

膜苞鸢尾和中亚鸢尾中抑制脂多糖诱导小鼠 RAW264.7 细胞产生 NO 的活性成分研究

杨 阳¹, 董晓芳², 申美伦¹, 徐 尹¹, 张绪阳¹, 赵长琦²

1. 西安医学院药学院, 陕西 西安 710021

2. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875

摘要: 目的 研究鸢尾属 2 种植物膜苞鸢尾 *Iris scariosa* 和中亚鸢尾 *Iris bloudowii* 中的抗炎活性成分。方法 利用正、反相硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、反相薄层制备色谱、半制备液相色谱等技术进行分离纯化, 根据波谱学数据 (MS、¹H-NMR、¹³C-NMR) 进行化合物的结构鉴定。用脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型对分离到的化合物进行抗炎活性筛选。结果 从膜苞鸢尾的根及根状茎中分离得到 5 个化合物, 分别鉴定为鸢尾苷 (1)、野鸢尾苷 (2)、尼鸢尾苷 (3)、芒果新苷 (4)、芒果苷 (5)。从中亚鸢尾的根及根状茎中分离得到了 7 个化合物, 分别鉴定为尼鸢尾苷 (3)、尼鸢尾黄素 (6)、4'-羟基-5,3'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮 (7)、5,5'-二羟基-3',4'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮 (8)、4'-羟基-5,3'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (9)、irifloside (10) 和尼鸢尾黄素-4'-[O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1"→6")-β-D-吡喃葡萄糖苷] (11)。化合物 2、3、5、6、7、9、11 及此前报道的从膜苞鸢尾中分离得到的野鸢尾黄素和 irilone 均对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 分泌有一定的抑制作用。结论 化合物 1~5 是首次从膜苞鸢尾中分离得到, 化合物 4、6~11 是首次从中亚鸢尾中分离得到。生物活性结果提示化合物 2、3、5、6、7、9、11 以及野鸢尾黄素和 irilone 具有潜在的抗炎活性。

关键词: 鸢尾属; 膜苞鸢尾; 中亚鸢尾; RAW264.7 细胞; 抗炎活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)23-5503-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.004

Active ingredients from *Iris scariosa* and *Iris bloudowii* with inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW264.7 macrophages

YANG Yang¹, DONG Xiao-fang², SHEN Mei-lun¹, XU Yin¹, ZHANG Xu-yang¹, ZHAO Chang-qi²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

2. College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory constituents from the roots and rhizomes of *Iris scariosa* and *I. bloudowii*. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by column chromatography (silica gel, ODS, and sephadex LH-20), RP-preparative TLC, and semi-preparative HPLC. Their structures were identified by spectroscopic methods (MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR). The anti-inflammatory activities of the compounds were evaluated by the inhibition against NO production in lipopolysaccharide (LPS) activated RAW 264.7 macrophages. **Results** Five compounds including tectoridin (1), iridin (2), nigricin 4'-O-β-D-glucoside (3), neomangiferin (4), and mangiferin (5) were isolated and identified from the roots and rhizomes of *I. scariosa*. Besides, seven compounds, nigricin 4'-O-β-D-glucoside (3), nigricin (6), nigricanin (7), 5,5'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-6,7-methylenedioxyisoflavone (8), nigricanin-4'-O-β-D-glucopyranoside (9), irifloside (10), and nigricin-4'-[O-β-D-glucopyranosyl-(1"→6")-β-D-glucopyranoside] (11) were isolated and identified from the roots and rhizomes of *I. bloudowii*. Compounds 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, and previously reported chemical constituents of *I. scariosa* irigenin and irilone could inhibit NO production in RAW 264.7 macrophages to some extent. **Conclusion** Compounds 1—5 are isolated from *I. scariosa* and compounds 4 and 6—11 are isolated from *I. bloudowii* for the first time, respectively. The results of bioactivity assays indicated that compounds 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, and other two compounds irigenin and irilone isolated and purified from *I. scariosa* earlier are potential anti-inflammation agents.

Key words: *Iris* L.; *Iris scariosa* Willd. ex Link.; *Iris bloudowii* Ledeb.; RAW264.7 cell lines; anti-inflammation activity

收稿日期: 2018-08-23

基金项目: “十二五”重大新药创制科技重大专项 (2013ZX09103001-019-001); 西安医学院青年科研基金 (2016QN19); 西安医学院大学生创新创业训练项目 (2015DXS1-21)

作者简介: 杨 阳, 女, 讲师, 从事天然药物化学研究。E-mail: 57060657@qq.com

鸢尾属植物包括约 300 个种, 广泛分布于北温带地区。中国约有该属植物 60 种^[1]。鸢尾属植物在全世界的许多国家被用作传统民间药材, 治疗癌症、炎症、细菌和病毒感染等多种疾病^[2]。该属植物的化学成分主要包括黄酮类、三萜类、苯醌类和二苯乙烯类化合物^[3], 其中以黄酮类最为重要。近年来, 鸢尾属植物的天然产物研究十分活跃, 新的黄酮糖苷^[4-6]、具有环戊烷结构的多环鸢尾醛型三萜^[7]等化合物被陆续从中分离得到。本课题组曾对该属植物中的黄酮类成分和其余 3 类主要成分及其生物活性进行研究, 从该属植物中分离到的部分化合物显示出抗癌、抗炎、清除自由基、保护肝脏和心血管损伤以及治疗糖尿病等生物活性, 具有一定的开发价值^[8-9]。

近年来, 从鸢尾属植物中分离到的常规黄酮类化合物根据其结构特点可以分为 5 类: 黄酮异黄酮及其糖苷、黄酮及其糖苷、黄酮醇及其糖苷、二氢黄酮、二氢黄酮醇及其糖苷。结构母核均连有 *O*-取代官能团, 如羟基、甲氧基和亚甲二氧基。且连接位置有一定规律, A 环上主要的取代位置是 5,7-二位或 5,6,7-三位。值得注意的是, 亚甲二氧基仅连接在 A 环的 6,7-位上, 这种结构在鸢尾科其他属的植物中较为少见。B 环上最常见的取代位置是 4'-位或 3',4'-二位, 此外, 取代基还出现在 2'位、2',3'-二位或 3',4',5'-三位。另外, 分离得到的常规黄酮类化合物形成的糖苷中, 多为 7-*O*-、4'-*O*-、6-*C*-糖苷, 而 3-*O*-、5-*O*-及 8-*C*-糖苷相对少见。此外, 近年来文献报道的鸢尾属植物中的修饰黄酮有 3 类: 香豆酮并色酮类化合物 (coumaronochromones)、盾木素类似物 (peltogynoids) 和环状黄烷 (cycloflavan)。

膜苞鸢尾 *Iris scariosa* Willd. ex Link 产于我国新疆及哈萨克斯坦、俄罗斯, 其根及根状茎是我国新疆中药镰叶马蔺根的基原, 具有清热解毒、利咽的药效^[1,10]。中亚鸢尾 *Iris bloudowii* Ledeb. 主要分布于我国黑龙江、吉林、新疆等地区, 俄罗斯、哈萨克斯坦也有分布, 作为地方习用药材和民间用药被使用^[1]。

本研究从膜苞鸢尾根及根状茎的甲醇提取物中分离得到 5 个化合物, 分别鉴定为鸢尾苷 (tectoridin, **1**)、野鸢尾苷 (iridin, **2**)、尼鸢尾苷 (nigricin 4'-*O*- β -*D*-glucoside, **3**)、新芒果苷 (neomangiferin, **4**)、芒果苷 (mangiferin, **5**); 从中亚鸢尾根及根状茎的甲醇提取物中分离得到 7 个化合物, 分别鉴定为尼鸢尾苷 (nigricin 4'-*O*- β -*D*-

glucoside, **3**)、尼鸢尾黄素 (nigricin, **6**)、4'-羟基-5,3'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮 (nigricanin, **7**)、5,5'-二羟基-3',4'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮 (5,5'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-6,7-methylene-dioxyisoflavone, **8**)、4'-羟基-5,3'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮-4'-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 (nigricanin-4'-*O*- β -*D*-glucopyranoside, **9**)、irifloside (**10**) 和尼鸢尾黄素-4'-[*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1" $\rightarrow$ 6")- β -*D*-吡喃葡萄糖苷] (nigricin-4'-[*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 6")- β -*D*-glucopyranoside], **11**)。采用脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 NO 生成模型, 以吲哚美辛和 *N*-硝基-左旋精氨酸甲酯为阳性对照药, 评价以上化合物及此前从膜苞鸢尾中分离纯化的野鸢尾黄素和 irilone 对细胞 NO 生成的抑制作用, 结果提示化合物 **2**、**3**、**5**、**6**、**7**、**9**、**11** 及野鸢尾黄素和 irilone 具有潜在的抗炎作用。

1 仪器与材料

SJ-1031A 型紫外检测仪 (岛津公司, 日本); Bruker Avance 500 MHz、Bruker Avance II 400 MHz、Bruker Ascend TM 600 MHz 核磁共振仪 (Bruker 公司, 德国); Finnigan MAT 95 质谱仪 (Thermo Fisher 公司, 美国); 柱色谱硅胶 (200~300 目, AR 级), 青岛海洋化工厂; 反相 ODS Li Chrosorb RP-18, 德国 Merck 公司; 日本三菱化学大孔吸附树脂 (HP-20), 上海摩速科学器材有限公司; Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶, 瑞典安发码西亚生物技术公司; LC-6AD 型半制备液相色谱仪 (岛津公司, 日本), 色谱柱为 YMC-Pack, ODS-A (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m), N2000 色谱工作站; 氯仿 (AR 级, 成都市科龙化工试剂厂); 甲醇 (AR 级, 天津河东区红岩试剂厂); 全波长酶标仪 (Multiskan go 1510, Thermo Scientific 公司); MCO-15AC 型 CO₂ 恒温培养箱 (日本 Sanyo 公司); SW-CJ-1F 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); Ti-u 型倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); DMEM 培养基、胎牛血清 (北京协和细胞资源中心); NO 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。吲哚美辛、*N*-硝基-左旋精氨酸甲酯 (*L*-NAME); LPS, Sigma 公司。

RAW264.7 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

膜苞鸢尾和中亚鸢尾的根及根状茎分别采自新疆察布查尔锡伯自治县和新疆霍城县松树头地区,

经北京师范大学生命科学院植物分类学教授刘全儒分别鉴定为鸢尾科鸢尾属植物膜苞鸢尾 *Iris scariosa* Willd. ex Link. 和中亚鸢尾 *Iris bloudowii* Ledeb. 的根及根状茎。凭证标本(20110701ISR、20110703IBR)存放于北京师范大学生命科学院生物医学研究所。

2 方法

2.1 提取与分离

膜苞鸢尾根及根状茎 1.1 kg, 剪碎后, 于室温下用 20 倍甲醇浸泡 6 次, 每次 3 d, 提取合并 2~6 次浸提液(因第 1 次浸提液中多糖含量太高, 不利于柱色谱分离), 减压蒸馏得浸膏 135.8 g。将浸膏混悬于水中, 用氯仿萃取 6 次, 每次 500 mL, 合并萃取液, 减压回收。得到氯仿部分 23.0 g、水相提取物 96.2 g。取 16.5 g 氯仿部分进行正相硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇(10:0→0:10)梯度洗脱, 薄层色谱检测, 合并所含成分近似的洗脱液, 减压回收, 得到 25 个组分 Fr. C1~C25。Fr. C23 经正相硅胶柱色谱柱进一步分离纯化, 以石油醚-丙酮(10:0→0:10)洗脱, 得到化合物 1 (5.8 mg)。Fr. C19~C21 (200 mg) 采用反相制备液相色谱, 流动相为水-甲醇(40:60)等度洗脱, 得到化合物 2 (15.4 mg, $t_R=58.728$ min) 和 3 (6.2 mg, $t_R=85.921$ min)。取 20.3 g 水相部分进行 ODS 硅胶柱色谱, 以水-甲醇(9:1→0:10)梯度洗脱, 得到 23 个组分(Fr. H1~H23)。其中 Fr. H6 和 Fr. H9 中有析出, 分别得到化合物 4 (20.7 mg) 和 5 (14.1 mg)。

中亚鸢尾根及根状茎 1.2 kg, 剪碎后, 于室温下用 20 倍甲醇浸泡 6 次, 每次 3 d, 提取合并 2~6 次浸提液(因第 1 次浸提液中多糖含量太高, 不利于柱色谱分离), 减压蒸馏获得浸膏 153.0 g。将浸膏混悬于水中, 用氯仿萃取 6 次, 每次 500 mL, 合并萃取液, 减压回收。得到氯仿相提取物 44.3 g 和水相提取物 93.2 g。取 44.3 g 氯仿相提取物进行正相硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇(10:0→0:10)梯度洗脱, 得到 14 个组分(Fr. C1~C14)。Fr. C3 经重结晶得化合物 3 (261.2 mg)。Fr. C4 经重结晶得到化合物 6 (368.7 mg) 和组分 Fr. C4-2。对组分 Fr. C4-2 反复进行正相硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇(10:0→0:10)梯度洗脱, 得到化合物 7 (25.8 mg)。取 34.1 g 水相提取物进行正相硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇(10:0→0:10)梯度洗脱, 共得到 14 个组分(Fr. H1~H14)。Fr. H8 进行正相硅胶柱色谱, 以氯仿-

甲醇(10:0→0:10)梯度洗脱, 共得到 3 个组分(Fr. H8-1~H8-3)。其中 Fr. H8-2 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 使用甲醇洗脱, 得到化合物 9 (135.6 mg)。Fr. H10 进行 ODS 开放柱色谱分离, 使用水-甲醇(10:0→0:10)进行梯度洗脱, 得到化合物 8 (254.7 mg)。Fr. H11 先反复进行 ODS 开放柱色谱, 以水-甲醇(10:0→0:10)梯度洗脱, 后使用 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 甲醇洗脱, 得到化合物 10 (36.8 mg)。Fr. H13 进行 ODS 开放柱色谱分离, 以水-甲醇(10:0→0:10)梯度洗脱, 共得到 4 个组分(Fr. H13-1~H13-4)。其中 Fr. H13-2 先后采用葡聚糖凝胶柱色谱(甲醇)和反相薄层制备色谱(水-甲醇 4:6)进一步分离纯化, 得到化合物 11 (18.6 mg)。

2.2 化合物对 RAW264.7 细胞 NO 生成的影响

2.2.1 细胞培养 RAW 264.7 细胞培养于含 100 U/mL 双抗、10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中孵育生长, 隔日传代。

2.2.2 MTT 法检测提取物对细胞活力的影响 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液将细胞数稀释为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 培养 24 h。待细胞完全贴壁后, 给药组分别加入不同浓度的待测样品, 终浓度为 6.25、12.5、25、50、100、200 μ mol/L。溶剂对照组均不加入受试药物和 LPS, 但加入 DMSO, 体积分数为 0.1%。调零组只加培养液, 不加细胞以调零。每个实验浓度设置 3 个复孔。以上各组经培养箱培养 24 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 15 μ L, 继续培养 4 h 后吸弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 转移至酶标仪中振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。用酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A)值。根据下列公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.2.3 Griess 法测定提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放的影响 对数生长期的 RAW 264.7 细胞, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液将细胞数稀释为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔定容 200 μ L。37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 实验设置空白对照组(不加 LPS 和样品)、LPS 组(终质量浓度为 1 μ g/mL)、阳性对照组(LPS+吡嗪美辛或 L-NAME)、给药组(LPS+样品)、调零组。每组设 3 个复孔。培养 24 h 后, 以 Griess 法检测细胞上清液中亚硝酸盐(NO₂⁻)的量, 间接反映 NO 的生成量。

2.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析。按照公式计算抑制率, 得到半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{抑制率} = (A_{LPS} - A_{\text{给药}}) / (A_{LPS} - A_{\text{空白}})$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 461.105 5 $[M-H]^-$ (计算值 461.108 4, $C_{22}H_{21}O_{11}$), 确定分子式为 $C_{22}H_{22}O_{11}$ 。不饱和度为 12。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.90 (1H, s, 5-OH), 9.55 (1H, s, 4'-OH), 8.32 (1H, s, H-2), 7.33 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.88 (1H, s, H-8), 6.75 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 3.80 (3H, s, 6-OCH₃), 5.48 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-1'), 4.62 (2H, m, H-6'), 5.42~5.02 (4H, m, H-2'~5'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.9 (C-4), 157.6 (C-4'), 156.8 (C-7), 154.6 (C-9), 152.8 (C-2), 152.4 (C-5), 132.4 (C-6), 130.1 (C-2', 6'), 122.0 (C-1'), 121.0 (C-3), 115.1 (C-3', 5'), 106.4 (C-10), 94.0 (C-8), 60.3 (6-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **1** 为鸢尾苷。

化合物 **2**: 白色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 557.106 5 $[M+Cl]^-$ (计算值 557.106 2, $C_{24}H_{26}O_{13}Cl$), 确定分子式为 $C_{24}H_{26}O_{13}$ 。不饱和度为 12。 1H -NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.11 (1H, s, H-2), 6.76 (1H, s, H-8), 6.63 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.62 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6'), 5.00 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1'), 3.72 (3H, s, 6-OCH₃), 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.79 (3H, s, 5'-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 155.7 (C-2), 124.0 (C-3), 181.9 (C-4), 154.2 (C-5), 134.2 (C-6), 158.0 (C-7), 94.9 (C-8), 153.4 (C-9), 107.9 (C-10), 127.0 (C-1'), 105.1 (C-2'), 151.1 (C-3'), 137.4 (C-4'), 153.2 (C-5'), 110.6 (C-6'), 101.3 (C-1''), 70.54 (C-2''), 78.5 (C-3''), 74.1 (C-4''), 77.6 (C-5''), 62.0 (C-6''), 61.2 (6-OCH₃), 60.7 (4'-OCH₃), 55.5 (5'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[2], 故鉴定化合物 **2** 为野鸢尾苷。

化合物 **3**: 白色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 475.120 2 $[M+H]^+$ (计算值 475.124 0, $C_{23}H_{23}O_{11}$), 确定分子式为 $C_{23}H_{22}O_{11}$ 。不饱和度为 13。 1H -NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.92 (1H, s, H-2), 6.63 (1H, s, H-8), 7.32 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 7.04 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 4.82 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.82 (1H, dd, $J = 2.0, 11.6$ Hz, H-6''a), 3.62 (1H, dd, $J = 5.2, 11.6$ Hz, H-6''b), 5.99 (2H, s, 6,

7-OCH₂O-), 3.94 (3H, s, 5-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD) δ : 153.1 (C-2), 127.3 (C-3), 177.4 (C-4), 142.5 (C-5), 136.6 (C-6), 155.1 (C-7), 94.0 (C-8), 156.4 (C-9), 114.1 (C-10), 126.3 (C-1'), 131.5 (C-2'), 117.6 (C-3'), 159.0 (C-4'), 117.6 (C-5'), 131.5 (C-6'), 102.3 (C-1''), 78.1 (C-2''), 79.4 (C-3''), 74.9 (C-4''), 71.4 (C-5''), 62.6 (C-6''), 61.3 (5-OCH₃), 104.0 (6, 7-OCH₂O-)。以上数据与文献报道一致^[2], 故鉴定化合物 **3** 为尼鸢尾苷。

化合物 **4**: 黄色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 583.132 2 $[M-H]^-$ (计算值 583.129 9, $C_{25}H_{27}O_{16}$), 分子式为 $C_{25}H_{28}O_{16}$, 不饱和度 12。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.41 (1H, s, H-4), 6.98 (1H, s, H-5), 7.73 (1H, s, H-8), 4.60 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1''), 4.94 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.4 (C-1), 110.2 (C-2), 161.7 (C-3), 93.4 (C-4), 156.1 (C-4a), 101.9 (C-5), 163.9 (C-6), 143.4 (C-7), 111.6 (C-8), 107.7 (C-8a), 178.9 (C-9), 101.2 (C-8b), 152.4 (C-4b), 73.1 (C-1'), 70.4 (C-2'), 79.0 (C-3'), 70.0 (C-4'), 81.4 (C-5'), 61.3 (C-6'), 103.1 (C-1''), 72.9 (C-2''), 75.7 (C-3''), 69.3 (C-4''), 77.0 (C-5''), 60.3 (C-6'')。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **4** 为新芒果苷。

化合物 **5**: 黄色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 421.078 9 $[M-H]^-$ (计算值 421.077 1, $C_{19}H_{17}O_{11}$), 分子式为 $C_{19}H_{18}O_{11}$, 不饱和度为 11。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.76 (1H, s, 1-OH), 6.37 (1H, s, H-4), 6.87 (1H, s, H-5), 7.38 (1H, s, H-8), 4.59 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-1'), 4.04 (1H, brs, H-2'), 3.17 (3H, m, H-3'~5'), 3.69 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-6'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.7 (C-1), 107.5 (C-2), 163.7 (C-3), 93.2 (C-4), 102.5 (C-5), 153.9 (C-6), 143.6 (C-7), 107.7 (C-8), 179.0 (C-9), 111.6 (C-8a), 156.1 (C-4a), 150.7 (C-4b), 101.2 (C-8b), 73.0 (C-1'), 70.2 (C-2'), 78.9 (C-3'), 70.5 (C-4'), 81.5 (C-5'), 61.4 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **5** 为芒果苷。

化合物 **6**: 白色晶体 (甲醇)。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 313.073 4 $[M+H]^+$ (计算值 313.071 2, $C_{17}H_{13}O_6$), 确定分子式为 $C_{17}H_{12}O_6$ 。不饱和度为 12。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.19 (1H, s, H-2), 7.00 (1H, s, H-8), 7.33 (2H, d, $J = 8.4$

Hz, H-2', 6'), 6.79 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 3.89 (3H, s, 5-OCH₃) 6.18 (2H, s, 6, 7-OCH₂O-), 9.50 (1H, s, 4'-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 151.0 (C-2), 124.2 (C-3), 174.0 (C-4), 140.4 (C-5), 135.9 (C-6), 152.5 (C-7), 93.6 (C-8), 153.9 (C-9), 113.2 (C-10), 122.4 (C-1'), 130.2 (C-2'), 114.8 (C-3'), 157.1 (C-4'), 114.8 (C-5'), 130.2 (C-6'), 60.8 (5-OCH₃), 102.6 (6, 7-OCH₂O-)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **6** 为尼鸢尾黄素。

化合物 **7**: 白色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 343.081 5 [M+H]⁺ (计算值 343.081 8, C₁₈H₁₅O₇), 确定分子式为 C₁₈H₁₄O₇。不饱和度为 12。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.23 (1H, s, H-2), 7.00 (1H, s, H-8), 7.11 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.84 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.93 (1H, dd, $J = 8.4$, 1.6 Hz, H-6'), 3.90 (3H, s, 5-OCH₃), 6.18 (2H, s, 6, 7-OCH₂O-), 3.79 (3H, s, 3'-OCH₃), 9.19 (1H, s, 4'-OH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 152.5 (C-2), 124.2 (C-3), 174.0 (C-4), 140.5 (C-5), 135.9 (C-6), 151.2 (C-7), 93.5 (C-8), 153.9 (C-9), 113.2 (C-10), 122.8 (C-1'), 113.6 (C-2'), 147.1 (C-3'), 146.5 (C-4'), 115.1 (C-5'), 121.7 (C-6'), 60.7 (5-OCH₃), 102.5 (6, 7-OCH₂O-), 55.7 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **7** 为 4'-羟基-5,3'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮。

化合物 **8**: 淡黄色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 359.073 5 [M+H]⁺ (计算值 359.076 7, C₁₈H₁₅O₈), 确定分子式为 C₁₈H₁₄O₈。不饱和度为 12。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.36 (1H, s, H-2), 6.78 (1H, s, H-8), 6.55 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.60 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6'), 3.57 (3H, s, 4'-OCH₃), 6.06 (2H, s, 6, 7-OCH₂O-), 3.66 (3H, s, 5'-OCH₃), 12.78 (1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 155.1 (C-2), 125.7 (C-3), 180.6 (C-4), 141.4 (C-5), 129.7 (C-6), 154.0 (C-7), 89.5 (C-8), 150.2 (C-9), 107.4 (C-10), 122.1 (C-1'), 104.6 (C-2'), 152.9 (C-3'), 136.5 (C-4'), 150.2 (C-5'), 110.4 (C-6'), 59.9 (4'-OCH₃), 102.9 (6, 7-OCH₂O-), 55.8 (5'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **8** 为 5,5'-二羟基-3',4'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮。

化合物 **9**: 微黄色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 505.135 9 [M+H]⁺ (计算值 505.134 6, C₂₄H₂₅O₁₂), 确定分子式为 C₂₄H₂₄O₁₂。不饱和度为

13。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.27 (1H, s, H-2), 7.00 (1H, s, H-8), 7.17 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 7.12 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.02 (1H, dd, $J = 8.4$, 1.5 Hz, H-6'), 3.91 (3H, s, 5-OCH₃), 6.13 (2H, s, 6, 7-OCH₂O-), 3.80 (3H, s, 3'-OCH₃), 4.95 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.68 (1H, dd, $J = 2.0$, 11.2 Hz, H-6''a), 3.47 (1H, dd, $J = 5.2$, 11.6 Hz, H-6''b); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 151.6 (C-2), 123.9 (C-3), 173.9 (C-4), 140.4 (C-5), 135.8 (C-6), 152.6 (C-7), 93.5 (C-8), 153.9 (C-9), 113.2 (C-10), 125.7 (C-1'), 113.8 (C-2'), 148.5 (C-3'), 146.2 (C-4'), 115.1 (C-5'), 121.4 (C-6'), 100.1 (C-1''), 73.2 (C-2''), 79.1 (C-3''), 69.7 (C-4''), 76.8 (C-5''), 60.6 (C-6''), 60.7 (5-OCH₃), 102.6 (6, 7-OCH₂O-), 55.8 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[2], 故鉴定化合物 **9** 为 4'-羟基-5,3'-二甲氧基-6,7-亚甲二氧基异黄酮-4'-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **10**: 微黄色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 491.120 7 [M+H]⁺ (计算值 491.119 0, C₂₃H₂₃O₁₂), 确定分子式为 C₂₃H₂₂O₁₂。不饱和度为 13。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.49 (1H, s, H-2), 6.87 (1H, s, H-8), 7.19 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 7.13 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.07 (1H, dd, $J = 8.5$, 1.5 Hz, H-6'), 12.88 (1H, s, 5-OH), 6.16 (2H, s, 6, 7-OCH₂O-), 3.78 (3H, s, 3'-OCH₃), 4.94 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.68 (1H, dd, $J = 4.8$, 11.2 Hz, H-6''a), 3.48 (1H, dd, $J = 5.7$, 11.6 Hz, H-6''b); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 155.0 (C-2), 121.8 (C-3), 180.7 (C-4), 141.3 (C-5), 129.6 (C-6), 154.0 (C-7), 89.5 (C-8), 152.9 (C-9), 107.4 (C-10), 124.2 (C-1'), 113.6 (C-2'), 148.6 (C-3'), 146.6 (C-4'), 115.2 (C-5'), 121.4 (C-6'), 100.0 (C-1''), 73.2 (C-2''), 77.0 (C-3''), 69.7 (C-4''), 76.8 (C-5''), 60.6 (C-6''), 102.9 (6, 7-OCH₂O-), 55.8 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **10** 为 irifloside。

化合物 **11**: 白色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 659.160 3 [M+Na]⁺ (计算值 659.158 8, C₂₉H₃₂O₁₆Na), 确定分子式为 C₂₉H₃₂O₁₆。不饱和度为 14。¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.96 (1H, s, H-2), 6.65 (1H, s, H-8), 7.34 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.07 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 3.95 (3H, s, 5-OCH₃), 6.00 (2H, s, 6, 7-OCH₂O-), 4.87 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 4.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ : 153.2 (C-2), 126.4

(C-3), 177.5 (C-4), 142.6 (C-5), 136.6 (C-6), 155.1 (C-7), 94.0 (C-8), 156.4 (C-9), 114.1 (C-10), 127.2 (C-1'), 131.7 (C-2'), 117.6 (C-3'), 158.7 (C-4'), 117.6 (C-5'), 131.7 (C-6'), 101.8 (C-1''), 75.3 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.5 (C-4''), 77.9 (C-5''), 69.6 (C-6''), 104.5 (C-1'''), 74.9 (C-2'''), 77.8 (C-3'''), 71.7 (C-4'''), 78.0 (C-5'''), 62.8 (C-6'''), 61.3 (5-OCH₃), 104.0 (6, 7-OCH₂O-). 以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **11** 为尼鸢尾黄素-4'-[O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1'''→6'')-β-D-吡喃葡萄糖苷]。

表 1 化合物对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Effect of compounds from *I. scariosa* and *I. bloudowii* on RAW264.7 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	细胞存活率/%					
	6.25 μmol·L ⁻¹	12.5 μmol·L ⁻¹	25 μmol·L ⁻¹	50 μmol·L ⁻¹	100 μmol·L ⁻¹	200 μmol·L ⁻¹
1	109.23 ± 6.89	106.57 ± 2.20	103.44 ± 7.34	98.21 ± 8.23	94.90 ± 3.91	91.04 ± 4.76
2	117.45 ± 9.97	108.35 ± 4.90	95.20 ± 3.76	92.10 ± 7.23	90.11 ± 5.94	86.77 ± 11.21
3	99.80 ± 13.02	97.23 ± 8.77	95.45 ± 9.45	93.12 ± 5.76	90.21 ± 8.82	82.06 ± 10.03
4	NT					
5	100.09 ± 8.34	99.23 ± 5.11	97.70 ± 7.33	97.60 ± 5.88	95.08 ± 10.22	94.00 ± 9.01
6	104.28 ± 6.89	93.70 ± 3.29	95.12 ± 9.88	92.10 ± 10.09	92.06 ± 7.89	78.23 ± 9.99
7	NT					
8	102.12 ± 13.23	106.23 ± 11.11	99.80 ± 9.90	98.23 ± 4.30	97.44 ± 6.90	87.94 ± 7.12
9	97.23 ± 5.92	96.28 ± 5.21	95.09 ± 8.49	97.14 ± 3.21	93.65 ± 7.44	80.68 ± 8.69
10	NT					
11	116.27 ± 10.24	113.34 ± 6.89	106.28 ± 4.98	102.78 ± 6.57	96.70 ± 4.90	89.27 ± 6.01
野鸢尾黄素	105.99 ± 9.01	103.23 ± 2.34	101.78 ± 7.09	99.90 ± 7.23	91.52 ± 3.08	84.01 ± 7.87
irilone	99.99 ± 6.70	96.21 ± 8.66	90.85 ± 5.58	93.69 ± 11.65	90.25 ± 8.04	71.09 ± 3.95

NT-未测试, 下同

NT-not tested, same as below

化合物 **2**、**3**、**5**、**6**、**7**、**9**、**11** 及野鸢尾黄素和 irilone 抑制 NO 生成的 IC₅₀ 值分别为(66.06 ± 1.24)、(99.34 ± 3.20)、(177.67 ± 7.23)、(79.23 ± 3.77)、(60.08 ± 1.32)、(102.39 ± 8.71)、(51.21 ± 3.98)、(14.30 ± 2.60)、(77.48 ± 5.02) μmol/L。与阳性对照药吲哚美辛和 L-NAME 相比^[17-19], 化合物 **2**、**3**、**6**、**7**、**9**、**11** 及野鸢尾黄素和 irilone IC₅₀ 值皆小于阳性对照药, 且具有统计学意义 ($P < 0.001$), 结果见表 2。

由于部分化合物的结构相似, 只有个别取代基的不同, 因此可简单讨论它们对 NO 抑制活性的构效关系。(1) 野鸢尾黄素、nigricanin 和尼鸢尾黄素的活性分别强于野鸢尾苷、nigricanin-4'-O-β-D-glucoside 和尼鸢尾苷。说明糖单元会降低该类黄酮类化合物对 NO 的抑制活性。而例外是, 尼鸢尾黄素-4'-[O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1'''→6'')-β-D-吡喃葡萄糖苷] 的活性则强于尼鸢尾苷和尼鸢尾黄素。(2) 野鸢尾黄素的活性最强, 提示 5',7-二羟基可能是黄酮类化合物抑制 NO 生成的活性基团。(3) 尼鸢尾

3.2 抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 NO 生成实验

关于活性测试的对象, 除本实验分得的化合物外, 还测试了此前从膜苞鸢尾中分离得到的 2 个化合物野鸢尾黄素和 irilone。首先通过 MTT 实验测试化合物对 RAW264.7 细胞活力的影响, 确定化合物的无毒剂量范围。实验结果表明, 鸢尾苷(**1**)和芒果苷(**5**)在 6.25~200.00 μmol/L 时对细胞生长无影响, 其余化合物在 6.25~100.00 μmol/L 时对细胞生长无影响, 存活率大于 90%。具体结果见表 1。

表 2 化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成的抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Inhibition of NO production in LPS induced RAW 264.7 macrophages by compounds from *I. scariosa* and *I. bloudowii* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)
1	>200
2	66.06 ± 1.24 ^{***}
3	99.34 ± 3.20 ^{***}
4	NT
5	177.67 ± 7.23
6	79.23 ± 3.77 ^{***}
7	60.08 ± 1.32 ^{***}
8	NT
9	102.39 ± 8.71 ^{***}
10	NT
11	51.21 ± 3.98 ^{***}
野鸢尾黄素	14.30 ± 2.60 ^{***}
irilone	77.48 ± 5.02 ^{***}
吲哚美辛	146.50 ± 9.02
L-NAME	167.82 ± 11.68

与吲哚美辛组比较: ** $P < 0.01$; 与 L-NAME 组比较: [#] $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.01$ vs indomethacin; ^{##} $P < 0.01$ vs L-NAME group.

黄素的活性强于 irilone, 提示 5 羟基的甲基化可能会增强 NO 的抑制活性。化合物对 NO 抑制活性的构效关系规律与文献报道相一致^[20]。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [2] Rahman A U, Nasim S, Baig I, *et al.* Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(8): 1100-1102.
- [3] Rahman A U, Nasim S, Baig I, *et al.* Two new isoflavanoids from the rhizomes of *Iris soforana* [J]. *Nat Prod Res*, 2004, 18(5): 465-471.
- [4] Shi G R, Wang X, Liu Y F, *et al.* Bioactive flavonoid glycosides from whole plants of *Iris japonica* [J]. *Phytochem Lett*, 2017, 19: 141-144.
- [5] Zhang C L, Wang Y, Liu Y F, *et al.* Two new flavonoid glycosides from *Iris tectorum* [J]. *Phytochem Lett*, 2016, 15: 63-65.
- [6] Meng Y, Qin M, Qi B, *et al.* Four new C-glycosylflavones from the leaves of *Iris lactea* Pall. var. *chinensis* (Fisch.) Koidz [J]. *Phytochem Lett*, 2017, 22: 33-38.
- [7] Zhang C L, Hao Z Y, Liu Y F, *et al.* Polycycloiridals with a cyclopentane ring from *Iris tectorum* [J]. *J Nat Prods*, 2017, 80(1): 156-161.
- [8] 杨 阳, 杨黎彬, 赵长琦. 鸢尾属植物中的黄酮类成分及其生物活性 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1692-1703.
- [9] 杨 阳, 陈洁君, 张大勇, 等. 鸢尾属植物的化学成分及生物活性 [J]. 有机化学, 2013, 33: 1244-1253.
- [10] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [11] 李 蓉, 秦民坚. 薄叶鸢尾的化学成分研究 [J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(2): 122-124.
- [12] Youn U J, Jang J E, Nam J W, *et al.* Anti-respiratory syncytial virus (RSV) activity of timosaponin A-III from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(7): 1062-1065.
- [13] 杨 阳, 陈洁君, 王辉等. 膜苞鸢尾和蓝花喜盐鸢尾的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1371-1375.
- [14] Al-Khalil S, Al-Eisawi D, Kato M, *et al.* New isoflavones from *Iris nigricans* [J]. *J Nat Prods*, 1994, 57(2): 201-205.
- [15] Xie G Y, Qin X Y, Liu R, *et al.* New isoflavones with cytotoxic activity from the rhizomes of *Iris germanica* L. [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(23): 2173-2177.
- [16] Nasim S, Baig I, Orhan I, *et al.* Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica* [J]. *Helv Chim Acta*, 2003, 86(10): 3354-3362.
- [17] Salvatore G, Vito A T, Serena F, *et al.* Inhibition of nitric oxide production by natural oxyprenylated coumarins and alkaloids in RAW 264.7 cells [J]. *Phytochem Lett*, 2017, 20: 181-185.
- [18] Nathalie R, Sabine A, Ulrich H, *et al.* Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages [J]. *Planta Med*, 2011, 77(17): 1890-1897.
- [19] Kim A R, Cho J Y, Zou Y, *et al.* Flavonoids differentially modulate nitric oxide production pathways in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(3): 297-304.
- [20] Matsuda H, Morikawa T, Ando S, *et al.* Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action [J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11(9): 1995-2000.