

## 小驳骨乙酸乙酯部位的化学成分研究

张海新,夏 召,许天启,陈宜敏,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:**研究小驳骨(*Justicia gendarussa* Burm. f.)中乙酸乙酯部位的化学成分。综合运用反复硅胶柱色谱、ODS 开放柱、凝胶柱色谱、反相半制备型 HPLC,对小驳骨的 95% 乙醇提取物中乙酸乙酯部位的化学成分进行分离纯化,并通过 HR-ESI-MS、NMR 等光谱数据及 X 射线单晶衍射共鉴定了 21 个化合物的结构,分别为 2,3,3a,5-四氢-1*H*-苯并[*d*]吡咯并[2,1-*b*][1,3]恶嗪-1-酮(1)、4'-羟基苯乙酮(2)、apocynin(3)、白首乌二苯酮(4)、对羟基苯甲醛(5)、水杨酸(6)、2,4-二羟基苯乙酮(7)、2,5-二羟基苯乙酮(8)、1,3,5-三甲氧基苯(9)、丁香酮(10)、壬二酸(11)、(+)-松脂素-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(12)、corchoionoside C(13)、patuletin-3-*O*-glucoside(14)、commicarpiflavonol glucoside A(15)、1,2,3-三甲氧基-5-硝基苯(16)、4-硝基苯酚(17)、单油酸甘油酯(18)、tetradecanoate(19)、硬脂酸(20)、棕榈酸(21)。化合物 1、16 为新天然产物,所有化合物均首次从该植物中分离得到。对从中分离得到的单体化合物进行抗炎活性的筛选,其中,槲皮素作为阳性药,其  $IC_{50}$  值为  $16.94 \pm 0.40 \mu\text{M}$ 。化合物 4、6、8 具有显著的抗炎活性,其值均小于  $16.94 \pm 0.40 \mu\text{M}$ 。

**关键词:**小驳骨;乙酸乙酯部位;X 射线衍射;抗炎活性

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)7-1148-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.7.009

## Study on chemical constituents from ethyl acetate fraction of *Justicia gendarussa* Burm. f.

ZHANG Hai-xin, XIA Zhao, XU Tian-qi, CHEN Yi-min, ZHOU Guang-xiong\*

Guangdong 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:** To investigate the chemical constituents of the ethyl acetate fractions in *Justicia gendarussa* Burm. f. The chemical constituents in ethyl acetate fractions of 95% ethanol extract from *J. gendarussa* were isolated and purified by repeated silica gel column chromatography, ODS open column, Sephadex LH-20 chromatography and semi-preparative HPLC. Based on HR-ESI-MS, NMR, X-ray single crystal diffraction and other spectral data, 21 compounds were identified as 2,3,3a,5-tetrahydro-1*H*-benzo[*d*]pyrrolo[2,1-*b*][1,3]oxazin-1-one (1), 4'-hydroxyacetophenone (2), apocynin (3), baishouw benzophenone (4), *p*-hydroxybenzaldehyde (5), salicylic acid (6), 2,4-dihydroxyacetophenone (7), 2,5-dihydroxyacetophenone (8), 1,3,5-trimethoxybenzene (9), syringylethanone (10), nonanedioic acid (11), (+)-pinosresinol-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (12), corchoionoside C (13), patuletin-3-*O*-glucoside (14), commicarpiflavonol glucoside A (15), 1,2,3-trimethoxy-5-nitrobenzene (16), 4-nitrophenol (17), glyceryl monooleate (18), tetradecanoate (19), stearic acid (20), palmitic acid (21). Compounds 1 and 16 were discovered from natural resources for the first time. All compounds were isolated from this plant for the first time and were screened for anti-inflammatory activities. The  $IC_{50}$  values of compounds 4, 6 and 8 were lower than that of positive drug (quercetin as positive control,  $IC_{50} = 16.94 \pm 0.40 \mu\text{M}$ ), which indicated compounds 4, 6 and 8 had significant anti-inflammatory activities.

**Key words:** *Justicia gendarussa* Burm. f.; ethyl acetate fraction; X-ray diffraction; anti-inflammatory

收稿日期:2019-12-02 接受日期:2020-05-28

基金项目:国家重点研究计划(2017YFC1703800);自然科学基金面上项目(81573578);广州市科技计划(201704030120)

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

小驳骨 *Justicia gendarussa* Burm. f. 为爵床科驳骨草属多年生小灌木,又名接骨草,生于丘陵草坡,路旁村边或灌木丛中,广泛分布于中国、印度和马来

半岛<sup>[1]</sup>。其干燥地上部分,被《中国药典》2015年版一部收为新增药材,具有祛风湿、散瘀血、续筋骨之功效。小驳骨作为一种民族传统用药,有着广泛的临床应用,被广泛用于治疗筋膜骨折、创伤性损伤、月经阻滞以及产后腹痛等症<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明,小驳骨具有抗炎、抗氧化、止痛和肝保护等多种活性<sup>[2,3]</sup>。但其化学成分报道较少,为了更好地阐明小驳骨中具有生物活性的成分,本实验综合运用各种现代色谱和光谱技术,对小驳骨地上部分95%乙醇提取物的乙酸乙酯部位进行了深入的化学成分研究。并以LPS诱导的RAW 264.7巨噬细胞为模型,评估分离得到的单体化合物抑制NO释放的作用,以进行抗炎活性的筛选,以期进一步丰富了小驳骨植物的成分多样性,为后续该植物的活性成分的开发与利用奠定了基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

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);液相分析色谱柱为Ultimate XB-C<sub>18</sub>(4.6 × 250.0 mm, 5 μm, 美国Welch公司);半制备液相色谱柱为Ultimate XB-C<sub>18</sub>(10.0 × 250.0 mm, 5 μm, 美国Welch公司);Eyela旋转蒸发仪(N-1100V-WB);BP211D电子天平(Sartorius公司)。TLC预制板(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20(Pharmacia公司);ODS(Silicycle公司);核磁用氘代试剂(Merck公司);色谱级甲醇(山东禹王公司);液相用水(广东怡宝公司),其他试剂均为分析纯。

### 1.2 细胞株

小鼠巨噬细胞系RAW 264.7由暨南大学药学院中药及天然药物研究所提供。

### 1.3 药材来源

实验药材于2016年6月在中国广东省广州暨南大学校园内采集,由暨南大学药学院周光雄教授鉴定为爵床科植物小驳骨*Justicia gendarussa* Burm. f.的地上部分。模式标本(JG-201601)存放在暨南大学生药学教研室。

## 2 实验方法

### 2.1 提取与分离

干燥的小驳骨地上部分20 kg,粗粉碎后用95%乙醇热回流反复提取2次,80%乙醇热回流提

取1次,每次2 h,滤过,合并3次提取液,减压浓缩至无醇味,得到粗提取物浸膏。粗提取物浸膏加水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,萃取液分别减压浓缩,得到石油醚部位(500 g)、乙酸乙酯部位(1.2 kg)。乙酸乙酯部位经正相硅胶柱色谱分离,石油醚-丙酮(V/V 100:0→0:100)梯度洗脱,经TLC分析合并后得到24个子流分Fr. 1~24。Fr. 20经过反复硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇系统,(100:0→0:100)多梯度洗脱,经TLC分析合并得到8个子流分Fr. 24-1~8。Fr. 24-1重结晶得化合物**1**(3 mg)。Fr. 24-6经Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱色谱(甲醇),得到Fr. 24-6-1~10。Fr. 24-6-4经半制备液相(甲醇/水32%),重结晶得到化合物**16**(7 mg)和**17**(5 mg)。Fr. 8经过反复硅胶柱色谱,二氯甲烷-乙酸乙酯(100:0→0:100)多梯度洗脱,经TLC分析合并得到9个子流分Fr. 8-1~9。Fr. 8-2经Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇1:1),得到Fr. 8-2-1~12。Fr. 8-2-2经半制备液相(甲醇/水56%)得到化合物**2**(6 mg)和**3**(10 mg)。Fr. 8-2-6经半制备液相(甲醇/水47%)得到化合物**4**(10 mg)。Fr. 8-6经Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇1:1),得到Fr. 8-6-1~9。Fr. 8-6-5经半制备液相(甲醇/水55%)得到化合物**5**(20 mg)和**6**(8 mg)。Fr. 8-8经Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇1:1),得到Fr. 8-8-1~12。Fr. 8-8-4经半制备液相(甲醇/水57%)得到化合物**8**(5 mg)和**9**(10 mg)。Fr. 10经过反复硅胶柱色谱,采用二氯甲烷-乙酸乙酯系统(100:0→0:100)多梯度洗脱,经TLC分析合并得到10个子流分Fr. 10-1~10。Fr. 10-1经Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇1:1),得到流分Fr. 10-1-1~8。Fr. 10-1-1重结晶得**11**(3 mg)。Fr. 10-1-2经半制备液相(甲醇/水50%)得到化合物**7**(5 mg)和**10**(10 mg)。Fr. 10-4经Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇1:1),得到Fr. 10-4-1~12。Fr. 10-4-3经半制备液相(甲醇/水50%)得到化合物**18**(9 mg)、**19**(10 mg)和**20**(7 mg)。Fr. 10-4-9经半制备液相(甲醇/水52%)得到化合物**21**(6 mg)。Fr. 24经过反复硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇系统(100:0→0:100)多梯度洗脱,经TLC分析合并得到12个子流分Fr. 24-1~12。Fr. 24-1经Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱色谱(甲醇),得到Fr. 24-1-1~8。Fr. 24-1-7经半制备液相(甲醇/水20%)得

到化合物 **12** (7 mg)。Fr. 24-4 经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱 (甲醇), 得到 Fr. 24-4-1 ~ 8。Fr. 24-4-5 经半制备液相 (甲醇/水 18%) 得到化合物 **13** (5 mg)。Fr. 24-12 经反复 ODS 开放柱色谱, 甲醇-水系统 (20:80→100:0) 多梯度洗脱, TLC 分析合并 7 个子流分 Fr. 24-12-1 ~ 7。Fr. 24-12-5 经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱 (甲醇), 得到 Fr. 24-12-5-1 ~ 6。Fr. 24-12-5-4 经半制备液相 (甲醇/水 15%) 得到化合物 **14** (10 mg) 和 **15** (3 mg)。

## 2.2 细胞培养

小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 放置在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 取对数期细胞用于实验。

## 2.3 细胞活力实验

RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释后接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL, 最终每孔 4 × 10<sup>4</sup> 个细胞。置恒温培育箱 (37 °C, 5%

CO<sub>2</sub>) 中培养 24 h, 吸出培养液, 加入含有不同浓度的待测化合物及阳性对照药 (槲皮素) 的培养液, 培养 24 h 后弃去上清液, 在每孔中加入 5 mg/mL MTT, 37 °C 下反应 4 h, 弃去 MTT, 每孔加入 200 μL DMSO, 置摇床上低速震荡 10 min, 使结晶充分溶解, 用酶标仪在 570 nm 处测量各孔的 OD 值, 计算化合物的 IC<sub>50</sub> 值。

## 2.4 抗炎活性实验

抗炎活性采用抑制一氧化氮 (NO) 生成实验, 以 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 为检测模型, 应用 Griess 试剂显色法检测一氧化氮生成量。RAW 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释到每孔 4 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL。置恒温培育箱 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 中培养 24 h, 吸出培养液, 加入含有不同浓度的待测化合物及阳性对照药 (槲皮素) 的培养液, 同时预先在培养液中加入 100 ng/mL LPS。培养 24 h 后, 吸取各

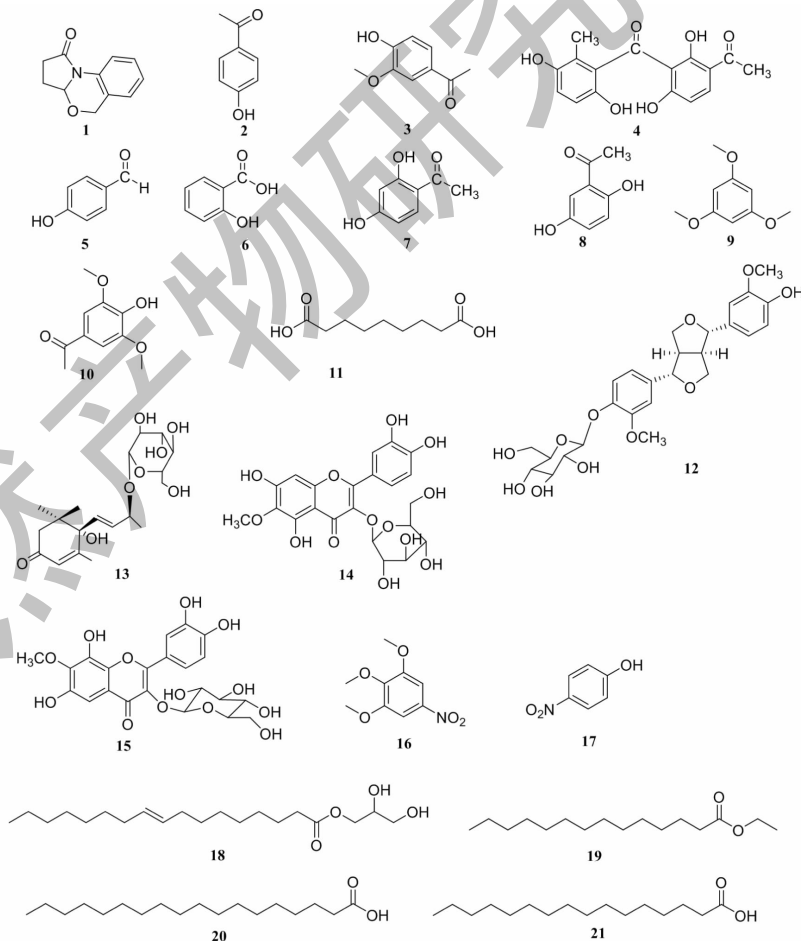


图1 化合物 1~21 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-21

孔上清液至新的96孔板中,每孔加入以1:1比例混合的Griess A和B溶液100  $\mu\text{L}$ 。在3 000 rpm下离心1 min,继续在黑暗处反应10 min。用酶标仪540 nm波长下测定各孔OD值,计算化合物的 $\text{IC}_{50}$ 值。

### 3 实验结果

#### 3.1 化合物结构鉴定

**化合物 1** 无色针状晶体(甲醇);分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ 。经单晶X射线衍射确定其结构(图1)为2,3,3a,5-四氢-1*H*-苯并[*d*]吡咯并[2,1-*b*][1,3]恶嗪-1-酮,并得到其晶体结构数据:晶体属单斜晶系,空间群为 $\text{P2}_1/\text{n}$ ;晶胞参数: $a = 10.1529(4) \text{ \AA}$ ,  $b = 7.4076(3) \text{ \AA}$ ,  $c = 11.7498(4) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 98.068(4)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,晶胞体积 $V = (874.946) \text{ \AA}^3$ ;晶胞内分子数 $Z = 4$ ;计算密度 $D_{\text{calc}} = 1.436 \text{ mg/m}^3$ ;  $F(000) = 400$ ,  $T = 293(2) \text{ K}$ 。化合物1(CCDC 1968067)的晶体学数据已上传剑桥晶体学数据中心晶体数据库(网址为www.ccdc.cam.ac.uk),读者可以从该中心免费获得。

**化合物 2** 无色针状晶体(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$ 135.0446 [ $\text{M} - \text{H}$ ] $^-$ (计算值为135.0446),确定其相对分子量为136,分子式 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$ 。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.87(2H, d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ , H-2, 6), 6.83(2H, d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ , H-3, 5), 2.51(3H, s, - $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 132.1(C-1), 130.1(C-2, 6), 116.2(C-3, 5), 164.1(C-4), 199.5(C-7), 26.3(- $\text{CH}_3$ )。以上数据与文献<sup>[4]</sup>报道一致,故鉴定化合物2为4'-羟基苯乙酮。

**化合物 3** 黄色粉末(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$ 189.0529 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ (计算值为189.0528),确定其相对分子量为166,分子式 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.43(1H, d,  $J = 2.1 \text{ Hz}$ , H-2), 6.86(1H, d,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , H-5), 7.49(1H, dd,  $J = 8.2, 2.1 \text{ Hz}$ , H-6), 3.82(3H, s, - $\text{OCH}_3$ ), 2.48(3H, s, - $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 128.7(C-1), 111.1(C-2), 152.0(C-3), 147.6(C-4), 114.9(C-5), 123.4(C-6), 196.0(C-7), 55.6(- $\text{OCH}_3$ ), 26.2(- $\text{CH}_3$ )。以上数据与文献<sup>[5]</sup>报道一致,故鉴定化合物3为apocynin。

**化合物 4** 淡黄色针状结晶(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$ 325.0729 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ (计算值为325.0688),确定其相对分子量为302,分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.70(1H, d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ , H-4), 6.44(1H, d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ , H-5), 2.53(3H,

s, H-9), 2.22(3H, s, H-10), 6.70(1H, d,  $J = 8.7 \text{ Hz}$ , H-3'), 6.76(1H, d,  $J = 8.7 \text{ Hz}$ , H-4'), 12.92(1H, s, -OH), 9.36(1H, s, -OH);  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 111.6(C-1), 162.3(C-2), 112.2(C-3), 132.1(C-4), 107.7(C-5), 162.9(C-6), 203.2(C-7), 202.8(C-8), 30.6(C-9), 26.1(C-10), 115.8(C-1'), 147.1(C-2'), 117.6(C-3'), 118.8(C-4'), 148.0(C-5'), 137.0(C-6')。以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道一致,故鉴定化合物4为白首乌二苯酮。

**化合物 5** 无色针状晶体(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$ 123.0449 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ (计算值为123.0445),确定其相对分子量为122,分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.80(2H, m, H-2, 6), 6.90(2H, m, H-3, 5), 9.76(1H, s, H-7);  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 165.3(C-1), 130.3(C-2, 6), 116.9(C-3, 5), 133.4(C-4), 192.9(C-7)。以上数据与文献<sup>[7]</sup>报道一致,故鉴定化合物5为对羟基苯甲醛。

**化合物 6** 无色针晶(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$ 161.0287 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ (计算值为161.0215),确定其相对分子量为138,分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 6.94(1H, m, H-2), 7.51(1H, ddd,  $J = 8.7, 7.2, 1.8 \text{ Hz}$ , H-3), 6.90(1H, m, H-4), 7.79(1H, dd,  $J = 7.9, 1.8 \text{ Hz}$ , H-5);  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 113.0(C-1), 130.3(C-2), 119.2(C-3), 135.7(C-4), 17.1(C-5), 161.2(C-6), 172.0(C-7)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道一致,故鉴定化合物6为水杨酸。

**化合物 7** 无色针晶(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$ 153.0548 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ (计算值为153.0551),确定其相对分子量为152,分子式 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 6.22(1H, d,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ , H-3), 6.35(1H, dd,  $J = 8.8, 2.0 \text{ Hz}$ , H-5), 7.73(1H, d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ , H-6), 2.50(3H, s, - $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 112.7(C-1), 165.3(C-2), 102.3(C-3), 164.2(C-4), 108.2(C-5), 133.6(C-6), 202.5(C-7), 26.3(- $\text{CH}_3$ )。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道一致,故鉴定化合物7为2,4-二羟基苯乙酮。

**化合物 8** 黄色粉末(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$ 153.0553 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ (计算值为153.0551),确定其相对分子量为152,分子式 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 6.79(1H, d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ , H-3), 6.99(1H, dd,  $J = 8.8, 3.0 \text{ Hz}$ , H-4), 7.19(1H, d,  $J = 3.0 \text{ Hz}$ , H-6), 2.57(3H, s, - $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ (100

MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 115.4 (C-1), 153.7 (C-2), 118.2 (C-3), 124.4 (C-4), 149.4 (C-5), 120.2 (C-6), 203.9 (C-7), 27.7 (-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **8** 为 2,5-二羟基苯乙酮。

**化合物 9** 无色颗粒(甲醇);HR-ESI-MS:  $m/z$  169.0128 [M + H]<sup>+</sup>(计算值为 169.0864),确定其相对分子量为 168,分子式 C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.20(3H, s, H-2, 4, 6), 3.80(9H, s, 1, 3, 5-OCH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR(150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 147.4 (C-1, 3, 5), 106.9 (C-2, 4, 6), 56.0 (1, 3, 5-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **9** 为 1,3,5-三甲氧基苯。

**化合物 10** 红色粉末(甲醇);HR-ESI-MS:  $m/z$  219.0636 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 219.0633),确定其相对分子量为 196,分子式 C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.18(2H, s, H-2, 6), 2.47(3H, s, -CH<sub>3</sub>), 3.77(6H, s, 3, 5-OCH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR(150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 196.9 (C-2, 6), 148.3 (C-3, 5), 197.4 (C-7), 26.7 (-CH<sub>3</sub>), 56.6 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.2 (5-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **10** 为丁香酮。

**化合物 11** 无色针状结晶(甲醇);分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>。经单晶 X 射线衍射确定其结构(图 2)为壬二酸,并得到其晶体结构数据:晶体属单斜晶系,空间群为 P2<sub>1</sub>/c;晶胞参数:  $a = 5.4846(4) \text{ \AA}$ ,  $b = 9.4475(8) \text{ \AA}$ ,  $c = 18.8079(5) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 95.708(7)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,晶胞体积  $V = 969.71(15) \text{ \AA}^3$ ;晶胞内分子数  $Z = 4$ ;计算密度  $D_{\text{calc}} = 1.289 \text{ mg/m}^3$ ;  $F(000) = 408$ ,  $T = 293(2) \text{ K}$ 。化合物 **11**(CCDC 1968064)的晶体学数据已上传剑桥晶体学数据中心晶体数据库(网址为 www.ccdc.cam.ac.uk),读者可以从该中心免费获得。

**化合物 12** 白色粉末(甲醇);HR-ESI-MS:  $m/z$  543.1845 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 543.1842),确定其相对分子量为 520,分子式 C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>11</sub>。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.88(1H, br s, H-2'), 6.95(1H, br s, H-2''), 6.73(1H, d,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , H-5'), 6.75(1H, d,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , H-5''), 6.85(1H, d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , H-6'), 7.04(1H, d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , H-6''), 4.61(1H, d,  $J = 4.0 \text{ Hz}$ , H-7'), 4.66(1H, d,  $J = 4.0 \text{ Hz}$ , H-7''), 4.88(1H, d,  $J = 4.0 \text{ Hz}$ , Glc-1), 3.76(3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.77(3H, s, 3''-OCH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR(75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 132.0 (C-1'), 35.1 (C-

1''), 110.4 (C-2', 2''), 147.5 (C-3'), 148.9 (C-3''), 145.8 (C-4'), 146.1 (C-4''), 115.1 (C-5', 5''), 118.1 (C-6'), 118.6 (C-6''), 85.1 (C-7), 84.8 (C-7'), 53.5 (C-8), 53.7 (C-8'), 70.8 (C-9), 71.0 (C-9'), 100.1 (Glc-1), 73.2 (Glc-2), 77.0 (Glc-3), 69.6 (Glc-4), 76.8 (Glc-5), 60.6 (Glc-6), 55.6 (3'-OCH<sub>3</sub>), 55.7(3''-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **12** 为(+)-松脂素-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

**化合物 13** 白色粉末(甲醇);HR-ESI-MS:  $m/z$  409.1834 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 409.1839),确定其相对分子量为 386,分子式 C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2.05(1H, d,  $J = 17.0 \text{ Hz}$ , H<sub>1</sub>-2), 2.58(1H, d,  $J = 17.0 \text{ Hz}$ , H<sub>2</sub>-2), 5.76(1H, br s), 5.95(1H, d,  $J = 15.5 \text{ Hz}$ , H-7), 5.64(1H, dd,  $J = 15.5, 6.4 \text{ Hz}$ , H-8), 4.43(1H, m, H-9), 1.19(3H, d,  $J = 6.5 \text{ Hz}$ , H-10), 0.93(3H, s, H-11), 0.92(3H, s, H-12), 1.82(3H, d,  $J = 1.3 \text{ Hz}$ , H-13), 4.99(1H, s, 6-OH), 4.09(1H, d,  $J = 7.7 \text{ Hz}$ , Glc-1), 3.11(1H, s, Glc-2), 3.03(1H, s, Glc-3), 2.92(1H, s, Glc-4), 2.94(1H, s, Glc-5), 3.41(2H, m, Glc-6);<sup>13</sup>C NMR(100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 41.0 (C-1), 49.3 (C-2), 197.4 (C-3), 125.6 (C-4), 163.8 (C-5), 77.9 (C-6), 131.6 (C-7), 131.5 (C-8), 72.0 (C-9), 22.1 (C-10), 23.1 (C-11), 24.1 (C-12), 18.6 (C-13), 100.0 (Glc-1), 73.3 (Glc-2), 77.0 (Glc-3), 70.0 (Glc-4), 77.2 (Glc-5), 61.1 (Glc-6)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **13** 为 corchoinoside C。

**化合物 14** 白色粉末(甲醇);HR-ESI-MS:  $m/z$  517.1093 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 517.0957),确定其相对分子量为 494,分子式 C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub>。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.53(1H, s, H-8), 7.60(1H, d,  $J = 2.7 \text{ Hz}$ , H-2'), 6.86(1H, d,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , H-5'), 7.57(1H, d,  $J = 8.1 \text{ Hz}$ , H-6'), 5.60(1H, d,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ , Glc-1), 3.09 ~ 3.60(6H, m, Glc-2-Glc-6), 3.75(3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR(100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 156.7 (C-2), 133.3 (C-3), 178.0 (C-4), 152.7 (C-5), 131.5 (C-6), 151.9 (C-7), 94.2 (C-8), 157.7 (C-9), 104.8 (C-10), 122.0 (C-1'), 116.6 (C-2'), 145.1 (C-3'), 148.8 (C-4'), 115.6 (C-5'), 121.6 (C-6'), 101.2 (Glc-1), 74.4 (Glc-2), 76.8 (Glc-3), 70.2 (Glc-4), 77.8 (Glc-5), 61.3 (Glc-6),

60.4(-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **14** 为 patuletin-3-*O*-glucoside。

**化合物 15** 黄色粉末(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$  517.096 4 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 517.095 7),确定其相对分子量为 494,分子式 C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub>。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 6.47(1H, s, H-5), 7.58(1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 6.83(1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-5'), 7.56(1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-6'), 5.40(1H, d, *J* = 7.4 Hz, Glc-1), 3.09 ~ 3.58(6H, m, Glc-2-Glc-6), 3.75(3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR(100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 156.0(C-2), 133.0(C-3), 177.5(C-4), 93.9(C-5), 151.7(C-6), 131.5(C-7), 152.3(C-8), 93.9(C-9), 104.0(C-10), 121.5(C-1'), 116.1(C-2'), 144.9(C-3'), 148.5(C-4'), 115.2(C-5'), 121.2(C-6'), 101.0(Glc-1), 74.1(Glc-2), 76.5(Glc-3), 70.0(Glc-4), 77.5(Glc-5), 61.0(Glc-6), 59.9(-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **15** 为 commicarpiflavonol glucoside A。

**化合物 16** 无色针晶(甲醇);分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>。经单晶 X 射线衍射确定其结构(图 3)为 1,2,3-三甲氧基-5-硝基苯,并得到其晶体结构数据:晶体属单斜晶系,空间群为 P2<sub>1</sub>/n;晶胞参数: $a = 6.840 5(9) \text{ \AA}$ ,  $b = 13.738(2) \text{ \AA}$ ,  $c = 10.330 9(12) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 99.311(12)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,晶胞体积  $V = 958.1(2) \text{ \AA}^3$ ;晶胞内分子数  $Z = 4$ ;计算密度  $D_{\text{calc}} = 1.478 \text{ mg/m}^3$ ;F(000) = 448, T = 293(2) K。化合物 **16**(CCDC 1968065)的晶体学数据已上传剑桥晶体学数据中心晶体数据库(网址为 www.ccdc.cam.ac.uk),读者可以从该中心免费获得。

**化合物 17** 无色针晶(甲醇);分子式为 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>。经单晶 X 射线衍射确定其结构(图 4)为 4-硝基苯酚,并得到其晶体结构数据:晶体属单斜晶系,空间群为 C2;晶胞参数: $a = 21.153 9(8) \text{ \AA}$ ,  $b = 3.611 8(10) \text{ \AA}$ ,  $c = 10.292 6(4) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 117.234(12)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,晶胞体积  $V = 699.22(5) \text{ \AA}^3$ ;晶胞内分子数  $Z = 4$ ;计算密度  $D_{\text{calc}} = 1.321 \text{ mg/m}^3$ ;F(000) = 288, T = 293(2) K。化合物 **17**(CCDC 1968066)的晶体学数据已上传剑桥晶体学数据中心晶体数据库(网址为 www.ccdc.cam.ac.uk),读者可以从该中心免费获得。

**化合物 18** 黄色油状(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$  365.361 0 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 365.266 9),确定

其相对分子量为 342,分子式 C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 5.30(1H, dt, *J* = 4.7, 9.4 Hz, H-9), 2.10(2H, m, H-11), 2.01(1H, m, H-1'), 4.04(2H, s, OH), 0.85(3H, t, *J* = 6.9 Hz, -CH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR(150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 174.2(C-1), 35.1(C-2), 25.1(C-3), 28.6(C-4), 26.6(C-5), 28.8(C-6), 28.8(C-7), 28.7(C-8), 129.7(C-9), 129.7(C-10), 31.3(C-11), 28.7(C-12), 29.0(C-13), 29.0(C-14), 28.9(C-15), 29.1(C-16), 22.1(C-17), 14.0(C-18)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **18** 为单油酸甘油酯。

**化合物 19** 黄色油状(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$  279.217 4 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 279.230 1),确定其相对分子量为 256,分子式 C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.23-1.10(24H, m, -CH<sub>2</sub>), 2.17(3H, t, *J* = 7.4 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.85(3H, t, *J* = 6.9 Hz, -CH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR(150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 174.6(C-1), 33.7(C-2), 24.6(C-3), 28.7(C-4), 28.6(C-5), 28.9(C-6), 29.0(C-7), 29.0(C-8), 29.0(C-9), 29.0(C-10), 29.0(C-11), 28.6(C-12), 22.1(C-13), 14.0(C-14)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **19** 为 tetradecanoate。

**化合物 20** 无色片状晶体(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$  307.261 4 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 307.150 0),确定其相对分子量为 284,分子式 C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.99(2H, m, H-2), 0.85(3H, t, *J* = 6.8 Hz, -CH<sub>3</sub>), 4.04(1H, s, -OH);<sup>13</sup>C NMR(150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 35.1(C-2), 26.6(C-3), 28.6(C-4), 28.7(C-5), 29.0(C-6), 29.0(C-7), 29.1 × 8(C-8 ~ 15), 31.3(C-16), 22.1(C-17), 14.0(C-18)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **20** 为硬脂酸。

**化合物 21** 无色针晶(甲醇);HR-ESI-MS: $m/z$  257.248 1 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值为 257.096 9),确定其相对分子量为 256,分子式 C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.99(2H, m, H-2), 0.85(3H, t, *J* = 6.8 Hz, -CH<sub>3</sub>), 4.04(1H, s, -OH);<sup>13</sup>C NMR(150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 35.1(C-2), 26.6(C-3), 28.6(C-4), 28.7(C-5), 29.0(C-6), 29.0(C-7), 29.1 × 8(C-8-15), 31.3(C-16), 22.1(C-17), 14.0(C-18)。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **21** 为棕榈酸。

表1 化合物1~21的细胞活力和抑制NO生成活性

Table 1 Cell viability assay of RAW 264. 7 and inhibition of nitricoxide production of compounds 1-21

化合物 Compound	细胞活力 IC <sub>50</sub> Cell viability IC <sub>50</sub> (μM)	抗炎活性 IC <sub>50</sub> Anti-inflammatory IC <sub>50</sub> (μM)
	RAW 264. 7	NO
1	>100	55.01 ± 3.19
2	>100	20.72 ± 0.49
3	>100	41.93 ± 5.61
4	>100	15.97 ± 1.32
5	>100	27.66 ± 4.80
6	>100	7.88 ± 0.55
7	>100	34.57 ± 1.59
8	>100	12.67 ± 2.14
9	>100	70.52 ± 5.82
10	>100	>100
11	>100	30.73 ± 1.01
12	>100	36.16 ± 2.95
13	>100	43.84 ± 0.97
14	>100	45.26 ± 1.75
15	>100	65.95 ± 6.11
16	>100	70.58 ± 4.99
17	>100	90.34 ± 2.06
18	>100	>100
19	>100	86.78 ± 3.13
20	>100	>100
21	>100	75.47 ± 4.66
槲皮素 Quercetin	>100	16.94 ± 0.40

注:阳性对照药为槲皮素。

Note: Quercetin was used as positive control.

### 3.2 抗炎活性实验结果

21个化合物(1~21)的细胞活力和抗炎活性结果见表1。阳性药的IC<sub>50</sub>值为16.94 ± 0.40 μM,化合物4、6、8的IC<sub>50</sub>值均小于阳性药的IC<sub>50</sub>,表明化合物4、6、8具有显著的抗炎活性。

### 4 讨论与结论

本研究从小驳骨的乙醇提取物中分离鉴定了21个化合物,包括酚酸类,脂肪酸类,糖苷类等。其中,化合物1和16为新天然产物,所有化合物均首次从该植物中分离得到。对其抗炎活性进行了初步筛选,只有化合物4、6、8有抗炎活性,但这一些化合物的活性在一定程度上揭示了该药治疗作用的物质基础,对于小驳骨中活性成分的后期研究和质量控制研究具有一定的参考价值和指导意义。本论文在前

期研究基础上,进一步丰富了小驳骨的化学成分种类,为该种药用资源的综合开发和利用奠定了基础。

### 参考文献

- 1 Lu S, Zhang G. Alkaloids from *Gendarussa vulgaris* Nees [J]. Nat Prod Res, 2008, 22: 1610-1613.
- 2 Jothimanivannan C, Kumar RS, Subramanian N. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of aerial parts of *Justicia gendarussa* Burm [J]. Int J Pharmacol, 2010, 6: 278-283.
- 3 Krishna KL, Mruthunjaya K, Patel JA. Antioxidant and hepatoprotective potential of stem methanolic extract of *Justicia gendarussa* Burm [J]. Int J Pharmacol, 2010, 6: 72-80.
- 4 Gruber G, Kerschensteiner L, Steglich W. Chromapedic acid, pulvinic acids and acetophenone derivatives from the mush-

- room Leccinum chromapes* (Boletales) [J]. *Z Naturforsch, B; J Chem Sci*, 2014, 69:432-438.
- 5 Jung SH, Lee YS, Lee S, et al. Isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin induced diabetic rat tissues [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2002, 25:306-312.
  - 6 Zan K, Guo LN, Zheng J, et al. Chemical constituents of ethnic medicine *Cynanchum otophyllum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41:101-105.
  - 7 Hu L, Ding Z, Liu J. The chemical constituents of basidiomycetes *Boletopsis grisea* [J]. *Acta Bot Yunnanica* (云南植物研究), 2002, 24:667-670.
  - 8 Li ZL, Lu XY, Meng DL, et al. Study on chemical constituents in roots and stems of *Sophora flavescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36:25-26.
  - 9 Yasuda T, Kon R, Nakazawa T, et al. Metabolism of paeonol in rats [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62:1142-1144.
  - 10 Sun J, Yin ZQ, Zhang QW, et al. Chemical constituents from ethyl acetate extract of *Ganoderma lucidum* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, 42:220-222.
  - 11 Xie Q, Wang WJ, Li GQ, et al. Chemical constituents from the leaves of *Hunteria zeylanica* [J]. *J Jinan Univ: Nat Sci* (暨南大学学报: 自科版), 2013, 34:121-124.
  - 12 Yan T, Ding L, Cheng B, et al. Chemical constituents from aerial parts of *Hypoestes phyllostachya* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2018, 49:1767-1772.
  - 13 Fan XN, Lin S, Zhu CG, et al. Aromatic constituents of *Heteroplexis micocephala* and their bioactivities [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36:48-56.
  - 14 Çalç İ, Kuruüzüm-Uz A, Lorenzetto PA, et al. (6S)-Hydroxy-3-oxo- $\alpha$ -ionol glucosides from *Capparis spinosa* fruits [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59:451-457.
  - 15 Xie Q, Wei Y, Zhang G. Separation of flavonol glycosides from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by high-speed counter-current chromatography [J]. *Sep Purif Technol*, 2010, 72:229-233.
  - 16 Abou-Hussein DR, Galal AM, Khan IA, et al. Commicarpiflavonol glucosides A and B; Two new 5-deoxyflavonol glucosides from *Commicarpus grandiflorus* [J]. *Rec Nat Prod*, 2017, 11:141-146.
  - 17 Yang S, Sun J, Lu H, et al. Bioactivity-guided isolation of anticancer compounds from *Euphorbia lathyris* [J]. *Anal Methods*, 2015, 7:9568-9576.
  - 18 Baloch IB, Baloch MK. Isolation and characterization of cytotoxic compounds from *Euphorbia cornigera* Boiss [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12:985-991.
  - 19 Qin B, Lu R, Wang H, et al. Chemical constituents from *Musella lasiocarpa* (Franch.) C. Y. Wu [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12:41-44.
  - 20 Jin XQ, Yan MM, Huang EX, et al. Studies on the chemical constituents of *Eupolyphaga sinensis* Walkre [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18:355-356.

(上接第 1110 页)

- 17 Li GH, You JM, Zhai MR, et al. Effects of dietary tyrosine levels on performance and melanin contents in tissues of taihe silky fowls aged from 0 to 4 weeks of age [J]. *Acta Agr Bor-occid Sin* (西北农业学报), 2009, 18(3):60-63.
- 18 Yan S, Ma RJ, Yang L, et al. Chemical constituents and skin

caring activities of *Dendrobium loddigesii* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:615-620.

- 19 Far MMME, Taie HAA. Antioxidant activities, total anthocyanins, phenolics and flavonoids contents of some sweetpotato genotypes under stress of different concentrations of sucrose and sorbitol [J]. *Aus J Basic Appl Sci*, 2009, 3:3609-3616.

(上接第 1212 页)

- 24 Sánchez CL, Van Swearingen AED, Arrant AE, et al. Simplified dietary acute tryptophan depletion: effects of a novel amino acid mixture on the neurochemistry of C57BL/6J mice [J]. *Food Nutr Res*, 2015, 59:27424-27434.
- 25 Markus CR, Olivier B, Panhuysen GE, et al. The bovine protein  $\alpha$ -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable sub-

jects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71:1536-1544.

- 26 Markus CR, Firk C, Gerhardt C, et al. Effect of different tryptophan sources on amino acids availability to the brain and mood in healthy volunteers [J]. *Psychopharmacol*, 2008, 201(1):107-114.