

假酸浆果中黄酮类化学成分及免疫活性研究

刘 艳, 杨炳友, 许振鹏, 李晓毛, 罗雨萌, 吕邵娃, 匡海学*

黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 研究假酸浆 *Nicandra physaloides* 果中的黄酮类化学成分及其免疫活性。方法 采用硅胶、ODS 及 HPLC 等色谱方法分离化合物, 利用 NMR、MS 波谱学方法鉴定其结构, 并采用脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖模型评价化合物的免疫活性。结果 从假酸浆果 70% 乙醇回流提取物的正丁醇部位分离得到 13 个化合物, 分别鉴定为 3"-hydroxy-puerarin (1)、puerarin-6"-O-glucoside (2)、daidzein 8-C-[α -D-apiofranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (3)、葛根素 (4)、3"-methoxyl-puerarin (5)、6-C- α -L-arabinosyl-8-C- β -D-glycosylchrysin (6)、oroxylin A-7-O- β -D-glucuronide methyl ester (7)、大豆黄苷 (8)、黄芩苷 (9)、quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (10)、quercetin 3-rutinoside (11)、kaempferol 3-rutinoside (12) 和 quercetin 3-glucoside (13); 化合物对 LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞增殖影响的实验表明, 化合物 1~3、7、9、10、12、13 显示出对小鼠脾淋巴细胞增殖的抑制作用, 而化合物 6 表现出对小鼠脾淋巴细胞增殖的促进作用。结论 化合物 1~7 为首次从茄科植物中分离得到, 8~13 为首次从该属植物中分离得到, 且化合物 1~3、6、7、9、10、12、13 可能具有潜在的免疫活性。

关键词: 假酸浆; 异黄酮; 黄酮苷; 3"-hydroxy-puerarin; 葛根素; 黄芩苷; 免疫活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)22-3965-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.006

Study on flavonoids from *Nicandra physaloides* and their immune activities

LIU Yan, YANG Bing-you, XU Zhen-peng, LI Xiao-mao, LUO Yu-meng, LV Shao-wa, KUANG Hai-xue

Key Laboratory of Chinese Materia Medica Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the flavonoids from the fruits of *Nicandra physaloides* and clarify the immune activities of the isolated compounds. **Methods** The separations and purifications were taken by silica gel and ODS chromatogram columns as well as preparative HPLC, and the structural identification based on physicochemical property, $^1\text{H-NMR}$, and $^{13}\text{C-NMR}$ as well as HR-MS data. And the immune activities were evaluated by mice splenic lymphocyte proliferation model induced by LPS. **Results** Thirteen compounds were obtained from the butanol fraction of the 70% ethanol extract of *N. physaloides* fruits, which were identified as 3"-hydroxy-puerarin (1), puerarin-6"-O-glucoside (2), daidzein 8-C-[α -D-apiofranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (3), puerarin (4), 3"-methoxyl-puerarin (5), chrysin 6-C- α -L-arabinopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranoside (6), oroxylin A-7-O- β -D-glucuronide methyl ester (7), daidzin (8), baicalin (9), quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (10), quercetin 3-rutinoside (11), kaempferol 3-rutinoside (12), and quercetin 3-glucoside (13), respectively. The results indicated that compounds 1—3, 7, 9—10, and 12—13 could inhibit the proliferation of mice spleen lymphocytes and 6 could promote the proliferation in the influence of mice spleen lymphocytes proliferation induced by LPS. **Conclusion** Compounds 1—7 are isolated from the plants of Solanaceae for the first time, compounds 8—13 are obtained from the plants of *Nicandra* Adans. firstly. And the compounds 1—3, 6, 7, 9—10, and 12—13 possibly possess the potential immune activities.

Key words: *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn.; isoflavone; flavonoid glycoside; 3"-hydroxy-puerarin; puerarin; baicalin; immune activities

假酸浆 *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn. 为茄科 (Solanaceae) 假酸浆属 *Nicandra* Adans. 植物, 又名大千生、田珠、冰粉、水晶凉粉、蓝花天仙子、

鞭打绣球等。其原产自秘鲁, 以 “Apple of Peru” “Belladonna de Pais” 为人们熟知, 也因其花色淡紫或蓝紫, 清秀幽雅, 被作为观赏植物^[1]。其以全草、

收稿日期: 2016-06-13

作者简介: 刘 艳 (1987—), 女, 博士生, 中级, 研究方向为中药及复方药效物质基础研究。

*通信作者 匡海学 (1955—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药及复方药效物质基础研究。

Tel: (0451)82193001 E-mail: hxkuang@hotmail.com

果及种子入药,性平,味微苦、甘、酸,具有镇静、祛痰、清热解毒等功效,用于狂犬病、精神病、癫痫、风湿痛、鼻渊、感冒、泌尿道感染以及疮疖^[2-3]。假酸浆种子可加工成凉粉、果冻,是消炎利尿、消暑解渴的夏季保健品。现代研究表明,假酸浆具有降糖、利尿、麻醉、抗氧化等药理作用,国外亦作镇痛、驱虫、抗菌、消炎、退热、利尿、散瞳剂使用^[4]。然而,关于假酸浆的化学成分的研究并不深入,且主要集中在甙体类、生物碱等。为了深入探讨假酸浆中的化学成分、寻找其多种生物活性的药效物质基础,本实验对假酸浆果乙醇提取物的正丁醇部位的化学成分进行研究,最终得到 13 个黄酮类化合物,分别鉴定为 3"-hydroxy-puerarin (1)、daidzein-8-C-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (2)、puerarin-6"-O-glucoside (3)、葛根素 (puerarin, 4)、3"-methoxyl-puerarin (5)、6-C- α -L-arabinosyl-8-C- β -D-glycosylchrysin (6)、oroxylin A-7-O- β -D-glucuronide methyl ester (7)、大豆黄苷 (daidzin, 8)、黄芩苷 (baicalin, 9)、quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (10)、quercetin-3-rutinoside (11)、kaempferol-3-rutinoside (12)、quercetin-3-glucoside (13)。并在此基础上,开展了基于脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖模型免疫活性评价。

1 仪器与材料

2695-2996 型分析 HPLC (美国 Waters 公司); Delta 600-2487 型制备 HPLC (美国 Waters 公司); Sunfire C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 美国 Waters 公司); Sunfire C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 19 mm, 10 μ m, 美国 Waters 公司); Bruker-400 超导核磁共振光谱仪 (德国 Bruker 公司); Acquity Ultra Performance LCTM 液质联用色谱仪 (美国 Waters 公司); 柱色谱反相 ODS-AM (日本 YMC 公司); TLC 用硅胶板 (Silicagel60 F254) 和 RP₁₈ 反相板均为德国 Merck 公司产品; 所用试剂均为分析纯 (西陇科学股份有限公司); ELx 800 酶标仪 (美国 BioTek 公司); BT 25S 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); 150i 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程有限公司); RPMI 1640 (美国 Corning 公司); 10 000 U/mL 青霉素/链霉素 (美国 Corning 公司); Hanks' 平衡盐溶液 (Biotopped 公司); DMSO (Sigma 公司); lipopolysaccharide (Biosharp 公司); 噻唑蓝 (MTT, Biotopped 公司); 醋酸地塞米松 (批号

150423, 天津天药药业股份有限公司); 96 孔板 (美国 Corning 公司)。

BALB/c 小鼠,雌雄各半,18~20 g,由黑龙江中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号 SYXK (黑) 2016004。

假酸浆果采收于黑龙江中医药大学药用植物园,经黑龙江中医药大学药学院药用植物教研室樊锐锋鉴定为茄科假酸浆属植物假酸浆 *Nicandra Physaloides* (L.) Gaertn. 的果实。原植物标本 (2014007) 保存于黑龙江中医药大学中药化学教研室。

2 提取与分离

干燥粉碎的去籽假酸浆果 (30 kg) 用 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 2.5 h,减压回收溶剂,得提取物 2.99 kg。提取物与水混悬均匀,依次用石油醚、醋酸乙酯、水饱和正丁醇萃取。正丁醇部分 (100 g) 经正相硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇系统 (100:1 $\rightarrow$ 0:1) 梯度洗脱,得到 13 个部分,即 Fr. I~XIII。Fr. VIII 经过正相硅胶柱色谱分离,得 9 个流分,其中流分 8 经 HPLC 分离即得化合物 7 (10 mg)。Fr. X 经过正相硅胶柱色谱,得 10 个流分,其中流分 3 经 HPLC 分离即得化合物 9 (13 mg)。流分 6 经过反相 ODS 柱色谱得到 8 个组分 Fr. 1~8,其中 Fr. 6 析出结晶即得化合物 8 (9 mg),其余母液经过 HPLC 得化合物 5 (12 mg) 和 10 (10 mg)。Fr. XI 经过正相硅胶柱色谱,得 12 个流分。其中流分 8 经过 ODS 柱色谱得到 9 个组分 Fr. 1~9,Fr. 8 经过 HPLC 分离得化合物 1 (10 mg)、4 (11 mg)、12 (8 mg) 和 13 (12 mg)。Fr. XIII 经过正相硅胶柱色谱,得 15 个流分。流分 12 经过 ODS 柱色谱分离得到 17 个组分 Fr. 1~17,Fr. 11 经过 HPLC 分离得化合物 2 (9 mg),Fr. 13 经过 HPLC 分离得化合物 6 (16 mg),Fr. 14 经过 HPLC 分离得化合物 11 (11 mg),Fr. 15 经过 HPLC 分离得化合物 3 (17 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 C₂₁H₂₀O₁₀, ESI-MS m/z : 433.117 1 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.13 (1H, s, H-2), 8.03 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 6.97 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6), 7.01 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 6.82 (1H, dd, J = 1.8, 8.2 Hz, H-5'), 6.80 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-6'), 5.09 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 154.5 (C-2), 125.6 (C-3), 178.3 (C-4), 128.1 (C-5), 116.5 (C-6), 163.0 (C-7), 113.1 (C-8),

158.0 (C-9), 118.5 (C-10), 124.7 (C-1'), 116.4 (C-2'), 146.7 (C-3'), 146.2 (C-4'), 117.5 (C-5'), 121.7 (C-6'), 75.6 (C-1''), 73.0 (C-2''), 80.0 (C-3''), 71.7 (C-4''), 82.8 (C-5''), 62.8 (C-6'')。以上数据与文献报道^[5]基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为 3''-hydroxy-puerarin。

化合物 **2**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 $C_{27}H_{30}O_{14}$, ESI-MS m/z : 579.172 3 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.15 (1H, s, H-2), 8.03 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.96 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 7.36 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.84 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 5.09 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-1''), 4.25 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1'''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 154.5 (C-2), 125.6 (C-3), 178.3 (C-4), 128.2 (C-5), 116.3 (C-6), 163.0 (C-7), 112.8 (C-8), 158.7 (C-9), 118.5 (C-10), 124.2 (C-1'), 131.4 (C-2'), 116.3 (C-3'), 158.7 (C-4'), 116.3 (C-5'), 131.4 (C-6'), 75.8 (C-1''), 73.0 (C-2''), 79.7 (C-3''), 71.5 (C-4''), 81.5 (C-5''), 66.9 (C-6''), 105.3 (C-1'''), 78.0 (C-2'''), 77.7 (C-3'''), 71.1 (C-4'''), 74.8 (C-5'''), 62.8 (C-6''')。以上数据与文献报道^[6]基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 puerarin-6''-O-glucoside。

化合物 **3**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 $C_{26}H_{29}O_{13}$, ESI-MS m/z : 549.158 8 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.15 (1H, s, H-2), 8.02 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.96 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 7.35 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.83 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 5.09 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-1''), 4.24 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 154.5 (C-2), 125.5 (C-3), 178.3 (C-4), 128.1 (C-5), 116.3 (C-6), 163.0 (C-7), 112.9 (C-8), 158.0 (C-9), 118.5 (C-10), 124.2 (C-1'), 131.4 (C-2'), 116.3 (C-3'), 158.6 (C-4'), 116.3 (C-5'), 131.4 (C-6'), 75.8 (C-1''), 73.2 (C-2''), 79.8 (C-3''), 71.5 (C-4''), 81.4 (C-5''), 68.9 (C-6''), 111.0 (C-1'''), 78.0 (C-2'''), 80.5 (C-3'''), 75.0 (C-4'''), 65.6 (C-5''')。以上数据与文献报道^[7]基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 6''-O- α -D-apiofranosylpuerarin。

化合物 **4**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 $C_{21}H_{20}O_9$, ESI-MS m/z : 417.121 3 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.17 (1H, s, H-2), 8.03 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.97 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 7.36 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.83 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 5.09 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-1''); ^{13}C -NMR

(100 MHz, CD_3OD) δ : 154.5 (C-2), 125.6 (C-3), 178.3 (C-4), 128.1 (C-5), 116.5 (C-6), 163.0 (C-7), 113.2 (C-8), 158.0 (C-9), 118.5 (C-10), 124.2 (C-1'), 116.3 (C-2'), 131.4 (C-3'), 158.6 (C-4'), 131.4 (C-5'), 116.3 (C-6'), 75.7 (C-1''), 73.0 (C-2''), 80.0 (C-3''), 71.7 (C-4''), 82.8 (C-5''), 62.8 (C-6'')。以上数据与文献报道^[8]基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为葛根素。

化合物 **5**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 $C_{22}H_{23}O_{10}$, ESI-MS m/z : 447.126 8 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.18 (1H, s, H-2), 8.02 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.96 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 7.14 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.93 (1H, dd, $J = 1.8, 8.0$ Hz, H-5'), 6.80 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6'), 5.09 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-1''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 154.7 (C-2), 125.5 (C-3), 178.2 (C-4), 128.1 (C-5), 116.2 (C-6), 163.0 (C-7), 113.2 (C-8), 158.0 (C-9), 118.5 (C-10), 124.7 (C-1'), 116.2 (C-2'), 148.7 (C-3'), 147.8 (C-4'), 114.0 (C-5'), 122.8 (C-6'), 75.7 (C-1''), 73.0 (C-2''), 80.0 (C-3''), 71.7 (C-4''), 82.8 (C-5''), 62.8 (C-6'')。以上数据与文献报道^[9]基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 3''-methoxyl-puerarin。

化合物 **6**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 $C_{22}H_{23}O_{10}$, ESI-MS m/z : 447.130 2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.69 (1H, s, H-2), 6.96 (2H, m, H-2', 6'), 8.04 (2H, m, H-3', 5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 163.6 (C-2), 105.7 (C-3), 184.2 (C-4), 160.2 (C-5), 108.5 (C-6), 163.2 (C-7), 105.9 (C-8), 157.5 (C-9), 105.9 (C-10), 133.2 (C-1'), 130.2 (C-2'), 128.2 (C-3'), 132.5 (C-4'), 128.2 (C-5'), 130.2 (C-6'), 76.5 (C-1''), 75.2 (C-2''), 72.0 (C-3''), 71.3 (C-4''), 70.4 (C-5''), 75.0 (C-1'''), 73.2 (C-2'''), 80.2 (C-3'''), 72.4 (C-4'''), 82.9 (C-5'''), 63.1 (C-6''')。以上数据与文献报道^[10]基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 6-C- α -L-arabinosyl-8-C- β -D-glycosylchrysin。

化合物 **7**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 $C_{23}H_{22}O_{11}$, ESI-MS m/z : 475.124 7 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.81 (1H, s, H-3), 6.61 (1H, s, H-8), 5.21 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 166.0 (C-2), 106.2 (C-3), 184.3 (C-4), 151.1 (C-5), 132.4 (C-6), 158.1 (C-7), 100.3 (C-8), 157.6 (C-9), 107.3 (C-10), 131.3 (C-1'), 127.6 (C-2'), 130.3 (C-3'), 133.4 (C-4'), 130.3 (C-5'), 127.6 (C-6'), 101.8 (C-1''), 74.5 (C-2''), 77.2 (C-3''), 72.8

(C-4''), 76.8 (C-5''), 170.8 (C-6''), 62.5 (6''-OCH₃), 53.0 (7-OCH₃)。以上数据与文献报道^[11]基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 oroxylin A-7-O-β-D-glucuronide methyl ester。

化合物 **8**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 C₂₁H₂₀O₉, ESI-MS *m/z*: 417.115 9 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8.21 (1H, s, H-2), 8.15 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 7.21 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.5 Hz, H-6), 7.24 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 7.38 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-2', 6'), 6.86 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-3', 5'), 5.10 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 155.1 (C-2), 126.2 (C-3), 178.2 (C-4), 128.3 (C-5), 117.1 (C-6), 163.5 (C-7), 105.1 (C-8), 158.7 (C-9), 120.2 (C-10), 124.1 (C-1'), 131.4 (C-2'), 116.3 (C-3'), 159.2 (C-4'), 116.3 (C-5'), 131.4 (C-6'), 101.8 (C-1''), 78.4 (C-2''), 77.8 (C-3''), 74.7 (C-4''), 71.2 (C-5''), 62.4 (C-6'')。以上数据与文献报道^[12]基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为大豆黄苷。

化合物 **9**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 C₂₁H₁₈O₁₁, ESI-MS *m/z*: 447.091 7 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.95 (1H, s, H-3), 6.95 (1H, s, H-8), 7.55 (3H, m, H-3', 4', 5'), 7.97 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, H-2', 6'), 5.20 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 166.2 (C-2), 105.7 (C-3), 184.5 (C-4), 151.4 (C-5), 132.1 (C-6), 152.6 (C-7), 95.7 (C-8), 148.2 (C-9), 107.9 (C-10), 132.6 (C-1'), 127.5 (C-2'), 130.2 (C-3'), 133.1 (C-4'), 130.2 (C-5'), 127.5 (C-6'), 102.2 (C-1''), 74.4 (C-2''), 76.8 (C-3''), 72.9 (C-4''), 76.7 (C-5''), 170.9 (C-6'')。以上数据与文献报道^[13]基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为黄芩苷。

化合物 **10**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 C₂₁H₂₀O₁₂, ESI-MS *m/z*: 465.105 1 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.18 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.36 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 7.84 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 6.89 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.57 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, H-6'), 5.22 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 157.3 (C-2), 134.3 (C-3), 178.0 (C-4), 161.4 (C-5), 98.4 (C-6), 164.5 (C-7), 93.2 (C-8), 156.9 (C-9), 104.2 (C-10), 121.4 (C-1'), 114.6 (C-2'), 144.3 (C-3'), 148.4 (C-4'), 116.3 (C-5'), 121.4 (C-6'), 104.1 (C-1''), 71.7 (C-2''), 73.6 (C-3''), 68.5 (C-4''), 75.7 (C-5''), 60.4 (C-6'')。以上数据与文献报道^[14]基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为

quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside。

化合物 **11**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 C₂₇H₃₀O₁₆, ESI-MS *m/z*: 611.159 7 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.19 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.37 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 7.66 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 6.87 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.62 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.4 Hz, H-6'), 5.09 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 158.5 (C-2), 135.7 (C-3), 179.4 (C-4), 162.9 (C-5), 100.0 (C-6), 166.0 (C-7), 94.9 (C-8), 159.3 (C-9), 105.6 (C-10), 123.1 (C-1'), 117.8 (C-2'), 145.8 (C-3'), 149.8 (C-4'), 116.1 (C-5'), 123.6 (C-6'), 104.8 (C-1''), 75.8 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.4 (C-4''), 77.2 (C-5''), 68.6 (C-6''), 102.4 (C-1'''), 72.1 (C-2'''), 72.3 (C-3'''), 74.0 (C-4'''), 69.7 (C-5'''), 17.9 (C-6''')。以上数据与文献报道^[15]基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 quercetin 3-rutinoside。

化合物 **12**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 C₂₇H₃₀O₁₅, ESI-MS *m/z*: 595.167 4 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.40 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 8.06 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 5.12 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 161.5 (C-2), 135.5 (C-3), 179.4 (C-4), 163.0 (C-5), 100.0 (C-6), 166.2 (C-7), 95.0 (C-8), 158.6 (C-9), 105.6 (C-10), 122.8 (C-1'), 132.4 (C-2'), 116.2 (C-3'), 159.4 (C-4'), 116.2 (C-5'), 132.4 (C-6'), 104.6 (C-1''), 75.8 (C-2''), 78.1 (C-3''), 71.5 (C-4''), 77.2 (C-5''), 68.6 (C-6''), 102.4 (C-1'''), 72.1 (C-2'''), 72.3 (C-3'''), 73.9 (C-4'''), 69.7 (C-5'''), 17.9 (C-6''')。以上数据与文献报道^[15]基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为 kaempferol 3-rutinoside。

化合物 **13**: 不定形粉末 (甲醇), 分子式为 C₂₁H₂₀O₁₂, ESI-MS *m/z*: 465.102 5 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.18 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.37 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 7.70 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 6.86 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.56 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, H-6'), 5.24 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 158.4 (C-2), 135.6 (C-3), 179.5 (C-4), 163.0 (C-5), 99.9 (C-6), 166.0 (C-7), 94.8 (C-8), 159.0 (C-9), 105.7 (C-10), 123.2 (C-1'), 116.0 (C-2'), 149.9 (C-3'), 154.9 (C-4'), 117.6 (C-5'), 123.1 (C-6'), 104.4 (C-1''), 75.7 (C-2''), 78.1 (C-3''), 71.2 (C-4''), 78.4 (C-5''), 62.6 (C-6'')。以上数

据与文献报道^[15]基本一致, 故鉴定化合物 **13** 为 quercetin 3-glucoside。

4 免疫活性评价

参照文献方法^[16]考察化合物 **1**~**13** 对 LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。取健康 BALB/c 小鼠, 颈椎脱臼处死, 于 75% 酒精浸泡中消毒。在无菌条件下取出小鼠脾脏, 用 RPMI 1640 不完全培养基冲洗 2 次后置于一一次性平皿中, 重复吹打分离脾淋巴细胞, 研磨余下脾脏同细胞悬液过 200 目筛网, 调整脾淋巴细胞密度为 5×10^6 个/mL, 加入到 96 孔板中, 每孔 100 μ L。并加入 50 μ L 的 LPS (80 μ g/mL), 最后分别加入 25、50、100、200、400 μ g/mL 的化合物。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中, 连续培养 48 h 后, 每孔加入 20 μ L 的 5 mg/mL MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 离心吸弃上清, 每孔加入 DMSO 溶液 150 μ L, 震荡混匀, 10 min 后于酶标仪 570 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算 IC_{50} 值, 见表 1。

表 1 化合物 **1**~**13** 对 LPS 诱导小鼠脾细胞增殖的影响
Table 1 Effects of compounds **1**—**13** on mice splenocytes proliferation induced by LPS

化合物	$\text{IC}_{50}/$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	化合物	$\text{IC}_{50}/$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	31.8	8	—
2	109.8	9	27.7
3	96.5	10	37.6
4	—	11	—
5	—	12	28.2
6	-82.3	13	39.9
7	15.5		

“—” 表示促进小鼠脾淋巴细胞增殖

“—” indicated promoting mice splenocytes proliferation

实验结果表明, 化合物 **1**~**3**、**7**、**9**、**10**、**12** 和 **13** 对小鼠脾淋巴细胞增殖抑制作用, 化合物 **6** 对小鼠脾淋巴细胞增殖具有促进作用, 而其他化合物活性作用不明显。

5 结论

本实验探索了假酸浆果中黄酮类化学成分, 并利用 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖模型评价了这些化合物的免疫活性。以上实验结果, 为阐明假酸浆的药效物质基础和进一步开发利用这一药用资源提供了实验基础和科学依据。

参考文献

[1] Rajamaki M L, Valkonen J T. Detection of a natural point mutation in Potato virus A that overcomes resistance to vascular movement in *Nicandra physaloides*, and studies on seed transmissibility of the mutant virus [J]. *Ann Appl*

Biol, 2004, 144(1): 77-86.

- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 [M]. 第 2 版. 北京: 中国卫生出版社, 1987.
- [3] Tu G Y, Wang Z W, Ou H. Study on rheological properties of mixed xanthan gum and gum in seed of *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2010, 22(2): 285-288.
- [4] Anton Hogstad J R. A morphological and chemical study of *Nicandra physaloides* (L.) Pers [J]. *J Am Pharm Assoc*, 1923, 12(7): 576-582.
- [5] Hirakura K, Morita M, Nakajima K, et al. Phenolic glucosides from the root of *Pueraria lobata* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(5): 921-928.
- [6] Niu Y, Li H, Dong J, et al. Identification of isoflavonoids in *Radix Puerariae* for quality control using on-line high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionization-mass spectrometry coupled with post-column derivatization [J]. *Food Res Int*, 2012, 48(2): 528-537.
- [7] Kayano S, Matsumura Y, Kitagawa Y, et al. Isoflavone C-glycosides isolated from the root of kudzu (*Pueraria lobata*) and their estrogenic activities [J]. *Food Chem*, 2012, 134: 282-287.
- [8] 龚婧如, 王书芳. 刺五加的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2337-2341.
- [9] Kinjo J, Furusawa J, Baba J, et al. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III. isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems [J]. *Chem Pharmt Bull*, 1987, 35(12): 4846-4850.
- [10] Takagi S, Yamaki M, Inoue K. Flavone di-C-glycosides from *Scutellaria baicalensis* [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(10): 2443-2444.
- [11] Zhou Z H, Zhang Y J, Yang C R. New flavonoid glycosides from *Scutellaria amoena* [J]. *Stud Plant Sci*, 1999, 6: 305-310.
- [12] Ruan B, Kong L Y, Takaya Y, et al. Studies on the chemical constituents of *Psoralea corylifolia* L. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(1): 41-44.
- [13] Malikov V M, Yuldashev M P. Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. genus. Distribution, structure, and properties [J]. *Chem Nat Com*, 2002, 38(4): 358-406.
- [14] An R B, Sohn D H, Jeong G S, et al. In vitro hepatoprotective compounds from *Suaeda glauca* [J]. *Arch Pharm Res.*, 2008, 31(5): 594-597.
- [15] Kazuma K, Noda N, Suzuki M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(2): 229-237.
- [16] 宋博翠. 瑞香素对小鼠淋巴细胞免疫抑制效果及其作用机制的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.