

何首乌叶不同萃取物的抗炎活性及其化学成分鉴定

吴静¹, 谢传奇¹, 徐志勇¹, 吴磊^{1*}, 刘云飞¹, 熊伟¹, 徐敢珍²

¹江西省科学院应用化学研究所 南昌 330096

²江西新世嘉农业科技有限公司 江西宜春 336000

摘要 目的:研究何首乌叶的成分,为其功能食品的研发提供基础数据。方法:对何首乌叶醇提取物进行有机溶剂萃取,分别得到何首乌叶石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水等不同萃取物,并对不同萃取物进行抗炎活性检测,后续通过硅胶柱色谱、C18 柱色谱结合半制备液相等方法对抗炎活性较好的成分进行分离、纯化以及结构鉴定,结果:在质量浓度 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,乙酸乙酯萃取物对 RAW264.7 细胞存活率无明显的抑制作用,且剂量依赖地抑制 NO 的生成。石油醚和二氯甲烷萃取物在质量浓度 0~25 $\mu\text{g/mL}$ 时,均无明显细胞毒性,并在 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,二氯甲烷萃取物对 NO 的抑制率(51.47%)高于石油醚萃取物的抑制率(43.91%)。从二氯甲烷和乙酸乙酯萃取物中分离、鉴定出 11 个化合物,分别为 2,3,4,6-三羟基苯乙酮-3-O- β -D-glucoside(1)、杨梅苷(2)、槲皮苷(3)、阿福豆苷(4)、 β -谷甾醇(5)、正十六烷-5,8,11 三烯酸(6)、二十六烷(7)、 α -亚麻酸(8)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(9)、肉豆蔻酸(10)和槲皮素(11)。结论:何首乌叶具有很好的抗炎活性,化合物 2,4,6,7,8,9,10,11 均为首次从何首乌中分离得到。

关键词 何首乌叶; 抗炎活性; 化学成分; RAW264.7; 黄酮苷

文章编号 1009-7848(2024)04-0411-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.04.039

炎症是机体应对外界刺激所做出的一种正常生理性反应,巨噬细胞是一类免疫细胞,可通过增加一氧化氮(NO)、活性氧(ROS)、炎症因子等来启动炎症反应,然而过量的炎症介质会导致糖尿病、类风湿性关节炎和癌症等急性和慢性疾病,威胁人们健康^[1-2]。非甾体类抗炎药物、免疫抑制剂和皮质类固醇是临床上治疗炎症的常规药物,长期服用此类合成药物会对人体造成一定的毒副作用,严重时会引起胃出血和肝肾损伤等^[3-5]。鉴于此,寻找天然来源的抗炎药物或者具有抗炎活性的先导化合物是目前研究的热点。

何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)是何首乌科的一种多年生藤本植物^[6],分布在中国的大多省份以及韩国和日本。何首乌作为中国药典中较受欢迎的中药之一,它被广泛用于治疗与衰老相关的各种疾病,目前也是许多药物和处方

中的主要成分。何首乌具有多种生物活性,包括抗肿瘤、抗菌、止血、解痉、镇痛、免疫调节和抗衰老活性^[7]。现代药理学研究和临床实践表明何首乌在治疗生发、白发、高血脂、保护肝脏、减缓衰老、增强免疫功能、改善心血管健康等方面是有效的^[8-12]。截至目前,从何首乌中分离鉴定出 150 多种化合物,包括二苯乙烯苷、蒽醌、酚类、黄酮、萜类、磷脂和碳水化合物^[13-15]。何首乌中这些化合物可能与其潜在的生物活性密切相关。这些化合物大多从何首乌的根和藤中分离所得。目前对其叶子的化学成分研究较少,造成其叶子资源的浪费以及未开发使用。虽然何首乌叶并不是药食同源类植物,但是在江西、台湾等地区有将何首乌叶作为茶叶饮用的习惯,未出现中毒现象。之前有研究^[16]表明何首乌叶与其根、藤的化学成分有较大的差异,其引起肝毒的主要成分二苯乙烯苷在叶中未检出。本研究通过脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 细胞构建炎症模型,测定并筛选何首乌叶各萃取物的抗炎活性,对其抗炎活性较强的成分进行化学成分分离,对合理开发并充分利用何首乌叶资源提供数据支撑。

收稿日期: 2023-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260250);江西省重点研发计划项目(2023BBF60026);江西省科学院省级财政科研项目经费包干制试点示范项目(2023YSBG21021,2021YSBG21016)

第一作者: 吴静,女,硕士,助理研究员

通信作者: 吴磊 E-mail: wulei858196@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

何首乌叶,由江西新世嘉农业科技有限公司提供,DMEM高糖培养液,美国HyClone公司;胎牛血清,阿根廷Natocor公司;青链霉素、MTT、DMSO,北京索莱宝生物科技有限公司;台盼蓝染色液,上海生工生物工程股份有限公司;PBS缓冲液,深圳百凯美生物技术有限公司;亚硝酸钠、盐酸萘乙二胺、磺胺,上海凛恩科技发展有限公司;LPS,美国Sigma-Aldrich公司;甲醇(色谱级)、其余试剂(分析纯),天津致远化学股份有限公司;核磁共振所需氘代试剂由测试中心提供。

1.2 设备与仪器

CO₂恒温培养箱(ESCO CellMate),新加坡艺思高科技公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司;恒温水浴锅,常州金坛良友仪器有限公司;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;FDU-1200EYELA冷冻干燥机,上海爱朗仪器有限公司;荧光倒置显微镜(TS2-FL,Nikon),日本尼康公司;全波长扫描酶标仪(Infinite 200 PRO M Nano),瑞士Tecan公司;Sykam-S-501高效液相色谱仪,德国赛卡姆公司;Bruker AV-400型核磁共振仪,瑞士Bruker公司;HT-3502中压玻璃柱层析柱,苏州汇通色谱分离纯化有限公司;中高压色谱系统(P270高压恒流泵,UV230 II紫外-可见检测器),大连依利特分析仪器有限公司。

1.3 样品的提取制备

何首乌叶经过干燥、粉碎后,称取10 kg,加入20倍量(kg/L)的70%乙醇进行热回流搅拌提取,提取时间2 h,提取2次,提取液过滤、合并,减压浓缩、冷冻干燥后,得到何首乌粗提取物(Crude, 1.745 kg),取部分粗提取物,先用少量水打散成浑浊液并进行溶剂萃取,所选溶剂根据极性由小到大依次用石油醚(PE)、二氯甲烷(CH₂Cl₂)、乙酸乙酯(EtOAc)、正丁醇(BuOH)进行萃取,剩余为水相(H₂O),将萃取液合并、浓缩至浸膏,通过冷干燥分别得到198.71 g石油醚萃取物(得率1.99%),222.54 g二氯甲烷萃取物(得率2.22%),149.71 g乙酸乙酯萃取物(得率1.49%),421.73 g正丁醇萃取物(4.21%)和877.60 g水提取物(8.78%)。分别取适量粗提物及各萃取物,加入DMSO配制成

100 mg/mL的母液,放于4℃冰箱便于后续试验。

1.4 细胞培养

用DMEM高糖完全培养液(含10%胎牛血清和1%青链霉素)培养细胞,置于37℃,5%CO₂恒温培养箱中,隔天换液,将细胞培养至对数生长期。

1.5 抗炎活性筛选及测定

1.5.1 Griess法测定NO的释放量 参考Baek等^[7]的方法,首先以NaNO₂为标准品绘制NO标准曲线。给处于对数生长期的细胞更换新鲜培养液,用移液器将细胞吹打分散均匀,用细胞计数仪记录细胞浓度,计算并调整细胞浓度为5×10⁵个/mL,将细胞均匀接种于96孔无菌细胞培养板中,100 μL/孔,培养过夜。先在96孔细胞培养板中,加入药物预处理2 h(空白组、对照组和LPS组加入纯培养液),50 μL/孔,再加入脂多糖(LPS)处理24 h(空白组和对照组加入纯培养液),50 μL/孔。将96孔细胞培养上清液转移至新的96孔酶标板中,100 μL/孔;配制Griess工作液,将其加入96孔酶标板中,100 μL/孔,室温振荡10 min,于波长540 nm处检测吸光值;将吸光值带入亚硝酸钠标准曲线回归方程,得出细胞上清液中NO浓度。

1.5.2 MTT法测定细胞存活率 参考MTT法^[8]测定细胞存活率。将MTT试剂加入96孔细胞培养板中,10 μL/孔,于37℃避光孵育4 h,移除上清液,加入DMSO试剂,150 μL/孔,室温振荡10 min,于波长492 nm处检测吸光值;计算细胞存活率,见式(1)。

$$\text{存活率}(\%) = (A_{\text{药物组或LPS组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100 \quad (1)$$

1.6 化学成分的分离及结构鉴定

乙酸乙酯萃取物经中高压色谱柱、制备HPLC(乙腈:水=15:85→乙腈:水=25:75,V/V)分离纯化得化合物1(8.82 mg, *t_R* = 4.69 min)、化合物2(27.91 mg, *t_R* = 18.26 min)、化合物3(32.47 mg, *t_R* = 20.93 min)、化合物4(9.05 mg, *t_R* = 24.85 min)。二氯甲烷萃取物与硅胶进行干法上样、装柱,流动相采用二氯甲烷-甲醇混合液进行梯度洗脱,所使用的混合液比例依次为100:0,100:1,50:1,25:1,10:1,5:1,2:1,所接馏分进行TLC跟踪检测,划线合并后得到8个组分Fr.1~Fr.8。Fr.1再经硅胶

色谱柱,二氯甲烷反复洗脱后得到化合物 5(27.93 mg);Fr.2 和 Fr.3 分别经硅胶色谱柱,依次用二氯甲烷-甲醇(100:1→50:1)梯度洗脱,得到化合物 6(15.89 mg)和化合物 7(4.27 mg);Fr.4~Fr.8 经过脱色及甲醇反复结晶得到化合物 8(11.65 mg)、化合物 9(7.28 mg)、化合物 10(15.43 mg)、化合物 11(12.79 mg)和化合物 12(24.18 mg)。所得化合物经过核磁共振波谱仪记录 ^1H NMR (400 MHz) 和 ^{13}C NMR (100 MHz) 光谱,并用 TMS (四甲基硅烷) 作为内标,在氘代氯仿和氘代二甲基亚砷中测量其化学位移值 δ 。根据所得波谱数据与文献对比,确定化合物结构。

1.7 数理统计

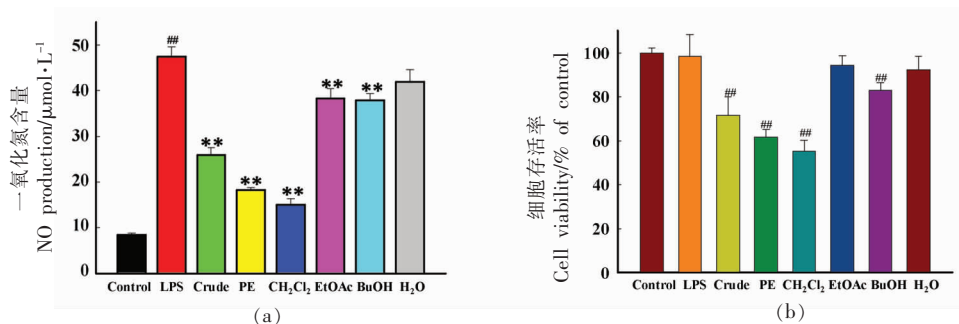
数据通过 SPSS 25.0 进行处理,并显示为“平均值 \pm 误差值”。显著性检验通过单因素方差分析和 Tukey 多重比较检验确定, $P < 0.01$ 具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 抗炎活性的筛选

何首乌不同萃取物抗炎活性的初步筛选结果如图 1a 所示,LPS 组 NO 分泌量达到 47.49 $\mu\text{mol/L}$,

而空白组细胞维持正常水平 8.51 $\mu\text{mol/L}$,证明所建造炎症模型成功,试验组中给予相同质量浓度的何首乌萃取物作用后,各个萃取物都相对减弱了 NO 的分泌,其中二氯甲烷萃取物 NO 的分泌量为 13.22 $\mu\text{mol/L}$,表现出了显著的 NO 抑制效果,其抑制 NO 的效果由大到小依次为二氯甲烷萃取物>石油醚萃取物>粗提取物>乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物>水提取物。然而,细胞毒性试验表明(图 1b),与正常细胞相比,何首乌粗提取物以及各萃取物在 100 $\mu\text{g/mL}$ 给药质量浓度时,分别表现出不同程度的细胞毒性。其中,二氯甲烷萃取物对细胞的存活率影响最大,其次是石油醚物和粗提取物。因此,这些萃取物的抗炎活性可能为假阳性,即通过杀死细胞而降低 NO 的含量。所以,这些萃取物是否具有抗炎活性,需要进一步缩小质量浓度范围,在确定其对细胞无毒害作用的基础上来进行判断。此外,100 $\mu\text{g/mL}$ 的 EtOAc 萃取物对 RAW264.7 细胞无毒害作用且能够显著降低 NO 的含量,表明其具有一定的抗炎活性,可在后续试验通过对该萃取物进行化学成分分离,推测并探究其抗炎物质基础。



注:与对照组相比,##, $P < 0.01$;与 LPS 组相比,**, $P < 0.01$ 。Control 为对照组,LPS 为模型组,Crude 为粗提取物,PE 为石油醚萃取物, CH_2Cl_2 为二氯甲烷萃取物,EtOAc 为乙酸乙酯萃取物,BuOH 为正丁醇萃取物, H_2O 为水提取物,样品质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,LPS 质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 1 PML 不同萃取物对 RAW264.7 一氧化氮含量及细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.1 The effects of different extract fractions of PML on the contents of NO in RAW264.7 and cells viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

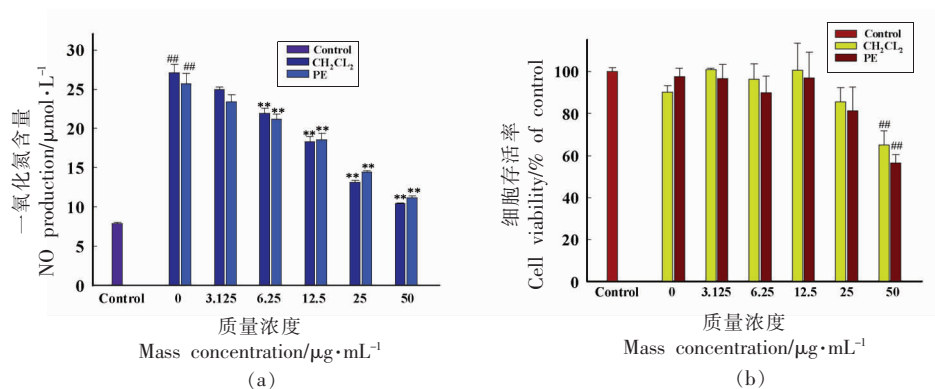
2.2 抗炎活性有效剂量的确定

选取了 CH_2Cl_2 及 PE 萃取物,进行系列浓度梯度的抗炎活性研究,结果如图 2a 与图 2b 所示。图 2b 表明,50 $\mu\text{g/mL}$ 的 CH_2Cl_2 及 PE 极显著降低了 RAW264.7 细胞的存活率,而 0~25 $\mu\text{g/mL}$ 质量

浓度范围内的 CH_2Cl_2 及 PE 均无明显细胞毒性,存活率均大于 83%。图 2a 表明 NO 含量随着质量浓度的增加而降低,表现出一定的剂量效应关系。在 6.25~25 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内, CH_2Cl_2 及 PE 均显著降低了 NO 的含量,同时在此浓度范围,两

者对 RAW264.7 细胞均无毒性,表明 CH_2Cl_2 及 PE 均有一定的抗炎活性。特别是 CH_2Cl_2 萃取物,在 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与 LPS 组相比 NO 的含量降低了 51.47%,效果要优于同质量浓度的 PE (43.91%)

和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EtOAc (20.12%)。因此, CH_2Cl_2 也可在后续试验中进行化学成分分离,并且其中化学成分抗炎活性可能比 EtOAc 中的化学成分更强。



注:与对照组相比,##, $P < 0.01$;与 LPS 组相比,**, $P < 0.01$ 。Control 为对照组不加药物、不加 LPS;给 LPS 组的药质量浓度为 $0 \mu\text{g}/\text{mL}$,只加 LPS,LPS 质量浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 2 不同质量浓度的 CH_2Cl_2 及 PE 对 RAW264.7 一氧化氮含量及细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.2 The effects of different mass concentrations of CH_2Cl_2 and PE on the contents of NO in RAW264.7 and cells viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.3 结构鉴定

化合物 1: 无色片状结晶 (甲醇); $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.14 ~5.10 (11H, br, Glucosyl H), 4.43 (s, 5H), 2.61 (3H, s, COCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 203.28 (C=O), 160.86 (C-6), 157.57 (C-4), 155.47 (C-2), 126.38 (C-3), 106.53 (C-1), 104.36 (Glucosyl C-1), 95.02 (C-5), 77.66 (Glucosyl C-5), 76.26 (Glucosyl C-3), 74.09 (Glucosyl C-2), 69.87 (Glucosyl C-4), 61.01 (Glucosyl C-6), 32.83 (CH_3)。以上数据与文献[19]报道基本一致,故鉴定化合物 1 为 2,3,4,6-三羟基苯乙酮-3-O- β -D-glucoside。

化合物 2: 黄色粉末 (甲醇); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 0.84 (3H, d, $J = 6.2 \text{ Hz}$, H-6''), 3.17 (1H, m, H-4''), 3.40 (1H, m, H-5''), 3.57 (1H, dd, $J = 9.2, 3.0 \text{ Hz}$, H-3''), 3.98 (1H, brs, H-2''), 5.20 (1H, d, $J = 1.0 \text{ Hz}$, H-1''), 6.20 (1H, d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, H-6), 6.37 (1H, d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, H-8), 6.88 (2H, s, H-2', 6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 17.99 (C-6''), 70.47 (C-2''), 70.84 (C-3''), 71.01 (C-5''),

71.72 (C-4''), 93.97 (C-8), 99.11 (C-6), 102.38 (C-1''), 104.49 (C-10), 108.35 (C-2', 6'), 120.06 (C-1'), 134.72 (C-3), 136.90 (C-4'), 146.22 (C-3', 5'), 156.85 (C-9), 157.94 (C-2), 161.76 (C-5), 164.61 (C-7), 178.23 (C-4)。以上数据与文献[20]报道基本一致,故鉴定化合物 2 为杨梅苷。

化合物 3: 黄色粉末 (甲醇); $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 0.83 (3H, d, $J = 6.1 \text{ Hz}$, H-6''), 3.17 (1H, t, $J = 9.4 \text{ Hz}$, H-4''), 3.40 (1H, m, H-5''), 3.53 (1H, dd, $J = 9.1, 3.3 \text{ Hz}$, H-3''), 3.99 (1H, brs, H-2''), 5.26 (1H, s, H-1''), 6.22 (1H, s, H-8), 6.41 (1H, s, H-6), 6.86 (1H, d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, H-5'), 7.25 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1 \text{ Hz}$, H-6'), 7.31 (1H, d, $J = 2.1 \text{ Hz}$, H-2'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 17.96 (C-6''), 70.04 (C-3''), 70.51 (C-5''), 70.80 (C-2''), 71.63 (C-4''), 94.08 (C-8), 99.14 (C-6), 102.28 (C-1''), 104.53 (C-10), 115.91 (C-2'), 116.10 (C-5'), 121.17 (C-1'), 121.56 (C-6'), 134.66 (C-3), 145.65 (C-3'), 148.89 (C-4'), 156.89 (C-2), 157.75 (C-9), 161.74 (C-5), 164.64

(C-7), 178.19 (C-4)。以上数据与文献[21]报道基本一致,故鉴定化合物3为槲皮苷。

化合物4:黄色粉末(甲醇); $C_{21}H_{20}O_{10}$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 0.78 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''), 3.11 (1H, t, $J = 9.2$ Hz, H-4''), 3.39 (1H, m, H-5''), 3.46 (1H, dd, $J = 9.0, 2.9$ Hz, H-3''), 3.98 (1H, brs, H-2''), 5.30 (1H, s, H-1''), 6.22 (1H, s, H-6), 6.42 (1H, s, H-8), 6.91 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 7.77 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 17.92 (C-6''), 70.52 (C-5''), 70.77 (C-4''), 71.07 (C-2''), 71.55 (C-3''), 94.21 (C-8), 99.21 (C-6), 102.23 (C-1''), 104.52 (C-10), 115.84 (C-3', 5'), 120.95 (C-1'), 131.04 (C-2', 6'), 134.63 (C-3), 150.45 (C-4'), 156.95 (C-2), 157.66 (C-9), 161.72 (C-5), 164.82 (C-7), 178.14 (C-4)。以上数据与文献[21]报道基本一致,故鉴定化合物4为阿福豆苷。

化合物5:白色针状结晶(甲醇) $C_{30}H_{52}O$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.32 (1H, m, H-1), 3.51 (1H, m, H-3), 1.15 (3H, s, CH_3 -19), 1.10 (3H, s, CH_3 -18), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH_3 -21), 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -26), 0.85 (3H, m, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -27), 0.71 (3H, s, $J = 7.3$ Hz, CH_3 -29); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 140.71 (C-5), 121.72 (C-6), 71.62 (C-3), 56.82 (C-14), 56.04 (C-17), 50.07 (C-9), 45.75 (C-24), 42.27 (C-4), 42.19 (C-13), 39.79 (C-12), 37.08 (C-1), 36.47 (C-10), 36.19 (C-20), 34.04 (C-7), 31.88 (C-22), 31.57 (C-8), 29.52 (C-25), 29.18 (C-16), 28.13 (C-23), 26.06 (C-2), 24.11 (C-15), 23.05 (C-28), 20.96 (C-11), 20.18 (C-27), 19.83 (C-29), 19.62 (C-18), 19.19 (C-21), 11.91 (C-19), 12.06 (C-26)。以上数据与文献[22]报道基本一致,故鉴定化合物5为 β -谷甾醇。

化合物6:无定型粉末,分子式 $C_{26}H_{47}O_2$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.22-5.47 (6H, m, H-5, 6, 8, 9, 11, 12), 2.80 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2a), 2.75 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2b), 1.62 (4H, m, $2 \times CH_2$), 1.27 (6H, m, $3 \times CH_2$), 1.28 (6H, m, $3 \times$

CH_2), 1.20 (12 H, brs, $6 \times CH_2$), 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -26); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.87 (C-1), 131.91 (C-5), 130.20 (C-6, 8), 129.98 (C-9), 128.26 (C-11), 128.05 (C-12), 34.04 ($-CH_2$), 31.90 ($-CH_2$), 31.51 ($-CH_2$), 29.67 ($-CH_2$), 29.64 ($-CH_2$), 29.57 ($-CH_2$), 29.54 ($-CH_2$), 29.50 ($-CH_2$), 29.41 ($-CH_2$), 29.33 ($-CH_2$), 29.29 ($-CH_2$), 29.22 ($-CH_2$), 29.17 ($-CH_2$), 29.11 ($-CH_2$), 29.05 ($-CH_2$), 27.18 ($-CH_2$), 25.52 ($-CH_2$), 24.66 ($-CH_2$), 22.66 ($-CH_2$), 20.53 ($-CH_2$), 14.20 ($-CH_3$ -26)。以上数据与文献[23]一致,故鉴定为正十六烷-5, 8, 11 三烯酸。

化合物7:白色粉末(甲醇); $C_{26}H_{54}$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.26 (48H, m, H-2~25), 0.88 (6H, t, $J = 7.0$ Hz, H-26, 1); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 31.93 (C-3, 4), 29.70 (C-6~21), 29.66 (C-5, 22), 29.36 (C-4, 23), 22.68 (C-2, 25), 14.08 (C-1, 6)。以上数据与文献[24]报道基本一致,故鉴定化合物7为二十六烷。

化合物8:淡黄色油状物质(甲醇); $C_{18}H_{30}O_2$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.41-5.23 (6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 2.80 (4H, s, H-11, 14), 2.31 (2H, d, $J = 6.4$ Hz, H-2), 2.07 (4H, dd, $J = 13.9, 6.8$ Hz, H-17, 8), 1.59 (2H, s, H-3), 1.28 (8H, d, $J = 17.8$ Hz, H-7, 6, 5, 4), 0.97 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 131.91 (C-16), 130.15 (C-9), 128.28 (C-12), 128.19 (C-13), 127.74 (C-15), 127.09 (C-10), 34.09 (C-2), 29.61 (C-7), 29.22 (C-6), 29.16 (C-5), 29.07 (C-4), 27.20 (C-8), 25.60 (C-14), 25.50 (C-11), 24.83 (C-3), 20.51 (C-17), 14.22 (C-18)。以上数据与文献[25]报道基本一致,故鉴定化合物8为 α -亚麻酸。

化合物9:淡黄色粉末(甲醇); $C_{14}H_{28}O_2$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.64 (1H, brs, 5-OH), 8.05 (2H, d, $J = 8.35$ Hz, H-6', H-2'), 6.86 (2H, d, $J = 8.39$ Hz, H-5', H-3'), 6.44 (1H, brs, H-8), 6.21 (1H, brs, H-6), 5.31 (1H, d, $J = 7.24$ Hz, H-1''), 5.09 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1'''), 3.09-3.71 (10H, m, H-6'', H-2'', H-2''',

H-5'''), 0.98 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6'''); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 177.86 (C-4), 164.57 (C-7), 161.66 (C-5), 160.34 (C-4'), 157.31 (C-9), 156.96 (C-2), 133.80 (C-3), 133.71 (C-6'), 131.33 (C-2'), 121.37 (C-1'), 115.59 (C-3'), 115.56 (C-5'), 104.48 (C-10), 101.82 (C-1'''), 101.22 (C-1'''), 99.19 (C-6), 94.21 (C-8), 76.86 (C-3''), 76.23 (C-5''), 74.65 (C-2''), 72.32 (C-4'''), 71.09 (C-4''), 70.82 (C-3'''), 70.42 (C-2'''), 68.70 (C-5'''), 67.36 (C-6''), 18.17 (C-6'''). 以上数据与文献[26]报道基本一致,故鉴定化合物 9 为山柰酚-3-*O*-芸香糖苷。

化合物 10: 白色粉末 (甲醇); $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.34 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 1.62 (2H, dd, $J = 14.6, 7.3$ Hz, H-3), 1.28~1.32 (20H, d, $J = 18.3$ Hz, H-4~H-13), 0.86 (3H, dt, $J = 10.1, 5.2$ Hz, H-14); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 179.96 (C-1), 34.08 (C-2), 31.92 (C-12), 29.69 (C-9), 29.66 (C-8), 29.64 (C-7), 29.59 (C-6), 29.43 (C-5), 29.35 (C-10), 29.24 (C-11), 29.07 (C-4), 24.68 (C-3), 22.66 (C-13), 14.04 (C-14)。以上数据与文献[27]报道基本一致,故鉴定化合物 10 为肉豆蔻酸。

化合物 11: 黄色粉末 (甲醇); $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.48 (1H, s, OH-5), 7.64 (1H, t, $J = 2.21$ Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.42 (1H, d, $J = 2.10$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 176.29 (C-4), 164.33 (C-7), 161.18 (C-9), 156.60 (C-5), 148.16 (C-4'), 147.28 (C-2), 145.51 (C-3'), 136.17 (C-3), 122.42 (C-1'), 120.43 (C-6'), 116.06 (C-5'), 115.54 (C-2'), 103.48 (C-10), 98.64 (C-6), 93.80 (C-8)。以上数据与文献[28]报道基本一致,故鉴定化合物 11 为槲皮素。

3 讨论与结论

LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁的组成成分,可作用于宿主细胞细胞膜表面上的 Toll 样受体 4

来刺激细胞产生炎症^[2]。当巨噬细胞受到外界刺激时,细胞内与炎症相关的信号转导通路打开,NO、IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 等炎症因子被大量释放出来,NO 可调节炎症和宿主防御并参与到各种慢性疾病中,是一种重要的炎症介质^[29]。因此,本实验以 NO 的释放量为指标,采用 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 来建立体外炎症模型,对何首乌叶萃取物进行抗炎活性的检测和筛选。抗炎结果表明石油醚和二氯甲烷萃取物有较强的抗炎活性,其对 NO 的释放有显著的抑制作用和相同的趋势,在一定的质量浓度范围内,都是随着给药质量浓度的增加,NO 的释放量逐渐减少,这可能与其含有的物质相近有关,石油萃取物多以挥发油物质为主,二氯甲烷萃取物中除含有少量的挥发油以外,还有一部分中极性的物质,另外,石油醚萃取后采用二氯甲烷萃取,其里面会含有相同物质。

对二氯甲烷及乙酸乙酯萃取物进行化学成分的分离、纯化,最终得到 11 种化合物,包括 5 种黄酮类化合物,3 种脂肪酸类化合物,1 种烷烃类化合物,1 种酚类化合物,1 种甾体类化合物,这表明何首乌叶中黄酮类化合物较为丰富,与何首乌块根的化学成分有较大差异。江西省产品质量监督检测院对江西产地的何首乌叶中总黄酮含量进行检测,结果显示总黄酮含量约为 1%,含量较高。李忠红等^[6]采用 HPLC-qTOF MS 对何首乌叶中成分进行分析,推断鉴定出杨梅苷、山柰酚、槲皮苷、槲皮素和阿福豆苷 5 种黄酮类化合物,这个结果也与本研究分离、纯化得到的化合物一致。根据以往的文献报道,槲皮素被证明有较强的抗氧化及抗炎活性,可通过 TLR4/NF- κ B 通路来下调 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子 mRNA 的表达,从而抑制 RAW264.7 细胞炎症^[30];杨梅苷在抗氧化、抗炎及心血管保护上也发挥着巨大作用,可通过抑制 P38/MAPK 信号通路来达到抗炎的效果^[31]; α -亚麻酸可通过 NF- κ B 及 MAPKs 通路起到抗炎镇痛的作用^[32];因此,何首乌叶的抗炎活性物质基础可能来自于这些化合物。综上所述,本研究对何首乌叶的综合利用提供一定的数据支撑,为其开发相应的功能食品提供新思路。

参 考 文 献

- [1] REUTER S, GUPTA S C, CHATURVEDI M M, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 49(11): 1603–1616.
- [2] YANG M L, WANG Y D, PATEL G, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of different extracts from *Epigynum auritum* through down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 261: 113105.
- [3] WANG Y, WANG V M, CHAN C C. The role of anti-inflammatory agents in age-related macular degeneration (AMD) treatment [J]. *Eye*, 2011, 25(2): 127–139.
- [4] KUHN M, CAMPILLOS M, LETUNIC I, et al. A side effect resource to capture phenotypic effects of drugs [J]. *Molecular Systems Biology*, 2010, 6(1): 343.
- [5] SULEYMAN H, DEMIRCAN B, KARAGOZ Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclo-oxygenase inhibitors [J]. *Pharmacological Reports*, 2007, 59(3): 247.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020)版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 183.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Publishing House, 2020: 183.
- [7] 孙文丽. 中药夜交藤的化学成分研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.
SUN W L. Study on the constituents of *Polygoni multiflori* Caulis[D]. Kunming: Yunnan University of Chinese Medicine, 2018.
- [8] BEGUM S, GU L J, LEE M R, et al. *In vivo* hair growth-stimulating effect of medicinal plant extract on BALB/c nude mice [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2015, 53(8): 1098–1103.
- [9] PARK S Y, JIN M L, KANG N J, et al. Anti-inflammatory effects of novel polygonum multiflorum compound via inhibiting NF- κ B/MAPK and upregulating the Nrf2 pathways in LPS-stimulated microglia [J]. *Neuroscience letters*, 2017, 651: 43–51.
- [10] UM M Y, CHOI W H, AAN J Y, et al. Protective effect of *Polygonum multiflorum* Thunb on amyloid β -peptide 25–35 induced cognitive deficits in mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 104(1/2): 144–148.
- [11] LV L S, CHENG Y H, ZHENG T S, et al. Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 99: 765–773.
- [12] SONG Y F, YANG J B, JING W G, et al. Systemic elucidation on the potential bioactive compounds and hypoglycemic mechanism of *Polygonum multiflorum* based on network pharmacology [J]. *Chinese Medicine*, 2020, 15(1): 1–15.
- [13] 李晓娜, 杨文斌, 辜燕芬, 等. 何首乌饮片颜色-成分-活性快速无损评价 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14): 249–253, 259.
LI X N, YANG W B, GU Y F, et al. Rapid non-destructive evaluation of *Polygonum multiflorum* Thunb slice by its color-component-viability [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(14): 249–253, 259.
- [14] SHEN B B, YANG Y P, YASAMIN S, et al. Analysis of the phytochemistry and bioactivity of the genus polygonum of polygonaceae [J]. *Digital Chinese Medicine*, 2018, 1(1): 19–36.
- [15] YANG J B, LIU Y, WANG Q, et al. Characterization and identification of the chemical constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. by high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection and linear ion trap FT-ICR hybrid mass spectrometry [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 172: 149–166.
- [16] 李忠红, 吕文莉, 林红, 等. 何首乌叶主要成分的 HPLC-qTOF MS 分析 [J]. *中南药学*, 2019, 17(7): 1115–1118.
LI Z H, LV W L, LIN H, et al. Analysis of major constituents in *Polygonum multiflorum* Thunb leaf by HPLC-qTOF MS method [J]. *Central South Pharmacy*, 2019, 17(7): 1115–1118.
- [17] BAEK K S, HONG Y D, KIM Y, et al. Anti-inflammatory activity of AP-SF, a ginsenoside-enriched fraction, from Korean ginseng [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2015, 39(2): 155–161.
- [18] YANG Y, XING R G, LIU S, et al. Immunostimulatory effects of chitooligosaccharides on RAW 264.7

- mouse macrophages via regulation of the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(1): 36.
- [19] YOSHIKAZI M, FUJINO H, ARISE A, et al. Polygoacetophenoside, a new acetophenone glucoside from *Polygonum multiflorum* [J]. *Planta Medica*, 1987, 53(3): 273-275.
- [20] DUAN C H, LEE J N, LEE C M, et al. Phytochemical constituents from *Metasequoia glyptostroboides* leaves[J]. *Natural Product Sciences*, 2009, 15(1): 12-16.
- [21] LEE H J, AHN D, LEE E B, et al. Phenolic components from the fruits of *Pourthiaea villosa*[J]. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 2013, 44(1): 16-21.
- [22] 陈俊, 葛晓瑾, 付钰, 等. 兰花根石油醚部位化学成分研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(12): 2575-2581.
- CHEN J, GE X J, FU Y, et al. Studies on the chemical constituents from petroleum ether portion of *Cymbidium rhizoma*[J]. *World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 21(12): 2575-2581.
- [23] SONG H K, CHUNG I M, LIM J D. Chemical constituents from the fruits of *Lycium chinense* [J]. *Asian J Chem*, 2013, 25(17): 9879-9882.
- [24] 叶凤梅, 谢阳国, 朱燕, 等. 贡山八角枝叶化学成分研究(英文)[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(4): 604-608, 625.
- YE F M, XIE Y G, ZHU Y, et al. Chemical constituents of branches and leaves of *Illicium wardii* A.C.Smith[J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, 27(4): 604-608, 625.
- [25] ALAMSJAH M A, HIRAO S, ISHIBASHI F, et al. Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(11): 2186-2192.
- [26] WIRASATHIEN L, PENG SUPARP T, MORIYASU M, et al. Cytotoxic C-benzylated chalcone and other constituents of *Ellipeiopsis cherrevensis* [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2006, 29(6): 497-502.
- [27] 杨志学, 李鹏, 马廷升. 马蹄莲中有机酸的分离与结构鉴定[J]. *中南药学*, 2008(2): 140-142.
- YANG Z X, LI P, MA T S. Isolation and identification of organic acid from *Zantedeschia aethiopica* [J]. *Central South Pharmacy*, 2008(2): 140-142.
- [28] 闫建昆, 张翔宇, 石旭柳, 等. 杜仲叶中黄酮类化学成分研究[J]. *中国现代中药*, 2021, 23(4): 599-604.
- YAN J K, ZHANG X Y, SHI X L, et al. Study on flavonoids from leaves of *Eucommia ulmoides* [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2021, 23(4): 599-604.
- [29] 符佳, 陈加容, 胡樱凡, 等. 紫花地丁提取物对LPS诱导RAW 264.7细胞的体外抗炎作用[J]. *成都大学学报(自然科学版)*, 2020, 39(2): 143-147, 175.
- FU J, CHEN J R, HU Y F, et al. Anti-inflammatory effect of *Viola yedoensis* extracts on LPS-stimulated RAW 264.7 cells[J]. *Journal of Chengdu University (Natural Science Edition)*, 2020, 39(2): 143-147, 175.
- [30] 任改艳, 张步有, 黄剑林. 槲皮素对LPS诱导小鼠RAW264.7细胞炎症的保护作用[J]. *中成药*, 2019, 41(8): 1795-1799.
- REN G Y, ZHANG B Y, HUANG J L. Protective effects of quercetin on the inflammation of mice RAW264.7 cells induced by LPS[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2019, 41(8): 1795-1799.
- [31] MEOTTI F C, POSSER T, MISSAU F C, et al. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2007, 74(6): 924-931.
- [32] REN J, CHUNG S H. Anti-inflammatory effect of α -linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(13): 5073-5080.

The Anti-inflammatory Activity and Chemical Composition Identification of Different Extracted Parts of *Polygonum multiflorum* Leaves

Wu Jing¹, Xie Chuanqi¹, Xu Zhiyong¹, Wu Lei^{*}, Liu Yunfei¹, Xiong Wei¹, Xu Ganzhen²

¹Institute of Applied Chemistry, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096

²Jiangxi Xinshijia Agricultural Technology Co., Ltd., Yichun 336000, Jiangxi)

Abstract Objective: To study the chemical constituents of *Polygonum multiflorum* leaves and lay a foundation for the research and development of functional food of *P. multiflorum*. Methods: Organic solvent fractions was performed on the alcohol extract of *P. multiflorum* leaves to obtain different fractions parts such as petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, and water. Anti-inflammatory activities were carried out on different extraction parts. The fractions with strong anti-inflammatory activity were separated and purified by using silica gel and C18 column combined with semipreparative HPLC methods. Results: The ethyl acetate fraction had no cytotoxicity on RAW264.7 cells in the concentration range of 0–100 $\mu\text{g/mL}$ and showed dose-dependent inhibition of NO production. Petroleum ether and dichloromethane fractions displayed no cytotoxicity in the concentration range of 0–25 $\mu\text{g/mL}$, the inhibitory rate on NO of dichloromethane fraction (51.47%) was higher than the fraction of petroleum ether (43.91%). Eleven compounds were isolated from the fractions of ethyl acetate and dichloromethane. The chemical structures were identified as 2,3,4,6-tetrahydroxyacetophenone-3-O- β -D-glucoside (1), myricitrin (2), quercitrin (3), afzelin (4), β -sitosterol (5), n-hexacos-5, 8, 11-trienoic acid (6), hexacosane (7), α -linolenic acid (8), kaempferol-3-O-rutinoside (9), myristic acid (10) and quercetin (11). Conclusion: *P. multiflorum* leaves showed good anti-inflammatory activity, and compounds 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 were isolated and obtained from *P. multiflorum* for the first time.

Keywords *Polygonum multiflorum* Thunb. leaves; anti-inflammatory activity; chemical constituents; RAW264.7; flavonoid glycosides