

油茶枯乙酸乙酯部位化学成分及其抗炎活性

焦兵¹, 许承婷¹, 黎青¹, 覃江克^{1*}, 宋云飞²

- (1. 广西师范大学 化学与药学院, 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室, 广西 桂林 541004;
2. 桂林莱茵生物科技股份有限公司, 广西 桂林 541199)

[摘要] 目的:为了深入研究油茶枯化学成分及其药理活性,为其进一步开发利用奠定科学依据。方法:采用各种柱色谱手段对油茶枯醇提取物的乙酸乙酯部位化学成分进行分离,采用现代波谱手段鉴定其结构;并采用脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立体外炎症筛选模型,评价其抗炎活性,为其进一步开发利用奠定科学依据。结果:从油茶枯醇提取物的乙酸乙酯部位中分离获得 10 个化合物,其中 8 个为酚酸类化合物,2 个为黄酮类化合物,分别为对羟基苯甲酸(1),原儿茶酸(2),没食子酸(3),没食子酸甲酯(4),没食子酸乙酯(5),异香草酸(6),3,4-二羟基苯甲酸乙酯(7),2-(3',4'-二羟基)-1,3-胡椒环-5-醛(8),槲皮素(9),芦丁(10),其中化合物 4~8 为首次从该植物中分离获得。上述化合物对 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 产生炎症因子 NO 均具有良好的抑制作用,剂量依赖性明显,其中化合物 8 的活性最强。结论:油茶枯中的酚酸和黄酮类化合物在抗炎药物的开发、应用上具有良好发展前景。

[关键词] 油茶; 油茶枯; 乙酸乙酯部位; 2-(3', 4'-二羟基)-1, 3-胡椒环-5-醛

[中图分类号] R284.1;R284.2;R289;R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0132-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20191012

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190212.1446.004.html>

[网络出版时间] 2019-02-13 13:35

Chemical Constituents of Ethyl Acetate Extract from Seed Cake of *Camellia oleifera* and Its Anti-inflammatory Activities

JIAO Bing¹, XU Cheng-ting¹, LI Qing¹, QIN Jiang-ke^{1*}, SONG Yun-fei²

- (1. State Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, School of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China;
2. Guilin Layn Natural Ingredients Corporation, Guilin 541199, China)

[Abstract] **Objective:** To intensively study the chemical constituents from the seed cake of *Camellia oleifera* and its pharmacological activities, in order to provide scientific basic for its further development and utilization. **Method:** All kinds of column chromatography and spectral methods were employed to isolate and identify the monomeric compounds from its ethyl acetate portion of ethanol extract. The *in vitro* anti-inflammatory effects were evaluated by LPS-induced inflammatory model in RAW264.7 macrophages. **Result:** Eight phenolic acids and two flavonoids were isolated from the ethyl acetate soluble portion and identified as *p*-hydroxybenzoic acid (1), protocatechuic acid (2), gallic acid (3), methyl gallate (4), ethyl gallate (5), isovanillic acid (6), ethyl 3, 4-dihydroxybenzoate (7), 2-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-1, 3-benzodioxole-5-aldehyde (8),

[收稿日期] 20181126(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21462007);广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 1598007-19);省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室支持项目(CMEMR2015-A03,CMEMR2016-A08)

[第一作者] 焦兵,硕士,从事天然药物化学研究,E-mail:1161499609@qq.com

[通信作者] *覃江克,博士,教授,博士生导师,从事天然药物化学研究,E-mail:jiangkeq@sina.com

quercetin (9), rutoside (10). Among them, compounds 4-8 were first isolated from this plant. These compounds had good anti-inflammatory activities against NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages in an obvious dose-dependent manner. Among them, compound 8 showed a strongest activity. **Conclusion:** The above results show that the phenolic acids and flavonoids from seed cake of *C. oleifera* have good prospects for the development and application of anti-inflammatory drugs.

[Key words] *Camellia oleifera*; seed cake of *Camellia oleifera*; ethyl acetate extract; 2-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-1, 3-benzodioxole-5-aldehyde

油茶 (*Camellia oleifera*) 系山茶科山茶属植物, 是世界四大木本油料植物之一, 油茶产油量大, 茶籽油营养价值高, 具有食药两用功能, 对于预防和治疗高血压、冠心病、高血脂、动脉粥样硬化等心血管疾病具有良好的功效^[1]。油茶枯是油茶果制取茶油后的余渣, 据统计我国年产茶油约 30 万吨, 油茶枯约百万吨, 资源贮量大^[2]。油茶枯性苦、辛辣 (含有皂素), 工业上常用于提取皂素; 在民间仅用于肥田, 大量被废弃作燃料, 未能有效地加以综合利用和充分发挥油茶的宝贵价值, 造成了极大的资源浪费^[3]。

油茶作为一种在我国南方地区广泛存在的食药两用植物, 种植历史悠久, 还积累了丰富的民间药用经验与优良传统, 其根、花、果、油等早被 2005 年版《中国药典》记载^[4], 油茶枯在用于湿疹、跌打损伤等病痛的治疗上, 被《中药大词典》《岭南中草药》所记载^[5-6]。油茶枯药用价值上的突破, 需要依赖于对其化学成分和药理学活性系统性研究工作的进展。近年来随着学者深入研究, 发现油茶枯中富含皂素、多酚、多糖等多种生物活性成分, 据报道油茶皂素、油茶多酚具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化、抗炎等多种生物活性^[7-12], 除此之外油茶多糖具有较好的降脂、降血糖作用^[13-14]。然而目前这些研究对象大多是油茶枯粗提物, 对油茶枯中纯单体化合物生物活性的报道较少^[3]。鉴于目前对油茶枯中纯单体化合物的研究很少, 笔者对油茶枯的单体化学成分进行了系统分离, 从其 80% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位中分离获得 8 个酚酸类化合物和 2 个黄酮类化合物, 分别鉴定为对羟基苯甲酸(1), 原儿茶酸(2), 没食子酸(3), 没食子酸甲酯(4), 没食子酸乙酯(5), 异香草酸(6), 3,4-二羟基苯甲酸乙酯(7), 2-(3', 4'-二羟基苯基)-1, 3-胡椒环-5-醛(8), 槲皮素(9), 芦丁(10), 其中化合物 4~8 为首次从该植物中分离获得; 并采用脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 体外炎症筛选模型初步评价其抗炎活性, 以期对油茶枯化学成分的深度研究与开发利用提供一定实验和理论基础。

1 材料

油茶枯购于广西桂林市龙胜县, 经广西师范大学生命科学院唐绍清教授鉴定为正品。RAW264.7 巨噬细胞 (中科院上海生命科学研究院); 一氧化氮 (NO) 试剂盒 (碧云天公司, 批号 062617170810); 噻唑蓝 (MTT) 粉剂、脂多糖 (Solarbio 公司, 批号分别为 1117X055, 813Q032); DMEM 基础培养基、胎牛血清 (Gibco 公司, 批号 A37F00H, 8117278); 吡啶美辛 [萨恩化学技术 (上海) 有限公司, 批号 DG060035]; 石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇、甲醇 (西陇化工股份有限公司, 分析纯); 50 μm ODS 常压开放柱填料, YMC-Pack-ODS-AQ (20.0 mm \times 250 mm) (日本 YMC 有限责任公司); Inertil ODS-3 (4.6 mm \times 250 mm) 分析柱 (日本岛津科技公司); 100~200 目柱色谱硅胶 (青岛海洋化工有限公司); WRS-IA 型数字熔点仪 (上海精密科学仪器有限公司); 400 MHz, 500 MHz 型超导核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); P230 II 型高效液相色谱 (大连依利特分析仪器有限公司); Dr. Flash 中压快速纯化系统 [利穗科技 (苏州) 有限公司]; Infinite M1000 型多功能酶标仪 (Tecan 公司)。

2 方法

2.1 提取分离 取粉碎后的油茶枯粉末 6 kg, 用 80% 的乙醇回流提取 3 次 (60 L \times 3), 每次为 3 h, 合并总提取液, 减压浓缩得褐色流浸膏 2.5 L。静置后撇去上层残油, 将下层浸膏分为 10 份并分别分散于 2 L 水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取。其中乙酸乙酯萃取物 80 g, 经硅胶柱色谱进行分离, 石油醚-乙酸乙酯 (9:1~0:1) 梯度洗脱, TLC 检测各流分, 合并相同组分, 收集 10%, 20%, 40%, 50%, 60% 乙酸乙酯的流分, 得 Fr. 1~Fr. 5 共 5 个流分。Fr. 2 经中低压制谱以 50 μm ODS 为分离填料, 甲醇-水 (10:90~80:20) 梯度洗脱, HPLC 跟踪检测, 合并相同流分, 得 Fr. 2-1~Fr. 2-8 共 8 个组分; Fr. 2-7 组分经半制备液相色谱甲醇-水 (60:40~80:20) 梯度洗脱, 反复分离得化合物 6 (58 mg)

和 7(11.7 mg);Fr. 2-8 组分在放置过程中析出白色晶体,过滤、石油醚洗涤后得化合物 4(5.6 mg)。Fr. 3 经中低压制备色谱以 50 μm ODS 为分离填料,甲醇-水(10:90 ~ 80:20)梯度洗脱,HPLC 跟踪检测,合并相同流分,其中 80% 甲醇洗脱部分,再利用半制备色谱 75% 甲醇洗脱,得化合物 2(23 mg)和 5(14 mg)。Fr. 4 经中低压制备色谱以 50 μm ODS 为分离填料,甲醇-水(50:50 ~ 100:0)梯度洗脱,收集 80% 甲醇洗脱部分,再利用半制备液相色谱甲醇-水(75:25)等度洗脱,得化合物 1(25 mg),3(10 mg),8(20 mg)。Fr. 5 经中低压制备色谱以 50 μm ODS 为分离填料,甲醇-水(50:50 ~ 100:0)梯度洗脱,HPLC 跟踪检测,合并相同流分,对于 60% 甲醇洗脱部分,再利用半制备色谱甲醇-水(55:45)洗脱,得到化合物 9(15.2 mg)和 10(6 mg)。HPLC 分析的条件均为甲醇-水(5:95 ~ 100:0)梯度洗脱 30 min,检测波长为 254 nm。

2.2 抗炎活性测试

2.2.1 细胞毒性试验

采用 MTT 法测定化合物的细胞毒性^[15]。将生长态势表现良好的 RAW264.7 细胞进行消化,得到 RAW264.7 细胞悬液并对其进行细胞计数,依照计数结果将细胞密度调整至 1×10^5 个/mL。按照每孔 180 μL 的体积将细胞悬液接种于 96 孔板中,在 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 条件下的细胞培养箱中培养 24 h。倒去培养基之后,重新加入新鲜培养基 180 μL ,并在每孔中加入 LPS 溶液 10 μL 使其质量浓度为 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,然后在 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 条件下细胞培养箱中放置 2 h。再把不同浓度的阳性对照吡啶美辛以及化合物样品,加入到 96 孔板中,每个浓度梯度设置 4 个复孔。于 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养 24 h。每孔加入质量浓度为 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 10 μL ,放置在培养箱中继续作用 4 h。弃掉上清液,每孔加入 DMSO 100 μL ,震荡 15 min 使得甲臞紫色结晶完全溶解。将 96 孔板按要求放置于酶标仪中,选择波长为 570 nm,在此条件下测定吸光度 A。根据测得的 A 值计算细胞存活率。利用 Origin 8.0 进行数据处理和统计学分析。

2.2.2 炎症介质 NO 的检测

采用 Griess 法来检测亚硝酸盐,从而测定出总 NO 的含量^[16]。取对数生长期的 RAW264.7 细胞,用细胞刮刮落细胞,轻轻吹打成单细胞悬液,离心弃去上清液,用完全培养基重悬细胞并计数后,按每孔 2 mL 接种至 6 孔培养板中,5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 饱和湿度条件下培养 24 h。吸尽每孔上清液,加入新鲜无血清 DMEM 培养基,随

机分为对照组, LPS (5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, LPS (5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 化合物组,每组设 3 个复孔,加入相应浓度药物后于 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 饱和湿度条件下继续培养 24 h,随后取细胞上清液测定其中 NO 的含量。

3 结构鉴定

化合物 1 白色无定型粉末, mp 214 ~ 216 $^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.87 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 6.82 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 122.7 (C-1), 133.0 (C-2, 6), 116.0 (C-3, 5), 163.4 (C-4), 170.0 (COOH)。以上数据与文献[17]报道一致,故鉴定该化合物为对羟基苯甲酸。

化合物 2 无色针状结晶,与 FeCl_3 反应显深蓝色,提示有酚羟基存在;与溴甲酚绿反应阳性,提示有羧基存在, mp 199 ~ 200 $^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.44 (1H, br s, H-2), 6.80 (1H, dd, $J = 0.8, 7.8$ Hz, H-5), 7.43 (1H, dd, $J = 2.0, 7.8$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 123.1 (C-1), 115.8 (C-2), 146.1 (C-3), 151.5 (C-4), 117.7 (C-5), 123.9 (C-6), 170.2 (COOH); 以上数据与文献[18]报道一致,故鉴定该化合物为原儿茶酸。

化合物 3 无色针状晶体, mp 232 ~ 234 $^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 12.30 (1H, br s, COOH), 9.21 (2H, br s, 3, 5-OH), 8.86 (1H, br s, 4-OH), 6.93 (2H, s, H-2, 6); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ : 120.9 (C-1), 109.2 (C-2, 6), 145.9 (C-3, 5), 138.4 (C-4), 167.9 (COOH)。以上数据与文献[19]报道一致,故鉴定化合物为没食子酸。

化合物 4 白色无定型粉末, mp 201 ~ 204 $^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.04 (2H, br s, H-2, 6), 3.81 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 121.5 (C-1), 110.0 (C-2), 146.5 (C-3, 5), 139.7 (C-4), 109.1 (C-6), 169.0 (C=O), 52.3 (OCH_3)。以上数据与文献[20]报道一致,故鉴定化合物为没食子酸甲酯。

化合物 5 白色无定性粉末, mp 151 ~ 154 $^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.05 (2H, s, H-2, 6), 4.27 (2H, q, $J = 5.6$ Hz, OCH_2), 1.35 (3H, t, $J = 5.6$ Hz, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 121.8 (C-1), 110.0 (C-2, 6), 146.5 (C-3, 5), 139.7 (C-4), 168.6 (C=O), 61.7 (OCH_2), 14.5 (CH_3)。以上数据与文献[20]报道一致,故鉴定化合物为没食子酸乙酯。

化合物 6 白色无定型粉末, mp 255 ~

257 °C; ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.54 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, H-6), 7.44 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 6.97 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 3.89 (3H, s, OCH₃); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 170.3 (C = O), 124.4 (C-1), 111.7 (C-2), 147.3 (C-3), 153.3 (C-4), 117.3 (C-5), 123.6 (C-6), 56.4 (OCH₃)。以上数据与文献[21]报道一致,故鉴定化合物为异香草酸。

化合物 7 白色无定型粉末, mp 132 ~ 135 °C; ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.43 (1H, br s, H-2), 7.42 (1H, dd, *J* = 2.1, 7.8 Hz, H-6), 6.80 (1H, dd, *J* = 0.8, 7.8 Hz, H-5), 4.29 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, O-CH₂), 1.35 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₃); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 168.4 (C = O), 122.9 (C-1), 115.8 (C-2), 146.2 (C-3), 151.6 (C-4), 117.4 (C-5), 123.6 (C-6), 61.7 (O-CH₂), 14.6 (CH₃)。以上数据与文献[22]报道一致,故鉴定化合物为 3,4-二羟基苯甲酸乙酯。

化合物 8 白色无定型粉末, mp 203 ~ 205 °C; ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 9.66 (1H, s, CHO), 7.32 ~ 7.26 (2H, m, H-4, 6), 6.90 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-7), 6.85 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-2'), 6.77 ~ 6.69 (2H, m, H-5', 6'), 5.19 (1H, s, H-2); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 105.2 (C-2), 115.2 (C-4), 131.2 (C-5), 126.9 (C-6), 116.6 (C-7), 147.6 (C-8), 154.1 (C-9), 193.6 (CHO), 147.0 (C-1'), 115.8 (C-2'), 146.5 (C-3'), 131.5 (C-4'), 116.2 (C-5'), 119.9 (C-6')。以上数据与文献[23]报道一致,故鉴定化合物为 2-(3',4'-二羟苯基)-1,3-胡椒环-5-醛。

化合物 9 黄色针状结晶, mp 252 ~ 253 °C。 ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.69 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.42 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6)。 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 147.7 (C-2), 135.7 (C-3), 175.9 (C-4), 156.1 (C-5), 98.2 (C-6), 163.9 (C-7), 93.4 (C-8), 160.7 (C-9), 103.0 (C-10), 122.0 (C-1'), 115.1 (C-2'), 45.1 (C-3'), 146.8 (C-4'), 115.6 (C-5'), 119.9 (C-6')。以上数据与文献[24]报道一致,故鉴定该化合物为槲皮素。

化合物 10 黄色粉末, mp 188 ~ 190 °C。 ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.58 ~ 7.50 (2H, m, H-2', 6'), 6.85 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d,

J = 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 5.33 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1''), 4.38 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-1'''), 3.70 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-6''), 3.41 ~ 3.02 (9H, m, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 2''', 3''', 4''', 5'''), 0.98 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, H-6''')。 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 156.2 (C-2), 133.3 (C-3), 177.4 (C-4), 161.2 (C-5), 98.7 (C-6), 164.1 (C-7), 93.6 (C-8), 156.5 (C-9), 104.0 (C-10), 121.2 (C-1'), 115.2 (C-2'), 144.7 (C-3'), 148.4 (C-4'), 116.3 (C-5'), 121.6 (C-6'), 101.2 (C-1''), 74.1 (C-2''), 76.4 (C-3''), 70.0 (C-4''), 75.9 (C-5''), 67.0 (C-6''), 100.7 (C-1'''), 70.4 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 68.2 (C-5'''), 17.7 (C-6''')。以上数据与文献[25]报道一致,故鉴定该化合物为芦丁。

上述化合物 1 ~ 8 均为酚酸类化合物, 9 ~ 10 为黄酮类化合物, 其中化合物 4 ~ 8 为首次从该植物中分离获得。

4 抗炎活性测定

4.1 细胞毒性实验 采用 MTT 方法测定了化合物 1 ~ 10 和阳性对照吲哚美辛对 RAW264.7 细胞存活率的影响, 结果见表 1。阳性对照药吲哚美辛在浓度为 50 ~ 200 μmol·L⁻¹ 时与阴性对照组无差异, 说明在该浓度范围内吲哚美辛无细胞毒性。化合物 1 ~ 10 在浓度为 100 μmol·L⁻¹ 及以下浓度时, 细胞存活率与阴性对照组无明显差异, 说明化合物 1 ~ 10 在该浓度及以下没有细胞毒作用; 但浓度升至 200 μmol·L⁻¹ 时, 大部分化合物的细胞存活率均低于 80%, 与阴性对照组有显著性差异, 说明该浓度下化合物有细胞毒作用。因此, 选取了 25, 50, 100 μmol·L⁻¹ 的终浓度下进行后续的抗炎活性考察, 确保化合物在无毒的浓度范围内进行测试。

4.2 抗炎活性 NO 是诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 催化精氨酸氧化分解产生的重要生物信使化合物, 其在正常的细胞或组织中有少量的基础表达, 然而在细胞或机体受外界刺激引发炎症反应时, 其表达量迅速数倍增加, 不但与周围组织反应, 并生成破坏性更强的自由基等, 进一步加剧炎症反应, 通常被认为是炎症产生标志和细胞体外抗炎筛选模型考察的常用指标^[26]。化合物 1 ~ 10 在不同剂量下中对炎症介质 NO 的抑制能力见表 2。实验结果表明, 正常组的 RAW264.7 细胞的上清液中 NO 的浓度为 (15.1 ± 0.8) μmol·L⁻¹, 在受到 5 ng·L⁻¹ 的 LPS 刺激后 NO 的浓度提升至 (56.3 ± 1.9) μmol·L⁻¹, 诱发了显著的炎症反应; 而当加入阳性药吲哚美辛及

表 1 化合物对 RAW264.7 细胞存活率的影响

Table 1 Effect of compounds on RAW264.7 cells viability

组别	加药浓度		
	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
化合物 1	75.3 \pm 1.5 ¹⁾	90.4 \pm 1.0	93.4 \pm 2.5
化合物 2	74.2 \pm 1.6 ¹⁾	91.6 \pm 0.7	95.7 \pm 3.6
化合物 3	69.8 \pm 1.2 ¹⁾	92.5 \pm 2.6	96.3 \pm 0.7
化合物 4	70.0 \pm 2.5 ¹⁾	91.8 \pm 1.1	94.3 \pm 0.4
化合物 5	67.3 \pm 3.6 ¹⁾	90.9 \pm 2.3	93.0 \pm 1.0
化合物 6	65.6 \pm 1.8 ¹⁾	90.7 \pm 3.0	92.9 \pm 0.8
化合物 7	65.1 \pm 1.4 ¹⁾	89.4 \pm 0.7	91.6 \pm 2.6
化合物 8	55.4 \pm 1.6 ¹⁾	90.7 \pm 2.9	92.5 \pm 1.1
化合物 9	78.0 \pm 2.0 ¹⁾	89.4 \pm 2.3	94.2 \pm 3.3
化合物 10	79.0 \pm 1.0 ¹⁾	87.5 \pm 3.0	93.5 \pm 1.8
吲哚美辛	92.0 \pm 1.4 ¹⁾	100.1 \pm 1.0	102.5 \pm 1.7
正常		96.0 \pm 0.9	

注: ¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 化合物对 NO 释放量的影响

Table 2 Effect of compounds on NO release

组别	加药浓度		
	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
化合物 1	31.6 \pm 1.9 ¹⁾	33.7 \pm 2.8 ¹⁾	38.0 \pm 2.8 ¹⁾
化合物 2	29.2 \pm 2.0 ¹⁾	32.4 \pm 3.9 ¹⁾	35.6 \pm 2.6 ¹⁾
化合物 3	28.4 \pm 3.2 ¹⁾	29.4 \pm 2.5 ¹⁾	33.5 \pm 3.4 ¹⁾
化合物 4	25.5 \pm 1.8 ¹⁾	27.5 \pm 2.2 ¹⁾	36.2 \pm 1.6 ¹⁾
化合物 5	25.2 \pm 0.8 ¹⁾	28.6 \pm 0.8 ¹⁾	35.6 \pm 1.1 ¹⁾
化合物 6	26.2 \pm 0.7 ¹⁾	29.2 \pm 2.9 ¹⁾	37.8 \pm 1.8 ¹⁾
化合物 7	25.1 \pm 2.7 ¹⁾	28.6 \pm 2.2 ¹⁾	33.9 \pm 2.6 ¹⁾
化合物 8	24.2 \pm 1.0 ¹⁾	29.7 \pm 2.2 ¹⁾	33.4 \pm 2.0 ¹⁾
化合物 9	24.4 \pm 0.6 ¹⁾	27.6 \pm 2.1 ¹⁾	31.3 \pm 2.7 ¹⁾
化合物 10	25.2 \pm 0.4 ¹⁾	29.5 \pm 2.0 ¹⁾	33.0 \pm 1.9 ¹⁾
吲哚美辛		20.8 \pm 0.6	
LPS		56.3 \pm 1.9 ¹⁾	
正常		15.1 \pm 0.8	

化合物 1~10 后,这些化合物在不同剂量均能抑制 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生 NO 的表达,并呈现良好的剂量依赖性。当加入终浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阳性药吲哚美辛后,上清液中 NO 的浓度降至 (20.8 \pm 0.6) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,加入 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 1~10 后,上清液中 NO 的浓度降至 24.2~31.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,在该剂量下,化合物 8 的抑制效果最好,此时 NO 的浓度降至 (24.2 \pm 1.0) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,接近阳性对照药。化合物 1~3 对 NO 的抑制能力呈现逐渐增强的效果,这可能与其结构中酚羟基的数量逐渐增多有关;而对于酚酸类化合物 4~8 及黄酮类化合物 9~10,没有发现明显的构效关系,但均对 NO 的表达具有显著的抑制作用,效果优于化合物 1~3,如化合物 6 在 25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的终浓度下,其对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生炎症介质 NO 的抑制能力分别为 (44.7 \pm 4.5)%, (65.7 \pm 5.0)%, (73.2 \pm 1.7)%,剂量依性非常明显。

5 讨论

油茶枯是我国资源丰富、非常值得进一步开发和实现综合利用的农林副产品,在日化、食品、生物医药等领域具有良好的利用前景。要实现油茶枯的综合利用,其化学成分和药理活性研究是基础。由于皂素在油茶枯的含量高达 8% 左右,故目前对油茶枯化学成分的研究主要集中在皂素上,而对于酚酸、黄酮等其他含量相对低的非皂苷类化合物却亟

待进一步深入进行。本文从油茶枯醇提取物的乙酸乙酯部位分离鉴定了 8 个酚酸和 2 个黄酮类化合物,采用 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立体外炎症筛选模型,发现它们均具有良好的体外抗炎活性,笔者推测酚酸和黄酮类化合物可能是油茶枯发挥抗炎活性的重要物质基础,显示了其在作为天然炎症药物开发上的良好发展潜力。

[参考文献]

- [1] 陈秋平,姜天甲,马晓丰,等.油茶蒲水提物的减肥作用[J].中国粮油学报,2011,26(9):66-69.
- [2] 国家林业局.全国油茶产业发展规划(2009~2020年)[M].北京:中国林业出版社,2009:3.
- [3] 干丽,李嘉滢,蔡艳艳,等.茶桔饼主要化学成分的研究及综合利用[J].中南药学,2013,11(11):823-826.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[M].北京:化学工业出版社,2005:278.
- [5] 江苏新医学院.中药大辞典.下册[M].上海:上海科学技术出版社,2000:1603.
- [6] 广东中医药研究所,华南植物研究所.岭南草药志[M].上海:上海科学技术出版,1961:94.
- [7] 林国荣.油茶饼中茶皂素的分离及生物活性的研究[J].中国粮油学报,2016,31(1):76-79.
- [8] ZHANG X F, YANG S L, HAN Y Y. Qualitative and quantitative analysis of triterpene saponins from tea seed pomace (*Camellia oleifera* Abel) and their activities against bacteria and fungi[J]. Molecules, 2014, 19(6): 7568-7580.

- [9] ZHOU H, WANG C Z, YE J Z, et al. New triterpene saponins from the seed cake of *Camellia oleifera* and their cytotoxic activity [J]. *Phytochem Lett*, 2014, 8 (1): 46-51.
- [10] 姜天甲, 应铁进, 陈秋平, 等. 油茶籽壳总黄酮的提取及抗氧化研究 [J]. *中国食品学报*, 2010, 10 (1): 93-99.
- [11] 袁英姿, 曹清明, 钟海雁, 等. 油茶籽多酚对茶油的抗氧化性的研究 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30 (6): 103-105.
- [12] LIU X, JIA L, GAO Y, et al. Anti-inflammatory activity of total flavonoids from seeds of *Camellia oleifera* Abel [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46 (10): 920-922.
- [13] 陶俊. 油茶籽多糖分离纯化及降脂机理的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [14] ZHANG S, LI X Z. Hypoglycemic activity *in vitro* of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel. seed cake [J]. *Int J Biol Macromolecules*, 2018, 115: 811-819.
- [15] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65 (1/2): 55-63.
- [16] Green L C, Wagner D A, Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids [J]. *Anal Biochem*, 1982, 126 (1): 131-138.
- [17] 廖小建, 徐石海, 黄启昌, 等. 海绵 *Callyspongia fibrosa* 的化学成分研究 (I) [J]. *光谱实验室*, 2005, 22 (2): 281-283.
- [18] 曹桂云, 黄娇, 张启航, 等. 绒毛栗色鼠尾草的化学成分分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (20): 47-50.
- [19] 魏友霞, 王军宪. 二色补血草地下部分化学成分研究 [J]. *中药材*, 2006, 29 (11): 1182-1184.
- [20] 胡立志, 周忠玉, 贾永霞, 等. 橄榄仁果实化学成分的研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2014, 22 (4): 419-424.
- [21] 冯宝民, 段礼新, 杨静, 等. 三子养亲汤化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2006, 37 (10): 1474-1476.
- [22] 项昭保, 徐一新, 陈海生, 等. 橄榄中酚类化学成分研究 [J]. *中成药*, 2009, 31 (6): 917-918.
- [23] 朱伶俐, 艾志福, 徐丽, 等. 桂枝化学成分分离鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20190712.
- [24] CHEN Y X, ZHOU J, TAN N H. The chemical constituents of *Parakmeria yunnanensis* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2001, 23 (3): 352-356.
- [25] 侯凤飞, 郑亚夫, 张海鸣, 等. 蒙药白益母草的化学成分研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15 (9): 18-20.
- [26] Ryu M, Kim E H, CHUN M. Astragali Radix elicits anti-inflammation via activation of MKP-1, concomitant with attenuation of p38 and Erk [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115 (2): 184-193.

[责任编辑 顾雪竹]