

无叶假木贼的化学成分及抗菌活性研究

孙 艳^{1,2}, 沈庆国^{1,2}, 屈玲霞^{1,2}, 赵森森^{1,2}, 张娜娜^{1,2}, 王竣楠^{1,2}, 郇旭升^{1,2}, 庄华青^{1,2}, 张 丽^{1,2}, 关永霞^{1,2*}, 汪 冶^{3*}

1. 鲁南厚普制药有限公司, 山东 临沂 276006

2. 鲁南制药集团股份有限公司中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006

3. 丽水学院, 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 研究无叶假木贼 *Anabsis aphylla* 的化学成分及其抗菌活性。方法 采用 RP-C₁₈、Sephadex LH-20、硅胶等柱色谱进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据鉴定化合物结构。采用 MTT 比色法对化合物进行抗枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、番茄疮痂病菌 *Xanthomonas vesicatoria*、溶血葡萄球菌 *Staphylococcus haemolyticus*、根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*、黄瓜角斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 活性筛选。结果 从无叶假木贼中分离了 10 个化合物, 分别鉴定为假木贼碱 (1)、N-甲基假木贼碱 (2)、6-(diethylamino)-[2,3'-bipyridin]-3-ol (3)、2-(2-(pyridine-3-yl)pyridin-5-yl)-6-(pyridin-3-yl)piperidine (4)、2-(pyridine-3-yl)-5-(6-(pyridine-3-yl)pyridine-2-yl)pyridine (5)、白羽扇豆碱 (6)、12N-甲基金雀花碱 (7)、金雀花碱 (8)、水杨酸 (9)、香草酸 (10)。化合物 9 对番茄疮痂病菌、溶血葡萄球菌、根癌土壤杆菌、黄瓜角斑病菌的最小抑菌浓度 (minimal inhibit concentration, MIC) 分别为 20.0、10.0、10.0、20.0 μg/mL。结论 化合物 3 和 5 为新化合物, 分别命名为无叶假木贼碱 A 和无叶假木贼碱 B; 化合物 6~10 为首次从该属植物中分离得到。化合物 9 具有明显的抗菌活性; 从无叶假木贼中分离得到的生物碱类化合物 1~8 对上述病原微生物抑制作用不明显。

关键词: 无叶假木贼; 生物碱; 抗菌活性; 无叶假木贼碱 A; 无叶假木贼碱 B; 白羽扇豆碱; 12N-甲基金雀花碱; 金雀花碱
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)08-2278-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.003

Chemical constituents from *Anabsis aphylla* and their antibacterial activities

SUN Yan^{1,2}, SHEN Qing-guo^{1,2}, Qu Ling-xia^{1,2}, ZHAO Sen-sen^{1,2}, ZHANG Na-na^{1,2}, WANG Jun-nan^{1,2}, HUAN Xu-sheng^{1,2}, ZHUANG Hua-qing^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, GUAN Yong-xia^{1,2}, WANG Ye³

1. Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 276006, China

2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine of Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

3. Lishui University, Lishui 323000, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of *Anabsis aphylla* and their antibacterial activities. **Methods** Chromatographic methods were used for the isolation and purification of chemical constituents, and the structures of the isolated compounds were elucidated by spectroscopic analyses and spectroscopic data. And the antimicrobial activities of compounds against *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* were evaluated by MTT assay. **Results** Ten compounds were isolated, and their structures were identified as anabasine (1), N-methyl anabasine (2), 6-(diethylamino)-[2,3'-bipyridin]-3-ol (3), 2-(2-(pyridin-3-yl)pyridin-5-yl)-6-(pyridine-3-yl)piperidine (4), 2-(pyridine-3-yl)-5-(6-(pyridine-3-yl)pyridine-2-yl)pyridine (5), lupanine (6), 12N-methylcytisine (7), cytisine (8), 2-hydroxybenzoic acid (9), vanillic acid (10). The minimal inhibitory concentration (MIC) of compound 9 against *X. vesicatoria*, *S. haemolyticus*, *A. tumefaciens* and *P. syringae* by MTT assay were 20.0, 10.0, 10.0 and 20.0 μg/mL, respectively. **Conclusion**

收稿日期: 2021-09-27

基金项目: 山东省重点研发计划 (重大科技创新工程) 项目 (2020CXGC010505)

作者简介: 孙 艳 (1984—), 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发与工艺优化。Tel: 15069956136 E-mail: 253341135@qq.com

*通信作者: 汪 冶, 研究员, 研究方向为药用生物资源开发与利用。Tel: 15157810683 E-mail: 33301816@qq.com

关永霞, 硕士研究生, 研究方向为中药新药开发与制药共性技术研究。Tel: (0539)8336639 E-mail: jmsgyx@163.com

Compounds **3** and **5** are two new compounds, named as anabasis aphylla A and anabasis aphylla B, respectively. Compounds **6—10** are isolated from the plants of this genus for the first time. Compound **9** was observed to exhibited good antibacterial activities. The alkaloid compounds **1—8** isolated from *A. aphylla* had no obvious inhibitory effect on the above pathogenic microorganisms.

Key words: *Anabasis aphylla* L.; alkaloid; antibacterial activity; anabasis aphylla A; anabasis aphylla B; lupanine; 12*N*-methylcytisine; cytisine

无叶假木贼 *Anabasis aphylla* L.为藜科假木贼属植物^[1], 又称毒藜、无叶毒藜、阿那培斯、木烟等, 半灌木, 高 20~50 cm。主要分布于我国甘肃西部、新疆, 欧洲、中亚以及俄罗斯西伯利亚也有分布, 生长于荒漠、戈壁、沙丘及干旱山坡^[2]。该植物具有杀虫止痒的功效, 可用于治疗疥癣、疥疮和湿疹痒痛; 民间主要用于防治菜青虫、蚜虫等多种害虫^[3]。目前报道的化学成分主要有生物碱、萜类、皂苷类和生物大分子等^[4], 表现出抗胆碱酯酶活性、抗微生物和杀虫等活性^[5-6]。

我国对该植物化学成分的研究报道较少, 为了明确无叶假木贼药效物质基础, 合理开发其药用资源, 本实验对无叶假木贼地上部分 95%乙醇提取物开展了化学成分研究及抗菌活性研究。从中分离得到 10 个化合物(图 1), 分别鉴定为假木贼碱(anabasine, **1**)、*N*-甲基假木贼碱(*N*-methyl anabasine, **2**)、6-(diethylamino)-[2,3'-bipyridin]-3-ol

(**3**)、2-(2-(pyridine-3-yl) pyridin-5-yl)-6-(pyridin-3-yl)piperidine (**4**)、2-(pyridine-3-yl)-5-(6-(pyridine-3-yl)pyridine-2-yl)pyridine (**5**)、白羽扇豆碱(lupanine, **6**)、12*N*-甲基金雀花碱(12*N*-methylcytisine, **7**)、金雀花碱(cytisine, **8**)、水杨酸(2-hydroxybenzoic acid, **9**)、香草酸(vanillic acid, **10**)。其中化合物 **3** 和 **5** 为新化合物; 化合物 **6~10** 为首次从该属植物中分离得到。化合物 **9** 具有明显的抗菌活性, 对番茄疮痂病菌 *Xanthomonas vesicatoria*、溶血葡萄球菌 *Staphylococcus haemolyticus*、根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*、黄瓜角斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 的最小抑菌浓度(minimal inhibit concentration, MIC)为 20.0、10.0、10.0、20.0 μg/mL。化合物 **10** 具有一定的抗菌活性, 对溶血葡萄球菌和根癌土壤杆菌的 MIC 均为 50.0 μg/mL。从无叶假木贼中分离得到的生物碱类化合物 **1~8** 对上述病原微生物抑制作用不明显。

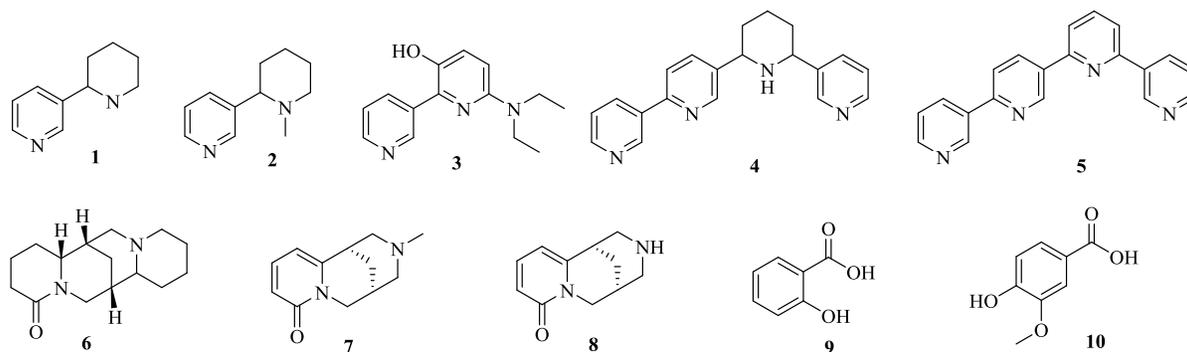


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—10

1 仪器与材料

INOVA-400 核磁共振仪 (Varian 公司, 美国); HP-5973 型质谱仪、HP1100MSD (ESI) 型质谱仪 (Agilent 公司, 美国); Waters 2489 型液相色谱仪 (Waters 公司, 美国), 半制备用色谱柱为 SunFire™-C₁₈ (Waters, 150 mm×10 mm, 10 μm) 柱和 Kromasil-C₁₈ (Kromasil, 250 mm×10 mm, 5 μm) 柱; Rotavapor R-220 旋转蒸发器 (Büchi 公司, 瑞士); 柱色谱材料: 粗硅胶 40~80 目、柱色谱硅

胶 200~300 目、薄层色谱硅胶 H (60 型)、薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 及预制硅胶板 GF₂₅₄ (青岛海洋化工有限公司); 反相色谱硅胶 (RP-C₁₈, 德国 Merck 公司); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (Amersham Pharmacia Biotech 公司)。

药材采自新疆石河子, 由新疆石河子大学生命科学学院闫平教授鉴定为无叶假木贼 *A. aphylla* L. 地上部分, 样本 (000156) 存放于贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室。抗菌活性所用菌种由

中国农业大学植物病理学系提供。

2 提取与分离

干燥的无叶假木贼地上部分 (13.0 kg), 用 8 倍量 95% 乙醇加热提取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液。减压浓缩提取液至无醇味, 得到乙醇粗提物, 用蒸馏水加热溶解制成水悬液。首先, 用 10% 的盐酸调节 pH 值至 3.0 左右, 醋酸乙酯萃取, 浓缩后得到醋酸乙酯组分 (116.0 g); 剩余的水溶液, 用 10% 的氨水调节 pH 值至 9.0 左右, 氯仿萃取次, 减压浓缩萃取液, 得到氯仿部分 (生物碱组分 118.5 g) 和水部分^[7]。

氯仿部位加适量甲醇和氯仿溶解, 经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 凝胶柱色谱, 得到生物总碱。生物总碱部分经硅胶柱色谱, 石油醚-二乙胺梯度洗脱 (6:1~1:1), 通过 TLC 检测合并相似组分后得到 6 个部分 (Fr. 1~6)。Fr. 1 经过 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 凝胶柱色谱和反相硅胶 (RP-C₁₈) 柱色谱分离纯化, 分别得到化合物 2 (239.0 mg) 和 4 (62.0 mg)。Fr. 2 经硅胶柱色谱以石油醚-二乙胺 (5:1~4:1) 洗脱, 再经过 Sephadex LH-20 (甲醇) 凝胶柱色谱, 得到化合物 3 (39.0 mg)、7 (20.0 mg) 和 8 (15.0 mg)。Fr. 3 经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 凝胶柱色谱、反相硅胶 (RP-18) 柱色谱 (甲醇-水 60:40) 和半制备型高效液相色谱仪 (pre-HPLC, 甲醇-水 70:30, ODS 柱) 分离纯化, 得到化合物 6 (18.0 mg)。其中 Fr. 4 经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 凝胶柱色谱、正相硅胶 (硅胶 300~400 目) 柱色谱 [石油醚-二乙胺 (3:1~2:1)], 得到化合物 1 (32.0 mg) 和 5 (14.0 mg)。

醋酸乙酯部位氯仿溶解后经用石油醚、石油醚-醋酸乙酯 (80:1~1:1) 梯度洗脱, 通过 TLC 检测合并相似组分后得到 4 个部分 (Fr. 7~10), Fr. 7 经硅胶常压柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯 (60:1~10:1) 梯度洗脱, 洗脱液采用薄层色谱检测, 合并相同组分, 进一步分离, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (氯仿-甲醇 1:1) 色谱纯化, 得到化合物 9 (20.0 mg) 和 10 (19.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色油状物; 改良碘化铋钾溶液喷雾显色呈红色斑点, ESI-MS m/z : 163 [M+H]⁺; C₁₀H₁₄N₂。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.63 (1H, s, H-2'), 8.49 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-6'), 7.85 (1H, d, J =

8.0 Hz, H-4'), 7.26 (1H, dd, J = 4.8, 8.0 Hz, H-5'), 5.85 (1H, -NH, brs), 3.80 (1H, dd, J = 3.2, 11.2 Hz, H-2); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 148.8 (C-2'), 148.7 (C-6'), 137.6 (C-3'), 134.7 (C-4'), 123.5 (C-5'), 58.9 (C-2), 46.5 (C-6), 32.7 (C-3), 24.2 (C-5), 23.9 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 1 为假木贼碱。

化合物 2: 黄色油状物; 改良碘化铋钾溶液喷雾显色呈红色斑点, ESI-MS m/z : 177 [M+H]⁺; C₁₁H₁₆N₂。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.58 (1H, s, H-2'), 8.48 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-6'), 7.72 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4'), 7.25 (1H, dd, J = 4.8, 8.0 Hz, H-5'), 2.18 (3H, s, -NCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 148.5 (C-2'), 148.4 (C-6'), 140.6 (C-3'), 134.1 (C-4'), 123.4 (C-5'), 59.7 (C-2), 47.5 (C-6), 34.7 (C-3), 29.2 (-NCH₃), 25.6 (C-5), 25.1 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[9-10], 故鉴定化合物 2 为 *N*-甲基假木贼碱。

化合物 3: 黄色油状物; 改良碘化铋钾溶液喷雾显色呈红色斑点, 推断为生物碱类化合物。EI-MS m/z : 243 (M⁺, 80), 228 (90), 214 (100), 200 (93); ESI-MS m/z : 244 [M+H]⁺, 266 [M+Na]⁺; 表明该化合物的相对分子质量为 243, 提示含有奇数个氮原子。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 低场区 δ _H 9.24 (2H, s), 8.46 (1H, d, J = 4.8 Hz), 8.40 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.42 (1H, dd, J = 4.8, 8.0 Hz) 提示有 ABX 偶合系统; δ _H 7.20 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.55 (1H, d, J = 8.4 Hz) 提示有相邻芳香质子; 在高场区 δ _H 3.45 (4H, q, J = 7.2 Hz), 1.10 (6H, t, J = 7.2 Hz) 提示有对称乙基结构片段。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) 低场区有 10 个碳原子信号, 分别是 δ _C 151.0 (s), 149.5 (d), 147.8 (d), 142.8 (s), 136.9 (s), 135.5 (d), 134.4 (s), 127.9 (d), 123.0 (d), 106.8 (d), 在高场区有 2 个碳信号 δ _C 42.1 (t), 13.1 (q)。结合质谱、氢谱和碳谱数据分析可推测该化合物的分子式为 C₁₄H₁₇N₃O, 不饱和度 Ω = 8, 提示含有 2 个吡啶结构单元, 从 δ _H 3.45 (4H, q, J = 7.2 Hz), 1.10 (6H, t, J = 7.2 Hz) 和 δ _C 42.1 (t), 13.1 (q) 可以推测含有 -N(CH₂CH₃)₂ 结构单元。还有 1 个羟基化学位移在 δ _H 9.24 与吡啶单元质子信号重叠。

2 个吡啶单元取代情况需要借助二维谱解析。从 HMBC 谱可以看出 δ _H 3.45 (H-1'') 与 δ _C 151.0 (C-6) 相关, δ _H 7.20 (H-4) 与 δ _C 151.0 (C-6), 136.9

(C-2), 142.8 (C-3) 相关。 δ_{H} 6.55 (H-5) 与 δ_{C} 142.8 (C-3) 相关, 羟基质子 δ_{H} 9.24 与 δ_{C} 142.8 (C-3) 和 δ_{C} 136.9 (C-2) 相关。从以上 $-N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 和羟基在同一个吡啶结构单元中并确定它们的取代位置。通过 δ_{H} 7.42 (H-5') 分别与 δ_{C} 147.8 (C-6'), 135.5 (C-4'), 134.4 (C-3') 相关, 8.40 (H-4') 与 136.9 (C-2) 相关, δ_{H} 9.24 (H-2') 分别与 134.4 (C-3'), 136.9 (C-2) 相关可以确定另一个吡啶结构单元取代位置, 由此确定 2 个吡啶结构单元的连接方式。因此确定化合物 **3** 的结构为 6-(diethylamino)-[2,3'-bipyridin]-3-ol, 其结

构和 HMBC 主要相关见图 2。通过数据库检索, 确定化合物 **3** 是新化合物, 命名为无叶假木贼碱 A。氢谱和碳谱数据详细归属见表 1。

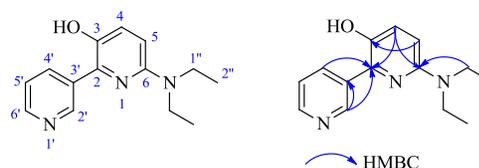


图 2 化合物 **3** 的结构和 HMBC 图谱

Fig. 2 Structure and HMBC correlations of compound **3**

表 1 化合物 **3** 的氢谱 (400 MHz, DMSO- d_6) 和碳谱 (100 MHz, DMSO- d_6) 数据

Table 1 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) and $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) data of compound **3**

碳位	δ_{C}	δ_{H}	DEPT	碳位	δ_{C}	δ_{H}	DEPT
1				2'	149.5	9.24 (1H, s)	CH
2	136.9		C	3'	134.4		C
3	142.8		C	4'	135.5	8.40 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	CH
4	127.9	7.20 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	CH	5'	123.0	7.42 (1H, dd, $J = 8.0, 4.8$ Hz)	CH
5	106.8	6.55 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	CH	6'	147.8	8.46 (1H, d, $J = 4.8$ Hz)	CH
6	151.0		C	1''	42.1	3.45 (4H, q, $J = 7.2$ Hz)	CH ₂
1'				2''	13.1	1.10 (6H, t, $J = 7.2$ Hz)	CH ₃

化合物 **4**: 黄色油状物; 改良碘化铋钾溶液喷雾显色呈红色斑点, ESI-MS m/z : 317 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.17 (1H, s, H-2''), 8.75 (1H, s, H-6'), 8.66 (1H, s, H-2'''), 8.63 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6''), 8.50 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6'''), 8.31 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4''), 7.95 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 7.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4'''), 7.30 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 7.40 (1H, dd, $J = 4.8, 8.0$ Hz, H-5''), 7.28 (1H, dd, $J = 4.8, 8.0$ Hz, H-5'''), 3.94 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-2), 3.90 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-6), 2.03 (1H, m, H_a-4), 1.69 (1H, m, H_e-4), 1.84 (2H, m, H_a-3, 5), 1.60 (2H, m, H_e-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 153.7 (C-2'), 149.7 (C-6''), 148.9 (C-6'), 148.7 (C-6'''), 148.6 (C-2'''), 148.0 (C-2''), 140.4 (C-3'''), 139.8 (C-5'), 135.4 (C-4'), 134.7 (C-3''), 134.4 (C-4'''), 134.2 (C-4''), 123.5 (C-5''), 123.4 (C-5'''), 120.4 (C-3'), 59.9 (C-6), 59.6 (C-2), 34.4 (C-3, 5), 25.3 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **4** 为 2-(2-(pyridin-3-yl) pyridin-5-yl)-6-(pyridin-3-yl) piperidine。

化合物 **5**: 淡黄色油状物; 改良碘化铋钾溶液喷雾显色呈红色斑点, 推断可能为生物碱类化合物。

EI-MS m/z : 310 (M^+ , 100); ESI-MS m/z : 311 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 表明该化合物的相对分子质量为 310; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 显示质子信号全部位于低场区, 其中 δ_{H} 9.44, 9.35, 9.29 提示含有 3 个吡啶结构单元, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 谱显示, H-2''/H-6''/H-4'', H-2'''/H-6'''/H-4''', H-3/H-4/H-5 存在相关。提示含有 2 个 3-取代吡啶结构单元, 分别是 δ_{H} 9.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 8.69 (1H, t, $J = 8.0, 3.6$ Hz, H-6''), 8.42 (1H, dd, $J = 8.0, 3.6$ Hz, H-4''), 7.46 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-5'') 和 δ_{H} 9.29 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'''), 8.69 (1H, t, $J = 8.0, 3.6$ Hz, H-6'''), 8.49 (1H, dd, $J = 8.0, 4.0$ Hz, H-4'''), 7.46 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-5''')。还有 1 个 2,5-二取代吡啶结构单元 δ_{H} 9.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6'), 8.59 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-4'), 7.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3')。另外从 δ_{H} 7.94 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-4), 7.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3), 7.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5) 可知还有 1 个 2,6-二取代吡啶结构单元。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱给出 20 个碳信号峰, 结合 DEPT 谱将它们归属为 14 个叔碳和 6 个季碳, 结合质谱和氢谱分析可推断其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4$, 不饱和度为 16, 因此结构中有 4 个吡啶环。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 数据显示骨架与化合物 **4** 相似, 在低场区

比化合物 **4** 多出 1 个吡啶结构单元, 在高场区没有出现哌啶环结构信息。

从 HMBC 图谱 (图 3) 可以观察到 δ_{H} 9.29 (H-2'''), 8.49 (H-4''') 分别与 δ_{C} 154.6 (C-6) 相关, δ_{H} 9.44 (H-6''), 8.59 (H-4''), 8.42 (H-4'') 分别与 δ_{C} 154.8 (C-2') 相关, δ_{H} 7.92 (H-3') 与 δ_{C} 134.3 (C-3'') 相关, δ_{H} 7.84 (H-3) 分别与 δ_{C} 133.4 (C-5'), 154.1 (C-2) 相关。从而确定 4 个吡啶环连接顺序, 通过 HMQC 谱将 C 和 H 的关系进行了归属。由此将化合物 **5** 的结构确定为 6-(diethylamino)-[2,3'-bipyridin]-3-ol, 通过数据库检索, 确定化合物 **5** 为新化合物,

命名为无叶假木贼碱 B, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 2。

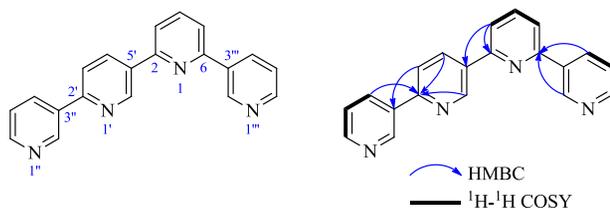


图 3 化合物 **5** 结构和 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY、HMBC 图谱
Fig. 3 Structure and $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, HMBC correlations of compound **5**

表 2 化合物 **5** 的氢谱和碳谱数据 (400/100 MHz, CDCl_3)

Table 2 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data of compound **5** (400/100 MHz, CDCl_3)

碳位	δ_{C}	δ_{H}	DEPT	碳位	δ_{C}	δ_{H}	DEPT
1				1''			
2	133.4		C	2''	148.3	9.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	CH
3	119.4	7.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	CH	3''	134.3		C
4	138.1	7.94 (1H, t, $J = 8.0$ Hz)	CH	4''	134.4	8.42 (1H, dd, $J = 8.0, 3.6$ Hz)	CH
5	119.4	7.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	CH	5''	123.6	7.46 (1H, t, $J = 8.0$ Hz)	CH
6	154.6		C	6''	150.1	8.69 (1H, dd, $J = 8.0, 3.6$ Hz)	CH
1'				1'''			
2'	154.8		C	2'''	148.3	9.29 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	CH
3'	120.4	7.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	CH	3'''	134.3		C
4'	135.3	8.59 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz)	CH	4'''	134.4	8.49 (1H, dd, $J = 8.0, 4.0$ Hz)	CH
5'	133.4		C	5'''	123.6	7.46 (1H, t, $J = 8.0$ Hz)	CH
6'	148.5	9.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	CH	6'''	150.1	8.69 (1H, dd, $J = 8.0, 3.6$ Hz)	CH

化合物 **6**: 无色油状物; 改良碘化铋钾溶液喷雾显色呈红色斑点; ESI-MS m/z : 249 $[\text{M}]^+$; 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.80 (2H, m, H-3), 1.84 (2H, m, H-4), 2.01 (2H, m, H-7), 1.48 (1H, m, H-8 α), 1.78 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-8 β), 1.77 (1H, m, H-9), 2.29 (1H, m, H-10 β), 4.61 (1H, m, H-10 α), 2.11 (1H, m, H-11), 1.78 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-13 β), 1.39 (1H, m, H-13 α), 4.48 (1H, m, H-14), 2.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-15 β), 1.80 (1H, m, H-15 α), 2.58 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-17 β), 1.83 (1H, m, H-17 α); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 169.4 (C-2), 65.6 (C-11), 60.1 (C-6), 54.5 (C-15), 51.5 (C-17), 46.6 (C-10), 37.6 (C-9), 34.5 (C-7), 34.0 (C-3), 32.5 (C-12), 29.1 (C-5), 28.9 (C-8), 22.3 (C-4), 23.3 (C-14), 23.0 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[8,13], 故鉴定化合物 **6** 为白羽扇豆碱。

化合物 **7**: 无色油状物; 改良碘化铋钾溶液喷雾显色呈红色斑点; ESI-MS m/z : 205 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ON}_2$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.28 (1H, m, H-4), 6.32 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3), 6.07 (1H, dd, $J = 6.7, 1.2$ Hz, H-5), 3.88 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10eq), 3.72 (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H-10ax), 3.00~3.18 (4H, m, H-11, 13), 2.90 (1H, m, H-7), 2.04 (3H, s, $N\text{-CH}_3$), 1.79 (2H, m, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 162.1 (C-2), 151.1 (C-6), 138.8 (C-4), 115.7 (C-3), 103.4 (C-5), 59.6 (C-13), 58.2 (C-11), 49.4 (C-10), 45.6 (C-14), 35.5 (C-7), 27.6 (C-9), 25.4 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **7** 为 12N-甲基金雀花碱。

化合物 **8**: 白色针状晶体 (丙酮); 改良碘化铋钾溶液喷雾显色呈红色斑点; mp 154~155 $^{\circ}\text{C}$; ESI-MS m/z : 191 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ 。 $^1\text{H-NMR}$

(400 MHz, CDCl₃) δ: 7.31 (1H, dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, H-4), 6.45 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3), 5.95 (1H, dd, *J* = 6.7, 1.2 Hz, H-5), 4.08 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-10eq), 3.88 (1H, dd, *J* = 15.6, 6.6 Hz, H-10ax), 2.85~3.14 (5H, m, H-11, 13, 7), 2.34 (1H, m, H-9), 1.90 (2H, m, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 164.3 (C-2), 150.1 (C-6), 138.8 (C-4), 116.7 (C-3), 103.0 (C-5), 54.0 (C-13), 53.0 (C-11), 49.9 (C-10), 35.7 (C-7), 28.6 (C-9), 26.4 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **8** 为金雀花碱。

化合物 **9**: 白色粉末; ESI-MS *m/z*: 139 [M+H]⁺; C₇H₆O₃。 ¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ: 7.87 (1H, m, H-6), 7.52 (1H, m, H-4), 6.93 (2H, m, H-3, 5); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) δ: 113.1 (C-1), 162.9 (C-2), 118.0 (C-3), 136.7 (C-4), 119.9 (C-5), 131.2 (C-6), 172.7 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[15-16], 故鉴定化合物 **9** 为水杨酸。

化合物 **10**: 白色粉末; ESI-MS *m/z*: 169 [M+H]⁺; C₈H₈O₄; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.89 (1H, s, H-6), 7.54 (1H, s, H-2), 6.83 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 3.88 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 170.1 (s, COOH), 113.7 (s, C-1), 115.8 (d, C-2), 148.6 (s, C-3), 152.6 (s, C-4), 123.1 (d, C-5), 125.3 (d, C-6), 56.3 (q, OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **10** 为香草酸。

4 抗菌活性筛选

本实验采用 MTT 比色法 (MTT colorimetric assay method) 对化合物 **1~10** 进行抗 5 种菌株 (枯

草芽孢杆菌 *B. subtilis*、番茄疮痂病菌 *X. vesicatoria*、溶血葡萄球菌 *S. haemolyticus*、根癌土壤杆菌 *A. tumefaciens*、黄瓜角斑病菌 *P. syringae* pv. *lachrymans*) 活性筛选, 具体步骤如下: 将供试菌种接种到 LB 固体培养基上, 培养 24 h。接种于 25 mL LB 液体培养基中, 25 °C 摇培。用无菌水把生长后的菌液校正浓度至 0.5 麦氏比浊标准 (×10⁸ CFU/mL), 再用 LB 液体培养基 1:100 稀释, 将菌液稀释到 ×10⁶ CFU/mL。将 90 μL ×10⁶ CFU/mL 的菌液加到 96 孔培养板中; 再分别加入 10 μL 的测试样品液, 分别设空白对照 (水) 组、溶剂对照组、阳性对照 (硫酸链霉素) 组、加药组。每组设 4 次重复; 培养板四周用封口膜封好, 培养 24 h; 每孔中加入 5 mg/mL 10 μL MTT 溶液, 共培养 4 h 后, 在 96 孔培养板中无蓝紫色物质生成的药剂最低浓度即为 MIC, 结果见表 3。

实验结果表明, 化合物 **9** 具有较强的抗菌活性, 对番茄疮痂病菌、溶血葡萄球菌、根癌土壤杆菌、黄瓜角斑病菌的 MIC 为 20.0、10.0、10.0、20.0 μg/mL; 化合物 **10** 对以上 4 种靶标细菌的 MIC 分别为 100.0、50.0、50.0、100.0 μg/mL; 从无叶假木贼中分离得到的生物碱类化合物 **1~8** 未对上述 5 种植物病原微生物表现出明显的抑制活性。

5 讨论

本实验研究了无叶假木贼的化学成分及其抗菌活性, 采用现代色谱技术手段分离鉴定了 10 个化合物, 其中化合物 **1~5** 为吡啶类生物碱, **6~8** 为喹诺里西啶类生物碱, **9~10** 为苯甲酸类衍生物。化合

表 3 化合物 **1~10** 对细菌的最低抑制浓度

Table 3 Minimal inhibitory concentration (MIC) of compounds 1—10 on bacteria growth

化合物	MIC/(μg·mL ⁻¹)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>
1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	100.0	100.0	200.0	100.0	100.0
3	100.0	100.0	200.0	100.0	100.0
4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
6	100.0	100.0	200.0	100.0	100.0
7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
9	50.0	20.0	10.0	10.0	20.0
10	100.0	100.0	50.0	50.0	100.0
硫酸链霉素	5.0	5.0	1.0	2.0	1.5

物 3 和 5 为新化合物, 化合物 6~10 为首次从该属植物中分离得到。

对分离得到的 10 个化合物进行抗菌活性筛选, 研究表明化合物 9 对番茄疮痂病菌、溶血葡萄球菌、根癌土壤杆菌、黄瓜角斑病菌表现出比较明显的抗菌活性; 其他化合物对上述 5 种植物病原微生物没有表现出明显的抑制活性。本实验进一步研究了无叶假木贼的化学成分, 不仅为其物质基础研究提供了依据, 同时在一定程度上丰富了无叶假木贼化合物药理活性的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第二十七卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 146.
- [2] 朱格麟. 藜科植物的起源、分化和地理分布 [J]. 植物分类学报, 1996, 34(5): 486-504.
- [3] 杜华, 周立刚, 李春, 等. 藜科植物化学成分与生物活性的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(5): 884-889.
- [4] 陈华, 李援朝. 假木贼属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(6): 585-589.
- [5] Tilyabaev Z, Abduvakhobov A A. Alkaloids of *Anabasis aphylla* and their cholinergic activities [J]. *Chem Nat Compd*, 1998, 34(3): 295-297.
- [6] 杜华, 周立刚, 唐静, 等. 无叶假木贼和盐爪爪提取物的抗菌活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(1): 92-96.
- [7] 惠军, 惠寿年. 正交实验法优选无叶假木贼生物碱的提取工艺 [J]. 新疆师范大学学报: 自然科学版, 2004, 23(3): 57-59.
- [8] 杨秀伟. 生物碱 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 36, 69, 71.
- [9] John A. Dean 主编. 常文保等, 译. 分析化学手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 568-589.
- [10] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册-第七分册-核磁共振波谱分析 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1999: 115-127.
- [11] Du H, Wang Y, Yan C, et al. Alkaloids from *Anabasis aphylla* L [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(11/12): 1093-1095.
- [12] 丛浦珠, 苏克曼. 分析化学手册-第九分册-质谱分析 [M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2000: 503-524.
- [13] 肖雯, 贾恢先. 沙冬青种子中金雀花碱成分分析 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2007, 43(2): 43-46.
- [14] 戴志廷, 张勇, 唐胜, 等. 金雀花碱衍生物的设计合成及降糖活性研究 [J]. 药学学报, 2018, 53(3): 416-424.
- [15] 王星星, 王重娟, 李仲昆. 鸡矢藤的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 世界中医药, 2021, 16(5): 826-830.
- [16] 刘明韬, 韩志超, 章漳, 等. 龙胆的化学成分研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(2): 103-104.
- [17] 李小辉, 袁名睿, 陆雪萍, 等. 麦冬的化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3804-3809.

[责任编辑 王文倩]