

腰痹通胶囊化学成分研究 (II)

刘 瑞^{1,2}, 宋亚玲^{2,3}, 刘莉娜^{2,3}, 王雪晶^{2,3}, 罗 鑫^{2,3}, 顾 睿^{2,3}, 黄文哲^{2,3}, 王振中^{2,3}, 萧 伟^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要:目的 对腰痹通胶囊内容物醇提抗炎活性部位的化学成分进行研究。方法 采用体外抗炎模型进行活性部位的筛选, 运用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 以及制备型 HPLC 等方法对活性部位进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据对得到的单体化合物进行结构鉴定; 采用脂多糖 (LPS) 诱导的大鼠胸主动脉平滑肌细胞 (A7r5) 炎症反应模型, 考察化合物对炎症因子 NO 的影响, 评价其抗炎活性。结果 从腰痹通胶囊内容物中共分离得到 11 个化合物, 包括 2 个有机酸、1 个生物碱、2 个洋川芎内酯、1 个倍半萜和 5 个香豆素类成分, 分别鉴定为咖啡酸乙酯 (1)、阿魏酸 (2)、延胡索甲素 (3)、洋川芎内酯 H (4)、洋川芎内酯 I (5)、藜本酚 (6)、哥伦比亚苷元 (7)、尤劳帕替醇 (8)、meranzin hydrate (9)、angelitriol (10)、6-[1(R),2(R)-1,2,3-trihydroxy-3-methylbutyl]-7-methoxycoumarin (11)。化合物 1~6 对 LPS 刺激的 A7r5 细胞炎症因子 NO 具有不同程度的抑制作用。结论 化合物 1、3、6、8~11 为首次从该复方中分离得到, 有机酸和洋川芎内酯类化合物可能是腰痹通胶囊抗炎的主要活性成分。

关键词: 腰痹通胶囊; 抗炎; 咖啡酸乙酯; 洋川芎内酯; 藜本酚

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0549-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.007

Studies on chemical constituents in Yaobitong Capsule (II)

LIU Rui^{1,2}, SONG Ya-ling^{2,3}, LIU Li-na^{2,3}, WANG Xue-jing^{2,3}, LUO Xin^{2,3}, GU Rui^{2,3}, HUANG Wen-zhe^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, Xiao Wei^{1,2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory constituents from the ethanol extract of Yaobitong Capsule. **Methods** The chemical constituents were isolated by repeated silica gel column, Sephadex LH-20, and preparative HPLC. The structures were identified by various spectral data analysis and physicochemical properties. The anti-inflammatory effects were evaluated by *in vitro* model of LPS-stimulated rat thoracic aortic smooth muscle cells (A7r5). **Results** Eleven compounds were isolated from the contents of the capsule, including 2 organic acids, 1 alkaloid, 2 senkyunolides, 1 sesquiterpene, and 5 coumarins, which identified as ethyl caffeate (1), ferulic acid (2), corydaline (3), senkyunolide H (4), senkyunolide I (5), ligustiphenol (6), columbianetin (7), ulopterol (8), meranzin hydrate (9), angelitriol (10), and 6-[1(R),2(R)-1,2,3-trihydroxy-3-methylbutyl]-7-methoxycoumarin (11). Compounds 1—6 showed the anti-inflammatory activity in different degrees. **Conclusion** Compounds 1, 3, 6, and 8—11 are isolated from Yaobitong Capsule for the first time, and organic acids and senkyunolide compounds may be the anti-inflammatory pharmacodynamic material bases of Yaobitong Capsule.

Key words: Yaobitong Capsule; anti-inflammatory; ethyl caffeate; senkyunolide; ligustiphenol

收稿日期: 2017-09-13

基金项目: 科技部重大新药创制项目: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 刘 瑞 (1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药复方药效物质基础研究。

Tel: 18761380946 E-mail: liuruiwfm@163.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337 Fax: (0518)81152327 E-mail: kanionlunwen@163.com

腰痹通胶囊原方源于中国中医科学院首席研究员、中国中医科学院骨伤科研究所孙树椿主任医师在长期临床实践中有效治疗腰椎间盘突出症的经验总结,由三七、川芎、延胡索、白芍、牛膝、狗脊、熟大黄、独活 8 味中药经现代化工艺研制而成,全方具有活血化瘀、祛风除湿、行气止痛之功效,用于血瘀气滞、脉络闭阻所致腰痛,临床用于治疗腰椎间盘突出症具有良好的效果^[1]。近年来腰痹通胶囊的临床用量不断增加,其销量已在治疗腰椎间盘突出等疾病的中成药中位于前列,疗效显著、无毒副作用^[2]。目前对腰痹通胶囊的研究主要集中在药理及临床等方面^[3-5],而对于复方化学成分及其变化未见报道。为了阐明该临床经验方治疗疾病的物质基础,探索中药复方化学的研究方法,本课题组对腰痹通胶囊进行了系统的化学成分研究,前期研究已从中分离得到 16 个化合物。本实验对该方进行了进一步研究,并且采用脂多糖(LPS)诱导的大鼠胸主动脉平滑肌细胞(A7r5)炎症反应模型对腰痹通胶囊及其分离部位进行了活性评价,确定 75%乙醇提取物经硅胶柱色谱石油醚-醋酸乙酯(10:1、5:1 和 3:1)洗脱部位为抗炎活性部位,在此基础上对活性部位进行了系统的化学成分研究,从中分离得到了 11 个化合物,分别为咖啡酸乙酯(ethyl caffeate, **1**)、阿魏酸(ferulic acid, **2**)、延胡索甲素(corydaline, **3**)、洋川芎内酯 H(senkyunolide H, **4**)、洋川芎内酯 I(senkyunolide I, **5**)、藁本酚(ligustiphenol, **6**)、哥伦比亚苷元(columbianetin, **7**)、尤劳帕替醇(ulopterol, **8**)、meranzin hydrate(**9**)、angelitriol(**10**)、6-[1(R),2(R)-1,2,3-thihydroxy-3-methylbutyl]-7-methoxycoumarin(**11**)。化合物 **1**、**3**、**6**、**8**~**11** 为首次从腰痹通胶囊中分离得到,采用 LPS 诱导的 A7r5 炎症反应模型,对分离到的化合物 **1**~**11** 进行了抗炎活性测定,其中,化合物 **1**~**6** 对 LPS 刺激的 A7r5 细胞炎症因子 NO 具有较强的抑制作用,为进一步研究其抗炎作用机制以及腰痹通胶囊的临床应用提供依据。

1 仪器与材料

Bruker-AV-400 型核磁共振光谱仪(Bruker 公司); Agilent 1260 制备型高效液相色谱仪(Agilent 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); 二氧化碳培养箱(Thermo scientific 3100); 倒置显微镜(OLYPUS, CKX41SF); 96 孔细胞培养

板(美国 Costar); 25 cm² 细胞培养瓶(美国 Costar); 酶标仪(MD); 移液枪(Eppendorf); BXM-30R 立式压力蒸气灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); LD4-2A 离心机(北京众益中和生物技术有限公司); 细胞自动计数仪(Invitrogen, C1028)。

制备型色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ [250 mm×21.2 mm, 5 μm, 月旭科技(上海)股份有限公司], 柱色谱硅胶(200~300 目)、薄层色谱硅胶 G(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20(Pharmacia 公司); 乙腈(色谱纯, Oceanpak 公司, 瑞典); 石油醚、甲醇、醋酸乙酯(分析纯, 南京化学试剂有限公司); DMEM 培养基、胰蛋白酶(Gibco 公司), 胎牛血清(Hyclone), LPS、DMSO(Sigma 公司); NO 检测试剂盒(碧云天生物技术研究所有)。

腰痹通胶囊(批号 150821)由江苏康缘药业股份有限公司提供; A7r5 购于中国科学院典型培养物保藏中心上海细胞库。

2 方法

2.1 提取与分离

腰痹通胶囊内容物(3.0 kg), 用 75%乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 提取液减压浓缩成浸膏。浸膏(145 g)用硅胶粗处理, 先用石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱(50:1、20:1、10:1、5:1、3:1、1:1、0:1), 再用醋酸乙酯-甲醇(3:1、0:1)洗脱, 共分为 9 段(Fr. 1~9)。采用 LPS 诱导的 A7r5 炎症反应模型对这 9 个部位进行了活性评价, 确定 Fr. 3~5 为抗炎活性部位。取 Fr. 3(10:1, 18.81 g)经 Sephadex LH-20 分离, 甲醇洗脱, 分为 3 段(Fr. 31~33); 其中 Fr. 32 经硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯(20:1→0:1)梯度洗脱得到 6 个流分 Fr. A1~A6; Fr. A1 重结晶得到化合物 **1**(268.8 mg); Fr. A4 经制备型 HPLC, 以乙腈-水(18:82)洗脱, 得到化合物 **2**(123.2 mg)和 **3**(15.6 mg); Fr. A5 经制备型 HPLC, 以乙腈-水(22:78)洗脱, 分离得到化合物 **4**(9.8 mg)。取 Fr. 4(5:1, 16.91 g)经制备型 HPLC, 以乙腈-水(23:77)洗脱, 得到化合物 **5**(5.6 mg)、**6**(11.3 mg)和 **7**(7.5 mg)。Fr. 5(3:1, 25.3 g)经硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯(20:1→0:1)梯度洗脱得到 3 个流分 Fr. B1~B3; Fr. B1 经 Sephadex LH-20, 以甲醇洗脱后经制备型 HPLC, 以乙腈-水(22:78)洗脱, 得到化合物 **8**(32 mg)和 **9**(17 mg); Fr. B2 经制备型 HPLC, 以乙腈-水(23:77)洗脱, 得到化合

物 **10** (26 mg); Fr. B3 经制备型 HPLC, 以乙腈-水 (23 : 77) 洗脱, 得到化合物 **11** (9 mg)。

2.2 抗炎活性研究

2.2.1 供试品配制 取化合物 **1**~**11**, 分别溶于 DMSO 中配制成浓度为 50 mmol/L 的储存液, 加药时用无血清 DMEM 培养液稀释成 50 μ mol/L 的供试品药液。

2.2.2 细胞培养 A7r5 细胞接种入 25 cm² 的细胞培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。细胞隔 2 d 换液, 待细胞培养至长满细胞瓶 80%~90% 的情况下, 弃上清, PBS 缓冲液清洗 1 遍, 弃上清, 加入 0.25% 胰酶 2 mL, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱消化 5 min。加入等体积的完全培养基终止消化, 将细胞从培养瓶上轻轻吹打下来, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 加入完全培养基吹打混悬, 以 1 : 3 的接种密度传代, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。

2.2.3 化合物对 A7r5 细胞生长的影响 A7r5 细胞传代至第 3 代, 调整细胞密度至 8×10^4 /mL, 按每孔 100 μ L 接种至 96 孔培养板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h, 弃上清, PBS 清洗细胞孔 1 遍。随机分为对照组、化合物 **1**~**11** 组 (50 μ mol/L), 对照组每孔加入含有 0.1% DMSO 的无血清培养基 100 μ L, 化合物组加入无血清培养基配制的相应药液 100 μ L, 每组设 3 个复孔, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 20 h。每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L, 4 h 后酶标仪于波长 450 nm 处检测吸光度值 (A_{450})。

2.2.4 炎症因子 NO 的检测 细胞处理方法同“2.2.3”项。随机分为对照组、模型组、化合物 **1**~**11** 组 (50 μ mol/L), 对照组每孔加入含有 0.1% DMSO 的无血清培养基 100 μ L, 模型组加入含有 LPS (3 μ g/L) 的无血清培养基 100 μ L, 化合物组加入用含 3 μ g/L LPS 的无血清培养基配制的相应药液 100 μ L (50 μ mol/L), 每组设 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。取上清 50 μ L, 采用 NO 检测试剂盒按照说明书检测 NO 炎症因子, 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{NO}_{\text{模型组}} - \text{NO}_{\text{LPS+药物组}}) / (\text{NO}_{\text{模型组}} - \text{NO}_{\text{对照组}})$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 207 [M-H]⁻。 ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.53 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6), 6.77 (1H, d,

J = 8.2 Hz, H-5), 6.24 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 4.21 (2H, q, H-1'), 1.31 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-2'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 122.9 (C-1), 115.1 (C-2), 146.8 (C-3), 149.6 (C-4), 116.5 (C-5), 127.8 (C-6), 146.9 (C-7), 115.3 (C-8), 169.4 (C-9), 69.4 (C-1'), 14.7 (C-2')。以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **1** 为咖啡酸乙酯。

化合物 **2**: 白色针状结晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 193 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.59 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.17 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 7.06 (1H, dd, J = 8.2, 1.8 Hz, H-6), 6.81 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.31 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 3.89 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 127.8 (C-1), 111.6 (C-2), 150.5 (C-3), 149.4 (C-4), 116.2 (C-5), 124.0 (C-6), 146.8 (C-7), 116.4 (C-8), 171.3 (C-9), 56.4 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **2** 为阿魏酸。

化合物 **3**: 无色棱状柱晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 268 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.91 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-11), 6.82 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-12), 6.69 (1H, s, H-1), 6.61 (1H, s, H-4), 4.20 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8e), 3.83~3.91 (12H, m, -OCH₃), 3.69 (1H, s, H-14), 3.51 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8a), 3.21 (3H, m, H-6), 2.60 (2H, dd, J = 12.2, 6.9 Hz, H-5), 0.95 (3H, d, J = 6.9 Hz, -CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 108.7 (C-1), 147.2 (C-2), 147.7 (C-3), 110.0 (C-4), 128.5 (C-4a), 29.3 (C-5), 51.4 (C-6), 54.5 (C-8), 150.0 (C-9), 144.9 (C-10), 111.2 (C-11), 123.9 (C-12), 134.9 (C-12a), 38.3 (C-13), 63.0 (C-14), 128.4 (C-14a), 60.0 (-OCH₃), 56.1 (-OCH₃), 55.9 (-OCH₃), 55.8 (-OCH₃), 18.3 (-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为延胡索甲素。

化合物 **4**: 淡黄色油状物 (甲醇), ESI-MS m/z : 222 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.45 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-8), 4.43 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 3.79 (1H, dd, J = 7.7, 3.2 Hz, H-6), 2.67 (1H, ddd, J = 18.7, 5.4, 3.3 Hz, H-4), 2.43 (1H, m, H-4), 2.34 (2H, dd, J = 15.0, 7.6 Hz, H-9), 1.97 (1H, m, H-5a), 1.84 (1H, m, H-5b), 1.52 (2H, m, H-10), 0.96 (3H, t, J = 7.4 Hz, H-11); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 170.1 (C-1), 155.4 (C-3), 149.7 (C-3a), 20.9 (C-4), 25.5 (C-5), 70.3 (C-6), 63.1 (C-7), 127.7 (C-7a), 114.8 (C-8), 29.1 (C-9), 23.2 (C-10), 14.1 (C-11)。以上数据与文献报

道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **4** 为洋川芎内酯 H。

化合物 **5**: 淡黄色油状物 (甲醇), ESI-MS m/z : 222 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.46 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-8), 4.25 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-7), 3.90~4.00 (1H, m, H-6), 2.49~2.57 (2H, m, H-4), 2.35 (2H, dd, $J = 15.0, 7.6$ Hz, H-9), 1.95 (2H, m, H-5), 1.53 (2H, dd, $J = 14.7, 7.4$ Hz, H-10), 0.97 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-11); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.9 (C-1), 155.4 (C-3), 150.0 (C-3a), 18.2 (C-4), 25.1 (C-5), 71.1 (C-6), 59.4 (C-7), 126.6 (C-7a), 114.5 (C-8), 29.1 (C-9), 23.3 (C-10), 14.1 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为洋川芎内酯 I。

化合物 **6**: 无色油状物 (甲醇), ESI-MS m/z : 262 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.25 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-6), 6.70 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 6.57 (1H, s, H-3), 6.95 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-10), 6.48 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-9), 2.24 (3H, s, H-14), 1.63 (3H, s, H-13), 1.30 (3H, s, H-15), 1.23 (3H, s, H-12); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 201.7 (C-8), 156.5 (C-8), 155.2 (C-10), 140.7 (C-1), 137.0 (C-4), 127.9 (C-6), 121.6 (C-5), 121.5 (C-9), 117.7 (C-3), 80.4 (C-11), 71.4 (C-7), 29.3 (C-12), 29.2 (C-15), 24.5 (C-14), 21.2 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **6** 为藁本酚。

化合物 **7**: 白色无定形粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 244 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.83 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.38 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6), 6.16 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 4.80 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-2'), 3.30 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-3'), 1.29 (3H, s, H-6'), 1.25 (3H, s, H-5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 161.8 (C-2), 110.8 (C-3), 144.9 (C-4), 128.9 (C-5), 106.5 (C-6), 164.4 (C-7), 113.7 (C-8), 151.1 (C-9), 112.9 (C-10), 91.1 (C-2'), 26.6 (C-3'), 70.9 (C-4'), 23.9 (C-5'), 23.9 (C-6')。以上数据与文献基本一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为哥伦比亚苦元。

化合物 **8**: 无色针状结晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 276 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.86 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-4), 7.43 (1H, s, H-5), 6.92 (1H, s, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-3), 3.92 (3H, s, -OCH₃), 3.56 (1H, dd, $J = 10.4, 1.9$ Hz, H-2'), 3.08 (1H, dd, $J = 14.0, 1.8$ Hz, H-1'a), 2.54 (1H, dd, $J =$

14.1, 10.4 Hz, H-1'b), 1.25 (6H, s, H-4', 5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 161.3 (C-2), 111.9 (C-3), 144.6 (C-4), 129.8 (C-5), 126.2 (C-6), 162.3 (C-7), 98.1 (C-8), 154.6 (C-9), 111.7 (C-10), 31.7 (C-1'), 77.1 (C-2'), 72.5 (C-3'), 24.2 (C-4'), 23.9 (C-5'), 55.2 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为尤劳帕替醇。

化合物 **9**: 白色块片状固体 (甲醇), ESI-MS m/z : 277 $[M-H]^-$ 。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.88 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.49 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5), 7.04 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-6), 6.23 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-3), 3.94 (3H, s, -OCH₃), 3.67 (1H, dd, $J = 9.4, 3.6$ Hz, H-2'), 3.05 (2H, m, H-1'), 1.29 (6H, d, $J = 8.7$ Hz, H-4', 5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 162.4 (C-2), 111.6 (C-3), 145.0 (C-4), 127.0 (C-5), 107.6 (C-6), 161.2 (C-7), 115.8 (C-8), 153.3 (C-9), 112.9 (C-10), 24.9 (C-1'), 77.4 (C-2'), 72.7 (C-3'), 24.2 (C-4'), 24.0 (C-5'), 55.3 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为 meranzin hydrate。

化合物 **10**: 无色针状结晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 260 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.91 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-4), 7.75 (1H, s, H-5), 6.94 (1H, s, H-8), 6.25 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.40 (1H, s, H-2'), 3.93 (3H, s, -OCH₃), 3.39 (1H, s, H-1'), 1.38 (3H, s, H-4'), 1.30 (3H, s, H-5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 162.2 (C-2), 111.9 (C-3), 144.9 (C-4), 129.4 (C-5), 127.1 (C-6), 159.2 (C-7), 97.9 (C-8), 154.8 (C-9), 112.0 (C-10), 76.7 (C-1'), 66.5 (C-2'), 73.5 (C-3'), 25.5 (C-4'), 25.4 (C-5'), 55.2 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **10** 为 angelitriol。

化合物 **11**: 无色针状结晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 260 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.91 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.71 (1H, s, H-5), 6.94 (1H, s, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-3), 3.92 (3H, s, -OCH₃), 3.59 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2'), 3.28~3.36 (1H, m, H-1'), 1.32 (3H, s, H-4'), 1.25 (3H, s, H-5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 162.2 (C-2), 111.9 (C-3), 144.7 (C-4), 129.4 (C-5), 127.8 (C-6), 161.1 (C-7), 98.3 (C-8), 155.1 (C-9), 112.2 (C-10), 78.1 (C-1'), 68.7 (C-2'), 73.7 (C-3'), 26.3 (C-4'), 22.7 (C-5'), 55.3 (C-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **11** 为 6-[1(R),2(R)-1,2,3-thi-hydroxy-3-methylbutyl]-7-methoxycoumarin。

3.2 抗炎活性

在 LPS 刺激 A7r5 细胞的炎症反应中, 与对照组比较, 化合物 1~11 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 的质量浓度下对 A7r5 细胞生长均无明显影响。在筛选结果中, 化合物 1~6 对 LPS 刺激 A7r5 细胞释放 NO 具有不同程度的抑制作用, 显示了较好的体外抗炎活性。结果见表 1。

表 1 化合物 1~11 对 LPS 刺激 A7r5 细胞产生 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effects of different compounds 1—11 on production of NO in LPS-stimulated A7r5 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO 释放量 (A_{450})	抑制率/%
对照	—	0.057 5 $\pm$ 0.000 6	—
模型	—	0.063 6 $\pm$ 0.001 2 ^{##}	—
1	50	0.056 7 $\pm$ 0.000 2 ^{**}	113.1
2	50	0.058 6 $\pm$ 0.003 7 ^{**}	82.0
3	50	0.057 2 $\pm$ 0.002 5 ^{**}	104.9
4	50	0.058 7 $\pm$ 0.001 8 ^{**}	80.3
5	50	0.057 9 $\pm$ 0.002 0 ^{**}	93.4
6	50	0.056 8 $\pm$ 0.000 1 ^{**}	111.5
7	50	0.060 3 $\pm$ 0.004 0	54.1
8	50	0.062 6 $\pm$ 0.000 4	16.4
9	50	0.058 8 $\pm$ 0.002 2	78.7
10	50	0.059 2 $\pm$ 0.001 8	72.1
11	50	0.059 2 $\pm$ 0.001 3	72.1

与对照组比较 ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较 ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

腰痹通胶囊能促进受损局部组织血液循环, 改善血流状态, 降低毛细血管通透性, 减轻神经根水肿, 发挥抗炎镇痛作用^[17]。本研究采用现代化学-药理学相结合的方法对其活性部位(腰痹通胶囊内容物 75%醇提物硅胶柱色谱分离部位(10:1、5:1 和 3:1)进行化学成分研究, 应用各种现代色谱分离手段分离并鉴定了 11 个化合物, 化合物 1、3、6、8~11 为首次从腰痹通胶囊中分离得到, 并采用体外抗炎模型, 对分离得到的化合物进行了抗炎作用研究, 结果显示有机酸(化合物 1、2)和洋川芎内酯(化合物 4、5)类化合物体外抗炎活性较强, 可能是腰痹通胶囊的主要抗炎活性成分; 另外, 藁本酚(化合物 6)也有一定的抗炎活性, 此与文献报道一致^[18]。这在一定程度上为探讨腰痹通胶囊药效物质基础提供了依据。在后续研究中, 本课题组

将继续追踪分离活性成分, 选择能反映复方整体药效活性的评价模型, 对腰痹通胶囊成分进行研究, 以期阐明其药效物质基础。这将为腰痹通胶囊的质量标准提升和临床及市场应用奠定一定的基础。

参考文献

- [1] 周一敏, 蒙 剑. 腰痹通胶囊治疗腰椎间盘突出症 57 例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 287-288.
- [2] 张 军, 孙树椿, 石关桐, 等. 腰痹通胶囊治疗腰椎间盘突出症的临床研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(6): 31-33.
- [3] 唐朝辉, 曹 亮, 丁 岗, 等. 腰痹通胶囊改善大鼠腰椎间盘突出极其机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(10): 1086-1091.
- [4] 胡惠民, 彭 鹏, 周国坚, 等. 腰痹通胶囊治疗腰椎间盘突出症的近期疗效分析 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(10): 15-16.
- [5] 唐朝辉, 曹 亮, 丁 岗, 等. 腰痹通胶囊对大鼠腰椎间盘突出模型药效及炎症因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 155-158.
- [6] 柳庆龙, 陈阿虹, 唐进英, 等. 胆木枝叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 52-57.
- [7] 张 愉, 朱海林, 孙隆儒. 百花丹参根的酚酸类成分研究 [J]. 中药材, 2017, 40(4): 855-858.
- [8] 胡甜甜, 张 雪, 马世中, 等. 延胡索中的生物碱成分 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1917-1920.
- [9] 宋秋月, 付迎波, 刘 江, 等. 当归的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1900-1904.
- [10] 郝淑娟, 张振学, 田 洋, 等. 川芎化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(3): 22-25.
- [11] Yu D Q, Xie F Z, Chen R Y, et al. Studies on the structure of ligustiphenol from *Ligusticum sinense* Oliv. [J]. *Chin Chem Lett*, 1996, 7(8): 721-722.
- [12] 丁希飞, 冯 旭, 董云发, 等. 中药独活化学成分的研究 [J]. 中药材, 2008, 31(4): 516-518.
- [13] 韦 玮, 徐 嵬, 杨秀伟, 等. 杭白芷醋酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2602-2613.
- [14] 邓可众, 丁邑强, 周 斌, 等. 枳壳化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 36-38.
- [15] Liu J H, Guo Y J, Xu S X, et al. Two new coumarins from *Angelica pubescens* f. *biserrata* [J]. *Chin Chem Lett*, 1993, 4(10): 885-886.
- [16] Kozawa M, Baba K, Matsuyama Y. Comparison of the coumarin components of commercial crude drug tou-dokkatsu and the roots of the related plants, and studies on coumarins of tou-dokkatsu [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1982, 36(3): 202-210.
- [17] 吴小明, 汤 池, 谢康宁, 等. 腰痹通胶囊对腰椎间盘突出症的疗效及炎症因子的影响 [J]. 中国药业, 2015, 24(16): 80-81.
- [18] 黄彦合, 于德泉. 消旋藁本酚及其类似物的合成研究 [J]. 药学报, 1997, 32(9): 36-42.