

溪黄草药用部位的化学成分研究

林俊廷

广州医科大学附属第三医院 广东 广州 510170

【摘要】：运用分离提纯鉴定等技术进一步研究溪黄草所含的二萜类化合物，并对其进行活性筛选，探究其所具有的药理活性。通过硅胶、凝胶以及反向硅胶等色谱技术对溪黄草乙醇提取物进行纯化分离。应用核磁、质谱以及文献对比鉴定纯化的化合物。利用 NO 抑制模型和修复 H₂O₂ 损伤细胞模型筛选了化合物的抗炎抗氧化活性。研究发现：溪黄草除了综述所得的二萜类化合物，还含有 Graciliflorin E(1),Geradianin(2), Hinokiol(3), 16-acetoxylsugiol(4) 和 Gerardianin B(5) 等 5 种二萜，并均具有抗氧化，抗一氧化氮活性，均能够保护细胞免受伤害，其中化合物 3, 4 抗一氧化氮效果出色，化合物 2 抗氧化效果最明显，在中药市场具有良好的市场前景。

【关键词】：溪黄草；二萜；色谱纯化；核磁结构鉴定；抗氧化活性；抗一氧化氮活性

DOI:10.12417/2811-051X.26.12.033

引言

南药溪黄草的基原为唇形科香茶菜属植物纤花香茶菜 *Isodon.iophanthoides* 的地上干燥部分；或唇形科香茶菜属植物纤花香茶菜 *Isodon.iophanthoides* var.*graciliflora* 及溪黄草 *Isodon.serra* 的地上干燥部分；或为唇形科香茶菜属植物线纹香茶菜 *Isodon.striatus* 及溪黄草 *Isodon.serra* 的全草等三个来源。今溪黄草一般指 *Isodon.serra*。溪黄草在世界范围内大约有 150 种，主要分布在热带和亚热带。因其喜生于溪边湿地和海拔 190~1800m 山谷潮湿处，故溪黄草广泛分布于我国长江以南的广东省，福建省，湖南省等地。

溪黄草的主要药理作用有保肝，清热利湿，退黄，凉血散瘀，抗病毒和调节免疫，常用于湿热泻痢，跌打肿痛，瘀血积滞，腹胀肋痛等症。溪黄草还具有利胆作用。溪黄草水煎剂可显著增加大鼠胆汁流量、降低胆汁中胆固醇含量，但对胆红素和胆汁酸含量无影响。溪黄草在临床上可用于治疗急性黄疸型肝炎，急性胆囊炎，乙型肝炎，肠炎，目前以为中成药消炎利胆片、胆石通胶囊及复方胆通胶囊的原料之一，近年市场上更是出现了溪黄草冲剂，溪黄草袋泡茶等具有市场前景的保健产品，广受大众欢迎。

1 实验内容与结果

1.1 实验内容

取干燥溪黄草 15kg，用 200L 的 95%乙醇在室温下浸泡提取。将得到的乙醇浸泡提取液经浓缩至无醇味后，加适量水使其分散混悬溶解。再经乙酸乙酯萃取，得到 650g 乙酸乙酯层萃取物和水层萃取物。其中乙酸乙酯层萃取物经硅胶柱色谱，共得到 18 个组分，组分 14 (A-14) 再次经硅胶柱色谱洗脱得 10 个亚分，亚分 6 (B-6) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱，洗脱剂为 80%甲醇，得到 42 次亚分，次亚分 26 (C-26) 经赛普锐思高效液相色谱仪制备 (RP-18,10mm×250mm,5μm,美国安捷伦公司) (45%甲醇) 分离得到化合物 1-5，化合物 1 (3 mg)、

化合物 2 (1.4 mg)、化合物 3 (2.1 mg)、化合物 4 (2.7 mg) 和化合物 5 (2.1mg)。

1.2 化合物的波谱数据

1.2.1 化合物 1:Graciliflorin E

化合物 1 为白色无定形粉末，易溶于甲醇、氯仿。ESI-MS 给出准分子离子峰 $m/z:329.2[M+H]^+$ ，确定分子式为 C₂₁H₂₈O₃。

¹H-NMR(400 MHz MeOD)δ:1.28(3H,s,H-19),1.37(3H,s,H-18),1.63(3H,s,H-17),1.66(3H,s,H-16),1.67(2H,s,H-2''),1.68(3H,s,H-20),1.71(2H,m,H-1''),1.71(2H,m,H-3''),1.74(2H,m,H-2β),1.7(2H,m,H-3β),3.49(2H,m,H-1β),3.24(3H,s,OMe),6.18(1H,s,H-6-OH),6.45(2H,s,H-11),7.60(2H,s,H-14),9.51(1H,s,H-12-OH);

¹³C-NMR(100 MHz MeOD)δ:40.5(C-1),18.6(C-2),34.1(C-3),38.1(C-4),174.9(C-5),141.5(C-6),184.2(C-7),123.4(C-8),138.3(C-9),42.2(C-10),116.0(C-11),146.4(C-12),127.2(C-13),123.4(C-14),80.5(C-15),26.1(C-16),26.0(C-17),33.1(C-18),24.6(C-19),29.3(C-20),51.0(OMe)。

1.2.2 化合物 2:Geradianin

化合物 2 为白色无定形粉末，易溶于甲醇、氯仿。ESI-MS 给出 $m/z:549.3[M+H]^+$ ，确定分子式为 C₂₆H₂₈O₁₃。

¹H-NMR(400 MHz MeOD) δ :2.03(1H,m,H-8),2.93(1H,m,H-299),3.14(1H,m,H-499),3.24(1H,m,H-599),3.24(1H,m,H-399),4.04(1H,m,H-699),4.04(1H,m,H-9),4.07(1H,m,H-199),4.43(1H,m,H-99),4.78(1H,m,H-7)5.93(2H,s,O-CH₂-O),6.76(1H,m,H-5),6.87(1H,m,H-59),6.98(1H,m,H-6),7.14(1H,m,H-2),7.58(1H,m,H-29),7.84(1H,m,H-69);

¹³C-NMR(100 MHz MeOD) δ :135.6(C-1),107.3(C-2),147.5(C-3),147.8(C-4),102.8(C-5),126.5(C-6),85.3(C-7),59.3(C-8),61.3(C-9),130.6(C-19),109.6(C-29),147.2(C-39),151.7(C-49),107.2(C-59),120.5(C-69),199.3(C-79),86.7(C-89),107.3(C-99),101.9(C-199),67.4(C-299),70.1(C-399),73.6(C-499),76.4(C-599),77.1(C-6

99),100.9(O-CH₂-O),100.9(O-CH₂-O)。

1.2.3 化合物 3:Hinokiol

化合物 3 为白色无定形粉末, 易溶于甲醇、氯仿。ESI-MS 给出 m/z:319.2[M+H]⁺, 确定分子式为 C₂₀H₃₂O₁₃。

¹H-NMR(400 MHz MeOD)δ:0.87(3H,s,H-18),1.03(3H,s,H-19),1.14(3H,s,H-20),1.20(3H,m,H-16),1.23(3H,m,H-17),1.24(1H,m,H-15),1.50(1H,m,H-1^{''}),1.72(1H,m,H-2^{''}),1.74(1H,m,H-6^{''}),1.76(1H,m,H-2β),1.84(1H,m,H-6β),2.10(1H,m,H-1β),2.78(1H,m,H-7^{''}),2.85(1H,m,H-7β),3.21(1H,m,H-15),3.50(1H,m,H-3),6.63(1H,m,H-11),6.83(1H,s,H-14);

¹³C-NMR(100 MHz MeOD)δ:37.2(C-1),29.6(C-2),77.0(C-3),44.1(C-4),18.8(C-6),

31.6(C-7),127.3(C-8),148.0(C-9),37.7(C-10),111.2(C-11),150.9(C-12),131.9(C-13),126.8(C-14),28.2(C-15),22.5(C-16)22.8(C-17),15.6(C-18),24.6(C-20),29.6(C-20)。

1.2.4 化合物 4:16-acetoxylsugirol

化合物 4 为白色无定形粉末, 易溶于甲醇、氯仿。ESI-MS 给出 m/z:359.4[M+H]⁺, 确定分子式为 C₂₂H₃₀O₄。

¹H-NMR(600 MHz CDCl₃)δ:7.92(s,1H,H-14),6.87(s,1H,H-11),4.26(m,2H,H-16),3.41(m,1H,H-15),2.72(m,1H,H-6^{''}),2.66(m,1H,H-6β),2.41(m,1H,H-1β),2.16(s,3H,H-22),1.88(m,1H,H-5),1.79(m,1H,H-2β),1.74(m,1H,H-3β),1.68(m,1H,H-2^{''}),1.60(m,1H,H-3^{''}),1.59(m,1H,H-1^{''}),1.45(m,3H,H-17),1.17(s,3H,H-20),1.01(s,3H,H-19),0.95(s,3H,H-18);

¹³C-NMR(150 MHz CDCl₃)δ:36.2(C-1),19.1(C-2),42.5(C-3),34.1(C-4),50.2(C-5),36.4(C-6),200.1(C-7),125.4(C-8),155.9(C-9),38.5(C-10),111.3(C-11),160.2(C-12),126.8(C-13),124.8(C-14),33.1(C-15),70.0(C-16),17.1(C-17),33.1(C-18),22.1(C-19),24.2(C-20),175.5(C-21),21.5(C-22)。

1.2.5 化合物 5:Gerardianin B

化合物 5 为黄色粉末, 易溶于甲醇、氯仿。ESI-MS 给出 m/z:319.3[M+H]⁺, 确定分子式为 C₂₂H₂₉O₆。

¹H-NMR(600 MHz CDCl₃)δ:4.65(m,1H,H-7),4.32(m,1H,H-16β),4.31(m,1H,H-16^{''}),3.42(m,1H,H-15),2.66(m,1H,H-1β),2.25(m,1H,H-6β),2.05(s,3H,H-22),1.69(m,1H,H-2β),1.56(m,1H,H-6^{''}),1.50(m,1H,H-2^{''}),1.50(m,1H,H-3β),1.41(s,3H,H-20),1.25(d,J=7.0 Hz,3H,H-17),1.18(m,1H,H-3^{''}),1.10(m,1H,H-5),1.00(m,1H,H-1^{''}),0.95(s,3H,H-19),0.89(s,3H,H-18);¹³C-NMR(150 MHz CDCl₃)δ:34.1(C-1),20.0(C-2),42.1(C-3),34.2(C-4),46.4(C-5),26.2(C-6),63.5(C-7),144.2(C-8),148.1(C-9),40.1(C-10),189.0(C-11),153.3(C-12),120.1(C-13),184.5(C-14),29.7(C-15),68.3(C-16),15.1(C-17),34.0(C-18),20.9(C-19),18.6(C-20),173.3(C-21),21.8(C-22)。

3 活性筛选

3.1 抑制 NO 生成活性筛选

3.1.1 实验方法

诱导并取小鼠腹腔巨噬细胞, 计数, 铺板。采用含有 10% 胎牛血清 100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 将细胞在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中传代培养。

实验组分为空白对照组, LPS 组, 给药组和 DEX 组。对照组只加入培养基, DEX 组中加入 LPS 和 1μM 的地塞米松, 给药组加入 LPS 和 10μM 的待测样品, 在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 24 h, 取上清液 100μL, 加入 Griess 试剂 10 min 后, 用酶标仪 540 nm 测定 OD (光密度) 值, 根据 NO 标准曲线计算 NO 生成量, 同时通过 MTT 法测定各组中细胞生长的抑制率。

3.1.2 化合物的抑制 NO 生成活性筛选结果

表 1 化合物抑制 NO 生成活性筛选结果

化合物 编号	筛选模型	剂量 (mol/L)	NO 生成量 抑制率(%)	MTT 法测定的生 长抑制率(%)
空白	小鼠巨噬细胞 NO 生成	/	/	/
LPS	NO	/	/	/
DEX	NO	105	/	/
1	NO	105	3.2	7.1
2	NO	105	5.3	6.9
3	NO	105	13.4	5.1
4	NO	105	16.4	4.8
5	NO	105	5.4	7.3

以上实验应用 LPS 诱导原代小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子 NO 生成模型, 通过测定 NO 生成量抑制率 (%) 和生长抑制率 (%) 的变化来筛选有效的抗炎活性化合物, 结果表明, 以上化合物 3,4 有较明显的抗炎活性。

3.2 抗氧化活性筛选

3.2.1 实验方法

SK-N-SH 细胞的培养基为含有 10%胎牛血清, 100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 按常规方法于 37℃、5%CO₂ 条件下培养, 隔天换液, 待细胞长至亚融合状态时进行分组实验。取生长状态良好的同一代的 SK-N-SH 细胞消化、离心、重悬, 将细胞 (105 个/ml) 接种于 96 孔板, 200μL/孔, 于 37℃、5%CO₂ 条件下培养 36h 左右, 观察细胞形态与密度 (形态呈梭形, 密度至 80%时进行实验)。实验设

立两组：正常对照，加入 100 μ L 正常培养基，培养 24h。受筛药物组（药物终浓度 10-5 M），加入 100 μ L 受筛药物培养 24h 后加入过氧化氢损伤（12h，终浓度 0.4 mM）。用 MTT 比色法检测细胞活力，将细胞(105 个/mL 板，200 μ L/孔，按分组处理，终止培养前 4h 每孔加入 20 μ L MTT（5 mg/ml），4h 后接种清于 96 孔吸去上，加入 150L DMSO，溶解结晶物，酶标仪测 OD 值，检测波长 570nm。

3.2.2 化合物的抗氧化活性筛选结果

表 2 化合物的抗氧化活性筛选结果

化合物编号	细胞存活率(%)	改善率(%)
1	59.4	12.7
2	70.2	44.2
3	60.1	13.0
4	63.3	24.1
5	59.9	12.8

结果表明，在药物浓度为 10-5 M 下，化合物 1、2、3、4、5 均对 H₂O₂ 致细胞损伤有一定的保护作用，尤其是化合物 2 值得进一步研究。

4 结论

本课题对溪黄草所含二萜类化合物进行了药理活性筛选，结果显示其具有抗菌，抗肿瘤细胞等中草药普遍所含的药理作用。为进一步研究此类化合物的其他药理活性，对分离得到的 5 个化合物进行了药理模型的活性筛选。结果表明：

（1）在抗氧化活性实验中 1、2、3、4、5 在 10-5 M 水平下，对 H₂O₂ 致 SK-N-SH 细胞损伤有一定的保护作用，即具有一定的抗氧化活性。

（2）在抑制 NO 生成活性筛选实验中，所筛选化合物在 10-5M 水平下，化合物 3、4 对 LPS 诱导原代小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成有明显的抑制作用。

以上结果显示，所得的 5 个二萜类化合物均具有抗氧化活性，抗一氧化氮活性，能够避免细胞损伤，减缓衰老，提高免疫力同时抑制癌细胞的生长，可以作为优秀的抗癌药物供临床治疗使用，具有很好的发展前景。

参考文献:

- [1] 孙礼芹,钱菲,李医明,等.多基源溪黄草的化学成分和药理作用研究进展[J].上海中医药大学学报,2020,34(6):88-98.
- [2] 邓乔华.溪黄草资源分布与开发利用的研究[J].今日药学,2009,19(9):21-25+8.
- [3] 刘银花,梁利球,沈婕,等.溪黄草与虎杖煎剂利胆作用的实验研究[J].时珍国医国药,2009,20(7):1626-1627.