

毛裂蜂斗菜根茎的化学成分及抗炎活性

王玉亮,郭美丽*,张戈,薛芊

(第二军医大学药学院生药学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的:对毛裂蜂斗菜根茎的化学成分进行研究,并验证其抗炎活性。方法:用95%乙醇提取,溶剂萃取,对乙酸乙酯萃取部分采用硅胶柱层析分离,在正己烷-乙酸乙酯混合液中重结晶精制,利用理化性质和波谱数据鉴定所得化合物的分子结构;并以化合物对组胺致离体豚鼠气管片收缩的影响评价其抗炎活性。结果:从毛裂蜂斗菜中分离得到6种单体化合物,经鉴定分别为合模蜂斗菜螺内酯(1)、蜂斗菜内酯-B(2)、豆甾醇(3)、-谷甾醇(4)、蜂斗菜内酯-D(5)和胡萝卜苷(6);化合物2和5对组胺致离体豚鼠气管片收缩均有抑制作用。结论:化合物1、4和6为首次从该植物中分离得出;化合物2和5有明显的抗组胺活性。

[关键词] 蜂斗叶属;化学成分;倍半萜类;组胺

[中图分类号] R 282.710.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1210-04

Chemical constituents in root of *Petasites tricholobus* Franch. and their anti-inflammatory activity

WANG Yu-liang, GUO Mei-li*, ZHANG Ge, XUE Qian (Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the chemical constituents in the root of *Petasites tricholobus* Franch. and evaluate their anti-inflammatory activity. **Methods:** The primary extraction was done with 95% ethanol and subsequently with other agents including ethyl acetate. The compounds extracted with ethyl acetate were isolated by silica gel column chromatography and purified by means of recrystallization. The structures of the compounds were elucidated by employing chemical and spectral methods. The anti-inflammatory activities of the compounds were evaluated through their inhibitory effect on the trachea contraction of guinea pig induced by histamine *in vitro*. **Results:** Six compounds were isolated from the root of *Petasites tricholobus* Franch., namely, homofukinolide (1), bakkenolide-B (2), stigmasterol (3), and -sitosterol (4), bakkenolide-D (5), and -sitosterol-3-O-D-glucopyranoside (6). Bakkenolide-B and bakkenolide-D demonstrated inhibitory effect on the trachea contraction induced by histamine *in vitro*. **Conclusion:** Homofukinolide, -sitosterol, and -sitosterol-3-O-D-glucopyranoside are isolated for the first time from *Petasites tricholobus* Franch.. Bakkenolide-B and -D have obvious anti-histamine activities.

[KEY WORDS] *Petasites*; chemical constituent; sesquiterpenes; histamine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1210-1213]

毛裂蜂斗菜 (*Petasites tricholobus* Franch.) 系菊科蜂斗菜属植物,广泛分布于我国西北、西南地区。其根茎在民间用于解毒祛瘀,外敷治跌打损伤、骨折、蛇伤等,其花蕾在甘肃等地作为款冬花的替代品用于止咳、平喘。到目前为止,对其化学成分的研究报道较少,已知含有的化合物主要为倍半萜内酯^[1]和三萜类^[2]。

为研究毛裂蜂斗菜化学成分和抗炎药理作用,本实验对毛裂蜂斗菜进行了较系统的化学成分研究,从其根茎中分离得到6个化合物,经波谱解析鉴定为合模蜂斗菜螺内酯(1)、蜂斗菜内酯-B(2)、豆甾醇(3)、-谷甾醇(4)、蜂斗菜内酯-D(5)和胡萝卜苷(6)。其中化合物1、4和6为首次从该植物中分得。在此基础上,通过观察化合物2和5对组胺致离体豚鼠气管片收缩曲线的影响,验证了其抗炎活性。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 毛裂蜂斗菜根茎采自四川成都,经第二军医大学生药学教研室郭美丽副教授鉴定为 *Petasites tricholobus* Franch.。柱层析:硅胶 G, H (60型)为青岛海洋化工厂产品;TLC板: HSGF254为烟台市化工研究院产品;显色剂:10%硫酸乙醇液,碘蒸气, ZF-1型三用紫外分析仪; ZMD83-1型电热熔点测定仪(未校正);岛津 UV-265紫外分光光度仪;日立 275-50红外分析仪; Bruker-Spectrospin AC-300P型及 Bruker AMX-500型磁共振仪; Varian MA T-212型质谱仪;所用试剂均为分析纯。Hoechst AG生产的离体气管浴槽; BBC公司

[作者简介] 王玉亮,硕士。

* Corresponding author. E-mail: mlguo@smmu.edu.cn

SE460 四道记录仪;TF6V5 等张换能器;BMT 四道放大器;仪器均由德国生产。

1.2 化学成分的提取 取毛裂蜂斗菜干燥根茎 3.5 kg,粉碎,95%乙醇渗漉提取,浸出液减压浓缩,得浸膏 231.4 g,浸膏用水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取。乙酸乙酯萃取部分共 101.1 g,硅胶柱层析分离,以正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱,根据薄层层析监测,将洗脱液合并为 4 份。将

第 1 份进行硅胶层析,以正己烷-乙酸乙酯 50:1 洗脱得化合物 1(7.9 mg)。第 2 份经硅胶层析,正己烷-乙酸乙酯 10:1 洗脱得化合物 2(2.3 g)、3(1.2 g)和 4(120 mg)。第 3 份经硅胶层析分离,以正己烷-乙酸乙酯 5:1 洗脱,得化合物 5(1.6 g)。第 4 份经硅胶层析分离,氯仿-甲醇 15:1 洗脱,得化合物 6(450 mg)。6 个化合物结构见图 1。

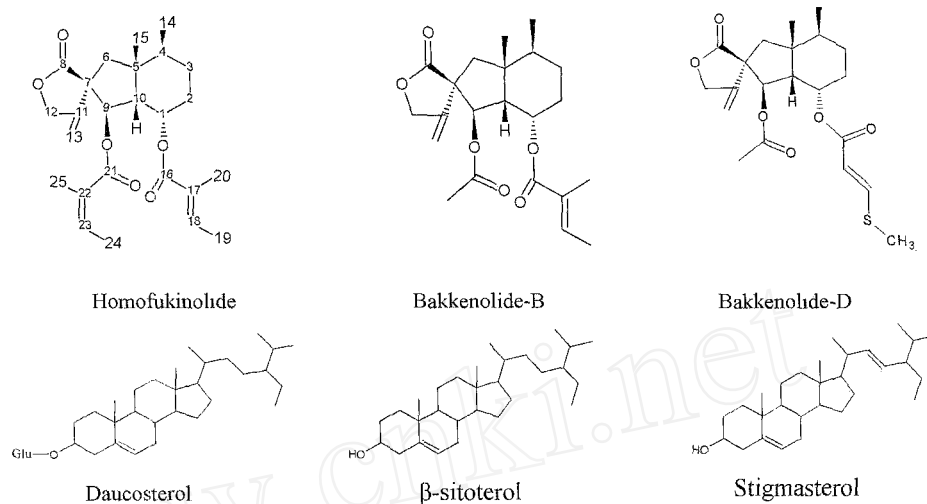


图 1 6 个化合物的结构

Fig 1 The structures of 6 compounds

1.3 离体豚鼠气管片收缩实验 参照文献^[3]方法,将豚鼠击毙,立即分离剪下气管,放入盛有克-亨氏(Kerb-Henseleit)营养液的平皿中,气管腹面(软骨环面)纵行切开,再在 2~3 个软骨环的间隔横切,每段气管片在其纵切口处用针线缝上,每 2~3 段气管片相互连成一串,即成气管片标本,将标本悬挂在 10 ml 浴管中,负荷 1.5 g,37 保温,于克-亨氏液中通氧(95% O₂ + 5% CO₂),标本平衡约 0.5 h,在张力稳定后,开始在浴管中加入不同浓度(10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ g/ml)组胺,使气管片收缩,记录组胺不同浓度紧张效应(累加剂量)。冲洗浴管,使气管片张力恢复到原先位置(1 g),稳定一段时间后,分别加入蜂斗菜内酯 B 和 D,温孵 5 min 后,加入不同浓度(10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ g/ml)组胺,使气管片收缩,记录组胺收缩效应,每加一次药物观察 3 min。以最大收缩效应为 100%,计算收缩百分率。收缩百分率 = 组胺收缩幅度/组胺最大收缩幅度 × 100%。

1.4 统计学处理 所有测定数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 化合物的结构鉴定

2.1.1 化合物 1 白色结晶, m. p. 184.0 ~ 186.0, 质谱显示相对分子质量为 430, 分子式为 C₂₅H₃₄O₆, IR (KBr, cm⁻¹): 1 773 示有内酯环, 1 723、1 708、1 233 示有酯键, 3 080、1 668、1 648、905、850 示有双键, 且 1 648、905 示有末端双键。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 6.13 (2H, q, *J* = 8 Hz, 18, 23-H), 5.9 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, 9-H), 5.2 (2H, d, *J* = 2.5 Hz, 13-H), 5.16 (1H, m, 1-H), 4.56 (2H, t, *J* = 2.0 Hz, 12-H), 2.92 (1H, dd, *J* = 4.5, 11.5 Hz, 10-H), 2.35, 1.97 (2H, Abq, *J* = 14.0 Hz, 6-H), 1.95 (3H, d, 19-H), 1.87 (3H, d, 24-H), 1.78 (3H, s, 20-H), 1.68 (3H, s, 25-H), 1.18 (3H, s, 15-H), 0.91 (3H, d, *J* = 5.5 Hz, 14-H); 比较文献^[4], 确认化合物 1 为合模蜂斗菜螺内酯。碳谱数据见表 1。

表1 蜂斗菜内酯 B、D 和合模蜂斗菜螺内酯的碳谱数据

Tab 1 ¹³CNMR spectral data of bakkenolide-B, -D and homofukinolide

C	Bakkenolide-B	Bakkenolide-D	Homofukinolide	DEPT
1	70.1	70.1	70.5	CH
2	29.5	29.5	29.7	CH ₂
3	26.8	26.8	26.9	CH ₂
4	35.2	35.3	35.4	CH
5	43.3	43.3	43.5	C
6	45.8	45.8	45.9	CH ₂
7	54.9	54.9	55.4	C
8	177.4	177.5	177.8	C
9	80.5	80.5	80.8	CH
10	51.4	51.7	51.8	CH
11	147.7	147.9	148.2	C
12	70.4	70.4	70.7	CH ₂
13	108.2	108.2	108.1	CH ₂
14	15.5	15.5	15.6	CH ₃
15	15.5	16.2	16.0	CH ₃
16	167.2	165.6	166.2	C
17	128.2	112.5	126.9	CH
18	136.6	147.8	137.2	CH
19	20.3	21.2	20.3	CH ₃
20	19.5	-	19.7	CH ₃
21	169.8	169.8	167.3	C
22	20.9(CH ₃)	19.5(CH ₃)	128.1	C
23	-	-	141.2	CH
24	-	-	20.3	CH ₃
25	-	-	20.4	CH ₃

2.1.2 化合物 2 白色结晶, m. p. 174.0 ~ 176.0, EIMS 给出相对分子质量 390, 分子式为 C₂₀H₃₀O₆, 不饱和度为 8, IR (KBr, cm⁻¹): 1785、1145、1039 示有内酯环; 3100、1651、850 示有双键, 且 1651 示末端双键。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃,) 中有 5 个甲基信号: 0.89 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.10 (3H, s), 1.75 (3H, s), 1.80 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.91 (3H, s), 其中 1.75 是 20 位甲基, 1.80 是 19 位甲基, 1.91 是乙酰基。5.92 含一个 H 的 qq 峰提示有 OCOC(CH₃) = CHCH₃ 存在; 4.62 含 2 个 H 的三重峰是 12 位 H, 这也说明双键在 11 位; 5.11 含 1 个 H 的 ddd 峰是 1 位 H; 5.73 含 1 个 H 的 d 峰 (J = 11.5 Hz) 是 9 位 H, 1.35 含 1 个 H 的 qdd 峰是 4 位 H。由 ¹³C NMR 和 DEPT 数据得知, 分子中有 5 个伯碳、5 个叔碳、7 个季碳 (内含 1 个酯羰基 C 177.4, 1 个乙酰羰基 C 169.9, 1 个和双键共轭的酯羰基 C 167.2, 2 个烯键 C 147.7 和 136.6), 147.7、136.6、128.2 和 108.2 说明分子中有 2 个烯键。这样扣除 3 个羰基、2 个双键、1 个 C 内酯环, 剩下的 2 个不饱和度即为 2 个环。比较文献^[2], 确认化合物 2 为蜂斗菜内酯-B。碳谱数

据见表 1。

2.1.3 化合物 3 白色针状结晶 (CHCl₃), m. p. 160 ~ 162, Libermann 反应阳性。¹H NMR (CDCl₃) : 5.35 (1H, m, 6-H), 5.30 (1H, m, 22-H), 5.04 (1H, m, 23-H), 3.52 (1H, m, 3-H), 0.7 ~ 2.3 (m, CH, CH₂), 1.02 (3H, d, 21-CH₃), 0.97 (3H, s, 19-CH₃), 0.85 (6H, d, 26-CH₃, 27-CH₃), 0.82 (3H, 29-CH₃), 0.70 (3H, s, 18-CH₃)。 ¹³C NMR (CDCl₃) : 37.27 (1-C), 31.69 (2-C), 71.82 (3-C), 42.33 (2-C), 140.77 (5-C), 121.71 (6-C), 31.88 (7-C), 31.92 (8-C), 50.16 (9-C), 36.15 (10-C), 21.09 (11-C), 39.70 (12-C), 42.33 (13-C), 56.88 (14-C), 24.30 (15-C), 28.24 (16-C), 56.79 (17-C), 12.24 (18-C), 19.81 (19-C), 39.79 (20-C), 21.09 (21-C), 138.30 (22-C), 129.30 (23-C), 51.24 (24-C), 31.92 (25-C), 19.40 (26-C), 21.09 (27-C), 25.40 (28-C), 11.86 (29-C)。与豆甾醇标准品混熔熔点不下降, 两者的 TLC R_f 值及 IR 谱相同。根据以上化学性质及波谱数据, 并与文献^[5]对照, 鉴定为豆甾醇。

2.1.4 化合物 4 白色针状结晶 (EtOAc), m. p. 140 ~ 142 EIMS 提示相对分子质量为 414, IR、R_f 值与 -谷甾醇标准品一致, 混合熔点不下降, 确定为 -谷甾醇。

2.1.5 化合物 5 白色针状结晶, m. p. 203 ~ 205, 由 HRMS 得其的相对分子质量为 408.1596, 分子式为 C₂₂H₂₈O₆S, 不饱和度为 8。IR (KBr, cm⁻¹): 1778、1173、1053 示有内酯环, 1743、1693、1229 示有酯键, 3057、1567、899、800 示有双键, 且 1567、899 示有末端双键。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃,) 出现 4 个甲基信号: 0.89 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.10 (3H, s), 2.01 (3H, s) 和 2.36 (3H, s)。其中 2.01 是乙酰基, 2.36 是连 S 的甲基。5.5 ~ 7.1 间 2 个双键 H 组成的 AX 系统示有 OCOCH = CH-SCH₃ 存在; 4.65 含 2 个 H 的三重峰 (J = 2.0 Hz) 是 12 位 2 个 H, 这也说明末端双键在 11 位; 5.15 含 1 个 H 的 ddd 峰是 1 位 H; 由 ¹³C NMR 和 DEPT 数据得知, 化合物 5 有 4 个伯碳、5 个仲碳、6 个叔碳、6 个季碳 (内含 1 个酯羰基 C 177.5, 1 个乙酰羰基 C 169.8, 1 个和双键共轭的酯羰基 C 165.6, 1 个烯键 C 152.7, 2 个连甲基季碳)。152.7、147.8、112.5 和 108.2, 4 个烯键 C 说明分子中有 2 个双键。这样扣除 3 个羰基, 2 个双键, 1 个 C 内酯环, 剩下的 2 个不饱和度即为 2 个环。比较文献^[2], 确认化合物为蜂斗菜内酯-D。

碳谱数据见表 1。

2.1.6 化合物 6 无色片状结晶, m. p. 292 ~ 295, 相对分子质量为 576, 分子式为 $C_{35}H_{60}O_6$ 。
 ^{13}C NMR(C_5D_5N): 37.5 (C1), 30.3 (C2), 78.5 (C3), 40.0 (C4), 140.9 (C5), 121.8 (C6), 32.1 (C7), 32.1 (C8), 50.4 (C9), 36.9 (C10), 21.3 (C11), 39.4 (C12), 42.5 (C13), 56.9 (C14), 24.5 (C15), 28.4 (C16), 56.3 (C17), 12.2 (C18), 19.4 (C19), 36.4 (C20), 19.3 (C21), 34.3 (C22), 29.6 (C23), 46.1 (C24), 26.5 (C25), 19.1 (C26), 19.9 (C27), 23.4 (C28), 11.9 (C29), 葡萄糖基: 102.5 (C'1), 75.2 (C'2), 78.8 (C'3), 71.8 (C'4), 78.3 (C'5), 62.9

(C'6)。10% 硫酸乙醇溶液显色紫色, 与胡萝卜苷标准品混合熔点不下降, 波谱数据与文献^[6]比较, 确定化合物 6 为胡萝卜苷。

2.2 化合物抗组胺活性 研究表明, 蜂斗菜内酯 B 和 D 对组胺引起的豚鼠离体气管片收缩均有抑制作用, 蜂斗菜内酯 B 在 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} g/ml 浓度均能使气管片收缩百分率降低, 10^{-5} g/ml 的浓度效果最明显; 蜂斗菜内酯 D 在 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} g/ml 浓度亦能使气管片收缩百分率降低, 在 10^{-7} g/ml 的浓度时, 抑制组胺收缩的效果就特别明显。具体结果见表 2。

表 2 蜂斗菜内酯 B 和蜂斗菜内酯 D 对组胺收缩曲线的影响

Tab 2 Effect of bakkenolide-B and -D on contraction curve of histamine

($n=6, \bar{x} \pm s, \%$)

Sample	Content of histamine				
	10^{-7} g/ml	10^{-6} g/ml	10^{-5} g/ml	10^{-4} g/ml	
Bakkenolide-B	Before adm	1.8 ±4.1	5.6 ±7.3	38.6 ±23.4	93.8 ±12.6
	10^{-6} g/ml	4.3 ±9.6	0.7 ±1.5	19.2 ±26.2	57.5 ±38.0
	Before adm	11.5 ±8.2	21.7 ±10.4	44.9 ±11.6	100.0 ±0.0
	10^{-5} g/ml	2.4 ±5.0 *	4.8 ±7.1 **	19.1 ±16.1 **	66.1 ±25.2 **
	Before adm	3.3 ±4.0	10.5 ±10.8	41.1 ±18.0	100.0 ±0.0
	10^{-4} g/ml	2.9 ±6.6	1.5 ±3.3	22.0 ±18.3	58.5 ±25.2 **
Bakkenolide-D	Before adm	7.4 ±9.9	24.0 ±22.6	57.9 ±32.1	100.0 ±0.0
	10^{-7} g/ml	1.5 ±2.4	4.7 ±7.1	19.9 ±15.2 *	56.9 ±25.1 **
	Before adm	5.2 ±5.2	13.1 ±12.4	54.0 ±23.4	99.2 ±1.9
	10^{-6} g/ml	0.0 ±0.0	0.7 ±1.6	16.7 ±11.4 *	57.1 ±25.0 **
	Before adm	4.5 ±6.0	9.7 ±19.5	41.4 ±30.4	93.4 ±12.6
	10^{-5} g/ml	1.6 ±2.8	3.9 ±6.1	27.2 ±12.4	71.5 ±17.1 *

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs before adm in the same group

3 讨论

我们的研究表明, 毛裂蜂斗菜中的主要抗炎活性物质为蜂斗菜内酯类化合物。体外药理实验表明蜂斗菜内酯有与蜂斗素类化合物相似的药理作用, 提示我们, 毛裂蜂斗菜与欧蜂斗菜有相似的抗炎作用^[7]。本研究结果为毛裂蜂斗菜资源的开发与利用提供了依据。

[参考文献]

- [1] 程捷. 毛裂蜂斗菜化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 1999, 34: 734-736.
 [2] Xie WD, Zhang Q, Li PL, et al. Two triterpenoids and other constituents from *Petasites tricholobus* [J]. Phytochemistry,

2005, 66: 2340-2345.

- [3] 胡国胜, 黄先菊. DDPH 对多种介质所致豚鼠离体气管平滑肌收缩的影响[J]. 中国现代应用药学杂志, 1998, 15: 11-14.
 [4] Naya K, Hayashi M, Takagi I, et al. The structural elucidation of sesquiterpene lactones from *Petasites japonicus* Maxim [J]. Bull Chem Soc Jpn, 1972, 45: 3673-3685.
 [5] 冯长根, 李琼. 香青兰化学成分研究[J]. 中成药, 2006, 28: 94-98.
 [6] 海力茜·陶尔大洪, 徐建军, 凯赛尔·阿不都克热木, 等. 新疆红芪的化学成分[J]. 华西药理学杂志, 2006, 21: 47-48.
 [7] Thomet AR, Schapowal A, Heinisch IVWM, et al. Anti-inflammatory activity of an extract of *Petasites hybridus* in allergic rhinitis[J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2: 997-1006.

[收稿日期] 2006-06-23

[修回日期] 2006-10-19

[本文编辑] 尹茶