

- citromyctin analogue produced by *Ascomycota* sp. Ind19F07 isolated from deep sea sediment[J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(9): 820-826.
- [15] 胡彩云, 李赛妮, 陈玉婵, 等. 深海真菌 *Diaporthe phaseolorum* FS459 的聚酮类化合物研究 (英文) [J]. 有机化学, 2021, 41(4): 1591-1598.
- [16] Goddard M L, Mottier N, Jeanneret-Gris J, et al. Differential production of phytotoxins from *Phomopsis* sp. from grapevine plants showing esca symptoms[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(34): 8602-8607.
- [17] 司徒, 倪娜, 刘孟珊, 等. 1株黄河三角洲来源杂色曲霉 *A. versicolor* BHT-72 的次级代谢产物研究[J]. 中国海洋药物, 2023, 42(1): 31-36.
- [18] Padhi S, Masi M, Panda S K, et al. Antimicrobial secondary metabolites of an endolichenic *Aspergillus niger* isolated from lichen thallus of *Parmotrema ravum*[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(18): 2573-2580.
- [19] Zhang Y P, Zhu T, Fang Y C, et al. Carbonarones A and B, new bioactive gamma-pyrone and alpha-pyridone derivatives from the marine-derived fungus *Aspergillus carbonarius*[J]. *J Antibiot*, 2007, 60(2): 153-157.
- [20] Komai S I, Hosoe T, Itabashi T, et al. New vermistatin derivatives isolated from *Penicillium simplicissimum*[J]. *Heteroeyeles*, 2005, 65(11): 2771-2776.
- [21] 邹庭光, 薛楷聪, 朱静琳, 等. 海南东寨港秋茄内生真菌 *Penicillium* sp. KF22 聚酮类次级代谢产物研究[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(19): 1557-1562.
- [22] 吴斌, 吴立军, 张磊, 等. 麻叶千里光抗菌化学成分的研究 (I) [J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(5): 341-345.
- [23] 许进业, 许凤清, 孔垂皓, 等. 粉防己根的化学成分及抗肝纤维化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(12): 2050-2055.
- [24] 夏雪奎, 齐君, 刘昌衡, 等. 仿刺参共附生真菌 *Aspergillus terreus* 来源的聚酮类化合物的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(4): 10-14; 62.
- [25] Pobolevskaya M P, Zhuravleva O I, Leshchenko E V, et al. New metabolites from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* Maire and *Penicillium lividum* Westling[J]. *Phytochem Lett*, 2016, 15: 7-12.
- [26] 肖泽恩, 黄锡山, 韦蔚烜, 等. 北海红树林内生真菌 *Aspergillus* sp. GXIMD00016 的抗炎次级代谢产物[J]. 中山大学学报 (自然科学版) (中英文), 2022, 61(6): 69-73.
- [27] Lopes T I, Coelho R G, Yoshida N C, et al. Radical-scavenging activity of orsellinates[J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(11): 1551-1554.

## 石仙桃假鳞茎乙酸乙酯部位化学成分及其黑色素抑制活性研究

李琴<sup>1</sup>, 郁阳<sup>1,2,3</sup>, 蔡百祥<sup>1,2\*</sup>, 王举涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽合肥 230012; 2. 安徽省活性天然产物重点实验室, 安徽合肥 230012; 3. 食药菌功能活性与资源利用安徽省联合共建学科重点实验室, 安徽合肥 230012)

**摘要:** 目的 研究石仙桃 *Pholidota chinensis* Lindl. 假鳞茎乙酸乙酯部位的化学成分及其黑色素抑制活性。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶、薄层色谱及半制备 HPLC 进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。采用 NaOH 裂解法检测化合物对 B16F10 细胞黑色素生成的抑制作用。结果 从中分离得到 10 个单体化合物, 分别鉴定为石仙桃烯酸 A (1)、3, 3', 5-三甲氧基联苳 (2)、3, 3', 5-三甲氧基联苳 (3)、coeloginin (4)、ochrolide (5)、石仙桃菲 (6)、3, 3'-二羟基-5-甲氧基二苯乙烯 (7)、3, 4'-二羟基-2', 3', 5-三甲氧基二苯乙烯 (8)、3-羟基-5-甲氧基二苯乙烯 (9)、4, 7-二羟基-2, 3, 6-三甲氧基菲 (10)。化合物 2~10 干预后, B16F10 细胞的黑色素含量为 (66.82±0.93)% ~ (134.00±3.16)%。结论 化合物 1 为新的烯酸类衍生物, 2~10 为芪类, 4~5 为首次从石仙桃属植物中分离获得。化合物 2~3 具有显著黑色素抑制活性, 5~10 的抑制活性与阳性药熊果苷相当。

**关键词:** 石仙桃; 假鳞茎; 乙酸乙酯部位; 化学成分; 分离鉴定; 芪类; 黑色素抑制活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0851-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.020

收稿日期: 2025-12-04

基金项目: 安徽中医药大学校级人才支持计划 (2023rczd008)

作者简介: 李琴, 女, 硕士在读, 从事中药化学成分研究。E-mail: 2241444749@qq.com

\* 通信作者: 蔡百祥, 男, 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础与质量评价研究。E-mail: caibx@ahcm.edu.cn

王举涛, 男, 教授, 硕士生导师, 从事中药化学成分与品质评价研究。E-mail: wjt591@ahcm.edu.cn

# Chemical constituents from the ethyl acetate fraction of *Pholidota chinensis* pseudobulbs and their melanin inhibitory activity

LI Qin<sup>1</sup>, YU Yang<sup>1,2,3</sup>, CAI Bai-xiang<sup>1,2\*</sup>, WANG Ju-tao<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Province Key Laboratory of Bioactive Natural Products, Hefei 230012, China; 3. Functional Activity and Resource Utilization on Edible and Medicinal Fungi Joint Laboratory of Anhui Province, Hefei 230012, China)

**ABSTRACT: AIM** To study the chemical constituents from the ethyl acetate fraction of *Pholidota chinensis* Lindl. pseudobulbs and their melanin inhibitory activity. **METHODS** The separation and purification were carried out using silica gel, Sephadex LH-20 glucan gel, thin-layer chromatography, and semi-preparative HPLC, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. The inhibitory effect of the compounds on melanin production in B16F10 cells was detected by NaOH lysis method.

**RESULTS** Ten compounds were isolated and identified as phochine olefine acid A (**1**), 3, 3', 5-trimethoxybibenzyl (**2**), 3, 3', 5-trimethoxybibenzyl (**3**), coelogenin (**4**), ochrolide (**5**), pholidotophenanthrene (**6**), 3, 3'-dihydroxy-5-methoxystilbene (**7**), 3, 4'-dihydroxy-2', 3', 5-trimethoxystilbene (**8**), 3-hydroxy-5-methoxystilbene (**9**), 4, 7-dihydroxy-2, 3, 6-trimethoxyphenanthrene (**10**). After the treatment with compounds **2–10**, the melanin content in B16F10 cells ranged from (66.82 ± 0.93)% to (134.00 ± 3.16)%. **CONCLUSION** Compound **1** is a new olefine acid, **2–10** are stilbenoids, **4–5** are isolated from *Pholidota* genus for the first time. Compounds **2–3** can significantly inhibit melanin synthesis in B16F10 cells, while **5–10** display inhibitory activity comparable to that of the positive control drug, arbutin.

**KEY WORDS:** *Pholidota chinensis* Lindl.; pseudobulbs; ethyl acetate fraction; chemical constituents; isolation and identification; stilbenoids; melanin inhibitory activity

石仙桃 *Pholidota chinensis* Lindl. 为兰科石仙桃属的常绿附生草本植物，民间亦称石橄榄、果上叶等。该植物药食同源，其假鳞茎为常用的入药部位，是我国传统中草药之一，首载于《生草药性备要》<sup>[1]</sup>。石仙桃性凉，味苦、微酸，功擅养阴、清肺、利湿、清瘀等，常用于治疗内伤吐血、哮喘、肺热咳嗽、神经衰弱、肺结核咳血、胃十二指肠溃疡等<sup>[2]</sup>。现代研究表明，石仙桃属植物主要含有菲、联苳、二苯乙烯、萜类、木脂素和酚酸类等成分<sup>[3-4]</sup>。其中，萜类成分（即菲和联苳类化合物）作为该属特征性活性成分，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、美白、抗菌等作用<sup>[5-7]</sup>。目前，许多联苳、二苯乙烯及菲类衍生物已被证实具有抑制黑色素生成的作用<sup>[8-10]</sup>。然而，石仙桃中化学成分在抑制黑色素生成方面的研究仍不够充分。本研究旨在采用多种现代色谱分离技术对石仙桃假鳞茎的乙酸乙酯部位进行分离纯化，尤其是萜类化学成分，结合理化性质及波谱数据鉴定化合物结构，并进一步通过体外细胞模型评价其对黑色素生成的抑制活性，初步探讨其构效关系，以期对石仙桃的进一步

研究开发提供科学依据。

## 1 材料

1.1 药材 石仙桃于2023年10月采自云南省怒江傈僳族自治州，由安徽中医药大学蔡百祥博士鉴定为兰科石仙桃属植物石仙桃 *Pholidota chinensis* Lindl. 的假鳞茎。

1.2 仪器 AV III 600 核磁共振波谱仪（德国 Bruke 公司）；半制备高效液相色谱仪（HPLC）（武汉睿合色谱技术有限公司）；AB135-S 电子天平（十万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司）；Waters 1525 分析高效液相色谱仪、XBridge C<sub>18</sub> 分析型色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）、制备型色谱柱（20 mm×250 mm，5 μm）（美国 Waters 公司）；KQ2200 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；SpectraMax i3X 多功能酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；LX-165T2R 低温离心机（海尔集团公司）；SW-CJ-2FD 超净工作台（苏州净化设备有限公司）；Zcqr-1150 二氧化碳细胞培养箱（上海智诚分析仪器制造有限公司）。Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶（美国 GE Healthcare 公司）；GF<sub>254</sub> 薄层硅胶板（100 mm×

100 mm) (青岛海洋化工有限公司)。

1.3 细胞与试剂 小鼠皮肤黑色素瘤细胞系 B16F10 细胞、RPMI-1640 基础培养基 (批号 WHB824U191)、PBS 缓冲液 (批号 WHB825N211) (武汉普诺赛生命科技有限公司); DMEM 高糖培养基 (批号 319005237) [维森特生物技术 (南京) 有限公司]; 胎牛血清 (批号 BC20240202, 南京生航生物技术有限公司); 二甲基亚砜 (批号 34824985V)、胰酶消化液 (批号 01425004CJ) (北京兰杰柯科技有限公司); 熊果苷 (批号 K621084)、 $\alpha$ MSH (批号 K372809) [凯库勒 (广州) 生物医药有限公司]; CCK-8 试剂盒 [批号 HY5060606036, 瑞迪生物科技 (武汉) 有限公司]。NaOH (批号 1310732, 天津市大茂化学试剂厂); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国赛默飞世尔科技公司)。

## 2 提取与分离

取石仙桃假鳞茎 8.0 kg, 干燥后粉碎, 加入甲醇, 冷浸提取 3 次, 减压浓缩后得到不含醇味的浸膏, 再用等体积乙酸乙酯重复萃取 3 次, 得乙酸乙酯部位浸膏。取乙酸乙酯部位浸膏约 411 g, 通过硅胶柱 (流动相二氯甲烷-甲醇 100 : 0 ~ 0 : 100) 分离, 利用薄层色谱 (TLC) 检识, 合并相同组分, 最终得到 9 个组分 (A-I)。

组分 A (10.5 g) 经中压反相色谱柱分离, 以甲醇-水 (50 : 50 ~ 100 : 0) 梯度洗脱, 经 TLC 检识合并, 得 10 个亚组分 (Fr. A1 ~ Fr. A10)。Fr. A4 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离, 以甲醇洗脱, 得 8 个组分 (Fr. A4.1 ~ Fr. A4.8), Fr. A4.3 经制备型 HPLC (流动相乙腈-0.1% 甲酸 65 : 35 ~ 80 : 20, 检测波长 200、270 nm) 分离, 得到化合物 **2** (1.9 mg,  $t_R = 34.0$  min)。

组分 B (12.8 g) 经中压反相色谱柱分离, 以甲醇-水 (20 : 80 ~ 100 : 0) 梯度洗脱, 经 TLC 检识合并, 得 16 个亚组分 (Fr. B1 ~ Fr. B16)。组分 Fr. B8 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离, 以甲醇洗脱, 得 6 个组分 (Fr. B8.1 ~ Fr. B8.6), Fr. B8.6 经制备型 HPLC (流动相乙腈-0.1% 甲酸 55 : 45 ~ 70 : 30, 检测波长 200、260 nm) 分离, 得到化合物 **10** (2.5 mg,  $t_R = 13.1$  min)。组分 Fr. B12 经制备型 HPLC (流动相乙腈-0.1% 甲酸 65 : 35 ~ 80 : 20, 检测波长 210、300 nm) 分离, 得到化合物 **9** (3.2 mg,  $t_R = 17.5$  min)。

组分 D (170.9 g) 以 100 ~ 200 目硅胶均匀拌样, 经硅胶柱 (流动相石油醚-乙酸乙酯, 100 :

0 ~ 0 : 100) 分离, TLC 检识后合并相同组分, 最终得到 9 个组分 (Fr. D1 ~ Fr. D9)。组分 Fr. D6 (14.3 g) 经中压反相色谱柱分离, 以甲醇-水 (30 : 70 ~ 100 : 0) 梯度洗脱, 经 TLC 检识合并, 得 21 个亚组分 (Fr. D6.1 ~ Fr. D6.21)。组分 Fr. D6.6 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离, 以甲醇洗脱, 得 9 个组分 (Fr. D6.6.1 ~ Fr. D6.6.9), Fr. D6.6.5 经制备型 HPLC (流动相乙腈-0.1% 甲酸, 20 : 80 ~ 35 : 65, 检测波长 220、270 nm) 分离, 得到化合物 **1** (1.8 mg,  $t_R = 23.0$  min)。组分 Fr. D6.12 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离, 以甲醇洗脱, 得 8 个组分 (Fr. D6.12.1 ~ Fr. D6.12.8), Fr. D6.12.5 经制备型 HPLC (流动相乙腈-0.1% 甲酸 35 : 65 ~ 50 : 50, 检测波长 220、260 nm) 分离, 得到化合物 **5** (3.3 mg,  $t_R = 23.9$  min) 和 **3** (15.0 mg,  $t_R = 32.0$  min); Fr. D6.12.8 经制备型 HPLC (流动相乙腈-0.1% 甲酸 45 : 55 ~ 60 : 40, 检测波长 210、270 nm) 分离, 得到化合物 **6** (2.1 mg,  $t_R = 29.9$  min)。组分 Fr. D6.18 有结晶析出, 用甲醇洗去杂质后, 经制备型 HPLC (流动相乙腈-0.1% 甲酸 65 : 35 ~ 80 : 20, 检测波长 200、250 nm) 分离, 得到化合物 **4** (10.0 mg,  $t_R = 16.0$  min)。组分 Fr. D6.14 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离, 以甲醇洗脱, 得 8 个组分 (Fr. D6.14.1 ~ Fr. D6.14.8), Fr. D6.14.7 和 Fr. D6.14.8 经制备型 HPLC (流动相乙腈-0.1% 甲酸 45 : 55 ~ 55 : 45, 检测波长 220、300 nm) 分离, 分别得到化合物 **7** (20.0 mg,  $t_R = 18.0$  min) 和 **8** (1.6 mg,  $t_R = 25.0$  min)。本研究中, 制备型 HPLC 体积流量均为 8 mL/min。

## 3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色油状物 (甲醇),  $[\alpha]_D^{20}$  ( $c = 1.0$ , CH<sub>3</sub>OH)。其高分辨质谱 (ESI-HRMS) 显示化合物的准分子离子峰为  $m/z$ : 363.10814 [M-H]<sup>-</sup> (理论值 363.10799), 结合其<sup>13</sup>C-NMR 和 DEPT 谱数据, 推测分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>。在其<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 谱 (表 1) 中, 芳香区信号一组 ABX 耦合氢质子信号  $\delta$ : 7.56 (1H, dd,  $J = 8.2$ , 2.0 Hz)、7.52 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)、6.85 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 2 个甲氧基氢信号  $\delta$ : 3.90 (3H, s)、3.65 (3H, s), 2 个亚甲基氢信号  $\delta$ : 2.67 (2H, m), 2.60 (2H, m)。<sup>13</sup>C-NMR 和 DEPT (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 谱显示, 该化合物有 18 个碳信号, 其中包括 1 个非连氧碳基碳信号 ( $\delta$ :

198.0), 3个连氧碳基碳信号( $\delta$ : 173.0, 172.9, 172.8), 8个烯键碳信号( $\delta$ : 152.1, 147.6, 139.2, 138.9, 129.0, 123.8, 114.4, 110.4), 2个甲氧基碳信号( $\delta$ : 55.0, 50.8), 2个甲基碳信号( $\delta$ : 24.8, 7.0), 2个亚甲基碳信号( $\delta$ : 31.2, 18.6)。其 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY谱结合HSQC谱可知,芳香环上邻位H3'-H4'相关,表明其存在C3'-C4'的结构片段,结合其HMBC谱中可以观察到 $\delta$ : 2.53(H-8')、6.85(H-3')与81.4(C-5')相关,以及 $\delta$ : 7.56(H-4')、7.52(H-6')与198.0(C-7')相关,表明含有末端甲基的羰基连在苯环的C-5'位上,再通过 $\delta$ : 7.52(H-6')、3.90(2'-OCH<sub>3</sub>)与147.6(C-2')相关,可以确定苯环上甲氧基在C-2'位取代。在其 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY谱还可以

观察到2个亚甲基氢H2-H3相关,表明其含有C2-C3结构,在其HMBC谱中可以看到 $\delta$ : 2.67(H-4)与173.0(C-6)/138.9(C-2)/172.9(C-3a), 2.60(H-5)与139.2(C-2), 1.94(2-CH<sub>3</sub>)与139.2(C-3)/172.8(C-1)相关,可确定烯酸的基本母核平面结构为2-甲基-3-甲氧羰基-2,3-烯-己二酸。再结合其质谱数据可知,苯环与烯酸通过酯键相连,由上述信号数据确定化合物1的平面结构,见图1。之后,再结合化合物的ROESY谱(5-CH<sub>3</sub>与H-3之间相关)确定化合物中4,5位双键为Z型,最终确定化合物的立体构型。经SCI-Finder数据库检索,确定化合物为1个新的烯酸类化合物,命名为石仙桃烯酸A。

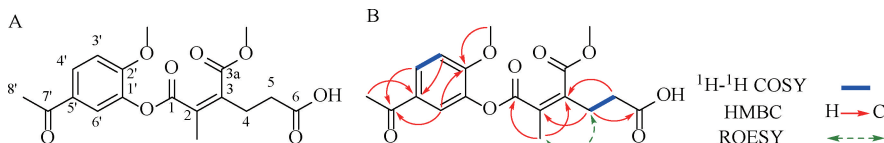


图1 化合物1的结构(A)及关键 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、HMBC相关(B)

Fig. 1 Chemical structure (A) and key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC correlations (B) of compound 1

表1 化合物1的 $^1\text{H}$ -NMR和 $^{13}\text{C}$ -NMR数据(600/150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Tab. 1  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for compound 1 (600/150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

位置	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	—	172.8
2	—	138.9
3	—	139.2
3a	—	172.9
4	2.67(m)	18.6
5	2.60(m)	31.2
6	—	173.0
1'	—	152.1
2'	—	147.6
3'	6.85(d, $J=8.2$ Hz)	114.4
4'	7.56(dd, $J=8.2, 2.0$ Hz)	123.8
5'	—	129.0
6'	7.52(d, $J=2.0$ Hz)	110.4
7'	—	198.0
8'	2.53(s)	24.8
2-CH <sub>3</sub>	1.94(s)	7.0
3a-OCH <sub>3</sub>	3.65(s)	50.8
2'-OCH <sub>3</sub>	3.90(s)	55.0

化合物2: 黄色油状物, ESI-MS  $m/z$ : 273.1 [M+H]<sup>+</sup>。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.21 (1H, t,  $J=8.1$  Hz, H-5'), 6.81 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-6'), 6.76 (2H, d,  $J=7.1$  Hz, H-2', 4'), 6.36 (2H, d,  $J=2.2$  Hz, H-2, H-6),

6.33 (1H, t,  $J=2.3$  Hz, H-4), 3.80 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.78 (6H, s, 3, 5-OCH<sub>3</sub>), 2.91 ~ 2.86 (4H, m, H-7, 7');  $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 144.3 (C-1), 106.6 (C-2), 160.9 (C-3), 98.1 (C-4), 160.9 (C-5), 106.6 (C-6), 38.2 (C-7), 143.5 (C-1'), 114.3 (C-2'), 159.8 (C-3'), 129.4 (C-4'), 121.0 (C-5'), 111.4 (C-6'), 37.9 (C-7'), 55.4 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (5-OCH<sub>3</sub>), 55.3 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定该化合物为3,3',5-三甲氧基联苯。

化合物3: 白色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 245.1 [M+H]<sup>+</sup>。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.05 (1H, t,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 6.64 (1H, d,  $J=7.6$  Hz, H-4'), 6.62 (1H, s, H-2'), 6.59 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-6'), 6.24 (1H, s, H-2), 6.22 (1H, s, H-6), 6.18 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-4), 3.69 (3H, dd,  $J=4.5, 1.9$  Hz, 5-OCH<sub>3</sub>), 2.76 (4H, h,  $J=6.7$  Hz, H-7, 7');  $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 145.5 (C-1), 106.5 (C-2), 159.3 (C-3), 99.9 (C-4), 162.2 (C-5), 109.0 (C-6), 39.2 (C-7), 144.7 (C-1'), 113.7 (C-2'), 158.3 (C-3'), 116.3 (C-

4'), 130.2 (C-5'), 120.8 (C-6'), 38.8 (C-7'), 55.5 (5-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定该化合物为 3, 3'-二羟基-5-甲氧基联苳。

化合物 4: 黄色结晶, ESI-MS  $m/z$ : 315.0 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.65 (1H, s, H-8), 6.59 (1H, s, H-6), 3.96 (3H, s, 1-OCH<sub>3</sub>), 3.83 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 2.93 (2H, t,  $J=7.7$  Hz, H-9), 2.86 (2H, t,  $J=7.9$  Hz, H-10); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 157.1 (C-1), 38.4 (C-2), 150.3 (C-3), 99.9 (C-4), 153.6 (C-5), 100.5 (C-6), 159.5 (C-7), 112.1 (C-8), 26.1 (C-9), 19.7 (C-10), 115.0 (C-4a), 106.8 (C-4b), 127.8 (C-8a), 136.8 (C-10a), 60.9 (1-OCH<sub>3</sub>), 60.5 (2-OCH<sub>3</sub>), 164.6 (-OCOAr-)。以上波谱数据与文献 [13] 报道基本一致, 故鉴定该化合物为 coeloginin。

化合物 5: 黄色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 313.0 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.90 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-10), 7.66 (1H, d,  $J=9.1$  Hz, H-9), 7.16 (1H, s, H-8), 7.01 (1H, s, H-6), 4.18 (3H, s, 1-OCH<sub>3</sub>), 3.93 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 158.2 (C-1), 138.2 (C-2), 150.8 (C-3), 97.8 (C-4), 154.7 (C-5), 102.0 (C-6), 158.2 (C-7), 107.5 (C-8), 123.0 (C-9), 121.3 (C-10), 114.4 (C-4a), 106.6 (C-4b), 124.7 (C-8a), 132.7 (C-10a), 61.7 (1-OCH<sub>3</sub>), 60.9 (2-OCH<sub>3</sub>), 164.3 (-OCOAr-)。以上波谱数据与文献 [14] 报道基本一致, 故鉴定该化合物为 ochrolide。

化合物 6: 棕褐色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 257.0 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.97 (1H, s, H-3), 6.67 (1H, d,  $J=1.4$  Hz, H-6), 6.58 (1H, d,  $J=1.4$  Hz, H-8), 3.90 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.16 (4H, d,  $J=3.8$  Hz, H-9, 10); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 141.8 (C-1), 149.4 (C-2), 96.3 (C-3), 148.8 (C-4), 156.8 (C-5), 97.7 (C-6), 159.3 (C-7), 109.8 (C-8), 26.8 (C-9), 23.3 (C-10), 118.5 (C-4a), 118.1 (C-4b), 130.6 (C-8a), 113.6 (C-10a), 57.6 (2-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献 [15] 报道基本一致, 故鉴定该化合物为石仙桃菲。

化合物 7: 棕色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 243.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.15 (1H, t,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 7.00 (1H, s, H-6), 6.99 (1H, s, H-4'), 6.95 (1H, t,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.68 (1H, dd,  $J=8.0, 2.4$  Hz, H-7, 7'), 6.59 (1H, s, H-2), 6.58 (1H, s, H-6), 6.28 (1H, t,  $J=2.3$  Hz, H-4), 3.78 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 140.1 (C-1), 107.0 (C-2), 159.8 (C-3), 101.9 (C-4), 162.6 (C-5), 104.7 (C-6), 129.7 (C-7), 140.8 (C-1'), 113.9 (C-2'), 158.8 (C-3'), 115.8 (C-4'), 130.6 (C-5'), 119.3 (C-6'), 129.9 (C-7'), 55.7 (5-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献 [16] 报道基本一致, 故鉴定该化合物为 3, 3'-二羟基-5-甲氧基二苯乙烯。

化合物 8: 红棕色油状物, ESI-MS  $m/z$ : 303.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.24 (1H, d,  $J=5.1$  Hz, H-7'), 7.22 (1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-6'), 6.90 (1H, d,  $J=16.4$  Hz, H-7), 6.63 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H-5'), 6.57 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-2), 6.54 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-6), 6.26 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-4), 3.86 (3H, s, 2', 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 141.5 (C-1), 106.5 (C-2), 159.7 (C-3), 101.4 (C-4), 162.5 (C-5), 104.7 (C-6), 128.3 (C-7), 124.1 (C-1'), 153.0 (C-2'), 142.2 (C-3'), 152.1 (C-4'), 113.2 (C-5'), 122.2 (C-6'), 124.1 (C-7'), 55.6 (5-OCH<sub>3</sub>), 61.6 (2'-OCH<sub>3</sub>), 61.1 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献 [17] 报道基本一致, 故鉴定该化合物为 3, 4'-二羟基-2', 3', 5-三甲氧基二苯乙烯。

化合物 9: 红棕色油状物, ESI-MS  $m/z$ : 227.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.48 (2H, d,  $J=6.5$  Hz, H-2', 6'), 7.30 (2H, t,  $J=7.0$  Hz, H-3', 5'), 7.22~7.19 (3H, m, H-4', 7, 7'), 7.03 (1H, q,  $J=16.3$  Hz, H-2), 6.31 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-4), 3.75 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 140.8 (C-1), 104.8 (C-2), 159.7 (C-3), 101.9 (C-4), 162.5 (C-5), 107.0 (C-6), 129.6 (C-7), 138.6 (C-1'), 127.5 (C-2'), 129.8 (C-3'), 128.6 (C-4'), 129.8 (C-5'), 127.5 (C-6'), 129.6 (C-7'), 55.6 (5-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与

文献 [18] 报道基本一致, 故鉴定该化合物为 3-羟基-5-甲氧基二苯乙烯。

化合物 **10**: 棕色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 301.1  $[M+H]^+$ .  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 9.00 (1H, s, H-5), 7.41 (1H, d,  $J=8.7$  Hz, H-9), 7.35 (1H, d,  $J=8.7$  Hz, H-10), 7.17 (1H, s, H-8), 7.05 (1H, s, H-1), 4.04 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 4.01 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.98 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 110.0 (C-1), 152.5 (C-2), 143.0 (C-3), 150.2 (C-4), 108.5 (C-5), 149.2 (C-6), 146.5 (C-7), 112.9 (C-8), 126.8 (C-9), 125.5 (C-10), 119.1 (C-4a), 125.1 (C-4b), 128.8 (C-8a), 131.1 (C-10a), 60.7 (2-OCH<sub>3</sub>), 61.5 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.2 (6-OCH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献 [19] 报道基本一致, 故鉴定该化合物为 4, 7-二羟基-2, 3, 6-三甲氧基菲。

#### 4 黑色素抑制活性研究

4.1 化合物对 B16F10 黑色素瘤细胞的毒性 采用 CCK-8 法<sup>[20]</sup> 检测化合物对细胞的毒性。将 B16F10 细胞接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 24 h, 分别加入含有样品溶液 (50  $\mu$ mol/L) 的培养基各 100  $\mu$ L, 孵育 24 h, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 培养箱内避光孵育 1.5 h, 用酶标仪于 450 nm 波长处测定光密度 (OD)。设置无药物处理的对照组、无细胞的空白组, 每组设置 3 个平行实验, 计算细胞活力, 公式为细胞活力 =  $[(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。结果显示, 在该测试浓度下, 除化合物 **1** 外, B16F10 细胞活力与对照组相当, 说明化合物 **2~10** 对 B16F10 细胞无显著细胞毒性。

4.2 化合物对 B16F10 黑色素瘤细胞中黑色素含量的影响 采用 NaOH 裂解法<sup>[20]</sup> 测定 B16F10 黑色素瘤细胞内的黑色素含量。将 B16F10 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h, 弃培养基, 将细胞分为空白组、模型组 (100 nmol/L  $\alpha$ -MSH)、阳性药组 (100 nmol/L  $\alpha$ -MSH+500  $\mu$ g/mL 熊果苷)、给药组 (100 nmol/L  $\alpha$ -MSH+50  $\mu$ mol/L 化合物), 各组给予相应剂量药物, 继续孵育 72 h。细胞用 PBS 溶液洗 2 次, 胰酶消化, 900 r/min 离心 4 min 后弃上清加入 400  $\mu$ L 含 10% 二甲基亚砜的 1 mol/L NaOH 溶液, 裂解细胞, 80 °C 孵育 1 h, 再接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 在 405 nm 波长处测定 OD 值, 以空白组

为对照, 比较各组细胞内黑色素相对含量。每组设置 3 个平行实验, 黑色素相对含量计算公式为黑色素相对含量 =  $OD_{\text{给药组}} / OD_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。由表 2 可知, 化合物 **2~3** 的黑色素抑制活性优于阳性对照药熊果苷, **5、7~10** 的抑制活性与熊果苷相当, 而 **4** 和 **6** 的抑制活性相对较弱。

表 2 化合物 **2~10** 对 B16F10 细胞内黑色素含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 2 Effects of compounds **2-10** on intracellular melanin content in B16F10 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	黑色素含量/%	组别	黑色素含量/%
对照组	101.3 $\pm$ 1.46	<b>5</b>	93.59 $\pm$ 3.83**
模型组	150.00 $\pm$ 7.55 <sup>#</sup>	<b>6</b>	134.00 $\pm$ 3.16**
阳性药组	95.63 $\pm$ 3.15	<b>7</b>	88.86 $\pm$ 6.17**
<b>2</b>	76.70 $\pm$ 6.84**	<b>8</b>	93.80 $\pm$ 9.22**
<b>3</b>	66.82 $\pm$ 0.93**	<b>9</b>	96.27 $\pm$ 6.60**
<b>4</b>	103.10 $\pm$ 8.35**	<b>10</b>	88.25 $\pm$ 4.58**

注: 与对照组比较, <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

#### 5 讨论

本研究从石仙桃假鳞茎的乙酸乙酯部位中成功分离并鉴定得到 10 个化合物, 主要的结构类型为芪类成分, 其中化合物 **1** 为新的烯酸类成分, 化合物 **4~5** 为首次从石仙桃属植物中分离得到, 并通过体外细胞实验探究分离所得化合物的对 B16F10 细胞黑色素生成的抑制作用。结果显示, 化合物 **2~10** 均表现出不同程度的抑制作用, 其中化合物 **2、3、7、8、10** 的抑制活性均优于阳性对照药。

本研究结果显示, 联苈类 (**2~3**) 化合物表现出较显著的黑色素抑制活性。相比之下, 二苯乙烯类 (**7~9**) 和菲类 (**5、10**) 化合物虽然也具有一定抑制活性, 但除化合物 **2~3** 外, 抑制活性均弱于阳性药, 提示联苈结构在芪类化合物中具有显著的黑色素抑制作用。对比化合物 **2~3**, 将 3, 3'-位的甲氧基换为羟基后, 黑色素抑制活性显著增强, 说明酚羟基可能在抑制活性中发挥一定作用; 化合物 **8** 的活性优于 **9**, 提示在苯环的多个位置引入羟基可能有利于活性的提升, 这也与文献 [21-22] 中报道的活性官能团 (酚羟基) 的特征一致。

综上所述, 本研究从石仙桃中分离鉴定得到结构多样的天然产物, 并初步揭示了其抑制黑色素生成的构效关系, 游离酚羟基的存在、联苈类结构以及 3, 3'-位的二取代模式都可能是产生抑制活性的关键结构特征。基于以上发现, 化合物 **2~3** 作为高效、低毒的先导分子, 值得进行进一步的深入研究。

参考文献:

- [ 1 ] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 748-750.
- [ 2 ] 余传隆, 黄泰康, 丁志遵, 等. 中药辞海(第一卷)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 1431.
- [ 3 ] 吴秀彩, 梁爽, 栗正英. 石仙桃属植物化学成分和药理活性的研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(4): 60-62.
- [ 4 ] 胡军, 郭洁, 晏和贵, 等. 石仙桃属植物萜类化学成分研究进展[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(4): 422-428.
- [ 5 ] 袁佳, 张苑雯, 遆慧慧, 等. 石仙桃化学成分及其抗菌抗炎活性研究[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(4): 1-7.
- [ 6 ] Qi J X, Jia Y W, Zhou D, et al. Axially chiral dihydrophenanthrene dimers from *Pholidota yunnanensis* with anti-neuroinflammatory activities[J]. *Bioorg Chem*, 2024, 150: 107570.
- [ 7 ] Ti H H, Zhuang Z X, Li Y, et al. Three new phenanthrenes from *Pholidota chinensis* Lindl. and their antibacterial activity[J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(8): 2056-2062.
- [ 8 ] Ma R J, Yang L, Bai X, et al. Phenolic constituents with antioxidative, tyrosinase inhibitory and anti-aging activities from *Dendrobium loddigesii* Rolfe[J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2019, 9(5): 329-336.
- [ 9 ] Axiotis E, Angelis A, Antoniadis L, et al. Phytochemical analysis and dermo-cosmetic evaluation of *Cymbidium* sp. (*Orchidaceae*) cultivation by-products [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 11(1): 101.
- [ 10 ] 李紫微, 梁钰, 陈晓曼, 等. 二苯乙烯化合物的提取工艺优化及其酪氨酸酶抑制活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 238-247.
- [ 11 ] Hernández-Romero Y, Rojas J I, Castillo R, et al. Spasmodic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*[J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 160-167.
- [ 12 ] 李媛, 李玉鹏, 郑金蓉, 等. 云南独蒜兰菲和联苄类化学成分的研究(英文)[J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(2): 29-32.
- [ 13 ] Sachdev K, Kulshreshtha D K. Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis*[J]. *Phytochemistry*, 1986, 25(2): 499-502.
- [ 14 ] Bhaskar M U, Rao L J M, Rao N S P, et al. Ochrolide, a phenanthropyrone from *Coelogyne ochracea*[J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(12): 3545-3546.
- [ 15 ] 毕志明, 周小琴, 王峥涛, 等. 云南石仙桃中一个新的萜类化合物[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(8): 576-578.
- [ 16 ] 胡军, 赵会然, 顾玲丽, 等. 岩笋的化学成分研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2017, 39(6): 1059-1064.
- [ 17 ] Guo X Y, Wang J, Wang N L, et al. New stilbenoids from *Pholidota yunnanensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2006, 54(1): 21-25.
- [ 18 ] 闵建华, 尚强, 刘和平, 等. 云南松化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(18): 3693-3698.
- [ 19 ] Lu D, Liu J P, Li H J, et al. Phenanthrene derivatives from the stems and leaves of *Dioscorea nipponica* Makino[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(1): 1-6.
- [ 20 ] 闫昱辛, 何美军, 李宇, 等. 铁皮石斛叶多糖美白和抗氧化活性[J]. 植物研究, 2025, 45(1): 111-118.
- [ 21 ] 何敏, 凡美艳, 杨维, 等. 曲酸类酪氨酸酶抑制剂研究进展[J]. 化学试剂, 2022, 44(7): 1001-1011.
- [ 22 ] Ismail T, Shafi S, Srinivas J, et al. Synthesis and tyrosinase inhibition activity of trans-stilbene derivatives[J]. *Bioorg Chem*, 2016, 64: 97-102.