

萱草根的研究

III. 治疗血吸虫病有效成分的初步分离和鉴定

陈昌 郑贤育 钱挹芬 肖树华

邵葆若 黄兰孙

(中国医学科学院寄生虫病研究所)

在血吸虫病的治疗上,百合科萱草属萱草根 (*Hemerocallis thunbergii* Baker) 是一种有希望的中药。前报^[1]通过动物试验,证明萱草根能使小白鼠体内的血吸虫萎缩和生殖器官退化,且能暂时性地抑制雌虫排卵。但这些变化都是可逆性的,由于药物对宿主产生比对虫体更为剧烈的毒性,在宿主致死前,虫体尚未被杀死。如果能除去它的毒性而保持疗效,就很理想。为此,必须首先研究有毒和有效成分是否可以分离?或为同一物质?因此,我们进行了有效成分的分离和提纯。

我们用氯仿提取,通过氧化铝层分离,获得一种黄色粉末,在243°C时变棕色,266—269°C时熔融(分解),经用小白鼠测毒试验,LD₅₀为0.95毫克/20克,同时出现疗效。这个粉末可用甲酰二甲胺或氯仿重结晶。用甲酰二甲胺重结晶后呈橘红色结晶,在240°C时变棕色,268—269°C时熔融(分解)。经试验,毒性与疗效都大大降低,但剂量增大后,毒性与疗效又同时出现。这个结晶经用碱溶解后,加酸酸化,复得黄色粉末,于240°C时变棕色,268—269°C时熔融(分解),测毒结果,LD₅₀为0.34毫克/20克。如果再以甲酰二甲胺重结晶,则又得上述橘红色结晶,毒性与疗效又大大降低,剂量增大后,毒性与疗效则又同时出现。上述分次获得的三个产物,都显示了毒性与疗效同时出现的现象,但所显示的毒性与疗效的程度却有差别。因此,必须阐明它们是否都是纯粹的化合物?是否是同一物质?所以我们又将上述分次获得的产物,进行了鉴定。为了便于叙述起见,以下将第一次获得的黄色粉末称为“萱草根成分I”,用甲酰二甲胺重结晶所得的橘红色结晶称为“萱草根成分II”,橘红色结晶经用碱、酸处理后,所得的黄色粉末称为“萱草根成分III”。

鉴定结果:(1)它们不但熔点相同,相互间的混合熔点也不降低;(2)在红外线吸收光谱上,所呈现的吸收峰也是一致的(图1A—C);(3)在相同的条件下,进行乙酰化后,分别获得的衍生物熔点均为240—241°C,并都是白色板状结晶,它们相互间的混合熔点也不降低;(4)萱草根成分I, II, III的乙酰衍生物,在红外线吸收光谱上,所呈现的吸收峰也是一致的(图2A—C);(5)用三种不同的溶剂系统进行纸上层析,显色后,均呈现一个相似的絳紫色斑点;(6)萱草根成分I, II, III均不溶于乙醇、乙醚等一般的有机溶剂中;但能溶于氢氧化钠、碳酸钠溶液中,溶解后均生成黄色溶液。不溶于碳酸氢钠溶液中,说明是弱酸

性物質。它們在酒精溶液中遇三氯化鐵試劑均显綠色，漸漸变紫色，最后变为棕色；在乙醇鈉溶液中均呈綠色；在浓硫酸溶液中均呈櫻紅色。

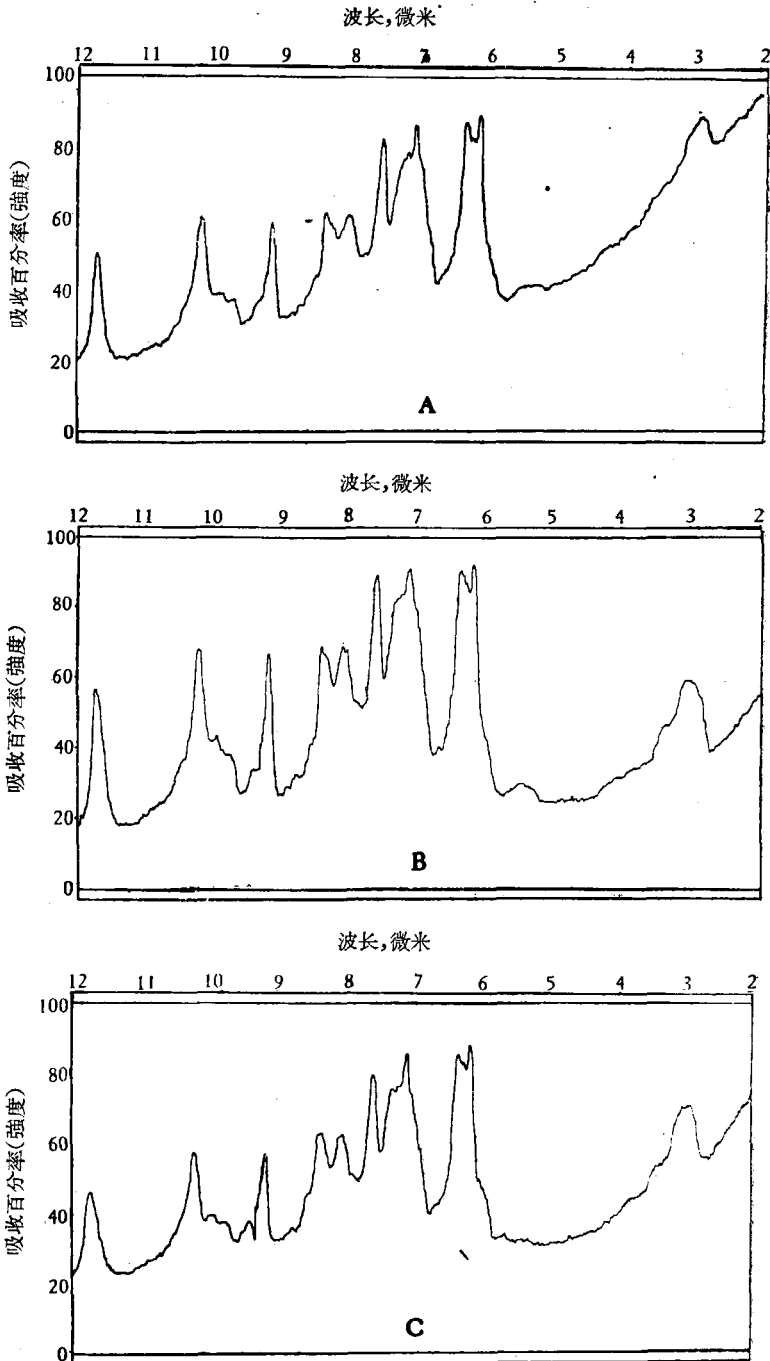


图 1

- A. 萱草根成分 I 紅外線吸收光譜。 B. 萱草根成分 II 紅外線吸收光譜。
 C. 萱草根成分 III 紅外線吸收光譜。

以上結果,說明了萱草根成分 I, II, III 可能是同一种物质,这种物质系治疗血吸虫病的有效成分;这种成分对血吸虫病有效,但同时对于宿主有毒,經藥理試驗,証明疗效与毒性間的关系是平行的。这种治疗血吸虫病的化学成分暫定名为萱草根素(hemerocallin)。

萱草根成分 I, II, III 从实验結果看来,很可能是同一物质,但藥理作用却表現有程度上的不同。这种現象可能与化合物的結構有关,是否是由于結構上的互变現象或其他原因所引起,目前尚缺乏实验資料以說明。

根据萱草根素乙酰衍生物的分子量和所含的乙酰基,推算出萱草根素的分子式为 $C_{16}H_{14}O_4$ 。經測定,含有两个碳-甲基。在紅外綫吸收光譜上,沒有游离的羥基吸收峯,所含的羥基可能是与羰基以氢鍵相結合(I.R. V_{max}^{KBr} , 6.18 微米)(图 1A—C)。

萱草根素乙酰衍生物,遇三氯化鉄試剂,不呈显色反应,能溶于一般的有机溶剂中,根据測得的分子量及乙酰基,乙酰萱草根素的分子式为 $C_{16}H_{12}O_4(COCH_3)_2$ 。在紅外綫吸收光譜上呈現乙酰基(I.R. V_{max}^{KBr} , 5.65 微米)及羰基(5.90 微米)。經藥理試驗,証明乙酰萱草根素无毒也无效。

实 驗 部 分*

一、萱草根素的提取

取萱草根粉一公斤,加入 5—6 公斤氯仿,在沙氏提取器中抽提 3—4 天。将氯仿提取液濃縮至 250 毫升左右,置冰箱中放置过夜,有棕黄色沉淀析出。抽滤,滤液濃縮至干,得氯仿浸膏(保留,另行处理)。棕黄色沉淀用丙酮-碱溶液^[2-4]溶解后,通过氧化铝柱层,呈显三层,上层为褐色(杂质),中层紅色(为乙醚溶解部分),下层为黄色。下层用丙酮洗脱,将洗液濃縮至小体积时,加入 5% 盐酸酸化,即得黄色粉末(萱草根成分 I),得量为原生药的 0.3—0.4%,在 243°C 时变棕色,268—269°C 时熔融(分解),測毒試驗 LD_{50} 为 0.95 毫克/20 克小白鼠体重。經甲酰二甲胺重結晶后,得橘紅色結晶(萱草根成分 II),熔点 240°C 变棕色,268—269°C 时熔融(分解),在紅外綫吸收光譜上出現結合的羰基(I.R. V_{max}^{KBr} , 6.18 微米)(图 1B)。經測毒試驗,一次用量达 60 毫克/20 克时,未能測出 LD_{50} 。根据其乙酰衍生物的分子量和乙酰基的測定,推算出它的分子式为 $C_{16}H_{14}O_4$ 。

分析 $C_{16}H_{14}O_4$

实验值, % C 71.08, 71.00; H 5.32, 5.54; C—CH₃ 11.37, 11.49

計算值, % C 71.09; H 5.22; C—CH₃ 11.12

将此橘紅色結晶(萱草根成分 II)溶解于 5% 氢氧化鈉溶液中,加入稀盐酸酸化后,又析出黄色粉末(萱草根成分 III),240°C 时变棕色,268—269°C 时熔融(分解), LD_{50} 为 0.34 毫克/20 克。繼以甲酰二甲胺重結晶,复得橘紅色結晶的萱草根成分 II。

保留的氯仿浸膏,用乙醚在沙氏提取器中提取,直至提取液呈极淡的黄色为止。然后将乙醚提取液通过氧化铝柱层,呈現三层(通过吸附柱的乙醚液,經濃縮后,析出黄色絮状沉淀,熔点为 55°C)。上层褐色层为杂质,中层为紅色,下层为黄色。先用乙醚洗脱下层黄色层,濃縮至小体积时,先后析出两种結晶,一为金黄色棒状結晶,熔点 172°C; 一为黄色

* 本文內熔点,均未經校正。

針狀結晶, 熔点 156—158°C。再分割中层紅色层, 用 10% 氢氧化鈉液洗脫, 洗液以 5% 盐酸酸化, 获得一种黄色沉淀, 熔点 150°C。以上整个乙醚溶解部分, 經葯理試驗, 証明对血吸虫无作用, 所以未繼續研究。

上述氯仿浸膏, 經乙醚提取后的乙醚不溶部分, 再用丙酮, 繼續洗滌, 至洗液呈极淡之黄色为止, 然后用丙酮-碱液溶解后, 二次通过氧化铝柱层, 以丙酮冲洗黄色层, 濃縮洗液, 加稀盐酸酸化后, 又析出少量黄色粉末(萱草根成分 I)。

二、乙酰衍生物的制备

取萱草根成分 I、II 和 III 各 1 克, 分別加入吡啶 1.5 毫升、乙酸酐 7 毫升, 于室温下放

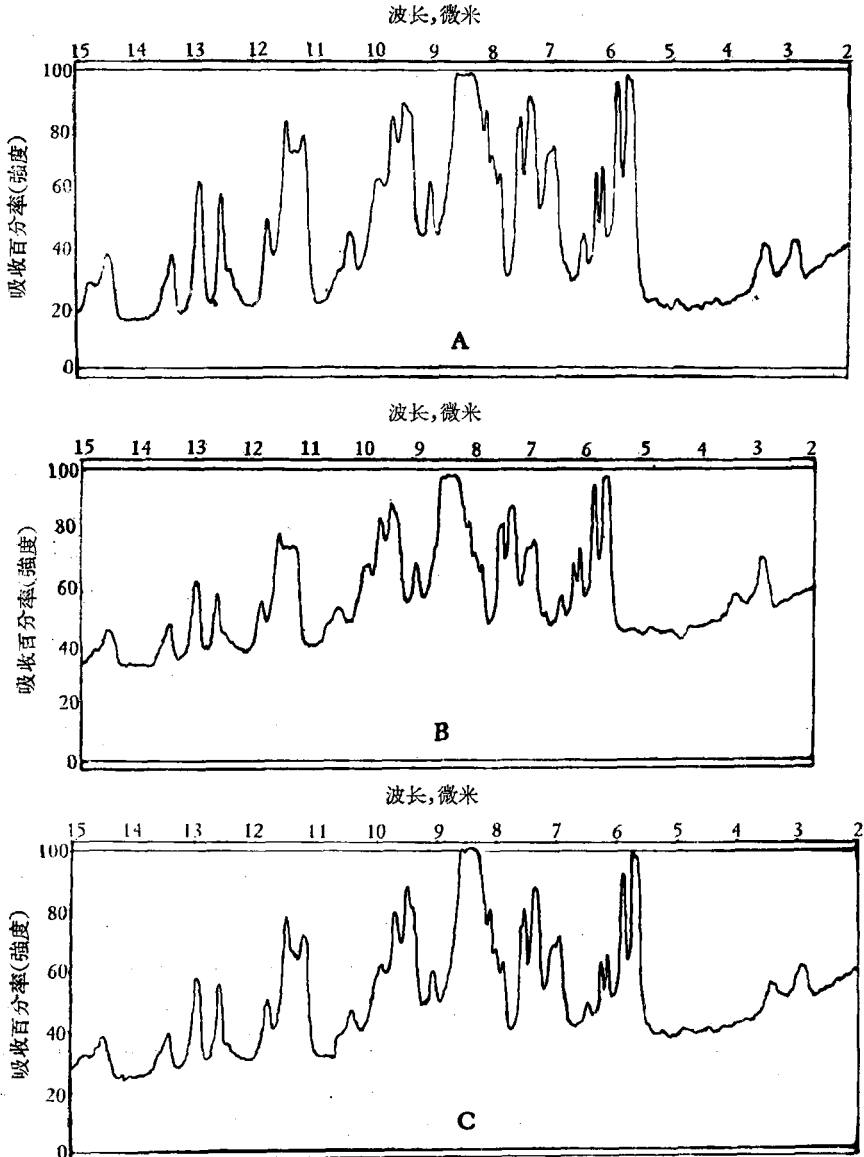


图 2 A. 萱草根成分 I 乙酰衍生物紅外線吸收光譜。 B. 萱草根成分 II 乙酰衍生物紅外線吸收光譜。 C. 萱草根成分 III 乙酰衍生物紅外線吸收光譜。

置过夜。再加入 15 毫升乙醚及 25 毫升水,振摇,放置片刻,在水层与醚层间均有白色结晶析出。过滤后,用少量丙酮洗涤,干燥后得 0.95 克,熔点为 238—240°C,经丙酮重结晶,均得白色板状结晶,熔点为 240—241°C。测定相互间的混合熔点,也不降低。它们在红外吸收光谱上均呈现乙酰基(I.R. V_{\max}^{KBr} 5.65 微米)及羰基(5.90 微米)(图 2A—C)。分子量测定(Rast 法): 357.8。

分析 $C_{16}H_{12}O_4(COCH_3)_2$

实验值, % C 68.43, 68.17; H 4.94, 5.26; $COCH_3$ 24.30, 24.66

计算值, % C 68.07; H 5.12; $COCH_3$ 24.29

测毒试验:小白鼠一次投服至 4 毫克/20 克不死,未能测出其 LD_{50} 。

三、纸上层析试验

1. 分别将萱草根成分 I, II 和 III 溶解于吡啶-丙酮(1:2)溶液中,再用毛细管分别吸取此 I, II, III 的溶液各 1 滴,分别滴于事先用甲酰胺-丙酮(1:2)混合液饱和,并经压干的 Whatman No. 1 滤纸上,以无水苯-氯仿(7:2)作展开剂,展开时间为 3 小时,展开时温度为 11—12°C。用下行法展开。经喷以三氯化铁显色剂,分别各得一个相似的绿色斑点,这个斑点随即逐渐变为紫色(图 3)。

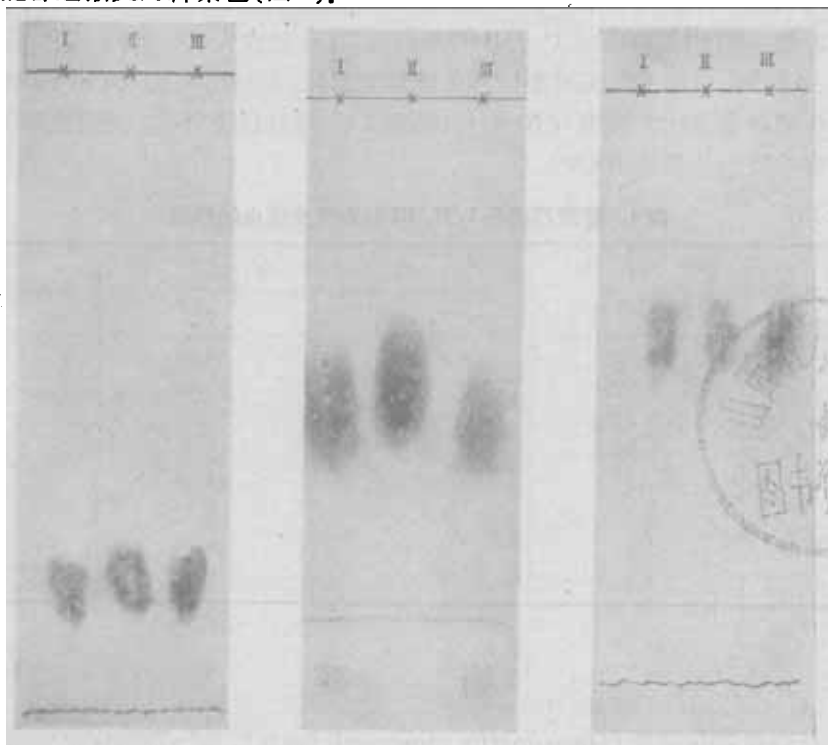


图 3

图 4

图 5

萱草根成分 I, II, III 的纸上层析(无水苯-氯仿作展开剂) 萱草根成分 I, II, III 的纸上层析(甲苯-正丁醇作展开剂) 萱草根成分 I, II, III 的纸上层析(二甲苯-甲乙酮作展开剂)

2. 按上法,用甲酰胺-丙酮(1:2)饱和滤纸,以甲苯-正-丁醇(4:3)作展开剂,展开时间为 2.5 小时,展开时温度为 15—16°C。经三氯化铁试剂显色后,分别呈现出一个相似的绿色斑点,这个斑点渐渐变为紫色(图 4)。

3. 按上法,用甲酰二甲胺-丙酮(1:2)饱和滤纸,以二甲苯-甲乙酮(1:5)作展开剂,在14—15℃时展开3小时。經三氯化鉄試剂显色后,分別显出一个相似的綠色斑点,漸漸的变为絳紫色(图5)。

四、疗效試驗

取萱草根成分 I, II 及乙酰衍生物治疗感染 40 ± 2 条血吸虫尾蚴达四周的小白鼠。I 的剂量为 0.038 毫克/20 克(1/15 LD₅₀), 其余二者則同为 9.5 毫克/20 克, 疗程 14 天。結果各治疗組的动物于投药 7 天后, 其体内两性虫体即有明显的萎縮和生殖器官的退化, 同时随着投服药物累积剂量的增加, 动物陸續出現肢体瘫痪和死亡。这些情况与服萱草根生药后的情况极相似。治疗組剩余的动物, 于停药后 3 周解剖, 結果每鼠平均虫数与对照組的相仿, 亦未发现死虫。鉴于萱草根成分 II 的毒性极低, 但用碱溶解, 加酸沉淀后, 却可得毒性极大的萱草根成分 III; 从化学性状来看, 它們又是相同的; 因此, 为了了解萱草根有效成分的毒性与疗效的关系, 又用萱草根成分 I, III 和 II 作疗效試驗。前二者的剂量分別为 0.038 及 0.022 毫克/20 克(1/15 LD₅₀), 后者的則分別用 0.022, 0.55, 1.1, 2.2, 3.3 及 4.4 毫克/20 克等 6 种剂量, 疗程均为 14 天, 停药后次日各組解剖 4—5 鼠, 檢出虫体, 用 5% 的福馬林固定, 并用卡紅染色, 測定生殖器官退化指数和虫体的大小, 以資比較。結果說明 I 和 III 的結果相仿。II 的剂量与 III 相同或大 25 倍时, 虫体无明显变化; 当剂量大 50 倍时, 虫体开始呈現萎縮和生殖器官退化, 至所用剂量大 150—200 倍时, 虫体萎縮和生殖器官退化的情况与 III 的相仿(表 1)。綜合以上所述, 說明萱草根有效成分的毒性与疗效間的关系是平行的。

表 1 萱草根成分 I, II, III 对血吸虫成虫的作用

萱草根成分	剂 量 毫克/20 克	虫体大小, 毫米		生殖器官退化指数
		♀	♂	
I	0.038	7.42	8.06	2.4
III	0.022	7.37	7.67	2.7
II	0.022	11.24	9.80	0
II	0.55	11.56	9.41	0
II	1.1	10.98	10.00	0.2
II	2.2	9.48	8.52	0.5
II	3.3	7.05	8.00	1.9
II	4.4	7.17	7.83	2.7

摘 要

百合科萱草属萱草根 (*Hemerocallis thunbergii* Baker), 系一种治疗血吸虫病的中药。經过氯仿提取, 通过氧化铝层分离, 能获得一种黄色粉末(萱草根成分 I), 在 243℃ 时变棕色, 266—269℃ 时熔融(分解)。經用小白鼠測毒試驗, LD₅₀ 为 0.95 毫克/20 克, 同时出現疗效。用甲酰二甲胺重結晶, 得橘紅色結晶(萱草根成分 II), 在 240℃ 时变棕色, 268—269℃ 时熔融(分解), 毒性与疗效却大大降低, 但当剂量增大时, 毒性与疗效又同时出現。繼以碱液溶解結晶, 加酸酸化, 又得黄色粉末(萱草根成分 III), 在 240℃ 时变棕

色, 268—269°C 时熔融(分解), LD_{50} 为 0.34 毫克/20 克。萱草根成分 I, II, III 虽然毒性大小有差别, 但是, 在化学上均为弱酸性物质, 它们的溶解情况、显色反应和熔点等都相同; 而且, 相互间的混合熔点也不降低; 在红外线吸收光谱上, 所呈现的吸收峰也相一致; 纸上层析试验, 在三种不同的溶解系统中, 均得相似的一个斑点; 它们在相同条件下进行乙酰化, 分别获得熔点为 240—241°C 的白色板状结晶, 相互间的混合熔点也不降低, 红外线吸收光谱也相一致。

根据上述结果, 从化学上来看, 萱草根成分 I, II, III 可能是同一种物质, 这种物质系治疗血吸虫病的有效成分。经药理试验证明, 成分 I, II, III 的药理作用尚有程度上的不同, 这种现象可能与化学结构有关, 尚待更多实验阐明。这个化合物暂定名为萱草根素 (hemerocallin), 分子式为 $C_{16}H_{14}O_4$ 。

致谢 本实验蒙中国科学院有机化学研究所进行元素分析; 本院药物研究所进行红外线吸收光谱的测定; 本所姚守平先生进行分子量测定, 马荣生同志参加部分实验工作, 特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 萧树华等, 萱草根的研究 II. 萱草根实验治疗小白鼠血吸虫病的研究. 药学报, 1962, 9, 218.
- [2] 卫生部医学科学研究委员会血吸虫病研究委员会, 萱草根——“藜芦”治疗血吸虫病的研究. 血吸虫病防治研究文集, 1960 年, 第 284 页, 上海科学技术出版社.
- [3] 上海第一医学院药系药化教研组, 中药藜芦成分的研究. 中国药学会上海分会论文摘要 1, 1959 年 7 月, 第 5 页.
- [4] 颜闾等, 藜芦的化学研究——第 1 报, 中国药学会上海分会论文摘要 1, 1959 年 7 月, 第 6 页.

STUDIES ON *HEMEROCALLIS THUNBERGII* BAKER

III. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTIVE PRINCIPLE AGAINST SCHISTOSOMIASIS JAPONICA

CHEN CHANG, ZHENG XIAN-YU, QUIAN YI-FEN, XIAO SHU-HUA,

SHAO BAO-RUO AND HUANG LAN-SUN

(*Institute of Parasitic Diseases of the Chinese Academy of Medical Sciences*)

ABSTRACT

The active principle of *Hemerocallis thunbergii* Baker was isolated by extraction from the pulverized drug with chloroform in Soxhlet apparatus. By chromatography on aluminium oxide, a yellow powder (sample I) was obtained, which became brownish and sintered above 243°C, and finally melted at 266—269°C under decomposition. Its LD₅₀ to mice was 0.95 mg/20 g body weight. Recrystallization from dimethyl formamide yielded orange red crystals (sample II), which also became brownish, sintered above 240°C and melted at 268—269°C under decomposition. Its effect and toxicity were greatly dropped; the LD₅₀ could not be determined below 60 mg/20 g. But the effect and the toxicity reappeared when the dose was greatly increased. Dissolve the orange red crystals in sodium hydroxide solution and then acidify by diluted hydrochloric acid, a yellow powder (sample III) was again obtained, which also became brownish, sintered above 240°C, and melted at 268—269°C under decomposition. Its LD₅₀ was 0.34 mg/20 g. The results of experimental therapy of schistosomiasis japonica in mice indicated that the effect of the drug was parallel to its toxicity.

The samples I, II and III showed no depression on the determination of the mixed melting point. Their infrared spectrum and that of their acetyl derivatives were all identical. Paper chromatographic tests with three different solvent systems showed in each case only one reddish-violet spot on spraying with ferric chloride reagent. These results indicated that the samples I, II and III may be the one and same compound whose empirical formula is C₁₆H₁₄O₄. The name "hemerocallin" was suggested for the active principle obtained.