

大苞鞘石斛化学成分及细胞毒活性研究

李静娟^{1,2}, 任福才^{1,2}, 胡江苗^{1*}, 周俊^{1*}

1. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要:目的 研究大苞鞘石斛 *Dendrobium wardianum* 的主要化学成分及部分化合物的肿瘤细胞毒活性。方法 应用多种色谱分离技术, 结合半制备液相色谱对化合物进行分离纯化, 通过核磁共振谱、质谱、薄层色谱对照等鉴定化合物结构; MTS 法检测部分化合物的肿瘤细胞毒活性。结果 从大苞鞘石斛中分离得到 16 个化合物, 分别鉴定为愉悦石斛素(1)、钩状石斛素(2)、反式-阿魏酸二十烷基酯(3)、反式-阿魏酸二十二烷基酯(4)、对香豆素酸二十四烷基酯(5)、4-羟基-3-甲氧基肉桂醛(6)、二氢松柏醇(7)、3,7-二甲氧基-5-羟基-1,4-萘醌(8)、3-乙氧基-5-羟基-7-甲氧基-1,4-萘醌(9)、4-甲氧基-9,10-二氢菲-2,7-二醇(10)、5,7,4'-三羟基二氢黄酮(11)、5,7,4'-三羟基-3',5'-二甲氧基二氢黄酮(12)、苜蓿素(13)、3,5,4'-三甲氧基-4-羟基联苳(14)、3,5,3'-三甲氧基-4'-羟基联苳(15)和 3,3'-二甲氧基-4,5'-二羟基联苳(16)。对所得化合物 3、6、8、9、11、14、15 进行了肿瘤细胞毒活性筛选, 其中化合物 6、8 有一定的体外肿瘤生长抑制活性。结论 化合物 3、5、6 为首次从石斛属植物中分离得到, 化合物 10、11、14、15 为首次从大苞鞘石斛中分离得到; 大苞鞘石斛活性成分有待挖掘。**关键词:** 大苞鞘石斛; 联苳; 愉悦石斛素; 钩状石斛素; 反式-阿魏酸二十烷基酯; 对香豆素酸二十四烷基酯; 4-羟基-3-甲氧基肉桂醛

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)07-1819-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.016

Chemical constituents and cytotoxic activities of *Dendrobium wardianum*

LI Jing-juan^{1,2}, REN Fu-cai^{1,2}, HU Jiang-miao¹, ZHOU Jun¹

1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents and cytotoxic activity of *Dendrobium wardianum*. **Methods** The compounds were separated and purified by various column chromatography techniques and semi-preparative liquid chromatography, and the structures were then identified by NMR, MS and TLC. And the cytotoxic activity of compounds 3, 6, 8, 9, 11, 14, 15 were detected by MTS assay. **Results** Sixteen compounds were isolated from *D. wardianum*. They were identified as amotin (1), aduncin (2), *E*-ferulic acid eicosyl ester (3), *E*-ferulic acid docosyl ester (4), tetracosyl *p*-coumarate (5), 4-hydroxy-3-methoxy cinnamaldehyde (6), dihydroconiferyl alcohol (7), 3,7-dimethoxy-5-hydroxy-1,4-phenanthrenequinone (8), 3-ethoxy-5-hydroxy-7-methoxy-1,4-phenanthrenequinone (9), 4-methoxy-9,10-dihydrophilic-2,7-diol (10), 5,7,4'-trihydroxy dihydroflavone (11), 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxy dihydroflavone (12), tricin (13), 3,5,4'-trimethoxy-4-hydroxybibenzyl (14), 3,5,3'-trimethoxy-4'-hydroxybibenzyl (15) and 3,3'-dimethoxy-4,5'-dihydroxybibenzyl (16). Compounds 6 and 8 have tumor growth inhibitory activity on tumor growth *in vitro*. **Conclusion** Compounds 3, 5, 6 are isolated from *Dendrobium* for the first time, and 10, 11, 14, 15 are isolated from *D. wardianum* for the first time. The active components of *D. wardianum* need to be further explored.

Key words: *Dendrobium wardianum* Warner; bibenzyls; amotin; aduncin; *E*-ferulic acid eicosyl ester; tetracosyl *p*-coumarate; 4-hydroxy-3-methoxy cinnamaldehyde

收稿日期: 2019-12-12

基金项目: 云南省科技专项“云南石斛产业转型升级技术与产业化”(2017ZF003-04)

作者简介: 李静娟, 女, 硕士研究生, 从事中药分析研究。Tel/Fax: (0871)65223264 E-mail: lijingjuan17@mails.ucas.ac.cn

*通信作者 周俊, 男, 中国科学院院士, 研究员, 博士生导师, 从事植物化学及药用植物资源研究。

Tel/Fax: (0871)65223264 E-mail: jzhou@mail.kib.ac.cn

胡江苗, 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事药物化学研究。Tel/Fax: (0871)65223264 E-mail: hujiangmiao@mail.kib.ac.cn

石斛药用历史悠久,具有益胃生津、滋阴清热的功效,其药用基原为石斛属金钗石斛等多种植物茎。因其多基原的特性以及在免疫调控、肿瘤辅助治疗、代谢性疾病等方面的应用,石斛一直受到科技工作者的关注^[1-3]。目前从石斛属植物中分离得到数百种化合物,主要有生物碱类、多糖类、联苳类、萜类等^[4-6]。

大苞鞘石斛 *Dendrobium wardianum* Warner 是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 石斛组 (Sect. *Dendrobium*) 多年生草本植物,主要分布于中国云南,东南亚国家等^[7],具有很高的观赏和药用价值,药用俗称“扁黄草”,功效同石斛^[8]。大苞鞘石斛的化学成分研究报道不多,从中分离的酚性成分有抗肿瘤活性^[9-11],本课题组前期从大苞鞘石斛 90%乙醇提取物中分离得到以倍半萜类型为主的化合物^[12]。为了进一步发掘大苞鞘石斛中的化学物质基础并探索其肿瘤细胞毒活性,本实验对大苞鞘石斛的化学成分进行了进一步探究。

通过多种柱色谱,从 80%乙醇提取大苞鞘石斛的醋酸乙酯部位分离得到 16 个化合物,分别是愉悦石斛素 (amotin, **1**)、钩状石斛素 (aduncin, **2**)、反式-阿魏酸二十烷基酯 (*E*-ferulic acid eicosyl ester, **3**)、反式-阿魏酸二十二烷基酯 (*E*-ferulic acid docosyl ester, **4**)、对香豆素酸二十四烷基酯 (tetracosyl *p*-coumarate, **5**)、4-羟基-3-甲氧基肉桂醛 (4-hydroxy-3-methoxy cinnamaldehyde, **6**)、二氢松柏醇 (dihydroconiferyl alcohol, **7**)、3-甲氧基-5-羟基-7-甲氧基-1,4-菲醌 (3,7-dimethoxy-5-hydroxy-1,4-phenanthrenequinone, **8**)、3-乙氧基-5-羟基-7-甲氧基-1,4-菲醌 (3-ethoxy-5-hydroxy-7-methoxy-1,4-phenanthrenequinone, **9**)、4-甲氧基-9,10-二氢菲-2,7-二醇 (4-methoxy-9,10-dihydrophilic-2,7-diol, **10**)、5,7,4'-三羟基二氢黄酮 (5,7,4'-trihydroxy dihydroflavone, **11**)、5,7,4'-三羟基-3',5'-二甲氧基二氢黄酮 (5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxy dihydroflavone, **12**)、苜蓿素 (tricin, **13**)、3,5,4'-三甲氧基-4-羟基联苳 (3,5,4'-trimethoxy-4-hydroxybibenzyl, **14**)、3,5,3'-三甲氧基-4'-羟基联苳 (3,5,3'-trimethoxy-4'-hydroxybibenzyl, **15**) 和 3,3'-二甲氧基-4,5'-二羟基联苳 (3,3'-dimethoxy-4,5'-dihydroxybibenzyl, **16**)。化合物 **3**、**5**、**6** 为首次从石斛属植物中分离得到, **10**、**11**、**14**、**15** 为首次从大苞鞘石斛中分离得到。对化合物 **3**、**6**、**8**、**9**、**11**、

14、**15** 进行肿瘤细胞毒活性筛选,结果显示化合物 **6** 和 **8** 的肿瘤细胞毒活性优于阳性药顺铂。

1 仪器与材料

Brucker AM-400、DRX-500、Brucker avance III-600 和 800 型超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司) 测定, TMS 为内标; 旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 公司); Agilent 1100 色谱仪 (美国 Agilent 公司), 半制备色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×10 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); 薄层色谱硅胶、200~300 目柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 凝胶柱色谱 Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); 高效液相色谱仪所用试剂均为色谱纯, 其他为分析纯; 显色剂为 10% 硫酸-乙醇溶液; 阳性对照药: 顺铂 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 N1001A), 紫杉醇 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 D1106A)。

大苞鞘石斛样品于 2018 年购自云南文山药市, 经贵州中医药大学吴之坤博士鉴定为大苞鞘石斛 *Dendrobium wardianum* Warner, 样品标本 (Zsh-7) 保存于中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室。

2 提取与分离

大苞鞘石斛干品 (4.7 kg) 经 80%乙醇浸泡过夜, 再用 80%乙醇回流提取 3 次, 每次时间为 2 h, 合并浸泡液和提取液减压浓缩得浸膏 (300 g)。用醋酸乙酯 (2 L×3) 萃取, 减压浓缩后得到醋酸乙酯部位 (210 g)。氯仿溶解醋酸乙酯部位, 用 365 g 硅胶拌样, 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (2:1) 为流动相, 得到 5 个流分 (Fr. A~E)。Fr. A (34 g) 用硅胶柱以石油醚-醋酸乙酯 (50:1→1:1) 梯度洗脱得到 4 个流分 (Fr. A1~A4)。Fr. A3 (5 g) 进一步经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (35:1→2:1) 得到化合物 **5** (2 mg) 和 **15** (3 mg)。Fr. B (25 g) 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (6:1→1:1) 梯度洗脱, 分离纯化后得到化合物 **3** (3 mg)、**4** (2 mg)、**6** (1 mg)、**8** (5 mg) 和 **9** (5 mg)。Fr. C (21 g) 经硅胶柱以石油醚-丙酮 (3:1) → 三氯甲烷: 甲醇 (50:1→1:1) 梯度洗脱, 得到 6 部分 (Fr. C1~Fr. C6)。Fr. C1 (3 g) 经硅胶柱色谱, 三氯甲烷-甲醇 (100:1→1:1) 洗脱, 接出部分流分析出结晶, 重结晶后经半制备液相色谱得到化合物 **1** (200 mg) 和 **2** (180 mg)。Fr. C4 (3 g) 经凝胶柱色谱 (三氯甲烷-甲醇 1:1) 和硅胶柱色谱 (三氯甲烷-甲醇 100:1→1:1) 反复分离纯化得到化合物 **7** (1 mg)、

11 (2 mg) 和 **12** (3 mg)。Fr. C6 (715 mg) 经硅胶柱色谱, 三氯甲烷-甲醇 (50:1→0:1) 洗脱得到化合物 **10** (1 mg)、**14** (4 mg)、**16** (3 mg) 和 **13** (2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色针状结晶 (甲醇); mp 255~257 °C; ESI-MS m/z : 319 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (800 MHz, methanol- d_4) δ : 4.63 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-2), 4.49 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3), 2.53 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-5), 2.32 (2H, m, H-6, 8a), 2.15 (1H, m, H-7a), 1.99 (2H, m, H-12, 8b), 1.81 (1H, m, H-7b), 1.00 (6H, dd, J = 19.9, 6.7 Hz, H-13, 14); ^{13}C -NMR (200 MHz, Methanol- d_4) δ : 179.9 (s, C-15), 179.2 (s, C-11), 84.7 (d, C-2), 84.5 (d, C-3), 82.6 (s, C-4), 52.7 (d, C-5), 51.4 (s, C-1), 48.3 (d, C-6), 38.4 (t, C-7), 30.6 (t, C-8), 29.7 (d, C-12), 25.7 (q, C-10), 16.8 (q, C-14), 16.1 (q, C-13) 以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **1** 为愉悦石斛素。

化合物 **2**: 无色针状结晶 (甲醇); mp 274~275 °C; ESI-MS m/z : 293 $[M-H]^-$; 1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ : 4.74 (2H, m, H-2, 3), 3.82 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-8), 2.58 (1H, d, J = 5.8 Hz, H-5), 2.53 (1H, d, J = 5.8 Hz, H-6), 2.36 (2H, m, H-7a), 2.19 (1H, m, H-7b), 1.81 (1H, m, H-12), 1.39 (3H, s, H-10), 1.00 (6H, d, J = 6.7 Hz, H-13, 14); ^{13}C -NMR (125 MHz, Methanol- d_4) δ : 177.4 (s, C-15), 170.1 (s, C-11), 83.4 (d, C-3), 82.4 (d, C-2), 82.0 (s, C-4), 74.2 (s, C-9), 68.0 (d, C-8), 52.7 (d, C-6), 52.1 (d, C-5), 43.6 (s, C-1), 34.7 (t, C-7), 29.1 (d, C-12), 21.3 (q, C-10), 16.6 (q, C-14), 16.0 (q, C-13)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **2** 为钩状石斛素。

化合物 **3**: 白色粉末 (氯仿); ESI-MS m/z : 473 $[M-H]^-$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.61 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.08~7.04 (2H, overlapped, H-2, 6), 6.91 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.29 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 5.84 (1H, s, 4-OH), 4.19 (2H, t, J = 6.7 Hz, H-1'), 3.93 (3H, s, 3-OCH₃), 1.69 (2H, m, H-2'), 1.25 (17H, m, H-3'~19'), 0.88 (3H, t, J = 6.7 Hz, H-20'); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.4 (s, C-9), 146.7 (s, C-4), 144.6 (s, C-3), 123.1 (d, C-6), 115.7 (d, C-8), 114.7 (d, C-5), 109.3 (d, C-2), 64.6 (t, C-1'), 55.9 (q, 3-OCH₃), 31.9 (t, C-19'), 14.1 (q, H-20')。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **3** 为反式-阿魏酸二

十烷基酯。

化合物 **4**: 白色粉末 (氯仿); ESI-MS m/z : 501 $[M-H]^-$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.60 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.11~7.01 (2H, overlapped, H-2, 6), 6.91 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.29 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 5.88 (1H, s, 4-OH), 4.18 (2H, t, J = 6.7 Hz, H-1'), 3.93 (3H, s, 3-OCH₃), 1.69 (2H, m, H-2'), 1.25 (19H, m, H-3'~21'), 0.87 (3H, t, J = 6.6 Hz, H-22'); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.4 (s, C-9), 146.8 (s, C-4), 144.6 (s, C-3), 123.1 (d, C-6), 115.7 (d, C-8), 114.7 (d, C-5), 109.3 (d, C-2), 64.6 (t, C-1'), 55.9 (q, 3-OCH₃), 31.9 (t, C-21'), 14.1 (q, H-22')。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **4** 为反式-阿魏酸二十二烷基酯。

化合物 **5**: 白色粉末 (氯仿); ESI-MS m/z : 499 $[M-H]^-$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.62 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.43 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.84 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 6.30 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8), 4.18 (2H, t, J = 6.7 Hz, H-1'), 1.69 (2H, m, H-2'), 1.25 (21H, m, H-3'~23'), 0.88 (3H, t, J = 6.5 Hz, H-24'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.5 (s, C-9), 157.5 (s, C-4), 144.2 (s, C-7), 129.9 (d, C-6), 129.4 (d, C-2), 127.4 (s, C-1), 116.1 (s, C-8), 115.8 (d, C-3, 5), 64.7 (t, C-1'), 31.9 (t, C-23'), 14.1 (q, H-24')。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **5** 为对香豆素酸二十四烷基酯。

化合物 **6**: 黄色粉末 (氯仿); ESI-MS m/z : 177 $[M-H]^-$; 1H -NMR (800 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.65 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1), 7.40 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-3), 7.13 (1H, dd, J = 8.2, 1.8 Hz, H-6'), 7.07 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-5'), 6.96 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-2'), 6.60 (1H, dd, J = 15.8, 7.7 Hz, H-2), 3.95 (3H, s, 3'-OCH₃); ^{13}C -NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 193.6 (d, C-1), 153.1 (d, C-3), 148.9 (s, C-4'), 146.9 (s, C-3'), 126.7 (s, C-1'), 126.5 (d, C-2), 124.1 (d, C-6'), 114.9 (d, C-5'), 109.4 (d, C-2'), 56.0 (q, 3'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **6** 为 4-羟基-3-甲氧基肉桂醛。

化合物 **7**: 黄色油状物 (氯仿); ESI-MS m/z : 181 $[M-H]^-$; 1H -NMR (800 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.84 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-5), 6.71 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.69 (1H, dd, J = 7.9, 2.0 Hz, H-6), 5.47 (1H, s, 4-OH), 3.88 (3H, s, 3-OCH₃), 3.68 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-3'),

2.64 (2H, m, H-1'), 1.87 (2H, m, H-2'); ^{13}C -NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 146.4 (s, C-3), 143.7 (s, C-4), 133.7 (s, C-1), 120.9 (d, C-6), 114.2 (d, C-5), 111.0 (d, C-2), 62.3 (t, C-3'), 55.9 (q, 3-OCH₃), 34.5 (t, C-1'), 31.8 (t, C-2')。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 7 为二氢松柏醇。

化合物 8: 棕黑色固体(氯仿); ESI-MS m/z : 283 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 11.00 (1H, s, 5-OH), 8.14 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-10), 8.08 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-9), 6.94 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-6), 6.83 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-8), 6.16 (1H, s, H-2), 3.96 (3H, s, 3-OCH₃), 3.93 (3H, s, 7-OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 185.5 (s, C-4), 183.4 (s, C-1), 160.2 (s, C-3), 159.8 (s, C-7), 155.3 (s, C-5), 138.9 (s, C-8a), 136.4 (d, C-9), 131.4 (s, C-10a), 127.6 (s, C-4a), 121.6 (d, C-10), 116.2 (s, C-4b), 107.7 (d, C-6), 106.3 (d, C-2), 100.8 (d, C-8), 55.9 (q, 3-OCH₃), 54.5 (q, 7-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[20], 鉴定化合物 8 为 3,7-二甲氧基-5-羟基-1,4-菲醌。

化合物 9: 棕黑色固体(氯仿); ESI-MS m/z : 297 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.03 (1H, s, 5-OH), 8.09 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-10), 8.03 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-9), 6.91 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8), 6.11 (1H, s, H-2), 4.13 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, -OCH₂-), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃), 1.57 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, -CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 186.6 (s, C-4), 184.5 (s, C-1), 160.7 (s, C-3), 160.5 (s, C-7), 156.4 (s, C-5), 139.9 (s, C-8a), 137.3 (d, C-9), 132.3 (s, C-10a), 128.7 (s, C-4a), 122.6 (d, C-10), 117.1 (s, C-4b), 108.6 (d, C-6), 107.6 (d, C-2), 101.8 (d, C-8), 66.0 (t, -OCH₂-), 55.5 (q, 7-OCH₃), 14.0 (q, -CH₃)。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 9 为 3-乙氧基-5-羟基-7-甲氧基-1,4-菲二酮。

化合物 10: 棕色粉末(甲醇); ESI-MS m/z : 241 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ : 8.00 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.61 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8), 6.60 (1H, dd, $J = 8.4, 2.7$ Hz, H-6), 6.39 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-1), 3.82 (3H, s, 4-OCH₃), 2.63 (4H, s, H-9, 10); ^{13}C -NMR (200 MHz, Methanol- d_4) δ : 159.1 (s, C-4), 157.5 (s, C-2), 156.1 (s, C-7), 141.8 (s, C-10a), 140.5 (s, C-8a), 130.0 (d, C-5), 126.2 (s, C-4b), 115.0 (d, C-8), 113.6 (d, C-6), 108.3 (d, C-1), 99.3 (d, C-3),

55.9 (q, 4-OCH₃), 31.8 (t, C-10), 31.2 (t, C-9)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 10 为 4-甲氧基-9,10-二氢菲-2,7-二醇。

化合物 11: 黄色粉末(甲醇); ESI-MS m/z : 271 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.31 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 5.88 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.87 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.34 (1H, dd, $J = 12.9, 2.7$ Hz, H-2), 3.11 (1H, dd, $J = 17.1, 13.0$ Hz, H-3a), 2.70 (1H, dd, $J = 17.1, 2.9$ Hz, H-3b); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 198.0 (s, C-4), 168.6 (s, C-7), 159.2 (s, C-4'), 131.2 (s, H-1'), 129.2 (d, C-2', 6'), 116.5 (d, C-3', 5'), 103.5 (s, C-10), 80.6 (d, C-2), 44.2 (t, C-3)。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 11 为 5,7,4'-三羟基二氢黄酮。

化合物 12: 黄色粉末(甲醇); ESI-MS m/z : 331 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ : 6.78 (2H, s, H-2', 6'), 5.90 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6, 8), 5.35 (1H, dd, $J = 12.9, 2.7$ Hz, H-2), 3.86 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.15 (1H, dd, $J = 17.1, 13.0$ Hz, H-3a), 2.72 (1H, dd, $J = 17.2, 2.8$ Hz, H-3b); ^{13}C -NMR (125 MHz, Methanol- d_4) δ : 197.7 (s, C-4), 168.5 (s, C-7), 165.5 (s, C-5), 164.8 (s, C-9), 149.3 (s, C-3', 5'), 137.0 (s, C-4'), 131.0 (s, C-1'), 105.0 (d, C-2', 6'), 97.1 (d, C-6), 96.2 (d, C-8), 80.9 (d, C-2), 56.8 (q, 3', 5'-OCH₃), 44.3 (t, C-3)。以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 12 为 5,7,4'-三羟基-3',5'-二甲氧基二氢黄酮。

化合物 13: 淡黄色粉末(甲醇); ESI-MS m/z : 329 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.25 (2H, s, H-2', 6'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.49 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.95 (6H, s, 3', 5'-OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, Methanol- d_4) δ : 183.9 (s, C-4), 166.1 (s, C-2), 166.0 (s, C-7), 163.2 (s, C-5), 159.4 (s, C-9), 149.6 (s, C-3', 5'), 105.3 (d, C-2', 6'), 104.6 (s, C-10), 100.1 (d, C-6), 95.1 (d, C-8), 57.0 (q, 3', 5'-OCH₃)。以上数据与文献对照一致^[24], 故鉴定化合物 13 为苜蓿素。

化合物 14: 黄色粉末(氯仿); ESI-MS m/z : 287 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H -NMR (800 MHz, CDCl_3) δ : 7.08 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.82 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.35 (2H, s, H-2, 6), 5.37 (1H, s, 4-OH), 3.84 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.79 (3H, s, 4'-OCH₃), 2.84~2.80 (4H, m, H- α, α'); ^{13}C -NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 158.1 (s,

C-4'), 147.0 (s, C-3, 5), 133.1 (s, C-1'), 129.7 (d, C-2', 6'), 113.9 (d, C-3', 5'), 105.3 (d, C-2, 6), 56.5 (q, 3, 5-OCH₃), 55.5 (q, 4'-OCH₃), 38.6 (t, C-α'), 37.5 (t, C-α)。以上数据与文献对照一致^[25], 故鉴定化合物 **14** 为 3,5,4'-三甲氧基-4-羟基联苳。

化合物 **15**: 无色油状物 (氯仿); ESI-MS m/z : 287 [M-H]⁻; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.83 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.67 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 6.63 (1H, s, H-2'), 6.32 (2H, d, J = 5.6 Hz, H-2, 6), 5.46 (1H, s, 4'-OH), 3.85 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.77 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 2.83 (4H, m, H-α, α'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 160.7 (s, C-3, 5), 121.0 (d, C-6'), 114.2 (d, C-5'), 111.1 (d, C-2'), 106.6 (d, C-2, 6), 97.9 (d, C-4), 55.9 (q, 3'-OCH₃), 55.3 (q, 3, 5-OCH₃), 38.6 (t, C-α), 37.4 (t, C-α')。以上数据与文献对照一致^[25], 故鉴定化合物 **15** 为 3,5,3'-三甲氧基-4'-羟基联苳。

化合物 **16**: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z 273 [M-H]⁻; ¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ: 6.68 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.66 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2'), 6.59 (1H, dd, J = 8.0, 1.7 Hz, H-6'), 6.21 (2H, d, J = 2.0 Hz, H-2, 6), 6.18 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-4), 3.77

(3H, s, 3'-OCH₃), 3.69 (3H, s, 3-OCH₃), 2.80~2.70 (4H, m, H-α, α'); ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄) δ: 162.2 (s, C-3), 159.3 (s, C-5), 148.6 (s, C-3'), 145.5 (s, C-4'), 134.7 (s, C-1'), 109.2 (d, C-6), 106.7 (d, C-2), 99.9 (d, C-4), 56.3 (q, 3'-OCH₃), 55.5 (q, 3-OCH₃), 39.6 (t, C-α), 38.5 (t, C-α')。以上数据与文献对照一致^[26], 故鉴定化合物 **16** 为 3,3'-二甲氧基-4,5'-二羟基联苳。

4 细胞毒活性测定

采用 MTS 法检测化合物 **3**、**6**、**8**、**9**、**11**、**14**、**15** 对人早幼粒急性白血病 HL-60 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人结肠癌 SW480 细胞的细胞毒活性, 顺铂和紫杉醇为阳性对照。96 孔板上接种培养细胞, 化合物用 DMSO 溶解, 以 40 μmol/L 浓度初筛, 加入待测化合物溶液, 37 °C 培养 48 h 后贴壁细胞弃孔内培养液, 加入 MTS 溶液和培养液, 充分反应后在 492 nm 波长下, 用多功能酶标仪检测。

其中化合物 **6**、**8** 表现出一定的细胞毒活性, 再分别以 40、8、1.6、0.32、0.064 μmol/L 浓度复筛, 得到细胞毒活性半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。结果见表 1。

表 1 细胞毒活性复筛结果

Table 1 Rescreening results of cytotoxic activity

化合物名称	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)				
	HL-60	A549	SMMC-7721	MCF-7	SW480
6	2.03±0.25	—	6.92±0.07	2.42±0.22	3.70±0.05
8	2.21±0.19	8.72±0.12	7.66±0.32	0.91±0.01	3.25±0.11
顺铂	3.45±0.50	28.19±0.80	14.30±0.16	21.52±0.17	21.12±1.44
紫杉醇	<0.008	<0.008	0.193±0.00	<0.008	<0.008

5 讨论

石斛早在《神农本草经》中便有记载, 具补五脏虚劳羸弱, 强阴, 久服厚肠胃, 轻身延年等功效, 作为保健品和观赏性植物被消费者熟知^[27-28]。大苞鞘石斛与《中国药典》2015 年版收载的金钗石斛均来源于兰科石斛属石斛组, 金钗石斛研究深入且功效明确, 而大苞鞘石斛的有效化学成分和药理活性测定还需进一步挖掘和完善。本研究从大苞鞘石斛中分离鉴定了 16 个化合物, 包括苯丙素类、菲类、倍半萜类, 黄酮类、联苳类等, 结构类型丰富, 完善了大苞鞘石斛的化学物质构成。石斛的免疫和抗肿瘤作用一直为石斛的研究热点^[29], 本实验对大苞

鞘石斛中一些酚性化合物测试肿瘤细胞毒活性, 活性筛选结果表明化合物 **6**、**8** 与阳性药顺铂相比有较好的肿瘤细胞毒活性。对比化合物 **3** 与 **6** 的结构以及活性表现, 表明苯丙醛结构的化合物 **6** 其醛基是重要的活性基团, 成羧并酯化后活性降低; 同理, 与化合物 **9** 相比, 化合物 **8** 的 3 位甲氧基是其细胞毒作用的活性位点。

参考文献

- [1] 杨 琴. 金钗石斛复方降血糖、增强免疫活性的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [2] 颜美秋, 杨志远, 施秋秋, 等. 石斛在糖尿病等代谢性疾病中的作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2019,

- 50(10): 2491-2497.
- [3] 李 杰, 章金辉, 叶庆生, 等. 大苞鞘石斛和铁皮石斛多糖提取及其免疫调节作用比较 [J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 89-95.
- [4] Ng T B, Liu J, Wong J H, *et al.* Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(5): 1795-803.
- [5] Jun X, Han Q B, Li S L, *et al.* Chemistry, bioactivity and quality control of *Dendrobium*, a commonly used tonic herb in traditional Chinese medicine [J]. *Phytochem Rev*, 2013, 12(2): 341-67.
- [6] 李 成, 刘晓龙, 张 璐, 等. 石斛化学成分及药理作用研究进展 [J]. 生物化工, 2019, 5(1): 149-152.
- [7] 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, 1999.
- [8] 李安华, 周志宏, 沈 妍, 等. 大苞鞘石斛化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(4): 479-480.
- [9] Blomqvist L, Brandange S, Gawell L, *et al.* Studies on Orchidaceae alkaloids. XXXVII. dendrowardine, a quaternary alkaloid from *Dendrobium wardianum* Wr [J]. *Acta Chem Scand*, 1973, 27(4): 1439-1441.
- [10] Fan W W, Xu F Q, Dong F W, *et al.* Dendrowardols A and B, two new sesquiterpenoids from *Dendrobium wardianum* Warner [J]. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54(15): 1928-1930.
- [11] Zhang C, Liu S J, Yang L, *et al.* Sesquiterpene amino ether and cytotoxic phenols from *Dendrobium wardianum* Warner [J]. *Fitoterapia*, 2017, 122: 76-79.
- [12] 范卫卫. 四种石斛的化学成分及生物活性研究 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2013.
- [13] Dahmen J, Leander K. Amotin and amoenin, two sesquiterpenes of the picrotoxane group from *Dendrobium amoenum* [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17(11): 1949-1952.
- [14] 毕志明, 麦建峰, 朱 琳, 等. 钩状石斛化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(21): 1618-1620.
- [15] Kotowicz C, César A N Catalán, Griffin C L, *et al.* Triterpenes and other constituents of *Nassauvia axillaris* [J]. *Biochem System Ecol*, 2005, 33(7): 737-742.
- [16] Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, *et al.* Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2010, 33(5): 675-680.
- [17] Nishimura K, Takenaka Y, Kishi M, *et al.* Synthesis and DNA polymerase α and β inhibitory activity of alkyl *p*-coumarates and related compounds [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(5): 476-480.
- [18] Maria C, Carpinella, Laura M, *et al.* Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(9): 2506-2511.
- [19] 张 雪, 高 昊, 王乃利, 等. 金钗石斛中的酚性成分 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 652-655.
- [20] Chen H Y, Shiao M S, Huang Y L, *et al.* Antioxidant principles from *Ephemerantha lonchophylla* [J]. *J Nat Prods*, 1999, 62(9): 1225-1227.
- [21] 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.
- [22] Khan M K, Rakotomanomana N, Loonis M, *et al.* Chemical synthesis of citrus flavanone glucuronides [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(14): 8437-8443.
- [23] Chang C L, Wang G J, Zhang L J, *et al.* Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiquesetinervius* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2/3): 271-279.
- [24] 柴兴云, 王 林, 宋 越, 等. 山银花中黄酮类成分的研究 [J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(4): 9-12.
- [25] Wang X L, Liu D, Xia Y M, *et al.* Ramberg-backlund rearrangement approaches to the synthesis of natural bibenzyls [J]. *Chin J Chem*, 2004, 22(5): 467-472.
- [26] 管惠娟, 张 雪, 屠凤娟, 等. 铁皮石斛化学成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1873-1876.
- [27] 龚建英, 王华新, 龙定建, 等. 我国石斛属植物资源及其主要种类观赏特性 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 233-235.
- [28] 林 萍, 毕志明, 徐 红, 等. 石斛属植物药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(11): 116-119.
- [29] 李 雯, 谢 杨. 石斛属植物抗肿瘤作用及其活性成分的研究 [J]. 中国保健营养: 临床医学学刊, 2010, 19(1): 14-15.