

安络小皮伞菌丝体中的镇痛成分

方圣鼎^{*1}, 张振德¹, 陈链¹, 何直升¹, 蔡国琴², 杜晨捷²

(¹中国科学院上海药物研究所)

(²上海中药制药三厂)

我国民间用安络小皮伞菌丝体来治疗跌打刀伤、骨折疼痛。根据这一经验, 上海中药制药三厂将野生小皮伞菌采用人工大规模固体培养, 将其干菌丝体连同基质的粗提物制成“安络解痛片”, 作为镇痛药销售于市场。曾有报道, 从中分得甘露醇、胆甾醇醋酸酯等^[1, 2]多种成分, 并证明镇痛成分为三十烷酸和麦角甾醇^[2]。为了稳定产品质量, 我们对其镇痛成分重新进行了探讨。以小鼠热板法和扭体法测定为先导, 其镇痛有效成分系醇溶性, 进一步与生物试验相结合分得一镇痛成分, 根据波谱数据证明为对羟基肉桂酸(I), 并用人工合成了I。小鼠扭体镇痛试验证实, 且有对抗苯丙胺的作用。另外安络小皮伞菌丝体中还含有大量甘露醇, 又分得 β -谷甾醇、软脂酸、二十八烷酸和苜蓿素(II)。据文献报道^[8]对豚鼠离体肠的平滑肌具有松弛作用, 类似一种弱的雌性激素。从菌丝体中还检出17种氨基酸, 其中天门冬氨酸的含量占总氨基酸的2.7%, 丙氨酸占2.21%。I, II, 脂酸及二十八烷酸属首次报道。

1 材料和方法

1.1 实验材料

安络小皮伞 (*Marasmius androsaceus*) 是一种真菌, 属担子菌纲、伞菌目、白磨科小皮伞属。用甘蔗渣、麸皮或米糠为基质进行固体培养。取菌丝体连同基质干燥备用。

1.2 提取和分离

取干菌丝体连同培养基加冷水浸泡洗涤, 残渣烘干、磨粉用乙醇回流提取, 醇液减压浓缩至小体积, 滤取析出物。溶液再减压浓缩得糖浆状物, 得率1.93%。经硅胶柱层

析, 二氯甲烷中递增甲醇洗脱。从二氯甲烷-甲醇 96:4 中分得苜蓿素(II), 95:5 中分得对羟基肉桂酸(I)。小体积的析出物用甲醇提取, 用同样条件层析, 二氯甲烷洗脱流分中依次分得软脂酸、二十八烷酸和 β -谷甾醇。

上述冷水浸出液减压浓缩至适当体积, 通过强酸性阳离子交换树脂(Zerolit 225, H型), 先用水洗, 继用0.15mol/L 氢氧化铵洗脱, 洗脱液减压浓缩至干, 得率0.03%。经氨基酸自动分析仪(LKB 4400), 分析结果(%)含有天门冬氨酸(2.7)、苏氨酸(0.79)、丝氨酸(0.58)、谷氨酸(0.55)、脯氨酸(0.92)、甘氨酸(0.81)、丙氨酸(2.21)、胱氨酸(0.23)、缬氨酸(0.49)、蛋氨酸(0.18)、异亮氨酸(0.30)、亮氨酸(0.77)、酪氨酸(0.18)、苯丙氨酸(0.43)、组氨酸(0.17)、赖氨酸(0.63)和精氨酸(1.04)。通过树脂柱的水溶液经检查主要为甘露醇及蔗糖。

另取干菌丝体连同基质粉碎直接加乙醇回流提取, 经溶液减压浓缩至小体积、放置, 析出粗结晶, 加水溶解过滤除去不溶物, 水液减压浓缩, 加适量乙醇放置即析出无色针状甘露醇晶体, 得率0.2%。

2 结果

2.1 多糖成分鉴定

对羟基肉桂酸(I): 白色细针状晶体(二氯甲烷-丙酮或甲醇), mp 212-214°C, 微溶于冷水, 溶于热水、乙醇、甲醇, 难溶于二氯甲烷。UV 呈二取代芳香环吸收特征, 并有较强的

K 吸收带。IR(cm^{-1}): 1675 (br, $>\text{C}=\text{O}$), 2500~3000 (OH), 3400 (OH), 1510, 1590, 1600 (芳环) 和 1630, 980(反式双键)。MSm/z(%):164 (M^+ , 100), 147(M^+-17 , 52), 119 (48)和 106(19)。元素分析 ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$, 实验值(%): C65.72, H4.84, 计算值 (%): C65.85, H4.91。 $^1\text{HNMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 6.30 (1H, d, $J=15.8\text{Hz}$, $\text{C}_1\text{-H}$), 6.79 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$, C_3' , $5'$ -H), 7.49 (1H, d, $J=15.8\text{Hz}$, $\text{C}_2\text{-H}$), 7.55 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$, C_2' , $6'$ -H), 9.95 (1H, s, OH, 加 D_2O 消失), 13.21(1H, br, s, COOH, 加 D_2O 消失)。

上述结果与对羟基肉桂酸 (I) 结构相符, 与合成化合物比较 TLC、IR 和 $^1\text{HNMR}$ 均完全一致, 混合熔点亦不下降。

对羟基肉桂酸的合成: 采用 Knoevenagel 反应, 4-羟基苯甲醛与丙二酸在无水吡啶溶液中以六氢吡啶作催化剂得到粗品, 经甲醇-二氯甲烷重结晶, mp210~212 $^\circ\text{C}$, IR、 $^1\text{HNMR}$ 与天然分得的对羟基肉桂酸完全一致, 混合熔点亦不下降。

β -谷甾醇: 白色片状结晶 (甲醇), mp136~137 $^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}^{25}}$ -35 $^\circ$ (c, 1.5, CHCl_3), 与 β -谷甾醇标准品混合熔点不下降, TLC Rf 值、IR、MS 及 $^1\text{HNMR}$ 均完全一致。

软脂酸: 白色结晶性粉末 (甲醇), mp62~63 $^\circ\text{C}$ 。EI-MS m/z: 256 (M^+), 241 (M^+-CH_3), 与软脂酸标准品对照, 混合熔点不下降, TLC Rf 值及 IR 亦一致。

二十八烷酸: 白色粉末 (甲醇), mp67~68 $^\circ\text{C}$, IR 呈长链脂肪酸的特征吸收。MS m/z: 424(M^+), 然后依次递减 14(CH_2), 基峰 129 [(CH_2) $_6\text{COOH}$]。 $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.34(2H, t)为羧基二个 α 质子信号, 1.60(2H, m)为甲基邻近亚甲基二个质子信号, 1.24 (48H, br, s)为 24 个 CH_2 质子信号, 0.86(3H, t)为 端甲基质子信号, 上

述结果与二十八烷酸相符。

甘露醇: mp165~167 $^\circ\text{C}$ (甲醇), 醋酐-吡啶常法乙酰化, 得六乙酰化合物针状晶体 (乙醇), mp121~123 $^\circ\text{C}$ 。与 D-甘露醇标准品混合熔点不下降、TLC Rf 值、IR、MS 及 $^1\text{HNMR}$ 均完全一致。

苜蓿素 (II): 黄色针状晶体 (甲醇), mp278~280 $^\circ\text{C}$, HCl-Mg 粉反应呈红色。UV:

$\lambda_{\text{max}}^{\text{meOH}}$ nm (log ϵ): 245 (4.16), 268(4.06), 350 (4.27); $\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOMe}}$ nm: 230 (sh), 262, 325, 420, $\lambda_{\text{max}}^{\text{A}^1\text{C}^{13}}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{A}^1\text{C}^{13}+\text{HCl}}$ nm: 214, 255, 278, 305, 360, 390; $\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOAc}}$ nm: 275, 318, 395; $\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3}$ nm: 269, 352 提示为 4', 5', 7 羟基取代的黄酮类化合物。IR (cm^{-1}), 3600, 3300 (br) (OH), 1650 (共轭羰基), 1600, 1580, 1500 (芳环)。MS m/z: 330 (M^+ , 100), 315, 302, 301, 287, 259, 213, 187, 178, 163, 153, 134, 123 和 107。 $^1\text{HNMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 3.88 (6 H, s, $2\times\text{OCH}_3$), 6.20 (1 H, d, $J=1.6\text{Hz}$; $\text{C}_6\text{-H}$), 6.56 (1 H, d, $J=1.6\text{Hz}$, $\text{C}_8\text{-H}$), 6.99 (1 H, s, $\text{C}_3\text{-H}$), 7.33 (2H, s, C_2' , $6'-\text{H}$), 9.30 (1H, br, s, $\text{C}_4'\text{-OH}$, 加 D_2O 消失), 10.80(1H, br, s, $\text{C}_7\text{-OH}$, 加 D_2O 消失), 12.96 (1H, br, s, $\text{C}_5\text{-OH}$, 加 D_2O 消失)。NOE 差谱实验表明, 当照射 δ 6.99 使 δ 7.33 增益 14.3%, 而照射 δ 3.88 可使 δ 7.33 增益 14%, 表明二个甲氧基分别在 B 环 C_3' 和 C_5' 位上, C_3 存在孤独烯质子。综上所述与苜蓿素^[4] 相同, IR 光谱^[4] 亦完全一致。

2.2 对羟基肉桂酸 (p-MA) 的药理实验

1.镇痛试验 (扭体法): 小鼠 (每组 5 只) 体重为 $21\pm 0.9\text{g}$, 随机分组, 对照组小鼠 ip0.6% 冰醋酸 10mL/kg, 2~3min 后出现扭体反应, 腹部贴地, 扭曲躯体, 伸展后肢等动作, 观察 15min 内的反应频率。对照组扭体反应为 41

次/15min, ip p-MA 组 350mg/kg, 经 15min 后 ip 冰醋酸, 小鼠扭体反应降为 13 次/15min, 对小鼠扭体反应抑制率为 72%。

2. 苯异丙胺的兴奋活动: 使用 GJ-8502 型光电记录仪, 室温 23~25°C, 观察小鼠 (每组 5 只, 体重 20±0.9g) 的自发活动, 在相同条件下分批进行试验, 设生理盐水对照组, 苯异丙胺组 (6mg/kg, ip), p-MA 组, 各组小鼠在给药 10min 后, 放入光电记录仪中进行观察, 于 10, 30, 60, 120 和 300min, 分别试验, 每次记录 5min, 实验结果, 苯异丙胺使小鼠在 30min 内出现明显的兴奋活动 ($P<0.01$), 与生理盐水对照组比, 能持续 2h (见图); p-MA (350mg/kg, ip) 在 10~30min 内, 使小鼠活动显著抑制 ($P<0.01$)。

3. 小鼠急性毒性试验: 小鼠 (每组 6 只), 体重 21±0.8g 随机分组, 各组 ip p-MA 1040, 1260, 1400 和 1750mg/kg 一次给药, 3h 内死亡, LD₅₀ 为 1273.5mg/kg (95% 可信限为 1190.4~1362.5mg/kg)。

另取邻羟基肉桂酸同样以 350mg/kg 剂量 ip, 用小鼠扭体法观察镇痛作用, 结果对小鼠扭体反应的抑制率为 67%。该类化合物的

镇痛效果属首次报道。

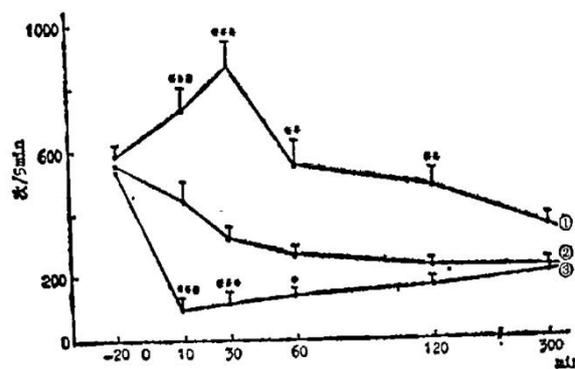


图 对羟基肉桂酸对小鼠自主活动的影响
剂量: ip p-MA 350mg/kg 和苯异丙胺 6mg/kg 与生理盐水对照
(1) 苯异丙胺 (2) 生理盐水 (3) p-MA ** $P<0.05$
*** $P<0.01$

参考文献

[1] 杨淑贤等: 中草药 1981; 12(6): 47
[2] 朱绍雄等: 中草药 1988; 19(8): 2
[3] Bickoff E M et al: J Pharm Sci 1964, 53: 1411
[4] 锹塚昭三等, 日本农艺化学会志, 1961; 35: 71; 1964, 38: 351
