 mg)。Fr. E3 经反复柱色谱分离,乙酸乙酯-丙酮(40:1-1:1, v/v)梯度洗脱得到 3 个亚流分 Fr. E3.1-Fr. E3.3。Fr. E3.1 经硅胶柱分离,氯仿-甲醇(20:1, v/v)等度洗脱得到化合物 3(41 mg)。Fr. E3.2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离,甲醇洗脱,得到化合物 4(8 mg)、5(7 mg)。Fr. E3.3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和制备型高效液相色谱分离,得到化合物 6(10 mg)、7(8 mg)、8(8 mg)。Fr. E5 经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱分离,甲醇洗脱,得到化合物 9(15 mg)、10(5.0 mg)、11(6 mg)。正丁醇萃取部分(120.0 g)经硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇(20:1→0:1, v/v)梯度洗脱,得到 6 个流分,分别为 Fr. B1-B6。Fr. B3(34.0 g)经硅胶柱分离后再通过反向硅胶色谱柱分离,甲醇-水(30:1→100:0, v/v)梯度洗脱,得到化合物 12(620 mg)、13(9 mg)。Fr. B6 经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱分离,甲醇洗脱,得到化合物 14(5 mg)、15(8 mg)。

## 3 结构鉴定

化合物 1 浅黄色针晶(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 269 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 12.96 (1H, s, 5-OH), 10.86 (1H, s, 7-OH), 9.63 (1H, s, 4'-OH), 8.32 (1H, s, H-2), 7.37 (2H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-8), 6.22 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-6);<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 154.0 (C-2), 121.2 (C-3), 180.2 (C-4), 157.6 (C-5), 99.0 (C-6), 164.3 (C-7), 93.7 (C-8), 157.4 (C-9), 104.4 (C-10), 122.3 (C-1'), 130.2 (C-2', 6'), 115.1 (C-3', 5'), 162.0 (C-4')。以上数据与文献<sup>[9]</sup>基本一致,故鉴定化合物 1 为染料木素(Genistein)。

化合物 2 黄色针晶(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 285 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 12.42 (1H, s, 5-OH), 8.07 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-3', 5'), 6.46 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-8), 6.22 (1H, d,  $J$  =

2.1 Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 146.8 (C-2), 135.7 (C-3), 175.9 (C-4), 160.7 (C-5), 98.2 (C-6), 164.0 (C-7), 93.5 (C-8), 156.2 (C-9), 103.0 (C-10), 121.7 (C-1'), 129.5 (C-2', 6'), 115.4 (C-3', 5'), 159.2 (C-4')。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **2** 为山萘酚 (Kaempferol)。

**化合物 3** 白色粉末 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 461 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ 。 $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 12.94 (1H, s, 5-OH), 9.63 (1H, s, 4'-OH), 8.45 (1H, s, H-2), 7.40 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2', 6'), 6.89 (1H, s, H-8), 6.83 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3', 5'), 3.76 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 5.18 (1H, d,  $J = 4.5$  Hz, H-1''), 3.17 ~ 3.47 (m, other sugar protons);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 152.9 (C-2), 121.1 (C-3), 180.8 (C-4), 152.5 (C-5), 132.5 (C-6), 156.6 (C-7), 94.0 (C-8), 154.7 (C-9), 106.5 (C-10), 122.1 (C-1'), 130.2 (C-2', 6'), 115.1 (C-3', 5'), 157.5 (C-4'), 100.2 (C-1''), 73.1 (C-2''), 77.3 (C-3''), 69.7 (C-4''), 76.7 (C-5''), 60.7 (C-6''), 60.3 (6-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **3** 为鸢尾苷 (Tectoridin)。

**化合物 4** 白色粉末 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 429 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$ 。 $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 8.45 (1H, s, H-2), 8.06 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-5), 7.54 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2', 6'), 7.24 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 7.15 (1H, dd,  $J = 9.0, 2.1$  Hz, H-6), 7.0 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3', 5'), 3.79 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 5.11 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 3.18 ~ 3.47 (m, other sugar protons);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 153.5 (C-2), 124.0 (C-3), 174.6 (C-4), 126.9 (C-5), 115.6 (C-6), 161.4 (C-7), 103.4 (C-8), 157.0 (C-9), 118.5 (C-10), 123.3 (C-1'), 130.0 (C-2', 6'), 113.6 (C-3', 5'), 159.0 (C-4'), 100.0 (C-1''), 73.1 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.2 (C-5''), 60.6 (C-6''), 55.1 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **4** 为芒柄花苷 (Ononin)。

**化合物 5** 黄色粉末 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 431 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ 。 $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 12.46 (1H, s, 5-OH), 10.16 (1H, s, 3-OH), 9.52 (1H, s, 4'-OH), 8.08 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2', H-6'), 6.93 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3', H-5'),

6.81 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.41 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.54 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-1''), 3.85 (1H, s, H-5''), 1.13 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-5'');  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 147.5 (C-2), 136.0 (C-3), 176.1 (C-4), 160.4 (C-5), 98.8 (C-6), 161.4 (C-7), 94.3 (C-8), 155.7 (C-9), 104.7 (C-10), 121.5 (C-1'), 129.6 (C-2', C-6'), 115.5 (C-3', C-5'), 159.4 (C-4'), 98.4 (C-1''), 70.1 (C-2''), 70.3 (C-3''), 71.6 (C-4''), 69.9 (C-5''), 17.9 (C-6'')。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **5** 为山萘酚-7-*O*- $\alpha$ -L-鼠李糖苷,即  $\alpha$ -鼠李异洋槐素 ( $\alpha$ -Rhamnoisorobin)。

**化合物 6** 白色粉末 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 445 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ 。 $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 154.9 (C-2), 122.7 (C-3), 180.4 (C-4), 161.6 (C-5), 99.9 (C-6), 163.1 (C-7), 94.6 (C-8), 157.2 (C-9), 106.1 (C-10), 122.2 (C-1'), 130.2 (C-2', C-6'), 113.8 (C-3', C-5'), 159.3 (C-4'), 99.6 (C-1''), 73.1 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.2 (C-5''), 60.6 (C-6''), 55.2 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **6** 为鹰嘴豆芽素 A-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (Sissotrin)。

**化合物 7** 白色粉末 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 433 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ 。 $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 78.1 (C-2), 42.0 (C-3), 196.2 (C-4), 163.5 (C-5), 95.9 (C-6), 166.8 (C-7), 95.0 (C-8), 162.8 (C-9), 101.8 (C-10), 131.9 (C-1'), 128.1 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 157.6 (C-4'), 100.3 (C-1''), 73.2 (C-2''), 77.1 (C-3''), 69.7 (C-4''), 76.6 (C-5''), 60.7 (C-6'')。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **7** 为南酸枣苷 (Chorospondin)。

**化合物 8** 淡黄色针晶 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 283 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。 $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 7.83 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2', H-6'), 6.89 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3', H-5'), 6.52 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-3), 6.51 (1H, s, H-8), 6.36 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 3.79 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 160.4 (C-2), 107.2 (C-3), 175.6 (C-4), 159.8 (C-5), 96.4 (C-6), 162.4 (C-7), 95.2 (C-8), 159.0 (C-9), 106.0 (C-10), 121.5 (C-1'), 127.8 (C-2', 6'), 115.8 (C-3', 5'), 160.6 (C-4'), 55.8 (5-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文

献<sup>[16]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **8** 为 Thevetiaflavon。

**化合物 9** 淡黄色粉末(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 447  $[M-H]^-$ ,分子式为  $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 12.93 (1H, s, 5-OH), 8.35 (1H, s, H-2), 7.16 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2'), 7.06 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-5'), 6.93 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6'), 6.39 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.23 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 4.99 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 3.47 ~ 3.71 (m, other sugar protons); <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 154.4 (C-2), 125.4 (C-3), 180.0 (C-4), 162.0 (C-5), 99.2 (C-6), 164.8 (C-7), 93.8 (C-8), 157.6 (C-9), 104.3 (C-10), 121.9 (C-1'), 116.7 (C-2'), 145.3 (C-3'), 146.5 (C-4'), 116.1 (C-5'), 120.0 (C-6'), 102.3 (C-1''), 73.3 (C-2''), 77.3 (C-3''), 69.8 (C-4''), 75.9 (C-5''), 60.8 (C-6'')。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **9** 为香豌豆酚-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (orobol-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside)。

**化合物 10** 黄色粉末(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 447  $[M-H]^-$ ,分子式为  $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 12.42 (1H, s, 5-OH), 8.07 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', 5'), 6.80 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.46 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.07 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1''), 3.20 ~ 3.72 (m, other sugar protons); <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 147.6 (C-2), 136.3 (C-3), 176.1 (C-4), 160.8 (C-5), 98.3 (C-6), 162.1 (C-7), 93.6 (C-8), 155.8 (C-9), 103.2 (C-10), 122.0 (C-1'), 129.2 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 159.4 (C-4'), 100.0 (C-1''), 73.2 (C-2''), 77.2 (C-3''), 69.7 (C-4''), 76.7 (C-5''), 60.7 (C-6'')。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **10** 为山萘酚-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (Kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside)。

**化合物 11** 黄色粉末(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 447  $[M-H]^-$ ,分子式为  $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 12.67 (1H, s, 5-OH), 10.87 (1H, s, 7-OH), 9.62 (1H, s, 4'-OH), 9.34 (1H, s, 3'-OH), 7.35 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'), 7.25 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-6'), 6.87 (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), 5.39 (1H, brs, H-1''), 0.92 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, CH<sub>3</sub>-5'')。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **11** 为槲皮苷 (Quercitrin)。

**化合物 12** 黄色粉末(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 609  $[M-H]^-$ ,分子式为  $C_{27}H_{30}O_{16}$ 。<sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 156.3 (C-2), 132.9 (C-3), 177.5 (C-4), 161.3 (C-5), 98.7 (C-6), 164.1 (C-7), 93.6 (C-8), 155.6 (C-9), 103.9 (C-10), 120.9 (C-1'), 131.0 (C-2', 6'), 115.3 (C-3', 5'), 160.0 (C-4'), 97.9 (C-1''), 82.5 (C-2''), 77.5 (C-3''), 69.7 (C-4''), 77.0 (C-5''), 60.8 (C-6''), 104.1 (C-1'''), 74.4 (C-2'''), 76.7 (C-3'''), 69.6 (C-4'''), 76.6 (C-5'''), 60.5 (C-6''')。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **12** 为山萘酚-3-*O*- $\beta$ -D-槐糖苷 (Kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-sophoroside)。

**化合物 13** 白色粉末(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 593  $[M-H]^-$ ,分子式为  $C_{27}H_{30}O_{15}$ 。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 12.90 (1H, s, 5-OH), 8.50 (1H, s, H-2), 7.53 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2', 6'), 7.12 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3', 5'), 6.74 (1H, s, H-8), 6.49 (1H, s, H-6), 5.09 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-1''), 4.93 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-1'''), 3.18 ~ 3.70 (m, other sugar protons); <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 155.0 (C-2), 124.0 (C-3), 180.3 (C-4), 161.6 (C-5), 99.7 (C-6), 163.1 (C-7), 94.6 (C-8), 157.4 (C-9), 106.1 (C-10), 122.2 (C-1'), 130.0 (C-2', 6'), 116.1 (C-3', 5'), 157.2 (C-4'), 99.9 (C-1''), 73.1 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.0 (C-5''), 60.6 (C-6''), 100.4 (C-1'''), 73.2 (C-2'''), 76.6 (C-3'''), 69.7 (C-4'''), 77.2 (C-5'''), 60.7 (C-6''')。以上数据与文献<sup>[21]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **13** 为染料木素-7,4'-双葡萄糖苷 (Genistein-7,4'-*O*- $\beta$ -D-diglucoside)。

**化合物 14** 黄色粉末(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 625  $[M-H]^-$ ,分子式为  $C_{27}H_{30}O_{17}$ 。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 12.67 (1H, s, 5-OH), 7.60 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.2$  Hz, H-6'), 7.55 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'), 6.87 (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), 5.69 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-1''), 4.60 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1'''); <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 156.2 (C-2), 133.0 (C-3), 177.4 (C-4), 161.3 (C-5), 98.0 (C-6), 164.1 (C-7), 93.4 (C-8), 155.5 (C-9), 104.2 (C-10), 121.1 (C-1'), 115.4 (C-2'), 144.8 (C-3'), 148.5 (C-4'), 116.0 (C-5'), 121.8 (C-6'), 103.9 (C-1''), 82.7 (C-2''), 76.7 (C-

3''), 69.6 (C-4''), 76.5 (C-5''), 60.7 (C-6''), 98.6 (C-1'''), 74.4 (C-2'''), 76.5 (C-3'''), 69.5 (C-4'''), 77.5 (C-5'''), 60.6 (C-6'''). 以上数据与文献<sup>[22]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **14** 为槲皮素-3-*O*- $\beta$ -D-槐糖苷(Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-sophoroside)。

**化合物 15** 黄色粉末(甲醇);ESI-MS  $m/z$ : 755 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为 C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>O<sub>20</sub>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 12.62 (1H, s, 5-OH), 10.22 (1H, s, 4'-OH), 8.08 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3', 5'), 6.82 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.43 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.69 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 5.54 (1H, brs, H-1'''), 4.62 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1'''), 1.90 (3H, s, H-6'''), 3.10 ~ 3.84 (m, other sugar protons); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150 MHz)  $\delta$ : 156.1 (C-2), 133.1 (C-3), 177.6 (C-4), 160.9 (C-5), 99.3 (C-6), 161.5 (C-7), 94.3 (C-8), 155.9 (C-9), 105.6 (C-10), 120.6 (C-1'), 131.0 (C-2', 6'), 115.3 (C-3', 5'), 160.2 (C-4'), 97.9 (C-1''), 82.4 (C-2''), 76.5 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.0 (C-5''), 60.5 (C-6''), 104.1 (C-1'''), 74.4 (C-2'''), 76.6 (C-3'''), 69.7 (C-4'''), 77.5 (C-5'''), 60.8 (C-6'''), 98.4 (C-1'''), 70.2 (C-2'''), 69.8 (C-3'''), 71.6 (C-4'''), 70.1 (C-5'''), 17.9 (C-6'''). 以上数据与文献<sup>[23]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **15** 为山萘酚-3-*O*- $\beta$ -D-槐糖-7-*O*- $\alpha$ -L-鼠李糖苷(Kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-sophoroside-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside)。

#### 4 抗骨质疏松活性筛选

采用 MTT 法,考察槐角中分离得到的 15 个化合物对成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖率的影响。以  $\alpha$ -MEM 培养基(含 10% 胎牛血清, 100 units/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素)作为空白对照,以雌二醇作为阳性对照,将 MC3T3-E1 细胞以  $5.0 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ L,并分为空白对照组,阳性对照组以及各浓度的异黄酮类化合物组(图 1)和其他黄酮类化合物组(图 2)。在 37  $^{\circ}$ C, 含 5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱中培养 24 h 细胞贴壁后,依次更换含不同浓度待测样品的培养基(化合物浓度分别为  $1.0 \times 10^{-4}$ 、 $1.0 \times 10^{-6}$ 、 $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L),阳性药组终浓度为  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L 的雌二醇,空白对照组换液处理,继续培养 48 h 后,每孔加入 20  $\mu$ L MTT(5 mg/ml)培养 4 h,吸弃培养基,加入 150  $\mu$ L/孔 DM-

SO,震荡溶解 10 min,用酶标仪测 490 nm 下各组吸光度值(OD)。

实验重复三次,实验结果应用 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) 软件中的 two-way RM ANOVA test 进行数据分析,与空白对照组进行对比,  $P < 0.05$  即认为实验组具有显著性差异。

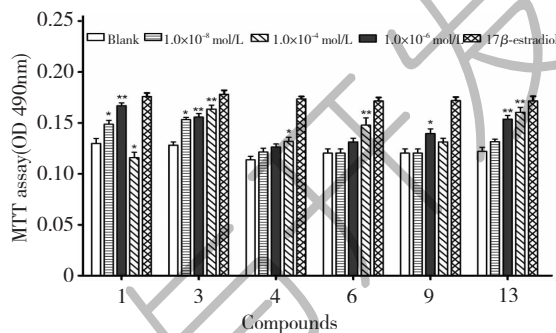


图 1 化合物 **1,3,4,6,9,13** 促进成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖作用

Fig. 1 Effect of **1,3,4,6,9,13** on osteoblast proliferation in MC3T3-E1 cells

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

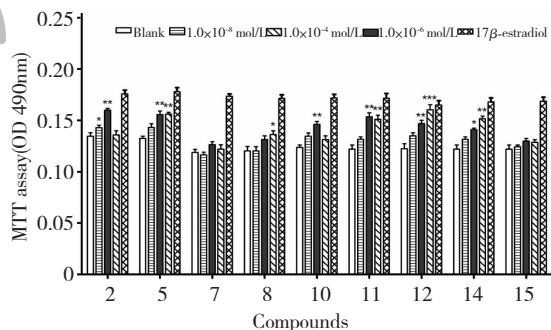


图 2 化合物 **2,5,7,8,10,11,12,14,15** 促进成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖作用

Fig. 2 Effect of **2,5,7,8,10,11,12,14,15** on osteoblast proliferation in MC3T3-E1 cells

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

#### 5 结论

本研究从槐角 70% 乙醇提取物中的正丁醇萃取部分和乙酸乙酯萃取部分分离鉴定了 15 个黄酮类化合物,其中 8 个化合物为首次从槐角中分离得到,4 个化合物为首次从槐属植物中分离得到;在此基础上,考察了所有化合物对成骨细胞 MC3T3-E1 细胞的增殖作用,以期筛选出预防或治疗骨质疏松

作用的药物,结果显示,除化合物 **7** 和 **15** 以外,其他化合物均具有促进成骨细胞增殖作用,其中化合物 **1** ~ **3**、**5**、**11** ~ **14** 作用明显,说明槐角中黄酮类成分可能具有抗骨质疏松作用,并且化合物 **1** ~ **3**、**5**、**11** ~ **14** 可以作为抗骨质疏松的潜在药物进行更深入的研究。

#### 参考文献

- 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, 355.
- Wei HM (韦华梅), Wang JB (王剑波). The study in the development of the traditional Chinese medicine Fructus Sophorae. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2010, 6: 115-119.
- Yankep E, Njamen D, Fotsing MT, et al. Isoflavone with anti-inflammatory activity from the root bark of *Millettia griffoniana*. *J Nat Prod*, 2003, 66: 1288-1290.
- Kim HJ, Kim MK, Shim JG, et al. Anti-oxidative phenolic compounds from Sophorae Fructus. *Nat Prod Sci*, 2004, 10: 330-334.
- Chang L, Ren YP, Cao L, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of six flavonoids from Fructus Sophorae extract in rat plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B*, 2012, 904: 59-64.
- Ma L (马磊), Lou FC (楼凤昌). The anticancer activity in vitro of constituents from fruits of *Sophora japonica*. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2006, 4: 151-153.
- Abdallah HM, Al-Abd AM, Asaad GF, et al. Isolation of antiosteoporotic compounds from seeds of *Sophora japonica*. *PLoS One*, 2014, 9: e98559.
- Ishida H, Umino T, Tsuji K, et al. Studies on the antihemostatic substances in herbs classified as hemostatics in traditional Chinese medicine On the antihemostatic principles in *Sophora japonica* L. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37: 1616-1618.
- Zhang X (张雪), Song QS (宋启示). Chemical constituents of the roots of *Flemingia ferruginea* Grah. ex Wall. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40: 865-868.
- Dong F (董芬), Fan TY (范田运), Zhang JX (张建新), et al. Chemical constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 679-682.
- Li R (李蓉), Qin MJ (秦民坚). Studies on the constituents of *Iris leptophylla*. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, 34: 122-124.
- Yu WW (余弯弯), Jin C (金晨), Shuang PC (双鹏程), et al. Isoflavones and flavans from *Millettia nitida* var. *Hirsutissima*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40: 2363-2366.
- Zhang N (张妮), Wei XY (魏孝义), Lin LD (林立东). Chemical constituents from the leaves of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2014, 22: 96-100.
- Tan YX (谭永霞), Sun YH (孙玉华), Chen RY (陈若芸). Studies on chemical constituents in seeds of *Cicerarietinum*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32: 1650-1652.
- Zhang L (张莉), Pei D (裴栋), Huang YR (黄炎如), et al. Chemical constituents from *Cynomorium songaricum*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2016, 39: 74-77.
- Li G (李岗), Wang ZP (王召平), Xian YX (仙云霞), et al. Flavonoids from *Gleditsiae Spina* and their antitumor activities. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 47: 2812-2816.
- Li RR (李烧烧), Wang CF (王彩芳), Lei PL (雷沛霖), et al. Chemical constituents in Flos Sophorae Carbonisatus. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 607-609.
- Wu XJ (邬秀娟), Wang L (王黎), Guan LN (管丽娜), et al. Flavonoids from *Hemistepta lyrata*. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学), 2011, 17: 107-110.
- Li SH (李胜华). Flavonoid constituents of whole plant of *Kummerowia striata*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2014, 49: 817-820.
- Liu J (刘洁). Studies on the chemical constituents and bioactivities of *Viburnum odoratissimum*. Tianjin: Tianjin University of Chinese Medicine (天津中医药大学), MSc. 2013.
- Tang YP (唐于平), Lou FC (楼凤昌), Ma W (马雯), et al. Isoflavonoid glycosides from the pericarps of *Sophora japonica*. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32: 187-189.
- Wang XY (王晓燕), Wang WW (王雯雯), Zhou YH (周勇辉), et al. Study on chemical constituents of *Rosa chinensis* Jacq. Flower. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2012, 47: 500-503.
- Tang YP (唐于平), Lou FC (楼凤昌), Wang JH (王景华). Two kaempferol triglycosides from pericarps of *Sophora japonica* L. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26: 839-840.