

海南栽培肾茶的化学成分研究

张荣荣^{1,2}, 梅文莉², 黄圣卓², 李薇², 周丽曼², 赵友兴², 于旭东^{1*},
戴好富^{2*}

(1. 海南大学农学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口 571101)

摘要: 为了解肾茶(*Clerodendranthus spicatus*)的化学成分, 从海南栽培肾茶地上部分分离得到 11 个化合物, 经波谱分析分别鉴定为: 吐叶醇 (1)、丁香脂素 (2)、3,4-二羟基苯乙醇 (3)、甜橙素 (4)、5,6,7,4'-四甲氧基黄酮 (5)、5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (6)、6-羟基-5,7,4'-三甲氧基黄酮 (7)、5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄烷酮 (8)、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基-二氢黄酮 (9)、松脂素 (10)和熊果酸 (11)。化合物 3、9 和 10 为首次从肾茶中分离得到。对化合物 1~6 进行活性测试, 结果表明化合物 3~5 对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制活性。

关键词: 肾茶; 唇形科; 化学成分; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

doi: 10.11926/jtsb.3676

Chemical Constituents from the Cultivated *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu in Hainan

ZHANG Rong-rong^{1,2}, MEI Wen-li², HUANG Sheng-zhuo², LI Wei², ZHOU Li-man²,
ZHAO You-xing², YU Xu-dong^{1*}, DAI Hao-fu^{2*}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: In order to understand the chemical constituents of *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu, eleven compounds were isolated from its aerial part cultivated in Hainan. On the basis of spectral data, their structures were identified as: vomifoliol (1), (-)-syringaresinol (2), 3,4-dihydroxyphenylethyl alcohol (3), sinesetin (4), 5,6,7,4'-tetramethoxyflavone (5), 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone (6), 6-hydroxy-5,7,4'-trimethoxyflavone (7), 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavanone (8), 3,3',5-trihydroxy-4',7-dimethoxyflavanone (9), pinioresinol (10) and ursolic acid (11). Compounds 3, 9 and 10 were obtained from this species for the first time. The compounds 3-5 exhibited inhibitory activity against acetylcholinesterase.

Key words: *Clerodendranthus spicatus*; Lamiaceae; Chemical constituent; Acetylcholinesterase inhibitory activity

肾茶[*Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu]为唇形科(Lamiaceae)肾茶属多年生草本植物, 因其雄蕊长得酷似猫的胡须, 又名“猫须草”、“猫须公”, 傣名“雅糯妙”。该属全世界约有 5 种, 主要分

收稿日期: 2016-09-06

接受日期: 2016-10-17

基金项目: 中国热带农业科学院热带生物技术研究所基本科研业务费专项(ITBB2015ZD02, ITBB2015RC03); 海南省星火产业带专项(HNXH201319); 海南省产学研一体化专项(CXY20140027); 海南省中西部高校提升综合实力工作资金项目(201417); 海南大学应用科技学院基金项目(HYK1524); 海南省自然科学基金项目(314057); 公益性行业(农业)科研专项(201303117)资助

This work was supported by the Special Projects of Fundamental Research Funds for Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (Grant No. ITBB2015ZD02, ITBB2015RC03), the Special Projects for Spark Industrial Belt of Hainan Province (Grant No. HNXH201319), the Special Projects for Production-teaching-research Combination of Hainan Province (Grant No. CXY20140027), the Fund Projects for Improving Comprehensive Strength in Colleges and Universities of the Midwest of Hainan Province (Grant No. 201417), and the Fund Projects of the College of Applied Science and Technology, Hainan University (Grant No. HYK1524), the Natural Science Foundation of Hainan (Grant No. 314057), and the Public Welfare Industry (Agriculture) Special Research Project (Grant No. 201303117).

作者简介: 张荣荣(1991~), 女, 硕士研究生, 从事天然产物化学研究。E-mail: 1021122938@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: daihaofu@itbb.org.cn, doeast@163.com

布于印度尼西亚、马来西亚、缅甸和菲律宾等热带地区^[1]。目前,我国肾茶的种类尚不确定,《中国植物志》记载,中国仅有1种;《海南植物志》记载,中国约有2种,海南有1种^[2]。肾茶全草均可入药,具有清热去湿、排石利尿的疗效^[3-5],且对肾结石、胆结石、胆囊炎、尿路结石具有神奇疗效,被誉为“国际利尿化石药”^[6]。肾茶除应用于泌尿系统外,还具有抗炎^[7]、抗肿瘤^[8]、降血糖血脂^[9]、保肝^[10]、提高机体免疫力^[11]等药理活性。目前,已从肾茶中分离得到的化学成分主要有黄酮类、酚酸类、木脂素类、二萜类、三萜类、色原烯类、糖苷类、甾体类和香豆素类等200多个单体化合物^[12]。由于肾茶的药用价值较高,市场需求量越来越大,并且随着环境气候的变化及野生肾茶资源的破坏,海南野生肾茶已处于濒危状态,无法满足市场需求^[13]。根据报道,肾茶在我国广东、广西、海南、云南、福建、四川等地均有引种栽培^[14]。因此,为了更深入地挖掘海南栽培肾茶中具有药用价值的化学成分,本研究对海南栽培肾茶地上部分乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分进行化学成分分离,并对其单体化合物进行结构鉴定及生物活性测试,为海南栽培肾茶的药理研究和开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

超净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);SHZ-D(Ⅲ)循环真空泵(上海隆拓仪器设备有限公司);BP221S 万分之一电子秤(北京赛多利斯天平有限公司);Bruker AV-500 型青岛海洋超导核磁共振波谱仪(内标为TMS);Autospec300 质谱仪;BSA-100A 自动收集器(上海青浦沪西仪器厂);N-1000 (2L)立式旋转蒸发仪和CA-1111 冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司);凝胶 Sephadex LH-20 (GE 公司);ODS (20~45 μm)(Fuji 公司);柱层析用硅胶(200~300 目,60~80 目)和薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂);MCI GEL CHP20P (75~150 μm)(三菱化学公司);ELX-800 酶标仪(美国宝特公司);乙酰胆碱酯酶(上海京都生物技术有限公司)、碘化硫代乙酰胆碱、二硫代二硝基苯甲酸(DNTB)和他克林均购自 Sigma 公司;有机试剂为95%乙醇、重蒸甲醇、乙酸乙酯、氯仿、石油醚、丙酮等。

1.2 材料

人工栽培肾茶地上部分于2015年11月采自海南省儋州市海南大学农科基地,叶片菱状卵形,花白色,经海南大学农学院于旭东副教授鉴定为唇形科肾茶属肾茶[*Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu],标本存放于海南大学农学院热带珍稀植物资源开发与利用实验室。

1.3 提取和分离

干燥肾茶地上部分(9.7 kg)粉碎,用95%的乙醇加热回流提取3次,每次25 L,减压回收乙醇至无醇味,得到乙醇提取物。将乙醇提取物用水分散成悬浊液,先后用石油醚和乙酸乙酯各萃取3次,分别浓缩得石油醚萃取物(88.8 g)和乙酸乙酯萃取物(233.0 g)。

乙酸乙酯萃取物(233.0 g)经硅胶(硅胶 H)减压柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯[8:1~1:3, V/V, 下同]梯度洗脱,得到20个流分(Fr.1~Fr.20)。Fr.9 (4.9 g)过MCI柱,得到纯甲醇洗脱物2.0 g。经ODS柱色谱,以甲醇:水(2:3~1:0)梯度洗脱,得到8个流分(Fr.9-1~Fr.9-8)。Fr.9-1 (197.9 mg)经Sephadex LH-20柱色谱(石油醚:氯仿:甲醇=2:1:1)得到3个亚流分,Fr.9-1-1 (100.0 mg)经Sephadex LH-20柱色谱(依次以纯甲醇和纯丙酮作为流动相)和硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=4:1)得到化合物4 (7.5 mg)、5 (6.5 mg)和6 (1.8 mg); Fr.9-3 (53.4 mg)经硅胶柱色谱(石油醚:丙酮=12:1),得到化合物8 (1.0 mg); Fr.9-4 (30.0 mg)经硅胶柱色谱(石油醚:丙酮=4:1)和Sephadex LH-20柱色谱(石油醚:氯仿:甲醇=2:1:1),得到化合物10 (1.3 mg); Fr.9-6 (237.0 mg)经Sephadex LH-20柱色谱(石油醚:氯仿:甲醇=2:1:1),得到6个亚流分,Fr.9-6-1 (27.9 mg)经硅胶柱色谱(氯仿:甲醇=120:1)和Sephadex LH-20柱色谱(纯丙酮),得到化合物1 (10.2 mg); Fr.9-6-3 (132.4 mg)经Sephadex LH-20柱色谱(依次以氯仿:甲醇=1:1,纯甲醇和纯丙酮为流动相),得到化合物3 (1.5 mg)。

Fr.8 (12.6 g)过MCI柱,得到纯甲醇洗脱物3.3 g。经ODS柱色谱,以甲醇:水(2:3~1:0)梯度洗脱,得到9个流分(Fr.8-1~Fr.8-9)。Fr.8-8 (1.5 g)经Sephadex LH-20柱色谱(依次以氯仿:甲醇=1:1和石油醚:氯仿:甲醇=2:1:1为流动相)和硅胶柱色谱(氯仿:甲醇=270:1),得到化合物11 (1.5 mg); Fr.8-3 (67.8 mg)经Sephadex LH-20柱色谱(石油醚:

氯仿：甲醇=2：1：1)和硅胶柱色谱(石油醚：乙酸乙酯=8：1),得到化合物 **9** (1.0 mg)。

Fr.15 (9.8 g)过 MCI 柱, 得到纯甲醇洗脱物 6.0 g。经 ODS 柱色谱, 以甲醇：水(2：3~1：0)梯度洗脱, 得到 7 个流分(Fr.15-1~Fr.15-7)。Fr.15-1 (397.0 mg)经 Sephadex LH-20 柱色谱(石油醚：氯仿：甲醇=2：1：1)和硅胶柱色谱(氯仿：甲醇=200：1), 得到化合物 **2** (1.2 mg); Fr.15-3 (145.7 mg)经硅胶柱色谱(氯仿：甲醇=450：1), 得到化合物 **7** (2.5 mg)。

1.4 结构鉴定

化合物 1 无色针晶(CHCl_3); ESI-MS m/z : 247 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 5.89 (1H, brs, H-4), 5.84 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-8), 5.77 (1H, m, H-7), 4.39 (1H, m, H-9), 2.43 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-2a), 2.22 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-2b), 1.88 (3H, brs, H-11), 1.28 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 1.07 (3H, s, H-12), 1.00 (3H, s, H-13); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 41.2 (C-1), 49.7 (C-2), 198.3 (C-3), 126.9 (C-4), 163.3 (C-5), 79.1 (C-6), 129.0 (C-7), 135.7 (C-8), 68.1 (C-9), 23.7 (C-10), 19.0 (C-11), 22.9 (C-12), 24.0 (C-13)。以上波谱数据与文献[16]基本一致, 故鉴定为吐叶醇(Vomifoliol)。

化合物 2 白色粉末(CHCl_3); ESI-MS m/z : 441 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 6.58 (4H, s, H-2, H-6, H-2', H-6'), 4.73 (2H, d, $J = 4.2$ Hz, H-7, H-7'), 4.28 (2H, dd, $J = 6.8$, 9.1 Hz, H-9b, H-9'b), 3.92 (2H, m, H-9a, H-9'a), 3.90 (12H, s, H-3, H-5, H-3', H-5'), 3.10 (2H, m, H-8, H-8'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 132.2 (C-1, C-1'), 102.8 (C-2, C-6, C-2', C-6'), 147.3 (C-3, C-5, C-3', C-5'), 134.4 (C-4, C-4'), 86.2 (C-7, C-7'), 54.5 (C-8, C-8'), 72.0 (C-9, C-9'), 56.6 (3-OCH₃, 5-OCH₃, 3'-OCH₃, 5'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[17]一致, 故鉴定为丁香脂素[(-)-Syringaresinol]。

化合物 3 淡黄色油状(CH_3OH); ESI-MS m/z : 177 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ 6.60 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.58 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.42 (1H, dd, $J = 2.0$, 8.0 Hz, H-6), 3.50 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 2.53 (2H, m, H-7); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ 130.1 (C-1), 115.3 (C-2), 144.6 (C-3), 143.1 (C-4), 116.2 (C-5), 119.5 (C-6), 38.5 (C-7), 62.8 (C-8)。以上波谱数据与文献

[18]一致, 故鉴定为 3,4-二羟基苯乙醇(3,4-Dihydroxyphenylethyl alcohol)。

化合物 4 黄色粉末(CHCl_3); ESI-MS m/z : 379 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ 7.49 (1H, dd, $J = 2.0$, 8.5 Hz, H-6'), 7.30 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, s, H-8), 6.58 (1H, s, H-3), 3.98 (3H, s, 5-OCH₃), 3.97 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.96 (3H, s, 7-OCH₃), 3.94 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.90 (3H, s, 6-OCH₃); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ 161.2 (C-2), 107.4 (C-3), 177.3 (C-4), 154.5 (C-5), 140.0 (C-6), 157.7 (C-7), 96.4 (C-8), 152.7 (C-9), 112.9 (C-10), 124.2 (C-1'), 108.7 (C-2'), 149.3 (C-3'), 151.9 (C-4'), 111.2 (C-5'), 62.3 (C-5), 61.6 (6-OCH₃), 56.2 (7-OCH₃), 56.1 (3'-OCH₃), 56.4 (4'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[19]基本一致, 故鉴定为 5,6,7,3',4'-五甲氧基黄酮, 即甜橙素(Sinsetin)。

化合物 5 白色针状晶体(CHCl_3); ESI-MS m/z : 365 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.82 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6'), 7.00 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 6.79 (1H, s, H-8), 6.59 (1H, s, H-3), 3.98 (3H, s, 5-OCH₃), 3.97 (3H, s, 7-OCH₃), 3.91 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.88 (3H, s, 6-OCH₃); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 162.3 (C-2), 107.2 (C-3), 177.4 (C-4), 154.6 (C-5), 140.5 (C-6), 157.8 (C-7), 96.4 (C-8), 152.7 (C-9), 113.0 (C-10), 124.0 (C-1'), 127.8 (C-2', C-6'), 114.5 (C-3', C-5'), 161.3 (C-4'), 62.3 (5-OCH₃), 61.7 (6-OCH₃), 56.4 (7-OCH₃), 55.6 (4'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[19]基本一致, 故鉴定为 5,6,7,4'-四甲氧基黄酮(5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone)。

化合物 6 黄色粉末(CHCl_3); ESI-MS m/z : 381 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.53 (1H, dd, $J = 8.5$, 2.1 Hz, H-6'), 7.34 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.98 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.60 (1H, s, H-8), 6.56 (1H, s, H-3), 3.99 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.98 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.97 (3H, s, 7-OCH₃), 3.93 (3H, s, 6-OCH₃); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 164.1 (C-2), 104.6 (C-3), 182.8 (C-4), 152.5 (C-5), 132.8 (C-6), 158.9 (C-7), 90.8 (C-8), 153.4 (C-9), 106.3 (C-10), 124.0 (C-1'), 109.0 (C-2'), 149.5 (C-3'), 153.2 (C-4'), 111.3 (C-5'), 120.2 (C-6'), 56.2 (6-OCH₃), 56.3 (7-OCH₃), 56.5 (3'-OCH₃), 61.0 (4'-

OCH₃)。以上波谱数据与文献[20]一致, 故鉴定为 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮(5-Hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone)。

化合物 7 黄色粉末(DMSO); ESI-MS m/z : 351 [M + Na]⁺; 分子式 C₁₈H₁₆O₆; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 9.00 (1H, s, 6-OH), 8.00 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2', H-6'), 7.15 (1H, s, H-8), 7.10 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3', H-5'), 6.68 (1H, s, H-3), 3.92 (3H, s, 5-OCH₃), 3.85 (3H, s, 7-OCH₃), 3.74 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 160.1 (C-2), 105.9 (C-3), 175.8 (C-4), 144.3 (C-5), 137.5 (C-6), 153.3 (C-7), 96.7 (C-8), 150.8 (C-9), 112.0 (C-10), 123.3 (C-1'), 127.7 (C-2'), 114.5 (C-3'), 161.8 (C-4'), 114.5 (C-5'), 127.7 (C-6'), 61.2 (5-OCH₃), 56.3 (7-OCH₃), 55.5 (4'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[19]基本一致, 故鉴定为 6-羟基-5,7,4'-三甲氧基黄酮(6-Hydroxy-5,7,4'-trimethoxyflavone)。

化合物 8 黄色粉末(CHCl₃); ESI-MS m/z : 383 [M + Na]⁺; 分子式 C₁₉H₂₀O₇; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 11.87 (1H, s, 5-OH), 6.99 (2H, dd, J = 2.4, 4.2 Hz, H-2', H-6'), 6.91 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5'), 6.12 (1H, s, H-8), 5.36 (1H, dd, J = 2.9, 13.3 Hz, H-2), 3.93 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.91 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.88 (3H, s, 7-OCH₃), 3.84 (3H, s, 6-OCH₃), 3.12 (1H, dd, J = 13.3, 17.2 Hz, H-3a), 2.80 (1H, dd, J = 2.9, 17.2 Hz, H-3b); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 79.7 (C-2), 43.5 (C-3), 196.7 (C-4), 158.8 (C-5), 130.8 (C-6), 161.1 (C-7), 91.6 (C-8), 155.2 (C-9), 103.3 (C-10), 132.5 (C-1'), 109.5 (C-2'), 150.0 (C-3'), 148.7 (C-4'), 111.3 (C-5'), 119.0 (C-6'), 61.1 (6-OCH₃), 56.4 (7-OCH₃), 56.2 (3'-OCH₃), 56.1 (4'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[21]一致, 故鉴定为 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄烷酮(5-Hydroxy-6,7,3',4'-trimethoxyflavanone)。

化合物 9 白色针状晶体(CHCl₃); ESI-MS m/z : 355 [M + Na]⁺; 分子式 C₁₇H₁₆O₇; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 11.82 (1H, s, 5-OH), 8.93 (1H, s, 3'-OH), 6.91~6.86 (3H, m, H-2', H-5', H-6'), 6.09 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.06 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.77 (1H, d, J = 2.0 Hz, 3-OH), 5.06 (1H, dd, J = 11.2 Hz, H-2), 4.54 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-3), 3.79 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.78 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 82.9 (C-2), 71.5 (C-3), 198.1 (C-4), 162.8 (C-5), 94.8 (C-6), 167.5 (C-7), 93.9 (C-8), 162.3

(C-9), 101.6 (C-10), 129.5 (C-1'), 111.8 (C-2'), 146.4 (C-3'), 147.9 (C-4'), 115.1 (C-5'), 119.3 (C-6'), 55.8 (7-OCH₃), 55.6 (4'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[22-23]一致, 故鉴定为 3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基-二氢黄酮(3,3',5-Trihydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone)。

化合物 10 无色油状(CH₃OH); ESI-MS m/z : 381 [M + Na]⁺; 分子式 C₂₀H₂₂O₆; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 6.94 (2H, d, J = 1.8 Hz, H-2, H-2'), 6.81 (2H, dd, J = 1.8, 8.1 Hz, H-6, H-6'), 6.76 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-5, H-5'), 4.70 (2H, d, J = 4.0 Hz, H-7, H-7'), 4.23 (2H, dd, J = 6.9, 9.0 Hz, H-9a, H-9'a), 3.85 (6H, s, 3-OCH₃, 3'-OCH₃), 3.83 (2H, dd, J = 2.5, 8.0 Hz, H-9b, H-9'b), 3.14 (2H, m, H-8, H-8'); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 133.8 (C-1, C-1'), 111.0 (C-2, C-2'), 149.1 (C-3, C-3'), 147.8 (C-4, C-4'), 116.1 (C-5, C-5'), 120.1 (C-6, C-6'), 87.6 (C-7, C-7'), 55.4 (C-8, C-8'), 72.6 (C-9, C-9'), 56.4 (3-OCH₃, 3'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[24]基本一致, 故鉴定为松脂素(Pinoresinol)。

化合物 11 白色粉末(CH₃OH); ESI-MS m/z : 479 [M + Na]⁺; 分子式 C₃₀H₄₈O₃; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 5.23 (1H, t, J = 3.6 Hz, H-12), 3.15 (1H, m, H-3), 1.12 (3H, s, 27-CH₃), 0.98 (3H, s, 23-CH₃), 0.97 (3H, overlap, 30-CH₃), 0.96 (3H, s, 25-CH₃), 0.88 (3H, d, J = 6.5 Hz, 26-CH₃), 0.85 (3H, s, 29-CH₃), 0.78 (3H, s, 24-CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 38.2 (C-1), 27.9 (C-2), 79.7 (C-3), 38.2 (C-4), 56.7 (C-5), 19.5 (C-6), 31.8 (C-7), 39.8 (C-8), 47.3 (C-9), 34.3 (C-10), 24.1 (C-11), 126.9 (C-12), 139.6 (C-13), 43.3 (C-14), 28.8 (C-15), 24.4 (C-16), 47.7 (C-17), 54.4 (C-18), 40.4 (C-19), 39.8 (C-20), 29.2 (C-21), 38.1 (C-22), 28.7 (C-23), 16.4 (C-24), 16.0 (C-25), 17.6 (C-26), 24.1 (C-27), 181.7 (C-28), 17.8 (C-29), 21.6 (C-30)。以上波谱数据与文献[25]基本一致, 故鉴定为熊果酸(Ursolic acid)。

1.5 活性测试

采用 Ellman 法^[15]测定化合物 1~6 的乙酰胆碱酯酶抑制活性。化合物 1~6 均用 DMSO 进行溶解。取磷酸缓冲液 110 μL (pH 8.0)、50 μg mL⁻¹ 的待测样品 10 μL 和 0.02 μg mL⁻¹ 的乙酰胆碱酯酶 40 μL 于 96 孔板中, 30℃温育 20 min 后, 依次加入 2.48 mg mL⁻¹ 的 DTNB 溶液和 1.81 mg mL⁻¹ 的碘化硫代乙酰胆碱

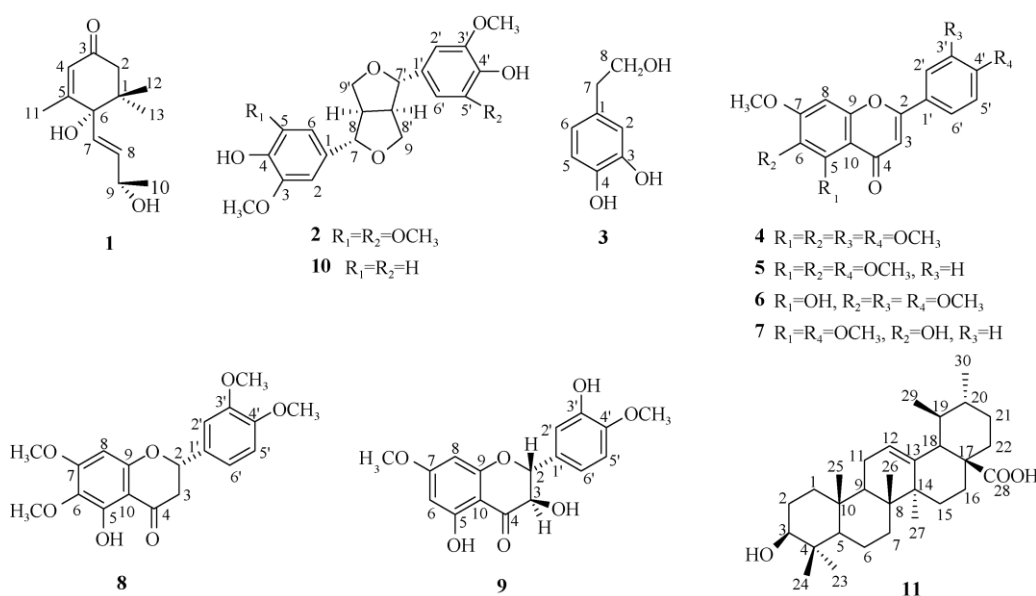


图 1 化合物 1~11 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1–11

溶液各 10 μL , 充分混匀, 反应体系总体积 200 μL 。30 min 后, 在波长 405 nm 处用酶标仪进行检测。阳性对照为他克林, 反应终浓度为 0.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 阴性对照为 DMSO, 终浓度为 0.1%, 试验重复 3 次。化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制率 = $(E-S)/E \times 100\%$, 式中, E 为阴性对照平均吸光值, S 为待测样品的平均吸光值。结果表明, 化合物 3~5 对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制作用(表 1)。

表 1 化合物 1~6 (0.05 mg mL^{-1}) 的乙酰胆碱酯酶抑制活性

Table 1 Anti-acetylcholinesterase activities of compounds 1–6 (0.05 mg mL^{-1})			
化合物 Compound	抑制率 Inhibition rate (%)	化合物 Compound	抑制率 Inhibition rate (%)
1	<10	4	30.7 $\pm$ 0.6
2	<10	5	31.4 $\pm$ 0.4
3	19.4 $\pm$ 0.6	6	<10

他克林为阳性对照(0.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$)。

Tacrine was used as positive control (0.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$)。

3 结果和讨论

本研究利用多种色谱方法, 从海南栽培肾茶乙醇提取物的乙酸乙酯部分分离得到 11 个化合物, 包括 6 个黄酮类: 甜橙素 (4)、5,6,7,4'-四甲氧基黄酮 (5)、5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (6)、6-羟基-5,7,4'-三甲氧基黄酮 (7)、5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (8) 和 3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基-二氢黄酮

(9), 2 个木脂素类: 丁香脂素 (2) 和松脂素 (10), 1 个倍半萜类: 吐叶醇 (1), 1 个酚类: 3,4-二羟基苯乙醇 (3) 和 1 个三萜类: 熊果酸 (11)。其中, 化合物 3、9 和 10 为首次从肾茶中分离得到。此外, 化合物 3~5 对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制活性。

肾茶具有广泛的药理活性和生物活性, 但药理活性研究大多局限于其粗提物, 而具体活性成分及其作用机制尚不明确。本研究分离纯化鉴定了 11 个化合物, 其中一些化学成分具有多种药理活性, 黄酮类化合物是肾茶的主要活性成分之一, 具有抗癌、抗炎、抗氧化、降血糖及抗血小板凝集^[26]等作用。化合物 4 可以通过调节蛋白 I κ B- α , 影响 NF- κ B 的活性, 从而具有抗炎的功效^[27]; 曹欢欢等^[28]的研究表明, 化合物 6 能够显著促进大鼠结肠粘膜 Cl^- 电流及小鼠气管粘膜下腺液体的分泌, 为开发治疗习惯性便秘等新药提供科学依据。高南南等^[9]采用小鼠耳肿胀法进行研究, 肾茶具有较好的抗炎活性, 化合物 11 起到重要作用。此外, 化合物 11 还具有抗肿瘤^[29]和保肝^[30]等活性。Nakasone 等^[31]曾报道, 化合物 2 在硫氰酸铁和 TBA 中有较好的抗氧化活性; Maturura^[32]在 PAF 模型的研究中, 认为化合物 2 还具有抗血小板凝集的效果。从橄榄油中提取分离得到的化合物 3 具有抗炎、抗血小板聚集、抗肿瘤及抑制细胞增殖等多种生物活性^[33]。金虹^[34]采用 CPE 法, 对从爵床(*Justicia procumbens*)

中分离得到的化合物 **10** 进行体外抗 H5N1 病毒活性初步筛选和评价, 结果表明其具有一定的抗 H5N1 病毒活性。本研究结果丰富了肾茶的化学成分及其药理活性, 为肾茶的进一步研发与利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] Deletis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edite. Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 66 [M]. Beijing: Science Press, 1999: 574–577.
中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第 66 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 574–577.
- [2] Guangdong Institute of Botany. Flora of Hainan, Vol. 4 [M]. Beijing: Science Press, 1977: 56–57.
广东省植物研究所. 海南植物志, 第 4 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 56–57.
- [3] CHEN J B, BAI X H, JIANG G Z. Preliminary study on development and utilization of *Clerodendranthus spicatus* [J]. J Yunnan Trop Crops Sci Techn, 1998, 21(3): 6–8.
陈建白, 白旭华, 蒋桂芝. 肾茶开发利用的初步研究 [J]. 云南热作科技, 1998, 21(3): 6–8.
- [4] ZHANG P, LI B R. Preliminary studies on the transplanting density, cover degree and topdressing of *Clerodendranthus spicatus* [J]. Chin J Trop Crops, 1997(3): 39–41.
张平, 李伯儒. 肾茶移栽密度、荫蔽度和追肥量的研究初报 [J]. 热带作物研究, 1997(3): 39–41.
- [5] XU N, XU X D, YANG J S, et al. Advances in studies on *Clerodendranthus spicatus* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2010, 41(5): 848–852. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2010.5.050.
许娜, 许旭东, 杨峻山, 等. 猫须草的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 848–852. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2010.5.050.
- [6] LI J Y, KANG L Q. Research progress in exploitation and utilization of *Clerodendranthus spicatus* [J]. Acta Agri Jiangxi, 2010, 22(3): 99–104. doi: 10.3969/j.issn.1001-8581.2010.03.033.
李金雨, 康龙泉. 猫须草的研究和开发利用进展 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(3): 99–104. doi: 10.3969/j.issn.1001-8581.2010.03.033.
- [7] GAO N N, TIAN Z, LI L L, et al. Studies on pharmacological effects of *Clerodendranthus spicatus* [J]. Chin Herb Med, 1996, 27(10): 615.
高南南, 田泽, 李玲玲, 等. 肾茶药理作用的研究 [J]. 中草药, 1996, 27(10): 615.
- [8] CHEN Y L, TAN C H, TAN J J, et al. Progress of chemical and pharmacological studies on *Clerodendranthus spicatus* [J]. Nat Prod Res Dev, 2009, 21(5): 885–891. doi: 10.3969/j.issn.1001-6880.2009.05.038.
- 陈伊蕾, 谭昌恒, 谭俊杰, 等. 肾茶的化学和药理研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 885–891. doi: 10.3969/j.issn.1001-6880.2009.05.038.
- [9] MOHAMED E A H, MOHAMED A J, ASMAWI M, et al. Anti-hyperglycemic effect of *Orthosiphon stamineus* benth leaves extract and its bioassay-guided fractions [J]. Molecules, 2011, 16(5): 3787–3801. doi: 10.3390/molecules16053787.
- [10] ALSHAWSH M A, ABDULLA M A, ISMAIL S, et al. Hepatoprotective effects of *Orthosiphon stamineus* extract on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, 2011: 103039. doi: 10.1155/2011/103039.
- [11] CEN X B, WANG R S. The effect of *Clerodendranthus spicatus* on immunefunction in mice [J]. Mod Prev Med, 1997, 24(1): 73–74.
岑小波, 王瑞淑. 肾茶对小鼠免疫功能的影响 [J]. 现代预防医学, 1997, 24(1): 73–74.
- [12] LIU D P, HUANG R G. Research progress of *Clerodendranthus spicatus* [J]. Strait Pharm J, 2013, 25(11): 56–60.
柳丹萍, 黄荣桂. 肾茶研究新进展 [J]. 海峡药学, 2013, 25(11): 56–60.
- [13] LUO C, YU X D, WU F H, et al. Genetic diversity in *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) based on ISSR markers [J]. J Trop Biol, 2015, 6(2): 204–222. doi: 10.3969/j.issn.1674-7054.2015.02.016.
罗灿, 于旭东, 吴繁花, 等. 肾茶种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 热带生物学报, 2015, 6(2): 204–222. doi: 10.3969/j.issn.1674-7054.2015.02.016.
- [14] LUO G X, LOU S C. Precious medicinal plants: *Clerodendranthus spicatus* [J]. Guangxi Trop Agri, 2004(6): 31–32. doi: 10.3969/j.issn.2095-0764.2004.06.018.
罗关兴, 娄尚椿. 珍贵药用保健植物——肾茶 [J]. 广西热带农业, 2004(6): 31–32. doi: 10.3969/j.issn.2095-0764.2004.06.018.
- [15] ELLMAN G L, COURTNEY K D, VALENTINO Jr A, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharm, 1961, 7(2): 88–95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- [16] XU Y W, ZHOU H L, REN D M, et al. Chemical constituents from the aerial parts of *Litsea glutinosa* (Lour.) C. B. Rob. [J]. J Shandong Univ (Health Sci), 2016, 54(3): 45–49. doi: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2015.887.
徐有伟, 周洪雷, 任冬梅, 等. 潺槁木姜子地上部位化学成分 [J]. 山东大学学报(医学版), 2016, 54(3): 45–49. doi: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2015.887.
- [17] LEONG Y W, HARRISON L J, POWELL A D. Phenanthrene and other aromatic constituents of *Bulbophyllum vaginatum* [J]. Phytochemistry, 1999, 50(7): 1237–1241. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00687-6.
- [18] LI C Y, GAO H, JIAO W H, et al. Isolation and identification of quinones constituents from root cortex of *Morinda officinalis* How [J].

- J Shenyang Pharm Univ, 2011, 28(1): 30–36,60.
- 李晨阳, 高昊, 焦伟华, 等. 巴戟天根皮中的醌类成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(1): 30–36,60.
- [19] SUMMARYONO W, PROKSCH P, WRAY V, et al. Qualitative and quantitative analysis of the phenolic constituents from *Orthosiphon aristatus* [J]. Planta Med, 1991, 57(2): 176–180. doi: 10.1055/s-2006-960060.
- [20] SONG F J, GAO J, YANG G Z, et al. Studies on the chemical constituents of *Rabdosia rubescens* Hemsl. in the western part of Hubei Province [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2011, 22(5): 1069–1070. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.05.013.
- 宋发军, 高洁, 杨光忠, 等. 鄂西冬凌草化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1069–1070. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.05.013.
- [21] TAN J J, TAN C H, CHEN Y L, et al. Study on chemical constituents of *Clerodendranthus spicatus* [J]. Nat Prod Res Dev, 2009, 21(4): 608–611,592. doi: 10.3969/j.issn.1001-6880.2009.04.016.
- 谭俊杰, 谭昌恒, 陈伊蕾, 等. 肾茶化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(4): 608–611,592. doi: 10.3969/j.issn.1001-6880.2009.04.016.
- [22] ZHAO J H, KANG H, YAO G H, et al. Study on chemical constituents of *Blumea balsamifera* DC. [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2007, 38(3): 350–352. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2007.03.012.
- 赵金华, 康晖, 姚光辉, 等. 艾纳香化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 350–352. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2007.03.012.
- [23] RUANGRUNGSI N, TAPPAYUTHPIJARN P, TANTIVATANA P, et al. Traditional medicinal plants of Thailand: I. Isolation and structure elucidation of two new flavonoids, (2R,3R)-dihydroquercetin-4'-methyl ether and (2R,3R)-dihydroquercetin-4',7'-dimethyl ether from *Blurnea balsamifera* [J]. J Nat Prod, 1981, 44(5): 541–545. doi: 10.1021/np50017a005.
- [24] YIN L, ZHANG Y, TIAN H Y, et al. Chemical constituents from *Adonis amurensis* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2014, 45(23): 3361–3366. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.001.
- 尹蕾, 张冤, 田海妍, 等. 福寿草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3361–3366. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.001.
- [25] WANG J Z, WANG F P. Study on chemical constituents of *Rabdosia coetsa* [J]. Nat Prod Res Dev, 1998, 10(3): 15–19.
- 王建忠, 王锋鹏. 细锥香茶菜的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1998, 10(3): 15–19.
- [26] YU X D. The cultivation methods and comparison of active medicinal ingredients about *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu in Hainan [D]. Haikou: South China University of Tropical Agriculture, 2006: 13–14.
- 于旭东. 海南产猫须草的栽培方式与其药用活性成分比较分析 [D]. 海口: 华南热带农业大学, 2006: 13–14.
- [27] SHIN H S, KANG S I, YOON S A, et al. Sinensetin attenuates LPS-induced inflammation by regulating the protein level of IkB- α [J]. Biosci Biotechn Biochem, 2012, 76(4): 847–849. doi: 10.1271/bbb.110908.
- [28] CAO H H, FANG H, YU B, et al. Polymethoxylated flavonoids activate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel [J]. Acta Physiol Sin, 2015, 67(2): 225–234. doi: 10.13294/j.aps.2015.0027.
- 曹欢欢, 房芳, 于波, 等. 甲氧基黄酮类化合物对囊性纤维化跨膜电导调节因子的激活作用 [J]. 生理学报, 2015, 67(2): 225–234. doi: 10.13294/j.aps.2015.0027.
- [29] SHYU M H, KAO T C, YEN G C. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(10): 6110–6118. doi: 10.1021/jf100574j.
- [30] CHEN W, LI K Q, XIONG X J. The chemical, pharmacology and clinical research of ursolic acid [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2001, 32(S): 208–210.
- 陈武, 李开泉, 熊筱娟. 乌索酸的化学、药理及临床研究 [J]. 中草药, 2001, 32(S): 208–210.
- [31] NAKASONE Y, TAKARA K, WADA K, et al. Antioxidative compounds isolated from kokuto, non-centrifugal cane sugar [J]. Biosci Biotechn Biochem, 1996, 60(10): 1714–1716. doi: 10.1271/bbb.60.1714.
- [32] MATSURUR. Syringaresinol diglucoside as blood platelet aggregation inhibitor [J]. Kokai Koho J P, 1987, 86(8): 126.
- [33] HUR W, KIM S W, LEE Y K, et al. Oleuropein reduces free fatty acid-induced lipogenesis via lowered extracellular signal-regulated kinase activation in hepatocytes [J]. Nutri Res, 2012, 32(10): 778–786. doi: 10.1016/j.nutres.2012.06.017.
- [34] JIN H. Studies on the chemical constituents and bioactivities of *Justicia procumbens* L. [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2014: 115–118.
- 金虹. 爵床化学成分及其生物活性研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014: 115–118.