

## 牛大力根化学成分及其抑制破骨细胞产生活性

刘雅兰<sup>1</sup>, 张毓婷<sup>2</sup>, 顾琼<sup>2</sup>, 滕希峰<sup>4</sup>\*, 何琳<sup>3</sup>\*<sup>1</sup>广东药科大学药学院; <sup>2</sup>中山大学药学院, 广州 510006;<sup>3</sup>广东药科大学医药化工学院 广东省化妆品工程技术研究中心, 中山 528458;<sup>4</sup>广东药科大学中药学院 国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点实验室, 广州 510006

**摘要:**为研究牛大力(*Millettia speciosa* Champ.) 根的化学成分及其抑制破骨细胞产生活性, 采用色谱技术从牛大力根部分 95% 乙醇提取物中分离得到 11 个化合物。通过核磁共振波谱、质谱以及与文献数据比较, 化合物结构鉴定为 millettiaosa A(1)、高丽槐素(2)、medicarpin(3)、羽扇豆醇(4)、 $\beta$ -谷甾醇亚油酸酯(5)、 $\beta$ -谷甾醇(6)、单棕榈酸甘油酯(7)、二十七烷酸甘油酯(8)、香草醛(9)、琥珀酸甲酯(10)和 1-辛醇(11)。其中化合物 5 和 10 为首次从崖豆藤属中分离得到。对化合物 1~11 的抑制破骨细胞产生活性进行评价, 发现化合物 2、3、4 和 6 具有显著的抑制破骨细胞产生活性, 其  $IC_{50}$  分别为 2.23、1.39、2.25 和 1.63  $\mu$ M。其中化合物 2 为首次报道具有抑制破骨细胞产生活性。

**关键词:**牛大力; 化学成分; 结构鉴定; 抑制破骨细胞产生

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)12-2046-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.12.004

## Chemical constituents of the roots of *Millettia speciosa* and their inhibitory effects on the formation of osteoclastic cell

LIU Ya-lan<sup>1</sup>, ZHANG Yu-ting<sup>2</sup>, GU Qiong<sup>2</sup>, TENG Xi-feng<sup>4</sup>\*, HE Lin<sup>3</sup>\*<sup>1</sup>School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University;<sup>2</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China;<sup>3</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Provincial Cosmetics Engineering and Technology Research Center, Zhongshan 528458, China;<sup>4</sup>School of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, State Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory for Production and Development of Lingnan Medicinal Material, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** To investigate the chemical constituents and their inhibitory effects on osteoclastic cell formation activity from the roots of *Millettia speciosa*, eleven compounds were isolated and identified from the roots of *Millettia speciosa* through various column chromatography. Based on the NMR and MS spectra, their structures were identified as millettiaosa A(1), maackiain(2), medicarpin(3), lupeol(4),  $\beta$ -sitosterollinoleate(5),  $\beta$ -sitosterol(6),  $\alpha$ -monopalmitin(7), (2S)-1-O-heptatriacontanoyl glycerol(8), vanillin(9), methyl hydrogen succinate(10), 1-octanol(11). Compounds 5 and 10 were firstly isolated from the genus *Millettia*. All the isolated compounds 1-11 were evaluated for their inhibitory effects on osteoclastic cell formation. Among of them, compounds 2, 3, 4 and 6 exhibited potent inhibition with  $IC_{50}$  values of 2.23, 1.39, 2.25 and 1.63  $\mu$ M, respectively. Compound 2 was firstly reported inhibitory effects on osteoclastic cell formation activity.

**Key words:** *Millettia speciosa*; chemical composition; structural identification; inhibition of osteoclastic cell formation

牛大力(*Millettia speciosa* Champ.) 是豆科崖豆藤属植物, 别名血藤、猪脚笠、倒吊金钟、山莲藕、金

钟根、大力薯、美丽崖豆藤等, 主要分布于我国的福建、广西、广东、贵州、海南等地<sup>[1,2]</sup>。牛大力作为传统的药食同源植物在民间的食用历史悠久, 主要用于腰肌劳损、肺虚咳嗽、风湿性关节炎、跌打损伤等疾病<sup>[3]</sup>。据报道, 牛大力中化学成分包括异黄酮类、黄酮类、生物碱、香豆素和三萜等化合物<sup>[4,6]</sup>。但

收稿日期: 2019-09-27 接受日期: 2019-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(81573310); 省、市重点学科建设专项(51661001)

\* 通信作者 Tel: 86-760-88207977; E-mail: xfteng78@163.com, helin721@163.com

牛大力根、茎和叶的化学成分有所不同,其中根部富含异黄酮类化合物,以高丽槐素为主<sup>[3]</sup>。近年来,因极高的经济及药用价值,牛大力在两广地区及香港等地的使用量逐年增多,造成了牛大力资源的短缺<sup>[2]</sup>。因此,深入研究牛大力显得十分必要。为了进一步研究其物质基础并寻找可能的抑制破骨细胞产生活性成分,我们对产于广西的牛大力干燥根部分进行了系统化学成分研究,从中提取分离到了11个化合物,分别鉴定为 millettiaosa A (**1**)、高丽槐素 (**2**)、medicarpin (**3**)、羽扇豆醇 (**4**)、 $\beta$ -谷甾醇亚油酸酯 (**5**)、 $\beta$ -谷甾醇 (**6**)、单棕榈酸甘油酯 (**7**)、二十七烷酸甘油酯 (**8**)、香草醛 (**9**)、琥珀酸甲酯 (**10**) 和 1-辛醇 (**11**)。化合物 **5** 和 **10** 为首次从崖豆藤属中分离得到。同时测定了化合物 **1**~**11** 的抑制破骨细胞产生活性。其中化合物 **2**、**3**、**4** 和 **6** 显示出显著的抑制破骨细胞产生活性,其  $IC_{50}$  分别为 2.23、1.39、2.25 和 1.63  $\mu\text{M}$ 。其中化合物 **2** 为首次报道具有抑制破骨细胞产生活性。

## 1 仪器与材料

LC-MS 液质联用仪 (美国 Agilent 公司);  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR 用 Bruker Advance 500 型或 400 型超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司) 测定,溶剂为  $\text{CDCl}_3$  和  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 柱层析填料: 正相硅胶 (200-300 目, 青岛海洋化工有限公司), 反相填充材料 RP-18 (40-75  $\mu\text{m}$ , Biotage 公司), Sephadex LH-20 (瑞典 GE healthcare); GF<sub>254</sub> 薄层层析正相硅胶板 (青岛海洋化工有限公司); 显色剂为 10% 的硫酸乙醇溶液; MEM- $\alpha$  培养基 (美国 Gibco); 胎牛血清 (美国 Hyclone); 青霉素和链霉素双抗溶液 (美国 Hyclone); 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, mcsf); GST-rRANKL (中山大学药学院药物分子设计中心); DMSO (上海翌圣生物科技); MTT (上海翌圣生物科技); 4% 多聚甲醛 (安徽 Bio-sharp); TRAcP 染色试剂盒 (美国 Sigma Aldrich)。

牛大力 (*M. speciosa* Champ.) 根部分于 2017 年 11 月采购于广西南宁邕宁区那楼镇屯吴农科组, 由广东药科大学中药资源系滕希峰老师鉴定, 标本存放于广东药科大学中药学院。

## 2 提取与分离

将牛大力 (*M. speciosa* Champ.) 根部分 10.5 kg, 粉碎后称重, 加入适量 95% 乙醇, 加热回流提取, 提取 3 次, 每次 2 h。过滤回收提取液并减压浓缩得粗提物 589.5 g。95% 乙醇浸膏用水混悬后, 依次用石

油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯萃取, 每种溶剂萃取三次, 得到石油醚萃取物 56.0 g, 二氯甲烷萃取物 20.0 g, 乙酸乙酯萃取物 40.7 g。

石油醚部分经硅胶柱 (200 ~ 300 目), 以石油醚-乙酸乙酯 ( $V_{\text{石油醚}}/V_{\text{乙酸乙酯}} = 100:0, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0:1$ ) 梯度洗脱, 得到 A1-A15 十五个组分。A5 经反复硅胶柱层析, MCI 和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **5** (8 mg)。A9 经反复硅胶柱层析, MCI 和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **6** (39 mg) 和 **7** (6 mg)。二氯甲烷部分经硅胶柱 (200-300 目), 以二氯甲烷-乙酸乙酯 ( $V_{\text{二氯甲烷}}/V_{\text{乙酸乙酯}} = 100:0, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0:1$ ) 梯度洗脱, 得到 B1-B4 四个组分。B1 经反复硅胶柱层析, MCI 和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **9** (4 mg)。B2 经反复硅胶柱层析, MCI 和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **1** (8 mg)。B3 经反复硅胶柱层析, MCI 和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **4** (6 mg)。乙酸乙酯部分经硅胶柱 (200 ~ 300 目), 以二氯甲烷-甲醇 ( $V_{\text{二氯甲烷}}/V_{\text{甲醇}} = 100:0, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0:1$ ) 梯度洗脱, 得到 C1-C4 四个组分。C1 经反复硅胶柱层析, MCI 和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **8** (7 mg)。C2 经反复硅胶柱层析, MCI 和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **3** (5 mg) 和 **11** (4 mg)。C3 经反复硅胶柱层析, MCI 和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **10** (3 mg) 和 **2** (6 mg)。

## 3 波谱数据和结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色无定形粉末;  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$ , ESI-MS:  $m/z$  321 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 Hz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.36 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-1), 6.72 (1H, s, H-11), 6.55 (1H, dd,  $J = 8.3, 2.6$  Hz, H-2), 6.43 (1H, s, H-8), 6.41 (1H, d,  $J = 2.6$  Hz, H-4), 5.90 (2H, d,  $J = 11.0$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.47 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-6a), 4.22 (1H, dd,  $J = 11.1, 5.1$  Hz, H-6), 3.63 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-6), 3.47 (1H, m, H-12a), 1.25 (2H, m, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 Hz)  $\delta_{\text{C}}$ : 132.2 (C-1), 112.7 (C-1a), 109.9 (C-2), 157.3 (C-3), 103.8 (C-4), 156.8 (C-4a), 66.6 (C-6), 78.6 (C-6a), 154.4 (C-7a), 94.0 (C-8), 148.2 (C-9), 141.9 (C-10), 104.9 (C-11), 118.1 (C-11a), 101.4 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 29.9 (C-12), 40.30 (C-12a)。以上数据和文献<sup>[7]</sup>对照基本一致, 故确定化合物为 millettiaosa A。

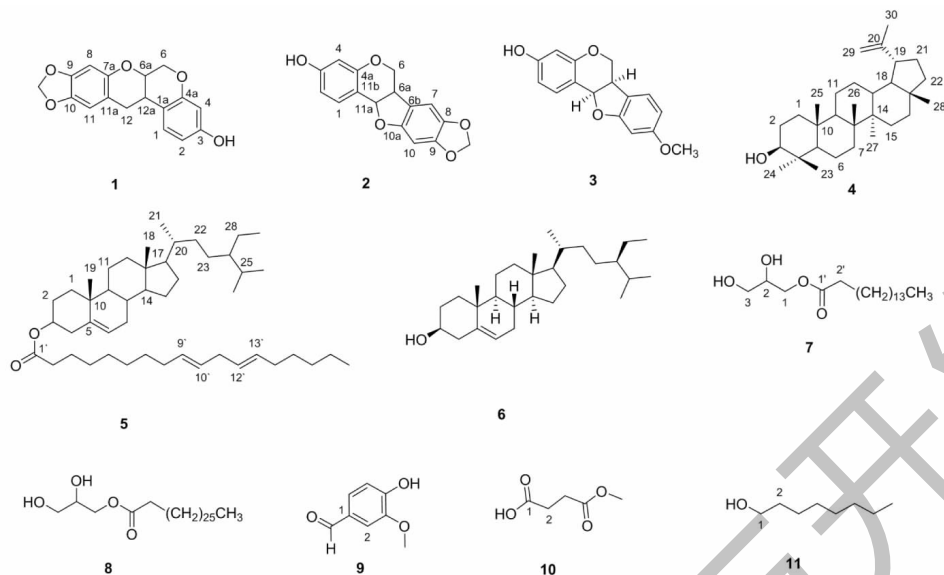


图1 化合物1~11的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-11

**化合物 2** 白色无定形粉末;  $C_{16}H_{12}O_5$ , ESI-MS:  $m/z$  283.3  $[M]^+$ ;  $^1H$  NMR ( $CD_3$ ) $_2CO$ , 400 Hz)  $\delta_H$ : 7.27 (1H, s, H-1), 6.86 (1H, d,  $J = 8.4, 2.5$  Hz, H-2), 6.52 (1H, s, H-7), 6.36 (1H, s, H-4), 6.32 (1H, s, H-10), 5.87 (2H, d,  $J = 11.8$  Hz,  $OCH_2O$ ), 5.46 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-11a), 4.24 (1H, d,  $J = 10.5, 4.5$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.59 (1H, t,  $J = 10.5, 9.5$  Hz, H-6 $\beta$ ), 3.54 (1H, m, H-6a);  $^{13}C$  NMR ( $CD_3$ ) $_2CO$ , 100 Hz)  $\delta_C$ : 133.1 (C-1), 110.5 (C-2), 159.8 (C-3), 104.0 (C-4), 157.8 (C-4a), 67.1 (C-6), 41.1 (C-6a), 119.6 (C-6b), 106.0 (C-7), 142.5 (C-8), 149.0 (C-9), 94.0 (C-10), 155.4 (C-10a), 79.5 (C-11a), 112.9 (C-11b), 102.2 ( $OCH_2O$ )。以上数据和文献<sup>[8]</sup>对照基本一致,故确定化合物为高丽槐素。

**化合物 3** 黄色油状物;  $C_{16}H_{14}O_4$ , ESI-MS:  $m/z$  271  $[M + H]^+$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 Hz)  $\delta_H$ : 7.38 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-1), 7.13 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-7), 6.56 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.5$  Hz, H-2), 6.46 (1H, dd,  $J = 5.6, 2.4$  Hz, H-8), 6.46 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-10), 6.42 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-4), 5.49 (1H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-11a), 4.23 (1H, dd,  $J = 10.8, 4.8$  Hz, H-6 $\beta$ ), 3.77 (3H, s, 9- $OCH_3$ ), 3.61 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.53 (1H, ddd,  $J = 11.6, 8.0, 3.4$  Hz, H-6a);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 Hz)  $\delta_C$ : 132.3 (C-1), 109.9 (C-2), 156.8 (C-3), 103.8 (C-4), 157.3 (C-4a), 66.7 (C-6), 39.7 (C-6a),

119.3 (C-6b), 124.9 (C-7), 106.5 (C-8), 161.3 (C-9), 97.1 (C-10), 160.8 (C-10a), 78.7 (C-11a), 112.7 (C-11b), 55.7 (9- $OCH_3$ )。以上数据和文献<sup>[9]</sup>对照基本一致,故确定化合物为 medicarpin。

**化合物 4** 白色粉末;  $C_{30}H_{50}O$ , ESI-MS:  $m/z$  426  $[M]^+$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 Hz)  $\delta_H$ : 4.68 (1H, s, H-29), 4.57 (1H, s, H-29), 3.19 (1H, dd,  $J = 11.2, 5.1$  Hz, H-3), 1.68 (3H, s, 30- $CH_3$ ), 1.01 (3H, s, 26- $CH_3$ ), 0.97 (3H, s, 23- $CH_3$ ), 0.94 (3H, s, 27- $CH_3$ ), 0.83 (3H, s, 25- $CH_3$ ), 0.79 (3H, s, 28- $CH_3$ ), 0.76 (3H, s, 24- $CH_3$ );  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 Hz)  $\delta_C$ : 38.8 (C-1), 27.6 (C-2), 79.2 (C-3), 39.0 (C-4), 55.4 (C-5), 18.5 (C-6), 34.4 (C-7), 41.0 (C-8), 50.6 (C-9), 37.3 (C-10), 21.1 (C-11), 22.9 (C-12), 38.2 (C-13), 43.0 (C-14), 25.3 (C-15), 35.7 (C-16), 43.2 (C-17), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 151.1 (C-20), 29.9 (C-21), 40.2 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 16.3 (C-25), 16.1 (C-26), 14.7 (C-27), 18.2 (C-28), 109.5 (C-29), 19.5 (C-30)。以上数据和文献<sup>[10]</sup>对照基本一致,故确定化合物为羽扇豆醇。

**化合物 5** 淡黄色油状物;  $C_{47}H_{80}O_2$ , ESI-MS:  $m/z$  677  $[M + H]^+$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 Hz)  $\delta_H$ : 5.43 (4H, m, H-9', 10', 12', 13'), 4.61 (1H, m, H-3), 2.77 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz, H-11'), 2.27 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-2'), 2.10 (4H, m, H-8', 14'), 1.68 (m,  $-(CH_2)_n-$ ), 1.02 (3H, s, 19- $CH_3$ ), 0.91 (3H, s, 21-

CH<sub>3</sub>), 0.89 (3H, t,  $J = 6.3$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, m, 29-CH<sub>3</sub>), 0.84 (3H, s, 26-CH<sub>3</sub>), 0.80 (3H, s, 27-CH<sub>3</sub>), 0.68 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 Hz)  $\delta_c$ : 37.2 (C-1), 28.4 (C-2), 73.8 (C-3), 38.3 (C-4), 139.9 (C-5), 122.7 (C-6), 32.1 (C-7), 32.1 (C-8), 50.2 (C-9), 36.7 (C-10), 21.2 (C-11), 39.9 (C-12), 42.5 (C-13), 56.8 (C-14), 24.4 (C-15), 29.3 (C-16), 56.2 (C-17), 12.0 (C-18), 19.5 (C-19), 36.3 (C-20), 19.2 (C-21), 34.1 (C-22), 26.2 (C-23), 46.0 (C-24), 29.5 (C-25), 18.9 (C-26), 20.0 (C-27), 23.2 (C-28), 12.1 (C-29), 173.5 (C-1'), 34.9 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.8 (C-4'), 29.5 (C-5'), 32.0 (C-6'), 29.9 (C-7'), 27.4 (C-8'), 128.1 (C-9'), 130.4 (C-10'), 25.8 (C-11'), 130.2 (C-12'), 128.2 (C-13'), 28.0 (C-14'), 29.8 (C-15'), 31.7 (C-16'), 22.9 (C-17'), 14.3 (C-18')。以上数据和文献<sup>[11]</sup>对照基本一致,故确定化合物为 $\beta$ -谷甾醇亚油酸酯。

**化合物 6** 无色针状结晶; C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O, ESI-MS:  $m/z$  437.5 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 Hz)  $\delta_H$ : 5.35 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-6), 3.59 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.92 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.84 (3H, t,  $J = 7.8$  Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 0.81 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, 27-CH<sub>3</sub>), 0.68 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 Hz)  $\delta_c$ : 36.3 (C-1), 29.9 (C-2), 72.0 (C-3), 39.9 (C-4), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 31.8 (C-7), 42.5 (C-8), 50.3 (C-9), 36.7 (C-10), 21.2 (C-11), 37.4 (C-12), 42.5 (C-13), 56.2 (C-14), 24.5 (C-15), 28.4 (C-16), 56.9 (C-17), 12.0 (C-18), 18.9 (C-19), 34.1 (C-20), 19.2 (C-21), 32.1 (C-22), 26.2 (C-23), 46.0 (C-24), 29.3 (C-25), 19.6 (C-26), 20.0 (C-27), 23.2 (C-28), 12.1 (C-29)。以上数据和文献<sup>[12]</sup>对照基本一致,故确定化合物为 $\beta$ -谷甾醇。

**化合物 7** 白色粉末; C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>; ESI-MS:  $m/z$  353 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 Hz)  $\delta_H$ : 4.24 (1H, m, H-1a), 4.16 (1H, m, H-1b), 3.96 (1H, m, H-2), 3.69 (1H, dd,  $J = 11.4, 3.9$  Hz, H-3a), 3.59 (1H, dd,  $J = 11.5, 5.8$  Hz, H-3b), 2.34 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2'), 1.62 (2H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-3'), 1.25 (24H, s, H-4' ~ 15'), 0.87 (3H, t,  $J = 6.6$  Hz, 16'-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 Hz)  $\delta_c$ : 65.3 (C-1), 70.4 (C-2), 63.5 (C-3), 174.5 (C-1'), 34.3 (C-2'), 32.1 (C-3'), 14.3 (C-16')。以上数据和文献<sup>[13]</sup>对照基

本一致,故确定化合物为单棕榈酸甘油酯。

**化合物 8** 白色粉末状结晶; C<sub>30</sub>H<sub>60</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS:  $m/z$  507.7 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 Hz)  $\delta_H$ : 4.23 (2H, m, H-1), 3.96 (1H, m, H-2), 3.70 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.0$  Hz, H-3b), 3.60 (1H, dd,  $J = 11.4, 5.8$  Hz, H-3a), 2.35 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2'), 1.69 (2H, m, H-3'), 1.25 (46 H, m, H-4' ~ H-26'), 0.87 (3H, t,  $J = 6.6$  Hz, 27'-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 Hz)  $\delta_c$ : 65.3 (C-1), 70.4 (C-2), 63.5 (C-3), 174.5 (C-1'), 34.3 (C-2'), 32.1 (C-3'), 29.9 ~ 29.8 (C-4' ~ C-19'), 29.6 (C-20'), 29.5 (C-21'), 29.4 (C-22'), 29.3 (C-23'), 25.1 (C-24'), 22.8 (C-25'), 14.3 (C-27')。以上数据和文献<sup>[14]</sup>对照基本一致,故确定化合物为二十七烷酸甘油酯。

**化合物 9** 无色针状结晶; C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, ESI-MS:  $m/z$  151 [M - H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 Hz)  $\delta_H$ : 9.83 (1H, s, 1-CHO), 7.43 (1H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-6), 7.26 (1H, s, H-2), 7.04 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-5), 5.30 (1H, s, 4-OH), 3.97 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 Hz)  $\delta_c$ : 130.0 (C-1), 108.9 (C-2), 147.3 (C-3), 151.8 (C-4), 114.5 (C-5), 127.7 (C-6), 191.1 (CHO), 56.3 (3-OCH<sub>3</sub>)。以上数据和文献<sup>[15]</sup>对照基本一致,故确定化合物为香草醛。

**化合物 10** 无色油状物; C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS:  $m/z$  155 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 Hz)  $\delta_H$ : 3.70 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>), 2.71 (2H, m, H-2), 2.66 (2H, m, H-3); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 Hz)  $\delta_c$ : 177.3 (COOH), 172.9 (COO), 52.1 (OCH<sub>3</sub>), 29.9 (C-2), 28.8 (C-3)。以上数据和文献<sup>[16]</sup>对照基本一致,故确定化合物为琥珀酸甲酯。

**化合物 11** 白色油状物; C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O, ESI-MS:  $m/z$  153.4 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 Hz)  $\delta_H$ : 3.66 (2H, s, H-1), 1.42 (2H, s, H-2), 1.25 (n × CH<sub>2</sub>), 0.89 (3H, t,  $J = 6.4$  Hz, 8-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 Hz)  $\delta_c$ : 77.4 (C-1), 32.1 (C-2), 30.5 (C-3), 29.9 (C-4), 29.5 (n × CH<sub>2</sub>), 22.9 (C-7), 14.3 (C-8)。以上数据和文献<sup>[17]</sup>对照基本一致,故确定化合物为1-辛醇。

#### 4 化合物的抑制破骨细胞产生活性筛选

采用体外 RANKL 诱导分化的成熟的破骨细胞 (osteoclast, OC), 评价 11 个化合物的抑制破骨细胞产生活性。

分离正常 C57BL/6J 小鼠骨髓单核巨噬细胞 (bone marrow macrophage, BMM), 将 BMM 细胞以  $6 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 细胞培养过夜后, 用完全培养基配置待测化合物, 所有化合物的终浓度均为 10  $\mu\text{M}$ , 弃去板中原有的培养基, 将配置好的化合物分别加入孔中。同时加入 M-CSF 和 GST-rRANKL, 使培养液中 M-CSF 和 GST-rRANKL 的终浓度分别为 30 和 50 ng/mL。每两天换药一次, 直至第 4 或第 5 天对照组出现明显的细胞融合。弃去培养基, 用 4% 的多聚甲醛固定 30 min。之后用 dd H<sub>2</sub>O 轻轻洗三次, 加入配好的 TRAcP 染液, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 直至出现颜色。将板置于光学显微镜下观察, 将细胞核大于等于三个的融合细胞视作破骨细胞, 计数, 结果见图 2 与图

3。用多功能酶标仪工作站检测其在 540 nm 处的吸收强度。

活性测试结果发现化合物 2、3、4 和 6 具有显著的抑制破骨细胞产生活性, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 2.23、1.39、2.25 和 1.63  $\mu\text{M}$ 。

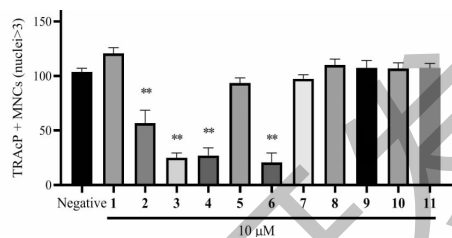


图 2 化合物 1~11 的抑制破骨细胞产生活性  
Fig. 2 Inhibitory effects of compounds 1-11 on osteoclastic cell formation activity

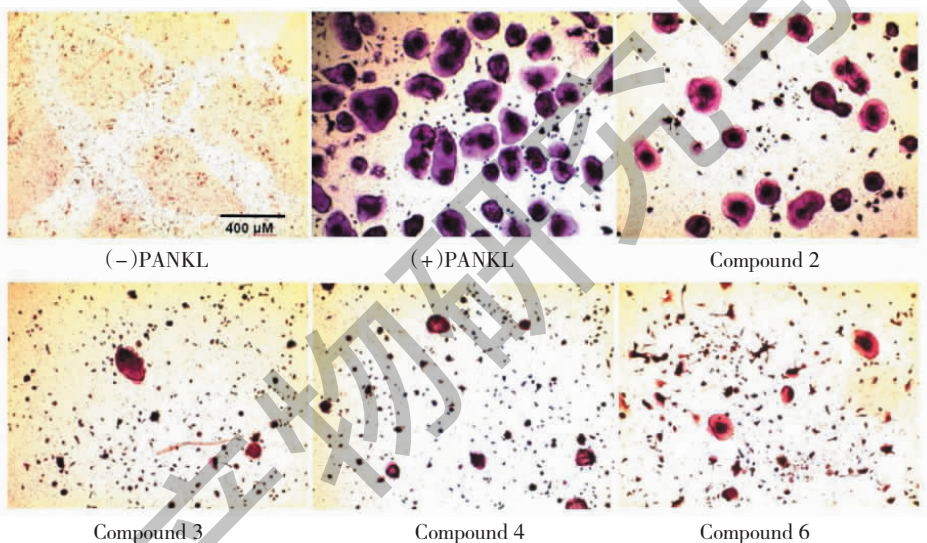


图 3 破骨细胞的 TRAcP 染色图片

Fig. 3 Pictures of osteoclasts stained with TRAcP

注: 化合物 2、3、4 和 6 的浓度均为 10  $\mu\text{M}$ 。Note: Concentrations of compounds 2, 3, 4 and 6 are all 10  $\mu\text{M}$ 。

## 5 结论

本研究从牛大力 (*M. speciosa* Champ.) 根的乙醇提取物中分离鉴定了 11 个化合物, 化合物 5 和 10 为首次从崖豆藤属中分离得到。对分离到的 11 个化合物进行抑制破骨细胞产生活性研究, 其中化合物 2、3、4 和 6 有显著的抑制破骨细胞产生活性。化合物 5 是化合物 6 碳 3 位被亚油酸取代, 未显示抑制破骨细胞产生活性, 说明 3 位长链脂肪酰基取代不利于抑制破骨细胞产生活性。化合物 2 为首次报道具有抑制破骨细胞产生活性。本研究, 为牛大力在骨性疾病上的应用以及牛大力的进一步开发应用

提供了依据。

## 参考文献

- China Flora Editorial Board of CAS. Flora of China (中国植物志): Vol. 40 [M]. Beijing: Science Press, 1994: 136-138.
- Fang LJ, Ning S. Advances on medicinal plant *Millettia speciosa* champ [J]. Anhui Agr Sci Bull (安徽农学通报), 2017, 23(23): 18-20.
- Chen C, Liu PH, Luo N, et al. The overview on the research of radix *Millettiae speciosa* as food [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2016, 37: 168-172.