

雪层杜鹃中的黄酮类化合物及其抗氧化和抗炎活性研究

王 兰^{1,2†}, 曾 禧^{1,2†}, 姚后宗^{1*}, 袁 涛^{1,2*}¹江西师范大学健康学院;²江西师范大学生命科学院,南昌 330022

摘要: 本文研究雪层杜鹃提取物中的黄酮类化学成分及其抗氧化和抗炎活性。本研究采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备高效液相色谱 (HPLC) 等多种色谱分离技术对雪层杜鹃的乙酸乙酯提取物进行分离纯化,并通过 NMR、IR 和 HR-ESI-MS 等方法共鉴定出 8 个黄酮类化合物,包括 1 个新化合物:3',8-二甲氧基槲皮素-3-O- α -L-阿拉伯呋喃糖苷(**1**)和 7 个已知化合物:桑黄素-3-O- β -L-赖氧苷(**2**)、花旗松素-3-O- α -L-阿拉伯糖苷(**3**)、表儿茶素(**4**)、(-)-表没食子儿茶素(**5**)、(-)-儿茶素(**6**)、二氢杨梅素(**7**)、二氢槲皮素(**8**)。它们的抗氧化和抗炎活性利用 H₂O₂ 氧化损伤模型和脂多糖诱导的一氧化氮生成模型分别测定。化合物 **2**、**4** 和 **8** 使 H₂O₂ 损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率从 (44.0 ± 2.3)% 分别提高到了 (80.6 ± 0.4)%、(78.4 ± 1.6)% 和 (81.9 ± 1.7)%。化合物 **8** 也表现出一定的抗炎活性,IC₅₀ 值为 37.7 μ mol/L。结果证明雪层杜鹃中的黄酮类化合物具有被发掘成抗氧化和抗炎先导化合物的潜力。

关键词: 雪层杜鹃;类黄酮;抗炎活性;抗氧化活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)8-1350-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.8.008

Flavonoids from *Rhododendron nivale* and their antioxidant and anti-inflammatory activitiesWANG Lan^{1,2†}, ZENG Xi^{1,2†}, YAO Hou-zong^{1*}, YUAN Tao^{1,2*}¹School of Health, Jiangxi Normal University; ²College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract: This study investigates the flavonoid compounds in the extracts of *R. nivale* and their antioxidant and anti-inflammatory activities. Various chromatographic separation techniques such as silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) were used to separate and purify the ethyl acetate extracts of *R. nivale*. Using NMR, IR, and HR-ESI-MS, eight flavonoid compounds were identified, including a new one, 3',8-dimethoxyquercetin-3-O- α -L-arabinofuranoside (**1**), and seven known compounds: morin-3-O- β -L-lyxoside (**2**), (2R,3R)-taxifolin-3-O-arabinoside (**3**), epicatechin (**4**), (-)-epigallocatechin (**5**), (-)-catechin (**6**), dihydromyricetin (**7**), dihydroquercetin (**8**). Their antioxidant and anti-inflammatory activities were measured using a H₂O₂-induced oxidative damage model and a lipopolysaccharide-induced nitric oxide production model, respectively. Compounds **2**, **4** and **8** increased the viability of H₂O₂-damaged SH-SY5Y cells from (44.0 ± 2.3)% to (80.6 ± 0.4)%, (78.4 ± 1.6)% and (81.9 ± 1.7)%, respectively. Compound **8** also exhibited anti-inflammatory activity with an IC₅₀ value of 37.7 μ mol/L. These results demonstrate that the flavonoid compounds in *R. nivale* have potential as lead compounds for developing antioxidant and anti-inflammatory agents.

Key words: *Rhododendron nivale*; flavonoids; anti-inflammatory activity; antioxidant activity

雪层杜鹃 (*Rhododendron nivale* Hook. f.) 是杜鹃

花科 (Ericaceae) 杜鹃属 (*Rhododendron*) 的一种常绿小灌木^[1]。在我国主要分布于西藏海拔 3 200 ~ 5 490 m 的灌丛中。雪层杜鹃是一味常用藏药,具有抗炎,治疗类风湿关节炎和慢性支气管炎的药理作用^[2]雪层杜鹃所含化学成分主要有黄酮类^[3]和倍半萜类^[4]等化合物。黄酮类化合物具有良好的抗

收稿日期:2024-03-22 接受日期:2024-06-12

基金项目:江西省“双千计划”(JXSQ2018101008);江西省海外高层次人才引进项目(20223BCJ25009)

† 共同第一作者

* 通信作者 Tel:86-791-88120392; E-mail: yaohz@jxnu.edu.cn; tyuan@jxnu.edu.cn

炎和抗氧化活性^[5,6]。目前对于雪层杜鹃的黄酮类化合物研究较少,仅有 Guo 等^[3]从雪层杜鹃中分离得到具有抗衰老活性的杨梅素苷和 diplomorphanin B。但杜鹃属其他植物中的黄酮类化合物含量丰富^[7,8],研究比较深入,结果表明杜鹃属植物中的黄酮类化合物具有较好的抗炎活性^[9]和抗氧化生物^[10]活性。Ye 等^[9]从杜鹃花叶中分离到 12 个黄酮类化合物,发现化合物槲皮素 3-O- α -L-(2"-O-乙酰基)阿拉伯呋喃糖苷对脂多糖刺激的 RAW 264.7 细胞中肿瘤坏死因子- α 具有抑制作用。Lin 等^[10]从阿里山杜鹃中分离得到的黄酮类化合物芦丁和(2R,3S)-儿茶素具有 1,1-二苯基-2-三硝基苯胍自由基(DPPH)清除能力,IC₅₀为 6.1 和 6.8 $\mu\text{mol/L}$ 。另外,杜鹃属植物中黄酮类成分的提取方法也有较多研究,例如大白花杜鹃在最优提取工艺下总黄酮提取率为 25.9%^[11]。因此,对雪层杜鹃中黄酮类化合物的研究具有潜在的应用价值。

为进一步发掘雪层杜鹃中的黄酮类化合物,本研究对雪层杜鹃乙酸乙酯提取物中的化学成分进行了研究。同时,本研究采用 H₂O₂ 诱导的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)氧化损伤模型和脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7)一氧化氮生成模型来评价这些化合物的抗氧化损伤和抗炎活性。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 植物材料

雪层杜鹃枝叶于 2021 年 5 月采集自云南省迪庆州梅里雪山。经中国民族大学龙春林教授鉴定为杜鹃属植物雪层杜鹃 *Rhododendron nivale*。标本(RN-202105)保存于江西师范大学生命科学学院道地药材药效物质研究实验室。

1.1.2 试剂

Sephadex LH-20 树脂(瑞典 GE Healthcare);中压色谱分离凝胶(MCI)(CHP20P,75~150 μm ,日本东京三菱化学工业株式会社);十八烷基硅胶(ODS)填料(150~200 目,美国默克 Merck);柱色谱硅胶(100~200、200~300 目;烟台新诺化工有限公司)和薄层色谱 GF₂₅₄ 硅胶板(烟台新诺化工有限公司);实验用水为纯净水;其他色谱纯试剂、分析纯试剂(上海泰坦科技股份有限公司)。

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(批号:FSD500)、DMEM 培养基(批号:6124069)和 DMEM-F12 培养基(批号:8122199)(美国 Gibco 公司);磷

酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)(批号:6123169)、青霉素和链霉素(批号:WHAB23F201)(赛默飞世尔科技公司);地塞米松(批号:109955,纯度:98%)、阿霉素(批号:C15533027,纯度:98%)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(批号:S1735)、一氧化氮检测试剂盒(Griess 试剂,批号:S0021M)、CCK-8 试剂盒(批号:BS350B)(上海碧云天生物技术有限公司);小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 和神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y(美国 ATCC 公司)

1.1.3 仪器

Rudolph Autopol IV/IV-T 旋光仪(美国 Rudolph 公司);Nicolet 6700 红外光谱仪(美国赛默飞公司);Triple TOF 6600 高分辨质谱(美国沃特世 AB Sciex 公司);AVANCE 400 MHz 核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司);Primaide 高效液相色谱仪(1110 Pump, 1210 Auto Sampler, 1310 Column Oven, 1430 Diode Array Detector, 日本日立公司);CMax Plus 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 提取与分离

4.29 kg 干燥雪层杜鹃枝叶粉末用 2 L 甲醇在室温下浸提 3 次,每次 7 d。合并提取液,减压浓缩得浸膏 766.16 g。用 4 L 水将浸膏混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得到乙酸乙酯浸膏 238.54 g。乙酸乙酯浸膏经硅胶柱分离,以石油醚-乙酸乙酯(200:1~0:100)和甲醇为梯度洗脱液,得到 12 个流分(Fr. 1~Fr. 12)。

Fr. 10 流分(39.19 g)经 ODS 柱分离,以甲醇-水(10:90~100:0)梯度洗脱得到 9 个流分(Fr. 10A~Fr. 10I)。Fr. 10B 流分(13.70 g)经 MCI 凝胶柱分离,以甲醇-水(5:95~100:0)梯度洗脱得到 8 个流分(Fr. 10B1~Fr. 10B8)。Fr. 10B7 流分(223.7 mg)采用 Sephadex LH-20 柱分离,以纯甲醇洗脱得 5 个流分(Fr. 10B7a~Fr. 10B7e),其中 Fr. 10B7d 组分为化合物 2(7.7 mg)。Fr. 10B7a 流分(103.6 mg)经半制备 HPLC(甲醇:水=25:75, mL/min)纯化得到化合物 1(12.8 mg, t_R =25.1 min)。

Fr. 10B5 流分(2.79 g)经 Sephadex LH-20 柱分离,纯甲醇洗脱得 6 个流分(Fr. 10B5a~Fr. 10B5f)。Fr. 10B5e 流分(111.1 mg)经半制备 HPLC(甲醇:水=25:75, 3 mL/min)纯化后得到化合物 3(16.3 mg, t_R =33.5 min)。Fr. 10B5a 流分(277.8 mg)再次采用 Sephadex LH-20 柱分离,以纯甲醇洗脱得 3 个流分(Fr. 10B5a1~Fr. 10B5a3)。Fr. 10B5a2 流分

(11.1 mg)经半制备 HPLC(甲醇:水 = 25:75, 3 mL/min)纯化后得到化合物 **4**(5.3 mg, $t_R = 22.6$ min)。

Fr. 10B3 流分(5.13 g)经 MCI 柱分离,使用甲醇-水(0:100 ~ 100:0)梯度洗脱得到 8 个流分(Fr. 10B3a ~ Fr. 10B3h)。Fr. 10B3d 流分(237.8 mg)经半制备 HPLC(甲醇:水 = 25:75, 3 mL/min)纯化后得到化合物 **5**(13.1 mg, $t_R = 18.8$ min)和 **6**(9.3 mg, $t_R = 20.5$ min)。Fr. 10B3h 流分(2.14 g)采用 SephadexLH-20 柱分离,以纯甲醇洗脱得 4 个流分(Fr. 10B3h1 ~ Fr. 10B3h4)。Fr. 10B3h3 流分(51.8 mg)经半制备 HPLC(甲醇:水 = 25:75, 3 mL/min)纯化后得到化合物 **7**(27.0 mg, $t_R = 20.0$ min)。Fr. 10B3h2 流分(55.7 mg)经半制备 HPLC(甲醇:水 = 35:65, 3 mL/min)纯化后得到化合物 **8**(13.4 mg, $t_R = 20.5$ min)。

1.3 活性与毒性测定

1.3.1 抗氧化活性

SH-SY5Y 细胞混悬于 DMEM-F12 培养基(含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素溶液)中,细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中,在 37 °C 和 5% 二氧化碳中培养 24 h。待细胞完全贴壁后,在对照组、 H_2O_2 组和空白组中加入 PBS,将浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的样品加到样品组中。6 h 后,向样品组和 H_2O_2 组加入 70 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 。培养 24 h 后,在每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂。培养 2 h,使用酶标仪记录 450 nm 处吸光值,并按公式(1)计算细胞存活率(R_1)。

$$R = \left[\frac{(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}})}{(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})} \right] \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 抗炎活性

本研究根据已发表的方法,使用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生一氧化氮模型来筛选化合物 **1** ~ **8** 的抗炎活性^[12]。RAW 264.7 细胞混悬于 DMEM 培养基(含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素溶液)中,以 5×10^4 个细胞/孔的密度铺在 96 孔板中,在 37 °C 下培养 24 h。用 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)刺激细胞 24 h,然后用不同浓度的样品和地塞米松(阳性对照)继续培养 24 h。每孔取出 50 μL 培养液,并加入 Griess 试剂(50 μL 试剂 A + 50 μL 试剂 B)。反应 5 min 后,测定 540 nm 处吸光度。采用软件 Graphpad Prism 8.0 进行数据处理,将各剂量和抑制率等参数用非线性回归拟合计算 IC_{50} 。所有的实验重复进行三次。

1.3.3 细胞毒性

SH-SY5Y 和 RAW 264.7 细胞按 1×10^5 个/孔的密度接种于 96 孔板内,培养 24 h,使细胞完全贴壁。空白组不加细胞。样品组中加入 100 μL 50 或 60 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **1** ~ **8** 或阳性对照阿霉素(doxorubicin),空白组和对照组中加入等体积的 PBS。培养 24 h 后,向每个孔内加入 10% CCK-8 试剂,继续培养 2 ~ 4 h。测定 450 nm 处吸光度,并按公式(1)计算细胞存活率(R_2)。

2 结果与讨论

2.1 结构鉴定

化合物 **1** 黄色粉末,溶于甲醇; $[\alpha]_D^{25} = -64.1$ (c 0.10, H_2O)。HR-ESI-MS: m/z 493.099 0 $[M-H]^-$ (计算值 $C_{22}H_{21}O_{13}$, 493.0988), 结合 ^{13}C NMR 数据(见表 1)确定其分子式为 $C_{22}H_{22}O_{13}$, 不饱

表 1 化合物 **1** 的 1H NMR(400 MHz) 和 ^{13}C NMR(100 MHz) 数据(CD_3OD)

Table 1 1H (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data of compound **1** (CD_3OD)

No.	δ_H (J in Hz)	δ_C
1	-	-
2	-	158.9
3	-	135.1
4	-	180.1
5	-	158.6
6	6.27(s)	100.1
7	-	158.0
8	-	129.1
9	-	150.4
10	-	105.6
1'	-	122.0
2'	7.33(d, 2.1)	111.1
3'	-	146.7
4'	-	139.0
5'	-	149.4
6'	7.36(d, 2.1)	106.0
1''	5.52(br s)	109.7
2''	4.37(brd, 2.7)	83.5
3''	3.91(m)	78.8
4''	3.89(m)	88.2
5''	3.52(m)	62.6
8-OCH ₃	3.91(s)	62.0
3'-OCH ₃	3.95(s)	56.9

和度为 12。由红外光谱数据推测出化合物 **1** 含有一个羰基(1650 cm^{-1})。 ^1H NMR 谱图中观察到 3 个芳香质子 $7.33(1\text{H}, \text{d}, J = 2.1\text{ Hz}, \text{H}-2')$ 、 $\delta_{\text{H}} 7.36(1\text{H}, \text{d}, J = 2.1\text{ Hz}, \text{H}-6')$ 和 $6.27(1\text{H}, \text{s}, \text{H}-6)$, 2 个甲氧基 $\delta_{\text{H}} 3.95(3\text{H}, \text{s}, 3'-\text{OCH}_3)$ 和 $3.91(3\text{H}, \text{s}, 8-\text{OCH}_3)$ 和 6 个糖基质子信号在 $\delta_{\text{H}} 3.52 \sim 5.52$ 之间, 其中 $1''$ 位糖质子信号在 $5.52(1\text{H}, \text{br s}, \text{H}-1'')$ (见表 1)。综合 HSQC 和 ^{13}C NMR 谱图, 可将该化合物 22 个碳归属为: 2 个甲基、1 个亚甲基、7 个次甲基

(其中包括 3 个 sp^2 杂化碳)、12 个季碳。以上数据暗示该化合物为一个黄酮苷类化合物, 进一步将它的核磁数据和已知化合物 8-甲氧基槲皮素-3- O - α -阿拉伯呋喃糖苷^[13] 的核磁数据对比, 发现它们非常相似, 差别在于化合物 **1** 多了一个甲氧基信号, 但是少了一个芳香质子信号, 表明化合物 **1** 的结构比已知化合物多了一个甲氧基取代在芳香环上。进一步分析化合物 **1** 的二维核磁数据(^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC 等)可以确定该化合物的结构(见图 1)。

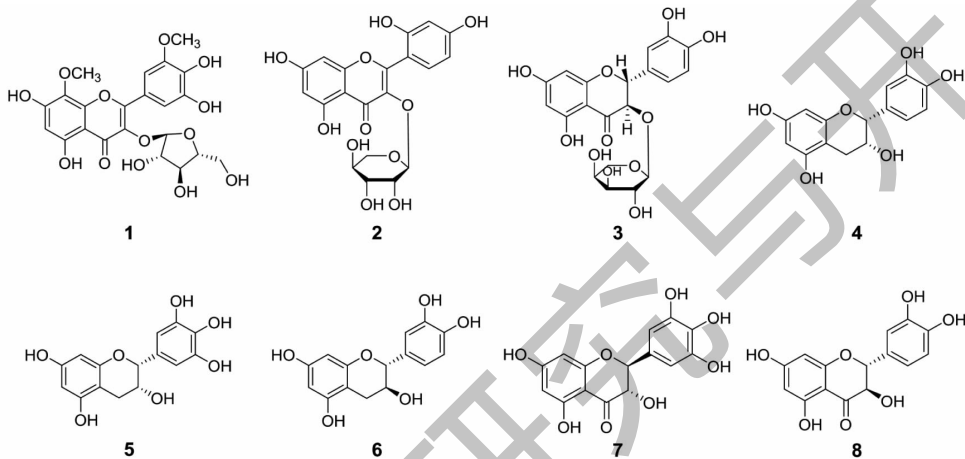


图 1 化合物 **1**~**8** 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds **1**-**8**

HMBC 谱图 H-2' 与 C-2 ($\delta_{\text{C}} 158.9$)、C-1' ($\delta_{\text{C}} 122.0$)、C-3' ($\delta_{\text{C}} 146.7$)、C-4' ($\delta_{\text{C}} 139.0$) 和 C-6' ($\delta_{\text{C}} 106.0$) 相关, H-6' 与 C-1'、C-2' ($\delta_{\text{C}} 111.1$)、C-4' 和 C-5' ($\delta_{\text{C}} 149.4$) 相关, $3'-\text{OCH}_3$ 与 C-3' 相关, 表明化合物 **1** 比 8-甲氧基槲皮素-3- O - α -阿拉伯呋喃糖苷多出的甲氧基在 B 环的 C-3' 位。化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 的相关信号 H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H₂-5'' 支持了阿拉伯糖的存在。HMBC 中 H-1'' 和 C-3 的相关说明了阿拉伯糖连接在苷元的 C-3 位, 以及图

2 中的其他 HMBC 相关信号进一步支持了化合物 **1** 的结构推断。根据 ^1H NMR 谱中端基质子 H-1'' ($\delta_{\text{H}} 5.52, 1\text{H}, \text{br s}$) 的化学位移和峰型, 可以推测化合物 **1** 的 C-3 位连接 α -阿拉伯糖。至此, 化合物 **1** 的结构确定为 3',8-二甲氧基槲皮素-3- O - α -阿拉伯呋喃糖苷。通过对比化合物 **1** 和已知化合物 8-甲氧基槲皮素-3- O - α - L -阿拉伯呋喃糖苷 ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -73.0, c 0.15$) 的旋光值^[14], 可以推测化合物 **1** 的糖为 L -构型。

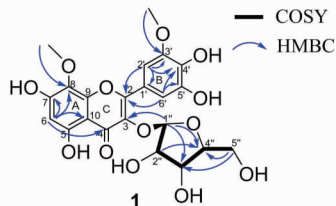


图 2 化合物 **1** 的关键 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关信号

Fig. 2 Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compound **1**

化合物 **2** 黄色粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -108.8 (c 0.31, \text{MeOH})$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.53

($1\text{H}, \text{d}, J = 2.1\text{ Hz}, \text{H}-3'$), 7.50 ($1\text{H}, \text{dd}, J = 8.4, 2.1\text{ Hz}, \text{H}-5'$), 6.90 ($1\text{H}, \text{d}, J = 8.4\text{ Hz}, \text{H}-6'$), 6.39

(1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 5.47 (1H, s, H-1''), 4.33 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H-2''), 3.96 ~ 3.89 (1H, m, H-5''), 3.87 ~ 3.85 (1H, m, H-4''), 3.56 ~ 3.44 (2H, m, H-3'', 5''); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 158.6 (C-2), 134.9 (C-3), 180.0 (C-4), 163.1 (C-5), 99.9 (C-6), 166.1 (C-7), 94.8 (C-8), 159.3 (C-9), 109.6 (C-10), 123.1 (C-1'), 146.3 (C-2'), 116.9 (C-3'), 149.8 (C-4'), 116.5 (C-5'), 123.0 (C-6'), 105.6 (C-1''), 88.1 (C-2''), 83.3 (C-3''), 78.8 (C-4''), 62.6 (C-5''). 以上数据与文献^[15]报道一致,故鉴定该化合物为桑黄素-3-*O*- β -L-赖氧苷。

化合物 3 白色固体,溶于甲醇; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.97 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 5.92 (1H, br s, H-8), 5.90 (1H, br s, H-6), 5.13 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-2), 4.79 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-3), 3.92 (1H, dd, $J = 11.6, 7.3$ Hz, H-5''), 3.84 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-1''), 3.80 (1H, dt, $J = 7.3, 3.0$ Hz, H-4''), 3.59 (1H, dd, $J = 6.3, 3.8$ Hz, H-2''), 3.56 (1H, dd, $J = 6.3, 3.0$ Hz, H-3''), 3.42 ~ 3.36 (1H, m, H-5''); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 83.8 (C-2), 76.4 (C-3), 196.0 (C-4), 165.4 (C-5), 97.4 (C-6), 169.2 (C-7), 96.5 (C-8), 164.2 (C-9), 102.4 (C-10), 129.0 (C-1'), 115.7 (C-2'), 146.5 (C-3'), 147.4 (C-4'), 116.3 (C-5'), 120.8 (C-6'), 101.5 (C-1''), 73.1 (C-2''), 66.8 (C-3''), 71.1 (C-4''), 63.4 (C-5''). 以上数据与文献^[16]报道一致,故鉴定该化合物为花旗松素-3-*O*- α -L 阿拉伯糖苷。

化合物 4 棕色粉末; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.98 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 6.80 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 5.94 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 5.92 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 4.80 (1H, br s, H-2), 4.19 (1H, t, $J = 4.2$ Hz, H-3), 2.86 (1H, dd, $J = 16.8, 4.2$ Hz, H-4a), 2.74 (1H, dd, $J = 16.8, 4.2$ Hz, H-4b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.2 (C-4), 158.0 (C-5), 96.5 (C-6), 157.7 (C-7), 95.9 (C-8), 157.4 (C-9), 100.1 (C-10), 132.3 (C-1'), 115.9 (C-2'), 146.0 (C-3'), 145.8 (C-4'), 115.4 (C-5'), 119.4 (C-6')。以上数据与文献^[17]报道一致,故鉴定该化合物为表儿茶

素。

化合物 5 白色固体; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.52 (2H, s, H-2', 6'), 5.94 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 5.91 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 4.76 (1H, br s, H-2), 4.17 (1H, dd, $J = 4.7, 3.2$ Hz, H-3), 2.85 (1H, dd, $J = 16.7, 4.7$ Hz, H-4a), 2.73 (1H, dd, $J = 16.7, 3.2$ Hz, H-4b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.1 (C-4), 157.9 (C-5), 96.4 (C-6), 157.3 (C-7), 95.9 (C-8), 157.7 (C-9), 96.4 (C-10), 107.0 (C-1', 2'), 131.5 (C-3'), 133.6 (C-4'), 100.1 (C-5'), 146.7 (C-6')。以上数据与文献^[18]报道一致,故鉴定该化合物为(-)-表没食子儿茶素。

化合物 6 白色固体; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5.6$ (c 0.28, MeOH)。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.84 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.72 (1H, dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, H-6'), 5.93 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 5.86 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 4.56 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2), 3.97 (1H, m, H-3), 2.85 (1H, dd, $J = 16.1, 5.4$ Hz, H-4a), 2.50 (1H, dd, $J = 16.1, 8.1$ Hz, H-4b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 82.9 (C-2), 68.8 (C-3), 28.5 (C-4), 157.6 (C-5), 95.5 (C-6), 157.8 (C-7), 96.3 (C-8), 156.9 (C-9), 100.9 (C-10), 132.3 (C-1'), 115.3 (C-2'), 146.2 (C-3'), 146.2 (C-4'), 116.1 (C-5'), 120.0 (C-6')。以上数据除旋光值外与文献^[18]报道一致,故鉴定该化合物为(-)-儿茶素。

化合物 7 白色固体; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.53 (2H, s, H-2', 6'), 5.92 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.88 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 4.83 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-2), 4.46 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 85.2 (C-2), 73.7 (C-3), 198.2 (C-4), 165.2 (C-5), 97.3 (C-6), 168.7 (C-7), 96.3 (C-8), 164.4 (C-9), 101.8 (C-10), 129.1 (C-1'), 108.1 (C-2', 6'), 146.8 (C-3', 5'), 134.9 (C-4')。以上数据与文献^[7]报道一致,故鉴定该化合物为二氢杨梅素。

化合物 8 黄色粉末; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.97 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 5.92 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.88 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 4.91 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-2), 4.50 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3); ^{13}C NMR

(100 MHz, CD₃OD) δ : 85.1 (C-2), 73.7 (C-3), 198.3 (C-4), 165.3 (C-5), 97.3 (C-6), 168.8 (C-7), 96.3 (C-8), 164.5 (C-9), 101.8 (C-10), 129.9 (C-1'), 116.1 (C-2'), 146.3 (C-3'), 147.1 (C-4'), 115.9 (C-5'), 120.9 (C-6')。以上数据与文献^[7]报道一致,故鉴定该化合物为二氢槲皮素。

2.2 抗氧化活性

黄酮类化合物在植物中常充当抗氧化剂^[19]。因此,本研究也以 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型评价从雪层杜鹃中分离纯化得到的黄酮类化合物 **1**~**8** 的抗氧化能力。SH-SY5Y 细胞经 50 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 **1**~**8** 作用 24 h 后,细胞存活率均高于 90%,证明化合物 **1**~**8** 的细胞毒性很低。然而,细胞经 70 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理 24 h 后,存活率仅为 (44.0 \pm 2.3)%,可见 H₂O₂ 诱导的氧化损伤模型已成功建立。化合物 **1**~**8** 抗氧化损伤实验结果表明,化合物 **2**、**4**、**8** 具有很强的氧化损伤保护效果,细胞存活率分别为 (80.6 \pm 0.4)%、(78.4 \pm 1.6)% 和 (81.9 \pm 1.7)%,远高于模型组的 (44.0 \pm 2.3)% (见表 2)。

表 2 化合物 **1**~**8** 对 H₂O₂ 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 The protection effects of compounds **1**~**8** on H₂O₂-damaged SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物 Compound	细胞存活率 Survival rate (%)
1	43.3 \pm 0.6
2	80.6 \pm 0.4***
3	45.9 \pm 1.0
4	78.4 \pm 1.6***
5	47.4 \pm 1.6
6	70.2 \pm 1.5***
7	51.0 \pm 1.5**
8	81.9 \pm 1.7***
模型组 Model	44.0 \pm 2.3

注:与模型组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with model, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.3 抗炎活性

雪层杜鹃是一味具有抗炎活性的常用藏药^[2]。因此,本研究也以 LPS 诱导的一氧化氮生成模型评价化合物 **1**~**8** 是否具有抗炎活性。细胞毒性实验证明化合物 **1**~**8** 在 60 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 RAW 246.7 细胞无毒性。抗炎活性评价结果表明,阳性

药地塞米松 (IC₅₀ = 2.8 $\mu\text{mol/L}$) 表现出与文献报道相当的抗炎活性^[20]。与化合物 **1**~**7** 对比,化合物 **8** 表现出一定的抗炎作用,IC₅₀ 值为 37.7 $\mu\text{mol/L}$ (见表 3)。

表 3 化合物 **1**~**8** 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 生成的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Inhibitory effect of **1**~**8** on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物 Compound	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
1	> 60
2	> 60
3	> 60
4	> 60
5	> 60
6	> 60
7	> 60
8	37.7 \pm 0.3
地塞米松 Dexamethasone	2.8 \pm 0.4

3 结论

本文对雪层杜鹃的乙酸乙酯提取物进行分离纯化得到 8 个黄酮类化合物,它们的化学结构通过核磁共振波谱、红外光谱和高分辨质谱等分析方法以及与已知化合物波谱数据比对得到了鉴定,其中化合物 **1** 是 3',8-二甲氧基槲皮素为苷元的新化合物;化合物 **2**~**8** 为已知化合物。另外,本文也评价了化合物 **1**~**8** 的抗氧化损伤和抗炎活性,其中化合物 **2**、**4**、**6**、**8** 表现出较强的抗氧化能力。化合物 **1**、**5**、**7** 的 B 环上具有三个取代基,它们的抗氧化活性较弱。而 B 环只有两个取代基的化合物如 **2**、**4**、**6**、**8** 的表现出较好的活性。前期有研究报道从雪层杜鹃植物中发现其他具有抗氧化活性的黄酮类化合物^[3],本研究也进一步支持了这个结果。

氧化应激的发生是由于活性氧生成和细胞抗氧化反应之间的不平衡。此前有报道称,氧化应激在神经退行性疾病的发生和发展中起着重要作用^[21]。SH-SY5Y 细胞是研究神经退行性疾病的常用细胞,本文使用 SH-SY5Y 细胞为研究对象。结果表明,化合物 **8** 使 H₂O₂ 损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率从 (44.0 \pm 2.3)% 提高到了 (81.9 \pm 1.7)%,且具有抗炎活性。据此推测化合物 **8** 具有成为抗氧化、抗炎先导化合物的潜力,且可为神经退行性疾病新药的

研发提供参考价值。

参考文献

- 1 Li Y, Liu YB, Yu SS. Grayanoids from the Ericaceae family: structures, biological activities and mechanism of action [J]. *Phytochem Rev*, 2013, 12: 305-325.
- 2 Li Y, Liu YB, Liu YL, et al. Mollanol A, a diterpenoid with a new *C*-nor-*D*-homograyanane skeleton from the fruits of *Rhododendron molle* [J]. *Org Lett*, 2014, 16: 4320-4323.
- 3 Guo X, Dong Z, Li Q, et al. Flavonoids from *Rhododendron nivale* Hook. f delay aging via modulation of gut microbiota and glutathione metabolism [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154270.
- 4 Guo X, Shang X, Li B, et al. Acaricidal activities of the essential oil from *Rhododendron nivale* Hook. f. and its main compound, δ -cadinene against *Psoroptes cuniculi* [J]. *Vet Parasitol*, 2017, 236: 51-54.
- 5 Khan A, Ikram M, Hahm JR, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Citrus* flavonoid hesperetin: Special focus on neurological disorders [J]. *Antioxidants*, 2020, 9: 609.
- 6 Frattaruolo L, Carullo G, Brindisi M, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) leaf phytocomplexes: Identification of licoflavanone as a modulator of NF- κ B/MAPK pathway [J]. *Antioxidants*, 2019, 8: 186.
- 7 Jin HZ, Chen G, Li XF, et al. Flavonoids from *Rhododendron decorum* [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45: 85-86.
- 8 Lou XW, Lin QH, Zhang GY, et al. Identification and characterization of three new flavonoids from *Rhododendron dauricum* [J]. *Chem Nat Compd*, 2015, 13: 628-633.
- 9 Ye C, Jin M, Jin C, et al. Two novel flavonoids from the leaves of *Rhododendron dauricum* L. with their inhibition of TNF- α production in LPS-induced RAW 264. 7 cells [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35: 1331-1339.
- 10 Lin CY, Lin LC, Ho ST, et al. Antioxidant activities and phytochemicals of leaf extracts from 10 native *Rhododendron* species in Taiwan [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 283938.
- 11 Zhang Y, Zhang D. Optimization of extraction technology of total flavonoids from *Rhododendron decorum* Franch [J]. *J South Agric* (南方农业学报), 2014, 45: 2026-2030.
- 12 Yu YH, Feng YP, Liu W, et al. Diverse triterpenoids from mastic produced by *Pistacia lentiscus* and their anti-inflammatory activities [J]. *Chem Biodivers*, 2022, 19: e202101012.
- 13 Yang IJ, Byeon SH, Baik JS, et al. Phenolic compounds from the branches of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder and their antioxidative activities [J]. *J Korean Chem Soc*, 2015, 59: 353-357.
- 14 Biologia D, Milano U, Colombo ML, et al. Flavonol glycosides from *Dryas octopetala* [J]. *J Nat Prod*, 1984, 47: 809-814.
- 15 Park KM, Yang MC, Lee KH, et al. Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum* maxim [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2006, 29: 1086-1090.
- 16 Li XF, Jin HZ, Cheng G, et al. Flavonoids from the aerial parts of *Rhododendron primulaeflorum* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 612-615.
- 17 Hu JM, Cheng JJ, Zhao YX, et al. Chemical constituents from fruit hulls of *Garcinia mangostana* (Cuttiferae) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2006, 28: 319-322.
- 18 Wan JF, Yang CH, Dong M, et al. Chemical constituents from *Lysimachia clethroides* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 59-62.
- 19 Pietta PG. Flavonoids as antioxidants [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1035-1042.
- 20 Zeng QT, Cui H, Yao HZ, Yuan T. Five sesquiterpenes from *Paraconiothyrium* sp. and their anti-inflammatory activity [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20: e202300477.
- 21 Chen HX, Liang FC, Gu P, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 288.