

## 土牛膝抗炎成分分离、鉴定与含量测定研究

欧阳文<sup>1,4#</sup>, 罗懿钒<sup>1,4#</sup>, 李震<sup>2,5,6</sup>,  
王雄龙<sup>2,5</sup>, 张云坤<sup>3,4</sup>, 周华荣<sup>2,5,6</sup>, 唐纯玉<sup>2,5,6\*</sup>, 李顺祥<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>湖南中医药大学药学院,长沙 410208;<sup>2</sup>湖南时代阳光药业股份有限公司,永州 410116;

<sup>3</sup>湖南食品药品职业学院;<sup>4</sup>湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心,长沙 410208;

<sup>5</sup>湖南省抗感染中药工程技术研究中心;<sup>6</sup>湖南时代阳光博士后科研流动站协作研发中心,永州 410116

**摘要:**本研究建立脂多糖诱导的巨噬细胞炎症模型,结合层析法对土牛膝抗炎活性成分进行分离,并用 NMR、MS 以及对对照品比较,对得到的化合物进行结构鉴定。结果表明粗毛牛膝醇提取物抗炎效果最佳,其反相层析 50%、70% 及 100% 甲醇洗脱物抗炎活性高和细胞毒性低,从 50% ~ 70% 甲醇洗脱物分离鉴定出 9 种单体化合物:β-蜕皮甾酮(1)、牛膝甾酮(2)、水龙骨甾酮 B(3)、*N*-反式阿魏酰酪胺(4)、*N*-顺式阿魏酰酪胺(5)、*N*-顺式阿魏酰-3-甲氧基酪胺(6)、*N*-反式阿魏酰-3-甲氧基酪胺(7)、竹节参皂苷 IV a(8)、5,2'-二甲氧基-6-甲氧甲基-7-羟基-异黄酮(10); 100% 甲醇洗脱物鉴定出主要成分竹节参皂苷 I(9)。在 LPS + 25 μM 单体浓度下,化合物抗炎活性由强到弱为 4 > 1 > 5 > 2 > 6 > 9 > 10 > 3 > 7 > 8。反相液相色谱测定结果表明,野生牛膝和柳叶牛膝(两年生)地下根茎 β-蜕皮甾酮含量在温度高季节含量高,8 月份达到最高,分别为 0.914 ± 0.016 和 1.412 ± 0.038 mg/g; 两年生粗毛牛膝随季节变化规律不明显。具有抗炎活性的阿魏酰酪胺类生物碱首次从土牛膝中分离鉴定。

**关键词:**土牛膝;抗炎活性;分离鉴定;β-蜕皮甾酮;含量测定

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)7-1171-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.7.012

## Study on the isolation, identification and content determination of anti-inflammatory components in Tunixi

OUYANG Wen<sup>1,4#</sup>, LUO Yi-fang<sup>1,4#</sup>, LI Zhen<sup>2,5,6</sup>, WANG Xiong-long<sup>2,5,6</sup>,  
ZHANG Yun-kun<sup>3,4</sup>, ZHOU Hua-rong<sup>2,5,6</sup>, TANG Chun-yu<sup>2,5,6\*</sup>, LI Shun-xiang<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

<sup>2</sup>Hunan Era Sunshine Pharmaceutical Co., Ltd., Yongzhou 410116, China; <sup>3</sup>Hunan Food and Drug Vocational College;

<sup>4</sup>Hunan Province Engineering Research Center of Bioactive Substance Discovery of TCM, Changsha 410208, China;

<sup>5</sup>Hunan Engineering Technology Research Center for anti-infection Chinese Medicine;

<sup>6</sup>Hunan Era Sunshine Collaborative R & D Center for Post-doctoral Studies, Yongzhou 410116, China

**Abstract:** The inflammation macrophages (RAW 264.7) model induced by lipopolysaccharide (LPS) with nitric oxide (NO) release as an index was established to investigate the anti-inflammatory components in different varieties of Tunixi and column chromatography was used to isolate the active compounds from *Achyranthes aspera* Linnacus methanol extract. The chemical structures of the active components were deduced based on the nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) data analysis and comparing with reference substances. The methanol extracts of *A. aspera* showed the best anti-inflammatory effect, furthermore, its 50%, 70% and 100% methanol elutes featured low cytotoxicity and high anti-inflammatory activity. Nine pure compounds isolated from the 50% and 70% methanol elutes were identified as β-ecdysterone (1), inokosterone (2), polygodine B (3), *N*-trans-feruloyl-tyramine (4), *N*-cis-feruloyl-tyramine (5), *N*-cis-feruloyl-3-methoxy-

收稿日期:2020-03-10 接受日期:2020-05-28

基金项目:湖南省教育厅优秀青年基金(18B251);湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目(湘食药科 R201806);永州市科技创新及应用研究项目(永财企指[2019]2号);湖南中医药大学中药学一流建设学科(校行科学[2018]3号)

\* 通信作者 Tel:86-0731-88459421; E-mail:lishunxiang@hotmail.com, timesun1969@163.com

#共同第一作者

tyramine (6), *N*-trans-feruloyl-3-methoxytyramine (7), chikusetsusaponin IVa (8), 5,2'-dimethoxy-6-(methoxymethyl)-7-hydroxy-isoflavonol (10), meanwhile, oleanolic acid 28-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (9) was elucidated as the main component in its 100% methanol elute. At the concentration of LPS + 25  $\mu$ M, the anti-inflammatory activity order was 4 > 1 > 5 > 2 > 6 > 9 > 10 > 3 > 7 > 8. The  $\beta$ -ecdysterone content in the underground rhizomes of wild *A. bidentata* Blume and *A. longifolia* (Makino) Makino changed obviously with seasons and reached the highest level in August at 0.914  $\pm$  0.016 and 1.412  $\pm$  0.038 mg/g, respectively. However, there is no obvious seasonal variation observed in the *A. aspera*. Moreover, feruloyl tyramine alkaloids with anti-inflammatory activity were firstly reported from *A. aspera* in this research.

**Key words:** *Achyranthes aspera*; anti-inflammatory activity; isolation and identification;  $\beta$ -ecdysterone; content determination

土牛膝别名倒钩草、倒梗草等,来源较为复杂,包括苋科植物粗毛牛膝 *Achyranthes aspera* Linnacus、柳叶牛膝 *A. longifolia* (Makino) Makino 及牛膝 *A. bidentata* Blume 野生种的干燥根及根茎。具有活血祛瘀,泻火解毒,利尿通淋之功效。主治闭经,跌打损伤,风湿关节痛,痢疾,白喉,咽喉肿痛,疮痈,淋证,水肿<sup>[1]</sup>。“喉咽清”来源于民间验方,由土牛膝、马兰草、车前草和天名精四位药味组成,土牛膝为君药,具有清热解毒和利咽止痛的功效,主要用于肺胃实热所导致的咽部肿痛、发热、口渴、便秘、扁桃体炎、咽炎等证<sup>[2]</sup>。喉咽清口服液(颗粒)为国家重点新产品和国家医保目录品种,在新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)防治中,于2020年2月7日被湖南省卫生健康委员会纳入《湖南省儿童新型冠状病毒感染临床诊断与治疗专家共识(试行第一版)》,用于儿童新型冠状病毒感染的防治,适于咽痛偏于风热者<sup>[3]</sup>。

土牛膝提取物具有很好的抗炎功效,Rao等<sup>[4]</sup>建立家兔声带炎症模型,观察研究了土牛膝提取物对大白兔急性咽喉炎的治疗作用,结果表明土牛膝提取物可以显著抑制家兔急性咽喉炎的症状。Ou等<sup>[5]</sup>研究土牛膝提取物的抗炎作用,结果表明土牛膝提取物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀和鸡蛋清引起的大鼠足跖肿胀以及急性炎症导致的腹腔毛细血管通透性均有不同程度的抑制作用。前期本课题组对土牛膝化学成分进行了系统研究,已经分得16个单体化合物,包括蜕皮甾酮类和齐墩果酸为苷元的三萜皂苷类,还分得生物碱、脂肪酸及一种新异黄酮类化合物<sup>[6,7]</sup>。以脂多糖刺激小鼠单核巨噬细胞株 RAW264.7,可以诱导细胞产生多种相关介质和细胞因子如 NO、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-6 (IL-6)、cyclooxygenase-2 (COX-2) 等而形成炎症细胞模型,此模型被广泛应用于抗炎药物的筛选评价。NO 作为众多炎症介质中的重要因子之一,在调节多种生理功能方面起重要作用,例如血管

扩张、神经传递和炎症应答等,其浓度可以用来评价炎症反应的强弱程度<sup>[8]</sup>。为进一步明确土牛膝抗炎活性成分,本课题组建立脂多糖刺激的 RAW264.7 炎症模型,分析不同土牛膝的抗炎作用,并在活性指导下对粗毛牛膝抗炎成分进行分离纯化,鉴定结构并测定主要活性成分含量随季节变化规律,现将研究结果报告如下。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

粗毛牛膝 (*A. aspera* Linnacus) 和柳叶牛膝 (*A. longifolia* (Makino) Makino) 采自湖南永州马鞍岭瑶家寨湖南时代阳光药业股份有限公司种植基地,野生牛膝 (*A. bidentata* Bl. 野生种) 采自湖南长沙湖南中医药大学药用植物园,怀牛膝 (*A. bidentata* Bl.) 采自河南焦作东岩村,以上品种均由湖南中医药大学药用植物学教研室王智老师鉴定,凭证标本保存 (No. 2018072201 (粗毛牛膝)、2018072202 (柳叶牛膝)、2018072501 (野生牛膝)、2018102401 (怀牛膝)) 在湖南中医药大学中药活性物质筛选工程技术研究中心。

### 1.2 仪器与试剂

小鼠单核巨噬细胞株 (RAW264.7) 购于中科院上海细胞库。竹节参皂苷 IVa (PS010730) 购买于成都普思生物科技股份有限公司,纯度大于 98%; 脂多糖、地塞米松、二甲基亚砜、thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) (美国 Sigma 公司); dulbecco's modified eagle media (DMEM) 高糖培养基 (美国 gibco 公司); 胎牛血清 fetal calf serum (FBS) (德国 pan seratech 公司); phosphate buffered saline (PBS) 磷酸盐缓冲液 (hyclone 公司); NO 检测试剂盒 (碧云天公司); 色谱级乙腈、甲醇、反相硅胶板 (德国默克公司); octadecylsilyl-A (ODS-A) 和 ODS-AQ (50  $\mu$ m, 日本 YMC 公司); 柱层析硅胶 (80 ~ 100 目和 200 ~ 300 目), 薄层色谱板 (青岛海洋公司); 常规提取分离用试剂甲醇等均为分析纯试剂 (长沙汇虹试剂公司)。

AL104 万分之一电子天平(梅特勒-托利多公司); $C_{18}$  色谱柱(日本 YMC 公司),LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);R204B3 型旋转蒸发器(上海申顺科技有限公司);超净工作台(苏州艾克林净化设备有限公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);低速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);酶标仪(美国 Biotek 公司);数显恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司);G2-XS QToF 超高效液相-质谱联用仪(美国 Waters 公司);INOVA-600 MHz 高分辨超导核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司)。

## 2 方法

### 2.1 RAW264.7 细胞培养

参考文献<sup>[9,10]</sup>,简述如下:将 RAW264.7 细胞接种于细胞培养瓶中,加入含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基中,充分吹打混匀,放入 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养,每日在光学显微镜下观察细胞的生长状况,1 天更换一次培养基,取对数生长期的细胞进行后续试验。另外还包括细胞传代、细胞冻存和细胞复苏等基本操作。

### 2.2 活性测试样品的制备与分离

取不同品种土牛膝和怀牛膝粉末约 30 g,分别采用 10、6、4 倍甲醇回流提取三次,每次提取 1 h,提取液过滤并减压浓缩和冷冻干燥得醇提取物。精确称取各提取物样品,DMSO 完全溶解(终体积不得超过 0.1%)。用完全培养基配制成相应浓度的稀释液,现配现用,用 0.22 μm 微孔滤器除菌后测定细胞毒性和抗炎活性。

粗毛牛膝(*A. aspera* L.) 1.17 kg,阴干过 20 目筛,10 倍甲醇回流提取 3 次,每次 2 h,提取液浓缩并干燥得浸膏 130 g。再将浸膏与 117.5 g ODS-AQ 全亲水性反相硅胶搅拌,低于 60 °C 水浴锅挥干溶剂,经 ODS 柱层析(4cm × 10 cm),利用甲醇-水溶液梯度洗脱,其中水、10%、30%、50%、70%、90% 的甲醇-水溶液和纯甲醇,丙酮分别洗脱 2 L,各分离部位减压浓缩干燥后,分别得到水洗脱物(110.5 g)、10% 甲醇洗脱物(1.3 g)、30% 甲醇洗脱物(2.42 g)、50% 甲醇洗脱物(2.99 g)、70% 甲醇洗脱物(4.37 g)、90% 甲醇洗脱物(4.31 g)、100% 甲醇洗脱物(3.39 g)、丙酮洗脱物(1.27 g),各部分测定活性。

合并 50% ~ 70% 甲醇洗物 3.0 g,用甲醇溶解后,拌硅胶 10 g 并挥干溶剂,过硅胶柱层析(2 cm ×

20 cm),采用二氯甲烷-甲醇(98:2、97:3、96:4、95:5、90:10、80:20、70:30、2:1、1:1,纯甲醇)梯度洗脱,共获得 40 组分,其中 Fr. 15(二氯甲烷-甲醇 90:10 洗脱)组分经过硅胶柱层析,得到 Fr. 15A-E 五个组分,Fr. 15B 再反复通过硅胶柱,二氯甲烷-甲醇 9:1 洗脱,分离得到化合物 **1**(55 mg)和 **2**(12 mg);Fr. 15D 过 ODS 柱层析,40% 甲醇水反复洗脱分离,得化合物 **3**(4.7 mg)。Fr. 9(二氯甲烷-甲醇 95:5 洗脱)组分,先过 ODS-A 反相色谱柱,55% 甲醇洗脱纯化,并进一步经过硅胶柱分离(二氯甲烷-甲醇 97:3 洗脱),获得两个主要组分(Fr. 9A 和 Fr. 9B),组分 Fr. 9A 进一步经制备液相色谱(37% 乙腈-水溶液)制备纯化,获得化合物 **4**(7.0 mg)和 **5**(4.4 mg)。组分 Fr. 9B 进一步经制备液相色谱(37% 乙腈-水溶液)制备纯化,获得化合物 **6**(5.0 mg)和 **7**(5.4 mg)。Fr. 30(二氯甲烷-甲醇 7:3 洗脱)组分,过 ODS-A 反相色谱柱,65% 甲醇-0.1% 甲酸水溶液反复洗脱纯化,获得化合物 **8**(4.1 mg)。Fr. 6(二氯甲烷-甲醇 97:3 洗脱)组分,过 ODS 柱色谱,水-甲醇梯度洗脱得到 7 个亚组分 Fr. 6A ~ G,其中 Fr. 6B 过 ODS 柱色谱,50% 甲醇反复洗脱,得到结晶 **10**(2.3 mg)。

100% 甲醇洗脱物,经过 ODS 柱色谱,90% 甲醇分离,主要化合物 **9**(11.3 mg)以结晶形式析出。

### 2.3 化合物结构鉴定

通过分析理化性质,采用现代波谱技术(<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 及 MS)方法解析,并结合对照品分析比较鉴定化合物结构。

### 2.4 MTT 法分析样品细胞毒性实验

称取 25 mg 的 MTT,放入 10 mL 的离心管中,加 5 mL 的 PBS 缓冲液,配成浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,超声完全溶解后用 0.22 μm 微孔滤器除菌,4 °C 避光保存。取生长状态良好,处于对数生长期的培养细胞,脱壁后,用含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基配制成单细胞悬液,用细胞计数器计数,以 3 × 10<sup>4</sup> 个/孔,每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。设空白组、对照组和样品组。空白组无细胞,对照组加入含细胞的 100 μL DMEM 培养基。样品组分别加入不同浓度样品,使终体积为 100 μL,每组设 3 个复孔,培养 24 h。弃去旧培养基,再加入质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 孵育,4 h 后弃去培养液,每孔加入 150 μL DMSO 溶

液,在培养板平台震荡机上震荡 10 min,置酶标仪中 490 nm 处测定各孔吸光值(OD 值)。按公式计算细胞存活率。计算公式如下:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{样品组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100\%$$

## 2.5 炎症模型中 NO 释放量检测

处于对数生长期的培养细胞,脱壁后,用含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基制成单细胞悬液,细胞计数器计数,调节细胞密度为  $3 \times 10^4$  个/mL,均匀接种于 96 孔培养板上,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。将原培养液弃去,设置正常组、模型组和样品组。正常组不加 LPS 和样品;模型组在培养液中加入 LPS 溶液(终浓度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );样品组为不同浓度土牛膝提取物和单体化合物的稀释培养基 100  $\mu\text{L}$ ,每组设置 3 个复孔。培养 24 h,取其上清液于离心管中。按照试剂盒说明书中的操作方法,先将培养基按顺序加入各试剂,于波长 550 nm 处的酶标仪上测定各孔的吸光度值(OD 值),根据标准曲线测定 NO 释放量( $\mu\text{M}$ )。配置单体和提取物溶液时,DMSO(终体积不得超过 0.1%)完全溶解,用完全培养基配制成相应浓度的稀释液,现配现用,并用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤器除菌。

## 2.6 活性测试数据处理

实验数据均用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行显著性差异分析,组间比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  表示差异显著,具有统计学意义。

## 2.7 反相液相色谱测定 $\beta$ -蜕皮甾酮条件

参考文献<sup>[11]</sup>,岛津 HPLC 仪(LC-20A 二元高压梯度仪,SPD-20A 紫外检测仪),色谱柱为岛津 YMC  $\text{C}_{18}$  柱(250 mm  $\times$  4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ ),检测波长 250 nm,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(16:84,V/V),流速为 1 mL/min。

## 2.8 含量测定样品制备

### 2.8.1 对照品的制备

精密称取  $\beta$ -蜕皮甾酮 2.8 mg,置于 10 mL 容量瓶,加色谱甲醇溶解并定容,配置 0.28 mg/mL 的储液。精密吸取储液 1 mL,置于另一 10 mL 容量瓶,加色谱甲醇定容,即得 0.028 mg/mL 的对照品溶液。

### 2.8.2 供试品制备

参考文献<sup>[12]</sup>,称取药材粗粉(过四号筛)约 0.1 g,精密称定,置于 10 mL 容量瓶,加甲醇至刻度,超

声 30 min(功率:40 kHz,100 W),放冷后甲醇定容,过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,即得供试品溶液,精密吸取 20  $\mu\text{L}$  进样,按色谱条件分析。

## 2.9 方法学考察

### 2.9.1 线性关系

精密吸取 0.028 mg/mL 的对照品溶液 1、2、4、8、20  $\mu\text{L}$  进样,按色谱条件分析,按照进样量(ng)和  $\beta$ -蜕皮甾酮峰面积计算线性回归方程。

### 2.9.2 精密度试验

精密吸取  $\beta$ -蜕皮甾酮对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,按照色谱条件中的方法测定,重复进样 6 次。

### 2.9.3 重现性试验

分别取同一批粉末 6 份,按样品溶液的制备操作,并按色谱条件进行测定。

### 2.9.4 样品稳定性试验

取同一份样品溶液,室温放置,分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定  $\beta$ -蜕皮甾酮峰面积值。

### 2.9.5 回收率试验

采用加样回收试验,精密吸取已知含量的柳叶牛膝粉末,加入大体相同量的对照品溶液,流动相定容至 10 mL 容量瓶,过膜,微量进样器精密吸取 20  $\mu\text{L}$  按照色谱条件下进行测定。

## 3 结果

### 3.1 MTT 法测定不同土牛膝甲醇提取物对 RAW264.7 细胞的毒性作用

由表 1 可知,柳叶牛膝和野生牛膝醇提取物在 25 ~ 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞存活率高,且与正常组相比,无显著性差异( $P > 0.05$ ),而粗毛牛膝和怀牛膝提取物在浓度为 400 ~ 120 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞均有不同程度地死亡。故本研究选取浓度为 50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  进行后续干预,测定抗炎活性。

### 3.2 土牛膝各提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响研究

由表 2 可知,对照组与模型组比较,LPS 诱导 RAW264.7 细胞时,使 NO 释放量明显增加( $P < 0.01$ )。与模型组相比,怀牛膝和不同土牛膝提取物干预时,NO 释放量均有减少,且呈剂量依赖性抑制;在浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,三种土牛膝的抗炎作用均强于怀牛膝,对比不同土牛膝醇提取物的 NO 释放量发现,抑制作用最强的为粗毛牛膝,NO 释放量为  $12.92 \pm 0.50 \mu\text{M}$ ,与模型组有极显著差异。故进一步对粗毛牛膝醇提取物进行分离,测定活性。

表1 各提取物的细胞存活率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 1 Cell survival rate of each extract ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

浓度 Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	细胞存活率 Cell survival rate(%)			
	柳叶牛膝 <i>A. longifolia</i>	野生牛膝 Wild <i>A. bidentata</i>	粗毛牛膝 <i>A. aspera</i>	怀牛膝 <i>A. bidentata</i>
空白对照 Blank control	100.04 $\pm$ 4.30	100.04 $\pm$ 3.80	99.99 $\pm$ 3.05	100.06 $\pm$ 6.03
25	108.37 $\pm$ 3.09	107.22 $\pm$ 2.67	96.44 $\pm$ 1.10	94.89 $\pm$ 2.56
50	105.74 $\pm$ 7.97	100.83 $\pm$ 6.58	90.56 $\pm$ 2.14	100.21 $\pm$ 5.30
100	112.72 $\pm$ 7.57	98.60 $\pm$ 6.53	94.20 $\pm$ 0.69	97.38 $\pm$ 6.20
200	111.81 $\pm$ 4.68	97.81 $\pm$ 4.04	99.22 $\pm$ 11.99	99.08 $\pm$ 13.31
400	109.95 $\pm$ 3.08*	96.21 $\pm$ 2.66	79.46 $\pm$ 1.84**	87.52 $\pm$ 4.26*
800	83.93 $\pm$ 1.46**	73.76 $\pm$ 1.26**	78.43 $\pm$ 2.20**	82.98 $\pm$ 7.61*
1200	56.53 $\pm$ 3.62**	46.00 $\pm$ 4.05**	71.60 $\pm$ 2.82**	58.58 $\pm$ 1.70**

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

表2 不同提取物对LPS诱导RAW264.7细胞释放NO的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 2 Effect of different extracts on NO release of RAW264.7 cells induced by LPS ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

不同提取物 Different extracts	NO释放量 NO release concentration( $\mu\text{M}$ )				
	对照组 Control group(LPS-)	模型组 Model group(LPS+)	LPS + 50 $\mu\text{g/mL}$	LPS + 100 $\mu\text{g/mL}$	LPS + 200 $\mu\text{g/mL}$
柳叶牛膝 <i>A. longifolia</i>			17.31 $\pm$ 0.47**	16.47 $\pm$ 0.12**	15.33 $\pm$ 1.03**
野生牛膝 Wild <i>A. bidentata</i>	1.10 $\pm$ 0.03**	29.09 $\pm$ 2.05	19.91 $\pm$ 0.46**	17.98 $\pm$ 0.40**	15.11 $\pm$ 0.42**
粗毛牛膝 <i>A. aspera</i>			23.05 $\pm$ 0.70*	18.85 $\pm$ 0.70**	12.92 $\pm$ 0.50**
怀牛膝 <i>A. bidentata</i>			20.88 $\pm$ 0.23**	20.73 $\pm$ 1.74**	17.53 $\pm$ 0.92**

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### 3.3 MTT法测定粗毛牛膝各分离部位对RAW264.7细胞的毒性作用

粗毛牛膝醇提取物经反相柱层析分离,水-甲醇梯度洗脱得到各个洗脱组分。各部分细胞毒性结果如表3所示,除去90%甲醇洗脱组外,其它部位均

在浓度范围为25~200  $\mu\text{g/mL}$ 时无明显细胞毒性,细胞存活率较高;在浓度为400~1200  $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞均有不同程度地死亡。故除90%甲醇洗脱组外,各洗脱组分均选取浓度为50、100、200  $\mu\text{g/mL}$ 进行干预,测定抗炎活性。

表3 粗毛牛膝各分离部位的细胞存活率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 3 Cell survival rate of different fractions of *Achyranthes aspera* Linnacus ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

浓度 Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	细胞存活率 Cell survival rate(%)							
	水洗物 Water elutes	10% 甲醇洗物 10% methanol elutes	30% 甲醇洗物 30% methanol elutes	50% 甲醇洗物 50% methanol elutes	70% 甲醇洗物 70% methanol elutes	90% 甲醇洗物 90% methanol elutes	100% 甲醇洗物 100% methanol elutes	丙酮洗物 Acetone elutes
空白对照 Blank control	100.00 $\pm$ 5.19	99.98 $\pm$ 5.80	100.02 $\pm$ 4.68	100.03 $\pm$ 2.76	99.98 $\pm$ 4.47	99.98 $\pm$ 2.09	100.00 $\pm$ 4.17	99.94 $\pm$ 4.28
25	97.29 $\pm$ 2.44	97.35 $\pm$ 2.77	104.67 $\pm$ 5.02	97.48 $\pm$ 1.43	95.46 $\pm$ 3.12	100.79 $\pm$ 2.04	96.67 $\pm$ 4.16	98.16 $\pm$ 8.92
50	101.79 $\pm$ 0.23	97.49 $\pm$ 2.74	99.93 $\pm$ 1.52	96.96 $\pm$ 4.16	91.94 $\pm$ 3.07	64.92 $\pm$ 4.09**	95.29 $\pm$ 4.33	98.23 $\pm$ 7.15
100	105.53 $\pm$ 5.43	94.66 $\pm$ 5.22	99.42 $\pm$ 6.57	96.87 $\pm$ 3.90	92.04 $\pm$ 1.82	8.57 $\pm$ 0.58**	98.28 $\pm$ 4.15	103.23 $\pm$ 2.99

续表 3(Continued Tab. 3)

浓度 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	细胞存活率 Cell survival rate(%)								
	水洗物 Water elutes	10% 甲醇洗物 10% methanol elutes	30% 甲醇洗物 30% methanol elutes	50% 甲醇洗物 50% methanol elutes	70% 甲醇洗物 70% methanol elutes	90% 甲醇洗物 90% methanol elutes	100% 甲醇洗物 100% methanol elutes	丙酮洗物 Acetone elutes	
200	104.07 $\pm$ 3.15	93.69 $\pm$ 3.39	91.92 $\pm$ 3.86	95.98 $\pm$ 3.92	97.78 $\pm$ 5.88	0.80 $\pm$ 0.04 **	96.09 $\pm$ 3.04	104.46 $\pm$ 5.57	
400	100.98 $\pm$ 4.37	96.52 $\pm$ 2.29	53.85 $\pm$ 4.98 *	90.77 $\pm$ 1.82 *	31.67 $\pm$ 2.51 **	0.75 $\pm$ 0.07 **	85.06 $\pm$ 4.09 *	102.69 $\pm$ 3.63	
800	108.91 $\pm$ 4.87	91.18 $\pm$ 1.50	28.23 $\pm$ 1.79 *	81.07 $\pm$ 2.98 *	11.89 $\pm$ 0.50 **	0.50 $\pm$ 0.03 **	70.06 $\pm$ 4.63 **	47.06 $\pm$ 4.04 **	
1 200	107.92 $\pm$ 3.65	83.80 $\pm$ 2.40 *	13.56 $\pm$ 1.09 *	49.28 $\pm$ 1.74 **	7.59 $\pm$ 0.37 **	0.09 $\pm$ 0.04 **	35.34 $\pm$ 2.24 **	24.63 $\pm$ 2.39 **	

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

### 3.4 土牛膝各分离部位对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响研究

各洗脱部分抗炎结果如表 4 所示,与模型组相比,粗毛牛膝各洗脱部位作用后,NO 释放量均有减少,且呈浓度依赖性。50 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下,水洗物对 NO 释放量无抑制作用( $P > 0.05$ ),浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的水洗物和 50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 10% 甲

醇洗物对 NO 释放量有抑制作用( $P < 0.05$ );其他组在各浓度下对 NO 释放量具有显著抑制作用( $P < 0.01$ )。另外,30%、50%、70%、100% 甲醇洗物和丙酮洗物在 50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下对 NO 释放量的抑制作用均极其明显。综合各洗脱物得率及抗炎活性,确定 50%、70% 及 100% 甲醇洗物为重点分离对象。

表 4 粗毛牛膝分离部位对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of different fractions of *A. aspera* on NO release of RAW264.7 cells induced by LPS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

不同洗脱部位 Different fraction	NO 释放量 NO release concentration( $\mu\text{M}$ )				
	对照组 Control group (LPS-)	模型组 Model group (LPS+)	LPS + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	LPS + 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
水洗物 Water elutes			32.32 $\pm$ 0.95	30.38 $\pm$ 0.52	27.64 $\pm$ 0.63 *
10% 甲醇洗物 10% methanol elutes			28.66 $\pm$ 0.28 *	27.18 $\pm$ 1.26 *	24.58 $\pm$ 0.43 **
30% 甲醇洗物 30% methanol elutes			23.85 $\pm$ 0.16 **	6.19 $\pm$ 0.16 **	2.06 $\pm$ 0.08 **
50% 甲醇洗物 50% methanol elutes	1.32 $\pm$ 0.16 **	32.23 $\pm$ 0.45	21.71 $\pm$ 0.28 **	13.23 $\pm$ 0.37 **	1.32 $\pm$ 0.08 **
70% 甲醇洗物 70% methanol elutes			13.46 $\pm$ 0.16 **	7.25 $\pm$ 0.24 **	0.90 $\pm$ 0.08 **
100% 甲醇洗物 100% methanol elutes			4.61 $\pm$ 0.14 **	1.55 $\pm$ 0.14 **	0.67 $\pm$ 0.08 **
丙酮洗物 Acetone elutes			2.71 $\pm$ 0.29 **	1.92 $\pm$ 0.08 **	0.76 $\pm$ 0.16 **

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

### 3.5 化合物结构鉴定

**化合物 1** 为白色晶体;紫外光下显暗紫色荧光,香草醛-浓硫酸反应显蓝绿色。液质联用分析,给出准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$  (481.318 1), $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$  (445.297 0),结合文献<sup>[7]</sup>和课题组前期分离对照品,确定该化合物为  $\beta$ -蜕皮甾酮。

**化合物 2** 为无色针状结晶;紫外光下可见暗紫色荧光,该化合物的比移值与  $\beta$ -蜕皮甾酮相似,香草醛-浓硫酸反应显示红色。与已知对照品比较,确定为牛膝甾酮,高效液相色谱分析显示两个峰。进行超高液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱分析,

出现两个峰,质谱数据显示相同准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$  (481.316 3 和 481.316 0),证明两个化合物分子式均为  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$ ,结合文献比较<sup>[13]</sup>,鉴定化合物为 25-*R* 牛膝甾酮,25-*S* 牛膝甾酮。

**化合物 3** 为白色结晶性粉末;紫外光下可见暗紫色荧光。负离子模式 ESI-MS 给出准分子离子峰 $[\text{M} + 2\text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$  (531.271 6),经过与前期分离对照品在三种高效液相色谱条件下比较,确定为水龙骨甾酮 B。

**化合物 4** 白色粉末状物质;<sup>1</sup>H NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.45 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-7),

7.13(1H, s, H-2), 7.07(2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-2'), 6.04(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-6), 6.81(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5), 6.73(2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-3', 5'), 6.42(1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-8), 3.90(3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.48(2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-8'), 2.77(2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-7'); <sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 169.5(s, C-9), 149.6(s, C-4), 157.2(s, C-3), 142.4(d, C-7), 128.6(s, C-1), 123.5(d, C-6), 119.0(d, C-8), 116.8(d, C-5), 111.8(d, C-2), 131.6(s, C-1'), 131.0(d, C-2', 6'), 150.1(s, C-4'), 116.6(d, C-3', 5'), 56.7(q, 3-OCH<sub>3</sub>), 42.9(t, C-8'), 36.1(t, C-7')。以上波谱数据与文献<sup>[14,15]</sup>基本一致, 鉴定为 *N*-反式阿魏酰酪胺。

**化合物 5** 为白色粉末状物质;核磁共振氢谱和碳谱数据同化合物 **4** 基本一致, 且两者一同制备分离得到, 化合物 **5** 长时间放置不太稳定, 可逐步转化为化合物 **4**; 两者的区别在于化合物 **5** 中  $\delta$  5.83(1H, d,  $J = 12.6$  Hz), 6.63(1H, d,  $J = 12.6$  Hz) 是一个顺式双键。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.38(1H, s, H-2), 6.94(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-6), 6.75(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5), 6.63(1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-7), 5.83(1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-8), 3.85(3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 7.01(2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-2'), 6.70(2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-3', 5'), 3.41(2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-8'), 2.71(2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-7'); <sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 170.3(s, C-9), 148.5(s, C-4), 156.9(s, C-3), 138.4(d, C-7), 131.1(s, C-1), 128.5(d, C-6), 124.8(d, C-8), 115.8(d, C-5), 113.9(d, C-2), 56.3(q, 3-OCH<sub>3</sub>), 131.4(s, C-1'), 130.7(d, C-2', 6'), 116.2(d, C-3', 5'), 148.5(s, C-4'), 42.3(t, C-8'), 35.5(t, C-7')。以上波谱数据与文献<sup>[14,15]</sup>报道一致, 故鉴定为 *N*-顺式阿魏酰酪胺。

**化合物 6** 白色粉末;<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.79(1H, s, H-2), 6.74(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5), 6.94(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-6), 2.73(2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-7), 3.44(2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-8), 7.38(1H, s, H-2'), 6.70(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5'), 6.62(1H, m, H-6'), 6.62(1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-7'), 5.84(1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-8'), 3.80(3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.84(3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 131.9(s, C-1), 113.9(d, C-2), 148.5(s, C-3), 148.9(s, C-4), 124.8(d, C-5), 116.1

(d, C-6), 138.3(d, C-7), 121.5(d, C-8), 170.4(s, C-9), 128.5(s, C-1'), 113.4(d, C-2'), 146.0(s, C-3'), 148.5(s, C-4'), 122.1(d, C-5'), 115.8(d, C-6'), 36.0(t, C-7'), 42.3(t, C-8'), 56.3(q, 3'-OCH<sub>3</sub>), 56.2(q, 3-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14,15]</sup>报道一致, 故鉴定为 *N*-顺式阿魏酰-3-甲氧基酪胺。

**化合物 7** 为白色粉末状物质;核磁共振氢谱和碳谱数据同化合物 **6** 基本一致, 两者一同制备分离得到, 且化合物 **6** 长时间放置不太稳定, 可逐步转化为化合物 **7**; 两者的区别在于化合物 **7** 中  $\delta$  6.33(1H, d,  $J = 15.6$  Hz), 7.36(1H, d,  $J = 15.6$  Hz) 是一个反式双键。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.75(1H, s, H-2), 6.68(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5), 6.60(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-6), 2.70(2H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-7), 3.42(2H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-8), 7.05(1H, s, H-2'), 6.72(1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.95(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-6'), 7.36(1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-7'), 6.33(1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-8'), 3.76(3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.81(3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 132.0(s, C-1), 113.4(d, C-2), 149.0(s, C-3), 149.8(s, C-4), 123.2(d, C-5), 116.4(d, C-6), 142.0(d, C-7), 118.7(d, C-8), 169.2(s, C-9), 128.2(s, C-1'), 111.5(d, C-2'), 146.0(s, C-3'), 149.3(s, C-4'), 122.3(d, C-5'), 116.1(d, C-6'), 36.2(t, C-7'), 42.4(t, C-8'), 56.3(q, 3'-OCH<sub>3</sub>), 56.3(q, 3-OCH<sub>3</sub>); 以上数据与文献<sup>[14,15]</sup>报道一致, 故鉴定为 *N*-反式阿魏酰-3-甲氧基酪胺。

**化合物 8** 通过与对照品比较, 在三种不同高效液相色谱条件下分析, 与竹节参皂苷 IVa 一致, 故鉴定化合物 **8** 为竹节参皂苷 IVa。

**化合物 9** 通过与对照品比较, 在三种不同高效液相色谱条件下分析, 与竹节参皂苷 I 一致, 故鉴定化合物 **9** 为竹节参皂苷 I。

**化合物 10** 为无色针状结晶(甲醇), 香草醛-浓硫酸反应显红色。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.93(1H, s, H-2), 7.38(1H, t,  $J = 8.4$  Hz, H-4'), 7.22(1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6'), 7.05(1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3'), 6.99(1H, t,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.72(1H, s, H-8), 4.59(2H, s, H-11), 3.85(3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.78(3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>), 3.44(3H, s, 11-OCH<sub>3</sub>), 以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道一致, 故鉴定为 5, 2'-二甲氧基-6-甲氧甲基-7-羟基-异黄酮。

### 3.6 MTT 法测定不同浓度单体化合物对 RAW264.7 细胞的毒性作用

选取地塞米松 (dexamethasone, DXMS) 为阳性对照药物, 分析 10 个单体的细胞毒性和抗炎活性, 由表 5 可见, 各单体化合物均在 12.5 ~ 50  $\mu\text{M}$  浓度范围时对细胞无明显毒性; 在浓度为 100 ~ 200  $\mu\text{M}$  时, 细胞均有不同程度地死亡。各单体化合物均在低于 50  $\mu\text{M}$  的浓度范围内细胞存活率较高, 且与正常对照组相比, 无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。故各单体化合物选取 12.5、25、50  $\mu\text{M}$  进行 NO 释放量检测。

表 5 不同浓度单体化合物的细胞存活率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Cell survival rate of each compound ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

化合物 Compound	浓度 Concentration ( $\mu\text{M}$ )					
	空白对照 Blank control	12.5	25	50	100	200
DXMS	100.00 $\pm$ 4.49	92.02 $\pm$ 3.43	93.55 $\pm$ 2.60	94.37 $\pm$ 1.60	67.61 $\pm$ 1.61 **	49.36 $\pm$ 3.08 **
1	100.03 $\pm$ 7.46	112.07 $\pm$ 1.68	104.21 $\pm$ 4.28	105.68 $\pm$ 2.79	81.21 $\pm$ 2.63 *	64.11 $\pm$ 4.26 **
2	100.00 $\pm$ 2.08	97.48 $\pm$ 3.07	92.78 $\pm$ 4.77	93.88 $\pm$ 3.20	77.64 $\pm$ 3.34 **	66.68 $\pm$ 3.16 **
3	100.00 $\pm$ 1.10	97.3 $\pm$ 2.18	95.11 $\pm$ 4.28	95.01 $\pm$ 4.94	84.76 $\pm$ 1.65 **	77.77 $\pm$ 6.35 **
4	100.00 $\pm$ 0.58	99.83 $\pm$ 1.00	100.00 $\pm$ 0.76	96.28 $\pm$ 0.85	86.97 $\pm$ 0.58 **	73.10 $\pm$ 0.59 **
5	100.00 $\pm$ 0.80	99.12 $\pm$ 1.00	98.44 $\pm$ 1.53	97.29 $\pm$ 0.85	75.83 $\pm$ 0.51 **	66.33 $\pm$ 0.85 **
6	100.00 $\pm$ 2.36	99.06 $\pm$ 1.73	95.96 $\pm$ 4.97	96.20 $\pm$ 3.05	64.96 $\pm$ 0.93 **	50.94 $\pm$ 0.58 **
7	100.00 $\pm$ 0.49	97.56 $\pm$ 0.54	99.59 $\pm$ 1.08	100.20 $\pm$ 1.61	76.37 $\pm$ 0.61 **	56.82 $\pm$ 0.41 **
8	100.01 $\pm$ 4.11	97.62 $\pm$ 4.26	98.69 $\pm$ 3.95	93.33 $\pm$ 1.69	71.17 $\pm$ 2.89 **	52.98 $\pm$ 1.97 **
9	100.06 $\pm$ 7.20	99.45 $\pm$ 1.13	95.89 $\pm$ 7.02	93.37 $\pm$ 1.06	76.25 $\pm$ 0.31 **	61.12 $\pm$ 4.31 **
10	99.98 $\pm$ 2.29	93.80 $\pm$ 1.50	92.34 $\pm$ 2.80 *	92.07 $\pm$ 1.50 **	73.25 $\pm$ 2.12 **	45.77 $\pm$ 2.35 **

注: 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

表 6 土牛膝各单体化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of different compounds on NO release of RAW264.7 cells induced by LPS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

化合物 Compound	NO 释放量 NO release concentration ( $\mu\text{M}$ )				
	对照组 Control group (LPS-)	模型组 Model group (LPS +)	LPS + 12.5 $\mu\text{M}$	LPS + 25 $\mu\text{M}$	LPS + 50 $\mu\text{M}$
DXMS	1.15 $\pm$ 0.21 **	25.63 $\pm$ 0.42	14.36 $\pm$ 0.38 **	12.23 $\pm$ 0.25 **	8.78 $\pm$ 0.43 **
1			14.26 $\pm$ 0.42 **	13.26 $\pm$ 0.31 **	12.26 $\pm$ 0.16 **
2			17.40 $\pm$ 0.43 **	15.03 $\pm$ 0.29 **	12.67 $\pm$ 0.29 **
3			20.50 $\pm$ 0.21 **	19.94 $\pm$ 0.21 **	19.48 $\pm$ 0.35 **
4			15.58 $\pm$ 0.22 **	12.40 $\pm$ 0.36 **	8.60 $\pm$ 0.39 **
5			16.65 $\pm$ 0.37 **	14.96 $\pm$ 0.37 **	12.01 $\pm$ 0.28 **



续表 6(Continued Tab. 6)

化合物 Compound	NO 释放量 NO release concentration( $\mu\text{M}$ )				
	对照组 Control group(LPS-)	模型组 Model group(LPS +)	LPS + 12.5 $\mu\text{M}$	LPS + 25 $\mu\text{M}$	LPS + 50 $\mu\text{M}$
6			18.04 $\pm$ 0.34 **	16.42 $\pm$ 0.34 **	14.41 $\pm$ 0.46 **
7			20.40 $\pm$ 0.40 **	19.96 $\pm$ 0.45 **	18.31 $\pm$ 0.30 **
8			22.58 $\pm$ 0.31 **	20.21 $\pm$ 0.62 **	16.69 $\pm$ 0.12 **
9			18.79 $\pm$ 0.35 **	17.35 $\pm$ 0.37 **	15.54 $\pm$ 0.70 **
10			19.21 $\pm$ 1.12 **	17.63 $\pm$ 0.08 **	14.34 $\pm$ 0.16 **

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

### 3.8 系统适用性试验结果与分析

分别吸取对照品溶液、供试样品溶液、样品溶液加对照品溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,按“色谱条件”注入液相色谱仪测定,结果表明采用本色谱条件, $\beta$ -蜕皮甾酮与相邻峰分离度好,大于 1.5,且在与对照品相同的保留时间内,空白无干扰。

#### 3.8.1 线性关系考察结果

$\beta$ -蜕皮甾酮进样量在 28 ~ 560 ng 范围内线性关系好,线性方程为  $y = 840.35x - 701.31$ ,  $R^2 = 0.9997$ 。

#### 3.8.2 精密度试验

精密吸取 5  $\mu\text{L}$  对照品溶液,连续重复进样 6 次,测定峰面积并计算 RSD,结果显示  $\beta$ -蜕皮甾酮峰面积 RSD 为 2.44%,表明仪器精密度好。

#### 3.8.3 稳定性试验

取同一供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,分别于 0、2、4、8、12、

24 h 注入液相色谱仪,测定待测成分峰面积并计算 RSD;结果表明  $\beta$ -蜕皮甾酮峰面积的 RSD 为 2.15%,表明供试品溶液室温放置 24 h 内稳定。

#### 3.8.4 重现性试验

按样品制备方法,平行制备 6 份供试品溶液,按色谱条件进行测定,结果表明  $\beta$ -蜕皮甾酮平均含量为 0.0604%,RSD 为 1.99%,说明方法重现性好。

#### 3.8.5 加样回收率试验

精密称取已测含量的柳叶牛膝粉末约 0.1 g,置 10 mL 容量瓶中,精密加入用色谱纯甲醇配置的对照品溶液 2.5 mL(即加入  $\beta$ -蜕皮甾酮 70  $\mu\text{g}$ ),甲醇定容,按样品制备方法制备加样供试品溶液,测定并计算加样回收率。结果如下表 7 所示,平均回收率为 104.05%,RSD 为 1.54%,说明该方法测定结果准确。

表 7 加样回收率试验结果

Table 7 Test results of sample adding recovery rate

试验次数 Test times(n)	样品含量 Content( $\mu\text{g}$ )	加对照品量 Added( $\mu\text{g}$ )	测定量 Detected( $\mu\text{g}$ )	回收率 Recovery(%)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD(%)
1	74.33	70	147.67	104.77	104.05	1.54
2	74.60	70	146.75	103.07		
3	74.51	70	147.17	103.80		
4	74.23	70	148.22	105.70		
5	74.14	70	147.97	105.47		
6	74.70	70	145.75	101.50		

### 3.9 土牛膝不同季节蜕皮甾酮含量测定结果

对不同土牛膝和不同月份  $\beta$ -蜕皮甾酮含量测定,结果如下表 8 所示。野生牛膝(采集于湖南中医药大学药用植物园)和柳叶牛膝(种植基地,两年

生)地下根茎不同月份中含量差异较大,从 4 月到 12 月季节变化过程中,含量先逐渐增加,后又逐渐降低,其中 8 月含量最高,分别为  $0.914 \pm 0.016$  和  $1.412 \pm 0.038$  mg/g。8 月是湖南地区温度最高季

节,说明温度高有利于次生代谢产物 $\beta$ -蜕皮甾酮的累积。粗毛牛膝(种植基地,两年生) $\beta$ -蜕皮甾酮含量随季节变化影响不大。

表8 不同品种土牛膝不同季节蜕皮甾酮含量测定结果

Table 8 Ecdysterone content determination results of different varieties of Tunixi in different seasons(mg/g)

月份 Month	柳叶牛膝(两年生) <i>A. longifolia</i> (Two years life)	粗毛牛膝(两年生) <i>A. aspera</i> (Two years life)	野生牛膝 Wild <i>A. bidentata</i>
4	0.565 ± 0.024	0.535 ± 0.013	0.287 ± 0.009
5	0.725 ± 0.019	0.641 ± 0.017	0.382 ± 0.020
6	1.025 ± 0.035	0.572 ± 0.021	0.548 ± 0.014
7	1.075 ± 0.014	0.612 ± 0.019	0.731 ± 0.010
8	1.412 ± 0.038	0.661 ± 0.022	0.914 ± 0.016
9	1.305 ± 0.060	0.634 ± 0.029	0.510 ± 0.011
10	1.076 ± 0.013	0.576 ± 0.018	0.481 ± 0.017
11	1.116 ± 0.052	0.647 ± 0.009	0.355 ± 0.012
12	1.016 ± 0.021	0.604 ± 0.016	0.322 ± 0.011

#### 4 结论与讨论

粗毛牛膝、野生牛膝和柳叶牛膝醇提取物均能剂量依赖性抑制 NO 量的释放,其中以粗毛牛膝醇提取物抗炎效果最佳;粗毛牛膝醇提取物过反相层析组分,50%、70%及100%甲醇洗脱物表现为细胞毒性低,抗炎活性高;进一步经分离鉴定,从50%~70%甲醇洗脱物分离鉴定出9种单体化合物: $\beta$ -蜕皮甾酮(1)、牛膝甾酮(2)、水龙骨甾酮 B(3)、*N*-反式阿魏酰酪胺(4)、*N*-顺式阿魏酰酪胺(5)、*N*-顺式阿魏酰-3-甲氧基酪胺(6)、*N*-反式阿魏酰-3-甲氧基酪胺(7)、竹节参皂苷 IV a(8)、5,2'-二甲氧基-6-甲氧基-7-羟基-异黄酮(10)、竹节参皂苷 I(9)为100%甲醇洗脱物主要成分;体外抗炎结果表明,各单体在安全剂量范围内,均能剂量依赖性抑制 NO 量的释放,在 LPS + 25  $\mu$ M 单体浓度下,化合物抗炎活性强弱依次为 4 > 1 > 5 > 2 > 6 > 9 > 10 > 3 > 7 > 8,比较抗炎活性与原药材含量, $\beta$ -蜕皮甾酮(1)为主要抗炎活性单体;野生牛膝和柳叶牛膝(两年生)地下根茎 $\beta$ -蜕皮甾酮含量随季节有明显变化,体现在温度高季节含量高,温度低含量降低;而两年生粗毛牛膝随季节变化规律不明显。以上结果表明土牛膝具有显著的抗炎作用,抗炎成分包括甾酮类、三萜皂苷、生物碱类及异黄酮类,具有抗炎活性的阿魏酰酪胺生物碱为首次从土牛膝中分离鉴定。

ODS-AQ 是日本 YMC 公司研发的一种独特高品质亲水性球形 C<sub>18</sub> 色谱填料,可用 100% 水系为流动相。本实验中采用 ODS-AQ 柱对粗毛牛膝醇提取

物进行分离,首先采用纯水洗脱,将糖类或糖苷类洗脱下来,本实验水洗物特别多,干燥后占总提取物约 85%,活性测定显示水洗物基本无抗炎活性,因此使用 ODS-AQ 柱对粗毛牛膝醇提取进行活性分离是成功的。水洗后,反相 ODS-AQ 柱继续用甲醇-水梯度洗脱,甲醇比例逐渐增加,洗脱成分极性也逐渐降低,活性测定显示,抗炎活性也逐渐升高,这充分说明土牛膝中起到关键抗炎作用的是极性较低化合物,这与文献<sup>[16]</sup>记载“土牛膝根吹末或温酒治疗,效果更佳”是一致的。项目前期已经从土牛膝中分离得到了几个吡啶类生物碱,此次又首次分离鉴定了阿魏酰酪胺生物碱类,进一步丰富了土牛膝的化学资源库,也提示进一步对土牛膝极性较低组分展开化学成分研究,将得到更多活性好和有趣的化合物。

$\beta$ -蜕皮甾酮是土牛膝起抗炎的主要活性成分,含量测定结果表明野生牛膝和柳叶牛膝(两年生)地下根据含量随季节有明显变化,体现在温度高季节含量高,温度低含量降低,而两年生粗毛牛膝随季节变化规律不明显,这可能与粗毛牛膝地下根茎粗硬,对 $\beta$ -蜕皮甾酮的累积影响小。在 $\beta$ -蜕皮甾酮含量测定,中国药典采用水饱和正丁醇超声提取或甲醇提取,提取液蒸干后再甲醇溶解定容,我们在操作中发现,提取液蒸干后,样品变得很黏,甲醇溶解转移后损失大。另外在甲醇超声提取时,超声仪的功率和超声时间对提取影响大,超声提取功率为 40 kHz(100 W)和超声 30 min 能将 $\beta$ -蜕皮甾酮充分提取出来。 $\beta$ -蜕皮甾酮结构中含有不饱和羰基结构,

250 nm 为最大吸收波长,摩尔吸收系数大,因此 0.1 g 药材置于 10 mL 容量瓶超声提取,提取液用滤膜过滤测定,即使药材中蜕皮甾酮含量低至万分之一也在线性范围内。

#### 参考文献

- 1 He XL. Study on the identification and application of *Achyranthes bidentata*, *Cyathula officinalis* Kuan and Tunixi[J]. J Pract Tradit Chin Med(实用中医药杂志),2013,29(2):136-137.
- 2 Peng YM, Li YH, Xie Y, et al. Study on the application of membrane separation technology in the purification of Houy-anqing oral liquid [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2014, 36:1991-1993.
- 3 Hunan Provincial Health Committee. Prevention and control of novel coronavirus infection in neonates in Hunan province (Trial version 1) [R]. Brief letter of Xiangwei Medical Administration Office 2020, Number 34.
- 4 Rao F, Li RQ, Fu HZ, et al. Experimental study of wild *Achyranthes* root on acute pharyngitis [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志), 2009, 8: 4073-4074.
- 5 Ou LL, Yu X, Zhu Y, et al. Anti-inflammatory effects of *Achyranthes aspera* on animal models of acute inflammation [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 2012, 27: 644-646.
- 6 Ou YW, Luo YF, Chen SJ, et al. A new isoflavonol isolated from *Achyranthes aspera* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49:3208-3212.
- 7 Ou YW, Luo YF, Chen SJ, et al. Study on the ecdysterone constituents of *Achyranthes aspera* L. [J]. J Hunan Univ Chin Med (湖南中医药大学学报), 2018, 38:1129-1132.
- 8 Chen ZQ, Fu JM, Yang T, et al. Effects of inflammatory cyto-
- 9 kines on expression of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in synovial cells and its mechanism [J]. Zhejiang Med J (浙江医学), 2019, 41:1816-1820.
- 9 Zhang L, Hasegawa I, Ohta T. Anti-inflammatory cyclopentene derivatives from the inner bark of *Tabebuia avellanedae* [J]. Fitoterapia, 2016, 109:217-223.
- 10 Teh SS, Ee GCL, Mah SH. Evaluation of nitric oxide inhibition effect in LPS-stimulated RAW 264. 7 macrophages by phytochemical constituents from *Mesua beccariana*, *Mesua congestiflora* and *Mesua ferrea* [J]. Med Chem Res, 2017, 26:3240-3246.
- 11 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 72.
- 12 Zhang LJ, Sun DD, Tu WQ, et al. Study on determination of  $\beta$ -ecdysterone and fingerprints of *Achyranthes bidentata* Bl. from different areas [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25:500-505.
- 13 Zhang LJ, Liu XM, Tu WQ, et al. Simultaneous determination of five components in *Achyranthis Bidentatae Radix* by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2018, 38:623-629.
- 14 Zhang LL, Li YX, Wei XY, et al. Chemical constituents from twigs of *Euptelea pleiospermum* [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2016, 24:228-232.
- 15 Sarker U SD, Bartholomew B, Nash RJ. Alkaloids from *Balanites aegyptiaca* [J]. Fitoterapia, 2000, 71:328-330.
- 16 Chinese Materia Medica Editorial Board of National Institute of Chinese Medicine. Chinese Materia Medica (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999:1481.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社