

三脉紫菀化学成分分离及其抗补体和抗炎活性的研究

丁 昉^{1,2}, 黄莉婷^{1,2}, 高红伟^{1,2*}, 许琼明^{1,3}, 奉建芳^{1,2}, 杨世林^{1,2}, 陈道峰^{1,4}

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530020

2. 广西优势中成药与民族药开发工程技术中心, 广西 南宁 530020

3. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123

4. 复旦大学药学院, 上海 201203

摘要: 目的 活性导向分离鉴定三脉紫菀 *Aster ageratoides* 中具有抗补体活性的主要成分, 探讨其中活性较好的化合物抗补体主要作用靶点以及抗炎活性。方法 采用减压硅胶柱、凝胶 sephadex LH-20 柱色谱法、中压制备和半制备液相法, 对三脉紫菀醋酸乙酯部位进行具有抗补体活性的化学成分分离, 其结构通过 ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 进行鉴定; 采用红细胞溶血法对分离得到的化学成分进行抗补体活性及其作用靶点筛选; 采用脂多糖 (LPS) 刺激小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞对化合物进行抗炎活性的研究。结果 分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为齐墩果酸 (1)、槲皮素 (2)、山柰酚 (3)、3,5,7,3'-四羟基-4'-甲氧基黄酮 (4)、山柰酚-7-O- α -L-吡喃鼠李糖苷 (5)、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 (6)、山柰酚-3-O- α -L-鼠李糖苷 (7)、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷 (8)、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷 (9)、山柰酚-3-O- β -D-葡萄糖苷 (10)、山柰酚-7-O- β -D-葡萄糖苷 (11)、山柰酚-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-葡萄糖苷 (12)、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-葡萄糖苷 (13)、芦丁 (14)。抗补体实验结果表明, 14 个化合物都具有一定的抗补体活性, 并呈现较好的构效关系。抗补体靶点研究结果表明, 化合物 1 作用于补体系统的 C1q、C5、C9 组分, 化合物 2 作用于补体系统的 C1q、C2、C5、C9。抗炎活性研究表明化合物能明显抑制一氧化氮 (NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 的释放, 且能明显抑制诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧化酶-2 (COX-2) 的表达。结论 分离得到 14 个化合物, 其中化合物 1、4、6、9、12、13 为该植物中首次发现。这 14 个化合物具有一定程度的抗补体活性, 且化合物 2 具有明显的抗炎活性。

关键词: 三脉紫菀; 抗补体活性; 抗炎活性; 构效关系; 齐墩果酸; 3,5,7,3'-四羟基-4'-甲氧基黄酮; 槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)09-2028-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.004

Isolation of chemical ingredients from *Aster ageratoides* and their anticomplement and anti-inflammatory activities

DING Fang^{1,2}, HUANG Li-ting^{1,2}, GAO Hong-wei^{1,2}, XU Qiong-ming^{1,3}, FENG Jian-fang^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}, CHEN Dao-feng^{1,4}

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China

2. Guangxi Engineering Technology Research Center of Advantage Chinese Patent Drug and Ethnic Drug Development, Nanning 530020, China

3. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China

4. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To isolate and identify chemical ingredients with anti-complement activity from *Aster ageratoides* and investigate the key targets and anti-inflammatory activities of obtained compounds with good anti-complement activity. **Methods** Using silica gel column, sephadex LH-20 column, Medium Pressure Liquid Chromatography system, and Semi-preparative HPLC, chemical ingredients that displayed anti-complement activity were isolated. Their chemical structures were identified by ¹H-NMR and

收稿日期: 2019-04-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81803807); 广西壮族自治区青年科学基金项目 (2018JJB140265); 广西高校引进海外高层次人才“百人计划”项目 (05018064); 广西科技基地和人才专项 (2018AD19034)

作者简介: 丁 昉, 硕士, 讲师, 主要研究方向为中药抗炎活性研究。Tel: 15878759316 E-mail: 552463809@qq.com

*通信作者 高红伟, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为中药抗炎活性及抗肿瘤活性研究。Tel: 18077022216 E-mail: gaohongwei06@126.com

^{13}C -NMR and their anti-complement activities and targets were investigated by erythrocyte hemolysis *in vitro*. In addition, using LPS-stimulated RAW264.7 cells, we investigated the anti-inflammatory activity of compound **2**. **Results** A total of 14 compounds were obtained from *A. ageratoides* and identified as oleanolic acid (**1**), quercetin (**2**), kaempferol (**3**), 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone (**4**), kaempferol-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**5**), quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**6**), kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnoside (**7**), quercetin-3-*O*- α -L-rhamnoside (**8**), kaempferide-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**9**), kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**10**), kaempferol-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**11**), kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**12**), kaempferide-3-*O*- α -L-rhamnoside-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (**13**), and rutin (**14**). They all exhibited anti-complement activity to some certain degree and good structure-activity relationship. The targets of compounds **1** and **2** were C1q, C5, and C9 and C1q, C2, C5, and C9, respectively. The anti-inflammatory experiments indicated that compound **2** exhibited a significant biological activity, which significantly suppressed the release of NO, TNF- α , and IL-6 and expressions of iNOS and COX-2. **Conclusion** A total of 14 compounds were obtained and they all displayed anticomplement activity, of which compounds **1**, **4**, **6**, **9**, **12**, and **13** are firstly discovered in *A. ageratoides*. Compound **2** exhibited a significant anti-inflammatory activity.

Key words: *Aster ageratoides* Turcz.; anticomplement activity; anti-inflammatory activity; structure-activity relationship; oleanolic acid; 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone; quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside

三脉紫菀 *Aster ageratoides* Turcz. 为菊科紫菀属多年生草本的植物，味苦、辛，性凉，具有清热解毒，利尿止血，化痰止咳等作用^[1]。其主要用于治疗上呼吸道感染、咽喉发炎、肺部感染、咳嗽痰多等疾病^[2]。目前，从三脉紫菀中发现的化学成分主要有三萜酸、三萜皂苷、黄酮类、多糖、挥发油等^[3]。三脉紫菀除了传统的抗炎、杀菌作用，还发现其具有明显的抗肿瘤、抗氧化、抗高血压等作用^[4]。但是，很少有研究涉及到三脉紫菀的抗补体活性，因此，本研究主要针对其抗补体活性成分的发现。

补体是一种具有特殊功能的蛋白，主要存在于人与动物的血清当中，是一道重要的防御线。目前，已经发现补体系统中具有重要酶活性的补体有 40 多种，其中主要组分为 C1q、C2~C9^[5]。补体系统在受到外界干扰时，补体各成分会按照一定的顺序激活，可发挥免疫媒介效应，以响应外界刺激^[5-6]。补体系统激活途径主要是通过经典途径 (classical pathway)、替代激活途径 (alternative pathway)、凝集素激活途径 (lectin pathway) 进行^[5-6]。补体系统的正常激活是清除外源和机体内有害物维持机体内各方面的平衡的重要防御系统^[7-8]。然而，补体系统过度激活会引起机体免疫系统的紊乱，造成一系列的免疫性疾病，如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、急性呼吸窘迫综合征等^[8]。此外，补体系统的激活与炎症有密切的关系，C3 和 C5 可以作用到肥大细胞和嗜碱性粒细胞的细胞膜上，使细胞脱颗粒，释放组胺、白三烯及前列腺素等活性介质，C2 和 C4 能增强血管的通透性，引起炎症充血，引起一系列炎症反应^[8]。本研究在前期活性研究基础上，发

现三脉紫菀醋酸乙酯部位具有明显的抗补体活性，采用活性导向分离，分离并鉴定其抗补体活性及抗炎活性成分。本实验从三脉紫菀醋酸乙酯部位分离得到 14 个化合物，分别鉴定为齐墩果酸 (oleanolic acid, **1**)、槲皮素 (quercetin, **2**)、山柰酚 (kaempferol, **3**)、3,5,7,3'-四羟基-4'-甲氧基黄酮 (3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone, **4**)、山柰酚-7-*O*- α -L-吡喃鼠李糖苷 (kaempferol-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside, **5**)、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, **6**)、山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnoside, **7**)、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (quercetin-3-*O*- α -L-rhamnoside, **8**)、山柰素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (kaempferide-3-*O*- β -D-glucopyranoside, **9**)、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside, **10**)、山柰酚-7-*O*- β -D-葡萄糖苷 (kaempferol-7-*O*- β -D-glucopyranoside, **11**)、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖-7-*O*- β -D-葡萄糖苷 (kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside-7-*O*- β -D-glucopyranoside, **12**)、山柰素-3-*O*- α -L-鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-葡萄糖苷 [kaempferide-3-*O*- α -L-rhamnoside-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside, **13**]、芦丁 (rutin, **14**)。其中化合物 **1**、**4**、**6**、**9**、**12**、**13** 为该植物中首次发现。并且这 14 个化合物都具有一定抗补体活性，其中化合物 **1** 和 **2** 活性最好，并进行了抗补体的作用靶点研究，对化合物 **2** 进行了抗炎活性研究，结果表明化合物 **2** 具有明显的抗炎活性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

半制备岛津高效液相色谱仪 (LC-20AB,

SPD-20A, 日本岛津公司); C₁₈ 分析色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 kromasil 公司); Bruker AVANCE III600 型核磁共振仪 (德国布鲁克公司); 中压柱色谱 (填料为 ODS, 瑞士 Buchi 公司); Biotek Synergy H1 酶标仪 (美国博腾公司); 梅特勒-托利多电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 5810 高速低温离心机、5417C 小型低温高速离心机 (德国艾本德公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 96 孔板 (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 材料

Alsever 液保存羊血 (上海康润生物科技有限公司); 抗绵羊红细胞 (sheep red blood cell, SRBC) 抗体 (溶血素, 自制); 化学试剂 (分析纯及色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氘代试剂 (德国 Merck 公司); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、Greiss 试剂 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (FBS) 及高糖培养基 (DMEM), 美国 Gibco 公司; 抗体诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧化酶-2 (COX-2)、GAPDH (美国 CST 公司); 肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 及白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (中国深圳欣博盛公司); 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞 (美国 ATCC)。山脉紫菀由江西中医学院刘荣华老师提供, 由苏州大学李笑然教授鉴定为三脉紫菀 *Aster ageratoides* Turcz. 全草。

2 方法

2.1 提取与分离

称取粉碎 (过 20 目筛) 的三脉紫菀 5 kg, 加入乙醇 (95%) 50 L 浸泡 1 h, 加热回流 2 h, 滤过。重复提取 1 次。合并滤液、浓缩、得乙醇提取浸膏。将浸膏用热水分散, 分别用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇进行萃取, 依次得萃取物为 200.3、120.9、41.2 g。将醋酸乙酯部位经过减压硅胶柱色谱 (60~100 目), 用氯仿-甲醇进行洗脱初分, 得到馏份 Fr. 1~5;

其中的馏份 Fr. 1 (氯仿-甲醇 95:5) 经过常压硅胶柱 (200~300 目) 反复色谱, 在经过 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 以及用半制备高效液相 (甲醇-水 56:44~72:28) 进行纯化得到化合物 **1** (14.4 mg)、**2** (20.2 mg)、**3** (22.1 mg); 用同样的方法从 Fr. 2 (氯仿-甲醇 90:10) 中, 分离得到化合物 **4** (16.2 mg)、**5** (11.2 mg)、**6** (9.6 mg)、**7** (10.3 mg)、**8** (12.3 mg); 在 Fr. 3 (氯仿-甲醇 80:20) 中分离得到化合物 **9** (11.2 mg)、**10** (13.6 mg)、**11** (10.5 mg)、**12** (11.6 mg); 在 Fr. 4 (氯仿-甲醇 70:30) 中分离得到化合物 **13** (22.6 mg)、**14** (15.6 mg)。

2.2 抗补体活性测试

按照表 1 配制中药测定组、中药对照组、补体组以及全溶血组样品。将配制好的每管样品放置 37 °C 水浴 30 min 后, 低温 (4 °C) 离心 (2 000 r/min) 10 min 后, 分别取每个样品上清 0.2 mL 于 96 孔板, 用酶标仪在 405 nm 下测定吸光度 (A) 值。通过利用溶血率和溶血抑制率公式, 计算出不同浓度的中药测定组的各溶血抑制率, 利用 Graphpad Prism 6.0 软件, 计算半数抑制溶血浓度 (CH₅₀)。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{中药测定}} - A_{\text{中药对照}}) / A_{\text{补体}}$$

$$\text{抑制率} = 1 - \text{溶血率}$$

2.3 抗补体作用靶点测试

按照表 2 配制靶点检测组、样品组、样品对照

表 1 补体经典途径溶血实验中所加各成分的体积

Table 1 Volume of components added in classical hemolysis test of complement

组别	BBS/mL	补体/mL	中药/mL	溶血素/ mL	2% SRBC/ mL
中药测定		0.2	0.2	0.1	0.1
中药对照	0.4	—	0.2	—	—
补体	0.2	0.2	—	0.1	0.1
全溶血	—	—	—	—	0.1

表 2 补体作用靶点鉴定中所加各成分的体积

Table 2 Volume of components added in identification of complement targets

组别	BBS/mL	三蒸水/mL	补体/mL	样品/mL	溶血素/mL	缺失血清 C-depleted Sera/mL	2% SRBC/ mL
靶点检测	—	—	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
样品	0.2	—	0.1	0.1	0.1	—	0.1
样品对照	0.5	—	—	0.1	—	—	—
缺失血清	0.2	—	—	—	0.1	0.2	0.1
补体	0.3	—	0.1	—	0.1	—	0.1
全溶血	—	0.4	—	—	0.1	—	0.1

组、缺失血清组、补体组以及全溶血组样品。将配置好的所有样品放置 37 °C 水浴 30 min 后, 低温 (4 °C) 离心 (2 000 r/min) 10 min 后, 在酶标仪 405 nm 下测定吸光度。扣除相应对照组吸光度值后计算溶血率。比较缺失血清组和相应的缺失血清中加入了供试品处理过的人血清后 (即靶点检测组) 溶血率的变化, 根据靶点检测组溶血情况, 判断供试品对补体 C1q、C2、C3、C4、C5 及 C9 有无拮抗作用。靶点检测组较相应的缺失血清组溶血能力恢复, 说明供试品不作用于该缺失组分; 若溶血能力不能恢复, 则说明供试品作用于该缺失组分。

2.4 Greiss 试剂检测化合物对 NO 释放的影响

将 RAW264.7 细胞培养在含有 10% FBS DMEM 中, 放在含有 5% CO₂ 温度为 37 °C 培养箱中进行培养。将 RAW264.7 细胞 2×10⁴ 个接种在 96 孔板中, 然后将其培养在 CO₂ 培养箱过夜, 用不同浓度 (80、40、20 μmol/L) 的化合物 2 预处理细胞 1 h 后, 加入 LPS (1 μg/mL) 共培养 16 h, 取上清液 (80 μL) 与 Griess 试剂 (80 μL) 混合, 在 CO₂ 培养箱避光孵育 15 min, 用酶标仪在波长为 540 nm 检测吸光度值。

2.5 ELISA 方法检测 TNF-α 和 IL-6 的释放

将 RAW264.7 细胞 2×10⁵ 个接种在 24 孔板中, 然后将其培养在 CO₂ 培养箱过夜, 用不同浓度 (80、40、20 μmol/L) 的化合物 2 预处理细胞 1 h 后, 加入 LPS (1 μg/mL) 共培养 16 h, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 检测化合物对炎症因子 TNF-α 及 IL-6 的释放情况。

2.6 Western blotting 法检测 iNOS 和 COX-2 的表达

将 RAW264.7 细胞 6×10⁵ 个接种在 24 孔板中, 然后将其培养在 CO₂ 培养箱过夜, 用不同浓度 (80、40、20 μmol/L) 的化合物 2 预处理细胞 1 h 后, 加入 LPS (1 μg/mL) 共培养 16 h, 加入 RIPA 裂解液, 收集总蛋白, 用 Western blotting 法检测 iNOS 和 COX-2 的表达。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.08 (1H, brs, H-12), 3.02 (1H, m, H-3), 2.64 (1H, m, H-18), 0.96, 0.79, 0.75, 0.73, 0.72, 0.61, 0.59 (各 3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 180.0 (C-28), 143.6 (C-13), 122.0 (C-12), 78.4 (C-3), 55.0 (C-5), 47.4 (C-9), 46.1 (C-17), 45.7 (C-19), 41.3

(C-18), 41.0 (C-14), 39.0 (C-8), 38.4 (C-4), 38.2 (C-1), 36.7 (C-10), 33.5 (C-21), 32.6 (C-29), 32.4 (C-7), 32.3 (C-22), 30.3 (C-20), 27.6 (C-23), 27.4 (C-15), 26.4 (C-2), 25.5 (C-27), 23.1 (C-16), 23.0 (C-30), 22.7 (C-11), 18.0 (C-6), 16.4 (C-26), 15.2 (C-25), 14.9 (C-24)。以上数据与文献报道一致^[9]。故鉴定化合物 1 为齐墩果酸。

化合物 2: 淡黄色粉末 (甲醇), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.68 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2'), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.19 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-6); ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175.8 (C-4), 163.8 (C-7), 160.7 (C-9), 156.1 (C-5), 147.7 (C-4'), 146.8 (C-2), 145.0 (C-3'), 135.7 (C-3), 121.9 (C-1'), 119.9 (C-6'), 115.6 (C-5'), 115.0 (C-2'), 103.0 (C-10), 98.1 (C-8), 93.3 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 2 为槲皮素。

化合物 3: 黄色针状结晶 (甲醇), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.49 (1H, s, 5-OH), 10.78 (1H, s, 7-OH), 10.10 (1H, s, 3-OH), 9.39 (1H, s, 4'-OH), 8.05 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175.9 (C-4), 163.9 (C-7), 160.7 (C-9), 159.2 (C-4'), 156.2 (C-5), 146.2 (C-2), 135.6 (C-3), 129.5 (C-2'), 121.6 (C-1'), 115.4 (C-3'), 115.4 (C-5'), 103.1 (C-10), 98.2 (C-6), 93.5 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 3 为山柰酚。

化合物 4: 黄色粉末, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.45 (1H, s, 5'-OH), 7.81 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.75 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 7.12 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.50 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 6.25 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 3.92 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175.2 (C-4), 164.2 (C-7), 156.2 (C-7), 160.7 (C-5), 149.2 (C-4'), 145.9 (C-2), 146.2 (C-3'), 136.2 (C-3), 123.5 (C-10), 119.5 (C-6'), 114.4 (C-5'), 111.3 (C-2'), 102.8 (C-1'), 98.0 (C-6), 93.1 (C-8), 55.6 (4'-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 4 为 3,5,7,3'-四羟基-4'-甲氧基黄酮。

化合物 5: 黄色针晶 (甲醇), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.13 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.92

(2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 6.76 (1H, s, H-8), 6.44 (1H, s, H-8), Rha: 5.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.42~4.02 (4H, m, H-2''~5''), 1.26 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, H-6''). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.5 (C-4), 163.3 (C-5), 162.3, (C-7), 160.8 (C-4'), 157.8 (C-9), 148.8 (C-2), 137.6 (C-3), 130.9 (C-2'), 130, 9 (C-6'), 123.9 (C-1'), 116.4 (C-3'), 116.4 (C-5'), 106, 2 (C-10), 99.8 (C-6), 95.3 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **5** 为山柰酚-7-*O*- α -L-吡喃鼠李糖苷。

化合物 **6**: 黄色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.62 (1H, s, 5-OH), 7.57 (1H, dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, H-6'), 7.54 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.32 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.12 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), Glc: 5.43 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.08~3.09 (6H, m, H-2''~6''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.4 (C-4), 166.1 (C-7), 161.4 (C-5), 156.7 (C-9), 156.3 (C-2), 149.1 (C-4'), 145.1 (C-3'), 133.4 (C-3), 121.8 (C-1'), 121.2 (C-6'), 116.0 (C-5'), 115.2 (C-2'), 103.8 (C-10), 99.4 (C-6), 94.0 (C-8), Glc: 101.3 (C-1''), 77.6 (C-3''), 76.9 (C-5''), 74.6 (C-2''), 70.0 (C-4''), 61.1 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **6** 为槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **7**: 淡黄色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.62 (1H, s, 5-OH), 7.57 (1H, dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, H-6'), 7.54 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.32 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.12 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), Rha: 5.43 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.08~3.09 (6H, m, H-2''~5''), 0.78 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-6), 1.12 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-6''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.7 (C-4), 164.0 (C-7), 161.2 (C-5), 157.0 (C-9), 156.4 (C-2), 148.3 (C-4'), 145.1 (C-3'), 134.4 (C-3), 121.0 (C-1'), 121.0 (C-6'), 115.8 (C-5'), 115.4 (C-2'), 104.2 (C-10), 101.9 (C-1''), 98.6 (C-6), 93.5 (C-8), 71.5 (C-4''), 70.6 (C-3''), 70.4 (C-2''), 70.1 (C-5''), 17.3 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **7** 为山柰酚-3-*O*- α -L-鼠李糖苷。

化合物 **8**: 黄色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.62 (1H, s, 5-OH), 7.57 (1H, dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, H-6'), 7.54 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.32 (1H, d, $J = 1.6$ Hz,

H-8), 6.12 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), Glc: 5.43 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.08~3.09 (6H, m, H-2''~6'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.4 (C-4), 166.1 (C-7), 161.4 (C-5), 156.7 (C-9), 156.3 (C-2), 149.1 (C-4'), 145.1 (C-3'), 133.4 (C-3), 121.8 (C-1'), 121.2 (C-6'), 116.0 (C-5'), 115.2 (C-2'), 103.8 (C-10), 99.4 (C-6), 94.0 (C-8), Rha: 101.9 (C-1''), 71.5 (C-4''), 70.6 (C-3''), 70.4 (C-2''), 70.1 (C-5''), 17.3 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **8** 为槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷。

化合物 **9**: 黄色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.90 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, brs, H-8), 6.23 (1H, brs, H-6), 5.30 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 3.85 (3H, s, OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.9 (C-2), 133.5 (C-3), 177.6 (C-4), 161.4 (C-5), 98.8 (C-6), 164.6 (C-7), 94.2 (C-8), 156.7 (C-9), 103.9 (C-10), 121.5 (C-1'), 131.4 (C-2', C-6'), 116.7 (C-3', C-5'), 157.5 (C-4'), 101.5 (C-1''), 74.3 (C-2''), 76.5 (C-3''), 70.3 (C-4''), 76.0 (C-5''), 62.2 (C-6''), 56.7 (OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **9** 为山柰素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **10**: 黄色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.91 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2', 6'), 6.86 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, brs, H-8), 6.21 (1H, brs, H-6), 5.32 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.8 (C-2), 133.6 (C-3), 177.8 (C-4), 161.6 (C-5), 98.9 (C-6), 164.5 (C-7), 94.0 (C-8), 156.6 (C-9), 104.2 (C-10), 121.3 (C-1'), 131.0 (C-2', 6'), 115.5 (C-3', C-5'), 160.0 (C-4'), 101.4 (C-1''), 74.5 (C-2''), 76.7 (C-3''), 70.1 (C-4''), 75.9 (C-5''), 62.3 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **10** 为山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **11**: 黄色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.91 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2', 6'), 6.86 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, brs, H-8), 6.21 (1H, brs, H-6), 5.32 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 147.8 (C-2), 136.6 (C-3), 177.3 (C-4), 161.2 (C-5), 98.0 (C-6), 162.3 (C-7), 93.9 (C-8), 156.1 (C-9), 104.1 (C-10), 121.5 (C-1'), 131.4 (C-2', 6'), 115.3 (C-3', 5'), 160.3 (C-4'), 101.3 (C-1''), 74.2 (C-2''), 76.6 (C-3''), 70.2 (C-4''), 75.7

(C-5''), 62.5 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **11** 为山柰酚-7-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **12**: 黄色粉末, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.91 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-2', 6'), 6.86 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, brs, H-8), 6.21 (1H, brs, H-6), 5.32 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 156.8 (C-2), 133.6 (C-3), 177.8 (C-4), 161.6 (C-5), 98.9 (C-6), 162.5 (C-7), 94.2 (C-8), 156.6 (C-9), 104.2 (C-10), 121.3 (C-1'), 131.0 (C-2', 6'), 115.5 (C-3', 5'), 160.0 (C-4'), 101.4 (C-1''), 74.5 (C-2''), 76.7 (C-3''), 70.1 (C-4''), 75.9 (C-5''), 62.3 (C-6''), 100.9 (C-1'''), 74.1 (C-2'''), 76.6 (C-3'''), 70.7 (C-4'''), 75.3 (C-5'''), 62.5 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **12** 为山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖-7-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **13**: 黄色粉末, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.95 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, brs, H-8), 6.25 (1H, brs, H-6), 5.30 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1''), 4.38 (1H, brs, H-1'''), 3.82 (3H, s, OCH₃), 1.12 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 156.4 (C-2), 133.1 (C-3), 177.2 (C-4), 161.1 (C-5), 98.7 (C-6), 164.0 (C-7), 93.7 (C-8), 156.7 (C-9), 103.7 (C-10), 120.7 (C-1'), 131.3 (C-2', 6'), 116.5 (C-3', 5'), 158.6 (C-4'), 101.2 (C-1''), 74.0 (C-2''), 76.2 (C-3''), 69.9 (C-4''), 75.8 (C-5''), 66.7 (C-6''), 100.6 (C-1'''), 70.1 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 71.7 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 56.9 (OCH₃), 17.5 (C-6''')。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物为 **13** 山柰素-3-*O*- α -L-鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **14**: 黄色粉末, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.54 (2H, m, H-2', 6'), 6.85 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6) 5.34 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, H-1''), 5.08 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, H-1'''), 1.01 (3H, d, *J* = 7.4 Hz, 6'''-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.4 (C-4), 164.4 (C-7), 161.2 (C-5), 156.6 (C-9), 156.3 (C-2), 148.2 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.6 (C-6'), 121.2 (C-1'), 116.3 (C-5'), 115, 3 (C-2'), 104.0 (C-10), 101.2 (C-1''), 100.8 (C-1'''), 98.7 (C-6), 93.6 (C-8), 76.5 (C-3'), 75.9 (C-5''), 74.1 (C-2''), 71.9 (C-4'''), 70.6 (C-3'''), 70.8 (C-2'''), 70.0 (C-4''), 68.4 (C-5''), 67.0 (C-6''), 17.4 (C-6'')。以上数据与文献报

道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **14** 为芦丁。

3.2 化合物的抗补体活性

抗补体活性实验结果显示, 这 14 个化合物都具有一定的抗补体活性, 其中化合物 **1** 和 **2** 活性最好(表 3)。通过其构效关系分析可得出以下结论: 黄酮类化合物均有较好的活性, 主要是由于其含有多个酚羟基, 一般情况下酚羟基越多活性越好; 当黄酮 C-3 位成苷后, 黄酮类的抗补体活性略有增强; 当 C-7 位酚羟基被取代后, 其活性略有下降; 5,7-二取代黄酮的抗补体活性可能与 B 环上的羟基数目成反比。齐墩果酸活性比较好, 可能是由于羧基使得抗补体活性增加。

表 3 三脉紫菀中各化合物抗补体活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Determination of anticomplement activity of various compounds in *A. ageratoides* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	CH ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	化合物	CH ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
1	0.09 ± 0.12	9	0.28 ± 0.07
2	0.11 ± 0.02	10	0.25 ± 0.02
3	0.12 ± 0.01	11	0.24 ± 0.01
4	0.19 ± 0.24	12	0.36 ± 0.02
5	0.22 ± 0.12	13	0.39 ± 0.03
6	0.19 ± 0.02	14	0.45 ± 0.01
7	0.21 ± 0.06	肝素钠	0.05 ± 0.02
8	0.22 ± 0.02		

3.3 化合物 1 和 2 的抗补体作用靶点

三脉紫菀中化合物 **1** 和 **2** 抗补体活性作用靶点研究见图 1。结果显示, 经化合物 **1** 预处理过的血清不能使补体 C1q、C5、C9 缺失的血清的溶血能力恢复, 其溶血率分别为 9.87%、7.56%、8.83%, 说明化合物 **1** 作用于补体 C1q、C5、C9 组分。同理化合物 **2** 作用于补体 C1q、C2、C5、C9, 其溶血率分别为 10.12%、8.36%、8.92%、8.65%。

3.4 化合物 2 对 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 、IL-6 释放的影响

三脉紫菀中化合物 **2** 的抗炎活性研究如图 2 所示, 结果表明, LPS 造模后, RAW264.7 细胞释放到上清液中 NO、TNF- α 、IL-6 含量明显升高, 化合物 **2** 高剂量能明显抑制 NO、TNF- α 、IL-6 的释放。

3.5 化合物 2 对 RAW264.7 细胞 iNOS 和 COX-2 表达影响

三脉紫菀中化合物 **2** 对 iNOS 和 COX-2 表达影响如图 3 所示, 结果表明, LPS 造模后, RAW264.7 细胞中 iNOS 和 COX-2 表达明显升高, 化合物 **2** 在

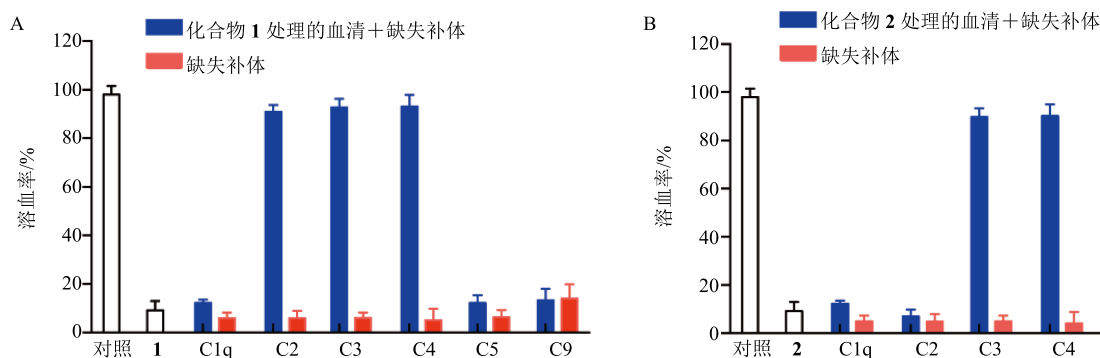
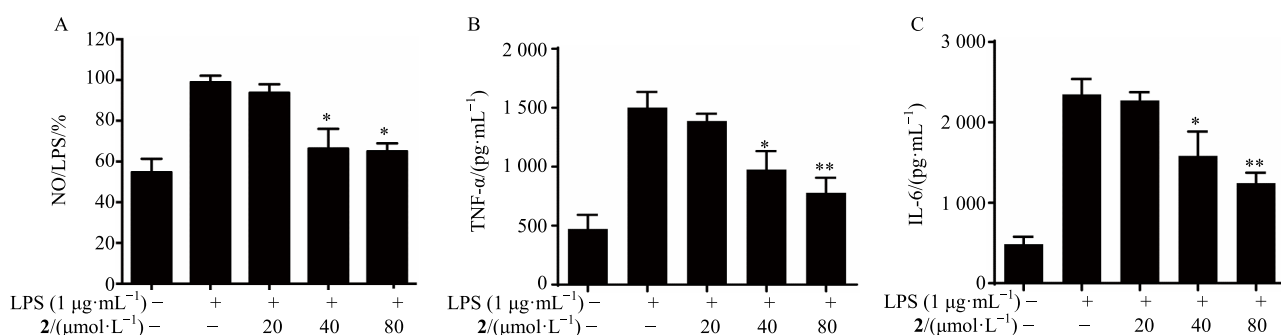


图 1 化合物 1 (A) 和 2 (B) 抗补体作用靶点测试

Fig. 1 Testing of anti-complement targets of compounds 1 (A) and 2 (B)

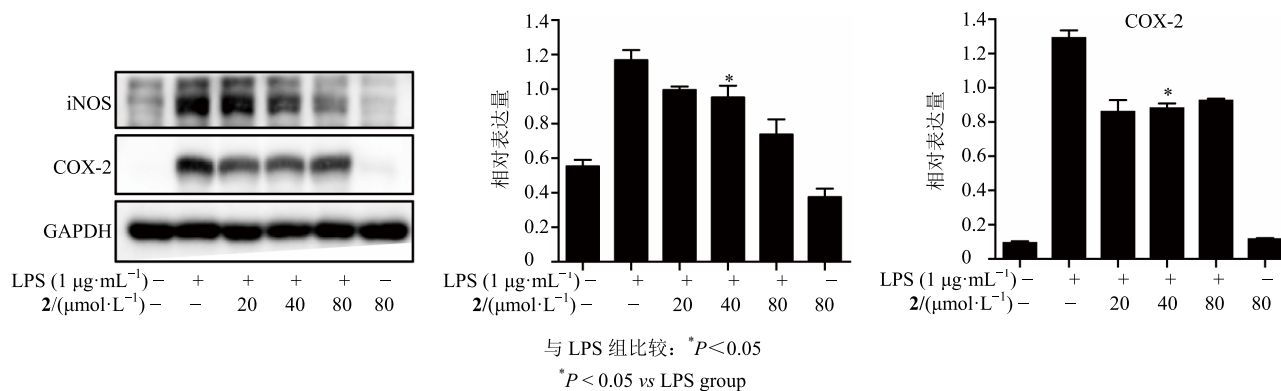


与 LPS 组比较: *P < 0.05 **P < 0.01

*P < 0.05 **P < 0.01 vs LPS group

图 2 化合物 2 对 NO (A)、TNF-α (B)、IL-6 (C) 释放的影响 (n = 3)

Fig. 2 Effect of compound 2 on release of NO (A), TNF-α (B), and IL-6 (C) (n = 3)



与 LPS 组比较: *P < 0.05

*P < 0.05 vs LPS group

图 3 化合物 2 对 iNOS 和 COX-2 表达的影响 (n = 3)

Fig. 3 Effect of compound 2 on expressions of iNOS and COX-2 (n = 3)

不同剂量下能明显抑制 iNOS 和 COX-2 的升高。

4 讨论

黄酮类化合物是一类普遍存在于自然界中各种植物的活性成分。其广泛分布在菊科、芸香科、玄参科各种植物中。在三脉紫菀的醋酸乙酯部位的活性导向分离过程中,本实验得到的大部分化合物都

属于黄酮类化合物,主要是由于黄酮类化合物具有很多酚羟基,展现出非常明显的抗补体活性。分离得到 14 个化合物中 13 个是黄酮类化合物,且都具有抗补体活性。构效关系分析结果显示,一般情况下酚羟基越多活性越好;当黄酮 C-3 位成苷后,黄酮类的抗补体活性略有增强;当 C-7 位酚羟基被取

代后,其活性略有下降;5,7-二取代黄酮的抗补体活性可能与B环上的羟基数目呈反比。此外,本实验利用补体缺失血清方法,检测化合物**1**和**2**抗补体活性的作用靶点。其原理主要是在经典途径中,补体被激活,引发红细胞破裂、溶血。加入临界浓度中药能抑制体系的溶血,且体系达到一个抑制平衡,此时若加入含补体成分的全血清即重新引发溶血。在这样的平衡体系中,分别加入不同组分缺失的补体缺失血清,若加入缺失血清后,缺失的组分能被中药处理过的血清补充,达到加入全血清的效果,则缺失血清的溶血能力恢复,提示中药不作用于该组分;如果加入缺失血清后,缺失的组分不能被中药处理过的血清补充,体系不溶血,则提示中药正是作用于此位点。基于此理论,又筛选了化合物**1**和**2**的抗补体作用靶点,结果显示化合物**1**作用于补体C1q、C5、C9组分;化合物**2**作用于补体C1q、C2、C5、C9。此外,本实验对抗补体活性较好的化合物**2**进行了抗炎活性研究,结果表明化合物**2**能明显抑制RAW264.7细胞中炎症因子NO、TNF- α 、IL-6的释放以及iNOS和COX-2表达。

参考文献

- [1] 王国艳,吴 弢,林平川,等.紫菀酚类化学成分的研究[J].中国中药杂志,2003,28(10):946-948.
- [2] Lu Y H, Wang Z T, Xu L S, *et al.* Three anthraquinones isolated from *Aster tataricus* L. f [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2003, 12(2): 112-113.
- [3] 冯子明,杨桢楠,姜建双,等.野菊花的化学成分[J].中国中药杂志,2010,35(24):3302-3305.
- [4] 康林之,朱建成,任 刚,等.三脉紫菀有效组分配比的平喘作用及其毒性研究[J].重庆医学,2016,45(36):5056-5058.
- [5] Walport M J. Complement [J]. *New Engl J Med*, 2001, 344(14): 1058-1066.
- [6] Morgan B P. *Methods in Molecular Biology* [M]. New Jersey: Humana Press Inc., 2000.
- [7] Makrides S C. Therapeutic inhibition of the complement system [J]. *Pharmacolog Rev*, 1998, 50(1): 59-88.
- [8] Asghar S S, Pasch M C. Therapeutic inhibition of the complement system [J]. *Pharmacolog Rev Mar*, 1998, 50(1): 59-88..
- [9] 王延亮,段松冷,张庆英,等.岩木瓜茎干的化学成分研究[J].中草药,2014,45(3):333-336.
- [10] 王红刚,盛亚丽,黄巧玲,等.千根草化学成分研究[J].中草药,2014,45(19):2766-2769.
- [11] 杨义芳,王 晖,夏野鹰,良种银杏幼苗叶质量分析(I) [J].中草药,2001,32(11):1033-1036.
- [12] Saewan N, Koysomboon S, Chantapromma K. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(6): 1018-1025.
- [13] 董 礼,李 磊,廖志华,等.柴胡红景天化学成分的研究[J].西北植物学报,2007,27(12):2564-2567.
- [14] 徐 文,周光雄,戴 毅,等.木荷茎的化学成分研究[J].中草药,2010,41(6):863-866.
- [15] 范积平,张贞良,皱叶酸模化学成分研究[J].中药材,2009,32(12):1836-1840.
- [16] 邓可众,熊 英,高文远,半边莲的化学成分研究[J].中草药,2009,40(8):1198-1201.
- [17] Lee E J, Moon B H, Park Y H, *et al.* Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2008, 29(2): 507-510.
- [18] 张忠立,左月明,徐 璐,等.三白草黄酮类化学成分的研究[J].中草药,2011,42(8):1490-1493.