

## 东北鹤虱果实中抗菌活性成分的研究

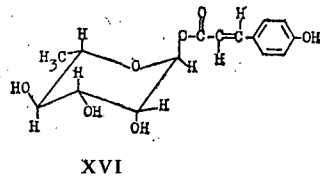
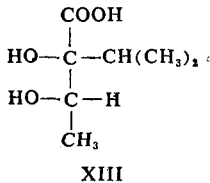
王秀纯 裴月湖 李 铨 朱廷儒

(沈阳药学院, 沈阳)

**提要** 自紫草科植物东北鹤虱 *Lappula echinata* Gilib. 果实中分离出十六种化合物。其中晶 XIII(-)-绿花倒提壶酸((-)-viridifloric acid)为一新的天然产物, 晶 XVI为一新酯甙, 对香豆酰- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖甙[1-(p-coumaroyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranose]。并鉴定其它八种化合物为棕榈酸 I、尿囊素 III、腺嘌呤 VI、腺苷 VII、L-亮氨酸 X、L-缬氨酸 XI、L-酪氨酸 XII 和琥珀酸 XV。I、VI、XIII、XV 和 XVI 显示了不同程度的抗菌活性。

**关键词** 东北鹤虱; 抑菌活性; (-)-绿花倒提壶酸; 对香豆酰- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖甙

东北鹤虱 *Lappula echinata* Gilib. 为紫草科鹤虱属植物, 俗称赖毛子、粘珠子, 广泛分布于我国华东、东北等地。其果实在东北地区代中药鹤虱(菊科天名精果实)入药, 用于驱肠道寄生虫<sup>(1)</sup>。近年来临床用该果实制剂防治痔疮术后感染效果良好, 体外抑菌试验表明该药对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和大肠杆菌等有较强的抑制作用。东北鹤虱果实的化学成分除油脂分析外, 其余未见报道。我们以体外抑菌活性为指标, 对东北鹤虱果实的成分进行了分析, 共分得十六个化合物。通过理化常数比较、光谱数据分析, 鉴定其中八个化合物分别为棕榈酸 I、尿囊素 III、腺嘌呤 VI、腺苷 VII、L-亮氨酸 X、L-缬氨酸 XI、L-酪氨酸 XII 和琥珀酸 XV。晶 XIII 为首次在自然界发现的(-)-绿花倒提壶酸((-)-viridifloric acid)。晶 XVI 为一新的酯甙, 对香豆酰- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖甙(1-(p-coumaroyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranose)。



晶 XIII 为无色针晶熔点  $140\sim 142^\circ\text{C}$ , 与三氯化铁-铁氰化钾试剂反应阴性, 加热后则呈蓝色斑点。溴甲酚绿反应及过碘酸反应阳性。红外光谱中有一  $\text{COOH}$  吸收 ( $3300\sim 2500$ ,  $1700\text{ cm}^{-1}$ )。 $^1\text{H}$  核磁共振谱表明尚有一  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  ( $\delta 1.99$ , m, 1 H,  $J=7\text{ Hz}$ ;  $\delta 0.84$ , d, 6 H,  $J=7\text{ Hz}$ ) 和  $\text{CH}-\text{CH}_3$  ( $\delta 3.8$ , q, 1 H,  $J=6\text{ Hz}$ ;  $\delta 1.09$ , d, 3 H,  $J=6\text{ Hz}$ ) 基团。 $^{13}\text{C}$  核磁共振谱共有六个峰:  $\delta 14.8$ ,  $16.3$ ,  $31.3$ ,  $68.9$ ,  $81.8$ ,  $173.9$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )。其中  $\delta 68.9$  表明  $\text{CH}_3-\text{CH}-$  中亚甲基碳与氧原子相连接:  $\text{CH}_3-\text{CH}-$ 。  $\delta 81.8$  吸收峰表明羧基的

$\alpha$  碳上应连有羟基:  $\begin{array}{c} | \\ -\text{C}-\text{COOH} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$ 。质谱  $m/z 162(\text{M}^+$ , 改变电离电压后测出),  $118$  (60%。

$M^+ - CO_2$ ), 103(100%,  $M^+ - CO_2 - CH_3$ )。由此可得分子结构  $CH_3 - CHOH - COH - COOH$ 。

$$\begin{array}{c} | \\ CH(CH_3)_2 \end{array}$$

XIII 的理化性质与上述结构的 2S, 3S-异构体一致<sup>(2,3)</sup>, 故鉴定为 2S, 3S-2, 3-二羟基-2-异丙基丁酸即(-)-绿花倒提壶酸((-)-viridifloric acid)。迄今为止在自然界发现的该酸均为与吡咯里西啶类生物碱结合成酯的形式存在<sup>(4,5)</sup>, 自植物中分到游离酸尚属首次。虽在提取过程中使用了酸, 但对该果实的丙酮提取液的薄层层析和纸层析鉴定结果均直接检出了游离的(-)-绿花倒提壶酸。文献亦有报道该类酯对酸稳定<sup>(5)</sup>。

晶 XVI 为无色棱柱状结晶双熔点 81~83°C 和 188~190°C。Molish 反应及三氯化铁反应阳性。场解析质谱得分子量为 310。红外光谱 1685, 1635, 1602, 1575, 1510, 980, 825  $cm^{-1}$  吸收峰及  $^1H$  核磁共振谱  $\delta$  6.35(d, 1H, J=16 Hz), 7.67(d, 1H, J=16 Hz) 和 7~7.8(AA'/BB' 系统) 吸收峰表明有对-香豆酰基。质谱中 147(100%) 峰及  $^1H$  核磁共振谱 1.20(d, 3H) 峰为鼠李糖基信号。将 XVI 分别用酸和碱水解, 在两种水解液中检查出了对-香豆酸和鼠李糖, 因此 XVI 为对香豆酸和鼠李糖结合成的酯甙。分子量 310, 所以甙元与糖应为 1:1 结合。晶 XVI 的红外光谱中在 1010~1100  $cm^{-1}$  区间有三个吸收峰以及  $^1H$  核磁共振谱中  $\delta$  5.56(d, 1H, J=2 Hz) 的特征信号, 表明 XVI 是一个吡喃型酯甙<sup>(6)</sup>。克分子比旋度与  $\alpha$ -L-鼠李糖甲甙相近, 故为  $\alpha$  甙键。所以 XVI 为对香豆酰- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖甙。

上述十个化合物对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌的体外抑菌试验结果表明, 棕榈酸、腺嘌呤、琥珀酸、(-)-绿花倒提壶酸和对香豆酰- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖甙均具有不同程度的抗菌活性。

## 实 验 部 分

熔点用 Kofler 熔点测定器测定(未校正)。红外光谱用 PE 599B 型和 IR-27G 型红外分光光度计测得(KBr 压片)。核磁共振谱用 FX-60Q 型和 PE-R 32 型核磁共振光谱仪(TMS 内标)。旋光值用 PE 241 型旋光仪测得。质谱用 JMSD 300-JMA 2000 色谱质谱仪。柱层析用硅胶系上海五四农场产品, 柱层析用聚酰胺为中国人民解放军八三三〇五部队 701 厂产品。

### (一) 有效部分的分离

东北鹤虱果实粗粉石油醚脱脂, 水煎。水煎液浓缩后依次用乙醇沉淀(A)、酸沉淀(B)(pH 2), 酸水液调至中性后分别用乙酸乙酯(C)、正丁醇(D)萃取。残水液再调至 pH 2, 继用乙醚(E)、乙酸乙酯(F)和正丁醇(G)萃取。抑菌试验表明 B, D, E, F 为抗菌活性部分。

酸沉淀物(B) 45g 用硅胶柱分离, 依次以不同比例石油醚—二氯甲烷, 二氯甲烷—乙酸乙酯洗脱。分别在 5% 乙酸乙酯—二氯甲烷和乙酸乙酯洗脱液中得到晶 I(20 mg) 和晶 II(200 mg)。

正丁醇萃取物(D) 浓缩后析出淡黄色沉淀物(Da 12 g), 母液继续浓缩, 放置得粘稠状物(Db 7 g) 及母液浓缩物(Dc 10 g)。Da 以聚酰胺柱分离, 用不同比例的乙酸乙酯—95% 乙醇洗脱, 分别在比例为 8:2 和 7:3 洗脱部分中得晶 III(60 mg) 和晶 IV(20 mg)。Db 部分以硅胶柱分离, 用不同比例的氯仿—乙酸乙酯—甲醇洗脱, 分别在比例为 20:1:1, 10:1:1, 20:2:3 和 20:3:4 洗脱部分中得到晶 V(20 mg), 晶 VI(40 mg), 晶 VII(20 mg) 和晶 VIII(20 mg)。Dc 部分以硅胶柱层析, 用不同比例的氯仿—甲醇洗脱。分别在比例为 10:1 洗脱液中

得到晶 IX(20 mg), 2:8 洗脱液中得到晶 X(30 mg), 晶 XI(20 mg)和晶 XII(40 mg)。

乙醚提取物(E)拌以适量硅胶, 在沙氏提取器中依次用乙醚、乙酸乙酯、乙醇和甲醇提取。将活性最强的乙醚提取部分用聚酰胺柱分离, 以不同比例的二氯甲烷—乙酸乙酯、乙酸乙酯—甲醇洗脱, 分别在 60%乙酸乙酯—二氯甲烷和 1%甲醇—乙酸乙酯洗脱液中得到晶 XIII(300 mg)和晶 XIV(15 mg)。

乙酸乙酯萃取物(F)用硅胶柱层析, 以不同比例二氯甲烷—乙酸乙酯洗脱, 分别在比例为 3:7 和 7:3 洗脱部分中得到晶 XV(1 g)和晶 XVI(50 mg)。

## (二) 化合物的鉴定

棕榈酸(I)熔点 61~61.5°C; 尿囊素(III), 无色棱柱状结晶熔点 238~40°C, 琥珀酸(XV)无色针状结晶熔点 186~188°C, 红外光谱均与标准品一致, 混合熔点不变。棕榈酸用三氟化硼甲醇液甲酯化, 经气相色谱分析, 保留时间与标准品一致。

腺嘌呤(VI)白色粉末状结晶 220°C 升华。腺苷(VII)无色针状结晶熔点 234~236°C,  $[\alpha]_D - 61.4^\circ$  (c, 0.2115, 水)。二者红外光谱和  $^1\text{H}$  核磁共振谱均匀标准品一致。

L-亮氨酸(X)、L-缬氨酸(XI)、L-酪氨酸(XII)熔点及比旋光度均与文献值一致, 红外光谱与 Sadtler 标准图谱相符。

(一)-绿花倒提壶酸(XIII)无色针晶熔点 140~142°C(石油醚—乙醚),  $[\alpha]_D - 0.4^\circ$  (C, 0.500, 乙醇)。马钱子碱盐熔点 207~210°C(乙醇)。红外光谱  $\nu_{\text{cm}^{-1}}$  3448, 3300, 3300~2500, 1705, 1250, 1160, 1085, 1000, 900, 742。核磁共振(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.84(d, 6 H, J=7 Hz), 1.09(d, 3 H, J=6 Hz), 1.99(m, 1 H, J=7 Hz), 3.80(q, 1 H, J=6 Hz), 4.9~7.9(br, 3 H)。低分辨质谱 m/z(%) 162(M<sup>+</sup>, 改变电离电压后测得), 118(70), 103(100), 85(40), 43(60), 与标准图谱相符。

对香豆酰- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖甙(XVI)无色棱柱状结晶, 双熔点 81~83°C, 188~190°C(氯仿—甲醇—丙酮)。  $[\alpha]_D - 117.5^\circ$  (C, 0.1354, 乙醇)。质谱(FD) m/e(%) 310(M<sup>+</sup>, 28.6), 164(28.6), 163(64.4), 147(100)。红外光谱  $\nu_{\text{cm}^{-1}}$  3400, 1685, 1635, 1602, 1575, 1510, 1240, 1070, 1025, 980, 920, 825。 $^1\text{H}$ 核磁共振谱(60 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>)  $\delta$  1.20(d, 3 H, J=7 Hz), 3.61~4.05(m, 糖上质子), 5.56(d, 1 H, J=2 Hz), 6.35(d, 1 H, J=16 Hz), 7.67(d, 1 H, J=16 Hz), 7~7.8(AA'BB'系统)。

晶(XVI)的酸和碱水解 XVI 分别用 5% NaOH 和 6% HCl 水解 20 分钟后, 酸水解液及碱水解液酸化后分别用乙醚提取。醚提液的薄层层析(氯仿—甲醇—乙酸 45:8:4; 乙酸乙酯—乙酸 95:5)和纸层析(水饱和的苯酚; 正丁醇—乙酸—水 4:1:5 上层)碱性高锰酸钾(红色背景白色斑点)及三氯化铁(黄色斑点)呈色, 均只显单一斑点, 其 R<sub>f</sub> 值与反式对-香豆酸标准品一致。醚提取后的酸水解液按常法处理后经纸层析(正丁醇—乙酸—水 4:1:5 上层; 水饱和的苯酚; 丙酮—水 9:1), 邻苯二甲酸—苯胺试剂显色, 鉴定与鼠李糖标准品 R<sub>f</sub> 值一致(0.35, 0.23, 0.16)。

致谢 本院郭允珍副教授鉴定生药材料。南京药学院赵守训教授惠赠尿囊素标准品, 辽宁省药物研究所植化室惠赠腺苷标准品。辽宁省理化测试中心和本院仪器分析室、药分研究室代测光谱。本室徐素华老师代做抑菌实验

## 参 考 文 献

1. 江苏新医学院. 中药大辞典. 第一版. 上海人民出版社, 1977:2629.
2. Crowley H C, et al. The alkaloids of *Heliotropium supinum* L., with observations on viridifloric acid. *Aust J Chem* 1959; 12:694.
3. Dry Leonard J, et al. The senecio alkaloids. part IX. the synthesis and resolution of 3, 4-dihydroxy-2-methylpentane-3-carboxylic acids: viridifloric and trachelantic acid. *J Chem Soc* 1952; (5):3445.
4. 林启寿. 中草药成分化学. 第一版. 北京: 科学出版社, 1977:691~692.
5. D'silva JB and Notari RE. Kinetics and mechanisms of aqueous degradation of the anticancer agent, indicine N-oxide. *Int J Pharm* 1981; 8: 45
6. 林启寿. 中草药成分化学. 第一版. 北京: 科学出版社, 1977:126.

## STUDIES ON THE ANTIBACTERIAL CONSTITUENTS IN THE FRUIT OF *LAPPULA ECHINATA* GILIB

WANG Xiu-Chun, PEI Yue-Hu, LI Xian and ZHU Ting-Ru (T. R. ZHU)

(Shenyang College of Pharmacy, Shenyang)

**ABSTRACT** Sixteen constituents (I~XVI) were isolated from the fruit of *Lappula echinata* Gilib. Eight of them were identified as palmitic acid(I), allantoin (III), adenine(VI), adenosine(VII), L-leucine(X), L-valine(XI), L-tyrosine(XII), and succinic acid(XV). (-)-Viridifloric acid (XIII) was found from natural resource for the first time. All of them were first reported to occur in the *Lappula* genus. A new compound, 1-(p-coumaroyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranose(XVI), was elucidated on the basis of spectral data and chemical evidence. Antibacterial experiment showed that compounds I, VI, XIII, XV and XVI were all active. Structure determination of the other compounds is still underway.

**Key words** *Lappula echinata* Gilib; Borraginaceae; Antibacterial constituents; (-)-Viridifloric acid; 1-(p-Coumaroyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranose