

黄花蒿水提物黄酮苷类成分研究

吴其国^{1,2,3}, 范明惠^{1,2}, 黄乐怡^{1,2}, 王永丽^{1,2}, 俞桂新^{1,2*}

(1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203;
3. 安庆医药高等专科学校药学院, 安徽 安庆 246052)

摘要: 采用HP-20大孔吸附树脂、MCI柱色谱、硅胶柱色谱、中压液相色谱、葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱色谱及制备液相色谱等多种色谱技术, 从黄花蒿水提物的正丁醇部位分离得到21个黄酮苷类化合物。根据化合物的理化性质和波谱数据确定了它们的结构, 分别为甲氧基万寿菊素-7-O- β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷(1)、荜草苷(2)、芹菜素-6-C- β -D-吡喃葡萄糖-8-C- β -L-吡喃阿拉伯糖苷(3)、芹菜素-6-C- β -D-吡喃半乳糖-8-C- β -L-吡喃阿拉伯糖苷(4)、芹菜素-6-C- β -L-吡喃阿拉伯糖-8-C- β -D-吡喃葡萄糖苷(5)、芹菜素-6-C- α -L-吡喃阿拉伯糖-8-C- β -D-吡喃葡萄糖苷(6)、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷(7)、芹菜素-6-C- α -L-吡喃阿拉伯糖-8-C- β -D-吡喃葡萄糖苷(8)、芹菜素-6,8-二-C-吡喃葡萄糖苷(9)、万寿菊素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(10)、木犀草素-6-C-吡喃葡萄糖苷(11)、牡荆素(12)、山柰酚-3-O- β -吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 2)- β -吡喃葡萄糖苷(13)、槲皮素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(14)、万寿菊素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(15)、7-甲氧基-栝草亭-6-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(16)、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(17)、假荆芥属苷(18)、芦丁(19)、山柰酚-3-O- β -槐糖苷(20)和万寿菊素-3-O- β -D-芦丁糖苷(21)。其中, 化合物1为新化合物, 化合物2、4、6、7、10、11、13、15、16、18、20、21为首次从黄花蒿中分离得到。通过ELISA法检测新化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞IL-6蛋白表达实验测定了新化合物的抗炎活性, 结果表明化合物1在高(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、低(25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度均能表现出显著抑制IL-6蛋白的生成与表达。

关键词: 黄花蒿; 水提物; 黄酮; 抗炎

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1629-05

Flavonoid glycosides from the water extract of *Artemisia annua* L.

WU Qi-guo^{1,2,3}, FAN Ming-hui^{1,2}, HUANG Le-yi^{1,2}, WANG Yong-li^{1,2}, CHOU Gui-xin^{1,2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China;
3. Department of Pharmacy, Anqing Medical College, Anqing 246052, China)

Abstract: Twenty one flavonoid glycosides were isolated and purified from *n*-butanol portion of the water extract of *A. annua* by various chromatographic techniques such as HP-20 macroporous adsorption resin, silica gel, ODS, Sephadex LH-20 gel column chromatography and preparative high performance liquid chromatography. Their structures were identified by analysis of physicochemical properties and spectral data, and determined as axillarin-7-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (1), orientin (2), apigenin-6-C- β -D-glucopyranosyl-8-C- β -L-arabinopyranoside (3), apigenin-6-C- β -D-galactopyranosyl-8-C- β -L-arabinopyranoside (4), apigenin-6-C- β -L-arabinopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranoside (5), apigenin-6-C- α -L-arabinofuranosyl-8-C- β -D-glucopyranoside (6), quercetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (7), apigenin-6-C- α -L-arabinopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranoside (8), vicenin-2 (9), patuletin-7-O- β -D-glucopyranoside (10), luteolin-6-C-glucopyranoside

收稿日期: 2022-12-07; 修回日期: 2022-12-30.

基金项目: 十三五科技重大专项“中药组分资源库”子课题-中药组分及对照品制备(2019ZX09735002-004).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322623, E-mail: chouguixinzyb@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1340

(11), vitexin (12), kaempferol-3-*O*- β -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -glucopyranoside (13), quercetin-7-*O*- β -*D*-glucopyranoside (14), patuletin-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside (15), 7-*O*-methyl-quercetagenin-6-*O*- β -*D*-glucopyranoside (16), quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside (17), nepitrin (18), rutin (19), kaempferol-3-*O*- β -sophoroside (20), and patuletin-3-*O*-rutinoside (21). Compound 1 is a new compound, compounds 2, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 20 and 21 are isolated from *A. annua* for the first time. In the anti-inflammatory assay, compound 1 inhibited the release of IL-6 from LPS-induced RAW264.7 cells to significantly degrees with the high (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), medium (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), low (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) concentration.

Key words: *Artemisia annua* L.; water extract; flavonoid; anti-inflammatory

崇明苦草是上海市崇明地区世代相传的一种药草,因其疗效显著而家喻户晓。其基原植物为菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L.,具有清热解毒、消肿止痛的功效,并有多重食疗作用^[1]。虽然与中药青蒿为同一基原,但有别于青蒿的是,崇明苦草一般于每年3月份播种,10~11月份果实成熟后采收,取其带成熟果实的茎枝,晾干,储存3年,作为“崇明苦草”应用。当地习惯于水煎应用,可用于产后恢复等,如产后服用崇明苦草煮鸡蛋,有助于排出恶露,降低产后感染等。研究表明,从妊娠结束到产后恢复,可能受巨噬细胞激活状态的影响,与其中IL-6等炎症相关蛋白表达水平有关^[2-4]。为此,本文对崇明苦草水提物中黄酮类成分进行了系统的分离、纯化,从中得到21个黄酮苷类成分,其中1个为新化合物,12个为该种中首次报道。同时采用ELISA法检测了化合物1在不同浓度下对LPS诱导的RAW264.7细胞中IL-6蛋白表达水平,结果显示,化合物1在高(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、低(25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)三种浓度下均能表现出显著的抑制IL-6蛋白的表达,并呈现浓度依赖性,表明化合物1可通过抑制IL-6的生成和表达来发挥抗炎作用。本文的研究结果,不仅丰富了黄花蒿水提取物中黄酮类成分的信息,也可为阐明黄花蒿抗炎作用的药效物质基础提供一定的依据。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物1为黄色粉末,溶于甲醇。根据高分辨质谱的准分子离子峰 m/z : 641.170 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 641.171 2, $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{17}$) 和 ^{13}C NMR 数据确定分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{17}$, 不饱和度为13。在260和354 nm处具有最大吸收的紫外光谱表明化合物具有黄酮醇骨架^[5]。红外光谱显示,在3 320 (OH)、1 653 (α - β 不饱和 CO) 和 1 598 (芳香环) cm^{-1} 有吸收峰^[6]。 ^1H NMR 谱(表1)显示一组ABX耦合系统的3个芳环质子信号 δ_{H} 7.70 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.58 (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, H-6'), 表明存在1,3,4-三取

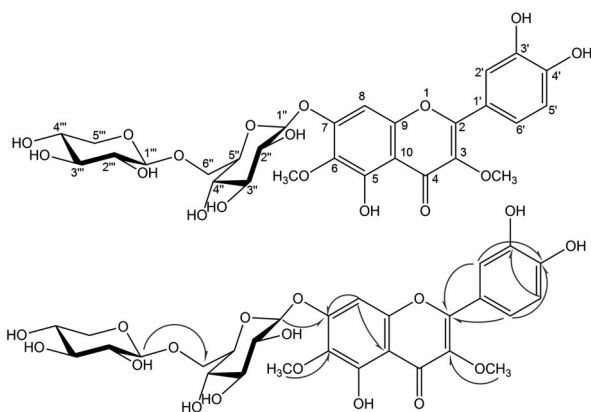
代环B^[7],以及A环上的一个芳质子信号 δ_{H} 6.92 (1H, s, H-8), 另可见2个甲氧基信号在 δ_{H} 3.91 (3H, s, 6-OCH₃)、3.82 (3H, s, 3-OCH₃), 2个糖的端基氢信号在 δ_{H} 5.12 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 4.32 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'')。化合物1的 ^{13}C NMR显示28个碳信号,除去黄酮骨架15个碳信号和2个甲氧基碳信号,剩余11个碳信号分别为1个6碳糖和1个5碳糖的信号。

由HSQC可知2个糖端基碳的信号为 δ_{C} 102.0、105.4,结合文献^[8]和端基氢耦合常数可知一个为 β -*D*-葡萄糖、一个为 β -*D*-木糖。将化合物1的碳谱数据与已知化合物甲氧基万寿菊素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(axillarlin-7-*O*-glucopyranoside)的数据比较^[9],发现二者较为相似,进一步分析二者的碳谱数据,化合物1除多了一个木糖片段外,其余碳信号与已知化合物的基本一致,唯一区别在葡萄糖C-6位的化学位移不同,已知化合物中葡萄糖6位碳信号的化学位移值为 δ_{C} 60.7,而化合物1的为 δ_{C} 69.9,表明化合物1中的木糖片段是连接在葡萄糖的C-6上。HMBC谱(图1)中 δ_{H} 5.12与C-7 (δ_{C} 157.8) 相关, δ_{H} 4.32 (H-1'')与 δ_{C} 69.9 (C-6'') 相关,进一步证实化合物1中木糖与葡萄糖是(1 \rightarrow 6)连接的。化合物1的结构鉴定为甲氧基万寿菊素-7-*O*- β -*D*-吡喃木糖-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(axillarlin-7-*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside)。

20个已知化合物分别鉴定为荜草苷(2)^[10]、芹菜素-6-*C*- β -*D*-吡喃葡萄糖-8-*C*- β -*L*-吡喃阿拉伯糖苷(3)^[11]、芹菜素-6-*C*- β -*D*-吡喃半乳糖-8-*C*- β -*L*-吡喃阿拉伯糖苷(4)^[12]、芹菜素-6-*C*- β -*L*-吡喃阿拉伯糖-8-*C*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(5)^[13,14]、芹菜素-6-*C*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖-8-*C*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(6)^[15]、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(7)^[16]、芹菜素-6-*C*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖-8-*C*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(8)^[17]、芹菜素-6,8-二-*C*-吡喃葡萄糖苷(9)^[18]、万寿菊素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(10)^[19]、木犀草素-6-*C*-吡喃葡萄糖苷(11)^[20]、牡荆素(12)^[21]、山柰酚-3-*O*- β -吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 2)- β -吡喃葡萄糖苷(13)^[22]、槲皮素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(14)^[23]、万寿菊素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(15)^[24]、7-甲

Table 1 The ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data of compound **1** (measured in methanol- d_4)

Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
2		158.7
3		139.5
4		180.4
5		153.8
6		133.9
7		157.8
8	6.92, s	95.5
9		153.4
10		108.2
1'		122.8
2'	7.70, d (2.2)	116.8
3'		146.4
4'		150.1
5'	6.95, d (8.5)	116.5
6'	7.58, dd (8.5, 2.2)	122.7
1''	5.12, d (7.3)	102.0
2''	3.56–3.61, m	74.7
3''	3.49–3.56, m	77.7
4''	3.45–3.52, m	71.1
5''	3.79–3.72, m	77.3
6''a	4.18, dd (11.3, 1.7)	69.9
6''b	3.80–3.86, m	
1'''	4.32, d (7.0)	105.4
2'''	3.23–3.27, m	74.8
3'''	3.27–3.32, m	77.7
4'''	3.45–3.52, m	71.0
5'''a	3.89–3.83, m	66.9
5'''b	3.16, dd (11.4, 10.0)	
3-OCH ₃	3.82, s	60.5
6-OCH ₃	3.91, s	61.5

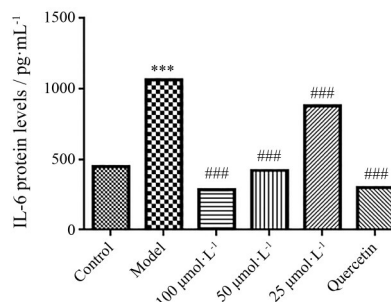
**Figure 1** The structure and the key HMBC (—) correlation signals of compound **1**

氧基-栝草亭-6-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (**16**)^[25]、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (**17**)^[26]、假荆芥属苷 (**18**)^[27]、芦丁 (**19**)^[26]、山柰酚-3-*O*- β -槐糖苷 (**20**)^[28]、万寿菊素-3-*O*- β -D-芦丁糖苷 (**21**)^[29]。其中, 化合物 **2**、**4**、**6**、**7**、**10**、**11**、**13**、**15**、**16**、**18**、**20**、**21** 为首次从黄花蒿中分离得到。

2 化合物 **1** 的抗炎活性

采用 ELISA 法检测化合物 **1** 对 LPS 诱导的

RAW264.7 细胞 IL-6 蛋白表达, 结果表明, 化合物 **1** 在高 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、中 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、低 ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 三个浓度下 IL-6 均被显著性抑制 (图 2), 并呈现浓度依赖性, 表明化合物 **1** 可通过抑制 IL-6 的生成和表达来发挥抗炎作用。

**Figure 2** Detection the IL-6 protein expression of compound **1** by ELISA method (** $P < 0.001$ vs control group; #### $P < 0.001$ vs model group)

实验部分

Bruker AVANCE-III (400 MHz 或 600 MHz) 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司), PerkinElmer FT-IR 红外光谱仪 (美国 PerkinElmer 公司), TU-1901 紫外光谱仪 (北京普析通用仪器有限责任公司), Autopol VI 型旋光仪 (美国 Rudolph 公司), GRACE 中压液相色谱仪 (美国 GRACE 公司), Agilent Technologies 1100 制备型色谱仪、安捷伦 7000 QQQ GC-MS 质谱仪 (美国安捷伦公司), CAPCELL PAK C18 制备色谱柱 (日本资生堂), EYELA WATER BATH SB-2000 旋转蒸发器、EYELA COOL ACE CA-1111 旋蒸冷凝设备 (日本东京理化), SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), 电子天平 (Sartorius BT124, Sartorius-BT-323S, 德国赛多利斯集团), MCI 填料 ($75 \sim 150 \mu\text{m}$)、大孔吸附树脂 (HP-20 型) (日本三菱化学有限公司), 柱色谱硅胶、薄层色谱及制备型薄层色谱硅胶板 ($100 \sim 200$ 目, $200 \sim 300$ 目, 青岛海洋化工厂分厂), Sephadex LH-20 ($25 \sim 100 \mu\text{m}$, 美国通用电器医疗集团), 氘代甲醇、水、吡啶和 DMSO (国药集团), 乙腈 (制备级和色谱级)、甲醇 (制备级、色谱级、分析级)、乙酸乙酯 (分析级)、乙醇 (分析级)、DMSO (分析级)、吡啶 (分析级)、硫酸、甲酸、丙酮 (色谱级试剂来源于 Fisher 公司, 其他均来源于国药公司)。实验用药材购买自上海崇明岛地区, 原植物经上海中医药大学俞桂新研究员鉴定为菊科黄花蒿 *Artemisia annua* L. (20190920-1), 凭证标本保存于上海中药标准化中心。

1 提取分离

取崇明苦草 32.5 kg, 切段 ($5 \sim 10 \text{ mm}$), 第一次加

10 倍量水煎煮 1 h, 过滤, 第二次药渣加 8 倍量水煎煮 1 h, 过滤, 第三次药渣再加 8 倍量水煎煮 1 h, 过滤, 共提取 3 次, 合并滤液浓缩至约 40 L (60 °C), 得到崇明苦草药材水提物组分, 编号 KC。再将崇明苦草水提物转移至萃取罐中, 按 1:1 加入乙酸乙酯, 搅拌, 静置, 分别萃取 3 次, 合并 3 次的乙酸乙酯萃取部分, 浓缩干燥得到乙酸乙酯部位, 编号 KC-A; 乙酸乙酯萃取剩余部分, 按 1:1 加入正丁醇分别萃取 3 次, 合并 3 次正丁醇萃取部分, 浓缩干燥得到正丁醇部位, 编号 KC-B; 经正丁醇萃取后剩下的水部分, 浓缩干燥得到水部位, 编号 KC-C。KC-B 部位经 HP-20 大孔吸附树脂柱分离, 分别依次用水、15% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇和 95% 乙醇洗脱, 得到 5 个部位 (KC-B-1~KC-B-5)。取 KC-B-3 部位经 MCI 柱色谱分离, 分别依次用 30%、40%、50%、60%、100% 甲醇洗脱, 得到 9 个部位 (KC-B-301~KC-B-309)。KC-B-301 部位进一步采用中压 ODS 柱色谱分离, 分别用 10%、20%、30%、40%、50%、100% 甲醇洗脱, 得到 15 个部位 (KC-B-301-1~KC-B-301-15)。

KC-B-301-9 部位进一步采用硅胶柱色谱分离, 分别用乙酸乙酯、乙酸乙酯: 甲醇: 水 (30:2:1、20:2:1、15:2:1、10:2:1)、纯甲醇洗脱, 得到 15 个部位 (KC-B-301-9-1~KC-B-301-9-15)。KC-B-301-9-2 部位经液相制备色谱分离 (梯度洗脱, 0~30 min, 15%~30% 乙腈, 18 min 出峰) 可得到化合物 **2** (2 mg)。KC-B-301-9-5 部位凝胶柱色谱分离用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 甲醇洗脱得到 14 个部位 (KC-B-301-9-5-1~KC-B-301-9-5-14), KC-B-301-9-5-10 经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 18% 乙腈, 14 min 出峰) 可得到化合物 **3** (10 mg), KC-B-301-9-5-11 经液相制备色谱分离 (梯度洗脱, 0~35 min, 6%~20% 乙腈, 31 min 出峰) 可得到化合物 **4** (17 mg), KC-B-301-9-5-12 经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 15% 乙腈, 26、31 min 出峰) 可得到化合物 **5** (69 mg)、化合物 **6** (23 mg), KC-B-301-9-5-13 经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 20% 乙腈, 12 min 出峰) 可得到化合物 **7** (74 mg)。KC-B-301-9-9 部位凝胶柱色谱分离用 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 的甲醇洗脱得到 7 个部位 (KC-B-301-9-9-1~KC-B-301-9-9-7), KC-B-301-9-9-6 部位经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 15% 乙腈) 得到化合物 **8** (37 mg), KC-B-301-9-9-4 部位经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 15% 乙腈) 得到化合物 **9** (8 mg)。KC-B-301-12 部位用 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 依次用 50% 醇、70% 甲醇、80% 甲醇、90% 甲醇、无水甲醇洗脱, 得到 19 个部位 (KC-B-301-12-1~KC-B-301-12-19), KC-B-301-12-16 部位经液相制备色谱分离可得到

化合物 **10** (18 mg), KC-B-301-12-15 部位经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 20% 乙腈, 分别在 11.5、18.5 min 出峰) 可得到化合物 **11** (3 mg)、**12** (20 mg), KC-B-301-12-11 部位经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 18% 乙腈, 24 min 出峰) 可得到化合物 **13** (30 mg), KC-B-301-12-18 部位经液相制备色谱分离可得到化合物 **14** (12 mg)。KC-B-301-14 部位采用硅胶柱色谱分离, 分别用乙酸乙酯: 甲醇: 水 (30:1:1、20:1:1、10:2:1)、纯甲醇, 得到 7 个部位 (KC-B-301-14-1~KC-B-301-14-7)。KC-B-301-14-2 部位进一步用 iSephadex LH-20 柱色谱分离, 用 40% 甲醇洗脱得到 11 个部位 (KC-B-301-14-2-1~KC-B-301-14-2-11), KC-B-301-14-2-8 部位经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 20% 乙腈) 可得到化合物 **15** (111 mg), KC-B-301-14-2-10 部位经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 20% 乙腈) 可得到化合物 **16** (6 mg)、**17** (11 mg)。KC-B-301-14-3 部位进一步用 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 的甲醇洗脱得到 12 个部位 (KC-B-301-14-3-1~KC-B-301-14-3-12), KC-B-301-14-3-9 部位经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 20% 乙腈, 25 min 出峰) 可得到化合物 **18** (25 mg)。KC-B-301-14-4 部位用 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 用 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 甲醇洗脱得到 7 个部位 (KC-B-301-14-4-1~KC-B-301-14-4-7), KC-B-301-14-4-6 部位经液相制备色谱分离 (洗脱条件为 20% 乙腈, 16 min 出峰) 可得到化合物 **19** (800 mg), KC-B-301-14-4-5 部位经液相制备色谱分离 (梯度洗脱 10~30 min, 10%~25% 乙腈, 分别在 28.8、30.3 min 出峰) 可得到化合物 **20** (12 mg)、**21** (12 mg)。KC-B-301-14-4-4 部位经液相制备色谱分离 (梯度洗脱 0~25 min, 15%~40% 乙腈, 18 min 出峰) 可得到化合物 **1** (8 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 641.170 4 $[M+H]^+$ (计算值 $C_{28}H_{32}O_{17}$, 641.171 2); 旋光值为 $[\alpha]_D^{20} -47$ (c 0.1, MeOH); IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3 321、2 920、1 653、1 598、1 465、1 350、1 212、1 033、805; 1H NMR (400 MHz, methanol- d_4) 和 ^{13}C NMR (100 MHz, methanol- d_4) 数据见表 1。

3 ELISA 法检测化合物 **1** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-6 蛋白表达

将 RAW264.7 细胞按每毫升 1×10^6 的密度接种于 6 孔板中, 设置空白对照组、LPS ($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 模型组、阳性组 (槲皮素) 和给药组 (高浓度 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、中浓度 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、低浓度 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。待细胞贴壁后 (24 h), 加入一定量稀释好的药物和阳性药, 其终浓度

为 100、50、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 药物与细胞共同预孵, 孵育 2 h 后, 加入 LPS (100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共同孵育 24 h。收集各组每孔培养基上清液用于检测培养基上清中炎症因子分泌量。采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 以 One-way ANOVA 方式进行方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为具有统计学显著性差异标准。结果显示化合物 1 在高、中、低 3 个浓度下 IL-6 均被显著性抑制。

作者贡献: 吴其国是本文第一作者, 负责化合物分离、鉴定、新化合物活性筛选和文章撰写; 范明慧、黄乐怡、王永丽对提取分离提供了一定帮助; 俞桂新为本文通讯作者。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Xu G, Yu AP, Lu CS, et al. Research on the origin of bitter grass in Chongming [J]. Asia Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2021, 17: 34-36.
- [2] Zhang L, Sugiyama T, Murabayashi N, et al. The inflammatory changes of adipose tissue in late pregnant mice [J]. J Mol Endocrinol, 2011, 47: 157-165.
- [3] Timmons BC, Fairhurst AM, Mahendroo MS. Temporal changes in myeloid cells in the cervix during pregnancy and parturition [J]. J Immunol, 2009, 182: 2700-2707.
- [4] Castelucci BG, Consonni SR, Rosa VS, et al. Recruitment of monocytes and mature macrophages in mouse pubic symphysis relaxation during pregnancy and postpartum recovery [J]. Biol Reprod, 2019, 101: 466-477.
- [5] Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The Systematic Identification of Flavonoids [M]. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1970: 41-61.
- [6] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ, et al. Spectrometric Identification of Organic Compounds [M]. 8th Edition. New York: Wiley, 1980.
- [7] Harborne JB. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 [M]. London: CRC Press Chapman & Hall, 1994.
- [8] Olszewska MA, Kwapisz A. Metabolite profiling and antioxidant activity of *Prunus padus* L. flowers and leaves [J]. Nat Prod Res, 2011, 25: 1115-1131.
- [9] Flamini G, Antognoli E, Morelli I. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy [J]. Phytochemistry, 2001, 57: 559-564.
- [10] Rayyan S, Fossen T, Nateland HS, et al. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug 'Crataegi folium cum flore' (hawthorn) [J]. Phytochem Anal, 2010, 16: 334-341.
- [11] Cao J, Qin Y, Yin CL, et al. Chemical constituents of *Viola yedoensis* and their antioxidant activity [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 77-81.
- [12] Dong Q, Huang Y, Qiao SY. Studies on chemical constituents from *Stellaria media* I [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1048-1051.
- [13] Liang D, Liu YF, Hao ZY, et al. Flavones and megastigmanes from *Lysimachia clethroides* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 1171-1175.
- [14] Du QZ, Zhao YC, Li B. Structural identification and antioxidant activity of flavonoids from flowers of *Mucuna sempervirens* [J]. Food Sci (食品科学), 2011, 32: 111-115.
- [15] Pérez MJ, Cuello AS, Zampini IC, et al. Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacities [J]. Food Res Int, 2014, 64: 762-771.
- [16] Ding YX, Guo YJ, Ren Y, et al. Isolation of flavonoids from male flowers of *Eucommia ulmoides* and their anti-oxidative activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 323-327.
- [17] Shingo W, Puming HE, Ikue H, et al. Glycosidic flavonoids as rat-liver injury preventing compounds from green tea [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64: 2262-2265.
- [18] Dong LH, Tai ZG, Yang YB, et al. Chemical constituents of the flowers of *Sophora viciifolia* Hance [J]. West China J Pharm Sci (华西药理学杂志), 2010, 25: 636-640.
- [19] Sevindik HG, Güvenalp Z, Yerdelen KÖ, et al. Research on drug candidate anticholinesterase molecules from *Achillea biebersteinii* Afan. using by molecular docking and *in vitro* methods [J]. Med Chem Res, 2015, 24: 3794-3802.
- [20] De Oliveira DM, Siqueira EP, Nunes YRF, et al. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa* [J]. Rev Bras Farmacogn, 2013, 23: 614-620.
- [21] Zhang PC, Xu SX. C-Glucoside flavonoids from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E.Br [J]. J Asian Nat Prod Res, 2003, 5: 131-136.
- [22] Sekine T, Arita J, Yamaguchi A, et al. Two flavonol glycosides from seeds of *Camellia sinensis* [J]. Pergamon, 1991, 30: 991-995.
- [23] Zhao HY, Fan MX, Shi JL, et al. Chemical constituents from the seeds of *Lepidium apetalum* Willd [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2010, 41: 14-18.
- [24] Merfort I, Wendisch D. Flavonoidglycosideaus Arnica montana und Arnica chamissonis [J]. Planta Med, 1987, 53: 434-437.
- [25] Senatore F, Agostino MD, Dini I. Two new quercetagenin O-glucosides from *Tagetes mandonii* [J]. Biochem Syst Ecol, 1999, 27: 309-311.
- [26] Kazuma K, Noda N, Suzuki M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea* [J]. Phytochemistry, 2003, 62: 229-237.
- [27] Lee GT, Duan CH, Lee JN, et al. Phytochemical constituents from *Salvia plebeia* [J]. Nat Prod Sci, 2010, 16: 207-210.
- [28] Wolfram K, Schmidt J, Wray V, et al. Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 1076-1084.
- [29] Lin L, Qiu S, Lindenmaier M, et al. Patuletin-3-O-rutinoside from the aerial parts of *Echinacea angustifolia* [J]. Pharm Biol, 2008, 40: 92-95.