

湖北旋覆花化学成分及抗结核活性研究

胡西南,徐健龙,张诗浩,刘朝霞*,刘呈雄,程凡,邹坤*

三峡大学 生物与制药学院 天然产物研究与利用湖北省重点实验室,宜昌 443002

摘要:为进一步研究湖北旋覆花花序中的化学成分及抗结核活性。实验采用硅胶柱色谱、反相硅胶柱色谱以及制备型高相液相等方法进行了成分系统研究,肉汤二倍稀释法测定化合物的体外抗结核分支杆菌活性。从其花序中分离得到 10 个化合物。应用波谱学方法分别鉴定为:7,8-epoxy-9-(isobutyryloxy) thymolisobutyrate (**1**)、10-(2-methylbutyloxy)-8,9-epoxythymolisobutyrate (**2**)、stigmaterol (**3**)、ayapin (**4**)、ergolide (**5**)、5,10-epi-2,3-dihydroaromatol (**6**)、xanthalongin (**7**)、bigelovin (**8**)、carpesiolin (**9**)、aromaticin (**10**)。化合物 **1,2,5,6,8~10** 均为首次从该植物中分离得到。其中化合物 **5~10** 均为倍半萜类化合物。化合物 **5,6,8~10** 对结核分枝杆菌细胞株具有较好的抑制活性,最小抑制浓度 MIC 值分别为 10.00、30.00、5.00、3.15、3.15 μM ,9 和 10 的活性效果显著。

关键词:湖北旋覆花;化学成分;结构鉴定;抗结核分枝杆菌活性

中图分类号:R931.6;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)4-0621-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.4.010

Chemical constituents and anti-tuberculosis activity *in vitro* from flowers of *Inula hupehensis* Ling

HU Xi-nan, XU Jian-long, ZHANG Shi-hao, LIU Zhao-xia*, LIU Cheng-xiong, CHENG Fan, ZOU Kun*

Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biological and Pharmaceutica Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: To investigate chemical constituents and anti-tuberculosis activity *in vitro* from the flowers of *Inula hupehensis* Ling, various chromatographic techniques, including silica gel-column chromatography, ODS and preparative HPLC were used. Anti-tuberculosis activity *in vitro* was determined by double broth dilution method. Ten compounds were isolated. Their structures were identified on the basis of NMR, MS as 7,8-epoxy-9-(isobutyryloxy) thymolisobutyrate (**1**), 10-(2-methylbutyloxy)-8,9-epoxythymolisobutyrate (**2**), stigmaterol (**3**), ayapin (**4**), ergolide (**5**), 5,10-epi-2,3-dihydroaromatol (**6**), xanthalongin (**7**), bigelovin (**8**), carpesiolin (**9**), aromaticin (**10**). Compounds **1,2,5,6,8-10** were isolated from this plant for the first time. Compounds **5-10** are sesquiterpenoids. Compounds **5,6,8-10** have coninhibitory activity against mycobacterium tuberculosis cell lines. Minimal inhibition concentration MIC as follows: 10.00, 30.00, 5.00, 3.15, 3.15 μM .

Key words: *Inula hupehensis* Ling; chemical constituents; structural identification; anti-tuberculosis activity.

湖北旋覆花 *Inula hupehensis* (Ling) 为菊科 (Compositae) 旋覆花属 (*Inula*) 多年生草本植物,又名六月菊、覆花、金佛草、金沸草^[1]。主要分布在中国湖北神农架和恩施地区,以及四川东部(巫山)^[2]。在我国传统中医药文化中,最早关于旋覆花的功效记载于《神农本草经》:“主结气肺下满,惊悸。除水,去五脏间寒热,补中,下气”。是土家族的一种

传统中草药,性味咸、温。具有降气、消痰、行水、止呕等功效,主治咳嗽消痰、肺下胀满大腹水肿、去头目风、泄散风寒^[3]。

该植物为我国特有品种,主要产于湖北恩施和神农架,地理位置特殊,植物资源集中。湖北旋覆花的化学成分为倍半萜、黄酮、甾醇、百里酚以及多糖类化合物,倍半萜类为特征成分。国内外大量研究显示旋覆花属植物倍半萜类成分在抗肿瘤、抗炎和治疗糖尿病方面均具有良好的生物活性^[4-8],但关于抗结核方面的研究鲜有报道。据 WHO 统计,2016 年全世界范围内每年约有 1 040 万人感染结核并引

收稿日期:2018-10-23 接受日期:2019-04-02

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81803383)

* 通信作者 E-mail: bosliu2009@163.com

起死亡^[9]。结核病是由结核分枝杆菌引起的一种慢性、消耗性传染病。最早的抗结核药物链霉素来自于放线菌,但近年来结核杆菌产生了耐药性,现有抗结核药物很难杀死耐药菌株。因此,本文对湖北旋覆花化学成分及抗结核活性进行了研究,对于开发其药用资源,从天然产物中寻找新型抗结核杆菌活性物质具有重大意义,也为以后该植物的药用开发提供了参考依据。

1 仪器与材料

1.1 菌株

标准菌株人型结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* H37R_v、牛分枝杆菌 *M. bovis* BCG,均购于上海公共卫生临床中心。

1.2 主要试剂与仪器

柱层层析硅胶(批号:0370245 青岛海洋化工有限公司);MCI GEL(批号:3E804 日本三菱化学);色谱级甲醇(批号:17065112 美国 TEDIA 公司);色谱级乙腈(批号:17065094 美国 TEDIA 公司);分析级甲醇(批号:20140319 国药集团化学试剂有限公司);分析级石油醚(批号:20150930 国药集团化学试剂有限公司);分析级乙酸乙酯(批号:20170422 天津科密欧化学试剂有限公司);分析级丙酮(批号:2017111001 成都市科隆化学品有限公司);Middlebrook 7H9 培养基(批号:271310 美国 BD 公司);吐温 80(批号:20170319 国药集团化学试剂有限公司);DMSO(批号:20170823 国药集团化学试剂有限公司);利福平(批号:H32021677 常州制药厂有限公司)。

Bruker AV 400 核磁共振谱仪(瑞士布鲁克公司);SHIMADU LC-6AD 高效液相色谱仪,(岛津企业管理中国有限公司);YMC-Pack ODA-A 色谱柱(10 μm,250×10 mm 半制备型;5 μm,250×4.6 mm 分析型,日本 YMC 公司);FreeZone 2.5 L 低温冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);Sartorius cp324s 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);GLH-100C 恒温恒湿培养箱(德国 BINDER 公司);Haiser HR40-II A2 生物安全柜(上海恒勤仪器设备有限公司);Unic 2000 可见分光光度计(上海旦鼎国际贸易);TOMY ss-325 高压灭菌锅(北京久航润达科技有限公司)。

1.3 药材

2017 年 8 月采自于湖北神农架林区,经三峡大学生物与制药学院王玉兵副教授鉴定为湖北旋覆花

(*Inula hupehensis* Ling)。植物标本现保存于三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室。

2 实验方法

2.1 提取分离

取干燥旋覆花花序部分 4.51 kg,粉碎后用 95% 乙醇浸提 3 次,每次 12 h,提取液合并过滤,减压蒸馏干燥得乙醇提取物 685.71 g,提取率为 15.2%。将乙醇提取物悬浮于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得各部位萃取物:石油醚萃取物 121.97 g、乙酸乙酯萃取物 108.48 g、正丁醇萃取物 43.74 g。

取石油醚萃取物浸膏 37.64 g,经正相硅胶柱层析分离,以石油醚-丙酮溶剂系统(100:1~1:1)梯度洗脱,依据薄层色谱合并得 20 个组分(Fr. 1~20)。Fr. 5 进行高效液相色谱半制备分离纯化(乙腈-水=75:25,2.5 mL/min),得到化合物 **1**(16.1 mg)、**2**(1.1 mg)。Fr. 6 经 MCI 层析柱甲醇-水(10:90~1:0)分离,得 5 个部分(Fr6. 1~5)。Fr6. 3 经甲醇重结晶得化合物 **3**(64.9 mg)。Fr. 7 经正相硅胶柱层析分离,石油醚-乙酸乙酯(10:1~1:1)洗脱,进行高效液相色谱半制备分离纯化(乙腈-水=51:49,2.5 mL/min),得到化合物 **4**(3.0 mg)、**6**(28.2 mg)、**7**(452.2 mg)、**10**(27.3 mg)。

取乙酸乙酯萃取物 103.68 g,经正相硅胶柱层析分离,以氯仿-甲醇溶剂系统(100:1~1:1)梯度洗脱,得 15 个组分 IH. 1-15。IH. 2 经正相硅胶柱石油醚-乙酸乙酯溶剂体系(30:1~1:1)反复分离纯化,经高效液相色谱半制备分离纯化(乙腈-水=40:60,2.5 mL/min),得到化合物 **5**(85.3 mg)、**8**(22.6 mg)、**9**(28.4 mg)。

化合物结构均采用质谱(MS)、核磁共振(NMR)波谱方法鉴定,并与文献对照确定化合物 **1**~**10** 的结构。

2.2 肉汤二倍稀释法考察体外抗结核分支杆菌增殖抑制活性

2.2.1 10%(v/v)的 OADC 的配置

H₂O(375 mL),GS(10 g),NaCl(4.25 g),Oleic acid(0.3 mL),BSA(25 g),上述试剂搅拌 1 h 直至完全溶解,调体积至 500 mL,用 0.22 μm 无菌过滤器过滤,放于 4℃ 保存。

2.2.2 接种菌株的准备

试验菌株 H37R_v 和 BCG 在 Middlebrook 7H9 肉汤附加 0.5% glycerol,0.25% 吐温 80 和 10%

OADC 37 °C 培养至对数生长期 ($OD_{600} 0.6 \sim 1$), 两种培养物与足够体积的灭菌 Middlebrook 7H9 肉汤培养基混合, 达到 OD_{600} 为 0.08, 即为检测用的菌液。

2.2.3 肉汤二倍稀释法操作过程^[10]

试验在 96 孔平底细胞培养板中进行。设置空白、阳性对照、阴性对照。不同单体化合物平行检测三次。加 200 μL 无菌蒸馏水到微板的外围孔中, 于第 2 列孔中加 200 μL Middlebrook 7H9 肉汤, 继续向第二列孔中注入各化合物溶液 (100 μM)、阳性药物利福平、阴性对照物 DMSO, 剩余孔中都增补 100 μL Middlebrook 7H9 肉汤, 留一行做空白对照, 不加任何物质只加培养基, 对每列进行系列二倍稀释, 100 μL 菌悬液加到所有检测孔中。被检测溶液的最终浓度从 50 μM 到 0.78 μM 。平板套上封闭的塑料袋在 37 °C 的培养箱中孵育 7~9 天, 而后观察浊度。无混浊现象的最低浓度定义为 MIC。

3 实验结果

3.1 化合物结构式

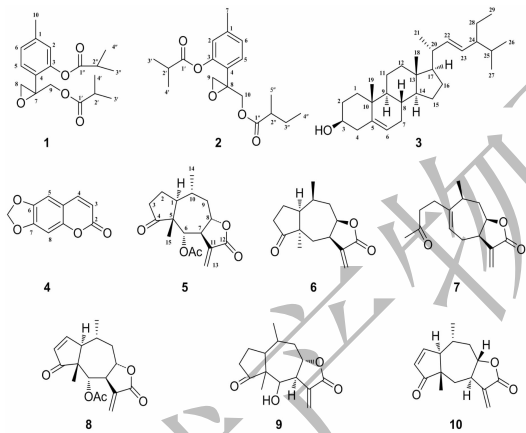


图 1 化合物 1~10 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-10

3.2 化合物结构鉴定

化合物 1 无色油状物 (CHCl_3), EI-MS m/z 338 $[\text{M}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_6$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.86 (1H, s, H-2), 7.35 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.04 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-6), 3.02 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-8a), 2.79 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-8b), 4.57 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-9a), 4.19 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-9b), 2.34 (3H, s, H-10), 2.51 (1H, dt, $J = 16.0, 8.0, 4.0$ Hz, H-2'), 1.09 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 1.10 (3H, dd, $J = 16.0, 8.0$ Hz, H-4'), 2.84 (1H, dt, $J = 16.0, 8.0, 4.0$ Hz, H-2''),

1.32 (3H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3''), 1.32 (3H, d, $J = 12.0$ Hz, H-4''); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 139.88 (C-1), 122.93 (C-2), 148.56 (C-3), 125.96 (C-4), 128.91 (C-5), 126.70 (C-6), 56.89 (C-7), 50.68 (C-8), 64.83 (C-9), 21.10 (C-10), 176.39 (C-1'), 33.82 (C-2'), 18.99 (C-3'), 18.99 (C-4'), 175.30 (C-1''), 34.17 (C-2''), 18.87 (C-3''), 18.83 (C-4''). 以上数据与文献^[11]报道一致, 故鉴定化合物为 7, 8-epoxy-9-(isobutyryloxy) thymolisobutyrate。

化合物 2 无色油状物 (CHCl_3), EI-MS m/z 334 $[\text{M}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_5$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.87 (1H, s, H-2), 7.35 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.04 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 2.34 (3H, s, H-7), 2.78 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-9a), 3.02 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9b), 4.06 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-10a), 4.17 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-10b), 2.84 (1H, m, H-2'), 1.33 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 1.33 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 2.50 (1H, m, H-2''), 1.59 (1H, m, $J = 8.0$ Hz, H-3a'), 1.41 (1H, m, H-3b''), 0.80 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, H-4''), 1.08 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 139.89 (C-1), 122.93 (C-2), 148.56 (C-3), 125.98 (C-4), 128.92 (C-5), 126.73 (C-6), 21.11 (C-7), 56.95 (C-8), 50.64 (C-9), 64.74 (C-10), 176.01 (C-1'), 34.19 (C-2'), 19.01 (C-3'), 18.90 (C-4'), 175.33 (C-1''), 40.85 (C-2''), 26.59 (C-3''), 16.45 (C-4''), 11.37 (C-5''). 以上数据与文献^[12]报道一致, 故鉴定化合物为 10-(2-methylbutyloxy)-8, 9-epoxythymolisobutyrate。

化合物 3 白色无定形固体 (CHCl_3), EI-MS m/z 390 $[\text{M}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3.51 (m, H-3a), 5.34 (d, $J = 4.0$ Hz, H-7), 0.76 (s, H-18), 0.83 (s, H-19), 5.15 (1H, t, $J = 12.0, 8.0$ Hz, H-21), 5.01 (t, $J = 12.0, 8.0$ Hz, H-22), 0.70 (d, $J = 8.0$ Hz, H-25), 0.78 (d, $J = 8.0$ Hz, H-26), 1.0 (d, $J = 8.0$ Hz, H-28), 1.0 (d, $J = 8.0$ Hz, H-29); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 137.20 (C-1), 31.60 (C-2), 71.80 (C-3), 42.20 (C-4), 140.70 (C-5), 121.73 (C-6), 31.89 (C-7), 31.92 (C-8), 50.81 (C-9), 36.58 (C-10), 21.07 (C-11), 39.62 (C-12), 42.23 (C-13), 56.83 (C-14), 24.38 (C-15), 28.91 (C-16), 55.92 (C-

17), 12.07 (C-18), 19.45 (C-19), 40.51 (C-20), 21.22 (C-21), 138.31 (C-22), 129.28 (C-23), 51.22 (C-24), 31.89 (C-25), 21.02 (C-26), 18.89 (C-27), 25.39 (C-28), 12.29 (C-29)。以上数据与文献^[13]报道一致,故鉴定化合物为 stigmaterol。

化合物 4 无色固体粉末(CHCl₃), EI-MS m/z 190 [M]⁺, 分子式为 C₁₀H₆O₄; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.12 (2H, s, H-2), 6.33 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-7), 7.62 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 6.88 (1H, s, $J = 8.0$ Hz, H-9); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 151.32 (C-3a), 161.35 (C-6), 113.46 (C-7), 143.42 (C-8), 112.72 (C-8a), 105.04 (C-9), 144.94 (C-9a), 102.34 (OCH₂O)。以上数据与文献^[14]报道一致,故鉴定化合物为 ayapin。

化合物 5 无色片状结晶(CHCl₃), EI-MS m/z 306 [M]⁺, 分子式为 C₁₇H₂₂O₅; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 2.29 (1H, $J = 16.0, 12.0, 4.0$ Hz, ddt, H-1), 2.16 (1H, m, H-2a), 1.46 (1H, m, H-2b), 2.14 (1H, m, H-3a), 2.39 (1H, dd, $J = 24.0, 20.0, 8.0$ Hz, H-3b), 5.50 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 3.04 (1H, m, H-7), 4.49 (1H, ddd, $J = 12.0, 10.0, 4.0$ Hz, H-8), 1.57 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-9a), 2.51 (1H, m, H-9b), 1.86 (1H, m, H-10), 5.85 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13a), 6.21 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13b), 1.11 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-14), 1.07 (3H, s, H-15), 2.02 (3H, s, OAc); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 46.76 (C-1), 24.49 (C-2), 37.92 (C-3), 218.66 (C-4), 56.08 (C-5), 74.72 (C-6), 52.70 (C-7), 76.25 (C-8), 44.33 (C-9), 30.01 (C-10), 137.29 (C-11), 169.39 (C-12), 122.14 (C-13), 19.99 (C-14), 18.43 (C-15), 169.14 (MeCO), 21.13 (COCH₃)。以上数据与文献^[15]报道一致,故鉴定化合物为 ergolide。

化合物 6 无色片状结晶(CHCl₃), EI-MS m/z 248 [M]⁺, 分子式为 C₁₅H₂₀O₃; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.51 (2H, m, H-2b), 4.31 (1H, ddd, $J = 12.0, 8.0, 4.0$ Hz, H-8), 1.63 (1H, m, H-9a), 2.49 (3H, m, H-9b), 1.96 (2H, m, H-10), 6.21 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13a), 5.54 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13b), 1.12 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-14), 1.06 (3H, s, H-15); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 48.69 (C-1), 24.14 (C-2), 35.22 (C-3), 222.40 (C-4), 50.02 (C-5), 34.54 (C-6), 44.76 (C-7), 80.86 (C-

8), 44.06 (C-9), 26.61 (C-10), 140.25 (C-11), 169.88 (C-12), 120.10 (C-13), 20.00 (C-14), 22.04 (C-15)。以上数据与文献^[16]报道一致,故鉴定化合物为 5,10-epi-2,3-dihydroaromatin。

化合物 7 黄色油状物(CHCl₃), EI-MS m/z 248 [M]⁺, 分子式为 C₁₅H₂₀O₃; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 2.24 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-2), 2.57 (1H, ddd, $J = 24.0, 16.0, 8.0$ Hz, H-3a), 2.46 (1H, m, H-3b), 5.44 (1H, m, H-5), 2.18 (1H, m, H-6a), 2.44 (1H, m, H-6b), 3.33 (1H, m, H-7), 4.65 (1H, m, H-8), 2.03 (1H, m, H-9a), 1.92 (1H, ddd, $J = 12.0, 8.0$ Hz, H-9b), 2.36 (1H, m, H-10), 5.53 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13a), 6.25 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13b), 1.13 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-14), 2.16 (3H, s, H-15); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 144.42 (C-1), 30.42 (C-2), 42.61 (C-3), 208.28 (C-4), 120.10 (C-5), 26.55 (C-6), 42.10 (C-7), 79.32 (C-8), 36.64 (C-9), 35.42 (C-10), 138.98 (C-11), 170.29 (C-12), 122.14 (C-13), 20.95 (C-14), 29.93 (C-15)。以上数据与文献^[17]报道一致,故鉴定化合物为 xanthalongin。

化合物 8 无色针状结晶(CHCl₃), EI-MS m/z 304 [M]⁺, 分子式为 C₁₇H₂₀O₅; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 3.05 (1H, m, H-1), 7.75 (1H, dd, $J = 6.0, 4.0$ Hz, H-2), 6.14 (1H, dd, $J = 8.0, 4.0$ Hz, H-3), 5.66 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 3.12 (1H, m, H-7), 4.65 (1H, ddd, $J = 12.0, 8.0, 4.0$ Hz, H-8), 2.60 (1H, m, H-9a), 1.60 (1H, ddd, $J = 24.0, 12.0$ Hz, H-9b), 2.10 (1H, m, H-10), 5.96 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13a), 6.27 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13b), 1.33 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, H-14), 1.25 (3H, s, H-15), 2.01 (3H, s, COCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 52.22 (C-1), 161.61 (C-2), 130.82 (C-3), 209.18 (C-4), 56.29 (C-5), 73.12 (C-6), 53.98 (C-7), 76.17 (C-8), 44.41 (C-9), 27.23 (C-10), 137.16 (C-11), 169.63 (C-12), 122.18 (C-13), 19.82 (C-14), 22.71 (C-15), 168.95 (COCH₃), 21.13 (COCH₃)。以上数据与文献^[18]报道一致,故鉴定化合物为 bigelovin。

化合物 9 无色片状结晶(CHCl₃), EI-MS m/z 264 [M]⁺, 分子式为 C₁₅H₂₀O₄; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 4.05 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 3.05 (1H, s, C-6-OH), 2.91 (1H, m, H-7), 4.42 (1H,

ddd, $J = 12.0, 10.0, 4.0$ Hz, H-8), 6.02 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13a), 6.24 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13b), 1.12 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, H-14), 1.06 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 50.06 (C-1), 24.60 (C-2), 44.16 (C-3), 223.20 (C-4), 57.75 (C-5), 75.36 (C-6), 45.19 (C-7), 76.05 (C-8), 37.70 (C-9), 30.18 (C-10), 138.96 (C-11), 169.68 (C-12), 121.86 (C-13), 19.09 (C-14), 20.10 (C-15)。以上数据与文献^[19]报道一致,故鉴定化合物为 carpesiolin。

化合物 10 无色片状结晶(CHCl_3), EI-MS m/z 246 $[\text{M}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.79 (1H, dt, $J = 16.0, 8.0$ Hz, H-1), 7.68 (1H, dd, $J = 8.0, 4.0$ Hz, H-2), 6.18 (1H, dd, $J = 8.0, 4.0$ Hz, H-3), 1.69 (1H, dd, $J = 16.0, 12.0, 8.0$ Hz, H-6a), 2.52 (1H, d, H-6b), 2.94 (1H, m, H-7), 4.55 (1H, ddd, $J = 12.0, 8.0, 4.0$ Hz, H-8), 1.49 (1H, d, $J = 24.0, 12.0, 4.0$ Hz, H-9a), 2.56 (1H, m, H-9b), 2.17 (1H, m, H-10), 5.57 (1H, d, J

$= 4.0$ Hz, H-13a), 6.24 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-13b), 1.30 (3H, d, $J = 12.0$ Hz, H-14), 1.23 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 54.23 (C-1), 161.60 (C-2), 130.35 (C-3), 213.73 (C-4), 51.19 (C-5), 32.07 (C-6), 46.51 (C-7), 79.62 (C-8), 44.21 (C-9), 27.97 (C-10), 140.31 (C-11), 169.64 (C-12), 120.19 (C-13), 19.87 (C-14), 27.20 (C-15)。以上数据与文献^[20]报道一致,故鉴定化合物为 aromaticin。

3.3 体外抗结核分支杆菌增殖抑制实验结果

经过文献调研显示旋覆花属植物中倍半萜类化合物具有显著的生物活性,因此本文选取了分离得到的倍半萜类化合物 **5** ~ **10** 进行体外抗结核分支杆菌增殖抑制活性测试。结果表明化合物 **5, 6, 8** ~ **10** 对人型结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* H37R_v、牛分枝杆菌 *M. bovis* BCG 具有较好的增殖抑制活性,其中化合物 **9** 和 **10** 的增殖活性更加显著,化合物 **7** 没有抗结核分支杆菌增殖抑制活性。具体活性结果见表 1。

表 1 化合物 **5, 6, 7** ~ **10** 对结核分支杆菌的增殖抑制影响 ($n = 3$)

Table 1 Anti-tuberculosis activity of compounds **5, 6, 7-10** ($n = 3$)

菌株 Strain	MIC (μM)						利福平 Rifampic-in
	5	6	7	8	9	10	
<i>M. tuberculosis</i> H37R _v	6.25	12.50	>200	6.25	-	-	0.39
<i>M. bovis</i> BCG	10.00	30.00	>200	5.00	3.15	3.15	0.006

注:利福平为阳性对照药。

Note: RIF of positive control.

4 结果

目前对湖北旋覆花化学成分及抗结核药理作用研究较少,本课题组对湖北旋覆花的花序进行了深入研究。从中共分离鉴定了 10 个化合物。其中包括 6 个倍半萜类, 2 个百里酚类, 1 个甾醇和 1 个酚类, 化合物 **1, 2, 5, 6, 8** ~ **10** 均为首次从该植物中分离得到。通过肉汤二倍稀释法评价了体外抗结核分支杆菌增殖抑制活性,与化合物 **7** 比较,化合物 **5, 6, 8** ~ **10** 对人型结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* H37R_v、牛分枝杆菌 *M. bovis* BCG 都具有良好的增殖抑制活性,猜测活性部位主要为闭环 A 以及 5 位甲基,其中化合物 **9** 和 **10** 的增殖活性更加显著,可能与 7, 8 位取代基有关。

由于主要近年来结核分支杆菌对现有抗结核药物产生了广泛耐药性,耐药菌株很难被药物杀死。

本文对湖北旋覆花化学成分及抗结核活性的研究,从结果来看,倍半萜类化合物具有良好的抗结核生物活性,也为从天然化合物中筛选有效抗结核活性物质提供了途径。这对于开发其药用资源,从天然产物中寻找新型抗结核杆菌活性物质具有重大意义,也为计算机辅助研究分子构效关系以及寻找活性位点提供了参考依据。

致谢:感谢上海市公共卫生临床中心范小勇研究员在抗结核活性试验中给予的指导和帮助,在此致以真诚的谢意!

参考文献

- 1 Chinese Academy of Sciences, Chinese ethnography editorial board. Flora Reipublicae Populsris Sinicae; Vol 75 (中国植物志:第 75 卷)[M]. Beijing: Science Press, 1979.
- 2 Marco JA, Sanz-Cervera JF, Manglano E. Chlorinated thymol

- derivatives from *Inula crithmoides* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 33:875-878.
- 3 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, 2010.
 - 4 Wu YB, Zhang DQ, Wang YZ. Advances in the study of chemical constituents of *Inula britannica* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2006, 18:503-507.
 - 5 GUO QL, Yang JS. Sesquiterpenes in *Inula L.* plants and their pharmacological activities [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2005, 17:804-809.
 - 6 Zhang XY, Wang ZX, Shan JJ. Constituents and pharmacological activities of *Inula L.* [J]. *Int Pharm Res*(国际药学研究杂志), 2008, 35:433-440.
 - 7 Qin JJ. The discovery and biological activities evaluation of novel sesquiterpenes and from four medicinal plants of the Genus *Inula* [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University (上海交通大学), 2011.
 - 8 Cheng XR. Studies on bioactive secondary metabolites from four medicinal plants of Genus *Inula* [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University (上海交通大学), 2012.
 - 9 Ma AJ, Zhao YL. The prevalence and surveillance of drug-resistant tuberculosis [J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2018, 43:502-506.
 - 10 Fan JW, Yu L, Ma LZ, et al. Antimycobacterial activity of 29 plants extracts [J]. *Chin Sci Bull* (中国农学通报), 2009, 25(24):1-7.
 - 11 Mossa JS, El-Feray FS, Muhammad I, et al. Sesquiterpene lactones and thymol esters from *Vicoa pentanema* [J]. *J Nat Prod*(天然产物杂志), 1997, 60:550-555.
 - 12 Zee OP, Kim DK, Kang RL. Thymol derivatives from *Carpesium divaricatum* [J]. *Arch Pharm Res*, 1998, 21:618-620.
 - 13 Zhang XQ, Qi J, Ye WC. Chemical constituents of *Xanthium sibiricum* Patr. ex Widder. [J]. *Chin Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2004, 35:404-405.
 - 14 Jerezano A, Jiménez F, Delgado F, et al. New approach for the construction of the Coumarin Frame and application in the total synthesis of natural products [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 42:185-198.
 - 15 Huang HQ, Piao XL, Yan MN, et al. Seven sesquiterpene lactones from flower of *Inula helianthus-aquatica* [J]. *Chin J Exp Tradit Med From*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17:112-115.
 - 16 Merfort I, Wendisch D. Sesquiterpene lactones of *Arnica cordifolia*, subgenus *Austromontana* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34:1436-1437.
 - 17 Willuhn G, Skibinski A, Schmidt TJ. Structure revision of xanthalongin and further sesquiterpene lactones from flowers of *Arnica longifolia* [J]. *Planta Med*, 1998, 64:635-639.
 - 18 Wang Q, Zhou BN, Zhang RW, et al. Cytotoxicity and NMR spectral assignments of ergolide and bigelovin [J]. *Planta Med*, 1996, 62:166-168.
 - 19 Maruyama M, Omura S. Carpesiolin from *Carpesium abrotanoides* [J]. *Phytochemistry*, 1977, 16:782-783.
 - 20 Majetich G, Song JS, Leigh AJ, et al. Allylsilane-based annulations. Direct stereoselective syntheses of (±)-graveolide and (±)-aromaticin [J]. *Nat Prod Lett*, 1993, 1:179-186.
- ~~~~~
- (上接第 642 页)
- 11 Zhou BH, Yi HL, Guo XX, et al. Preliminary analysis of tannin-related constituents in Pomegranate peel by HPLC-ESI-MS [J]. *China Pharm* (中国药师), 2015, 18:201-204.
 - 12 Eldahshan OA, Ayoub NA, Singab, et al. Potential superoxide anion radical scavenging activity of Doum Palm (*Hyphaene thebaica* L.) leaves extract [J]. *Rec Nat Prod*, 2008, 2(3):83-93.
 - 13 Wang Q, Lu ZW, Liu YH, et al. Rapid analysis on phenolic compounds in *Rheum palmatum* based on UPLC-Q-TOF/MSE combined with diagnostic ions filter [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42:1922-1931.
 - 14 Liu DY, Shi XF, Li C, et al. Chemical constituents of flavonoids in pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2011, 42:631-633.
 - 15 Zeng ML, Shen NT, Wu SW, et al. Analysis on chemical constituents in *Tetragium hemsleyanum* by UPLC-Triple-TOF/MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48:874-883.
 - 16 Jin LZ, Qing MC, Shou ZL, et al. Study on metabolism of scutellarin in rats by HPLC-MS and HPLC-NMR [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5:249-256.
 - 17 Bai NS, He K, Marc R, et al. Active compounds from *Lagerstroemia speciosa*, insulin-like glucose uptake-stimulatory/inhibitory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56:11668-11674.
 - 18 Yi F, Hu LH. Two DNA topoisomerase inhibitors in *Camptotheca acuminata* [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2005, 1:25-31.
 - 19 Yu JY, Wang YH, Liu GQ, et al. Identification of flavonoids from *Thlaspi arvense* L. by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2015, 37:556-561.
 - 20 Yang L. Research development of pharmacology activities of quercitrin [J]. *Asia-Pac Trad Med* (亚太传统医药), 2015, 11(6):61-65.