

碎米花杜鹃的化学成分及其对小鼠免疫细胞影响的研究

汪伟光¹, 曹永国², 付立卓¹, 李海舟¹, 邓旭明², 李蓉涛¹

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224; 2. 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062)

摘要:目的 研究碎米花杜鹃 *Rhododendron spiciferum* 叶的化学成分及其免疫活性。方法 利用多种色谱技术进行化合物的分离纯化, 通过各种波谱方法鉴定其化学结构, 并用 MTT 法测定化合物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。结果 分离鉴定了 12 个已知的黄酮类化合物, 分别为槲皮素-3-O- α -L-阿拉伯呋喃糖苷(1)、槲皮素-3-O- α -L-鼠李吡喃糖苷(2)、二氢槲皮素-3-O- α -L-阿拉伯吡喃糖苷(3)、落新妇苷(4)、5,7,4'-三羟基-二氢黄酮醇-3-O- α -L-鼠李吡喃糖苷(5)、柚皮素(6)、(2S)-5,7,4'-三羟基-8-甲基黄烷酮(7)、epicatechin-(2 β →O→7,4 β →8)-*ent*-epicatechin(8)、花青素 A-1(9)、bis-8,8'-catechinylmethane(10)、儿茶素(11)、表儿茶素(12)。化合物 8,9,11 在一定浓度范围内单独或者协同非特异性丝裂原(ConA 或 LPS)作用均能显著增强小鼠脾淋巴细胞增殖能力($P < 0.05, 0.01$ 或 0.001)。结论 碎米花杜鹃的化学成分为首次报道。相关免疫活性实验表明, 化合物 8,9,11 具有一定的免疫增强作用。

关键词:碎米花杜鹃; 黄酮; 小鼠脾淋巴细胞

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)01-0019-05

Chemical constituents from *Rhododendron spiciferum* and their effects on immunocyte of mice

WANG Wei-guang¹, CAO Yong-guo², FU Li-zhuo¹, LI Hai-zhou¹, DENG Xu-ming², LI Rong-tao¹

(1. College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract : Objective To study the chemical constituents from the leaves of *Rhododendron spiciferum* and their immunomodulatory activities. **Methods** The chemical constituents were isolated by various chromatography techniques and their structures were elucidated on the basis of spectroscopic data. The immunomodulatory activity of some compounds was examined by Balb/c mouse spleen lymphocyte proliferation through MTT. **Results** Twelve known flavonoids were isolated and identified as: quercetin-3-O- α -L-arabinofuranoside (1), quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside (2), *trans*-taxifolin-3-O- α -arabinopyranoside (3), astilbin (4), 3-O-rhamnoside engeletin (5), naringenin (6), (2S)-5,7,4'-trihydroxy-8-methylflavanone (7), epicatechin-(2 β →O→7,4 β →8)-*ent*-epicatechin (8), proanthocyanidin A-1 (9), bis-8,8'-catechinylmethane (10), catechin (11), and epicatechin (12). The results showed that compounds 8, 9, and 11 alone or combined with ConA or LPS could significantly enhance the proliferation of spleen lymphocytes in a certain dose range. **Conclusion** This is the first report on the chemical constituents from *R. spiciferum*. Compounds 8, 9, and 11 are found to be effect on increasing immunomodulatory activity.

Key words : *Rhododendron spiciferum* Franch. ; flavonoids ; Balb/c mouse spleen lymphocyte

碎米花杜鹃 *Rhododendron spiciferum* Franch. 是杜鹃花科杜鹃花属植物^[1]。杜鹃花科植物中,分有毒性的和非毒性的。有毒性植物中,公认的毒性成分是木藜芦烷型二萜。非毒性植物占绝大多数,其主要活性成分是黄酮、挥发油类化合物,在

民间被广泛应用于止咳、化痰,感冒、吐血及妇科病等^[2,3],具有很高的开发利用价值。照山白、兴安杜鹃、烈香杜鹃等现已开发成药^[4]。鉴于杜鹃花科植物的良好药用活性以及碎米花杜鹃化学成分研究从未见文献报道,笔者对该种的化学成分进行了深入

① 收稿日期:2009-03-12
基金项目:国家自然科学基金资助项目(20862011);霍英东青年教师基金资助项目(111040);教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NECT-06-0824)
作者简介:汪伟光(1984-),男,湖北省黄冈市人,昆明理工大学生命科学与技术学院在读硕士研究生,从事天然产物的分离纯化和结构鉴定工作两年。Tel:13769198965 Fax:(0871)3801191 E-mail:wwg1984@yahoo.com.cn
*通讯作者 李蓉涛 Tel:(0871)3801018-201 E-mail:rongtaolikh@yahoo.cn

细致的研究。从中分离鉴定了12个已知黄酮类化合物,分别为槲皮素-3-O- α -L-阿拉伯呋喃糖苷(1)、槲皮素-3-O- α -L-鼠李吡喃糖苷(2)、二氢槲皮素-3-O- α -阿拉伯吡喃糖苷(3)、落新妇苷(4)、5,7,4'-三羟基-二氢黄酮醇-3-O- α -L-鼠李吡喃糖苷(5)、柚皮素(6)、(2S)-5,7,4'-三羟基-8-甲基黄烷酮(7)、epicatechin-(β →O→7,4 β →8)-*ent*-epicatechin(8)、花青素A-1(9)、bis-8,8'-catechiny-lmethane(10)、儿茶素(11)、表儿茶素(12)。

1 仪器与材料

核磁共振谱在Bruker AM-400及DRX-500型超导核磁共振仪上测定(TMS为内标);高效液相色谱采用Agilent 1200型高效液相色谱仪测定;反相填充材料ODS(40~60 μ m),Merck公司生产;Sephadex LH-20为英国安玛西亚公司生产;柱色谱硅胶(80~100、100~200、200~300目)、GF₂₅₄型和G型硅胶薄层板均为青岛海洋化工厂生产。

碎米花杜鹃于2007年10月采于昆明市金殿后山,由中国科学院昆明植物研究所马永朋博士鉴定,标本保存于昆明理工大学生命科学与技术研究中心,标本号20071002。

2 提取与分离

干燥的碎米花杜鹃叶9.3 kg,粉碎后用70%丙酮水溶液室温浸泡3次,每次48 h,合并提取液,减压蒸馏除去丙酮,静置过夜后水部分依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯和正丁醇萃取,其中得醋酸乙酯部分843 g。对醋酸乙酯部分用硅胶柱色谱、RP-18、Sephadex LH-20、HPLC等手段反复分离纯化得到化合物1(72 mg)、2(230 mg)、3(42 mg)、4(62 mg)、5(15 mg)、6(30 mg)、7(16 mg)、8(20 mg)、9(37 mg)、10(5 mg)、11(16 mg)、12(7 mg)。

3 结构鉴定

化合物1:黄色粉末。¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ : 6.20(1H, s, H-6), 6.39(1H, s, H-8), 7.52(1H, brs, H-2'), 7.48(1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.90(1H, d, J = 8.3 Hz, H-6'), 4.23(1H, d, J = 2.1 Hz, Ara-H-1'), 3.29~3.91(5H, m, Ara-H-2''~5''); ¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz) δ : 159.4(s, C-2), 134.9(s, C-3), 180.0(s, C-4), 163.1(s, C-5), 99.9(d, C-6), 166.0(s, C-7), 94.8(d, C-8), 158.6(s, C-9), 105.6(s, C-10), 123.0(s, C-1'), 116.4(d, C-2'), 146.4(s, C-3'), 149.9(s, C-4'), 116.9(d, C-5'), 123.1(d, C-6'), 109.5(d, C-1''), 83.3(d, C-2''), 78.7(d, C-3''), 88.0(d, C-4''), 62.6

(t, C-5'')。以上¹H-NMR和¹³C-NMR数据与文献报道一致^[5], 鉴定为槲皮素-3-O- α -L-阿拉伯呋喃糖苷。

化合物2:黄色粉末。¹H-NMR(CD₃COCD₃, 400 MHz) δ : 6.30(1H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 6.52(1H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 7.46(1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 6.91(1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 7.28(1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6'), 5.52(1H, d, J = 2.0 Hz, Rha-H-1'), 3.32~3.63(4H, m, Rha-H-2''~5''), 0.91(3H, d, J = 6.2 Hz, Rha-6'')。 ¹³C-NMR(CD₃COCD₃, 100 MHz) δ : 157.9(s, C-2), 135.7(s, C-3), 179.2(s, C-4), 163.0(s, C-5), 99.5(d, C-6), 165.0(s, C-7), 94.5(d, C-8), 158.3(s, C-9), 105.6(s, C-10), 122.7(s, C-1'), 116.1(d, C-2'), 145.8(s, C-3'), 149.0(s, C-4'), 115.6(d, C-5'), 122.5(d, C-6'), 102.7(d, C-1''), 71.4(d, C-2''), 72.0(d, C-3''), 73.0(d, C-4''), 71.3(d, C-5''), 17.3(q, C-6'')。上述光谱数据与文献报道一致^[6], 鉴定为槲皮素-3-O- α -L-鼠李吡喃糖苷。

化合物3:白色粉末。¹H-NMR(CD₃COCD₃, 500 MHz) δ : 5.16(1H, d, J = 10.2 Hz, H-2), 4.86(1H, d, J = 10.7 Hz, H-3), 5.93(1H, s, H-6), 5.96(1H, s, H-8), 7.07(1H, brs, H-2'), 6.89(1H, d, J = 7.9 Hz, H-5'), 6.84(1H, d, J = 8.1 Hz, H-6'), 4.01(1H, d, J = 4.2 Hz, Ara-H-1'), 3.38~4.12(5H, m, Ara-H-2''~5'')。 ¹³C-NMR(CD₃COCD₃, 125 MHz) δ : 83.1(d, C-2), 75.0(d, C-3), 196.0(s, C-4), 165.0(s, C-5), 97.1(d, C-6), 168.1(s, C-7), 96.1(d, C-8), 163.8(s, C-9), 100.4(s, C-10), 128.6(s, C-1'), 115.5(d, C-2'), 145.9(s, C-3'), 146.9(s, C-4'), 116.0(d, C-5'), 120.6(d, C-6'), 102.1(d, C-1''), 72.4(d, C-2''), 65.6(d, C-3''), 70.4(d, C-4''), 62.2(t, C-5'')。上述光谱数据与文献报道一致^[7], 鉴定为二氢槲皮素-3-O- α -阿拉伯吡喃糖苷。

化合物4:白色粉末。¹H-NMR(CD₃COCD₃, 400 MHz) δ : 5.19(1H, d, J = 10.6 Hz, H-2), 4.69(1H, d, J = 10.6 Hz, H-3), 5.97(1H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 5.99(1H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 7.10(1H, d, J = 1.5 Hz, H-2'), 6.88(1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.92(1H, dd, J = 8.2, 1.5 Hz, H-6'), 4.13(1H, brs, Rha-H-1'), 3.32~3.90(4H, m, Rha-H-2''~5''), 1.16(3H, d, J = 6.2 Hz, Rha-H-6'')。 ¹³C-NMR(CD₃COCD₃, 100 MHz) δ : 83.3(d, C-2), 77.2(d, C-3), 196.0(s, C-4), 165.2(s, C-5), 97.0(d, C-6), 167.7(s, C-7), 95.9(d, C-8), 163.6

(s, C-9), 102.3 (s, C-10), 128.9 (s, C-1'), 116.0 (d, C-2'), 146.0 (s, C-3'), 146.8 (s, C-4'), 115.3 (d, C-5'), 120.3 (d, C-6'), 101.3 (d, C-1''), 71.3 (d, C-2''), 72.1 (d, C-3''), 73.4 (d, C-4''), 69.8 (d, C-5''), 17.9 (q, C-6''). 上述光谱数据与文献报道一致^[8], 鉴定为落新妇苷。

化合物 5: 白色粉末。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ : 4.61 (1H, d, J = 10.9 Hz, H-2), 5.11 (1H, d, J = 10.9 Hz, H-3), 5.89 (1H, s, H-6), 5.91 (1H, s, H-8), 7.36 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-2', 6'), 6.83 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-3', 5'), 4.18 (1H, brs, Rha H-1''), 3.30~4.02 (4H, m, Rha H-2''~5''), 1.17 (3H, d, J = 6.2 Hz, Rha H-6'')。¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ : 83.8 (d, C-2), 78.7 (d, C-3), 196.0 (s, C-4), 165.5 (s, C-5), 97.4 (d, C-6), 168.7 (s, C-7), 96.3 (d, C-8), 164.1 (s, C-9), 102.5 (s, C-10), 128.6 (s, C-1'), 130.0 (d, C-2', 6'), 116.4 (d, C-3', 5'), 159.4 (s, C-4'), 102.2 (d, C-1''), 71.3 (d, C-2''), 72.1 (d, C-3''), 73.4 (d, C-4''), 70.5 (d, C-5''), 17.9 (q, C-6'')。上述光谱数据与文献报道一致^[9], 鉴定为 5, 7, 4'-三羟基二氢黄酮醇-3-O- α -L-鼠李吡喃糖苷。

化合物 6: 黄色粉末。¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 5.41 (1H, dd, J = 13.0, 2.8 Hz, H-2), 3.14 (1H, dd, J = 17.0, 13.0 Hz, H-3a), 2.71 (1H, dd, J = 17.0, 2.9 Hz, H-3b), 6.00 (1H, s, H-6), 6.00 (1H, s, H-8), 7.36 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-2', 6'), 6.88 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-3', 5')。¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ : 79.8 (d, C-2), 43.3 (t, C-3), 197.1 (s, C-4), 165.1 (s, C-5), 96.7 (d, C-6), 167.2 (s, C-7), 95.8 (d, C-8), 164.2 (s, C-9), 103.1 (s, C-10), 130.6 (s, C-1'), 128.9 (d, C-2', 6'), 116.1 (d, C-3', 5'), 158.5 (s, C-4')。上述光谱数据与文献报道完全一致^[10], 鉴定为柚皮素。

化合物 7: 黄色粉末。¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 5.40 (1H, dd, J = 13.0, 2.9 Hz, H-2), 3.14 (1H, dd, J = 17.0, 13.0 Hz, H-3a), 2.70 (1H, dd, J = 17.0, 3.0 Hz, H-3b), 6.03 (1H, s, H-6), 7.37 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.88 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 5'), 1.96 (3H, s, Me)。¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ : 79.7 (d, C-2), 43.5 (t, C-3), 197.1 (s, C-4), 161.7 (s, C-5), 95.0 (d, C-6), 165.1 (s, C-7), 102.8 (s, C-8), 162.3 (s, C-9), 104.5 (s, C-10), 130.8 (s, C-1'), 128.8 (d, C-2', 6'), 116.0 (d, C-

3', 5'), 158.5 (s, C-4'), 6.9 (q, Me)。上述光谱数据与文献报道一致^[11], 鉴定为 (2S)-5, 7, 4'-三羟基-8-甲基黄烷酮。

化合物 8: 浅黄色粉末。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ : 4.17 (1H, d, J = 4.7 Hz, H-3), 4.40 (1H, d, J = 4.7 Hz, H-4), 6.00 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.09 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 7.30 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-10), 6.86 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-13), 7.07 (1H, dd, J = 8.1, 2.3 Hz, H-14), 4.98 (1H, brs, H-2'), 4.27 (1H, m, H-3'), 2.96 (1H, dd, J = 17.3, 4.6 Hz, H-4 α), 2.82 (1H, dd, J = 17.3, 8.3 Hz, H-4 β), 6.16 (1H, s, H-6'), 7.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-10'), 6.85 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-13'), 7.06 (1H, dd, J = 8.3, 2.3 Hz, H-14')。¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ : 99.7 (s, C-2), 67.3 (d, C-3), 28.6 (d, C-4), 103.9 (s, C-4a), 156.6 (s, C-5), 98.0 (d, C-6), 157.6 (s, C-7), 96.3 (d, C-8), 153.7 (s, C-8a), 132.1 (s, C-9), 115.2 (d, C-10), 145.8 (s, C-11), 144.9 (s, C-12), 116.0 (d, C-13), 120.5 (d, C-14), 81.4 (d, C-2'), 65.8 (d, C-3'), 29.4 (t, C-4'), 102.2 (s, C-4'a), 155.9 (s, C-5'), 96.1 (d, C-6'), 151.6 (s, C-7'), 106.6 (s, C-8'), 151.5 (s, C-8'a), 130.6 (s, C-9'), 115.4 (d, C-10'), 146.0 (s, C-11'), 145.4 (s, C-12'), 115.6 (d, C-13'), 119.6 (d, C-14')。上述光谱数据与文献报道一致^[6], 鉴定为 epicatechin (2 β $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 β $\rightarrow$ 8)-*ent*-epicatechin。

化合物 9: 浅黄色粉末。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ : 4.15 (1H, d, J = 4.7 Hz, H-3), 4.25 (1H, d, J = 4.7 Hz, H-4), 5.8 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.09 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 7.28 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-10), 6.73 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-13), 7.02 (1H, dd, J = 8.1, 2.3 Hz, H-14), 4.69 (1H, brs, H-2'), 4.13 (1H, m, H-3'), 2.60 (1H, dd, J = 16.6, 8.1 Hz, H-4 α), 2.82 (1H, dd, J = 16.6, 5.1 Hz, H-4 β), 6.16 (1H, s, H-6'), 7.11 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-10'), 6.80 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-13'), 6.83 (1H, dd, J = 7.9, 2.3 Hz, H-14')。¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ : 100.3 (s, C-2), 68.1 (d, C-3), 29.0 (d, C-4), 104.0 (s, C-4a), 156.8 (s, C-5), 98.1 (d, C-6), 158.1 (s, C-7), 96.5 (d, C-8), 154.2 (s, C-8a), 132.6 (s, C-9), 115.6 (d, C-10), 146.8 (s, C-11), 145.6 (s, C-12), 116.3 (d, C-13), 120.7 (d, C-14), 84.5 (d, C-2'), 62.8 (d, C-3'), 29.2 (t, C-4'), 103.1 (s, C-4'a), 156.1 (s, C-5'), 96.5 (d,

C-6 β), 152.2 (s, C-7 β), 106.8 (s, C-8 β), 151.4 (s, C-8 α), 130.5 (s, C-9 β), 115.7 (d, C-10 β), 146.8 (s, C-11 β), 146.3 (s, C-12 β), 115.7 (d, C-13 β), 119.8 (d, C-14 β)。上述光谱数据与文献报道一致^[12], 鉴定该化合物为花青素 A-1。

化合物 10: 浅黄色粉末。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ : 5.02 (1H, brs, H-2), 4.24 (1H, m, H-3), 2.78 (1H, dd, J = 16.7, 3.0 Hz, H-4 α), 2.88 (1H, dd, J = 16.7, 4.3 Hz, H-4 β), 5.8 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 5.95 (1H, s, H-8), 7.18 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-10), 6.81 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-13), 6.92 (1H, dd, J = 8.1, 1.9 Hz, H-14), 2.98 (2H, s, H-CH₂)。 ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ : 80.6 (d, C-2, 2 β), 66.5 (d, C-3, 3 β), 29.1 (t, C-4, 4 β), 100.0 (s, C-4 α , 4 β), 155.5 (s, C-5, 5 β), 97.0 (d, C-6, 6 β), 15.8 (s, C-7, 7 β), 105.5 (s, C-8, 8 β), 156.9 (s, C-8 α , 8 β), 131.3 (s, C-9, 9 β), 115.3 (d, C-10, 10 β), 145.7 (s, C-11, 11 β), 145.5 (s, C-12, 12 β), 115.7 (d, C-13, 13 β), 119.5 (d, C-14, 14 β), 16.4 (t, CH₂)。上述数据与文献报道一致^[13], 鉴定该化合物为 bis-8, 8'-catechinylmethane。

化合物 11: 无色针体 (丙酮)。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 500 MHz) δ : 4.54 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-2), 4.02 (1H, m, H-3), 2.90 (1H, dd, J = 16.1, 5.4 Hz, H-4 α), 2.53 (1H, dd, J = 16.1, 8.0 Hz, H-4 β), 5.86 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.0 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.88 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2 β), 6.78 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5 β), 6.73 (1H, dd, J = 8.1, 1.9 Hz, H-6 β)。 ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 125 MHz) δ : 82.8 (d, C-2), 68.8 (d, C-3), 28.5 (t, C-4), 157.6 (s, C-5), 96.3 (d, C-6), 156.9 (s, C-7), 95.5 (d, C-8), 157.8 (s, C-9), 100.8 (s, C-10), 132.2 (s, C-1 β), 115.2 (d, C-2 β), 146.2 (s, C-3 β), 146.2 (s, C-4 β), 116.1 (d, C-5 β), 120.0 (d, C-6 β)。上述光谱数据与儿茶素完全一致^[14], 鉴定为儿茶素。

化合物 12: 无色针状晶体 (丙酮)。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ : 4.20 (1H, d, J = 4.6 Hz, H-2), 3.75 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-3), 2.85 (1H, dd, J = 16.6, 4.6 Hz, H-4 α), 2.72 (1H, dd, J = 16.0, 3.2 Hz, H-4 β), 5.91 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-6), 6.01 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-8), 7.04 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2 β), 6.80 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5 β), 6.80 (1H, dd, J = 8.1, 1.8 Hz, H-6 β)。 ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ : 79.3 (d, C-2), 66.6 (d, C-

3), 28.9 (t, C-4), 157.7 (s, C-5), 96.2 (d, C-6), 156.9 (s, C-7), 95.3 (d, C-8), 157.6 (s, C-9), 99.4 (s, C-10), 131.8 (s, C-1 β), 115.4 (d, C-2 β), 145.4 (s, C-3 β), 145.5 (s, C-4 β), 115.5 (d, C-5 β), 118.9 (d, C-6 β)。上述光谱数据与表儿茶素完全一致^[15], 鉴定为表儿茶素。

4 小鼠脾淋巴细胞增殖研究

化合物 8~12 均为黄烷类及其二聚体, 为了考察这类化合物的相关免疫活性, 故选取了量大的化合物 8、9、11 用 MTT 法检测其对小鼠脾淋巴细胞转化率的影响。

4.1 制备小鼠脾淋巴细胞悬液: 颈椎脱臼法处死 Balb/c 小鼠, 用 75% 乙醇浸泡约 3 min 消毒; 无菌取脾并置于无血清的 RPMI1640 培养液中, 冲洗 2 次, 取约 5 mL 无血清 RPMI1640 培养液, 轻轻插入脾内吹出细胞, 重复操作数次至脾外膜透明; 收集全部细胞悬液 1 000 $\times g$ 离心 5 min 弃上清, 加入 Tris-NH₄Cl 约 3 mL, 轻轻吹匀, 去除红细胞, 1 000 $\times g$ 离心 5 min 弃上清, 重复操作 2 次; 细胞沉淀用无血清 RPMI1640 培养液重悬, 轻轻吹匀, 1 000 $\times g$ 离心 5 min 弃上清; 细胞沉淀用 RPMI1640 完全培养液重悬, Trypan Blue 染色计数活细胞 95% 以上。调整细胞密度为 5 $\times 10^9$ 个/L, 制成脾细胞悬液。

4.2 小鼠脾淋巴细胞给药: 将制备的脾淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ L。然后每孔分别加入 100 μ L 含不同浓度化合物 8、9、11 的 RPMI1640 完全培养液, 使化合物 11 终质量浓度分别为 1、5、25、50 mg/L (单药组), 或每孔分别加入 100 μ L 不同质量浓度化合物 11 (1、5、25、50 mg/L) 和 ConA (5 mg/L) 或 LPS (20 mg/L) 的混合液 (组合化合物 11 组), 同时设定阳性、阴性和空白对照组, 每组均设 4 复孔。将 96 孔细胞培养板置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中连续培养 44 h; 取出培养板, 每孔加入 20 μ L MTT 液, 继续培养 4 h; 于 1 800 $\times g$ 离心 10 min 弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO; 用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度 (A) 值, 结果以刺激指数 (SI) 值反映小鼠脾淋巴细胞增殖率的高低: SI = 药物刺激孔 $\bar{A}$ / 阴性对照孔 $\bar{A}$ 。(化合物 8、9 的质量浓度分别为 5、25、50、100 mg/L)

4.3 化合物 8、9、11 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS13.0 软件进行方差分析, 各剂量药物组与对照组比较差异显著用 * P < 0.05, ** P < 0.01 或 *** P < 0.001 进行标识, 所有试验结果均重复操作 3 次。结果见图 1。

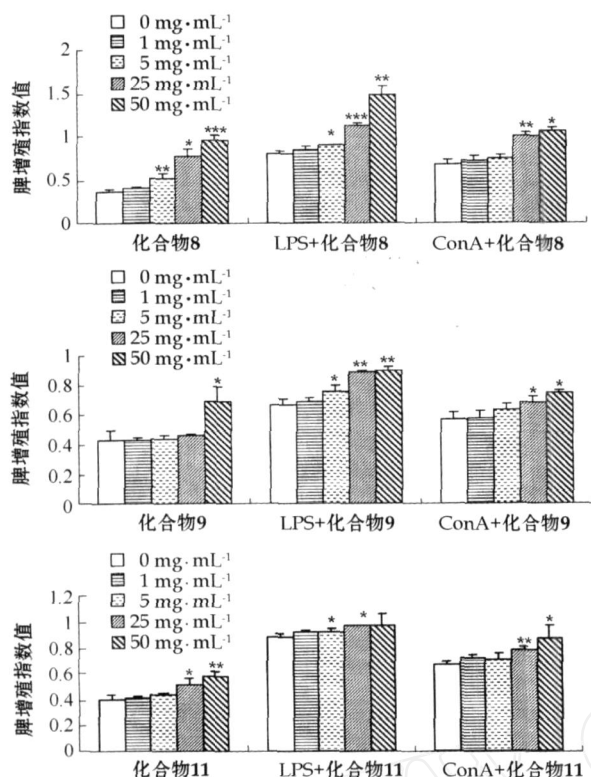


图 1 化合物 8、9、11 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 (n=3)

Fig 1 Effects of compounds 8, 9, and 11 on Balb/c mouse spleen lymphocyte proliferation (n=3)

5 讨论

从碎米花杜鹃叶的醋酸乙酯部分分离情况来看,没有分离得到杜鹃花科公认的有毒成分——木藜芦烷型二萜,进一步证实了该种为非毒性的。虽然分离所得均为黄酮类化合物,但是黄酮种类涉及典型黄酮及其苷、二氢黄酮苷、黄烷、花青素等,黄酮结构多样性突出。免疫活性试验表明,小鼠脾淋巴细胞受到化合物 8、9、11 或/和 ConA 以及 LPS 协同作用后,均在一定的浓度范围内对于小鼠脾淋巴细胞的增殖率有显著增强作用 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$),具有明显的量效关系。故初步表明化合物 8、9、11 有免疫增强的作用。以上实验对于该科植物的化学成分及其活性研究有一定的指导意义。

致谢:衷心感谢中国科学院昆明植物研究所马永朋博士在样品采集和鉴定方面做出的辛苦劳动。非常感谢昆明理工大学生命科学与技术学院微生物专业李奎同学在活性数据处理与表图制作方面给予的无私帮助。

参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [2] 钟国华, 胡美英. 杜鹃花科植物活性成分及作用机制研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(6): 509-514.
- [3] 胡梅, 肖培根. 高效薄层扫描法测定 166 种杜鹃中 6 种黄酮类成分的含量 [J]. 药学报, 1989, 24(12): 923-931.
- [4] 夏重道, 杜安全, 汪先荣. 照山白有效成分的化学研究 [J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(4): 314-315.
- [5] Pachaly P, Klein M. Inhaltsstoffe von *Andromeda polifolia* constituents of *Andromeda polifolia* [J]. *Planta Med*, 1987, 53: 442-444.
- [6] Markham K R, Ternai B, Stanley R, et al. Carbon-13 NMR studies of flavonoids- III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives [J]. *Tetrahedron*, 1978, 34(9): 1389-1397.
- [7] Chosson E, Chaboud A, Chulia A J, et al. Dihydroflavonol glycosides from *Rhododendron ferrugineum* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1431-1433.
- [8] Britto D, Manickam J, Soosai V. Determination of aglycon chirality in dihydroflavonol 3-O- α -L-rhamnosides by ^1H -NMR spectroscopy [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43(2): 338-339.
- [9] Reisch J, Raouf A, Mester H I, et al. A flavonoids from *Flindersia australis* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(9): 2114-2115.
- [10] Wadah S T, Murakami T, et al. Chemical studies of the contents of *alsophila-spinulosa* tryon [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(10): 4182-4187.
- [11] Corr 6 Dirceu de B, Guerra L F B, Gottlieb O R, et al. C-methyl phenolics from *Qualea* species [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(2): 305-307.
- [12] Lou H X, Yamazaki Y, Sasaki T, et al. A-type proanthocyanidins from peanut skins [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(2): 297-308.
- [13] Kiatgrajai P, Wellons J D, Gollob L. Kinetics of polymerization of (+)-catechin with formaldehyde [J]. *J Org Chem*, 1982, 47: 2913-2917.
- [14] Nahrstedt A, Proksch P, Conn E E. Dhurrin, (-)-catechin, flavonol glycosides and flavones from *Chamaebatia foliolosa* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(5): 1546-1547.
- [15] Morimoto S, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds X X XVIII: Isolation and characterization of flavanol glucosides and procyanidin oligomers from *Cassia* bark (*Cinnamomum cassia* Blume) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34: 633-642.