

[成分分析]

腊肠果化学成分及其生物活性

张国栋^{1,3}, 董玉启^{1,3}, 王春华^{1,2*}, 李正^{1,2}, 朱彦^{1,3}

(1. 天津中医药大学天津市现代中药重点实验室, 天津 300193; 2. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 300193; 3. 天津国际生物医药联合研究院中药新药研发中心, 天津 300457)

摘要: **目的** 研究腊肠树 *Cassia fistula* Linn 成熟果实的化学成分及其生物活性。**方法** 腊肠果 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位采用硅胶柱、Sephadex LH-20、ODS、HPLC 等进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。采用 DPPH 和 ABTS 自由基清除实验评价抗氧化活性; 用 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 246.7 炎症反应模型检测抗炎活性。**结果** 从中分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为 3, 5, 7, 4'-四羟基黄酮 (**1**)、(-)-表儿茶素 (**2**)、5, 7, 4'-三羟基二氢黄酮 (**3**)、7, 8, 3', 4', 5'-五羟基黄酮-8-*O*-鼠李糖苷 (**4**)、epizfzelechin- (4 β →8) -epizfzelechin (**5**)、 β -腺苷 (**6**)、3-羟基乌苏-12-烯-28-酸 (**7**)、3-甲氧基-4-羟基苯甲酸 (**8**)、 β -*D*-吡喃葡萄糖基-2-甲基丁酸酯 (**9**)、 β -*D*-吡喃葡萄糖基-2-甲基丙酸酯 (**10**)、*D*-甘露糖醇 (**11**)、 β -谷甾醇 (**12**)。化合物 **1~2**、**4~5** 有较强的 DPPH 和 ABTS 自由基清除作用, IC_{50} (0.003±0) ~ (0.112±0.009) mg/mL。化合物 **1~3**、**8** 能够抑制 LPS 诱导细胞产生 NO。**结论** 化合物 **4~7**、**9~10** 为首次从该植物中分离得到。化合物 **1~2**、**4~5** 具有一定的抗氧化活性, 化合物 **1~3**、**8** 具有一定的抗炎活性。

关键词: 腊肠树; 果实; 化学成分; 分离鉴定; 抗氧化活性; 抗炎活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)12-2918-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.12.018

Chemical constituents from the fruits of *Cassia fistula* and their biological activities

ZHANG Guo-dong^{1,3}, DONG Yu-qi^{1,3}, WANG Chun-hua^{1,2*}, LI Zheng^{1,2}, ZHU Yan^{1,3}

(1. Tianjin Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 3. Research and Development Center of Traditional Chinese Medicine, Tianjin International Joint Academy of Biotechnology & Medicine, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT: AIM To study the chemical constituents from the fruits of *Cassia fistula* Linn and their biological activities. **METHODS** The ethyl acetate fraction of 95% ethanol extract from the fruits of *C. fistula* was isolated and purified by silica column, Sephadex LH-20, ODS and preparative HPLC, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. The antioxidant activity was evaluated by DPPH and ABTS radicals scavenging experiments. The anti-inflammatory activity was evaluated by LPS induced RAW 264.7 inflammatory cell model. **RESULTS** Twelve compounds were isolated and identified as 3, 5, 7, 4'-tetrahydroxyflavane (**1**), (-)-epicatechin (**2**), 5, 7, 4'-trihydroxyflavanone (**3**), 7, 8, 3', 4', 5'-pentahydroxyflavone-8-*O*-rhamnoside (**4**), epizfzelechin- (4 β →8) -epizfzelechin (**5**), β -adenosine (**6**), 3-hydroxyl-12-ursen-28-oic acid (**7**), 4-hydroxyl-3-methoxybenzoic acid (**8**), β -*D*-glucopyranosyl-2-methylbutanoate (**9**), β -*D*-glucopyranosyl-2-methylpropanoate (**10**), *D*-mannitol (**11**) and β -sitosterol (**12**). Compounds **1~2**, **4~5** had strong DPPH and ABTS radicals scavenging effects with the IC_{50} (0.003±0) ~ (0.112±0.009) mg/mL. Compounds **1~3** and **8** could inhibit the production of NO by LPS-induced cells.

收稿日期: 2018-11-30

基金项目: 天津市科技计划项目 (15PTCYSY00030)

作者简介: 张国栋 (1990—), 男, 硕士生, 研究方向为药物化学。E-mail: gckymd66@foxmail.com

* 通信作者: 王春华 (1982—), 男, 副研究员, 研究方向为天然药物化学与天然产物合成生物学。E-mail: weh_cpu@vip.126.com

CONCLUSION Compounds **4-7**, **9-10** are isolated from this plant for the first time. Compounds **1-2**, **4-5** show moderate antioxidant activity, and compounds **1-3**, **8** have moderate anti-inflammatory activity.

KEY WORDS: *Cassia fistula* Linn; fruits; chemical constituents; isolation and identification; antioxidant activity; anti-inflammatory activity

腊肠果为决明属植物腊肠树 *Cassia fistula* Linn 的成熟干燥果实^[1]。腊肠果具有清热、治疗实热便秘、四肢肿胀的功效,在治疗肝病特别是黄疸型肝炎方面有很好的疗效,《月王药诊》《中国藏药》对其均有收录^[2]。现代研究证实腊肠树的果实有较好的抗氧化活性,其治疗糖尿病也是基于抗氧化活性^[3-4]。另外可治疗耳鼻内炎症引起的肿块^[5]。国内外研究表明腊肠果主要含有黄酮类、蒽醌类、甾体类、生物碱和挥发油类等成分^[6]。为探究其抗氧化、抗炎活性,进一步了解药效物质基础,本实验对腊肠果 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位进行分离纯化,从中分离并鉴定出 12 个化合物,其中化合物 **4-7**、**9-10** 为首次从该植物中分离得到;化合物 **1-2**、**4-5** 具有很好的自由基清除能力;化合物 **1-3**、**8** 具有抗炎活性。

1 材料

Aglient 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Synapt G2 mass 质谱仪 (美国 Waters 公司); BrukerAV-III 核磁共振波谱仪 (TMS 为内标,瑞士 Bruker 公司); ADP440 旋光仪 (英国 Bellingham+Stanley 公司); RE-52AA 型、RE-5205 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); TGL-16C 飞鸽牌系列离心机 (上海安亭科学仪器厂); Sephadex LH-20 (瑞士 GE Healthcare 公司); 反向 C₁₈ 柱层析硅胶 (日本 YMC 公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱层析硅胶 (青岛海洋化工厂); 汽套式二氧化碳培养箱 (上海施都凯仪器设备有限公司)。抗坏血酸 (天津市北方天医化学试剂厂); 脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司); 细胞计数试剂盒 CCK-8 (上海同仁化学研究所); Griess Reagent System 试剂盒 (美国 Promega 公司); 胎牛血清 (美国 HyClone 公司); 小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。甲醇、乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚均为分析纯。

腊肠果购于云南省丽江市,经天津中医药大学中药制药工程学院王春华副研究员鉴定为决明属植物腊肠树 *Cassia fistula* Linn 的干燥果实,留样于天津中医药大学滨海现代中药实验室中药研究与分析部。

2 提取与分离

腊肠果干燥品 20 kg 加入 100 L 95% 乙醇室温浸泡,减压浓缩得浸膏,以适量的水分散,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得到石油醚层 230 g、乙酸乙酯层 720 g、正丁醇层 430 g、水层乙醇层 1 800 g。乙酸乙酯层浸膏经硅胶柱以二氯甲烷-甲醇梯度 (二氯甲烷-甲醇 100 : 0 ~ 0 : 100) 梯度洗脱得 Fr. 1 ~ 9 共 9 个组分。化合物 **12** 由 Fr. 3 经硅胶柱得到; Fr. 4 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇梯度洗脱)、HPLC (甲醇-水, 梯度洗脱)、Sephadex LH-20 (甲醇-水, 梯度洗脱) 得化合物 **1** (15.0 mg)、**3** (10.0 mg)、**4** (5.0 mg)、**5** (6.0 mg); Fr. 6 采用 Sephadex LH-20 (甲醇-水, 梯度洗脱)、HPLC (甲醇-水, 洗梯度脱) 得化合物 **8** (10.0 mg)、**9** (8.0 mg)、**10** (8.0 mg); Fr. 2 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 梯度洗脱) 得化合物 **7** (10.0 mg); Fr. 8 经 Sephadex LH-20 (甲醇-水, 梯度洗脱) 得化合物 **11** (8.0 mg); Fr. 6 经 Sephadex LH-20 (甲醇-水, 梯度洗脱)、HPLC (甲醇-水, 洗梯度脱) 得化合物 **2** (200.0 mg)、**6** (7.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, 易溶于甲醇。硅胶薄层层析 UV 254 nm 下有暗斑, 5% 香草醛-浓硫酸显色反应呈紫红色, ESI-MS m/z : 275.1 [M+H]⁺, 分子式 C₁₅H₁₄O₅。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 2.75 (1H, dd, $J=16.9, 2.7$ Hz, H-4), 2.88 (1H, dd, $J=16.8, 4.5$ Hz, H-4), 4.18 (1H, m, H-3), 4.60 (1H, d, $J=4.6$ Hz, H-2), 5.94 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6), 5.95 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 6.79 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3', 5'), 7.32 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', 6'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 29.3 (C-4), 67.4 (C-3), 79.9 (C-2), 95.9 (C-8), 96.4 (C-6), 100.0 (C-10), 115.7 (C-3', 5'), 129.1 (C-2', 6'), 131.6 (C-1'), 157.4 (C-5), 157.6 (C-7), 157.8 (C-9), 158 (C-4')。以上数据与文献 [7] 一致, 故鉴定为 **3, 5, 7, 4'-四羟基黄酮**。

化合物 **2**: 淡黄色结晶, 易溶于甲醇。硅胶薄层层析 UV 254 nm 下为暗斑, 5% 香草醛-浓硫酸显

色反应呈红色。 $[\alpha]_D^{25}$ -34.6° (*c* 0.32, CH₃OH), ESI-MS *m/z*: 291.1 [M+H]⁺, 分子式 C₁₅H₁₄O₆。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 2.75 (1H, dd, *J*=11.2, 2.8 Hz, H-4), 2.87 (1H, dd, *J*=11.2, 1.9 Hz, H-4), 4.17 (1H, m, H-3), 4.81 (1H, d, *J*=4.5 Hz, H-2), 5.93 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-6), 5.96 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-8), 6.77 (1H, s, H-5'), 6.81 (1H, s, H-6'), 6.99 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H-2'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 29.2 (C-4), 67.4 (C-3), 79.8 (C-2), 95.9 (C-8), 96.4 (C-6), 100.1 (C-10), 115.3 (C-2'), 115.9 (C-6'), 119.4 (C-5'), 132.2 (C-1'), 145.7 (C-3'), 145.8 (C-4'), 157.3 (C-9), 157.5 (C-7), 157.9 (C-5)。以上数据与文献 [8] 一致, 故鉴定为 (-)-表儿茶素。

化合物 3: 白色粉末, 易溶于甲醇。硅胶薄层层析 UV 254 nm 下为暗斑, 盐酸-镁粉反应呈阳性。ESI-MS *m/z*: 273.1 [M+H]⁺, 分子式 C₁₅H₁₂O₅。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 2.67 (1H, dd, *J*=11.4 Hz, 2.0 Hz, H-3a), 3.12 (1H, dd, *J*=11.4, 8.6 Hz, H-3b), 5.33 (1H, dd, *J*=8.6, 2.0 Hz, H-2), 5.85 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H-6), 5.91 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H-8), 6.82 (1H, dd, *J*=1.9, 3.2 Hz, H-5'), 6.83 (1H, dd, *J*=1.9, 3.2 Hz, H-3'), 7.31 (1H, dd, *J*=1.2, 4.4 Hz, H-6'), 7.33 (1H, dd, *J*=1.2, 4.4 Hz, H-2'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 44.0 (C-3), 80.5 (C-2), 96.2 (C-8), 97.0 (C-6), 103.4 (C-10), 116.3 (C-3', C-5'), 129.0 (C-2', C-6'), 131.1 (C-1'), 159.0 (C-4'), 164.9 (C-5), 165.5 (C-9), 168.3 (C-7), 197.8 (C-4)。以上数据与文献 [9] 一致, 故鉴定为 5, 7, 4'-三羟基二氢黄酮。

化合物 4: 淡黄色粉末, 溶于甲醇, 微溶于二氯。硅胶薄层层析 UV 254 nm 下有暗斑, 盐酸-镁粉反应呈阳性。ESI-MS *m/z*: 449.1 [M+H]⁺, 分子式 C₂₁H₂₀O₁₁。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 0.86 (3H, d, *J*=6.1 Hz, H-6''), 3.26 (1H, m, H-5''), 3.34 (1H, m, H-4''), 3.68 (1H, dd, *J*=9.4, 9.5 Hz, H-3''), 4.15 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2''), 5.27 (1H, d, *J*=0.8 Hz, H-1''), 6.10 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-6), 6.26 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 7.22 (1H, dd, *J*=1.9, 8.3 Hz, H-6'), 7.25 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 17.6 (C-6''), 71.9 (C-5''),

72.0 (C-3''), 72.1 (C-2''), 73.2 (C-4''), 94.7 (C-6), 99.8 (C-1''), 103.5 (C-10), 105.9 (C-3), 115.0 (C-2'), 115.6 (C-5'), 121.5 (C-1'), 121.6 (C-6'), 136.2 (C-8), 146.3 (C-3'), 149.7 (C-4'), 158.4 (C-7), 159.2 (C-5), 163.1 (C-9), 165.8 (C-2), 179.5 (C-4)。以上数据与文献 [10] 一致, 故鉴定为 7, 8, 3', 4', 5'-五羟基黄酮-8-*O*-鼠李糖苷。

化合物 5: 黄色无定型粉末, 易溶于甲醇。薄层层析 UV 254 nm 下有暗斑, 香草醛-浓硫酸显橙红色。ESI-MS *m/z*: 547.2 [M+H]⁺, 分子式 C₃₀H₂₆O₁₀。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 2.72 (2H, m, H-4'), 4.05 (1H, s, H-3'), 4.18 (1H, s, H-3), 4.61 (1H, s, H-4), 4.90 (1H, s, H-2'), 5.01 (1H, s, H-2), 6.06 (3H, m, H-6, 6', 8), 6.79 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-15, 15'), 6.82 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-13, 13'), 7.24 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-16, 16'), 7.35 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-12, 12'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 29.7 (C-4'), 37.7 (C-4), 67.4 (C-3'), 72.6 (C-3), 77.3 (C-2), 79.7 (C-2'), 96.1 (C-8, 8'), 96.5 (C-6, 6'), 100.6 (C-10, 10'), 115.7 (C-13, 13', 15, 15'), 129.0 (C-12, 12', 16, 16'), 131.6 (C-11, 11'), 155.4 (C-14, 14'), 157.8 (C-5, 5'), 157.8 (C-9, 9'), 157.9 (C-7, 7')。以上数据与文献 [11] 一致, 故鉴定为 epizfzelechin- (4 β→8) - epizfzelechin。

化合物 6: 白色粉末, 易溶于甲醇。硅胶薄层层析紫外灯下 254 nm 有暗斑, 碘化铍钾显色呈红色, Molish 反应呈紫色环。 $[\alpha]_D^{25}$ -64.0° (*c* 0.10, H₂O), ESI-MS *m/z*: 268.1 [M+H]⁺, 分子式 C₁₀H₁₃N₅O₄。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.56 (1H, dd, *J*=8.4, 3.6 Hz, H-5'a), 3.68 (1H, d, *J*=12.1 Hz, H-5'b), 3.97 (1H, q, *J*=3.4 Hz, H-4'), 4.15 (1H, q, *J*=4.3 Hz, H-3'), 4.61 (1H, q, *J*=5.6 Hz, H-2'), 5.17 (1H, d, *J*=4.6 Hz, 3'-OH), 5.38 (1H, m, 5'-OH), 5.41 (1H, d, *J*=6.5 Hz, 2'-OH), 5.88 (1H, d, *J*=6.2 Hz, H-1'), 7.33 (2H, s, -NH₂), 8.14 (1H, s, H-2), 8.35 (1H, s, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 61.6 (C-5'), 70.6 (C-3'), 73.4 (C-2'), 85.9 (C-4'), 87.9 (C-1'), 119.3 (C-5), 139.9 (C-8), 149.1 (C-4), 152.3 (C-2), 156.1 (C-6)。以上数据与文献 [12] 一致, 故鉴定为 β-腺苷。

化合物 7: 白色粉末, 易溶于丙酮, 10% 硫酸-乙醇显色剂显色呈紫红色, 紫外吸收不明显。ESI-MS m/z : 457.4 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{30}H_{48}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, Pyridine- d_5) δ : 0.87 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-29), 1.05 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-30), 1.08 (6H, s, H-25, 27), 1.25 (3H, s, H-23), 1.27 (3H, s, H-26), 2.66 (1H, d, $J=11.3$ Hz, H-18), 3.48 (1H, dd, $J=5.5, 10.6$ Hz, H-3), 5.51 (1H, s, H-12); ^{13}C -NMR (125 MHz, Pyridine- d_5) δ : 16.1 (C-25), 17.0 (C-24), 17.6 (C-26), 17.9 (C-11), 19.2 (C-6), 21.8 (C-30), 24.0 (C-27), 24.1 (C-29), 24.1 (C-16), 28.5 (C-2), 29.1 (C-23), 29.2 (C-15), 31.5 (C-21), 34.0 (C-7), 37.7 (C-22), 37.9 (C-10), 39.5 (C-19), 39.8 (C-8), 39.8 (C-1), 39.9 (C-20), 40.4 (C-4), 42.9 (C-14), 48.5 (C-17), 48.5 (C-9), 54.0 (C-18), 56.2 (C-5), 78.5 (C-3), 126.1 (C-12), 139.7 (C-13), 180.3 (C-28)。以上数据与文献 [13] 一致, 故鉴定为 3-羟基乌苏-12-烯-28-酸。

化合物 8: 白色粉末, 易溶于甲醇。硅胶薄层板层析 UV 254 nm 下有暗斑, 10% 硫酸-乙醇不显色, 2% $FeCl_3$ - $K_3 [Fe(CN)_6]$ 乙醇显色剂显色呈阳性。ESI-MS m/z : 167.0 $[M-H]^-$, 分子式 $C_8H_8O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.89 (3H, s, $-OCH_3$), 6.84 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5), 7.55 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2), 7.56 (1H, dd, $J=1.9, 8.7$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 56.4 ($-OCH_3$), 113.8 (C-5), 115.8 (C-2), 123.1 (C-1), 125.3 (C-6), 148.7 (C-3), 152.7 (C-4), 170.0 ($-COOH$)。以上数据与文献 [14] 一致, 故鉴定为 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸。

化合物 9: 淡黄色粉末, 易溶于甲醇, 10% 硫酸-乙醇显色剂显色呈淡黄色。 $[\alpha]_D^{25} + 1.9^\circ$ (c 0.35, CH_3OH), ESI-MS m/z : 263.1 $[M-H]^-$, 分子式 $C_{11}H_{20}O_7$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 0.98 (3H, t, $J=7.6$ Hz, H-4), 1.22 (3H, d, $J=7.6$ Hz, H-5), 1.50 (1H, m, H-3b), 1.77 (1H, m, H-3a), 2.49 (1H, m, H-2), 3.34~3.46 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.72 (1H, dd, $J=4.3$ Hz, H-6b'), 3.86 (1H, dd, $J=1.0, 12.5$ Hz, H-6a'), 5.53 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 11.4 (C-5), 18.3 (C-4), 27.2 (C-3), 41.8 (C-2), 61.9 (Glu-C-6'), 70.7 (Glu-

C-4'), 74.1 (Glu -C-2'), 78.1 (Glu -C-5'), 78.4 (Glu -C-3'), 95.3 (Glu -C-1'), 177.6 (C-1)。以上数据与文献 [15] 一致, 故鉴定为 β -D-吡喃葡萄糖基-2-甲基丁酸酯。

化合物 10: 淡黄色粉末, 易溶于甲醇, 10% 硫酸-乙醇显色剂显色呈淡黄色, ESI-MS m/z : 249.1 $[M-H]^-$, 分子式 $C_{10}H_{18}O_7$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.13 (6H, d, $J=6.8$ Hz, H-3a, 3b), 2.40 (1H, m, H-2), 3.32~3.50 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.71 (1H, dd, $J=4.3$ Hz, H-6b'), 3.83 (1H, dd, $J=1.0, 12.5$ Hz, H-6a'), 5.51 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 21.3 (C-3), 25.6 (C-2), 61.9 (Glu -C-6'), 70.7 (Glu -C-4'), 73.9 (Glu -C-2'), 77.6 (Glu -C-5'), 78.4 (Glu -C-3'), 95.1 (Glu -C-1'), 177.5 (C-1)。以上数据与文献 [15] 一致, 故鉴定为 β -D-吡喃葡萄糖基-2-甲基丙酸酯。

化合物 11: 白色粉末, 微溶于甲醇。10% 浓硫酸-乙醇反应显棕黄色。晶体在碱性条件下与三氯化铁反应生成棕黄色沉淀, 震荡不消失, 加过量的碱性即溶解生成棕色溶液。ESI-MS m/z : 183.1 $[M+H]^+$, 分子式 $C_6H_{14}O_6$ 。 1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.56 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3, 4), 3.62 (2H, ddd, $J=2.7, 6.2, 8.7$ Hz, H-2, 5), 3.68 (2H, dd, $J=10.8, 6.1$ Hz, H-1a, 6a), 3.76 (2H, dd, $J=10.8, 6.1$ Hz, H-1b, 6b); ^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ : 63.2 (C-1, 6), 69.3 (C-2, 5), 70.9 (C-3, 4)。以上数据与文献 [16-17] 一致, 故鉴定为 D-甘露糖醇。

化合物 12: 白色粉末, 易溶于氯仿。10% 硫酸乙醇显色呈紫红色斑点。ESI-MS m/z : 415.4 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{29}H_{50}O$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.67 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-18), 0.82 (6H, m, H-28, 29), 0.84 (3H, m, H-21), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-26), 0.98 (3H, s, H-19), 3.70 (1H, m, H-3), 5.33 (1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.0 (C-18), 12.2 (C-29), 19.2 (C-19), 19.5 (C-21), 21.2 (C-26, 27), 21.3 (C-11), 23.2 (C-28), 25.5 (C-16), 26.3 (C-15), 26.4 (C-23), 30.0 (C-25), 31.7 (C-2), 31.8 (C-8), 32.0 (C-7), 32.1 (C-22), 36.3 (C-20), 37.0 (C-1), 37.4 (C-10), 39.8 (C-12), 40.6 (C-4), 42.4 (C-13), 46.0 (C-24), 56.1 (C-17), 56.6 (C-14), 57.0 (C-9), 71.9 (C-

3), 121.8 (C-6), 140.8 (C-5)。以上数据与文献[18]一致,且薄层色谱3种展开系统展开,与β-谷甾醇对照品对照,Rf值及显色情况均相同,且混合熔点不下降,故鉴定为β-谷甾醇。

4 生物活性筛选

4.1 抗氧化活性 DPPH和ABTS自由基的清除方法常被用来评价天然产物的抗氧化活性^[19-21]。选取化合物1~8,精密称量,甲醇溶解并定容,等比稀释母液,分成若干梯度浓度供试品溶液。以抗坏血酸为阳性药。实验分为药物组、DPPH(ABTS)对照组、空白组,每组3个复孔,药物组依次加入不同浓度的样品溶液各50 μL,加入150 μL DPPH(ABTS)甲醇溶液;为了消除药物本身的影响,空白对照组依次加入不同浓度样品溶液各50 μL,各加入150 μL甲醇溶液。而DPPH(ABTS)对照组则加入50 μL甲醇和150 μL DPPH(ABTS)甲醇溶液(ABTS溶液)。各样品组置于多功能读板机中,在37℃下记录45 min内吸光度变化情况。各实验均平行3次,并计算其IC₅₀值^[22]。

DPPH(ABTS)自由基清除活性 = $[1 - (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}) / OD_{\text{对照}}] \times 100\%$,其中OD_{样品}为[DPPH(ABTS)自由基+样品]吸光度值,OD_{空白}为(甲醇+样品)吸光度值,OD_{对照}为[DPPH(ABTS)自由基+甲醇]吸光度值。结果见表1。

表1 抗氧化性实验IC₅₀值(mg/mL, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 IC₅₀ values in antioxidant tests (mg/mL, $\bar{x} \pm s$)

化合物	DPPH	ABTS
1	0.012±0.004	0.011±0.001
2	0.003±0	0.003±0
3	>3.000	>3.000
4	0.112±0.009	0.014±0.002
5	0.055±0.003	0.012±0.001
6	>3.000	>3.000
7	>3.000	>3.000
8	>1.000	>1.000
抗坏血酸	0.009±0	0.008±0

IC₅₀是自由基清除掉一半时所需要的样品浓度,是评价药物抗氧化活性的重要指标。实验结果表明,化合物1~2、5显示出较强抗氧化活性,化合物4活性较弱,化合物8随浓度增加抗氧化活性有增强的趋势,化合物3、6~7无明显抗氧化活性。

4.2 细胞毒性检测 采用CCK-8试剂盒,以小鼠巨噬细胞RAW 264.7检测化合物1~3、5、7~8的细胞毒活性,以地塞米松磷酸钠(DEX, 5 μg/mL)为阳性对照药,LPS(0.1 μg/mL)为造模用药,

设计实验^[23]。小鼠巨噬细胞用含10%灭活胎牛血清的DMEM培养液(含双抗)在37℃恒温、5%CO₂饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期的细胞,细胞刮板刮下细胞,制成单细胞悬液,分别接种于96孔培养板(边沿孔添加基础培养基以减少对实验孔的干扰),每孔含约1×10⁴个细胞,待贴壁后,设置细胞对照组、实验组、空白对照组。实验组分别加入不同的化合物溶液,每个质量浓度组设3个复孔,细胞对照组加入等体积的培养基,置37℃恒温、5%CO₂饱和湿度培养箱中培养;分别在24、48 h取出培养板,更换新的培养基,每孔加入10% CCK-8溶液10 μL,37℃、5%CO₂条件下继续培养3 h,在450 nm处测定吸光度A值,并计算细胞存活率。

细胞存活率 = $[(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$,其中OD_{实验组}为(细胞培养基+药物+CCK-8)吸光度值;OD_{对照组}为(细胞培养基+CCK-8)吸光度值;OD_{空白组}为(无细胞的培养基+CCK-8)吸光度值。与空白对照组对比细胞毒活性检测,结果见图1。

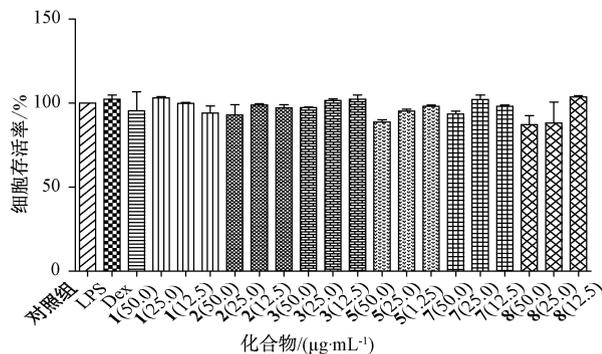


图1 各化合物对细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of various compounds on cell viability

体外细胞毒性检测显示,试验药物对小鼠巨噬细胞RAW 264.7无明显的细胞毒性。化合物5、7~8在高质量浓度时表现出对细胞增殖抑制的迹象但无显著细胞毒性。阳性药DEX(5 μg/mL)和造模用药LPS(0.1 μg/mL)均无明显细胞毒活性。

4.3 抗炎活性检测 NO由L-精氨酸经一氧化氮合成酶催化产生,参与炎症有关的细胞因子调节,在炎症反应中具有抗炎作用,小鼠巨噬细胞在IL-1、IL-2、TNF、IFN等炎症因子和内毒素(如LPS)的诱导下,可产生大量NO,抗炎活性物质可消除炎症减少NO释放。通过测量化合物抑制小鼠巨噬细胞中NO的生成量,可筛选腊肠果中抗炎

活性成分。由于NO不稳定，很快被代谢成相对稳定的亚硝酸根，Griess Reagent System 试剂盒在酸性（磷酸）环境中通过磺胺和N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐的重氮化反应可检测亚硝酸盐的含有量，间接地对NO含有量进行比较精确的检测。

依据CCK-8试剂盒细胞毒测定结果，设计实验^[24]。实验分为对照组（不含药物细胞培养基）、实验组（含有不同化合物浓度的细胞培养基）、阳性药DEX组（含有阳性DEX的细胞培养基）、LPS组（含有LPS的细胞培养基）。实验数据用GraphPad Prism软件做统计图，各组间比较通过SPSS软件进行显著性差异检验，当 $P < 0.05$ 时，组间具有显著性差异。与LPS组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。结果见图2。

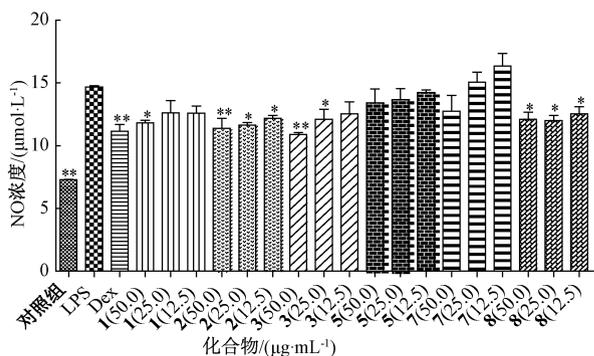


图2 各化合物对LPS刺激小鼠巨噬细胞生成NO的影响
Fig.2 Effects of various compounds on NO stimulated by LPS in mice macrophages

结果表明，化合物1~3、8能够不同程度的抑制LPS诱导细胞产生NO，其中化合物2~3的活性较强。化合物5、7活性较弱。

5 讨论

化合物4~7、9~10为首次从该植物中分离得到。经DPPH和ABTS自由基清除实验，显示腊肠果95%乙醇提取物的乙酸乙酯部位中抗氧化活性强的主要为酚酸、黄酮类。在抗炎活性成分筛选中，所选化合物和阳性药物的浓度均未对细胞产生不良反应，化合物1~3、8具有一定抗炎活性。以期丰富腊肠果的化学成分组成，进一步阐明其药效成分及药理活性，为其进一步开发提供依据。

参考文献:

[1] 林艳芳. 中国傣医药彩色图谱[M]. 云南: 云南民族出版社, 2003.
[2] 青海省药品检验所. 中国藏药. 第一卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.

[3] Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee M A, et al. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(18): 5042-5047.
[4] Manonmani G, Bhavapriya V, Kalpana S, et al. Antioxidant activity of *Cassia fistula* (Linn.) flowers in alloxan induced diabetic rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 97(1): 39-42.
[5] 周兆奎, 赵世望, 刀正员. 傣药的概况[J]. *中成药研究*, 1981, 3(11): 6-9.
[6] Lee C K, Lee P H, Kuo Y H. The chemical constituents from the aril of *Cassia fistula* L. [J]. *J Chin Chem Soc Taip*, 2001, 48(6A): 1053-1058.
[7] 陶华明, 朱全红, 刘永宏. 草麻黄根的黄酮类成分研究[J]. *中草药*, 2011, 42(9): 1678-1682.
[8] 扶教龙, 谭昌恒, 谭俊杰, 等. 云南透骨草的化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(1): 8-11.
[9] 毕丹, 孙云波, 宋联强, 等. 莲花清胆胶囊化学成分研究(I)[J]. *中草药*, 2018, 49(4): 795-800.
[10] 毛华丽. 黑面神化学成分分离及结构鉴定[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
[11] 和东阳, 王利勤. 神黄豆果实化学成分的研究[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(11): 1355-1359.
[12] 叶科元. 南极真菌 *Penicillium* sp. S-1-16 次级代谢产物的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
[13] 李宛霏, 邹娟, 李继新, 等. 岩凤尾蕨化学成分的研究[J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1278-1281.
[14] 韦建华, 李常伟, 向杨, 等. 复方依山红化学成分的研究[J]. *广西中医药*, 2016, 39(2): 75-78.
[15] Braham H, Ben-Jannet H, Mighri Z, et al. Carbohydrates from *Moricandia arvensis* growing in Tunisia[J]. *J Soc Chim Tun*, 2007, 9: 109-113.
[16] 李元伟. 金耳子实体化学成分及其体外抗氧化活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
[17] 周文英, 范家恒. 甘露醇工业化制造方法的评述[J]. *甘蔗糖业*, 2005(5): 46-50.
[18] 李国强, 李韵仪, 谭卓杰. β -谷甾醇的波谱结构解析[J]. *广东化工*, 2018, 45(10): 116-128.
[19] 刘志东, 郭本恒, 王荫榆. 抗氧化活性检测方法的研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(3): 563-567.
[20] 李治明, 崔紫芳, 梁栩. 油楠叶中黄酮提取及抗氧化活性研究[J]. *广州化工*, 2015, 43(23): 137-140.
[21] 李峰. 藤茶中抗氧化活性物质的提取及其二氢杨梅素生理活性分析[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
[22] 顾兵, 张政, 李玉萍, 等. 半数致死量及其计算方法概述[J]. *中国职业医学*, 2009, 36(6): 507-508; 511.
[23] 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较[J]. *激光生物学报*, 2007, 16(5): 559-562.
[24] Ding L Q, Jiang Z H, Liu Y, et al. Monoterpenoid inhibitors of NO production from *Paeonia suffruticosa*[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(8): 1598-1603.