

赵伟,邱迎彤,李岑,等. 臭常山喹啉生物碱化学成分及活性研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 283–285.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.093

臭常山喹啉生物碱化学成分及活性研究

赵伟¹, 邱迎彤³, 李岑², 吕庆银¹, 张于³, 张振²

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州理工学院制药工程学院, 贵州贵阳 550025;
3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650000)

摘要:从芸香科臭常山属臭常山(*Orixa japonica* Thunb.)乙醇提取物中分离得到了5种喹啉生物碱,通过理化性质和波谱分析鉴定为:米利纽碱(melineurine)、普拉迪斯碱(platydesmine)、巴福酮(balfourolone)、罂度瑞叭啉碱(pseudoribalinine)和青花椒碱(schinifoline),该5个化合物均首次从该属植物中分离得到。对这些化合物进行了鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、萎蔫短小杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌活性筛选试验,发现化合物巴福酮(balfourolone)对肺炎克雷伯氏杆菌和金黄色葡萄球菌具有较好的抑制活性,且在50 mmol/mL浓度下抑制率分别达到50.1%、56.9%。

关键词:臭常山;喹啉生物碱;分离鉴定;抑菌活性

中图分类号: R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0283-03

臭常山(*Orixa japonica* Thunb.)为芸香科臭常山属植物,在《贵州民间方药集》《贵阳民间药草》《贵州草药》中称为臭山羊、大山羊^[1]、骚牯羊^[2]、梔子黄^[3]等。在贵州民间用其根、茎、叶入药,主治风热感冒、咳嗽喉痛、脘腹胀痛、风湿关节痛、跌打伤痛、湿热痢疾、疟疾等病症^[4];各部位煎出的汁用以杀灭牛马身上的虱子。国内外有关臭常山的文献报道集中在对其进行化学研究,而对生物活性的研究较少^[5],近代药理研究也不多见,其有效部位、有效成分、作用机理仍不明确。本试验对购自贵州贵阳的臭常山的乙醇提取物进行化学研究,分离得到5个化合物,并进行7种抑菌活性筛选,以期得到具有抗菌活性的先导化合物,为民族药新药开发提供物质基础。

1 仪器与材料

1.1 材料

臭常山于2012年4月购自贵州贵阳市中药材批发市场,

由贵阳医学院孙庆文副教授鉴定为芸香科植物臭常山。

1.2 试验菌株

贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室保存菌株:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、萎蔫短小杆菌(*wilting short bacillus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

1.3 仪器

Bruker AM-400、DRX-500和Avance III-600核磁共振仪,以TMS作为内标;ESI质谱由Waters 2695 HPLC-Thermo Finnigan LCQ Advantage离子阱质谱仪测定;高效液相 Agilent 1100和1200,色谱柱 Eclipse XDB-C₁₈;Sephadex LH-20(Pharmacia公司);反相填充材料 Lichroprep RP-18 gel(20~45 μm)(德国默克公司);柱色谱和薄层色谱硅胶 GF254型(山东青岛海洋化工厂)。显色剂为碘化铋钾溶液。

1.3 试验方法

1.3.1 提取与分离 取干燥的臭常山样品5 kg,粉碎后用10倍量95%的乙醇溶液超声提取3次(提取时间每次均为30 min)后过滤,合并滤液,减压回收乙醇得到浸膏,将浸膏加水稀释后,依次用乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次,减压回收溶剂,得乙酸乙酯萃取物160 g,采用硅胶柱层析、反相 RP-18柱层析、Sephadex LH-20以及HPLC等各种方法分离纯化。

收稿日期:2015-03-28

基金项目:贵州省科学技术项目(编号:黔科合J字[2011]3004);中国科学院2013学西部之光项目。

作者简介:赵伟(1990—),男,江苏靖江人,硕士,研究方向为天然产物。E-mail:zhaoweil51525@sina.com。

通信作者:张振,教授,研究方向为天然产物,E-mail:zhangzhen@git.edu.cn;张于,研究员,研究方向为植物生物碱的化学研究,E-mail:zhangyu@mail.kib.ac.cn。

[10] Philipp E. Assay for tyrosine hydroxylase in hypothalamic homogenates using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Journal of Chromatography, 1987, 419(419): 27–36.

[11] Haavik J, Flatmark T. Rapid and sensitive assay of tyrosine 3-monooxygenase activity by high-performance liquid chromatography using the native fluorescence of DOPA[J]. Journal of Chromatogra-

phy, 1980, 198(4): 511–515.

[12] Okuno S, Fujisawa H. Assay of tyrosine 3-monooxygenase using the coupled nonenzymatic decarboxylation of dopa[J]. Analytical Biochemistry, 1983, 129(2): 405–411.

[13] Winder A J, Harris H. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase[J]. European Journal of Biochemistry/FEBS, 1991, 198(2): 317–326.

1.3.2 活性试验

1.3.2.1 菌液配制 分别将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌接种于琼脂斜面培养基上, 37 ℃ 培养 24 h, 从斜面培养基中挑取菌种接种于 LB 液体培养基中, 37 ℃ 培养 18 h, 再用灭菌生理盐水将菌液稀释成 1×10^5 CFU/mL 菌悬液。

1.3.2.2 含药培养基配制 将分离得到的单体化合物加入适量(保证 DMSO 最终浓度 $\leq 1\%$) 的 0.1 mol/L DMSO 溶解后稀释于 LB 培养基中。

1.3.2.3 接种 将鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、萎蔫短小杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌的 1×10^5 CFU/mL 的菌悬液分别接入 96 孔板, 每孔中分别加入 100 μ L 提取液和 100 μ L 稀释菌液。以 200 μ L 的菌

液作为空白对照。

1.3.2.4 抑制率的测定 将 96 孔板置微型振荡器上振荡 1 min, 使各孔内溶液充分混匀, 37 ℃ 培养 20 h, 用酶标仪测吸光度 D , 计算抑制率: 抑制率 = $(D_{\text{对照}} - D_{\text{样品}}) / D_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 臭常山喹啉生物碱的化学成分分析

利用各种分离纯化手段和核磁共振、质谱等波谱分析方法共分离鉴定了 5 个喹啉生物碱, 分别为 melineurine(化合物 1)、platydesmine(化合物 2)、balfourolone(化合物 3)、pseudoribalinine(化合物 4) 和 schinifoline(化合物 5), 中文名分别为米利纽碱、普拉迪斯碱、巴福酮、嘧度瑞叭咪碱和青花椒碱。

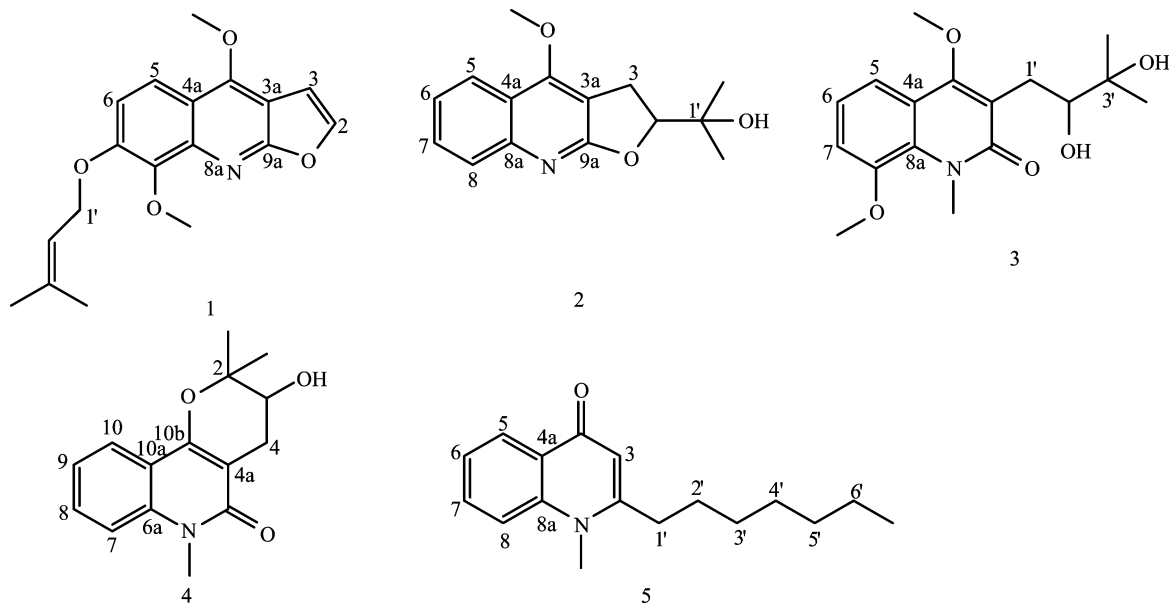


图1 化合物1~5的结构式

化合物 1: 黄色针状结晶, 分子式为 $C_{18}H_{19}NO_4$; ESI-MS (positive) m/z 313 $[M + Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.76 (6H, s, 3'-2CH₃), 3.98 (3H, s, 8-OCH₃), 4.48 (3H, s, 4-OCH₃), 4.75 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 5.53 (1H, m, H-2'), 7.31 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-6), 7.34 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-3), 7.80 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 7.95 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-5); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 18.7 (C-5'), 26.1 (C-4'), 59.3 (4-OMe), 61.9 (8-OMe), 67.2 (C-1'), 102.3 (C-3a), 105.0 (C-3), 114.7 (C-6), 115.3 (C-4a), 118.2 (C-5), 120.5 (C-2'), 138.2 (C-3'), 141.9 (C-8a), 143.2 (C-8), 143.3 (C-2), 151.8 (C-7), 157.5 (C-4), 164.6 (C-9a)。以上波谱数据与文献[6]的波谱数据对照基本一致, 确定为 melineurine(米利纽碱)。

化合物 2: 黄色针状结晶, 分子式为 $C_{15}H_{17}NO_3$; ESI-MS (positive) m/z 259 $[M + Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.34 (3H, s, 3'-CH₃), 1.41 (3H, s, 3'-CH₃), 3.53 (1H, dd, $J = 8.9, 4.6$ Hz, H-1'), 3.57 (1H, dd, $J = 7.9, 4.6$ Hz, H-1'), 4.16 (3H, s, 4-OCH₃), 4.57 (1H, dd, $J = 8.9, 7.9$ Hz, H-2'), 7.28 (1H, m, H-6), 7.48 (1H, m, H-7), 7.64 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, 0.7 Hz, H-8), 7.93 (1H, dd, $J = 8.3, 0.9$

Hz, H-5); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 25.6 (1'-CH₃), 26.0 (1'-CH₃), 30.4 (C-3), 58.8 (4-OMe), 71.5 (C-1'), 87.1 (C-2), 103.6 (C-4a), 120.9 (C-3a), 122.8 (C-5), 123.7 (C-6), 127.6 (C-8), 130.0 (C-7), 148.8 (C-8a), 158.9 (C-4), 170.3 (C-9a)。以上波谱数据与文献[7]的波谱数据对照基本一致, 确定为 platydesmine(普拉迪斯碱)。

化合物 3: 黄色针状结晶, 分子式为 $C_{17}H_{23}NO_5$; ESI-MS (positive) m/z 321 $[M + Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.31 (3H, s, 3'-CH₃), 1.31 (3H, s, 3'-CH₃), 2.72 (1H, dd, $J = 13.7, 10.3$ Hz, H-1'), 3.10 (1H, dd, $J = 13.7, 2.1$ Hz, H-1'), 3.59 (1H, dd, $J = 10.3, 2.1$ Hz, H-1'), 3.92 (3H, s, 1-NCH₃), 3.93 (3H, s, 8-OCH₃), 3.98 (3H, s, 4-OCH₃), 7.09 (1H, dd, $J = 7.9, 1.1$ Hz, H-5), 7.23 (1H, dd, $J = 7.9$ Hz, H-6), 7.46 (1H, dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 24.8 (3'-CH₃), 26.3 (3'-CH₃), 29.2 (C-1'), 35.8 (1-NCH₃), 57.1 (8-OMe), 62.6 (4-OMe), 72.9 (C-3'), 79.2 (C-2'), 114.8 (C-7), 116.6 (C-5), 120.8 (C-4a), 122.5 (C-3), 123.8 (C-6), 149.8 (C-8a), 162.1 (C-4), 167.2 (C-2)。以上波谱数据与文献[8]的波谱数据对照基本一致, 确定为 balfourolone(巴福酮)。

化合物 4: 黄色针状结晶, 分子式 $C_{15}H_{17}NO_3$; ESI-MS (positive) m/z 259 $[M + Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.38 (3H, s, 2-CH₃), 1.45 (3H, s, 2-CH₃), 2.70 (1H, dd, $J=12.0, 3.2$ Hz, H-4), 2.90 (1H, dd, $J=12.0$ Hz, 3.2, H-4), 3.66 (3H, s, 6-NCH₃), 3.89 (1H, t, $J=6.8, 3.2$ Hz, H-3), 7.21 (1H, dd, $J=10.8, 4.8$ Hz, H-8), 7.28 (1H, t, $J=13.6, 7.6$ Hz, H-7), 7.51 (1H, t, $J=10.4, 5.2$ Hz, H-6), 7.97 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-5); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 21.9 (2-CH₃), 24.8 (2-CH₃), 27.2 (C-4), 29.2 (6-NCH₃), 68.8 (C-3), 79.2 (C-2), 103.6 (C-10a), 113.8 (C-7), 116.3 (C-4a), 121.5 (C-10), 125.0 (C-9), 130.2 (C-8), 138.6 (C-6a), 154.0 (C-10b), 163.2 (C-5)。以上波谱数据与文献[9]的波谱数据对照基本一致, 确定为 pseudoribalinine(嘧度瑞叭咪碱)。

化合物 5: 白色针状结晶, 分子式 $C_{17}H_{23}NO$; ESI-MS (positive) m/z 257 $[M + Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 0.89 (3H, t, $J=6.0$ Hz, 7'-CH₃), 1.2-1.5 (8H, m, 3'-H-6'-H), 1.70 (2H, m, H-2'), 2.75 (2H, t, $J=8$ Hz, H-1'),

3.79 (3H, s, N-CH₃), 6.37 (1H, s, H-3), 7.41 (1H, t, $J=8$ Hz, H-6), 8.45 (1H, dd, $J=8$ Hz, H-8); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 14.0 (6'-CH₃), 22.6 (C-6'), 28.6 (C-2'), 28.9 (C-4'), 29.2 (C-3'), 31.6 (C-5'), 34.1 (1-NCH₃), 34.8 (C-1'), 111.2 (C-3), 115.3 (C-8), 123.3 (C-6), 126.2 (C-4a), 126.7 (C-5), 132.0 (C-7), 141.9 (C-8a), 154.7 (C-2), 177.9 (C-4)。以上波谱数据与文献[10]的波谱数据对照基本一致, 确定为 schinifoline(青花椒碱)。

2.2 臭常山喹啉生物碱的抑菌活性分析

通过酶标仪测定并计算, 得到化合物 1 至化合物 5 对鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、萎蔫短小杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌的抑制率。结果(图 2)显示, 化合物 1 至化合物 5 对鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、萎蔫短小杆菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌均没有良好的抑制活性, 对肺炎克雷伯氏杆菌和金黄色葡萄球菌有较好的抑制活性, 其中, 对肺炎克雷伯氏杆菌的抑制率分别为 29.2%、27.3%、50.1%、10.1% 和 18.2%, 对金黄色葡萄球菌的抑制率分别为 15.3%、19.9%、56.9%、25.5% 和 15.3%。

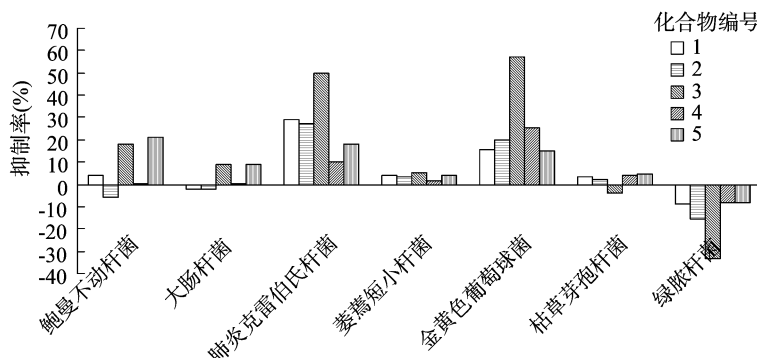


图2 化合物 1 至化合物 5 对试验菌株的抑制率

3 小结

肺炎克雷伯菌, 俗称肺炎杆菌, 为革兰氏阴性杆菌, 常存在于人体上呼吸道和肠道, 当机体抵抗力降低时, 便经呼吸道进入肺内而引起大叶或小叶融合性实变, 是肠杆菌科克雷伯菌属中对人致病性较强的重要致病菌和医源性感染菌。在医院感染的败血症中, 克雷伯杆菌等重要病原菌, 病死率较高。

在临床上克雷伯杆菌感染采用抗生素治疗, 细菌耐药现象严重, 不同菌株之间对药物的敏感性差异甚大, 多数对氨苄(羧苄) 西林耐药, 通常用头孢菌素类合并氨基糖苷类治疗。臭常山中分离得到的喹啉生物碱对肺炎克雷伯氏杆菌有一定的抑制作用, 为进一步研究该类生物碱的构效关系, 开发抗细菌性肺炎及抗呼吸道疾病的药物提供了相应的物质基础。

参考文献:

- [1] 杨济秋, 杨济中. 贵州民间方药集[M]. 贵阳: 贵州科学技术出版社, 1958: 416.
- [2] 贵阳市卫生局. 贵州民间草药[M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1959: 325.
- [3] 贵州省中医研究所. 贵州草药[M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1970.

- [4] 冯 煦, 董云发, 王 鸣, 等. 臭常山喹啉生物碱成分[J]. 中草药, 2004, 35(2): 1336-1338.
- [5] 管贵桦, 刘明川, 杨胜杰, 等. 植物臭常山化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(9): 54-55.
- [6] Al-Rehaily A J, Ahmad M S, Muhammad I, et al. Furoquinoline alkaloids from *Teclea nobilis*[J]. Phytochemistry, 2003, 64(8): 1405-1411.
- [7] Reisch J, Nordhaus P. Synthese von 2-substituierten dihydrofuro [2,3-b] chinolinen[J]. Monatshefte fur Chemie, 1994, 125: 230.
- [8] Stephen A, Derek R, Narain D, et al. Syntheses and absolute configuration assignments of mono- and di-substituted chiral quinoline alkaloids obtained by asymmetric oxidation[J]. Heterocycles, 2009, 79: 831-850.
- [9] Brown N M D, Grundon M F, Harrison D M, et al. Quinoline alkaloids. XXI: The ^{13}C NMR spectra of hemiterpenoid quinoline alkaloids and related prenylquinolines[J]. Tetrahedron, 1980, 36(24): 3579-3584.
- [10] Liu Z L, Chu S S, Jiang G H, et al. Feeding deterrents from *Zanthoxylum schinifolium* against two stored-product insects[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(21): 10130-10133.