

白叶莓根部化学成分的研究

王明奎, 梁 健, 彭树林, 丁立生*

(中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 研究蔷薇科悬钩子属药用植物白叶莓 *Rubus innominatus* 根部的化学成分。方法 用甲醇室温浸提后以乙酸乙酯萃取, 萃取物通过多次正相和反相硅胶柱层析分离纯化, 并采用 NMR, MS 等波谱方法及与标准品对照 TLC 鉴定化学结构, 抗菌活性用杯碟法测定。结果 共分离鉴定出 10 个三萜酸和 2 个甾体类化合物, 抗菌试验表明乙酸乙酯萃取物和一些三萜酸具有一定的抗菌活性。结论 这些成分均为首次从该属植物中分离得到。

关键词: 白叶莓; 三萜酸; 甾体; 抗菌活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)04-0295-03

Studies on chemical constituents from root of *Rubus innominatus*

WANG Ming-kui, LIANG Jian, PENG Shu-lin, DING Li-sheng

(Chengdu Institute of Biology, CAS, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Object** To study the chemical constituents from the root of *Rubus innominatus* S. Moore

(Rosaceae). **Methods** Twelve compounds were isolated from the methanol extract by repeated column chromatography over normal and reversed phase silica gels. Their structures were identified by analysis of their spectral data and comparing TLC with authentic samples. **Results** Ten triterpenic acids and two steroids were isolated and identified. The antibacterial test indicated some triterpenic acids had antibacterial activity. **Conclusion** All compounds were obtained from the plants of *Rubus* L. for the first time.

Key words: *Rubus innominatus* S. Moore; triterpenic acid; steroids; antibacterial activity

白叶莓 *Rubus innominatus* S. Moore 系蔷薇科悬钩子属植物, 主要分布在陕西、安徽、浙江、福建、江西、湖北、四川、云南、贵州和广东等地。其根入药, 可治风寒咳嗽^[1], 但其药用成分迄今未见报道。为探索该植物的有效成分, 揭示其生理活性物质, 为悬钩子属药用植物的深层次开发提供基础资料, 本实验对白叶莓根的化学成分进行了初步研究。预试结果显示该植物中主要成分为三萜和鞣质。我们从其根部的甲醇提取物中分离得到 10 个三萜和 2 个甾体类成分。其结构分别鉴定为: β -谷甾醇 (I)、覆盆子酸 (II)、2-羧基坡曼酸 (III)、乌苏酸 (IV)、坡曼酸 (V)、2 α , 19 α -二羟基-3-氧-乌苏-12-烯-28-酸 (VI)、2 α , 3 α -二羟基乌苏-12, 18-二烯-28-酸 (VII)、2 α , 3 α -二羟基乌苏-12, 19-二烯-28-酸 (VIII)、蔷薇酸 (IX)、arjunolic acid (X), tormetic acid (XI) 和胡萝卜苷 (XII)。

化合物 II: 白色粉末, 在紫外灯 254 nm 下

GF₂₅₄薄层板上显紫红色。FAB-MS 示其准分子离子峰为 m/z 485 $[M-H]^-$, 结合¹³CNMR 和 DEPT 确定该化合物分子式为 C₃₀H₄₆O₅, 推测为三萜类化合物。¹³CNMR 中 δ_c 140.3 和 δ_c 127.6 提示该化合物为乌苏烷型三萜, δ_c 146.3 和 δ_c 129.5 显示该化合物除 12(13) 位存在双键外, 还有另外一个双键存在, δ_c 72.7 季碳信号表明 19 位碳可能接有 α 型羟基, δ_c 180.7 表明有一羧基存在, δ_c 201.2 显示有一酮羰基存在。DEPT 谱显示该化合物含 7 个伯碳, 7 个仲碳, 6 个叔碳, 10 个季碳。分子式显示除一个酮基氧, 一个羟基氧和两个羧基氧外, 还有一个羟基, 此羟在碳应接在双键上(否则应在碳谱 65~85 间出峰), 这样其结构可能是 2, 19 α -二羟基-3-氧-乌苏-1, 12-二烯-28-酸或 2, 19 α -二羟基-1-氧-乌苏-2, 12-二烯-28-酸。因其碳谱数据(表 1)与前者的文献^[2]报道完全一致, 故将其鉴定为覆盆子酸。

化合物 III: 白色粉末, 在紫外灯(254 nm)下不

* 收稿日期: 2002-09-18

基金项目: 四川省青年科学基金; 教育部留学回国人员科研启动基金资助

作者简介: 王明奎(1966-), 男, 重庆市开县人, 博士, 副研究员, 研究方向为天然活性物质的分离鉴定及结构转化, 已在国内外学术期刊上发表论文 40 余篇。

* 通讯作者 Tel: (028) 5226292 Fax: (028) 5223843 E-mail: lsding@cib.ac.cn

显色。¹³CNMR 示有 30 个碳信号,推测为三萜类化合物。DEPT 谱显示该化合物含 7 个伯碳,8 个仲碳,6 个叔碳和 9 个季碳。 δ c 140.2 和 δ c 128.7 显示该化合物为乌苏烷型三萜;氢谱高场区清楚显示出 7 个甲基,其中 1 个甲基峰被裂分为两重峰($J = 6.4$ Hz),符合 30 位甲基氢的裂分情况。 δ c 73.5 显示 19 位碳可能接有 α 型羟基; δ c 83.6 说明另一羧基存在, δ c 182.2 显示有一羟基存在, δ c 212.6 显示有一

酮羰基存在。通过比较碳谱数据(表 1)将其鉴定为 2-羧基坡曼酸^[3]。

化合物 V: 白色粉末,在紫外灯 254 nm 下无荧光,硫酸显色呈蓝色。 δ c 180.2 显示有一羟基存在,其碳谱数据(表 1)与坡曼酸的文献^[4]值完全吻合。

化合物 VI: 白色粉末,在紫外灯 254 nm 下无荧光。其碳谱数据(表 1)与 2 α ,19 α -二羟基-3-氧-乌苏-12-烯-28-酸的文献^[5]报道完全一致。

表 1 化合物 II, III 和 V ~ XI 的¹³CNMR 波谱数据(C₅D₅N)

Table 1 ¹³CNMR spectral data of compounds II, III and V – XI (pyridine-*d*₅)

碳位	II	III ^a	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
1	130.9(d)	54.4(q)	39.1	50.2	43.4	43.3	42.9(q)	47.6	48.3
2	146.3(s)	212.7(s)	28.2	69.8	66.2	66.2	66.2(d)	68.7	68.7
3	201.2(s)	83.7(d)	78.3	216.5	79.3	79.3	79.4(d)	83.9	83.9
4	44.7(s)	44.6(s)	39.5	48.2	38.9	38.9	38.8(s)	39.9	38.7
5	54.2(d)	55.8(d)	56.0	57.7	48.9	48.9	48.8(d)	56.1	56.1
6	19.3(t)	19.9(q)	19.0	19.6	18.4	18.4	18.6(q)	19.0	19.1
7	33.3(t)	33.8(q)	33.7	33.2	35.1	34.3	33.5(q)	33.4	33.6
8	38.6(s)	41.4(d)	40.4	40.4	39.9	39.6	40.6(s)	40.1	40.5
9	43.3(d)	46.5(d)	47.9	47.4	48.2	48.2	47.6(d)	48.5	48.3
10	42.4(s)	42.9(s)	37.4	37.9	38.6	38.7	38.7(s)	38.7	40.9
11	24.0(t)	24.6(q)	24.1	24.2	31.9	23.5	24.1(q)	24.3	24.2
12	127.6(d)	128.7(d)	128.1	127.6	125.9	127.2	128.0(d)	123.0	128.0
13	140.3(s)	140.2(s)	140.0	140.1	139.5	138.5	140.0(s)	145.0	140.0
14	41.0(s)	41.4(s)	42.2	42.2	45.1	43.9	42.1(s)	42.2	42.4
15	29.3(t)	29.6(d)	29.4	29.3	28.8	28.7	29.4(q)	29.2	29.4
16	26.4(t)	26.5(d)	26.5	26.4	24.0	23.8	26.4(q)	24.9	26.4
17	48.3(s)	48.2(s)	48.3	48.3	48.9	48.2	48.3(s)	46.1	47.9
18	54.8(d)	55.0(d)	54.7	54.6	–	50.8	54.6(d)	44.9	54.1
19	72.7(s)	73.5(s)	72.8	72.7	134.8	129.2	72.7(s)	81.3	72.7
20	42.3(d)	43.0(d)	42.4	42.4	35.7	–	42.4(d)	35.8	42.4
21	27.0(t)	27.0(q)	27.2	27.0	27.1	33.6	27.1(d)	28.9	27.1
22	38.4(t)	38.8(q ⁰)	37.4	38.5	35.1	29.2	38.5(q)	33.7	38.5
23	27.9(q)	29.6(t)	28.9	25.3	29.6	29.6	29.5(t)	28.4	28.4
24	22.1(q)	17.2(t)	16.9	21.8	22.5	22.4	22.3(t)	17.6	17.3
25	20.0(q)	16.7(t)	15.7	17.3	18.4	17.5	16.8(t)	16.9	16.9
26	17.6(q)	17.1(t)	17.3	16.8	18.1	17.5	17.3(t)	17.6	17.7
27	24.7(q)	24.7(t)	24.8	24.7	22.1	22.1	24.7(t)	29.2	24.7
28	180.7(s)	182.2(s)	180.6	180.7	–	–	180.7(s)	181.0	181.0
29	27.1(q)	27.3(t)	27.0	27.1	19.7	20.5	27.0(t)	29.2	27.0
30	16.8(q)	16.6(t)	16.6	16.0	18.4	17.2	16.7(t)	24.9	16.8

a: 在 methanol-*d*₄ 中 – : 信号被溶剂覆盖
a: in methanol-*d*₄ – : signal was covered by solvent

化合物 VII 和 VIII 作为混合物获得, 白色粉末。碳谱多数峰成对或重叠出现, 说明可能是一对三萜混合物。在双键区出现 6 个信号: δ c 139.5, 138.5, 134.8, 129.2, 127.2 和 125.9。其中 δ c 125.9, 139.5 及 δ c 127.2, 138.5 提示该混合物均为 12-烯乌苏酸型化合物。 δ c 134.8, 129.2 信号及被溶剂吡啶峰所掩盖的两个烯碳与文献^[6]比较表明为 $\Delta^{18(19)}$ 及 $\Delta^{19(20)}$ 的混合物。在 δ c 60~85 区域的两个羟基碳信号 δ c 79.3 与 66.2 与文献^[4]对比, 羟基应分别连接在 2, 3

位, 且均为 α 构型。因此将化合物 VII 和 VIII 分别鉴定为 2 α , 3 α -二羟基乌苏-12, 18-二烯-28-酸和 2 α , 3 α -二羟基乌苏-12, 19-二烯-28-酸^[7]。

化合物 IX: 白色粉末, 在紫外灯 254 nm 下无荧光, 硫酸显色呈蓝色。与文献报道的蔷薇酸比较, 碳谱数据(表 1) 完全一致^[8]。

化合物 X 和 XI 未分离开, 为白色粉末, 在紫外灯 254 nm 下无荧光。¹³CNMR 显示该混合物为两个结构非常相似的三萜类化合物, 并且从峰高上分析两

化合物含量不等。在 δ 120~150 区间有 δ : 145.0, 140.0, 128.0, 123.4 四峰, 并且 δ : 145.0 和 δ : 123.4 两峰明显高于 δ : 140.0 和 δ : 128.0 两峰, 说明量多者(化合物 X)为齐墩果烷型三萜; 量少者(化合物 XI)为乌苏烷型三萜。在 δ : 60~85 区间有四个峰: δ : 81.3 为齐墩果烷型三萜 19α 构型羟基碳的常见化学位移值; δ : 72.7 为乌苏烷型三萜 19α 构型羟基碳的常见化学位移值; δ : 83.9 和 68.7 的 2 个化合物分别为 $2\alpha, 3\beta, 19\alpha$ -三羟基齐墩果-12-烯-28-酸^[4,9]和 $2\alpha, 3\beta, 19\alpha$ -三羟基乌苏-12-烯-28-酸^[10]。

化合物 I、IV 和 XII 通过与标准化合物比较 TLC 分别鉴定为: β -谷甾醇、乌苏酸和胡萝卜苷。

用金黄色葡萄糖球菌 ATCC25923、大肠杆菌 ATCC25922、绿脓杆菌 ATCC27853 和克氏肺炎杆菌 999 进行了体外抑菌试验, 试验表明, 除 IX 外, 其它样品在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下对所试菌株均具有抑菌活性, 对大肠杆菌和抑菌活性比其它 3 种细菌弱, 对绿脓杆菌的力活性最强。提取物的抑菌活性与纯化后的三萜成分的活性相当或更强, 而鞣质抗菌活性弱, 说明三萜与鞣质合同可增强三萜的抗菌活性。这可说明民间用悬钩子提取物治疗烧伤是合理的。

1 植物来源及仪器

植物样品采自重庆市南川县金佛山(海拔 1 000 m 左右), 由重庆市药物种植研究所刘正宇副研究员鉴定。

熔点用 XRC-1 型显微熔点仪测定, 温度计未校正; NMR 用 Bruker AC-300P 和 Avance DMX-500 仪测定, TMS 为内标; 质谱用 VG 公司 ZAB-HS 型质谱仪测定; 柱层析用硅胶和硅胶 HPTLC 为青岛海洋化工厂产品; Lobar RP-18, Si 60 和 RP-18 色谱柱为 Merck 公司产品。

阳性对照药环丙沙星纸片(5 $\mu\text{g}/\text{片}$)购自北京天坛中国药品生物制品检定所。金黄色葡萄糖球菌 ATCC25923、大肠杆菌 ATCC25922、绿脓杆菌 ATCC27853 为华西医科大学基础医学院机能实验室保存菌株, 经重新鉴定后使用。克氏肺炎杆菌 999 为 1999 年成都地区收集的临床分离致病菌, 经重新鉴定后使用。培养基选用中国药品生物制品检定所生产的 MH 固体琼脂培养基及 MH 肉汤培养基。

2 提取与分离

白叶莓根部 5.0 kg(干重), 粉碎后用 MeOH 室温浸提 3 次, 每次 5 d, 减压回收 MeOH 后得浸膏

505 g。取 500 g 浸膏分散于 H₂O 中, EtOAc 萃取得萃取物 103 g 及水相部分。EtOAc 部分在适量热 MeOH 中溶解后, 加等体积 H₂O 及少量环己烷得到甲醇/水不溶物。将该部分进行反复的正相、反相色谱分离, 正相色谱洗脱剂为氯仿-乙醚-甲醇; 反相色谱洗脱剂为甲醇-水。从中分离出化合物 I (284 mg), II (84 mg), III (11 mg), IV (229 mg), V (39 mg), VI (34 mg), VII 和 VIII 的混合物 (492 mg), IX (417 mg), X (50 mg) 及 XI 和 XII 的混合物 (193 mg)。

3 杯碟法测试体外抗菌活性

挑取 2~3 个单菌落接种于 2 mL MH 肉汤培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 增菌 4~6 h, 用 0.5# 麦氏比浊管调整菌液浓度, 使含菌量为 10 cfu/mL。于灭菌双碟内倾入 20 mL 融化的 MH 琼脂培养基, 待冷凝后用灭菌棉签沾取上述菌液, 均匀地涂抹在琼脂平皿表面, 待菌液干燥后, 放入灭菌牛津小杯。于每个牛津小杯内滴加待测药液, 同时放入阳性对照环丙沙星纸片, 用无菌陶瓦盖好, 置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后, 取出观察有无抑菌圈, 并记录抑菌圈直径的大小。

References:

- [1] Beijing Institute of Botany, CAS. *Iconographia Cormophytorum Sinicorum* (中国高等植物图鉴) [M]. Tomus II. Beijing: Science Press, 1994.
- [2] Hattori M, Kuo K P, Shu Y Z, *et al.* A triterpene from the fruits of *Rubus chingii* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(12): 1975-1976.
- [3] Liu X Q, Jia Z J. Studies on the chemical constituents of alpine burnet *Sanguisorba alpina* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(9): 451-454.
- [4] Mahato S B, Kundu A P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(6): 1517-1575.
- [5] Xu H X, Zeng F Q, Wan M, *et al.* Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(6): 643-645.
- [6] Durham D G, Liu L X, Richards R M E. Unsaturated E-ring triterpenes from *Rubus pinfaensis* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(2): 505-508.
- [7] Yang S C, Fang J M, Cheng Y S. Chemical constituents from the roots and aerial parts of *Rosa taiwanensis* [J]. *J Chin Chem Soc*, 1995, 42: 573-577.
- [8] Durham D G, Liu X J, Richards R M E. A triterpene from *Rubus pinfaensis* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(6): 1469-1472.
- [9] Delado M C C, Silva M S D, Fo R B. 3β -Hydroxy-21 β -E-cinnamoyloxy olean-12-28-oic-acid, a triterpenoid from *Entolobium contortistiliquum* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(10): 2289-2292.
- [10] Gan L, Zhao Y Y, Zhang J H, *et al.* Isolation and identification of triterpenoids from *Rubus alceaefolius* Poir [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23(6): 361-363.