

## • 化学成分 •

## 猫爪草中的 1 个新呋喃倍半萜

张露丹<sup>1</sup>, 龙玉娇<sup>1</sup>, 王瑞沅<sup>1</sup>, 曹亚男<sup>1</sup>, 范小勇<sup>2</sup>, 邹坤<sup>1</sup>, 王慧<sup>1\*</sup>

1. 三峡大学生物与制药学院 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2. 复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海 201508

**摘要:** 目的 研究猫爪草 *Ranunculi Ternati Radix* 的化学成分及其体外抗结核杆菌活性。方法 综合运用正相硅胶柱色谱、大孔树脂柱色谱、薄层色谱和高效液相色谱等多种色谱技术对猫爪草醇提物进行分离纯化, 根据化合物的理化性质及其波谱数据鉴定其结构, 并采用微量肉汤二倍稀释法对所得到的单体化合物进行体外抗结核杆菌活性评价。结果 从猫爪草醇提物中分离鉴定了 11 个单体化合物, 分别为 (5*S*)-5-[5-(furan-3-yl)-2-methyl-5-oxopentyl]-3-methylfuran-2(5*H*)-one (1)、棕榈酸乙酯 (2)、邻苯二甲酸二丁酯 (3)、反式-4-羟基-2-壬烯酸 (4)、亚油酸甲酯 (5)、亚油酸乙酯 (6)、亚油酸 (7)、1-*O*-(9*Z*, 12*Z*-octadecadienoyl) glycerol (8)、烟酰胺 (9)、腺苷 (10) 和邻苯二甲酸二甲酯 (11)。体外抗结核杆菌实验结果表明, 化合物 1、2、4~8 和 10 对牛型分枝杆菌 BCG 有较弱抑制活性, 其最低抑菌浓度均为 100 μg/mL。结论 化合物 1 为新的呋喃倍半萜, 命名为猫爪草呋喃倍半萜 A, 化合物 4、8~11 为首次从该植物中分离得到。化合物 1、2、4~8 和 10 对牛型分枝杆菌 BCG 有较弱抑制活性。

**关键词:** 猫爪草; 猫爪草呋喃倍半萜 A; 结核杆菌; 烟酰胺; 反式-4-羟基-2-壬烯酸; 腺苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)14-4413-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.001

A new furanosesquiterpenoid from *Ranunculi Ternati Radix*ZHANG Lu-dan<sup>1</sup>, LONG Yu-jiao<sup>1</sup>, WANG Rui-feng<sup>1</sup>, CAO Ya-nan<sup>1</sup>, FAN Xiao-yong<sup>2</sup>, ZOU Kun<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>

1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China

**Abstract: Objective** To investigate the chemical constituents from Maozhaocao (*Ranunculi Ternati Radix*) and their activities against *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** Various chromatographic techniques, including silica gel column chromatography, macroporous resin column chromatography, TLC and HPLC, were used to separate and purify the ethanol extracts from *Ranunculi Ternati Radix*. The structures of isolates were elucidated by physicochemical properties and spectral analyses. The activity of all compounds against *M. tuberculosis in vitro* was tested by microbroth double dilution method. **Results** Eleven compounds were isolated from *Ranunculi Ternati Radix* and identified as (5*S*)-5-(5-(furan-3-yl)-2-methyl-5-oxopentyl)-3-methylfuran-2(5*H*)-one (1), ethyl palmitate (2), dibutyl phthalate (3), *trans*-4-hydroxy-2-nonenoic acid (4), methyl linoleate (5), ethyl linoleate (6), linoleic acid (7), 1-*O*-(9*Z*, 12*Z*-octadecadienoyl) glycerol (8), niacinamide (9), β-adenosine (10), dimethyl phthalate (11), respectively. Compounds 1, 2, 4–8 and 10 had mild inhibitory activities against *Mycobacterium bovis* BCG, all with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 100 μg/mL, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new furanosesquiterpenoid, named ranunculifuran A. Compounds 4, 8–11 were isolated from *Ranunculi Ternati Radix* for the first time. Compounds 1, 2, 4–8 and 10 had mild inhibitory activities against *M. bovis* BCG.

收稿日期: 2023-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22207063); 高等学校学科创新引智计划 (D20015); 湖北省教育厅科学技术研究项目 (Q20161207); 天然产物研究与利用湖北省重点实验室 (三峡大学) 开放基金 (2022NPRD07)

作者简介: 张露丹, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: zhangld27@126.com

\*通信作者: 王慧, 博士, 副教授, 研究方向为天然产物化学。E-mail: alice0507@yeah.net

**Key words:** *Ranunculi Ternati Radix*; ranunculifuran A; *Mycobacterium tuberculosis*; niacinamide; *trans*-4-hydroxy-2-nonenic acid;  $\beta$ -adenosine

结核病 (tuberculosis, TB) 是一种古老的、经空气传播的慢性感染性疾病, 由结核分枝杆菌 (*mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 引起, 最常见的患病部位是肺部 (即肺结核)。据世界卫生组织 (World health organization, WHO) 最新数据显示, 2021 年全球约有 1060 万个结核病新发病例, 导致约 160 万人死亡, 目前全球约有 1/4 的人口感染 Mtb, 结核病是严重危害人类健康的传染性疾病之一, 是全球单一传染病致死的十大死亡原因之一<sup>[1]</sup>。

猫爪草 *Ranunculi Ternati Radix* 是毛茛科毛茛属一年生草本植物小毛茛 *Ranunculus ternatus* Thunb. 的干燥块根, 始载于《中药材手册》, 1977 年开始收载于《中国药典》, 现被列为国家重点发展的 3 类中药材之一<sup>[2]</sup>。猫爪草的块根为主要入药部分, 民间用其治疗淋巴结核。临床上猫爪草也用于治疗结核病、肿瘤和咽炎<sup>[3]</sup>。国内已有猫爪草胶囊获得生产批准, 还有益肺止咳胶囊、仙鱼汤、养金护肺汤等包含猫爪草在内的复方药剂<sup>[4]</sup>。经文献调研, 国内外学者已从猫爪草中分离鉴定出有机酸类、酯类、黄酮类、生物碱类、糖苷类等多种化学成分, 且对猫爪草及其制剂进行了抗结核活性和临床疗效的研究<sup>[5-12]</sup>。

本研究前期采用微量肉汤二倍稀释法评价了猫

爪草醇提物石油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取部位的体外抗结核杆菌活性, 结果表明其萃取部位均对牛型分枝杆菌 BCG 均具有一定抑制活性, 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 分别为 200、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。为明确其抗结核杆菌活性成分, 本课题组对猫爪草醇提物石油醚、醋酸乙酯及正丁醇萃取部位化学成分进行了系统分离, 共分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为 (5*S*)-5-[5-(furan-3-yl)-2-methyl-5-oxopentyl]-3-methylfuran-2(5*H*)-one (1)、棕榈酸乙酯 (ethyl palmitate, 2)、邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate, 3)、反式-4-羟基-2-壬烯酸 (*trans*-4-hydroxy-2-nonenic acid, 4)、亚油酸甲酯 (methyl linoleate, 5)、亚油酸乙酯 (ethyl linoleate, 6)、亚油酸 (linoleic acid, 7)、1-*O*-(9*Z*,12*Z*-octadecadienoyl) glycerol (8)、烟酰胺 (niacinamide, 9)、腺苷 ( $\beta$ -adenosine, 10) 和邻苯二甲酸二甲酯 (dimethyl phthalate, 11), 结构见图 1。化合物 1 为新的呋喃倍半萜, 命名为猫爪草呋喃倍半萜 A; 化合物 4、8~11 为首次从该植物中分离得到。对单体化合物进行体外抗结核杆菌活性评价, 实验结果显示, 化合物 1、2、4~8 和 10 对牛型分枝杆菌 BCG 有较弱抑制活性, 其 MIC 均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

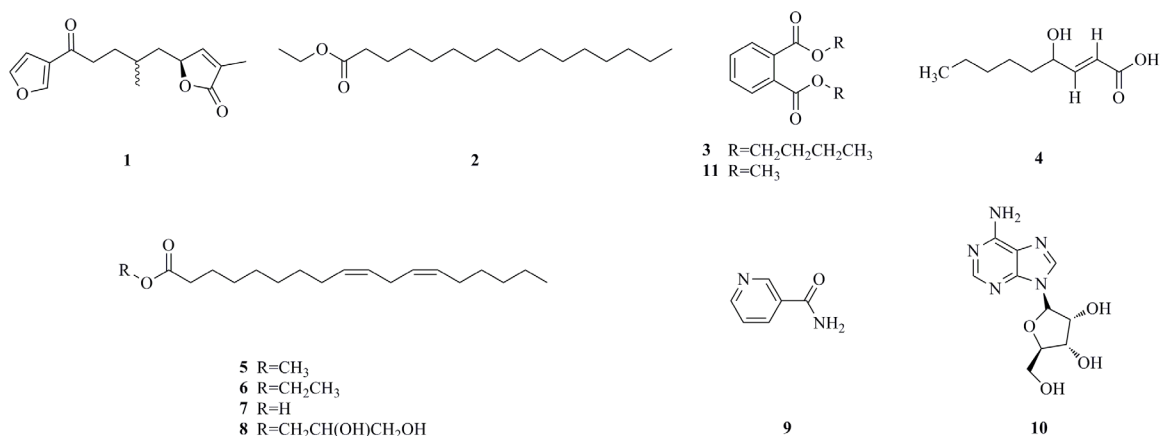


图 1 化合物 1~11 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—11

## 1 仪器与材料

Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (美国戴安公司); LC-2010 型高效液相色谱仪 (北京清华科技有限公司); 分析型色谱柱 YMC-Pack ODA-A (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 日本 YMC 公

司); 半制备型色谱柱 Daisogel-10 $\mu$ -100A (250 mm $\times$ 10 mm, 10  $\mu\text{m}$ , 日本 DAISO 公司); 半制备型色谱柱 Positilil ODS-P (250 mm $\times$ 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 北京英莱克科技发展有限公司); AV 400 型核磁共振波谱仪 (瑞士布鲁克公司); solariX 型 FT-ICR

MS/MRMS (德国布鲁克道尔顿公司); Acquity QDa 型质谱检测器 (美国 Waters 公司); Chirscan 型圆二色光谱仪 (英国应用光物理公司); GLH-100C 型恒温恒湿培养箱 (德国 BINDER 公司); Haier HR40-IIA2 型生物安全柜 (上海恒勤仪器设备有限公司); UV-5900 型紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); TOMY SX-700 型蒸汽灭菌器 (北京久航润达科技有限公司); 200~300、300~400 目正相柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶板 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工有限公司); HP-20 大孔吸附树脂 (日本三菱公司); 色谱甲醇、色谱乙腈 (美国 TEDIA 公司); 石油醚、醋酸乙酯、甲醇、二氯甲烷、浓硫酸 (天津科密欧化学试剂有限公司); 正丁醇、无水乙醇 (国药集团);  $\alpha$ -萘酚 (天津市大茂化学试剂厂); Middlebrook 7H9 培养基 (美国 BD 公司); 甘油 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 聚山梨酯 80 (生工生物工程股份有限公司); DMSO、异烟肼、乙胺丁醇 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 利福平 (常州制药厂有限公司)。

药材于 2021 年 5 月购买自云南省, 经三峡大学生物与制药学院王玉兵教授鉴定为小毛茛 *R. ternatus* Thunb. 的干燥块根。标本 (RT20210001) 存放于三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室。

标准菌株牛型分枝杆菌 *M. bovis* BCG 由上海公共卫生临床中心提供。

## 2 提取与分离

猫爪草干燥块根 2.19 kg, 粉碎后加 95%乙醇 2.5 L, 冷浸提取 4 次, 每次 24 h, 合并提取液, 减压浓缩得浓缩液。浓缩液用水分散后, 依次用石油醚、醋酸乙酯及正丁醇各 1.5 L 萃取 4 次, 各部分萃取液减压浓缩至干, 得到石油醚萃取部位 (18.7 g), 醋酸乙酯萃取部位 (3.9 g) 及正丁醇萃取部位 (20.6 g)。

石油醚部位 (18.7 g) 经正相硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 石油醚-丙酮 (100:0→1:2) 梯度洗脱, 得到 122 个流分。TLC 及 HPLC 分析后, 合并 Fr. 66~71 (236.4 mg), 经半制备型 HPLC 分离纯化 (甲醇-水 47:53, 3 mL/min), 得到化合物 1 (2.2 mg,  $t_R=25.7$  min)。合并 Fr. 25~30 (R1, 4.6 g), 经正相硅胶柱色谱 (300~400 目) 进一步分离, 石油醚-醋酸乙酯 (50:1→1:1) 梯度洗脱, 得到 106 个流分, TLC 及 HPLC 分析后, 合并亚流分 Fr. R1-7~11 (143.2 mg), 经半制备 HPLC 分离纯化 (乙腈-水 73:27, 3 mL/min), 得到化合物 2 (6.4 mg,

$t_R=29.7$  min); 合并亚流分 Fr. R1-39~42 (401.4 mg), 经半制备 HPLC 分离纯化 (甲醇-水 66:34, 3 mL/min), 得到化合物 3 (4.5 mg,  $t_R=39.8$  min)。合并 Fr. 52~60 (R2, 2.9 g), 经正相硅胶柱色谱 (300~400 目) 进一步分离, 二氯甲烷-甲醇 (100:0→2:1) 梯度洗脱, 得到 96 个流分, TLC 及 HPLC 分析后, 合并亚流分 Fr. R2-67~73 (197.1 mg), 经半制备 HPLC 分离纯化 (乙腈-0.1%乙酸水 29:71, 3 mL/min), 得到化合物 4 (4.3 mg,  $t_R=21.9$  min)。

醋酸乙酯部位 (R3, 3.9 g) 经正相硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 石油醚-醋酸乙酯 (100:0→1:3) 梯度洗脱, 得到 200 个流分。TLC 及 HPLC 分析后, 合并 Fr. R3-33~40 (176.5 mg), 经半制备 HPLC 分离纯化 (乙腈-水 79:21, 3 mL/min), 得到化合物 5 (11.6 mg,  $t_R=67.5$  min) 和 6 (17.6 mg,  $t_R=80.2$  min); 合并 Fr. R3-79~80 (115.3 mg), 经半制备 HPLC 分离纯化 (乙腈-水 75:25, 3 mL/min), 得到化合物 7 (48.4 mg,  $t_R=38.8$  min); 合并 Fr. R3-135~148 (65.7 mg), 经半制备 HPLC 分离纯化 (乙腈-水 65:35, 3 mL/min), 得到化合物 8 (13.5 mg,  $t_R=57.4$  min)。

正丁醇部位 (R4, 20.6 g) 经 HP-20 大孔吸附树脂柱色谱分离, 水洗脱至 Molish 试剂对洗脱液无紫环反应, 后续以 (30%、60%、100%) 乙醇-水梯度洗脱, 得到 26 个流分。经 TLC 及 HPLC 分析后, 合并 Fr. R4-5~6 (583.2 mg), 经半制备 HPLC 分离纯化 (甲醇-0.1%乙酸水 4:96, 3 mL/min), 得到化合物 9 (2.9 mg,  $t_R=17.2$  min) 和 10 (21.6 mg,  $t_R=62.6$  min); 合并 Fr. R4-20~26 (313.3 mg), 经半制备 HPLC 分离纯化 (甲醇-0.1%乙酸水 28:72, 3 mL/min), 得到化合物 11 (4.9 mg,  $t_R=37.2$  min)。

## 3 结构鉴定

化合物 1: 淡黄色油状物, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰  $m/z$ : 263.127 7 [M+H]<sup>+</sup> (理论值 263.127 8); 285.109 7 [M+Na]<sup>+</sup> (理论值 285.109 7); 547.230 1 [2M+Na]<sup>+</sup> (理论值 547.230 2), 由此可知, 化合物 1 的分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>, 不饱和度为 7。从碳谱和氢谱数据 (表 1) 可知, 化合物含有 3 个碳碳双键和 2 个羰基碳, 由此推测, 该化合物含有 2 个环系。

结合 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 和 HSQC 谱可知, 该化合物有 2 个 CH<sub>3</sub>, 3 个 CH<sub>2</sub>, 6 个 CH 以及 4 个季碳。<sup>1</sup>H-NMR 谱中, 低场区给出 5 个质子信号  $\delta_H$  8.05 (1H, brs, H-4), 7.45 (1H, t,  $J=1.6$  Hz, H-1), 7.04 (1H,

表1 化合物1的核磁数据 (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
Table 1 NMR data of compound 1 (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

碳位	$\delta_C$	$\delta_H$
1	144.4	7.45 (1H, t, $J = 1.6$ Hz)
2	108.8	6.76 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)
3	127.8	
4	147.2	8.05 (1H, brs)
5	195.0	
6	37.9	2.77 (1H, t, $J = 7.2$ Hz) 2.77 (1H, t, $J = 7.2$ Hz)
7a	30.7	1.88 (1H, m)
7b		1.57 (1H, m)
8	30.0	1.78 (1H, m)
9	20.1	1.02 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)
10a	40.9	1.64 (1H, m)
10b		1.52 (1H, m)
11	79.7	4.98 (1H, m)
12	149.1	7.04 (1H, t, $J = 1.6$ Hz)
13	130.0	
14	174.4	
15	10.8	1.92 (3H, t, $J = 1.6$ Hz)

的质子；高场区在  $\delta_H$  2.77 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H<sub>2</sub>-6), 1.88 (1H, m, H-7a), 1.78 (1H, m, H-8), 1.64 (1H, m, H-10a), 1.57 (1H, m, H-7b) 和 1.52 (1H, m, H-10b) 处给出 6 个连在脂肪碳上的质子信号；在  $\delta_H$  1.92 (3H, t,  $J = 1.6$  Hz, Me-15) 处给出 1 个连在烯碳上的甲基质子信号和  $\delta_H$  1.02 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, Me-9) 处 1 个连在次甲基上的甲基质子信号。

<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 谱 (图 2) 中,  $\delta_H$  7.45 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, H-1) 和 6.76 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2) 存在明显相关;  $\delta_H$  2.77 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H<sub>2</sub>-6) 和 1.88 (1H, m, H-7a) 以及 1.57 (1H, m, H-7b) 存在明显相关;  $\delta_H$  1.78 (1H, m, H-8) 和 1.57 (1H, m, H-7b), 1.52 (1H, m, H-10b), 1.02 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, Me-9) 均存在明显相关;  $\delta_H$  1.52 (1H, m, H-10b) 和 4.98 (1H, m, H-11) 存在明显相关;  $\delta_H$  4.98 (1H, m, H-11) 和 7.04 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, H-12) 存在明显相关。HMBC 谱 (图 2) 中  $\delta_H$  8.05 (1H, brs, H-4) 和  $\delta_C$  144.4 (C-1), 127.8 (C-3), 108.8 (C-2) 存在明显相关;  $\delta_H$  7.45 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, H-1) 和  $\delta_C$  147.2 (C-4), 127.8 (C-3), 108.8 (C-2) 存在明显相关;  $\delta_H$  6.76 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2) 和  $\delta_C$  144.4 (C-1), 147.2 (C-4) 存在明显相关, 提示分子中存在呋喃环单元; HMBC 谱 (图 2) 中  $\delta_H$  7.04 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, H-12) 和  $\delta_C$  79.7 (C-11) 存在明显相关;  $\delta_H$  2.77 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H<sub>2</sub>-6) 和  $\delta_C$

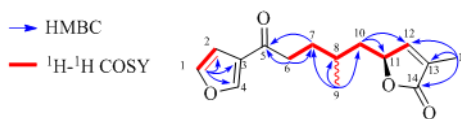


图2 化合物1的主要 HMBC 和 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 相关  
Fig. 2 Key HMBC and <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY correlations of compound 1

t,  $J = 1.6$  Hz, H-12), 6.76 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2) 和 4.98 (1H, m, H-11), 推测为连在烯碳或者连氧碳上 195.0 (C-5), 30.7 (C-7) 存在明显相关;  $\delta_H$  1.92 (3H, t,  $J = 1.6$  Hz, Me-15) 和  $\delta_C$  174.4 (C-14), 149.1 (C-12), 130.0 (C-13) 存在明显相关, 提示该甲基连在 C-13 位;  $\delta_H$  1.02 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, Me-9) 和  $\delta_C$  40.9 (C-10), 30.7 (C-7), 30.0 (C-8) 存在明显相关, 提示该甲基连在 C-8 位;  $\delta_H$  1.64 (1H, m, H-10a), 1.52 (1H, m, H-10b) 和  $\delta_C$  79.7 (C-11) 存在明显相关;  $\delta_H$  1.64 (1H, m, H-10a) 和  $\delta_C$  149.1 (C-12) 存在明显相关。NOESY 谱 (图 3) 中,  $\delta_H$  1.02 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, Me-9) 和  $\delta_H$  1.57 (1H, m, H-7b), 1.52 (1H, m, H-10b) 存在明显相关, 表明其位于同侧; 而  $\delta_H$  1.02 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, Me-9) 和  $\delta_H$  4.98 (1H, m, H-11) 没有明显相关, 表明其位于异侧。

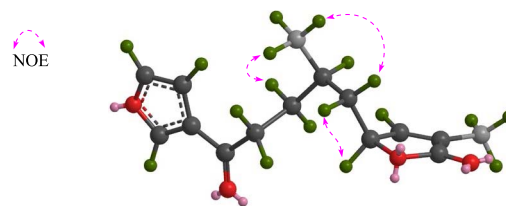


图3 化合物1的主要 NOESY 相关

Fig. 3 Key NOESY correlations of compound 1

化合物 1 的绝对构型通过圆二色散光谱 (circular dichroism, CD) 的量子化学计算所确定。黑色曲线部分为该化合物的实测 CD 曲线, 黑色虚线分别对应其 2 种互为镜像的立体构型的计算 CD 曲线。将实测 CD 曲线和计算 CD 曲线比对, 根据匹配度确定该化合物的绝对构型为 11*S* (图 4)。经 Sci-finder 检索, 化合物 1 为新化合物, 命名为猫爪草呋喃倍半萜 A (ranunculifuran A)。

化合物 2: 白色固体。HR-ESI-MS  $m/z$ : 285.278 8 [M + H]<sup>+</sup> (理论值 285.278 8), 确定分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>, 计算不饱和度为 1。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.88 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-16), 1.26 (27H, m, H-4~15, 18), 1.61 (2H, m, H-3), 2.29 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 4.13 (2H, dd,  $J = 14.0, 7.2$  Hz, H-17); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 14.3 (CH<sub>3</sub>), 14.4

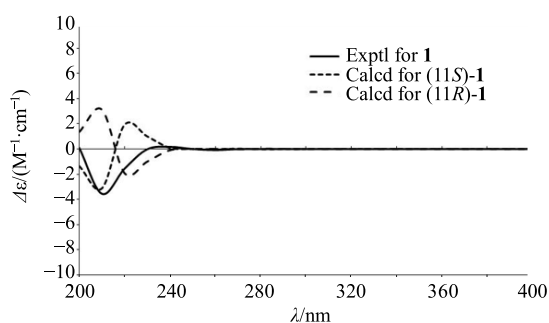


图4 化合物1的计算ECD曲线和实测ECD曲线

Fig. 4 Calculated and experimental ECD spectra of compound 1

(CH<sub>3</sub>), 22.8 (C-15), 25.1 (C-3), 29.3~29.8 (C-4~13), 32.1 (C-14), 34.6 (C-2), 60.3 (C-17), 174.1 (C-1)。以上数据与文献报道的数据基本一致<sup>[13]</sup>, 故鉴定化合物2为棕榈酸乙酯。

化合物3: 无色油状物。HR-ESI-MS *m/z*: 279.159 1 [M+H]<sup>+</sup> (理论值 279.159 1), 确定分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>, 计算不饱和度为6。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.96 (6H, t, *J* = 7.6 Hz, H-4'), 1.44 (4H, m, H-3'), 1.72 (4H, m, H-2'), 4.31 (4H, t, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 7.53 (2H, dd, *J* = 5.6, 3.6 Hz, H-1, 2), 7.72 (2H, dd, *J* = 5.6, 3.6 Hz, H-3, 6); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 13.9 (C-4'), 19.3 (C-3'), 30.7 (C-2'), 65.7 (C-1'), 129.0 (C-3, 6), 131.1 (C-4, 5), 132.5 (C-1, 2), 167.9 (C=O)。以上数据与文献报道的数据基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物3为 dibutyl phthalate。

化合物4: 无色油状物。ESI-MS *m/z*: 171.1 [M-H]<sup>-</sup> (理论值 171.1), 分子式 C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.89 (3H, t, *J* = 6.0 Hz, H-9), 1.29~1.47 (6H, m, H-6~8), 1.57 (2H, m, H-5), 4.31 (1H, s, H-4), 6.04 (1H, s, H-2), 6.99 (1H, m, H-3); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.2 (C-9), 22.7 (C-8), 25.1 (C-7), 31.8 (C-6), 36.6 (C-5), 71.2 (C-4), 120.2 (C-2), 152.1 (C-3), 171.5 (C-1)。以上数据与文献报道的数据基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物4为 *trans*-4-hydroxy-2-nonenic acid。

化合物5: 无色油状物。HR-ESI-MS *m/z*: 295.263 2 [M+H]<sup>+</sup> (理论值 295.263 2), 确定分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>, 计算不饱和度为3。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18), 1.25~1.39 (14H, m, H-4~7, 15~17), 1.63 (2H, m, H-3), 2.04 (4H, dd, *J* = 14.0, 7.2 Hz, H-8, 14), 2.30 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2), 2.77 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-11), 3.66

(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 5.29~5.40 (4H, m, H-9, 10, 12, 13); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.2 (C-18), 22.7 (C-17), 25.1 (C-3), 25.8 (C-11), 27.3 (C-8), 27.3 (C-14), 29.2 (C-6), 29.3 (C-5), 29.3 (C-4), 29.5 (C-15), 29.7 (C-7), 31.7 (C-16), 34.2 (C-2), 51.6 (C-OCH<sub>3</sub>), 128.0 (C-12), 128.2 (C-10), 130.2 (C-9), 130.4 (C-13), 174.5 (C-1)。以上数据与文献报道的数据基本一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物5为 methyl linoleate。

化合物6: 无色油状物。HR-ESI-MS *m/z*: 309.278 8 [M+H]<sup>+</sup> (理论值 309.278 8), 确定分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>, 计算不饱和度为3。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18), 1.25 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-20), 1.27~1.34 (14H, m, H-4~7, 15~17), 1.61 (2H, m, H-3), 2.04 (4H, dd, *J* = 14.0, 7.2 Hz, H-8, 14), 2.28 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2), 2.76 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-11), 4.11 (2H, dd, *J* = 14.0, 7.2 Hz, H-19), 5.35 (4H, m, H-9, 10, 12, 13); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.2 (C-18), 14.4 (C-20), 22.7 (C-17), 25.1 (C-16), 25.7 (C-6), 27.3 (C-7), 27.3 (C-15), 29.2 (C-8), 29.2 (C-14), 29.3 (C-5), 29.5 (C-11), 29.7 (C-4), 31.6 (C-3), 34.5 (C-2), 60.3 (C-19), 128.0 (C-10), 128.1 (C-12), 130.2 (C-9), 130.3 (C-13), 174.1 (C-1)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物6为 ethyl linoleate。

化合物7: 无色油状物。HR-ESI-MS *m/z*: 281.247 6 [M+H]<sup>+</sup> (理论值为 281.247 5), 确定分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, 计算不饱和度为3。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.89 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18), 1.25~1.39 (14H, m, H-4~7, 15~17), 1.65 (2H, m, H-3), 2.05 (4H, dd, *J* = 13.6, 6.8 Hz, H-8, 14), 2.35 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2), 2.77 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, H-11), 5.35 (4H, m, H-9, 10, 12, 13); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.2 (C-18), 22.7 (C-17), 24.8 (C-3), 25.8 (C-11), 27.3 (C-6), 27.3 (C-14), 29.2 (C-5), 29.2 (C-6), 29.3 (C-4), 29.5 (C-15), 29.7 (C-7), 31.7 (C-16), 34.2 (C-2), 128.0 (C-12), 128.2 (C-10), 130.1 (C-9), 130.3 (C-13), 180.7 (C-1)。以上数据与文献报道一致<sup>[18]</sup>, 故鉴定化合物7为 linoleic acid。

化合物8: 无色油状物。HR-ESI-MS *m/z*: 355.284 3 [M+H]<sup>+</sup> (理论值 355.284 3), 确定分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>, 计算不饱和度为3。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18), 1.26~1.36 (14H, m, H-4~7, 15~17), 1.62 (2H, m, H-3),

2.04 (4H, dd,  $J = 13.6, 6.8$  Hz, H-8, 14), 2.34 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 2.76 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-11), 3.59 (1H, dd,  $J = 11.6, 6.0$  Hz, H-3'b), 3.69 (1H, dd,  $J = 11.6, 4.0$  Hz, H-3'a), 3.91 (1H, m, H-2'), 4.11~4.20 (2H, m, H-1'), 5.28~5.41 (4H, m, H-9, 10, 12, 13);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 14.2 (C-18), 22.7 (C-17), 25.0 (C-3), 25.7 (C-11), 27.3 (C-8), 27.3 (C-14), 29.2 (C-6), 29.3 (C-5), 29.5 (C-4), 29.7 (C-15), 31.6 (C-16), 34.3 (C-2), 63.4 (C-3'), 65.3 (C-1'), 70.4 (C-2'), 128.0 (C-10), 128.2 (C-12), 130.1 (C-9), 130.4 (C-13), 174.5 (C-1)。以上数据与文献报道的数据基本一致<sup>[19]</sup>, 故鉴定化合物 **8** 为 1-*O*-(9*Z*,12*Z*-octadecadienoyl) glycerol。

化合物 **9**: 无色针状结晶 (甲醇)。ESI-MS  $m/z$ : 123.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (理论值 123.1), 分子式  $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.55 (1H, ddd,  $J = 8.0, 4.8, 0.8$  Hz, H-5), 8.29 (1H, dt,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-4), 8.69 (1H, dd,  $J = 4.8, 1.6$  Hz, H-6), 9.02 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 125.1 (C-5), 131.4 (C-3), 137.4 (C-4), 149.5 (C-2), 152.8 (C-6), 169.8 (C=O)。以上数据与文献报道的数据基本一致<sup>[20]</sup>, 故鉴定化合物 **9** 为烟酰胺。

化合物 **10**: 白色固体粉末。ESI-MS  $m/z$ : 268.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (理论值 268.1), 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3.61 (2H, m, H-5'), 3.96 (1H, m, H-4'), 4.14 (1H, m, H-3'), 4.59 (1H, m, H-2'), 5.88 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-1'), 8.14 (1H, s, H-2), 8.36 (1H, s, H-8);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 61.7 (C-5'), 70.6 (C-3'), 73.5 (C-2'), 85.9 (C-4'), 88.0 (C-1'), 119.3 (C-5), 140.0 (C-8), 149.1 (C-4), 152.4 (C-2), 156.1 (C-6)。以上数据与文献报道的数据基本一致<sup>[21]</sup>, 故鉴定化合物 **10** 为  $\beta$ -adenosine。

化合物 **11**: 淡黄色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 195.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (理论值 195.1), 分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.92 (6H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 7.55 (2H, dd,  $J = 6.0, 3.6$  Hz, H-3, 4), 7.73 (2H, dd,  $J = 6.0, 3.6$  Hz, H-2, 5);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 52.8 ( $-\text{OCH}_3$ ), 129.0 (C-3, 6), 131.3 (C-4, 5), 132.0 (C-1, 2), 168.2 (C=O)。以上数据与文献报道的数据基本一致<sup>[22]</sup>, 故鉴定化合物 **11** 为 dimethyl phthalate。

#### 4 体外抗结核杆菌活性

采用微量肉汤二倍稀释法考察猫爪草醇提取物石

油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取部位, 以及所有化合物对 *M. bovis* BCG 的抑制活性。试验菌株 *M. bovis* BCG 培养至对数生长期, 用培养物和培养基稀释成菌悬液供检测用。试验在 96 孔平底细胞培养板中进行, 设置空白、阳性对照、阴性对照和给药组, 各萃取部位、单体化合物和阳性对照药平行检测 3 次。加 200  $\mu\text{L}$  无菌蒸馏水到微板的外围孔中, 于第 2 列孔中加 200  $\mu\text{L}$  Middlebrook 7H9 肉汤, 继续向第 2 列孔中注入 2  $\mu\text{L}$  各化合物溶液、阳性药物 (利福平、异烟肼、乙胺丁醇)、阴性对照物 (DMSO), 剩余孔中都增补 100  $\mu\text{L}$  Middlebrook 7H9 肉汤, 留 1 行作空白对照, 不加任何物质只加培养基, 对每列进行系列二倍稀释, 100  $\mu\text{L}$  菌悬液加到所有检测孔中。被检测化合物溶液的最终质量浓度 200~0.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阳性药物质量浓度 50~0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。平板套上封闭的塑料袋在 37  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱中孵育 7~9 d, 而后观察浊度。无混浊现象的最低浓度定义为 MIC。

体外抗结核杆菌活性实验结果显示猫爪草醇提取物石油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取部位对牛型分枝杆菌 BCG 有不同程度的抑制活性, 其 MIC 分别为 200、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 化合物 **1**、**2**、**4**~**8** 和 **10** 对牛型分枝杆菌 BCG 有较弱抑制活性, 其 MIC 均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 阳性对照药利福平、异烟肼和乙胺丁醇的 MIC 分别为 0.2、0.4、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 5 讨论

猫爪草有机酸部位是其抗结核有效部位之一, 且猫爪草中有机酸的含量较高, 其中长链脂肪酸占大多数<sup>[23-25]</sup>。本研究从猫爪草中分离鉴定了 11 个化合物, 包括 1 个呋喃倍半萜、5 个长链有机酸类化合物、2 个邻苯二甲酸酯、2 个生物碱和 1 个非长链有机酸, 其中化合物 **1** 为新的呋喃倍半萜, 将其命名为猫爪草呋喃倍半萜 A; 化合物 **4**、**8**~**11** 均为首次从猫爪草中分离得到。

人型分枝杆菌 H37Rv、H37Ra 和牛型分枝杆菌 BCG 被广泛用作研究结核致病性机制的参比菌株<sup>[26]</sup>。本研究从猫爪草中分离鉴定的 5 个长链有机酸类化合物 (化合物 **2**、**5**~**8**) 和 1 个非长链有机酸 (化合物 **4**) 对牛型分枝杆菌 BCG 具有较弱抑制活性, 其 MIC 均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[27]</sup>。化合物 **2** 为棕榈酸的衍生物, 化合物 **5**~**8** 为亚油酸或其衍生物, 据报道, 亚油酸和棕榈酸对结核分枝杆菌 H37Rv 及 3 种多药耐药结核分枝杆菌菌株的 MIC 分别为 50~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 25~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[28-29]</sup>, 化合物 **2**、**5**~**8** 对结核

分枝杆菌 H37Rv 以及耐药结核分枝杆菌是否具有抑制活性, 其抗菌作用机制如何均有待进一步研究。

本研究成果丰富了猫爪草的化学成分多样性, 为猫爪草中抗结核杆菌活性先导化合物的发现提供了实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020 [R/OL]. [2022-10-27]. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>.
- [2] 黄华靖, 江洁怡, 肖观林, 等. 猫爪草的化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中药材, 2022, 45(3): 752-759.
- [3] Wang C L, Wang J Q, Gao M Z, et al. *Radix Ranunculi Ternati*: Review of its chemical constituents, pharmacology, quality control and clinical applications [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(7): 930-952.
- [4] 刘芊伊. 猫爪草醇类提取物对小鼠骨髓来源巨噬细胞极化的影响 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2018.
- [5] 熊英, 邓可众, 郭远强, 等. 猫爪草中黄酮类与萜类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1449-1452.
- [6] Xiong Y, Deng K Z, Gao W Y, et al. A novel alkenoic acid ester and a new benzophenone from *Ranunculus ternatus* [J]. *Chin Chem Lett*, 2007, 18(11): 1364-1366.
- [7] Deng K Z, Xiong Y, Zhou B, et al. Chemical constituents from the roots of *Ranunculus ternatus* and their inhibitory effects on *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 11859-11865.
- [8] Zhan Z L, Feng Z M, Yang Y N, et al. Ternatusine A, a new pyrrole derivative with an epoxyoxepino ring from *Ranunculus ternatus* [J]. *Org Lett*, 2013, 15(8): 1970-1973.
- [9] Feng Z M, Zhan Z L, Yang Y N, et al. New heterocyclic compounds from *Ranunculus ternatus* Thunb [J]. *Bioorg Chem*, 2017, 74: 10-14.
- [10] Zhang L, Li R Y, Li M Z, et al. *In vitro* and *in vivo* study of anti-tuberculosis effect of extracts isolated from *Ranunculi Ternati Radix* [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffus Lung Dis*, 2014, 31(4): 336-342.
- [11] 周勇, 程芳. 猫爪草对肺结核患者外周血淋巴细胞颗粒裂解肽表达及其T淋巴细胞杀菌能力的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(18): 1629-1632.
- [12] 夏露, 卢水华, 刘平. 中药对结核病免疫调控机制的研究进展 [J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(2): 168-172.
- [13] 熊英, 裴美燕, 章常华, 等. 猫爪草中的脂肪酸类化合物 [J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(3): 348-351.
- [14] Li J T, Yin B L, Liu Y, et al. Mono-aromatic constituents of *Dendrobium longicornu* [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45(2): 234-236.
- [15] Mu L H, Ju Q F, Liu P, et al. Chemical constituents of the roots of *Pottsia laxiflora* [J]. *Chem Nat Compd*, 2013, 48(6): 1004-1007.
- [16] He W J, Zhou X J, Qin X C, et al. Quinone/hydroquinone meroterpenoids with antitubercular and cytotoxic activities produced by the sponge-derived fungus *Gliomastix* sp. ZSDS1-F7 [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(5): 604-609.
- [17] Aidarhan N, Guoruoluo Y, Liu Z S, et al. Chemical constituents of the petroleum-ether fraction from seeds of *Saussurea involucrata* [J]. *Chem Nat Compd*, 2020, 56(2): 358-360.
- [18] Nakano H, Cantrell C L, Mamonov L K, et al. Echinopsacetylenes A and B, new thiophenes from *Echinops transiliensis* [J]. *Org Lett*, 2011, 13(23): 6228-6231.
- [19] Kim D G, Kang M J, Hong S S, et al. Antiinflammatory effects of functionally active compounds isolated from aged black garlic [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(1): 53-61.
- [20] 晁凌会, 彭治添, 任易, 等. 紫堇的化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1508-1512.
- [21] 旷敏, 彭伟伟, 许立, 等. 植物根际土壤真菌 *Trichoderma velutinum* 的化学成分研究 [J]. 中南药学, 2022, 20(9): 1975-1981.
- [22] Khusnutdinov R I, Shchadneva N A, Mayakova Y Y, et al. Methylation of mono- and dicarboxylic acids with dimethyl carbonate catalyzed with binder-free zeolite NaY [J]. *Russ J Org Chem*, 2017, 53(2): 163-168.
- [23] 池玉梅, 杨毅琴, 于生. 中药材猫爪草有机酸部位药效及组成的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(6): 365-367.
- [24] 何潇. 猫爪草多糖理化性质及抗肝损伤活性的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [25] 黄华靖, 江洁怡, 肖观林, 等. UPLC-Q-TOF-MS法分析猫爪草化学成分 [J]. 中成药, 2022, 44(7): 2405-2409.
- [26] Xiao G H, Zhang S, Zhang L, et al. Untargeted metabolomics analysis reveals *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv specifically induces tryptophan metabolism in human macrophages [J]. *BMC Microbiol*, 2022, 22(1): 249-258.
- [27] Gibbons S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents [J]. *Phytochem Rev*, 2005, 4(1): 63-78.
- [28] Choi W H. Evaluation of anti-tubercular activity of linolenic acid and conjugated-linoleic acid as effective inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(2): 125-129.
- [29] Sandoval-Montemayor N E, García A, Elizondo-Treviño E, et al. Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 11173-11184.

[责任编辑 王文倩]