

• 化学成分 •

云南石仙桃的化学成分及其抑制 NO 生成的作用

郭晓宇¹, 王 珏², 王乃利^{1,3}, 北中进², 姚新生^{1,4*}

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 日本大学药学部 生药学研究室, 日本 千叶县 274-85553;

3. 清华大学深圳研究生院, 广东 深圳 518055; 4. 深圳中药及天然药物研究中心, 广东 深圳 518055)

摘要:目的 研究云南石仙桃全草的化学成分, 并通过测定所得化合物抑制大鼠巨噬细胞中 NO 的生成量, 以确定云南石仙桃中抑制 NO 生成的活性成分。方法 采用多种柱色谱法进行分离纯化, 并根据理化常数和光谱分析进行结构鉴定。利用微板紫外比色法, 体外测定各化合物对脂多糖(LPS)和 γ -干扰素(IFN- γ)诱导的 RAW 264.7 大鼠巨噬细胞 NO 的生成量。结果 分离得到了 7 个化合物, 分别为反式-3,3',5-三羟基-2'-甲氧基二苯乙烯(*trans*-3,3',5-trihydroxy-2'-methoxystilbene, I)、顺式-3,3',5-二羟基-5-甲氧基二苯乙烯(*cis*-3,3'-dihydroxy-5-methoxystilbene, II)、反式-3,3',5-三羟基二苯乙烯(*trans*-3,3',5-trihydroxystilbene, III)、3,3'-二羟基-5-甲氧基联苄(3,3'-dihydroxy-5-methoxybibenzyl, batatasin-III, IV)、3,4'-二羟基-3',5-二甲氧基联苄(3,4'-dihydroxy-3',5-dimethoxybibenzyl, gigantol, V)、3,3',5-三羟基联苄(3,3',5-trihydroxybibenzyl, VI)、2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲(贝母兰宁, 2,7-dihydroxy-4-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene, coelonin, VII)。结论 化合物 II、IV、VI 具有较强的抑制大鼠巨噬细胞 NO 生成的作用。化合物 I 和 II 为新化合物, 化合物 III~VII 为首次从该属植物中分离得到。

关键词:兰科; 云南石仙桃; 二苯乙烯; 联苄; NO

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0492-05

Constituents from *Pholidota yunnanensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production

GUO Xiao-yu¹, WANG Jue², WANG Nai-li^{1,3}, KITANAKA Susumu², YAO Xin-sheng^{1,4*}

(1. College of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. College of Pharmacy, Nihon University, Chiba 274-85553, Japan; 3. Graduate School at Shenzhen, Tsinghua

University, Shenzhen 518055, China; 4. Shenzhen Research Center of Traditional

Chinese Medicines and Natural Products, Shenzhen 518055, China)

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents of the whole plant of *Pholidota yunnanensis* and to examine the inhibitory effects of the isolated compounds on nitric oxide (NO) production in activated rat macrophage-like cell line (RAW 264.7). **Methods** Various chromatographic techniques were used to separate and purify the constituents, and their structures were elucidated on the basis of spectroscopic analysis. The inhibitory effects of these compounds on NO production in RAW 264.7 cells of rats activated by lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ) were tested *in vitro* by microplate ultraviolet-colorimetric method. **Results** Seven compounds were isolated and identified as *trans*-3,3',5-trihydroxy-2'-methoxystilbene (I), *cis*-3,3'-dihydroxy-5-methoxystilbene (II), *trans*-3,3',5-trihydroxystilbene (III), 3,3'-dihydroxy-5-methoxybibenzyl (batatasin-III, IV), 3,4'-dihydroxy-3',5-dimethoxybibenzyl (gigantol, V), 3,3',5-trihydroxybibenzyl (VI), 2,7-dihydroxy-4-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene (coelonin, VII). **Conclusion** Compounds II, IV, and VI show favorable inhibitory effects on NO production, compounds I and II are new compounds, and compounds III-VII are isolated from this genus for the first time.

Key words: Orchidaceae; *Pholidota yunnanensis* Rolfe; stilbene; bibenzyl; nitric oxide (NO)

收稿日期: 2005-07-08

作者简介: 郭晓宇(1978-), 女, 辽宁省大连人, 现为沈阳药科大学天然药物化学专业博士研究生, 主要从事天然产物的活性成分研究。
Tel: (0755)26036133 E-mail: helen_guoxy@163.com

* 通讯作者 姚新生 Tel: (0755)26036137 E-mail: yaosx@sz.tsinghua.edu.cn

云南石仙桃 *Pholidota yunnanensis* Rolfe 为兰科石仙桃属植物,分布于我国的四川、云南、广西等地。其全草或假鳞茎可以入药,具有清热利湿、散风止痛之功效,在民间用于治疗消化不良、痈疮肿毒及风湿疼痛等疾病^[1]。目前从云南石仙桃中分离得到的主要为三萜类成分^[2~4]。在初步的活性筛选过程中,云南石仙桃全草 60%乙醇提取物显示出较好的抑制脂多糖(LPS)和 γ -干扰素(IFN- γ)诱导的大鼠巨噬细胞(RAW 264.7)生成 NO 的活性,即在终质量浓度为 30 mg/mL 时抑制率为 92.1%,且无细胞毒作用。因此对其化学成分进行了研究,从云南石仙桃干燥全草 60%乙醇提取物中分离得到了 7 个化合物,根据理化常数和光谱分析鉴定其结构,分别为反式-3,3',5-三羟基-2'-甲氧基二苯乙烯(*trans*-3,3',5-trihydroxy-2'-methoxystilbene, I)、顺式-3,3'-二羟基-5-甲氧基二苯乙烯(*cis*-3,3'-dihydroxy-5-methoxystilbene, II)、反式-3,3',5-三羟基二苯乙烯(*trans*-3,3',5-trihydroxystilbene, III)、3,3'-二羟基-5-甲氧基联苳(batatasin-III, IV)、3,4'-二羟基-3',5-二甲氧基联苳(gigantol, V)、3,3',5-三羟基联苳(3,3',5-trihydroxybibenzyl, VI)、2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲(贝母兰宁, coelonin, VII)。化合物 I 和 II 为新化合物,化合物 III~VII 为首次从该属植物中分离得到。利用体外测定大鼠巨噬细胞 NO 生成量的活性筛选方法测定了 7 个化合物的活性,其中化合物 I、IV、VI 具有较强的抑制大鼠巨噬细胞生成 NO 的作用。

1 仪器与材料

紫外光谱用岛津 UV2401PC 型紫外可见分光光度计测定(甲醇);红外光谱用岛津 FT/IR-8400 型傅里叶变换红外光谱仪测定(KBr);ESI-MS 和 HR-ESI-MS 分别用 Micromass Q-TOF 型和 Bruker Esquire 2000 型质谱仪测定;核磁共振光谱用 Bruker Avance 400 型核磁共振波谱仪测定,TMS 为内标。薄层色谱用硅胶 G 和色谱用硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂生产,Sephadex™ LH-20 为瑞典 Amersham Biosciences AB 公司生产,ODS-A 120-S150 为日本 YMC CO., LTD. 公司生产;样品纯化使用岛津 LC-8A 型高效液相色谱仪,岛津 SPD-10A 型紫外可见光检测器和 ODS 制备柱(Shim-pack, 20 mm×250 mm, 5 μ m)。巨噬细胞 NO 生成量使用 MTP-120 酶标仪(Corona Electric CO., Ltd.)测定。药材 2003 年 4 月购于广西柳州市中草药市场,由中国药科大学徐璐珊教授鉴定,留

样于深圳中药及天然药物研究中心(编号:YGXYPY-2003)。

2 提取与分离

云南石仙桃干燥全草 2.3 kg, 60%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,减压回收乙醇得浸膏(270 g, 11.7%)。将浸膏用水(3.0 L)分散,依次用氯仿(3.0 L×3)、醋酸乙酯(3.0 L×3)和正丁醇(3.0 L×3)进行萃取。氯仿部分(45.0 g)经过硅胶柱色谱,环己烷-醋酸乙酯梯度洗脱,得到 13 个部分。Fr. 10 (10 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱,甲醇-水(60:40)为洗脱剂,然后经 ODS 中低压柱色谱,以甲醇-水(50:50, 70:70)洗脱,再经制备 HPLC[甲醇-水(47:53), 10 mL/min, 275 nm]纯化得到化合物 V (11.4 mg)。Fr. 11 (10.4 g)经硅胶中低压柱色谱,氯仿-甲醇(70:1, 60:1, 30:1)为洗脱剂,然后经 ODS 中低压柱色谱,甲醇-水(50:50, 70:30)为洗脱剂,再经 HPLC[甲醇-水(53:47), 10 mL/min, 220 nm]纯化得到化合物 III (50.6 mg)和 IV (14.4 mg)。醋酸乙酯部分(50.0 g),经过硅胶柱色谱,氯仿-甲醇梯度洗脱,得到 13 个部分。Fr. 4 (5.6 g)经 ODS 柱色谱,甲醇-水梯度洗脱,再经过制备 HPLC[甲醇-水(42:58), 10 mL/min, 278 nm]纯化得到化合物 VII (5.0 mg)。Fr. 7 (6.6 mg)经 Sephadex LH-20 柱色谱,甲醇-水梯度洗脱得到 8 个部分;Fr. 7-4 经 ODS 柱色谱,甲醇-水(40:60, 50:50)洗脱,再经制备 HPLC[甲醇-水(38:62), 10 mL/min, 220 nm]纯化得到化合物 VI (17.4 mg);Fr. 7-5 经 ODS 柱色谱,甲醇-水(40:60, 50:50)洗脱,再经制备 HPLC[甲醇-水(42:58), 10 mL/min, 220 nm]纯化得到化合物 I (6.8 mg);Fr. 7-6 经 ODS 柱色谱,甲醇-水(40:60, 60:40)洗脱,再经制备 HPLC[甲醇-水(38:62), 10 mL/min, 303 nm]纯化得到化合物 II (5.8 mg)。

3 结构鉴定

化合物 I:淡黄色半固体,,UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ):207(4.50),304(4.44),示有苯环存在。ESI-MS: m/z 281[M+Na]⁺,259[M+H]⁺,257[M-H]⁻,提示相对分子质量为 258。HR-ESI-MS: m/z 259.0965 [M+H]⁺,计算值为 259.0970 (C₁₅H₁₅O₄),说明该化合物分子式为 C₁₅H₁₅O₄。¹H-NMR(400 MHz, acetone-d₆)中,有 2 个反式烯烃氢信号 δ 7.31(1H, d, $J=16.5$ Hz)和 7.06(1H, d, $J=16.5$ Hz),提示结构中存在一个反式烯键;3 个芳香氢信号 δ 7.16(1H, dd, $J=7.7, 1.8$ Hz)、6.94(1H, t, $J=7.7$ Hz)和 6.82(1H, dd, $J=7.7$,

1.8 Hz)提示结构中存在一个 1,2,3-三取代的苯环;3 个芳香氢信号 δ 6.59(2H,d, $J=2.3$ Hz)和 6.31(1H,t, $J=2.3$ Hz)说明还存在一个 1,3,5-三取代的苯环;此外,有 1 个苯环上的甲氧基的氢信号 δ 3.80(3H,s)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,acetone- d_6)中共有 15 个碳信号,结合 DEPT 135 和 HMQC 谱确定有 2 个烯烃碳信号 δ 130.7 和 123.5,12 个芳香碳信号和 1 个甲氧基碳信号。以上信息说明化合物 I 具有典型的反式二苯乙烯的结构特征。HMBC 谱

中可以看到上述两个苯环分别连接在反式烯烃两端的相关信号,并可将全部的碳、氢信号进行归属(表 1)。NOESY 谱中甲基氢信号 δ 3.80 与氢信号 δ 7.31 具有相关,可以进一步证明甲氧基连接在 C-2'。通过分子式及结构信息判断结构中还存在 3 个羟基,分别连接在 C-3,C-5 和 C-2'。因此化合物 I 的结构鉴定为反式-3,3',5-三羟基-2'-甲氧基二苯乙烯,为一个新化合物。

化合物 I:白色固体,UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ):219

表 1 化合物 I 和 II 的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HMBC 数据(in acetone- d_6)^a

Table 1 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and HMBC Data of compounds I and II (in acetone- d_6)^a

位置	I			II		
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1		140.7			140.4	
2	6.59 (1H,d, $J=2.3$)	106.0	C-4,C-6,C- α' (3J);C-3(2J)	6.70 (1H,t, $J=2.2$)	107.0	C-4,C-6,C- α' (3J);C-3(2J)
3		159.7			159.5	
4	6.31 (1H,t, $J=2.3$)	103.2	C-2,C-6(3J);C-3,C-5(2J)	6.38 (1H,t, $J=2.2$)	101.8	C-2,C-6(3J);C-3,C-5(2J)
5		159.7			162.2	
6	6.59 (1H,d, $J=2.3$)	106.0	C-2,C-4,C- α' (3J);C-5(2J)	6.71 (1H,t, $J=2.2$)	104.3	C-2,C-4,C- α' (3J);C-5(2J)
1'		132.0			139.7	
2'		146.6		7.06 (1H,m)	113.9	C-4',C-6'(3J);C-3'(2J)
3'		151.3			158.6	
4'	6.82 (1H,dd, $J=7.7,1.8$)	116.4	C-2',C-6'(3J);C-3',C-5'(2J)	6.79 (1H,ddd, $J=8.0,2.4,0.9$)	115.6	C-2',C-6'(3J);C-3'(2J)
5'	6.94 (1H,t, $J=7.7$)	125.2	C-1',C-3'(3J);C-6'(2J)	7.21 (1H,t, $J=8.0$)	130.4	C-1',C-3'(3J)
6'	7.16 (1H,dd, $J=7.7,1.8$)	117.7	C-2',C-4',C- α' (3J);C-5'(2J)	7.08 (1H,dt, $J=8.0,9.0$)	118.9	C-2',C-4',C- α' (3J)
α	7.31 (1H,d, $J=16.5$)	123.5	C-1,C-2',C-6'(3J)	7.11 (1H,d, $J=6.0$)	129.6	C-1,C-2',C-6'(3J)
α'	7.06 (1H,d, $J=16.5$)	130.7	C-2,C-6,C-1'(3J)	7.11 (1H,d, $J=6.0$)	129.5	C-2,C-6,C-1'(3J)
2'-OCH ₃	3.80 (3H,s)	61.4	C-2'(3J)			
5-OCH ₃				3.81 (3H,s)	55.5	C-5(3J)

a- J (in parentheses) in Hz

(5.88),306(5.89),示有苯环存在。 $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3389示有羟基,1585,1497和1454为苯环的特征吸收,683示有顺式双键存在。ESI-MS: m/z 243 $[\text{M}+\text{H}]^+$,241 $[\text{M}-\text{H}]^-$,提示相对分子质量为 242。HR-ESI-MS: m/z 243.1038 $[\text{M}+\text{H}]^+$,计算值为 243.1021($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_3$),说明该化合物的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,acetone- d_6)中共有 7 个芳香氢信号,其中 4 个氢信号 δ 7.21(1H,t, $J=8.0$ Hz),7.08(1H,dd, $J=8.0,0.9$ Hz),7.06(1H,t, $J=2.4$ Hz)和 6.79(1H,ddd, $J=8.0,2.4,0.9$ Hz)偶合裂分的方式提示结构中存在一个 1,3-二取代的苯环,3 个氢信号 δ 6.71(1H,t, $J=2.2$ Hz)、6.70(1H,t, $J=2.2$ Hz)和 6.38(1H,t, $J=2.2$ Hz)提示结构中还存在一个 1,3,5-三取代的苯环。此外,有 2 个顺式烯烃氢信号 δ 7.11(2H,d, $J=6.0$ Hz)和一个苯环上的甲氧基的氢信号 δ 3.81(3H,s)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,acetone- d_6)中共有 15 个碳信号,结合 DEPT 和 HMQC 谱确定有 2 个烯烃碳

信号 δ 129.6 和 129.5,12 个芳香碳信号和 1 个甲氧基碳信号。以上信息说明化合物 II 具有顺式二苯乙烯的结构特征。通过 HMBC 谱中的相关信号可以确定两个苯环与烯烃的连接方式,并可将碳、氢信号进行归属(表 1)。因此化合物 II 的结构鉴定为顺式-3,3'-二羟基-5-甲氧基二苯乙烯,为一个新化合物。化合物 I 和 II 的结构式见图 1。

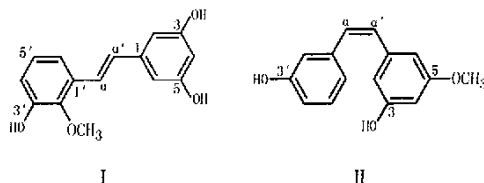


图 1 化合物 I 和 II 的结构

Fig. 1 Structures of compounds I and II

化合物 II:淡黄色半固体,UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ):217(4.56),305(4.54)。ESI-MS: m/z 229 $[\text{M}+\text{H}]^+$,227 $[\text{M}-\text{H}]^-$,揭示相对分子质量为 228,结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 确定分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ 。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) 中, 根据 4 个芳香氢信号 δ 7.15 (1H, t, $J=8.1$ Hz)、7.00 (1H, br d, $J=8.1$ Hz)、6.93 (1H, d, $J=2.4$ Hz) 和 6.67 (1H, ddd, $J=8.1, 2.4, 0.8$ Hz) 偶合裂分的情况, 判断结构中存在一个 1,3-二取代的苯环; 另外 2 个芳香氢信号 δ 6.42 (2H, d, $J=2.1$ Hz, H-2,6) 和 6.15 (1H,

t, $J=2.1$ Hz, H-4) 揭示结构中存在一个 1,3,5-三取代的苯环; 此外有 2 个烯烃氢信号 δ 6.92 (2H, s)。 $^1\text{H-NMR}$ 数据与文献报道^[5]一致。通过 HMQC 和 HMBC 谱可将碳信号进行归属 (表 2)。最终鉴定该化合物的结构为反式-3,3',5-三羟基二苯乙烯, 为首次从该属植物中分离得到。

表 2 化合物 III~VII 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据^aTable 2 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ Data of compounds III~VII^a

位置	III ^b		IV ^c		V ^d		VI ^e		位置	VII ^d	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}		δ_{H}	δ_{C}
1		138.7		145.5		144.5		145.0	1	6.34(1H,d,J=2.3)	107.3
2	6.42(1H,d,J=2.1)	104.6	6.23(1H,t,J=2.2)	109.0	6.24(1H,m)	108.1	6.23(1H,d,J=2.2)	107.7	2		151.8
3		158.5		159.4		156.6		159.5	3	6.41(1H,d,J=2.3)	98.2
4	6.15(1H,t,J=2.1)	102.3	6.17(1H,t,J=2.2)	100.0	6.26(1H,m)	99.0	6.19(1H,t,J=2.2)	101.2	4		157.8
5		158.5		162.2		160.7		159.5	4a		116.4
6	6.42(1H,d,J=2.1)	104.6	6.23(1H,t,J=2.2)	106.6	6.31(1H,t,J=1.7)	106.7	6.23(1H,d,J=2.2)	107.7	4b		125.6
1'		138.3		144.7		133.7		144.4	5	8.10(1H,d,J=8.3)	129.1
2'	5.53(1H,d,J=2.1)	113.0	6.61(1H,t,J=2.1)	116.3	6.68(1H,dd,J=8.0,1.9)	121.0	6.72(1H,m)	115.1	6	6.72(1H,dd,J=8.3,2.7)	112.8
3'		157.5		158.3	5.83(1H,d,J=8.0)	114.2		158.2	7		153.6
4'	6.57(1H,ddd,J=8.1,2.4,0.8)	114.7	6.58(1H,ddd,J=8.0,2.5,0.8)	113.8		143.6	6.65(1H,ddd,J=7.7,2.3,0.8)	113.5	8	5.70(1H,m)	114.3
5'	7.15(1H,t,J=8.1)	129.5	7.04(1H,t,J=8.0)	130.2		146.2	7.08(1H,t,J=7.7)	130.0	8a		139.7
6'	7.00(1H,br d,J=8.2)	117.5	6.64(1H,br d,J=8.0)	123.8	6.62(1H,d,J=1.9)	111.2	6.69(1H,m)	120.3	9	2.79(2H,m)	29.9
a	6.94(1H,s)	128.0	2.75(2H,m)	38.8	2.80(2H,m)	37.1	2.78(2H,m)	38.2	10	2.70(2H,m)	30.5
d	6.94(1H,s)	128.7	2.75(2H,m)	39.1	2.80(2H,m)	38.2	2.72(2H,m)	38.4	10a		141.0
5-OCH ₃		3.68(3H,s)		55.5	3.75(3H,s)		55.2		4-OCH ₃	5.86(3H,s)	55.5
5'-OCH ₃					3.84(3H,s)		55.8				
3,5-OH	9.22(2H,s)						8.04(2H,s)				
3'-OH	9.38(1H,s)										

a- J (Hz); b-在 DMSO-d_6 中测定; c-在 CD_3OD 中测定; d-在 CDCl_3 中测定; e-在 acetone-d_6 中测定

a- J (in parentheses) in Hz; b-spectra were run in DMSO-d_6 ; c-spectra were run in CD_3OD ; d-spectra were run in CDCl_3 ; e-spectra were run in acetone-d_6

化合物 IV: 淡黄色油状物, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 214 (4.88), 275 (4.24), 280 (4.21), 示有苯环存在。ESI-MS: m/z 267 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 245 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 243 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 提示相对分子质量为 244, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 确定分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 中, 4 个芳香氢信号 δ 7.04 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.64 (1H, br d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 6.61 (1H, t, $J=2.1$ Hz, H-2') 和 6.58 (1H, ddd, $J=8.0, 2.1, 0.8$ Hz, H-4') 提示结构中存在一个 1,3-二取代的苯环; 另外 3 个芳香氢信号 δ 6.23 (1H, t, $J=2.2$ Hz, H-2), 6.21 (1H, t, $J=2.2$ Hz, H-6) 和 6.17 (1H, t, $J=2.2$ Hz, H-4) 说明结构中还存在一个 1,3,5-三取代的苯环; 此外, 有 1 个苯环上的甲氧基的氢信号 δ 3.68 (3H, s, 5-OCH₃) 和 2 个亚甲基的氢信号 δ 2.75 (4H, m, H₂- α , α')。化合物 IV 具有二萜类化合物的结构特征, 结合分子式判断它为联苕类衍生物。通过 HMQC 和 HMBC 可以将各个碳、氢信号进行归属 (表 2)。 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道^[6,7]一致, 故化

合物 IV 的结构为 3,3'-二羟基-5-甲氧基联苕, 为首次从该属植物中分离得到。

化合物 V: 淡黄色油状物, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 210 (4.88), 281 (4.05)。ESI-MS: m/z 297 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 275 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 273 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 提示相对分子质量为 274。 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道^[8,9]的 3,4'-二羟基-3',5-二甲氧基联苕一致, 为首次从该属植物中分离得到。

化合物 VI: 无定形粉末, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 207 (4.72), 275 (3.80)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1601, 1458, 示有苯环存在。ESI-MS: m/z 253 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 231 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 229 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 提示相对分子质量为 230。 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道^[10]的 3,3',5-三羟基联苕相符合, 为首次从该属植物中分离得到。

化合物 VII: 无定形粉末, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 209 (4.69), 280 (4.30)。ESI-MS: m/z 265 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 243 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 241 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 提示相对分子质量为 242, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 确定分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 中共有 5

个芳香氢信号,其中 3 个氢信号 δ 8.10(1H,d, $J=8.3$ Hz,H-5)、6.72(1H,dd, $J=8.3,2.7$ Hz,H-6)和 6.70(1H,m,H-8)构成了一个 ABX 自旋偶合系统,还有 2 个间位偶合的芳香氢信号 δ 6.41(1H,d, $J=2.3$ Hz,H-3)和 6.34(1H,d, $J=2.3$ Hz,H-1);此外,有 1 个苯环上的甲氧基的氢信号 δ 3.86(3H,s,4-OCH₃)和 2 个亚甲基的氢信号 δ 2.70(4H,br s,H₂-9,10)。该化合物也具有二氢茛类的结构特征,结合分子式推测其为二氢茛的衍生物。通过 HMQC 和 HMBC 可以将碳、氢信号进行归属(表 2)。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献一致^[9],故将化合物 VI 的结构鉴定为 2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢茛,为首次从该属植物中分离得到。

4 抑制大鼠巨噬细胞生成 NO 的活性测试

取大鼠巨噬细胞样细胞系(RAW 264.7)细胞,以 1.2×10^6 /mL 浓度接种在 96 孔板(SumitomoBakelite, # 8096R, Tokyo)中,在 37 °C 下培养 2 h。然后将供试样品(3、10、30、100 μ mol/L)与 LPS (100 ng/mL)和 INF- γ (0.33 ng/mL)一同加入到细胞培养液中,共同在 37 °C 下培养 16 h,将细胞培养液迅速在冰中冷却。取细胞培养液的上清液按每孔 100 μ L 置于新的 96 孔板中,在每孔中加入 50 μ L Griess 试剂(1%对氨基苯磺酰胺,5%磷酸,0.1%萘乙二胺)。室温下放置 10 min 后,用酶标仪在 550 nm 测定反应产物的吸光度(A)值,并扣除在 630 nm 测定的背景吸光度(A)值。在同一块 96 孔板中,要同时加入 NaNO₂ 的标准溶液用以计算 NO₂⁻ 浓度的标准曲线,以未加 LPS、INF- γ 和样品的细胞培养液作为空白,以未加样品的细胞培养液为阴性对照,以白藜芦醇(resveratrol)为阳性对照。用 MTT 法测定细胞毒作用[NO 抑制率 = $(A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$]。结果见表 3。

表 3 化合物体外抑制大鼠巨噬细胞生成 NO 的试验结果

Table 3 Results of inhibitory effect of compounds on NO production by activated murine macrophages in vitro

样 品	IC ₅₀ /(μ mol · L ⁻¹)
I *	>100
II	13.9
IV	27.8
V *	>100
VI	12.0
VI *	>100
白藜芦醇	29.8

* 在测试浓度下无细胞毒作用

* no cytotoxicity in concentration detected

5 结论

NO 是一种简单而不稳定的自由基,是 L-精氨酸经由一氧化氮合成酶催化产生的。NO 参与许多生理和病理过程,巨噬细胞在 IL-1、IL-2、TNF、IFN 等细胞因子和内毒素(如 LPS)的诱导下可以产生大量的 NO,同时 NO 上调又可以使巨噬细胞释放炎症性细胞因子,如 TNF- α 、IL-1 α 和 γ -IFN 等。这些因子对机体既起到介导炎症的作用,又起到细胞生长分化的调节作用。巨噬细胞在细胞内、外环境变化时可通过 NO 产生免疫保护、免疫损伤和免疫调节作用^[11]。

本实验利用体外抑制大鼠巨噬细胞 NO 生成的活性测试体系,对从云南石仙桃中分离得到的 7 个化合物进行了活性测定,结果表明化合物 I、IV 和 VI 具有很好的 NO 生成的抑制作用,活性高于阳性对照白藜芦醇,并且没有细胞毒作用。化合物 II 在实验浓度下具有细胞毒作用。该结果提示云南石仙桃中的抗炎活性成分可能为茛类化合物。

致谢:中国药科大学徐璐珊教授帮助鉴定药材;上海药物研究所叶阳教授帮助测试高分辨质谱;本课题组张雪、新三林同学测试核磁共振数据,高昊、王新峦同学测试质谱数据,罗群会同学测试红外和紫外光谱数据。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.
- [2] Ma X M, Li M F, Zhang Q R. Chemical constituents of Yunnan *Pholidota* (*Pholidota yunnanensis*) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1995, 26(2): 59-61.
- [3] Bi Z M, Wang Z T, Xu L S. A new triterpene from the orchid *Pholidota yunnanensis* [J]. Chin Chem Lett, 2004, 15 (10): 1179-1181.
- [4] Bi Z M, Wang Z T, Xu L S, et al. Studies of the chemical constituents of *Pholidota yunnanensis* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2004, 29(1): 47-49.
- [5] Piao Z S, Wang L, Feng Y B, et al. Studies on the synthesis of a natural product-piceatannol and its analogs [J]. Chin Chem Lett, 2002, 13(6): 521-524.
- [6] Majumder P L, Roychowdhury M, Chakraborty S. Thunb-ene, a stilbene derivative from the orchid *Thunia alba* [J]. Phytochemistry, 1998, 49(8): 2375-2378.
- [7] Han G X, Wang L X, Zhang W D, et al. Study on chemical constituents of *Bletilla striata* (I) [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2002, 23(4): 443-445.
- [8] Leong Y W, Kang C C, Harrison L J, et al. Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the orchid *Bulbophyllum vaginatum* [J]. Phytochemistry, 1997, 44(1): 157-165.
- [9] Juneja R K, Sharma S C, Tandon J S. Two substituted bibenzyls and a dihydrophenanthrene from *Cymbidium aloifolium* [J]. Phytochemistry, 1987, 26(4): 1123-1125.
- [10] Hernández-Romero J, Rojas J I, Castillo R, et al. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii* [J]. J Nat Prod, 2004, 67(2): 160-167.
- [11] Zheng Y C. Nitric oxide and immunoregulation of macrophage [J]. Foreign Med Sci: Immunol (国外医学:免疫学分册), 1995, 15(4): 204-206.