

• 化学成分 •

半夏中抑制肿瘤坏死因子- α 产生的新脑苷杨秀伟¹, 韩美华¹, 钟国跃², 张明²

(1. 北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083;

2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要:目的 研究半夏 *Pinellia ternata* 鲜块茎中的生物活性成分, 为其质量评价提供科学依据。方法 采用多种柱色谱方法分离纯化, 根据理化性质和谱学方法鉴定结构。采用 MTT 法, 体外观察化合物对脂多糖(LPS)刺激的小鼠腹腔巨噬细胞产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的抑制作用。结果 分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为环阿屯醇(I)、 β -谷甾醇(II)、 α -棕榈精(III)、胡萝卜苷(IV)、异半夏苷(1-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(2S, 3R, 4E, 11Z)-2-[(2R-羟基十六碳烯酰基)氨基]-4, 11-十八碳二烯-1, 3-二醇, V)、胡萝卜苷-6'-O-二十烷酸酯(β -谷甾醇-3-O- β -D-葡萄糖苷-6'-O-二十烷酸酯, VI)、尿嘧啶(VII)和蔗糖(VIII)。环阿屯醇和异半夏苷在 10 μ mol/L 对 LPS 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞产生 TNF- α 的抑制率分别为 54.7% 和 47.5%。结论 异半夏苷为新化合物, 半夏抗炎作用可能与环阿屯醇和异半夏苷有关。

关键词:半夏; 鲜块茎; 异半夏苷; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0485-06

A new cerebroside with inhibition on TNF- α production from fresh rhizome
of *Pinellia ternata*.

YANG Xiu-wei¹, HAN Mei-hua¹, ZHONG Guo-yue², ZHANG Ming²

(1. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

Abstract: Objective To study the chemical constituents in the fresh rhizome of *Pinellia ternata*, and provide the scientific basis for quality control. **Methods** Various chromatographic techniques were used to separate and purify the chemical constituents and their chemical structures were determined on the basis of physicochemical properties and spectroscopic analysis. The inhibitory effects of the isolated compounds on tumor necrosis factor- α (TNF- α) production in the peritoneal macrophages of mice stimulated with lipopolysaccharide (LPS) were observed *in vitro* by microplate ultraviolet-colorimetric method. **Results** Eight compounds were isolated and identified as cycloartenol (I), β -sitosterol (II), α -monopalmitin (III), daucosterol (IV), isopinelloside (1-O- β -D-glucopyranosyl-(2S, 3R, 4E, 11Z)-2-[(2R-hydroxyhexadecenoyl-amino)-4, 11-octadecadiene-1, 3-diol, V), daucosterol-6'-O-eicosanate (β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside-6'-O-eicosanate, VI), uracil (VII), and sucrose (VIII). The inhibitory effects of cycloartenol and isopinelloside were 54.7% and 47.5%, respectively, against the TNF- α production in the peritoneal macrophages of mice stimulated with LPS at a concentration of 10 μ mol/L *in vitro*. **Conclusion** The isopinelloside is a new compound. The anti-inflammatory effects of the rhizome of *P. ternata* is at least related to cycloartenol and isopinelloside.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; fresh rhizome; isopinelloside; tumor necrosis factor- α (TNF- α)

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 系天南星科 Araceae 植物, 主产于四川、湖北、辽宁等地, 为

收稿日期: 2007-08-28

基金项目: 国家“十五”科技攻关资助项目(99-929-01-02A); 国家计委“现代中药”资助项目([2002]2323)

作者简介: 杨秀伟, 男, 吉林长春市人, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物化学及其生物转化研究和教学工作。

Tel: (010)82805106 E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

许多复方的组成药味之一。其性味辛、温,有毒,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之功效;主治痰多咳嗽、痰饮眩悸、风痰眩晕、痰厥头痛、呕吐反胃、头晕不眠等症,生用外消痈肿^[1]。关于半夏的化学成分,已有报道半夏挥发油、生物碱、黄酮、多糖^[2]、脑苷^[3]、甾类^[4]和苯丙素^[5]等的研究。为了深入和系统地研究半夏的生物活性成分,本研究以质量相对稳定的重庆市“国家中药半夏 GAP 种植基地”栽培的半夏为实验材料,分离并鉴定了8个化合物,根据其理化性质和谱学数据分析,分别鉴定为环阿屯醇(I)、 β -谷甾醇(II)、 α -棕榈精(III)、胡萝卜苷(IV)、异半夏苷(V)、胡萝卜苷-6'-O-二十烷酸酯(β -谷甾醇-3-O- β -D-葡萄糖苷-6'-O-二十烷酸酯,VI)、尿嘧啶(VII)和蔗糖(VIII)。其中,异半夏苷为新化合物;环阿屯醇和异半夏苷在 1×10^{-5} mol/L 对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激的小鼠腹腔巨噬细胞产生肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)具有抑制作用。

1 仪器与材料

熔点(mp)用 XT4A 型显微熔点测定仪测定;红外光谱(IR)用 Thermo Nicolet Nexus 470 型傅里叶变换红外光谱仪测定;紫外光谱(UV)用 Varian Cary 300 UV-VIS 型紫外光谱仪测定;核磁共振波谱用 Varian INOVA 500 型核磁共振仪测定, TMS 为内标, CDCl_3 或 $\text{DMSO}-d_6$ 、 $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ 为溶剂;质谱用 MDS SCIEX API QSTAR 型飞行时间质谱仪(ESI-TOF-MS)、Finnigan TRACE 2000 GC-MS 型质谱仪(EI-MS)、Bruker Daltonics APEXTM IV 型傅里叶变换离子回旋质谱仪(HR-ESI-MS)测定;日产 BIO-RAD Model 450 型酶标仪;柱色谱用硅胶(200~300 目)和 TLC 硅胶 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工厂产品;Sephadex LH-20(25~100 μm)购自 Pharmacia 公司;脂多糖(LPS)购自 Promega 公司;胎牛血清(FCS)为 Hyclon 产品;RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品;巯基乙醇酸钠为 Difoco 产品;放线菌素 D 和四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)购自北京化工厂;48 和 96 孔培养板购自 Costar 公司。实验使用三蒸水,所用试剂为分析纯或色谱纯。

C57BL6J 小鼠,雄性,体重 16~18 g,购自中国医学科学院实验动物中心;饲养在明暗周期 12 h、温度(22 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 的动物室环境条件下,饲喂标准动物饲料,自由饮水。小鼠成纤维细胞株 L929 细胞由中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所药

理室提供。

半夏新鲜块茎于 2003 年 11 月采自重庆市“国家中药半夏 GAP 种植基地”,经重庆市中药研究院钟国跃研究员鉴定为半夏属植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的块茎。凭证标本(20031120)存于北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室。

2 提取与分离

新鲜半夏块茎研碎,取 27 kg,用 5 倍量 70% 乙醇回流提取 5 次,第 1 次提取 2.0 h,以后每次提取 1.0 h;合并提取液、冷却,滤去淀粉,回收乙醇,得流浸膏 1.055 kg(收率 3.91%)。用 2 500 mL 水溶解浸膏,依次用等体积醋酸乙酯和水饱和的正丁醇分别萃取 5 次,合并萃取液,回收至干,分别得醋酸乙酯和正丁醇萃取物 127 g(0.47%)和 126 g(0.46%)。

取醋酸乙酯萃取物 127 g,进行硅胶柱色谱分离,石油醚-醋酸乙酯(20:1 $\rightarrow$ 10:1 $\rightarrow$ 2:1)和氯仿-甲醇(50:1 $\rightarrow$ 25:1 $\rightarrow$ 10:1 $\rightarrow$ 1:1)梯度洗脱,共得到 8 个组分。所有组分分别经硅胶和 Sephadex LH-20 柱色谱反复分离和纯化,从组分 1 得到化合物 I(31.5 mg)、II(2.0 g)和 III(50.0 mg);从组分 8 得到化合物 IV(2.3 g)和 V(30.0 mg)。取正丁醇萃取物 126 g,用与醋酸乙酯萃取物类似的柱色谱方法分离和纯化;在醋酸乙酯中逐渐增加甲醇体积分数进行梯度洗脱,分别得到化合物 VI(20.0 mg)、VII(13 mg)和 VIII(5.0 g)。

3 结构鉴定

化合物 I:白色粉末; $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$;IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 422(OH), 2 929, 2 865, 1 447, 1 377, 1 101, 1 050, 1 024, 999;EI-MS m/z : 426.6 $[\text{M}]^+$ (17), 393.5(53), 286.4(58), 69.1(100); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 3.27(1H, m, H-3), 0.95(3H, s, H-18), 0.31(1H, d, $J=4.5$ Hz, H_a-19), 0.54(1H, d, $J=4.0$ Hz, H_b-19), 0.87(3H, d, $J=7.0$ Hz, H-21), 5.08(1H, t, H-24), 1.59(3H, br s, H-26), 1.67(3H, s, H-27), 0.87(3H, s, H-28), 0.95(3H, s, H-29), 0.79(3H, s, H-30); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 32.0(C-1), 30.4(C-2), 78.8(C-3), 40.5(C-4), 47.1(C-5), 21.1(C-6), 28.1(C-7), 48.0(C-8), 20.0(C-9), 26.1(C-10), 26.0(C-11), 32.9(C-12), 45.3(C-13), 48.8(C-14), 35.6(C-15), 26.5(C-16), 52.3(C-17), 19.3(C-18), 29.9(C-19), 35.9(C-20), 18.0(C-21), 36.3(C-22), 24.9(C-

23), 125.2 (C-24), 130.9 (C-25), 17.6 (C-26), 25.7 (C-27), 18.2 (C-28), 25.4 (C-29), 14.0 (C-30)。¹H-NMR和¹³C-NMR谱数据与文献报道的环阿屯醇的数据一致^[4]。

化合物Ⅰ: 无色针晶(MeOH), C₂₉H₅₀O; mp、IR、EI-MS和NMR数据与对照品β-谷甾醇的数据一致。

化合物Ⅱ: 白色粉末, mp 56~58 °C; C₁₉H₃₈O₄; IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 309, 2 916, 2 850, 1 739, 1 730, 1 469, 1 198, 1 180, 1 047, 991, 943, 719; EI-MS *m/z*: 331 [M+H]⁺ (5), 299 (22), 257 (37), 239 (100), 134 (40), 98 (71)。¹H-NMR和¹³C-NMR谱数据与文献报道的α-棕榈精的数据一致^[4]。

化合物Ⅳ: 白色粉末; IR、ESI-TOF-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR谱数据与对照品胡萝卜苷的数据一致。

化合物Ⅴ: 白色粉末; 在TLC板上展开, 与Dragendorff试剂呈浅黄色阳性反应。在ESI-TOF-MS, 阳离子模式下给出准分子离子*m/z* 736.647 5 [M+Na]⁺和714.660 3 [M+H]⁺; 阴离子模式下给出准分子离子*m/z* 712.601 7 [M-H]⁻, 证明其相对分子质量为713。阳离子模式ESI-HR-MS给出分子组成为C₄₀H₇₅NO₉ [实测值*m/z*: 736.533 85 [M+Na]⁺, 理论值736.533 95 (C₄₀H₇₅NNaO₉)]。IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 384, 3007, 2 923, 2 852, 1 645, 1 537, 1 465, 1 081, 967, 721, 613; 示有羟基(3 384 cm⁻¹)、酰胺基(1 645和1 537 cm⁻¹)和氧糖苷键(1 081 cm⁻¹)。化合物Ⅴ的¹H-NMR和¹³C-NMR数据(表1)确切证明存在糖基、酰胺基和脂肪链, 提示其为脑苷类化合物(图1)。¹H-NMR波谱 δ_H 4.26 (1H, d, *J*=8.0 Hz, glc-H-1), 3.18 (1H, dd, *J*=9.0, 8.0 Hz, glc-H-2), 3.35 (1H, t, *J*=9.0 Hz, glc-H-3), 3.31 (1H, t, *J*=8.5 Hz, glc-H-4), 3.27 (1H, dd, *J*=8.5, 4.5 Hz, glc-H-5), 3.66 (1H, dd, *J*=11.5, 4.5 Hz, glc-H_a-6), 3.86 (1H, d, *J*=11.5 Hz, glc-H_b-6)和¹³C-NMR波谱 δ_C 104.7, 74.9, 77.9, 71.5, 77.8, 62.6与文献报道的1-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*Z*)-2-[(2(*R*)-羟基二十碳酰基)氨基]-4, 8-十八碳二烯-1, 3-二醇(1-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*Z*)-2-[(2(*R*)-hydroxyicosanoyl) amino]-4, 8-octadecadiene-1, 3-diol, 图1-X)的β-*D*-吡喃葡萄糖基^[6]的信号一致, 推断化合物Ⅴ的分子结构中结合一β-*D*-吡喃葡萄糖基。将化合物Ⅴ用10% HCl水溶液水解, 进行纸色谱分析并与标准品糖对照, 检出

β-*D*-吡喃葡萄糖, 亦证明了此推断。¹³C-NMR波谱中δ_C 54.6是与氮相连碳的特征信号, δ_C 177.2是酰胺碳的特征信号。¹H-NMR波谱中δ_H 1.28 (2H, m)和0.89 (6H, t, *J*=6.5 Hz)信号, 说明化合物Ⅴ的分子结构中有11个亚甲基(-CH₂-), 确证了2个长链脂肪基的存在。C-4和C-5烯键的两个质子的偶合常数*J*_{4,5}=15.5 Hz和C-6的化学位移出现在δ_C 33.0, 证明H-4和H-5为反式。通常情况下, 邻接反式双键的亚甲基的¹³C-NMR信号出现在δ_C 32~33, 而邻接顺式双键的亚甲基的¹³C-NMR信号出现在δ_C 27~28^[7]。¹H-NMR波谱中δ_H 5.43 (2H, t, *J*=5.0 Hz)为烯质子H-11和H-12的信号, ¹³C-NMR波谱中δ_C 131.3为烯碳C-11和C-12的信号, 两者磁性等价(表1), 烯质子H-11和H-12为顺式; C-10和C-13的化学位移分别为δ_C 27.9和28.3, 进一步证明了C-11和C-12烯键的立体几何性质, 从而进一步证明了H-11和H-12为顺式^[6]。将化合物Ⅴ的NMR波谱数据与半夏脑苷^[3](图1-X)进行比较, 除C-10、C-11、C-12、C-13和H-10、H-11、H-12、H-13的化学位移不同外, 其他信号几乎完全相同。在化合物Ⅴ, C-10、C-11、C-12和C-13的¹³C-NMR信号分别出现在δ_C 32.6、131.1、132.3和32.6, 相应结合的质子的¹H-NMR信号分别出现在δ_H 2.01 (2H, m), 5.45 (1H, br dt, *J*=15.0, 6.5 Hz), 5.66 (1H, br dt, *J*=15.0, 6.5 Hz)和2.01 (2H, m)^[3]。因此, 化合物Ⅴ和Ⅴ是一对几何异构体。从而化合物Ⅴ的化学结构鉴定为1-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(2*S*, 3*R*, 4*E*, 11*Z*)-2-[(2(*R*)-羟基十六碳烯酰基)氨基]-4, 11-十八碳二烯-1, 3-二醇[1-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(2*S*, 3*R*, 4*E*, 11*Z*)-2-[(2(*R*)-hydroxyhexadecenoyl) amino]-4, 11-octadecadiene-1, 3-diol], 是一个新的化合物, 命名为异半夏苷(isopinelloside)。

化合物Ⅵ: 白色无定形粉末, mp 121~123 °C; C₅₅H₉₈O₇; IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 473, 2 925, 2 850, 1 724, 1 693, 1 468, 1 379, 1 309, 1 254, 1 171, 1 088, 1 020, 930, 843, 800, 721, 640。MS和NMR谱学数据与文献报道的胡萝卜苷-6'-*O*-二十烷酸酯的数据一致。

化合物Ⅶ: 白色无定形粉末(H₂O), mp 297~302 °C; C₄H₄N₂O₂; IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 100 (NH), 2 940, 1 720 (C=O), 1 660 (C=O), 1 452, 1 417, 1 392, 1 237, 1 006, 992; UV λ_{max}^{MeOH} nm: 210, 260; EI-MS *m/z*: 112 [M]⁺ (100), 69 (81), 42 (65); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 5.53 (1H, d, *J*=7.5 Hz,

表1 化合物V和X的¹H-NMR(500 MHz)和¹³C-NMR(125 MHz)波谱数据
Table 1 ¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C-NMR (125 MHz) Data of compounds V and X

位置	V		位置	X ^[3]	
	¹ H-NMR δ (m, J in Hz)	¹³ C-NMR δ		¹ H-NMR δ (m, J in Hz)	¹³ C-NMR δ
1a	4.10 (1H, dd, 10.0, 5.5)	69.7	1a	4.01 (1H, dd, 10.5, 5.5)	69.2
1b	3.71 (1H, dd, 10.0, 3.5)		1b	3.67 (1H, dd, 10.5, 4.0)	
2	3.98 (1H, ddd, 5.5, 3.5, 1.9)	54.6	2	3.91 (1H, m)	53.7
3	4.12 (1H, td, 7.5, 1.9)	72.8	3	4.08 (1H, br q, 5.5)	71.8
4	5.48 (1H, dd, 15.5, 7.5)	131.3	4	5.41 (1H, br dd, 16.0, 5.5)	131.1
5	5.35 (1H, dt, 15.5, 6.5)	129.9	5	5.32 (1H, br dt, 16.0, 6.5)	129.8
6	2.02 (2H, m)	33.0	6	1.98 (2H, m)	32.9
7,8	1.23~1.30 (4H, m)	30.4, 30.5	7~9	1.25~1.30 (6H, m)	29.5~30.0
9	1.24 (2H, m)	33.6	10	2.01 (2H, m)	32.6
10	2.04 (2H, m)	27.9	11	5.45 (1H, br dt, 15.0, 6.5)	131.1
11	5.43 (1H, t, 5.0)	131.3	12	5.66 (1H, br dt, 15.0, 6.5)	132.3
12	5.43 (1H, t, 5.0)	131.3	13	2.01 (2H, m)	32.2
13	2.06 (2H, m)	28.3	14~16	1.25 (6H, m)	27.2~29.6
14~16	1.28 (6H, m)	27.9~30.5	17	1.25 (2H, m)	23.0
17	1.30 (2H, m)	23.8	18	0.87 (3H, t, 7.0)	14.6
18	0.89 (3H, t, 6.5)	14.5	1'		175.2
1'		177.2	2'	3.90 (1H, m)	72.1
2'	3.98 (1H, dd, 7.8, 4.0)	73.0	3'	1.95 (2H, m)	35.2
3'a	1.70 (1H, m)	35.8	4'	1.25 (2H, m)	25.5
3'b	1.55 (1H, m)		5'~13'	1.25 (18H, m)	29.5~30.0
4'	1.41 (2H, m)	26.6	14'	1.25 (2H, m)	32.2
5'~13'	1.28 (18H, m)	30.7~30.8	15'	1.25 (2H, m)	23.0
14'	1.28 (2H, m)	31.2	16'	0.87 (3H, t, 7.0)	14.6
15'	1.25 (2H, m)	23.8	1''	4.21 (1H, d, 7.5)	104.2
16'	0.89 (3H, t, 6.5)	14.5	2''	3.13 (1H, ddd, 9.0, 7.5, 4.0)	74.0
1''	4.26 (1H, d, 8.0)	104.7	3''	3.30 (1H, td, 9.0, 4.0)	77.2
2''	3.18 (1H, dd, 9.0, 8.0)	74.9	4''	3.24 (1H, td, 9.0, 4.0)	70.7
3''	3.35 (1H, t, 9.0)	77.9	5''	3.18 (1H, m)	77.3
4''	3.31 (1H, t, 8.5)	71.5	6''a	3.59 (1H, dt, 12.0, 6.0)	62.0
5''	3.27 (1H, dd, 8.5, 4.5)	77.8	6''b	3.77 (1H, br dd, 12.0, 6.0)	
6''a	3.66 (1H, dd, 11.5, 4.5)	62.6			
6''b	3.86 (1H, d, 11.5)				

H-5), 7.43 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6), 10.89 (1H, s, -NH), 11.09 (1H, s, -NH); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ: 151.8 (C-2), 164.8 (C-4), 100.5 (C-5), 142.5 (C-6)。以上数据与对照品尿嘧啶的数据完全一致。

化合物Ⅶ: 无色棱晶 (MeOH), mp 161~164 °C; C₁₂H₂₂O₁₁; ESI-TOF-MS (positive) m/z : 341 [M-1]⁻。IR 和 NMR 波谱数据与对照品蔗糖的数据完全一致。

4 化合物 I 和 V 对 LPS 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞产生 TNF-α 的抑制作用

4.1 受试样品的配制和给药剂量: 受试样品用 DMSO 配成 0.1 mol/L 的储存液, 使用时用磷酸缓冲液 (PBS) 稀释。受试样品终浓度为 10 μmol/L。

4.2 巯基乙醇酸钠诱导的小鼠腹腔巨噬细胞的获得与培养: 将 1 mL 4% 巯基乙醇酸钠溶液 (提前 1 个月以上配制, 灭菌后室温避光保存) ip 给予每只

C57BL/6J 小鼠。注射后第 4 天断头处死小鼠, 放尽血液, 于 75% 乙醇中浸泡 1~2 min, ip D-Hank's 生理缓冲液 6~8 mL, 充分按摩后缓缓吸出腹腔中液体, 再重复冲洗腹腔 1 次, 合并细胞悬液。在 1 000 r/min 条件下离心 5 min, 小心倾去上清。用冰冷的 RPMI-1640 培养基洗涤 1 次, 计数细胞。细胞用 RPMI-1640 培养基重悬, 将细胞浓度调整为 1×10^6 /mL, 接种于 48 孔 (每孔 0.5 mL) 细胞板中, 在 37 °C、5% CO₂ 贴壁培养 2 h。倾去培养基, 用 D-Hank's 生理缓冲液冲洗 2 次, 除去未贴壁细胞, 每孔加入含有不同受试化合物 (终浓度为 10 μmol/L) 和刺激剂 LPS (5 μg/mL) 的 5% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养 24 h。收集上清, 测定 TNF-α 的量。

4.3 L929 细胞结晶紫染色法测定 TNF-α: L929 细胞长满单层后, 用 0.25% 胰酶消化, 重悬细胞于含 10% NBS 的 RPMI-1640 培养液中, 计数细胞, 调细

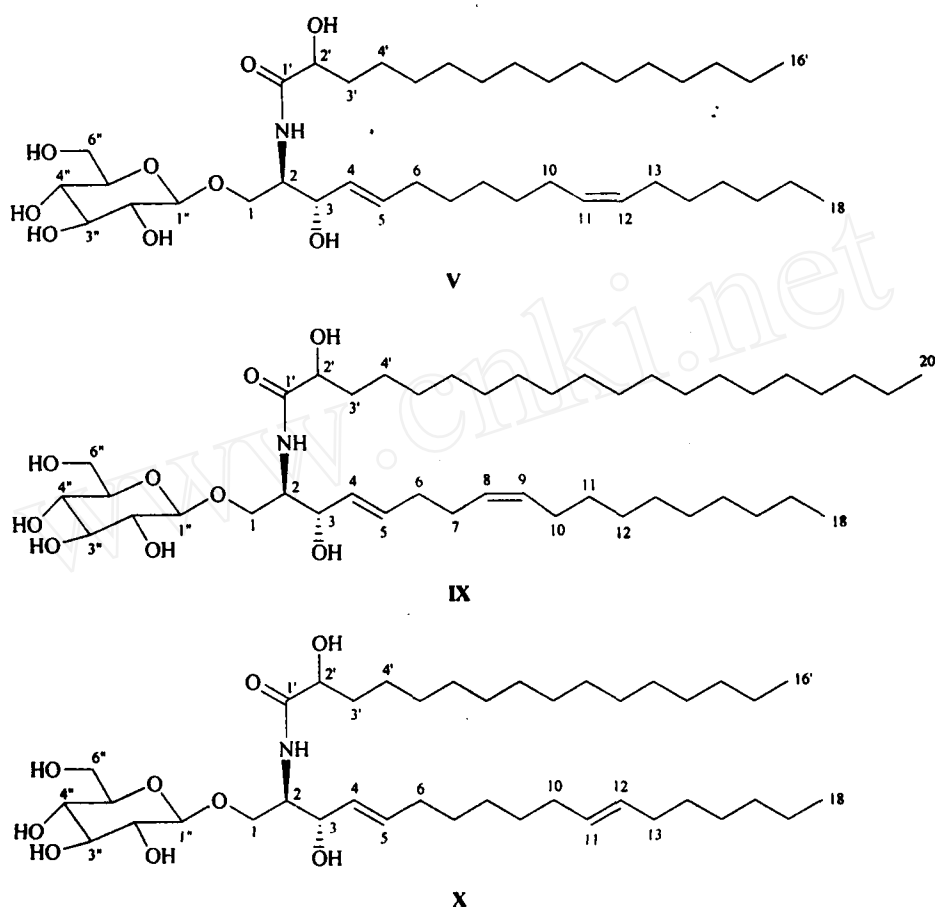


图 1 化合物 V、IX 和 X 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds V, IX, and X

胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 接种到 96 孔平底培养板中, 每孔 $200 \mu\text{L}$, 设 3 个复孔, 在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 24 h; 弃上清, 每孔加入含 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 放线菌素 D 的培养液 $100 \mu\text{L}$, RPMI-1640 培养基或待测样品 $100 \mu\text{L}$, 设 3 个复孔, 在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 20 h 后弃上清, 每孔加入 MTT ($5 \text{ mg}/\text{mL}$) $20 \mu\text{L}$, 继续培养 4 h 后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO 溶解 10 min, 待结晶完全溶解后置于酶标仪中 570 nm 处测定吸光度 (A) 值。以 RPMI-1640 培养液孔为对照, 以细胞毒百分率表示样品所含 $\text{TNF-}\alpha$ 的量。细胞毒百分率 $= [1 - (\text{样品 A} / \text{对照 A 值}) \times 100\%]$ 。

4.4 统计学分析: 各组数据用 $\bar{x} \pm s (n=3)$ 表示, 组间分析用 t 检验进行统计学处理。

4.5 结果: 如表 2 所示, 化合物 I 和 V 在 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度时对 LPS 刺激的 C57BL/6J 小鼠腹腔巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 具有抑制作用, 抑制率分别为 54.7% 和 47.5% 。

5 结论

从质量相对稳定的重庆市“国家中药半夏 GAP 种植基地”栽培的半夏新鲜块茎中分离并鉴定了 8 个

表 2 化合物 I 和 V 对 LPS 刺激的 C57BL/6J 小鼠腹腔巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 的抑制作用 ($n=3$)

Table 2 Inhibition of compounds I and V on $\text{TNF-}\alpha$ production in peritoneal macrophage of C57BL/6J mice stimulated by LPS ($n=3$)

组别	A 值	抑制率/%
对照	0.445 ± 0.016	—
LPS	$0.316 \pm 0.012^{***}$	—
LPS + I	$0.386 \pm 0.013^{**}$	54.7
LPS + V	$0.377 \pm 0.032^*$	47.5

与对照组比较: $***P < 0.001$

与 LPS 组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$

$***P < 0.001$ vs control group

$*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs LPS group

化合物, 化合物 V 命名为异半夏苷, 为新化合物。

巨噬细胞是重要的抗炎免疫细胞, 其在非特异性免疫、体液免疫以及肿瘤免疫等方面起着重要的作用。巨噬细胞分泌的细胞因子主要有 $\text{TNF-}\alpha$ 等。采用对 $\text{TNF-}\alpha$ 高度敏感的小鼠成纤维细胞株 L929 细胞生物活性测定法测试了环阿屯醇和异半夏苷对 LPS 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 的抑制作用, 测定时在培养的 L929 细胞中加入过量的放

线菌素 D 抑制 L929 细胞的有丝分裂,然后分别加入环阿屯醇和异半夏苷。结果表明环阿屯醇和异半夏苷在 1×10^{-5} mol/L 浓度时对 LPS 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞产生 TNF- α 的抑制率分别为 54.7% 和 47.5%。LPS 刺激的巨噬细胞产生大量的 TNF- α , 而环阿屯醇和异半夏苷组则能明显降低 TNF- α 的量,表明降低 TNF- α 的量是环阿屯醇和异半夏苷发挥抗炎作用的一个重要机制。半夏的抗炎作用可能与此有关,详细的研究正在进行中。

致谢:中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所刘柏合在生物活性测试中给予的帮助。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 上海人民出

版社, 1977.

- [2] 蔡世珍, 邹忠梅, 徐丽珍, 等. 半夏属药用植物的研究进展 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 2004, 26(1): 17-24.
- [3] Chen J H, Cui G Y, Liu J Y, et al. Pinelloside, an antimicrobial cerebroside from *Pinellia ternata* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 903-906.
- [4] 何萍, 李帅, 王素娟, 等. 半夏化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 671-674.
- [5] Han M H, Yang X W, Zhang M, et al. Phytochemical studies on the rhizome of *Pinellia ternata* and quantification of phenylpropanoids in commercial pinellia rhizome by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chromatographia*, 2006, 64(11/12): 647-653.
- [6] Jung J H. New bioactive cerebrosides from *Arisaema amurense* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59: 319-322.
- [7] Breitmaier E, Voelter W. *Carbon-13C-NMR Spectroscopy* [M]. New York: Academic Press, 1987.

山核桃树皮化学成分研究

王金兰, 张淑霞, 李铁军, 张伟琦, 王建军, 张树军

(齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:目的 研究山核桃树皮化学成分。方法 利用硅胶柱色谱及重结晶等方法进行分离纯化,通过理化性质及波谱分析鉴定结构。结果 得到 15 个化合物,鉴定为:4,8-二羟基萘酚-1-O- β -D-(6'-乙酰氧基)吡喃葡萄糖苷(I)、双氢山萘酚(II)、胡桃醌(III)、胡萝卜苷(IV)、山萘酚(V)、4,8-二羟基萘酚-1-O- β -D-[6'-O-(3'',5''-二甲氧基-4''-羟基苯甲酰基)]吡喃葡萄糖苷(VI)、山萘酚-3-O- α -L-鼠李糖苷(VII)、3,3'-二甲氧基鞣花酸(VIII)、柚皮素(IX)、槲皮素(X)、4,8-二羟基四氢萘酚(XI)、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷(XII)、柚皮素-7-O- β -D-葡萄糖苷(XIII)、4,8-二羟基萘酚-1-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(XIV)、4,5,8-三羟基- α -四氢萘酚-5-O- β -D-[6'-O-(3'',5''-二甲氧基-4''-羟基苯甲酰基)]吡喃葡萄糖苷(XV)。结论 化合物 I 为新化合物,命名为山核桃酚;化合物 II、VI~IX、XI、XIII 系首次从该属植物中得到。

关键词:山核桃;山核桃酚;胡桃醌;萘酚;萘醌

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0490-04

Chemical constituents from bark of *Juglans mandshurica*

WANG Jin-lan, ZHANG Shu-xia, LI Tie-jun, ZHANG Wei-qi, WANG Jian-jun, ZHANG Shu-jun

(Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the bark of *Juglans mandshurica*. **Methods** The compounds were isolated and purified by column chromatography on silica gel, HPLC, and recrystallization. Their structures were elucidated by the physicochemical and spectroscopic evidences. **Results** Fifteen compounds were identified as: 4, 8-dihydroxynaphthalenyl-O- β -D-(6'-acetoxyl) glucopyranoside (I), dihydrokaempferol (II), juglone (III), daucosterol (IV), kaempferol (V), 4, 8-dihydroxynaphthalenyl-1-O- β -D-[6'-O-(3'', 5''-dimethoxy-4''-hydroxybenzoyl)] glucopyranoside (VI), kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside (VII), 3, 3'-dimethoxylelagic acid (VIII), naringenin (IX), quercetin (X), reginone (XI), quercetin-3-O- α -L-rhamnoside (XII), naringenin-7-O- β -D-glucoside (XIII), 4, 8-dihydroxynaphthalenyl-1-O- β -D-glucoside (XIV), 4, 5, 8-trihydroxy- α -tetralone-5-O- β -D-[6'-O-(4''-hy-

收稿日期:2007-08-30

基金项目:黑龙江省教育厅海外学人项目(10545HQ027)

作者简介:王金兰, Tel:(0452)2742562 E-mail:jinwang@163.com