

谷精草中1个新的黄酮苷类化合物

张 勇^{1,2,3}, 阿吉艾克拜尔·艾萨^{1,3}, 朱维良^{1,2,3*}

(1. 中国科学院新疆理化技术研究所, 省部共建新疆特有药用资源利用国家重点实验室培育基地, 中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院上海药物研究所, 新药研究国家重点实验室, 中国科学院受体结构与功能重点实验室, 上海 201203; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 采用大孔吸附树脂、反相硅胶、葡聚糖凝胶及微孔树脂等多种色谱技术, 从谷精草水提取中分离得到10个化合物。通过NMR、ESI-MS、HR-ESI-MS、UV、IR等波谱技术并结合化学方法对其进行了结构鉴定, 分别为6-methoxyquercetin-3-*O*-(2''-vanilloyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**1**)、丁香脂素-4'-*O*- β -D-葡萄糖苷(**2**)、芦丁(**3**)、1-*O*-feruloylglycerol (**4**)、邻苯二酚(**5**)、吐叶醇(**6**)、 β -D-(6-*O*-*trans*-feruloyl) fructofuranosyl- α -D-*O*-glucopyranosid (**7**)、二氢阿魏酸(**8**)、鸟嘌呤核苷(**9**)和槲皮素-3-*O*- β -D-龙胆二糖苷(**10**)。化合物**1**为新化合物, 化合物**2**、**4**~**10**为首次从谷精草属植物中分离得到, 化合物**3**为首次从该植物中分离得到。分子对接结果显示化合物**1**具有潜在的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 转换酶抑制活性。体外抗炎活性实验证实, 化合物**1**在1、10和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能显著抑制脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞中TNF- α 的升高, 具有较好的体外抗炎活性。

关键词: 谷精草属; 谷精草; 黄酮苷; 化学成分; 抗炎

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)07-2139-07

A new flavone glycoside from *Eriocaulon buergerianum*ZHANG Yong^{1,2,3}, HAJI Akber Aisa^{1,3}, ZHU Wei-liang^{1,2,3*}

(1. State Key Laboratory Basis of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization, CAS Laboratory of Chemistry of Plant Resources in Arid Regions, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 2. CAS Key Laboratory of Receptor Research, State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Ten compounds were isolated from the water extract of *Eriocaulon buergerianum* by HP20, ODS, Sephadex LH-20 and MCI Gel CHP-20 column chromatographic methods. Their structures were identified by spectroscopic and chemical approaches as 6-methoxyquercetin-3-*O*-(2''-vanilloyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**1**), syringaresinol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**), rutin (**3**), 1-*O*-feruloylglycerol (**4**), 1,2-benzenediol (**5**), vomifoliol (**6**), β -D-(6-*O*-*trans*-feruloyl) fructofuranosyl- α -D-*O*-glucopyranosid (**7**), dihydroferulic acid (**8**), guanosine (**9**) and quercetin-3-*O*- β -gentiobioside (**10**). The compound **1** is a new compound, the compounds **2** and **4**–**10** were obtained from *Eriocaulon* genus for the first time, and the compound **3** was isolated from this plant for the first time. Molecular docking study showed that **1** is a potential inhibitor of TNF- α . The compound **1** was evaluated for their anti-inflammatory activities *in vitro*, and **1** showed significant inhibitory activity against TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophage cells at the concentrations of 1, 10 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

收稿日期: 2022-01-28; 修回日期: 2022-03-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603270).

*通讯作者 Tel: 86-21-50806600-1205, E-mail: wlzhu@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0133

Key words: *Eriocaulon* Linn.; *Eriocaulon buergerianum* Koern.; flavone glycoside; chemical constituent; anti-inflammatory

谷精草 *Eriocaulon buergerianum* Koern. 为谷精草科谷精草属一年或多年生草本植物, 该属植物全球约有 400 种, 我国约 34 种, 主产南部和西南地区。其中, 谷精草 (*E. buergerianum* Koern.)、华南谷精草 (*E. sexangulare* Linn.) 和毛谷精草 (*E. austral* R. Br.) 可供药用, 具有清热祛风、清肝明目功效^[1]。谷精草首载于《本草拾遗》(唐), 距今已有近 1 300 年的历史, 此后在《开宝本草》(宋)、《本草纲目》(明) 和《植物名实图考》(清) 中均有详细记载, 是治疗眼疾的常用中药^[2]。《中国药典》记载, 仅谷精草 *E. buergerianum* 的干燥带花茎的头状花序可作为中药谷精草入药; 辛、甘, 性平, 归肝、肺经; 具有疏散风热, 明目退翳功效, 主治风热目赤、肿痛羞明、眼生翳膜、风热头痛^[3]。现代研究表明, 谷精草主要含有黄酮、萜并吡喃酮和咕吨酮类化合物, 以及少量的酚类化合物^[4-9]。谷精草提取物及单体化合物报道具有抗菌^[4]、减肥^[6]、降糖^[9]、抗氧化^[10]和神经保护^[11]等生物活性。总体上, 国内外有关谷精草化学成分的研究较少, 现已报道的单体化合物主要来源于乙醇提取物, 为进一步明确谷精草的药效物质基础, 丰富其化合物组成, 本文对谷精草水提物中化学成分进行了系统研究, 从中分离得到 10 个化合物, 并通过多种波谱技术成功地对其结构进行了鉴定, 分别是 6-methoxyquercetin-3-*O*-(2'''-vanilloyl)- β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside (**1**)、丁香脂素-4'-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (**2**)、芦丁 (**3**)、1-*O*-feruloylglycerol (**4**)、邻苯二酚 (**5**)、吐叶醇 (**6**)、 β -*D*-(6-*O*-*trans*-feruloyl) fructofuranosyl- α -*D*-*O*-glucopyranosid (**7**)、二氢阿魏酸 (**8**)、鸟嘌呤核苷 (**9**) 和槲皮素-3-*O*- β -*D*-胆甾二糖苷 (**10**)。化合物 **1** 为新化合物 (图 1), 化合物 **2**、**4**~**10** 为首次从谷精草属植物中分离得到, 化合物 **3** 为首次从该植物中分离得到。同时, 采用自主开发的多靶标分子对接平台, 预测到化合物 **1** 具有抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 转换酶活性, 并通过细胞实验证实化合物 **1** 在 1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 的升高, 具有较好的体外抗炎活性。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色无定形粉末, 易溶于甲醇, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 59.6 (c 0.5, MeOH); IR 显示结构中含有羟基 ($3\ 362\ \text{cm}^{-1}$)、苯环 ($1\ 558\ \text{cm}^{-1}$); UV (MeOH) λ_{max} : 255、290、345 nm;

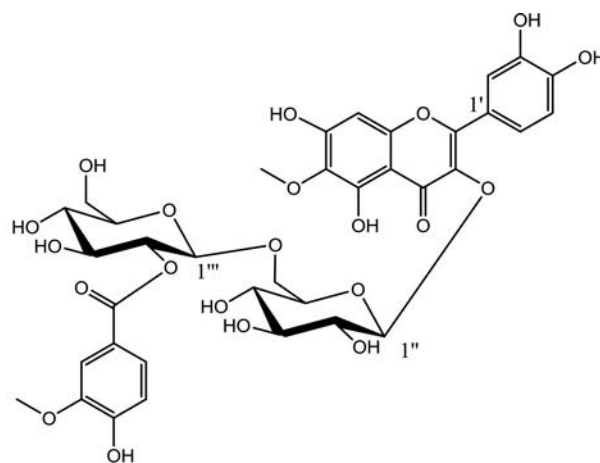


Figure 1 Structure of new compound **1**

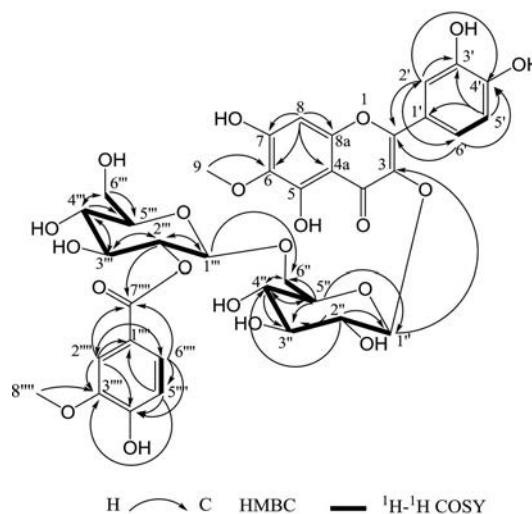
HR-ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 807.198 3 (计算值 807.197 8), 推断其分子式为 $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_{21}$, 不饱和度 $\Omega = 18$ 。

化合物 **1** 的 ^1H NMR 数据显示, 低场区存在 7 个芳香氢质子信号: δ_{H} 7.83 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2')、7.76 (1H, dd, $J = 8.5, 1.9$ Hz, H-6')、7.46 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-2''')、7.22 (1H, dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, H-6''')、6.91 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5')、6.67 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''')、6.53 (1H, s, H-8), 根据化学位移及耦合常数判断结构中含有 2 个 ABX 耦合系统的苯环; 2 个糖的端基氢质子信号 δ_{H} 5.18 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'') 和 4.49 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1'''), 其耦合常数提示 2 个单糖的端基碳构型均为 β -构型; 2 个六碳糖 6 位亚甲基信号 δ_{H} 3.88 (1H, overlapped)、3.73 (1H, dd, $J = 12.9, 6.9$ Hz)、3.68 (1H, dd, $J = 12.1, 1.9$ Hz)、3.63 (1H, dd, $J = 12.1, 4.5$ Hz), 该信号结合 2 个糖的端基氢质子信号提示六碳糖单糖可能为葡萄糖; 2 个甲氧基信号 δ_{H} 3.86 (3H, s) 和 3.85 (3H, s)。化合物 **1** 的 ^{13}C NMR、DEPT-135 谱结合 HSQC 显示含有 36 个碳原子, 包括 2 个甲基碳信号 δ_{C} 56.4 和 61.1; 2 个亚甲基碳信号 δ_{C} 62.0 和 68.3; 7 个芳香环上次甲基信号 δ_{C} 124.6、123.6、117.5、116.4、115.9、113.8、95.5; 10 个糖上次甲基信号 δ_{C} 104.2、101.7、79.7、77.8、77.2、76.0、75.9、75.5、71.3、71.2; 2 个羰基信号 δ_{C} 179.4 和 167.5; 13 个芳香季碳信号 δ_{C} 159.7、158.5、153.7、153.5、152.8、150.3、148.7、146.1、135.2、133.0、122.8、122.4、105.8。上述 ^1H 、 ^{13}C NMR 数据提示化合物 **1** 可能为含有两个六碳糖基的黄酮苷类化合物, 该结构中同时存在一个 ABX 耦合系统的苯环取代基, 具体数据见表 1。在

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR spectral data of compound **1** (CD3OD) (^1H NMR 500 MHz; ^{13}C NMR 125 MHz)

No.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		
2		158.5
3		135.2
4		179.4
4a		105.8
5		153.7
6		133.0
7		159.7
8	6.53 (1H, s)	95.5
8a		153.5
9	3.86 (3H, s)	61.1
1'		122.8
2'	7.83 (1H, d, 1.9)	117.5
3'		146.1
4'		150.3
5'	6.91 (1H, d, 8.5)	116.4
6'	7.76 (1H, dd, 8.5, 1.9)	123.6
Glc		
1''	5.18 (1H, d, 7.8)	104.2
2''	3.47 (1H, t-like, 8.7)	75.5
3''	3.34 (1H, m)	77.8
4''	3.15 (1H, t-like, 9.1)	71.3
5''	3.22 (1H, m)	79.7
6''	3.88 (1H, overlapped, 6''-Ha) 3.73 (1H, dd, 12.9, 6.9, 6''-Hb)	68.3
Glc		
1'''	4.49 (1H, d, 8.1)	101.7
2'''	4.68 (1H, t-like, 8.1)	76.0
3'''	3.22 (1H, m)	75.9
4'''	3.36 (1H, m)	71.2
5'''	2.71 (1H, m)	77.2
6'''	3.68 (1H, dd, 12.1, 1.9, 6'''-Ha) 3.63 (1H, dd, 12.1, 4.5, 6'''-Hb)	62.0
Vanilloyl		
1''''		122.4
2''''	7.46 (1H, d, 1.4)	113.8
3''''		148.7
4''''		152.8
5''''	6.67 (1H, d, 8.2)	115.9
6''''	7.22 (1H, d, 8.2, 1.4)	124.6
7''''		167.5
8''''	3.85 (3H, s)	56.4

HMBC谱(图2)中, δ_{H} 5.18 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'')与 δ_{C} 135.2 (C-3) 相关, δ_{H} 4.49 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1''')与 δ_{C} 68.3 相关, 提示结构中1个六碳糖通过1''位与黄酮苷元的3位形成 β -糖苷键, 两个六碳糖则通过1'''位与6''位连接形成二糖结构; δ_{H} 3.86 (3H, s, 9-OCH₃)与 δ_{C} 133.0 (C-6) 相关, δ_{H} 3.85 (3H, s, 8''''-OCH₃)与 δ_{C} 148.7 (C-3''') 相关, 提示两个甲氧基分别连接在黄酮苷元的6位和香草酰基(vanilloyl)的3''''位; δ_{H} 4.68 (1H, t-like, $J = 8.1$ Hz, 2'''-H)与 δ_{C} 167.5 (C-7''') 相关, 提示香草酰基通过C-7''''与2'''-H连接。两个六碳糖除端基氢质子以外的氢质子信号, 可由 ^1H - ^1H COSY

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

(图2)和HMBC进行确认。通过进一步的分析2D-NMR (^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC)结果, 同时结合1D-NMR数据, 化合物**1**的平面结构与文献报道的化合物6-methoxyquercetin-7-O-(6'''-vanilloyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside^[12]类似, 主要差异体现在**1**的二糖结构与黄酮苷元的C-3位相连, 已报道化合物的二糖结构与黄酮苷元的C-7位相连; **1**的C-6'''信号向高场移动, H-2'''信号则往低场移动, 上述结果提示**1**与已报道化合物相比, 香草酰基取代位置发生了变化; HMBC结果进一步证实**1**中香草酰基为C-2'''位取代, 以及二糖结构与黄酮苷元的C-3位相连。通过以上波谱数据, 确定**1**为6-methoxyquercetin-3-O-(2'''-vanilloyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside。

化合物**1**糖的类型以及绝对构型通过酸水解的化学方法做了进一步确认。**1**经酸水解、中和后的水液部分, 经薄层色谱分析(TLC)与D-葡萄糖标准品比较, 确定含有葡萄糖。为进一步确认水解液中葡萄糖绝对构型, 将获得的中和后水解液采用ODS填料进行纯化, TLC进行目标化合物检识, 富集葡萄糖纯品, 减压浓缩后冷冻干燥, 干燥样品测定旋光值, 与D-葡萄糖标准品旋光值比较, 确定化合物**1**中糖的绝对构型为D-葡萄糖。综上, 化合物**1**的结构进一步确定为6-methoxyquercetin-3-O-(2'''-vanilloyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, 为新化合物。

2 化合物**1**与TNF- α 的分子对接结果

采用自主开发的多靶标分子对接平台, 以TNF- α 的晶体结构(PDB ID: 2az5)为基础开展分子对接, 预测化合物**1**与TNF- α 转换酶的结合能力。结果显示, 化合物**1**与TNF- α 转换酶的结合能为-10.33 kcal \cdot mol⁻¹,

而 TNF- α 结构中 ATP 结合位点配体 6,7-dimethyl-3-[(methyl{2-[methyl(1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1*H*-indol-3-yl)methyl]amino}ethyl)amino)methyl]-4*H*-chromen-4-one ($K_d = 5.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 打分结果为 $-9.44 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。化合物 **1** 与 TNF- α 的结合模式图显示, 化合物 **1** 与 59 位的酪氨酸形成了 face-to-face 的 π - π 相互作用, 与 151 位的酪氨酸、120 位的亮氨酸形成氢键作用, 化合物 **1** 可能具有抑制 TNF- α 的活性 (图 3)。

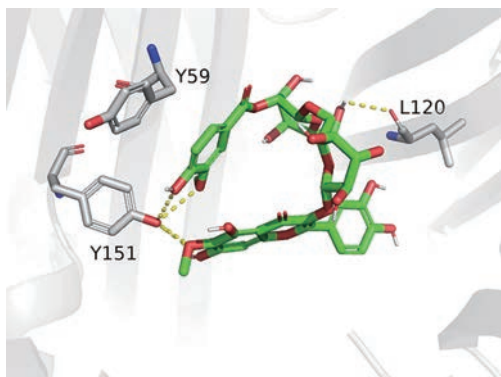


Figure 3 The docking mode of compound **1** against TNF- α (Uniprot ID: P01375, PDB ID: 2az5). TNF- α is shown in gray cartoon, essential residues in gray sticks, compound **1** in green sticks. The polar interactions between compound **1** and TNF- α are shown in yellow dashes. Compound **1** forms a face-to-face π - π interaction with Y59 and forms hydrogen bonds with Y151 and L120

3 化合物**1**的抗炎活性检测

采用 ELISA 试剂盒检测了化合物 **1** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 的释放, 结果显示化合物 **1** 在 1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 的升高, 且呈浓度依赖关系, 证实化合物 **1** 具有较强的体外抗炎活性 (图 4)。

4 小结

本实验从谷精草水提物中分离并鉴定了 10 个化

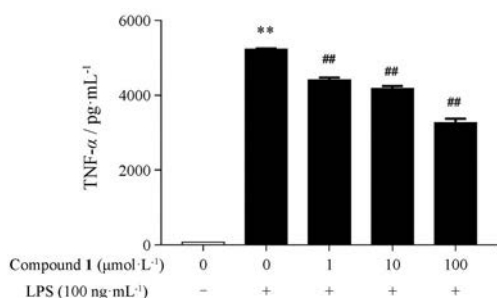


Figure 4 Effect of compound **1** on the overproduction of TNF- α in LPS-induced RAW264.7 cells at the concentrations of 1, 10 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. ** $P < 0.01$ vs untreated group; ## $P < 0.01$ vs LPS treatment group. LPS: Lipopolysaccharide

合物, 包括 3 个黄酮苷类化合物 (**1**、**3**、**10**)、1 个木脂素糖苷类化合物 (**2**)、3 个阿魏酸衍生物 (**4**、**7**、**8**) 和 3 个其他类化合物 (**5**、**6**、**9**)。其中, 化合物 **1** 为新化合物, **2**、**4**~**10** 为首次从谷精草属植物中分离得到, **3** 为首次从 *Eriocaulon buergerianum* Koern. 植物中分离得到。这些化合物进一步丰富了谷精草属植物的化合物类型, 可为后续进一步开展该植物的药效物质研究提供有益参考。

此外, 采用自主开发的多靶标分子对接平台, 预测到化合物 **1** 具有抑制 TNF- α 转换酶活性, 并在细胞层面证实化合物 **1** 可呈浓度依赖性的抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 的释放, 具有较强的体外抗炎活性。

实验部分

质谱仪 (Agilent G6520 Q-TOF LC-MS, 美国 Agilent 公司); 旋光仪 (Autopol VI, 美国 Rudolph 公司); 红外光谱仪 (IRAffinity-1S Fourier transform infrared spectrophotometer, 日本 SHIMADZU 公司); 核磁共振仪 (Bruker Avance III 500, 瑞士 Bruker 公司, 以 TMS 为内标)。Synergy2 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); 5804R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); FORMA STERI-CYCLE i160 细胞培养箱 (赛默飞公司)。TLC 板 (硅胶 GF 254 预制薄层色谱板, 烟台化学工业研究所); 大孔树脂 (DIAION HP20)、微孔树脂 (MCI GEL CHP20P) (日本三菱化学株式会社); 反相硅胶 (ODS-A-HG 12 nm S-50 μm \ODS-AQ-HG 12 nm S-50 μm , 日本 YMC 公司); 葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司); 显色剂 (硫酸-香兰素显色剂)、*D*-葡萄糖标准品 (纯度 $\geq 98\%$)、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、盐酸、氢氧化钠等试剂 (国药集团化学试剂有限公司)。RAW264.7 细胞购自南京科佰生物科技有限公司, FBS 购自 Gibco 公司, DMEM 购自 HyClone 公司, 青霉素-链霉素溶液 (双抗) 购自 Gibco 公司, ELISA 小鼠 TNF- α 试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司 (批号 M210825-102a)。

谷精草药材 2019 年购于安徽省亳州药材市场, 经上海中医药大学石燕红副研究员鉴定为谷精草科谷精草属植物谷精草 *Eriocaulon buergerianum* Koern. 的干燥带花茎的头状花序。样品 (No. GJC-20190614) 保存于中国科学院上海药物研究所药物发现与设计中心实验室。

1 提取与分离

干燥的谷精草中药材 (带花茎的头状花序) 8 kg, 加入蒸馏水 80 L, 浸泡 30 min 后, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热回流提取, 每次回流提取 1 h, 提取结束后过滤收集滤液, 药渣重复上述工艺再提取一次, 合并两次滤液, 减压浓缩得

到10 L水提浓缩液。水提浓缩液依次采用乙酸乙酯、正丁醇做溶剂进行萃取处理, 分别收集萃取液减压浓缩后得到乙酸乙酯、正丁醇层以及萃取后水层3个部位。正丁醇萃取部位(153 g)采用HP 20型大孔吸附树脂柱色谱进行纯化, 乙醇-水作为流动相梯度洗脱, 依次得到水部位、20%乙醇部位、40%乙醇部位、60%乙醇部位、95%乙醇部位。

20%乙醇部位(36.2 g)采用ODS填料, 甲醇-水(0:100、10:90、20:80、40:60、100:0)梯度洗脱得到Fr.1~Fr.10。Fr.1(1.7 g)采用Sephadex LH20纯化, 甲醇-水等度(30:70)洗脱得到Fr.1.1~Fr.1.4。Fr.1.1(274 mg), 采用MCI填料, 甲醇-水(0:100、10:90、20:80)梯度洗脱, 得到化合物**9**(21.2 mg)。Fr.4(476.1 mg)采用ODS填料, 甲醇-水(10:90、20:80、30:70、50:50)梯度洗脱得到Fr.4.1~Fr.4.6。Fr.4.2(52.6 mg)采用Sephadex LH20纯化, 甲醇-水等度(30:70)洗脱, 得到化合物**10**(23.1 mg)。

40%乙醇部位(2.4 g)采用ODS填料, 甲醇-水(20:80、40:60、60:40、100:0)梯度洗脱得到Fr.1~Fr.3。其中Fr.1(78.1 mg)经Sephadex LH20纯化, 甲醇-水(40%)等度洗脱, 得到化合物**5**(16.8 mg)。Fr.2(964.2 mg)经Sephadex LH20色谱, 甲醇-水(60:40)等度洗脱得到Fr.2.1~Fr.2.3。Fr.2.2(346.1 mg)经ODS甲醇-水(30:70、40:60、50:50)梯度洗脱得到Fr.2.2.1和Fr.2.2.2。Fr.2.2.2(118.6 mg)经Sephadex LH20、ODS色谱, 甲醇-水反复纯化, 得到化合物**1**(4.6 mg)。Fr.2.2.1(29.1 mg)经ODS色谱, 甲醇-水(10:90、20:80、30:70)梯度洗脱, 得到化合物**2**(2.4 mg)。Fr.2.1(268.3 mg)经Sephadex LH20纯化, 甲醇-水(40%)等度洗脱, 得到化合物**3**(30.5 mg)。Fr.2.3(128.7 mg)经Sephadex LH20、ODS反复纯化, 得到化合物**4**(3.6 mg)。Fr.3(188.7 mg)经Sephadex LH20纯化, 甲醇-水(50%)等度洗脱得到Fr.2.3.1~Fr.2.3.3。Fr.2.3.1(38.7 mg)经ODS色谱, 甲醇-水梯度洗脱(30:70、40:60、60:40), 得到化合物**6**(8.8 mg)。Fr.2.3.2(71.4 mg)经ODS、Sephadex LH20色谱, 甲醇-水反复纯化, 得到化合物**7**(8.8 mg)。Fr.2.3.3(58.9 mg)经ODS色谱, 甲醇-水梯度洗脱(40:60、50:50、70:30), 得到化合物**8**(7.2 mg)。

2 化合物的酸水解

称取2 mg化合物**1**, 加入5%盐酸5 mL, 100 °C水浴加热1 h, 加热结束放冷至室温后用5% NaOH调pH至7后, 采用乙酸乙酯萃取3次, 每次5 mL。萃取后水层减压浓缩得水溶性样品, 取样品适量, 水溶解后采用TLC(正丁醇:吡啶:水=6:4:3)检识, 与D-葡萄糖标准品比对, 两者 R_f 值(0.5)基本一致。随后, 取萃取后的水溶

性样品, 采用ODS填料(ODS-AQ-HG 12 nm S-50 μm)进行纯化, 水洗脱, TLC检测并富集含葡萄糖的样品, 减压浓缩后冷冻干燥得葡萄糖干燥样品, 随后称取样品测定旋光值($[\alpha]_D^{20} +62.0$, c 0.5, H_2O), 经与D-葡萄糖标准品($[\alpha]_D^{20} +74.4$, c 0.5, H_2O)和L-葡萄糖标准品($[\alpha]_D^{20} -88.0$, c 0.5, H_2O)旋光值比较, 最终确定化合物**1**中单糖为D-葡萄糖。

3 结构鉴定

化合物**1** 黄色无定形粉末, 易溶于甲醇; HR-ESI-MS m/z : 807.198 3 (计算值807.197 8), 分子式为 $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_{21}$, 不饱和度18; UV (MeOH) λ_{max} : 255、290、345 nm; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3 362、1 717、1 699、1 684、1 653、1 600、1 558、1 506、1 472、1 456、1 364、1 283、1 200、1 074、1 028、1 001; ^1H (500 MHz, CD_3OD) 和 ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) 数据见表1。

化合物**2** 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 579.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 6.72 (2H, s, H-2',6'), 6.66 (2H, s, H-2,6), 4.86 (1H, overlapped, glc-1''), 4.77 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-7), 4.73 (1H, d, $J=4.3$ Hz, H-7'), 4.29 (2H, m, 9,9'-H(a)), 3.91 (2H, m, 9,9'-H(b)), 3.86 (6H, m, 3,5-OCH₃), 3.85 (6H, m, 3',5'-OCH₃), 3.77 (1H, dd, $J=2.3, 12.0$ Hz, glc-H-6''a), 3.66 (1H, dd, $J=5.2, 12.0$ Hz, glc-H-6''b), 3.47 (1H, m, glc-2''), 3.42 (2H, m, glc-4'',5''), 3.20 (1H, m, glc-3''), 3.14 (2H, m, H-8,8'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 154.4 (C-3',5'), 149.4 (C-3,5), 139.5 (C-1'), 136.3 (C-4), 135.6 (C-4'), 133.1 (C-1), 105.3 (C-1''), 104.9 (C-2,6), 104.6 (C-2',6'), 87.6 (C-7'), 87.2 (C-7), 78.3 (C-3''), 77.8 (C-5''), 75.7 (C-2''), 72.9 (C-9,9'), 71.4 (C-4''), 62.6 (C-6''), 57.1 (C-3',5'), 56.8 (C-3,5), 55.7 (C-8), 55.5 (C-8')。以上数据与文献^[13]报道的丁香脂素-4'-O- β -D-葡萄糖苷基本一致。

化合物**3** 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 609.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.67 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.63 (1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6), 5.11 (1H, d, $J=7.7$ Hz, glc-1''), 4.52 (1H, s, rha-1'''), 3.25~3.90 (glc-2'',3'',4'',5'',6''; rha-2'',3'',4'',5''), 1.13 (3H, d, $J=6.2$ Hz, rha-6'''); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 179.4 (C-4), 166.0 (C-7), 163.0 (C-5), 159.3 (C-9), 158.5 (C-2), 149.8 (C-4'), 145.8 (C-3'), 135.6 (C-3), 123.6 (C-1'), 123.1 (C-6'), 117.7 (C-5'), 116.0 (C-2'), 105.6 (C-10), 104.7 (glc-1''), 102.4 (rha-1'''), 99.9 (C-6), 94.9 (C-8), 78.2 (C-3''), 77.2 (C-5''), 75.7 (C-2''), 73.9 (C-4'''), 72.2 (C-3'''), 72.1 (C-2'''), 71.4 (C-4''), 69.7 (C-5'''), 68.6 (C-6''), 17.9 (C-

6'')。以上数据与文献^[14]报道的芦丁基本一致。

化合物**4** 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 267.3 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 7.66 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.20 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.09 (1H, dd, $J = 1.8, 8.2$ Hz, H-6), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.40 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 4.27 (1H, dd, $J = 5.3, 11.4$ Hz, glycerol H-1'(a)), 4.18 (1H, dd, $J = 5.3, 11.4$ Hz, glycerol H-1'(b)), 3.90 (3H, s, -OCH₃), 3.89 (1H, m, glycerol H-2'), 3.61 (2H, dd, $J = 5.5, 5.5$ Hz, glycerol H-3'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 167.8 (C-9), 149.3 (C-4), 148.0 (C-3), 145.6 (C-7), 126.3 (C-1), 122.7 (C-6), 115.1 (C-5), 113.9 (C-8), 110.4 (C-2), 69.9 (C-2'), 65.2 (C-1'), 62.7 (C-3'), 55.1 (-OCH₃)。以上数据与文献^[15]报道的1-*O*-阿魏酸甘油酯基本一致。

化合物**5** 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 109.1 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 6.75 (2H, m, H-3,6), 6.65 (2H, m, H-2,5); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 146.3 (C-1,2), 120.9 (C-4,5), 116.4 (C-3,6)。以上数据与文献^[16]报道邻苯二酚基本一致。

化合物**6** 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 247.2 [M+Na]⁺。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 5.88 (1H, s, H-2), 5.80 (1H, m, H-8), 5.77 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7), 4.32 (1H, m, H-9), 2.48 (1H, d, $J = 16.9$ Hz, 6-Ha), 2.17 (1H, d, $J = 16.9$ Hz, 6-Hb), 1.92 (3H, s, 11-CH₃), 1.25 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 10-CH₃), 1.04 (3H, s, 12-CH₃), 1.02 (3H, s, 13-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 201.2 (C-3), 167.4 (C-5), 136.9 (C-8), 130.0 (C-7), 127.1 (C-4), 80.0 (C-6), 68.6 (C-9), 50.7 (C-2), 42.4 (C-1), 24.5 (C-12), 23.8 (C-10), 23.5 (C-11), 19.6 (C-13)。以上数据与文献^[17]报道吐叶醇基本一致。

化合物**7** 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 517.1 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 7.66 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), 7.21 (1H, s, H-2''), 7.10 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6''), 6.83 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5''), 6.41 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''), 5.42 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1'), 4.51 (1H, m, H-6), 4.46 (1H, dd, $J = 3.6, 11.8$ Hz, H-6'a), 4.17 (2H, m, H-3), 4.10 (1H, m, H-5), 4.02 (1H, m, H-5'), 3.91 (3H, s, -OCH₃), 3.88 (1H, m, H-4), 3.86 (1H, m, H-6'b), 3.74 (1H, dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, H-3'), 3.66 (1H, brs, H-1), 3.44 (1H, dd, $J = 3.5, 9.5$ Hz, H-2'), 3.37 (1H, m, H-4'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 169.0 (C-9''), 150.7 (C-4''), 149.4 (C-3''), 147.1 (C-7''), 127.7 (C-1''), 124.2 (C-6''), 116.5 (C-5''), 115.2 (C-8''), 111.7 (C-2''), 105.6 (C-2), 93.5 (C-1'), 80.8 (C-5), 79.0 (C-3), 76.8 (C-4), 74.8 (C-3'), 74.3 (C-2'), 73.3 (C-4'), 71.6 (C-5'), 66.7

(C-6), 63.9 (C-6'), 62.5 (C-1), 56.5 (-OCH₃)。以上数据与文献^[18]报道 β -*D*-(6-*O*-*trans*-Feruloyl)fructofuranosyl- α -*D*-*O*-glucopyranosied基本一致。

化合物**8** 淡黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 195.2 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 6.79 (1H, s, H-2), 6.70 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 6.64 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-6), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 2.82 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-7), 2.55 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-8); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 177.2 (-COOH), 148.8 (C-4), 145.8 (C-5), 133.7 (C-3), 121.6 (C-6), 116.1 (C-2), 113.0 (C-1), 56.3 (-OCH₃), 37.3 (C-8), 31.7 (C-7)。以上数据与文献^[19]报道二氢阿魏酸基本一致。

化合物**9** 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 282.2 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 7.92 (1H, s, H-8), 5.68 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 4.38 (1H, t, $J = 3.4$ Hz, H-2'), 4.07 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-3'), 3.88 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-4'), 3.59 (1H, dd, $J = 3.6, 12.0$ Hz, H-5'a), 3.51 (1H, dd, $J = 3.6, 12.0$ Hz, H-5'b); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 156.7 (C-6), 153.3 (C-2), 151.2 (C-4), 135.8 (C-8), 116.4 (C-5), 86.2 (C-1'), 85.0 (C-4'), 73.4 (C-2'), 70.1 (C-3'), 61.1 (C-5')。以上数据与文献^[20]报道鸟嘌呤核苷基本一致。

化合物**10** 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 625.1 [M-H]⁻。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 7.70 (1H, s, H-2'), 7.66 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, s, H-6), 5.24 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 4.15 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'''), 3.99 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-6''a), 3.87 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-6''a), 3.76 (1H, dd, $J = 2.4, 11.6$ Hz, H-6''b), 3.65 (1H, dd, $J = 5.6, 12.2$ Hz, H-6''b), 3.61 (1H, m, H-5''), 3.50 (1H, t, $J = 8.6$ Hz, H-2''), 3.44 (1H, m, H-3''), 3.38 (1H, m, H-4''), 3.23 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-3'''), 3.18 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-4'''), 3.07 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-2'''), 3.01 (1H, m, H-5'''); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 177.7 (C-4), 164.2 (C-7), 161.3 (C-5), 157.2 (C-9), 156.8 (C-2), 148.1 (C-4'), 144.2 (C-3'), 133.9 (C-3), 121.8 (C-6'), 121.4 (C-1'), 115.9 (C-2'), 114.4 (C-5'), 104.1 (C-10), 102.9 (C-1'''), 102.3 (C-1''), 98.2 (C-6), 93.1 (C-8), 76.3 (C-5'''), 76.2 (C-5''), 76.1 (C-3'''), 75.9 (C-3''), 74.0 (C-2''), 73.4 (C-2'''), 69.6 (C-4'',4'''), 67.9 (C-6''), 60.8 (C-6''')。以上数据与文献^[21]报道槲皮素-3-*O*- β -*D*-龙胆二糖苷基本一致。

4 化合物**1**与TNF- α 的分子对接结合模型

采用自主开发的多靶标分子对接平台,以TNF- α 的晶体结构(PDB ID: 2az5)为基础开展分子对接,通

过比较化合物 **1** 和 TNF- α 结构中 ATP 结合位点配体 6, 7-dimethyl-3- [(methyl{2- [methyl{1- [3- (trifluoromethyl)phenyl] -1*H*-indol-3-yl)methyl}amino]ethyl}amino)methyl]-4*H*-chromen-4-one ($K_d = 5.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 两者的打分结果, 从而预测化合物 **1** 是否具有 TNF- α 转换酶的抑制活性。

5 化合物 **1** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用

将 RAW264.7 细胞培养于含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 收集对数增长期细胞备用。调整细胞数为每毫升 4×10^4 个, 然后在 24 孔细胞培养板中每孔加入 2 mL 的细胞悬液, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。实验分组为正常组、模型组 (LPS, $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和给药组。给药组分别加入 LPS ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和不同浓度的化合物 **1** (1 、 10 、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 共孵育 48 h。48 h 后取上清培养液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测化合物 **1** 对 TNF- α 释放的影响。

作者贡献: 张勇是本文的第一作者, 负责谷精草化学成分的分离鉴定、活性测试和文章撰写; 朱维良、阿吉艾克拜尔·艾萨负责设计研究; 朱维良是本文的通讯作者, 负责实验设计、分子对接打分预测、论文框架的构建及稿件修改, 并最终定稿。

利益冲突: 作者声明本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Editoria Committee of Flora of China. Flora of China: Vol 13(3) (中国植物志: 第 13(3) 卷) [M]. Beijing: Science Press, 1997: 20-25
- [2] Miao ZL, Tian CY, Chen L, et al. Textual criticism on the original plant of Flos Eriocauli in great compendium of Chinese material medica [J]. Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志), 2004, 38: 60-62.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 187.
- [4] Fang JJ, Ye G, Chen WL, et al. Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum* [J]. Phytochemistry, 2008, 69: 1279-1286.
- [5] Ho JC, Chen CM. Flavonoids from the aquatic plant *Eriocaulon buergerianum* [J]. Phytochemistry, 2002, 61: 405-408
- [6] Liang Y, Luo D, Gao X, et al. Novel fatty acid synthase inhibitors isolated from *Eriocaulon buergerianum* [J]. Lat Am J Pharm, 2018, 37: 1529-1534.
- [7] Qiao X, Ye G, Liu CF, et al. Chemical analysis of *Eriocaulon buergerianum* and adulterating species by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electro-spray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 57: 133-142.
- [8] Lee JJ, Chung CP, Chang SJ, et al. Morphological and chemical analyses of Eriocauli Flos sold in Taiwan markets [J]. J Food Drug Anal, 2017, 25: 939-945.
- [9] Zhu HY, Ye G. α -Glucosidase inhibitory activity of compounds from *Eriocaulon buergerianum* [J]. Nat Prod Res Dev, 2010, 22: 60-62.
- [10] Yuan JM, Shang XF, Wang YL, et al. Study on extraction of total flavonoids from *Eriocaulon buergerianum* Koern. and the scavenging activity on hydroxyl free radical [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2010, 21: 894-895.
- [11] Wang MW, Zhang ZJ, Cheang LC, et al. *Eriocaulon buergerianum* extract protects PC12 cells and neurons in zebrafish against 6-hydroxydopamine-induced damage [J]. Chin Med, 2011, 6: 16.
- [12] Lourdes CS, Marcelo AS, Clenilson MR, et al. Characterization of flavonoid and naphthopyranone derivatives from *Eriocaulon ligulatum* using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Nat Prod Commun, 2009, 4: 1651-1656.
- [13] Wang CZ, Yu DQ. Lignan and acetylenic glycosides from *Aster auriculatus* [J]. Phytochemistry, 1998, 48: 711-717.
- [14] Zhao M, Xu YH, Wulan TY, et al. Chemical constituents of ethyl acetate extracts of *Empetrum nigrum* var. *japonicum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 3399-3405.
- [15] Hiroko S, Yutaka S, Yoshihiro M. Phenolic glycerides from *Lilium auratum* [J]. Phytochemistry, 1987, 26: 844-845.
- [16] Xi CC, Xu YL, Feng K, et al. Chemical constituents from the seeds of *Capparis masaikai* [J]. J Chin Pharm Sci, 2021, 30: 924-931.
- [17] Zhang B, Yao CF, Wang Y, et al. Chemical constituents in water fraction of *Cynanchum auriculatum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 786-790.
- [18] Lee SY, Choi SU, Lee JH, et al. A new phenylpropane glycoside from the rhizome of *Sparganium stoloniferum* [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33: 515-521.
- [19] Chen XF, Ma GX, Huang Z, et al. Identification of water-soluble phenolic acids from *Clerodendranthus spicatus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 2614-2618.
- [20] Long ZH, Wang QY, Li B, et al. A new iridoid glycoside from *Buddleja officinalis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 35-44.
- [21] Fumi T, Takayuki M, Ryo K, et al. Flavonoids in the flowers of *Primula* \times *polyantha* Mill. and *Primula primulina* (Spreng.) H. Hara (Primulaceae) [J]. Phytochemistry, 2021, 189: 112827.