

# 王不留行中刺桐碱的分离鉴定及抗炎活性研究

蔡维维, 侯豹, 陈旭红, 孙海建, 邱丽颖\*

江南大学医学院, 无锡 214122

**摘要:** 利用有机溶剂萃取、制备型薄层层析、半制备高效液相色谱三步分离法从王不留行中分离出生物碱物质, 鉴定并探讨其抗炎活性。王不留行种子经石油醚脱脂、乙醇回流提取, 二氯甲烷、乙酸乙酯、水饱和正丁醇依次萃取, 获得水饱和正丁醇相(组分 A3)。组分 A3 经制备型薄层层析分离, 展开剂为正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5, 上层), 于紫外灯 254 nm、365 nm 下检视, 分为 7 个组分(组分 B1 ~ B7)。含量高且峰形简单的组分 B2 经半制备高效液相色谱分离, 甲醇-水作为流动相, 获得 1 个单体化合物(样品 I)。经 HPLC 分析, 样品 I 纯度高于 98%。通过化学反应、UV、IR、LC-MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 多种波谱分析方法对该化合物进行结构解析, 确定其分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 化学名称为 N,N,N-三甲基色氨酸, 中文名为刺桐碱(hypaphorine), 属于吲哚类生物碱。再采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀的炎症模型, 观察刺桐碱的抗炎效果。连续给药 6 d 后, 刺桐碱剂量为 25 mg · kg<sup>-1</sup> 时, 可显著抑制小鼠耳廓肿胀, 肿胀抑制率为 52.02%。与阿司匹林(200 mg · kg<sup>-1</sup>) 的肿胀抑制率(67.48%) 相比, 无显著性差异。本研究首次采用一条新工艺路线获得王不留行刺桐碱, 并发现其在整体水平上具有抗炎活性, 有望成为化学一类新药的候选分子。

**关键词:** 王不留行; 刺桐碱; HPLC; 抗炎活性

中图分类号: R284.1; R965.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.014

## Isolation, Identification and Its Anti-inflammatory Activity of Hypaphorine from *Vaccaria segetalis*

CAI Wei-wei, HOU Bao, CHEN Xu-hong, SUN Hai-jian, QIU Li-ying\*

Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** By solvent extraction, preparative thin-layer chromatography and semi-prepared high performance liquid chromatography successively, a kind of alkaloid was isolated from *vaccaria segetalis* and its anti-inflammatory activity was explored. *Vaccaria segetalis* seeds were defatted with petroleum ether following the reflux extraction with ethanol. Then the residual was further extracted with methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol saturated with water. The n-butanol fraction (constituent A3) was isolated by preparative thin layer chromatography with following procedure: n-butanol: ethyl acetate: water = 4: 1: 5 as developer, reviewing under the UV light at 254 and 365 nm, and divided to seven fractions (constituent B1 ~ B7). Constituent B2 of high content and simple composition was subjected to semi-preparative high performance liquid chromatography using an ethanol-water gradient system to get a compound (sample I). Sample I occupied the content of 0.215% in the raw seeds, and its purity was higher than 98%. On the basis of chemical reaction and spectroscopic methods, the formula of sample I was identified as C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The chemical name was N,N,N-trimethyl-tryptophan, and the Chinese name was hypaphorine belonging to indole alkaloids. The anti-inflammatory effect of hypaphorine was evaluated by the model of xylene-induced mouse ear edema after continuous administration for 6 days. The study showed that hypaphorine could significantly inhibit mouse ear swelling with an inhibition rate of 52.02% in the dose of 25 mg · kg<sup>-1</sup>. Compared with aspirin, hypaphorine had a higher biological activity. In this research, a new process route was studied to isolate the hypaphorine from *Vaccaria segetalis*. It was also found that hypaphorine in *Vaccaria segetalis* had the activity of anti-inflammatory at the overall level, thus hypaphorine was expected to be a candidate molecule to become a new drug.

收稿日期: 2017-09-01 接受日期: 2018-01-16

基金项目: 江南大学公共卫生研究中心资助(JUPH201504)

\* 通信作者 Tel: 86-510-85917007; E-mail: qiulydoc@sina.com

**Key words:** *Vaccaria segetalis*; hypaphorine; HPLC; anti-inflammatory activity

王不留行 (*Vaccaria segetalis*) 是一种传统中药,为双子叶植物石竹科植物麦蓝菜的干燥成熟种子。据中国药典记载,该植物具有行血通经,催生下乳,消肿敛疮等功效<sup>[1]</sup>。目前已鉴定出王不留行中含有 63 种化学成分,主要含有皂苷、环肽、黄酮类、类脂、脂肪酸、植物甾醇、单糖等<sup>[2]</sup>。本研究采用有机溶剂萃取、制备型薄层层析、半制备高效液相色谱三步分离法,结合理化性质和波谱数据,从王不留行种子中获得一种吡啶类生物碱-N,N,N-三甲基色氨酸(中文名:刺桐碱),并采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀的炎症模型对刺桐碱的抗炎活性进行研究<sup>[3]</sup>。本研究为王不留行刺桐碱的分离提供了一条新的技术路线,同时也为完善王不留行的药理学作用提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

DIONEX Ultimate-3000 型高效液相色谱仪(戴安中国有限公司); WATERS MALDI SYNAPT TOF MS(爱尔兰 Waters 公司); WATERS ACQUITY UPLC(爱尔兰 Waters 公司); Nicolet iS 10 傅立叶红外光谱仪(Nicolet 公司); Aduance400MHz 核磁共振分析仪(德国布鲁克公司); 旋转蒸发器 RE-52A(上海亚荣生化仪器厂); 循环式多用真空泵(河南省太康县科设备有限公司); Milli-Q 纯水仪(Millipore 公司); YLS-Q4 耳肿打耳器(山东省医学科学院设备站)。

### 1.2 药品及试剂

王不留行购自江苏省无锡市山禾药业股份有限公司,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为石竹科植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的干燥成熟种子。

甲醇为色谱纯(美国 Sigma-aldrich 公司); 石油醚、乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、二甲苯等为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 硅胶 GF254 板(青岛海洋化工厂分厂)。

### 1.3 实验动物

健康 ICR 小鼠, SPF 级, 4-5 周龄, 雌性, 体重 18-22 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(SCXK(沪)2007-0005)。饲养温度 25 °C, 相对湿度 55%。

## 2 方法和结果

### 2.1 王不留行中刺桐碱的分离

300 g 王不留行种子经粉碎, 4 倍石油醚常温脱

脂 24 h, 晾干。用 10 倍量 75% 乙醇溶液, 85 °C 回流提取 2 次, 每次 2 h。过滤去渣, 合并滤液, 减压浓缩至无乙醇, 去离子水复溶。再依次用等体积二氯甲烷、乙酸乙酯、水饱和正丁醇各萃取 4 次, 合并水饱和正丁醇相, 减压浓缩至干, 去离子水复溶, 真空干燥得正丁醇相干粉(组分 A: 6.15 g); 组分 A 经制备型硅胶 GF254 薄层板进行层析分离, 展开剂为正丁醇: 乙酸乙酯: 水 = 4: 1: 5(上层), 于紫外灯 254 nm、365 nm 下检视, 根据观察到的暗斑, 得到组分 B1 ~ B7(物质质量为 B1: 1.98 g; B2: 0.50 g; B3: 0.72 g; B4: 0.35 g; B5: 0.14 g; B6: 0.37 g; B7: 0.26 g); 再将组分 B2 经半制备高效液相色谱分离收集图 1 中 C1 组分, 得到一种白色不定型粉末, 记为样品(I), 质量为 64.42 mg, 计算其得率为 0.215%。

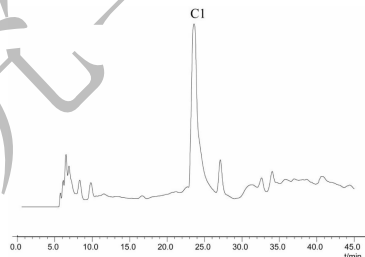


图 1 组分 B2 的半制备 HPLC 图

Fig. 1 Semi-preparative HPLC chromatogram of component B2

### 2.2 HPLC 检测样品(I) 纯度

精密称取样品(I) 10 mg, 用超纯水溶解, 配制成浓度为 1 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液。0.45 μm 微孔滤膜过滤, 备用。按下列色谱条件进行分析, 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-水(B); 等度洗脱: 0 ~ 9 min, 30% A; 流速: 0.8 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL; 进样方式: 手动进样; 分别在不同波长 220、250、280、350 nm 检测。

在不同检测波长下分析, 样品(I) 均为单一色谱峰, 见图 2, 采用峰面积归一化法计算纯度, 纯度均高于 98%, 满足了核磁共振等结构鉴定技术对样品纯度的要求。

### 2.3 样品(I) 结构鉴定

#### 2.3.1 理化性质鉴定

取 0.5 mg 样品(I) 溶于 4 mL 去离子水中, 并滴加 2 滴盐酸, 使之呈酸性。再滴加碘化铋钾试剂, 观察溶液出现桔红色或红棕色沉淀, 即为阳性反应, 说明样品为生物碱类物质。

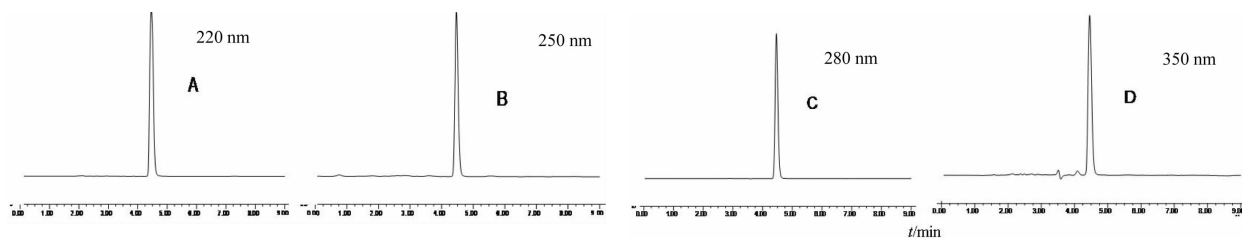


图2 样品(I)在不同波长检测的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of sample (I) in different wavelengths

### 2.3.2 红外光谱法(IR)

干燥环境下,用溴化钾直接压片后,采用傅里叶红外光谱仪检测样品(I),分析中红外区(波数4000~400  $\text{cm}^{-1}$ )的变化,记录红外光谱图,扫描次数32次,分辨率4  $\text{cm}^{-1}$ 。红外光谱(IR)分析结果如图3,提示该化合物中含有羰基(1630  $\text{cm}^{-1}$ ),碳氮键(1350  $\text{cm}^{-1}$ ),羟基或氨基键(3500~2800  $\text{cm}^{-1}$ )。900~600  $\text{cm}^{-1}$ 可能为芳烃中的C-H面外弯曲振动。

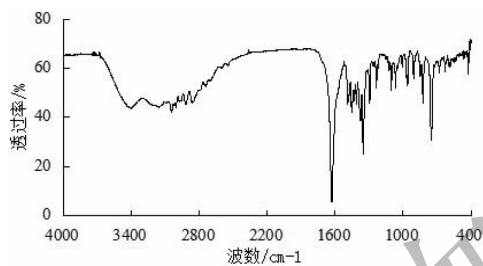


图3 样品(I)的红外图谱

Fig. 3 IR spectrum of sample (I)

### 2.3.3 核磁共振法(NMR)

将样品(I)用氘代水溶解于核磁管中,采用全数字化核磁共振波谱仪测定 $^1\text{H}$  NMR(400 Hz)、 $^{13}\text{C}$  NMR(100 Hz)。样品(I)的结构鉴定数据如下:

$^1\text{H}$  NMR(400 Hz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 7.68 (1 H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-5'), 7.54 (1 H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-8'), 7.29 (1 H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-7'), 7.26 (1 H, s, H-2'), 7.22 (1 H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-6'), 3.93 (1 H, dd,  $J$  = 12.0, 4.0 Hz, H-2), 3.44 (2 H, dd,  $J$  = 12.0, 4.0 Hz, H-3 $\beta$ ), 3.36 (1 H, d,  $J$  = 12.0 Hz, H-3 $\alpha$ ), 3.30 [9 H, s,  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ].

$^{13}\text{C}$  NMR (100 Hz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 22.6 (C-3), 51.8 [ $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ], 78.8 (C-2), 107.0 (C-3'), 112.0 (C-8'), 118.1 (C-5'), 119.4 (C-7'), 122.0 (C-6'), 124.6 (C-2'), 126.4 (C-4'), 136.1 (C-9'), 171.3 (C-1)。

### 2.3.4 LC-MS 测定物质的相对分子质量

液相色谱条件: BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1  $\times$  100

mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 流速0.3  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长200~700 nm, 按以下条件进行梯度洗脱: 0~0.1 min 0~15% A; 0.1~10 min 15%~80% A; 10~11 min 80%~100% A; 柱温: 45  $^\circ\text{C}$ , 进样量: 0.2  $\mu\text{L}$ 。

质谱采用电喷雾电离源(ESI); 扫描频率10 sec, 毛细管电压3 kV, 锥孔电压20 V, 离子源温度100  $^\circ\text{C}$ , 脱溶剂气温度400  $^\circ\text{C}$ , 脱溶剂气流速500  $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ , 锥孔气流速50  $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 陷阱碰撞能量 Trap Collision Energy: 6 Volts; 碰撞能量转移(Transfer Collision Energy): 4 Volts; 精密称取适量样品(I), 用超纯水溶解稀释制成溶液, 进样, 将流出物进行MS分析。在100~2500  $m/z$  范围内进行扫描检测, 获得负离子流图, 分析所得色谱峰(图4)。

从图4. A中可知:  $m/z$  247 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , 所以相对分子质量为246。增加轰击能量后, 产生了多个碎片离子峰(图4. B),  $m/z$  188 [ $\text{M}-59 + \text{H}$ ] $^+$ ,  $m/z$  146 [ $\text{M}-101 + \text{H}$ ] $^+$ ,  $m/z$  118 [ $\text{M}-129 + \text{H}$ ] $^+$ 。结合 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR数据, 采用MassLynx4.1软件推测其分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ , 不饱和度( $\Omega$ )为7。 $^{13}\text{C}$  NMR谱中:  $\delta$  171.34为羰基碳信号。在105~155 ppm间有8个碳信号( $\delta$  106.99,  $\delta$  111.97,  $\delta$  118.11,  $\delta$  119.38,  $\delta$  122.00,  $\delta$  124.61,  $\delta$  126.37,  $\delta$  136.07), 提示组分C1结构含有苯环、烯烃、羧基官能团中的一种或多种。结合UV谱图和 $^1\text{H}$  NMR谱的7~8 ppm的低场区数据, 说明含有苯环结构。同时, 在这一位移范围内, 计算得不饱和度为6, 而苯环的不饱和度为4, 说明存在两个环, 并且环上有碳原子被氮原子取代。 $\delta$  22.64说明存在一个饱和碳原子,  $\delta$  51.80和 $\delta$  78.76分别为C-N和C-O类型的碳信号。

综合以上理化性质和波谱数据, 分析样品(I)为N,N,N-三甲基色氨酸。查阅文献与*Ptercarous officinalis*种子提取的hypaphorine一致<sup>[4]</sup>, 中文名为刺桐碱。结构见图5。

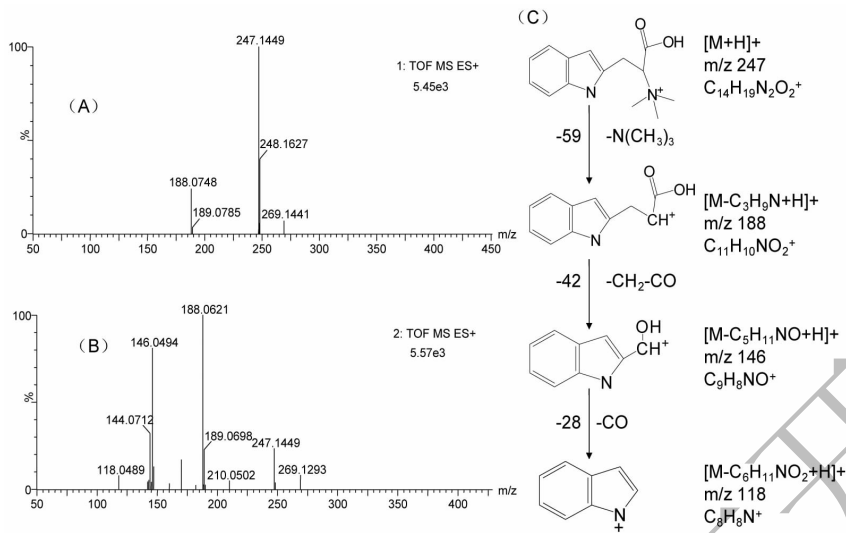


图4 样品(I)质谱图和离子碎片

Fig. 4 MS spectrum and proposed fragmentation of sample (I)

注:A、B:样品(I)质谱图;C:离子碎片的裂解过程

Note: A、B: Mass spectrum of sample (I); C: the cracking process of ion debris

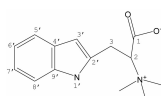


图5 样品(I)的化学结构图

Fig. 5 Structure of sample (I)

## 2.4 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型的作用实验

参考文献<sup>[5]</sup>,将30只ICR小鼠随机分为3组,每组10只(雌雄各半),体重18~22 g。分别称重、标记。分为空白对照组(生理盐水)、阳性药物对照组(阿司匹林,200 mg·kg<sup>-1</sup>)、刺桐碱组(25 mg·kg<sup>-1</sup>)。各组均按10 mg·kg<sup>-1</sup>给药容积进行灌胃给药,每天1次,连续给药6 d。最后1次给药1 h后,用微量加样枪于小鼠左耳正反两面各均匀涂二甲苯25 μL,右耳不涂作为对照。1 h后将小鼠脱颈致死,顺着耳廓基线剪下

两耳,使用直径为9 mm的耳廓打孔器,分别在同一部位打下圆耳片,分析称重。以两耳片重量差作为肿胀程度的指标,以肿胀率(%)和肿胀抑制率(%)表示抗炎作用强度。

肿胀率(%) = (左耳片重 - 右耳片重) / 右耳片重 × 100%

肿胀抑制率(%) = (空白对照组肿胀率 - 实验组肿胀率) / 空白对照组肿胀率 × 100%

实验结果均以“均数 ± 标准差”(x̄ ± s)表示,采用统计软件SPSS24.0进行单因素方差分析,P < 0.5为差异有统计学意义。

结果如表1所示,与空白对照组相比,25 mg·kg<sup>-1</sup>刺桐碱和200 mg·kg<sup>-1</sup>阿司匹林均能显著降低二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀度(P < 0.01),这表明25 mg·kg<sup>-1</sup>刺桐碱对急性炎症具有显著的抗炎作用。

表1 刺桐碱对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响(n = 10, x̄ ± s)

Table 1 Effect of hypaphorine on auricle swelling by xylene (n = 10, x̄ ± s)

组别 Group	给药剂量 Dose (mg·kg <sup>-1</sup> )	肿胀率 Swelling rate (%)	肿胀抑制率 Swelling inhibition ratio (%)
空白对照组 Control	-	121.31 ± 22.16	-
阳性药阿司匹林组 Aspirin	200	39.44 ± 11.64 **	67.48
刺桐碱组 Hypaphorine	25	58.20 ± 7.77 **	52.02

注:与对照组相比 \*\* P &lt; 0.01。

Note: Compared with control, \*\* P &lt; 0.01.

### 3 讨论

刺桐碱(hypaphorine)属于来源于色氨酸的吲哚碱类生物碱,常见于豆科相思子属、黄芪属、刺桐属多种植物中。对于其活性的研究不多,Ozawa等<sup>[6]</sup>研究发现一种巴西植物—刺桐属 *velutina* 中的刺桐碱可以诱导正常小鼠睡眠。Dauphin等<sup>[7]</sup>研究发现刺桐碱对真菌生长激素具有拮抗作用。

王不留行作为一种传统中药,具有良好的临床应用价值。体外细胞实验研究发现王不留行刺桐碱具有抑制内皮细胞和巨噬细胞炎症反应,并明确了其通过调控 PI3K/Akt/mTOR 和 AMPK 信号通路,进而分别作用于 Toll 样受体 4 (TLR4) 和过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ),抑制脂多糖诱导的炎症<sup>[8-10]</sup>。本研究通过建立动物炎症模型,从整体水平发现王不留行中的刺桐碱可以抑制二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀,具有抗炎活性。由于刺桐碱的相对分子量较小,并且生物碱类物质的合成研究已比较充分,有望通过分子合成及构效关系的研究,成为化学一类新药的候选分子。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China Vol I(中华人民共和国药典)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2015;53.
- 2 Zhou GH,Tang LY,Wang T, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert;a review[J]. *Phytochem Rev*,2016,15;813-827.

- 3 Lu JM(鲁建美),Zhang ZF(张志峰),Zeng R(曾锐), et al. Study on the anti-inflammation and analgesia effects of Liuweixiang pills[J]. *West Chin J Pharm Sci*(华西药科学杂志),2016,31(2):148.
- 4 Daniel HJ,David G,Linda E, et al. The indole alkaloid, hypaphorine and pterocarpus seed protection[J]. *Phytochemistry*,1982,21:1035-1037.
- 5 Ouyang K(欧阳凯),He XY(何先云),Zhou MQ(周卯勤), et al. Anti-inflammatory, analgesic and immunomodulatory effects of *Schnabelia tetradonta* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2016,28:1372-1376.
- 6 Ozawa M,Honda K,Nakai I, et al. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice[J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2008,18:3992-3994.
- 7 Dauphin A,Gérard J,Lapeyrie F, et al. Fungal hypaphorine reduces growth and induces cytosolic calcium increase in root hairs of *Eucalyptus globulus* [J]. *Protoplasma*, 2007, 231 (2):83-88.
- 8 Sun HJ,Cai WW,Wang X, et al. Vaccaria hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation via inactivation of NF $\kappa$ B and ERK pathways in Raw 264.7 cells[J]. *BMC Complement Altern Med*,2017,17:120.
- 9 Sun HJ,Zhu XX,Cai WW, et al. Hypaphorine attenuates lipopolysaccharide-Induced endothelial inflammation via regulation of TLR4 and PPAR- $\gamma$  dependent on PI3K/Akt/mTOR signal pathway[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(4). pii:E844.
- 10 Sun HJ,Zhu XX,Lin W, et al. Interactions of TLR4 and PPAR $\gamma$ ,Dependent on AMPK Signalling Pathway Contribute to Anti-Inflammatory Effects of Vaccariae Hypaphorine in Endothelial Cells[J]. *Cell Physiol Biochem*,2017,42:1227-1239.

(上接第 696 页)

- 5 Liu XJ(刘学军),Yin YG(殷涌光),Yu XX(于晓霞), et al. Development of drink of ginseng fruit and hawthorn mixture[J]. *Food Sci*(食品科学),2005,26:655-659.
- 6 Wang ZT(王治同),Lin K(林柯),Liu Y(刘宇), et al. Development of pepino fruit(*Solanum muricatum* Ait) vinegar beverage[J]. *Food Sci*(食品科学),2011,32:307-310.
- 7 Lu XH(卢晓会),Huang WY(黄午阳),Li CY(李春阳). Optimization of response surface methodology for microwave puffing of apple chips[J]. *J Sou Agr*(南方农业学报), 2011,42:188-191.

- 8 Xu SL(徐圣兰),Shi YG(石彦国),Li CY(李春阳). Study on the optimization of the microwave puffing pumpkin[J]. *Sci Tec Food Ind*(食品工业科技),2011(5):279-281.
- 9 Wang WD(王卫东),Yang Y(杨毅),Liu QD(刘全德), et al. Optimization of microwave puffing technology of kiwifruit chips[J]. *Sci Tec Food Ind*(食品工业科技),2014,35:299-302.
- 10 Yang XF(阳辛凤). Study on processing of papaya chips by microwave puffing[J]. *Sci Tec Food Ind*(食品工业科技), 2008,29:173-175.