

## 宁夏枸杞根和茎的化学成分及抗炎活性研究

兰 婷,黄远鹏,梁秋萍,周光雄\*

暨南大学药学院中药及天然药物研究所 广东省普通高校中药和天然药物药效物质基础重点实验室,广州 510632

**摘要:**研究宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)根部和茎部的化学成分。采用硅胶柱、ODS 开放柱、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱及半制备反相高效液相等色谱手段,对宁夏枸杞根和茎部乙醇提取物的石油醚部位及乙酸乙酯部位化学成分进行分离纯化,根据其理化性质以及波谱数据鉴定得到 12 个化合物,分别为 *N*-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(4-methoxyphenyl) prop-2-enamide (**1**)、3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-*N*-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl] acrylamide (**2**)、*N-trans*-coumaroyl octopamine (**3**)、(*E*)-2-(4,5-dihydroxy-2-[3-(4-hydroxyphenethyl) amino]-3-oxopropyl] phenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-*N*-(4-acetamidobutyl) acrylamide (**4**)、1,2-dihydro-6,8-dimethoxy-7-hydroxy-1-(3,4-dihydroxy-phenyl)-*N*<sup>1</sup>, *N*<sup>2</sup>-bis[2-(4-hydroxyphenyl) ethyl]-2,3-naphthalene dicarboxamide (**5**)、(+)-syringaresinol (**6**)、zhebeiresinol (**7**)、(±)-eriodictyol (**8**)、isovanilin (**9**)、5,5'-dimethoxybiphenyl-2,2'-diol (**10**)、*p*-hydroxyphenethyl*trans*-ferulate (**11**)、*E*-ferulic acid hexacosyl ester (**12**),所有化合物均为首次从该植物中分离得到。此外,采用 MTT 法和抑制一氧化氮(NO)生成实验,从细胞毒活性和抗炎活性两方面评估了化合物的生物活性。结果表明,化合物 **2** 具有显著的抗炎活性,其 IC<sub>50</sub> 值(17.00 ± 1.11 μmol/L) 小于阳性对照药槲皮素的 IC<sub>50</sub> 值(17.21 ± 0.50 μmol/L)。

**关键词:**宁夏枸杞;根和茎;化学成分;分离纯化

中图分类号:R284.1;R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)9-1491-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.9.002

Study on chemical constituents from root and stem of *Lycium barbarum* L.

LAN Ting, HUANG Yuan-peng, LIANG Qiu-ping, ZHOU Guang-xiong\*

Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New Drugs Research, Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract:** The chemical constituents in ethyl acetate and petroleum ether fractions of the ethanol extract from root and stem of *Lycium barbarum* L. were separated and purified by using silica gel, ODS and Sephadex LH-20 column chromatography in addition to reversed phase semi-preparative HPLC. According to the physicochemical properties and spectroscopic data, the compounds were identified. As a result, twelve compounds were obtained and identified as *N*-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(4-methoxyphenyl) prop-2-enamide (**1**), 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl] acrylamide (**2**), *N-trans*-coumaroyloctopamine (**3**), (*E*)-2-(4,5-dihydroxy-2-[3-(4-hydroxyphenethyl) amino]-3-oxopropyl] phenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-*N*-(4-acetamidobutyl) acrylamide (**4**), 1,2-dihydro-6,8-dimethoxy-7-hydroxy-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-*N*<sup>1</sup>, *N*<sup>2</sup>-bis[2-(4-hydroxyphenyl) ethyl]-2,3-naphthalene dicarboxamide (**5**), (+)-syringaresinol (**6**), zhebeiresinol (**7**), (±)-eriodictyol (**8**), isovanilin (**9**), 5,5'-dimethoxybiphenyl-2,2'-diol (**10**), *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (**11**), *E*-ferulic acid hexacosyl ester (**12**). All the compounds were isolated from this plant for the first time. The cytotoxic and anti-inflammatory activities of the compounds were evaluated by using MTT assay and nitric oxide (NO) production inhibition experiment. It was turned out that compound **2** showed the IC<sub>50</sub> value 17.00 ± 1.11 μmol/L due to the significant anti-inflammatory activity, which was lower than that of quercetin (IC<sub>50</sub> = 17.21 ± 0.50 μmol/L).

**Key words:** *Lycium barbarum* L.; root and stem; chemical constituents; separation and purification

收稿日期:2019-04-15

接受日期:2019-08-05

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81573578);国家中医药局项目(2017-110108-83-03-001423)

\* 通信作者 Tel:86-20-85221469; E-mail:guangxzh@sina.com

全球共有枸杞属植物 80 多种,离散分布在北美洲、南美洲、澳洲、欧亚大陆、太平洋岛屿和南非等地区。在我国,枸杞属植物有 7 个种 3 个变种,主要分

布于我国北部和西北部地区<sup>[1]</sup>。枸杞属植物在我国作为传统中药材的药用历史悠久,主要涉及的种为枸杞(*Lycium chinense* Mill.)和宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)。《本草纲目》记:“春采枸杞叶,名天精草;夏采花,名生长草;秋采籽,名枸杞子;冬采根,名地骨皮”<sup>[2]</sup>。中药枸杞子为宁夏枸杞的干燥成熟果实,其性味甘平,归肝、肾经,另一常用中药地骨皮是枸杞或宁夏枸杞的干燥根皮,具有凉血、除热、清肺降火的功效<sup>[3]</sup>。从宁夏枸杞中分离纯化的天然活性成分主要包括生物碱类、黄酮类、苯丙素类、类胡萝卜素、多糖类等<sup>[4,5]</sup>。现代药理研究表明,宁夏枸杞具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、降血脂、肝保护、神经保护、视力保护等作用<sup>[6,7]</sup>。

为拓宽枸杞类植物中的生物活性成分类型,进一步加深对宁夏枸杞药效物质基础的认识,丰富宁夏枸杞开发利用的理论基础,本实验采用多种色谱分离技术和波谱手段,系统分离了宁夏枸杞根和茎部,确定了12个化合物(图1),其均为首次从该植物中分离得到。对分离得到的化合物进行细胞活力和体外抗炎活性测试,发现化合物2能显著地抑制NO释放活性,为后续寻找宁夏枸杞中具有抗炎活性的天然活性成分提供了一些科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

液相用水(广东怡宝公司生产纯净水 20180407);BP211D 电子天平(Sartorius 公司);硅胶(青岛海洋化工厂 0180011);KQ5200E 型超声波清洗器仪

(昆山市超声仪器有限公司);TLC 预制板(青岛海洋化工厂 20170919);Eyela 旋转蒸发仪;ODS(Silicycle 公司 76231);色谱级甲醇(山东禹王公司 20180426016);液相分析色谱柱为 Ultimate XB-C<sub>18</sub>(5 μm, 4.6 × 250 mm)(美国 Welch 公司);Sephadex LH-20(Pharmacia 公司 10179062);液相半制备色谱柱为 Ultimate XB-C<sub>18</sub>(5 μm, 10 × 250 mm)(美国 Welch 公司);核磁用氘代试剂(Merck 公司 PR-286431012517MEI);Bruker AV-300、AV-400 和 AV-600 型核磁共振仪(德国布鲁克公司);LC-100 型液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司);Agilent 6120 LC/MS TOF 质谱仪(美国安捷伦科技公司);Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);Waters Synapt G2 TOF 高分辨质谱仪(英国沃特世公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma MKCC5045);Thermo Scientific 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);胎牛血清(杭州四季青公司 18120502);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司 2047946);青-链霉素(美国 Hyclone 公司 1881460),其他试剂均为分析纯。

### 1.2 药材来源

本实验所用宁夏枸杞干燥根、茎采集时间为2015年10月,采集地为甘肃省酒泉市瓜州县,鉴定人为中国科学院昆明植物研究所刘恩德博士,经鉴定该药材为茄科植物宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的干燥根和茎。

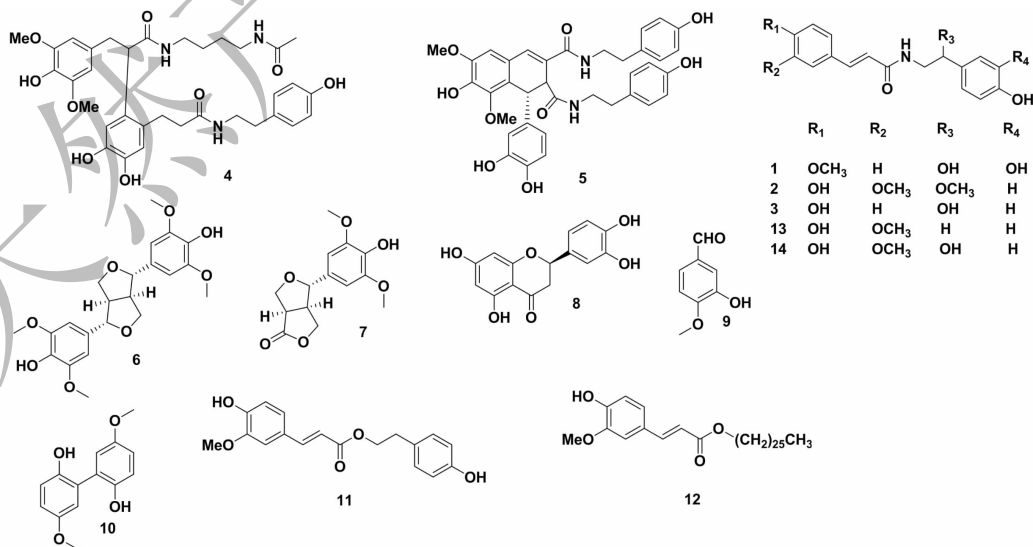


图1 化合物1~12的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-12

### 1.3 细胞株

从暨南大学药学院冻存细胞库中复苏得本实验所用的巨噬细胞 RAW 264.7。

## 2 实验方法

### 2.1 提取与分离

将 10 kg 宁夏枸杞干燥根和茎晾干,粉碎后加乙醇(10 倍量,95%)进行两次热回流提取,再用乙醇(80%)进行一次热回流提取,均为 2 h/次,过滤,合并三次提取液,经浓缩后得 640 g 总浸膏。向总浸膏中加入水悬浮(适量),先后用石油醚、乙酸乙酯萃取,得到萃取液后分别浓缩,最终获得石油醚部位萃取物(107.3 g)、乙酸乙酯部位萃取物(145 g)。石油醚部位(107.3 g)经硅胶柱洗脱(石油醚/乙酸乙酯 100:0→0:100)再经 TLC 分析后合并,得 Fr. 1-20 共 20 个馏分。其中 Fr. 4 经硅胶柱多梯度洗脱(二氯甲烷/甲醇 100:0→0:100)后,得到化合物 **12** (415.8 mg)。乙酸乙酯部位(145 g)先后经硅胶柱洗脱(二氯甲烷/甲醇 100:0→0:100)以及 TLC 分析合并,得到 18 个馏分 Fr. 1-18。其中 Fr. 3 经硅胶柱洗脱(二氯甲烷/甲醇 100:0→0:100),再通过 TLC 分析合并得到 10 个子馏分 Fr. 3-1 ~ Fr. 3-10。Fr. 3-3 经半制备液相色谱(甲醇/水 60:40)制备得到化合物 **9** (13.8 mg)。Fr. 3-7 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等度洗脱(二氯甲烷-甲醇 50:50),得到化合物 **6** (16.3 mg),Fr. 3-10 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等度洗脱(二氯甲烷-甲醇 50:50),得到 4 个子馏分 Fr. 3-10-1 ~ Fr. 3-10-4,其中 Fr. 3-10-4 经半制备液相色谱(甲醇/水 55:45)制备得到化合物 **7** (2.5 mg)。Fr. 6 经硅胶柱色谱梯度洗脱(二氯甲烷/甲醇 100:0→0:100),再通过 TLC 合并得到 7 个子馏分 Fr. 6-1 ~ Fr. 6-7。Fr. 6-2 经过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱等度洗脱(二氯甲烷-甲醇 50:50),得到化合物 **8** (2.8 mg)。同时,Fr. 6-2-3 经半制备液相色谱(甲醇/水 58:42)制备得到化合物 **11** (9.7 mg)。Fr. 8 经过 ODS 开放柱多梯度洗脱(甲醇-水 1:5→100:0),得到 8 个子馏分 Fr. 8-1 ~ Fr. 8-8。Fr. 8-5 经硅胶柱洗脱(二氯甲烷/甲醇 100:0→0:100)得到化合物 **3** (2.4 mg)。Fr. 8-6 经过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱以纯甲醇系统洗脱,得到 Fr. 8-6-4 再经半制备液相色谱(甲醇/水 65:45)制备得到化合物 **10** (5 mg),Fr. 8-6-7 经半制备液相色谱(甲醇/水 60:40)制备得到化合物 **2** (5.3 mg)。Fr. 13 经过 ODS 开放柱梯度洗脱(甲醇-水 1:5→100:0),得到

个子馏分 Fr. 13-1 ~ Fr. 13-8,其中 Fr. 13-6 经半制备液相色谱(甲醇/水 55:45)制备得到化合物 **1** (7.8 mg)。Fr. 15 经硅胶柱洗脱(二氯甲烷/甲醇 100:0→0:100),并且经 TLC 合并得到 10 个子馏分 Fr. 15-1 ~ Fr. 15-10,其中 Fr. 15-5 再经过 ODS 开放柱多梯度洗脱(甲醇-水 1:5→100:0)得到 Fr. 15-5-1,该馏分经半制备液相色谱(甲醇/水 45:55)制备得到化合物 **4** (7 mg)。Fr. 15-7 经过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱以纯甲醇系统洗脱,得到化合物 **5** (5 mg)。

### 2.2 细胞培养

将小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 在 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)中培育,培育条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>,待细胞长满培养皿底部的 80% 面积,将对数生长期的细胞取出用于实验。

### 2.3 细胞活力测试

RAW 264.7 细胞用 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)到 96 孔板(4 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔,体积为 100 μL/孔)。将细胞置培育箱中培养 24 h(培育箱条件:37 °C、5% CO<sub>2</sub>)后吸出培养液,加入待测化合物(不同浓度)及阳性对照药(槲皮素)的培养液,24 h 后将上清液除去,在 96 孔板中加入 MTT (5 mg/mL/孔),温度为 37 °C,4 h 后弃去 MTT,加入 DMSO (200 μL/孔),置摇床上低速震荡 10 min,在观察到结晶充分溶解后,在 570 nm 处用酶标仪测量各孔的 OD 值,计算化合物的 IC<sub>50</sub> 值<sup>[8]</sup>。

### 2.4 抗炎活性测试

本实验中通过抑制一氧化氮(NO)生成实验检测化合物抗炎活性,检测模型为小鼠巨噬细胞 RAW 264.7(LPS 诱导),采用 Griess 试剂显色法评估一氧化氮生成量。将 RAW 264.7 细胞用 DMEM 培养液(10% 胎牛血清)稀释,之后接种到 96 孔板(4 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔,每孔体积 100 μL)。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培育箱培育 24 h 后,吸出培养液,加入待测化合物(不同浓度)及阳性对照药(槲皮素)的培养液(培养液中预先加入 100 ng/mL LPS)。再经 24 h 后,将各孔上清液吸出,移至新的 96 孔板,每孔加入 100 μL 混合溶液(Griess A:B 为 1:1)。离心 1 min (3000 rpm)后移至黑暗处反应 10 min。在 540 nm 波长下用酶标仪测定各孔 OD 值,计算化合物的 IC<sub>50</sub> 值<sup>[8]</sup>。

### 3 实验结果

#### 3.1 化合物结构鉴定

**化合物 1** 黄色油状(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS:*m/z* 352.114 9 [M + Na]<sup>+</sup>, 确定其相对分子质量为 329, 分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.46 (2H, d, *J* = 15.9 Hz, H-2), 7.44 (2H, d, *J* = 15.6 Hz, H-3), 3.44 (1H, dd, *J* = 5.1, 13.5 Hz, H-1'a), 3.54 (1H, dd, *J* = 5.1, 13.5 Hz, H-1'b), 4.73 (1H, dd, *J* = 4.8, 7.8 Hz, H-2'), 7.11 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2''), 6.81 (1H, d, *J* = 5.4 Hz, H-5''), 7.02 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz, H-6''), 7.22 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2''', 6'''), 6.78 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3''', 5'''), 3.87 (3H, s, 4'''-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 169.5 (C-1), 118.6 (C-2), 142.2 (C-3), 48.3 (C-1'), 73.4 (C-2'), 134.7 (C-1''), 111.5 (C-2''), 149.9 (C-3''), 149.3 (C-4''), 116.5 (C-5''), 123.3 (C-6''), 128.2 (C-1'''), 128.4 (C-2''', 6'''), 116.1 (C-3''', 5'''), 158.1 (C-4'''), 56.4 (4'''-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为 *N*-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(4-methoxyphenyl) prop-2-enamide。

**化合物 2** 淡黄色粉末(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS:*m/z* 366.132 9 [M + Na]<sup>+</sup>, 确定其相对分子质量为 343, 分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3.47 (2H, dd, *J* = 8.1, 13.8 Hz, H-1'), 3.89 (3H, s, 3'''-OCH<sub>3</sub>), 3.22 (3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>), 4.25 (1H, dd, *J* = 4.2, 8.4 Hz, H-2'), 7.13 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, H-2''), 6.80 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3'', 5''), 6.79 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'''), 6.48 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-2), 7.03 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6'''), 7.17 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2'', 6''), 7.44 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-3); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 47.1 (C-1'), 56.4 (3'''-OCH<sub>3</sub>), 56.8 (2'-OCH<sub>3</sub>), 83.3 (C-2'), 111.5 (C-2'''), 116.3 (C-3'', 5''), 116.5 (C-5'''), 118.6 (C-2), 123.3 (C-6'''), 128.3 (C-1'''), 129.2 (C-2'', 6''), 131.4 (C-1''), 142.2 (C-3), 149.3 (C-3'''), 149.9 (C-4'''), 158.6 (C-4''), 169.2 (C-1)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl] acrylamide。

**化合物 3** 白色粉末(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS:*m/z* 298.111 0 [M - H]<sup>-</sup>, 确定其相对分子质量为 299,

分子式为 C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3.43 (1H, dd, *J* = 7.8, 13.8 Hz, H-1'a), 3.53 (1H, dd, *J* = 3.6, 13.8 Hz, H-1'b), 4.72 (1H, dd, *J* = 4.8, 7.8 Hz, H-2'), 6.78 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5', 7'), 6.78 (1H, d, *J* = 9 Hz, H-6, 8), 6.44 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-2), 7.22 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-4', 8'), 7.41 (2H, d, *J* = 9 Hz, H-5, 9), 7.45 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-3); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 47.8 (C-1''), 73.5 (C-2'), 116.1 (C-5', 7'), 116.7 (C-6, 8), 118.3 (C-2), 127.7 (C-4), 128.5 (C-4', 8'), 130.6 (C-5, 9), 134.7 (C-3'), 142.0 (C-3), 158.1 (C-7), 160.6 (C-6'), 169.6 (C-1)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 *N-trans-coumaroyloctopamine*。

**化合物 4** 黄色油状(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS:*m/z* 658.273 5 [M + Na]<sup>+</sup>, 确定其相对分子质量为 635, 分子式为 C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.35 (2H, s, H-3), 7.58 (1H, s, H-8), 6.84 (1H, s, H-2'), 6.59 (1H, s, H-5), 2.48 (2H, m, H-2), 2.23 (2H, m, H-4', 8'), 6.94 (2H, d, *J* = 16.8 Hz, H-2'', 6''), 6.68 (2H, d, *J* = 16.8 Hz, H-3'', 5''), 2.60 (2H, t, *J* = 14.4 Hz, H-7''), 3.22 (2H, m, H-8''), 3.14 (2H, m, H-1'''), 1.48 (4H, br. s, H-2''), 3.24 (2H, m, H-4''), 1.91 (3H, s, N-COCH<sub>3</sub>), 3.57 (6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 127.1 (C-1), 109.0 (C-2, 6), 148.7 (C-3, 5), 138.0 (C-4), 138.4 (C-7), 132.6 (C-8), 170.6 (C-9), 132.3 (C-1'), 118.2 (C-2'), 147.3 (C-3'), 146.2 (C-4'), 118.3 (C-5'), 127.1 (C-6'), 29.8 (C-7'), 37.7 (C-8'), 175.0 (C-9'), 131.2 (C-1''), 130.7 (C-2'', 6''), 116.2 (C-3'', 5''), 156.8 (C-4''), 35.6 (C-7''), 42.3 (C-8''), 40.2 (C-1), 27.7 (C-2), 28.0 (C-3), 40.6 (C-4), 173.6 (N-COCH<sub>3</sub>), 22.6 (N-COCH<sub>3</sub>), 56.3 (3', 5'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 (*E*)-2-(4,5-dihydroxy-2-[(3-[(4-hydroxyphenethyl)amino]-3-oxopropyl]phenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-*N*-(4-acetamidobutyl) acrylamide。

**化合物 5** 白色粉末(DMSO);HR-ESI-MS:*m/z* 641.251 1 [M + H]<sup>+</sup>, 确定其相对分子质量为 640, 分子式为 C<sub>36</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>49</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 4.61 (1H, s, H-1), 3.58 (1H, s, H-2), 7.28 (1H, s, H-4), 6.73 (1H, s, H-5), 6.37 (1H, d,

$J = 2.4$  Hz, H-2'), 6.54 (1H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-5'), 6.28 (1H, dd,  $J = 2.4, 6.4$  Hz, H-6'), 6.87 (2H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-2''', 6'''), 6.62 (2H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-3'', 5''), 6.66 (2H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-3''', 5'''), 6.96 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2'', 6''), 3.23 (2H, m, H- $\alpha$ ), 3.10 (2H, m, H- $\alpha'$ ), 2.61 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H- $\beta$ ), 2.46 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H- $\beta'$ ), 3.83 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.47 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>), 7.68 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, -NH), 8.15 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, -NH'); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 38.8 (C-1), 47.3 (C-2), 126.4 (C-3), 132.0 (C-4), 107.7 (C-5), 147.2 (C-6), 141.0 (C-7), 145.7 (C-8), 122.7 (C-4a), 124.2 (C-8a), 170.7 (C-2a), 167.3 (C-3a), 134.7 (C-1'), 115.1 (C-2'), 143.5 (C-3'), 144.6 (C-4'), 115.1 (C-5'), 118.1 (C-6'), 129.6 (C-1'', 1'''), 129.5 (C-2''', 6'''), 115.1 (C-3'', 5''), 155.6 (C-4'', 4'''), 115.1 (C-3''', 5'''), 129.5 (C-2'', 6''), 40.1 (C- $\alpha$ ), 40.3 (C- $\alpha'$ ), 34.3 (C- $\beta$ ), 34.4 (C- $\beta'$ ), 56.8 (6-OCH<sub>3</sub>), 60.8 (8-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**5**为1,2-dihydro-6,8-dimethoxy-7-hydroxy-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-*N*<sup>1</sup>, *N*<sup>2</sup>-bis [2-(4-hydroxyphenyl) ethyl]-2,3-naphthalene dicarboxamide。

**化合物 6** 无色油状(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS: $m/z$  441.151 2 [M + Na]<sup>+</sup>,确定其相对分子质量为418,分子式为C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 3.14 (2H, m, H-1, 5), 3.84 (1H, s, H-4b, 8b), 3.87 (12H, m, 3', 5', 3'', 5''-OCH<sub>3</sub>), 4.26 (2H, m, H-4a, 8a), 4.71 (2H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-2, 6), 6.66 (4H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-1', 6', 1'', 6''); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 55.5 (C-1, 5), 56.8 (C-3', 5', 3'', 5''-OCH<sub>3</sub>), 72.8 (C-4, 8), 87.6 (C-2, 6), 104.5 (C-2', 6', 2'', 6''), 133.1 (C-1', 1''), 136.1 (C-4', 4''), 149.3 (C-3', 5', 3'', 5'')。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**6**为(+)-syringaresinol。

**化合物 7** 白色粉末(DMSO);HR-ESI-MS: $m/z$  281.102 1 [M + H]<sup>+</sup>,确定其相对分子质量为280,分子式为C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 3.13 (1H, m, H-5), 3.59 (1H, m, H-1), 3.75 (6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.93 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-4b), 4.20 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-8b), 4.35 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-4a), 4.48 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-8a),

4.62 (1H, d,  $J = 10.4$  Hz, H-6), 6.63 (2H, s, H-2', 6'); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 45.9 (C-5), 48.4 (C-1), 56.3 (C-3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 69.7 (C-8), 70 (C-4), 86.3 (C-6), 102.8 (C-2', 6'), 129.8 (C-1'), 134.9 (C-4'), 147.3 (C-3', 5'), 178 (C-2)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**7**为zhebeiresinol。

**化合物 8** 黄棕色固体(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS: $m/z$  289.071 7 [M - H]<sup>-</sup>,确定其相对分子质量为288,分子式为C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 2.70 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3 $\beta$ ), 3.07 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 5.29 (1H, t,  $J = 12.6$  Hz, H-2), 5.88 (1H, s, H-8), 5.90 (1H, s, H-6), 6.92 (1H, s, H-2'), 6.79 (2H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-5', 6'); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 44.1 (C-3), 80.5 (C-2), 96.2 (C-8), 97.0 (C-6), 103.3 (C-10), 114.7 (C-2'), 116.2 (C-5'), 119.2 (C-6'), 131.8 (C-1'), 146.5 (C-3'), 146.9 (C-4'), 164.8 (C-9), 165.5 (C-5), 168.4 (C-7), 197.7 (C-1)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**8**为(±)-eriodictyol。

**化合物 9** 白色粉末(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS: $m/z$  153.054 8 [M + H]<sup>+</sup>,确定其相对分子质量为152,分子式为C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.75 (1H, s, -CHO), 7.46 (1H, s, H-2), 7.44 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.95 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-6), 3.94 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 56.4 (4-OCH<sub>3</sub>), 111.2 (C-2), 116.4 (C-6), 128.0 (C-5), 130.4 (C-1), 149.8 (C-3), 155.2 (C-4), 192.0 (C-1')。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**9**为isovanilin。

**化合物 10** 白色粉末(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS: $m/z$  247.090 2 [M + H]<sup>+</sup>,确定其相对分子质量为246,分子式为C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.44 (2H, br. s, 2,2'-OH), 6.77 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3, 3'), 7.02 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-4, 4'), 7.11 (2H, s, H-6, 6'), 3.88 (6H, s, 5, 5'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 127.7 (C-1, 1'), 150.4 (C-2, 2'), 116.3 (C-3, 3'), 123.9 (C-4, 4'), 149.2 (C-5, 5'), 111.6 (C-6, 6'), 56.3 (5, 5'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**10**为5,5'-dimethoxybiphenyl-2,2'-diol。

**化合物 11** 黄色粉末(CH<sub>3</sub>OH);HR-ESI-MS:

$m/z$  315. 141 7  $[M + H]^+$ , 确定其相对分子质量为 314, 分子式为  $C_{18}H_{18}O_5$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 2.76 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-2''), 3.46 (1H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-1''), 3.88 (1H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 7.12 (2H, s, H-2), 6.72 (1H, d,  $J = 12.8$  Hz, H-3', 5'), 6.80 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.40 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-8), 7.02 (2H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-6), 7.05 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', 6'), 7.43 (1H, d,  $J = 13.6$  Hz, H-7');  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 35.8 (C-2''), 42.5 (C-1''), 56.4 (3-OCH<sub>3</sub>), 111.5 (C-2), 116.3 (C-3', 5'), 116.5 (C-5), 118.7 (C-8), 123.2 (C-6), 128.3 (C-1), 130.7 (C-2', 6'), 131.3 (C-1'), 142.0 (C-7), 149.3 (C-3), 149.8 (C-4), 156.9 (C-4'), 169.2 (C-9)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate。

**化合物 12** 白色粉末 ( $CHCl_3$ ); HR-ESI-MS:  $m/z$  581.451 9  $[M + Na]^+$ , 确定其相对分子质量为 558, 分子式为  $C_{36}H_{62}O_4$ ;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.88 (3H, t,  $J = 6.3$  Hz, H-26'), 1.70 (2H, m, H-2'), 3.91 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 4.19 (2H, t,  $J = 12.6$  Hz, H-1'), 7.02 (1H, s, H-2), 6.91 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 7.06 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6), 7.61 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7), 6.29 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-3), 5.98 (1H, s, -OH), 1.25 (46H, br. s,  $(CH_2)_{23}$ );  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 14.3 (C-26'), 22.8 (C-25'), 26.1 (C-3'), 28.9 ( $CH_2$ ), 29.4 ( $CH_2$ ), 29.5 ( $CH_2$ ), 29.7 ( $CH_2$ ), 29.7 ( $CH_2$ ), 29.8 ( $CH_2 \times 2$ ), 29.8 ( $CH_2 \times 14$ ), 32.1 (C-1), 56.0 (3-OCH<sub>3</sub>), 64.7 (C-1'), 109.4 (C-2), 114.8 (C-5), 115.7 (C-8), 123.1 (C-6), 127.1 (C-1), 144.8 (C-7), 146.9 (C-3), 148.0 (C-4), 167.5 (C-9)。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为 *E*-ferulic acid hexacosyl ester。

### 3.2 细胞活力及抗炎活性实验结果

从宁夏枸杞根及茎中分离得到的 12 个化合物 (**1~12**) 的细胞毒活性和抗炎活性结果见表 1。具有显著抗炎活性的为化合物 **2**, 其  $IC_{50}$  值为  $17.00 \pm 1.11 \mu\text{mol/L}$ , 小于阳性对照药槲皮素 ( $IC_{50} = 17.21 \pm 0.50 \mu\text{mol/L}$ )。比较化合物 **2** 和 **3** 的结构与活性, 可初步推测该类化合物抑制 NO 生成的活性与  $R_2$ ,  $R_3$  上的取代基团有关, 本研究选取了与化合物 **2** 具有相同骨架的化合物 **13**, **14**, 进一步测试了它们

的细胞毒活性与抗炎活性, 结果发现具有阿魏酰酪胺骨架的一类化合物,  $R_3$  上的取代基团是其抗炎活性的关键, 其活性大小关系为:  $R_3$  为甲氧基 >  $R_3$  为氢取代 >  $R_3$  为羟基, 且当  $R_3$  上为羟基取代时, 化合物无抗炎活性。

表 1 化合物 **1~14** 的细胞毒活性和抗炎活性

Table 1 Cytotoxic activity and anti-inflammatory activity of compounds **1-14**

化合物 Compounds	细胞活力 Cytotoxic activity ( $IC_{50}/\mu\text{mol/L}$ )	抗炎活性 Anti-inflammatory activity ( $IC_{50}/\mu\text{mol/L}$ )
	RAW 264.7	NO
	阳性对照 Positive control	>100
1	>100	>100
2	>100	$17.00 \pm 1.11$
3	>100	>100
4	>100	>100
5	>100	>100
6	>100	$60.05 \pm 1.90$
7	>100	>100
8	>100	>100
9	>100	>100
10	>100	>100
11	>100	>100
12	>100	>100
13	>100	$33.15 \pm 2.04$
14	>100	>100

注: 阳性对照药为槲皮素, 化合物 **13** 为 *N*-*trans*-feruloyltyramin, **14** 为 (2*S*, *E*)-*N*-[2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]ferulamide 其结构见图 1。Note: Quercetin was used as positive control, compound 13 is *N*-*trans*-feruloyltyramin, and 14 is (2*S*, *E*)-*N*-[2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]ferulamide. Their structures are shown in Fig 1.

## 4 结论

本研究从宁夏枸杞根和茎部分离鉴定了 12 个化合物, 均为首次从该植物中分离得到。此外, 对这 12 个化合物进行了细胞毒活性和抗炎活性测试, 发现化合物 **2** 具有明显的抗炎活性, 其活性略强于阳性对照药槲皮素。通过比较化合物 **2**, **3**, **13**, **14** 的活性结果, 推测具有阿魏酰酪胺骨架的一类化合物,  $R_3$  上的取代基团是其抗炎活性的关键, 其活性大小关系为:  $R_3$  为甲氧基 >  $R_3$  为氢取代 >  $R_3$  为羟基, 且当  $R_3$  上为羟基取代时, 化合物无抗炎活性。本研究结果为后续寻找宁夏枸杞中具有抗炎活性的天然活性成分提供了一些科学依据, 丰富了医药和天然产物开发提的理论基础。

## 参考文献

- 1 Zheng XH, Chen F, Liang QP, et al. Amide constituents from the root of *Lycium yunnanense* Kuang and their anti-inflammatory activity[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:603-609.
- 2 Dong JZ, Yang JJ, Wang Y, et al. Resources of *Lycium* species in China and research progress at home and abroad[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33:2020-2027.
- 3 Wei ZL, Shi YY, Re YC, et al. Study on hypoglycemic mechanism of Cortex Lycii [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36:1050-1052.
- 4 Peng X, Tian G. Structural characterization of the glycan part of glycoconjugate LbGp2 from *Lycium barbarum* L. [J]. Carbohydr Res, 2001, 331:95-99.
- 5 Wei XS, Wang HY, Sun ZX, et al. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Lycium barbarum* L. [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2018, 40:2513-2520.
- 6 Chan HC, Chang RCC, Ip AKC, et al. Neuroprotective effects of *Lycium barbarum* Lynn on protecting retinal ganglion cells in an ocular hypertension model of glaucoma[J]. Exp Neurol, 2007, 203:269-273.
- 7 Zhu YF, Zhao QP, Gao H, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides attenuates *N*-methy-*N*-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in rats through regulation of poly(ADP-ribose) polymerase and caspase expression[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 191:125-134.
- 8 Xie LW, Atanasov AG, Guo DA, et al. Activity-guided isolation of NF- $\kappa$ B inhibitors and PPAR $\gamma$  agonists from the root bark of *Lycium chinense* Miller[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152:470-477.
- 9 Khalid MK, Ghulam MM, Ahmed A, et al. Three tyrosinase inhibitors and antioxidant compounds from *Salsola foetida* [J]. Helv Chim Acta, 2003, 86:457-463.
- 10 Choonghwan L, Jinhee K, Hojae L, et al. Two new constituents of *Isodon excisus* and their evaluation in an apoptosis [J]. J Nat Prod, 2001, 64:659-660.
- 11 Feng J, Hu M, Jin YJ, et al. Radical scavenging constituents from leaf of *Humulus scandens* [J]. Asian Journal of Chem, 2016, 8:1820-1822.
- 12 Zhang JX, Guan SH, Feng RH, et al. Neolignanamides, Lignan amides and other phenolic compounds from the root bark of *Lycium chinense* [J]. J Nat Prod, 2013, 76:51-58.
- 13 Mariaana HC, Nidia FR. Amides and lignamides from *Porcellia Macrocarpa* [J]. Phytochemistry, 1997, 46:879-881.
- 14 Wan MNHWS, Hakimi WS, Farediah A, et al. Anticholinesterase and anti-inflammatory constituents from *Beilschmiedia pulverulenta* Kosterm [J]. Nat Prod Sci, 2016, 22:225-230.
- 15 Oouyang GQ, Yang JZ, Ma J, et al. Chemical constituents from stems of *Clausena emarginata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47:1480-1485.
- 16 Zhou J, Li D, Wang JG, et al. Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam [J]. Nat Prod Res, 2007, 21:283-291.
- 17 Yun XJ, Shu HM, Chen GY, et al. Chemical constituents from barks of *Lannea coromandelica* [J]. Chin Herbal Med, 2014, 6:65-69.
- 18 Li XB, Chen GY, Liu RJ, et al. A new biphenyl derivative from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis longicolla* HL-2232 [J]. Nat Prod Res, 2017, 31:2264-2267.
- 19 Faten MMD, Manfred GR. Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. [J]. Phytochem, 2003, 62:1179-1184.
- 20 Wang GY, Lin PC, Gui X, et al. Phenolic compounds isolated from rhizoma of *Aster tataricus* [J]. Chin J Chin Mater Med, 2003, 28:946-948.