

通体结香技术产沉香色酮类成分分离及其抗炎作用

余章昕¹, 王灿红¹, 郑威¹, 陈德力¹, 杨云¹, 刘洋洋^{1*}, 魏建和^{1,2*} (1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室, 海口 570311; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193)

摘要:目的 研究通体结香技术产沉香中的2-(2-苯乙基)色酮类成分及其抗炎活性。方法 综合运用多种现代色谱分离方法对提取物进行分离, 并通过理化常数和波谱分析鉴定化合物结构; 结合脂多糖介导的RAW 264.7 细胞模型评价部分化合物的抗炎活性, 同时通过酶联免疫方法检测 TNF- α 的分泌水平。结果 从通体香中分离得到1个新化合物(7'R)-2-[2-(7'-羟基苯基)乙基]色酮(1), 此外还有9个类似物, 分别鉴定为: 6,7-二甲氧基-2-[2-(7'-羟基苯基)乙基]色酮(2), 6-羟基-2-[2-(7'-羟基苯基)乙基]色酮(3), 8-氯-6-羟基-2-(2-苯基乙基)色酮(4), 8-氯-6-羟基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(5), 8-氯-6-羟基-2-[2-(3'-羟基-4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(6), 7-羟基-6-甲氧基-2-(2-苯基乙基)色酮(7), 6-羟基-7-甲氧基-2-[2-(4'-羟基苯基)乙基]色酮(8), 6-羟基-2-[2-(3'-甲氧基-4'-羟基苯基)乙基]色酮(9), 6-羟基-2-[2-(3'-羟基-4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(10)。活性实验结果发现, 化合物1, 4, 6, 9对LPS诱导RAW264.7细胞释放TNF- α 炎症因子具有显著抑制作用, IC₅₀值分别为13.30, 8.53, 7.72和10.87 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 化合物1为新化合物, 首次报道化合物4的晶体结构; 化合物1, 4, 6, 9具有显著抗炎作用。

关键词:白木香; 通体结香技术; 沉香; 色酮; 抗炎活性

doi:10.11669/cpj.2019.23.007 中图分类号:R932 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)23-1945-06

Anti-inflammatory Chromones from Agarwood Produced Via Whole-Tree Agarwood-Inducing Technique of *Aquilaria sinensis*

YU Zhang-xin¹, WANG Can-hong¹, ZHENG Wei¹, CHEN De-li¹, YANG Yu¹, LIU Yang-yang^{1*}, WEI Jian-he^{1,2*} (1. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China; 2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the chromones and anti-inflammation effect of agarwood produced via whole-tree agarwood-inducing technique (Agar-Wit) from *A. sinensis*. **METHODS** The constituents were isolated and purified by chromatographic technique and semi-preparation HPLC. RAW264.7 cell model induced by lipopolysaccharide was used to evaluate the anti-inflammatory activity of some compounds, and the secretion level of TNF- α was detected by ELISA. **RESULTS** A new 2-(2-phenylethyl) chromone, (7'R)-2-[2-(7'-hydroxyphenyl)ethyl] chromone (1), along with nine analogues (2-10) were isolated from the agarwood produced by Agar-Wit, their structures were identified on the basis of physicochemical characteristics and spectroscopic data analysis as 6,7-dimethoxy-2-[2-(7'-hydroxyphenyl)ethyl] chromone (2), 6-hydroxy-2-[2-(7'-hydroxyphenyl)ethyl] chromone (3), 8-chloro-6-hydroxy-2-(2-phenylethyl) chromen-4-one (4), 8-chloro-6-hydroxy-2-[2-(4'-methoxyphenyl)ethyl] chromone (5), 8-chloro-6-hydroxy-2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl] chromone (6), 7-hydroxy-6-methoxy-2-(2-phenylethyl) chromone (7), 6-hydroxy-7-dimethoxy-2-[2-(4'-hydroxyethyl)] chromone (8), 6-hydroxy-2-[2-(3'-methoxy-4'-hydroxy)ethyl] chromone (9), 6-hydroxy-2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl] chromone (10). The results showed that compounds 1, 4, 6, 9 significantly inhibited the release of TNF- α inflammatory factors in RAW264.7 cells induced by LPS, with IC₅₀ values of 13.30, 8.53, 7.72, and 10.87

基金项目:海南省自然科学基金项目资助(219QN342); 国家重点研发计划项目资助(2018YFC1706400); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助(2016-I2M-2-003); 中组部“万人计划”项目资助(99950534); 海南省自然科学基金创新团队项目资助(2017CXTD022)

作者简介:余章昕,男,博士,助理研究员 研究方向:天然药物研究; 王灿红,女,硕士,助理研究员 研究方向:中药药效及作用机制研究。

余章昕和王灿红为共同第一作者 * 通讯作者:刘洋洋,男,副研究员,硕士生导师 研究方向:中药质量控制及标准研制研究

Tel:(0898)31589007 E-mail:eadchris@163.com; 魏建和,男,博干,研究员,博士生导师 研究方向:药用植物基因资源、分子育种及次生代谢产物调控研究 Tel:(010)57833358 E-mail:wjianh@263.net

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** Compound 1 is a new compound. The crystal structure of compound 4 is reported for the first time. Compounds 1, 4, 6, 9 show significant anti-inflammation activities.

KEY WORDS: *Aquilaria sinensis*; whole-tree agarwood-inducing technique; agarwood; chromone; anti-inflammation

沉香为常绿乔木瑞香科(Thymelaeaceae)沉香属(*Aquilaria*)和拟沉香属(*Gyrinops*)植物含有树脂的木材。白木香(*Aquilaria sinensis*)是我国主要的沉香树种,产于广东、海南和云南等地区。《中国药典》记载沉香具有“行气止痛、温中止呕、纳气平喘”功效,可用于胸腹胀闷疼痛,畏寒呕吐呃逆,肾虚气逆喘急等^[1]。近年来,沉香国际需求急剧增加,野生沉香属植物砍伐严重,均已处于濒危状态。针对全世界野生沉香资源濒危、沉香形成机制不清、缺乏产业化结香技术等问题,魏建和等提出并阐明“木香防御反应诱导结香机制”^[2],且在此基础上开发了“通体结香技术”^[3],所产沉香简称为通体香。采用“通体结香技术”极大地提高了沉香产量,且结香6个月的沉香药材可满足《中国药典》的要求^[4],结香20个月的沉香品质不低于野生沉香^[5]。

2-(2-苯乙基)色酮和倍半萜类化合物为沉香的主要活性成分^[6-7],课题组前期对通体香的研究发现了一些色酮类成分^[8],在进一步的工作中,我们从中获取了10个2-(2-苯乙基)色酮类化合物,分别为: (7'R)-2-[2-(7'-羟基苯基)乙基]色酮(1),6,7-二甲氧基-2-[2-(7'-羟基苯基)乙基]色酮(2),6-羟基-2-[2-(7'-羟基苯基)乙基]色酮(3),8-氯-6-羟基-2-[2-(3'-羟基-4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(4),8-氯-6-羟基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(5),8-氯-6-羟基-2-(2-苯基乙基)色酮(6),7-羟基-6-甲氧基-2-(2-苯基乙基)色酮(7),6-羟基-7-甲氧基-2-[2-(4'-羟基苯基)乙基]色酮(8),6-羟基-2-[2-(3'-甲氧基-4'-羟基苯基)乙基]色酮(9),6-羟基-2-[2-(3'-羟基-4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(10)。其中,化合物1为新化合物,首次报道化合物4的晶体结构。化合物1,4,6,9对脂多糖(LPS)诱导RAW264.7细胞释放肿瘤坏死因子(TNF)- α 炎症因子具有明显抑制作用。

1 材料与仪器

实验材料为7年生白木香(*A. sinensis*)(中国医学科学院药用植物研究所魏建和教授鉴定)采用通体结香技术结香18个月后所产沉香,结香基地位于广东省化州市平定镇,结香技术^[3]由中国医学科学院药用植物研究所海南分所提供,凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所海南分所沉香鉴定

中心标本馆。

Bruker AV III 600 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); LTQ-Obitrap 高分辨质谱(Thermo 公司); SGW[®] X-5 型显微熔点仪(上海仪电); SGW[®] -531 自动旋光仪(上海仪电); P230 型半制备液相色谱(依利特); 10 mm \times 250 mm, 5 μm C₁₈ 柱(日本 YMC 公司); ODS 填料(12 nm ~ 50 μm , 日本 YMC 公司); Sephadex LH-20 凝胶(美国 Pharmacia 公司); 柱色谱硅胶(100 ~ 200, 300 ~ 400 目)和薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂), 所用试剂均为分析纯, 购于西陇化工股份有限公司。

2 提取与分离

沉香粉末 300 g, 经干馏法提取, 得到 25.5 g 焦油。将其进行硅胶(100 ~ 200 目)柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯(100:1 至 1:1, V/V)以及二氯甲烷-甲醇(100:1 至 1:1, V/V)梯度洗脱, 得到 12 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 20)。将 Fr. 3 ~ Fr. 5 (Fr. A, 2.3 g) 再次经硅胶(200 ~ 300 目)柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯(20:1 至 1:5)梯度洗脱, 获取 5 个组分(Fr. A1 ~ Fr. A5)。Fr. A2 (0.58 g) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱二氯甲烷-甲醇(3:7, V/V)分离, 最后通过自制薄层色谱获得化合物 2 (14.6 mg)、3 (15 mg) 及 6 (6.9 mg)。Fr. A3 (0.63 g) 通过硅胶(200 ~ 300 目)柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯(10:1 至 1:10, V/V)梯度洗脱, 获取 5 个组分(Fr. A3a ~ Fr. A3e)。Fr. A3b (0.28 g) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱二氯甲烷-甲醇(1:1, V/V)分离, 经半制备液相色谱, 以乙腈-水(55:45, V/V)等度洗脱, 获得 5 (35.4 mg) 及 7 (2.1 mg)、9 (2.2 mg)。Fr. A3c (0.15 g) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱二氯甲烷-甲醇(3:7, V/V)分离, 通过半制备液相色谱(YMC, 10 mm \times 250 mm, 5 μm C₁₈), 以乙腈-水(1:1, V/V)等度洗脱, 获得 1 (4.1 mg)、4 (15.0 mg)、8 (2.5 mg) 及 10 (1.7 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 (图 1): 为淡黄色粉末, 熔点 125 ~ 127 $^{\circ}\text{C}$, 易溶于氯仿、甲醇溶剂。HRESIMS 测得相对分子质量为 m/z 267.083 2 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ (计算值 C₁₇H₁₅O₃, 267.084 1), 可知该化合物分子式为

C₁₇H₁₄O₃, 不饱和度为 11。IR 光谱在波数 3 310 和 1 625 cm⁻¹ 处显示有羟基和羰基吸收。¹H-NMR (表 1) 在低场区显示 1 个单峰氢信号 δ_H 6.26 (1H, s, H-3), 1 个邻位取代的苯环信号 δ_H 7.47 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-6), 8.10 (1H, dd, *J* = 1.8, 7.8 Hz, H-5), 7.78 (1H, td, *J* = 1.8, 7.8 Hz, H-7) 和 7.56 (1H, dd, *J* = 1.8, 7.8 Hz, H-8), 以及另 1 个 A₂B₂ 共轭系统的氢信号 δ_H 7.42 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2', 6'), 7.34 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-3', 5')。此外, 氢谱显示 1 个连氧的三重峰质子信号 δ_H 5.17 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-7')。低场区显示 1 个四重峰氢信号 δ_H 3.09 (2H, dd, *J* = 2.4, 6.6 Hz, H-8')。碳谱(表 1)共显示 15 个碳信号, 包括 1 个亚甲基信号 δ_C 45.4, 1 个连氧的次甲基信号 δ_C 72.8, 1 个三取代的双键信号 δ_C 112.3, 169.7, 和 1 个羰基信号 δ_C 180.7, 以及 2 个苯环碳信号 δ_C (158.3, 145.1, 135.6, 129.7, 129.0, 127.1, 126.7, 126.3, 124.6, 119.5)。分析 1 的¹H 和¹³C-NMR 谱数据, 发现与 2-(2-phenylethyl) chromone^[9] 的数据非常相似, 区别在于亚甲基 C-7', C-8' 的化学位移, 其中 1 个被羟基取代 δ_C 72.8。由于 C-7' 化学位移向低场移动, 在 HMBC 谱中 δ_H 5.17 (t, *J* = 6.6 Hz) 与 C-1', C-2' 和 C-6' 相关确定羟基连在 C-7' 位。由于化合物 1 只含有 1 个手性碳原子, 根据其旋光 [α]_D²⁵ + 82° (c 0.1, CHCl₃) 推断 C-7' 为 *R* 型^[10]。因此, 化合物 1 被鉴定为新化合物, 命名为 (7'*R*)-2-[2-(7'-hydroxyphenyl) ethyl] chromone。

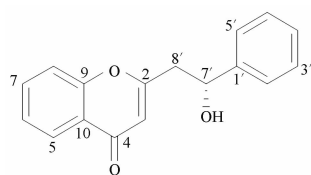


图 1 化合物 1 结构
Fig. 1 Structure of compound 1

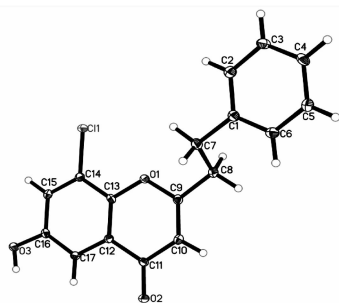


图 2 化合物 4 的晶体结构
Fig. 2 X-Ray structure of compound 4

表 1 化合物 1¹H-和¹³C-NMR 数据 (600/150 MHz, CD₃OD)

Tab. 1 The ¹H- and ¹³C-NMR data of compound 1 (600/150 MHz, CD₃OD)

| No. | δ _C | δ _H (<i>J</i> in Hz) |
|-----|----------------|----------------------------------|
| 1 | - | - |
| 2 | 169.7 | - |
| 3 | 112.3 | 6.26 (s) |
| 4 | 180.7 | - |
| 5 | 126.3 | 8.10 (dd, 1.8, 7.8) |
| 6 | 126.7 | 7.47 (t, 7.2) |
| 7 | 135.6 | 7.78 (td, 1.8, 7.8) |
| 8 | 119.5 | 7.56 (dd, 1.8, 7.8) |
| 9 | 158.3 | - |
| 10 | 124.6 | - |
| 1' | 145.1 | - |
| 2' | 127.1 | 7.42 (d, 7.2) |
| 3' | 129.7 | 7.34 (t, 7.2) |
| 4' | 129.0 | 7.27 (m) |
| 5' | 129.7 | 7.34 (t, 7.2) |
| 6' | 127.1 | 7.42 (d, 7.2) |
| 7' | 72.8 | 5.17 (t, 6.6) |
| 8' | 45.4 | 3.09 (dd, 2.4, 6.0) |

化合物 2: 淡黄色粉末, 熔点 133 ~ 136 °C。HRESIMS 测得相对分子质量为 *m/z* 349.104 3 [M + Na]⁺ (计算值 C₁₉ H₁₈ O₅ Na, 349.105 2)。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 7.45 (1H, s, H-5), 7.41 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2', 6'), 7.31 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-3', 5'), 7.28 (1H, m, H-4'), 7.11 (1H, s, H-8), 5.15 (1H, t, *J* = 6.0 Hz, H-7'), 3.97 (3H, s, OMe-6), 3.91 (3H, s, OMe-7), 3.06 (2H, dd, *J* = 2.4, 6.0 Hz, H-8')。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 168.7 (C-2), 111.6 (C-3), 180 (C-4), 104.9 (C-5), 149.6 (C-6), 156.8 (C-7), 101.3 (C-8), 154.7 (C-9), 117.6 (C-10), 145.2 (C-1'), 127.1 (C-2', 6'), 130.8 (C-3', 5'), 129.0 (C-4'), 72.9 (C-7'), 45.3 (C-8'), 56.9 (OMe-6), 57.2 (OMe-7)。以上数据与文献[10]报道的 6,7-二甲氧基-2-[2-(7'-羟基苯基)乙基]色酮(6,7-dimethoxy-2-[2-(7'-hydroxyphenyl)ethyl]chromone)数据基本一致。

化合物 3: 淡黄色粉末, 熔点 122 ~ 123 °C, 易溶于甲醇。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.89 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-5), 7.43 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2', 6'), 7.40 (2H, m, H-7, 8), 7.33 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-3', 5'), 7.29 (1H, m, H-4'), 5.14 (1H, t, *J* = 6.0 Hz, H-7'), 3.05 (2H, dd, *J* = 2.4, 6.0 Hz, H-8')。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 169.0 (C-2), 111.1 (C-3), 180.5 (C-4), 108.7 (C-5), 156.4 (C-6), 124.5 (C-

7), 120.5 (C-8), 152.1 (C-9), 125.2 (C-10), 145 (C-1'), 126.9 (C-2', 6'), 129.5 (C-3', 5'), 128.8 (C-4'), 72.7 (C-7'), 45.2 (C-8')。以上数据与文献[11]报道的6-羟基-2-[2-(7'-羟基苯基)乙基]色酮(6-hydroxy-2-[2-(7'-hydroxyphenyl)ethyl]chromone)数据基本一致。

化合物4:淡黄色固体,熔点144~146℃,易溶于氯仿、甲醇。¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.32(1H, d, J=2.8 Hz, H-7), 7.30(1H, d, J=2.8 Hz, H-5), 7.23(2H, m, H-4'), 7.20(2H, m, H-2', 6'), 7.10(1H, m, H-3', 5'), 6.12(1H, s, H-3), 3.11(2H, m, H-7'), 3.04(2H, m, H-8')。¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz) δ: 171.3 (C-2), 110.1 (C-3), 179.7 (C-4), 108.3 (C-5), 156.5 (C-6), 124.4 (C-7), 124.6 (C-8), 147.4 (C-9), 126.1 (C-10), 141.1 (C-1'), 129.6 (C-2', 6'), 129.4 (C-3', 5'), 127.5 (C-4'), 33.9 (C-7'), 36.9 (C-8')。以上数据与文献[12]报道的8-氯-6-羟基-2-(2-苯基乙基)色酮(8-chloro-6-hydroxy-2-(2-phenylethyl)chromen-4-one)数据一致。

在甲醇溶剂中,经过缓慢的挥发,我们得到化合物4的晶体。在100 K下,选0.132 × 0.12 × 0.11 mm³的单晶置于四圆衍射仪中,采用Mo Kα射线(λ=0.154 184 nm),以ω/2θ方式收集,在6.888° ≤ 2θ ≤ 146.806°内收集到衍射数据11 342个,其中独立衍射数据2 738(R_{int}=0.038 8)。晶体的分子式为C₁₇H₁₃ClO₃,相对分子质量300.72,属于斜方晶,空间群I₄₁/a,晶胞参数a=1.646 64(2) nm, b=1.646 64(2) nm, c=2.047 61(4) nm, α=β=γ=90.00°, V=5.551 94(17) nm³, Z=16, T=100.00(10) K, D_c=1.439 g·cm³, μ(Cu Kα)=2.504 mm⁻¹,和F(000)=2 496.0。Final R₁=0.054 4 [I>2σ(I)], wR₂(F²)=0.133 5 [I>2σ(I)], final R₁=0.059 4, wR₂(F²)=0.136 2(all data)。该化合物的晶体数据已保存于剑桥晶体数据库中,CCDC 1914716(图2)。

化合物5:淡黄色固体,熔点138~141℃,易溶于氯仿、甲醇。¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.33(1H, d, J=2.4 Hz, H-5), 7.31(1H, d, J=2.4 Hz, H-7), 7.20(2H, d, J=8.8 Hz, H-2', 6'), 6.82(2H, d, J=8.8 Hz, H-3', 5'), 6.11(1H, s, H-3), 3.70(3H, s, OMe-4'), 3.03(4H, m, H-7', 8')。¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz) δ: 171.3 (C-2), 110.1 (C-3), 179.7 (C-4), 108.3 (C-5), 156.2 (C-6), 124.3 (C-7), 124.5 (C-8), 147.5 (C-9), 126.1 (C-10), 133.1

(C-1'), 130.4 (C-2', 6'), 115 (C-3', 5'), 159.8 (C-4'), 33.1 (C-7'), 37.1 (C-8'), 56.6 (OMe-4')。以上数据与文献[15]报道的8-氯-6-羟基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(8-chloro-6-hydroxy-2-[2-(4'-methoxyphenyl)ethyl]chromone)数据一致。

化合物6:淡棕色粉末,熔点147~149℃,易溶于甲醇。¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.20(1H, d, J=2.4 Hz, H-7), 7.18(1H, d, J=2.4 Hz, H-5), 6.79(1H, d, J=8.4 Hz, H-5'), 6.68(1H, d, J=1.8 Hz, H-2'), 6.63(1H, dd, J=1.8, 8.4 Hz, H-6'), 6.05(1H, s, H-3), 3.70(3H, s, 4'-OMe)。¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz) δ: 171.2 (C-2), 110 (C-3), 179.8 (C-4), 108.2 (C-5), 157.0 (C-6), 126.3 (C-7), 124.5 (C-8), 147.3 (C-9), 126.3 (C-10), 134.1 (C-1'), 116.4 (C-2'), 147.7 (C-3'), 147.6 (C-4'), 112.9 (C-5'), 120.6 (C-6'), 33.3 (C-7'), 37.1 (C-8'), 56.4 (OMe-4')。以上数据与文献[13]报道的8-氯-6-羟基-2-[2-(3'-羟基-4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(8-chloro-6-hydroxy-2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl]chromone)数据一致。

化合物7:淡黄色针状晶体,熔点123~125℃,易溶于氯仿、甲醇。¹H-NMR(CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.19~7.30(5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 7.53(1H, s, H-8), 6.95(1H, s, H-5), 6.09(1H, s, H-3), 3.97(3H, s, OMe-6), 3.04(2H, t, J=7.2 Hz, H-8'), 2.90(2H, t, J=7.2 Hz, H-7')。¹³C-NMR(CDCl₃, 150 MHz) δ: 168.0 (C-2), 109.4 (C-3), 177.9 (C-4), 104.4 (C-5), 145.4 (C-6), 151.5 (C-7), 102.8 (C-8), 152.9 (C-9), 117.0 (C-10), 139.9 (C-1'), 128.8 (C-3', C-5'), 128.4 (C-2', C-6'), 126.7 (C-4'), 56.6 (6-OMe), 32.1 (C-7'), 36.3 (C-8')。以上数据与文献[14]报道的7-羟基-6-甲氧基-2-(2-苯基乙基)色酮[7-hydroxy-6-methoxy-2-(2-phenylethyl)chromone]数据一致。

化合物8:淡黄色固体,熔点132~135℃。¹H-NMR(CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.48(1H, s, H-5), 7.02(2H, dd, J=8.4, 2.4 Hz, H-2', 6'), 6.68(2H, dd, J=8.4, 2.4 Hz, H-3', 5'), 6.67(1H, s, H-8), 6.08(1H, s, H-3), 3.95(3H, s, OMe-7), 3.05(2H, t, J=7.2 Hz, H-8'), 2.89(2H, t, J=7.2 Hz, H-7')。¹³C-NMR(CDCl₃, 150 MHz) δ: 168.8 (C-2), 109.8 (C-3), 178.2 (C-4), 105.1 (C-5), 145.7 (C-6), 153.2 (C-7), 99.2 (C-8), 151.8 (C-9), 116.9 (C-10), 133.4 (C-1'), 130.1 (C-2', 6'), 115.7 (C-3', 5'),

155.8 (C-4'), 32.3 (C-7'), 36.8 (C-8'), 56.4 (OMe-7)。以上数据与文献[15]报道的6-羟基-7-甲氧基-2-[2-(4'-羟基乙基)]色酮(6-hydroxy-7-methoxy-2-(2-(4'-hydroxyethyl)]chromone)数据一致。

化合物9:淡黄色固体,熔点128~130℃,易溶于氯仿、甲醇。¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.45(1H, d, J=8.8 Hz, H-8), 7.36(1H, d, J=2.8 Hz, H-5), 7.23(1H, dd, J=8.8, 2.8 Hz, H-7), 6.74(1H, d, J=1.6 Hz, H-2'), 6.68(1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.63(1H, dd, J=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.09(1H, s, H-3), 3.73(3H, s, OMe-3')。¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz) δ: 171.5(C-2), 109.8(C-3), 180.6(C-4), 108.7(C-5), 156.4(C-6), 120.5(C-7), 124.5(C-8), 152.0(C-9), 125.1(C-10), 132.8(C-1'), 113.1(C-2'), 148.9(C-3'), 146.3(C-4'), 116.2(C-5'), 121.9(C-6'), 33.8(C-7'), 7.4(C-8'), 56.3(OMe-3')。以上数据与文献[16]报道的[6-羟基-2-[2-(3'-甲氧基-4'-羟基苯基)乙基]色酮](6-hydroxy-2-[2-(3'-methoxy-4'-hydroxy)ethyl]chromone)数据一致。

化合物10:淡黄色固体,熔点135~137℃。¹H-NMR(CD₃OD, 600 MHz) δ: 7.46(1H, d, J=9.0 Hz, H-8), 7.36(1H, d, J=3.0 Hz, H-5), 7.23(1H, dd, J=9.0, 3.0 Hz, H-7), 6.80(1H, d, J=8.4 Hz, H-5'), 6.68(1H, d, J=2.4 Hz, H-2'), 6.62(1H, dd, J=8.4, 2.4 Hz, H-6'), 6.09(1H, s, H-3), 3.79(3H, s, OMe-4'), 2.94(4H, brs, H-7', 8')。¹³C-NMR(CD₃OD, 150 MHz) δ: 171.4(C-2), 109.7(C-3), 180.6(C-4), 108.7(C-5), 156.5(C-6), 124.5(C-7), 120.5(C-8), 152(C-9), 125.1(C-10), 134.1(C-1'), 112.8(C-2'), 147.6(C-3'), 147.6(C-4'), 116.4(C-5'), 120.5(C-6'), 33.4(C-7'), 37.3(C-8'), 56.4(OMe-4')。以上数据与文献[15]报道的6-羟基-2-[2-(3'-羟基-4'-甲氧基苯基)乙基]色酮

(6-hydroxy-2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl]chromone)数据一致。

4 化合物的抗炎活性

体外抗炎活性筛选采用小鼠单核巨噬细胞Raw264.7模型^[17-18],具体如下:Raw264.7细胞用含10% FBS的DMEM培养液于37℃、5% CO₂培养箱中常规培养。细胞按1×10⁵个·mL⁻¹、200 μL·孔⁻¹接种于96孔板中,分别设置空白对照组、LPS诱导组、受试药物高、中、低(50, 25, 12.5 μg·mL⁻¹)剂量组,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中贴壁24 h后。除空白对照组除外,各组分别加入相应受试药物和终质量浓度为1 μg·mL⁻¹ LPS,继续培养24 h。吸取50 μL细胞培养上清液根据ELISA试剂盒操作说明检测TNF-α水平,然后每孔分别加入10 μL(5 mg·mL⁻¹) MTT继续培养4 h,弃去上清分别加150 μL DMSO,振摇10 min,采用酶标仪在570 nm处测OD值。

抗炎活性结果(表2)表明,与空白比较,LPS组的OD值显著升高(P<0.001),表明LPS诱导的RAW264.7细胞明显增殖发生炎症反应。相比LPS组,化合物1,4,6,9的OD值显著降低(P<0.001, P<0.01, P<0.05),明显抑制炎症的发生。计算IC₅₀值分别为13.30, 8.53, 7.72和10.87 μg·mL⁻¹。

对TNF-α抑制作用(表3)表明,相比LPS组,化合物1,4,6,9均显著降低TNF-α的水平(P<0.001, P<0.01, P<0.05)。

5 讨论

本实验采用各种色谱技术从通体结香技术诱导白木香形成的沉香中分离得到10个色酮类化合物。其中,化合物1为新化合物,首次报道化合物4的晶体结构;所有化合物均为首次从通体香中所得,

表2 化合物1, 4, 6, 9对RAW264.7细胞抗炎活性. n=3, $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 Inhibitory activity of compounds 1, 4, 6, 9 on NO production in RAW264.7 cells induced by LPS. n=3, $\bar{x} \pm s$

| Compounds | $\rho/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | | | IC ₅₀ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|-----------|---|---------------------------|---------------------------|--|
| | 50 | 25 | 12.5 | |
| 1 | 1.44 ± 0.43 ²⁾ | 1.95 ± 0.20 ²⁾ | 2.22 ± 0.43 ³⁾ | 13.30 |
| 4 | 1.01 ± 0.25 ¹⁾ | 1.50 ± 0.24 ¹⁾ | 1.76 ± 0.20 ¹⁾ | 8.53 |
| 6 | 0.68 ± 0.19 ¹⁾ | 1.71 ± 0.07 ¹⁾ | 2.00 ± 0.23 ¹⁾ | 7.72 |
| 9 | 0.75 ± 0.06 ¹⁾ | 1.00 ± 0.09 ¹⁾ | 1.31 ± 0.07 ¹⁾ | 10.87 |
| Blank | 2.21 ± 0.30 | | | |
| LPS | 2.93 ± 0.52 ¹⁾ | | | |

注:与空白比,¹⁾P<0.001;与LPS比,¹⁾P<0.001, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.05

Note:¹⁾P<0.001, vs Blank; ¹⁾P<0.001, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.05, vs LPS

表3 化合物 1, 4, 6, 9 对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞分泌 TNF- α 抑制作用. $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab.3 Inhibitory effect of compounds 1, 4, 6, 9 on TNF- α in RAW264.7 cells induced by LPS. $n=3, \bar{x} \pm s$

| Compounds | $\rho/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | | |
|-----------|---|--------------------------------|--------------------------------|
| | 50 | 25 | 12.5 |
| 1 | 33.24 \pm 4.31 ²⁾ | 49.71 \pm 2.04 ²⁾ | 71.18 \pm 4.35 ³⁾ |
| 4 | 10.00 \pm 2.52 ¹⁾ | 39.12 \pm 2.44 ²⁾ | 56.47 \pm 2.03 ³⁾ |
| 6 | 3.82 \pm 1.12 ¹⁾ | 45.88 \pm 3.72 ²⁾ | 60.59 \pm 5.52 ³⁾ |
| 9 | 2.35 \pm 0.65 ¹⁾ | 11.76 \pm 1.54 ¹⁾ | 40.00 \pm 1.26 ²⁾ |
| LPS | 80.15 \pm 5.79 ¹⁾ | | |

注:与 LPS 比, ¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$

Note: ¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$, vs LPS

且 2~10 均为从沉香中分离所得并报道;化合物 1, 4, 6, 9 可显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的炎症反应,同时抑制 TNF- α 的分泌水平,发挥抗炎作用。本实验为通体香的品质评价和基于通体香为原料的产品开发提供了基础依据。

REFERENCES

- [1] Ch. P (2015). Vol I (中国药典 2015 年版.一部)[S]. 2015: 185.
- [2] ZHANG Z, YANG Y, WEI J H, et al. Advances in studies on mechanism of agarwood formation in *Aquilaria sinensis* and its hypothesis of agarwood formation induced by defense response[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, 41(1):156-159.
- [3] LIU Y Y, CHEN H Q, YANG Y, et al. Whole-tree agarwood-inducing technique: an efficient novel technique for producing high-quality agarwood in cultivated *Aquilaria sinensis* trees[J]. *Molecules*, 2013, 18(3):3086-3106.
- [4] ZHANG Q, HUO H X, GU Y F, et al. HPLC-DAD Characteristic chromatogram of Chinese eaglewood[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2015, 50(21):213-216.
- [5] ZHANG X L, LIU Y Y, WEI J H, et al. Production of high-quality agarwood in *Aquilaria sinensis* trees via whole-tree agarwood-induction technology[J]. *Chin Chem Lett*, 2012, 23(6): 727-730.
- [6] WANG S, YU Z X, WANG C H, et al. Chemical constituents

and pharmacological activity of agarwood and *Aquilaria* plants [J]. *Molecules*, 2018, 23(2):342-362.

- [7] 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.
- [8] LIU Y Y, CHEN D L, YU Z X, et al. New 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives from agarwood and their inhibitory effects on tumor cells [J]. *Nat Prod Res*, doi.org/10.1080/14786419.2018.1528591.
- [9] HASHIMOTO K, NAKAHARA S, INOUE T, et al. A new chromone from agarwood and pyrolysis products of chromone derivatives[J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11):5088-5091.
- [10] LIAO G, MEI W L, DONG W H, et al. 2-(2-Phenylethyl) chromone derivatives in artificial agarwood from *Aquilaria sinensis*[J]. *Fitoterapia*, 2016, 110(1):38-43.
- [11] YAGURA T, ITO M, KIUCHI F, et al. Four new 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives from withered wood of *Aquilaria sinensis*[J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(5):560-564.
- [12] 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]. *Helvet Chim Acta*, 2012, 95(6):951-954.
- [13] DAI H F, LIU J, ZENG Y B, et al. A new cytotoxic 2-(2-phenylethyl) chromone from Chinese eaglewood [J]. *Chin Chem Lett*, 2008, 19(8):934-936.
- [14] WANG S L, HWANG T L, CHUANG M L, et al. New flavones, a 2-(2-phenylethyl)-4H-chromen-4-one derivative, and anti-inflammatory constituents from the stem barks of *Aquilaria sinensis* [J]. *Molecules*, 2015, 20(11):20912-20925.
- [15] SHAO H, MEI M L, LI W, et al. Chemical constituents of agarwood originating from *Gyrinops salicifolia* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27(12):2046-2049.
- [16] YANG D L, WANG H, GUO Z K, et al. A new 2-(2-phenylethyl) chromone derivative in Chinese agarwood 'Qi-Nan' from *Aquilaria sinensis*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(7):770-776.
- [17] HUANG X J, TANG J Q, LI M M, et al. Triterpenoid saponins from the rhizomes of *Anemone flaccida* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production in macrophage RAW264.7 cells [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(9):910-921.
- [18] LI J, LIANG Q L, LEI L L, et al. Structure modification of cis-stilbenoids from the tubers of *Scirpus yagara* and their anti-inflammatory activities [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2015, 50(1):15-18.

(收稿日期:2019-09-12)