

## 核桃分心木化学成分及抗炎活性研究

王丹<sup>1,2</sup>, 董红敬<sup>2</sup>, 郝翠<sup>2</sup>, 张力思<sup>3</sup>, 郭兰萍<sup>2</sup>, 王岱杰<sup>2</sup>, 王晓<sup>2\*</sup><sup>1</sup> 山东农业大学食品科学与工程学院, 泰安 271018; <sup>2</sup> 齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省分析测试中心  
山东省中药质量控制技术重点实验室, 济南 250014; <sup>3</sup> 山东省果树研究所山东省农业科学院, 泰安 271000

**摘要:** 为研究核桃分心木的化学成分, 明确其药效物质基础, 采用高速逆流色谱、反相 C<sub>18</sub> 柱色谱、制备型高效液相色谱等方法进行分离纯化, 通过质谱、核磁共振波谱等多种谱学数据分析鉴定其化学结构。从核桃分心木的乙酸乙酯萃取部位分离纯化得到 10 个化合物, 分别鉴定为: 2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-1H-indole-3-acetic acid (1)、核桃素 D (2)、2-hydroxycinchoninic acid (3)、C-藜芦酰乙二醇 (4)、槲皮素-3-O-(6"-没食子酰基)-β-D-半乳糖苷 (5)、槲皮素-3-O-(6"-没食子酰基)-β-D-葡萄糖苷 (6)、金丝桃苷 (7)、异槲皮苷 (8)、4,8-二羟基-1-四氢萘醌 (9)、槲皮素 (10)。化合物 3, 7 和 8 是首次从核桃分心木中分离得到, 化合物 1, 4 和 6 为首次从该种属植物中分离得到。运用 Griess 法检测 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中一氧化氮 (NO) 水平, 对各单体化合物的抗炎活性进行初步研究, 结果显示化合物 10 具有较好的抗炎作用。

**关键词:** 分心木; 化学成分; 鉴定; 抗炎活性

中图分类号: R285.5; Q946.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.9.013

## Chemical Constituents of *Diaphragma juglandis* Fructus and Their Anti-inflammatory Activity

WANG Dan<sup>1,2</sup>, DONG Hong-jing<sup>2</sup>, HAO Cui, ZHANG Li-si<sup>3</sup>, GUO Lan-ping<sup>2</sup>, WANG Dai-jie<sup>2</sup>, WANG Xiao<sup>2\*</sup><sup>1</sup> College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;<sup>2</sup> Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China;<sup>3</sup> Shandong Institute of Pomology, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Taian 271000, China

**Abstract:** To study the chemical constituents of ethyl acetate extract from *Diaphragma juglandis* Fructus for clarifying its pharmacological basis, the high-speed counter-current chromatography, reversed phase C<sub>18</sub> column chromatography and preparative high performance liquid chromatography were used for the separation and purification. Their chemical structures were identified by spectroscopic datas including electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Ten compounds were isolated and their chemical structures were identified as 2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-1H-indole-3-acetic acid (1), juglanin D (2), 2-hydroxycinchoninic acid (3), C-veratroylglycol (4), quercetin 3-O-(6"-O-galloyl)-β-galactoside (5), quercetin 3-O-(6"-O-galloyl)-β-glucoside (6), hyperoside (7), isoquercitrin (8), isosclerone (9) and quercetin (10). Compound 3, 7 and 8 are isolated from *Diaphragma juglandis* Fructus for the first time and compound 1, 4 and 6 are found in this genus for the first time. The anti-inflammatory activity of isolated compounds was evaluated by the levels of NO in LPS-induced RAW264.7 tested by Griess reagent. And compound 10 showed strong anti-inflammatory activity.

**Key words:** *Diaphragma juglandis* Fructus; chemical constituents; identification; anti-inflammatory activity

核桃分心木 (*Diaphragma juglandis* Fructus), 简称分心木, 又名核桃内隔膜, 是胡桃科核桃属植物果核的干燥木质隔膜, 质脆, 呈薄片状, 多弯曲, 通常占

核桃质量的 4% ~ 5%, 是新疆维吾尔族传统药物之一, 具有利尿清热, 健脾固肾, 涩精等功效<sup>[1]</sup>。通常将分心木加水煮沸后饮用, 治疗肾虚遗精疗效显著; 长期喝水泡分心木, 还可以缓解老年人的腰酸腿疼, 改善睡眠, 提高机体免疫力<sup>[2,3]</sup>。分心木中所含化学成分丰富, 主要包括有机酸或酚类、黄酮、生物碱、油脂、皂苷、挥发油、糖类、氨基酸、鞣质、多肽及其他

收稿日期: 2018-01-16

接受日期: 2018-06-22

基金项目: 郭兰萍院创新工程先导专项; 郭兰萍泰山学者岗位平台; 国家自然科学基金青年基金 (21506119)

\* 通信作者 Tel: 86-531-82605319; E-mail: wangx@sda.org

类化合物<sup>[4,5]</sup>。

近年来,有关核桃分心木单体化学成分研究的报道已有一些,主要采用柱色谱、高速逆流色谱等<sup>[6,7]</sup>方法分离纯化,但分离鉴定物质成分不全面,药理活性研究主要针对分心木的提取物,药效物质基础大多不明确,单体成分有待于进一步研究与开发。此外,由于目前研究者对分心木有效成分研究

不够深入,导致人们不重视分心木的开发利用,而使其大量浪费,没有实现药用价值。为充分利用该资源,本研究以核桃分心木为实验材料,结合前期研究的结果<sup>[8]</sup>,系统研究了其化学成分组成,由乙酸乙酯部位分离鉴定了10个化合物(图1),并对分离所得单体化合物进行体外抗炎活性初步研究,为其药物开发奠定基础。

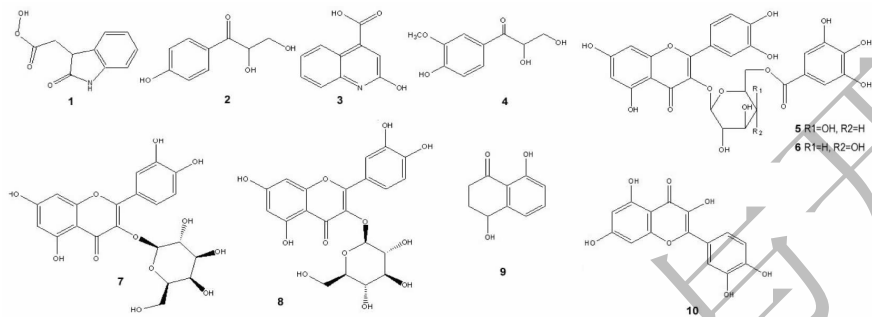


图1 化合物1~10的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-10

## 1 仪器与材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪(配有 PDA 检测器,自动进样器,美国 Waters 公司); RIGOL L-3140 型高效液相色谱仪(北京普源精电科技有限公司); Agilent 1200 RRLC-6410 QQQ-MS/MS 质谱仪(美国 Agilent 公司); YMC-PACK ODS-A 分析型色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); YMC-PACK ODS-A 半制备型色谱柱(250 mm×10.0 mm, 5 μm); Varian INOVA-400 型核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司); Varian INOVA-600 型核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司); 旋转蒸发器 R-3(瑞士 Buchi 公司); 立式压力灭菌器(上海申安医疗器械厂); 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司); 倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司); 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); NO 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司); SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司)。

95% 乙醇(分析纯,淄博丹阳化工有限公司); 石油醚、乙酸乙酯(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司); 甲醇(色谱纯, OCEANPAK ALEXATIVE CHEMICAL, Ltd); 甲酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司), 高效液相用水(娃哈哈饮用水有限公司); 二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司); DMEM 培养基(美国 Thermo 公司); 胎牛血清(FBS,美国 CLARK Bioscience 公司); 脂多糖

(LPS,上海源叶生物科技有限公司)。

分心木购于安徽亳州药材市场,小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞株购于美国 ATCC 公司。

## 2 实验方法

### 2.1 提取与分离

#### 2.1.1 样品制备

干燥后的核桃分心木药材 9 kg,粉碎后于 95% 乙醇中回流提取 2 次,每次 2 h,料液比 1:4 (w/v),趁热抽滤,合并 2 次滤液,减压蒸发至无醇味;石油醚萃取 6 次除去脂溶性成分,剩余水层用乙酸乙酯萃取 6 次,合并每部分萃取液,减压浓缩干燥得乙酸乙酯萃取部位粗提物 47.3 g。

根据前期研究结果<sup>[8]</sup>,乙酸乙酯萃取部位粗提物利用高速逆流色谱技术,洗脱两次,一次逆流(CCC1)溶剂系统为石油醚:乙酸乙酯:甲醇:水(1:9:1:9, v/v/v/v),流速 2 mL/min,波长 280 nm,上相为固定相,下相为流动相,分离、富集数次,根据 CCC1 色谱图合并相同成分(图 2A),减压浓缩干燥得乙酸乙酯部位 A2 馏分 600 mg。A7(CCC1 尾吹)馏分采用二次逆流(CCC2)色谱分离,溶剂系统为石油醚:乙酸乙酯:甲醇:水(1:2:1:2, v/v/v/v),流速 2 mL/min,波长 280 nm,上相为固定相,下相为流动相,分离、富集数次,根据 CCC2 色谱图合并相同成分(图 2B),减压浓缩干燥得乙酸乙酯部位 C7

(CCC2 尾吹) 馏分 40 mg, 放置冰箱冷冻保藏, 备用。

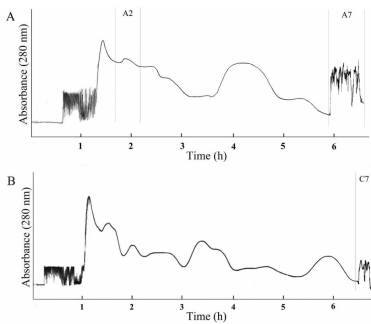


图2 分心木乙酸乙酯粗提物的 HSCCC 色谱图

Fig. 2 HSCCC chromatogram of ethyl acetate extract from *Diaphragma juglandis* Fructus

### 2.1.2 HPLC 分析

分心木 A2 和 C7 馏分采用 Waters 2695 型高效液相色谱分析, 以甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 流速 1 mL/min, 梯度洗脱 (A2 洗脱条件: 0 ~ 10 min, 15% 甲醇; 10 ~ 11 min, 15% ~ 30% 甲醇; 11 ~ 40 min, 30% ~ 40% 甲醇; 波长: 280 nm; C7 洗脱条件: 0 ~ 5 min, 25% ~ 30% 甲醇; 5 ~ 20 min, 30% 甲醇; 20 ~ 21 min, 30% ~ 70% 甲醇; 21 ~ 40 min, 40% ~ 50% 甲醇; 40 ~ 45 min, 50% 甲醇; 45 ~ 50 min, 50% ~ 100% 甲醇; 波长: 254 nm), 其高效液相色谱 (HPLC) 图见图 3。

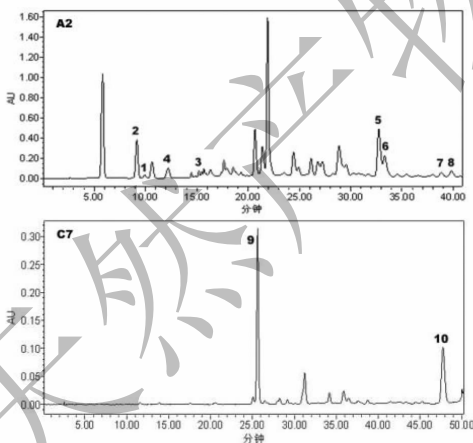


图3 分心木中 A2 和 C7 馏分的 HPLC 分析图

Fig. 3 HPLC chromatogram of A2 and C7 fractions from *Diaphragma juglandis* Fructus

### 2.1.3 分离纯化

分心木 A2 馏分 (600 mg), 经反相  $C_{18}$  中压柱色谱分离, 依次用甲醇-水 (15%、30%、50%) 进行梯度洗脱, 各馏分采用 Waters 2695 型高效液相色谱分析, 合并相同成分共分为 6 段。其中, 15% 甲醇洗脱

部位通过半制备高效液相色谱分离, 采用甲醇-水 (8:92, v/v) 等度洗脱, 得到化合物 **1** (6.2 mg); 30% 甲醇洗脱部位 I 通过半制备高效液相色谱分离, 采用甲醇-水 (15:85, v/v) 等度洗脱, 得到化合物 **2** (4.4 mg) 和 **3** (0.7 mg); 30% 甲醇洗脱部位 III 通过半制备高效液相色谱分离, 采用甲醇-水 (25:75, v/v) 等度洗脱, 得到化合物 **4** (2.8 mg); 50% 甲醇洗脱部位 II 通过半制备高效液相色谱分离, 采用甲醇-水 (30:70, v/v) 等度洗脱, 得到化合物 **5** (11.5 mg) 和 **6** (3.6 mg); 50% 甲醇洗脱部位 III 通过半制备高效液相色谱分离, 采用甲醇-水 (35:65, v/v) 等度洗脱, 得到化合物 **7** (3.0 mg) 和 **8** (5.0 mg)。

分心木 C7 馏分 (40 mg), 通过半制备高效液相色谱分离, 采用甲醇-水 (50:50, v/v) 等度洗脱, 得到化合物 **9** (7.1 mg) 和 **10** (7.2 mg)。

## 2.2 抗炎活性实验

### 2.2.1 供试品配制

取化合物 **1** ~ **10**, 分别用 DMSO 配制成 50 mM 的溶液作为储备液, 加药时用无血清 DMEM 培养基稀释即可。

### 2.2.2 NO 标准曲线的绘制

精密吸取 1 mL 培养基于标准品中, 摇匀, 依次稀释成 0、1、5、10、50、100  $\mu$ M 的溶液, 每孔加 50  $\mu$ L, 再加入等量的 Griess I 和 Griess II 试剂, 用酶标仪测定 540 nm 处吸光度 (OD 值), 绘制标准曲线。

### 2.2.3 NO 含量测定

测定方法参考文献<sup>[9]</sup>, 对各单体化合物的抗炎活性进行初步筛选。取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调整细胞密度为  $1.5 \times 10^5$ /mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  培养箱中, 24 h 后, 弃旧培养基, 每孔加 100  $\mu$ L 含药培养基, 随机分为对照组、LPS (1  $\mu$ g/mL) 组、LPS (1  $\mu$ g/mL) + 化合物 **1** ~ **10** (50  $\mu$ M) 组, 设 3 个复孔, 24 h 后, 取 50  $\mu$ L 上清液, 按 NO 试剂盒检测方法, 用酶标仪测定 540 nm 处 OD 值。

筛选出具有较强 NO 抑制作用的样品, 分别稀释成 0.5、2.5、5、25、50  $\mu$ M 的样品溶液。采用 MTT 法, 检测各浓度化合物对 RAW264.7 细胞活力的影响, NO 含量测定方法同 2.2.3 所述初筛方法。最后根据 2.2.2 绘制的 NO 标准曲线, 计算不同浓度样品中 NO 含量。实验数据采用 SPSS 17.0 软件处理, 并用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异用 T-Test 分析。

### 3 结果

#### 3.1 化合物结构鉴定

**化合物 1** 白色无定性粉末;ESI-MS: $m/z$  208.1  $[M+H]^+$ , 230.1  $[M+Na]^+$ , 437.1  $[2M+Na]^+$ , 206.0  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_{10}H_9NO_4$ ,  $M=207$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.24 (1H, s, -COOH), 7.30 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, H-4), 7.19 (1H, t,  $J=7.6$  Hz, H-6), 6.93 (1H, t,  $J=7.6$  Hz, H-5), 6.79 (1H, dd,  $J=7.2, 2.4$  Hz, H-7), 2.89 (2H, s, H-8);  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 178.6 (C-2), 170.9 (9-COOH), 143.1 (C-7a), 131.7 (C-3a), 129.6 (C-4), 124.3 (C-5), 121.8 (C-6), 109.9 (C-7), 73.1 (C-3), 42.1 (C-8)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 1 为 2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-1H-indole-3-acetic acid。

**化合物 2** 白色结晶;ESI-MS: $m/z$  183.1  $[M+H]^+$ , 205.1  $[M+Na]^+$ , 181.0  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_9H_{10}O_4$ ,  $M=182$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.85 (2H, m, H-2, 6), 7.87 (2H, m, H-3, 5), 4.90 (1H, t,  $J=5.4$  Hz, H-8), 3.67 (1H, d,  $J=4.2$  Hz, H-9a), 3.56 (1H, d,  $J=5.4$  Hz, H-9b);  $^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 115.6 (C-1), 127.0 (C-2, 6), 131.5 (C-3, 5), 162.6 (C-4), 198.7 (C-7), 74.4 (C-8), 64.7 (C-9)。以上数据与文献<sup>[11,12]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 2 为核桃素 D。

**化合物 3** 白色无定性粉末;ESI-MS: $m/z$  190.1  $[M+H]^+$ , 212.0  $[M+Na]^+$ , 188.0  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_{10}H_7NO_3$ ,  $M=189$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 11.66 (1H, br. s, -COOH), 8.09 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-5), 7.29 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-2), 7.45 (1H, m, H-6), 7.14 (1H, m, H-7), 6.48 (1H, s, H-8);  $^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 168.6 (11-COOH), 162.7 (C-2), 162.3 (C-4), 139.7 (C-9), 130.4 (C-6), 127.7 (C-5), 121.9 (C-3), 119.2 (C-7), 117.6 (C-10), 115.7 (C-8)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 3 为 2-hydroxycinchoninic acid。

**化合物 4** 白色粉末;ESI-MS: $m/z$  213.1  $[M+H]^+$ , 235.1  $[M+Na]^+$ , 211.1  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_{10}H_{12}O_5$ ,  $M=212$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.55 (1H, dd,  $J=8.4, 1.8$  Hz, H-6), 7.48 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2), 6.87 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5),

4.94 (1H, t,  $J=4.8$  Hz, H-8), 3.82 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.68 (1H, dd,  $J=10.8, 4.8$  Hz, H-9a), 3.58 (1H, dd,  $J=10.8, 4.8$  Hz, H-9b);  $^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 127.3 (C-1), 112.2 (C-2), 152.4 (C-3), 148.0 (C-4), 115.3 (C-5), 124.1 (C-6), 198.7 (C-7), 74.3 (C-8), 64.9 (C-9), 56.1 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[13,14]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 4 为 C-藜芦酰乙二醇。

**化合物 5** 黄色粉末;ESI-MS: $m/z$  617.1  $[M+H]^+$ , 639.1  $[M+Na]^+$ , 615.1  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_{28}H_{24}O_{16}$ ,  $M=616$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.65 (1H, dd,  $J=8.4, 2.4$  Hz, H-6'), 7.55 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2'), 6.88 (2H, br. s, H-2''', 6'''), 6.83 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-5'), 6.39 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-8), 6.18 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6), 5.35 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1''), 4.14 (1H, dd,  $J=10.8, 7.2$  Hz, H-6''), 4.06 (1H, dd,  $J=10.2, 5.4$  Hz, H-6''), 3.74 (2H, dd,  $J=7.2, 5.4$  Hz, H-4'', H-5''), 3.63 (1H, dd,  $J=9.6, 7.8$  Hz, H-2''), 3.47 (1H, dd,  $J=9.6, 3.0$  Hz, H-3'');  $^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 177.7 (C-4), 165.9 (C-7'''), 165.0 (C-7), 161.5 (C-5), 156.9 (C-2), 156.8 (C-9), 148.9 (C-4'), 145.9 (C-3''', 5'''), 145.2 (C-3'), 138.9 (C-4'''), 134.0 (C-3), 122.3 (C-1'), 121.5 (C-6'), 119.6 (C-1'''), 116.4 (C-2'), 115.6 (C-5'), 109.0 (C-2''', 6'''), 104.2 (C-10), 102.7 (C-1''), 99.2 (C-6), 94.1 (C-8), 73.3 (C-5''), 72.9 (C-3''), 71.5 (C-2''), 68.2 (C-4''), 62.5 (C-6'')。以上数据与文献<sup>[12,15,16]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 5 为槲皮素-3-O-(6''-没食子酰基)- $\beta$ -D-半乳糖苷。

**化合物 6** 黄色粉末;ESI-MS: $m/z$  617.1  $[M+H]^+$ , 639.1  $[M+Na]^+$ , 615.1  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_{28}H_{24}O_{16}$ ,  $M=616$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.57 (1H, dd,  $J=8.4, 2.4$  Hz, H-6'), 7.44 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-2'), 6.89 (2H, d,  $J=1.2$  Hz, H-2''', 6'''), 6.72 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 6.36 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-8), 6.17 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-6), 5.43 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, H-1''), 4.25 (1H, m, H-6''), 4.18 (1H, dd,  $J=12.0, 4.2$  Hz, H-6''), 3.43 (1H, dd,  $J=4.2, 2.4$  Hz, H-2''), 3.42 (1H, dd,  $J=4.2, 2.4$  Hz, H-3''), 3.37 (1H, m, H-4''), 3.30 (1H, m, H-5'');  $^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 177.6 (C-4), 166.1 (C-7'''), 166.2 (C-7), 161.6 (C-5),

156.9 (C-2), 156.8 (C-9), 149.1 (C-4'), 145.9 (C-3''', 5'''), 145.3 (C-3'), 138.9 (C-4'''), 133.8 (C-3), 122.3 (C-1'), 121.3 (C-6'), 119.8 (C-1'''), 116.2 (C-2'), 115.7 (C-5'), 109.1 (C-2''', 6'''), 104.2 (C-10), 101.9 (C-1''), 99.2 (C-6), 94.1 (C-8), 76.7 (C-5''), 74.7 (C-3''), 74.4 (C-2''), 69.9 (C-4''), 63.5 (C-6''). 以上数据与文献<sup>[15,16]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**6**为槲皮素-3-O-(6"-没食子酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

**化合物7** 黄色粉末;ESI-MS: $m/z$  465.1 [M + H]<sup>+</sup>, 487.1 [M + Na]<sup>+</sup>, 463.1 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>, M = 464, 303.0 [M + H-162]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.65 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, H-6'), 7.54 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 5.35 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1''), 3.66 (1H, br. d, *J* = 3.0 Hz, H-4''), 3.58 (1H, dd, *J* = 9.6, 7.8 Hz, H-2''), 3.46 (1H, dd, *J* = 10.2, 6.0 Hz, H-6''), 3.37 (1H, dd, *J* = 9.6, 3.6 Hz, H-3''), 3.33 (1H, m, H-5''), 3.30 (1H, dd, *J* = 10.2, 6.0 Hz, H-6''); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 177.7 (C-4), 165.7 (C-7), 161.6 (C-5), 156.9 (C-2), 156.5 (C-9), 149.0 (C-4'), 145.3 (C-3'), 133.9 (C-3), 122.3 (C-1'), 121.5 (C-6'), 116.4 (C-5'), 115.6 (C-2'), 103.9 (C-10), 102.4 (C-1''), 99.4 (C-6), 94.1 (C-8), 76.3 (C-5''), 73.7 (C-3''), 71.6 (C-2''), 68.3 (C-4''), 60.5 (C-6''). 以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**7**为金丝桃苷。

**化合物8** 黄色粉末;ESI-MS: $m/z$  465.1 [M + H]<sup>+</sup>, 487.1 [M + Na]<sup>+</sup>, 463.1 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>, M = 464, 303.0 [M + H-162]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.58 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.8 Hz, H-2'), 7.56 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6'), 6.84 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 5.45 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1''), 3.59 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6''), 3.57 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6''), 3.34 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.4 Hz, H-2''), 3.24 (1H, m, H-3''), 3.12 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-4''), 3.09 (1H, m, H-5''); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 177.7 (C-4), 166.3 (C-7), 165.4 (C-5), 156.8 (C-2), 156.5 (C-9), 149.0 (C-4'), 145.3 (C-3'), 133.7 (C-3), 122.0

(C-12), 121.5 (C-6'), 116.6 (C-5'), 115.6 (C-2'), 104.1 (C-10), 101.4 (C-1''), 99.3 (C-6), 94.1 (C-8), 77.9 (C-5''), 76.9 (C-3''), 74.5 (C-2''), 70.3 (C-4''), 61.4 (C-6''). 以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**8**为异槲皮苷。

**化合物9** 白色结晶;ESI-MS: $m/z$  179.1 [M + H]<sup>+</sup>, 201.1 [M + Na]<sup>+</sup>, 分子式为C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>, M = 178; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.51 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-6), 7.08 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-5), 6.85 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-7), 4.85 (1H, dd, *J* = 7.8, 3.6 Hz, H-4), 2.91 (1H, m, H-2b), 2.68 (1H, m, H-2a), 2.31 (1H, m, H-3b), 2.11 (1H, m, H-3a); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 204.8 (C-1), 162.2 (C-8), 147.1 (C-4a), 136.5 (C-6), 117.4 (C-5), 116.3 (C-7), 115.1 (C-8a), 66.8 (C-4), 34.6 (C-2), 31.1 (C-3)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**9**为4,8-二羟基-1-四氢萘醌。

**化合物10** 黄色粉末状固体;ESI-MS: $m/z$  303.0 [M + H]<sup>+</sup>, 301.1 [M-H]<sup>-</sup>, 325.0 [M + Na]<sup>+</sup>, 分子式为C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>, M = 302; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.67 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 148.2 (C-2), 136.1 (C-3), 176.3 (C-4), 161.1 (C-5), 98.7 (C-6), 164.7 (C-7), 93.8 (C-8), 156.6 (C-9), 103.4 (C-10), 122.4 (C-1'), 116.1 (C-2'), 145.5 (C-3'), 147.2 (C-4'), 115.5 (C-5'), 120.4 (C-6')。以上数据与文献<sup>[12,18]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**10**为槲皮素。

### 3.2 抗炎活性

对化合物**1**~**10**进行抗炎活性筛选,结果显示化合物**10**可显著抑制炎症细胞NO的释放。通过MTT实验测各细胞的活力(图4)发现,细胞经LPS和不同浓度样品处理后,细胞活性稳定,且没有加重细胞的毒性,即对细胞活力基本无影响。对该化合物进行不同浓度测定,根据NO标准曲线( $y = 0.0073x + 0.0573, R^2 = 0.9996$ ),计算不同浓度样品中NO含量。由表1可知,该化合物在不同浓度均表现出一定的抑制效果;浓度越大,NO抑制作用越强,且在25  $\mu$ M可表现出显著的抑制作用,提示该化合物通过抑制炎症因子NO的释放发挥抗炎作用。

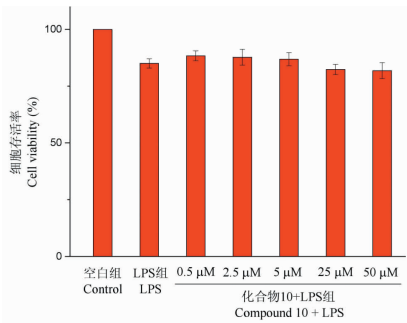


图4 化合物10在不同浓度对RAW264.7细胞活力的影响  
Fig. 4 Effect on RAW 264.7 cell viability of compound 10 at different concentrations.

表1 化合物10在不同浓度下对LPS诱导的RAW264.7细胞中NO生成的影响

Table 1 Effect on the NO production of compound 10 at different concentrations in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages

组别 Group	NO含量 NO concentration ( $\mu\text{M}$ ) ( $\bar{x} \pm s$ )
空白组 Control (DMSO)	2.40 $\pm$ 0.82 **
LPS组 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	55.12 $\pm$ 2.66
化合物10 Compound 10	
0.5 $\mu\text{M}$	47.76 $\pm$ 1.94
2.5 $\mu\text{M}$	40.73 $\pm$ 1.73 *
5 $\mu\text{M}$	40.52 $\pm$ 2.08 *
25 $\mu\text{M}$	31.42 $\pm$ 0.68 **
50 $\mu\text{M}$	31.07 $\pm$ 1.01 **

注:与LPS组比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compare with LPS, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

## 4 讨论

本研究通过逆流、反相 $C_{18}$ 、制备液相等柱色谱方法成功地从核桃分心木中分离得到10个化合物,分别鉴定为:2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-1*H*-indole-3-acetic acid(1)、核桃素D(2)、2-hydroxycinchonic acid(3)、C-藜芦酰乙二醇(4)、槲皮素-3-*O*-(6"-没食子酰基)- $\beta$ -D-半乳糖苷(5)、槲皮素-3-*O*-(6"-没食子酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖苷(6)、金丝桃苷(7)、异槲皮苷(8)、4,8-二羟基-1-四氢萘醌(9)和槲皮素(10)。其中,化合物3,7和8是首次从核桃分心木中分离得到,化合物1,4和6为首次从该种属植物中分离得到。对分心木中的10个化合物进行抗炎活性实验,发现槲皮素可有效抑制炎症因子NO的释放。在黄敬群等<sup>[19]</sup>报道中,槲皮素能够显著抑制痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度,更加印证了槲皮素的抗炎作

用,推测核桃分心木发挥抗炎作用的主要成分是槲皮素。

## 参考文献

- Jing YC(景援朝), Zhao HX(赵焕新), Bai H(白虹). Research progress of *Diaphragma juglandis* Fructus [J]. *J Pharm Res*(药学研究), 2014, 33:167-169.
- Gulbostan H(古力伯斯坦·艾达尔), Turapjan(吐热普江). Extraction of total alkaloids in walnut diaphragm and bacteriostatic activity[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:1591-1595.
- Wang Y(王艳), Mahmut D(迪丽达尔·马合木提), Han YC(韩艳春), et al. Study of Uygur medicine *Diaphragma juglandis* Fructus on mice model of kidney-yang deficiency [J]. *J Xinjiang Med Univ*(新疆医科大学学报), 2012, 35:153-157.
- Biken A(毕肯·阿不得克里木), Han YC(韩艳春), Aytulun S(阿依吐伦·斯马义). Study on the chemical constituents of *Diaphragma juglandis* Fructus [J]. *J Xinjiang Med Univ*(新疆医科大学学报), 2010, 33:1044-1046.
- Wang YM(王艳梅), Bai J(白洁), Chang J(常洁), et al. Chemical composition analysis of the volatile oil of walnut distracted wood [C]. International symposium on medicinal botany(药用植物学国际学术研讨会), 2007.
- Liu ZB(刘章彬), Huang YL(黄永林), Yang KD(杨克迪), et al. Isolation and identification of polyphenols from the leaves of *Castanopsis fordii* Hance [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29(1):67-73.
- Li G(李岗), Zhang XL(张晓蕾), Liu Q(刘倩), et al. Preparative separation of high purity arctigenin from *Arctii Fructus* by combining acid hydrolysis with HSCCC [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28:1581-1584.
- Wang D, Mu Y, Dong H, et al. Chemical constituents of the ethyl acetate extract from *Diaphragma juglandis* Fructus and their inhibitory activity on nitric oxide production *in vitro* [J]. *Molecules*, 2017, 23(1):72.
- Yu J, Song X, Wang D, et al. Five new chromone glycosides from *Scindapsus officinalis* (Roxb.) Schott [J]. *Fitoterapia*, 2017, 122:101-106.
- Su ZW, Ma ZH, Li Y, et al. N-Containing phytochemicals from the seeds of *Brucea javanica* [J]. *Chem Nat Compd*, 2017, 4:799-801.
- Zhang JB(张建斌), Liu JX(柳军玺), Fei Z(查飞), et al. Chemical constituents in green walnut husks of *Juglans regia* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2009, 40:847-849.
- Jing YC(景援朝), Zhao HX(赵焕新), Sun YL(孙永丽), et al. Chemical constituents from *Diaphragma Juglandis* Fructus [J]. *Food & Drug*(食品与药品), 2015, 17(2):87-90.

(下转第1607页)