

尖刀唇石斛化学成分研究

杨晓蓓^{1,2}, 颜莎¹, 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, 昆明 650201;

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 本文对尖刀唇石斛(*Dendrobium heterocarpum* Lindl.) 中的化学成分及其抗炎和抗氧化活性进行研究。实验采用硅胶、Sephadex LH-20 凝胶和高效液相色谱等手段进行分离纯化, 并用波谱学方法鉴定化合物结构, 从尖刀唇石斛的乙酸乙酯萃取部位中分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为 3,4'-二羟基-5-甲氧基联苳(1)、batatasin III(2)、3-羟基-4',5-二甲氧基联苳(3)、3-*O*-methylgigantol(4)、gigantol(5)、3,4-二羟基-4',5-二甲氧基联苳(6)、moscatilin(7)、dendrocandin A(8)、(*S*)-3,4,α-三羟基-4',5-二甲氧基联苳(9)、densiflorol A(10)、dendrocandin I(11)、dendrocandin F(12)、coelonin(13)、红花素(14)、4-羟基-2-甲氧基-3,6-二甲苯甲酸(15)。化合物 1~15 均为首次从该种植物中分离得到, 其中化合物 14 为首次从该属植物中分离得到。化合物 3、5、11 具有抑制小鼠 RAW264.7 巨噬细胞生成一氧化氮的作用; 化合物 5 具有较好的 ABTS 自由基清除能力, 化合物 6 具有较好的 DPPH 自由基清除能力。

关键词: 尖刀唇石斛; 联苳; 红花素; RAW264.7 巨噬细胞; DPPH 自由基

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)10-1745-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.10.011

Chemical constituents from *Dendrobium heterocarpum* Lindl.

YANG Xiao-bei^{1,2}, YAN Sha¹, HU Jiang-miao¹, ZHOU Jun^{1*}

¹State Key Laboratory of Phytochemistry and plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; ²University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Abstract: The aim of this research was to investigate the chemical constituents from *Dendrobium heterocarpum* Lindl. and antioxidant and anti-inflammatory activities of selected compounds. 15 compounds were isolated and purified from *Dendrobium heterocarpum* Lindl. by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 and semipreparative HPLC. And their structures were identified as 3,4'-dihydroxy-5-methoxybibenzyl (1), batatasin III (2), 3-hydroxy-4',5-dimethoxybibenzyl (3), 3-*O*-methylgigantol (4), gigantol (5), 3,4-dihydroxy-4',5-dimethoxybibenzyl (6), moscatilin (7), dendrocandin A (8), (*S*)-3,4,α-trihydroxy-4',5-dimethoxybibenzyl (9), densiflorol A (10), dendrocandin I (11), dendrocandin F (12), coelonin (13), carthamidin (14), 4-hydroxy-2-methoxy-3,6-dimethylbenzoic acid (15) based on extensive spectroscopic methods (¹H NMR, ¹³C NMR, HSQC, HMBC). Compounds 1-15 were isolated from *Dendrobium heterocarpum* for the first time, of which compound 14 were obtained from this genus for the first time. Some isolates were evaluated for the inhibitory activities on nitric oxide production and the ABTS and DPPH radical scavenging activity. Compounds 3, 5 and 11 showed inhibitory effect on the NO production in RAW264.7 macrophage cell. And Compounds 5 and 6 showed DPPH and ABTS⁺ radicals scavenging activity.

Key words: *Dendrobium heterocarpum*; bibenzyl; carthamidin; RAW264.7 macrophage cell; DPPH radical

石斛属(*Dendrobium*) 是兰科(Orchidaceae) 植物中第二大属, 我国石斛属植物共有 74 种 2 变种, 主

要分布于秦岭、淮河以南, 云南、两广、海南等地区^[1]。石斛药材最早记录在《神农本草经》中, 具有滋阴清热, 生津益胃, 润肺止咳, 明目等功效。目前研究显示石斛中主要包括多糖、生物碱、黄酮、酚类、萜类等, 现代药理学研究证明, 石斛具有增强免疫、缓解糖尿病及其并发症、抗肿瘤、抗氧化和延缓衰

收稿日期: 2019-03-06

接受日期: 2019-06-25

基金项目: 云南石斛产业转型升级技术与产业化(2017ZF003-04)

* 通信作者 Tel: 86-871-65223264; E-mail: jzhou@mail.kib.ac.cn

老、护肝、抗炎和保护神经系统等功效^[2,3]。

尖刀唇石斛 (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.) 生于海拔 1 500 ~ 1 750 米的山地疏林中树干上, 分布于云南南部至西部 (勐腊、潞西、腾冲、镇康)、斯里兰卡、印度、尼泊尔、锡金、不丹、缅甸、泰国、老挝、越南、菲律宾、马来西亚、印度尼西亚^[1]。尖刀唇石斛茎呈细圆柱形, 不分枝, 常弯曲, 表面金黄色或棕黄色, 具细密的浅纵皱纹。质轻而脆, 断面黄白色、平坦而疏松, 味苦^[4]。此花有栽培, 具有较高的园艺价值。目前对尖刀唇石斛的研究主要集中于其离体快繁技术、观赏特性和鉴定评价等, 对其化学成分及药理活性的研究还未见报道。为了发掘尖刀唇石斛的药用价值及为石斛资源合理的开发利用提供一定的依据, 本课题组对其乙酸乙酯提取物的化学成分进行了研究, 并从中分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为 3,4'-二羟基-5-甲氧基联苳 (**1**)、batataasin III (**2**)、3-羟基-4',5-二甲氧基联苳 (**3**)、3-*O*-methylgigantol (**4**)、gigantol (**5**)、3,4-二羟基-4',5-二甲氧基联苳 (**6**)、moscatilin (**7**)、dendrocandin A (**8**)、(*S*)-3,4, α -三羟基-4',5-二甲氧基联苳 (**9**)、densiflorol A (**10**)、dendrocandin I (**11**)、dendrocandin F (**12**)、coelonin (**13**)、红花素 (**14**)、4-羟基-2-甲氧基-3,6-二甲基苯甲酸 (**15**)。以上化合物均为首次从该植物中分离得到, 其中化合物 **14** 为首次从该属植物中分离得到, 并筛选出部分化合物对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的一氧化氮生成抑制活性和自由基清除活性进行研究, 为尖刀唇石斛深入的开发利用提供了一定的理论依据。

1 仪器与材料

Avance III-400 超导核磁共振仪 (德国布鲁克拜厄斯宾有限公司)、Avance III-500 超导核磁共振仪 (德国布鲁克拜厄斯宾有限公司)、Avance III-600 型超导核磁共振仪 (德国布鲁克拜厄斯宾有限公司)、API QSTAR Pulsari 液相四级杆飞行时间质谱仪 (MDS Scipaszex, Concord, Ontario, Canada), Auto Spec Premier P776 三扇型双聚焦质谱仪 (Waters, USA), Agilent 1100 半制备液相色谱仪 (美国安捷伦公司), 旋转蒸发仪 (德国海道夫), FlexStation 多功能酶标仪 (Bio-RAD 680, 美国), 薄层层析硅胶、柱层析硅胶 (青岛美高集团有限公司, 中国), Sephadex LH-20 (Ameisham Biosciences, Uppsala, Sweden), MCI gel CHP-20P (Mitsubishi Chemical Corp., Tokyo, Japan); 用于半制备的试剂为色谱纯, 其余均为分

析纯。脂多糖、NG-单甲基-*L*-精氨酸 (*L*-NMMA)、DPPH、ABTS (sigma 公司), 一氧化氮检测试剂盒 (广州碧云天)。小鼠 RAW264.7 巨噬细胞购自美国典型培养物保藏中心。

尖刀唇石斛采自云南文山, 经文山学院丁长春副教授鉴定为兰科石斛属植物尖刀唇石斛 (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.), 标本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 实验方法

2.1 提取分离

尖刀唇石斛全草鲜品 13 kg 干燥粉碎后用 40 L 丙酮浸泡三次, 合并提取液减压浓缩得到丙酮部位浸膏 320 g, 先后用乙酸乙酯、正丁醇分别合并萃取, 减压回收萃取液乙酸乙酯和正丁醇, 最终得到乙酸乙酯部位浸膏 95 g, 正丁醇部位浸膏 77 g。

其中乙酸乙酯部位, 经硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮, 100:0, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 0:1) 系统梯度洗脱, 得到 6 个组分 (Fr. 1 ~ Fr. 6)。Fr. 1 (6.7 g) 经硅胶柱色谱 (石油醚-乙酸乙酯, 100:0, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 0:1) 系统梯度洗脱得到 5 个组分 (Fr. 1.1 ~ Fr. 1.5), Fr. 1.1 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (三氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得到化合物 **15** (3 mg)。

Fr. 2 (2.0 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (三氯甲烷-甲醇, 1:1) 分离得到 1 个组份 (Fr. 2.1) 和化合物 **3** (128 mg) 和 **10** (2 mg)。

Fr. 3 (4.5 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (三氯甲烷-甲醇, 1:1) 分离得到 3 个组份 (Fr. 3.1 ~ Fr. 3.3)。Fr. 3.1 经正相硅胶柱 (石油醚-丙酮, 3:1) 得到 2 个组份 (Fr. 3.1.1 ~ Fr. 3.1.2), Fr. 3.1.2 依次通过凝胶柱层析 (三氯甲烷-甲醇, 1:1)、半制备 HPLC (甲醇-水, 70%) 分离得到化合物 **12** (10 mg); Fr. 3.1.1 经过 MCI 柱 (甲醇-水, 20% ~ 100%)、正相硅胶柱 (石油醚-乙酸乙酯 3:2)、Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (三氯甲烷-甲醇, 1:1) 分离得到化合物 **11** (5 mg)、**8** (8 mg) 和 **6** (7 mg)。Fr. 3.2 经过正相硅胶柱 (石油醚-乙酸乙酯 5:1)、Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (三氯甲烷-甲醇, 1:1)、半制备 HPLC 分离得到化合物 **4** (3 mg) 和 **9** (3 mg)。

Fr. 4 (5.4 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (三氯甲烷-甲醇, 1:1) 分离得到 5 个组份 (Fr. 4.1 ~ Fr. 4.5)。Fr. 4.5 经过正相硅胶柱 (三氯甲烷-甲醇, 40

:1)、Sephadex LH-20 凝胶柱层析(三氯甲烷-甲醇,1:1)、半制备 HPLC(甲醇-水,45%)分离得到化合物 **5**(11 mg),半制备 HPLC(甲醇-水,70%)分离得到化合物 **1**(37 mg)和 **2**(22 mg);Fr. 3.5 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(甲醇-水,90%)、半制备 HPLC(甲醇-水,60%)分离得到化合物 **7**(7 mg)。

Fr. 5(4.3 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(三氯甲烷-甲醇,1:1)分离得到 5 个组份(Fr. 5.1 ~ Fr. 5.5)。Fr. 5.5 经过正相硅胶柱(石油醚-丙酮,10:1)、半制备 HPLC(甲醇-水,65%)分离得到化合物 **13**(5 mg)和 **14**(6 mg)。

2.2 RAW264.7 细胞 NO 生成抑制活性

以脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为体外炎症反应模型,一氧化氮合酶抑制剂 NG-单甲基-L-精氨酸(L-NMMA, IC₅₀ = 34 μmol/L)为阳性对照(50 μmol/L),Griess 试剂显色法检测 NO 的生成量,同时以 MTS 法检测细胞活力,考察石斛中酚类化合物的抗炎作用。

将 RAW264.7 细胞接种至 96 孔板,培养过夜,弃去上清液,用 1mg/mL 的 LPS 诱导,同时加入终浓度为 25 μmol/L 的化合物溶液,设置 LPS 对照组和 L-NMMA 阳性对照组,培养过夜,分别取各组 50 μL 上清液随后加入 Griess 试剂 I 和试剂 II 各 50 μL,设置 3 个复孔,30 min 内于 540 nm 处测定吸光度值,利用公式 1 计算 NO 生成抑制率。同时用 MTS 检测细胞活力,排除化合物的细胞毒性对 NO 生成的影响。

NO 生成抑制率(%) = (LPS 对照组 OD_{540nm} - 样品组 OD_{540nm}) / LPS 对照组 OD_{540nm} × 100% (1)

2.3 自由基清除实验

DPPH 是 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 [1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl] 的英文简称,ABTS 是 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)] 的英文简称,其测定自由基清除作用是基于电子转移的方法,通过分光光度计测定颜色的变化来反映抗氧化能力的强弱。

2.3.1 DPPH 自由基清除实验

精密称取 DPPH 试剂 4.0 mg,用无水乙醇定容至 10 mL,待用。5 倍稀释 DPPH 自由基溶液,在 96 孔板中加入 25 μmol/L 的化合物 100 μL,每个样品设 3 个复孔,再加入稀释的 DPPH 自由基溶液 100

μL,同时设置空白对照和化合物空白对照,以同浓度的水溶性维生素 E(Trolox)为阳性对照,常温反应 37 °C 避光静置反应 30 min 后于波长 517 nm 处测定 OD 值,记为 D_s,空白对照记为 D_c,化合物对照记为 D_{sc},按公式 2 计算自由基清除率(SR)。

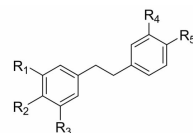
$$SR(\%) = [1 - (D_s - D_{sc})] / D_c \times 100\% \quad (2)$$

2.3.2 ABTS 自由基清除实验

精密称取 ABTS 试剂 40.0 mg,用蒸馏水定容至 10 mL,再精密称取过硫酸钾 7.0 mg,用蒸馏水定容至 10 mL,摇匀后与 ABTS 水溶液混合,室温黑暗处反应 12 ~ 16 h,产生 ABTS 自由基,避光保存,待用。15 倍稀释 ABTS 自由基溶液,在 96 孔板中加入 25 μmol/L 的化合物 100 μL,每个样品设 3 个复孔,再加入稀释的 ABTS 自由基溶液 100 μL,同时设置空白对照和化合物对照,以同浓度的水溶性维生素 E(Trolox)为阳性对照,常温反应 5 min 后于波长 734 nm 处测定 OD 值,记为 D_s,空白对照记为 D_c,化合物对照记为 D_{sc},按公式 2 计算自由基清除率(SR)。

3 结果与讨论

3.1 结构鉴定



- 1 R₁ = R₅ = OH, R₃ = OCH₃, R₂ = R₄ = H
- 2 R₁ = R₄ = OH, R₃ = OCH₃, R₂ = R₅ = H
- 3 R₁ = OH, R₃ = R₅ = OCH₃, R₂ = R₄ = H
- 4 R₃ = OH, R₁ = R₄ = R₅ = OCH₃, R₂ = H
- 5 R₃ = R₅ = OH, R₁ = R₄ = OCH₃, R₂ = H
- 6 R₂ = R₃ = OH, R₁ = R₅ = OCH₃, R₄ = H
- 7 R₂ = R₅ = OH, R₁ = R₃ = R₄ = OCH₃

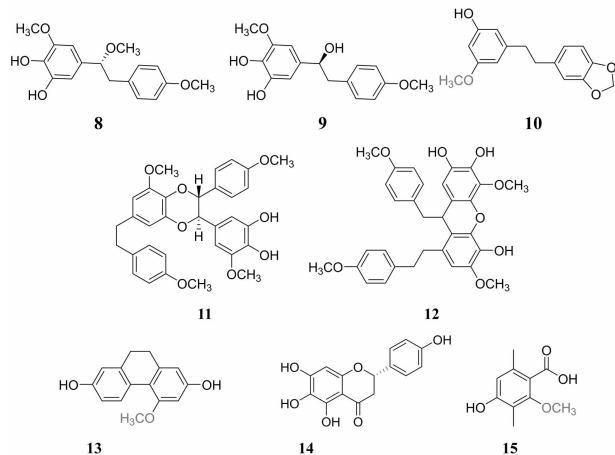


图 1 化合物结构

Fig. 1 Structures of compounds

化合物 1 白色粉末(三氯甲烷); (+)-ES-IMS: m/z 267 [M + Na]⁺; C₁₅H₁₆O₃; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H : 6.96 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.66 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.20 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.19 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 6.16 (1H, brs, H-4), 2.74 (4H, m, H- α , α'), 3.69 (3H, s, OCH₃-3); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C : 162.2 (s, C-3), 159.3 (s, C-5), 156.4 (s, C-4'), 145.6 (s, C-1), 134.0 (s, C-1'), 130.4 (d, C-2', 6'), 116.0 (d, C-3', 5'), 109.1 (d, C-6), 106.6 (d, C-2), 99.9 (d, C-4), 39.7 (t, C- α), 38.1 (t, C- α'), 55.5 (q, OCH₃-3); 。以上数据与文献^[5]报道基本一致,故鉴定化合物 **1** 为 3,4'-二羟基-5-甲氧基联苳。

化合物 2 红色油状物(三氯甲烷); (+)-ES-IMS: m/z 267 [M + Na]⁺; C₁₅H₁₆O₃; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H : 7.13 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-5'), 6.75 (1H, dd, J = 7.6, 1.9 Hz, H-6'), 6.65 (1H, dd, J = 7.6, 1.9 Hz, H-4'), 6.64 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.32 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-4), 6.25 (2H, brs, H-2, 6), 2.81 (4H, m, H- α , α'), 3.74 (3H, s, OCH₃-3); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C : 160.8 (s, C-3), 156.6 (s, C-5), 155.5 (s, C-3'), 144.4 (s, C-1), 143.6 (s, C-1'), 129.6 (d, C-5', 6'), 121.0 (d, C-6'), 115.4 (d, C-2'), 112.9 (d, C-4'), 108.0 (d, C-6), 106.8 (d, C-2), 99.1 (d, C-4), 37.7 (t, C- α), 37.3 (t, C- α'), 55.3 (q, OCH₃-3)。以上数据与文献^[6]报道基本一致,故鉴定化合物 **2** 为 batatasin III。

化合物 3 黄色油状物(三氯甲烷); C₁₆H₁₈O₃; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 7.09 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.83 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.32 (1H, t, J = 1.8 Hz, H-6), 6.26 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.25 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-4), 2.82 (4H, m, H- α , α'), 3.79 (3H, s, OCH₃-4'), 3.75 (3H, s, OCH₃-5); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C : 160.8 (s, C-4'), 157.8 (s, C-5), 156.6 (s, C-3), 144.6 (s, C-1), 133.8 (s, C-1'), 129.4 (d, C-2', 6'), 113.8 (d, C-3', 5'), 108.0 (d, C-2), 106.8 (d, C-6), 99.0 (d, C-4), 38.2 (t, C- α), 36.7 (t, C- α'), 55.3 (q, OCH₃-3'), 55.2 (q, OCH₃-5)。以上数据与文献^[7]报道基本一致,故鉴定化合物 **3** 为 3-羟基-4',5-二甲氧基联苳。

化合物 4 白色无定形粉末(三氯甲烷); C₁₇H₂₀O₄; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 6.79 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.72 (1H, dd, J = 8.1, 1.9 Hz, H-6'), 6.66 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.32 (1H, t, J = 1.9 Hz, H-4), 6.25 (2H, d, J = 1.9 Hz, H-2, 6), 2.82 (4H, m, H- α , α'), 3.86 (3H, s, OCH₃-3'), 3.84 (3H, s, OCH₃-4'), 3.75 (3H, s, OCH₃-3); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C : 159.8 (s, C-3), 155.6 (s, C-5), 147.7 (s, C-3'), 146.2 (s, C-1), 143.5 (s, C-4'), 133.3 (s, C-1'), 119.2 (d, C-6'), 110.8 (d, C-5'), 110.2 (d, C-2'), 106.9 (d, C-6), 105.8 (d, C-2), 97.9 (d, C-4), 37.2 (t, C- α), 36.1 (t, C- α'), 54.9 (q, OCH₃-3), 54.8 (q, OCH₃-3'), 54.2 (q, OCH₃-4')。以上数据与文献^[8]报道基本一致,故鉴定化合物 **4** 为 3-O-methylgigantol。

化合物 5 白色无定形粉末(三氯甲烷); (+)-ESIMS: m/z 297 [M + Na]⁺; C₁₆H₁₈O₄; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 6.84 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.68 (1H, dd, J = 8.0, 1.9 Hz, H-6'), 6.63 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.32 (1H, t, J = 1.9 Hz, H-4), 6.25 (2H, d, J = 1.9 Hz, H-2, 6), 2.81 (4H, m, H- α , α'), 3.84 (3H, s, OCH₃-3'), 3.75 (3H, s, OCH₃-3); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C : 160.8 (s, C-3), 156.6 (s, C-5), 146.3 (s, C-3'), 144.6 (s, C-1), 143.7 (s, C-4'), 133.7 (s, C-1'), 121.0 (d, C-6'), 114.2 (d, C-5'), 111.2 (d, C-2'), 108.1 (d, C-6), 106.8 (d, C-2), 99.0 (d, C-4), 38.3 (t, C- α), 37.3 (t, C- α'), 55.9 (q, OCH₃-3'), 55.3 (q, OCH₃-3)。以上数据与文献^[9]报道基本一致,故鉴定化合物 **5** 为 gigantol。

化合物 6 淡黄色油状物(三氯甲烷); C₁₆H₁₈O₄; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 7.09 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.45 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-6), 6.24 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 2.79 (4H, m, H- α , α'), 3.82 (3H, s, OCH₃-5), 3.79 (3H, s, OCH₃-4'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C : 157.8 (s, C-4'), 146.8 (s, C-5), 133.9 (s, C-3), 133.8 (s, C-4), 130.5 (s, C-1), 130.4 (s, C-1'), 129.4 (d, C-2', 6'), 113.7 (d, C-3', 5'), 108.7 (d, C-6), 103.6 (d, C-2), 38.1 (s, C- α), 37.2 (t, C- α'), 56.1 (q, OCH₃-5), 55.3 (q, OCH₃-4')。以上数据与文献^[10]报道基本一致,故鉴定化合物 **6** 为

3,4-二羟基-4',5-二甲氧基联苳。

化合物 7 黄色油状物(三氯甲烷); (+)-ESIMS: m/z 327 [M + Na]⁺; C₁₇H₂₀O₅; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 6.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.68 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, H-6'), 6.61 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 6.36 (2H, s, H-2,6), 2.81 (4H, m, H-α, α'), 3.85 (6H, s, OCH₃-3,5), 3.84 (3H, s, OCH₃-3'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 146.8 (s, C-3,5), 146.2 (s, C-3'), 143.7 (s, C-4'), 133.7 (s, C-1'), 132.9 (s, C-4), 132.8 (s, C-1), 121.1 (d, C-6'), 114.2 (d, C-5'), 111.2 (d, C-2'), 105.2 (d, C-2,6), 38.5 (t, C-α'), 38.0 (t, C-α), 56.3 (q, OCH₃-3,5), 55.9 (q, OCH₃-3'). 以上数据与文献^[11]报道基本一致,故鉴定化合物 7 为 moscatilin。

化合物 8 淡黄色无定形固体(三氯甲烷); [α]_D²⁴-36.8° (*c* = 0.11, MeOH); (+)-ESIMS: m/z 327 [M + Na]⁺; C₁₇H₂₀O₅; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.01 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-10,14), 6.78 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-11,13), 6.48 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.33 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 4.41 (1H, t, *J* = 7.4, 6.0 Hz, H-α), 3.00 (1H, dd, *J* = 13.8, 7.4 Hz, H-α'), 2.80 (1H, dd, *J* = 13.8, 6.0 Hz, H-α'), 3.18 (3H, s, OCH₃-7), 3.82 (3H, s, OCH₃-5), 3.77 (3H, s, OCH₃-12); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 157.9 (s, C-12), 146.9 (s, C-5), 143.6 (s, C-3), 133.6 (s, C-4), 131.6 (s, C-1), 130.6 (s, C-9), 130.4 (d, C-10,14), 113.6 (d, C-11,13), 107.4 (d, C-6), 101.4 (d, C-2), 85.2 (d, C-α), 43.8 (t, C-α'), 56.6 (q, OCH₃-α), 56.1 (q, OCH₃-5), 55.2 (q, OCH₃-12)。以上数据与文献^[12]报道基本一致,故鉴定化合物 8 为 dendrocandin A。

化合物 9 黄色粘稠油状物(三氯甲烷); [α]_D²⁴-19.0° (*c* = 0.13, MeOH); (+)-ESIMS: m/z 313 [M + Na]⁺; C₁₆H₁₈O₅; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.11 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2',6'), 6.84 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3',5'), 6.60 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.47 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 4.73 (1H, m, H-α), 3.86 (3H, s, OCH₃-3), 3.79 (3H, s, OCH₃-4'), 2.92 (2H, dd, *J* = 12.9, 6.6 Hz, H-α'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 158.4 (s, C-4'), 146.8 (s, C-3), 143.7 (s, C-5), 136.0 (s, C-4), 131.6 (s, C-1), 130.5 (d, C-2',6'), 130.0 (s, C-1'), 113.9 (d, C-3',

5'), 106.4 (d, C-2), 100.8 (d, C-6), 75.4 (d, C-α), 56.2 (q, OCH₃-3), 55.3 (q, OCH₃-4'), 45.2 (t, C-α')。以上数据与文献^[13]报道基本一致,故鉴定化合物 9 为 (*S*)-3,4,α-三羟基-4',5-二甲氧基联苳。

化合物 10 白色无定形粉末(三氯甲烷); (+)-ESIMS: m/z 295 [M + Na]⁺; C₁₆H₁₆O₄; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 6.72 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-5'), 6.68 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-2'), 6.62 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, H-6'), 6.31 (1H, s, H-4), 6.25 (2H, s, H-2,6), 5.92 (2H, s, H-7'), 3.76 (3H, s, OCH₃-3), 2.79 (4H, m, H-α, α'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 159.7 (s, C-12'), 156.6 (s, C-5), 147.5 (s, C-3'), 145.7 (s, C-4'), 144.4 (s, C-1), 135.5 (s, C-1'), 121.2 (d, C-6'), 108.9 (d, C-2'), 108.1 (d, C-5'), 107.9 (d, C-6), 106.8 (d, C-2), 100.8 (t, C-7'), 99.0 (d, C-4), 55.3 (q, OCH₃-3), 38.2 (t, C-α), 37.3 (t, C-α')。以上数据^[14]与文献报道基本一致,故鉴定化合物 10 为 densiflorol A。

化合物 11 淡黄色粘稠状物(三氯甲烷); [α]_D²⁴-10.5° (*c* = 0.44, MeOH); (+)-ESIMS: m/z 567 [M + Na]⁺; C₃₂H₃₂O₈; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.12 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-10,14), 7.04 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-10',14'), 6.84 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-11,13), 6.76 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-11',13'), 6.55 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-4), 6.42 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-4'), 6.33 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-6), 6.08 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6'), 4.77 (1H, m, H-8'), 4.76 (1H, m, H-7'), 3.83 (3H, s, OCH₃-1), 3.79 (3H, s, OCH₃-12), 3.76 (3H, s, OCH₃-12'), 3.69 (3H, s, OCH₃-1'), 2.85 (2H, m, H-8), 2.83 (2H, m, H-7); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C: 159.7 (s, C-12'), 157.8 (s, C-12), 148.7 (s, C-1), 146.5 (s, C-1'), 144.1 (s, C-3), 143.6 (s, C-3'), 134.4 (s, C-5), 133.9 (s, C-5'), 132.4 (s, C-2'), 131.8 (s, C-2), 129.4 (d, C-10,14), 129.1 (d, C-10',14'), 113.8 (d, C-11',13'), 113.6 (d, C-11,13), 109.4 (s, C-4), 108.2 (s, C-4'), 104.9 (d, C-6), 106.7 (d, C-6'), 80.6 (d, C-7'), 80.3 (d, C-8'), 56.2 (q, OCH₃-1), 56.2 (q, OCH₃-1'), 55.3 (q, OCH₃-12), 55.3 (q, OCH₃-12'), 38.0 (t, C-7), 37.0 (t, C-8)。以上数据与文献^[15,16]报道基本一致,故鉴定化合物 11 为 dendrocandin I。

化合物 12 橘红色粘稠状物(三氯甲烷); $[\alpha]_D^{24}$ -24.4° ($c = 0.16, \text{MeOH}$); (+)-ESIMS: m/z 545 $[M + H]^+$; $C_{32}H_{32}O_8$; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.04 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-10', 14'), 6.80 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-11', 13'), 6.66 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-11, 13), 6.55 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-10, 14), 6.47 (1H, s, H-6'), 6.10 (1H, s, H-4), 3.91 (1H, dd, $J = 7.1, 5.5$ Hz, H-7), 2.80 (2H, m, H-7'), 2.78 (2H, m, H-8'), 2.69 (2H, m, H-8), 4.00 (3H, s, OCH_3 -1), 3.86 (3H, s, OCH_3 -1'), 3.76 (3H, s, OCH_3 -12'), 3.74 (3H, s, OCH_3 -12); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 158.1 (s, C-12), 158.0 (s, C-12'), 145.5 (s, C-1'), 140.6 (s, C-3'), 139.3 (s, C-3), 138.7 (s, C-6), 135.0 (s, C-1), 134.8 (s, C-2), 133.6 (s, C-9'), 132.1 (s, C-2'), 130.6 (d, C-10, 14), 130.4 (s, C-9), 129.4 (d, C-10', 14'), 129.3 (s, C-5'), 117.9 (s, C-4'), 117.8 (s, C-5), 113.8 (d, C-11', 13'), 113.2 (d, C-11, 13), 109.0 (d, C-4), 107.3 (d, C-6'), 61.5 (q, OCH_3 -1), 56.3 (q, OCH_3 -1'), 55.3 (q, OCH_3 -12'), 55.2 (q, OCH_3 -12), 44.5 (t, C-8), 38.9 (d, C-7), 37.0 (t, C-8'), 33.7 (t, C-7'). 以上数据与文献^[15]报道基本一致,故鉴定化合物 12 为 dendrocandin F。

化合物 13 淡黄色油状物(甲醇); (+)-ESIMS: m/z 265 $[M + Na]^+$; $C_{15}H_{16}O_3$; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.98 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.61 (1H, d, $J = 8.2, 2.7$ Hz, H-6), 6.59 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-8), 6.38 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-1), 6.29 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-3), 2.62 (4H, s, H-9, 10), 3.81 (3H, s, OCH_3 -4); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 159.1 (s, C-4), 157.5 (s, C-2), 156.1 (s, C-7), 141.8 (s, C-8a), 140.5 (s, C-1a), 130.0 (d, C-5), 126.2 (s, C-5a), 116.8 (s, C-4a), 115.0 (d, C-6), 113.6 (d, C-8), 108.3 (d, C-1), 99.2 (d, C-3), 31.8 (t, C-9), 31.2 (t, C-10), 55.8 (q, OCH_3 -4)。以上数据与文献^[17]报道基本一致,故鉴定化合物 13 为 coelonin。

化合物 14 黄色粉末(甲醇); (+)-ESIMS: m/z 289 $[M + H]^+$; $C_{15}H_{12}O_6$; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.30 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 5.87 (1H, s, C-8), 5.31 (1H, dd, $J = 13.0, 3.0$ Hz, H-2), 3.09 (1H, dd, $J = 17.2, 13.0$ Hz, H-3a), 2.67 (1H, dd, $J = 17.2, 3.0$

Hz, H-3b); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 197.6 (s, C-4), 168.8 (s, C-4'), 165.5 (s, C-9), 164.9 (s, C-5), 159.0 (s, C-7), 131.1 (s, C-1'), 129.0 (d, C-2', 6'), 116.3 (d, C-3', 5'), 103.3 (d, C-10), 96.3 (d, C-8), 80.4 (d, C-2), 44.0 (t, C-3)。以上数据与文献^[18]报道基本一致,故鉴定化合物 14 为红花素。

化合物 15 无色针晶(甲醇); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 12.02 (1H, s, -COOH), 6.20 (1H, s, H-5), 3.91 (3H, s, OCH_3 -2), 2.45 (3H, s, CH_3 -6), 2.09 (3H, s, CH_3 -3); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 172.6 (s, -COOH), 163.2 (s, C-4), 158.0 (s, C-2), 140.2 (s, C-6), 110.5 (d, C-6), 108.5 (s, C-5), 105.3 (s, C-1), 51.8 (q, OCH_3 -2), 24.1 (q, CH_3 -6), 7.7 (q, CH_3 -3)。以上数据与文献^[19]报道基本一致,故鉴定化合物 15 为 4-羟基-2-甲氧基-3,6-二甲基苯甲酸。

3.2 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 NO 生成抑制活性
对尖刀唇石斛中分离得到的 7 个化合物(2、3、4、5、10、11、14)在 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 RAW264.7 细胞的 NO 生成抑制作用进行筛选,其结果如表 1 所示:

表 1 RAW264.7 细胞 NO 生成抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 The inhibitory effect on the NO production in RAW264.7 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物 Compound	抑制率 Inhibition rate (%)
L-NMMA *	57.91 \pm 1.50
2	46.06 \pm 0.26
3	51.15 \pm 0.27
4	46.01 \pm 0.30
5	51.57 \pm 0.36
10	13.72 \pm 1.92
11	58.54 \pm 0.16
14	31.72 \pm 0.51

注: L-NMMA (50 $\mu\text{mol/L}$), 一氧化氮合酶抑制剂, $IC_{50} = 34$ $\mu\text{mol/L}$ 。
Note: L-NMMA (50 $\mu\text{mol/L}$), an NO synthase inhibitor, was used as a positive control ($IC_{50} = 34$ $\mu\text{mol/L}$).

3.3 自由基清除实验

从尖刀唇石斛乙酸乙酯提取物中分离得到的化合物大多属于酚类化合物,多羟基的结构使其具有自由基清除能力。实验使用 ABTS 法和 DPPH 法对分离得到的 6 个化合物(1、2、5、6、9、12)在 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下自由基清除能力进行了检测,以水溶

性维生素 E(Trolox) 为阳性对照,实验结果如表 2 所示。

表 2 自由基清除作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 DPPH and ABTS⁺ radicals scavenging activity ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物 Compound	ABTS 自由基清除率 ABTS ⁺ radical scavenging rate (%)	DPPH 自由基清除率 DPPH radical scavenging rate (%)
Trolox *	50.71 ± 7.58	56.86 ± 0.50
1	31.13 ± 3.19	0.68 ± 1.45
2	34.88 ± 4.11	1.93 ± 1.24
5	40.97 ± 6.55	5.36 ± 1.09
6	28.32 ± 2.94	33.13 ± 2.20
9	16.58 ± 2.75	21.79 ± 1.01
12	29.89 ± 5.38	21.08 ± 1.19

注:Trolox (25 μmol/L),水溶性维生素 E,自由基清除阳性对照。

Note: Positive control used for radical scavenging assay at the concentration of 25 μmol/L.

4 结论

本文对尖刀唇石斛的乙酸乙酯提取物进行了化学成分的研究,从中分离鉴定了 15 个化合物,均为首次从尖刀唇石斛中分离得到。对其中 7 个化合物的一氧化氮生成抑制活性进行了研究,发现化合物 **3**、**5**、**11** 在 25 μmol/L 浓度下,对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的 NO 生成抑制率均在 50% 以上,其中化合物 **11** 与 50 μmol/L 的阳性对照药 L-NMMA 抑制效果相当。近年来越来越多的研究表明,炎症与许多疾病息息相关。石斛作为传统中药材,具有滋阴清热的功效。现代科学研究表明,石斛中的菲类及联苜类化合物都表现出一定的抗炎活性^[20,21]。在 25 μmol/L 浓度下化合物 **1**、**2**、**5** 和 **12** 均表现出一定的 ABTS 自由基清除能力,其中化合物 **5** 的结果最为显著,其半数清除浓度 (IC₅₀) 为 36.41 ± 1.99 μmol/L;而 **6**、**9**、**12** 三个化合物显示出 DPPH 自由基清除能力,其中效果最显著的为化合物 **6**,其 IC₅₀ 为 62.05 ± 3.40 μmol/L,化合物 **5** 和 **6** 具有较好的体外抗氧化能力。尖刀唇石斛多用于观赏,药用方向少有报道,本文首次揭示了尖刀唇石斛中体外抗炎和抗氧化的活性成分,为尖刀唇石斛的深入开发利用提供一定理论基础。

参考文献

1 Editorial Committee of the Flora of China of Chinese Academy of Sciences. Flora Reipublicae Popularis Sinicae(中国植

物志)[M]. Beijing: Science Press, 1999.

- Zhang XQ, Zhao TM, Liu J, et al. Advances in chemical compounds and pharmacological effects of *Dendrobii Caulis*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49:3174-3182.
- Si HY, Chen ND, Chen NF. Review on isolation and pharmacological activities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28:467-470.
- Li T, He X. Comparative study on the macroscopical identification characters of twenty-seven herbal medicines of *Dendrobium*[J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2016, 31(1):54-57.
- Crombie L, Crombie WM. Natural products of Thailand high δ1-THC-strain Cannabis. The bibenzyl-spiran-dihydrophenanthrene group: relations with cannabinoids and canniflavones[J]. J Chem Soc, 1982, 7:1455-66.
- Rueda DC, Angela Schöffmann, Mieri MD, et al. Identification of dihydrostilbenes in *Pholidota chinensis* as a new scaffold for GABAA receptor modulators[J]. Bioorg Med Chem, 2013, 22:1276-1284.
- Orsini F, Verotta L, Lecchi M, et al. Resveratrol derivatives and their role as potassium channels modulators[J]. J Nat Prod, 2004, 67:421-426.
- Tezuka Y, Hirano H, Kikuchi T, et al. Constituents of orchidaceous plants. X. Constituents of *Ephemerantha lonchophylla*; isolation and structure elucidation of new phenolic compounds, ephemeranthol-A, ephemeranthol-B, and ephemeranthoquinone, and of a new diterpene glucoside, ephemeranthoside[J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39:593-598.
- Guan HJ, Zhang X, Tu FJ, et al. Chemical constituents of *dendrobium officinale*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 12:1873-1876.
- Bi ZM, Wang ZT, Xu LS. Chemical constituents of *Dendrobium moniliforme*[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46: 124-126.
- Li MF, Xu GJ, Wu HM, et al. Chemical constituents of *Dendrobium loddigesii* Rolfe[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 1991, 26:307-310.
- Li Y, Wang CL, Guo SX, et al. Two new compounds from *Dendrobium candidum*[J]. Chem Pharm Bull, 2008, 56: 1477-1479.
- Li Y, Wang CL, Zhao HJ, et al. A novel *o*-benzoquinol and a new bibenzyl from *Dendrobium candidum*[J]. Chem Nat Compd, 2015, 51: 1052-1054.
- Fan CQ, Wang W, Wang YP, et al. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*[J]. Phytochemistry, 2001, 57: 1255-1258.

- 15 Li Y, Wang CL, Wang YJ, et al. Four new bibenzyl derivatives from *Dendrobium candidum* [J]. *Pharm Bull*, 2009, 57: 997-999.
- 16 Li Y, Wang CL, Zhao HJ, et al. Eight new bibenzyl derivatives from *Dendrobium candidum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16: 1035-1043.
- 17 Leong YW, Kang CC, Harrison LJ, et al. Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the orchid *bulbophyllum vaginatum* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44: 157-165.
- 18 Miyake Y, Minato K, Fukumoto S, et al. New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with *aspergillus saitoi* from flavanone glycoside in citrus fruit [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67: 1443-1450.
- 19 Fang ZF, Li ZL, Wang Y, et al. Chemical constituents from wing twigs of *Euonymus alatus* II [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33: 1422-1424.
- 20 Lin Y, Wang F, Yang LJ, et al. Anti-inflammatory phenanthrene derivatives from stems of *Dendrobium denneanum* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 95: 242-251.
- 21 Kin JH, Oh SY, Han SB, et al. Anti-inflammatory effects of *Dendrobium nobile* derived phenanthrene in LPS-stimulated murine macrophages [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38: 1117-1126.
-
- (上接第 1696 页)
- 14 Li BX, Feng QS, Zhang CT, et al. The effects of picroside II on the mRNA expression of phase II metabolic enzymes in the H₂O₂-induced L-02 cells damage [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2014, 20: 909-911.
- 15 Yang X, Hu M, He YR, et al. Protection of proanthocyanidins on oxidative damage in SH-SY5Y cells induced by H₂O₂ [J]. *J Guangdong Pharm Univer* (广东药学院学报), 2017, 33: 768-772.
- 16 Zhang XL, Chen BW, Sun XR, et al. The response surface method to optimize the ultrasonic-assisted extraction of *Ganoderma lucidum* melanin [J]. *J Nucl Agr Sci* (核农学报), 2018, 32: 532-538.
- 17 Pan L, Xin ZL, Liu B, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin by *Auricularia auricula* response surface method [J]. *J of Chin Inst of Food Sci and Technol* (中国食品学报), 2015, 15(7): 110-116.
- 18 Tu Y, Sun Y, Tian Y, et al. Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) [J]. *Food Chem*, 2009, 114: 1345-1350.
- 19 Hong L, Simon JD. Insight into the binding of divalent cations to *Sepia* eumelanin from IR absorption spectroscopy [J]. *Photochem Photobiol*, 2006, 82: 1265-1269.
- 20 Zhang M, Chen YL, Cheng FF, et al. Production of melanin by the fermentation of *Auricularia auricular* and its free radical scavenging activity [J]. *J Nucl Agr Sci* (核农学报), 2015, 29: 304-312.
- 21 Wang CL, Guo F, Wang YL. Free radicals and aging [J]. *J Hebei Med Univer* (河北医科大学学报), 2005, 26: 308-311.