

补骨脂中对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞产生一氧化氮抑制作用的补骨脂酚及其衍生物

吕 倩, 许青霞, 张英涛*, 杨秀伟*

北京大学药学院 天然药物学系, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

摘要: 目的 研究补骨脂 70%乙醇水提取物的环己烷溶性部分的补骨脂酚及其衍生物对脂多糖(LPS)诱导的鼠性巨噬细胞 RAW 264.7 产生一氧化氮(NO)抑制作用的生物学活性。方法 采用硅胶、高效液相色谱等柱色谱方法进行分离纯化, 通过化合物的谱学数据鉴定其结构。采用 LPS 离体诱导 RAW264.7 细胞的 NO 生成模型, 研究化合物对 NO 生成的抑制活性。结果 从补骨脂 70%乙醇水提取物的环己烷溶性部分分离出 12 个化合物, 分别鉴定为补骨脂酚(1)、12,13-二氢-12,13-环氧补骨脂酚(2)、 $\Delta^3,2$ -羟基补骨脂酚(3)、12-氧代补骨脂酚(4)、补骨脂醚酚 B(5)、补骨脂醚酚 C(6)、(12'S)-双补骨脂酚 C(7)、 $\Delta^{1,3}$ -补骨脂酚(8)、13-甲氧基补骨脂酚(9)、双补骨脂酚 B(10)、双补骨脂酚 A(11)和 12,13-二氢-12,13-二羟基补骨脂酚(12)。在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 生成实验模型中, 以 L-N⁶-(1-亚胺乙基)-赖氨酸(L-NIL)应用为阳性对照药, 其抑制 NO 生成的半数抑制浓度(IC₅₀)为(10.29±1.10) μmol/L。化合物 1、3、5、10、11 抑制作用的 IC₅₀ 值大于 50 μmol/L, 化合物 8、9、12 的 IC₅₀ 值接近于阳性药, 但化合物 2、4、7 的 IC₅₀ 值皆小于阳性对照药, 且具有统计学意义。结论 化合物 4 为新的天然产物。生物活性实验结果提示化合物 2、4、7~9、12 可能具有潜在的抗炎作用。

关键词: 补骨脂; 豆科; 补骨脂酚; 补骨脂酚衍生物; RAW 264.7 细胞株; 物质基础; 12-氧代补骨脂酚; (12'S)-双补骨脂酚 C; $\Delta^{1,3}$ -补骨脂酚; 13-甲氧基补骨脂酚

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)02-0307-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.005

Inhibition of bakuchiol and its derivatives in *Psoraleae Fructus* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cell lines

LV Qian, XU Qing-xia, ZHANG Ying-tao, YANG Xiu-wei

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Objective To study bakuchiol and its derivatives of cyclohexane soluble part in 70% ethanol aqueous extract of *Psoraleae Fructus* and their inhibition on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharides (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cell lines. **Methods** The compounds were separated and purified by silica gel column and high performance liquid chromatographies, and their structures were determined by spectroscopic data analyses. Using LPS-activated RAW 264.7 cell line models *in vitro*, all of the isolated compounds were evaluated for the inhibition against NO production. **Results** Twelve compounds were obtained and identified as bakuchiol (1), 12,13-dihydro-12,13-epoxybakuchiol (2), $\Delta^3,2$ -hydroxybakuchiol (3), 12-oxobakuchiol (4), psoracorylifol B (5), psoracorylifol C (6), (12'S)-bisbakuchiol C (7), $\Delta^{1,3}$ -bakuchiol (8), 13-methoxyisobakuchiol (9), bisbakuchiol B (10), bisbakuchiol A (11), and 12,13-dihydro-12,13-dihydroxybakuchiol (12), respectively. For the inhibition of NO production in the LPS-activated RAW 264.7 cell line model, a positive inhibitor, L-N⁶-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL), was used and showed the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of (10.29 ± 1.10) μmol/L. The IC₅₀ values of the assayed compounds 1, 3, 5, 10 and 11 were all more than 50 μmol/L, compounds 8, 9 and 12 were comparable to that of L-NIL, whereas the IC₅₀ values of compounds 2, 4 and 7 were less than that of the positive inhibitor with statistically significance. **Conclusion** Compound 4 is a new natural product.

收稿日期: 2019-11-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81773865)

作者简介: 吕 倩, 女, 硕士研究生, 主要从事中草药生物活性物质基础研究。Tel: (010)82801559; E-mail: 932077462@qq.com

*通信作者 杨秀伟, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药有效物质基础和药物代谢研究。Tel: (010)82801569 E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn
张英涛, 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药资源学研究。Tel: (010)82801559 E-mail: zytiao@bjmu.edu.cn

The results of the bioactivity assays indicated that compounds **2**, **4**, **7**, **8**, **9** and **12** are potential anti-inflammatory agents.

Key words: *Psoraleae Fructus*; Leguminosae; bakuchiol; bakuchiol derivatives; RAW 264.7 cell lines; substance foundation; 12-oxobakuchiol; (12'S)-bisbakuchiol C; $\Delta^{1,3}$ -bakuchiol; 13-methoxyisobakuchiol

传统中药补骨脂 *Psoraleae Fructus* 为豆科 (Leguminosae) 植物 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 始载于《开宝本草》, 具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻、消风祛斑之功效, 常用于肾阳不足、阳痿遗精、遗尿尿频、五更泄泻等症, 或外用治疗白癜风、斑秃等皮肤病^[1]; 亦可用于保健食品。补骨脂原产于四川、云南, 常生长于山坡、溪边、田边, 河北、山西、甘肃、安徽、江西、河南、广东、广西、贵州、重庆等省区有栽培; 印度、缅甸、斯里兰卡也有分布^[2]。中药物质基础研究是中药继承、发展、创新的关键科学问题^[3]。在对补骨脂的系列研究中, 本课题组曾报道了补骨脂中黄酮类化合物异补骨脂查耳酮 (isobavachalcone)、补骨脂二氢黄酮甲醚 (bavachinin)^[4-5]、补骨脂二氢黄酮 (bavachin) 和补骨脂查耳酮 (bavachalcone)^[5] 的分离纯化及其某些生物学活性。本研究从补骨脂 70% 乙醇水提取物的环己烷溶性部分分离鉴定出 12 个化合物, 分别鉴定为补骨脂酚 (bakuchiol, **1**)、12,13-二氢-12,13-环氧补骨脂酚 (12,13-dihydro-12,13-epoxybakuchiol, **2**)、 $\Delta^3,2$ -羟基补骨脂酚 ($\Delta^3,2$ -hydroxybakuchiol, **3**)、12-氧代补骨脂酚 (12-oxobakuchiol, **4**)、补骨脂醚酚 B (psoracorylifol B, **5**)、补骨脂醚酚 C (psoracorylifol C, **6**)、(12'S)-双补骨脂酚 C [(12'S)-bisbakuchiol C, **7**]、 $\Delta^{1,3}$ -补骨脂酚 ($\Delta^{1,3}$ -bakuchiol, **8**)、13-甲氧基异补骨脂酚 (13-methoxyisobakuchiol, **9**)、双补骨脂酚 B (bisbakuchiol B, **10**)、双补骨脂酚 A (bisbakuchiol A, **11**) 和 12,13-二氢-12,13-二羟基补骨脂酚 (12,13-dihydro-12,13-dihydroxybakuchiol, **12**)。化合物 **4** 为新的天然产物。采用脂多糖 (LPS) 诱导的鼠性巨噬细胞 RAW 264.7 细胞系一氧化氮 (NO) 生成模型, 以 *L*- N^6 -(1-亚胺乙基)-赖氨酸 [*L*- N^6 -(1-iminoethyl)-lysine, *L*-NIL] 为阳性对照药, 评价了所有分离鉴定化合物对 NO 生成的抑制作用, 生物活性结果提示化合物 **2**、**4**、**7**~**9**、**12** 可能具有潜在的抗炎作用。

1 仪器与材料

Finnigan TRACE 2000 型质谱仪 (EI-MS; Thermo Finnigan Inc., San Jose, CA, USA); MDS

SCIEX API QSTAR 型质谱仪 (ESI-TOF-MS; Applied Biosystems/MDS Sciex., Foster, CA, USA) 和 Waters Xevo G2 Q-TOF 高分辨电喷雾离子源质谱仪 (HR-ESI-TOF-MS, Waters, Milford, MA, USA); Bruker AV III 400 型核磁共振波谱仪 (NMR; Bruker BioSpin AG Facilities, Fällanden, Switzerland), 四甲基硅烷为内标; 反相制备高效液相色谱为 LC 3000 HPLC 仪系统 (北京创新通恒科技有限公司), 配置 P3050 二元泵, CXTH-3000 色谱工作站; 色谱柱为 Phenomenex Prodigy ODS (250 mm $\times$ 21.2 mm, 10 μ m; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA); Galaxy B 型 CO₂ 气体培养箱 (英国 RS Biotech 公司), JJT-1300 型超净工作台 (北京昌平长城空气净化公司); UV_{max} Kinetic Microplate Reader (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, California, CA, USA); XDS-1 倒置显微镜 (重庆光电仪器总公司); HZS-H 型恒温水浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); TGL-16C 型高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶板 (TLC) 分别为青岛海洋化工厂和 Merck 公司 (Darmstadt, Germany) 产品; 200~300 目柱色谱用硅胶为青岛海洋化工厂生产; 96 孔板和 25 cm² 细胞培养瓶购自美国 Corning Costar 公司 (Cambridge, MA, USA)。

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA (trypsin-EDTA)、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco[®] Laboratories 公司 (Grand Island, NY, USA); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、阳性对照药 *L*-NIL、二甲基亚砷 (DMSO)、Griess 试剂、LPS 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 双抗 (penicillin-streptomycin solution) 购自美国 HyClone 公司; 实验使用超纯水用美国 Millipore 纯水机制备; 分析纯乙醇、环己烷、丙酮等为北京化工厂产品; 色谱纯乙腈为美国 Fisher Chemical 产品。

RAW 264.7 细胞株 (3111C0001CCC000146) 购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

补骨脂药材于 2016 年 10 月采集于云南省临沧

市耿马县,经北京大学杨秀伟教授鉴定为豆科补骨脂属植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实,凭证标本(BGZ201610)存放于北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室。

2 方法

2.1 提取与分离

47.9 kg 的补骨脂粉末经 70%乙醇水回流提取 3 次,得醇提部位 8.2 kg (出膏率为 17.12%)。取 6.0 kg 粗提物溶解于热水中,用环己烷萃取 8 次,合并环己烷萃取液,得到环己烷部位 1.2 kg。取环己烷部位 1.0 kg,经硅胶柱(800 mm×140 mm)色谱,环己烷-醋酸乙酯(5:1、3:1、1:1、2:3、1:3、0:1)梯度洗脱,薄层色谱(TLC)检识,合并相同或相似流分,得到 26 个流分 Fr. A~Z。

Fr. B (27.2 g) 经硅胶柱(650 mm×55 mm)色谱,石油醚-醋酸乙酯(100:1、50:1、25:1、7:1、5:1、3:1、1:1、1:3、0:100)梯度洗脱,TLC 分析引导合并,得到 15 个流分 Fr. B-1~B-15。Fr. B-8 (2.1 g) 经反相硅胶柱色谱,乙腈-水(40:60→100:1)洗脱,得到 13 个流分 Fr. B-8-1~B-8-13。Fr. B-8-12 经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(70:30)等度洗脱,得到化合物 1 (30 mg, $t_R=72$ min)。

Fr. C (136.0 g) 经硅胶柱(120 mm×600 mm)色谱,石油醚-醋酸乙酯(100:1、50:1、20:1、15:1、10:1、5:1、5:2、1:1、0:100)梯度洗脱,TLC 分析引导合并,得到 16 个流分 Fr. C-1~C-16。Fr. C-4 (21.7 g) 经硅胶柱(650 mm×55 mm)色谱,石油醚-三氯甲烷(100:1、50:1、10:1、5:2、1:1、0:100)梯度洗脱,TLC 分析引导合并,得到 7 个流分 Fr. C-4-1~C-4-7。Fr. C-4-6 经 Sephadex LH-20 柱色谱,甲醇洗脱,再经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(52:48)等度洗脱,得到化合物 2 (21 mg, $t_R=55$ min)。Fr. C-6 (0.8 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱,甲醇洗脱,再经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(40:60)等度洗脱,得到化合物 3 (4 mg, $t_R=63$ min)。Fr. C-10 (2.1 g) 经半制备 HPLC (乙腈-水 9:1) 等度洗脱,得到 7 个流分 Fr. C-10-1~Fr. C-10-7。Fr. C-10-3 经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(52:48)等度洗脱,得到化合物 4 (3 mg, $t_R=65$ min)。Fr. C-10-5 经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(52:48)等度洗脱,得到化合物 5 (37 mg, $t_R=74$ min)。Fr. C-10-6 经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(52:48)等度洗脱,得到化合物 6 (48 mg, $t_R=86$ min)。

Fr. C-11 (2.1 g) 经半制备 HPLC (乙腈-水 90:10) 后再经石油醚-三氯甲烷(10:1)薄层色谱制备,得到化合物 7 (20 mg, $t_R=71$ min)。Fr. C-14 (1.1 g) 经半制备 HPLC (乙腈-水 90:10) 色谱后再经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(52:48)等度洗脱,得到化合物 8 (4 mg, $t_R=35$ min)。

Fr. D (335.0 g) 经硅胶柱(140 mm×800 mm)色谱,石油醚-三氯甲烷(100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:3、0:100)梯度洗脱,TLC 分析引导合并,得到 14 个流分 Fr. D-1~D-14。Fr. D-7 (1.7 g) 经半制备 HPLC (甲醇-水 94:6) 纯化,得到 12 个流分 Fr. D-7-1~D-7-12。Fr. D-7-1 再经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(52:48)等度洗脱,得化合物 9 (14 mg, $t_R=63$ min)。Fr. D-9 (37.0 g) 经硅胶柱(650 mm×55 mm)色谱,石油醚-三氯甲烷(100:1、50:1、20:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、1:1、1:3、0:100)梯度洗脱,TLC 分析引导合并,得到 28 个流分 Fr. D-9-1~D-9-28。其中,Fr. D-9-25 经制备 HPLC 纯化,甲醇-水(92:8)等度洗脱,得到化合物 10 (15 mg, $t_R=118$ min) 和 11 (26 mg, $t_R=124$ min)。Fr. D-12 (2.4 g) 经半制备 HPLC (乙腈-水 90:10) 分离,得到 13 个流分 Fr. D-12-1~D-12-13。Fr. D-12-2 经 Sephadex LH-20 柱色谱,甲醇洗脱,再经制备 HPLC 纯化,乙腈-水(26:74)等度洗脱,得到化合物 12 (27 mg, $t_R=160$ min)。

2.2 细胞培养液和其他溶液的配制

DMEM-15 和 -10 培养液、Griess 显色剂、MTT 工作液、三联液按文献报道方法^[6]制备。

2.3 RAW 264.7 细胞培养

用完全 DMEM-15 培养基复苏冻存的 RAW 264.7 细胞,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,待细胞状态、生长速度正常后,改用完全 DMEM-10 培养液培养,每天换液,待细胞在细胞瓶中生长达到 80% 时传代,传代比例为 1:3~1:5。

2.3.1 MTT 法测定细胞存活率 按“2.3.2”项中的操作取出上清后,原培养板每孔加入 20 μL 的 MTT (5 mg/mL) 工作液,继续温孵培养 4 h 后,每孔加入三联液 100 μL,培养箱中放置 10 h。用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。为保证结果的可靠性及实验的稳定性,所有实验在相同条件下重复 3 次。

细胞存活率 = $A_{\text{给药}}/A_{\text{对照}}$

2.3.2 LPS 诱导小鼠巨噬细胞释放 NO 模型的制备 取对数生长期 RAW 264.7 细胞, 用移液器轻柔吹打成细胞悬液, 用完全 DMEM-10 培养液调整细胞密度为 3×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中 (边缘用无菌水填充), 每孔 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下温孵培养 12 h 后加入 50 μL 终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 和 50 μL 受试化合物溶液 (化合物以 DMSO 溶解并用培养液稀释至目标浓度), 同时设模型组、阳性对照组 (*L-NIL*)、正常对照组和空白对照组 (只加入培养液, 不加细胞以调零), 每组设 3 个平行孔, 继续温孵培养 24 h。每孔取上清 100 μL 置于 96 孔板中, 加入 100 μL 配制好的 Griess 试剂, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 15 min, 置于酶标仪中于 540 nm 处测定 *A* 值, 采用标准曲线法计算 NO 浓度 (以 NaNO_2 作为制备标准曲线的对照品), 所获数据用 SPSS 16.0 软件统计处理, 计算抑制率, 求出半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。为保证结果的可靠性及实验的稳定性, 所有实验在相同的条件下皆重复进行 3 次。

$\text{NO 抑制率} = 1 - \text{实验组 NO 浓度} / \text{正常对照组 NO 浓度}$

2.4 数据处理和 IC_{50} 值计算

所有生物活性试验为 3 个独立的实验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 IC_{50} 值采用 SPSS 16.0 软件进行回归计算, 组间比较采用 One-Way ANOVA 检验。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色油状物; EI-MS m/z : 256 $[\text{M}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.25 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.76 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.25 (1H, d, $J = 16.3$ Hz, H-7), 6.05 (1H, d, $J = 16.3$ Hz, H-8), 1.95 (2H, m, H-10), 1.50 (2H, m, H-11), 5.11 (1H, tt, $J = 8.4, 7.1, 1.4$ Hz, H-12), 1.67 (3H, s, H-14), 1.58 (3H, s, H-15), 1.19 (3H, s, H-1'), 5.88 (1H, dd, $J = 17.4, 10.8$ Hz, H-2'), 5.04 (1H, dd, $J = 10.8, 1.3$ Hz, H-3'a), 5.00 (1H, dd, $J = 17.4, 1.3$ Hz, H-3'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 130.9 (C-1), 127.4 (C-2, 6), 115.4 (C-3, 5), 154.6 (C-4), 126.5 (C-7), 135.9 (C-8), 42.5 (C-9), 41.3 (C-10), 23.2 (C-11), 124.8 (C-12), 131.3 (C-13), 17.6 (C-14), 25.7 (C-15), 23.4 (C-1'), 146.0 (C-2'), 111.9 (C-3')。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为补骨脂酚, 化学结构见图 1。

化合物 **2**: 浅黄色油状物; EI-MS m/z : 272 $[\text{M}]^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.23 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.77 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.26 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.02 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 1.70 (2H, m, H-10), 1.55 (2H, m, H-11), 2.75 (1H, brt, $J = 6.4$ Hz, H-12), 1.31 (3H, s, H-14), 1.26 (3H, s, H-15), 1.19 (3H, s, H-1'), 5.86 (1H, ddd, $J = 17.4, 10.8, 1.0$ Hz, H-2'), 5.05 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-3'a), 5.06 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-3'b)^[7]; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 130.4 (C-1), 127.4 (C-2, 6), 115.4 (C-3, 5), 155.0 (C-4), 126.9 (C-7), 135.1 (C-8), 42.2 (C-9), 37.5 (C-10), 24.9 (C-11), 65.0 (C-12), 59.0 (C-13), 18.6 (C-14), 24.1 (C-15), 23.3 (C-1'), 145.4 (C-2'), 112.4 (C-3')^[8]。以上数据与文献报道一致, 故鉴定化合物 **2** 为 12,13-二氢-12,13-环氧补骨脂酚, 化学结构见图 1。

化合物 **3**: 无色油状物; EI-MS m/z : 272 $[\text{M}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.23 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.75 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.24 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.04 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 2.21 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-10), 5.62 (1H, dt, $J = 15.5, 6.0$ Hz, H-11), 5.58 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-12), 1.30 (6H, s, 14, 15- CH_3), 1.16 (3H, s, H-1'), 5.88 (1H, dd, $J = 17.4, 10.7$ Hz, H-2'), 5.04 (1H, dd, $J = 10.7, 1.3$ Hz, H-3'a), 5.00 (1H, dd, $J = 17.4, 1.3$ Hz, H-3'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 130.5 (C-1), 127.4 (C-2, 6), 115.4 (C-3, 5), 154.9 (C-4), 126.8 (C-7), 135.2 (C-8), 42.6 (C-9), 43.9 (C-10), 123.2 (C-11), 140.9 (C-12), 71.0 (C-13), 29.7 (C-14), 29.7 (C-15), 23.5 (C-1'), 145.5 (C-2'), 112.2 (C-3')。上述数据与文献报道基本一致^[7,9], 故鉴定化合物 **3** 为 $\Delta^3,2$ -羟基补骨脂酚, 化学结构见图 1。

化合物 **4**: 无色油状物; EI-MS m/z : 272 $[\text{M}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.24 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.78 (2H, brd, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 6.26 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.00 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 1.79 (2H, t, $J = 8.1$ Hz, H-10), 2.43 (2H, t, $J = 8.1$ Hz, H-11), 2.58 (1H, m, H-13), 1.07 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 14- CH_3), 1.06 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 15- CH_3), 1.18 (3H, s, 1'- CH_3), 5.84 (1H, dd, $J = 17.4, 10.7$ Hz, H-2'), 5.06 (1H, dd, $J = 10.7, 1.2$ Hz, H-3'a), 5.02 (1H, dd, $J = 17.4, 1.2$ Hz, H-3'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 130.5 (C-1), 127.4 (C-2, 6), 115.4 (C-3, 5), 154.8 (C-4), 127.0 (C-7), 134.9 (C-8), 42.0 (C-9), 34.1

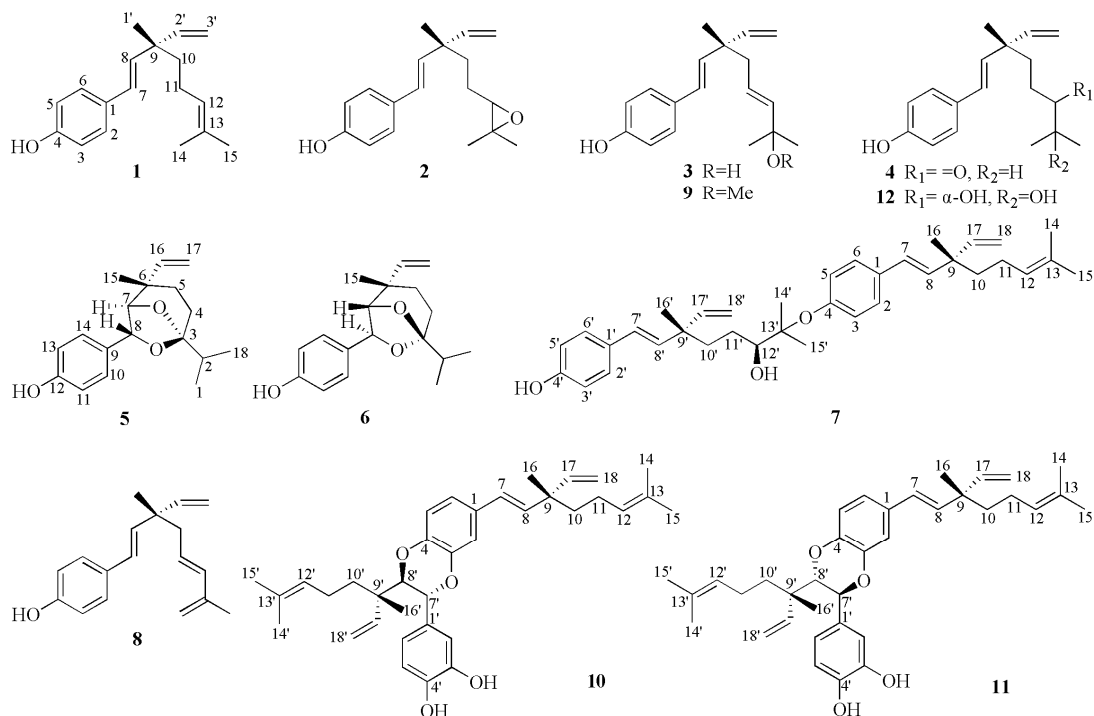


图1 化合物1~12的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—12

(C-10), 35.8 (C-11), 215.1 (C-12), 41.0 (C-13), 18.3 (C-14, 15), 23.5 (C-1'), 145.2 (C-2'), 112.5 (C-3')。以上数据与文献报道的一致^[10], 鉴定化合物 4 为 12-氧代补骨脂酚 (12-oxobakuchiol)。该化合物曾在研究补骨脂酚及其衍生物免疫抑制作用的构效关系研究中合成, 本研究是首次从天然产物中发现, 因此, 它是 1 个新的天然产物, 化学结构见图 1。

化合物 5: 白色粉末; EI-MS m/z : 288 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.03 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 1- CH_3), 2.08 (1H, qd, $J = 6.9$ Hz, H-2), 1.77 (1H, ddd, $J = 14.4, 13.4, 4.5$ Hz, H-4 α), 1.65 (1H, ddd, $J = 14.4, 13.4, 4.5$ Hz, H-4 β), 1.84 (1H, ddd, 14.4, 12.6, 5.2, H-5 α), 1.69 (1H, m, H-5 β), 3.97 (1H, brs, H-7), 5.10 (1H, brs, H-8), 7.23 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-10, H-14), 6.75 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-11, 13), 1.06 (3H, s, H-15), 6.11 (1H, dd, $J = 17.6, 10.9$ Hz, H-16), 5.13 (1H, dd, $J = 10.9, 1.0$ Hz, H-17a), 5.09 (1H, dd, $J = 17.6, 1.0$ Hz, H-17b), 1.04 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 18.0 (C-1), 35.3 (C-2), 112.5 (C-3), 26.3 (C-4), 28.8 (C-5), 38.6 (C-6), 88.0 (C-7), 77.8 (C-8), 134.7 (C-9), 127.8 (C-10, 14), 115.2 (C-11, 13), 155.1 (C-12), 23.4 (C-15), 143.5 (C-16), 112.2 (C-17), 17.5 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 5 为补骨脂醚酚 B,

化学结构见图 1。

化合物 6: 白色粉末 (甲醇); EI-MS m/z : 288 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 1- CH_3), 2.10 (1H, qd, $J = 7.0$ Hz, H-2), 1.71 (1H, dd, $J = 13.7, 5.8$ Hz, H-4 α), 1.81 (1H, ddd, 13.7, 12.8, 5.8 Hz, H-4 β), 2.03 (1H, ddd, $J = 13.7, 12.8, 5.8$ Hz, H-5 α), 1.46 (1H, brd, $J = 13.7, 5.8$ Hz, H-5 β), 3.92 (1H, brs, H-7 β), 4.97 (1H, brs, H-8 α), 7.17 (2H, brd, $J = 8.5$ Hz, H-10, 14), 6.71 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-11, 13), 1.19 (3H, s, 15- CH_3), 5.78 (1H, dd, $J = 17.7, 10.9$ Hz, H-16), 5.15 (1H, dd, $J = 10.9, 1.1$ Hz, H-17a), 5.07 (1H, dd, $J = 17.7, 1.1$ Hz, H-17b), 1.06 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 18- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 18.1 (C-1), 35.4 (C-2), 112.6 (C-3), 25.8 (C-4), 26.9 (C-5), 38.8 (C-6), 88.0 (C-7), 78.4 (C-8), 134.6 (C-9), 127.8 (C-10, 14), 115.1 (C-11, 13), 155.1 (C-12), 22.6 (C-15), 144.3 (C-16), 114.0 (C-17), 17.5 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 6 为补骨脂醚酚 C, 化学结构见图 1。

化合物 7: 无色油状物; EI-MS m/z : 528 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.26 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.89 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 6.27 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.12 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 1.50 (2H, m, H-10), 1.97 (2H, m, H-11), 5.12 (1H, brt,

$J = 7.0$ Hz, H-12), 1.58 (3H, s, 14-CH₃), 1.67 (3H, s, 15-CH₃), 1.21 (3H, s, 16-CH₃), 5.91 (1H, dd, $J = 17.2$, 10.4 Hz, H-17), 5.04 (1H, dd, $J = 10.4$, 1.3 Hz, H-18a), 5.02 (1H, dd, $J = 17.2$, 1.3 Hz, H-18b), 7.24 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.77 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.28 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7'), 6.05 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8'), 1.50 (1H, m, H-10'a), 1.97 (1H, m, H-10'b), 1.42 (1H, m, H-11'a), 1.50 (1H, m, H-11'b), 3.59 (1H, dd, $J = 10.2$, 1.9 Hz, H-12'), 1.20 (3H, s, 14'-CH₃), 1.20 (3H, s, 15'-CH₃), 1.19 (3H, s, 16'-CH₃), 5.87 (1H, dd, $J = 17.2$, 10.4 Hz, H-17'), 5.04 (1H, dd, $J = 10.4$, 1.3 Hz, H-18'a), 5.02 (1H, dd, $J = 17.2$, 1.3 Hz, H-18'b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 133.7 (C-1), 126.8 (C-2, 6), 124.3 (C-3, 5), 153.3 (C-4), 126.7 (C-7), 137.2 (C-8), 42.6 (C-9), 41.2 (C-10), 23.2 (C-11), 124.8 (C-12), 131.4 (C-13), 17.7 (C-14), 25.7 (C-15), 23.6 (C-16), 145.7 (C-17), 112.1 (C-18), 130.7 (C-1'), 127.4 (C-2', 6'), 115.4 (C-3', 5'), 154.8 (C-4'), 126.5 (C-7'), 135.6 (C-8'), 42.4 (C-9'), 38.4 (C-10'), 26.3 (C-11'), 78.6 (C-12'), 83.7 (C-13'), 20.6 (C-14'), 23.1 (C-15'), 23.3 (C-16), 145.8 (C-17'), 112.0 (C-18'). 以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **7** 为 (12'S)-双补骨脂酚 C, 化学结构见图 1。

化合物 **8**: 淡黄色油状物; ESI-MS m/z : 253 [M-H]⁻; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.25 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.76 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.26 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.08 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 2.30 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-10), 5.62 (1H, dt, $J = 15.6$, 7.4 Hz, H-11), 6.16 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-12), 4.88 (2H, brs, H-14), 1.81 (3H, s, 15-CH₃), 1.17 (3H, s, 16-CH₃), 5.90 (1H, dd, $J = 17.4$, 10.7 Hz, H-17), 5.05 (1H, dd, $J = 10.7$, 1.3 Hz, H-18a), 5.02 (1H, dd, $J = 17.4$, 1.3 Hz, H-18b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 130.7 (C-1), 127.4 (C-2, 6), 115.4 (C-3, 5), 154.7 (C-4), 126.8 (C-7), 135.4 (C-8), 42.8 (C-9), 44.6 (C-10), 126.7 (C-11), 135.5 (C-12), 142.1 (C-13), 114.7 (C-14), 18.8 (C-15), 23.5 (C-16), 145.5 (C-17), 112.2 (C-18)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **8** 为 Δ^{13} -补骨脂酚, 化学结构见图 1。

化合物 **9**: 淡黄色油状物; EI-MS m/z : 286 [M]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.22 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.76 (2H, brd, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.24 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.04 (1H, d, $J = 16.2$ Hz,

H-8), 2.25 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, H-10), 5.55 (1H, dt, $J = 15.8$, 6.9 Hz, H-11), 5.45 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-12), 1.26 (6H, s, H-14, 15), 5.89 (1H, dd, $J = 17.4$, 10.7 Hz, H-16), 5.05 (1H, dd, $J = 10.7$, 1.1 Hz, H-17a), 5.01 (1H, dd, $J = 17.4$, 1.1 Hz, H-17b), 1.18 (3H, s, 18-CH₃), 3.14 (3H, s, 13-OMe); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 130.2 (C-1), 127.3 (C-2, C-6), 115.4 (C-3, C-5), 155.1 (C-4), 126.9 (C-7), 135.0 (C-8), 42.6 (C-9), 44.2 (C-10), 126.6 (C-11), 137.9 (C-12), 75.4 (C-13), 25.8 (C-14), 25.9 (C-15), 145.5 (C-16), 112.2 (C-17), 23.5 (C-18), 50.2 (OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **9** 为 13-甲氧基异补骨脂酚, 化学结构见图 1。

化合物 **10**: 浅绿色油状物; ESI-MS m/z : 543 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.91 (1H, brs, H-2), 6.85 (2H, overlapped, H-5, 6), 6.24 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.03 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 1.47 (2H, m, H-10), 1.93 (2H, m, H-11), 5.09 (1H, brt, $J = 7.2$ Hz, H-12), 1.57 (3H, s, 14-CH₃), 1.66 (3H, s, 15-CH₃), 1.17 (3H, s, 16-CH₃), 5.85 (1H, dd, $J = 17.6$, 10.8 Hz, H-17), 5.01 (1H, dd, $J = 10.4$, 1.3 Hz, H-18a), 4.99 (1H, dd, $J = 17.2$, 1.3 Hz, H-18b), 6.80 (1H, brs, H-2'), 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6'), 4.88 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-7'), 4.01 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-8'), 1.47 (1H, m, H-10'a), 1.54 (1H, m, H-10'b), 1.82 (1H, m, H-11'a), 1.92 (1H, m, H-11'b), 5.04 (1H, brt, $J = 7.2$ Hz, H-12'), 1.57 (3H, s, 14'-CH₃), 1.66 (3H, s, 15'-CH₃), 1.07 (3H, s, 16'-CH₃), 5.53 (1H, dd, $J = 17.7$, 10.9 Hz, H-17'), 5.01 (1H, dd, $J = 10.7$, 1.3 Hz, H-18'a), 4.97 (1H, dd, $J = 17.7$, 1.3 Hz, H-18'b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 131.4 (C-1), 113.9 (C-2), 143.5 (C-3), 143.2 (C-4), 116.5 (C-5), 119.5 (C-6), 126.5 (C-7), 136.2 (C-8), 42.5 (C-9), 41.3 (C-10), 23.2 (C-11), 124.8 (C-12), 131.4 (C-13), 17.6 (C-14), 25.7 (C-15), 23.3 (C-16), 145.9 (C-17), 111.8 (C-18), 131.3 (C-1'), 115.1 (C-2'), 142.9 (C-3'), 144.0 (C-4'), 115.2 (C-5'), 121.1 (C-6'), 76.1 (C-7'), 81.3 (C-8'), 43.8 (C-9'), 38.7 (C-10'), 22.2 (C-11'), 124.5 (C-12'), 131.2 (C-13'), 17.5 (C-14'), 25.7 (C-15'), 17.4 (C-16'), 141.9 (C-17'), 112.7 (C-18')。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **10** 为双聚补骨脂酚 B, 化学结构见图 1。

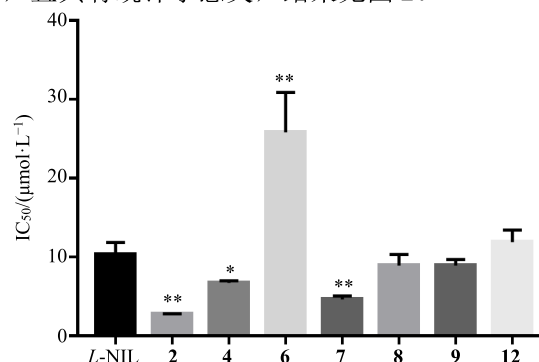
化合物 **11**: 浅绿色油状物; ESI-MS m/z : 541 $[M-H]^-$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.92 (1H, brs, H-2), 6.84 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5, H-6), 6.19 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.02 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 1.46 (2H, m, H-10), 1.93 (2H, m, H-11), 5.08 (1H, brt, $J = 7.2$ Hz, H-12), 1.57 (3H, s, 14- CH_3), 1.66 (3H, s, 15- CH_3), 1.17 (3H, s, 16- CH_3), 5.85 (1H, dd, $J = 17.6, 10.8$ Hz, H-17), 5.01 (1H, dd, $J = 10.8, 1.3$ Hz, H-18a), 4.99 (1H, dd, $J = 17.2, 1.3$ Hz, H-18b), 6.82 (1H, brs, H-2'), 6.86 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.76 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6'), 4.75 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-7'), 3.93 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-8'), 1.32 (1H, m, Ha-10'), 1.73 (1H, m, Hb-10'), 1.82 (1H, m, Ha-11'), 1.94 (1H, m, Hb-11'), 5.03 (1H, brt, $J = 7.2$ Hz, H-12'), 1.57 (3H, s, 14'- CH_3), 1.66 (3H, s, 15'- CH_3), 0.66 (3H, s, 16'- CH_3), 5.83 (1H, dd, $J = 17.7, 10.9$ Hz, H-17'), 5.01 (1H, dd, $J = 10.7, 1.3$ Hz, H-18'a), 4.97 (1H, dd, $J = 17.7, 1.3$ Hz, H-18'b); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 131.4 (C-1), 113.7 (C-2), 143.6 (C-3), 143.5 (C-4), 116.5 (C-5), 119.5 (C-6), 126.5 (C-7), 136.2 (C-8), 42.5 (C-9), 41.3 (C-10), 23.2 (C-11), 124.8 (C-12), 131.3 (C-13), 17.6 (C-14), 25.7 (C-15), 23.4 (C-16), 145.9 (C-17), 111.8 (C-18), 130.9 (C-1'), 115.4 (C-2'), 142.9 (C-3'), 144.3 (C-4'), 115.3 (C-5'), 121.4 (C-6'), 77.3 (C-7'), 81.8 (C-8'), 43.1 (C-9'), 38.3 (C-10'), 22.2 (C-11'), 124.5 (C-12'), 131.3 (C-13'), 17.5 (C-14'), 25.7 (C-15'), 19.9 (C-16'), 141.9 (C-17'), 114.0 (C-18'). 在 NOESY 实验中, δ 0.66 (16'- CH_3) 与 δ 3.93 (H-8') 呈 NOE, 而与 δ 4.75 (H-7') 无 NOE, 所以 H-8' 为 β 型。以上数据与文献报道的一致^[13], 故鉴定化合物 **11** 为双聚补骨脂酚 A, 化学结构见图 1。

化合物 **12**: 无色油状物; ESI-MS m/z : 289 $[M-H]^-$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.18 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.69 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.24 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.02 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 1.86 (1H, td, $J = 12.8, 4.2$ Hz, H-10a), 1.45 (1H, td, $J = 12.8, 4.0$ Hz, H-10b), 1.63 (1H, tq, $J = 12.8, 4.0, 1.6$ Hz, H-11a), 1.28 (1H, m, H-11b), 3.21 (1H, dd, $J = 10.3, 1.6$ Hz, H-12), 1.14 (3H, s, 14- CH_3), 1.10 (3H, s, 15- CH_3), 1.19 (3H, s, 16- CH_3), 5.91 (1H, dd, $J = 17.9, 10.3$ Hz, H-17), 5.01 (1H, dd, $J = 17.9, 1.3$ Hz, H-18a), 5.02 (1H, dd, $J = 10.3, 1.3$ Hz, H-18b);

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 130.5 (C-1), 128.2 (C-2, 6), 116.5 (C-3, 5), 158.4 (C-4), 128.4 (C-7), 135.6 (C-8), 43.4 (C-9), 40.0 (C-10), 27.3 (C-11), 80.4 (C-12), 73.9 (C-13), 25.8 (C-14), 24.9 (C-15), 24.1 (C-16), 147.7 (C-17), 112.1 (C-18)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **12** 为 12,13-二氢-12,13-二羟基补骨脂酚, 化学结构见图 1。

3.2 抑制 NO 生成实验

MTT 法^[14]细胞存活和生长实验结果表明, 受试物除化合物 **1** 外, 其他受试化合物 **2~12** 在 1.56~50.00 $\mu\text{mol/L}$ 对 RAW 264.7 细胞生长无影响, 细胞存活率大于 90%。实验体系中, 受试化合物溶剂 DMSO 的终浓度小于 0.5%, 对 RAW 264.7 细胞生长无影响, 阳性对照药选用诱导型 NO 合酶 (iNOS) 抑制剂 *L-NIL*^[15-16]。化合物 **1**、**3**、**5**、**10**、**11** 抑制 NO 生成的 IC_{50} 值大于 50 $\mu\text{mol/L}$, 化合物 **6** 的 IC_{50} 值高于阳性药, 化合物 **8**、**9**、**12** 的 IC_{50} 值接近阳性药, 但化合物 **2**、**4**、**7** 的 IC_{50} 值皆小于阳性对照药, 且具有统计学意义, 结果见图 2。



与 *L-NIL* 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs *L-NIL*

图 2 补骨脂酚衍生物对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞模型 NO 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of bakuchiol derivatives on NO production in LPS-activated RAW 264.7 cell model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

补骨脂酚主要存在于传统中药补骨脂的种子中, 不同产地样品的含量差异较大, 约为 1%~7%^[17], 如果将补骨脂酚衍生物计算在内, 含量更高。近年来, 补骨脂酚的研究日渐增多, 除医药用途外, 其美容护肤作用也引起广泛关注, 亦是一种极具潜力的具有多种功效的化妆品活性成分。补骨脂酚是 1 种异戊二烯基酚杂萜类化合物, 易氧化, 在肝脏微粒体药物代谢酶的作用下, 可代谢为多种代谢产

物^[18], 在血液、肝脏和肾脏多有分布^[19]。补骨脂酚及其衍生物具有多样性的生物学活性^[9-12,18]。

本实验首次从补骨脂中分离鉴定出 1 个新的天然产物——12-氧代补骨脂酚(4), 丰富了补骨脂的化学成分结构类型多样性, 并以国际公认的脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞产生 NO 为模型, 较系统地筛选了补骨脂中化学结构多样性的补骨脂酚及其衍生物对 NO 产生的抑制作用。如图 1 所示的化合物中, 补骨脂酚(1) 仅具有微弱的 NO 生成抑制活性, 但与其结构相近的具有非环合结构的化合物 8、9 和 12 对 NO 生成的抑制作用则与阳性对照药 L-NIL^[15-16]相当, 但当醇羟基(12) 转化为酮基(4) 时, 抑制作用大大加强, 化合物 4 与 12 的 IC₅₀ 值相差近 2 倍; 化合物 8、9 和 12 与化合物 4 的比较, 提示酮基是发挥活性的必要基团。补骨脂酚(1) 与化合物 12 形成的二聚体(7) 亦显示非常强的抑制作用, IC₅₀ 值为 (4.63±0.29) μmol/L, 与阳性对照药 [IC₅₀ = (10.29±1.10) μmol/L] 相差 2 倍之多。尽管化合物 10 和 11 亦为补骨脂酚衍生物的二聚体, 但无抑制活性; 补骨脂酚的侧链发生环合亦降低了抑制活性, 如化合物 6 的 IC₅₀ 值为 (25.82±3.58) μmol/L; 或使其抑制活性显著减弱, 如化合物 5 的 IC₅₀ 值大于 50 μmol/L。本实验结果提示化合物 2、4、7~9、12 可能具有潜在的抗炎作用, 是补骨脂值得关注的效应成分^[20]和质量标志物^[21]。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 朱相云主编. 中国药用植物志. (第五卷, 上册) [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2016.
- [3] 杨秀伟. 中药物质基础研究是中药继承、发展、创新的关键科学问题 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3429-3434.
- [4] Chen X M, Yang Y F, Zhang Y T. Isobavachalcone and bavachinin from *Psoraleae Fructus* modulate Aβ42 aggregation process through different mechanisms *in vitro* [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(18): 2930-2935.
- [5] Xu Q X, Hu Y, Li G Y, *et al.* Multi-target anti-alzheimer activities of four prenylated compounds from *Psoraleae Fructus* [J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 614.
- [6] 郑怡然, 韦 玮, 杨秀伟. 川芎中抑制脂多糖诱导的 RAW 264.7 和 BV2 细胞系 NO 生成的新的丁苯酚衍生物——川芎螺内酯 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1497-1503.
- [7] Labbe C, Faini F, Coll J, *et al.* Bakuchiol derivatives from the leaves of *Psoralea glandulosa* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(5): 1299-1303.
- [8] Wu C Z, Hong S S, Cai X F, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 and nuclear factor-κB inhibitory meroterpenes analogues of bakuchiol, a constituent of the seeds of *Psoralea corylifolia* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(8): 2619-2623.
- [9] Zhao G, Zheng X W, Qin G W, *et al.* *In vitro* dopaminergic neuroprotective and *in vivo* antiparkinsonian-like effects of Δ³, 2-hydroxybakuchiol isolated from *Psoralea corylifolia* (L.) [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(9): 1617-1629.
- [10] Chen H L, Du X L, Tang W, *et al.* Synthesis and structure-immunosuppressive activity relationships of bakuchiol and its derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(5): 2403-2411.
- [11] Yin S, Fan C Q, Dong L, *et al.* Psoracorylifols A-E, five novel compounds with activity against *Helicobacter pylori* from seeds of *Psoralea corylifolia* [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(11): 2569-2575.
- [12] Huang Y, Liu X, Wu Y, *et al.* Meroterpenes from *Psoralea corylifolia* against *Pyricularia oryzae* [J]. *Planta Med*, 2014, 80(15): 1298-1303.
- [13] Wu C Z, Cai X F, Nguyen T D, *et al.* Bisbakuchiols A and B, novel dimeric meroterpenoids from *Psoralea corylifolia* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2008, 39(15): 8861-8864.
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [15] Rao C V, Indranie C, Simi B, *et al.* Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1): 165-170.
- [16] Walker L M, Walker P D, Imam S Z, *et al.* Evidence for peroxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury: Studies with the inducible nitric oxide synthase inhibitor L-N⁶-(1-iminoethyl) lysine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 295(1): 417-422.
- [17] 姚三桃, 杨 滨, 徐植灵. 补骨脂中补骨脂酚的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(11): 681-683.
- [18] Hu X J, Zhang Y B, Zhao Z J. Metabolic detoxification of bakuchiol is mediated by oxidation of CYP 450s in liver microsomes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 111: 385-392.
- [19] 张 昀, 刘 路. 补骨脂酚在大鼠血清、肝和肾中的含量测定 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(8): 984-987.
- [20] 杨秀伟. 基于体内过程的中药有效成分和有效效应物质的发现策略 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 365-370.
- [21] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.