

[成分分析]

银柴胡化学成分及其抗炎活性

敖 亮, 李 静, 刘宇宏

(延安大学附属医院风湿科, 陕西 延安 716000)

摘要: 目的 研究银柴胡 *Stellaria dichotoma* L. var. lanceolata Bge 的化学成分及其抗炎活性。方法 银柴胡 95% 乙醇提取物采用硅胶、MCI、反相 C₁₈ 制备液相色谱进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。采用脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应模型评价其抗炎活性。结果 从中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为 3-羟基-β-卡巴林 (1)、taraxacine A (2)、1, 2, 3, 4-四氢-1, 3, 4-三羟基-β-卡巴林 (3)、1-乙酰基-β-卡巴林 (4)、arenarine A (5)、arenarine B (6)、邻苯二甲酸二异丁酯 (7)、邻苯二甲酸二丁酯 (8)、亚麻酸甲酯 (9)、苜蓿素 (10)。化合物 1~6 对炎症因子有较强的抑制作用, IC₅₀ 4.79~9.34 μg/mL。结论 所有化合物均为首次从该植物中分离得到, 首次发现化合物 1~6 有较强的抗炎活性。

关键词: 银柴胡; 化学成分; 分离鉴定; 抗炎活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1106-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.020

Chemical constituents from *Stellaria dichotoma* and their anti-inflammatory activities

AO Liang, LI Jing, LIU Yu-hong

(Department of Rheumatism, Yanan University Affiliated Hospital, Yanan 716000, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the chemical constituents from the *Stellaria dichotoma* L. var. lanceolata Bge and their anti-inflammatory activities. **METHODS** The 95% ethnol extract from *S. dichotoma* was isolated and purified by silica, MCI, C₁₈ prep-HPLC, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. Their anti-inflammatory activities were evaluated by LPS induced RAW264.7 inflammatory cell model. **RESULTS** Ten compounds were isolated and identified as 3-hydroxy-β-carboline (1), taraxacine A (2), 1, 2, 3, 4-tetrahydro-1, 3, 4-trioxo-β-carboline (3), 1-acetyl-β-carboline (4), arenarine A (5), arenarine B (6), diisobutyl-phthalate (7), dibutyl-phthalate (8), (z, z, z)-9, 12, 15-octadecatrienoic acid, methyl ester (9), tricin (10). Compounds 1-6 had stronger anti-inflammatory activities with the IC₅₀ values of 4.79-9.34 μg/mL. **CONCLUSION** All the compounds are isolated from this plant for the first time. Their stronger anti-inflammatory activities are discovered for the first time.

KEY WORDS: *Stellaria dichotoma* L. var. lanceolata Bge.; chemical constituents; isolation and identification; anti-inflammation activities

银柴胡为石竹科植物银柴胡 *Stellaria dichotoma* L. var. lanceolata Bge. 的干燥的根, 味甘性微温, 具有清虚热、除疳积之功能, 清热凉血的功效^[1]。临床常用于治疗小儿疳积发热、腹大肢瘦、阴虚潮热、感冒高热等疾病。近年来的研究发现, 银柴胡

还具抗炎、抗过敏、扩张血管等作用^[2]。目前从中纯化分离得到的化合物有甾醇类、环肽类、生物碱类、酚酸类和黄酮类等化学成分^[3]。本实验首次对银柴胡的抗炎化学成分进行研究, 分离纯化得到 10 个化合物, 化合物 1~6 对炎症因子有较强的

收稿日期: 2017-08-24

作者简介: 敖 亮 (1981—), 男, 本科, 主治医师, 主要从事类风湿性关节炎、强直性脊柱炎的临床与治疗研究。Tel: 13038568827, E-mail: aoliang321@163.com

抑制作用, IC_{50} 4.79 ~ 9.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 尤其化合物 1~3 活性最高, 为进一步研究其抗炎作用机制以及银柴胡的临床应用提供依据。

1 仪器与材料

AVANCE III 600 MHz 核磁共振波谱仪 (美国 Bruker 公司); AE240 电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司); SW-CJ-2F 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); CO_2 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 倒置显微镜 (OLYMPUS, CKX41SF); 96 孔细胞培养板、细胞培养瓶 (美国 Costar 公司); FBS (BI 公司); 地塞米松 (美国 Sigma 公司); TNF- α 和 IL-6 检测试剂盒 (碧云天生物科技)。柱层层析硅胶、高效硅胶 GF25 薄层板 (青岛海洋化工厂); MCI (瑞典 Pharmacia 公司); Agilent1200 HPLC (美国 Agilent 公司); 半制备色谱柱 (江苏汉邦科技有限公司); 反相 C_{18} 半制备色谱柱 (250 mm \times 20 mm 和 250 mm \times 4.6 mm, 中国华谱科技有限责任公司)。高效液相色谱用甲醇为色谱级 (美国 TEDIA 公司), 制备所用试剂均为分析纯。银柴胡于 2015 年采自青海省互助县, 经中国科学院西北高原生物研究所鉴定卢学锋研究员鉴定为正品。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞株购于中国科学院典型培养物保藏中心上海细胞库。

2 提取与分离

取干燥银柴胡根部粉末 10.0 kg, 以 95% 乙醇室温提取 3 次, 每次 10.0 h, 料液比为 1 : 5, 合并提取液, 减压浓缩, 得浸膏 3.2 kg。取 2.0 kg, 加适量水混悬, 依次用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得萃取物 315.0、834.0、453.0 g。取 400.0 g 正丁醇萃取物加硅胶适量拌样, 进行硅胶柱层析, 以二氯甲烷-甲醇溶剂系统 (8 : 2) 洗脱, 减压浓缩, 得浸膏 204.0 g。取该浸膏 200.0 g, 进行 MCI 柱层析, 以 90% 甲醇-水进行洗脱, 得到洗脱液减压浓缩, 得浸膏 150.0 g (B1), B1 加适量甲醇溶解, 经高效半制备液相色谱反复纯化, 最终从 B1 中得到化合物 1 (2.3 mg)、2 (2.1 mg)、3 (1.2 mg)、4 (3.0 mg)、5 (3.1 mg)、6 (2.5 mg)、7 (2.4 mg)、8 (1.8 mg)、9 (1.7 mg)、10 (3.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色粉末, EI-MS m/z : 226.074 2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 11.91 (1H, brs, 1-H), 7.08 (1H, d, $J = 6.8$ Hz,

5-H), 6.97 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, 6-H), 8.00 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, 9-H), 7.39 (1H, td, $J = 7.9$, 1.0 Hz, 10-H), 7.16 (1H, td, $J = 7.9$, 1.0 Hz, 11-H), 7.52 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, 12-H), 11.39 (1H, brs, 3-OH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 139.1 (C-2), 155.8 (C-3), 119.9 (C-5), 99.4 (C-6), 122.0 (C-7), 124.3 (C-8), 121.5 (C-9), 126.9 (C-10), 124.6 (C-11), 112.8 (C-12), 128.1 (C-13)。以上数据与文献 [4] 报道基本一致, 故鉴定为 3-羟基- β -卡巴林。

化合物 2: 黄色粉末, EI-MS m/z : 199.087 1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 4.17 (s, 3H), 7.27 ~ 7.32 (m, 1H), 7.48 ~ 7.54 (m, 2H), 7.57 (dd, $J = 5.57$, 0.59 Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 5.57$ Hz, 1H), 8.07 (dd, $J = 7.91$, 0.88 Hz, 1H), 8.35 (brs, 1H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 53.31 (C-15), 109.35 (C-13), 111.71 (C-9), 120.03 (C-3), 121.53 (C-1), 122.26 (C-6), 123.86 (C-2), 127.60 (C-5), 129.51 (C-8), 135.61 (C-4), 139.41 (C-12), 151.25 (C-10)。以上数据与文献 [5] 报道基本一致, 故鉴定为 taraxacine A。

化合物 3: 黄色粉末, EI-MS m/z : 215.033 3 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.37 (1H, ddd, $J = 7.7$, 1.3, 0.9 Hz, H-6), 7.44 (1H, ddd, $J = 8.1$, 7.1, 1.3 Hz, H-7), 7.63 (1H, ddd, $J = 8.1$, 1.1, 0.9 Hz, H-8), 8.36 (1H, ddd, $J = 7.7$, 1.3, 0.9 Hz, H-5), 11.87 (1H, brs, H-9), 13.35 (1H, brs, H-2)。 $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 113.77 (C-8), 115.71 (C-11), 121.55 (C-5), 123.34 (C-12), 123.80 (C-6), 126.37 (C-7), 135.40 (C-20), 137.55 (C-13), 157.65 (C-3), 159.19 (C-1), 170.45 (C-4)。以上数据与文献 [6] 报道基本一致, 故鉴定为 1, 2, 3, 4-四氢-1, 2, 3, 4-三羟基- β -卡巴林。

化合物 4: 黄色粉末, EI-MS m/z : 211.079 3 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.54 (1H, d, $J = 4.88$ Hz, 3-H), 8.14 (1H, d, $J = 4.88$ Hz, 4-H), 8.15 (1H, dd, $J = 6.83$, 1.46 Hz, 5-H), 7.33 (1H, ddd, $J = 8.32$, 6.34, 1.95 Hz, 6-H), 7.61 (1H, ddd, $J = 8.32$, 6.65, 1.46 Hz, 7-H), 7.60 (1H, dd, $J = 6.65$, 1.95 Hz, 8-H), 10.31 (1H, brs, 9-H), 2.89 (3H, s, $-\text{COCH}_3$)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 203.42 ($-\text{CO}-$), 141.21 (C-1),

138.22 (C-3), 136.11 (C-8 a), 135.32 (C-9 a), 131.43 (C-4b), 129.21 (C-6), 121.98 (C-5), 121.62 (C-4a), 120.68 (C-7), 119.10 (C-4), 111.87 (C-8), 25.86 (-CH₃)。以上数据与文献 [7] 报道基本一致, 故鉴定为1-乙酰基-β-卡巴林。

化合物 5: 淡黄色粉末, EI-MS m/z : 241.105 5 [M + H]⁺。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.48 (d, 1H, 3-H, $J=4.9$ Hz), 8.15 (d, 1H, 4-H, $J=4.9$ Hz), 8.14 (dd, 1H, 5-H, $J=7.8, 0.8$ Hz), 7.61 (m, 2H, 7-H, 8-H), 7.34 (ddd, 1H, 6-H, $J=7.9, 5.3, 2.8$ Hz), 5.24 (s, 2H, 2'-H), 3.61 (s, 3H, -OCH₃)。¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 199.47 (-CO-), 141.31 (C-C-8 a), 138.110 (C-3), 135.23 (C-9 a), 134.11 (C-1), 131.67 (C-4a), 129.51 (C-7), 121.76 (C-5), 120.93 (C-6), 120.37 (C-4b), 119.41 (C-4), 112.12 (C-8), 74.88 (C-2'), 59.57 (-OCH₃)。以上数据与文献 [8] 报道基本一致, 故鉴定为 arenarine A。

化合物 6: 淡黄色粉末, EI-MS m/z : 243.106 5 [M + H]⁺。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.34 (d, 1H, 3-H, $J=5.3$ Hz), 8.11 (d, 1H, 5-H, $J=7.9$ Hz), 7.89 (d, 1H, 4-H, $J=5.3$ Hz), 7.53 (m, 2H, 8-H, 7-H), 7.28 (ddd, 1H, 6-H, $J=7.9$ Hz, 6.8, 1.6 Hz), 5.38 (t, 1H, 1'-H, $J=6.2$ Hz), 3.88 (dd, 1H, 2'-H, $J=9.5, 6.2$ Hz), 3.84 (dd, 1H, 2'-H, $J=9.5, 6.2$ Hz), 3.48 (s, 3H, -OCH₃)。¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 143.23 (C-1), 140.74 (C-8 a), 137.19 (C-3), 133.88 (C-9 a), 130.11 (C-4 a), 128.83 (C-7), 121.94 (C-5), 121.49 (C-4b), 120.20 (C-6), 114.35 (C-4), 112.04 (C-8), 77.00 (C-2'), 72.43 (C-1'), 59.46 (-OCH₃)。以上数据与文献 [8] 报道基本一致, 故鉴定为 arenarine B。

化合物 7: 淡黄色油状物, EI-MS m/z : 287 [M + H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.73 (1H, dd, $J=5.7, 3.3$ Hz), 7.67 (1H, dd, $J=5.7, 3.3$ Hz), 4.09 (2H, d, $J=6.4$ Hz), 2.07 (1H, m), 0.95 (6H, d, $J=6.7$ Hz), 0.95 (6H, d, $J=6.7$ Hz)。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 169.5 (C-7), 133.7 (C-1, 6), 129.9 (C-2, 5), 132.4 (C-3, 4), 28.9 (C-2', 2''), 19.5 (C-3', 3''), 19.5 (C-4', 4''), 72.7 (C-1', 1'')。以上数据与文献 [9] 报道基本一致, 故鉴定为邻苯二甲酸二异丁酯。

化合物 8: 无色油状液体, EI-MS m/z : 287 [M + H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.75 (1H, m), 7.63 (1H, m), 4.29 (2H, m), 1.47 (2H, m), 1.75 (2H, m), 0.98 (3H, m)。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 169.5 (C-7), 133.7 (C-1, 6), 129.9 (C-2, 5), 132.4 (C-3, 4), 66.8 (C-1', 1''), 31.9 (C-2', 2''), 20.4 (C-3', 3''), 14.3 (C-4', 4'')。以上数据与文献 [10] 报道基本一致, 故鉴定为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 9: 无色油状液体, ESI-MS m/z : 293 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 5.34 (6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 3.69 (3H, s, -OCH₃), 2.07 (4H, t, $J=5.4$ Hz, H-8, H-17), 1.8 (2H, m, H-3), 1.29 ~ 1.33 (8H, brs, H-4, 5, 6, 7), 0.98 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-18)。¹³C-NMR (150 Hz, CDCl₃) δ: 174.4 (C-1), 132.2 (C-16), 130.5 (C-9), 128.5 (C-11), 128.4 (C-12), 127.9 (C-14), 127.3 (C-10), 51.5 (-OCH₃), 34.6 (C-2), 29.7 (C-7), 29.4 (C-6), 29.3 (C-5), 29.3 (C-4), 27.3 (C-8), 25.7 (C-11), 25.6 (C-14), 24.8 (C-3), 20.7 (C-17), 14.5 (C-18)。以上数据与文献 [11] 报道基本一致, 故鉴定为亚麻酸甲酯。

化合物 10: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 333 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.83 (6H, s, C3', C5'-OCH₃), 6.18 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-6), 6.54 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-8), 6.91 (1H, s, H-3), 7.34 (1H, m, H-2', 6'), 12.98 (1H, s, 5-OH)。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 181.9 (C-4), 164.2 (C-2), 164.2 (C-4'), 163.8 (C-7), 161.5 (C-9), 157.5 (C-5), 148.5 (C-3', 5'), 139.8 (C-1'), 120.6 (C-10), 104.6 (C-2', 6'), 103.8 (C-3), 98.9 (C-6), 94.3 (C-8), 56.5 (C3', C5'-OCH₃)。以上数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定为苜蓿素。

4 抗炎活性筛选

4.1 供试品配制 取化合物 1~6 以及阳性对照药物地塞米松, 分别用 DMSO 配制成 50 mg/mL 贮存液, 分别稀释成 1、5、10、15、25 μg/mL (所选化合物以及阳性药物浓度均未对细胞产生毒性作用) 的待测试品样品溶液。

4.2 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 10% 进口胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基进行培养, 置于 5% CO₂、37 °C、饱和湿度的细胞培养箱中。待细胞生长至对数生长期时进行传代, 2 ~ 3 d 传代 1 次。取 3 代后的细胞用于炎症因子抑制实验。

4.3 炎症因子检测 取对数生长期的 RAW264.7 细胞用 0.25% 胰酶消化约 1 min, 吸去胰酶, 用含有 10% 进口 FBS 的 DMEM 培养基中和胰酶作用, 轻轻吹打成单细胞悬液, 离心弃上清液, 用完全培养基重悬细胞并计数后, 调整细胞悬液至 1 × 10⁵ 个细胞/mL, 按每孔 100 μL 的培养体积接种至 96 孔培养板, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 12 h, 然后饥饿处理 12 h, 吸去每孔上清液, 每孔再加入 100 μL 无血清 DMEM 培养基配置的相应分组培养液, 随机分为对照组、LPS (1 μg/mL) 组、LPS (1 μg/mL) + 地塞米松 (0.5、1、3、5、7 μg/mL) 组和 LPS (1 μg/mL) + 化合物 1 ~ 6 (1、5、10、15、25 μg/mL) 组, 加入相应药物后, 每组设 3 个复孔, 置于 5% CO₂、37 °C、饱和湿度条件下培养 24 h 后, 取上清液用于肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白细胞介素-6 (IL-6) 炎症因子的表达情况检测, 并最终计算化合物的 IC₅₀ 值 (结果见表 1)。

表 1 抗炎活性实验 IC₅₀ 值 (IC₅₀, μg/mL)

Tab. 1 IC₅₀ values in anti-inflammatory tests (IC₅₀, μg/mL)

组别	地塞米松	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5	化合物 6
TNF-α	2.53	5.79	5.73	4.79	5.76	7.34	6.89
IL-6	3.15	6.74	5.21	7.86	7.97	9.34	8.89

注: IC₅₀ 是指被测量的拮抗剂的半抑制浓度

在炎症因子抑制作用筛选结果中, 阳性药地塞米松对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放的促炎因子 TNF-α 和 IL-6 的 IC₅₀ 分别为 2.53 μg/mL (95% CI 为 1.82 ~ 3.41 μg/mL) 和 3.15 μg/mL (95% CI 为 2.38 ~ 4.26 μg/mL)。化合物 1 ~ 6 对 LPS 刺激

的 RAW264.7 细胞释放的促炎因子 TNF-α 和 IL-6 均具有不同程度的抑制作用, 显示了较好的体外抑制促炎因子的活性作用, 其中化合物 1、2 和 3 对不同炎症因子的抑制作用分别表现出最强的效果, 但是化合物 1 ~ 6 对炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的抑制效果均弱于阳性药物地塞米松的抑制效果。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 22-23.

[2] 王秀芬, 由会玲. 银柴胡的药理作用与临床应用研究 [J]. 河北中医学报, 2012, 27(3): 43-44.

[3] 叶方, 杨光义, 王刚, 等. 银柴胡的研究进展 [J]. 医药导报, 2012, 31(9): 1174-1177.

[4] Jiao W H, Gao H, Li C Y, et al. Quassidines A-D, bis-β-carboline alkaloids from the stems of *Picrasma quassioides* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(2): 167-171.

[5] Beveridge R E, Gerstenberger B S. A direct copper-catalyzed route to pyrrolo-fused heterocycles from boronic acids [J]. *Tetrahedron Lett*, 2012, 53(5): 564-569.

[6] Koike K, Ohmoto T, Ikeda K. β-Carboline alkaloids from *Picrasma quassioides* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(9): 3060-3061.

[7] Zhou T S, Ye W C, Wang Z T, et al. β-Carboline alkaloids from *hypodematium squamuloso-pilosum* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(6): 1807-1809.

[8] Wu F E, Koike K, Nikaido T, et al. New β-carboline alkaloids from a Chinese medicinal plant, *Arenaria kansuensis*. Structures of arenarines A, B, C, and D [J]. *Chem Pharm Bul*, 1989, 37(7): 1808-1809.

[9] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册: 核磁共振分册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.

[10] 严振, 田洋, 马跃平, 等. 雷公藤根化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(1): 23-24, 32.

[11] 王晓彤, 冉小库, 徐煜彬, 等. 亚贡叶化学成分分离与鉴定 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(9): 1111-1113.

[12] 贺庆, 朱恩圆, 王峰涛, 等. 寻甸党参的黄酮类成分研究 [J]. 中国药学 (英文版), 2004, 13(3): 212-213.