

· 化学与分析 ·

半边风苯丙素类成分及抑制中性粒细胞呼吸爆发活性研究

任刚¹, 罗仇平¹, 李文艳², 朱根华¹, 邵峰¹, 黄慧莲¹, 刘荣华^{1*}

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西中医学院护理学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:继续对半边风的化学成分进行研究,并对包括前期研究的 9 个苯丙素类化合物进行生物活性评价,为半边风在畲族医药中的临床应用提供初步的药理学依据。方法:利用各种柱色谱对半边风根 95% 乙醇提取物正丁醇部位的化学成分进行分离纯化,根据化合物的理化性质及光谱数据鉴定其结构。采用化学发光法评价 9 个苯丙素类成分对大鼠中性粒细胞(PMN)呼吸爆发的抑制活性。结果:分离了 4 个苯丙素类化合物,分别鉴定为芥子醛葡萄糖苷(1)、丁香苷(2)、松柏醛葡萄糖苷(3)、淫羊藿苷 E5(4)。在药理活性研究中,有 6 个苯丙素类化合物对大鼠 PMN 呼吸爆发表现出不同的活性,其活性大小依次为东茛菪素 > 右旋松脂素 > 右旋丁香树脂酚 > 松柏醛 > β -hydroxypropiovanillon > 维生素 C(V_C) > 淫羊藿苷 E5,而芥子醛葡萄糖苷、丁香苷和松柏醛葡萄糖苷则对 PMN 呼吸爆发没有抑制作用。结论:化合物 3 为首次从该属植物中分离得到。半边风中的苯丙素类化学成分具有较强的抗 PMN 呼吸爆发作用,酚羟基可能是苯丙素类化合物抑制大鼠 PMN 呼吸爆发的重要基团。

[关键词] 半边风; 苯丙素类成分; 中性粒细胞; 呼吸爆发; 化学发光

[中图分类号] R284.1, R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)14-0080-04

[doi] 10.11653/syfy2013140080

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130514.0957.002.html>

[网络出版时间] 2013-05-14 09:57

Isolation and Anti-PMN Respiratory Burst Activity of Phenylpropanoids Compounds from *Dendropanax chevalieri*

REN Gang¹, LUO Zhang-ping¹, LI Wen-yan², ZHU Gen-hua¹,

SHAO Feng¹, HUANG Hui-lian¹, LIU Rong-hua^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Jiangxi University of TCM, Ministry of Education, Nanchang 330004, China;

2. School of Nursing, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the phenylpropanoids chemical constituents from the root of *Dendropanax chevalieri*, and evaluate the biological activity of the nine phenylpropanoids including the five phenylpropanoids isolated previously, and to provide preliminary pharmacological basis for the clinical application of the root of *D. chevalieri* in medicine of She nationality. **Method:** The constituents were isolated from *n*-butanol extract of *D. chevalieri* 95% ethanol extract by all kinds of column chromatography. Their structures were elucidated by analysis of physical chemical properties and spectral data. By using phorbol myristate acetate (PMA) as the stimulant, luminol-dependent chemiluminescence was used to compare the effects of the nine phenylpropanoids compounds on

[收稿日期] 20121017(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160509);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ10552);江西省卫生厅中医药科研基金课题(2009A058)

[第一作者] 任刚,博士,副教授,从事中药药效物质基础研究, Tel:0791-7118607, E-mail:firmblue2005@yahoo.com.cn

[通讯作者] *刘荣华,博士,教授,从事中药药效物质基础研究, Tel:0791-7119010, E-mail:rhliu@163.com

the respiratory burst of rat neutrophils. **Result:** Four phenylpropanoid compounds, sinapaldehyde glucoside (1), syringin (2), coniferaldehyde 4-*O*- β -*D*-glucopyranoside (3) and icariside E5 (4), were isolated and identified from *n*-butanol extract. As results of pharmacological studies, six phenylpropanoid compounds revealed different inhibitory activity on the respiratory burst of rat neutrophils. Their activity were ranked in the decreasing order of scopoletin > (+) -pinoresinol > (+) -syringaresinol coniferaldehyde > β -hydroxypropiovanillon > V_c > icariside E5, while sinapaldehyde glucoside, syringin and coniferaldehyde 4-*O*- β -*D*-glucopyranoside had no inhibitory activity. **Conclusion:** Compound 3 is isolated from this genus for the first time. Phenylpropanoid compounds isolated from the root of *D. chevalieri* has a strong anti-PMN respiratory burst activity and hydroxyl group might be a pharmacophore. This is the first report of the pharmacological evidence for the clinical application of the root of *D. chevalieri* in medicine of She nationality.

[**Key words**] *Dendropanax chevalieri*; phenylpropanoid; PMN; respiratory burst; chemiluminescence

畚药半边风为五加科树参属植物树参又名鸭掌木、鹅掌柴、鸭掌紫、枫荷梨等,广泛分布于长江以南各地^[1]。半边风的根或茎是我国江西、浙江一带的畚族人民习用的畚药,主要用于治疗风湿、类风湿炎症等,为畚医使用频率较高的30种畚药之一^[2]。尽管有研究^[3]表明半边风具有心肌保护方面的活性,但是它在畚族医学中抗炎症的临床应用一直缺乏现代药理学数据的支持。研究证明,中性粒细胞(PMN)的过度激发会导致活性氧代谢失衡,而过量分泌的氧自由基所造成的机体损伤是炎症发生的重要机制之一^[4-5]。研究表明,一些酚性成分能有效抑制PMN呼吸爆发^[6]。

本课题组在前期研究中发现,半边风根的95%乙醇提取物对大鼠PMN呼吸爆发具有较强的抑制作用,随后对该提取物乙酸乙酯部位活性部位进行了分离,从中鉴定了5种苯丙素类成分,分别为松柏醛、东茛菪素、 β -hydroxypropiovanillon、右旋松脂素、右旋丁香树脂酚^[7]。为进一步阐明半边风的药效物质基础,本研究对半边风根95%乙醇提取物的另一活性部位—正丁醇部位进行了化学成分的研究,分离鉴定了4个苯丙素化合物:芥子醛葡萄糖苷(1)、丁香苷(2)、松柏醛葡萄糖苷(3)和淫羊藿苷E5(4),其中松柏醛葡萄糖苷为首次从该属植物中分离得到。在此基础上,评价了从2个活性部位所获的9个苯丙素单体对大鼠PMN呼吸爆发的抑制效果,以期半边风根在畚族医药中的临床应用提供初步的药理学依据。

1 材料

1.1 试剂及药材 肝素钠(上海浦江应用生物化学研究所),葡聚糖 T₅₀₀(美国 Phamacia 公司),淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技有限公司),佛波豆蔻酸乙酯(PMA)、鲁米诺、HEPES 试剂(美国

Sigma 公司),Tris 试剂(AMRESCO 分装),三乙胺(上海试剂一厂),小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),二甲亚砜(DMSO,上海凌峰化学试剂有限公司),柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂),MCI gel CHP 20P(日本三菱化学公司),Sephadex LH-20(上海安玛西亚生物技术有限公司),RP-18(日本三菱公司),双蒸水自制。所用溶剂均为分析纯,由上海振兴化学试剂厂和天津化学试剂厂生产。

半边风药材于2009年10月采自浙江省温州市,经江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室任刚副教授鉴定为树参 *Dendropanax chevalieri* (Vig.) Merr. et Chun,的新鲜根,凭证标本(2009002FH)保存于本校标本馆。

1.2 仪器 循环水式多用真空泵(江西鼎技科学仪器有限公司),立式压力蒸气灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),GL-16G型高速冷冻离心机(上海安亭仪器厂),XW-80A型旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂),BPCL-K型微弱发光测量仪及其数据处理工作站(中国科学院北京生物物理研究所),倒置显微镜(江西凤凰光学仪器有限公司),细胞计数板(上海精密仪器有限公司),KQ-300DB型超声波数控清洗器(昆明市超声仪器有限公司),Bruker AM-400型超导核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司)。

1.3 动物 SD大鼠,清洁级,雌雄不限,体重(350±20)g,由湖南斯莱克景达动物中心提供,许可证号SCXK(湘)2009-0004。

2 提取和分离

半边风新鲜根3.2kg切成块状(2cm×1cm),加95%乙醇浸渍3d,过滤,得鲜根浸提液;药渣阴干,用YF-103型(2009)高速中药粉碎机适度粉碎后,以95%的乙醇回流提取2次,每次2h,提取液

与鲜根浸提液合并,减压回收溶剂得浸膏 213.3 g。取 200 g 浸膏以适量蒸馏水分散后,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,减压回收溶剂,得到石油醚部位 16.1 g,乙酸乙酯部位 17.9 g,正丁醇部位 22.1 g。取正丁醇部位(18 g)上 MCI gel CHP 20P 柱,甲醇-水(1:9~10:0)梯度洗脱,分成 A~D 4 个组分。组分 B(1.5 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)、硅胶柱色谱(氯仿-甲醇,15:1)、重结晶得化合物 **1**(500 mg)。组分 C(1.5 g)经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇,10:1~6:1)分成 3 个流分 C1~C5。流分 C1 上 RP-18 柱色谱,甲醇-水(2:8)洗脱,得化合物 **2**(100 mg)。流分 C2 依次经 RP-18 柱色谱(15% 甲醇水溶液)及 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)得化合物 **3**(4 mg)。流分 C5 经 RP-18 柱色谱(甲醇-水,2:8~4:6)得化合物 **4**(20 mg)。所获化合物理化性质及核磁共振波谱分析(¹H-NMR 和¹³C-NMR)分别鉴定为芥子醛葡萄糖苷(**1**)、丁香苷(**2**)、松柏醛葡萄糖苷(**3**)和淫羊藿苷 E5(**4**)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末(甲醇)。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 9.81 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-9), 7.45 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-7), 7.00 (2H, s, H-2, 6), 6.91 (1H, dd, *J* = 7.7, 15.8 Hz, H-8), 6.01 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, Glc-H-1), 3.90~4.43 (6H, 糖环上 H), 3.80 (6H, OCH₃ × 2)。¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 Hz) δ: 193.6 (C-9), 153.8 (C-3, 5), 150.0 (C-7), 138.4 (C-4), 130.1 (C-1), 128.3 (C-8), 107.3 (C-2, 6), 104.1 (C-1'), 79.0 (C-5'), 78.4 (C-3'), 75.9 (C-2'), 71.5 (C-4'), 62.4 (C-6'), 56.5 (OCH₃-3, 5)。上述数据与文献[8]报道基本一致,故鉴定化合物 **1** 为芥子醛葡萄糖苷(sinapaldehyde glucoside)。

化合物 **2** 白色粉末(甲醇)。¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 6.88 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-7), 6.86 (2H, s, H-2, 6), 6.61 (1H, dt, *J* = 5.12, 15.8 Hz, H-8), 5.80 (1H, d, *J* = 6.7 Hz, Glc-H-1), 4.58 (2H, d, *J* = 5.12, H-9), 3.58~4.40 (6H, 糖环上 H), 3.74 (6H, OCH₃ × 2)。¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 Hz) δ: 153.7 (C-3, 5), 133.8 (C-1), 131.0 (C-7), 129.3 (C-8), 105.0 (C-2, 6), 104.7 (C-1'), 78.6 (C-5'), 78.2 (C-3'), 75.9 (C-2'), 71.4 (C-4'), 62.7 (C-9), 62.4 (C-6'), 56.4 (OCH₃-3, 5)。上述数据与文献[9]中报道的丁香苷的数据一致,故鉴定化合物 **2** 为丁香苷

(syriagin)。

化合物 **3** 白色粉末(甲醇)。¹H-NMR (CD₃OD, 400 Hz): 9.62 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-9), 7.63 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-7), 7.34 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 7.26 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5), 7.25 (1H, dd, *J* = 8.7, 1.5 Hz, H-6), 6.73 (1H, dd, *J* = 15.8, 7.8, H-8), 5.51 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, Glc-H-1), 3.30~3.70 (6H, 糖环上 H), 3.90 (3H, OCH₃)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 Hz) δ: +196.1 (C-9), 155.4 (C-7), 151.1 (C-4), 150.8 (C-3), 130.4 (C-1), 128.2 (C-8), 124.4 (C-6), 117.2 (C-2), 112.7 (C-5), 102.0 (C-1'), 78.3 (C-3'), 77.8 (C-5'), 74.7 (C-2'), 71.2 (C-4'), 62.4 (C-6'), 56.7 (OCH₃-3)。上述波谱数据与文献[9]中报道的松柏醛苷的数据一致,故鉴定化合物 **3** 为松柏醛葡萄糖苷(coniferaldehyde 4-O-β-D-glucopyranoside)。

化合物 **4** 白色粉末(甲醇),该化合物 TLC 后,喷以 5% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝色,提示含有酚羟基。¹H-NMR (CD₃OD, 400 Hz) δ: 6.92 (2H, s, H-2', 6'), 6.58 (1H, d, *J* = 2.0, H-2), 6.56 (1H, d, *J* = 8.2, H-5), 6.52 (1H, d, *J* = 15.7, H-7'), 6.31 (1H, dd, *J* = 6.7, 1.5, H-6), 6.31 (1H, dt, *J* = 15.8, 5.7, H-8'), 4.68 (1H, d, *J* = 7.3, H-1''), 4.22 (2H, d, *J* = 5.6, H-9'), 3.97 (1H, m, H-8), 3.81 (3H, s, OCH₃-3'), 3.78 (1H, dd, *J* = 16.0, 4.5, H-6''a), 3.76 (1H, overlapped, H-9a), 3.70 (1H, overlapped, H-9b), 3.69 (3H, s, OCH₃), 3.67 (1H, dd, *J* = 12.4, 5.2, H-6''b), 3.50 (1H, d, *J* = 7.2, 8.0, H-2''), 3.42 (1H, dd, *J* = 8.0, 7.8, H-3''), 3.35 (1H, dd, *J* = 8.0, 7.8, H-4''), 3.13 (1H, m, H-5''), 2.97 (1H, dd, *J* = 14.0, 5.5, H-7a), 2.72 (1H, dd, *J* = 14.0, 9.5, H-7b)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 153.4 (C-3'), 148.4 (C-3), 145.3 (C-4), 144.9 (C-4'), 138.9 (C-5'), 135.3 (C-1'), 133.1 (C-1), 131.4 (C-7'), 129.6 (C-8'), 122.5 (C-6), 119.1 (C-6'), 115.6 (C-2), 113.6 (C-5), 109.0 (C-2'), 105.3 (C-1''), 78.0 (C-3''), 77.8 (C-5''), 75.9 (C-2''), 71.2 (C-4''), 66.8 (C-9), 63.6 (C-9'), 62.4 (C-6''), 56.3 (OCH₃-3), 56.2 (OCH₃-3')。上述波谱数据与文献[10]中报道的淫羊藿苷 E5 的波谱数据一致,故确定该化合物为淫羊藿苷 E5 (icariside E5)。

4 抗大鼠中性粒细胞呼吸爆发活性测试

采用大鼠 PMN 呼吸爆发模型^[11]来评价 9 个苯丙素成分的活性,其原理为:PMN 在受到外源性刺激剂十四烷酸乙酸大戟二萜醇酯(PMA)激活后发生呼吸爆发,所产生大量活性氧自由基被发光剂鲁米诺捕获产生化学发光(chemiluminescence, CL)。在中性粒细胞数量一定的情况下,其化学发光强度(PMN-CL)与 PMN 的呼吸爆发和吞噬功能正相关。具有 PMN 呼吸爆发抑制活性单体的加入则使 PMN-CL 降低,根据 PMN-CL 抑制率以判断所测单体对 PMN 呼吸爆发的抑制作用强弱。PMN-CL 抑制率的计算公式如下:

$$\text{PMN-CL 抑制率} = \frac{\text{PMN-CL}_{\text{溶剂对照}} - \text{PMN-CL}_{\text{样品}}}{\text{PMN-CL}_{\text{溶剂对照}}} \times 100\%$$

以 PMN-CL 抑制率为纵坐标,样品浓度为横坐标,建立量效关系曲线,通过量效曲线可求算出发光抑制率为 50% 时样品的浓度(即 IC_{50})值根据样品的 IC_{50} ,比较各样品对中性粒细胞呼吸爆发的抑制作用强弱, IC_{50} 越小,活性越强。见表 1。

表 1 半边风根中 9 个苯丙素类成分
对大鼠 PMN 呼吸爆发的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	IC_{50} /mol·L ⁻¹	化合物	IC_{50} /mol·L ⁻¹
松柏醛	92.2 ± 6.8	芥子醛葡萄糖苷	> 500
东莨菪素	22.4 ± 1.3	丁香苷	> 500
β -hydroxypropiovanillone	94.7 ± 6.9	松柏醛葡萄糖苷	> 500
右旋松脂素	37.0 ± 2.5	淫羊藿苷 E5	426.6 ± 32.4
右旋丁香树脂酚	55.6 ± 3.4	V _c	138.9 ± 9.8

结果表明,除芥子醛葡萄糖苷维生素 C、丁香苷和松柏醛葡萄糖苷外,其余 6 个苯丙素类成分对大鼠 PMN 呼吸爆发均具有不同程度的抑制作用。其中,化合物东莨菪素活性最强,其 IC_{50} 为 22.4 mol·L⁻¹,远小于阳性对照药物 V_c 的 IC_{50} (138.9 mol·L⁻¹)。分析这些苯丙素类化合物的结构可发现,其活性表现与分子结构中的酚羟基有关。酚羟基对活性的影响体现在 3 个方面:①酚羟基的化学环境。存在于不同化学环境的酚羟基对活性的贡献具有较大差异,如化合物东莨菪素,其 7 位酚羟基与苯并- α -吡喃酮超共轭体系连接,导致羟基脱氢后的类醌化合物结构更稳定(脱氢氧原子未成键电子与苯并- α -吡喃酮的超共轭,由于电子离域化作用使氧原子上未成键电子的进攻性降低),有利于脱氢反应的进行。这可能是东莨菪素具有较强活性的原

因。②酚羟基所处空间环境的拥挤状态。酚羟基邻位有大基团存在将对脱氢反应形成空间位阻效应,削弱酚羟基的活性,如酚羟基两个邻位均有甲氧基取代的右旋丁香树脂酚,其活性弱于一侧邻位有甲氧基取代的右旋松脂素。③酚羟基的数目。酚羟基多的化合物活性较强,如具有 2 个酚羟基的右旋松脂素、右旋丁香树脂酚的活性强于只有一个酚羟基的 β -hydroxypropiovanillone、松柏醛葡萄糖苷及淫羊藿苷 E5;酚羟基被苷化的芥子醛葡萄糖苷、丁香苷和松柏醛葡萄糖苷则没有表现出抑制大鼠 PMN 呼吸爆发的活性。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:人民卫生出版社, 1977:1261.
- [2] 雷后兴,李水福. 中国民族医药学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2008:233.
- [3] 黄敬耀,刘春梅,齐丕驹,等. 树参叶抗心律失常作用的研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(6):47.
- [4] Woodman R C, Ruedi J M, Jesaitis A J, et al. Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils[J]. J Clin Invest, 1991, 87(4):1345.
- [5] Moon B C, Girotti M J, Dawson R, et al. PMN superoxide radical production following a metabolic-endocrine simulation of trauma[J]. Ann Surg, 1986, 203(3):246.
- [6] 邵峰,唐芳瑞,陈慧娟,等. 4 个新黄酮类化合物抗中性粒细胞呼吸爆发作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24):351.
- [7] 任刚,罗仇平,黄慧莲,等. 兽药半边风化学成分研究[J]. 中药材, 2012, 35(1):62.
- [8] Takenaka Y, Okazaki N, Tanahashi T, et al. Secoiridoid and iridoid glucosides from afghanica [J]. Phytochemistry, 2002, 59:779.
- [9] Sano K, Sanada S, Ida Y, et al. Studies on the constituents of the bark of *Kalopanax pictum nakai* [J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(4):865.
- [10] Lee D Y, Lee D G, Cho J Y, et al. Lignans from the fruits of the red pepper (*Capsicum annuum* L.) and their antioxidant effects [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(10):1345.
- [11] 刘荣华,余伯阳,陈兰英,等. 山里红叶多元酚酸类成分对大鼠中性粒细胞呼吸爆发的抑制作用[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(5):428.

[责任编辑 邹晓翠]