

• 化学成分 •

老挝厚叶沉香中 1 个新的 2-(2-苯乙基)色酮和木脂素杂合物及其抑制一氧化氮作用

李 薇, 王 昊, 董文化, 曾 军, 袁靖喆, 王雅丽, 吴 妃, 梅文莉, 戴好富*

中国热带农业科学院热带生物技术研究所沉香国际联合研究中心/海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室/海南热带农业资源研究院海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 海南 海口 571101

摘要: 目的 研究老挝厚叶沉香 *Aquilaria crassna* 植物所产沉香的化学成分及其抑制一氧化氮作用。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 凝胶、高效液相色谱等多种色谱技术分离纯化得到单体化合物; 通过质谱、核磁共振等谱学方法并结合理化性质鉴定其结构; 采用脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 模型测试化合物抑制一氧化氮产生的抗炎活性。结果 从老挝沉香的乙醇提取物中分离鉴定 3 个化合物, 分别是厚叶沉香醇 (1)、8-氯-6-羟基-2-(2-苯乙基)色酮 (2) 和 8-氯-6-羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮 (3)。化合物 1 对脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 产生一氧化氮具有抑制作用, 其半数抑制浓度值为 $(47.53 \pm 2.14) \mu\text{mol/L}$ 。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为厚叶沉香醇, 是从沉香中首个发现的由 2-(2-苯乙基)色酮和木脂素形成的杂合物, 且对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞株产生一氧化氮呈现抑制活性。

关键词: 沉香; 厚叶沉香; 厚叶沉香醇; 2-(2-苯乙基)色酮; 杂聚体; 抑制一氧化氮产生活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2024)15 - 5011 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.001

One new heteropolymer composed of 2-(2-phenylethyl)chromone and lignan from *Aquilaria crassna* in Laos and its inhibition of nitric oxide production activity

LI Wei, WANG Hao, DONG Wenhua, ZENG Jun, YUAN Jingzhe, WANG Yali, WU Fei, MEI Wenli, DAI Haofu
International Joint Research Center of Agarwood, Institute of Tropical Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Hainan Provincial Key Laboratory of Natural Products Research and Utilization of Li Folk Medicine Resources, Key Laboratory of Conservation and Utilization of Tropical Agrobioresources of Hainan Province, Academy of Tropical Agricultural Resources, Haikou 571101, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from *Aquilaria crassna* in Laos and their inhibition of nitric oxide production activity. **Methods** Various chromatographic techniques, including silica gel, Sephadex LH-20 gel, high performance liquid chromatography (HPLC) were used for the separation and purification to gain monomer compounds. The structures of these compounds were by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) and other spectroscopic methods combined with physical and chemical properties. And lipopolysaccharide (LPS)-induced mouse mononuclear macrophage RAW264.7 model was used to test the anti-inflammatory activity of the compound on nitric oxide (NO) production. **Results** Three 2-(2-phenylethyl)chromones derivatives were isolated from ethanol extract of *A. crassna* and identified as aquicrassnol (1), 8-chloro-6-hydroxy-2-(2-phenylethyl)chromone (2), 8-chloro-6-hydroxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]chromone (3). *In vitro* anti-inflammatory assay results showed that compound 1 inhibit the NO production in mouse mononuclear macrophages RAW264.7 induced by LPS with half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of $(47.53 \pm 2.14) \mu\text{mol/L}$. **Conclusion** Compound 1, a new compound named aquicrassnol, was

收稿日期: 2024-04-09

基金项目: 海南省自然科学基金青年基金资助项目 (324QN317); 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2021031); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-21)

作者简介: 李 薇 (1988—), 女, 副研究员, 从事热带药用植物活性次生代谢产物研究。E-mail: liwei@itbb.org.cn

*通信作者: 戴好富 (1974—), 男, 研究员, 从事海南黎药资源代谢组学与生物功能研究。E-mail: daihaofu@itbb.org.cn

the first heteropolymer composed of 2-(2-phenylethyl)chromone and lignan from Chenxiang (*Aquilariae Lignum Resinatum*), and showed inhibitory activity on the production of NO in RAW264.7 cell line induced by LPS.

Key words: *Aquilariae Lignum Resinatum*; *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomete; aquicrassnol; 2-(2-phenylethyl)chromone; heteropolymer; inhibition of nitric oxide production activity

沉香为瑞香科 (Thymelaeaceae) 沉香属 *Aquilaria* Lam. 或拟沉香属 *Gyrinops* Gaertn. 植物含有树脂的木材, 是天然香料和名贵的传统药材。目前, 国际市场上交易的沉香主要植物来源有白木香 *A. sinensis* (Lour.) Spreng.、马来沉香 *A. malaccensis* Lam.、丝沉香 *A. filaria* (Oken) Merr. 和厚叶沉香 (又称柯拉斯那沉香) *A. crassna* Pierre ex Lecomete。在以往对上述 4 种植物来源的沉香以及瓦拉沉香 *A. walla* Gaertn 和柳叶拟沉香 *G. salicifolia* Ridl 所产沉香的大量研究中发现, 2-(2-苯乙基)色酮和倍半萜是沉香的 2 大类主要特征性成分^[1-2]。早期从沉香中分离出的 2-(2-苯乙基)色酮大多以单体形式存在, 只有少数是二聚体或三聚体^[3-5]。直至 2017 年, 本研究组从老挝、柬埔寨及斯里兰卡等沉香中

发现了一系列倍半萜、苄基丙酮或黄酮等与 2-(2-苯乙基)色酮形成的杂聚体^[6-10]。这些不常见的化合物是沉香中一类相对特殊的化学成分, 为在沉香中发现更多结构新颖的化合物提供了重要线索。本研究继续对老挝厚叶沉香树所产沉香进行研究, 共分离得到 3 个化合物 (图 1), 分别鉴定为厚叶沉香醇 (aquicrassnol, **1**)、8-氯-6-羟基-2-(2-苯乙基)色酮 [8-chloro-6-hydroxy-2-phenylethyl)chromone, **2**]、8-氯-6-羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮 [8-chloro-6-hydroxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]chromone, **3**]。其中, 化合物 **1** 为新化合物, 是沉香中发现的首个由 2-(2-苯乙基)色酮和木脂素形成的杂聚体, 命名为厚叶沉香醇 (aquicrassnol), 且其表现出对单核巨噬细胞 RAW264.7 产生一氧化氮具有一定的抑制活性。

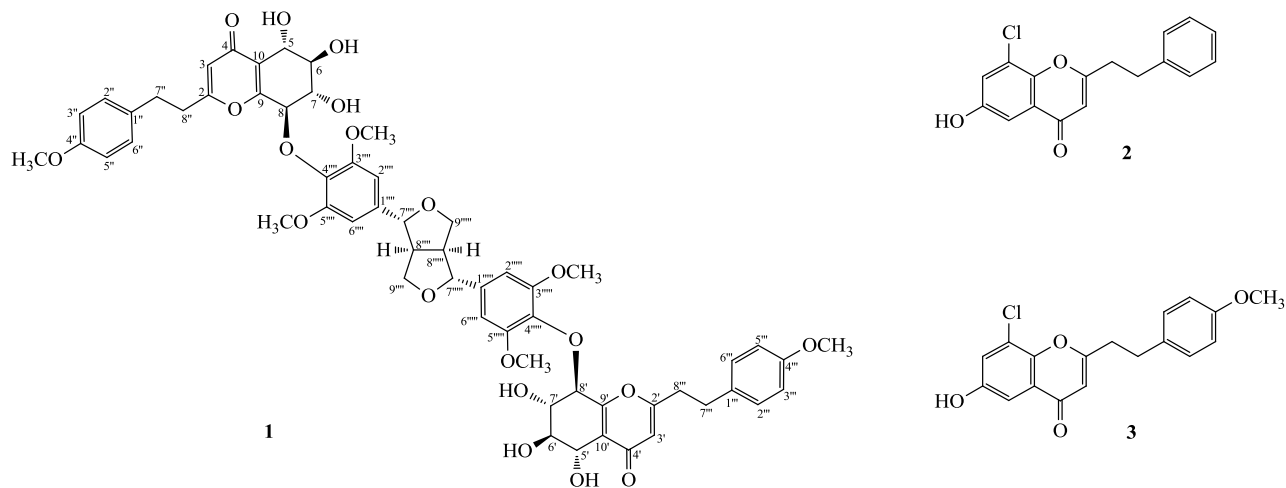


图 1 化合物 1~3 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—3

1 仪器与材料

Bruker AV-500 型超导核磁仪 (德国 Bruker 公司), TMS 作为内标; Nicolet 380 红外光谱仪 (美国 Thermo 公司); 紫外光谱仪 (UV-2550 Shimadzu); 旋光仪 (德国 Rudolph 公司); 安捷伦 1260 分析型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 安捷伦 1260 半制备型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 和 π -NAP 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m, Nacalai tesque 公司); 质谱仪 (Bruker amazon SL 公司); 圆二色谱仪 MOS-500 (法国

Biologic 公司); METTLER TOLEDO ME204 精密和分析天平 [万分之一, 梅特勒-托力多仪器 (上海) 公司]; ELX-800 酶标仪 (美国宝特公司); 超净工作台 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。Sephadex LH-20 凝胶 (德国 Merck 公司), CHP 20P MCI 材料 (日本三菱公司), ODS (20~45 μ m, 日本 Fuji 公司), 色谱硅胶板 G, 柱色谱用硅胶 G、H (200~300、60~80 目, 青岛海洋化工厂); BSA-100A 自动部分收集器 (上海青浦沪西仪器厂)。小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 购自中国科学院干细

胞库; DMEM 培养基、胎牛血清(赛默飞世尔科技公司); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、Griess 试剂、吡啶美辛(批号 RH107294, 上海罗恩试剂公司)、槲皮素(批号 SLBZ4289, 美国 Sigma 公司)、盐酸阿霉素(批号 H03A8J41034, 上海源叶生物科技有限公司)、四甲基偶氮唑蓝(美国 Sigma 公司)。

沉香样品采集于老挝, 经中国热带农业科学院热带生物技术研究所黄圣卓副研究员鉴定基原植物为瑞香科沉香属厚叶沉香 *A. crassna* Pierre ex Lecomte, 凭证标本(20140909)保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

2 提取与分离

干燥粉碎的沉香木材(2.2 kg)用95%的乙醇水加热回流提取3次, 每次加入10 L的乙醇, 减压回收乙醇至无醇味, 得到乙醇浸膏(296.0 g), 将乙醇浸膏用水分散成悬浊液, 依次用醋酸乙酯、正丁醇各萃取3次, 分别浓缩得醋酸乙酯浸膏和正丁醇浸膏。将醋酸乙酯萃取物(191.6 g)经减压柱色谱, 三氯甲烷-甲醇(1:0→0:1)洗脱, 得到11个流分(Fr. 1~11)。Fr. 5(48.5 g)经减压硅胶柱色谱, 以三氯甲烷/甲醇(1:0~0:1)梯度洗脱, 得到7个流分(Fr. 5-1~5-7)。Fr. 5-4(5.3 g)经 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(3:7、2:3、1:1、3:2、7:3、4:1、9:1、1:0, 每个梯度2.5 L)洗脱, 得到20个流分(Fr. 5-4-1~5-4-20)。Fr. 5-4-5(389.5 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 用三氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得化合物2(8.4 mg)和3(5.2 mg)。Fr. 8经 MCI 柱色谱, 用甲醇-水(1:1、3:2、7:3、4:1、9:1、1:0, 每个梯度2.5 L)进行洗脱, 得到9个流分(Fr. 8-1~8-9)。Fr. 8-8(13.5 g)经反相硅胶柱色谱, 用甲醇-水(3:7、2:3、1:1、3:2、7:3、4:1、9:1、1:0, 每个梯度2.5 L)洗脱得到5个流分(Fr. 8-8-1~8-8-5)。Fr. 8-8-2(1.2 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 用三氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得到3个流分(Fr. 8-8-2-1~8-8-2-3), Fr. 8-8-2-1-1经半制备 HPLC 纯化(C₁₈柱, 乙腈-水2:3)分离纯化得到, 化合物1(3.1 mg, t_R=15.12 min)。

3 结构鉴定

化合物1为淡黄色无定型固体。[α]_D²⁵+64.0(c 0.15, MeOH); UV λ_{max}^{MeOH}(nm): 212(4.83), 260(4.27), 283(3.65); IR ν_{max}^{KBr}(cm⁻¹): 3 414, 2 928, 1 657, 1 599, 1 508, 1 453, 1 239, 1 121, 1 029, 476; ECD (MeOH)

λ_{max}(Δε): 272(+4.4), 235(-3.8), 226(-4.0) nm, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据见表1。

高分辨质谱 HR-ESI-MS 在 *m/z* 1 101.370 9 [M+Na]⁺(C₅₈H₆₂O₂₀Na, 计算值 1 101.372 7)的准分子离子峰, 表明化合物1的分子式为 C₅₈H₆₂O₂₀, 不饱和度是 28。碳谱上仅出现 24 个碳信号, 表明化合物1有对称结构。¹H 和 ¹³C-NMR 数据(表1)显示该化合物中存在 4 个连续的含氧次甲基信号 [δ_C 68.8 (C-5/5')/δ_H 4.94 (2H, d, *J* = 5.6 Hz, H-5/5'), δ_C 71.9 (C-6/6')/δ_H 4.04 (2H, dd, *J* = 9.8, 5.1 Hz, H-6/6'), δ_C 71.7 (C-7/7')/δ_H 4.21 (2H, dd, *J* = 9.8, 5.6 Hz, H-7/7'), δ_C 79.1 (C-8/8')/δ_H 5.10 (2H, d, *J* = 5.6 Hz, H-8/8')], 1 个对位取代苯 [δ_C 131.5 (C-1''/1'''), δ_C 129.3 (C-2''/6''/2'''/6''')/δ_H 7.02 (4H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2''/6''/2'''/6'''), δ_C 114.2 (C-3''/5''/3'''/5''')/δ_H 6.80 (4H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3''/4''/3'''/5'''), δ_C 158.5 (C-4''/4''')], 2 个次甲基 [δ_C 31.8 (C-7''/7''')/δ_H 2.81 (4H, t, *J* = 7.6 Hz, H-7''/7'''), δ_C 35.9 (C-8''/8''')/δ_H 2.74 (4H, t, *J* = 7.6 Hz, H-8''/8''')], 1 个吡喃-4-酮单元 [δ_C 169.5 (C-2/2'), δ_C 113.7 (C-3/3')/δ_H 6.14 (2H, s, H-3/3'), δ_C 180.5 (C-4/4'), δ_C 158.5 (C-9/9'), δ_C 121.5 (C-10/10')。上述信息表明存在 2 个完全相同的 5,6,7,8-2-(2-苯基乙基)色酮单元。除了 3 个甲氧基信号 (δ_C 55.4/δ_H 3.77, 2×OCH₃, δ_C 56.5/δ_H 3.87) 外, 其余 18 个碳, 由 2 个对称的 C6-C3 单元组成, 由 C-7''''至 9''''的化学位移, 表明存在双四氢呋喃类木脂素骨架。结合分子式 C₅₈H₆₂O₂₀, 可以发现化合物1是由 2 个 5,6,7,8-四氢-2-(2-苯乙基)色酮单元和 1 个木脂素单元组成的完全对称结构。从 H-3/3' (δ6.14) 到 C-2/2' (δ169.5)/C-4/4' (δ180.5)/C-10/10' (δ121.5)/C-8''/8''' (δ35.9), 从 H-6/6' (δ4.04) 到 C-5/5' (δ68.8)/C-8/8' (δ79.1)/C-10/10' (δ121.5), 从 H-5/5' (δ4.94) 到 C-5/5' (δ68.8)/C-8/8' (δ79.1)/C-10/10' (δ121.5), 从 H-8/8' (δ5.10) 到 C-6/6' (δ71.9)/C-9/9' (δ158.5)/C-10/10' (δ121.5), 从 H-6''/6''' (δ7.02) 到 C-2''/2''' (δ129.3)/C-5''/5''' (δ114.2)/C-7''/7''' (δ31.8), 以及从 H-6''''/6'''' (δ6.61) 到 C-2''''/2'''' (δ103.0)/C-4''''/4'''' (δ134.8)/C-7''''/7'''' (δ85.8) 的 HMBC 相关信号可以证实上述骨架单元的存在(图2)。根据 OCH₃ (δ_C 56.5/δ_H 3.87) 到 C-3''''/C-5''''/C-3''''/C-5''''', OCH₃ (δ_C 55.4/δ_H 3.77) 到 C-4''/C-4'''' 的 HMBC 相关信号, 可以确定 4 个 OCH₃ (δ_C 56.5/δ_H 3.87) 分别连接在 C-3''''/C-5''''/C-3''''/C-5'''''' 上, 另外 2 个 OCH₃ (δ_C 55.4/δ_H 3.77) 连接在 C-4''/C-4'''' 上。从

HMBC 谱信号 H-8/8'到 C-4'''/4''''(δ 134.8), 以及 H-2'''/2''''与 H-8'''/8''''(δ 3.03) 之间的 ROESY 相关, 可以确定 2 个 5,6,7,8-四氢-2-(2-苯乙基)色酮单元和木脂素单元分别由 2 个醚键连接形成化合物 **1**。

另外, 与文献数据^[11-12]对比, 发现化合物 **1** 中

木脂素单元的平面结构及相对构型与从沉香基原植物中发现的 (+)-丁香树酯酚一致。这表明(+)-丁香树酯酚可能是化合物 **1** 木脂素单元的前体, 意味着化合物 **1** 中木脂素单元与(+)-丁香树酯酚具有相同的绝对构型。

表 1 化合物 **1** 的 ¹H- 和 ¹³C-NMR 数据 (500/125 MHz, CDCl₃)
Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data of compound **1** (500/125 MHz, CDCl₃)

碳位	Unit A/ Unit B		Unit C	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
2/2'	169.5, C			
3/3'	113.7, CH	6.14 (s)		
4/4'	180.5, C			
5/5'	68.8, CH	4.94 (d, $J = 5.1$ Hz)		
6/6'	71.9, CH	4.04 (dd, $J = 9.8, 5.1$ Hz)		
7/7'	71.7, CH	4.21 (dd, $J = 9.8, 5.6$ Hz)		
8/8'	79.1, CH	5.10 (d, $J = 5.6$ Hz)		
9/9'	158.5, C			
10/10'	121.5, C			
1''/1'''	131.5, C			
2''/6''/2'''/6'''	129.3, CH	7.02 (d, $J = 8.4$ Hz)		
4''/4'''	158.5, C			
3''/5''/3'''/5'''	114.2, CH	6.80 (d, $J = 8.4$ Hz)		
7''/7'''	31.8, CH ₂	2.81 (t, $J = 7.6$ Hz)		
8''/8'''	35.9, CH ₂	2.74 (t, $J = 7.6$ Hz)		
1''''/1'''''			138.2, C	
2''''/6''''/2'''''/6'''''			103.0, CH	6.61 (s)
4''''/4'''''			134.8, C	
3''''/5''''/3'''''/5'''''			152.9, C	
7''''/7'''''			85.8, CH	4.76 (d, $J = 2.5$ Hz)
8''''/8'''''			54.6, CH	3.03 (m)
9''''/9'''''			72.1, CH ₂	4.27 (m), 3.94 (dd, $J = 9.3, 3.1$ Hz)
4''/4'''-OCH ₃	55.4, CH ₃	3.77 (s)		
3''''/5''''/3'''''/5'''''-OCH ₃			56.5, CH ₃	3.87 (s)

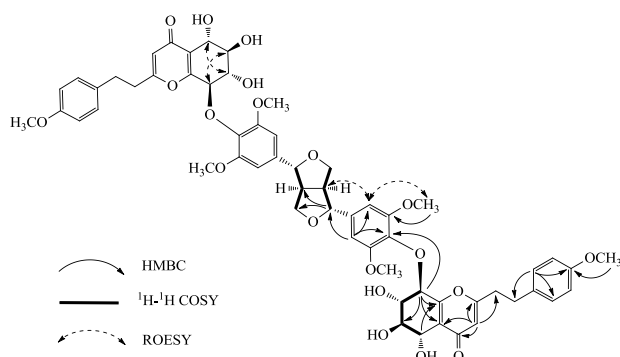


图 2 化合物 **1** 的关键 2D NMR 相关信号

Fig. 2 Key 2D NMR correlations of compound **1**

化合物 **1** 由 2 个 5,6,7,8-四氢-2-(2-苯乙基)色酮单元和木脂素组成, 呈完全对称结构, 表明 2 个 5,6,7,8-四氢-2-(2-苯乙基)色酮单元具有相同的构型。H-6/6'与 H-7/7'之间较大的偶合常数 (9.8 Hz), 以及 H-5/5'与 H-7/7', H-6/6'与 H-8/8'的 NOE 效应, 表明 5,6,7,8-四氢-2-(2-苯乙基)色酮单元的 H-5/5'与 H-6/6', H-7/7'与 H-8/8'分别处于反式位置 (图 2)。通过分析该化合物与 2-(2-苯乙基)色酮二聚体 aquicrassone **A**^[13]、(5*R*,6*S*,7*S*,8*R*)-6'-hydroxy-4'''-methoxy-crassin **B**^[14]、2'-hydroxy-aquifilarone **Q**^[14]以及(+)-丁香树酯酚的 CD 数据^[15], 根据激子手性规

则和化合物 **1** 的 CD 图谱中 Cotton 效应 [226 (-4.0), 272 (+4.4) nm], 可以判断化合物 **1** 中醚键连接的 2 个发色团呈顺时针分布, 即 C-8 和 C-8' 为 *R* 型 (图 3), 从而确定化合物 **1** 的绝对构型为 (5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,5*S'*,6*R'*,7*S'*,8*R'*,7*R''''*,8*S''''*,7*R''''*,8*S''''*)。因此, 化合物 **1** 的结构确定为如图 1 所示, 经 SciFinder 检索为新化

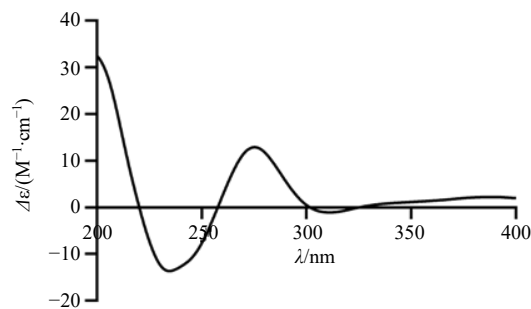


图 3 化合物 **1** 的 CD 谱图及发色团激子手性

Fig. 3 CD spectrum and exciton chirality between chromophores of compound **1**

合物, 并命名为厚叶沉香醇 (aquicrassnol)。化合物 **2**: 淡黄色油状物。ESI-MS m/z : 323.3 [M+Na]⁺, 分子式为 C₁₇H₁₃ClO₃; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.28 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-7), 7.18~7.21 (2H, m, H-3', 5'), 7.16~7.18 (2H, m, H-2', 6'), 7.14 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-5), 7.10 (1H, t, *J* = 6.9 Hz, H-4'), 6.12 (1H, s, H-3), 2.91~2.98 (4H, m, H-7', 8'); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 168.5 (C-2), 109.0 (C-3), 176.1 (C-4), 107.3 (C-5), 154.5 (C-6), 122.6 (C-7), 122.4 (C-8), 145.2 (C-9), 125.8 (C-10), 140.0 (C-1'), 128.5 (C-2'), 128.3 (C-3'), 126.2 (C-4'), 128.3 (C-5'), 128.5 (C-6'), 31.9 (C-7'), 34.7 (C-8')。以上数据与文献报道一致^[16], 确定化合物 **2** 为 8-氯-6-羟基-2-(2-苯乙基)色酮。

化合物 **3**: 淡黄色油状物。ESI-MS m/z : 353.8 [M+Na]⁺, 分子式为 C₁₈H₁₅ClO₄; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.35 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-7), 7.20 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-5), 7.15 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.17 (1H, s, H-3), 2.91~2.98 (4H, m, H-7', 8'); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 168.5 (C-2), 109.0 (C-3), 176.1 (C-4), 107.3 (C-5), 157.7 (C-6), 122.7 (C-7), 122.4 (C-8), 145.0 (C-9), 125.1 (C-10), 131.8 (C-1'), 129.3 (C-2'), 113.8 (C-3'), 157.7 (C-4'), 113.8 (C-5'), 129.3 (C-6'), 31.1 (C-7'), 35.0 (C-8')。以上数据与文献报道一致^[16], 确定化合物 **3** 为 8-氯-6-羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮。

4 抗炎活性测试

4.1 细胞毒活性

采用 MTT 法测试化合物 **1**~**3** 对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的细胞毒活性^[17-18]。RAW264.7 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养液于 37 °C、5%

CO₂ 培养箱中常规培养。细胞按 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板中培养 24 h, 分别设空白组、阳性药 (盐酸阿霉素) 组、待测化合物组, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中贴壁 72 h 后, 向每孔细胞中加入 15 μL 质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 在 37 °C 条件下反应 4 h 后吸走上清液, 向每孔加入 100 μL DMSO 充分溶解, 于酶标仪 490 nm 波长下测定每孔的吸光度 (*A*) 值, 每组实验平行 3 次。按公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - A/A_0$$

*A*₀、*A* 分别为空白组、实验组的 *A* 值

实验结果显示, 以上化合物在 100 μmol/L 浓度下不具有细胞毒活性。

4.2 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 产生 NO 的活性

采用 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 模型测试化合物 **1**~**3** 的抗炎活性^[19-20]。RAW264.7 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养液于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。细胞按 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板中培养 24 h, 分别设对照组 (不加 LPS)、模型组、阳性药 (槲皮素或吡咯美辛) 组、化合物不同剂量 (100、50、25、12.5、6.25 μmol/L) 组, 除对照组外, 模型组和各给药组加入 LPS (500 ng/mL) 诱导, 各给药组再加入相应药物, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中贴壁 24 h 后, 取 100 μL 于新的 96 孔板中, 之后向每孔加入 100 μL (40

mg/mL) Griess 试剂, 混匀后于酶标仪 540 nm 波长下测定各孔的 A 值, 每组实验平行 3 次。按公式计算 NO 抑制率, 利用 GraphPad Prism 软件处理数据, 求得化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 产生 NO 的半抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50})。

$$\text{抑制率} = (A_2 - A_1) / (A_2 - A_0)$$

A_0 、 A_1 、 A_2 分别为对照组、药物组、模型组的 A 值

结果显示, 化合物 **1** 具有抑制 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 产生 NO 的活性, IC_{50} 值为 $(47.53 \pm 2.14) \mu\text{mol/L}$ 。阳性对照槲皮素和吡喹美辛的 IC_{50} 值为 (12.46 ± 0.24) 和 $(25.28 \pm 1.14) \mu\text{mol/L}$ 。其他化合物无明显抑制 NO 产生的活性。

5 讨论

本研究首次从老挝厚叶沉香所产沉香中发现的由 2-(2-苯乙基)色酮与木脂素形成的新的杂合物 (**1**), 且该化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞株产生 NO 具有一定的抑制活性, IC_{50} 值为 $(47.53 \pm 2.14) \mu\text{mol/L}$ 。目前, 从沉香中共分离鉴定出 2-(2-苯乙基)色酮聚合物 103 个、杂合物 (杂聚体) 25 个, 其中多数都具有一定的生物活性^[1-10,21-26]。之前的杂聚体均是由 1 个 2-(2-苯乙基)色酮单元与 1 个倍半萜、黄酮或苜基丙酮等单元等结合而形成的, 而化合物 **1** 是由 2 个 2-(2-苯乙基)色酮单元与 1 个木脂素单元分别以 C-O-C 连接形成的杂聚体, 这也体现了其结构的特别之处。并四氢呋喃木脂素在沉香基原植物树干中分布广泛, 其中 (+)-丁香树酯酚是 1 个常见的化合物, 在很多植物中都有分布, 且在国产沉香基原植物白木香中含量也很高, 本研究组前期在白木香中分离得到其成分达 120 mg, 但在结香后的沉香树脂中却从未分离出此成分。此次化合物 **1** 中的木脂素单元即 (+)-丁香树酯酚, 这也为完善沉香中 2-(2-苯乙基)色酮衍生物的生物合成途径提供了研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li W, Chen H Q, Wang H, *et al.* Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: Chemistry, biological activities and biosynthesis [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(3): 528-565.
- [2] 戴好富. 沉香的现代研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2017: 1-26.
- [3] Iwagoe K, Konishi T, Kiyosawa S, *et al.* The structures of AH10 and AH11, nobel bi-phenylethylchromones from agalwood [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(11): 4889-4891.
- [4] Iwagoe K, Kodama S, Konishi T, *et al.* The structures of AH15 and AH18, new bi- and tri-phenylethylchromones from agalwood [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(11): 4680-4682.
- [5] Konishi T, Kiyosawa S, Shimada Y, *et al.* The structure of AH16, new tetrahydroxy-2-(2-phenylethyl)chromone from agalwood [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(5): 1428-1430.
- [6] Yang Y, Chen H Q, Kong F D, *et al.* Dimeric sesquiterpenoid-4H-chromone derivatives from agarwood of *Aquilaria crassna* and their cytotoxicity [J]. *Phytochemistry*, 2018, 145: 207-213.
- [7] Dong W H, Wang H, Guo F J, *et al.* Three new 2-(2-phenylethyl)chromone derivatives of agarwood originated from *Gyrinops salicifolia* [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 576.
- [8] Xia L L, Li W, Wang H, *et al.* LC-MS guided identification of dimeric 2-(2-phenylethyl)chromones and sesquiterpene-2-(2-phenylethyl)chromone conjugates from agarwood of *Aquilaria crassna* and their cytotoxicity [J]. *Fitoterapia*, 2019, 138: 104349.
- [9] Wang Y Y, Wang H, Mi C N, *et al.* Two new 2-(2-phenethyl)chromone derivatives from agarwood of *Aquilaria walla* and their cytotoxicity [J]. *Phytochem Lett*, 2021, 42: 36-40.
- [10] Chen L Y, Chen H Q, Cai C H, *et al.* Seven new 2-(2-phenethyl)chromone derivatives from agarwood of *Aquilaria walla* [J]. *Fitoterapia*, 2023, 165: 105421.
- [11] 李薇, 梅文莉, 王昊, 等. 白木香树干的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2826-2831.
- [12] 陈小宇, 李俊甫, 李颖硕, 等. 白木香茎皮的化学成分及其抗幽门螺旋杆菌活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20240510.201.
- [13] Chai H X, Wang H, Zeng J, *et al.* Two unprecedented 2-(2-phenethyl)chromone dimers from red soil agarwood of *Aquilaria crassna* [J]. *Phytochem Lett*, 2024, 59: 87-91.
- [14] Wei Y, Dong W H, Li W, *et al.* Six unprecedented 2-(2-phenethyl)chromone dimers from agarwood of *Aquilaria filaria* [J]. *Fitoterapia*, 2024, 175: 105905.
- [15] Qiu K M, Qiu H, Xie Y Q, *et al.* Chiral resolution of furofuran lignans and their derivatives from the stems of *Dendrobium 'Sonia'* [J]. *Chin J Nat Med*, 2023, 22: 1-9.
- [16] Gao Y H, Liu J M, Lu H X, *et al.* Two new 2-(2-phenylethyl)chromen-4-ones from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. *Helv Chim Acta*, 2012, 95(6): 951-954.
- [17] 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.
- [18] Han Y, Yuan C, Zhou X W, *et al.* Anti-inflammatory activity of three triterpene from *Hippophae rhamnoides* L. in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 12009.
- [19] Huo H X, Zhu Z X, Pang D R, *et al.* Anti-neuroinflammatory sesquiterpenes from Chinese eaglewood [J]. *Fitoterapia*, 2015, 106: 115-121.
- [20] 张琳, 王昊, 董文化, 等. 栽培奇楠沉香化学成分及其抗炎活性研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 695-703.
- [21] He D, Dong W H, Li W, *et al.* LC-MS-guided isolation of 2-(2-phenylethyl)chromone dimers from red soil agarwood of *Aquilaria crassna* [J]. *Fitoterapia*, 2022, 158: 105162.
- [22] Liu F Z, Wang H, Li W, *et al.* Filarones A and B, new anti-inflammatory dimeric 2-(2-phenethyl)chromones from agarwood of *Aquilaria filaria* [J]. *Phytochem Lett*, 2021, 46: 11-14.
- [23] Li W, Yang Y, Dong W H, *et al.* Dimeric 2-(2-phenylethyl)chromones from the agarwood of *Aquilaria crassna* in Laos [J]. *Fitoterapia*, 2019, 133: 12-16.
- [24] Huo H X, Zhu Z X, Song Y L, *et al.* Anti-inflammatory dimeric 2-(2-phenylethyl)chromones from the resinous wood of *Aquilaria sinensis* [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(3): 543-553.
- [25] Zhang H, Ma J L, Chang C, *et al.* Gastroprotective 2-(2-phenylethyl)chromone-sesquiterpene hybrids from the resinous wood of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 133: 106396.
- [26] Huang X L, Zhou Y T, Yan Y M, *et al.* Sesquiterpenoid-chromone heterohybrids from agarwood of *Aquilaria sinensis* as potent specific Smad3 phosphorylation inhibitors [J]. *J Org Chem*, 2022, 87: 7643-7648.

[责任编辑 王文倩]