

宽筋藤氯仿和正丁醇部位化学成分研究

高艳艳,郭凤霞,郭少波,梁燕,张薇*,刘斌*

北京中医药大学中药学院,北京 102488

摘要:研究宽筋藤的化学成分。宽筋藤干燥药材用70%乙醇回流提取,所得浸膏依次用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取。采用硅胶、ODS、Sephadex LH-20、大孔树脂等方法对宽筋藤的氯仿部位和正丁醇部位进行分离纯化,通过核磁共振波谱、质谱等现代波谱技术对分离得到的化合物进行结构鉴定。结果从宽筋藤的70%乙醇提取物中分离得到13个化合物,其中从氯仿部位分离得到4个化合物,分别为2-(2'-羟基二十四碳酰氨基)十八碳-1,3,4-三醇(1)、1,2-di-*O*-palmitoyl-3-*O*- β -D-galactopyranosyl glycerol(2)、soyacerebrosides I和II(3)、tinocordiside(4);从正丁醇部位分离得到9个化合物,分别为反式丁香苷(5)、3,4-二甲氧基苯基- β -D-葡萄糖苷(6)、tinosinen(7)、5-羟甲基-2-呋喃丙烯酸(8)、tinosineside A(9)、tinosposide A(10)、异落叶松脂素-9-*O*- β -D-葡萄糖苷(11)、开环异落叶松脂素-9-*O*- β -D-葡萄糖苷(12)、*L*-焦谷氨酸(13)。其中,化合物8作为天然产物首次报道,化合物1,2,3,6,11为首次从防己科植物中分离得到,化合物13为首次从宽筋藤中分离得到。此外,对分离得到的13个化合物进行了抑制脂多糖诱导RAW 264.7细胞释放NO活性的测定。

关键词:宽筋藤;化学成分;结构鉴定;抗炎活性

中图分类号:Q946.91

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)8-1325-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.8.007

Study on chemical constituents from chloroform and n-butanol fractions of *Tinosporae sinensis* (Lour.) Merr.

GAO Yan-yan, GUO Feng-xia, GUO Shao-bo, LIANG Yan, ZHANG Wei*, LIU Bin*

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Study on the chemical constituents from *Tinosporae sinensis* (Lour.) Merr. The shattered stem of *T. sinensis* was extracted with 70% ethanol under reflux. The crude extract was extracted with chloroform, ethyl acetate and n-butanol, successively. Thirteen compounds were isolated and purified by silica gel, ODS, Sephadex LH-20 and macroporous resin from chloroform and n-butanol fractions of *T. sinensis*. Their structures were elucidated via the interpretation of nuclear magnetic spectrometry, mass spectrometry and other spectral analyses. Thirteen compounds were identified as 2-(2'-hydroxytetracosanoylamino) octadecane-1,3,4-triol (1), 1,2-di-*O*-palmitoyl-3-*O*- β -D-galactopyranosyl glycerol (2), soyacerebrosides I and II (3), tinocordiside (4), *trans*-syringin (5), 3,4-dimethoxyphenyl- β -D-glucoside (6), tinosinen (7), 5-hydroxymethyl-2-furanacrylic acid (8), tinosineside A (9), tinosposide A (10), isolariciresinol-9-*O*- β -D-glucopyranoside (11), secoisolariciresinol-9-*O*- β -D-glucopyranoside (12) and *L*-pyroglutamic acid (13). Compounds 1-4 were isolated from chloroform fraction, and compounds 5-13 were isolated from n-butanol fraction. Compound 8 is the first report from natural sources, compounds 1,2,3,6,11 are newly isolated from the family Menispermaceae, compound 13 is newly isolated from *T. sinensis*. In addition, all the 13 compounds were evaluated for their inhibitory effects in lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells.

Key words: *Tinosporae sinensis* (Lour.) Merr.; chemical constituents; structural identification; anti-inflammatory

宽筋藤为防己科青牛胆属植物中华青牛胆 *Tinosporae sinensis* (Lour.) Merr. 的干燥藤茎,主要

分布于广东、广西、云南等地,尤以两广分布广,产量大,民间应用历史悠久^[1]。《全国中草药汇编》记

收稿日期:2022-01-14

接受日期:2022-05-11

基金项目:北京中医药大学“青年科学家培育计划”科研新锐人才项目(BUCM-2019-QNKXJC008)

*通信作者 E-mail:zhangwei_bucm@163.com, liubinyn67@163.com

载,宽筋藤味微苦、性凉,具有祛风止痛,舒筋活络的功效^[2]。宽筋藤在藏药中又名“勒哲”,是藏药常用药材,善祛风除湿、舒筋活络,疗效显著,《晶珠本草》中记载宽筋藤“治疗隆,赤巴合并症;培根病、风湿病、隆热病”^[3]。临床上,宽筋藤主要用于治疗风湿痹痛、腰肌劳损、跌打损伤等骨伤科疾病^[4,5],可见其具有较大的研究价值和开发潜力。现代药理研究表明,青牛胆属植物具有抗炎、抗辐射、抗肿瘤、抗病毒、免疫抑制等多种药理活性,但目前对该属植物的化学成分研究主要集中在海南青牛胆以及心叶青牛胆两个种上^[5,6]。宽筋藤作为青牛胆属植物中华青牛胆的藤茎,民间应用历史悠久,疗效确切可靠。但目前对宽筋藤的开发利用度依然较低,国内外学者对其药效物质基础的研究还比较薄弱,且多集中在乙酸乙酯部位化学成分分离,药理作用研究多集中在宽筋藤水煎液或提取物层面,其药效物质基础尚未完全阐明。为进一步丰富宽筋藤的化学成分,本实验采用多种色谱分离技术对宽筋藤的氯仿和正丁醇萃取部位进行化学成分研究,并对分离得到的化合物进行了抑制脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞释放 NO 活性的测定,以期从宽筋藤中寻找和发现活性成分,对进一步开发利用打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与amp;材料

Bruker Avance III-500 型超导核磁共振仪(美国 Bruker 公司);VARIAN INOVA-600 型超导核磁共振仪(美国 Varian 公司);VG-ZAB-HS 型质谱仪(英国 VG Instruments 公司);Bruker ESQUIRE-LC 型质谱仪(美国 Bruker 公司);LTQ-Orbitrap XL 质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);酶标仪(德国 BMG Labtech 公司)。

柱色谱用硅胶(60~100 目、200~300 目,青岛海洋化工厂);硅胶 G 预制薄层板(20 cm × 20 cm,青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20(美国 Pharmacia 公司);ODS 色谱柱材料(50 μm,日本 Yamaha Motor Company, YMC 公司);AB-8 型大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂);MCI-GEL CHP20P(日本三菱化学公司)。其他试剂均为分析纯。

小鼠巨噬细胞 RAW 264.7(北京协和细胞资源中心);地塞米松(大连美伦生物科技有限公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);PBS 磷酸缓冲液(美国 Gibco 公司);双抗(10 000 U 青霉素和链霉素混合液)(美国 Gibco 公司);FBS 胎牛血清(浙江天

杭生物科技有限公司);DMSO(阿拉丁公司);甲基噻唑蓝(美国 Sigma 公司);脂多糖(大连美伦生物科技有限公司);NO 试剂盒(北京百瑞极生物科技有限公司)。

宽筋藤药材购自安国市万联中药饮片有限公司,产地广西,批号 140101,经鉴定为防己科青牛胆属植物中华青牛胆 *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr. 的干燥藤茎。

1.2 提取与amp;分离

干燥宽筋藤药材(10 kg)经粉碎后加入 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压回收溶剂得宽筋藤提取物 1.3 kg。将总提取物加水分散,依次用氯仿、乙酸乙酯、水饱和的正丁醇萃取,萃取液减压回收溶剂,分别得到氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取部位。

氯仿萃取部位经硅胶柱色谱,二氯甲烷:甲醇(20:1→0:1, V/V)梯度洗脱,得 Fr. 1~Fr. 4 四个流分。Fr. 3 通过硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷:甲醇(150:1→0:1, V/V)洗脱,经薄层检识合并得 Fr. 3-1~Fr. 3-4。Fr. 3-1、Fr. 3-3 和 Fr. 3-4 先后经 Sephadex LH-20(氯仿:甲醇 = 1:2)洗脱、甲醇重结晶,得到化合物 1(3.6 mg)、化合物 2(5.4 mg)和化合物 3(4.3 mg)。Fr. 4 先后经硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇,100:1→0:1, V/V),Sephadex LH-20 柱色谱(氯仿:甲醇 = 1:2)和制备薄层色谱(二氯甲烷:甲醇 = 9:1)分离纯化,得到化合物 4(4.2 mg)。

正丁醇萃取部位经 AB-8 型大孔吸附树脂,水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇梯度洗脱,得到 Fr. 1~Fr. 5 五个流分。Fr. 2 经硅胶柱色谱(氯仿:甲醇,15:1→0:1, V/V)洗脱,得到 Fr. 2-1~Fr. 2-4。Fr. 2-1 经硅胶柱色谱,氯仿:甲醇(18:1→0:1, V/V)洗脱,得到 Fr. 2-1-1 和 Fr. 2-1-2。Fr. 2-1-1 经硅胶柱色谱,氯仿-甲醇(15:1→0:1, V/V)梯度洗脱,得到化合物 5(21.5 mg)。Fr. 2-1-2 经 MCI 柱色谱,水:甲醇(9:1→0:1, V/V)梯度洗脱和硅胶柱色谱分离(氯仿:甲醇:水 = 15:1:0.05, V/V/V),得到化合物 6(4.1 mg)。Fr. 2-2 经硅胶柱色谱,氯仿:甲醇(15:1→0:1, V/V)洗脱,得到 Fr. 2-2-1~Fr. 2-2-3。Fr. 2-2-1 经 Sephadex LH-20,甲醇洗脱,再经硅胶柱色谱(氯仿:甲醇:水 = 15:1:0.05, V/V/V)分离,得到化合物 7(3.2 mg)。Fr. 2-2-3 经硅胶柱色谱,氯仿:甲醇:水(12:1:0.05, V/V/V)分离,得到化合物 8(2.7 mg)。Fr. 2-3 经硅胶柱色谱,氯仿:甲醇(12:1→0:1, V/V)梯度洗脱,得到 Fr. 2-3-1 和 Fr. 2-3-2。Fr. 2-3-1 经 Sephadex LH-

20, 甲醇洗脱, 得到 Fr. 2-3-1-1 ~ Fr. 2-3-1-3。Fr. 2-3-1-1 和 Fr. 2-3-1-2 分别过硅胶柱色谱, 氯仿: 甲醇: 水(12: 1: 0.05, V/V/V) 洗脱, 得到化合物 **9**(3.3 mg) 和化合物 **10**(5.3 mg)。Fr. 2-3-1-3 经硅胶柱色谱分离, 氯仿: 甲醇(30: 1→0: 1, V/V)、氯仿: 甲醇(20: 1→0: 1, V/V)、氯仿: 甲醇: 水(12: 1: 0.05, V/V/V) 洗脱, 得到化合物 **11**(2.9 mg)。Fr. 2-3-2 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 甲醇洗脱, 再经硅胶柱色谱, 氯仿: 甲醇: 水(12: 1: 0.05, V/V/V) 洗脱, 得到化合物 **12**(3.2 mg)。Fr. 2-4 过硅胶柱色谱, 先后以氯仿: 甲醇: 水(20: 1: 0.05→0: 1: 0, V/V/V)、氯仿: 甲醇: 水(18: 1: 0.05→0: 1: 0, V/V/V)、氯仿: 甲醇: 水(9: 1: 0.05, V/V/V) 洗脱, 得到化合物 **13**(15 mg)。

1.3 抗炎活性筛选

采用脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放一氧化氮(NO)炎症细胞模型, 通过 Griess 法测定 NO 的含量^[7], 对宽筋藤中分离得到的化合物 **1**~**13** 进行了体外抗炎活性初步筛选。

1.3.1 RAW 264.7 细胞的培养

RAW 264.7 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养液于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中静置培养。待 RAW 264.7 细胞处于对数生长期时, 按 3 × 10⁵ 个/mL 的细胞密度, 每孔 100 μL, 接种于 96 孔板中于 37 °C、5% CO₂ 继续培养 24 h, 进行后续试验。

1.3.2 不同化合物对 NO 释放量的影响

实验设置空白对照组、模型组、阳性药组和给药组。空白对照组加入完全培养基; 模型组加入 10 μg/L LPS 溶液; 阳性药组加入 20 μmol/L 地塞米松和 10 μg/L LPS 混合液; 药物组加入 10 μg/L LPS 溶液和 20 μmol/L 各单体化合物的混合液, 刺激细胞共孵育 24 h。24 h 后, 每孔取 50 μL 上清液, 加入至新的 96 孔培养板中, 根据一氧化氮试剂盒说明书进行操作。将 96 孔培养板置于摇床上摇晃 10 min, 在酶标仪 540 nm 处读取各孔 OD 值, 计算化合物 NO 的抑制率, 实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = \frac{(OD_{\text{模型}} - OD_{\text{药物}})}{(OD_{\text{模型}} - OD_{\text{对照}})} \times 100\%$$

1.3.3 统计学方法

运用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行处理和分析, 各组计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用方差分析进行多组间比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色粉末(氯仿); ESI-MS: m/z 684.6 [M + H]⁺, m/z 706.6 [M + Na]⁺, 分子式 C₄₂H₈₅O₅N; ¹H NMR(600 MHz, C₅D₅N) δ: 8.59(1H, d, J = 8.9 Hz, NH), 6.72(2H, br s, 3-OH, 4-OH), 6.23(1H, br s, 1-OH), 5.13(1H, m, H-2), 4.63(1H, br s, H-2'), 4.53(1H, dd, J = 9.6, 5.3 Hz, H-1a), 4.44(1H, dd, J = 9.6, 5.3 Hz, H-1b), 4.37(1H, br s, H-3), 4.29(1H, br s, H-4), 2.24(2H, m, H-3'), 2.04(1H, m, H-5a), 1.95(2H, m, H-5b, H-6a), 0.86(6H, t, H-18, H-24'); ¹³C NMR(150 MHz, C₅D₅N,) δ: 61.8(C-1), 52.7(C-2), 76.5(C-3), 72.8(C-4), 35.5(C-5), 26.4(C-6), 175.0(C-1'), 72.2(C-2'), 33.9(C-3'), 25.6(C-4')。以上数据经与文献^[8]对照, 鉴定化合物 **1** 为 2-(2'-羟基二十四碳酰氨基)十八碳-1,3,4-三醇。

化合物 2 白色结晶(吡啶); ESI-MS: m/z 753.5 [M + Na]⁺, 分子式 C₄₁H₇₈O₁₀; ¹H NMR(500 MHz, C₅D₅N) δ: 5.67(1H, m, H-2), 4.69(1H, dd, J = 11.9, 4.2 Hz, H-3a), 4.53(1H, dd, J = 11.9, 4.2 Hz, H-3b), 4.37(1H, dd, J = 10.8, 3.2 Hz, H-1a), 4.16(1H, dd, J = 10.8, 5.3 Hz, H-1b), 4.14(1H, d, J = 7.5 Hz, H-1'), 0.85(6H, t, J = 6.8 Hz, CH₃); ¹³C NMR(125 MHz, C₅D₅N) δ: 63.3(C-1), 71.0(C-2), 68.1(C-3), 105.8(C-1'), 72.4(C-2'), 75.3(C-3'), 70.2(C-4'), 77.3(C-5'), 62.3(C-6'), 173.3(C-1''), 173.2(C-1'''), 34.5(C-2''), 34.3(C-2'''), 25.3(C-3'', 3'''), 23.0~34.5(C-4''~15'', 4'''~15'''), 14.3(C-16'', 16''')。以上数据经与文献对照^[9,10], 鉴定化合物 **2** 为 1,2-di-*O*-palmitoyl-3-*O*-β-D-galactopyranosyl glycerol。

化合物 3 白色结晶(吡啶); ESI-MS: m/z 714.5 [M + H]⁺, m/z 736.5 [M + Na]⁺(分子式 C₄₀H₇₅NO₉, 分子量 713); ¹H NMR(500 MHz, C₅D₅N) δ: 5.49(2H, m, H-8, 9), 4.23(1H, m, H-1''), 0.87(6H, t, -CH₃); ¹³C NMR(125 MHz, C₅D₅N) δ: 70.1(C-1), 54.7(C-2), 72.4(C-3), 132.0(C-4), 132.1(C-5), 33.0(C-6), 32.1/27.6(C-7), 130.0/129.4(C-8), 131.1/130.6(C-9), 32.9/27.4(C-10), 175.6(C-1'), 72.5(C-2'), 14.3(CH₃), 105.6(C-1''), 75.1(C-2''), 78.5(C-3''), 71.6(C-4''), 78.4(C-5''), 62.7(C-6'')。以上数据经与文献对照^[11,12], 鉴定化合物 **3** 为由 soyacerebroside I 和 soyacerebroside II 组成的一组顺反异构混

合物,通过分析 ^{13}C NMR 放大谱的丰度,表明 soyacerebroside I(反式异构体)与 soyacerebroside II(顺式异构体)二者比例约为 5: 4。

化合物 4 白色无定性粉末(甲醇);ESI-MS: m/z 419.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, m/z 815.4 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_7$; ^1H NMR(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.61 (1H, s, H-3), 2.90 (1H, m, H-6), 4.26 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 2.54 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1), 2.00 (1H, m, H-9), 1.94 (3H, s, H-14), 1.93 (1H, m, H-5), 1.69 (1H, m, H-7), 1.18 (1H, m, H-8), 1.06 (3H, s, H-15), 0.97 (3H, s, H-12), 0.86 (3H, s, H-13); ^{13}C NMR(150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 56.7 (C-1), 202.9 (C-2), 120.8 (C-3), 170.7 (C-4), 54.5 (C-5), 53.1 (C-6), 49.0 (C-7), 20.6 (C-8), 36.5 (C-9), 55.9 (C-10), 79.6 (C-11), 20.4 (C-12), 22.2 (C-13), 23.7 (C-14), 23.9 (C-15), 97.1 (C-1'), 70.6 (C-2'), 77.5 (C-3'), 74.0 (C-4'), 76.9 (C-5'), 61.5 (C-6')。以上数据经与文献对照^[13], 鉴定化合物 4 为 tinocordiside。

化合物 5 白色针状结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 395.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, m/z 767.3 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9$; ^1H NMR(600 MHz, CD_3OD) δ : 6.77 (2H, s, H-2, H-6), 6.57 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 6.35 (1H, dt, $J = 15.8, 5.6$ Hz, H-8), 4.89 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.25 (2H, d, $J = 5.6$ Hz, H-9), 3.88 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.81 (1H, dd, $J = 12.0, 2.2$ Hz, H-6'b), 3.69 (1H, dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, H-6'a), 3.50 (1H, m, H-2'), 3.44 (2H, m, H-3', H-4'), 3.24 (1H, m, H-5'); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ : 135.2 (C-1), 105.5 (C-2, 6), 154.3 (C-3, 5), 135.9 (C-4), 130.0 (C-7), 131.3 (C-8), 63.6 (C-9), 57.0 (3, 5-OCH₃), 105.3 (C-1'), 75.7 (C-2'), 78.4 (C-3'), 71.3 (C-4'), 77.8 (C-5'), 62.6 (C-6')。以上数据经与文献对照^[14,15], 鉴定化合物 5 为反式丁香苷。

化合物 6 白色结晶(甲醇);ESI-MS: m/z 317.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_8$ 。 ^1H NMR(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.82 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.70 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-2), 6.55 (1H, dd, $J = 2.7, 8.7$ Hz, H-6), 4.71 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.04 (1H, dd, $J = 12.0, 2.2$ Hz, H-6'a), 3.92 (1H, dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, H-6'b), 3.71 (3H, s, 3-OCH₃), 3.68 (3H, s, 4-OCH₃), 3.17 ~ 3.44 (4H, m, H-2' ~ H-5'); ^{13}C NMR(150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 143.9 (C-1), 102.4 (C-2), 152.0 (C-3), 149.4 (C-4), 107.2 (C-5), 112.6

(C-6), 55.4 (3-OCH₃), 56.1 (4-OCH₃), 101.5 (C-1'), 73.4 (C-2'), 76.8 (C-3'), 70.0 (C-4'), 77.2 (C-5'), 60.9 (C-6')。以上数据经与文献对照^[16], 鉴定化合物 6 为 3,4-二甲氧基苯基- β -D-葡萄糖苷。

化合物 7 白色无定型粉末(甲醇);ESI-MS: m/z 527.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, m/z 543.1 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 分子式 $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$; ^1H NMR(600 MHz, CD_3OD) δ : 6.74 (2H, s, H-3, H-5), 6.53 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 6.31 (1H, dt, $J = 15.9, 5.6$ Hz, H-8), 5.30 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-1''), 4.89 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.21 (2H, d, $J = 5.6$ Hz, H-9), 4.11 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-4''b), 4.00 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-2''), 3.84 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.78 (1H, m, H-6'b), 3.77 (1H, m, H-4''a), 3.65 (1H, dd, $J = 12.1, 5.0$ Hz, H-6'a), 3.60 (2H, s, H-5''), 3.59 (1H, dd, $J = 8.9, 7.7$ Hz, H-2'), 3.51 (1H, dd, $J = 8.9, 8.8$ Hz, H-3'), 3.44 (1H, dd, $J = 8.8, 9.5$ Hz, H-4'), 3.22 (1H, m, H-5'); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ : 135.3 (C-1), 154.3 (C-2, 6), 105.4 (C-3, 5), 135.8 (C-4), 131.3 (C-7), 130.1 (C-8), 63.6 (C-9), 57.0 (3, 5-OCH₃), 105.1 (C-1'), 75.4 (C-2'), 85.2 (C-3'), 69.8 (C-4'), 78.1 (C-5'), 62.5 (C-6'), 111.4 (C-1''), 77.9 (C-2''), 80.6 (C-3''), 75.0 (C-4''), 65.2 (C-5'')。以上数据经与文献对照^[13,17], 鉴定化合物 7 为 tinosinen。

化合物 8 白色无定型粉末(甲醇);ESI-MS: m/z 167.0 $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 123.0 $[\text{M}-\text{COOH}]^-$, 分子式 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$; ^1H NMR(600 MHz, CD_3OD) δ : 7.38 (1H, q, $J = 15.7$ Hz, H-7), 6.67 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-3), 6.41 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-4), 6.23 (1H, q, $J = 15.7$ Hz, H-6), 4.53 (2H, s, H-1'); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ : 151.9 (C-2), 116.7 (C-3), 111.0 (C-4), 158.9 (C-5), 132.5 (C-6), 117.0 (C-7), 170.7 (C-8), 57.5 (C-1')。以上数据经与文献对照^[18], 鉴定化合物 8 为 5-羟甲基-2-呋喃丙烯酸, 是合成 5-取代-2-羟甲基(羧基)呋喃的中间产物。

化合物 9 白色无定型粉末(甲醇);ESI-MS: m/z 601.2 $[\text{M}-\text{H} + \text{HCOOH}]^-$, 分子式 $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{13}$; ^1H NMR(CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.64 (1H, br s, H-16), 7.52 (1H, m, H-15), 6.54 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-14), 5.79 (1H, dd, $J = 12.6, 3.4$ Hz, H-12), 4.93 (1H, dd, $J = 11.0, 2.4$ Hz, H-1), 4.39 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.08 (1H, br d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 3.94 (1H, br s, H-4), 3.86 (1H, dd, $J = 11.7, 1.6$ Hz, H-6'b),

3.66(1H, dd, $J = 11.7, 7.5$ Hz, H-6'a), 3.35(1H, dd, $J = 8.3, 5.6$ Hz, H-3'), 3.28(1H, dd, $J = 5.6, 8.6$ Hz, H-4'), 3.24(1H, m, H-5'), 3.21(1H, dd, $J = 8.3, 7.8$ Hz, H-2'), 2.62(1H, dd, $J = 14.4, 12.6$ Hz, H-11b), 2.50(1H, dd, $J = 11.0, 11.1$ Hz, H-10), 2.33(1H, m, H-3b), 2.33(1H, m, H-7b), 2.01(3H, s, COCH₃), 1.95(1H, dd, $J = 14.4, 3.4$ Hz, H-11a), 1.77(1H, m, H-5), 1.77(1H, m, H-6b), 1.66(1H, m, H-3a), 1.66(1H, m, H-7a), 1.60(1H, s, H-6a), 1.07(3H, s, H-20); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 77.2 (C-1), 69.1 (C-2), 32.6 (C-3), 76.7 (C-4), 39.5 (C-5), 26.5 (C-6), 30.2 (C-7), 76.6 (C-8), 40.5 (C-9), 35.2 (C-10), 37.0 (C-11), 73.1 (C-12), 126.7 (C-13), 109.6 (C-14), 145.1 (C-15), 141.3 (C-16), 174.8 (C-17), 15.5 (C-20), 172.0 (COCH₃), 21.8 (COCH₃), 100.9 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.6 (C-4'), 77.8 (C-5'), 62.8 (C-6'). 以上数据经与文献对照^[13], 鉴定化合物 9 为 tinosineside A。

化合物 10 白色无定型粉末(甲醇); ESI-MS: m/z 561.2 [M + Na]⁺, 分子式 C₂₇H₃₈O₁₁; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.99(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.79(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.66(1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 6.63(1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 6.62(1H, dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, H-6'), 6.62(1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-6), 4.82(1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 3.86(1H, dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, H-6''b), 3.78(3H, s, 4-OCH₃), 3.73(3H, s, 3'-OCH₃), 3.70(3H, s, 3-OCH₃), 3.67(1H, dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, H-6''a), 3.58(2H, m, H-9), 3.58(2H, m, H-9'), 3.48(1H, dd, $J = 6.6, 7.3$ Hz, H-2''), 3.46(1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-3''), 3.39(1H, m, H-4''), 3.39(1H, m, H-5''), 2.68(1H, dd, $J = 13.7, 8.9$ Hz, H-7b), 2.68(1H, dd, $J = 13.7, 8.9$ Hz, H-7'a), 2.56(1H, dd, $J = 13.7, 8.9$ Hz, H-7'a), 1.90(1H, m, H-8), 1.90(1H, m, H-8'); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 135.4 (C-1), 113.9 (C-2), 150.4 (C-3), 148.7 (C-4), 112.9 (C-5), 122.7 (C-6), 36.2 (C-7), 44.2 (C-8), 62.2 (C-9), 137.5 (C-1'), 114.4 (C-2'), 150.6 (C-3'), 146.2 (C-4'), 117.8 (C-5'), 122.9 (C-6'), 36.2 (C-7'), 44.2 (C-8'), 62.3 (C-9'), 56.5 (3-OCH₃), 56.7 (4-OCH₃), 56.7 (3'-OCH₃), 103.2 (C-1''), 75.1 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.3 (C-5''), 62.7 (C-6'')。

以上数据经与文献对照^[13,17], 鉴定化合物 10 为 tinosposide A。

化合物 11 白色无定型粉末(甲醇); ESI-MS: m/z 547.2 [M + Na]⁺, 分子式 C₂₆H₃₆O₁₁; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.67(1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-5'), 6.65(1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-5), 6.64(1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-2'), 6.62(1H, d, $J = 1.1$ Hz, H-2), 6.56(1H, m, H-6), 6.56(1H, m, H-6'), 4.19(1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.87(1H, m, H-6''b), 3.86(1H, m, H-9'b), 3.75(6H, s, 3-OCH₃, 3'-OCH₃), 3.67(1H, m, H-6''a), 3.67(1H, m, H-9b), 3.56(1H, m, H-9a), 3.56(1H, m, H-9'a), 3.35(1H, m, H-4''), 3.35(1H, m, H-5''), 3.30(1H, m, H-3''), 3.21(1H, m, H-2''), 2.65(2H, m, H-7'), 2.56(2H, m, H-7), 2.06(1H, m, H-8'), 2.04(1H, m, H-8); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 134.0 (C-1), 113.4 (C-2), 148.8 (C-3), 145.4 (C-4), 115.7 (C-5), 122.8 (C-6), 35.5 (C-7), 44.0 (C-8), 62.8 (C-9), 133.9 (C-1'), 113.5 (C-2'), 148.8 (C-3'), 145.4 (C-4'), 115.7 (C-5'), 122.7 (C-6'), 35.5 (C-7'), 41.6 (C-8'), 70.4 (C-9'), 56.3 (3-OCH₃), 56.2 (3'-OCH₃), 104.6 (C-1''), 75.2 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.7 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.8 (C-6'')。以上数据经与文献对照^[19], 鉴定化合物 11 为开环异落叶松脂素-9- β -D-葡萄糖苷。

化合物 12 白色无定型粉末(甲醇); ESI-MS: m/z 545.2 [M + Na]⁺, 分子式 C₂₆H₃₄O₁₁; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.74(1H, dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, H-6), 6.69(1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 6.65(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.64(1H, s, H-5'), 6.18(1H, s, H-2'), 4.04(1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.85 ~ 3.64 (10H, m, H-9, 9', 2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 3.81(3H, s, 3-OCH₃), 3.78(3H, s, 3'-OCH₃), 3.15(1H, m, H-7'a), 2.87(1H, m, H-7'b), 2.75(1H, m, H-7), 1.96(2H, m, H-8, 8'); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 138.7 (C-1), 114.0 (C-2), 149.0 (C-3), 145.3 (C-4), 116.0 (C-5), 123.5 (C-6), 48.6 (C-7), 45.3 (C-8), 70.7 (C-9), 129.3 (C-1'), 112.3 (C-2'), 147.3 (C-3'), 146.0 (C-4'), 117.4 (C-5'), 133.7 (C-6'), 33.7 (C-7'), 41.2 (C-8'), 65.5 (C-9'), 56.5 (3-OCH₃), 56.4 (3'-OCH₃), 103.8 (C-1), 75.0 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.4 (C-4''), 77.9 (C-5''), 62.5 (C-6'')。以上数据经与文献对照^[20], 鉴定化合物 12 为异落叶松脂素-9- β -D-葡萄糖苷。

化合物 13 白色针状结晶(甲醇); ESI-MS: m/z

128.0 [M-H]⁻, 分子式 C₅H₇NO₃; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 4.25 (1H, dd, *J* = 9.1, 4.6 Hz, H-2), 2.49 (1H, m, H-3a), 2.33 (2H, m, H-4), 2.16 (1H, m, H-3b); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 57.0

(C-2), 30.4 (C-3), 26.1 (C-4), 175.8 (C-5), 181.1 (C-6)。以上数据经与文献对照^[21], 鉴定化合物 **13** 为 *L*-焦谷氨酸。

化合物 **1**~**13** 结构见图 1。

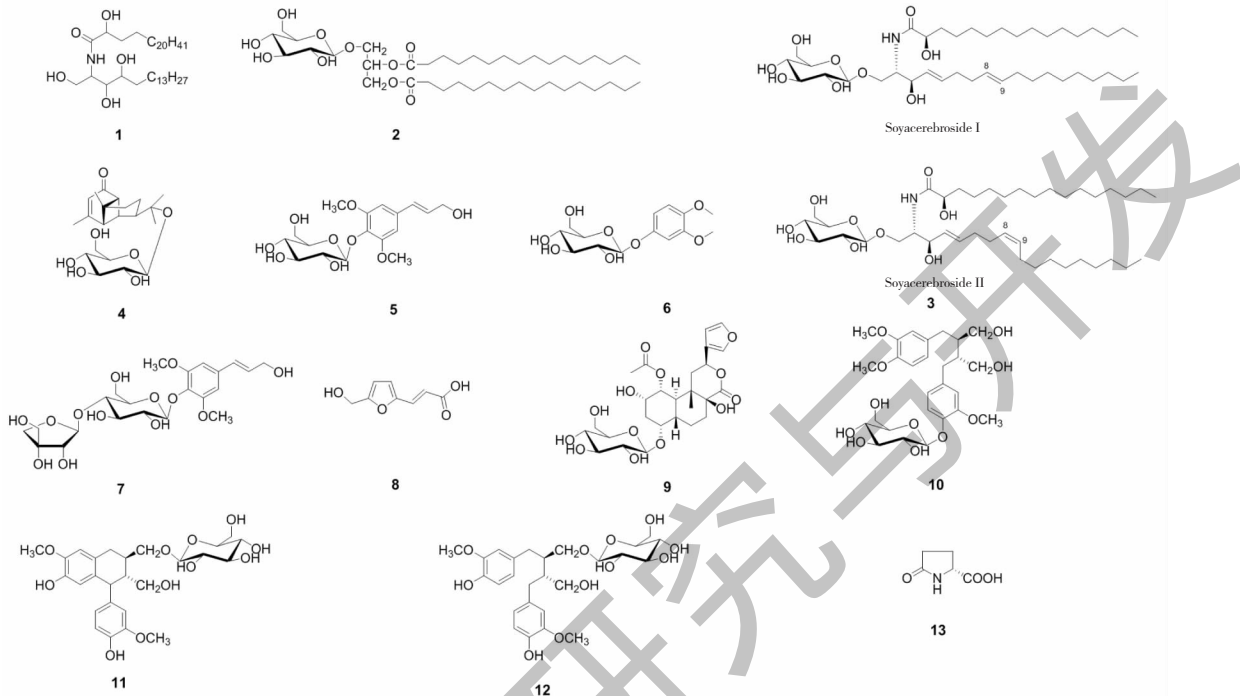


图 1 化合物 **1**~**13** 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds **1-13**

2.2 抗炎活性结果

本实验采用脂多糖(LPS)诱导的 RAW 264.7 细胞炎症筛选模型,以地塞米松为阳性对照,对宽筋藤中分离得到 13 个化合物(化合物 **1**~**13**)进行了抗炎活性筛选(见表 1)。结果显示,当浓度为 20 μmol/L,化合物 **2**,**3**,**4** 具有一定的 NO 生成抑制作用。

3 结论

本实验采用多种分离技术,从宽筋藤氯仿部位和正丁醇部位共分离鉴定了 13 个化合物,包括 2 个脑苷脂类化合物(**1**,**3**)、5 个苯丙素类化合物(**5**,**7**,**10**,**11**,**12**)、2 个萜类化合物(**4**,**9**)、1 个氨基酸类化合物(**13**)和 3 个其他类化合物(**2**,**6**,**8**)。其中,化合物 **8** 作为天然产物首次被报道,化合物 **1**,**2**,**3**,**6**,**11** 为首次从防己科植物中分离得到,化合物 **13** 为首次从宽筋藤中分离得到。有研究报道化合物 **4** 对人口腔表皮样癌 KB 细胞、子宫颈鳞癌 SiHa 细胞表现出一定的抑制活性;化合物 **3** 可通过减少 MCP-1 表达、抑制单核细胞/巨噬细胞浸润滑膜细胞而达到

表 1 化合物 **1**~**13** 的抗炎活性($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 The anti-inflammatory activities of compounds **1-13**($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物 Compound	NO 生成抑制率 Inhibitory rate of NO production (%)
1	8.58 ± 1.91
2	37.29 ± 2.49*
3	37.90 ± 1.75*
4	40.89 ± 6.55*
5	25.15 ± 4.15*
6	31.62 ± 3.89*
7	20.16 ± 1.83*
8	29.81 ± 2.6*
9	35.16 ± 3.41*
10	27.84 ± 3.54*
11	14.45 ± 1.34
12	30.99 ± 3.07*
13	27.39 ± 1.03*
地塞米松 Dexamethasone	63.24 ± 3.04*

注:与模型组比较, * *P* < 0.05

Note: Compared with control, * *P* < 0.05

减轻滑膜炎症、预防关节损伤的作用^[22,23]。本文在化学成分研究的基础上,对分离得到的13个化合物以LPS诱导RAW 264.7细胞为体外炎症模型,通过抑制NO生成实验评价化合物的抗炎活性,结果显示化合物**2**、**3**、**4**具有一定的抗炎活性。本研究不仅丰富了宽筋藤的化学结构类型和化学成分库,也为进一步阐明其药效物质基础、促进宽筋藤的资源开发提供了科学依据。

参考文献

- 1 Wu FR, Zeng CY, Dai WB. Pharmacological effects of *Tinospora sinensis* and research progress in its clinical application [J]. China Licensed Pharm (中国执业药师), 2014, 11(12):37-40.
- 2 National Compilation Group of Chinese Herbal Medicine. National Chinese Herbal Medicine: Vol I (全国中草药汇编:第一部) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1978.
- 3 Demar DP. Jinzhu Bencao (晶珠本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2012.
- 4 Liao GP, Sun DG, Yin XS, et al. Research progress of clinical application in orthopedics of Kuan Jin Teng [J]. For All Health (大家健康:学术版), 2015 9(16):39.
- 5 Bai WT, Xie YH, Wei YF, et al. Phytochemical and pharmacological research advances of Kuan Jin Teng, a Tibetan medicinal plants [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2016, 18:1666-1669.
- 6 Ma YJ, Bai WT, Zhu XF, et al. Research progress of medicinal plants of *Tinospora* [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2017, 15:1733-1738.
- 7 Li J, Liang QL, Lei LL, et al. Structure modification of *cis*-stilbenoids from the tubes of *Scirpus yagara* and their anti-inflammatory activities [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2015, 50:15-18.
- 8 Yang XY, Xu SH, Guo SH, et al. Study on the metabolite of *Laurencia cartilaginea* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2005, 17:303-305.
- 9 Jung JH, Lee H, Kang SS. Diacylglycerylgalactosides from *Arisaema amurense* [J]. Phytochemistry, 1996, 42:447-452.
- 10 Shibuya H, Kawashima K, Narita N, et al. Syntheses of a glycerophospholipid, C16-platelet activating factor and a palmitoyl analogue of M-5, an anti-inflammatory glyceroglycolipid [J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40:1166-1169.
- 11 Shibuya H, Kawashima K, Sakagami M, et al. Sphingolipids and glycerolipids. I. chemical structures and ionophoretic activities of soyacerebrosides I and II from soybean [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38:2933-2938.
- 12 Inagaki M, Harada Y, Yamada K, et al. Isolation and structure determination of cerebrosides from garlic, the bulbs of *Allium sativum* L. [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 46:1153-1156.
- 13 Yuan JZ. Studies on the constituents of *Smilax glabra* Roxb. and *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr. [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学), 2005.
- 14 Ren YL. Study on chemical constituents of two medicinal species [D]. Changsha: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), 2007.
- 15 Huang YZ, Zhang C, Huang S, et al. Chemical constituents of the plant *Micromelum falcatum* (Lour.) Tan [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24:1161-1164.
- 16 Pan HF, Lundgren LN. Phenolic extractives from root bark of *Picea abies* [J]. Phytochemistry, 1995, 39:1423-1428.
- 17 Li W, Koike K, Liu LJ, et al. New lignan glucosides from the stems of *Tinospora sinensis* [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52:638-640.
- 18 Li WH. Electroorganic Synthesis of 2-substituted 5-hydroxymethyl (carboxyl) furans [J]. Chin J Syn Chem, 2002, 10:177-179.
- 19 Inoshiri S, Sasaki M, Kohda H, et al. Aromatic glycosides from *Berchemia racemosa* [J]. Phytochemistry, 1987, 26:2811-2814.
- 20 Wang LQ, Zhao YX, Zhou L, et al. Lignans from *Gnetum montanum* Markgr. f. *megalocarpha* [J]. Chem Nat Compd, 2009, 45:424-426.
- 21 Hao XY, Tan NH, Zhou J. Constituents of *Gastrodia elata* in Guizhou [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2000, 22(1):81-84.
- 22 Liu SC, Chiu CP, Tsai CH, et al. Soya-cerebroside, an extract of *Cordyceps militaris*, suppresses monocyte migration and prevents cartilage degradation in inflammatory animal models. [J]. Sci Rep, 2017, 7:43205.
- 23 Manju B, Kunal P, Praveen KV, et al. Validation of ethnomedicinal potential of *Tinospora cordifolia* for anticancer and immunomodulatory activities and quantification of bioactive molecules by HPTLC [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 175:131-137.